



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Obtención de un compuesto bioactivo presente
en la anémona *Anthopleura texaensis***

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA

Presenta:

BRENDA QUINTANA ARROYO



CDMX, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARTINEZ BARAJAS J. ELEAZAR

VOCAL: HERNANDEZ LUIS FRANCISCO

SECRETARIO: RODRIGUEZ MORALES SERGIO

1er. SUPLENTE: FRAGOSO SERRANO MABEL CLARA

2° SUPLENTE: PEREDA MIRANDA ROGELIO GREGORIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE QUIMICA EN SISAL, DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

RODRIGUEZ MORALES SERGIO _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

FLORES RAMOS MIGUEL ÁNGEL _____

SUSTENTANTE:

QUINTANA ARROYO BRENDA _____

ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
RESUMEN.....	10
1 INTRODUCCIÓN	11
2 ANTECEDENTES.....	13
2.1 Organismos marinos como fuente de moléculas bioactivas	13
2.2 Cnidarios.....	16
2.3 Productos naturales aislados de Cnidarios.....	18
2.3.1 Fosfolipasa A2.....	20
2.3.2 Metaloproteinasa	20
2.3.3 Neurotoxinas.....	20
2.3.3.1 Toxinas de canales iónicos dependientes de voltaje	21
2.3.3.2 Toxinas de canales de Na ⁺ dependiente de voltaje	21
2.3.3.3 Toxinas de canales de K ⁺ dependientes de voltaje	21
2.3.4 Inhibidores de proteinasa tipo Kunitz.....	22
2.3.5 Inhibidores del canal TRPA1	22
2.3.6 Moduladores de canales ASIC	23
2.3.7 Beta defensina como Inhibidores de Alfa-Amilasa.....	23
2.3.8 Citolisinas.....	23
2.3.8.1 Toxinas formadoras de poros.....	24
2.3.8.2 Actinoporinas.....	24
2.3.8.3 Complejo de ataque de membrana/perforinas (MACPF)	24
2.3.8 Toxinas no péptidicas	25
2.4 Anémonas	26
2.4.1 Estructura anatómica	26
2.4.2 Nematocistos	27
2.4.3 <i>Anthopleura texaensis</i>	29
2.4.3.1 Clasificación taxonómica.....	29
2.4.3.2 Distribución geográfica.....	29
2.4.3.3 Moléculas activas presentes en el género <i>Anthopleura</i>	30
2.5 Separación biodirigida	33
2.5.1 Bioprospección.....	34

2.6	Bioensayos	35
2.7	Métodos para la determinación de toxinas.....	35
2.7.1	Purificación de las toxinas	35
2.7.1.1	Preparación de la muestra	35
2.7.1.2	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	36
2.7.1.2.1	Cromatografía de Fase Reversa (RPC)	37
2.7.1.2.2	Cromatografía de Intercambio Iónico (IEC)	38
2.7.1.2.3	Cromatografía de exclusión molecular (SEC)	38
2.7.1.3	Cromatografía en Fase Sólida (CFS)	39
2.7.1.3.1	Pasos para el uso de CFS.....	41
2.7.1.3.2	Tipos de columnas.....	42
3	JUSTIFICACIÓN.....	44
4	HIPOTESIS.....	45
5	OBJETIVO GENERAL	45
5.1	Objetivos particulares	45
6	METODOLOGÍA	46
6.1	Colecta de la anémona de mar <i>Anthopleura texaensis</i>	46
6.2	Identificación taxonómica de la anémona <i>Anthopleura texaensis</i>	47
6.3	Generación del extracto crudo	47
6.3.1	Generación del extracto etanólico	48
6.4	Evaluación de la actividad biológica	48
6.4.1	Actividad neurotóxica <i>in vivo</i> sobre cangrejo violinista (<i>Uca sp.</i>).....	48
6.4.2	Letalidad en nauplios de <i>Artemia salina</i>	49
6.4.3	Inhibición de la tubulina en <i>Brachydanio rerio</i>	50
6.4.4	Toxicidad en ontogenia de <i>Brachydanio rerio</i>	51
6.4.5	Ensayo de susceptibilidad microbiana.....	51
6.4.6	Hemólisis	53
6.5	Análisis cromatográficos	54
6.5.1	Sistema cromatográfico	54
6.5.2	Análisis CLAR de fase reversa.....	54
6.6	Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo	54
6.6.1	Prefraccionamiento.....	55

6.6.2	Aislamiento.....	56
6.6.2.1	Extracción en fase sólida	56
6.6.2.1.1	Prefraccionamiento y desalado.....	56
6.6.2.2	Separación cromatográfica.....	56
6.6.2.3	Determinación del peso moléculas de la señal aislada mediante Cromatografía de Gel Permeable (GPC).....	57
6.6.2.3.1	Calibración de la columna Gel Permeable	57
6.6.2.3.2	Preparación de la muestra a analizar	57
6.6.2.4	Desnaturalización de la muestra	58
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
7.1	Colecta e identificación de la anémona <i>Anthopleura texaensis</i>	59
7.2	Generación del extracto crudo	61
7.3	Evaluación de la actividad biológica de los extractos crudos (Bioensayos).....	63
7.3.1	Letalidad en nauplios de <i>Artemia salina</i>	63
7.3.2	Actividad neurotóxica en <i>Uca sp.</i>	63
7.3.3	Inhibición de tubulina en <i>Brachydanio rerio</i>	65
7.3.4	Toxicidad en ontogenia de <i>B. rerio</i>	67
7.3.5	Susceptibilidad microbiana.....	67
7.3.6	Hemolisis	67
7.3.7	Actividad citotóxica.....	67
7.4	Obtención de extracto etanólico de <i>A. texaensis</i>	70
7.5	Separación biodirigida	70
7.5.1	Separación por ultrafiltración	70
7.5.2	Separación de la fracción 3-1 kDa por Extracción en Fase Sólida de fase reversa	71
7.5.3	Análisis cromatográficos de la fracción 3-1 kDa	73
7.5.3.1	Determinación del peso molecular de la fracción A _{tex} _EtOH_3-1kDa_18- 20 mediante Cromatografía de Gel Permeable (GPC)	74
7.5.4	Desnaturalización de la muestra	76
8	CONCLUSIONES	78
9	BIBLIOGRAFÍA.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de toxinas aisladas de Cnidarios.....	19
Tabla 2. Clasificación de los diferentes tipos de citolisinas de acuerdo con su tamaño molecular	24
Tabla 3. Toxinas identificadas en anémonas del género <i>Anthopleura</i> , incluyendo su masa moléculas (kDa).....	30
Tabla 4. Especificaciones de las columnas de cromatografía en fase sólida C18-U y C18-T	43
Tabla 5. Valores de MIC reportados para diferentes antibióticos de los microorganismos a evaluar	52
Tabla 6. Estandares para calibración de columna Gel Permeable	57
Tabla 7. Descripción morfológica (Anatomía externa) de la anémona <i>Anthopleura texaensis</i>	60
Tabla 8. Peso del extracto obtenido de la liofilización de los organismos obtenidos	61
Tabla 9. Porcentaje de actividad hemolítica del extracto crudo de <i>A. texaensis</i>	67
Tabla 10. Pesos de los extractos crudos en etanol de <i>A. texaensis</i> de cuatro muestras en diferentes tiempos.....	70
Tabla 11. Efecto de las fracciones obtenidas por ultrafiltración del extracto etanólico de <i>A. texaensis</i> sobre el cangrejo violinista (<i>Uca sp.</i>).....	70
Tabla 12. Efecto en cangrejo <i>Uca sp.</i> De las diferentes fracciones obtenidas a partir de la separación en fase sólida de las prefracciones menores del extracto etanólico de <i>A. texaensis</i>	72
Tabla 13. Efecto en cangrejo <i>Uca sp.</i> de las diferentes fracciones obtenidas a partir de la colecta manual de tiempos de retención del cromatograma de la fracción 3-1 kDa del extracto etanólico de <i>A. texaensis</i>	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Kealiinina aislada de la esponja <i>Leucetta chagosensis</i>	14
Figura 2 Estructura molecular de (A) Ziconotida y (B) Leconotida, aisladas de <i>Conis catus</i>	15
Figura 3 Estructura molecular de Criptosporina 24.	15
Figura 4 Estructura molecular de Trabectedina.....	16
Figura 5 Cladograma simplificado del <i>Phylum Cnidaria</i>	17
Figura 6 Estructura anatómica de un Cnido. Célula característica de <i>phylum Cnidaria</i>	18
Figura 7 Estructura de toxinas no peptídicas aisladas de Cnidarios.....	25
Figura 8 Estructura anatómica representativa de las anémonas	27
Figura 9 Diagrama de un cnidocisto eyectando un nematocisto	28
Figura 10 Distribución geográfica de la anémona <i>A. texaensis</i> , que comprende el Golfo de México.....	30
Figura 11 Esquema general básico de un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	37
Figura 12 Cromatograma de SEC.....	39
Figura 13 Estructura de una columna típica de Cromatografía en Fase sólida.	41
Figura 14 Pasos en el uso, acondicionamiento y tratamiento de la muestra en Cromatografía en Fase Sólida.....	42
Figura 15 Base de sílice de columna C18-U	42
Figura 16 Base de sílice de columna C18-T.....	43
Figura 17 Diagrama de metodología empleada.....	46
Figura 18 Generación del extracto crudo de <i>A. texaensis</i>	47
Figura 19 Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo	55
Figura 20 Colecta e identificación de la anémona de mar <i>Anthopleura texaensis</i>	59
Figura 21 Anémona <i>Anthopleura texaensis</i>	61

Figura 22 Estadio 1K de <i>Brachydanio rerio</i> aproximadamente 3 horas después de la fertilización.....	65
Figura 23 Blanco: Embriones de 8 horas post fertilización sin ningún tratamiento	66
Figura 24 Embriones de 8 horas post fertilización bajo tratamiento de extracto crudo de la anémona <i>A. texaensis</i> , con efecto observable de lisis en las células	66
Figura 25 Embriones de 8 horas post fertilización bajo tratamiento de colchicina a concentración de 10 mM con efecto de retraso en la epibolia.....	66
Figura 26 Análisis por CLAR en extracto crudo de <i>Anthopleura texaensis</i>	69
Figura 27 Separación de la fracción 3-1 kDa de <i>A. texaensis</i>	73
Figura 28 Cromatogramas de la calibración de la columna Yarra 2000	75
Figura 29 Datos de la regresión lineal en la calibración de la columna Yarra 2000. Gráfica de la regresión lineal.....	76

ABREVIATURAS

<i>A. salina</i>	<i>Artemia salina</i>
<i>A. texaensis</i>	<i>Anthopleura texaensis</i>
Ara-C	Arabinosil citosina
ASIC	Canal iónico de detección de ácido
<i>B. pycyaneaus</i>	<i>Bacillus pyocyaneus</i>
<i>B. rerio</i>	<i>Brachydanio rerio</i>
CFS	Cromatografía en Fase Sólida
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CL-EMAR	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas
CLSI	<i>Clinical and Laboratories Standards Institute</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EM	Espectrometría de Masas
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
MACPF	La superfamilia del complejo de ataque de membrana/perforina
MIC	Concentración mínima inhibitoria
RPC	Cromatografía en Fase Reversa
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TRPA1	Receptor de potencial transitorio anquirina 1
VHC	Virus hepatitis C



RESUMEN

En los últimos años, las toxinas de cnidarios han comenzado a investigarse como una fuente potencial de nuevos compuestos terapéuticos bioactivos ya que poseen una alta concentración de polipéptidos y proteínas que actúan como neurotoxinas, hemolisinas y enzimas, y son responsables de una variedad de respuestas fisiopatológicas y efectos directos sobre el tejido muscular y nervioso. Estas toxinas poseen una diversidad estructural que ha permitido ejercer actividad farmacológica como agente antitumoral, antiviral, antiparasitario, entre otros.

Debido a lo anterior, la búsqueda de moléculas bioactivas en la anémona de mar *Anthopleura texaensis*, presente en las costas de Yucatán, es el principal objetivo de este trabajo de investigación. Ya que no hay literatura reportada sobre toxinas aisladas de dicha anémona. Por lo cual representa una posible fuente de moléculas con actividad biológica, con el fin de proveer alternativas a diferentes patologías.

Para ello, se colectaron 50 especímenes de *A. texaensis*, los cuales fueron liofilizados, llevado a polvo fino mediante mortero y pistilo, luego mediante maceración con agua se generó el extracto crudo. El extracto crudo generado se evaluó con el uso de bioensayos para determinar la posible actividad neurotóxica, antitumoral, antiparasitaria, antimicrobiana, citotóxica y hemolítica. Los resultados revelaron que el extracto crudo presento toxicidad en la ontogénia de *Brachydanio rerio*, actividad hemolítica y actividad neurotóxica en *Uca sp.*, donde presento toxicidad causando relajación, autotomía, parálisis y muerte.

El extracto crudo se sometió separación por peso molecular utilizando ultrafiltración con membranas de 100, 30, 10, 5, 3 y 1 kDa de corte molecular, luego el retentado activo de 5 kDa se volvieron a prefraccionar y desalar por Cromatografía en Fase Sólida de fase reversa para su posterior análisis de las fracciones activas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Fase Reversa



1 INTRODUCCIÓN

Desde que comenzó la bioprospección marina, los océanos del mundo y su diversa biota representan un recurso importante, quizás el mayor recurso en la Tierra, para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos. En los últimos 40 años se han registrado importantes avances en el descubrimiento de fármacos marinos en ensayos clínicos para el cáncer.¹ Aparte de la actividad anticancerígena, estos compuestos han demostrado ser una fuente abundante de agentes farmacológicamente activos para la producción de compuestos terapéuticos, enfermedades inflamatorias, microbianas y parasitarias.²

Por lo anterior, los productos naturales marinos han sido una fuente importante en la búsqueda de moléculas con actividad biológica, siendo cruciales para el desarrollo de fármacos innovadores para el tratamiento de diferentes patologías. Algunos ejemplos de estos fármacos de origen marino se encuentran el Prialt®, péptido natural aislado del veneno del caracol *Conus magus* utilizado como potente analgésico.³ Yondelis® es un alcaloide aislado del tunicado marino caribeño *Ecteinascidia turbinata*, siendo el primer anticancerígeno aprobado por la Unión Europea para el tratamiento de sarcoma y cáncer de ovario.⁴ A finales de enero del 2021, PharmaMar dio a conocer un fármaco denominado Plitidepsina, principio activo anticancerígeno extraído de *Aplidium albicans* utilizado contra el mieloma múltiple. Este fármaco ha demostrado en modelos preclínicos ser más potente contra el SARS-CoV-2 que el Remdesivir, el antiviral utilizado de primera línea.⁵ Por lo tanto, los avances científicos en los últimos años han permitido la obtención de nuevos fármacos de origen marino que se van posicionando en el mercado y que tienen una variada aplicación terapéutica.

Uno de los grupos interesantes que se ha estudiado debido a las sustancias que secretan es el filo de los Cnidarios, dentro de los que se incluyen a las medusas, los corales y las anémonas. De la composición de los extractos de los cnidarios, se han logrado identificar actualmente alrededor de 250 compuestos (péptidos, proteínas, enzimas e inhibidores de proteinasas) y sustancias no proteicas (purinas, compuestos de amonio cuaternario, aminos). Las anémonas son invertebrados marinos que presentan células u organelos especializados conocidos como cnidocitos, ubicados a lo largo de todo el cuerpo.



Los nematocistos, son cnidocitos empleados en la defensa contra depredadores y en la captura de presas.⁶ Están presentes principalmente en los tentáculos de las anémonas y mediante estimulación física o química, liberan una gran cantidad de toxinas, la mayoría de tipo proteico. Entre los polipéptidos presentes en los nematocistos hay neurotoxinas que bloquean los canales de sodio (Na^+) o potasio (K^+), fosfolipasas tipo A2, metaloproteasas, proteínas formadoras de poros e inhibidores de proteasas, que actúan como neurotoxinas, cardiotoxinas y citolisinas.⁷ Además, estas toxinas poseen una diversidad estructural que ha permitido ejercer acciones específicas y potentes, mostrando una variedad de actividades biológicas: antitumoral, antiparasitaria, Antimicrobiana, entre otras. Por ejemplo, el fármaco Dalazatida (anteriormente conocido como ShK-186 y SL5), es un péptido sintético de 37 aminoácidos inhibidor específico del canal de potasio Kv1.3 dependiente de voltaje y que se emplea para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, incluida la psoriasis, fue derivado de la ShK; toxina aislada de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus*.⁸

Por lo anterior, se ha tenido gran interés en las toxinas de los cnidarios, a pesar de que se han estudiado a lo largo de estos años, aún queda mucho que conocer acerca de los componentes de cada toxina de estos organismos. Está demostrado que cada especie de anémona produce toxinas diferentes, por lo tanto, la diversidad es muy amplia. El género *Anthopleura* específicamente, es uno de los más estudiados y se han identificado y aislado muchas toxinas con actividad biológica, entre las cuales encontramos a las anthopleurinas, toxinas que interactúan específicamente con el canal de Na^+ dependiente de voltaje, que en mamíferos puede causar un potente efecto inotrópico positivo (aumento de la fuerza de contracción cardíaca), las cuales están en desarrollo como nuevos estimulantes cardíacos.⁹

Es por ello, que la anémona *Anthopleura texaensis* es de interés para el aislamiento e identificación de posibles compuestos bioactivos, ya que hasta la fecha se desconocen las toxinas presentes en los nematocistos de la anémona *A. texaensis*, especie presente en las costas de Yucatán. Este proyecto de tesis tiene como objetivo aislar, identificar y evaluar la actividad biológica de al menos un compuesto bioactivo liberado de los nematocistos presentes en los tentáculos de la anémona *A. texaensis*, mediante separación biodirigida, con el fin de aislar e identificar un compuesto bioactivo de dicha anémona.



2 ANTECEDENTES

2.1 Organismos marinos como fuente de moléculas bioactivas

Desde la antigüedad los productos naturales han sido el principal medio para el tratamiento de enfermedades, que aún juegan un papel importante en la medicina moderna utilizada para tratar enfermedades humanas. Los productos naturales tienen una variedad de estructuras únicas y, por lo tanto, brindan cada vez más inspiración a los desarrolladores de fármacos. Aunque las plantas y bacterias terrestres siempre han sido las principales fuentes de productos naturales, en los últimos 30 años, los invertebrados marinos, las plantas y las bacterias también han producido muchos compuestos estructurales novedosos, conocidos como productos naturales marinos. Más del 70% de la superficie de nuestro planeta está cubierta por océanos.

El entorno marino está lleno de unas 500,000 especies de animales y plantas de unos 28 filos, en los que se han estudiado exhaustivamente principalmente nueve tipos de animales y plantas marinos para aislar productos naturales.¹⁰ Hay fitoplancton (dinoflagelados), microorganismos (bacterias, hongos), esponjas, algas (verdes, azules, rojas, marrones y verdes), moluscos (liebres, pepinos de mar), celenterados (corales blandos, gorgonias y anémonas de mar), y briozoos. Los organismos marinos han estado durante mucho tiempo en ambientes hostiles como alta salinidad, alta presión e hipoxia, y han sintetizado compuestos tóxicos durante el proceso de evolución o tienen la capacidad de obtener compuestos tóxicos de otros microorganismos marinos. Estos compuestos tóxicos pueden ayudarlos a evitar que los depredadores los atrapen, dándoles una ventaja sobre sus competidores y haciéndolos más fáciles de atrapar presas. El medio marino es un almacén especial de nuevos productos naturales bioactivos, cuya estructura y características químicas no suelen poseer los productos naturales terrestres. Estas sustancias bioactivas se pueden dividir en una variedad de tipos estructurales, incluidos terpenoides, esteroides, alcaloides, glucósidos, péptidos, polisacáridos, macrólidos, poliéteres y ácidos grasos insaturados. Los productos naturales marinos tienen efectos biológicos en el tratamiento de diversas enfermedades humanas, despertando gran interés de químicos, biólogos y farmacólogos.¹⁰

El primer esfuerzo serio en el estudio de productos naturales marinos comenzó en 1951 con el trabajo pionero de Bergman y Feeney que resultó en el aislamiento de espongotimidina y



espongouridina de la esponja *Cryptotethya crypta*. Este hallazgo condujo a la síntesis de arabinosil citosina (Ara-C), un agente anticancerígeno de origen marino utilizado principalmente para tratar diferentes formas de leucemia. Desde la década de 1950, se ha demostrado que los organismos marinos son ricas fuentes de metabolitos estructuralmente nuevos y biológicamente activos, lo que constituye valiosas oportunidades para el descubrimiento de fármacos, un área de extrema importancia entre la comunidad científica.¹⁰

¹¹ En los últimos años, los investigadores han extraído cada vez más productos naturales bioactivos de organismos marinos. Por ejemplo, la Eulotina C es un metabolito secundario citotóxico del ciliado marino *Euplotes crassus*, que exhibió efectos citotóxicos obvios en tres líneas celulares de melanoma humano diferentes (A375, MeWo y 501Mel). La farmacéutica Lillsunde¹² sintetizó 157 análogos de alcaloides derivados de esponjas marinas, clatrodina y oroidina, y descubrió que cuatro de ellos podían inhibir selectivamente el replicón del VHC.

