



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

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
BIOLÓGICA PRESENTES EN LA ANÉMONA *Telmatactis panamensis***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA IVONNE GARCÍA QUEZADA

DIRECTORA 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. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)

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

PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, MARZO DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



POSGRADO EN
CIENCIAS DEL MAR Y
LIMNOLOGÍA



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

TESIS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
BIOLÓGICA PRESENTES EN LA ANÉMONA *Telmatactis panamensis***



QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

QUÍMICA ACUÁTICA

PRESENTA:

MARÍA IVONNE GARCÍA QUEZADA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTOR:

DR. ROBERTO A. ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS

DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ

DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA

DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, MARZO DE 2023

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por brindarme una educación de calidad y permitir continuar mi formación académica.

Al CONACyT por la beca concedida durante la realización del posgrado (CVU 1022731) y al proyecto PAPIIT-UNAM IN217420 por el financiamiento.

A la Dra. Judith Sánchez Rodríguez por brindarme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Toxinología de Cnidarios, por sus enseñanzas y apoyo incondicional que permitieron la realización del presente proyecto de investigación, por su dedicación y consejos durante mi tiempo en el posgrado. Y por siempre compartir su calidez, confianza y amistad.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Roberto Arreguín, el Dr. Manuel Aguilar, el Dr. Estuardo López y al Dr. Sergio Rodríguez por su retroalimentación continua, asesoría y tiempo dedicado durante el desarrollo del presente estudio.

A mis compañeras de laboratorio, Catalina Corona y Aleida Flores, por su ayuda en el trabajo experimental, por las pláticas tanto motivadoras como desalentadoras que hicieron más ameno y divertido el tiempo en el laboratorio y, principalmente, por brindarme su amistad.

Al M. C. Cristian Moisés Galván Villa por el apoyo en las salidas de campo para la recolección de los organismos.

A la M. C. Laura Celis por proporcionar el compendio bibliográfico.

A mi familia por ser el pilar fundamental en mi vida, por enseñarme el verdadero valor del amor, de la dedicación, la fortaleza y unidad. Por la constante motivación para mi crecimiento que me impulsó a hacer lo que me apasiona y por ser mi refugio lleno de paz. A mis sobrinos que alumbran mis días con su alegría y curiosidad.

A Carlos, mi compañero de vida. Por su apoyo durante los buceos, la colecta de los cangrejos en la playa y, además de otras tareas, los consejos brindados que fueron indispensables para este proyecto. Por aventurarse a la costa caribeña, acompañarme en esta travesía memorable y compartir la admiración hacia el océano. Por su paciencia, confianza y amor incondicional.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
I. INTRODUCCIÓN	7
II. ANTECEDENTES	9
2.1 Compuestos activos de organismos marinos	9
2.2 Phylum Cnidaria	13
2.2.1 Cnidocitos y toxinas	13
2.2.2 Compuestos activos de cnidarios	15
2.3 Orden Actiniaria	16
2.3.1 Citolisinas	18
2.3.2 Neurotoxinas	21
2.4 Cáncer	22
2.4.1 Compuestos antitumorales de cnidarios	24
2.5 <i>Telmatactis panamensis</i>	25
III. JUSTIFICACIÓN	28
IV. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos particulares	29
V. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	29
VI. HIPÓTESIS	29
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	30
7.1 Obtención de las muestras biológicas	30
7.2 Obtención del extracto crudo	30
7.3 Cuantificación de proteínas	31
7.4 Fraccionamiento mediante cromatografía de líquidos de baja presión	31
7.5 Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE	32
7.6 Ensayos de actividad biológica	33
7.6.1 Ensayo <i>in vivo</i> de toxicidad	33

7.6.2	Actividad de fosfolipasas	33
7.6.3	Actividad de fosfolipasa A ₂ secretora (sPLA ₂)	34
7.6.4	Actividad hemolítica	35
7.6.5	Citotoxicidad en líneas celulares	36
7.6.5.1	Cultivo celular	36
7.6.5.2	Citotoxicidad del extracto y fracciones	37
7.6.5.3	Evaluación de la viabilidad celular	37
7.7	Análisis estadístico	38
VIII.	RESULTADOS	39
8.1	Colecta de muestras biológicas	39
8.2	Obtención del extracto crudo	39
8.3	Cuantificación de proteínas	40
8.4	Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE	42
8.5	Ensayos de actividad biológica del extracto crudo	43
8.5.1	Ensayo <i>in vivo</i> de toxicidad	43
8.5.2	Actividad de fosfolipasas	44
8.5.3	Actividad de fosfolipasa A ₂ secretora.....	45
8.5.4	Actividad hemolítica	45
8.5.5	Citotoxicidad en línea celulares tumorales	46
8.6	Fraccionamiento mediante cromatografía de líquidos de baja presión	51
8.6.1	Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE	52
8.6.2	Ensayos de actividad biológica de las fracciones	53
8.6.2.1	Ensayo <i>in vivo</i> de toxicidad	53
8.6.2.2	Actividad de fosfolipasas	55
8.6.2.3	Actividad de fosfolipasa A ₂ secretora	55
8.6.2.4	Actividad hemolítica	56
8.6.2.5	Citotoxicidad en líneas celulares tumorales	57
IX.	DISCUSIÓN	60
9.1	Obtención del extracto crudo	60
9.2	Separación por cromatografía de filtración en gel	61
9.3	Electroforesis SDS-PAGE	63

9.4 Ensayos de actividad biológica	64
9.4.1 Ensayo <i>in vivo</i> de toxicidad	64
9.4.2 Actividad de fosfolipasas A ₂	65
9.4.3 Actividad hemolítica	67
9.4.4 Citotoxicidad en líneas celulares tumorales	69
X. CONCLUSIONES	73
XI. REFERENCIAS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Línea de tiempo respecto a la aprobación sucesiva de los fármacos de origen marino utilizados actualmente. Se muestra la estructura química de los compuestos y su fuente marina.....	12
Figura 2. Anémona <i>Telmatactis panamensis</i>	26
Figura 3. Ubicación del sitio de recolecta de los organismos para el estudio	30
Figura 4. Ejemplar de la anémona <i>T. panamensis</i> identificado en la colecta	39
Figura 5. Tipos de cnidocistos presentes en la anémona <i>T. panamensis</i>	41
Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE al 16% de acrilamida del extracto crudo de <i>T. panamensis</i>	42
Figura 7. Disección de cangrejos <i>Ocypode quadrata</i> inyectados con extracto crudo de <i>T. panamensis</i>	44
Figura 8. Actividad enzimática de fosfolipasas A del extracto crudo de <i>T. panamensis</i> respecto al tiempo	44
Figura 9. Actividad hemolítica del extracto crudo de <i>T. panamensis</i> sobre eritrocitos humanos.....	45
Figura 10. Efecto del extracto crudo de <i>T. panamensis</i> en la viabilidad celular de (A) cáncer de mama MCF-7, (B) células de mama normales Hs 578Bst, y (C) glioma de rata C6.....	47
Figura 11. Cambios morfológicos en distintas líneas celulares después de 48 h de exposición con el extracto crudo de <i>T. panamensis</i>	48
Figura 12. Efecto del extracto crudo de <i>T. panamensis</i> en la viabilidad celular de (A) cáncer de mama MCF-7, (B) células de mama normales Hs 578Bst, y (C) glioma de rata C6.....	50
Figura 13. Cromatograma de filtración en gel Sephadex G-50 M del extracto crudo de <i>T. panamensis</i>	51
Figura 14. Electroforesis SDS-PAGE al 16% de acrilamida de las fracciones prepurificadas de <i>T. panamensis</i>	53

Figura 15. Disección de cangrejos <i>O. quadrata</i> inyectados con fracciones prepurificadas del extracto crudo de <i>T. panamensis</i>	54
Figura 16. Actividad enzimática de fosfolipasas A de fracciones prepurificadas del extracto crudo de <i>T. panamensis</i> respecto al tiempo	55
Figura 17. Actividad hemolítica de las fracciones prepurificadas de <i>T. panamensis</i> sobre eritrocitos humanos	56
Figura 18. Efecto de las fracciones de <i>T. panamensis</i> en la viabilidad celular de líneas celulares tumorales	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medicamentos de origen marino comercialmente disponibles y en desarrollo farmacológico.....	11
Tabla 2. Registro de colecta de <i>Telmatactis panamensis</i>	39
Tabla 3. Rendimiento del extracto crudo de <i>T. panamensis</i> respecto al peso húmedo (PH) y la cantidad de proteína	40
Tabla 4. Características de los cangrejos <i>Ocypode quadrata</i> inyectados con extracto crudo	43
Tabla 5. Efectos inducidos en los cangrejos tras la inyección de EC	43
Tabla 6. Actividad de sPLA ₂ del extracto crudo de <i>T. panamensis</i>	45
Tabla 7. Peso seco, rendimiento y concentración de proteína de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel del extracto crudo de <i>T. panamensis</i>	52
Tabla 8. Características y respuestas de los cangrejos tras la inyección de las fracciones prepurificadas	54
Tabla 9. Actividad de sPLA ₂ de las fracciones prepurificadas de <i>T. panamensis</i>	56
Tabla 10. Viabilidad de distintas líneas celulares tratadas con extracto crudo y fracciones prepurificadas de <i>T. panamensis</i> por 24 y 48 horas a una concentración de 500 µg/mL.....	58
Tabla 11. Viabilidad de distintas líneas celulares tratadas con extracto crudo y fracciones prepurificadas de <i>T. panamensis</i> por 24 y 48 horas a una concentración de 500 µg/mL.....	58

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASIC	Acid sensing ion channel
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Albúmina de suero bovino
CV	Cristal violeta
DTNB	5,5' ditio-bis- (ácido-2-nitrobenzoico)
EC	Extracto crudo
EMEM	Medio mínimo esencial de Eagle
F	Fracciones de <i>Telmatactis panamensis</i>
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Administración de Fármacos y Alimentos
HA	Actividad hemolítica
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IC ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
IT	Inmunotoxinas
MACPF	Complejo de ataque a membrana/perforina
MW	Marcador de peso molecular
<i>O. quadrata</i>	<i>Ocyprade quadrata</i>
PBS	Tampón fosfato salino
PFT	Toxinas formadoras de poros
PLA ₂	Fosfolipasa tipo A ₂
PM	Peso molecular
PNM	Productos naturales marinos
Pz	Actividad enzimática
Rf	Distancia de migración relativa
RN	Rojo neutro
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
sPLA ₂	Fosfolipasa A ₂ secretora

<i>T. panamensis</i>	<i>Telmatactis panamensis</i>
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TRP	Receptores de potencial transitorio
UH ₅₀	Unidad hemolítica al 50%
VC	Viabilidad celular

RESUMEN

El medio marino proporciona moléculas activas con una amplia diversidad y complejidad química, las cuales han sido de gran interés en el campo de la farmacología. Entre los organismos marinos, las anémonas producen múltiples toxinas biológicamente complejas para la autodefensa contra los depredadores, así como para la depredación y la competencia. Por lo tanto, se han considerado como una fuente de compuestos bioactivos con propiedades farmacológicas importantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad biológica del extracto crudo y de las fracciones prepurificadas de la anémona *Telmatactis panamensis* para probar sus propiedades citolíticas, enzimáticas y citotóxicas. Los organismos se colectaron en la playa Club de Yates, Manzanillo, Colima, mediante buceo. El extracto crudo (EC) se obtuvo por ciclos de agitación-congelación, seguido de sonicación y, por último se liofilizó. La purificación parcial del EC se realizó por cromatografía de filtración en gel y se obtuvieron cinco fracciones (F1-F5).

Al evaluar la actividad tóxica del extracto crudo y fracciones prepurificadas en cangrejos *Ocypode quadrata*, se demostraron las propiedades citolíticas del EC y las F1-F4. La actividad de fosfolipasas A₂ se evidenció en el EC y las fracciones F1-F3. Específicamente, el EC mostró una mayor actividad enzimática inducida por fosfolipasas secretoras (sPLA₂), mientras que las fracciones presentaron valores enzimáticos bajos comparados con el veneno de abeja. En el ensayo hemolítico, el EC y las F3-F4 causaron una actividad hemolítica dependiente de la concentración en eritrocitos humanos y presentaron una UH₅₀ de 85.42, 132 y 120 µg/mL, respectivamente. El EC y algunas fracciones prepurificadas exhibieron un efecto citotóxico frente a las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y glioma de rata C6. El EC indujo una respuesta dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, disminuyendo la viabilidad de las células C6 entre 38.76±1.90% con concentraciones de 50–500 µg/mL a las 24 h y entre 11.81±0.73% a las 48 h. La disminución obtenida en las células MCF-7 fue entre 61.71±20% y 12.07±0.61% a las 24 y 48 h, respectivamente. La F1 provocó la mayor actividad citotóxica en la línea celular C6, seguida de la F3 y la F2. Las células MCF-7 mostraron una menor sensibilidad frente a las fracciones, únicamente la F3 redujo la viabilidad hasta un 50%. Tanto el EC y las fracciones prepurificadas presentaron baja o nula citotoxicidad en la línea celular de mama normal Hs 578Bst; por lo tanto, se sugiere que presentan selectividad ante las células de cáncer de mama respecto a las células normales.

Los resultados respaldan que la anémona *T. panamensis* representa una fuente potencial para el descubrimiento de sustancias biológicamente activas contra líneas celulares tumorales. La purificación subsecuente y la evaluación adicional de las fracciones activas son necesarias para determinar las moléculas con actividad antitumoral y sus mecanismos de acción.

Palabras clave: Cnidaria, toxinas, citotoxicidad, viabilidad celular, selectividad, cáncer

ABSTRACT

The marine environment provides active molecules with a wide diversity and chemical complexity, which have been of great interest in the pharmacology field. Among marine organisms, sea anemones produce multiple biologically complex toxins for self-defense against predators, as well as for predation and competition. Therefore, they have been considered as a source of bioactive compounds with important pharmacological properties. The aim of this study was to evaluate the biological activity of the crude extract from the sea anemone *Telmatactis panamensis* and derived fractions to test their cytolytic, enzymatic and cytotoxic properties. The organisms were collected by diving at Club de Yates beach, Manzanillo, Colima. The crude extract (CE) was obtained by shaking-freezing cycles, followed by sonication, and finally was lyophilized. Partial purification of EC was performed by gel filtration chromatography and five fractions (F1-F5) were obtained.

The cytolytic properties of the CE and F1-F4 were demonstrated by evaluating their toxic activity in *Ocypode quadrata* crabs. The phospholipases A₂ activity was evidenced in the CE and F1-F3. Specifically, CE showed higher enzymatic activity induced by secretory phospholipases (sPLA₂), while fractions presented low enzymatic values compared to the bee venom. In the hemolytic assay, CE and F3-F4 caused a concentration-dependent hemolytic activity in human erythrocytes with a HU₅₀ of 85.42, 132 and 120 µg/mL, respectively. The CE and some prepurified fractions exhibited a cytotoxic effect against the MCF-7 breast cancer and C6 rat glioma cell lines. CE induced a response dependent on concentration and exposure time, reducing the viability of C6 cells between 38.76±1.90% with concentrations of 50–500 µg/mL at 24 h and 11.81±0.73% at 48 h. In MCF-7 cells, CE decreased the viability between 61.71±20% and 12.07±0.61% at 24 and 48 h, respectively. F1 provoked the highest cytotoxic activity in the C6 cell line, followed by F3 and F2. A lower sensitivity towards fractions were shown in the MCF-7 cells, only F3 reduced the viability up to 50%. Both the CE and the prepurified fractions displayed low or no cytotoxicity in the normal breast cell line Hs 578Bst; therefore, it is suggested that they present selectivity towards breast cancer cells with respect to normal cells.

The results support that the *T. panamensis* represents a potential source for the discovery of biologically active substances against tumor cell lines. Subsequent purification and further

evaluation of the active fractions are necessary to determine the molecules with antitumor activity and their mechanisms of action.

Keywords: Cnidaria, toxins, cytotoxicity, cell viability, selectivity, cancer

I. INTRODUCCIÓN

El resurgimiento del descubrimiento de fármacos iniciado en los últimos años por los productos naturales está ligado a la exploración de diversos ecosistemas, entre ellos el ambiente marino, el cual representa un recurso con una alta diversidad biológica abarcando aproximadamente el 50% de la biodiversidad global total; por ende, es considerado como una fuente prolífica de moléculas activas. Sin embargo, las fuentes marinas se encuentran escasamente exploradas en comparación con las de procedencia terrestre y sólo se ha analizado la composición química del 1% de las especies marinas registradas (Avila & Angulo-Preckler, 2021). Con el progreso de las técnicas de recolección de muestras (p. ej., buceo y exploración de aguas profundas), separación de compuestos (p. ej., HPLC) y determinación de estructuras (p. ej., espectroscopia de RMN y cristalografía de rayos X), el estudio de la química de productos naturales marinos (PNM) se ha desarrollado aceleradamente en los últimos años (Lyu *et al.*, 2021).

A lo largo de la evolución, los organismos marinos han desarrollado adaptaciones químicas complejas para defenderse como resultado de una intensa competencia en su entorno hostil (Simmons *et al.*, 2005). Por lo tanto, las presiones ambientales como la necesidad por el espacio, los nutrientes, la luz y la autodefensa han llevado a la producción de compuestos estructuralmente diversos con actividades biológicas y ecológicas específicas, los cuales les proporcionan una ventaja selectiva para su sobrevivencia (Datta *et al.*, 2015). Dado que la mayoría de los metabolitos secundarios se liberan directamente en el agua, la concentración de compuestos se diluye rápidamente a través de procesos de difusión y, por lo tanto, estos deben tener una mayor potencia para tener un efecto de largo alcance; en consecuencia, cuentan con una diversidad y complejidad tanto química como estructural, una mayor incidencia de bioactividad y especificidad (Petersen *et al.*, 2020). Debido a dichas características, los PNM han sido el foco de una intensa actividad de investigación que ha evidenciado propiedades biológicas relevantes, como anticancerígenas, antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes, anticoagulantes, antidiabéticas, antiincrustantes, analgésicas, neuroprotectoras y cardioprotectoras (Mayer *et al.*, 2022).

Un grupo de interés para la búsqueda de compuestos bioactivos son los cnidarios (Phylum Cnidaria) debido a que son productores conocidos de toxinas, las cuales se encuentran contenidas en cápsulas de naturaleza proteica llamadas nematocistos, estructuras especializadas capaces de inyectar una mezcla compleja de sustancias activas a las presas y depredadores desencadenando

una serie de reacciones tóxicas e inmunológicas en ellos (Jouiaei *et al.*, 2015). Debido a su toxicidad, el grupo Cnidaria se ha indicado durante mucho tiempo como una fuente preeminente de compuestos bioactivos naturales útiles para desarrollar agentes terapéuticos para el tratamiento de picaduras y enfermedades (Mariottini & Pane, 2013). Específicamente, su potencial se demuestra por el número notable de moléculas activas obtenidas a partir de estos organismos, siendo el segundo grupo con mayor número de compuestos bioactivos aislados, antecedido sólo por el Phylum Porifera (Blunt *et al.*, 2017).

En particular, las anémonas al ser animales sésiles han desarrollado a lo largo de la evolución mecanismos químicos específicos para las complejas interacciones en las que participan en el medio marino (Aneiros & Garateix, 2004). Se ha demostrado que los venenos de anémonas son una mezcla compleja de proteínas, péptidos y compuestos no proteicos. Los componentes principales se agrupan tradicionalmente en cuatro tipos funcionales: (1) fosfolipasas A₂ que degradan los fosfolípidos de membrana de las células neuronales y musculares, causando daño nervioso e inflamación muscular; (2) citolisinas que actúan sobre las membranas celulares y causan lisis celular; (3) neurotoxinas que interactúan con receptores y canales iónicos dependientes de voltaje y de ligando, alterando así la transmisión neural y provocando parálisis; (4) compuestos no proteicos (p. ej., purinas, aminas biogénicas, serotonina e histamina) que inducen dolor durante el envenenamiento (Madio *et al.*, 2019). Estos componentes muestran una gran diversidad estructural y una amplia gama de actividades biológicas, entre las cuales se destaca la actividad antitumoral, hemolítica, antimicrobiana, neurotóxica y antiparasitaria, entre otras. Por lo tanto, sus toxinas podrían ofrecer una herramienta para estudiar la fisiología celular y proporcionar agentes farmacológicos activos para el tratamiento de distintas enfermedades, como el cáncer, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, infecciosas, inflamatorias, inmunológicas, trastornos del sistema nervioso y para el desarrollo de analgésicos (Frazão *et al.*, 2012).

II. ANTECEDENTES

2.1 Compuestos activos de organismos marinos

Los productos naturales y sus estructuras moleculares juegan un papel importante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos (Lyu *et al.*, 2021), con aproximadamente dos tercios de los medicamentos aprobados actualmente que contienen productos naturales o sus derivados (Newman & Cragg, 2020). Particularmente, las fuentes naturales resultan adecuadas para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas; por lo tanto, el medio marino se ha vuelto un foco de exploración debido a que albergan una gran variedad de organismos que difieren en su fisiología y capacidad de adaptación lo cual modula la producción de tales moléculas, ya sea a través de sus propias vías biosintéticas, el secuestro de su dieta o por microbios simbióticos endo y epífitos (Martins *et al.*, 2014).

Aproximadamente el 70% de la superficie de la Tierra está cubierta por océanos, albergando una gran cantidad de recursos biológicos inexplorados. Las variaciones extremas de presión, salinidad, temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes y luz del océano conllevan a que los metabolitos secundarios de los organismos marinos presenten una amplia diversidad química y biológica (Montaser & Luesch, 2011), pertenecientes a diferentes familias como esteroides, isoprenoides, alcaloides, terpenoides, péptidos, polisacáridos, antraquinonas y policétidos. Además, la mayoría de los compuestos aislados también han mostrado propiedades antibióticas, antivirales, anticancerígenas, antiparasitarias, antioxidantes, antiinflamatorias o inmunomodulatorias (Petersen *et al.*, 2020). De igual manera, presentan varias ventajas en comparación con los compuestos no naturales, como alta diversidad química, especificidad bioquímica, menor incidencia de efectos secundarios, eficiencia de unión y propensión a interactuar con objetivos biológicos, lo que aumenta la importancia del descubrimiento de fármacos naturales de origen marino (Martins *et al.*, 2014).

El descubrimiento e identificación de los dos nucleósidos espongotimidina y espongouridina a principios de la década de 1950 de la esponja marina del Caribe *Cryptotethia crypta* pautó el inicio del campo de la bioquímica de productos naturales marinos (Figura 1) (Bergmann & Feeney, 1950; Lyu *et al.*, 2021). A lo largo de cinco décadas de mejoras técnicas y de investigación sostenida, se han identificado 39,472 compuestos marinos, y entre 1,000-1,500

son reportados cada año. Es decir, aproximadamente el 10% de los 400,000 productos naturales descritos hasta la fecha proceden de una paleta diversa de fuentes biológicas marinas, incluidos organismos procarióticos (eubacterias y cianobacterias) y eucarióticos (hongos, dinoflagelados, algas, esponjas, cnidarios, briozoos, moluscos, ascidias y equinodermos). Las principales fuentes de PNM en términos de cantidad y diversidad estructural incluyen a las esponjas (poríferos) y los cnidarios (principalmente corales y anémonas) para los invertebrados, así como los hongos marinos y los actinomicetos para los microorganismos (Sigwart *et al.*, 2021; <https://marinlit.rsc.org/>(acceso 02 Dic 2022)).

A pesar de la basta cantidad de compuestos marinos identificados, sólo un número limitado ha tenido aplicación farmacológica de modo que se encuentran comercialmente disponibles o en fases clínicas en desarrollo. Actualmente existen diecisiete medicamentos de origen marino aprobados por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA), entre ellos, Cytosar-U[®], Vira-A[®], Prialt[®], Yondelis[®], Halaven[®] y Adcetris[®], para el tratamiento principalmente de cáncer, enfermedades virales y como analgésicos. Sus principales características se recopilan en la Tabla 1 mientras que, la Figura 1 muestra una cronología de su descubrimiento, su estructura química y su fuente de origen marino. Muchos otros compuestos se encuentran todavía en fases clínicas para su evaluación (Mayer *et al.*, 2010; de la Torre & Albericio, 2021). Únicamente una toxina de origen proteico, denominada dalazatide, aislada de un representante del grupo Cnidaria de la anémona *Stichodactyla helianthus*, se encuentra en fases clínicas con resultados prometedores para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la psoriasis (Tarcha *et al.*, 2017).

Tabla 1. Medicamentos de origen marino comercialmente disponibles y en desarrollo farmacológico junto con su nombre comercial, clase química, estado clínico, fuente de origen e indicación terapéutica.

Compuesto	Marca comercial	Clase química	Estado clínico	Organismo marino	Tipo de enfermedad
Tisotumab vedontin-tftv	TIVDAK™	Anticuerpo		Molusco	Cáncer
Disitamab vedotin ¹	Aidixi™	Anticuerpo		Molusco	Cáncer
Belantamab mafodotin	Blenrep™	Anticuerpo		Molusco	Cáncer
Lurbinectedina	Zepzelca™	Alcaloide		Tunicado	Cáncer
Enfortumab vedotin	PADCEV™	Anticuerpo		Molusco	Cáncer
Polatuzumab vedotin	Polivy™	Anticuerpo		Molusco	Cáncer
Plitidepsina ²	Aplidin®	Depsipéptido	Aprobado	Tunicado	Cáncer
Panobinostat	Farydak®	AH*	por FDA	Esponja	Cáncer
Trabectedina	Yondelis®	Alcaloide		Tunicado	Cáncer
Brentuximab vedotin	Adcetris®	Anticuerpo		Molusco	Cáncer
Mesilato de eribulina	Halaven®	Macroclíclico		Esponja	Cáncer
Ácido omega-3-carboxílico	Epanova®	Ácido graso		Pez	HTG**
Etilo de icosapento	Vascepa®	Ácido graso		Pez	HTG
Ácido omega-3-éster etílico	Lovaza®	Ácido graso		Pez	HTG
Ziconotide	Prialt®	Péptido		Caracol cono	Dolor crónico
Vidarabina	Vira-A®	Nucleósido		Esponja	Antiviral
Citarabina	Cytosar-U®	Nucleósido		Esponja	Cáncer
Plitidepsina	N/A	Depsipéptido	Fase III	Tunicado	Coronavirus
Tetrodotoxina	Halneuron™	Alcaloide		Pez globo	Dolor crónico
ShK-186	Dalazatide	Péptido		Anémona	Autoinmunes
GTS-21	N/A	Alcaloide		Poliqueto	Esquizofrenia
PM1004	Zalypsis®	Alcaloide	Fase II	Nudibranquio	Cáncer
Plocabulin	N/A	Policétido		Esponja	Cáncer
SGN-LIV1A	N/A	Anticuerpo		Molusco	Cáncer
BA-3021	N/A	Anticuerpo		Esponja	Cáncer
Briostatina	N/A	Macrólido		Briozooario	Alzheimer

¹Aprobado en China ²Aprobado en Australia *Ácido hidroxámico **Hipertrigliceridemia

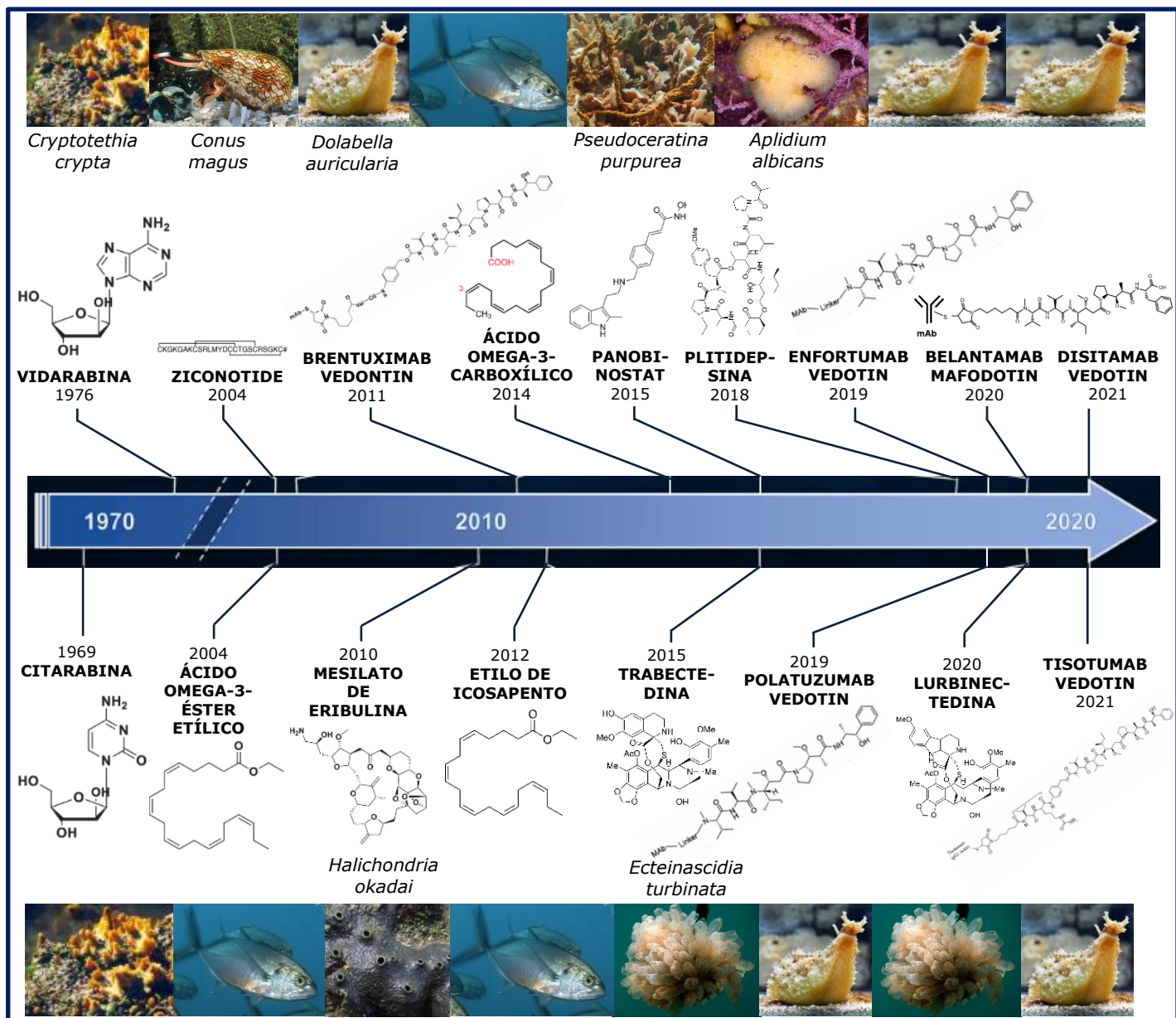


Figura 1. Línea de tiempo respecto a la aprobación sucesiva de los fármacos de origen marino utilizados actualmente. Se muestra la estructura química de los compuestos y su fuente marina. Modificado de Papon *et al.* (2022).