Asimismo se aisló la Kealiinina B (**Figura 1**)¹³ de la esponja indonesia *Leucetta chagosensis*, cuyos derivados mostraron buenas actividades antivirales y antifúngicas.¹⁴



Figura 1 Kealiinina aislada de la esponja *Leucetta chagosensis*

Por otra parte, la leconotida (**Figura 2**) fue aislada a partir del molusco marino *Conus catus*, es un péptido compuesto por 27 aminoácidos. La leconotida (CVID, AM336, CNSB004) es una ω -conotoxina similar a la ziconotida, que bloquea los canales de calcio sensibles al voltaje. Es de origen peptídico y tiene un poderoso efecto analgésico, se emplea en pacientes con severo dolor crónico, con la ventaja de no generar adicción o dependencia. La leconotida se puede administrar por vía intravenosa, y tiene una perspectiva de aplicación más amplia en comparación con la ziconotida (**Figura 2**) que debe administrarse por vía intratecal.¹⁴



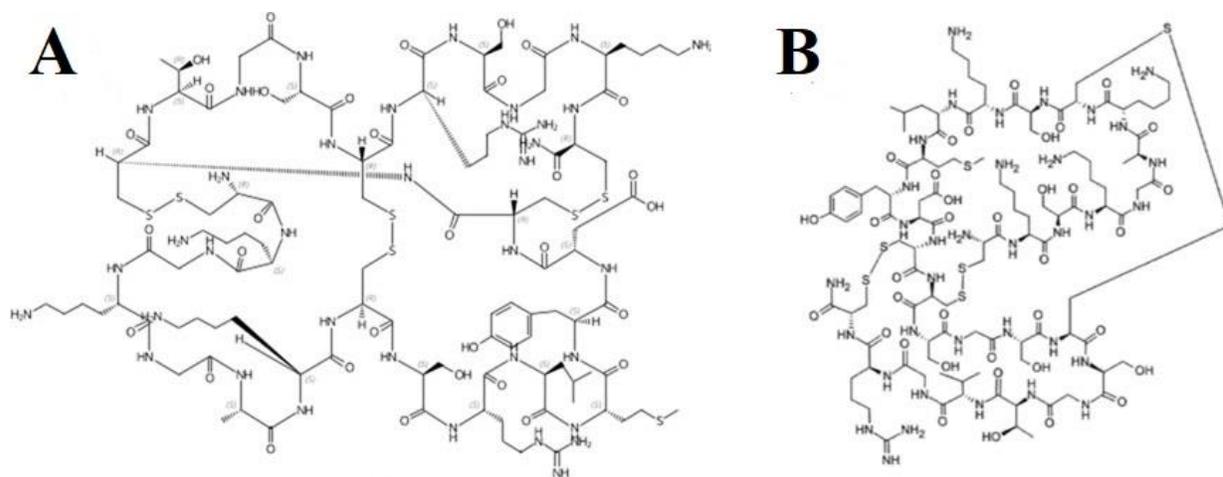


Figura 2 Estructura molecular de (A) Ziconotida y (B) Leconotida, aisladas de *Conis catus*.¹⁵

En el año 1994, Kobayashi obtuvo un análogo biológicamente equivalente y estructuralmente simple, la criptosporina 24 (**Figura 3**) de la esponja marina *Dysidea arenaria*. Las criptosporinas son una familia única de macrólidos, que se consideran uno de los nuevos fármacos más prometedores en el tratamiento del cáncer.¹⁶

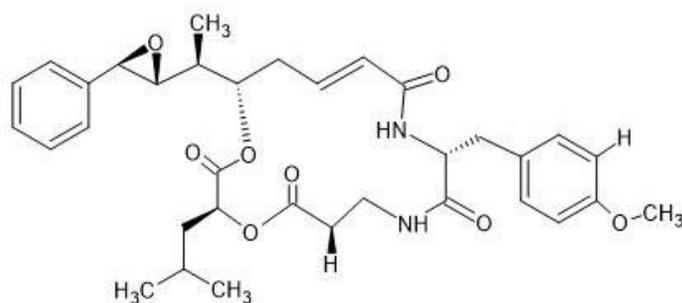


Figura 3 Estructura molecular de Criptosporina 24.

Otra molécula de gran relevancia es la Trabectedina (**Figura 4**). Fue el primer fármaco marino contra el cáncer aprobado por la Unión Europea (octubre de 2007). En octubre de 2015, Estados Unidos lo utilizó como fármaco de tratamiento para pacientes con liposarcoma o leiomiomas metastásico que habían recibido un régimen que contenía antraciclina. Se aislaron una serie de ecteinascidinas del tunicado caribeño *Ecteinascidia turbinata* y demostraron actividad antitumoral. Trabectedina (Ecteinascidin-743, ET743, Yondelis®)



tiene mejor actividad antitumoral que otras ecteinascidinas, por lo que fue seleccionada para un mayor desarrollo.

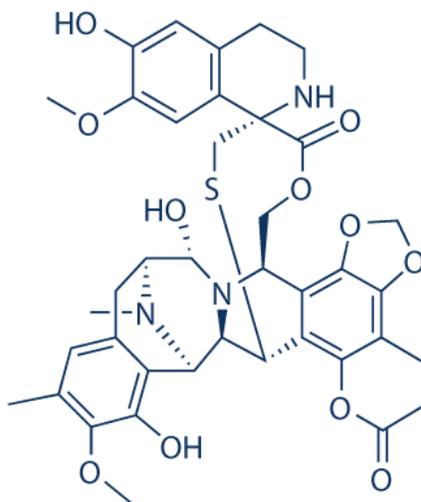


Figura 4 Estructura molecular de Trabectedina.¹⁷

Con el desarrollo de las técnicas de colecta de organismos marinos, como el buceo SCUBA la investigación de fármacos marinos ha progresado mucho, y muchos de ellos o sus análogos han ingresado al mercado global de fármacos y ensayos clínicos.

2.2 Cnidarios

El *phylum* Cnidaria contiene más de 11,000 especies. Es exclusivamente un grupo acuático, principalmente marino, incluye cinco clases principales (**Figura 5**): *Hydrozoa* (hidra y corales de fuego), *Scyphozoa* (medusas), *Cubozoa* (medusas de caja), *Staurozoa* (medusas con tallo) y *Anthozoa* (anémonas de mar, corales duros y corales blandos). Básicamente, el organismo unidad en Cnidaria es el pólipo, una cavidad gastrovascular sésil, pequeña (de unos pocos milímetros a menos de dos centímetros) rodeada por tres capas (una endodermis interna y una ectodermis externa con una matriz intermedia, la mesoglea). La boca del pólipo está rodeada de tentáculos, que facilitan la captura de presas¹⁸. Los pólipos forman diferentes tipos de colonias en *Hydrozoa* y *Anthozoa*. Por el contrario, viven como individuos aislados las especies *Scyphozoa*, *Cubozoa* y *Staurozoa*. Además de la etapa de pólipo, *Hydrozoa*, *Scyphozoa*, *Cubozoa* y *Staurozoa* tienen una etapa de nado libre (medusa), que coexiste con la etapa de pólipo.¹⁹



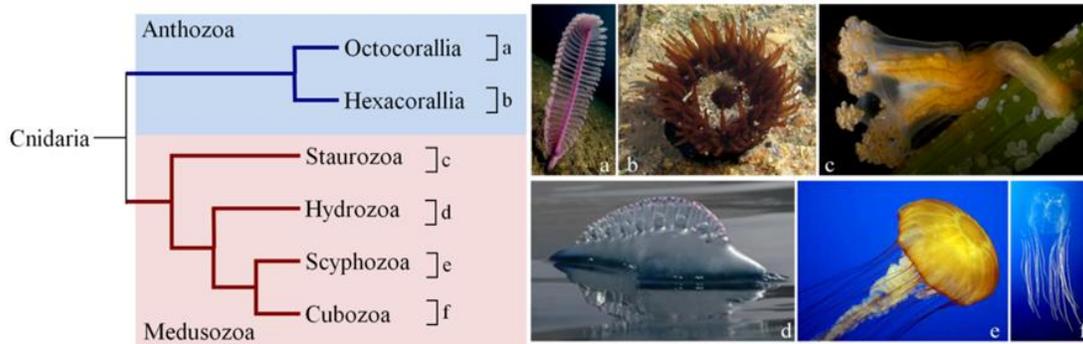


Figura 5 Cladograma simplificado del *Phylum Cnidaria*.²⁰

Tanto los organismos pelágicos como los bentónicos que pertenecen a este filo poseen orgánulos complejos y especializados (cnidae) hechos de una matriz de aminoácidos secretada por el aparato de Golgi.²¹ La estructura de los cnidos (**Figura 6**) es común en Cnidaria: una cápsula con paredes de colágeno llenas de toxinas con un túbulo en forma de hilo hueco enrollado. El túbulo se activa después de una estimulación mecánica. La mayoría de los túbulos, particularmente en los nematocistos, pueden penetrar la piel e inyectar las toxinas contenido en la cápsula, son el medio por el cual los cnidarios se defienden y obtienen presas. Los tentáculos o hilos tienen un ensanchamiento en su porción basal (el eje) y llevan numerosas y diferentes espinas. La clasificación de los cnidos se basa en la forma del eje y el tipo y distribución de las espinas²². La clasificación principal incluye nematocistos, espiroquistos y pticocitos^{18 22}. Los nematocistos tienen dos paredes que rodean la cápsula. Por el contrario, la cápsula de los espiroquistes tiene una pared única que es muy delgada. *Hydrozoa*, *Scyphozoa*, *Cubozoa* y *Staurozoa* poseen varios tipos de nematocistos, mientras que se han encontrado espirocitos en *Zoantharia* y los pticocitos parecen ser una característica de los tubos de *Ceriantharia*.

El mecanismo de descarga de los nematocistos se activa mediante estimulación química o física. En la mayoría de los organismos, la inyección induce parálisis, lo que facilita la siguiente captura del organismo. El mecanismo de captura de presas descrito anteriormente es básicamente el mismo para todas las etapas de Cnidaria, pólipo y medusa.²³ Sin embargo, las toxinas de Cnidaria pueden localizarse tanto en los nematocistos como en las células de las glándulas ectodérmicas, según la especie. Por ejemplo, la neurotoxina Nv1 de la anémona de mar *Nematostella vectensis* limita a las células de las glándulas ectodérmicas, mientras



que las toxinas de *Anemonia viridis* Tipo I se localizan tanto en los nematocistos como en las células de las glándulas ectodérmicas.²³

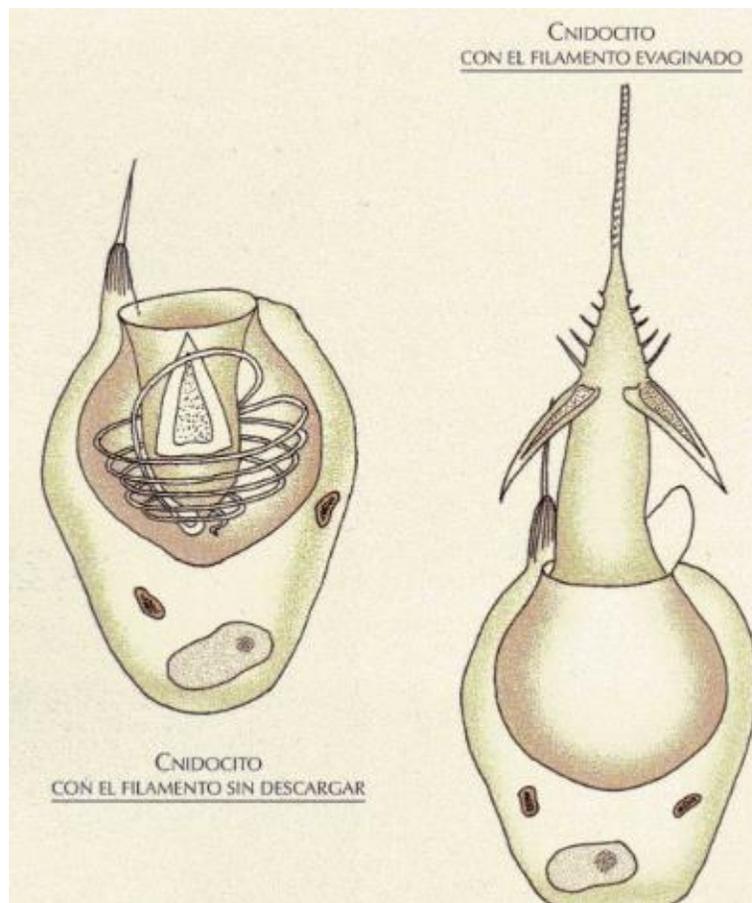


Figura 6 Estructura anatómica de un Cnido. Célula característica de *phylum* Cnidaria.²⁴

2.3 Productos naturales aislados de Cnidarios

La composición de los venenos de los cnidarios contiene una variedad de sustancias de naturaleza proteicas (péptidos, proteínas, enzimas e inhibidores de proteinasa) y no proteicas (purinas, compuestos de amonio cuaternario, aminas biogénicas y betaínas).²¹ Por ejemplo, la palitoxina es un poliéter de *Palythoa* y la caissarona es una iminopurina de *Bunodosoma caissarum*.²⁵

Este cóctel de toxinas varía de una especie a otra, pero consiste predominantemente en moléculas que actúan como neurotoxinas, citotoxinas e inducen dolor e inflamación.²⁶



Tabla 1. Tipos de toxinas aisladas de Cnidarios			
Tipo de Toxina	Clase en la que se encuentra	Función	Masa Molecular (kDa)
Enzimas			
Fosfolipasa A2	<i>Anthozoa, Cubozoa, Schyphozoa, Hydrozoa</i>	Citolítico, Hemolítico, Digestión de presas	13-45
Metaloproteasas	<i>Schyphozoa, Cubozoa, Anthozoa</i>	Citotóxico, citolítico, daño tisular local	17-130
Toxinas formadoras de poros (citolisinas)			
Actinoporinas y actinoporinas tipo proteínas	<i>Anthozoa, Hydrozoa</i>	Citolítico, Hemolítico, paro cardiovascular y respiratorio	20
Toxinas de medusa	<i>Cubozoa</i>	Hemolítico, cardiotónico, citolítico, miotóxico, inflamación cutánea	42-46
Toxinas relacionadas con Hidralisinas	<i>Hydrozoa, Anthozoa</i>	Citolítico, digestión de presas	27-31
Perforinas, complejo de ataque a membrana	<i>Anthozoa</i>	Citolítico, hemolítico	60
Neurotoxinas			
Toxinas del canal de Na ⁺ (tipo I-III)	<i>Anthozoa</i>	Neurotóxico, cardiotóxico, insecticida	3-8
Toxinas del canal de K ⁺ (tipo I, III y IV, V)	<i>Anthozoa</i>	Neurotóxico, Hipotensión, cardiotóxico, analgésico, antimicrobiano, inmunosupresor, anti-obesidad	3-4
Péptidos Kunitz (tipo II Ktxs)	<i>Anthozoa</i>	Paralítico, inhibidor de serine-proteasas	6
Small Cysteine-Rich Proteins (SCRiPs) y SCRiPs homólogos	<i>Anthozoa</i>	Paralítico	4.3-5.8
ASIC Inhibitors	<i>Anthozoa</i>	Analgésico	3
Inhibidores TRPV1	<i>Anthozoa</i>	Analgésico	3
Componentes bioactivos no proteicos			
Serotonina	<i>Hydrozoa, Anthozoa</i>	Vasodilatador, dolor agudo	-
Histamina	<i>Anthozoa</i>	Vasodilatador, dolor agudo	-
Bunodosina	<i>Anthozoa</i>	Analgésico	-
Caissarone	<i>Anthozoa</i>	Antagonista del receptor de adenosina	-



De todo el *Phylum* Cnidaria, la clase más estudiada es *Anthozoa*, la **Tabla 1**²⁷ enlista las principales toxinas extraídas de dicha clase, misma clase a la cual pertenece la anémona de estudio *Anthopleura texaensis*.

2.3.1 Fosfolipasa A2

La fosfolipasa A2 induce la descomposición de los glicerofosfolípidos, lo que produce lisofosfolípidos y ácidos grasos, como el ácido araquidónico¹²⁸. Los metabolitos derivados del ácido araquidónico (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) controlan una variedad de funciones celulares, incluido el catabolismo de los lípidos de la dieta, el metabolismo de la membrana celular y las enfermedades inflamatorias²⁹.

La fosfolipasa A2 es común en mamíferos, pero también en animales venenosos. Se ha identificado en reptiles (serpientes y lagartijas), ciempiés, insectos (sus cerdas, probóscides y agujones), arácnidos (escorpiones, arañas y garrapatas), cnidarios y cefalópodos.³⁰ Las funciones tóxicas de la fosfolipasa 2 en las toxinas de cnidarios incluyen la defensa, la inmovilización y la digestión de las presas.³⁰ La primera fosfolipasa A2 de cnidarios completamente secuenciada se publicó en 2002 para *Adamsia carcinoapados* y del género *Bunodosoma* se reportó la fosfolipasa A2 denominada Proteína catiónica C1 de la especie *Bunodosoma caissarum*.³¹

2.3.2 Metaloproteinasa

Las metaloproteinasas incluyen una gran variedad de enzimas proteinasas, que albergan un átomo de metal para realizar su actividad catalítica. Se encuentran en el veneno de animales terrestres, como ciempiés, serpientes y garrapatas^{32 33}. Inducen hemorragia y necrosis al degradar la matriz extracelular y prevenir la formación de coágulos sanguíneos. Estas funciones se asocian comúnmente con varios síntomas después de una picadura (daño en la piel, edemas, formación de ampollas, mionecrosis e inflamación).³⁴ Parecen ser comunes en las medusas que inducen picazón, como *Stomolophus meleagris*³⁵ y *Chironex fleckeri*³⁶.

2.3.3 Neurotoxinas

Las neurotoxinas son péptidos de bajo peso molecular que alteran el tejido nervioso. La neurotoxicidad es causada por el bloqueo de los procesos celulares de las neuronas, como la comunicación entre neuronas y la despolarización de la membrana por la toxina. El principal papel ecológico de las neurotoxinas es la parálisis y la inmovilización de la presa.



2.3.3.1 Toxinas de canales iónicos dependientes de voltaje

Cualquier familia de canales iónicos generalmente comprende varios subtipos con características fisiológicas, farmacológicas y estructurales particulares.³⁷ Los canales iónicos dependientes de voltaje juegan un papel crucial en la excitabilidad de las células y la transmisión neuromuscular de señales. Los canales iónicos activados por voltaje activan poros no selectivos dentro de las membranas por los que los iones pueden pasar utilizando el gradiente electroquímico a través de la propia membrana.³⁷ Cuando este mecanismo se altera, la transmisión de señales a través de las neuronas y los músculos también cambia de manera crítica, lo que puede conducir a ciertos trastornos, incluida la parálisis.

2.3.3.2 Toxinas de canales de Na⁺ dependiente de voltaje

Las toxinas de los canales de sodio activados por voltaje se han aislado desde la década de 1970 en *Anthozoa*³⁸, y representan la fracción más abundante en su extracto.³⁹ Estas toxinas, cuya masa molecular oscila entre 3,5 y 6,5 kDa, son capaces de unirse específicamente al sitio receptor y regular su funcionamiento.⁴⁰ Al controlar la apertura y el cierre del canal de sodio, las toxinas controlan las señales eléctricas que codifican y propagan información vital a largas distancias. La actividad de las toxinas del canal de sodio sugiere que pueden encontrar aplicación como bloqueadores del dolor. Por el contrario, Kalima y colaboradores⁴¹, sugirieron que los inhibidores de los canales de sodio extraídos de *Heteractis crispans* eran apropiados para aplicaciones farmacológicas, pero podrían usarse para estudiar los mecanismos más allá del transporte de sodio y para producir insecticidas.

Hay cuatro tipos de estos polipéptidos tóxicos de 3,5 a 6,5 kDa y se unen al sitio receptor tres del canal de Na⁺ durante el procedimiento de despolarización.