2.2 Phylum Cnidaria

El Phylum Cnidaria es el linaje de animales venenosos más antiguo conocido, surgió hace al menos 600 millones de años e incluye más de 12,000 especies que viven en hábitats acuáticos, la mayoría marinos. Se caracterizan principalmente por ser organismos con simetría radial, son diblásticos, es decir, tienen dos capas unicelulares, el endodermo y el ectodermo, separadas por la mesoglea (una matriz extracelular), cuentan con una sola cavidad del cuerpo llamada celénteron o cavidad gastrovascular con una única abertura que funciona como boca y ano, y se encuentra rodeada por un número variable de tentáculos. Muestran una diversidad morfológica significativa en su ciclo de vida dimórfico, ya que una sola especie puede mostrar una variedad de formas, ya sean pólipos sésiles, larvas plánula que nadan libremente o un medusoide pelágico. La mayoría son depredadores, pero ciertas especies pueden ser carroñeros, filtradores u obtienen sus nutrientes de algas unicelulares fotosintéticas, llamadas zooxantelas (Brusca & Brusca, 2003; Mille-Pagaza, 2011).

El Phylum Cnidaria incluye cinco clases principales: Hydrozoa (hidromedusas), Scyphozoa (medusas verdaderas), Cubozoa (cubomedusas), Staurozoa y Anthozoa (corales y anémonas). Los miembros de las clases Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa y Staurozoa muestran un ciclo de vida trifásico en transición de generaciones: una larva plánula que nada libremente, una etapa de pólipo sésil y una etapa de medusa pelágica sexual. En Anthozoa, la etapa de medusa se pierde y los adultos como pólipos sésiles representan la etapa de propagación sexual, pueden ser solitarios o formar colonias (Jouiaei *et al.*, 2015; D'Ambra & Lauritano, 2020).

2.2.1 Cnidocitos y toxinas

Los cnidarios al carecer de medios mecánicos para cazar desarrollaron a lo largo de su historia evolutiva mecanismos para alimentarse que les confirieron éxito ecológico, destacando principalmente la presencia de células especializadas denominados cnidocitos, caracterizados por albergar un complejo sistema organular formado por una matriz de aminoácidos secretada por el sistema de Golgi conocido como cnidae. Estos orgánulos específicos se sintetizan en células precursoras especializadas llamadas cnidoblastos. Después de su secreción desde el aparato de Golgi, la cnidae sufre más modificaciones estructurales en la matriz extracelular antes de migrar a la superficie del tentáculo (Beckmann & Ozbek, 2012).

Su estructura consiste en una cápsula con paredes de colágeno con un túbulo enrollado hueco en forma de hilo y con numerosas espinas, y la cual contiene a las toxinas. En la superficie se localiza un opérculo que cierra la cápsula y a un lado llevan una pequeña prolongación conocida como cnidocilo (Mariscal, 1974). Una combinación de estímulos mecánicos y químicos activan tal cnidocilo (actúa como mecanorreceptor) ocasionando que el hilo, que está envuelto dentro de la cápsula, sea empujado por presión osmótica fuera de la célula, y finalmente penetra e inyecta las toxinas en el organismo (Jouiaei *et al.*, 2015).

La clasificación de cnidocistos se basa en la forma del eje y el tipo y distribución de las espinas. Existen 28 tipos de cnidocistos morfológicamente distintos, que se dividen en tres subcategorías: nematocistos (25 tipos), espirocistos (2 tipos) y un tipo de pticosistos (Mariscal 1974). De estas tres subcategorías, solamente los nematocistos inyectan toxinas, se encuentran en todos los representantes de cnidarios y es el grupo más diverso morfológica y funcionalmente. Los espirocistos carecen de espinas, presentan una delgada cápsula de una sola pared, contienen sustancias higroscópicas adherentes que inmovilizan mecánicamente a la presa, y se encuentran en la mayoría de los anthozoos. Los pticosistos también carecen de espinas, son exclusivos de miembros de Ceritantharia y son utilizados para formar el tubo protector en el que viven las especies de este orden (Frazão *et al.*, 2012).

Las toxinas contenidas en los nematocistos están involucradas en diversas interacciones ecológicas, entre ellas, la depredación, defensa, digestión y competencia intraespecífica (Nevalainen *et al.*, 2004; Ashwood *et al.*, 2020). Esta diversidad ecológica se complementa con la diversidad funcional de las toxinas, que pueden incluir alrededor de 250 compuestos, lo cual refleja su gran complejidad toxicológica y su antigua historia evolutiva (Jouiaei *et al.*, 2015; Klompen *et al.*, 2020). Albergan principalmente una variedad de proteínas, entre ellas, actinoporinas (proteínas formadoras de poros), neurotoxinas (moduladores de canales iónicos), enzimas (fosfolipasas y metaloproteasas) junto con compuestos no proteínicos (purinas, aminos biogénicos, serotonina e histamina) (Jouiaei *et al.*, 2015), los cuales inducen la formación de poros o el estrés oxidativo en las células (Morabito *et al.*, 2012), afectan la permeabilidad de la membrana celular y el intercambio iónico o tienen actividad de fosfolipasas que comprometen la integridad celular (Mariottini & Pane, 2013).

2.2.2 Compuestos activos de cnidarios

Los estudios sobre las moléculas activas de cnidarios han ido incrementando en los últimos años y han evidenciado su amplia gama de actividades biológicas, tales como antimicrobiana, anticancerígena, antiparasitaria, antihistamínica, hemolítica, antioxidante, antiinflamatoria y antiviral, entre otras (Santhanam, 2020). Entre los diferentes grupos de cnidarios, las investigaciones químicas y farmacológicas se han centrado mayormente en la clase Anthozoa, siendo el orden Alcyonacea (corales blandos) y Gorgonacea (abanicos de mar) los grupos que han contribuido con el mayor número de compuestos bioactivos marinos, aunque otros órdenes, como Actiniaria (anémonas) y Scleractinia (corales duros), también producen compuestos relevantes (Rocha *et al.*, 2011)). Las clases químicas de los compuestos estudiados corresponden mayormente a terpenoides (61%), esteroides, eicosanoides, policétidos y en menor medida a alcaloides, péptidos, piridinas, diacilaminas y lípidos (1-3%). Los compuestos antitumorales son la principal área de interés en el estudio de PNM de cnidarios, seguido de los antimicrobianos y antiinflamatorios (Rocha *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2015).

El potencial de los cnidarios para emplearse como fuente de fármacos se demuestra también por el gran número de moléculas activas descritas; resulta que más de 5,000 han sido aisladas de estos organismos y probablemente el número siga en aumento conforme las investigaciones sigan enfocándose en este grupo tan diverso (Lyu *et al.*, 2021). Algunos de estos compuestos se han utilizado en la medicina tradicional para tratar la hipertensión, enfermedades respiratorias, genitourinarias, dermatológicas, neurológicas y hematológicas. Sin embargo, hasta la fecha, ninguno de los compuestos extraídos de los cnidarios se ha desarrollado y comercializado eficazmente como fármacos. No obstante, ciertos compuestos se encuentran en fases preclínicas como la pseudopterosina extraída del látigo de mar *Pseudopteroorgia elisabethae*, la eleutherobina de *Eleutherobia sp.* (coral blando) y de *Erythropodium caribaeorum*, las sarcodictinas de algunos corales y dalazatide de *Stichodactyla helianthus* (Jouiaei *et al.*, 2015; Mariottini & Grice, 2016; Prentis *et al.*, 2018).

En particular, los efectos nocivos de las toxinas de cnidarios involucran implicaciones graves para la salud humana debido a su neurotoxicidad, citotoxicidad y daño tisular, por lo que se han estimulado estudios acerca de su composición química y su actividad biológica que han conllevado a hallazgos novedosos, demostrado que las toxinas podrían ofrecer una herramienta

para estudiar la fisiología celular, proporcionar agentes terapéuticos para el tratamiento de picaduras o como fuentes prometedoras de agentes farmacológicos activos para el tratamiento de distintas enfermedades humanas (D'Ambra & Lauritano, 2020).

Las propiedades tóxicas de los cnidarios se empezaron a estudiar a partir de principios del siglo XX obteniendo resultados útiles tanto en el campo biológico como médico. El término de anafilaxia se definió estudiando el daño producido por toxinas del hidrozoo *Physalia* (Portier & Richet, 1902). Adicionalmente, se indicaron como una fuente importante de compuestos bioactivos con potencial farmacológico (Mariscal, 1974). Durante los años siguientes, una serie de toxinas diferentes se han descubierto y aislado, varios de ellas con características importantes para el desarrollo de nuevos fármacos, haciendo de los cnidarios un tema de investigación de interés preeminente (Rocha *et al.*, 2015).

2.3 Orden Actiniaria

Incluye a 1,200 especies de anémonas; generalmente son organismos solitarios o clonales, pero nunca coloniales, con coloración y tamaño variable, carecen de esqueleto calcáreo, aunque algunas especies segregan una cutícula quitinosa; tienen tentáculos en número variable sobre el disco oral, los cuales pueden ser de forma cónica simple alargados con numerosos nematocistos, generalmente dispuestos de forma hexagonal en uno o más círculos. Son exclusivamente animales marinos, se distribuyen en aguas tropicales principalmente en la zona intermareal y en arrecifes coralinos, se encuentran fijos mediante el disco pedal o bien se introducen en grietas de rocas (Brusca & Brusca, 2003; Mille-Pagaza, 2011).

Su construcción epitelial bidimensional ha dado forma a sus respuestas fisiológicas y de comportamiento y ha conllevado a un gran éxito ecológico a pesar de su simplicidad estructural, como lo demuestra su presencia en la mayoría de los ecosistemas marinos. Las anémonas juegan un papel importante en el acoplamiento bentónico-pelágico como parte de la comunidad de alimentación en suspensión bentónica, transfiriendo energía desde la columna de agua, al bentos y liberando metabolitos, gametos y descendencia de regreso a la columna de agua (Brusca & Brusca, 2003; Madio *et al.*, 2019).

Las anémonas producen toxinas en los tejidos corporales utilizando dos tipos diferentes de células, conocidas como nematocistos y células glandulares ectodérmicas. Se han descrito al menos 25 tipos diferentes de nematocistos en las anémonas, y un solo espécimen puede albergar varios tipos con distintas especializaciones funcionales en diferentes tejidos y con perfiles químicos muy diversos y específicos (Ashwood *et al.*, 2020). Los nematocistos se encuentran distribuidos en diferentes regiones del pólipo, en los tentáculos mayormente, en el acrorhagi, en la actinofaringe, en la columna basal y en los filamentos mesenteriales (Fautin, 2009).

Los nematocistos de las anémonas contienen una mezcla compleja de proteínas y polipéptidos que se conocen como toxinas (Abdzadeh *et al.*, 2020). Generalmente, sus principales componentes están agrupados en diferentes tipos funcionales, tales como enzimas (fosfolipasas A₂, endonucleasas y proteasas), neurotoxinas (toxinas de los canales de Na_v y K_v), citolisinas (actinoporinas) y componentes no proteicos (caissarona, bunodosina y palitoxina) (Anderluh & Maček, 2002; Frazão *et al.*, 2012; Madio *et al.*, 2019). Dichos compuestos han sido objeto de extensas investigaciones principalmente para su purificación, aislamiento, elucidación de su estructura química, y su consiguiente caracterización biológica; de modo que han sido reconocidos como una rica fuente de sustancias bioactivas con diversidad estructural y propiedades farmacológicas relevantes.

Los estudios sobre las toxinas de las anémonas fueron iniciados por Shapiro (1968) y Béress & Béress (1971) que aislaron toxinas de *Condylactis gigantea* y *Anemonia sulcata*, respectivamente. Estos estudios condujeron al descubrimiento de nuevos compuestos capaces de actuar al nivel de los canales de sodio activados por voltaje. A partir de entonces muchas otras toxinas polipeptídicas han sido aisladas y caracterizadas químicamente de diferentes especies de anémonas. Toxinas de *Stichodactyla mertensii* y *Stichodactyla gigantea* exhiben actividad antibacteriana y actividad antifúngica (Thangaraj *et al.*, 2011); citolisinas de *Stichodactyla helianthus* y de *Actinia equina* presentan actividad antiparasitaria (Tejuca *et al.*, 1999) y actividad citotóxica (Li *et al.*, 2014); fosfolipasas de *Aiptasia mutabilis* muestran actividad hemolítica (Marino *et al.*, 2009); actinoporinas de *Heteractis crispa* tienen actividad antitumoral (Fedorov *et al.*, 2010).

Si bien ya se han descrito una gran diversidad de familias de toxinas peptídicas de anémonas, una investigación exhaustiva respecto a su estructura química, sus mecanismos de

acción y blancos moleculares, es necesaria para comprender el papel clave de las toxinas en el diseño de nuevos fármacos. Asimismo, relativamente pocas especies se han examinado como fuente de proteínas y péptidos activos, ya que se han aislado 470 toxinas de sólo 60 especies de anémonas. Esto significa que el 5% (es decir, 60 especies de más de 1,200 especies) de todas las anémonas han sido estudiadas (Pinheiro-Junior *et al.*, 2022). Por lo tanto, resulta importante ampliar la diversidad taxonómica de anémonas para el aislamiento y caracterización de toxinas que conduzca al descubrimiento de compuestos peptídicos únicos con actividades farmacológicas novedosas.

2.3.1 Citolisinas

Las citolisinas son un grupo de toxinas formadoras de poros en las membranas celulares (Parker & Fiel, 2005). Estas proteínas exhiben un comportamiento dual en la interfaz agua-membrana. En el agua, permanecen en su mayoría monoméricas y se pliegan de manera estable, pero, al interactuar con membranas lipídicas de composición específica, se convierten en estructuras oligoméricas (Madio *et al.*, 2019). Una característica esencial de las citolisinas es su capacidad para formar poros en las membranas biológicas, lo que conduce a cambios osmóticos y pérdida de metabolitos intracelulares provocando así la muerte celular (Maček *et al.*, 1997).

Con base en su estructura primaria y propiedades funcionales, las citolisinas se han clasificado en cinco tipos o grupos (Anderluh & Maček, 2002; Madio *et al.*, 2019).

El grupo I consiste en péptidos básicos (pI ~9.2) de 5-8 kDa que contienen residuos de cisteína pero carecen de triptófano. Forman poros en las membranas que contienen fosfatidilcolina, no son inhibidas por la esfingomielina y tienen actividad antihistamínica. Este tipo se ha informado en pocas especies, como *Tealia felina*, *Heteractis crispa* y *Condylactis aurantiaca* (Elliott *et al.*, 1986; Zykova *et al.*, 1998).

El grupo II es el más abundante y el mejor estudiado, comprende proteínas monoméricas básicas (pI >9.5) de 20 kDa, las actinoporinas o toxinas formadoras de poros (PFT). Están compuestas por un dominio que carece de residuos de cisteína y está equipado con regiones funcionalmente importantes que se conservan en toda la familia de genes de las toxinas (Anderluh *et al.*, 2011). Estas regiones incluyen un parche prominente de aminoácidos aromáticos ubicado en la parte inferior de la molécula que parece formar el sitio principal de unión inicial a las membranas. Se asocian típicamente con membranas que contienen esfingomielina y crean poros selectivos de

cationes (1-2 nm). Esta formación de poros incluye al menos dos pasos, el primero implica la unión específica de un monómero de toxina a la bicapa lipídica y el segundo paso implica una oligomerización en la superficie de la membrana, lo que finalmente conduce a la formación del poro funcional. Este último paso incluye una importante contribución de los lípidos de la membrana y es probable que los monómeros estén dispuestos en la denominada disposición de poros toroidales (Hong *et al.*, 2002).

El grupo III está formado por citolisinas de 25-45 kDa con o sin actividad de fosfolipasas. En contraste con las actinoporinas, estas contienen varios residuos de cisteínas. Causan hemólisis en eritrocitos de mamíferos y son inhibidas por esfingomiélin. Primero se detectó en el veneno de *Aiptasia pallida* un sistema hemolítico formado por al menos tres componentes sinérgicos; una fosfolipasa A₂ con isoformas α de 45 kDa y β de 43 kDa, un factor colítico glicoproteico de 98 kDa que potencia la hemólisis inducida por la fosfolipasa A, y el tercero de 30 kDa. Ninguno de los cuales es individualmente lítico, es decir, la PLA₂ por sí sola no provoca ni la hidrólisis de los fosfolípidos de los glóbulos rojos intactos ni la hemólisis; se necesita del factor colítico para permitir que la fosfolipasa exhiba su actividad enzimática y hemolítica (Hessinger & Lenho, 1976). Además de estas fosfolipasas citolíticas, se han aislado del género *Urticina* la citolisina UpI (*U. piscivora*), una proteína básica (pI >9.4) de 28 kDa con actividad hemolítica, citotóxica e ictiotóxica (Cline *et al.*, 1995). Y UcI de *U. crassicornis* de 30 kDa de provista de actividad de fosfolipasas A₂ (Razpotnik *et al.*, 2009).

El grupo IV consiste en una sola proteína aislada de la anémona *Metridium senile*, la metridiolisina, con una masa de 80 kDa, que es activada por tioles para producir estructuras de anillo en las membranas y su actividad es inhibida por colesterol o fosfátidos. Se une de forma inespecífica a las membranas lipídicas y forma poros fluctuantes permeables al K⁺ en las membranas lipídicas (Anderluh & Maček, 2002; Kristan *et al.*, 2009).

El grupo V son citolisinas similares a la familia de proteínas del complejo de ataque de membrana/perforina (MACPF) y tienen una masa de 60 kDa. Hasta el momento, únicamente se han descrito tres, AvTx-60A de *Actinaria villosa*, y PsTx-60A y PsTx-60B de *Phyllodiscus semoni* (Putnam *et al.*, 2007).

Las citolisinas sirven como modelos proteicos para el estudio de las interacciones de la membrana proteína-lípido. Específicamente, debido a la interacción específica entre las actinoporinas con la esfingomiélin, estas son moléculas ideales para analizar la distribución de

lípidos y la dinámica de la esfingomiélin en las membranas celulares (Valcarcel *et al.*, 2001). Por otro lado, han sido examinadas por sus actividades biológicas, entre ellas, cardioestimulantes, dermonecróticas, antihistámicas y, principalmente, su capacidad de erradicar células tumorales y microorganismos patógenos (Klyshko *et al.*, 2004). Con base en estos hallazgos, las citolisinas se han considerado como componentes importantes para la construcción de inmunotoxinas (IT) contra células cancerígenas. Las IT son moléculas quiméricas construidas a partir de un dominio de unión, como un anticuerpo monoclonal o un factor de crecimiento, que reconoce a la célula dañina, y se acopla a una toxina para dirigir su actividad letal hacia una célula no deseada específica. Este enfoque aprovecha la actividad lítica de las toxinas dirigiéndolas hacia células aberrantes como las células tumorales, infectadas por virus o parásitos (Tejuca *et al.*, 2009; Rivera-de-Torre *et al.*, 2019). Aunque la actividad citolítica de los actinoporinas no es específica de un tipo celular, las aplicaciones de las IT se centran en mejorar la especificidad de la diana celular. Además, podría evitar la internalización de la toxina en la célula y prevenir el daño colateral comúnmente causado por la quimioterapia (Ramírez-Carreto *et al.*, 2020). Algunas actinoporinas como EqII, FraC, StnI, Gigantoxin-4 y RTX-A se han utilizado como fracción tóxica en el diseño de inmunotoxinas dirigidas para diferentes tipos de cáncer (Potrich *et al.*, 2000; Tejuca *et al.*, 2004; Tejuca *et al.*, 2009; Lv *et al.*, 2016; Samavarchi Tehrani *et al.*, 2020).

Durante la última década se han extraído varias citolisinas de más de 30 especies de anémonas, con actividades biológicas principalmente hemolítica y citotóxica. La equinatoxina II (EqII) de la anémona *Actinia equina* exhibe toxicidad significativa contra el carcinoma de ascitis de Ehrlich y líneas celulares de leucemia L1210 y tienen actividad hemolítica (Giraldi *et al.*, 1976). Las sticholisinas I y II (StnI y StnII) de *Stichodactyla helianthus* presentan actividad hemolítica y efecto citotóxico sobre linfomas de células B (Huerta *et al.*, 2001; Lanio *et al.*, 2001; Soto *et al.*, 2018). La fragaceatoxina C (FraC) de *Actinia fragacea* presenta actividad hemolítica y actividad antitumoral frente a las líneas celulares AML, HL-60, KG-1 (Bellomio *et al.*, 2009; Azadpour *et al.*, 2018). Las fosfolipasas del tipo A₂ se han aislado de diferentes especies de anémonas, tales como, *Adamsia carciniopados* (AcPLA₂) (Talvinen & Nevalainen, 2002), *Actinia australis*, *Bolecera tuedia*, *Metridium senile* (Nevalainen *et al.*, 2004), *Condylactys gigantea* (Romero *et al.*, 2010), con actividad catalítica. Mientras que, la toxina BcPLA₂ de *Bunodosoma caissarum* ejerce efecto sobre la función renal y promueve la secreción de insulina inducida en condiciones de alta concentración de glucosa (Martins *et al.*, 2009).

2.3.2 Neurotoxinas

La mayoría de las neurotoxinas aisladas de anémonas son péptidos ricos en cisteína de entre 3 y 10 kDa que interfieren con la transmisión de los impulsos nerviosos al modificar la función de los canales iónicos en las células nerviosas o musculares. Debido a que las anémonas son animales sésiles, las neurotoxinas desempeñan un papel fundamental en la inmovilización de las presas y la defensa contra los depredadores (Madio *et al.*, 2019). Estas prolongan el potencial de acción de las membranas excitables y no excitables en las neuronas sensoriales y las células del músculo cardíaco y esquelético (Smith & Blumenthal, 2007) mediante la modificación de la compuerta del canal de sodio o bloqueando la compuerta del canal de potasio durante la etapa de repolarización (Catterall *et al.*, 2007). Esto provoca que la célula se vuelva hiperactiva y libere cantidades masivas de neurotransmisores en las sinapsis y las uniones neuromusculares que pueden causar una etapa espástica inicial seguida de una parálisis (Jouiaei *et al.*, 2015).

Las neurotoxinas se encuentran entre los componentes mejor caracterizados de las anémonas en términos de sus mecanismos de acción. Afectan a los canales iónicos de sodio (Nav), potasio (Kv), canales iónicos sensibles al ácido (ASIC), canal de potasio ether-à-go-go humano (hERG) así como a los receptores de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) y anquirina 1 (TRPA1) (Liao *et al.*, 2019). Recientemente, se caracterizaron péptidos que inhiben canales iónicos activados por glutamato (Rodríguez *et al.*, 2018), modulan canales iónicos de calcio (Cav) (Pinheiro-Junior *et al.*, 2022; Lazcano-Pérez *et al.*, 2022) y que activan los receptores del canal GABA tipo A (GABA_AR) (Colom-Casnovas *et al.*, 2022). Brevemente, las toxinas de los canales de sodio (NaTxS) se han aislado desde la década de 1970, y representan la fracción más abundante de las toxinas. Tienen una masa molecular entre 3.5 y 6.5 kDa, son capaces de unirse específicamente al sitio receptor tres del canal de sodio provocando un retraso en su inactivación y un aumento en la duración del potencial de acción. Se clasifican en tres tipos según la disposición de las cisteínas, la composición de aminoácidos y la reactividad cruzada inmunológica. Por otro lado, las toxinas de canales de potasio (KTxS), descubiertas en 1990, son péptidos de 3-5 kDa bloquean de forma reversible la corriente de potasio. Se clasifican en cinco tipos con base en su similitud de secuencia y afinidad de unión (Frazão *et al.*, 2012).

La anthopleurina-A y -B aisladas de *Anthopleura xanthogrammica* y *A. elegantissima* actúan sobre canales de sodio, y se muestran como inótrupos positivos prometedores para su uso

en enfermedades cardiovasculares (Reimer *et al.*, 1985; Monks *et al.*, 1995). Las neurotoxinas ATX-I y -II y ShI de *Anemonia sulcata* y *Stichodactyla helianthus*, respectivamente, también han demostrado ser valiosas sondas del sitio 3 en los canales de sodio dependientes de voltaje, que media la inactivación del canal (Schweitz *et al.*, 1981; Kem *et al.*, 1989). La APETx2, de *A. elegantissima*, inhibe el canal iónico sensible al ácido ASIC3, que es un canal de Na⁺ regulado por protones que se ha implicado en la transducción del dolor asociado con acidosis en tejidos inflamados o isquémicos (Diochot *et al.*, 2004). Recientemente, se demostró que un nuevo miembro de la familia APETx, APETx4, tiene actividad sobre un posible objetivo contra el cáncer, el canal ether-à-go-go humano (hEag1 o Kv10.1), y también inhibe canales de Kv y Nav (Moreels *et al.*, 2017).

Las neurotoxinas representan recursos biológicos valiosos, ya que pueden ser “molecular probes” de gran utilidad para el estudio y análisis de canales iónicos implicados en la señalización eléctrica y las respuestas inmunitarias (Turk & Kem, 2009). Además, las neurotoxinas pueden proporcionar nuevos compuestos para tratar enfermedades causadas por disfunciones de los canales iónicos asociadas a mutaciones genéticas, por ejemplo, epilepsia, fibrosis quística, diabetes, dolor, esquizofrenia, depresión y cáncer. Así como para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson y esclerosis múltiple (Liao *et al.*, 2019).

2.4 Cáncer

El cáncer es una enfermedad causada por una combinación de alteraciones genéticas que codifican proteínas, oncogenes y genes supresores de tumores (Aqeilan *et al.*, 2008). Se desarrolla a partir de una célula progenitora dañada como parte de la carcinogénesis, la cual consta de múltiples pasos en el que las células normales evolucionan gradualmente a células malignas con la acumulación de múltiples alteraciones genéticas (Beckmann *et al.*, 1997). En consecuencia, se generan células que se dividen más rápidamente o evitan la muerte celular, liberándolas así del control del crecimiento y puntos de control del ciclo celular (Hejmadi, 2013). El proceso nominalmente se puede dividir en tres etapas denominadas iniciación, promoción y progresión. La iniciación, generalmente es rápida e implica el desarrollo de células alteradas y es causada por una mutación irreversible. La segunda etapa, la promoción, implica la expansión clonal selectiva a un tumor (benigno o canceroso), la cual es iniciada por un aumento en el crecimiento celular a través de un incremento en la proliferación celular y/o una disminución en la apoptosis. Por último, ocurre

la progresión a células cancerosas malignas al sufrir una variedad de cambios hereditarios, incluye la angiogénesis y el desarrollo de heterogeneidad tumoral (Barrett & Wiseman, 1987).