2.3.3.3 Toxinas de canales de K⁺ dependientes de voltaje

Estas toxinas inhiben la corriente de potasio a través de los canales Kv1. y Kv3. Las toxinas de los canales de potasio dependientes de voltaje se descubrieron durante la década de 1990.³⁸ Recientemente, las toxinas que actúan sobre el canal de potasio dependiente de voltaje se han investigado para el tratamiento de la esclerosis múltiple y otras enfermedades autoinmunes.⁴² Estas toxinas polipeptídicas de 3 a 5 kDa se pueden agrupar en cuatro clases estructurales: tipo I con 35 a 37 residuos de aminoácidos y tres puentes disulfuro; Tipo II con 58–59



residuos y tres puentes disulfuro; Tipo III con 41–42 residuos y tres puentes disulfuro; y Tipo IV con 28 residuos y dos puentes disulfuro.³⁸

2.3.4 Inhibidores de proteinasa tipo Kunitz

Se han identificado inhibidores de proteinasa tipo Kunitz en varias especies de cnidarios, pero exclusivamente en antozoos. Sus dominios activos, también conocidos como dominios Kunitz/BPTI, son relativamente pequeños, con un peso molecular de alrededor de 6 kDa. Antes del descubrimiento de las toxinas del canal de potasio Tipo II, se consideraba que los inhibidores de la proteinasa de la anémona de mar servían como inhibidores de las proteinasas endógenas en las propias anémonas de mar y como protectores de las toxinas inyectadas en presas y depredadores de una rápida degradación. Sin embargo, la identificación de toxinas del canal de potasio con actividad inhibidora de proteinasa sugiere que el papel ofensivo de los inhibidores de proteinasa de anémona de mar, al paralizar a la presa, puede ser más importante que su papel defensivo⁴³. El péptido IQ de tipo Kunitz HMIQ3c1, extraído del veneno de *Heteractis magnifica*, ha mostrado actividad neuroprotectora, que puede encontrar aplicación en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer.⁴⁴ Otro inhibidor de la proteinasa tipo Kunitz que puede apoyar el tratamiento de la enfermedad de Parkinson es el HCIQ2c1 extraído de *Heteractis crista*. Este estudio muestra por primera vez que los péptidos de Kunitz aumentan significativamente la viabilidad de las células de neuroblastoma en un modelo in vitro de neurotoxicidad inducida por 6-hidroxidopamina de la enfermedad de Parkinson.⁴⁵

2.3.5 Inhibidores del canal TRPA1

El Receptor de Potencial Transitorio Anquirina 1 (TRPA1, por sus siglas en inglés) es un nociceptor,⁴⁶ es el principal sensor de estrés mecánico y químico. Los agonistas de TRPA1 activan las neuronas sensoriales *in vivo*, lo que provoca dolor agudo, hiperalgesia térmica y mecánica e inflamación neurogénica. Otro modulador de TRPA1, denominado Ms 9a-1, se aisló de *Metridium senile* y mostró un efecto analgésico.⁴⁷ La actividad antibacteriana y la mejora moderada de TRPA1 sugieren que este péptido puede encontrar una gran aplicación como analgésico con propiedades antibacterianas.⁴⁸



2.3.6 Moduladores de canales ASIC

Los ASIC son canales iónicos sensibles al ácido y selectivos de sodio en el sistema nervioso periférico, particularmente activados durante la inflamación y la isquemia. Los péptidos π -AnmTX Ugr 9a-1 del veneno de la anémona de mar *Urticina grebelnyi*⁴⁹ y PhcrTx1 de *Phymanthus crucifer*⁵⁰ se dirigen a los canales ASIC. Además, también se han identificado Hcr 1b-1, Hcr 1b-2, Hcr 1b-3 y Hcr 1b-4 de la anémona de mar *Heteractis crispera* y han mostrado actividad neurotóxica al inhibir los canales ASIC. En particular, Hcr 1b-1 es un inhibidor específico de ASIC3 y Hcr 1b-2 puede inhibir los canales ASIC1a y ASIC3; los otros son específicos para el canal ASIC1a.⁵¹

2.3.7 Beta defensina como Inhibidores de Alfa-Amilasa

Entre los animales, los inhibidores de amilasa se han identificado solo en las anémonas de mar, que se encuentran entre los filos más antiguos que aparecieron en la Tierra.¹⁹ La heliantamida, un potente inhibidor de la α -amilasa pancreática humana es producida por la anémona del mar Caribe *Stichodactyla helianthus*, es el primer representante de un nuevo grupo de inhibidores de la amilasa que se aisló en 2016,⁵² mientras que la magnicamida es el segundo representante de dichos inhibidores. Ambos péptidos parecen ser compuestos prometedores para controlar la obesidad y la diabetes tipo.⁵³ La relevancia biológica de la presencia de inhibidores de la α -amilasa en las toxinas de Cnidarios sigue sin explicarse en gran medida. Se plantea la hipótesis de que la inhibición de la actividad de la α -amilasa interviene en el metabolismo de los hidratos de carbono, una fuente importante de energía para muchos organismos.⁵³

2.3.8 Citolisinas

Otro grupo de toxinas producidas ampliamente por los cnidarios, son las citolisinas (**Tabla 2**) que inducen necrosis, apoptosis e impide el crecimiento celular. La función ecológica de las citotoxinas es ayudar en la captura efectiva de presas y la defensa contra depredadores y competidores.⁵⁴ Según su estructura primaria y sus propiedades funcionales, las citolisinas se han clasificado en cuatro grupos de polipéptidos. El tipo I consta de péptidos de 5 a 8 kDa que forman poros en las membranas que contienen fosfatidilcolina y tienen actividad antihistamínica. El tipo II, las toxinas más numerosas dentro de las citolisinas se han estudiado extensamente y comprenden proteínas de 20 kDa, que son inhibidas por la



esfingomielina. Estas citolisinas tipo II también se denominan actinoporinas debido a su capacidad para unirse a los dominios de fosfolípidos de la membrana del organismo huésped, oligomerizando y formando poros selectivos de cationes. Las toxinas tipo III tienen 30-40 kDa y están formadas por citolisinas con o sin actividad, estando representadas hasta la fecha únicamente por las proteínas citolíticas del género *Urticina*. Las toxinas de tipo IV son citolisinas activadas por tiol con 80 kDa. *Metridium senile* produce metridiolisina que es hasta ahora el único representante de este grupo de toxinas.³⁸

Tabla 2. Clasificación de los diferentes tipos de citolisinas de acuerdo con su tamaño molecular		
Grupo	Masa molecular (kDa)	Actividad
I	5-8	Formación de poro; antihistamínica
II	20	Formación de poro
III	~30-45	Actividad de PLA ₂ ; Formación de poro
IV	80	Formación de poro

2.3.8.1 Toxinas formadoras de poros.

Son proteínas que rompen las membranas biológicas por lesión o formación de poros. La permeabilidad de la membrana plasmática de las células diana se altera, provocando la muerte celular.³⁸

2.3.8.2 Actinoporinas

Las proteínas formadoras de poros de la anémona de mar se denominan colectivamente actinoporinas, una subclase de toxinas formadoras de poros, un tipo de citolisina.⁵⁵

2.3.8.3 Complejo de ataque de membrana/perforinas (MACPF)

Las perforinas son proteínas formadoras de poros citolíticas que se unen a las membranas celulares y se oligomerizan para formar poros de hasta 20 nm de tamaño en la célula, lo que lleva a la citólisis.⁵⁶ El complejo de ataque a la membrana del sistema del complemento y la perforina producida por las células T y las células asesinas forman poros de hasta 20 nm en la membrana diana, lo que conduce a la lisis y muerte celular. A este grupo de citolisinas pertenecen PsTX-60A y PsTX-60B de *Phyllodiscus semoni* y AvTX-60A de *Actinaria villosa*, anémonas de mar japonesas.⁵⁷



2.3.8 Toxinas no pépticas

Se ha informado que *Heteractis crispa* produce palitoxina (**FIGURA 7A**), un poliéter, que es un vasoconstrictor y una de las toxinas no proteica más venenosas conocidas hasta la fecha. La bunodosina 391 es un aminoácido acilado descubierto a partir de *Bunodosoma cangicum* (**FIGURA 7B**). Se ha reportado que actúa sobre los receptores de serotonina y tiene actividad analgésica. La caissarona (3,9-dimetil-6-metilimino-8-oxo-3,6,8,9-tetrahidropurina) es una iminopurina de *Bunodosoma caissarum*, que es el primer compuesto marino informado como antagonista del receptor de adenosina (**FIGURA 7C**). Se ha reportado que la caissarona aumenta la motilidad en preparaciones aisladas de intestino de mamíferos. Se extrajo 1,2-iminometil-3-metil-6-aminometil-9H-purina de *Cylista troglodytes* (**FIGURA 7D**).

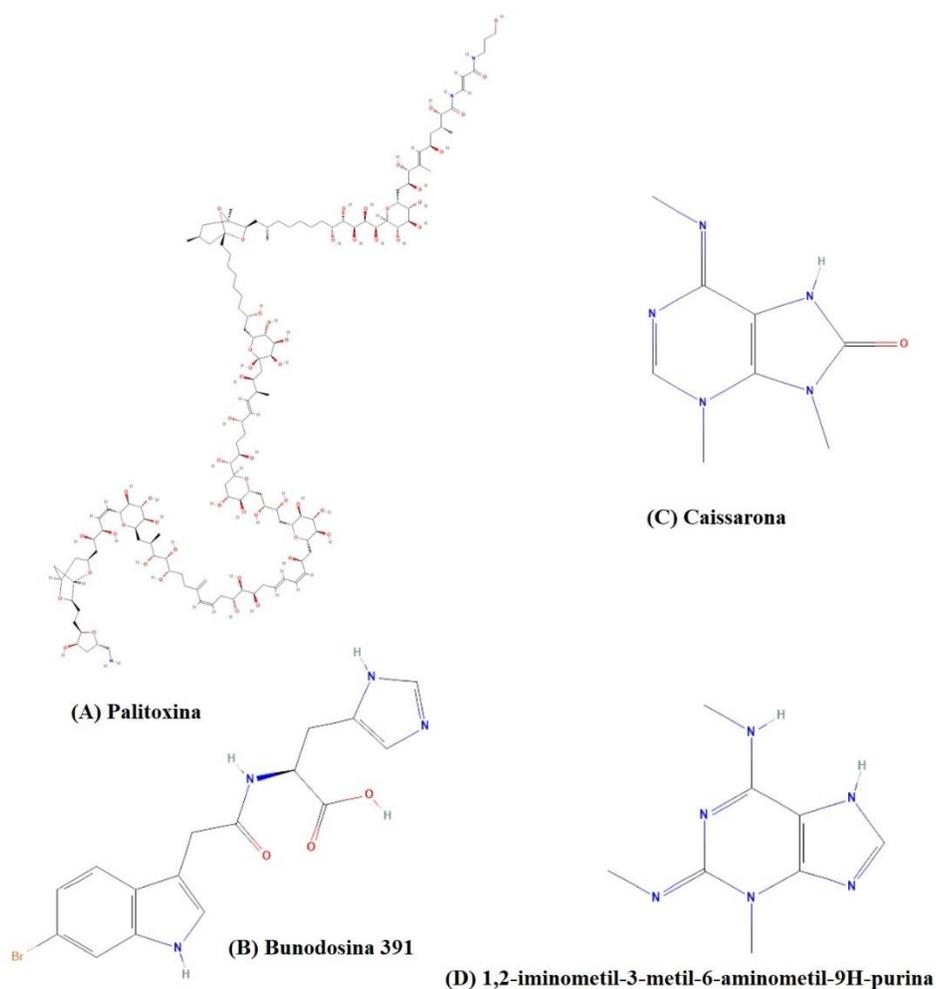


Figura 7 Estructura de toxinas no peptídicas aisladas de Cnidarios. (A) Estructura Palitoxina producida por *Heteractis crispa* (B) Estructura Bunodosina 391 aislada de *Bunodosoma*



cangicum (C) Estructura Caissarona presente en *Bunodosoma caissarum* (D) estructura de 1,2-ininometil-3-metil-6-aminometil-9H-purina aislada de *Cylista troglodytes*.⁵⁸

2.4 Anémonas

Las anémonas de mar son animales marinos invertebrados pertenecientes al *Phylum* Cnidaria (orden Actiniaria, Clase Anthozoa) que suelen estar adheridos a rocas o sustratos adecuados. En su mayoría son animales sésiles, pero si es necesario pueden moverse distancias cortas desliziéndose por el lecho marino. Están presentes desde las regiones tropicales hasta las polares y ocupan la zona intermareal de todos los océanos y se encuentran hasta profundidades de más de 10.000 m.⁵⁶ Las anémonas de mar tienen un papel importante en el ecosistema marino. Son animales depredadores que se alimentan de organismos de vida libre como crustáceos, moluscos y peces.⁵⁶ En su mayoría, son animales solitarios, pero también se sabe que algunos muestran simbiosis, especialmente en el ecosistema de los arrecifes de coral, donde ofrecen refugio y protección a otros animales del arrecife y, a cambio, reciben restos de comida y desechos metabólicos de los peces como fuente de nitrógeno.⁵⁵

2.4.1 Estructura anatómica

La forma típica de las anémonas (**Figura 8**) es cilíndrica, cuya base, o parte inferior, es el disco pedal, del que se vale para adherirse superficies rocosas principalmente, cuentan con una sola boca o también conocido como disco oral, rodeado de tentáculos, con los que el animal pica, aturde o captura a su presa, para ser arrastrada a la boca y de allí a la única cavidad del cuerpo en forma de saco. El disco oral se encuentra conformada por tentáculos que rodean la boca de la cavidad gástrica. Cada tentáculo está armado con células urticantes, cnidocitos, que contienen nematocistos, espirocistos y pticocistos. Los nematocistos consisten en pequeñas cápsulas que contienen un hilo liso o de púas enrollado en su interior. Utilizadas para la defensa y captura de presas, estas células urticantes también se pueden encontrar en otras partes del cuerpo. Las toxinas liberadas cuando se disparan los “arpones” pueden ser lo suficientemente potentes como para causar una picadura grave. Además, estos cnidocitos pueden hallarse en estructuras como la acontia (delgados hilos en los extremos de los mesenterios bajo los filamentos) y el acrorrhagi (crecimientos marginales en la pared del cuerpo de algunos géneros de Actiniaria).^{59,60}



La pared de su cuerpo está formada por dos capas celulares, una epidermis externa y una gastrodermis interna, con la presencia de una mesoglea que las divide. La presencia de células musculares se encuentra de manera predominante en las células de la gastrodermis.⁵⁹

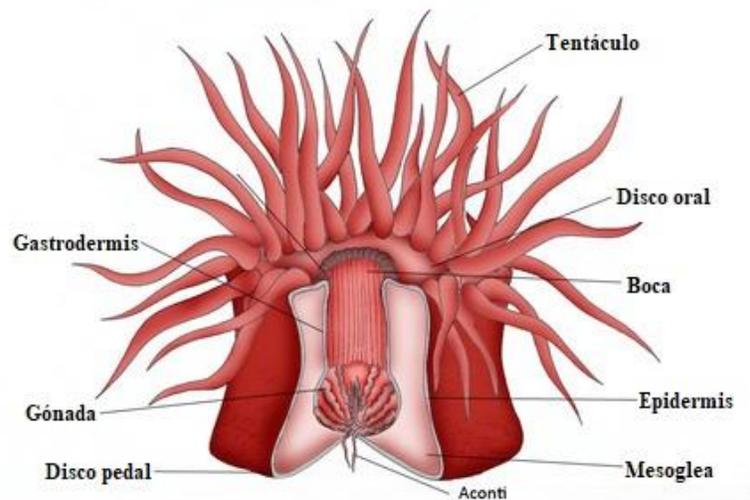


Figura 8 Estructura anatómica representativa de las anémonas.²⁷

2.4.2 Nematocistos

Las células urticantes (cnidocitos) son distintivas de los animales marinos venenosos del filo Cnidaria. Contienen orgánulos microscópicos (cnidae) que se descargan de forma explosiva, inyectando una mezcla de compuestos en presas o depredadores. Al entrar en contacto con la piel humana u otra superficie (p. ej., presa y depredador), los cnidos o nematocistos penetrantes evierten túbulos en forma de arpón cargados de espigas que actúan como dispositivos hipodérmicos para inyectar veneno (porinas proteicas, péptidos neurotóxicos y lípidos bioactivos).⁶¹

Los cnidocitos son células punzantes que disparan dardos para el ataque y la defensa.⁶² Funcionalmente, el disparo está regulado porque los cnidocitos son costosos, su costo no solo se deriva de su estructura compleja sino del hecho de que son dardos de un solo uso.⁶³ Trabajando como una pistola de arpón desechable, cada vez que se dispara un cnidocito, se debe reemplazar toda la célula; por lo tanto, no solo el arpón sino toda la pistola. Un elenco complejo de células de apoyo, incluidos los cilios y los quimiorreceptores, detectan estímulos químicos o físicos para regular la activación de los cnidocitos.⁶³



Los nematocistos son armas celulares complejas con formas y funciones altamente especializadas que representan una característica taxonómicamente restringida del *phylum* Cnidaria. Los nematocistos son orgánulos intracelulares derivados del aparato de Golgi²² compuestos por hilos venenosos encerrados dentro de una cápsula presurizada. Algunos tipos de nematocistos están asociados con las toxinas. Los nematocistos son el medio por el cual los cnidarios se protegen y capturan a sus presas, pero también son usados para la locomoción.²¹

Los nematocistos contienen toxinas y cuando se activan al entrar en contacto de con un estímulo químico o mecánico,⁶¹ la célula se descarga explosivamente, expulsando un tipo de estructuras microscópicas similares a arpones (cnida) que penetran la capa superficial de la víctima y liberan una mezcla de sustancias altamente tóxicas.⁶⁴

Debido a su papel en la depredación, se localizan principalmente en los tentáculos, lo que permite a los animales de este filo una eficiente captura de presas, aunque carecen de un sistema nervioso central sofisticado.⁶²

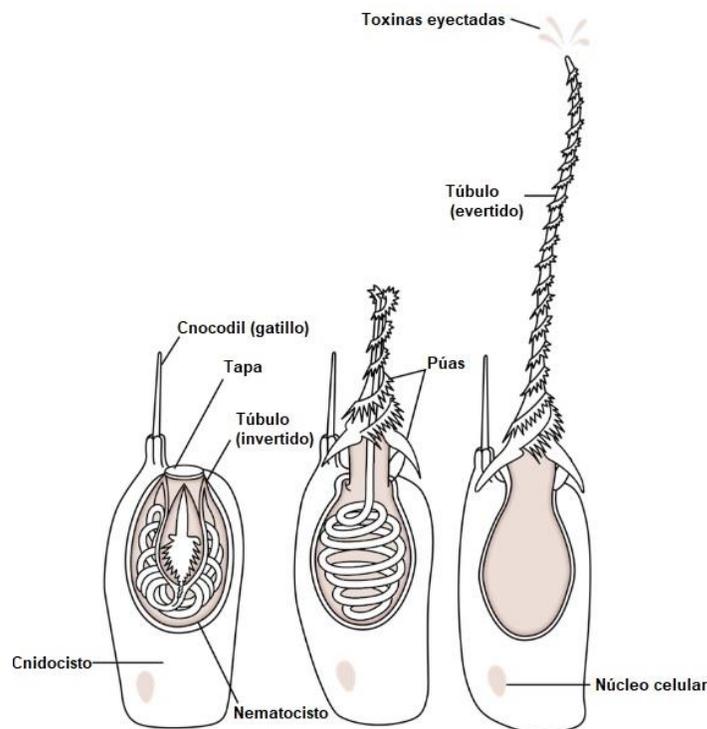


Figura 9 Diagrama de un cnidocisto eyectando un nematocisto.⁶⁵



2.4.3 *Anthopleura texaensis*

2.4.3.1 Clasificación taxonómica

Phylum: Cnidaria

Clase: Anthozoa

Orden: Actiniaria

Género: *Anthopleura*

Especie: *Anthopleura texaensis*

(Carlgren & Hedgepeth, 1952).⁶⁶

La clase *Anthozoa* incluye a los corales azules, corales negros, gorgonias, anémonas, plumas de mar, etc., clasificados en 10 órdenes y más de 7,500 especies válidas. Entre los 512 géneros diferentes de anémonas de mar conocidos, *Anthopleura* está representado por al menos 50 especies.⁶⁷

2.4.3.2 Distribución geográfica

A. texaensis habita aguas poco profundas, se adhiere a rocas. Su distribución comprende el Océano Atlántico Oeste desde las costas de Texas hasta las costas de Florida (**Figura 10**) además del Mar Caribe, Golfo de México, Islas Carolina, Micronesia.⁶⁸

En México la distribución de la anémona, se ha reportado en las zonas de la Península de Yucatán (banco de Campeche, arrecifes de Yucatán), en el Golfo de México (arrecifes de Veracruz) y en el Mar Caribe (Isla Mujeres, Punta Cancún, Puerto Morelos, Cozumel, Akumal, Tulum, Majahual, Xcalak).⁶⁹





Figura 10 Distribución geográfica de la anémona *A. texaensis*, que comprende el Golfo de México.⁷⁰

2.4.3.3 Moléculas activas presentes en el género *Anthopleura*

Se han aislado, caracterizado y determinado la presencia de moléculas activas a partir del género *Anthopleura*. En la **Tabla 3** se enlista a manera de resumen las toxinas aisladas y reportadas de 4 anémonas pertenecientes al género *Anthopleura*, como lo son: *A. asiática*, *A. elegantissima*, *A. fuscoviridis*, *A. xanthogrammica*.

Tabla 3. Toxinas identificadas en anémonas del género *Anthopleura*, incluyendo su masa moléculas (kDa)

Especie	Compuesto	Masa molecular (kDa)	Actividad biológica
<i>Anthopleura asiatica</i>	Bandoporina	20	Actividad hemolítica
<i>Anthopleura elegantissima</i>	Anthopleurina-C	N/A	Cardiotóxica en ratas, toxina de canal de sodio Tipo I
	APE 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3, 4 y 5-3	5	Genera parálisis en cangrejos, toxina de canal de sodio Tipo I



	APET x2	4.6	Inhibidor de ASIC3 (actúa en la parte externa del canal)
<i>Antopleura fuscoviridis</i>	AFT-I y AFT-II	N/A	Toxina de canal de sodio tipo I
<i>Anthopleura xanthogrammica</i>	Anthopleurina-A y Anthopleurina-B	N/A	Cardiotoxico en ratas, toxina del canal de potasio tipo I
	Toxina PCR 1-2, 2-1, 2-5, 2-10, 3-6, 3-7, 3-3, 4	N/A	Toxina de canal de sodio Tipo I
	AXPI-I y AXPI-II	N/A	Inhibidor tipo Kunitz
<i>Anthopleura spp.</i>	Hk2a, Hk7a, Hk8a, Hk16a	~5	Toxina del canal de sodio tipo I

La anémona *A. asiática*; es una especie común en las costas japonesas del Océano Pacífico y el Mar de Japón, que van desde las latitudes medias del sur de Honshu hasta Kyushu, De la cual se ha caracterizado la toxina proteica hemolítica denominada Bandaporina. La bandaporina mostró potente actividad hemolítica y toxicidad letal en Cangrejos de río, logrando así la identificación de un nuevo miembro de las toxinas de tipo actinoporina.⁷¹

Por otro lado, la anémona *A. elegantissima* ha sido una fuente importante de aislamiento de toxinas. Un ejemplo de ello es la denominada Anthopleurina C, aislada e identificada por Norton *et al.*, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo de acción exacto.⁷²

Por otro lado, Bruhn *et al.* aisló y caracterizó 5 polipéptidos neurotóxicos y cardiotoxicos de *A. elegantissima*, a partir del extracto acuoso metanólico. La purificación se realizó mediante diálisis y cromatografía de intercambio aniónico. La purificación final se logró mediante HPLC, identificando así 5 toxinas APE₁₋₁, APE₁₋₂, APE₂₋₁, APE₂₋₂ y APE₅₋₃. Todas las isotoxinas mostraron parálisis en cangrejo, a su vez producen un efecto inotrópico positivo en el músculo cardíaco de los mamíferos.⁷³

De la misma anémona *A. elegantissima*, Diochot *et al.* aislaron una nueva toxina (APETx2) que inhibe canales homomoméricos ASIC3 y los canales heteromoméricos en cultivos primarios de neuronas sensoriales de rata.⁷⁴



A su vez, de la anémona *A. fuscoviridis*, endémica de las costas de Japón, Satoshi *et al.* secuenciaron dos polipéptidos de 47 y 48 residuos de aminoácidos respectivamente: AFT-I y AFT-II, que demostraron actividad cardiotoxica y neurotóxica en cangrejo de río. Las secuencias tienen una alta homología con las de las toxinas I y II de *A. sulcata* y la antopleurina-A y -B de *A. xanthogrammica*.⁷⁵

De la anémona *A. xanthogrammica*, se aislaron dos polipéptidos cardioestimulantes denominados Antopleurina A y Antopleurina B que mostraron un poderoso efecto inotrópico positivo sin efecto cronotópico. Estudios farmacológicos posteriores indicaron que el sistema adrenérgico no estaba involucrado en el mecanismo de acción, la Na⁺, K⁺-ATPasa no se inhibía y los extractos no afectaban al tejido vascular. Estos polipéptidos no solo son herramientas útiles para el estudio de los canales de sodio activados por voltaje, sino que en los mamíferos esta interacción puede causar un potente efecto inotrópico positivo (aumento de la fuerza de la contracción cardíaca), lo que hace que algunas de estas toxinas sean compuestos potencialmente útiles en el desarrollo de nuevos estimulantes cardíacos. Por lo cual existe un interés en continuar analizando las antopleurinas como compuestos principales en el diseño de nuevos estimulantes cardíacos.⁹

Posteriormente en el año 1998 se identificaron y caracterizaron seis nuevas toxinas de *A. xanthogrammica*. De aproximadamente 47 residuos de aminoácidos, dichas toxinas interactúan con el canal de sodio con una afinidad aún mayor, mejorando la absorción de sodio.⁷⁶

Otro tipo de toxina aislada de *A. xanthogrammica* fueron dos inhibidores de proteasas (AXPI-I y AXPI-II), aisladas y secuenciadas en el año 1997 por Minagawa *et al.*, con actividad potente contra tripsina e inhibición de otras serin-proteasas. Ambos polipéptidos comprenden 58 residuos. Ambos inhibidores pertenecen a la familia tipo Kunitz.⁷⁷

Por último, se caracterizaron cuatro neurotoxinas de *Anthopleura spp.*, denominadas Hk2a, Hk7a, Hk8a y Hk16a, las cuatro neurotoxinas están compuestas por 47 aminoácidos. Demostraron fuerte actividad estimulante de las contracciones cardíacas.



Por todo lo anterior las anémonas pertenecientes al género *Anthopleura* son un blanco clave para el análisis y determinación de nuevas toxinas para posibles enfermedades cardíaca o relacionada con el sistema nervioso central.

2.5 Separación biodirigida

Los productos naturales bioactivos tienen una enorme importancia económica como especialidades químicas. Pueden utilizarse como fármacos, herramientas biológicas o farmacológicas, productos básicos (materias primas para la producción de fármacos), excipientes y nutracéuticos.

La naturaleza solo utiliza unos pocos componentes básicos para sus rutas biosintéticas, pero la gran diversidad de los productos finales resulta de varias enzimas "decoradoras" que se encuentran en cada especie, que inducen nuevas funciones. Que no son productos de desecho, sino metabolitos secundarios especializados involucrados en la relación del organismo con el medio ambiente, por ejemplo, como atrayentes de polinizadores, señalizadores, sustancias defensivas contra depredadores y parásitos, o resistencia contra plagas y enfermedades.

Una de las metodologías exitosas para la investigación de los productos naturales como fuente de nuevas moléculas con actividad terapéutica, incluye la detección de actividad farmacológica de las preparaciones del extracto de los productos naturales, seguida de un fraccionamiento guiado por bioensayos. Lo que conduce al aislamiento de los constituyentes activos puros del producto natural. Idealmente, esta metodología implica la prueba *in vivo* del fármaco tradicional para determinar la actividad farmacológica reivindicada. Después de la confirmación experimental de esta actividad, se desarrolla un método como el uso de bioensayos, que luego puede usarse para monitorear la actividad durante la purificación de los componentes activos, presentes en los productos naturales. Una vez que estas sustancias activas han sido identificadas, se puede desarrollar la estandarización de una preparación, o pueden iniciarse estudios de relación estructura-actividad mediante la síntesis parcial o total de las sustancias activas.⁷⁸

El objetivo es el aislamiento dirigido de nuevos productos bioactivos, es decir, sustancias con nuevas estructuras y nuevos mecanismos de acción. Se deben superar varios obstáculos para el descubrimiento de fármacos. Cuando se ha identificado un extracto activo, el primer obstáculo que se debe tomar es la dereplicación (la identificación rápida de compuestos



conocidos de una mezcla parcialmente purificada y la identificación de una estructura desconocida suficiente para priorizar o realizar un aislamiento). Esto puede significar una identificación completa de un producto natural después de una purificación o una identificación parcial al nivel de una familia de compuestos conocidos.

Utilizando técnicas “tándem”, la separación se lleva a cabo con los componentes analizados “en línea” por uno o más métodos espectroscópicos. El segundo obstáculo es la purificación del nuevo compuesto por métodos cromatográficos, el tercer obstáculo es la determinación de la estructura por métodos espectroscópicos, y cuando se ha establecido la nueva estructura, el cuarto obstáculo es la ampliación de la producción. El quinto y último obstáculo es la fase de química farmacéutica y cuando se ha caracterizado un compuesto principal optimizado, puede comenzar el proceso de desarrollo del fármaco.

La detección de alto rendimiento utiliza bioensayos específicos de un solo objetivo (pruebas en enzimas aisladas o en la unión del receptor) o bioensayos funcionales de múltiples objetivos (ensayos en animales completos, órganos aislados o células intactas). Los bioensayos se pueden miniaturizar en placas de micropozos de alta densidad (p. ej., placas de 1536 pocillos) a escala de microlitros.^{27,79,80}

2.5.1 Bioprospección

La bioprospección se define como una búsqueda sistemática y organizada de productos útiles derivados de biorecursos, incluidas plantas, microorganismos, animales, etc., que pueden desarrollarse aún más para la comercialización y los beneficios generales de la sociedad.

La bioprospección ha llevado a un mayor interés en aplicaciones potenciales para organismos marinos y sus subproductos, para la búsqueda de nuevos compuestos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades.⁸¹ La bioprospección de nuevos productos naturales marinos ya ha producido varios miles de moléculas novedosas. Además, dado que la biodiversidad del océano es mayor que la registrada en tierra, se espera que el descubrimiento de moléculas bioactivas aumente en los próximos años, proporcionando terapias nuevas y mejoradas para enfermedades humanas, junto con otros productos innovadores para otras actividades industriales (por ejemplo, nutracéuticos y biotecnología).⁸²



2.6 Bioensayos

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de evaluación bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos. Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades.⁸³

Existen algunos requisitos generales para los bioensayos para extractos de productos naturales: validez, falta de ambigüedad, precisión, reproducibilidad, simplicidad y un costo razonable. Algunas consideraciones especiales incluyen una alta selectividad (para limitar el número de derivaciones para la evaluación de seguimiento), una alta sensibilidad (para detectar bajas concentraciones de compuestos activos) y una alta especificidad (para ser insensible a una amplia variedad de compuestos inactivos) (eliminación de falsos positivos). La metodología también debe ser adaptable a materiales muy coloreados, alquitranados, poco solubles en agua y químicamente complejos.⁷⁹

2.7 Métodos para la determinación de toxinas

Para estudiar y caracterizar la actividad de una toxina, primeramente, se debe aislar y purificar. La purificación debe ser monitoreada mediante bioensayos de la actividad que se desea estudiar.

Los extractos de algunos animales, como los escorpiones, las arañas y anémonas, por lo general se obtienen en pequeñas cantidades, igual que las toxinas una vez purificadas. Por ello se requiere de un método de cuantificación que permita la preservación del material de estudio.

2.7.1 Purificación de las toxinas

2.7.1.1 Preparación de la muestra

Este es el aspecto más crítico en el proceso de purificación de las toxinas ya que el origen y tipo de la muestra suele ser muy diverso y en cada caso se deben tomar consideraciones diferentes y muchas veces de tipo empírico. La presencia de proteasas en algunos venenos es un factor que requiere una especial atención por lo cual es recomendable conservar las muestras en frío (-80°C) desde el momento de la extracción, ocasionalmente se usan



inhibidores de proteasas para preservar la muestra que va a ser posteriormente analizada. Este aspecto garantiza que se cuente con el total de los componentes proteicos presentes en la misma.

2.7.1.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

El desarrollo de fármacos biológicos modernos proviene principalmente del uso de tecnología de ADN recombinante en microorganismos vivos como *Escherichia coli* o la búsqueda de moléculas con potencial farmacológico de productos naturales, para producir agentes terapéuticos. Casualmente, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR, HPLC en inglés) surgió casi al mismo tiempo que estos avances biotecnológicos, y cada campo promueve y complementa el desarrollo del otro. La complejidad de los productos biológicos requiere el desarrollo de herramientas analíticas sofisticadas, incluidas mejoras en CLAR y espectrometría de masas (EM), lo que contribuye notablemente al análisis de los productos biológicos y facilita su desarrollo.⁸⁴

CLAR (**Figura 11**) es una técnica que separa los componentes de una muestra según su polaridad, tamaño molecular o carga eléctrica. De acuerdo con la propiedad en la que se base la separación de los componentes se escogerá la matriz a utilizar en la cromatografía. Las muestras de extractos de Cnidarios por su naturaleza pueden venir acompañadas de una muy alta concentración de sales, que interfieren, en general, en la separación mediante CLAR.

Los componentes de los extractos se separan por sus diferencias en polaridad. La colección de las fracciones se realiza de forma manual, se retira cualquier disolvente orgánico empleado en la separación por destilación (rotaevaporación), y el remanente acuoso se liofiliza y se mantiene a 5°C hasta su uso. Lo versátil de este método es que las fases móviles desaparecen al destilar o liofilizar, esto no ocurre cuando se trabaja con intercambio iónico que implica el uso de buffers con sales que luego requerirán un paso de desalinización. Al trabajar con fase reversa las toxinas liofilizadas se pueden resuspender directamente en las soluciones requeridas (buffers, medios de cultivo) para estudios posteriores de actividad en células aisladas.^{85,86}



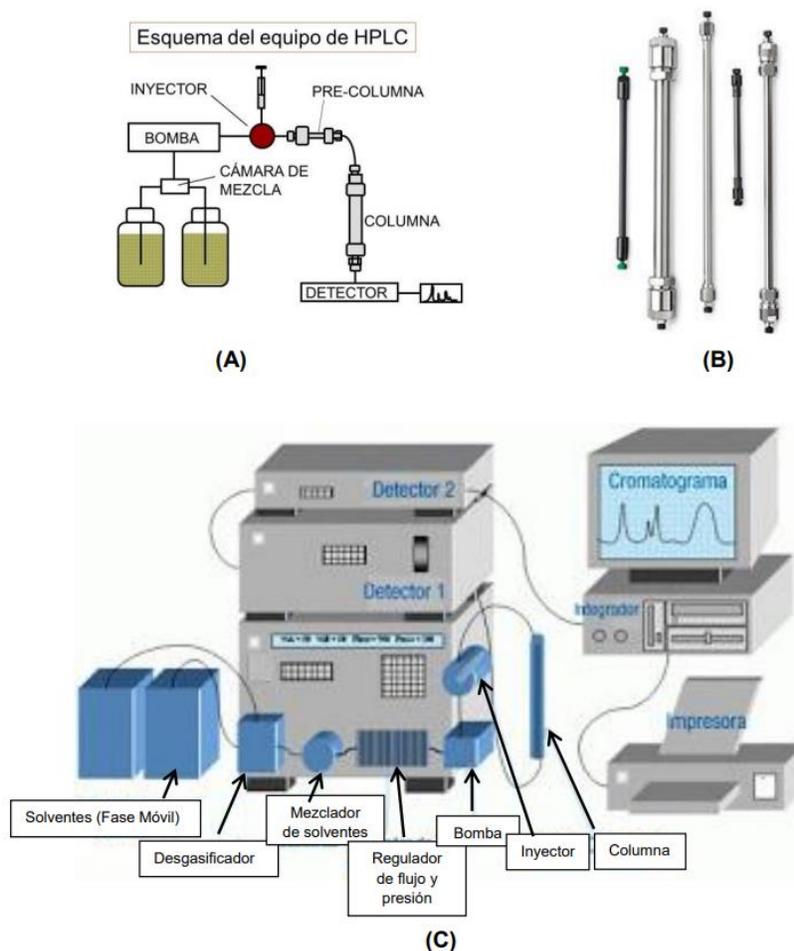


Figura 11 (A): Esquema general básico de un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR, HPLC en inglés); (B): Columnas para CLAR; (C): Sistema CLAR completo.

2.7.1.2.1 Cromatografía de Fase Reversa (RPC)

RPC es un tipo de método clave para la separación de proteínas y péptidos en función de su hidrofobicidad en condiciones nativas o desnaturizantes. RPC ofrece una separación de resolución relativamente alta, especialmente para los métodos de mapeo de péptidos para la caracterización de variantes de proteínas.⁸⁴

En condiciones de RPC, las proteínas y los péptidos se separan en función de su hidrofobicidad y su interacción con los ligandos hidrofóbicos en las fases estacionarias. Los ligandos de la fase estacionaria suelen estar compuestos por cadenas de carbono de diferentes longitudes, desde 4 carbonos (fase C4) hasta 18 carbonos (fase enlazada C18), entre más larga sea la cadena de carbono la fase estacionaria tendrá mayor hidrofobicidad.



La RPC de proteínas y péptidos generalmente emplea temperaturas altas y disolventes orgánicos, que pueden desnaturalizar a las proteínas y exponen los núcleos hidrofóbicos. El uso de gradientes lentos es común ya que las proteínas tienden a eluirse en un segmento de gradiente muy estrecho.

Para los péptidos, los métodos RPC se establecieron hace mucho tiempo utilizando columnas C8 o C1 y ácido trifluoroacético o ácido fórmico como aditivo de fase móvil para fases móviles de agua/acetonitrilo.^{85,87}

2.7.1.2.2 Cromatografía de Intercambio Iónico (IEC)

Los bioquímicos analíticos utilizan rutinariamente la cromatografía de intercambio iónico (Catiónico o Aniónico) para resolver las variantes de carga de las proteínas, cuya conformación nativa y bioactividad se conservan durante la separación.

Los métodos basados en la carga, son un componente integral de los estudios de caracterización de proteínas. IEC separa las proteínas en función de las diferencias en la carga superficial de las moléculas, y la separación está dictada por la interacción de la proteína con la fase estacionaria.

Dentro de la cromatografía de intercambio iónico podemos distinguir entre cromatografía de intercambio aniónico y catiónica. Durante una separación por intercambio de aniones, los aniones (moléculas cargadas negativamente) se unen a ligandos cargados positivamente de la fase estacionaria y se intercambian con contraiones cargados negativamente del buffer. La cromatografía de intercambio catiónico es al revés. Los cationes se unen a grupos cargados negativamente de la fase estacionaria y se intercambian con iones cargados negativamente del buffer.^{84,85,87}

2.7.1.2.3 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

La cromatografía de exclusión molecular (SEC) es una técnica analítica de uso común para el análisis de proteínas, en parte porque puede resolver alto peso molecular de proteínas. Las columnas SEC generalmente están llenas de partículas porosas con ligandos de diol hidrofílicos que sirven como fase estacionaria. Los poros de las partículas de la fase estacionaria restringen el acceso de las moléculas en función de su radio de Stokes. Las



proteínas más grandes son excluidas de los poros, eluyendo así primero. Las proteínas posteriores eluyen en orden de tamaño decreciente.⁸⁴

La cromatografía de exclusión por tamaño o filtración en gel es una técnica de sin interacción con la columna, por lo que se utilizan métodos isocráticos para su desarrollo (**Figura 12**). Es muy útil en la separación de proteínas, como el caso de las toxinas presentes en los Cnidarios.