Las células cancerosas pueden adquirir hasta diez características o capacidades funcionales que permiten que la carcinogénesis progrese o persista, las cuales manifiestan colectivamente sus efectos a través de ataques sobre el individuo afectado. Las células cancerosas son capaces de mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, evitar la destrucción inmune, permitir la inmortalidad replicativa, estimular la inflamación promotora de tumores, activar la invasión y metástasis, inducir la angiogénesis, inestabilidad y mutación del genoma, resistir la muerte celular (apoptosis) y desregular la energía celular (Pienta, 2008; Mendelsohn *et al.*, 2014). Cada capacidad funcional es importante no solo porque ayuda a comprender las características del cáncer, sino porque también proporciona un objetivo clave para el desarrollo de tratamientos terapéuticos múltiples. Estos generalmente no actúan como fármacos con actividad inmediata porque las células tumorales desarrollan estrategias avanzadas de resistencia (Hanahan, 2014). Por lo tanto, es imperativo el descubrimiento de nuevos tipos de terapias con diferentes mecanismos de acción para superar el obstáculo de resistencia (Mendelsohn *et al.*, 2014).

Existen dos tipos de cáncer, el cáncer esporádico y el cáncer hereditario. El cáncer que no se debe a un patrón hereditario se denomina esporádico, en el que ciertas células del cuerpo (células somáticas) desarrollan mutaciones que conllevan al cáncer; el 90 al 95% de todos los cánceres son de este tipo. En cuanto al cáncer hereditario, ocurre cuando un individuo nace con un cambio o mutación en una sola copia de un gen que fue heredado. En otras palabras, si ocurre una mutación en la célula de la línea germinal (células reproductoras: ovocitos y espermatozoides), resulta en una transformación del cáncer hereditario (Aqeilan *et al.*, 2008). Particularmente, se han descrito alrededor de 200 variedades de cáncer, cada una con propiedades y tratamientos particulares, y las cuales se agrupan en tres tipos principales. Los carcinomas (90%) son cánceres sólidos (por ejemplo, tumores sólidos) que surgen de las células epiteliales que cubren superficies internas y externas. El segundo tipo consta de sarcomas, cánceres sólidos que se desarrollan a partir de las células del tejido conectivo que forman estructuras corporales como los músculos y los huesos. Por último, las leucemias y los linfomas son cánceres de los glóbulos blancos (Pardee *et al.*, 2008).

Las causas del cáncer están determinadas por interacciones complejas entre factores genéticos y ambientales. Resulta de una combinación de factores externos e internos, tales como

mutágenos, radiación, tabaco, agentes infecciosos, mutaciones (genéticas y epigenéticas) y enfermedades inmunes (Aqeilan *et al.*, 2008; Abel & DiGiovanni, 2015).

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2015, el cáncer representa la segunda causa principal de muerte (después de enfermedades cardiovasculares). En 2018, se notificaron aproximadamente 18 millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial, lo que resultó en aproximadamente 10 millones de muertes. Para 2040, se espera que la carga mundial aumente a 27.5 millones de nuevos casos y 16.3 millones de muertes simplemente debido al crecimiento y envejecimiento de la población. Del mismo modo, el incremento y la prevalencia del cáncer en el futuro probablemente será considerablemente mayor debido a la creciente incidencia de factores que aumentan el riesgo de padecimiento, tales como, el tabaquismo, una dieta poco saludable, la inactividad física y un menor número de embarazos (Bray *et al.*, 2018).

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial (18.4% del total de muertes por cáncer), seguido del cáncer de mama femenino, cáncer de próstata y cáncer colorrectal. Por sexo, el cáncer de pulmón es el más frecuente y la principal causa de muerte en los hombres. Entre las mujeres, el cáncer de mama es el más comúnmente diagnosticado y la principal causa de muerte, seguido del cáncer colorrectal y de pulmón (Bray *et al.*, 2018).

2.4.1 Compuestos antitumorales de cnidarios

La citotoxicidad de las toxinas de cnidarios se ha estudiado durante décadas dando lugar a resultados que enfatizan la potente actividad de varios de ellos, en particular contra las células cancerosas. Se ha demostrado que tienen diferentes mecanismos de acción: pueden inhibir el crecimiento celular, por ejemplo, interfiriendo con el metabolismo celular o inhibiendo la síntesis de ADN, pueden bloquear el ciclo celular e incluso inducir la apoptosis (Mariottini & Pane, 2013; Sanderson *et al.*, 2016).

La búsqueda de fuentes novedosas para el desarrollo de agentes terapéuticos constituye una de las estrategias para el tratamiento selectivo de diferentes tipos de cáncer y las toxinas de anémonas que contienen elementos tanto citotóxicos como neurotóxicos son de alto interés, ya que en combinación con algún quimioterápico convencional puede tener el potencial de superar la quimiorresistencia. Diversos estudios han demostrado su potencial para el desarrollo de

compuestos anticancerígenos. El extracto crudo y una proteína Ucl aislada de la anémona *Urticina piscivora* producen efectos tóxicos contra tres líneas celulares tumorales KB, L1210 y HEL 299 (Cline *et al.*, 1995). La actinoporina purificada de *Sagartia rosea* resulta ser citotóxica para las líneas celulares U251 (glioblastoma), NSCLC (carcinoma de pulmón), BEL 7402 (carcinoma de hígado) y BGC-823 (adenocarcinoma de estómago) (Jiang *et al.*, 2003). La toxina citolítica formadora de poro (Bc2) producida por *Bunodosoma caissarum* reduce significativamente la viabilidad de las células U87 y A172 (Soletti *et al.*, 2008). La actinoporina RTX-A de *Heteractis crispata* también es citotóxica frente a células de leucemia promielocítica (HL-60; IC₅₀ = 1.06 nM), células de cáncer de mama (MDA-MB 231; IC₅₀ = 4.64 nM), células de carcinoma de cuello uterino (HeLa; IC₅₀ = 2.26 nM), leucemia monocítica (THP-1; IC₅₀ = 1.11 nM) y cáncer de colon (SNU C4; IC₅₀ = 4.66 nM), e induce la apoptosis de manera dosis-dependiente en células JB6 P⁺ Cl41 (Fedorov *et al.*, 2010). Algunas actinoporinas como EqtII, FraC y StnI se han utilizado como fracción tóxica en el diseño de inmunotoxinas para dirigir su actividad citotóxica hacia las células cancerosas *in vitro* (Tejuca *et al.*, 2004; Mutter *et al.*, 2018).

Asimismo, se ha evaluado el efecto citotóxico del extracto crudo de diversas especies de anémonas como *Bunodosopsis globulifera* (Monroy-Estrada *et al.*, 2013), *Aiptasia mutabilis* (Marino *et al.*, 2004), *Heteractis magnifica*, *Stichodactyla haddoni* y *Parachondylactis sinensis* (Ravindran *et al.*, 2010) demostrando su potente actividad citotóxica contra un panel diverso de líneas celulares tumorales.

2.5 *Telmatactis panamensis*

Phylum: Cnidaria

Clase: Anthozoa

Subclase: Hexacorallia

Orden: Actiniaria

Familia: Isophellidae

Género: *Telmatactis*

Telmatactis panamensis (Verrill, 1869)



Figura 2. Anémoma *Telmatactis panamensis*. Tomado de Acuña *et al.* (2012).

El género *Telmatactis* Gravier, 1916 incluye 28 especies válidas (Daly & Fautin, 2021). Se distribuyen en aguas subtropicales y tropicales de los océanos Atlántico, incluido el mar Mediterráneo, Índico y Pacífico. Carecen de zooxantelas, por lo que su vía nutricional es heterotrófica; es decir, se alimentan de presas de plancton, peces, moluscos y crustáceos (den Hartog, 1995).

La especie *T. panamensis* presenta una morfología caracterizada por tener un disco oral plano, liso, ancho, con un diámetro entre 10-15 mm, de color naranja claro a marrón y con manchas beige dispersas; boca pequeña, beige en la periferia. Presenta tentáculos digitiformes cortos dispuestos en 4 o 5 ciclos (48-96 en número) en la región oral que se contraen longitudinalmente, ciclos internos más largos que los externos, pueden ser de color marrón claro, púrpura o café con una banda cruzada blanca proximal. Columna cilíndrica, de 5 a 20 mm de diámetro y de 5-55 mm de altura, de color naranja pálido a café opaca. La actinofaringe es de color naranja pálido. Posee acontia de color blanco que puede emitirse a través del scapus; dos sifonoglifos simétricos, cada uno con una marca blanca en su intersección con el disco oral. El cnidoma de esta especie consta de espirocistos, basitricos, microbásicos p-mastigóforos, y microbásico amastigóforos (Fautin *et al.*, 2007; Acuña *et al.*, 2012; Acuña *et al.*, 2022).

Tiene una distribución desde el Golfo de California, México, hasta la costa de Ecuador y las Islas Galápagos (Fautin *et al.*, 2007). En México se ha registrado en Baja California, Jalisco, Colima, Michoacán y Guerrero. Se encuentra en fondos arenosos y arenosos-rocosos desde el

intermareal inferior hasta el submareal a profundidades de hasta 35 m. Generalmente está adherida debajo de rocas, pero también se puede encontrar unida a grandes guijarros o conchas (Acuña *et al.*, 2012).

Los estudios de esta especie son escasos y se encuentran limitados a registros acerca de su distribución y respecto a su descripción morfológica (Carlgren, 1951; Hendrickx *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2005; Garese, *et al.*, 2009; Bastida-Izaguirre, 2014; Ríos-Jara, 2016; Ramírez-Orellana, 2017; Castañeda-Rivero, 2017; Acuña *et al.*, 2022).

Al pertenecer al Phylum Cnidaria, característicamente produce toxinas; sin embargo, los estudios sobre el aislamiento y caracterización de las toxinas de *T. panamensis* son nulos y su potencial como fuente de compuestos bioactivos no ha sido descrito previamente. No obstante, algunas investigaciones han especificado la potente toxicidad de otras especies del género *Telmatactis*, como *T. australiensis* y *T. decora*, por lo que, debería especularse que son especialmente interesantes en el contexto toxinológico, con potencial para el aislamiento de compuestos bioactivos (Mizuno, 2016; Prentis *et al.*, 2018). Además, otro estudio evaluó el extracto crudo de la anémona *T. bernoni* el cual exhibe una potente actividad hemolítica y neurotóxica (Cruz-Hernández & Rodríguez-Morales, 2016), mientras que, Yamaguchi *et al.* (2010) establece la ausencia de toxinas del canal de potasio en *T. clavata*.

III. JUSTIFICACIÓN

El aumento de la carga mundial de enfermedades emergentes y de la resistencia a los medicamentos, junto con una fuerte caída en el descubrimiento de fármacos antiinfecciosos ha intensificado la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos a partir de distintas fuentes naturales. Debido a la gran diversidad en el medio marino, este se ha convertido en foco de exploración y búsqueda de productos naturales marinos con aplicación farmacológica de amplio espectro. Se ha demostrado que los cnidarios constituyen una importante fuente potencial de nuevos compuestos biológicamente activos, los cuales resultan tener una alta diversidad y complejidad química, especificidad y mecanismos de acción novedosos, que los convierten en candidatos prometedores para el desarrollo farmacológico.

En el Océano Pacífico mexicano, en específico en la región suroccidental, existe una alta diversidad de organismos marinos y es prácticamente escasa la investigación enfocada a la búsqueda de productos naturales marinos, por lo que resulta relevante ampliar el conocimiento acerca de fuentes promisorias de moléculas bioactivas. Asimismo, un campo en particular que permanece inexplorado es el de la Toxinología de Cnidarios, de manera que, el aislamiento y purificación de toxinas de distintas especies de anémonas pertenecientes a diversas regiones geográficas enriquecería dicha línea de investigación. La anémona *Telmatactis panamensis* es una especie con estudios limitados a pesar de tener una distribución extensa a lo largo de todo el Pacífico Norte y Sur Oriental, además la caracterización de sus toxinas no ha sido estudiada con anterioridad, por lo que parece pertinente evaluar su potencial como fuente de compuestos bioactivos. De modo que, el presente trabajo constituye el primer reporte del aislamiento y caracterización de las toxinas con actividad biológica presentes en *T. panamensis*.

IV. OBJETIVOS

4.1 *Objetivo general:*

Aislar y semipurificar algunos compuestos proteicos presentes en la anémona *Telmatactis panamensis*, así como evaluar su actividad biológica.

4.2 *Objetivos particulares:*

- Obtener el extracto crudo a partir de la anémona *Telmatactis panamensis*.
- Purificar de forma parcial el extracto crudo por medio de cromatografía de líquidos.
- Evaluar la actividad citolítica del extracto crudo y fracciones semipurificadas mediante distintos bioensayos de actividad hemolítica y de fosfolipasas.
- Determinar el efecto citotóxico del extracto crudo y las fracciones sobre cultivos celulares tumorales, específicamente de glioma de rata C6 y cáncer de mama MCF-7, y en un cultivo celular normal de tejido mamario Hs 578Bst.

V. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Qué tipo de toxinas proteicas están presentes en la anémona *Telmatactis panamensis*?

¿Qué actividades biológicas exhiben los compuestos aislados de *T. panamensis*?

¿Las toxinas de *T. panamensis* presentan selectividad ante las células tumorales respecto a las células normales?

VI. HIPÓTESIS

Los compuestos proteicos aislados de la anémona *Telmatactis panamensis* exhiben actividad hemolítica, sobre fosfolípidos y citotóxica.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de las muestras biológicas

Los organismos de la anémona *Telmatactis panamensis* se recolectaron en la playa Club de Yates, Manzanillo, Colima mediante buceo autónomo a una profundidad de 2-4 m (Figura 3). Los individuos se separaron de rocas donde se encontraban adheridos utilizando una espátula y se colocaron en bolsas de plástico Ziploc conteniendo agua de mar. Posteriormente, fueron congelados inmediatamente para ser transportados al laboratorio de Toxinología de Cnidarios en la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales y posteriormente se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

La identificación taxonómica de los ejemplares se realizó con base a la descripción original de Verrill (1869) y a la de Carlgren (1951).

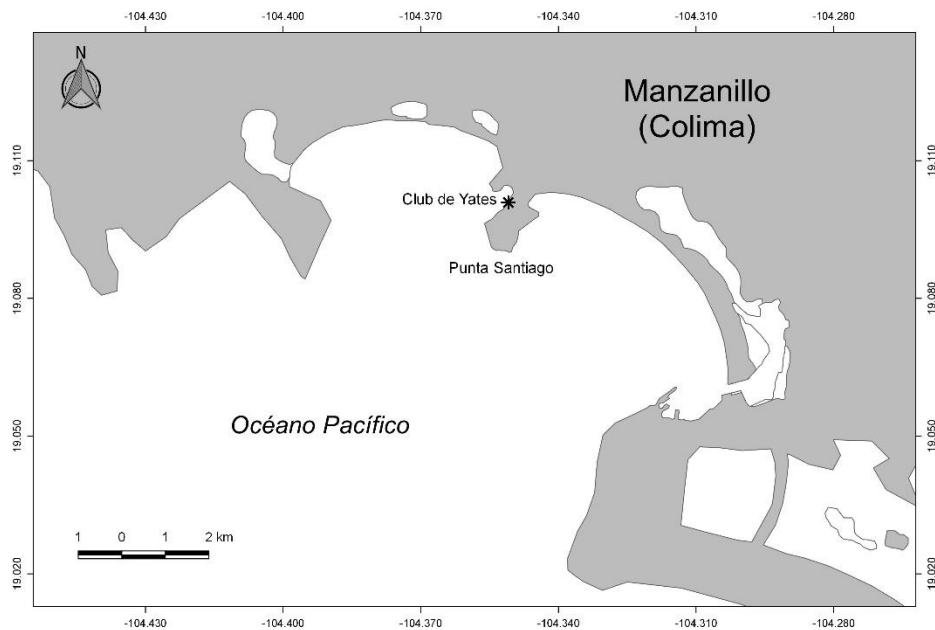


Figura 3. Ubicación del sitio de recolección de los organismos para el estudio (*).
Elaborado por García-Quezada M.I.

7.2 Obtención del extracto crudo

La extracción de toxinas mediante la descarga de nematocistos se realizó siguiendo el método modificado descrito por Kem *et al.* (1989). Los organismos se colocaron en agua desionizada y se mantuvieron en agitación mecánica durante 1 hora, posteriormente se separaron el tejido del sobrenadante; este último se refrigeró a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el tejido se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dos horas. Al transcurrir el tiempo, se realizó nuevamente la agitación. Consecutivamente, se

completaron nueve ciclos de agitación-congelación. Entre cada repetición la mezcla de tejido y el sobrenadante se sometieron a ultrasonido en un sonicador Cole-Parmer® modelo 08895-52 durante dos horas manteniendo la temperatura por debajo de 15 °C con la finalidad de conservar la actividad de los compuestos de interés. Durante cada ciclo se tomaron muestras y se observaron al microscopio (Labomed® CxL) para monitorear la descarga de nematocistos y a su vez identificar los tipos de nematocistos presentes. La identificación de los cnidocitos se basó en los trabajos de Mariscal (1974) y England & Robson (1991), teniendo en cuenta la forma de la cápsula, la longitud y la ornamentación de los túbulos.

Posteriormente, el extracto (sobrenadante) se centrifugó a 3,190 g a 4 °C por 10 minutos en una centrífuga Eppendorf® modelo 5810 R, se separó el sobrenadante obtenido y se congeló a -20 °C. Por último, el extracto se liofilizó en el equipo Freeze Drying System modelo 77500, Labconco® a una temperatura de -48 °C y vacío de 650×10^{-3} mBar.

7.3 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976), en específico por medio del ensayo estándar de microplaca. Se colocaron 250 µL de colorante de Bradford más 5 µL del estándar, muestra y/o blanco en una microplaca de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplaca Stat Fax 4200®, realizándose por triplicado. El blanco consistió en agua desionizada y colorante Bradford, mientras que la muestra de EC se preparó a distintas concentraciones (5 y 10 mg/mL) a partir de una solución madre de 50 mg/mL. Respecto a las fracciones se prepararon las siguientes concentraciones: 10 mg/mL para la F1 y F2, y 20 mg/mL para la F3, F4 y F5.

Con los valores de absorbancia obtenidos para el estándar de albúmina de suero bovino (ABS) de Bio-Rad® se realizó una curva de calibración, obteniéndose una ecuación de la recta, la cual fue utilizada para la determinación de proteína.

7.4 Fraccionamiento mediante cromatografía de líquidos de baja presión

La separación de las toxinas se realizó por medio de cromatografía de exclusión molecular. Primeramente, se disolvieron 3 g de extracto crudo en 50 mL de agua desionizada y la disolución obtenida fue aplicada a una columna (5.0 cm diámetro x 82.5 cm de alto, vol=1,600 cm³ aproximadamente) de filtración en gel Sephadex G-50 M (Pharmacia Biotech®) conectada a un

sistema de cromatografía líquida ÄKTAprime plus (GE Healthcare). La columna fue equilibrada y eluída con ácido acético 0.3 M, a un flujo de 2 mL/min, a un tamaño de muestra de 18 mL y con detección a una longitud de onda de 280 nm.

Las fracciones obtenidas se separaron de acuerdo con el cromatograma generado en el software PrimeView[®] 5.0 y se concentraron a presión reducida en un Rotavapor BUCHI[®] R-215 a 25 °C. Posteriormente, las fracciones se liofilizaron bajo las mismas condiciones descritas previamente.

Al término de la liofilización, las fracciones 4 y 5 se sometieron al proceso de diálisis para eliminar el contenido de sales empleando una membrana de 3,500 Da (Fisherbrand[®] Dialysis tubing). Las muestras se disolvieron en 2 mL de H₂O, se colocaron dentro de la membrana, se mantuvieron en agitación mecánica durante 3 horas y el contenido se volvió a liofilizar. A partir de este proceso las fracciones se denominaron F4_d y F5_d.

7.5 Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE

Para evaluar el peso molecular de los componentes proteicos del extracto crudo y de las fracciones prepurificadas se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La preparación de geles de poliacrilamida al 16% se realizó siguiendo el protocolo de Bio-Rad[®]. El gel separador se preparó mezclando 2.045 mL de agua desionizada, 2.5 mL de 1.5M Tris-HCl pH 8.8, 100 µL de SDS al 10%, 5.3 mL de acrilamida/bis-acrilamida y para iniciar la polimerización se añadieron 50 µL de persulfato de amonio al 10% y 5 µL de TEMED. En lo que respecta al gel compactador, se mezclaron 6.1 mL de agua desionizada, 2.5 mL de 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 100 µL de SDS al 10%, 1.33 mL de acrilamida/bis-acrilamida, 50 µL de persulfato de amonio al 10% y 10 µL de TEMED.

Las muestras se prepararon a una relación de 1:2 en amortiguador de carga (Laemmli, 1970), para su posterior desnaturalización a 95 °C durante 5 min. Se cargaron 13 µL de muestra del EC (50 mg/mL) y fracciones (20 mg/mL) en los pozos del gel y 3 µL de estándar de proteínas (Precision Plus Protein[™] Kaleidoscope Standards[™]) y se corrieron en una cámara electroforética con amortiguador de corrida 1X aplicándoles un voltaje de 150 V. Los geles del EC y fracciones 1 y 2 se tiñeron con Azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad[®]) durante 24 horas y se destiñeron con una solución de metanol (20%), etanol (10%) y ácido acético (5%) en H₂O. Mientras que, el gel con las fracciones 3, 4_d y 5_d se tiñó con plata empleando el kit ProteoSilver[™] Silver Stain Kit, SIGMA-

Aldrich® para optimizar la detección de las bandas proteicas debido a que al emplear el azul de Coomassie estas no se visualizaron.

La estimación de los pesos moleculares (PM) se determinó interpolando los valores de distancia de migración relativa (Rf) de las proteínas desconocidas en una ecuación de la recta obtenida a partir de una gráfica de log PM vs Rf de los estándares de proteínas.

7.6 Ensayos de actividad biológica

7.6.1 Ensayo *in vivo* de toxicidad

Con la finalidad de monitorear la actividad citolítica y neurotóxica del extracto crudo y las fracciones se realizó una preevaluación siguiendo el método descrito por Béress & Béress (1971). Primeramente, se colectaron cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* en la zona de playa de Puerto Morelos y se trasladaron inmediatamente al laboratorio de Toxinología de Cnidarios donde se prosiguió a pesarlos y sexarlos. Para el bioensayo, se inyectaron 50 µL del extracto crudo a una concentración de 212.5 µg/mL de proteína en la base del tercer pereiópodo de tres cangrejos. Respecto a las fracciones, las concentraciones de proteína utilizadas fueron variables mostradas en la Tabla 11. Como grupo control se utilizó agua desionizada. Posteriormente, se observó el comportamiento de los individuos y se registraron las reacciones provocadas por compuestos neurotóxicos tales como temblores, burbujeo, movimiento descoordinado de ojos y pereiópodos, parálisis, entre otros. Finalmente, se disecaron los organismos para examinar la necrosis de los órganos internos provocada por toxinas citolíticas, observada como oscurecimiento y licuefacción de tejidos.

7.6.2 Actividad de fosfolipasas

La actividad de fosfolipasas se determinó midiendo el halo de actividad enzimática del extracto crudo y fracciones de *Telmatactis panamensis* a diferentes concentraciones en medio de cultivo de agarosa enriquecido con yema de huevo con modificaciones al método de Habermann & Hardt (1972) y Schumacher *et al.* (1992). Los geles se prepararon mezclando tres soluciones SA, SB y SC en volúmenes 0.5:50:0.5 mL, respectivamente. La Solución A consistió en yema de huevo en NaCl al 0.86%; Solución B, 0.3 g agarosa en 50 ml de solución Tris-HCl mM a pH 7.95; y Solución C, 0.147g de CaCl₂ en 100 mL de H₂O (10 mM). Se colocaron aproximadamente 15 mL en cada caja Petri estéril. Una vez solidificadas, se hicieron orificios de 5 mm de diámetro con

una pipeta Pasteur estéril. Se colocaron en cada orificio 10 μL de H_2O como control negativo y 10 μL de veneno de abeja como control positivo y 10 μL de las muestras (EC y fracciones a una concentración de proteína de 1 mg/mL), probándose por triplicado.

Posteriormente, se realizaron registros de medición del diámetro del halo a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas. La actividad enzimática (Pz) se obtuvo al dividir el diámetro del pozo entre el diámetro del halo de acuerdo con la metodología descrita por Price *et al.* (1982), en la que establece una actividad positiva y negativa de PLA_2 correspondiente a valores de Pz de 0 a 1, respectivamente.

7.6.3 Actividad de fosfolipasa A_2 secretora (s PLA_2)

La actividad de fosfolipasa secretora del extracto crudo y fracciones se determinó usando el s PLA_2 Assay Kit (Cayman Chemical[®], EE. UU.). Este ensayo utiliza el análogo de 1,2-ditio de diheptanoil fosfatidilcolina que sirve como sustrato para la mayoría de s PLA_2 . Los tioles libres generados por PLA_2 tras la hidrólisis del enlace tioéster en la posición sn-2 se detectaron usando DTNB [5,5'-ditio-bis-(ácido-2-nitrobenzoico)]. El control negativo (no enzimático) consistió en 10 μL de DTNB y 15 μL de amortiguador de ensayo. El control positivo fue una solución de veneno de abeja (10 μL), DTNB (10 μL) y amortiguador de ensayo (5 μL). Las muestras de EC y fracciones se prepararon agregando 10 μL de DTNB, 10 μL de muestra y 5 μL de amortiguador de ensayo, realizándose por triplicado. Para iniciar la reacción se adicionaron 200 μL del sustrato a cada pozo. Las concentraciones de proteína probadas del EC fueron de 1 y 50 mg/mL, y de las fracciones de 1 mg/mL.

Los cambios de color se controlaron mediante un espectrofotómetro de microplacas a 414 nm, registrando la absorbancia cada minuto durante 10 min. La actividad PLA_2 se expresó en μmol de fosfatidilcolina hidrolizada por minuto por mg de proteína.

La actividad de s PLA_2 fue calculada usando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad sPLA}_2 = \frac{\Delta A_{414}/\text{min}}{10.66 \text{ mM}^{-1}} \times \frac{0.225 \text{ mL}}{0.01 \text{ mL}} \times \text{Dilución muestra}$$

Donde ΔA_{414} se obtuvo empleando la fórmula:

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

7.6.4 Actividad hemolítica

Para determinar las propiedades citolíticas del extracto crudo y fracciones de *T. panamensis*, se evaluó la actividad hemolítica en eritrocitos humanos de acuerdo con el método descrito por Rottini *et al.* (1990) con algunas modificaciones. Se extrajeron 3 mL de sangre de donante humano sano tipo B⁺ y se prosiguió a eliminar los componentes no deseados como el plasma y la grasa mediante tres lavados consecutivos con una solución isotónica: se añadieron 30 mL de solución Alsever a pH de 7.4 homogenizando cuidadosamente, se centrifugó a 1,795 g durante 5 min (Eppendorf® 5810 R) y el sobrenadante se desechó. Al término de los lavados, los eritrocitos se resuspendieron en 5 mL de solución Alsever. Posteriormente, se realizó una calibración de eritrocitos preparando una solución al 0.9% (0.09 mL de sangre y 9.91 mL de Alsever), seguido a ello se prepararon dos tratamientos estandarizados que consistieron en una mezcla de 50 µL de eritrocitos con 950 µL de solución Alsever o agua desionizada, correspondiendo al 0% de hemólisis (control negativo) y 100% de hemólisis (control positivo) respectivamente; estos fueron incubados a 37 °C por 30 min y centrifugados a 1,795 g durante 5 min. Las lecturas de absorbancia se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm, siendo los valores próximos a 0 pertenecientes al control negativo y valores próximos a 1 al control positivo.

En el caso de las muestras, se mezclaron distintas concentraciones del EC y fracciones, 50 µL de eritrocitos y solución Alsever para completar un volumen final de 1 mL, por triplicado. Las concentraciones de proteína probadas fueron 20, 50, 100, 150 y 200 µg/mL. Seguidamente, se incubaron a 37 °C por 30 minutos, después se centrifugaron a 1,795 g durante 5 min y la liberación de hemoglobina se midió a una absorbancia de 415 nm. El porcentaje de Actividad Hemolítica (% HA) fue calculado a partir de los datos de absorbancia obtenidos, usando la siguiente ecuación:

$$\% HA = \left(\frac{AbM - Ab0\%}{Ab100\% - Ab0\%} \right) * 100$$

Donde:

AbM: Absorbancia de la muestra

Ab100%: Absorbancia al 100% de hemólisis

Ab0%: Absorbancia al 0% de hemólisis

Los valores de % HA se graficaron obteniéndose una ecuación de la recta, la cual se utilizó para calcular la unidad hemolítica al 50% (UH₅₀), definiéndose como la cantidad de proteína requerida para causar un 50% de hemólisis en una solución de eritrocitos a 37 °C durante 30 min.