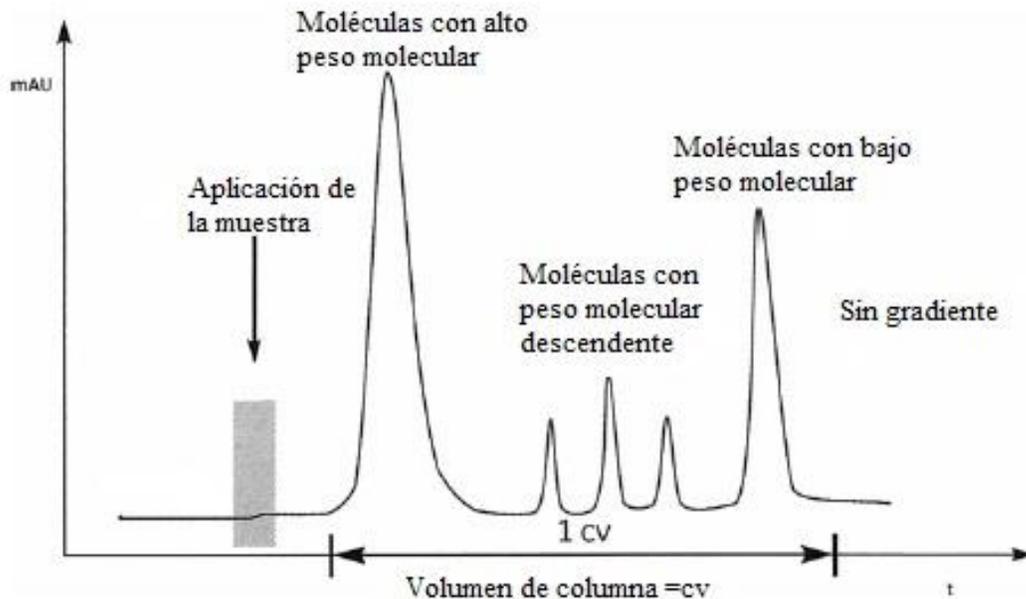


Figura 12 Cromatograma de SEC (también conocida como gel permeable). Generalmente no se utilizan gradientes con esta técnica.⁸⁷

2.7.1.3 Cromatografía en Fase Sólida (CFS)

Dado que las proteínas tienen rasgos característicos diferentes como tamaño, forma, carga neta, fase estacionaria utilizada y capacidad de unión, cada uno de estos componentes característicos se puede purificar mediante métodos cromatográficos. Entre estos métodos, con mayor frecuencia se aplica la cromatografía en fase sólida, técnica que permite la separación de una mezcla de forma semipreparativa o preparativa (más de 100 mg por análisis). Esta técnica se utiliza para la purificación de biomoléculas. En una columna (**Figura 13**) (fase estacionaria) primero se aplica la muestra a separar, luego se aplica tampón de lavado, y por último se procede a eluir la muestra, la cual puede ser en una fase o mediante la aplicación de un sistema de gradiente (fase móvil).⁸⁵



La cromatografía en fase sólida es una técnica rápida y rentable para la purificación de muestras complejas antes de su análisis mediante cromatografía de líquidos o de gases. Ya que se eliminan compuestos indeseables que pueden interferir con el análisis. En muchos casos la CFS ha remplazado la extracción líquido-líquido, que a menudo usa grandes volúmenes de disolvente.⁸⁸

Las aplicaciones típicas de CFS incluyen la limpieza de muestras, el enriquecimiento de trazas, la desalinización, el intercambio de disolventes y la conservación y el almacenamiento de muestras.

En el caso de los productos naturales marinos es muy importante el uso de cromatografía en fase sólida, ya que, al obtener el extracto, este contiene grandes concentraciones de sales y el uso de CFS ayuda al desalado de la muestra y eliminación de compuestos que pueden interferir en el posterior análisis por CLAR.

Las fases estacionarias clásicas de CFS van desde sílice pura y otros adsorbentes sólidos como alúmina, florisil, y carbono a sílice enlazada químicamente con fases similares a las utilizadas en CLAR. Las sílices aglomeradas siguen siendo los empaques de SPE más utilizados, y se han desarrollado varias décadas de aplicaciones.

Las cadenas de hidrocarburos tanto en el analito como en el adsorbente son atraídas entre sí por las fuerzas de dispersión de Van der Waals de baja energía. Los adsorbentes comunes de fase reversa contienen cadenas de hidrocarburos saturados como C18 y C8, o anillos aromáticos como fenilo o bifenilo. Debido a que las separaciones de fase inversa son relativamente inespecíficas, normalmente se retiene una amplia gama de compuestos orgánicos.

Los dispositivos de cartucho típicos consisten en columnas cortas (**Figura 13**) (generalmente un cilindro de jeringa abierto) que contienen un sorbente con un tamaño de partícula nominal entre 20 y 60 μm .⁸⁹



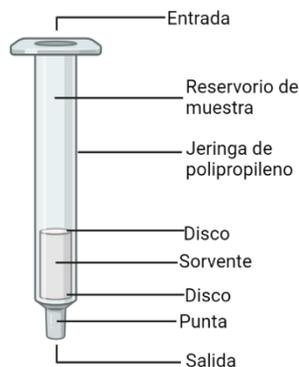


Figura 13 Estructura de una columna típica de Cromatografía en Fase sólida.

2.7.1.3.1 Pasos para el uso de CFS

La preparación de muestras con CFS normalmente consta de 4 pasos básicos (**Figura 14**): acondicionamiento, carga de muestras, lavado y elución.⁹⁰

1. **Lavado y acondicionamiento:** Antes de cargar la muestra/matriz, la columna SPE generalmente se lava y se “humedece” con metanol, isopropanol u otro(s) solvente(s) orgánico(s) de polaridad intermedia. Este paso de acondicionamiento elimina el aire atrapado y solvata o activa los ligandos en la superficie cromatográfica, lo que les permite interactuar de manera más efectiva con los analitos objetivo.
2. **Carga de la muestra:** Es la aplicación e introducción real de la muestra/matriz en la columna CFS. El objetivo principal del paso de carga de la muestra es garantizar que el(los) analito(s) objetivo (s) sean retenido cuantitativamente por el adsorbente.
3. **Lavado:** Los pasos de lavado están diseñados para eluir las impurezas que se retienen en el sorbente con menos fuerza que los analitos objetivo, y para enjuagar o "expulsar" los componentes residuales no retenidos de la muestra/matriz que pueden quedar del paso de carga de la muestra.
4. **Elución:** Una vez que los contaminantes retenidos más débilmente se han lavado de la muestra, se usa un disolvente "fuerte" diseñado para interrumpir las interacciones analito-sorbente para desorber o eluir selectivamente el analito del sorbente. Una mejor estrategia es la aplicación de un gradiente para ayudar en la separación de un extracto crudo complejo.





Figura 14 Pasos en el uso, acondicionamiento y tratamiento de la muestra en cromatografía en fase sólida.

2.7.1.3.2 Tipos de columnas

A continuación, se describen dos tipos de columnas C18 de cromatografía en fase sólida. En la **Tabla 4**, se comparan sus especificaciones.

- Columna C18-U (Phenomenex®)

La columna de CFS C18-U (**Figura 15**) tiene adsorbente de sílice C18 sin protección terminal, lo que otorga a la fase una selectividad hidrofóbica moderada con una selectividad polar leve debido a los grupos silanol activos. Los analitos objetivo son compuestos hidrofóbicos ligeramente polares. Retiene la mayoría de los analitos orgánicos de las matrices acuosas.

Se utiliza para desalinizar matrices acuosas antes del intercambio iónico, ya que las sales pasan a través del adsorbente sin retención.⁹¹

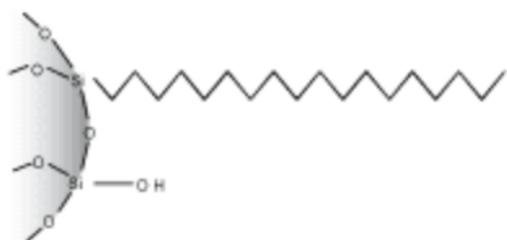


Figura 15 Base de sílice de columna C18-U



- Columna C18-T (Phenomenex®)

La columna C18-T (**Figura 16**) tiene un absorbente C18 de poro ancho que ofrece una fuerte selectividad hidrofóbica y acomoda moléculas de hasta 75 kD de tamaño.

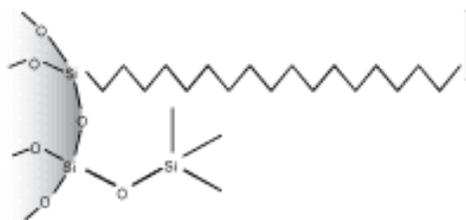


Figura 16 Base de sílice de columna C18-T

Tabla 4. Especificaciones de las columnas de cromatografía en fase sólida C18-U y C18-T

Fase	Base	Superficie (m ² /g)	% de carbono	Rango de tamaño de poro (Å)	Analitos objetivo
C18-T	Base sílice	300	15.0	120-150	Moléculas con tamaño mayor a 5 kDa
C18-U	Base sílice	500	17.0	65-75	Moléculas con tamaño molecular menor a 5 kDa



3 JUSTIFICACIÓN

El ecosistema marino presenta una amplia diversidad de organismos, de los cuales muchos contienen una variedad de toxinas usadas para la caza de alimento y defensa contra depredadores, algunas de estas toxinas han sido aisladas con el fin de obtener moléculas activas para el desarrollo de fármacos innovadores para el tratamiento de diferentes patologías. Algunos ejemplos de estos fármacos de origen marino se encuentran el Prialt®, péptido natural aislado del veneno del caracol *Conus magus* utilizado como potente analgésico. Yondelis® es un alcaloide aislado del tunicado marino caribeño *Ecteinascidia turbinata*, siendo el primer anticancerígeno aprobado por la Unión Europea para el tratamiento de sarcoma y cáncer de ovario. Por lo tanto, los avances científicos en los últimos años han permitido la obtención de nuevos fármacos de origen marino que se van posicionando en el mercado y que tienen una variada aplicación terapéutica.

Uno de los grupos marinos que se han estudiado debido a las sustancias que secretan es el filo de los Cnidarios, dentro de estos se incluyen a las medusas, corales y anémonas. Las toxinas presentes son de naturaleza proteica. Entre los polipéptidos presentes hay neurotoxinas que actúan sobre los canales de sodio (Na^+) o potasio (K^+), fosfolipasas, metaloproteasas, que actúan como neurotoxinas, cardiotoxinas y citolisinas, con una amplia variedad de respuestas fisiopatológicas como efectos directos sobre tejido muscular y nervioso.

Anthopleura texaensis es una anémona que se encuentra en la zona costera de la península de Yucatán, y ha sido reportada como fuente de neurotoxinas y citolisinas, que presentan efectos sobre los canales iónicos de sodio o de potasio, pero aún no se ha logrado la identificación y caracterización dichas toxinas.

Se propone el estudio de *A. texaensis*, con el fin de evaluar, aislar e identificar al menos un compuesto bioactivo de interés, presente en el extracto de la anémona, para su potencial aplicación terapéutica.



4 HIPOTESIS

Al ser la anémona *A. texaensis* perteneciente al *phylum* Cnidaria presentará moléculas biológicamente activas y por medio de la separación biodirigida del extracto, se identificará y obtendrá al menos un compuesto con actividad biológica de interés.

5 OBJETIVO GENERAL

Aislar, identificar y evaluar la actividad biológica de al menos un compuesto bioactivo presente en la anémona *A. texaensis*, mediante separación biodirigida.

5.1 Objetivos particulares

- Recolectar e identificar a la anémona *Anthopleura texaensis* presente en la zona costera de la península de Yucatán.
- Generar el extracto crudo de la anémona colectada por la técnica de maceración y extracción etanólica.
- Evaluar la actividad biológica del extracto crudo mediante bioensayos rápidos, para identificar posibles neurotoxinas y citolisinas.
- Realizar el perfil cromatográfico del extracto crudo para determinar la complejidad molecular.
- Someter el extracto crudo bioactivo a separación biodirigida mediante técnicas cromatográficas para determinar la naturaleza química de las moléculas activas.
- Analizar las fracciones que tienen actividad por CLAR.
- Caracterizar el o los compuestos bioactivos mediante estudios de CL-EMAR.



6 METODOLOGÍA

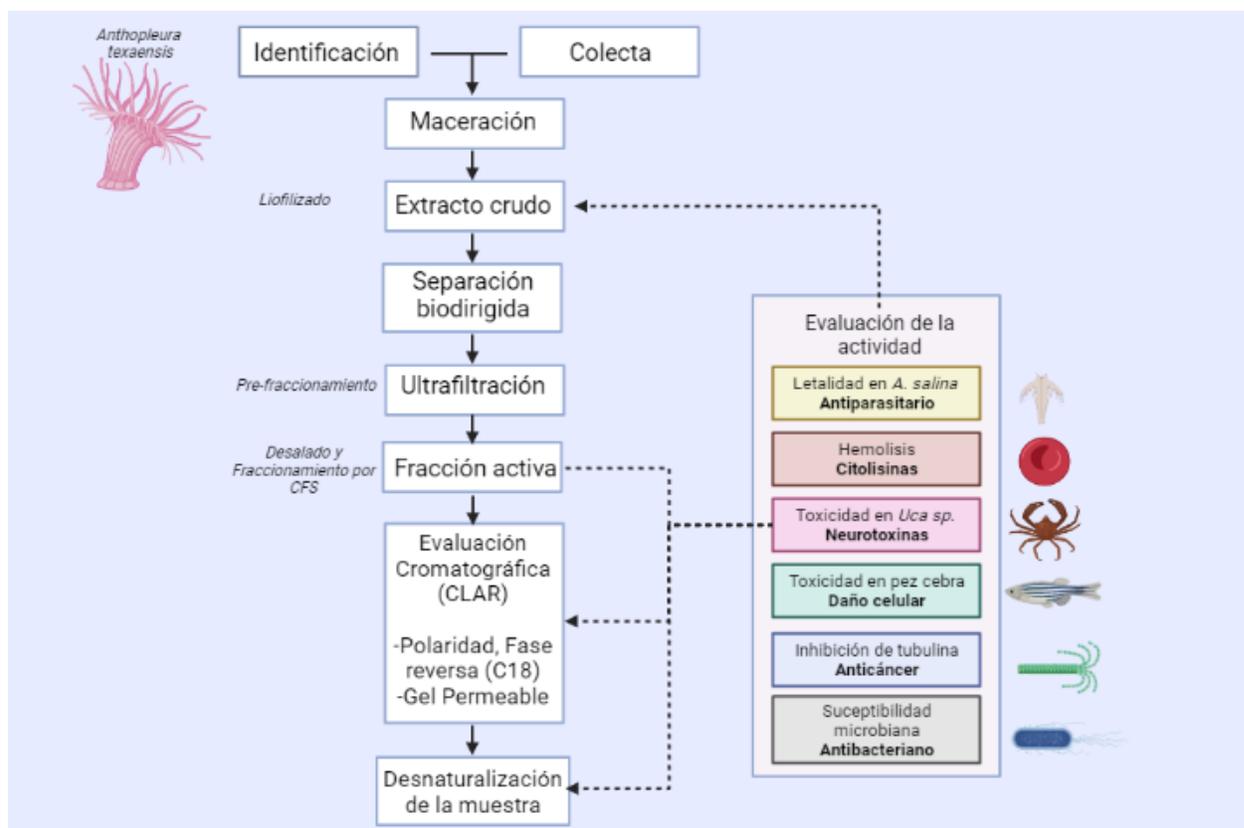


Figura 17 Diagrama de metodología empleada

6.1 Colecta de la anémona de mar *Anthopleura texaensis*

Se llevo a cabo la colecta de especímenes de *Anthopleura texaensis* en las zonas intermareales rocosas de la costa yucateca y las costas de Campeche, inspeccionando las rocas en las cuales las anémonas se hallan adheridas (San Crisanto, Yucatán GPS: 21°21'08"N 89°10'18"O y Puerto de Campeche, Campeche GPS: 19°47'46.7"N 90°36'60.0"W) con ayuda del uso de cincel y martillo, evitando en todo momento el daño ambiental. Así mismo se sumergieron en una pecera (de 20 L) con agua de mar y se le adicionó unos pocos cristales de Mentol, para sedar a los especímenes colectados y realizar su traslado a la Unidad de Química en la Unidad Académica Sisal de la UNAM.



6.2 Identificación taxonómica de la anémona *Anthopleura texaensis*

La identificación de los organismos se realizó en colaboración del Dr. Ricardo González Muñoz, especializado en biología marina y taxonomía de invertebrados bentónicos con análisis morfológicos externos e internos.

6.3 Generación del extracto crudo

- 1.- Los organismos sedados se guardaron en un ultracongelador RevCo a -70°C .
- 2.- Posteriormente fueron liofilizados a sequedad por tres días a 0.110 mBar y -50°C . Una vez secos, se molieron a polvo fino con mortero de porcelana para reducir el tamaño de la partícula y aumentar la superficie de contacto.
- 3.- Después se pesó el material obtenido y fue macerado con la mínima cantidad de agua destilada por treinta minutos, la suspensión fue filtrada y se repitió el proceso con una cantidad similar de agua destilada, el agua filtrada se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos, se congeló el sobrenadante y finalmente fue liofilizado y se colectó el pulverizado seco obtenido.

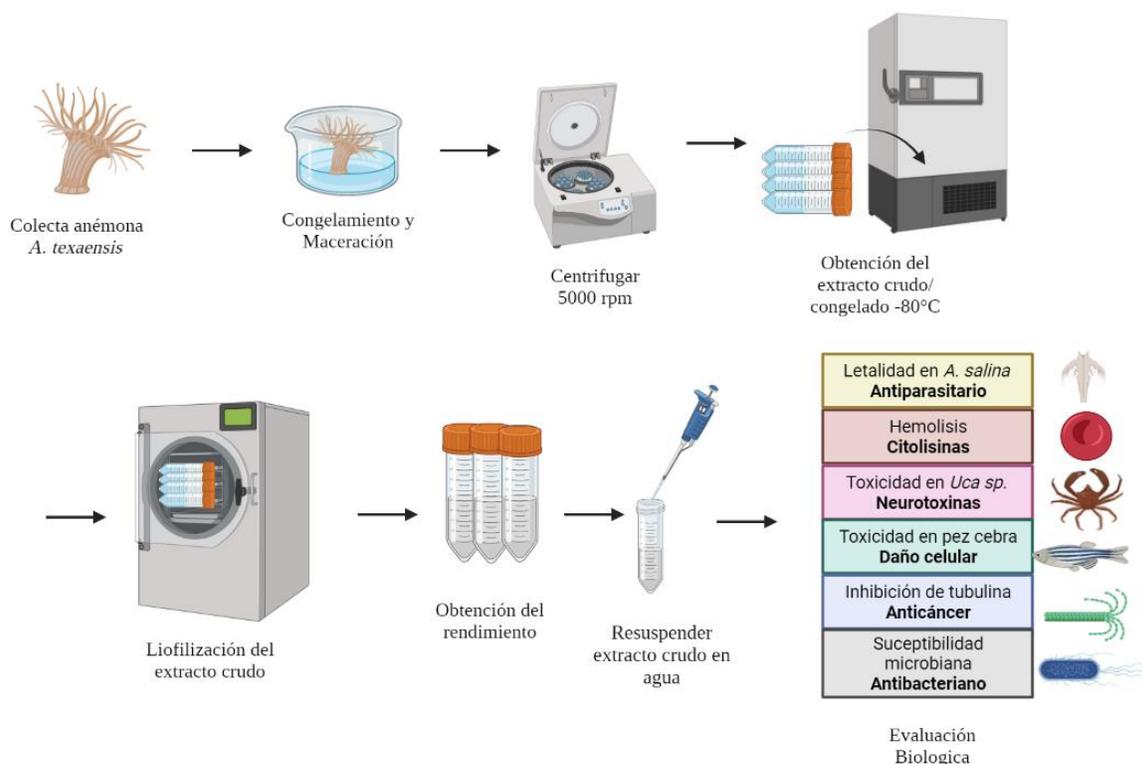


Figura 18 Generación del extracto crudo de *A. texaensis*



6.3.1 Generación del extracto etanólico

Los organismos sedados se colocaron durante algunos minutos en un recipiente con la mínima cantidad de alcohol etílico que los cubriera por completo, luego se retiraron permitiendo que escurriera la mayor cantidad de líquido dentro del recipiente.

Posteriormente fueron evaporados con un rotavapor hasta sequedad, el peso se obtuvo con las diferencias de pesos de los viales antes y después de la evaporación.

6.4 Evaluación de la actividad biológica

Para determinar una posible propiedad biológica, y para seguir el rastro de las moléculas en la separación biodirigida, los extractos generados fueron sometidos a evaluación farmacológica mediante bioensayos rápidos, estos bioensayos se realizaron inicialmente con cada uno de los extractos crudos y, posteriormente se repitieron aquellos con resultados relevantes durante el proceso de separación para identificar y seguir las fracciones activas.

A continuación, se describe el procedimiento para realizar los bioensayos que se efectúan con el fin de encontrar actividad biológica importante en los extractos.

6.4.1 Actividad neurotóxica *in vivo* sobre cangrejo violinista (*Uca sp.*)

Es una evaluación rápida en la que los resultados se muestran en un periodo de entre algunos segundos y hasta minutos, después de la administración de la muestra. Se observan movimientos conductuales como: cambio de comportamiento, temblores, oscurecimiento del caparazón, burbujeo e incluso muerte. Adicional a la prueba de neuroactividad, también se puede evaluar convulsiones y parálisis.^{92,93}

Los cangrejos *Uca sp.* fueron colectados de forma natural en a la ciénega de Sisal, Yucatán y colocados después en un contenedor de limpio de plástico para evitar estrés innecesario, hasta el momento del bioensayo.

- Generación de los extractos a evaluar

Se pesaron 10 mg de cada extracto y/o fracción y se diluyen en solución salina inyectable, obteniendo concentraciones de 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg/mL; para el control negativo se usa solución salina inyectable (0.9% NaCl en agua grado inyectable).

- Bioensayo



Se midieron 10 μL de la solución a analizar y se inyectaron en el tercer pereiópodo de los cangrejos de 2 g de peso, ajustando la dosis para organismos de pesos diferentes.

Se realizan observaciones y anotaciones de efectos de parálisis, relajación, descoordinación motora y/o muerte en los individuos, anotando los tiempos de reacción y, en el caso de las muertes, se hacen disecciones para buscar necrosis.