7.6.5 Citotoxicidad en líneas celulares

7.6.5.1 Cultivo celular

Para evaluar la actividad antitumoral del extracto y las fracciones se utilizaron las líneas celulares de glioma de rata C6 (ATCC[®] CCL-107TM), cáncer de mama MCF-7 (ATCC[®] HTB-22TM) y células normales de tejido mamario Hs 578Bst (ATCC[®] HTB-125TM). Las células se extrajeron de sus respectivos crioviales mediante un protocolo de descongelación; los viales se colocaron a 37 °C en baño maría durante 2 min, posteriormente se pasó su contenido celular a un tubo Falcon con el medio de cultivo adecuado para cada línea celular. A continuación, se centrifugó a 335 g durante 10 min (centrífuga IEC[®] Centra CL2), el medio se decantó, se resuspendió el pellet celular con 2 mL de PBS filtrado y se volvió a centrifugar (este paso se repitió dos veces). Después, las células se cultivaron en frascos de 25 cm² de superficie con tapa ventilada con medio F-12K (ATCC[®] 30-2004) para la línea C6, medio EMEM (ATCC[®] 30-2003) para MCF-7 y medio Hybri-Care (ATCC[®] 46-X) para las células Hs 578Bst suplementados con 10% de Suero fetal bovino (SFB), 1% Penicilina-estreptomicina y 0.1% Anfotericina-B. Adicionalmente, al medio EMEM se le agregó 10 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich[®], I9278-5ML) y al medio Hybri-Care 30 ng/mL de factor de crecimiento epitelial de ratón (Sigma-Aldrich[®], E5160-100UG). Finalmente, se incubaron en condiciones estériles a 37 °C, 1 atm de presión y 5% de CO₂ (Incubadora New Brunswick, Galaxy 248[®]).

Una vez que las células alcanzaron una confluencia de 80-100% se prosiguió a realizar un subcultivo celular; se les añadió tripsina al 0.25% (BD[®]) a los frascos T-25 para despegar a las células de la superficie; posteriormente se colectaron en tubos Falcon con medio de cultivo y se centrifugaron a 335 g durante 10 min (IEC[®] Centra CL2); después se realizaron dos lavados con PBS resuspendiendo el “pellet” celular. Seguidamente, las células se cultivaron en frascos T-75 y se incubaron.

7.6.5.2 Citotoxicidad del extracto y fracciones

Las muestras disueltas en medio de cultivo correspondiente a la línea celular se esterilizaron empleando filtros de 0.22 μm . Las concentraciones de proteína utilizadas fueron de 50, 150, 300, 500 $\mu\text{g/mL}$ para las células C6 y MCF-7. En la línea celular normal Hs 578Bst se excluyó la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ debido a la falta de disponibilidad de pozos.

Para los ensayos de viabilidad celular, las células se despegaron añadiendo tripsina 0.25% siguiendo un protocolo de despegado, teniendo como resultado una suspensión celular en un volumen conocido de medio. Se realizó un conteo celular tomando 10 μL de una mezcla de la suspensión celular y 10 μL azul de tripano y se colocaron en un hematocitómetro (Cámara de Neubauer).

Para el plaqueo experimental, se sembraron aproximadamente 5,000 células por pozo en microplacas de 96 pozos de media área con DMEM, EMEM o Hybri-Care suplementado y se incubaron hasta que la confluencia celular fuera mayor al 80%. Después, el medio se retiró para ser reemplazado con las diferentes concentraciones correspondientes del extracto y de las fracciones más medio de cultivo. Se consideraron distintos tiempos de exposición de 24 y 48 horas para determinar el efecto de las muestras sobre la viabilidad celular.

7.6.5.3 Evaluación de la viabilidad celular

Se realizaron dos métodos de viabilidad celular, tinción con Cristal Violeta (CV) de acuerdo con la metodología de Chiba *et al.* (1998) y tinción con Rojo Neutro (RN) siguiendo el protocolo de Repetto *et al.* (2008). Transcurrido el tiempo de exposición, el medio se retiró de los pozos y se realizaron lavados con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). A cada pozo se le agregaron 100 μL de RN-Medio a una concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich N4638), se incubaron durante 2 horas, se lavaron nuevamente y se extrajo el colorante con una solución de etanol: agua: ácido acético al 50:49:1%, respectivamente. La cantidad de colorante extraído se determinó registrando la absorbancia a 540 nm. Respecto a la tinción con CV, se repitió la metodología de lavados, se colocaron 50 μL de CV (Sigma CO775) en cada pozo y las microplacas se agitaron durante 15 min (Mixer Scilogex MX-M). El colorante se extrajo con una solución de ácido acético al 10% y se leyó la absorbancia a 570 nm. El porcentaje de viabilidad celular (%VC) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%VC = \left(\frac{AbM}{AbC} \right) * 100$$

Donde:

AbM: Absorbancia promedio de los pozos tratados con las muestras

AbC: Absorbancia promedio de los pozos control

7.7 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE). Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA de una vía a un nivel de significancia del 95% seguido de la prueba Dunnett, para comparaciones múltiples utilizando el programa MINITAB 20. Las diferencias significativas se determinaron por el valor de $p < 0.05$ (*).

VIII. RESULTADOS

8.1 Colecta de muestras biológicas

Fueron recolectadas un total de 155 anémonas de la especie *Telmatactis panamensis* (Figura 4) durante los cuatro muestreos, con un peso húmedo total de 350.6 g (Tabla 2). Los especímenes concuerdan con la descripción detallada de *T. panamensis* por Verrill (1869) y Carlgren (1951). Las características anatómicas observadas incluyen el tamaño, la morfología macroscópica general y el tipo de cnidocistos.



Figura 4. Ejemplar de la anémona *Telmatactis panamensis* identificado en la colecta.
Foto por Galván-Villa C.M.

Tabla 2. Registro de colecta de *Telmatactis panamensis*.

Muestreo	No. Ejemplares	Peso húmedo (g)
1	20	57.5
2	5	14.7
3	100	220
4	30	58.4
Total	155	350.6

8.2 Obtención del extracto crudo

La observación de alícuotas del extracto crudo al microscopio permitió verificar la descarga de las toxinas, obteniendo al final del último ciclo un total de 45-50% de nematocistos descargados.

Asimismo, se identificaron los cuatro tipos de cnidocistos distintivos presentes en la especie *Telmatactis panamensis*, reportados anteriormente por Fautin *et al.* (2007) y Acuña *et al.* (2012), los cuales se observan en la Figura 5.

Los basitricos fueron los nematocistos que se presentaron con mayor abundancia, los cuales están caracterizados por contar con espinas bien desarrolladas sólo en la base del túbulo (Figura 5A-B). Los microbásicos p-mastigóforos presentan un eje corto que se estrecha abruptamente para formar el filamento y la parte inferior del eje tiene una muesca-ranura en forma de V invertida prominente (Figura 5C-D). Mientras que, los microbásicos amastigóforos están caracterizados por la ausencia de filamento más allá del eje, el cual es corto, menos de tres veces la longitud de la cápsula (Figura 5F). Este tipo de nematocisto se encontró raramente (Mariscal, 1974). Por último, los espirocistos tienen el túbulo fuertemente enrollado dentro de la cápsula y carece por completo de espinas como se observa en la Figura 4E (Östman, 2000).

Por otra parte, al término de la liofilización, se obtuvo el peso seco del extracto crudo total de 23.2656 g y se determinó el rendimiento con base al peso húmedo y al peso seco. Para ello, se consideró al peso húmedo como un 100% de rendimiento, obteniendo un 6.64% de rendimiento (Tabla 3).

8.3 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína en el extracto crudo de *Telmatactis panamensis* obtenida fue de 1.99 mg/mL. En lo que respecta a la concentración de proteínas referente a cada mg de extracto crudo, se obtuvo un promedio de 0.085 mg de proteína/mg de extracto crudo. El rendimiento de la proteína fue del 8.5%, calculado a partir del peso seco (100%) y la cantidad de proteína del EC.

Tabla 3. Rendimiento del extracto crudo de *T. panamensis* respecto al peso húmedo (PH) y la cantidad de proteína.

Muestra	Peso (g)	%PH ¹	%EC ²
PH	350.6	100	---
EC	23.265	6.64	100
Cantidad de proteína			
EC	1.978	0.564	8.5

¹Porcentaje con respecto al peso húmedo y peso seco del EC

²Porcentaje con respecto al peso del EC y la cantidad de proteína

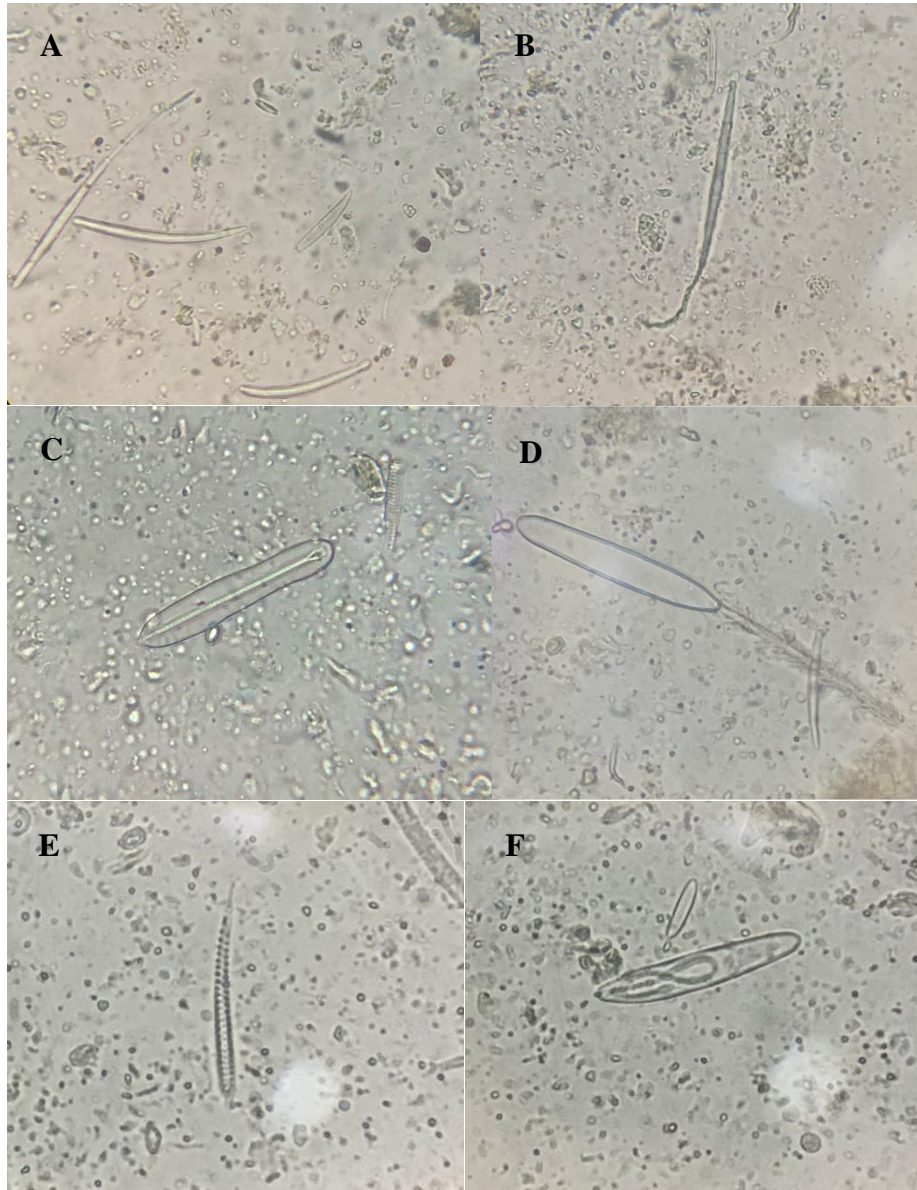


Figura 5. Tipos de cnidocistos presentes en la anémona *Telmatactis panamensis*. (A) Basitricos cargados. Objetivo: 60x. (B) Basitrico disparado. 100x. (C) Microbásico p-mastigóforo cargado. 60x. (D) Microbásico p-mastigóforo disparado. 100x. (E) Espirocisto. 100x. (F) Microbásico amastigóforo. 100x.

8.4 Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE

El análisis de la electroforesis en geles de poliacrilamida reveló el peso molecular de las proteínas del extracto crudo de la anémona *Telmatactis panamensis*, el cual contiene compuestos proteicos de bajo, mediano y alto peso molecular, desde 10 a 250 kDa, mostrado en la Figura 6. Las bandas con mayor definición son las cercanas a 75, 37, 25 y 10 kDa. Las proteínas de interés en el presente trabajo son las citolisinas que tienen un peso molecular entre 20-45 kDa; en el gel se pueden observar bandas cercanas a dichos pesos (indicadas con una flecha), lo cual pudiese evidenciar su presencia como componente proteico en el extracto crudo.

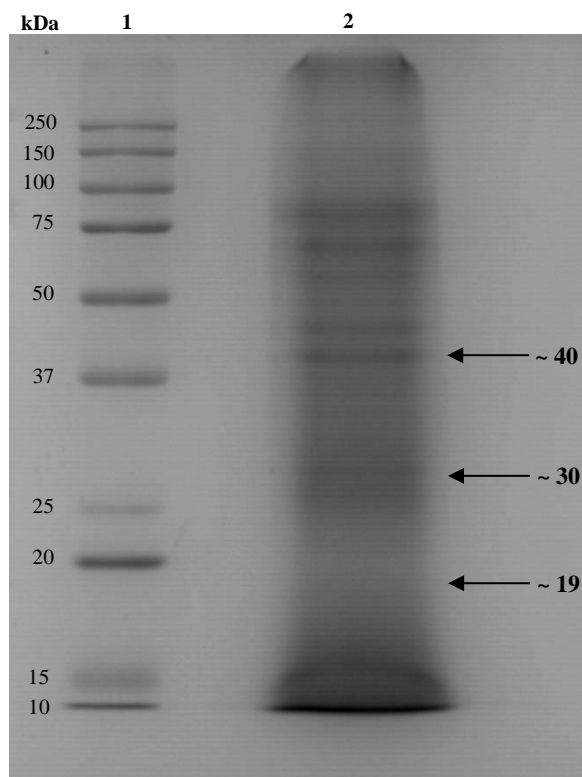


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE al 16% de acrilamida del extracto crudo de *Telmatactis panamensis*. Carril 1 corresponde al marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope. Carril 2 Extracto crudo de *T. panamensis* a una concentración de 50 mg/mL. Las flechas indican compuestos de interés, las citolisinas.

8.5 Ensayos de actividad biológica del extracto crudo

8.5.1 Ensayo *in vivo* de toxicidad

El ensayo *in vivo* con cangrejos permitió establecer la presencia de actividad tóxica del extracto crudo de *T. panamensis*. En la Tabla 4 se muestran las características de los organismos tratados. Las respuestas inducidas en los diferentes especímenes tras la inyección del EC se detallan en la Tabla 5. Los organismos control (inyectados con H₂O) se mantuvieron en estado de alerta, en movimiento activo y con reflejos. En contraste, los tres cangrejos tratados con el EC presentaron temblores, oscurecimiento del caparazón y movimiento descoordinado de ojos y pereiópodos. Los cangrejos 1 y 2 exhibieron los mismos efectos y finalmente murieron, la disección reveló la necrosis de sus órganos internos respecto al control mostrado en la Figura 7, mientras que, el cangrejo 3 regresó a un estado de comportamiento basal tras unas horas después de la inyección, por lo que permaneció vivo y no se observó oscurecimiento ni licuefacción de los tejidos internos.

Tabla 4. Características de los cangrejos *Ocypode quadrata* inyectados con extracto crudo.

Características	Cangrejo 1	Cangrejo 2	Cangrejo 3
Sexo	Macho	Hembra	Hembra
Peso (g)	12.4	6	11.1
Volumen inyectado (μL)	50	50	50
Cantidad inyectada de proteína (mg)	0.2125	0.2125	0.2125
mg proteína/g cangrejo	0.017	0.035	0.019

Tabla 5. Efectos inducidos en los cangrejos tras la inyección de EC. Los símbolos ✓ y ✗ indican presencia y ausencia del efecto, respectivamente.

Efectos	Control	Cangrejo 1	Cangrejo 2	Cangrejo 3
Temblores	✗	✓	✓	✓
Oscurecimiento del caparazón	✗	✓	✓	✓
Burbujeo	✗	✗	✗	✓
Movimiento descoordinado de ojos y/o pereiópodos	✗	✓	✓	✓
Parálisis	✗	✓	✓	✗
Muerte	✗	✓	✓	✗
Lisis de tejido	✗	✓	✓	✗



Figura 7. Disección de cangrejos *Ocypode quadrata* (A) Individuo control, inyectado con agua desionizada (B) Individuo inyectado con extracto crudo de la anémona *Telmatactis panamensis* a una concentración de 212.5 µg proteína/mL.

8.5.2 Actividad de fosfolipasas

El extracto crudo de *Telmatactis panamensis* presentó actividad de fosfolipasas tipo A. Adicionalmente, el presente ensayo permite evidenciar la actividad citolítica del EC. Específicamente, el EC a una concentración de 1 mg/mL exhibió una actividad enzimática moderada progresiva respecto al tiempo, obteniendo un índice Pz=0.455 a las 72 horas, mostrado en la Figura 8.

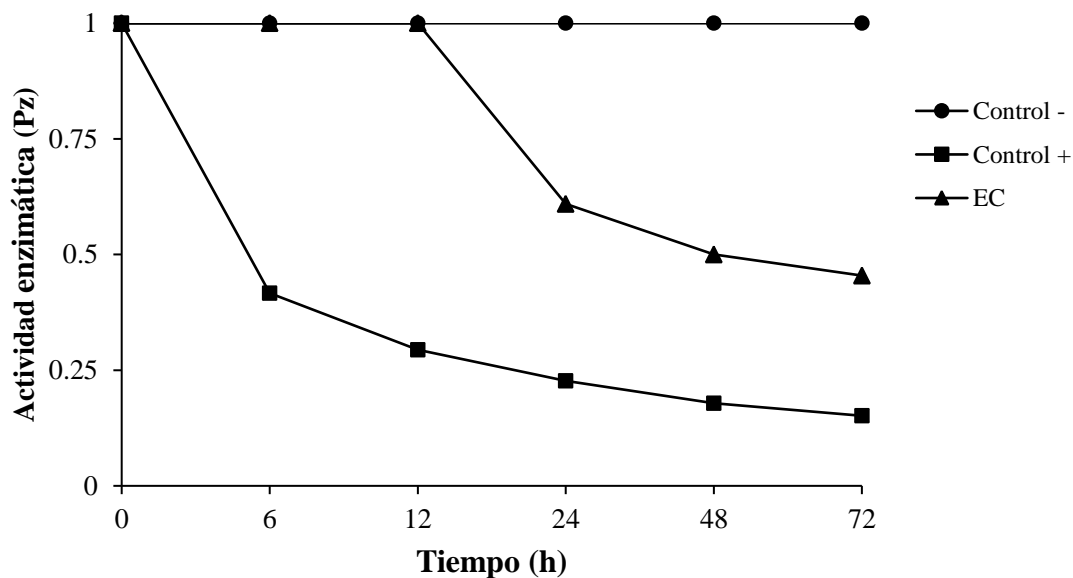


Figura 8. Actividad enzimática de fosfolipasas A del extracto crudo de *T. panamensis* respecto al tiempo. H₂O y veneno de abeja se utilizaron como control - y +, respectivamente. Valores de Pz cercanos a 1 indican nula actividad y cercanos a 0 de mayor actividad.

8.5.3 Actividad de fosfolipasa A₂ secretora

La actividad de sPLA₂ del extracto crudo de *T. panamensis* fue dependiente de la concentración de proteína, mostrada en la Tabla 6. Se obtuvieron valores de actividad enzimática de 0.1341 y 12.5938 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ a una concentración de 1 y 50 mg/mL , respectivamente. Mientras tanto, el veneno de abeja utilizado como control presentó una actividad de 22.2561 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

Tabla 6. Actividad de sPLA₂ del extracto crudo de *Telmatactis panamensis*.

Muestra	Actividad sPLA ₂ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
Veneno de abeja	22.2561
Extracto crudo	12.5938

8.5.4 Actividad hemolítica

El extracto crudo indujo una actividad hemolítica dependiente de la concentración en eritrocitos humanos, expresada como el porcentaje de liberación de hemoglobina. El 100% de actividad hemolítica se obtuvo a una concentración de proteína de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la unidad hemolítica al 50% (UH₅₀) calculada fue de 85.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 9).

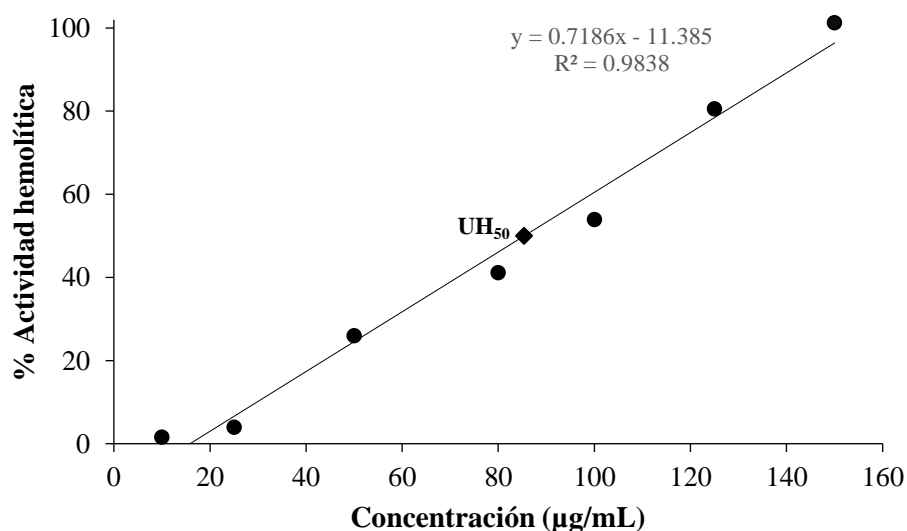


Figura 9. Actividad hemolítica del extracto crudo de *Telmatactis panamensis* sobre eritrocitos humanos. La unidad hemolítica al 50% (UH₅₀) está representada con el símbolo \blacklozenge

Datos expresados como la media \pm desviación estándar, $n = 3$.

8.5.5 Citotoxicidad en líneas celulares tumorales

Los efectos citotóxicos del extracto crudo de *T. panamensis* se probaron en distintas líneas celulares en términos de una reducción en la viabilidad celular, la cual fue evaluada primeramente por el ensayo de captación de rojo neutro (Figura 10). El extracto crudo indujo una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración y del tiempo de exposición en las células de cáncer de mama MCF-7 (Figura 10A) y glioma de rata C6 (Figura 10C), mostrando una reducción máxima en la viabilidad celular del 20% y del 1.9% a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ en un tiempo de exposición de 24 h, respectivamente. Mientras que, a las 48 h se mostró un decremento en la viabilidad de hasta un 0.61% para las células de cáncer de mama MCF-7 y un 0.73% para las células de glioma de rata C6. Por otro lado, la actividad del EC en las células de mama normales Hs 578Bst fue muy baja en las concentraciones probadas del extracto crudo (Figura 10B), el cual provocó una disminución máxima del 85% a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 h.

Para comprender mejor el conjunto de respuestas citotóxicas inducidas por el extracto crudo, se evaluó el efecto sobre la morfología celular después de 48 h de incubación. Como se puede observar en la Figura 11, la exposición del extracto de *T. panamensis* (500 $\mu\text{g/mL}$) ocasionó efectos evidentes en la morfología y en la densidad de las distintas líneas celulares. En particular, las células MCF-7 redujeron su tamaño, mostraron una densidad irregular sin la presencia de parches y presentaron una forma redondeada (Figura 11B) perdiendo su morfología típica, la cual consiste en células de forma poligonal con un crecimiento en parches discretos, como se evidencia en el grupo control sin tratamiento (Figura 11A). De igual manera, las células de glioma de rata C6 perdieron sus características morfológicas al ser expuestas al EC, presentándose en forma redondeada y disminuyeron su confluencia (Figura 11F) con respecto a las células control, las cuales tienen una morfología fusiforme con prolongaciones citoplasmáticas alargadas y presentan una densidad homogénea (Figura 11E). Por su parte, las células de mama normales Hs 578Bst no presentaron alteraciones drásticas en su morfología conservando su forma fusiforme típica y densidad (Figura 11C), solamente mostraron una disminución en su tamaño (Figura 11D).

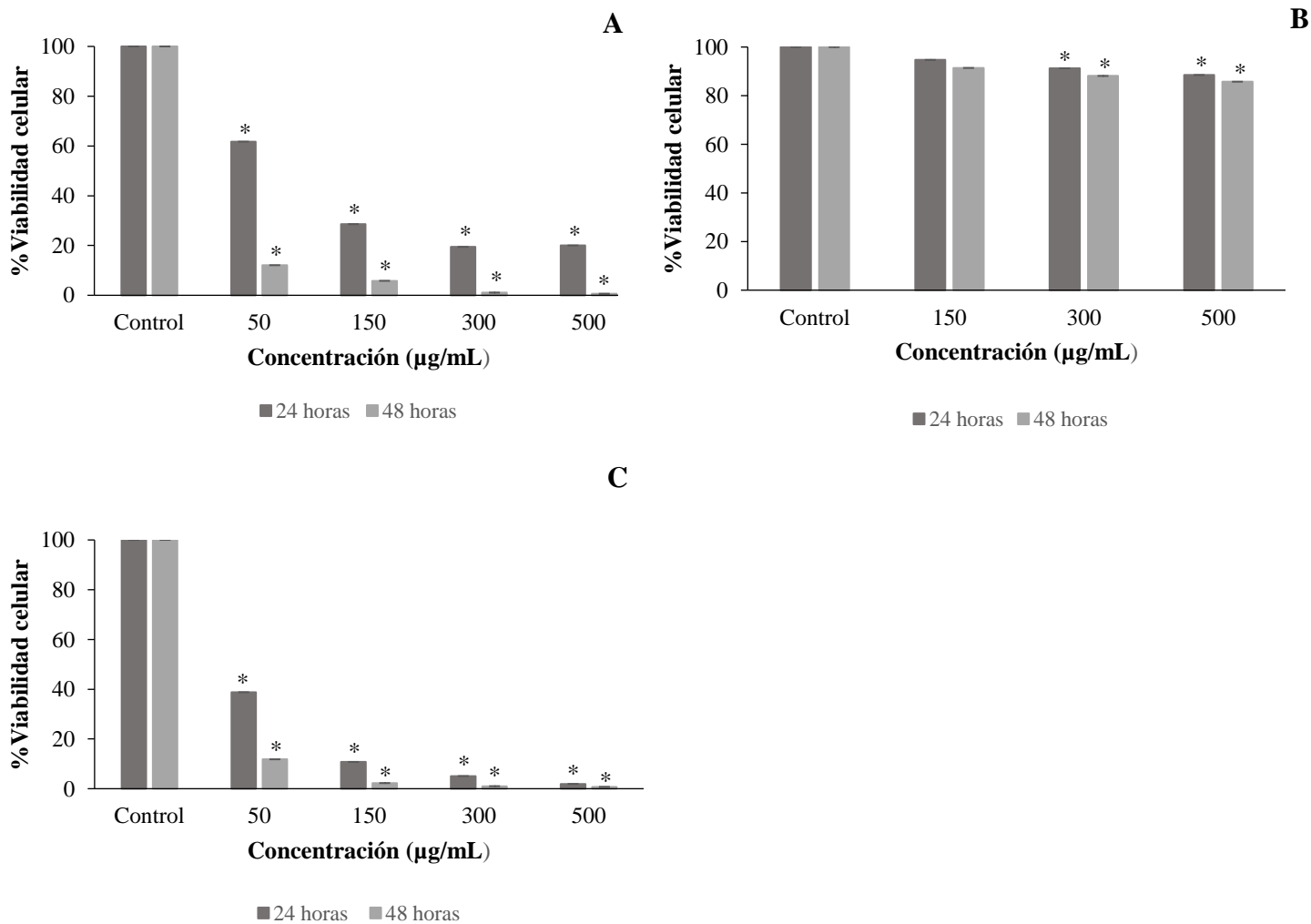


Figura 10. Efecto del extracto crudo de *Telmatactis panamensis* en la viabilidad celular de (A) cáncer de mama MCF-7, (B) células de mama normales Hs 578Bst y (C) glioma de rata C6. La actividad citotóxica se determinó por el ensayo rojo neutro después de 24 y 48 horas de exposición. El control representa el 100% de viabilidad. Datos expresados como la media \pm desviación estándar, n = 4 (ANOVA post-test Dunnett: *p < 0.05).

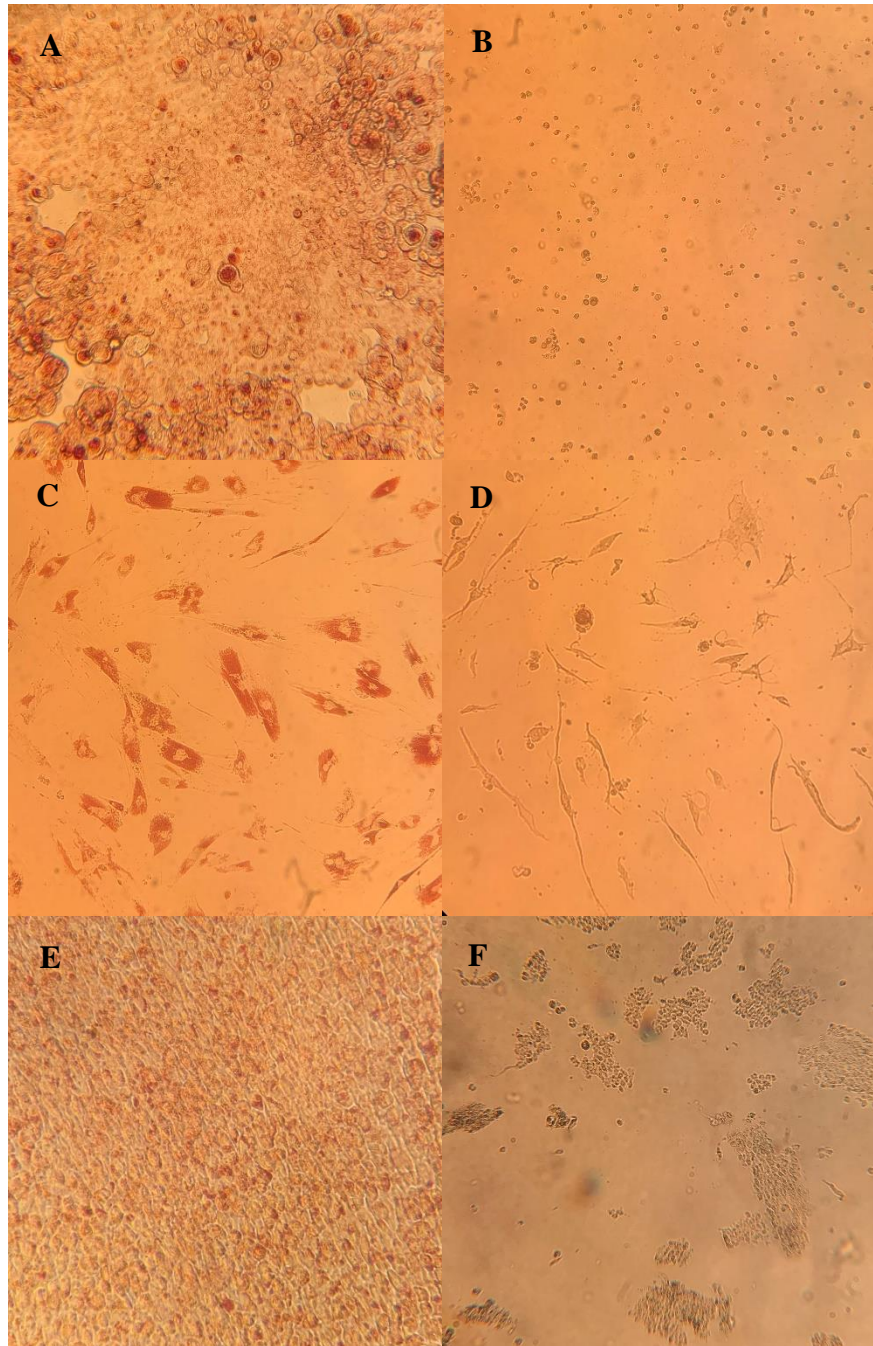


Figura 11. Cambios morfológicos en distintas líneas celulares después de 48 h de exposición con el extracto crudo de *Telmatactis panamensis* utilizando tinción con rojo neutro. A) Control MCF-7, B) Células MCF-7 tratadas con 500 µg/mL de EC, C) Control Hs 578Bst, D) Hs 578Bst con 500 µg/mL de EC, E) Control glioma de rata C6, F) C6 con 500 µg/mL de EC. Amplificación: 20x.

Posteriormente, se midió la citotoxicidad mediante el método de cristal violeta mostrando una disminución en la supervivencia de las células en un rango de concentraciones crecientes (Figura 12). El extracto crudo redujo la viabilidad de las células MCF-7 y C6 a un 11.62% (Figura 12A) y 14.37% (Figura 12C) a las 24 h. Por otra parte, en un tiempo de exposición de 48 h el porcentaje de viabilidad disminuyó a 8.46% y 11.77%, respectivamente, a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$. Las células de mama normales Hs 578Bst tratadas no presentaron efectos citotóxicos significativos en comparación con el control ($p > 0.05$), exhibiendo una respuesta máxima del 95% de viabilidad en los dos tiempos de exposición probados (Figura 12B).

El análisis estadístico con un nivel de confianza del 95% mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con los métodos de tinción rojo neutro y cristal violeta en las líneas celulares de glioma de rata y cáncer de mama MCF-7 en los tiempos de exposición de 24 y 48 horas con un valor de $p = 0.000$; en consecuencia, la prueba Dunnett para comparaciones múltiples reveló que las cuatro concentraciones probadas son estadísticamente diferentes a las 24 y 48 h. Asimismo, en las células de mama Hs 578Bst se mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con el ensayo de rojo neutro a las 24 y 48 h en las tres concentraciones probadas. Sin embargo, con el método cristal violeta no se registraron diferencias significativas entre los porcentajes de viabilidad celular en los dos tiempos de exposición ($p > 0.05$).

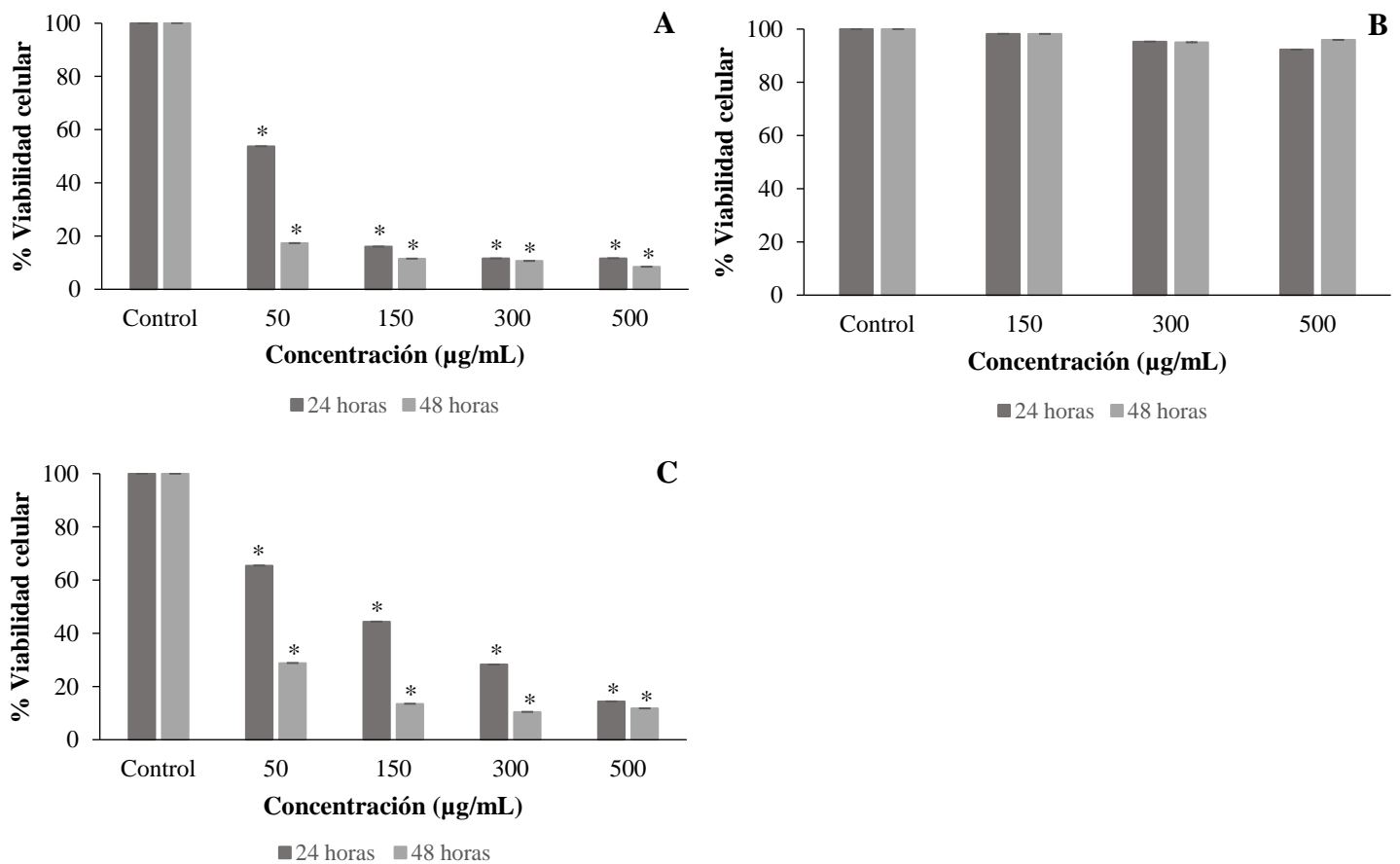


Figura 12. Efecto del extracto crudo de *Telmatactis panamensis* en la viabilidad celular de (A) cáncer de mama MCF-7, (B) células de mama normales Hs 578Bst y (C) glioma de rata C6. La actividad citotóxica se determinó por el ensayo cristal violeta después de 24 y 48 horas de exposición. El control representa el 100% de viabilidad. Datos expresados como la media \pm desviación estándar, n = 4 (ANOVA post-test Dunnett: *p < 0.05).

8.6 Fraccionamiento mediante cromatografía de líquidos de baja presión

La separación inicial del extracto crudo de *Telmatactis panamensis* por cromatografía de filtración en gel permitió identificar cinco fracciones, como se muestra en la Figura 13. Cada fracción fue concentrada, liofilizada y pesada. El rendimiento de las fracciones se calculó considerando como 100% los 3 g de EC que se utilizaron para la cromatografía, con relación al peso final de cada fracción; F1, F2, F3, F4 y F5 tuvieron un rendimiento de 11.85%, 1.2%, 5.99%, 57.98% y 7.66%, respectivamente. El peso seco, el rendimiento, la concentración y cantidad de proteína de las fracciones se muestra en la Tabla 7. La fracción con mayor rendimiento fue la F4, lo cual puede ser explicado por una elevada cantidad de sales evidenciado por el pico de conductividad en el cromatograma y por la concentración de proteína más baja de 0.007 mg/mg, respecto a las demás fracciones. Por otro lado, la F2 obtuvo el menor rendimiento, pero, sin embargo, presentó una elevada concentración de proteína de 0.181 mg/mg. Tras el proceso de diálisis, el peso seco de las fracciones 4 y 5 disminuyó considerablemente y, por ende, el rendimiento resultante fue menor del 1%. Por el contrario, la concentración de proteína de ambas fracciones aumentó (Tabla 7).

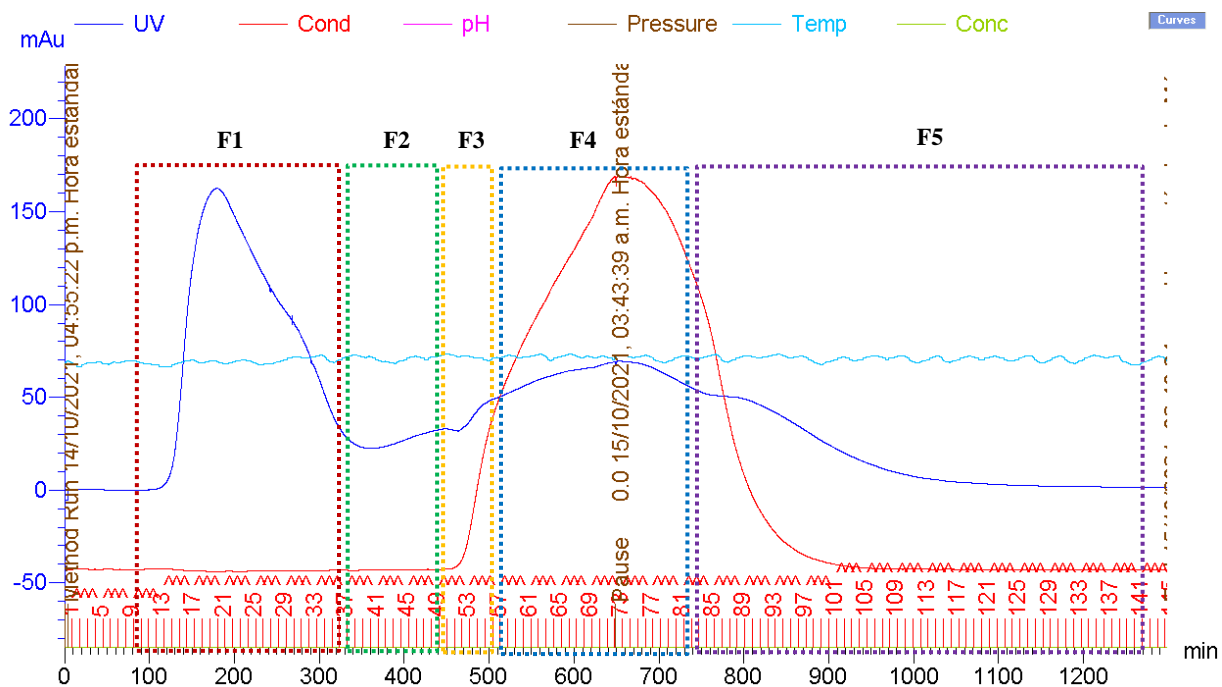


Figura 13. Cromatograma de filtración en gel Sephadex G-50 M del extracto crudo de *Telmatactis panamensis* (3 g). La columna fue equilibrada y eluída con ácido acético 0.3 M a un flujo de 2.0 mL/min, a una longitud de onda 280 nm para obtener las fracciones con volumen de 18 mL. Las cinco fracciones están delimitadas por una línea punteada.

Tabla 7. Peso seco, rendimiento y concentración de proteína de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel (Sephadex G50-M) del extracto crudo de *Telmatactis panamensis*.

Muestra	Peso (g)	%R^a	Concentración proteína (mg)*	Cantidad proteína (g)	%EC^b
EC	3	100	0.085	0.255	--
F1	0.3554	11.85	0.143	0.051	1.69
F2	0.036	1.20	0.181	0.007	0.22
F3	0.1796	5.99	0.034	0.006	0.20
F4	1.7395	57.98	0.007	0.012	0.41
F5	0.2298	7.66	0.010	0.002	0.08
F4 _d	0.0424	1.41	0.065	0.003	0.09
F5 _d	0.0043	0.14	0.074	0.0003	0.01

Subíndice d: fracción dializada

*Miligramos de proteína por miligramo de extracto crudo

^aRendimiento con base al peso del extracto crudo utilizado en la cromatografía y el peso de cada fracción (g)

^bPorcentaje con base al peso del extracto crudo utilizado (g) y la cantidad de proteína de cada fracción (g)

8.6.1 Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE

Los geles correspondientes a las fracciones prepurificadas se visualizaron en un fotodocumentador UVP ChemiDoc-It² 510 Imager, obteniendo la Figura 14, donde se observan proteínas de alto, mediano y bajo peso molecular para cada una de las fracciones. De manera que la separación del extracto crudo en la cromatografía fue ineficiente debido a que las fracciones contienen una mezcla compleja de proteínas con un rango de pesos moleculares similar que abarca desde los 250 a 10 kDa.

Las bandas de peso molecular con mayor definición se observan cerca de 75, 37 y 25 kDa en F1, mientras que en la F2 las bandas más marcadas son de bajo peso molecular cercanas a 20, 15 y 10 kDa (Figura 14A). Respecto a las F3, F4_d y F5_d (fracciones dializadas), muestran un patrón similar de pesos moleculares, destacando las bandas próximas a 75, 50, 20, 15 y 10 kDa (Figura 14B). Las cinco fracciones presentaron bandas entre 20-45 kDa, lo cual pudiese evidenciar la presencia de compuestos con actividad citolítica, posiblemente citolisinas.

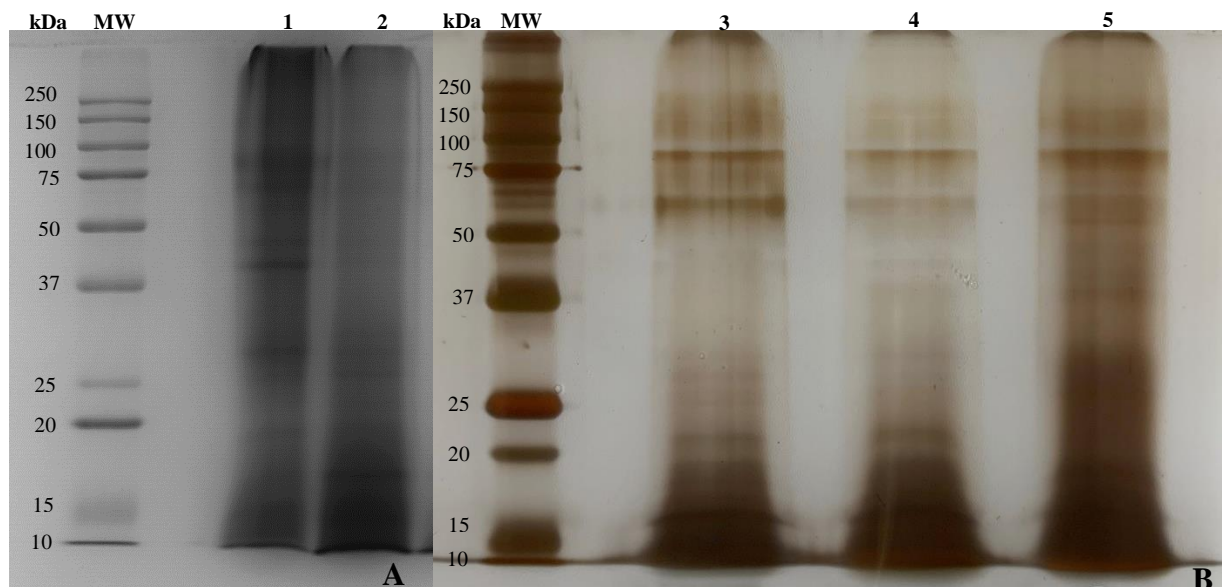


Figura 14. Electroforesis SDS-PAGE al 16% de acrilamida de las fracciones prepurificadas de *Telmatactis panamensis*. (A) Gel teñido con azul de Coomassie® G-250. Carril 1 F1. Carril 2 F2 (B) Gel teñido con plata. Carril MW corresponde al marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope. Carril 3 F3. Carril 4 F4_d. Carril 5 F5_d.

8.6.2 Ensayos de actividad biológica de las fracciones

8.6.2.1 Ensayo *in vivo* de toxicidad

La toxicidad de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel a partir del extracto crudo se examinó en cangrejos. Para ello, se sometió a prueba un organismo por cada fracción a distintas concentraciones, mostradas en la Tabla 8. Asimismo, se sintetizan los efectos observados, de los cuales cabe destacar que las fracciones 1 y 2 provocaron respuestas similares en los cangrejos tales como oscurecimiento del caparazón, burbujeo, movimiento descoordinado de ojos y pereiópodos, necrosis de órganos internos y la muerte (Figura 15).

La fracción 3 ocasionó efectos neurotóxicos y citolíticos, a una concentración de proteína menor que las F1 y F2. Mientras que, las fracciones 4 y 5 provocaron temblores, oscurecimiento del caparazón y movimiento descoordinado de pereiópodos, los cuales fueron de corta duración, ya que los individuos regresaron a su estado basal al transcurrir unas horas a partir de la inyección; sin embargo, fueron sacrificados para realizarles la necropsia que evidenció la lisis y oscurecimiento de los órganos internos ocasionado sólo por la F4 (Figura 15D).

Tabla 8. Características y respuestas de los cangrejos tras la inyección de las fracciones prepurificadas del extracto crudo de *Telmatactis panamensis*.

	Cangrejo 1	Cangrejo 2	Cangrejo 3	Cangrejo 4	Cangrejo 5
Peso (g)	22.9	21.1	17.6	13.7	20.7
Sexo	Macho	Hembra	Hembra	Hembra	Macho
Fracción inyectada	F1	F2	F3	F4	F5
Cantidad de proteína (mg)	0.179	0.226	0.068	0.028	0.04
mg proteína/g cangrejo	0.008	0.010	0.004	0.002	0.002
Temblores	×	✓	✓	✓	×
Oscurecimiento del caparazón	✓	✓	✓	✓	✓
Burbujeo	✓	✓	✓	×	×
Movimiento descoordinado de ojos y/o pereiópodos	✓	✓	✓	✓	✓
Parálisis	×	×	✓	×	×
Muerte	✓	✓	✓	×	×
Lisis de tejido	✓	✓	✓	✓	×

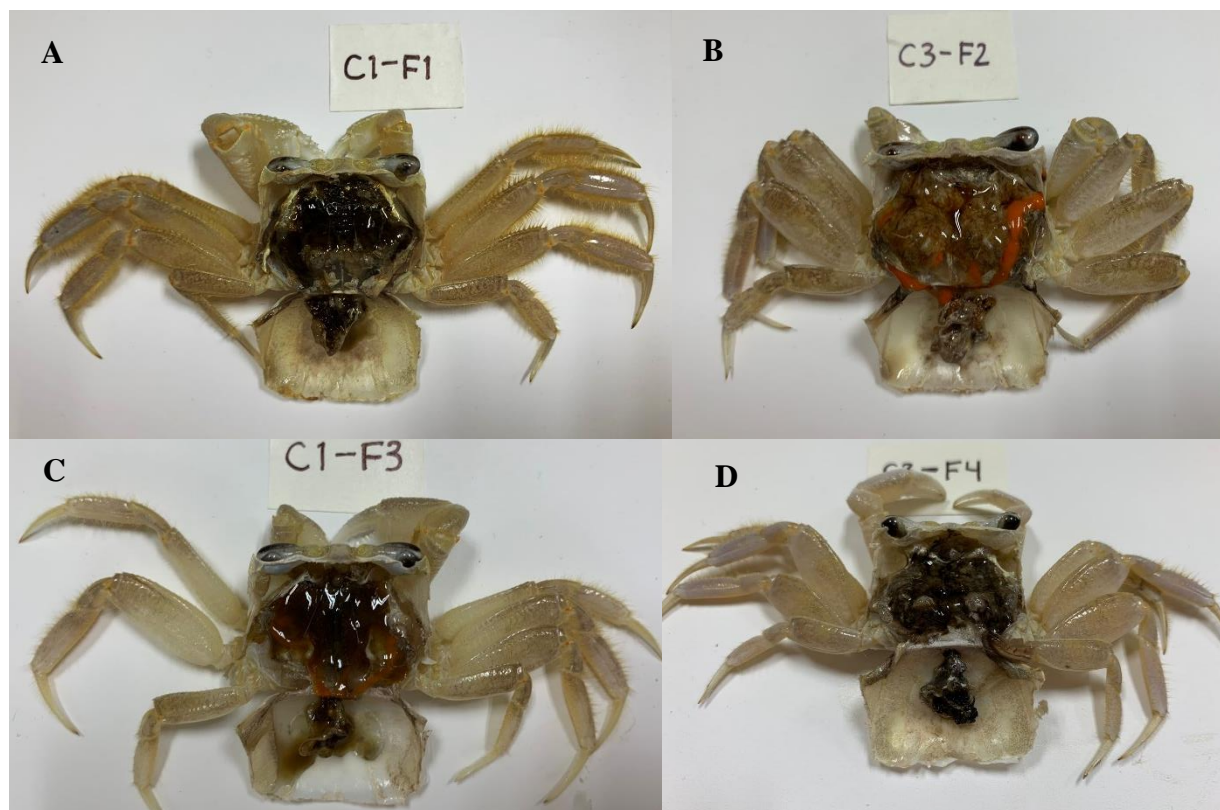


Figura 15. Disección de cangrejos *Ocypode quadrata* inyectados con fracciones prepurificadas. (A) F1 (0.179 mg de proteína) (B) F2 (0.226 mg proteína) (C) F3 (0.068 mg proteína) (D) F4 (0.028 mg proteína).

8.6.2.2 Actividad de fosfolipasas

El ensayo evidenció la actividad enzimática de las fosfolipasas A presentes en algunas de las fracciones prepurificadas a partir del extracto crudo de *T. panamensis*, mostrada en la Figura 16. En específico, la fracción 2 presentó la mayor actividad enzimática alcanzando un $Pz=0.275$ a las 72 h, comparado con las demás fracciones. Mientras que, las fracciones 1 y 3 exhibieron una actividad de fosfolipasas moderada similar con un índice de actividad aproximado de 0.30 a las 72 h. Por último, las fracciones 4 y 5 no presentaron actividad enzimática a las distintas concentraciones probadas, por lo que, no se incorporaron al gráfico.

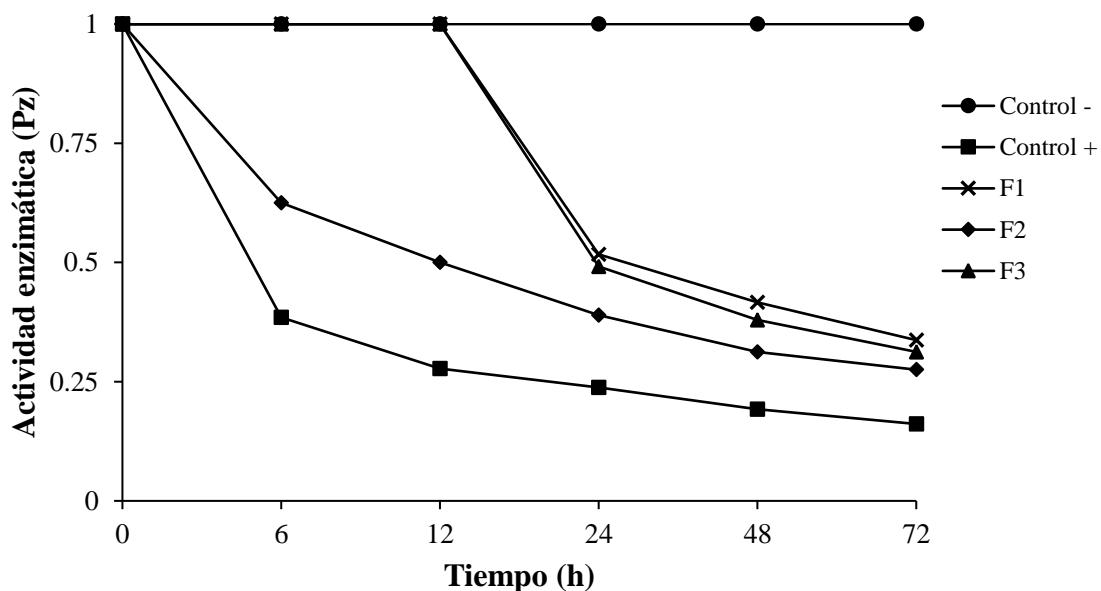


Figura 16. Actividad enzimática de fosfolipasas A de fracciones prepurificadas del extracto crudo de *T. panamensis* respecto al tiempo. H₂O y veneno de abeja se utilizaron como control – y +, respectivamente. Valores de Pz cercanos a 1 indican nula actividad y cercanos a 0 de mayor actividad.

8.6.2.3 Actividad de fosfolipasa A₂ secretora

La actividad enzimática de sPLA₂ de las fracciones prepurificadas del extracto crudo de *T. panamensis* se muestra en la Tabla 9. Generalmente, se obtuvieron valores bajos en todas las fracciones comparado con el veneno de abeja, utilizado como control positivo. En específico, la fracción 1 presentó la actividad de sPLA₂ menor (0.0389 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), mientras que, la fracción 2 exhibió el valor enzimático más alto (0.2910 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$).