6.4.2 Letalidad en nauplios de *Artemia salina*

El uso de esta evaluación biológica en *A. salina* se correlaciona con la actividad antitumoral, antiparasitaria y citotóxica.⁹⁴ Los pasos a seguir se enumeran a continuación:

- 1.- Se hidrataron quistes de *Artemia salina* var. *franciscana* por una hora en agua dulce.
- 2.- Los quistes se transfieren a un recipiente de eclosión cónico transparente de 2L con 1L de agua de mar (S=25 ups; 28°C; pH 7.7-8.0) en aireación y luz por 24 horas hasta su eclosión. Los nauplios eclosionados se cosecharon en un cernidor con malla de 100 micras en un recipiente con 50 mL de agua de mar. El inóculo para el ensayo se preparó contando cuantos nauplios se tienen al tomar 100 mL de la suspensión, diluyendo hasta alcanzar una densidad de 20-30 nauplio por 100 μL de suspensión.
- 3.- Para la generación de los compuestos a evaluar, se disolvieron 10 mg de cada extracto crudo y sus prefracciones en 1 mL de agua para obtener una disolución madre a 10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; generando después en viales de 5 mL disoluciones seriadas con alícuotas de 100 μL complementando a 1 mL con agua de mar, de manera que se obtenga un intervalo de 0.1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; se usa agua de mar como control negativo y dicromato de potasio como control positivo.
- 4.- Para el bioensayo, en una microplaca de 96 pozos de fondo plano se adicionaron 100 μL de agua de mar, 100 μL de la solución a evaluar y 100 μL de una solución de nauplios de *A. salina* (20-30 n), aforando cada pozo hasta su máxima capacidad con agua de mar. La microplaca se incubó por 24 horas a 26°C con luz artificial en agitación constante por 24 h. Una vez pasado el tiempo, la microplaca se visualizó con un microscopio estereoscópico y se contabilizan los organismos muertos. Luego, se añaden 100 mL de metanol, y se contabilizan todos los nauplios adicionados a cada pozo.



5.- Finalmente se calcula la LC50 con el programa estadístico Probit de la EPA, la actividad de los extractos es significativa cuando el LC50 es igual o menor a 30 µg/mL.

6.4.3 Inhibición de la tubulina en *Brachydanio rerio*

Para este ensayo y el de toxicidad en ontogenia de *B. rerio* se utilizaron peces cebras (*B. rerio*) wild type, del área de ecotoxicología bajo la dirección de la Dra. Gabriela Rodríguez.

Se usó el bioensayo establecido por Moon, *et al.* y modificado por Mandrekar y Thakur para establecer la inhibición de la tubulina en las primeras etapas del desarrollo de *Brachydanio rerio*.^{95,96}

- Obtención de los embriones

En un tanque de maternidad de 40L con temperatura de 28° C y un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad se colocan 10 peces hembras y 20 machos dentro de una malla de tela para inducir el apareamiento un día previo a la realización del experimento.

Al día siguiente, una hora después de haber iniciado el periodo de luz, se colectan los huevos por sifonado, se revisan y retiran aquellos que estén opacos, se separan de impurezas y se lavan ligeramente.

- Generación de los extractos a evaluar

Se pesan 50 mg de extracto y disuelven en 5 mL de agua destilada, haciendo diluciones logarítmicas para obtener un intervalo de trabajo de 10-0.001 mg/mL, como control positivo se usa colchicina (10 mg/mL, Sigma-Aldrich) y como control negativo agua del sistema.

- Bioensayo

1.- Se midieron 250 µL de cada solución a evaluar en una microplaca de 96 pozos.

2.- Se adicionaron tres embriones en estadio 1K (3 horas post fecundación) en cada uno de los pozos y se incubaron a 26° C por cinco horas.

3.- Se observaron al microscopio cambios ontogénicos como el bloqueo de la epibolia y/o producción de células blastodérmicas más grandes, así como inhibición del crecimiento, comparado con el control.



6.4.4 Toxicidad en ontogenia de *Brachydanio rerio*

Con el fin de aprovechar los organismos y las soluciones utilizadas en el bioensayo de inhibición de la tubulina, se continuó con la incubación para observar actividad citotóxica de los extractos y prefracciones.

1.- La microplaca se sigue incubando a 26° C durante 72 horas, a las 24, 48 y 72 horas se observan al microscópio estereoscópico buscando huevos coagulados opacos, desprendimiento de cola, falta de ritmo cardiaco y formación de somitas para considerar a un organismo muerto (parámetro letal); así como movimientos espontáneos, cambios en la pigmentación, formación de edemas o coágulos para determinar parámetros subletales y finalmente; malformación en órganos y estructuras, escoliosis, raquitismo o retardo del desarrollo para determinar parámetros teratogénicos.

6.4.5 Ensayo de susceptibilidad microbiana

Se determinó la capacidad bactericida o bacteriostática de los extractos, así como su concentración mínima inhibitoria tanto en organismos Gram- como Gram+. Para ello, se sigue el protocolo estandarizado del CLSI (Clinical and Laboratories Standards Institute) o el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).⁹⁷ Utilizando las siguientes cepas: *Escherichia coli* ATCC 11775, *Bacillus pycyanus* (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 24212.

- Obtención del inóculo bacteriano

Para reactivar cada cepa ATCC se toma una asada del glicerol, la cual se coloca en 10 mL de caldo nutritivo estéril y se incuba por 24 horas a 37 °C. Después de este tiempo, se toma una asada del crecimiento bacteriano y se siembra en una placa de agar selectivo para cada cepa (McConkey para Gram-, y Agar sangre para Gram+). El medio solido es incubado a 37 °C por 24 horas, tiempo en el que se selecciona una colonia aislada y se siembra en caldo Mueller-Hinton estéril. El caldo es incubado a 37 °C por 16 horas hasta obtener un crecimiento bacteriano ajustado a 0.5° McFarland (comparando con solución de BaCl₂ al 1%) y midiendo absorbancia del inóculo a 625 nm en intervalo de 0.08-0.1 en un espectrómetro Lambda 25 UV/Vis Perkin Elmer.

- Generación de los extractos a evaluar



Los extractos crudos y fracciones se evalúan a una concentración de 1.024 mg/mL de solución, usando como controles medio de cultivo, suspensión bacteriana, extracto o fracción a evaluar sólo, disolvente del extracto y antibiótico de referencia de acuerdo con la **Tabla 5**.⁹⁸

Tabla 5. Valores de MIC reportados para diferentes antibióticos de los microorganismos a evaluar			
Microorganismo	Antibiótico	MIC R* (µg/mL)	MIC S** (µg/mL)
<i>E. coli</i>	Ampicilina/ Amoxicilina	≥32	≤8
<i>E. coli</i>	Gentamicina	≥8	≤4
<i>B. pycyaneaus</i>	Gentamicina	≥8	≤4
<i>E. faecalis</i>	Gentamicina	>500	≤500
<i>E. faecalis</i>	Ampicilina	≥16	≤8

*R= Resistente; **S= Sensible

- Bioensayo

En una microplaca se adicionan 100 µL de medio Muller-Hinton en cada pozo. Al primer pozo se le añaden 100 µL de solución a evaluar en la máxima concentración (256 µg/mL), se homogeniza, y de este pozo se toman 100 µL, los cuales se transfieren al siguiente pozo, y así sucesivamente hasta terminar con esa hilera de pozos, la solución del pozo final es vertida en solución de cloro de desechos. Este esquema genera un intervalo de trabajo de 128-0.1 mg/mL en la microplaca (diluciones dobles seriadas). Cada fracción y controles se evalúan por duplicado.

2.-Se agrega a los pozos 100 µL del inóculo bacteriano estandarizado con la pipeta multicanal.

3.- Se coloca la placa en un agitador de microplacas a 900 rpm por un minuto y se incuba a 37 °C por 24 horas.

La Concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) es la concentración más baja donde no se observe turbidez en el pozo. Los valores obtenidos del control positivo se comparan con los reportados con el CLSI para verificar la validez de la evaluación.



6.4.6 Hemólisis

Se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Torres *et al.*, usando sangre humana certificada por el Hospital General Agustín O' Horan de la Ciudad de Mérida, Yucatán.⁹⁹

- Preparación de los eritrocitos

Se tomaron 500 µL de sangre humana, se transfiere a un tubo Falcon para centrifuga de 15 mL, se va agregando por las paredes con delicadeza 5 mL de solución salina isotónica, homogeneizando lentamente la mezcla, luego se centrifuga a 1500 rpm por cinco minutos, se decanta el sobrenadante y se vuelve a agregar solución salina, a centrifugar y a decantar, del mismo modo, dos veces, pero en la tercera vez no se decanta el sobrenadante, en su lugar se toman 20 µL del botón, se coloca en un tubo Eppendorf y se agregan 1980 µL de solución salina isotónica, la solución resultante corresponde a un concentrado de eritrocitos al 2%.

- Preparación de los extractos a evaluar

Se pesan 10 mg del extracto a evaluar y se disuelven en 1 mL de solución salina isotónica, luego se hacen diluciones logarítmicas para tener concentraciones de 1000-1 µg/mL, se usa agua destilada como control positivo y solución salina isotónica como control negativo.

- Bioensayo

Se colocan 50 µL de la solución a evaluar en tubos eppendorf, seguido de 900 µL de solución salina y 50 µL de eritrocitos al 2%; posteriormente se incuban a 37° C por 30 minutos, al término de la incubación se centrifugan a 2500 rpm durante 4 minutos, el botón se pasa a una microplaca de 96 pozos y se lee en espectrofotómetro a 415 nm. La actividad hemolítica se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad hemolítica} = \frac{A \text{ de la muestra}}{A \text{ del control positivo} - A \text{ del control negativo}} (100)$$

Donde:

A= Absorbancia



6.5 Análisis cromatográficos

6.5.1 Sistema cromatográfico

Para realizar los análisis de los extractos y fracciones generadas, se utilizó un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) Varian Polaris 211, con los siguientes módulos: Sistema dual de bombeo 210, Inyector automático Varian 410, Detector U.V. 325, detector de difracción de luz en evaporación PL-ELS 2100 ICE (DELD),) fueron: temperatura de nebulización de 40°C, temperatura de evaporación de 70°C, flujo de nitrógeno de 1 mL/min; mientras que la detección por UV fue a 215 nm). Todos los disolventes empleados, así como los reactivos fueron grado HPLC.

6.5.2 Análisis CLAR de fase reversa

Para observar la complejidad de los extractos crudos acuosos obtenidos se realizó un análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase reversa, basado en el método de Van Dyck (et al., 2010) en el equipo CLAR Varian. Para el análisis se empleó una columna en fase reversa LUNA-C18 (250 X 4.6 mm, 5 µm de partícula Phenomenex, INC.) en condiciones analíticas usando los detectores de U.V. 325 a una longitud de onda de 215 nm y Difracción de Luz en evaporación (DEDL) con 40° C en nebulización y 70°C de evaporación, con flujo de nitrógeno de 1.0 mL/min.

6.6 Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo

El extracto que mostró actividad fue fraccionado por las estrategias de separación biodirigida, empleando los datos de actividad generados en los bioensayos. Para seleccionar los extractos que se separaron, se utilizó como criterio tanto el perfil cromatográfico como farmacológico, eliminando aquellas fracciones inactivas.



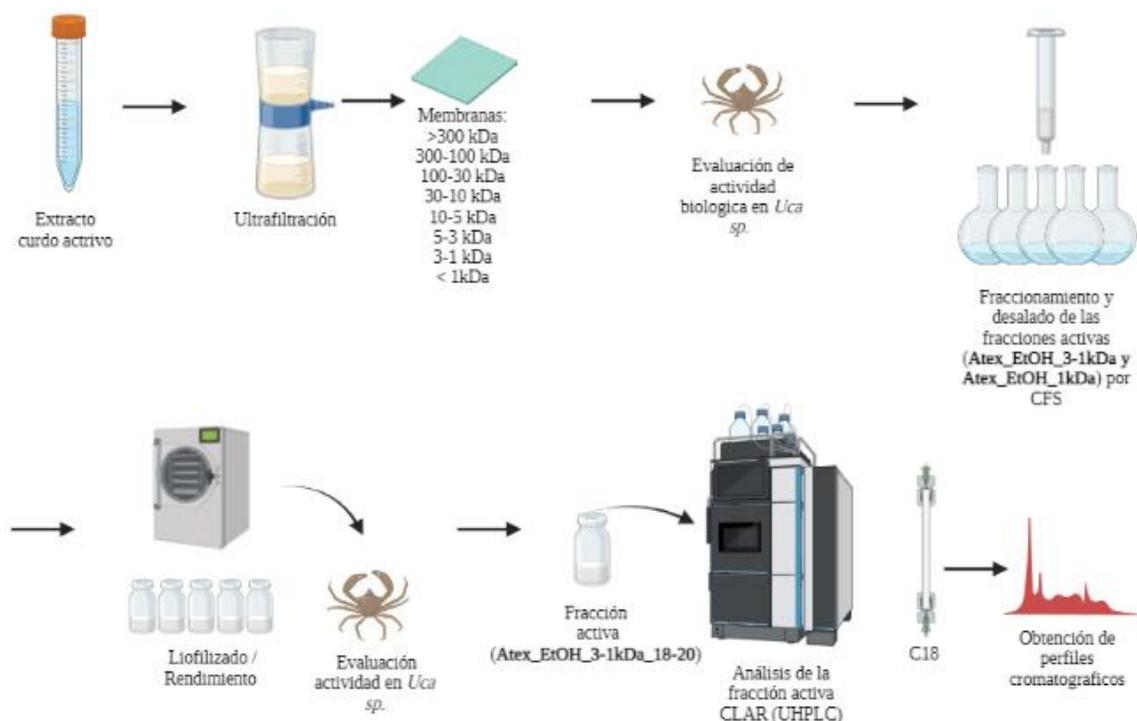


Figura 19 Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo

6.6.1 Prefraccionamiento

Con el fin de eliminar la convergencia de bioactividades antagonistas o enmascarantes, se realizó un prefraccionamiento por peso molecular, el cual, si bien carece de exactitud, sí es un buen indicador previo de retención de actividad por tamaño. A continuación, se describe el método:

Se resuspende el extracto en una mínima cantidad de agua, y se realiza la ultrafiltración en una celda tipo Amicon de la marca Millipore usando membranas de 100, 30, 10, 5, 3 y 1kDa, con presión positiva de nitrógeno (60 PSI).

En cada sesión de filtrado se colecta la fracción de mayor tamaño molecular (retentado) en viales previamente pesados, se guarda en un ultracongelador Rev Co a -70° C hasta el momento de la liofilización. Una vez secos los viales se determina el peso de la fracción y el rendimiento. Las fracciones obtenidas son:

-Fracción mayor a 300 kDa

-Fracción de 300-100 kDa



-Fracción de 100-30 kDa	-Fracción de 5-3 kDa
-Fracción de 30-10 kDa	-Fracción de 3-1 kDa
-Fracción de 10-5 kDa	-Fracción menor a 1 kDa

6.6.2 Aislamiento

6.6.2.1 Extracción en fase sólida

6.6.2.1.1 Prefraccionamiento y desalado

En general, los extractos crudos obtenidos de organismos marinos contienen de un 90 a un 95% de sales minerales (como lo son: cloruro, sodio, magnesio, azufre, calcio, potasio, bicarbonato, bromo, estroncio, boro y flúor), por lo anterior, se seleccionó a la extracción en fase sólida de fase reversa (SEFS, C18-U), como estrategia para eliminar las sales presentes en el extracto o fracción generada. Durante la SEFS, los compuestos orgánicos se retienen en el cartucho, y al lavarlo con tres volúmenes de agua se eliminan dichas sales.

Brevemente, las prefracciones activas seleccionadas (300 mg) se disolvieron en 10 mL de agua grado HPLC y se aplicaron en un cartucho Strata-C18 U (1g Fase/6 mL, Phenomenex Inc.) acondicionando previamente con 5 mL de metanol y con agua, respectivamente. Después de aplicada la muestra, el cartucho se lavó con agua HPLC (3X, 5 mL) y el extracto se separó por polaridad mediante eluciones de agua: acetonitrilo a diferentes concentraciones (100:0, 95:5, 90:10, 80:20 y 50:50 en ese orden) y con 100% de acetonitrilo. Las fracciones se colectaron en viales previamente pesados, los cuales se ultracongelaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se liofilizaron, pesaron y se calculó el rendimiento de la separación.

6.6.2.2 Separación cromatográfica

La fracción activa se separó por un análisis de CLAR colectando las señales de varios análisis usando una columna Luna C18 en las condiciones descritas (vida infra, sección 6.5.2). Para ello, se generó un extracto con 10 mg de la fracción activa (que eluyó con 50:50 de agua: acetonitrilo) y se disolvió en 150 μL de agua. Se realizaron 10 corridas en CLAR para análisis (inyectando 15 μg en cada corrida), colectando las fracciones del análisis cromatográfico, en viales previamente pesados. Cada fracción se rotaevaporó para eliminar al acetonitrilo, luego se liofilizaron, se reconstituyeron en agua y se evaluaron en el bioensayo de neurotoxicidad en crustáceos.



6.6.2.3 Determinación del peso moléculas de la señal aislada mediante Cromatografía de Gel Permeable (GPC)

La cromatografía de gel permeable es una técnica que permite calcular el peso molecular aproximado ($\pm 10\%$ del peso real) de una molécula o proteína en estado nativo, para ello es necesario calibrar la columna con estándares de peso conocido. Adicionalmente, al no ser destructiva, es preferida con respecto de la electroforesis o la espectrometría de masas.

Para ello, se utilizó una columna Yarra 2000 de gel permeable (300 X 7.8 mm, 3 μ m, Phenomenex Inc. USA) utilizando como fase móvil agua (Fase móvil A) y acetonitrilo ((fase móvil B) grado HPLC en modo isocrático (90% de A, 10% B) a un flujo de 1ml/min durante 30 min. Durante el tiempo de análisis de utilizo el detector de U.V. 325 con una longitud de onda de 215 nm. Se inyectó 20 μ L de cada estándar y fracción o señal colectada.

6.6.2.3.1 Calibración de la columna Gel Permeable

Para calibrar la columna se emplearon estándares en un rango de 132- 36,000 Daltons, dado que el rango de trabajo de la columna Yarra 2000 es de 0.5 a 40 kDa. Los estándares empleados se presentan en la **Tabla 6**. Se prepararon soluciones estándares con 4 mg/mL de cada estándar.

Tabla 6. Estándares para calibración de columna Gel Permeable			
STD	MW (Da)	Catalogo Sigma	Log
Gly-Gly	132	G1002	2.12
Bacitracina	1422	11702	3.15
Clupeina	5010	P4505	3.70
Aprotinina	6512	A1153	3.81
Albumina	66000	A2153	4.82

6.6.2.3.2 Preparación de la muestra a analizar

Para la muestra colectada, esta se liofilizó, se pesó y se reconstituyó en el volumen adecuado para dar una concentración de 1 mg/mL, se tomaron 20 μ L, y se inyectaron de manera manual en el sistema CLAR. Si el peso era muy bajo, la muestra fue diluida en 40 μ L, y 20 de ellos fueron inyectados, y recolectados al final del análisis.



6.6.2.4 Desnaturalización de la muestra

Con el fin de comprobar la naturaleza peptídica de los componentes activos, la fracción activa se calentó a punto de ebullición en baño María por diez minutos, después del tiempo transcurrido se realizó el bioensayo nuevamente para ver si la actividad se seguía observando.



7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Colecta e identificación de la anémona *Anthopleura texaensis*

Se realizaron varias colectas, en el Puerto de San Crisanto, Yucatán (21°21'08"N 89°10'18"O) y Puerto de Campeche (19°47'46.7"N 90°36'60.0"W), consiguiéndose aproximadamente 50 ejemplares de *Anthopleura texaensis*, las anémonas se encontraban presentes en las superficies rocosas de las escolleras, adheridas a ellas por medio de su disco pedal, a una profundidad somera. La mayoría de los organismos eran de difícil acceso bajo estructuras rocosas que forman una especie de cueva o en pequeños orificios en las rocas, posiblemente con la finalidad de dotar de protección a las anémonas. Con ayuda de cincel y martillo se retiraron las anémonas adheridas a las superficies rocosas (**Figura 20**).



Figura 20 Colecta e identificación de la anémona de mar *Anthopleura texaensis* en la zona costera de San Crisanto, Yucatán

La identificación se realizó mediante comparación de los caracteres macroscópicos (**Figura 21**). Las anémonas colectadas se encuentran dentro de las dimensiones descritas, el color característico del disco oral, columna, tentáculos y disco pedal, como se describe en la **Tabla 7**.