Tabla 9. Actividad de sPLA₂ de las fracciones prepurificadas del extracto crudo de *T. panamensis*.

Muestra	Actividad sPLA ₂ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
Veneno de abeja	22.2561
F1	0.0389
F2	0.2910
F3	0.2111
F4 _d	0.1156

8.6.2.4 Actividad hemolítica

La actividad hemolítica de las fracciones prepurificadas de *T. panamensis* fue variable a las distintas concentraciones probadas (Figura 17). Particularmente, las fracciones 3 y 4_d indujeron un efecto hemolítico dependiente de la concentración similar, obteniendo valores de la UH₅₀ de 132 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. En contraste, las fracciones 1 y 2 no presentaron una actividad hemolítica significativa, comparada con las fracciones anteriores. Ambas ocasionaron un efecto máximo aproximado de 8 y 17% de hemólisis, respectivamente, a distintas concentraciones.

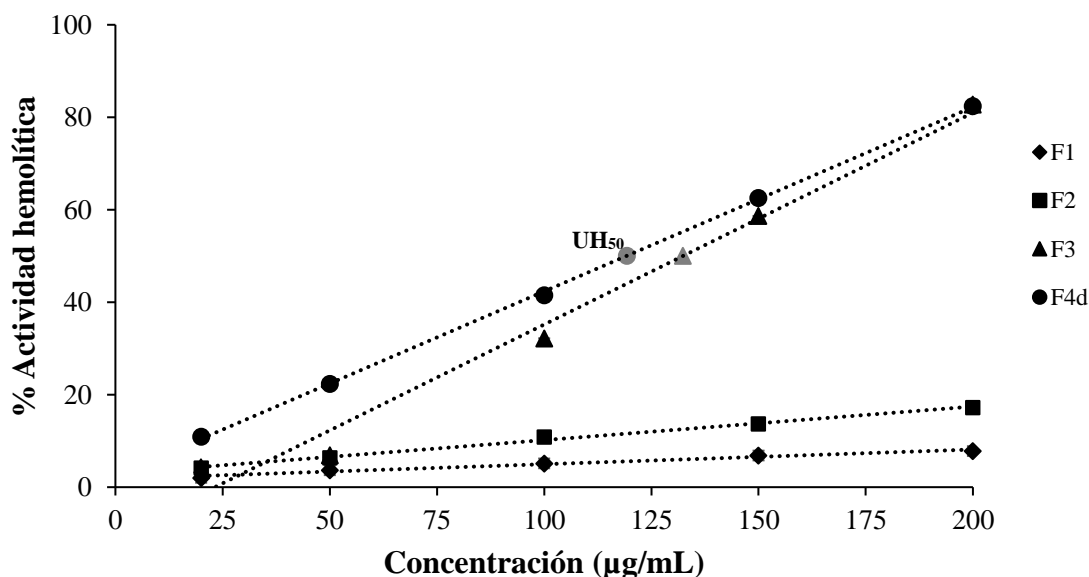


Figura 17. Actividad hemolítica de las fracciones prepurificadas de *Telmatactis panamensis* sobre eritrocitos humanos. La unidad hemolítica al 50% (UH₅₀) está representada con color gris oscuro. Datos expresados como la media \pm desviación estándar, n = 3.

8.6.2.5 Citotoxicidad en líneas celulares tumorales

En general, el extracto crudo de *T. panamensis* provocó una mayor disminución en la viabilidad celular en las líneas celulares tumorales MCF-7 y C6 en comparación con las fracciones purificadas de forma parcial (Tabla 10). Por otro lado, los efectos citotóxicos ejercidos por las fracciones fueron variables en las dos líneas celulares tumorales probadas. Específicamente, presentaron una mayor citotoxicidad frente a las células de glioma de rata C6 en contraste con las células de cáncer de mama MCF-7. Mientras que, las fracciones ejercieron un efecto citotóxico bajo en las células de mama normales Hs 578Bst.

Respecto a las células de glioma de rata C6, la F1 exhibió la mayor actividad citotóxica sólo a la concentración de 500 µg/mL, disminuyendo significativamente su viabilidad a 2.09% y 0.82% correspondientes a 24 y 48 h ($p < 0.05$) (Tabla 10). Los efectos citotóxicos de la F2 en la viabilidad celular fueron independientes de la concentración y del tiempo, mostrando valores máximos por debajo del 12% a una concentración de 300 µg/mL ($p < 0.05$) (Figura 18A). Por último, la exposición de la F3 provocó una respuesta citotóxica significativa dependiente de la concentración así como del tiempo de exposición, obteniendo una disminución de 11.64% a las 24 h y de 2.64% a las 48 h ($p < 0.05$) (Figura 18B).

La línea celular MCF-7 mostró una menor sensibilidad frente a las fracciones prepurificadas. Específicamente, la F3 presentó la mayor citotoxicidad dependiente de la concentración pero no del tiempo de exposición, reflejándose en una disminución significativa en la viabilidad en todas las concentraciones probadas a las 24 horas hasta un 52% a 500 µg/mL ($p < 0.05$) (Figura 18C). La F4_d presentó el mismo patrón que la F3; las concentraciones significativamente diferentes disminuyeron la viabilidad celular hasta un 69.01% a las 24 h (Figura 18D). En el caso de las fracciones restantes (F1-F2), las respuestas citotóxicas no fueron dependientes de la concentración o del tiempo de exposición, y los porcentajes de viabilidad celular inducidos por estas fueron más altos (Tabla 10). En contraste, las células de mama normales Hs 578Bst mostraron un efecto tóxico bajo significativo únicamente a una concentración de 500 µg/mL, con valores de viabilidad superiores al 85%, por lo que, la actividad citotóxica de las fracciones frente a esta línea celular en particular es menor comparada con las líneas celulares tumorales (Tabla 10, Figura 18E-F).

Los valores de viabilidad celular obtenidos con el método de tinción cristal violeta concuerdan con los resultados del ensayo rojo neutro (Tabla 11). Sin embargo, los porcentajes de viabilidad evaluados con cristal violeta son más altos respecto a los obtenidos con el rojo neutro, debido a que existe una sobreestimación dada por el carácter no vital del colorante. De igual manera, ambos ensayos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las líneas celulares tumorales C6 y MCF-7 a las 24 y 48 h de exposición. En contraste, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los porcentajes de viabilidad de las células de mama normales Hs 578Bst con el método cristal violeta.

Tabla 10. Viabilidad de distintas líneas celulares tratadas con extracto crudo y fracciones prepurificadas de *Telmatactis panamensis* por 24 y 48 horas a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$. La citotoxicidad se evaluó por el método de tinción rojo neutro.

	C6 ¹		MCF-7 ²		Hs 578Bst ³	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
EC	1.9*	0.73*	20.0*	0.61*	88.47*	85.74*
F1	2.09*	0.82*	70.57	86.94*	93.24*	89.95*
F2	17.92*	22.02*	83.23*	89.99*	90.65*	85.22*
F3	11.64*	2.65*	52.40*	71.64*	87.65*	89.23*
F4a	N/A	N/A	69.01*	97.22	88.58*	88.41*

¹Glioma de rata, ²Cáncer de mama, ³Células de mama normales
 N/A No aplica, muestra no probada
 ANOVA post-test Dunnett: * $p < 0.05$

Tabla 11. Viabilidad de distintas líneas celulares tratadas con extracto crudo y fracciones prepurificadas de *Telmatactis panamensis* por 24 y 48 horas a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$. La citotoxicidad se evaluó por el método de tinción cristal violeta.

	C6 ¹		MCF-7 ²		Hs 578Bst ³	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
EC	14.37*	11.77*	11.62*	8.46*	92.27	95.95
F1	33.56*	10.15*	76.67*	100	98.56	96.03
F2	N/A	N/A	85.00*	86.57*	97.92	93.82*
F3	48.49*	20.13*	76.86*	76.82*	98.38	100
F4a	N/A	N/A	94.18	90.82*	98.84	98.40

¹Glioma de rata, ²Cáncer de mama, ³Células de mama normales
 N/A No aplica, muestra no probada
 ANOVA post-test Dunnett: * $p < 0.05$

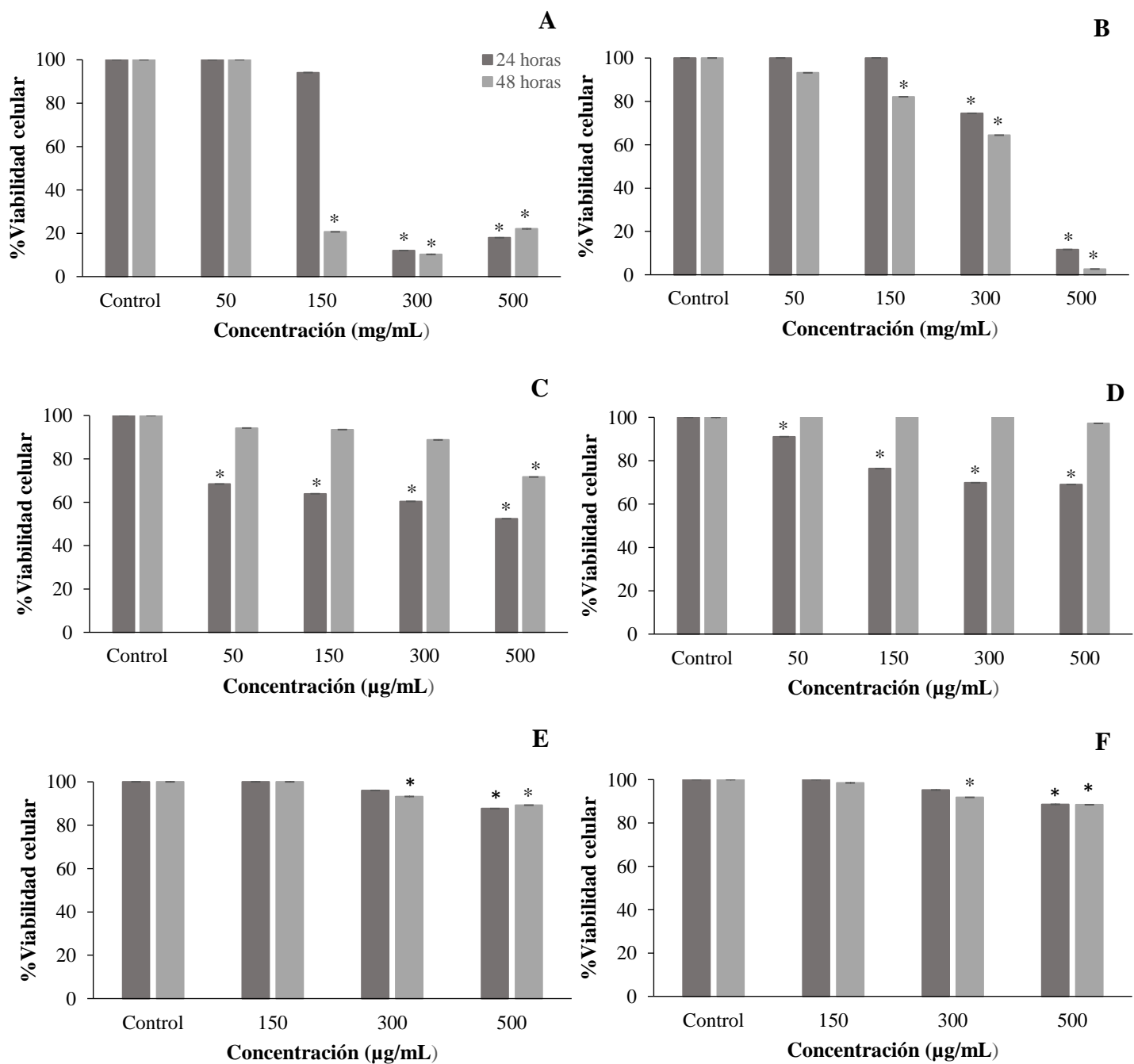


Figura 18. Efecto de las fracciones de *Telmatactis panamensis* en la viabilidad celular de líneas celulares tumorales (A) F2 en glioma de rata C6, (B) F3 en glioma de rata C6, (C) F3 en cáncer de mama MCF-7 y (D) F4_d en cáncer de mama MCF-7 (E) F3 en células de mama Hs 578Bst (F) F4_d en células de mama Hs 578Bst. La actividad citotóxica se determinó por el ensayo rojo neutro después de 24 y 48 horas de exposición. El control representa el 100% de viabilidad. Datos expresados como la media \pm desviación estándar, n = 4 (ANOVA post-test Dunnett: *p < 0.05).

IX. DISCUSIÓN

El phylum Cnidaria contiene una amplia variedad de organismos únicos que poseen adaptaciones importantes que se desarrollaron durante millones de años con la finalidad de asegurar su sobrevivencia en un entorno altamente competitivo. Una de estas adaptaciones es la presencia de toxinas que les confirió una ventaja ecológica importante durante el establecimiento de interacciones antagonistas como la depredación de sus presas, la defensa contra depredadores y la competencia intra e interespecífica (Chang *et al.*, 2015; Ashwood *et al.*, 2020), y lo cual se ve reflejado en la gran complejidad y diversidad química de las toxinas. Por lo tanto, los cnidarios representan una fuente invaluable de compuestos bioactivos útiles en la generación de nuevos fármacos. En este sentido, la evaluación de la bioactividad de los extractos de cnidarios proporciona una visión general de las propiedades de sus compuestos y su potencial farmacológico. Para explorar cualquier posible aplicabilidad, se identifica la presencia de toxinas mediante diferentes bioensayos. De igual manera, estas evaluaciones son importantes, ya que permiten obtener información sobre la toxicidad y los mecanismos de defensa de los cnidarios (García-Arredondo *et al.*, 2016).

A pesar de que la mayoría de los estudios toxicológicos de los cnidarios se han centrado en la clase Anthozoa, el orden Actiniaria permanece relativamente inexplorado, dado que el conocimiento de los componentes tóxicos es muy limitado debido al número reducido de toxinas identificadas hasta la fecha.

9.1 Obtención del extracto crudo

En el presente trabajo se reporta el aislamiento y caracterización de las toxinas de la anémona *Telmatactis panamensis*, representando el primer estudio toxinológico de dicha especie. Durante la obtención del extracto crudo se realizó la identificación de los diferentes tipos de cnidocistos distintivos presentes en *T. panamensis*; espirocistos, basitricos, microbásico p-mastigóforos y microbásico amastigóforos, los cuales permiten confirmar su identidad taxonómica. Este resultado coincide con el cnidoma descrito previamente por estudios taxonómicos realizados por Acuña *et al.* (2012) para la identificación de los especímenes. Además, el tipo de nematocisto microbásico amastigóforo se encontró escasamente; solamente dos cápsulas fueron visualizadas y

este resultado concuerda con el reporte de Fautin *et al.* (2007) referente al tipo, distribución y tamaño del cnidoma de *T. panamensis*.

Las principales limitaciones en la bioprospección de toxinas aisladas de cnidarios son las dificultades en el muestreo, la falta de suministro sostenible, escasa disponibilidad de compuestos bioactivos, difícil obtención de muestras puras y la insuficiente cantidad de extracto (Bordon *et al.*, 2020; Jayathilake & Gunathilake, 2020). Específicamente, en el caso de invertebrados marinos el rendimiento de los extractos es mermado por su alto contenido en agua y sales inorgánicas, que además pueden afectar los procesos de separación (Martins *et al.*, 2014). El rendimiento del extracto crudo de *T. panamensis* con respecto al peso húmedo fue de 6.64%. Resultados similares se han evidenciado en otras especies de anémonas, que demuestran la problemática de un rendimiento restringido del extracto crudo. El extracto crudo de *Lebrunia danae* presentó un rendimiento de 6.4% (Chávez-Villela, 2017), mientras que el de *Bunodeopsis globulifera* exhibe un 4.02% de rendimiento (Flores-Pérez, 2017).

La concentración de proteína en el EC fue de 0.085 mg de proteína/mg para el extracto crudo. Diversos estudios han reportado una concentración de proteína variable para distintas especies de anémonas. El EC de *Bartholomea annulata* exhibió una concentración de proteína de 0.5 mg/mg (Colom-Casanovas, 2014). En contraste, para *B. globulifera* se reportó de 0.034 mg de proteína/mg extracto crudo (Monroy-Estrada *et al.*, 2013). La variabilidad en la concentración de proteína en las distintas especies de anémonas puede ser explicada por la presencia de patrones dinámicos espaciales y temporales de la composición proteica del veneno, los cuales están sujetos a cambios en los factores biológicos presentes en su ciclo de vida, como la dieta y las etapas ontogenéticas, junto con cambios en los factores ambientales como la salinidad, temperatura, radiación ultravioleta y ubicación geográfica. Asimismo, podría deberse a diferencias en el método de cuantificación utilizado o al método de extracción de las toxinas (Ashwood *et al.*, 2020; Surm & Moran, 2021).

9.2 Separación por cromatografía de filtración en gel

El aislamiento y purificación de los componentes del veneno se lleva a cabo por dos razones principales: (1) para identificar y caracterizar los componentes responsables de la actividad observada en un bioensayo; o (2) para estudiar la diversidad química completa con el objetivo de

descubrir nuevos compuestos con potencial farmacológico (Vetter *et al.*, 2011). Específicamente, las técnicas de purificación de las toxinas de cnidarios más utilizadas consisten en varios pasos de separación empleando como primer paso la cromatografía de filtración en gel, siendo los geles de Sephadex G ideales para el fraccionamiento de mezclas proteicas solubles en agua. Este paso es comúnmente seguido de cromatografía de intercambio iónico y una purificación final por HPLC de fase reversa (Jayathilake & Gunathilake 2020). El extracto crudo de *Telmatactis panamensis* se prepurificó mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando Sephadex G-50 M, obteniendo diferentes picos que se dividieron en cinco fracciones F1-F5 (Figura 9). Tras someter las fracciones a un análisis electroforético con la finalidad de monitorear la separación adecuada de los compuestos proteicos por tamaño mediante la cromatografía se evidenció un patrón similar de pesos moleculares entre 10 y 250 kDa (Figura 10), por lo que la separación cromatográfica inicial del EC no logró resolver adecuadamente las fracciones, puesto que las fracciones constituyen mezclas proteicas heterogéneas respecto al tamaño. Una de las desventajas que se ha demostrado en el uso de Sephadex G-50 M como matriz es la presencia de una resolución relativamente baja (Houssen & Jaspars, 2006), lo cual es consistente con el cromatograma obtenido donde se observa que las señales se juntan sin tener un límite definido dificultando así la separación clara entre estas.

Los objetivos en esta etapa de prepurificación son simplificar la composición del extracto dividiéndolo en grupos de compuestos que comparten características fisicoquímicas similares y eliminar la mayor parte de los materiales no deseados y así enriquecer el extracto con respecto a los compuestos objetivo. Sin embargo, uno de los principales obstáculos en el proceso de separación es la abundancia de sales transferidas del agua de mar y de los propios organismos a los extractos acuosos que aun después del fraccionamiento se conservan en las muestras, y que a su vez interfieren en la caracterización de la actividad biológica, ya que pueden provocar falsos positivos y falsos negativos en los bioensayos. Por lo que, procedimientos complementarios de desalinización se deben de llevar a cabo (Houssen & Jaspars, 2006). Esto concuerda con lo obtenido con la fracción 4 en el proceso de prepurificación del extracto crudo de *T. panamensis*, la cual presenta una señal de conductividad alta indicando un elevado contenido de sales; en consecuencia, presenta el rendimiento mayor respecto a las demás fracciones (Tabla 6). Posterior a la desalinización por medio de diálisis, el rendimiento de las F4_d y F5_d decreció

considerablemente y la concentración de proteína aumentó, por lo que ambas fracciones se enriquecieron de compuestos proteicos al descartar algunos compuestos orgánicos y las sales.

Aunado a los resultados anteriores, el rendimiento total final de las fracciones de *T. panamensis* disminuyó significativamente de 84.67 a 20.59%, representando una recuperación de una quinta parte a partir del extracto crudo. Diversos estudios han demostrado que la obtención de muestras puras a partir de extractos de anémonas en cantidades suficientes representa otro desafío en las etapas de purificación. La separación cromatográfica por medio de Sephadex G-50 M del extracto de *Phymanthus crucifer* (Rodríguez *et al.*, 2012) y *Anthopleura elegantissima* (Bruhn *et al.*, 2001) proporcionó un rendimiento del 12 y 20%, respectivamente. Por lo tanto, la prepurificación del extracto crudo de *T. panamensis* fue ineficiente para la recuperación de las fracciones presentando un bajo rendimiento en general.

La purificación del extracto crudo de *T. panamensis* puede ser mejorada empleando una estrategia de separación multidimensional que comprende distintos pasos cromatográficos incluyendo filtración en gel, intercambio iónico y fase reversa acoplada con HPLC, que aumentan la resolución y la detección de los compuestos proteicos de interés, las citolisinas particularmente.

9.3 Electroforesis SDS-PAGE

Los nematocistos de las anémonas contienen una mezcla compleja de toxinas, principalmente proteínas y péptidos (Anderluh & Maček, 2002). Por lo tanto, la presencia de compuestos proteicos en el extracto crudo y fracciones de *Telmatactis panamensis* se evidenció mediante un análisis electroforético, el cual reveló que el extracto crudo y fracciones contienen polipéptidos con un peso molecular entre 10 kDa y 250 kDa. Resultados similares se han registrado en el extracto crudo y fracciones de la anémona *Anthopleura dowii* (10-250 kDa) (Ramírez-Carreto, *et al.*, 2019); el EC y la fracción I (P-I) de *Anthopleura nigrescens* presentan un rango entre 8-220 kDa (Alvarado *et al.*, 2014); para el EC de *Lebrunia danae* reportan pesos moleculares cercanos a 10 kDa hasta 250 kDa (Chávez-Villela, 2017). Con base en estudios de otras especies de anémonas, las enzimas que hidrolizan fosfolípidos corresponden a masas entre 12 y 45 kDa, mientras que las citolisinas se encuentran principalmente en la región de 20 kDa (Madio *et al.*, 2019). Adicionalmente, contienen péptidos neurotóxicos de bajo peso molecular, en su mayoría entre 3 y 7 kDa (Anderluh & Maček, 2002). Tanto el extracto crudo como las fracciones de *T. panamensis*

revelaron al menos una banda proteica alrededor de 20 kDa, lo que sugiere la presencia de actinoporinas.

Los extractos crudos de cnidarios además de contener una mezcla de toxinas provenientes de los nematocistos también albergan contaminantes proteicos de los remanentes del tejido corporal (Rodríguez *et al.*, 2012) derivados del método de extracción de toxinas en el que se utiliza todo el cuerpo de los organismos. En este sentido, la presencia de bandas de proteínas de alto peso molecular (mayores a 100 kDa) en el extracto crudo de *T. panamensis* pudiese deberse a los restos corporales que se evidenciaron durante la metodología de extracción, en el que los organismos se sometieron a una combinación de estímulos mecánicos, eléctricos y osmóticos. En contraste, aquellos estudios donde utilizan métodos menos invasivos, como estimulación eléctrica o shock hipotónico, permiten obtener extractos crudos con mayor pureza respecto a las toxinas contenidas en los nematocistos. Así, por ejemplo, el extracto de *Phymactis papillosa* obtenido por shock hipotónico muestra un patrón electroforético con pesos moleculares de 5-25 kDa (Cuya & Escobar, 2017).

La electroforesis se utiliza comúnmente como una técnica complementaria al proceso de purificación, la cual permite determinar la pureza de las fracciones obtenidas a lo largo de los distintos pasos cromatográficos. El perfil electroforético de las fracciones prepurificadas de *T. panamensis* mediante filtración en gel Sephadex G-50 M mostró un rango semejante de pesos moleculares de compuestos proteicos de 10-250 kDa. No obstante, ligeras diferencias entre las fracciones se observaron; en particular, la F3 y F4_d presentaron con mayor definición bandas de bajo peso molecular. Este resultado es consistente con lo esperado, ya que la cromatografía de exclusión molecular incluye a los compuestos pequeños por más tiempo, en consecuencia, son eluidos al final de la separación, siendo así contenidas en las últimas fracciones.

9.4 Ensayos de actividad biológica

9.4.1 Ensayo *in vivo* de toxicidad

El extracto crudo de *Telmatactis panamensis* mostró una actividad tóxica en los cangrejos *Ocypode quadrata* a una concentración de 0.2125 mg proteína/mL. Los organismos inyectados con EC presentaron temblores, movimiento descoordinado de pereiópodos y ojos, y parálisis; estos

efectos evidencian la actividad sobre el sistema neuromuscular ejercida por neurotoxinas. Adicionalmente, se observó necrosis en los órganos internos causada probablemente por compuestos citolíticos. Un estudio previo evaluó la toxicidad del EC de la anémona *T. bernoni* en cangrejos fantasma *O. quadrata* y reportó efectos similares, causando relajación, dificultad de movimiento, autotomía y muerte en los organismos a una concentración de 10 mg proteína/mL (Cruz-Hernández & Rodríguez-Morales, 2016). Este resultado indica que el extracto de *T. panamensis* es más potente respecto al extracto de *T. bernoni*, ya que requiere una menor concentración para exhibir una actividad tóxica.

El ensayo *in vivo* en cangrejos se usa ampliamente para evaluar la actividad tóxica de los compuestos de cnidarios debido a que sus presas naturales suelen ser crustáceos pequeños y resultan ser altamente sensibles a las neurotoxinas causando parálisis (García-Arredondo *et al.*, 2016). Asimismo, este bioensayo usualmente se acopla al proceso de purificación para buscar la actividad biológica de interés en las fracciones (Lazcano-Pérez *et al.*, 2012). En este estudio, las fracciones obtenidas por filtración en gel Sephadex G-50 M provocaron distintos efectos en los cangrejos inyectados. En general, las F1, F2, F3 y F4 presentaron efectos como necrosis y licuefacción de tejidos atribuidos a la actividad citolítica, por lo que se sugiere la presencia de citolisinas. Además, provocaron síntomas moderados de actividad neurotóxica, como movimiento descoordinado de pereiópodos y temblores. Específicamente, sólo la F3 exhibió actividad paralítica. Estos efectos son similares a los causados por la mayoría de las neurotoxinas de distintas especies de anémonas (Frazão *et al.*, 2012). Cabe destacar que la F5 no ocasionó efectos neurotóxicos y/o citolíticos significativos. Los resultados anteriores proporcionan información relevante sobre la presencia de neurotoxinas y citolisinas en el extracto crudo y fracciones de *T. panamensis*, por ende, constituyen una premisa para estudios posteriores enfocados en la purificación y caracterización de dichos compuestos.

9.4.2 Actividad de fosfolipasas A₂

La distribución de fosfolipasas A₂, enzimas definidas por su capacidad para catalizar la hidrólisis del enlace éster medio (sn-2) de los fosfolípidos, entre los miembros del Phylum Cnidaria está muy extendida encontrándose en las clases Anthozoa, Scyphozoa, Cubozoa e Hydrozoa. En particular, las PLA₂ se han descrito como una de las principales enzimas en anémonas y se ha propuesto que sus funciones tóxicas incluyen la defensa, la inmovilización y la digestión de las

presas (Frazão *et al.*, 2012). Estas enzimas proteicas se encuentran agrupadas dentro de las citolisinas tipo III, con pesos moleculares de 25-45 kDa (Madio *et al.*, 2019), sin embargo, se han encontrado PLA₂ de bajo peso molecular en algunas especies de anémonas entre 12 a 19 kDa, conocidas como fosfolipasas A₂ secretoras (sPLA₂) (Galettis & Norton, 1990; Talvinen & Nevalainen 2002; Martins *et al.*, 2009; Razpotnik *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2010; Madio *et al.*, 2019).

El presente trabajo evidencia la actividad enzimática en el extracto crudo y en algunas fracciones prepurificadas de *T. panamensis*, lo cual confirma la presencia de fosfolipasas A (PLA) como un componente activo en dicha especie de anémona. La actividad máxima de PLA en el EC fue de 0.455 a una concentración de proteína de 1 mg/mL a las 72 h. Por otro lado, entre las fracciones prepurificadas, la F2 presentó la mayor actividad enzimática Pz=0.275, mientras que, la F1 y F3 exhibieron una actividad similar de Pz=0.30 a 1 mg/mL. Varios estudios han demostrado que las toxinas de distintas especies de anémonas incluyen actividad de PLA₂. El extracto de *Lebrunia danae* y la F2 presentaron una actividad enzimática de PLA de 0.4 y 0.25, respectivamente, a una concentración de proteína de 60 µg/mL de transcurridas 72 horas (Chávez-Villela, 2017). La actividad de fosfolipasas reportada para el extracto crudo de *Bartholomea annulata* fue de Pz=0.458 a una concentración de 119.186 µg/mL; mientras tanto la FII resultó la más activa con un Pz=0.38 a 4 µg/mL (Colom-Casnovas, 2014). Con base a los resultados anteriores, se puede inferir que la actividad máxima de PLA del EC y de las fracciones es similar entre estas especies de anémonas; sin embargo, la concentración de proteína difiere, requiriendo una mayor concentración de proteína de *T. panamensis* para exhibir una actividad enzimática semejante.

La detección de PLA₂ en las toxinas de *T. panamensis* se realizó empleando dos métodos; el primero descrito por Habermann & Hardt (1972) determina de manera cualitativa la presencia de PLA, como se evidencia en los resultados obtenidos anteriormente. En cuanto al segundo método Cayman sPLA₂ Assay Kit proporciona una medición cuantitativa precisa de la actividad enzimática inducida por fosfolipasas secretoras (sPLA₂), esclareciendo específicamente el tipo de PLA₂ contenidas en el extracto crudo y fracciones. En el presente estudio, la actividad enzimática de sPLA₂ de las muestras fue variable y dependiente de la concentración utilizada. El extracto crudo de *T. panamensis* exhibió una actividad de 0.1341 y 12.5938 µmol/min/mg a una concentración de

proteína de 1 mg/mL y 50 mg/mL, respectivamente. Por otra parte, las fracciones presentaron valores bajos en general (0.0389 – 0.2910 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) comparado con el veneno de abeja (22.2561 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Estudios previos han establecido la actividad enzimática de sPLA₂ de diversas especies de cnidarios, evidenciando que varía significativamente entre las distintas especies. El extracto crudo de tres especies de corales escleractinios *Pseudodiploria strigosa*, *Siderastrea siderea* y *Porites asteroides* muestran una actividad de sPLA₂ de 0.03, 0.043, 0.048 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, respectivamente (García-Arredondo *et al.*, 2016). El veneno de la medusa *Nemopilema nomurai* y del zoantario *Palythoa caribaeorum* contienen una actividad enzimática de 8.55 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Heo *et al.*, 2016) y 0.155 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Lazcano-Pérez *et al.*, 2018). Dentro del grupo Actiniaria, solamente existe un reporte respecto la actividad enzimática de la anémona *Lebrunia danae*, el extracto crudo exhibe actividad catalítica de 0.5519 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ y las fracciones prepurificadas presentan valores bajos entre 0.0305–0.0438 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Chávez-Villela, 2017). A partir de este resultado, se demuestra que el EC de *T. panamensis* muestra una mayor actividad enzimática; sin embargo, las fracciones obtenidas tienen un patrón similar de una actividad de sPLA₂ baja en comparación con el control positivo. Adicionalmente, los resultados obtenidos con ambos métodos concuerdan en que la F2 exhibe la mayor actividad enzimática entre las demás fracciones prepurificadas,

Las PLA₂ están ampliamente caracterizadas con respecto a sus actividades catalíticas y farmacológicas (Arni & Ward, 1996). A las fosfolipasas aisladas a partir de anémonas se les ha atribuido, principalmente, actividad hemolítica (Oliveira *et al.*, 2006), citolítica y catalítica (Nevalainen *et al.*, 2004). La subsecuente purificación y secuenciación de las proteínas responsables de estas actividades será importante para clasificar y comprender la importancia ecológica de las PLA₂ de anémonas. Considerando lo anterior, el estudio de esta clase de enzimas representa una importante herramienta para el descubrimiento de nuevos compuestos con alto potencial farmacológico, así como de herramientas biológicas para el estudio de procesos fisiológicos y envenenamientos (Romero *et al.*, 2010).

9.4.3 Actividad hemolítica

El extracto crudo de *Telmatactis panamensis* causó efectos hemolíticos en una típica curva dosis-respuesta, en la que a una concentración de proteína de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indujo el 100% de hemólisis y presenta una UH₅₀ de 85.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En contraste, el extracto crudo de *T. bernoni*

alcanzó una actividad hemolítica de sólo el 14.96% (cantidad de proteína no mostrada) (Cruz-Hernández & Rodríguez-Morales, 2016). Este resultado indica que el extracto de *T. panamensis* presenta una mayor eficacia para inducir una respuesta hemolítica máxima. Asimismo, estudios previos han establecido la actividad citolítica de extractos crudos y compuestos aislados de diferentes especies de anémonas. Se ha reportado que el extracto crudo de las anémonas *P. papillosa* (Cuya & Escobar, 2017) y de *Anthopleura dowii* (Ramírez-Carretero *et al.*, 2019) exhiben actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos con una UH_{50} de 1.88 $\mu\text{g/mL}$ y 25.6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Los valores anteriores muestran que el EC de *T. panamensis* tiene una menor potencia, hasta 45 veces menos potente, ya que se requirieron dosis mayores para obtener efectos hemolíticos similares.

Por otro lado, la determinación de la actividad hemolítica de cada fracción parcialmente purificada, excepto F5 (no probada por cantidad insuficiente), mostró que sólo la F3 y F4_d produjeron una hemólisis significativa (UH_{50} = 132 y 120 $\mu\text{g/mL}$). Mientras que la F1 y F2 exhibieron una actividad hemolítica apenas detectable, menor del 17%. Este resultado es similar al reportado por Alvarado *et al.* (2014), que evidenció la ausencia de hemólisis para una de las fracciones prepurificadas (P-I) del extracto crudo de *Anthopleura nigrescens*. Adicionalmente, ambas fracciones, principalmente la F2, presentaron actividad de fosfolipasas A₂, la cual se ha relacionado con la actividad hemolítica. No obstante, se han reportado fosfolipasas A₂ y fracciones cromatográficas con ausencia de actividad hemolítica, tales como, la PLA₂ aislada de *Aiptasia pallida* (Grotendorst & Hessinger, 1999), la UcPLA₂ de *Urticina crassicornis* (Razpotnik *et al.*, 2010), y la CgPLA₂ de *Condylactis gigantea* (Romero *et al.*, 2010).

Las citolisinas se han indicado como los compuestos precursores de eventos citotóxicos y citolíticos, principalmente, hemólisis. Estas proteínas pueden actuar de dos formas: formando poros en la membrana (conocidas como actinoporinas o porinas) o hidrolizando ciertos fosfolípidos de la membrana (fosfolipasas) (Lazcano-Pérez *et al.*, 2018). En específico, las actinoporinas son altamente hemolíticas con una masa molecular de alrededor de 20 kDa, mientras que las PLA muestran un peso entre 12-45 kDa (Frazão *et al.*, 2012). Tanto el extracto crudo como las F3 y F4 revelaron la existencia de al menos una banda de proteína de alrededor de 20 kDa por SDS-PAGE, infiriendo la presencia de actinoporinas. De igual manera, el EC y la F3 presentaron bandas correspondientes a las PLA. Por tanto, se sugiere que el mecanismo subyacente de la hemólisis

inducido por el EC y las fracciones prepurificadas de *T. panamensis* se debe en gran medida a una acción lítica facilitada por citolisinas, o puede deberse a la sinergia de distintas toxinas.

Desde un punto de vista farmacéutico, resulta una ventaja cuando los compuestos bioactivos no tienen efectos citotóxicos y/o citolíticos, como la actividad hemolítica, que pudiesen comprometer la integridad de células normales. Sin embargo, se ha comprobado que las citolisinas presentan una selectividad de unión con membranas celulares con esfingomielina, una propiedad relevante en la terapia del cáncer (Morante *et al.*, 2016), ya que las células tumorales presentan una concentración mayor de este lípido en particular (Hendrich & Michalak, 2003). Asimismo, el bioensayo hemolítico se utiliza ampliamente como una herramienta para identificar y caracterizar la presencia de citolisinas en las anémonas (Maček *et al.*, 1994; Santamaría *et al.*, 2002).

Las propiedades hemolíticas de extractos de muchas especies de cnidarios han sido ampliamente reportadas. Particularmente, se ha informado que más de 32 especies anémonas producen péptidos citolíticos con diversas actividades biológicas, incluida la hemólisis y actividad antitumoral frente a distintas líneas celulares (Mariottini & Pane, 2013). Por ende, la purificación y caracterización biológica de las citolisinas presentes en el extracto crudo y fracciones de *T. panamensis* es imprescindible en futuros proyectos de investigación que permitan dilucidar su potencial farmacológico.

9.4.4 Citotoxicidad en líneas celulares tumorales

La resistencia a los fármacos quimioterapéuticos convencionales, los efectos secundarios adversos y la ausencia de tratamientos totalmente efectivos llevaron a la búsqueda de compuestos naturales innovadores para el tratamiento contra el cáncer (Nobili *et al.*, 2009). Particularmente, el uso potencial de las toxinas de las anémonas se ha considerado para el diseño de agentes farmacológicos debido a que exhiben múltiples efectos biológicos, incluyendo actividades citotóxicas, citolíticas y anticancerígenas (Ramezanpour *et al.*, 2012; Abdzadeh *et al.*, 2020). Sin embargo, hasta la fecha, la actividad de extractos crudos y moléculas aisladas de anémonas contra células malignas ha sido poco estudiada.

La citotoxicidad de compuestos químicos se evidencia como un conjunto de efectos sobre la integridad celular, los cuales pueden incluir una alteración de la morfología celular, falla de la

célula para adherirse a superficies, cambios en la tasa de crecimiento, desintegración y muerte celular (Horváth, 1980). Dichas respuestas concuerdan con las observadas en el extracto crudo y algunas fracciones prepurificadas de *T. panamensis* frente a las células MCF-7 y C6, incluidas la pérdida de la morfología típica, reducción del tamaño celular, una densidad irregular debido a que el fenotipo adherente se pierde y, en última instancia, la disminución de la viabilidad en respuesta a la ruptura de la integridad de la membrana celular.

En el presente trabajo se reporta por primera vez la citotoxicidad del extracto crudo y fracciones prepurificadas de la anémona *Telmatactis panamensis* sobre dos líneas celulares tumorales. El extracto crudo exhibió una actividad citotóxica en una curva típica dosis-respuesta, disminuyendo efectivamente la viabilidad celular a 20% y 1.9% de las células de cáncer de mama MCF-7 y glioma de rata C6, respectivamente, a una concentración de 500 µg/mL a las 24 h. Asimismo, el efecto tóxico incrementó respecto al tiempo de exposición de 48 h, en el que el EC provocó una reducción máxima en la supervivencia celular por debajo del 0.75% en ambas líneas celulares tumorales. Estudios previos han evidenciado la citotoxicidad de extractos crudos de varias especies de anémonas frente a distintas líneas celulares. Tal es el caso de la evaluación de los extractos crudos de *Heteractis crispa*, *H. magnifica*, *H. malu*, *Cryptodendrum adhaesivum* y *Entacmaea quadricolor* en las líneas celulares de cáncer de pulmón (A549), mama (T47D) y piel (A431), que mostraron que una concentración de 40 µg/mL de los cinco extractos reducen significativamente la viabilidad de las células A549. Por otra parte, sólo *H. malu* y *C. adhaesivum* tienen un efecto inhibitor significativo en las células T47D y A431 a 40 µg/mL (Ramezanpour *et al.*, 2012).

En general, el extracto crudo presentó una mayor citotoxicidad frente a las líneas celulares de cáncer de mama y glioma de rata en comparación con las fracciones. Se ha reportado anteriormente que la bioactividad difiere entre los extractos totales y las fracciones (Cutignano *et al.*, 2015), lo cual puede ser explicado por distintos factores: a efectos sinérgicos de los componentes en los extractos totales; a alteraciones osmóticas que provocan degradación celular debido al alto contenido de sales en extractos crudos ocasionando una respuesta falsa positiva en la actividad citotóxica; a una menor concentración de sales en las fracciones o la pérdida de compuestos inestables en el proceso de purificación (Ricchio *et al.*, 2022). En cuanto a las fracciones prepurificadas, sus efectos citotóxicos variaron dependiendo de la línea celular. La F1 presentó la

mayor actividad citotóxica frente a las células de glioma de rata C6, revelando que la concentración de 500 µg/mL provoca una disminución de la viabilidad de 2.09% y 0.82% a las 24 y 48 h, respectivamente. La exposición de la F3 provocó una citotoxicidad dependiente de la concentración, obteniendo una disminución de 11.64% a las 24 h y de 2.64% a las 48 h. Mientras que, la F2 mostró una reducción máxima en la viabilidad celular del 18% a las 24 h. Respecto a las células de cáncer de mama MCF-7, su sensibilidad frente a las fracciones prepurificadas fue menor ya que, solamente la F3 disminuyó la viabilidad al 52% a una concentración de 500 µg/mL a las 24 h, las fracciones restantes indujeron valores de viabilidad por arriba del 70%. Por tanto, estos resultados indican que las fracciones presentan una mayor citotoxicidad frente a las células de glioma de rata C6 en contraste con las células de cáncer de mama MCF-7; esto es consistente con hallazgos anteriores que demostraron que las líneas celulares tumorales tienen una sensibilidad distinta cuando se expone al mismo extracto crudo o a compuestos aislados de varias especies de anémonas (Ramezanzpour *et al.*, 2012; Moghadasi *et al.*, 2020). Particularmente, la baja susceptibilidad de las células MCF-7 ante las fracciones puede ser explicada con base a la biología de esta línea celular; debido a que presentan un gran número de proteínas transmembranales involucradas en la adhesión célula-sustrato y célula-célula, además de tener complejos de unión más estrechos, son generalmente más resistentes a la desagregación por compuestos químicos (Freshney, 2015).

Por otro parte, las células de mama normales Hs 578Bst no presentaron respuestas citotóxicas significativas inducidas por el extracto crudo y fracciones prepurificadas, puesto que no mostraron alteraciones drásticas en su morfología, densidad, y la viabilidad celular se mantuvo constante (por arriba del 85%) en las diferentes concentraciones probadas. Diversas investigaciones han evidenciado la selectividad de los extractos crudos o compuestos aislados de anémonas frente a células cancerosas. Los efectos del extracto crudo de la anémona *Heteractis magnifica* en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7, T47D) revelaron que la concentración de 15 µg/mL resultó en una supervivencia inferior al 5% de las células MCF7 y T47D a las 24 h. Por el contrario, el efecto en las células de mama normales 184B5 fue considerablemente menor a la misma concentración, exhibiendo una viabilidad del 50% (Ramezanzpour *et al.*, 2014). Dicho estudio establece que la citotoxicidad observada se debe a la presencia de citolisinas en el extracto crudo. La actividad de las citolisinas se basa en la formación de poros dentro de membranas que contienen esfingomielina, un lípido que se encuentra tanto en células normales como cancerígenas;

sin embargo, se ha demostrado que las membranas de estas últimas presentan una alta concentración de esfingomiélin y colesterol, por lo que, la unión de citolisinas incrementa considerablemente (Hendrich & Michalak, 2003). Con base en esta evidencia, se establece que el extracto crudo y fracciones prepurificadas de *T. panamensis* presentan selectividad ante las líneas celulares de cáncer de mama respecto a las células de mama normales.

Los resultados obtenidos por los métodos de tinción con rojo neutro y cristal violeta demostraron que el extracto crudo y algunas fracciones prepurificadas de *T. panamensis* tienen la capacidad de disminuir la supervivencia de células de glioma de rata C6 y cáncer de mama MCF-7. No obstante, las disminuciones en la viabilidad celular detectadas por el ensayo cristal violeta fueron de menor magnitud que aquellas detectadas por el ensayo rojo neutro. Estas diferencias podrían surgir debido a que los ensayos detectan diferentes propiedades celulares. El ensayo de captación de rojo neutro detecta la actividad a través de la inclusión del colorante por los lisosomas de células vivas (Repetto *et al.*, 2008), sin embargo, el ensayo cristal violeta detecta el fenotipo adherente de las células ya sean vivas o muertas (Saotome *et al.*, 1989).

La purificación subsecuente de las fracciones con mayor actividad citotóxica es fundamental para aislar y caracterizar los compuestos con potencial como agentes terapéuticos contra el cáncer en futuros trabajos de investigación. Asimismo, la dilucidación de los mecanismos de acción específicos subyacentes a los efectos citotóxicos de las citolisinas representa una herramienta importante para comprender las cualidades quimioterapéuticas y para diseñar estrategias para el tratamiento selectivo de diferentes tipos de cáncer.

X. CONCLUSIONES

El rendimiento restringido del 6.64% del extracto crudo de *T. panamensis* coincide con el reportado para otras especies de anémonas.

El extracto crudo de *T. panamensis* contiene compuestos proteicos con un peso molecular entre 10 y 250 kDa. Por otra parte, las fracciones prepurificadas presentan una mezcla compleja de proteínas con un rango de pesos moleculares similar de 10-250 kDa; por lo tanto, la separación cromatográfica inicial del EC no logró resolver adecuadamente las fracciones, por lo que se sugiere continuar con la purificación de los compuestos usando otras técnicas cromatográficas.

El extracto crudo y fracciones prepurificadas muestran actividad tóxica en cangrejos *Ocypode quadrata*. En particular, se evidenciaron componentes con actividad citolítica en el EC y las F1, F2, F3 y F4. Solamente el EC y la F3 exhiben actividad neurotóxica.

La actividad de fosfolipasas A₂ se evidenció en el extracto crudo y las fracciones F1, F2, F3. Específicamente, el EC muestra una mayor actividad enzimática inducida por fosfolipasas secretoras (sPLA₂); mientras tanto, las fracciones presentan valores enzimáticos bajos comparados con el veneno de abeja.

Se demostraron las propiedades citolíticas del extracto crudo y las fracciones F3-F4_d, puesto que inducen una actividad hemolítica dependiente de la concentración en eritrocitos humanos. Se sugiere que el mecanismo subyacente de la hemólisis se debe en gran medida a una acción lítica facilitada por citolisinas, o por la sinergia de distintas toxinas.

El extracto crudo y algunas fracciones prepurificadas presentan actividad citotóxica frente a las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y glioma de rata C6. El EC induce una respuesta dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, en la que disminuye la viabilidad de las células C6 entre 38.76-1.90% con concentraciones de 50-500 µg/mL a las 24 h, y entre 11.81-0.73% a las 48 h. La disminución obtenida en las células MCF-7 fue entre 61.71-20% y 12.07-0.61% a las 24 y 48 h, respectivamente. En contraste, las fracciones prepurificadas ejercen un efecto citotóxico variable en las distintas líneas celulares. La F1 exhibe la mayor actividad citotóxica en la línea celular C6, seguida de la F3 y la F2. Las células de cáncer de mama muestran una menor sensibilidad frente a las fracciones; únicamente la F3 reduce la viabilidad celular hasta

un 50% Tanto el EC y las fracciones prepurificadas presentan baja o nula actividad en la línea celular de mama normal Hs 578Bst, por lo tanto, se sugiere que presentan selectividad ante las células de cáncer de mama respecto a las células normales. Los resultados demuestran que *T. panamensis* contiene moléculas activas con potencial antitumoral frente a las células de cáncer de mama MCF-7 y glioma de rata C6.

XI. REFERENCIAS

- Abdzadeh, E., Heidari, B. & Hadavi, M. (2020). Sea anemone (*Stichodactyla haddoni*) induces apoptosis in lung cancer A549 cells: an *in vitro* evaluation of biological activity of mucus derivatives. *Biologia*, 75(8), 1203-1211.
- Abel, E. L. & DiGiovanni, J. (2015). Environmental carcinogenesis. En J. Mendelsohn, P. M. Howley, M. A. Israel, J. W. Gray & C. B. Thompson (Eds.), *The Molecular Basis of Cancer* (pp. 103-128). Saunders, Elsevier Health Sciences.
- Acuña, F. H., Cortés, J. & Garese, A. (2012). Occurrence of the sea anemone *Telmatactis panamensis* (Verrill, 1869) (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria) at Isla del Coco National Park, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 60, 201-205.
- Acuña, F. H., González-Muñoz, R., Garese, A. & Díaz-Ferguson, E. (2022). First records of *Anthopleura nigrescens* (Verrill, 1928) and *Telmatactis panamensis* (Verrill, 1869) (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) from Parque Nacional Coiba, Pacific coast of Panama. *Check List*, 18(5), 1141-1146.
- Alvarado, J., Álvarez, Y., Pedrera, L., Ros, U., Lanio, M. E., Valle, A. & Álvarez, C. (2014). Isolation and partial purification of a hemolytic sphingomyelin-inhibitable fraction from the sea anemone *Anthopleura nigrescens*. *Biotechnología aplicada*, 31(1), 53-56.
- Anderluh, G. & Maček, P. (2002). Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*, 40(2), 111-124.
- Anderluh, G., Sepčić, K., Turk, T. & Maček, P. (2011). Cytolytic proteins from cnidarians-an overview. *Acta Chimica Slovenica*, 58(4), 724-729.
- Aneiros, A. & Garateix, A. (2004). Bioactive peptides from marine sources: Pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B*, 803(1), 41-53.
- Aqeilan, R. I., Zanesi, N. & Croce, C. M. (2008). Environmental, genetic, and viral causes of cancer. En A. B. Pardee & G. F. Stein (Eds.), *The Biology and Treatment of Cancer: Undersanding Cancer* (pp. 35-56). John Wiley & Sons.
- Arni, R. K. & Ward, R. J. (1996). Phospholipase A₂—a structural review. *Toxicon*, 34(8), 827-841.
- Ashwood, L. M., Norton, R. S., Undheim, E. A., Hurwood, D. A. & Prentis, P. J. (2020). Characterising functional venom profiles of anthozoans and medusozoans within their ecological context. *Marine Drugs*, 18(4), 202.

- Avila, C. & Angulo-Preckler, C. (2021). A minireview on biodiscovery in Antarctic marine benthic invertebrates. *Frontiers in Marine Science*, 8, 686477.
- Azadpour, M., Karimian, M., Kheirandish, M. H., Asadi-Saghandi, A., Imani, M., Astani, A. & Jaliani, H. Z. (2018). Evaluating cytotoxic effects of recombinant fragaceatoxin C pore forming toxin against AML cell lines. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(9), 878.
- Barrett, J. C. & Wiseman, R. W. (1987). Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis: relevance to carcinogen risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 76, 65-70.
- Bastida-Izaguirre, D. (2014). *Inventario, diagnostico ambiental y ordenamiento espacial marino del santuario Islas e Islotes de Bahía de Chamela, Jalisco, México* [Tesis de doctorado, Universidad de Guadalajara]. Repositorio Institucional - Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
- Beckmann, A. & Özbek, S. (2012). The nematocyst: a molecular map of the cnidarian stinging organelle. *International Journal of Developmental Biology*, 56(6-8), 577-582.
- Beckmann, M. W., Niederacher, D., Schnürch, H. G., Gusterson, B. A. & Bender, H. G. (1997). Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of molecular medicine*, 75(6), 429-439.
- Bellomio, A., Morante, K., Barlič, A., Gutiérrez-Aguirre, I., Viguera, A. R. & González-Mañas, J. M. (2009). Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea*. *Toxicon*, 54(6), 869-880.
- Béress, L. & Béress, R. (1971). Reinigung zweier krabbenlähmender Toxine aus der Seeanemone *Anemonia sulcata*. *Kiel. Meeresforsch*, 27(1), 17-127.
- Bergmann, W. & Feeney, R. J. (1950). The isolation of a new thymine pentoside from sponges¹. *Journal of the American Chemical Society*, 72(6), 2809-2810.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G. & Prinsep, M. R. (2017). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 33(3), 382–413.
- Bordon, K. C. F., Cologna, C. T., Fornari-Baldo, E. C., Pinheiro-Junior, E. L., Cerni, F. A., Amorim, F. G., Anjolette, F. A. P., Cordeiro, F. A., Wiesel, G. A., Cardoso, I. A., Ferreria, I. G., Oliveira, I. S., Boldrini-Franca, J., Pucca, M. B., Baldo, M. A. & Arantes, E. C. (2020).

From animal poisons and venoms to medicines: achievements, challenges and perspectives in drug discovery. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1132.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Bruhn, T., Schaller, C., Schulze, C., Sanchez-Rodriguez, J., Dannmeier, C., Ravens, U., Heubach, J. F., Eckhardt, K., Schmidtmayer, J., Schmidt, H., Aneiros, A., Wachter, E. & Béress, L. (2001). Isolation and characterisation of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Toxicon*, 39(5), 693-702.
- Brusca, R. C. & Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates*. (2^a ed.). Sinauer Associates Inc.
- Carlgren, O. (1951). The actinian fauna of the Gulf of California. *Proceedings of the United States National Museum*, 101(3282), 415-449.
- Castañeda-Rivero, F. R. (2017). *Ecología funcional de los ensamblajes de macroinvertebrados epibentónicos en el norte del Golfo de California* [Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada]. Repositorio Institucional – CICESE.
- Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Frank, H. Y., Konoki, K. & Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49(2), 124-141.
- Chang, D., Olenzek, A. M. & Duda Jr, T. F. (2015). Effects of geographical heterogeneity in species interactions on the evolution of venom genes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1805), 20141984.
- Chávez-Villela, S. N. (2017). *Aislamiento, purificación y caracterización de la actividad citolítica de los compuestos presentes en la anémona Lebrunia danae del Caribe Mexicano* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional – UNAM.
- Chiba, K., Kawakami, K. & Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*, 12(3), 251–258.

- Cline, E. I., Wiebe, L. I., Young, J. D. & Samuel, J. (1995). Toxic effects of the novel protein UpI from the sea anemone *Urticina piscivora*. *Pharmacological research*, 32(5), 309-314.
- Colom-Casanovas, A. (2014). *Aislamiento y caracterización de algunas neurotoxinas de la anémona Bartholomea annulata* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional – UNAM.
- Colom-Casasnovas, A., Garay, E., Cisneros-Mejorado, A., Aguilar, M. B., Lazcano-Pérez, F., Arellano, R. O. & Sánchez-Rodríguez, J. (2022). Sea anemone *Bartholomea annulata* venom inhibits voltage-gated Na⁺ channels and activates GABA_A receptors from mammals. *Scientific reports*, 12(1), 1-15.
- Cruz-Hernández, E. & Rodríguez-Morales, S. (2016). Sea anemones from Yucatán Península as source of bioactive compounds. *Toxicology Letters*, (259), S198.
- Cutignano, A., Nuzzo, G., Ianora, A., Luongo, E., Romano, G., Gallo, C., Sansone, C., Aprea, S., Mancini, F., D’Oro, U. & Fontana, A. (2015). Development and application of a novel SPE-method for bioassay-guided fractionation of marine extracts. *Marine drugs*, 13(9), 5736-5749.
- Cuya, A. & Escobar, E. (2017). Estudio bioquímico del veneno de la anémona de mar *Phymactis papillosa* (Actiniidae). *Revista peruana de biología*, 24(3), 303-310.
- Daly, M. & Fautin, D. (2021). *World List of Actiniaria. Telmatactis Gravier, 1916*. World Register of Marine Species. Recuperado el 19 de mayo de 2021 de <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=100766>
- D’Ambra, I. & Lauritano, C. (2020). A review of toxins from Cnidaria. *Marine Drugs*, 18(10), 507.
- Datta, D., Talapatra, S. N. & Swarnakar, S. (2015). Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines – an overview. *International Letters of Natural Sciences*, 7, 42–61.
- de la Torre, B. G. & Albericio, F. (2020). The pharmaceutical industry in 2019. An analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. *Molecules*, 25(3), 745.
- den Hartog, J. C. (1995). The genus *Telmatactis* Gravier, 1916 (Actiniaria: Acontiaria: Isophelliidae) in Greece and the eastern Mediterranean. *Zoologische Mededelingen*, 69(14), 153-176.