Tabla 7. Descripción morfológica (Anatomía externa) de la anémona *Anthopleura texaensis*

Estructura	Descripción morfológica de <i>Anthopleura texaensis</i> ¹⁰⁰	Descripción de los organismos colectadas
Anatomía Externa	<p>Disco oral liso y ancho, de 4-6 mm de diámetro, de color verde oliva, verde claro a verde oscuro o amarillento con franjas radiales blancas; boca de color verde oscuro o marrón oscuro. Un anillo de proyecciones marginales redondeadas con acrorhagi, que rodea el disco oral. Hay una fosa profunda entre el disco oral y el margen de la columna. Tentáculos lisos, delgados, cónicos, relativamente cortos, estrechándose distalmente, contráctiles, dispuestos irregularmente en 4-5 ciclos (41-76 en número), ciclos internos más largos que los externos, gris, amarillo claro, verde oliva a verde oscuro, con manchas blancas en la cara bucal y en toda su longitud. Columna cilíndrica, robusta, de 6-17 mm de altura y 5-12 mm de ancho, con filas longitudinales de verrugas desde el margen hasta el limbo pero más pronunciadas distalmente, de color verde oliva a verde oscuro, amarillentas, anaranjadas pálidas o blanquecinas. Disco pedal bien desarrollado, ligeramente más ancho que la columna, beige y de color amarillento a blanco.</p>	<p>Extremo superior expandido de 11-27 mm de diámetro; disco oral liso, plano, de 5-10 mm de diámetro, verde oliva a verde oscuro; tentáculos ordenados hexaméricamente en cinco ciclos (96), lisos, delgados, de 3-8 mm de longitud con puntas afiladas, los ciclos internos más largos que los externos, contráctiles, gris claro con destellos naranjas, algunas veces con manchas blancas en su lado oral y a lo largo de toda su extensión; fosa bien marcada; columna cilíndrica gruesa de 8-14 mm de diámetro y 6-11 mm de altura con 42-48 hileras longitudinales de verrugas que van del margen hasta el limbus, aunque se encuentran más pronunciados distalmente, beige a naranja pálido, oscureciéndose hacia el extremo distal donde es naranja oscuro a brillante; margen con 42-48 proyecciones marginales con acrorhagi en la fosa que contiene basitricos y holotricos; disco pedal bien desarrollado, de 8-14 mm de diámetro, ligeramente más amplio que la columna, beige; habita oquedades y hendiduras de las rocas en la zona de rompiente a 0.5 msnm.</p>





Figura 21 Anémóna *Anthopleura texaensis*, vista lateral y vista superior (A).¹⁰⁰
Organismo colectado (B).

7.2 Generación del extracto crudo

Después de congelar a -70°C los organismos colectados, se procedió a liofilizarlos y pulverizarlos, el pulverizado se colocó en viales ámbar de 22 mL., se pesaron, se cubrieron con parafilm y se guardaron en una desecadora hasta su posterior uso. Los pesos obtenidos son presentados en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Peso del extracto obtenido de la liofilización de los organismos obtenidos

Especie	Peso extracto (g)
<i>A. texaensis</i>	12.44



Las técnicas reportadas para la obtención y preparación del extracto de los Cnidarios se han basado en la descarga eléctrica de nematocistos a través del amnios humano reportada por Barnes *et al.*,¹⁰¹ u homogeneización y pulverización o maceración de tentáculos enteros congelados y lavado con solución salina o tampón de fosfato, técnicas reportadas en la medusa *Chironex fleckeri* y *Chiropsalmus quadrigatus* por Turner *et al.* y Keen *et al.*^{102,103} Sin embargo, el extracto recuperado utilizando estos métodos es, de hecho, extractos tentaculares totales compuestos por el contenido de nematocistos y otros tipos de células tentaculares.

Las técnicas actuales de preparación del veneno se basan en la ruptura mecánica de los nematocistos aislados con mortero, perlas de vidrio y sonicación, en presencia de soluciones de extracción como agua destilada o solución salina.¹⁰⁴ Sin embargo, las dificultades relacionadas con la disponibilidad del equipo y la contaminación del veneno por componentes estructurales (p. ej., las paredes de la cápsula de nematocistos) son las principales desventajas de un enfoque de extracción basado en la disrupción mecánica.

Yanagihara et al. ha desarrollado otro enfoque en el que los cnidos intactos purificados por densidad se rompen usando presión seguida de una centrifugación rápida para recolectar los contenidos sin contaminarlos con material tentacular o componentes estructurales. Esta técnica da como resultado un veneno con una actividad y complejidad específicas muy altas, pero es un proceso laborioso.¹⁰⁵

Por todas estas razones, al tratarse de la anémona *A. texaensis* debido a su tamaño, la técnica más conveniente es someter los organismos a congelamiento para su posterior liofilización y pulverización. Ya que se libera el contenido presente en las células urticantes de todo el cuerpo. Un inconveniente es la contaminación por componentes estructurales u otro tipo de células.

Hartwick *et al.* Birsa *et al.* y Rifkin *et al.* utilizaron soluciones de etanol y ácido acético al 5%, demostrando que se provocan descargas masivas de las células urticantes en los cnidarios.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ El rendimiento puede variar según la especie que se estudia, la temporada estacional y las condiciones ambientales.



Algo a tomar en cuenta es que uno de los problemas del aislamiento de moléculas activas de productos naturales marinos es que los organismos contienen hasta 90% de agua, como lo es el caso de las anémonas y medusas. A su vez al encontrarse en un ambiente salino, al obtener el extracto podemos encontrar altas concentraciones salinas. Lo cual limita la extracción de compuestos con actividad biológica.

7.3 Evaluación de la actividad biológica de los extractos crudos (Bioensayos)

Una vez obtenido el extracto crudo, fue evaluado con el uso de bioensayos rápidos con el fin de generar el perfil farmacológico y determinar si el extracto mostraba ser activo y así continuar con la siguiente etapa de la separación.

7.3.1 Letalidad en nauplios de *Artemia salina*

El extracto crudo no presentó actividad citotóxica sobre *A. salina* a la máxima concentración evaluada (10 mg/mL), dando resultados negativos para este bioensayo en la especie analizadas. El control positivo presento una CL50 de 50 µg/mL, similar a la reportada en la literatura.

Aunque la prueba de Meyer se considera útil para identificar actividad antitumoral, antiparasitaria y citotóxica.⁹⁴ El hecho de que no se haya encontrado letalidad en este ensayo no descarta que para la especie estudiada haya la posible presencia de moléculas bioactivas, puesto que existen otros bioensayos más específicos como el efecto sobre el crecimiento del cultivo de protistas específicos, líneas celulares y la ontogenia de *Brachydanio rerio*, así como la prueba de hemólisis.

7.3.2 Actividad neurotóxica en *Uca sp.*

La reacción de los cangrejos violinistas (*Uca sp.*) al administrar 1 mg de extracto crudo de la anémona *A. texaensis* se describe a continuación:

El cangrejo, de pesó 2.1 g, al momento de la administración del extracto, presento relajación al instante y presentaba dificultad de movimiento, transcurridos cuatro minutos tuvo autotomía de una extremidad y realizaba giros sobre sí mismo varias veces, posteriormente realizó autotomía de otras dos extremidades y finalmente murió, presentando efecto letal en cangrejo *Uca sp.* A su vez el ensayo fue comparado con un control el cual el cual fue



administrado con solución salina isotónica, el cangrejo presentó actividad basal, estado de alerta y respuesta a estímulos.

Este bioensayo fue documentado por primera vez en 1982 por Béress y Zwick quienes utilizaron este ensayo como método estándar para caracterizar la actividad biológica y los efectos fisiológicos que una neurotoxina puede producir en el organismo. Los efectos neurotóxicos son convulsiones, parálisis y muerte.¹⁰⁹

En el año 2006, Sánchez-Rodríguez *et al.* reportaron que las toxinas producidas por la anémona *Bartholomea annulata* provocaba hiperactividad seguida de parálisis severa en cangrejos de la especie *O. quadrata*, y sugiere que las toxinas de naturaleza peptídica presentes en el extracto de la anémona actúan a través del sistema neuromuscular del cangrejo afectando los canales de sodio dependientes de voltaje y a las células musculares.¹¹⁰

Muchas veces se ha demostrado la presencia de un efecto tóxico de extractos crudos y fracciones purificadas de anémonas en crustáceos, el efecto de las neurotoxinas produce desequilibrios a nivel del sistema nervioso y el efecto de las citolisinas produce muerte celular y, por lo tanto, del individuo. P.e., Moran y sus colaboradores hallaron efecto neurotóxico en cangrejos de río en fracciones de *Condylactis gigantea*; en las toxinas AV1 (43 aas), AV2 (47 aas) y AV3 (27 aas) de *Anemonia viridis*; la toxina Ea3 (27 aas) de *Entacmaea actinostoloides* y la toxina Sh1 de *Stichodactyla helianthus*.³⁹

En el año 2021 Quaresma *et al.* determinaron los efectos de una toxina vesicular de la anémona *Bunodosoma cangicum* en el cangrejo *Neohelice granulata*. Los cangrejos mostraron temblores intensos en los pereiópodos inmediatamente después de la administración de la toxina a la dosis más alta (250 mg/Kg). A las dosis más bajas (62.5 mg/kg) no mostraron visualmente espasmos y parecían tener un comportamiento similar al de los animales del grupo control. Los cangrejos tratados con las dosis de 125 mg/Kg no mostraron espasmos hasta aproximadamente 40 min después de la administración; sin embargo, los cangrejos mostraron un estado de relajación, con algunos pereiópodos completamente distendidos. Los cangrejos que fueron administrados con la dosis de 62.5 mg/Kg se recuperaron a la condición basal durante los primero 10 min. Y los cangrejos expuestos a las dosis de 125 mg/Kg o 250 mg/Kg no pudieron volver al estado basal. Y con base en técnicas de espectrometría de masas, determinaron la presencia de un péptido que



tiene la capacidad de modular, canales iónicos. Y concluyeron que la dosis de toxina causa deterioros directamente proporcionales.¹¹¹

Apoyados en estos datos podemos decir que los efectos observados en los cangrejos tratados con el extracto crudo de *A. texaensis* fueron provocados por actividad neurotóxica y posible actividad citotóxica debido al efecto letal.

7.3.3 Inhibición de tubulina en *Brachydanio rerio*

Los microtúbulos son proteínas esenciales para la formación de husos mitóticos y mitosis celular, y han sido un objetivo importante en la quimioterapia del cáncer en las últimas décadas. El pez cebra se ha utilizado como una plataforma biotecnológica multifuncional para la evaluación de la bioactividad de moléculas estructuralmente diversas. Debido a la gran similitud entre el pez cebra y los humanos en genética, fisiología e inmunología, así como a la buena correlación con las respuestas a los medicamentos, el pez cebra simplifica significativamente el proceso de ensayo clínico y reduce la probabilidad de fallas en las últimas etapas del ensayo.¹¹²

Para examinar la inhibición de la tubulina *in vivo*, se realizaron experimentos con embriones de pez cebra, lo que representa un modelo viable para la evaluación de los efectos inhibitorios de tubulina de moléculas pequeñas.¹¹³

Se encontró efecto tóxico en la especie analizada a partir del estadio 1K, por lo que, al no seguir habiendo división celular, el efecto de inhibición de la tubulina se considera positivo (**Figura 22-25**). Sin embargo, en la **Figura 22** es evidente el efecto citolítico del extracto crudo.



Figura 22 Estadio 1K de *Brachydanio rerio* aproximadamente 3 horas después de la fertilización



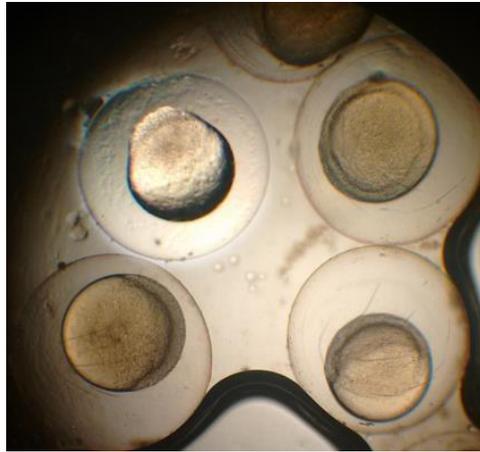


Figura 23 Blanco: Embriones de 8 horas post fertilización sin ningún tratamiento



Figura 24 Embriones de 8 horas post fertilización bajo tratamiento de extracto crudo de la anémona *A. texaensis*, con efecto observable de lisis en las células

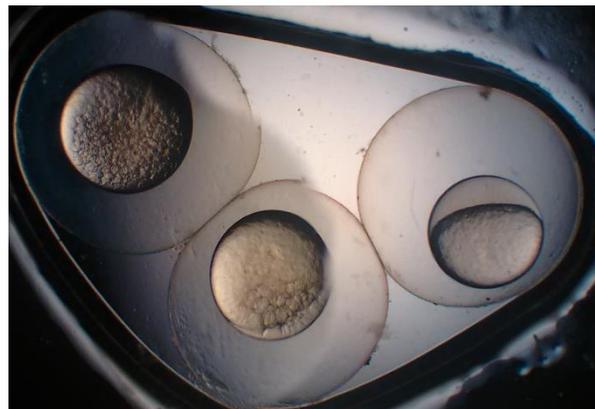


Figura 25 Embriones de 8 horas post fertilización bajo tratamiento de colchicina a concentración de 10 mM con efecto de retraso en la epibolia



7.3.4 Toxicidad en ontogenia de *B. rerio*

Como se muestra en la sección anterior, al existir citotoxicidad mortal inmediata en todos los extractos analizados, es imposible seguir un efecto en la ontogenia de los peces, puesto que esta es interrumpida.

7.3.5 Susceptibilidad microbiana

El análisis de la microplaca de crecimiento bacteriano reveló que los todos los extractos crudos evaluados de las anémonas estudiadas no inhibieron el crecimiento bacteriano a la máxima concentración evaluada (254 µg/mL).

7.3.6 Hemolisis

Las toxinas de otras anémonas de mar, incluidas *Actinia equina*, *Anemonia sulcata*, *Anthopleura xanthogrammica*, *Bunodosoma granulifera*, *Bunodosoma caissarum* y *Stichodactyla helianthus*, han reportado efectos citolíticos, hemolíticos, neurotóxicos y cardiotoxicos.

Los extractos crudos de *A. texaensis* mostró una leve actividad hemolítica incluso en las concentraciones más altas (de 13.25%).

Tabla 9. Porcentaje de actividad hemolítica del extracto crudo de *A. texaensis*. NA= No activa, ND= No determinada

Concentración	10000 µg/mL	1000 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL
Muestra	Hemólisis (%)				
<i>A. texaensis</i>	13.25	12.88	7.22	NA	NA
Control +	108.26	ND	ND	ND	ND
Control -	8.26	ND	ND	ND	ND

7.3.7 Actividad citotóxica

Los bioensayos de inhibición de la tubulina, toxicidad en la ontogenia de *Brachydanio rerio* y hemólisis, son indicadores de una posible actividad que derive en el hallazgo de fármacos contra el cáncer, aunque por diferentes mecanismos de acción: el efecto inhibitorio de la tubulina puede mostrar una desaceleración de la división celular, efecto clave para evitar el crecimiento descontrolado de las células cancerosas, mientras que el efecto citotóxico puede matar células específicas en ciertos puntos del crecimiento, mismo que puede servir en terapias dirigidas durante cirugías para atacar a las células cancerosas.



En este caso, la evaluación de citotoxicidad en *B. rerio* y de hemólisis muestran que *A. texaensis* tiene la capacidad de matar células en estadios tempranos, aunque cuantitativamente el efecto pudiese ser muy bajo; estos efectos pueden deberse a la presencia de citolisinas o actinoporinas, las cuales son bastante comunes en las anémonas: los extractos crudos de *Heteractis magnifica*, *Stichodactyla haddoni* y *Paracondylactus sinensis* presentaron efecto hemolítico y anticancerígeno.¹¹⁴También presentan efecto hemolítico: las fosfolipasas A2 de 27, 43 y 45 kDa aisladas de *Aiptasia pallida* y *Urticina piscivora*; la BcsI (19 kDa) de *Bunodosoma cassiarum* y; el RMI (5.1 kDa) de *Radianthus macrodactylus* y *Tealia felina*.^{114,115,115,116}

Para complementar la información obtenida en los bioensayos, se compararon los análisis de los extractos crudos por CLAR en dos detectores (UV/vis y ELSD), sin embargo, los resultados no fueron determinantes para tomar la decisión debido al ruido producido por la alta cantidad de sales presentes en las muestras, los análisis se muestran en la **Figura 26**.



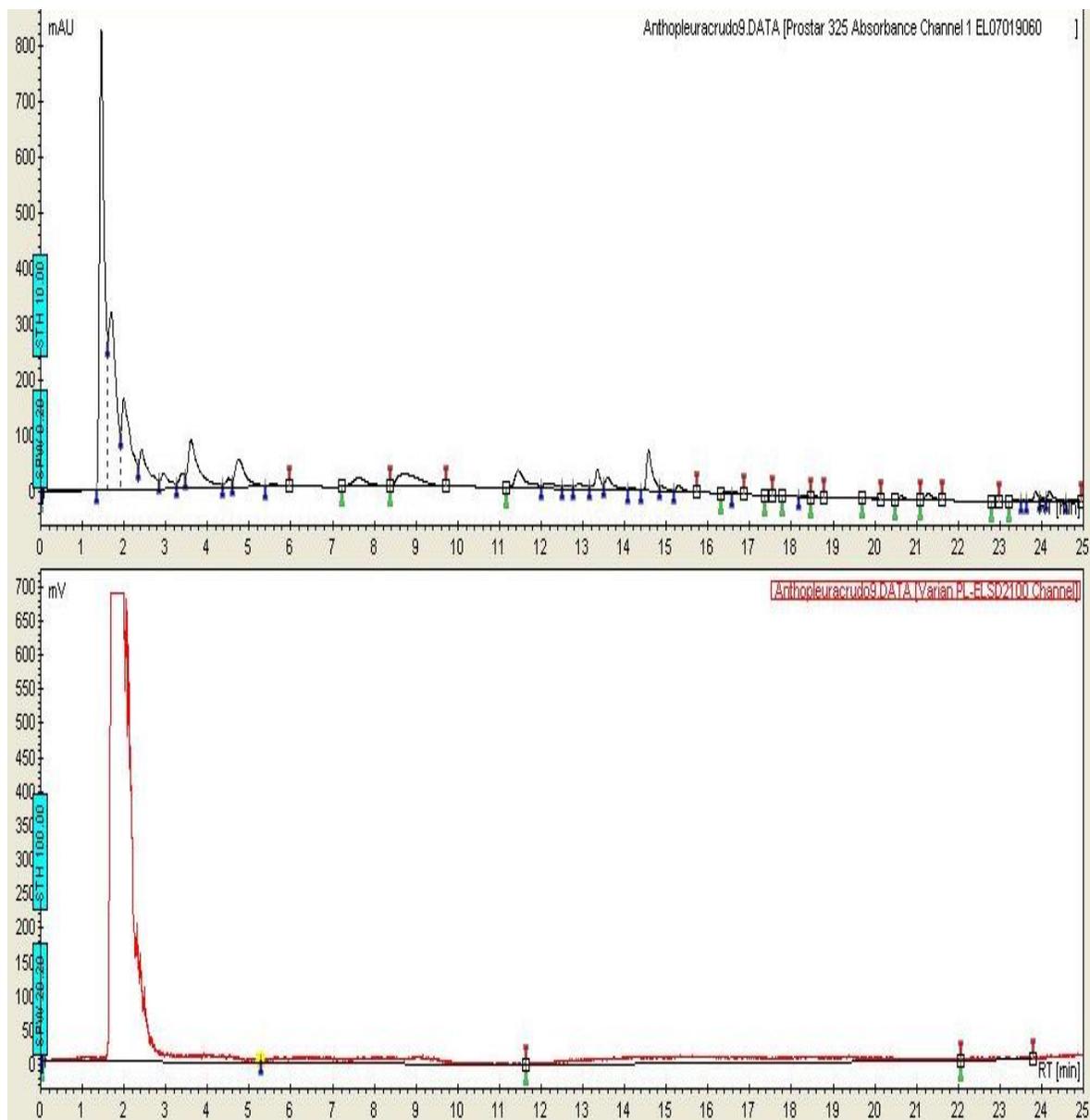


Figura 26 Análisis por CLAR en extracto crudo de *Anthopleura texaensis*. Equipo CLAR Varian Inc. Columna en Fase Reversa LUNA C18 de 250 x 4.6 mm, 5 μ M de partícula (Phenomenex, Inc, EE. UU.); condiciones analíticas, detectores UV/Vis a 250 nm (Arriba) y detector de luz evaporativo con flujo de nitrógeno de 1.0 mL/min (Abajo), donde; la señal obtenida corresponde a la señal debida a la presencia de sales.