- Diochot, S., Baron, A., Rash, L. D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M. & Lazdunski, M. (2004). A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *The EMBO journal*, 23(7), 1516-1525.
- Elliott, R. C., Konya, R. S. & Vickneshwara, K. (1986). The isolation of a toxin from the dahlia sea anemone, *Tealia felina* L. *Toxicon*, 24(2), 117-122.
- England, K.W. & Robson, E. A. (1991). Nematocysts of sea anemones (Actiniaria, Ceriantharia and Corallimorpharia: Cnidaria): nomenclature. En R. B. Williams, P. F. S. Cornelius, R. G. Hughes & E. A. Robson (Eds.), *Coelenterate Biology: Recent Research on Cnidaria and Ctenophora* (pp. 691-697). Springer.
- Fautin, D. G. (2009). Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon*, 54(8), 1054-1064.
- Fautin, D. G., Hickman, C. P., Daly, M. & Molodtsova, T. (2007). Shallow-water sea anemones (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria) and tube anemones (Cnidaria: Anthozoa: Ceriantharia) of the Galápagos Islands. *Pacific Science*, 61(4), 549-573.
- Fedorov, S., Dyshlovoy, S., Monastyrnaya, M., Shubina, L., Leychenko, E., Kozlovskaya, E., Jin, J. O., Kwak, J. Y., Bode, A. M., Dong, Z. & Stonik, V. (2010). The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (= *Radianthus macrodactylus*). *Toxicon*, 55(4), 811-817.
- Flores-Pérez, A. J. (2017). *Aislamiento y purificación de neurotoxinas presentes en la anémona *Bunodeopsis globulifera** [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional – UNAM.
- Frazão, B., Vasconcelos, V. & Antunes, A. (2012). Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview. *Marine Drugs*, 10(18), 1812–1851.
- Freshney, R. I. (2015). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. (6^a ed.). John Wiley & Sons.
- Fuentes, F. A. L., Villarreal, M. D. & Solís, F.A. (2005). Los invertebrados marinos. En L. E. Villaseñor (Ed.), *La biodiversidad en Michoacán. Estudio de Estado* (pp. 86-87). Comisión Nacional para el Conocimiento y el Uso de la Biodiversidad.
- Galettis, P. & Norton, R. S. (1990). Biochemical and pharmacological studies of the mechanism of action of tenebrosin-C, a cardiac stimulatory and haemolytic protein from the sea anemone, *Actinia tenebrosa*. *Toxicon*, 28(6), 695-706.

- García-Arredondo, A., Rojas-Molina, A., Ibarra-Alvarado, C., Lazcano-Pérez, F., Arreguín-Espinosa, R. & Sánchez-Rodríguez, J. (2016). Composition and biological activities of the aqueous extracts of three scleractinian corals from the Mexican Caribbean: *Pseudodiploria strigosa*, *Porites astreoides* and *Siderastrea siderea*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 22 (32).
- Garese, A., Guzmán, H. M. & Acuña, F. H. (2009). Anémonas de mar (Cnidaria: Actiniaria y Corallimorpharia) de Panamá. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44(3), 791-802.
- Giraldi, T., Ferlan, I. & Romeo, D. (1976). Antitumour activity of equinatoxin. *Chemico-biological interactions*, 13(3-4), 199-203.
- Grotendorst, G. R. & Hessinger, D. A. (1999). Purification and partial characterization of the phospholipase A₂ and co-lytic factor from sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon*, 37(12), 1779-1796.
- Habermann, E. & Hardt, K. L. (1972). A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analytical Biochemistry*, 50(1), 163-173.
- Hanahan, D. (2014). Rethinking the war on cancer. *The Lancet*, 383(9916), 558-563.
- Hejmadi, M. (2013). *Introduction to cancer biology*. (2 ed.). Ventus Publishing. <http://bookboon.com/en/introduction-to-cancer-biology-ebook>
- Hendrich, A. B. & Michalak, K. (2003). Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells. *Current drug targets*, 4(1), 23-30.
- Hendrickx, M. E., Brusca, R. C. & Findley, L. T. (2005). *Listado y distribución de la macrofauna del Golfo de California, México. Parte 1. Invertebrados*. Arizona-Sonora Desert Museum.
- Heo, Y., Kwon, Y. C., Shin, K., Yoon, W. D., Han, C. H., Yum, S. & Kim, E. (2016). cDNA and gene structures of two phospholipase A₂ isoforms, acidic PLA₂ PA4 and PLA₂ PA3A/PA3B/PA5, in *Nemopilema nomurai* jellyfish venom. *Toxicon*, 122, 160-166.
- Hessinger, D. A. & Lenhoff, H. M. (1976). Mechanism of hemolysis induced by nematocyst venom: roles of phospholipase A and direct lytic factor. *Archives of biochemistry and biophysics*, 173(2), 603-613.
- Hong, Q., Gutiérrez-Aguirre, I., Barlič, A., Malovrh, P., Kristan, K., Podlesek, Z., Macek, P., Turk, D., González-Mañas, J. M., Lakey, J. H. & Anderluh, G. (2002). Two-step membrane binding by Equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed

- aromatic cluster and a flexible helix. *Journal of biological chemistry*, 277(44), 41916-41924.
- Horváth, S. (1980). Cytotoxicity of drugs and diverse chemical agents to cell cultures. *Toxicology*, 16(1), 59–66.
- Houssen, W. E. & Jaspars, M. (2006). Isolation of marine natural products. En S. D. Sarker, Z. Latif & A. O. Gray (Eds.), *Natural Products Isolation* (pp. 353-390). Humana Press Inc.
- Huerta, V., Morera, V., Guanche, Y., China, G., Gonzalez, L. J., Betancourt, L., Martínez, D., Alvarez, C., Lanio, M. E. & Besada, V. (2001). Primary structure of two cytolysin isoforms from *Stichodactyla helianthus* differing in their hemolytic activity. *Toxicon*, 39(8), 1253-1256.
- Jayathilake, J. M. N. J. & Guanthilake, K. V. K. (2020). Cnidarian toxins: recent evidences for potential therapeutic uses. *The European Zoological Journal*, 87(1), 708-713.
- Jiang, X., Chen, H., Yang, W., Liu, Y., Liu, W., Wei, J., Tu, H., Xie, X., Wang, L. & Xu, A. (2003). Functional expression and characterization of an acidic actinoporin from sea anemone *Sagartia rosea*. *Biochemical and biophysical research communications*, 312(3), 562-570.
- Jouiaei, M., Yanagihara, A. A., Madio, B., Nevalainen, T. J., Alewood, P. F. & Fry, B. G. (2015). Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins*, 7(6), 2251–2271.
- Kem, W. R., Parten, B., Pennington, M. W., Price, D. A. & Dunn, B. M. (1989). Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry*, 28(8), 3483–3489.
- Klompfen, A. M., Macrander, J., Reitzel, A. M. & Stampar, S. N. (2020). Transcriptomic analysis of four cerianthid (Cnidaria, Ceriantharia) venoms. *Marine drugs*, 18(8), 413.
- Klyshko, E. V., Issaeva, M. P., Monastyrnaya, M. M., Il'yna, A. P., Guzev, K. V., Vakorina, T. I., Dmitrenol, P. S., Zykova, T. A. & Kozlovskaya, E. P. (2004). Isolation, properties and partial amino acid sequence of a new actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon*, 44(3), 315-324.
- Kristan, K. Č., Viero, G., Dalla Serra, M., Maček, P. & Anderluh, G. (2009). Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon*, 54(8), 1125-1134.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

- Lanio, M. E., Morera, V., Alvarez, C., Tejuca, M., Gómez, T., Pazos, F., Besada, V., Martínez, D., Huerta, V., Padrón, G. & de los Angeles Chávez, M. (2001). Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, 39(2-3), 187-194.
- Lazcano-Pérez, F., Bermeo, K., Castro, H., Salazar Campos, Z., Arenas, I., Zavala-Moreno, A., Chávez-Villela, S. N., Jiménez, I., Arreguín-Espinosa, R., Fierro, R., González-Márquez, H., Garcia, D. E. & Sánchez-Rodríguez, J. (2022). A sea anemone *Lebrunia neglecta* venom fraction decreases boar sperm cells capacitation: possible involvement of HVA calcium channels. *Toxins*, 14(4), 261.
- Lazcano-Pérez, F., Román-González, S. A., Sánchez-Puig, N. & Arreguín-Espinosa, R. (2012). Bioactive peptides from marine organisms: a short overview. *Protein and Peptide Letters*, 19(7), 700-707.
- Lazcano-Pérez, F., Zavala-Moreno, A., Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., García-Arredondo, A., Cuevas-Cruz, M., Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., Arreguín-Lozano, B. & Arreguín-Espinosa, R. (2018). Hemolytic, anticancer and anti-giardial activity of *Palythoa caribaeorum* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 24, 12.
- Li, Y. L., Duan, X. M., Wu, L. Q., Wu, H., Yang, X. Y. & Li, G. C. (2014). Cytotoxicity and subcellular distribution of sea anemone equinatoxin II S105-P142 fragment in cancer cells. *Journal of Tumor*, 2(8), 219-222.
- Liao, Q., Feng, Y., Yang, B. & Lee, S. M. Y. (2019). Cnidarian peptide neurotoxins: a new source of various ion channel modulators or blockers against central nervous systems disease. *Drug discovery today*, 24(1), 189-197.
- Lv, X., Zhang, J., Xu, R., Dong, Y., Sun, A., Shen, Y. & Wei, D. (2016). Gigantoxin-4-4D5 scFv is a novel recombinant immunotoxin with specific toxicity against HER2/neu-positive ovarian carcinoma cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(14), 6403-6413.
- Lyu, C., Chen, T., Qiang, B., Liu, N., Wang, H., Zhang, L. & Liu, Z. (2021). CMNPD: a comprehensive marine natural products database towards facilitating drug discovery from the ocean. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D509-D515.

- Maček, P., Belmonte, G., Pederzolli, C. & Menestrina, G. (1994). Mechanism of action of equinatoxin II, a cytolyisin from the sea anemone *Actinia equina* L. belonging to the family of actinoporins. *Toxicology*, 87(1-3), 205-227.
- Maček, P., Zecchini, M., Stanek, K. & Menestrina, G. (1997). Effect of membrane-partitioned n-alcohols and fatty acids on pore-forming activity of a sea anemone toxin. *European biophysics journal*, 25(3), 155-162.
- Madio, B., King, G. F. & Undheim, E. A. B. (2019). Sea anemone toxins: a structural overview. *Marine Drugs*, 17(6), 325.
- MarinLit, *RCS A database of the marine natural products literature*. Recuperado el 02 de diciembre de 2022. <https://marinlit.rsc.org/>
- Marino, A., Morabito, R. & La Spada, G. (2009). Factors altering the haemolytic power of crude venom from *Aiptasia mutabilis* (Anthozoa) nematocysts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 152(3), 418-422.
- Marino, A., Valveri, V., Muià, C., Crupi, R., Rizzo, G., Musci, G. & La Spada, G. (2004). Cytotoxicity of the nematocyst venom from the sea anemone *Aiptasia mutabilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 139(4), 295-301.
- Mariottini, G. L. & Grice, I. D. (2016). Antimicrobials from cnidarians. A new perspective for anti-infective therapy?. *Marine drugs*, 14(3), 48.
- Mariottini, G. L. & Pane, L. (2013). Cytotoxic and cytolytic cnidarian venoms. A review on health implications and possible therapeutic applications. *Toxins*, 6(1), 108–151.
- Mariscal, R.N. (1974). Nematocysts. En L. Muscatine & H. M. Lenhoff (Eds.), *Coelenterate Biology: reviews and new perspectives* (pp. 129–178). Academic Press.
- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H. & Santos, S. (2014). Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Marine Drugs*, 12(2), 1066–1101.
- Martins, R. D., Alves, R. S., Martins, A. M., Barbosa, P. S. F., Evangelista, J. S., Evangelista, J. J. F., Ximenes, R. M., Toyama, M. H., Toyama, D. O., Souza, A. J. F., Orts, D. J. B., Marangoni, S., de Menezes, D. B., Fonteles, M. C. & Monteiro, H. S. A. (2009). Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A₂ from sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon*, 54(4), 413-420.

- Mayer, A. M., Glaser, K. B., Cuevas, C., Jacobs, R. S., Kem, W., Little, R. D., McIntosh, J. M., Newman, D. J., Potts, B. C. & Shuster, D. E. (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(6), 255–265.
- Mayer, A. M., Pierce, M. L., Howe, K., Rodríguez, A. D., Taglialatela-Scafati, O., Nakamura, F. & Fusetani, N. (2022). Review marine pharmacology in 2018: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Pharmacological Research*, 183, 106391.
- Mendelsohn, J., Howley, P. M., Israel, M. A., Gray, J. W. & Thompson, C. B. (2014). *The Molecular Basis of Cancer*. (4^a ed.). Elsevier Health Sciences.
- Mille-Pagaza, S. R. (2011). *Invertebrados*. Instituto Politécnico Nacional.
- Mizuno, M. (2016). Envenomation by cnidarians and renal injuries. En S. Goffredo & Z. Dubinsky (Eds.), *The Cnidaria, Past, Present and Future* (pp. 623-636). Springer.
- Moghadasi, Z., Shahbazzadeh, D., Jamili, S., Mosaffa, N. & Bagheri, K. P. (2020). Significant anticancer activity of a venom fraction derived from the Persian Gulf sea anemone, *Stichodactyla haddoni*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 19(3), 402.
- Monks, S. A., Pallaghy, P. K., Scanlon, M. J. & Norton, R. S. (1995). Solution structure of the cardiostimulant polypeptide anthopleurin-B and comparison with anthopleurin-A. *Structure*, 3(8), 791-803.
- Monroy-Estrada, H. I., Chirino, Y. I., Soria-Mercado, I. E. & Sánchez-Rodríguez, J. (2013). Toxins from the caribbean sea anemone *Bunodeopsis globulifera* increase cisplatin-induced cytotoxicity of lung adenocarcinoma cells. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 19(1), 12.
- Montaser, R. & Luesch, H. (2011). Marine natural products: a new wave of drugs?. *Future Med. Chem.*, 3(12), 1475–1489.
- Morabito, R., Condello, S., Currò, M., Marino, A., Ientile, R. & La Spada, G. (2012). Oxidative stress induced by crude venom from the jellyfish *Pelagia noctiluca* in neuronal-like differentiated SH-SY5Y cells. *Toxicology in Vitro*, 26(5), 694-699.
- Morante, K., Bellomio, A., Gil-Cartón, D., Redondo-Morata, L., Sot, J., Scheuring, S., Valle, M., González-Mañas, J. M., Tsumoto, K. & Caaveiro, J. M. (2016). Identification of a

- membrane-bound prepore species clarifies the lytic mechanism of actinoporins. *Journal of Biological Chemistry*, 291(37), 19210-19219.
- Moreels, L., Peigneur, S., Galan, D. T., De Pauw, E., Béress, L., Waelkens, E., Pardo, L. A., Quinton, L. & Tytgat, J. (2017). APETx4, a novel sea anemone toxin and a modulator of the cancer-relevant potassium channel KV10. 1. *Marine drugs*, 15(9), 287.
- Mutter, N. L., Soskine, M., Huang, G., Albuquerque, I. S., Bernardes, G. J. & Maglia, G. (2018). Modular pore-forming immunotoxins with caged cytotoxicity tailored by directed evolution. *ACS chemical biology*, 13(11), 3153-3160.
- Nevalainen, T. J., Peuravuori, H. J., Quinn, R. J., Llewellyn, L. E., Benzie, J. A., Fenner, P. J. & Winkel, K. D. (2004). Phospholipase A₂ in cnidaria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(4), 731-735.
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*, 83(3), 770-803.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E. & Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological research*, 59(6), 365-378.
- Oliveira, J. S., Zaharenko, A. J., Ferreira Jr, W. A., Konno, K., Shida, C. S., Richardson, M., Lúcio, A. D., Beirao, P. S. L. & de Freitas, J. C. (2006). BcIV, a new paralyzing peptide obtained from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. A comparison with the Na⁺ channel toxin BcIII. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1764(10), 1592-1600.
- Östman, C. (2000). A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Scientia Marina*, 64(S1), 31-46.
- Papon, N., Copp, B. R. & Courdavault, V. (2022). Marine drugs: biology, pipelines, current and future prospects for production. *Biotechnology Advances*, 54, 107871.
- Pardee, A. B., Stein, G. S. & Bronstein, E. A. (2008). What goes wrong in cancer. En A. B. Pardee & G. S. Stein (Eds.), *The Biology and Treatment of Cancer: Undersanding Cancer* (pp. 1–19). John Wiley & Sons.
- Parker, M. W. & Feil, S. C. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in biophysics and molecular biology*, 88(1), 91-142.

- Petersen, L. E., Kellermann, M. Y. & Schupp, P. J. (2020). Secondary metabolites of marine microbes: from natural products chemistry to chemical ecology. En S. Jungblut, V. Liebich & M. Bode-Dalby (Eds.), *YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research, Our Future* (pp. 159–180). Springer.
- Pienta, K. J. (2008). Cancer as a disease: types of tumors, their frequencies, and their progression. En A. B. Pardee & G. F. Stein (Eds.), *The Biology and Treatment of Cancer: Understanding Cancer* (pp. 21–34). John Wiley & Sons.
- Pinheiro-Junior, E. L., Kalina, R., Gladkikh, I., Leychenko, E., Tytgat, J. & Peigneur, S. (2022). A tale of toxin promiscuity: the versatile pharmacological effects of Hcr 1b-2 sea anemone peptide on voltage-gated ion channels. *Marine drugs*, 20(2), 147.
- Portier, P. & Richet, C. (1902). The anaphylactic reaction of certain toxins. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 54, 170.
- Potrich, C., Viero, G., Menestrina, G., Tejuca, M., Anderluh, G. & Maček, P. (2000). Construction of new immunotoxins by linking equinatoxin II to mono-clonal antibodies via the biotin-avidin interaction. Cytotoxic effects on human tumor cells. *Acta Biol. Slov.*, 43,47-51.
- Prentis, P. J., Pavasovic, A. & Norton, R. S. (2018). Sea anemones: quiet achievers in the field of peptide toxins. *Toxins*, 10(1), 36.
- Price, M. F., Wilkinson, A. N. D. & Gentry, L. O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 20(1), 7–14.
- Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V. V., Jurka, J., Genikhovich, G., Grigoriev, I. V., Lucas, S. M., Steele, R. E., Finnerty, J. R., Technau, U., Martindale, M. Q. & Rokhsar, D. S. (2007). Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science*, 317(5834), 86-94.
- Ramezanpour, M., Da Silva, K. B. & Sanderson, B. J. (2012). Differential susceptibilities of human lung, breast and skin cancer cell lines to killing by five sea anemone venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18(2), 157-163.
- Ramezanpour, M., Da Silva, K. B., & Sanderson, B. J. (2014). The effect of sea anemone (*H. magnifica*) venom on two human breast cancer lines: death by apoptosis. *Cytotechnology*, 66(5), 845-852.

- Ramírez-Carretero, S., Miranda-Zaragoza, B. & Rodríguez-Almazán, C. (2020). Actinoporins: from the structure and function to the generation of biotechnological and therapeutic tools. *Biomolecules*, 10(4), 539.
- Ramírez-Carretero, S., Pérez-García, E. I., Salazar-García, S. I., Bernáldez-Sarabia, J., Licea-Navarro, A., Rudiño-Piñera, E., Pérez-Martínez, L., Pedraza-Alva, G. & Rodríguez-Almazán, C. (2019). Identification of a pore-forming protein from sea anemone *Anthopleura dowii* Verrill (1869) venom by mass spectrometry. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 25, e147418.
- Ramírez-Orellana, A. J. (2017). *Diversidad de anémonas de mar (Anthozoa: Actiniaria) en la zona intermareal de las playas rocosas del Área Natural Protegida Los Cóbanos y Punta Ampala, El Salvador* [Tesis de licenciatura]. Universidad de El Salvador.
- Ravindran, V. S., Kannan, L. & Venkateshvaran, K. (2010). Biological activity of sea anemone proteins: II. Cytolysis and cell line toxicity. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 1233-1236.
- Razpotnik, A., Križaj, I., Kem, W. R., Maček, P. & Turk, T. (2009). A new cytolytic protein from the sea anemone *Urticina crassicornis* that binds to cholesterol-and sphingomyelin-rich membranes. *Toxicon*, 53(7-8), 762-769.
- Razpotnik, A., Križaj, I., Šribar, J., Kordiš, D., Maček, P., Frangež, R., Kem, W. R. & Turk, T. (2010). A new phospholipase A₂ isolated from the sea anemone *Urticina crassicornis*—its primary structure and phylogenetic classification. *The FEBS journal*, 277(12), 2641-2653.
- Reimer, N. S., Yasunobu, C. L., Yasunobu, K. T. & Norton, T. R. (1985). Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant, anthopleurin-B. *Journal of Biological Chemistry*, 260(15), 8690-8693.
- Repetto, G., Peso, A. & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–1131.
- Riccio, G., Martínez, K. A., Martín, J., Reyes, F., D'Ambra, I. & Lauritano, C. (2022). Jellyfish as an alternative source of bioactive antiproliferative compounds. *Marine Drugs*, 20(6), 350.
- Ríos-Jara, E. (2016). *Inventario de la biota marina (cnidarios, poliquetos, moluscos, crustáceos, equinodermos y peces) del Santuario Islas e Islotes de Bahía Chamela, Jalisco, México* (Proyecto No. JF023). Universidad de Guadalajara. SNIB-CONABIO.

<https://datos.gob.mx/busca/dataset/inventario-de-la-biota-marina-cnidarios-poliquetos-moluscos-crustaceos-equinodermos-y-peces-del>

- Rivera-de-Torre, E., Palacios-Ortega, J., Gavilanes, J. G., Martínez-del-Pozo, Á. & García-Linares, S. (2019). Pore-forming proteins from cnidarians and arachnids as potential biotechnological tools. *Toxins*, *11*(6), 370.
- Rocha, J., Calado, R. & Leal, M. (2015). Marine bioactive compounds from cnidarians. En S. K. Kim (Ed.), *Springer handbook of Marine Biotechnology* (pp. 823-849). Springer.
- Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N. & Calado, R. (2011). Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds—An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Marine drugs*, *9*(10), 1860-1886.
- Rodríguez, A. A., Garateix, A., Salceda, E., Peigneur, S., Zaharenko, A. J., Pons, T., Santos, Y., Arreguín, R., Ständker, L., Frossmann, W., Tytgat, J., Vega, R. & Soto, E. (2018). PhcTx2, a new crab-paralyzing peptide toxin from the sea anemone *Phymanthus crucifer*. *Toxins*, *10*(2), 72.
- Rodríguez, A. A., Ständker, L., Zaharenko, A. J., Garateix, A. G., Forssmann, W. G., Béress, L., Valdés, O., Hernández, Y. & Laguna, A. (2012). Combining multidimensional liquid chromatography and MALDI-TOF-MS for the fingerprint analysis of secreted peptides from the unexplored sea anemone species *Phymanthus crucifer*. *Journal of Chromatography B*, *903*, 30-39.
- Romero, L., Marcussi, S., Marchi-Salvador, D. P., Silva Jr, F. P., Fuly, A. L., Stábeli, R. G., da Silva, S. L., González, J., del Monte, A. & Soares, A. M. (2010). Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A₂ from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Biochimie*, *92*(8), 1063-1071.
- Rottini, G., Dobrina, A., Forgiarini, O., Nardon, E., Amirante, G. A. & Patriarca, P. (1990). Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. *Infection and Immunity*, *58*(11), 3751-3758.
- Samavarchi Tehrani, S., Gharibi, S., Movahedpour, A., Goodarzi, G., Jamali, Z., Khatami, S. H., Maniati, M., Ranjbar, M., Shabaninejad, Z., Savardashtaki, A. & Taheri-Anganeh, M. (2020). Design and evaluation of scFv-RTX-A as a novel immunotoxin for breast cancer treatment: an in silico approach. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, *42*(1), 19-33.

- Sanderson, B. J., Da Silva, K. B. & Ramezanpour, M. (2016). How venom from the magnificent sea anemone, *Heteractis magnifica*, kills breast and lung cancer cells. En S. Goffredo & Z. Dubinsky (Eds.), *The Cnidaria, Past, Present and Future* (pp. 669-681). Springer.
- Santamaría, A., Sánchez-Rodríguez, J., Zugasti, A., Martínez, A., Galván-Arzate, S. & Segura-Puertas, L. (2002). A venom extract from the sea anemone *Bartholomea annulata* produces haemolysis and lipid peroxidation in mouse erythrocytes. *Toxicology*, *173*(3), 221-228.
- Santhanam, R. (2020). *Biology and Ecology of Venomous Marine Cnidarians*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1603-0>
- Saotome, K., Morita, H. & Umeda, M. (1989). Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicology in vitro*, *3*(4), 317-321.
- Schumacher, M. J., Schmidt, J. O., Egen, N. B., Dillon, K. A. & Tucson, B. A. (1992). Biochemical variability of venoms from individual european and africanized honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *90*(1), 59–65.
- Schweitz, H., Vincent, J. P., Barhanin, J., Frelin, C., Linden, G., Hugues, M. & Lazdunski, M. (1981). Purification and pharmacological properties of eight sea anemone toxins from *Anemonia sulcata*, *Anthopleura xanthogrammica*, *Stoichactis giganteus* and *Actinodendron plumosum*. *Biochemistry*, *20*(18), 5245-5252.
- Shapiro, B. I. (1968). Purification of a toxin from tentacles of the anemone *Condylactis gigantea*. *Toxicon*, *5*(4), 253-259.
- Sigwart, J. D., Blasiak, R., Jaspars, M., Jouffray, J. B. & Tasdemir, D. (2021). Unlocking the potential of marine biodiscovery. *Natural Product Reports*, *38*(7), 1235-1242.
- Simmons, T. L., Andrianasolo, E., Mcphail, K., Flatt, P. & Gerwick, W. H. (2005). Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, *4*(2), 333–343.
- Smith, J. J. & Blumenthal, K. M. (2007). Site-3 sea anemone toxins: molecular probes of gating mechanisms in voltage-dependent sodium channels. *Toxicon*, *49*(2), 159-170.
- Soletti, R. C., de Faria, G. P., Vernal, J., Terenzi, H., Anderluh, G., Borges, H. L., Moura-Neto, V. & Gabilan, N. H. (2008). Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. *Anti-cancer drugs*, *19*(5), 517-525.
- Soto, C., Bergado, G., Blanco, R., Griñán, T., Rodríguez, H., Ros, U., Pazos, F., Lanio, M. E., Hernández, A. M. & Álvarez, C. (2018). Sticholysin II-mediated cytotoxicity involves the

- activation of regulated intracellular responses that anticipates cell death. *Biochimie*, 148, 18-35.
- Surm, J. M. & Moran, Y. (2021). Insights into how development and life-history dynamics shape the evolution of venom. *EvoDevo*, 12(1), 1-18.
- Talvinen, K. A. & Nevalainen, T. J. (2002). Cloning of a novel phospholipase A₂ from the cnidarian *Adamsia carciniopados*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132(3), 571-578.
- Tarcha, E. J., Olsen, C. M., Probst, P., Peckham, D., Muñoz-Elías, E. J., Kruger, J. G. & Iadonato, S. P. (2017). Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial. *PloS one*, 12(7), e0180762.
- Tejuca, M., Anderluh, G. & Dalla Serra, M. (2009). Sea anemone cytolysins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon*, 54(8), 1206-1214.
- Tejuca, M., Anderluh, G., Maček, P., Marcet, R., Torres, D., Sarracent, J., Alvarez, C., Lanio, M. E., Serra, M. D. & Menestrina, G. (1999). Antiparasite activity of sea-anemone cytolysins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-Giardia antibodies. *International journal for parasitology*, 29(3), 489-498.
- Tejuca, M., Díaz, I., Figueredo, R., Roque, L., Pazos, F., Martínez, D., Iznaga-Escobar, N., Pérez, R., Alvarez, C. & Lanio, M. E. (2004). Construction of an immunotoxin with the pore forming protein StI and ior C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line. *International immunopharmacology*, 4(6), 731-744.
- Thangaraj, S., Bragadeeswaran, S., Suganthi, K. & Kumaran, N. S. (2011). Antimicrobial properties of sea anemone *Stichodactyla mertensii* and *Stichodactyla gigantea* from Mandapam coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S43-S46.
- Turk, T. & Kem, W. R. (2009). The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*, 54(8), 1031-1037.
- Valcarcel, C. A., Dalla Serra, M., Potrich, C., Bernhart, I., Tejuca, M., Martinez, D., Pazos, F., Lanio, M. E. & Menestrina, G. (2001). Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolysins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophysical journal*, 80(6), 2761-2774.
- Verrill, A. E. (1869). Review of the polyps of the west coast of America. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences*, 1(6) 377-558.

- Vetter, I., Davis, J. L., Rash, L. D., Anangi, R., Mobli, M., Alewood, P. F., Lewis, R. J. & King, G. F. (2011). Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. *Amino acids*, 40(1), 15-28.
- Yamaguchi, Y., Hasegawa, Y., Honma, T., Nagashima, Y. & Shiomi, K. (2010). Screening and cDNA cloning of Kv1 potassium channel toxins in sea anemones. *Marine drugs*, 8(12), 2893-2905.
- Zykova, T. A., Monastyrnaia, M. M., Apalikova, O. V., Shvets, T. V. & Kozlovskaiia, E. P. (1998). Low-molecular cytolysins and trypsin inhibitors from sea anemone *Radianthus macrodactylus*. Isolation and partial characterization. *Bioorganicheskaia khimiia*, 24(7), 509-516.