7.4 Obtención de extracto etanólico de *A. texaensis*

Los especímenes de *A. texaensis* relajados se colocaron durante unos minutos en un recipiente con etanol. En la **Tabla 10** se muestran diferentes pesos de extractos centrifugados y evaporados obtenidos en diferentes muestreos.

Tabla 10. Pesos de los extractos crudos en etanol en etanol de *A. texaensis* de cuatro muestras en diferentes tiempos

Muestra	Peso extracto (g)
1	1.05
2	1.27
3	1.69
4	0.21

7.5 Separación biodirigida

7.5.1 Separación por ultrafiltración

Después de realizar los bioensayos con los extractos crudos, se decidió que se iba a perseguir la actividad neurotóxica observada en los cangrejos, por lo que se realizó el bioensayo después de hacer el prefraccionamiento por ultrafiltración del extracto etanólico de *A. texaensis*, en la **Tabla 11** se muestra el peso obtenido de extracto en cada prefracción y el efecto observado en los cangrejos.

Tabla 11. Efecto de las fracciones obtenidas por ultrafiltración del extracto etanólico de *A. texaensis* sobre el cangrejo violinista (*Uca sp.*)

Clave Muestra	Prefracción	Peso (mg)	Efecto de <i>Uca sp.</i>
Atex_EtOH_10kDa	≥10 kDa	44.6	Movimientos de las extremidades durante unos segundos, inmediatamente se volteó y murió
Atex_EtOH_10-5kDa	10-5 kDa	20.6	Movimientos fuertes de las extremidades por 5 minutos pausados e intermitentes con



			momentos estáticos, finalmente se volteó y murió
Atex_EtOH_5-3kDa	5-3 kDa	9.4	Algunos movimientos involuntarios los primeros minutos y luego se quedó inmóvil sin voltearse, pero intentando realizar movimientos, sin reacción a estímulos visuales
Atex_EtOH_3-1kDa	3-1 kDa	75.9	Se aletargó, bajando las tenazas y viéndose relajado, sin reacción a estímulos visuales
Atex_EtOH_1kDa	≤ 1 kDa	74.6	Aletargado, pero con reacción defensiva y de huida, (aunque esta última con movimientos forzados) ante estímulos visuales
Control	Control (-)		Ningún comportamiento anormal durante toda la observación

7.5.2 Separación de la fracción 3-1 kDa por Extracción en Fase Sólida de fase reversa

Debido a que las fracciones de menor tamaño tenían más posibilidad de derivar en una molécula activa de tamaño molecular bajo y, por lo tanto, de configuración sencilla, se optó por separar a las fracciones 3-1 y ≤ 1 kDa, por lo que prefraccionaron y adicionalmente se eliminaron las sales del extracto por el método de separación en fase sólida de fase reversa, la tabla 10 muestra los resultados obtenidos.



Tabla 12. Efecto en cangrejo *Uca sp.* De las diferentes fracciones obtenidas a partir de la separación en fase sólida de las prefracciones menores del extracto etanólico de *A. texaensis*

Prefracción	Clave	Fracción	Efecto en <i>Uca sp.</i>
3-1	Atex_EtOH_3-1kDa_95_5	95:5	Inmóvil al inicio, pero actuando con normalidad pocos segundos después
	Atex_EtOH_3-1kDa_90_10	90:10	Sin efecto aparente
	Atex_EtOH_3-1kDa_80_20	80:20	Parálisis inmediata y muerte a los 5 minutos
	Atex_EtOH_3-1kDa_50_50	50:50	Ligera descoordinación, pero activo y defensivo ante estímulos, se observó relajación a los tres minutos y murió a los 10
≤1	Atex_EtOH_1kDa_95_5	95:5	Inmóvil al inicio, pero actuando con normalidad pocos segundos después
	Atex_EtOH_1kDa_90_10	90:10	Presenta un poco de descoordinación motora y relajación, quelas bajas y sin reacción a estímulos visuales, muerte a los 30 minutos
	Atex_EtOH_1kDa_80_20	80:20	Se volvió un poco aletargado y de movimientos lentos, pero no había descoordinación y reaccionaba a la defensiva ante estímulos visuales
	Atex_EtOH_1kDa_50_50	50:50	Sacudidas violentas, descoordinación inmediata, parálisis, volteo y muerte a los 10 minutos



7.5.3 Análisis cromatográficos de la fracción 3-1 kDa

Debido a que los efectos en el cangrejo fueron poco visibles y la cantidad de material restante de la fracción menor a 1 kDa había mermado mucho, y a que los efectos eran mucho más notorios y estables en la fracción de 3-1 kDa, la separación se siguió haciendo con esta última.

Posteriormente se realizó un análisis por CLAR en la prefracción activa (3-1 kDa) empleando una columna específica para separar péptidos (Júpiter Proteo, Phenomenex Inc.) para observar la complejidad de compuestos presentes (**Figura 27**), aunque el análisis mostraba un cromatograma bastante complejo, las señales estaban suficientemente separadas para realizar una separación. Por lo anterior, se realizó una separación manual inyectando el extracto en esta columna (10 veces) en la **Figura 27** se presentan las fracciones colectadas. Estas colectas se evaporaron y se realizó el bioensayo de neurotoxicidad como parte de la estrategia de separación biodirigida, los resultados se muestran en la **Tabla 13**.

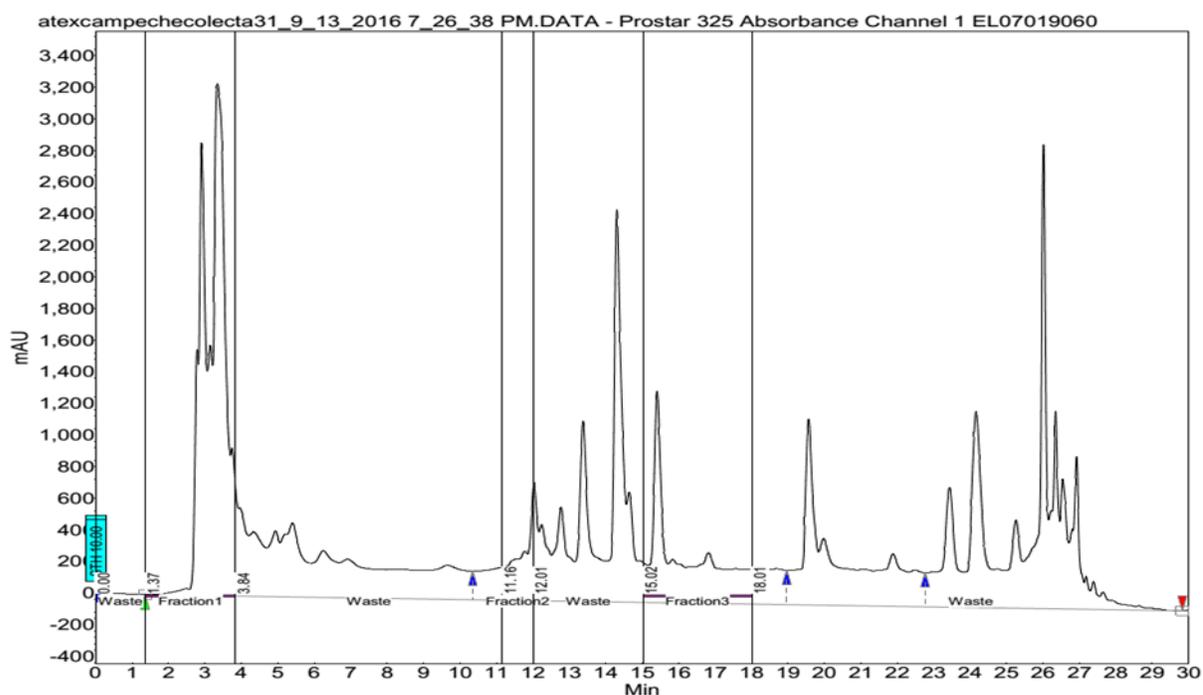


Figura 27 Separación de la fracción 3-1 kDa de *A. texaensis*. Análisis CLAR en equipo binario Varian de prefracción. Columna Jupiter Proteo (90 Å, 3 µm y 250x4.6 mm) en Fase Reversa por 30 minutos con lectura de 215 nm en detector UV/Vis



La fracción Atex_EtOH_3-1kDa_18-20 se dividió en 3 partes; La primera se empleó para determinar la actividad biológica, la segunda para determinar el peso molecular mediante Gel permeable y LC-EMAR, la tercera para determinar la estabilidad térmica, a fin de identificar la naturaleza química de la toxina aislada.

Tabla 13. Efecto en cangrejo *Uca sp.* de las diferentes fracciones obtenidas a partir de la colecta manual de tiempos de retención del cromatograma de la fracción 3-1 kDa del extracto etanólico de *A. texaensis*

Fracción	Tiempo	Peso (mg)	Efecto en <i>Uca sp.</i>
1	0-4'	18.5	Sin efecto aparente
2	4-7.5'	0.2	Sin efecto aparente
3	7.5-16'	2.7	Sin efecto aparente
4	16-18.5'	11.4	Sin efecto aparente
5	18.5-22'	20.9	Parálisis y muerte (10'')
6	22-24'	1.5	Sin efecto aparente
7	24-30'	19.7	Parálisis y muerte (1')
0	Control	-	Sin efecto aparente

7.5.3.1 Determinación del peso molecular de la fracción Atex_EtOH_3-1kDa_18-20 mediante Cromatografía de Gel Permeable (GPC)

Se utilizó una columna Yarra SEC-2000 (1-300 kDa, 145 Å, 3 µm) por CLAR, empleando un equipo CLAR binario Varian 211, bajo flujo isocrático de agua:acetonitrilo 90:10, con la intención de evitar el uso de sales para su elusión y detector de UV a 215 nm. Para determinar el peso molecular se calibró la columna con estándares de bajo peso molecular Para así obtener la curva de calibración.

En la **Figura 28**, se presentan tanto los cromatogramas sobrepuestos de los estándares y de la muestra **Atex_EtOH_3-1kDa_18-20** (activa en el modelo de neurotoxicidad *in vivo*). Como se puede observar en la figura la señal presenta un peso molecular entre la bacitracina (1442 Da) y el dipéptido Gly-Gly (132 Da). Mediante regresión lineal, utilizando el Log del peso molecular y el volumen de exclusión (tiempo de elusión en fase reversa), se puede



generar la ecuación lineal y despejar para que en función del volumen de exclusión se conozca el peso molecular. En la **Figura 29** se presenta la gráfica de la regresión lineal y los datos de regresión lineal.

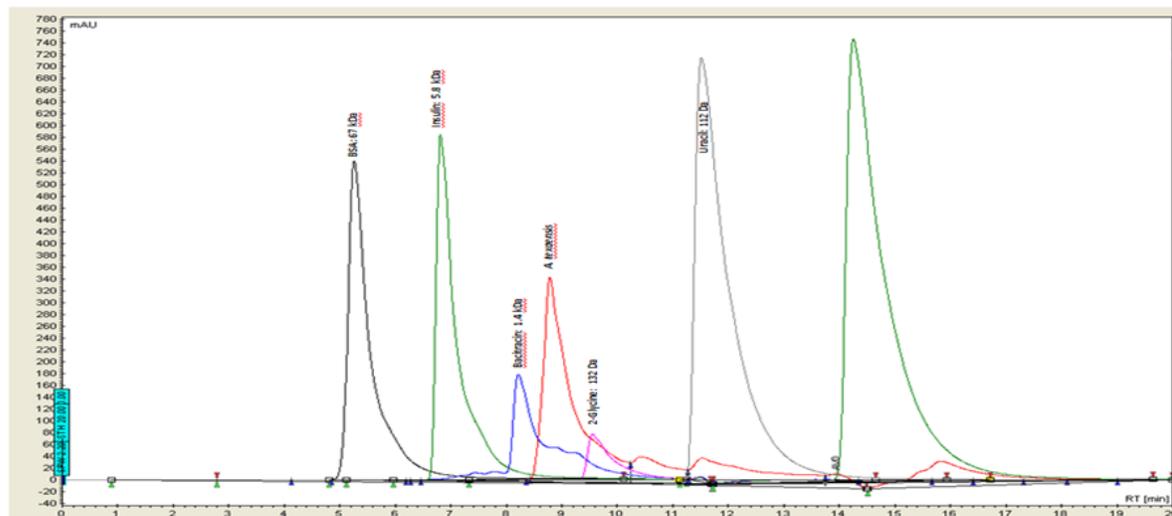


Figura 28 Cromatogramas de la calibración de la columna Yarra 2000, y de la determinación del peso molecular de la muestra Atex_EtOH_3-1kDa_18-20. Los estándares empleados fueron: Albumina (67 kDa, en color negro), Insulina (5.8 kDa, color Verde), Bacitracina (1.4 kDa, color Azul), Digly (132 Da, color Fucsia), Muestra Atex_EtOH_3-1kDa_18-20



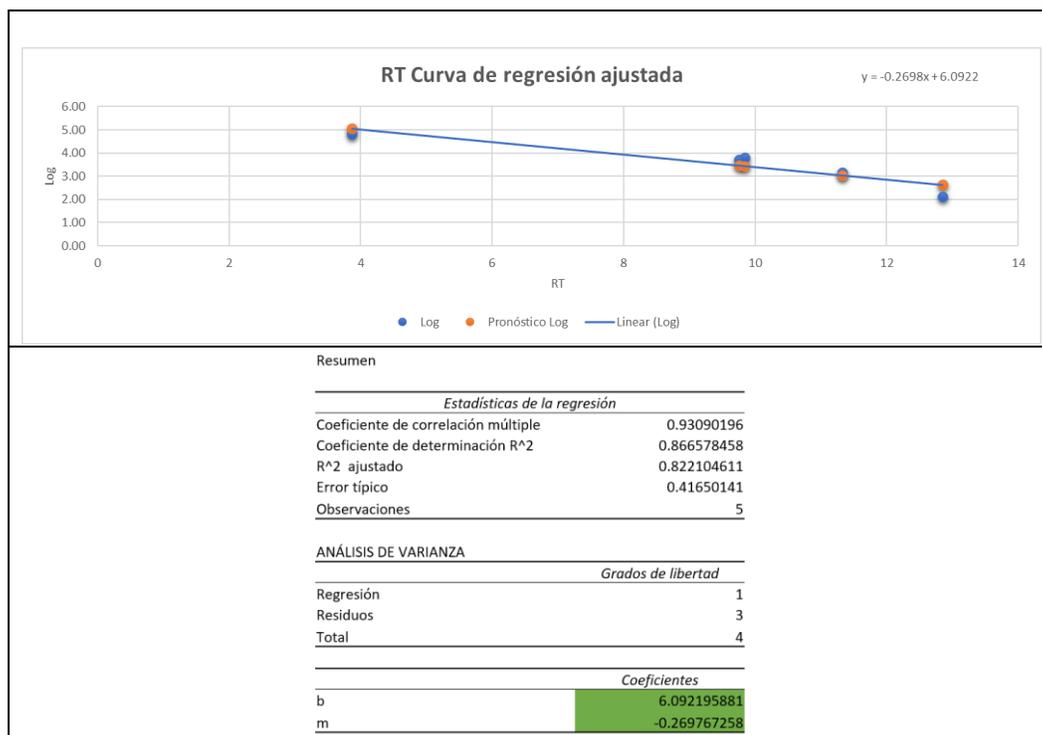


Figura 29 Datos de la regresión lineal en la calibración de la columna Yarra 2000. Gráfica de la regresión lineal (Datos de regresión lineal)

De la **Figura 29** se recuperan los datos de la ordenada a la origen ($b=6.0921$) y la pendiente ($m=-0.2697$), para generar la ecuación de la recta: $Ve = -0.269767 \text{LogMW} + 6.0982$, de donde $MW = \text{AntiLog}[(Ve - 6.09982) / 0.269767]$. Interpolando el volumen de exclusión de la muestra ATEX_ETOH_3-1KDA_18-20: **836.09 Da**. Resultado no esperado, porque en la literatura esta reportado que la mayoría de las neurotoxinas aisladas de anemonas son polipéptidos con pesos moleculares de 2-8 kDa (vida supra, Tabla 3, Pagina). Por lo anterior, se procedió a determinar su estabilidad térmica, seguido de su hidrólisis para determinar si su naturaleza química era peptídica.

7.5.4 Desnaturalización de la muestra

Posteriormente se intentó desnaturalizar la fracción activa ATEX_ETOH_3-1KDA_18-20, sin embargo, aunque el baño María se aplicó hasta llevar la muestra a sequedad, al reconstituir la muestra en agua HPLC y evaluar la actividad biológica, los resultados demostraron que la actividad no se perdió. Lo cual podría ser un indicador de que el



compuesto bioactivo es una neurotoxina de naturaleza no peptídica, debido a que la mayoría de los polipéptidos se desnaturalizan con el calor; o bien que es un polipéptido termoestable, aunque son pocas las proteínas reportadas.

La hidrólisis con ácido clorhídrico (HCl) 6N con calentamiento a 60 °C, dio negativo en la presencia de aminoácidos, reforzando la idea de una toxina no peptídica.



8 CONCLUSIONES

- Se colectó e identificó la anémona *Anthopleura texaensis*.
- El extracto crudo evaluado no presentó actividad en letalidad en nauplios de *Artemia salina*, inhibición de tubulina en *Brachydanio rerio* ni en susceptibilidad microbiana en *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*.
- El extracto crudo de la anémona evaluada presentó actividad neurotóxica en *Uca sp.*, toxicidad en la ontogenia de *Brachydanio rerio*.
- El extracto crudo de la anémona *Anthopleura texaensis* presentó actividad hemolítica.
- El extracto crudo de *Anthopleura texaensis* causó relajación, autotomía, parálisis y muerte de *Uca sp.*
- La hidrólisis de la fracción ATEX_ETOH_3-1KDA_18-20 con ácido clorhídrico (HCl) 6N, dio negativo en la presencia de aminoácidos, reforzando la idea de una toxina no peptídica.
- Por medio del análisis por CLAR y con el uso de los bioensayos, se determinó la presencia de una posible neurotoxina de naturaleza no peptídica.



9 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Mayer, A. M. S.; Rodríguez, A. D.; Berlinck, R. G. S.; Fusetani, N. Marine Pharmacology in 2007–8: Marine Compounds with Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antimalarial, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous System, and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *153* (2), 191–222. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.08.008>.
- (2) Hill, R. T.; Fenical, W. Pharmaceuticals from Marine Natural Products: Surge or Ebb? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21* (6), 777–779. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.007>.
- (3) McIntosh, M.; Cruz, L. J.; Hunkapiller, M. W.; Gray, W. R.; Olivera, B. M. Isolation and Structure of a Peptide Toxin from the Marine Snail *Conus Magus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *218* (1), 329–334. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90351-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90351-4).
- (4) Nigam, M.; Suleria, H. A. R.; Farzaei, M. H.; Mishra, A. P. Marine Anticancer Drugs and Their Relevant Targets: A Treasure from the Ocean. *DARU J. Pharm. Sci.* **2019**, *27* (1), 491–515. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00273-4>.
- (5) White, K. M.; Rosales, R.; Yildiz, S.; Kehrer, T.; Miorin, L.; Moreno, E.; Jangra, S.; Uccellini, M. B.; Rathnasinghe, R.; Coughlan, L.; Martinez-Romero, C.; Batra, J.; Rojc, A.; Bouhaddou, M.; Fabius, J. M.; Obernier, K.; Dejoze, M.; Guillén, M. J.; Losada, A.; Avilés, P.; Schotsaert, M.; Zwaka, T.; Vignuzzi, M.; Shokat, K. M.; Krogan, N. J.; García-Sastre, A. Plitidepsin Has Potent Preclinical Efficacy against SARS-CoV-2 by Targeting the Host Protein EEF1A. *Science* **2021**, *371* (6532), 926–931. <https://doi.org/10.1126/science.abf4058>.
- (6) Beckmann, A.; Özbek, S. The Nematocyst: A Molecular Map of the Cnidarian Stinging Organelle. *Int. J. Dev. Biol.* **2012**, *56*, 577–582. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113472ab>.
- (7) Gubič, Š.; Hendrickx, L. A.; Toplak, Ž.; Sterle, M.; Peigneur, S.; Tomašič, T.; Pardo, L. A.; Tytgat, J.; Zega, A.; Mašič, L. P. Discovery of KV1.3 Ion Channel Inhibitors: Medicinal Chemistry Approaches and Challenges. *Med. Res. Rev.* **2021**, *41* (4), 2423–2473. <https://doi.org/10.1002/med.21800>.
- (8) Tarcha, E. J.; Olsen, C. M.; Probst, P.; Peckham, D.; Muñoz-Elías, E. J.; Kruger, J. G.; Iadonato, S. P. Safety and Pharmacodynamics of Dalazatide, a Kv1.3 Channel Inhibitor, in the Treatment of Plaque Psoriasis: A Randomized Phase 1b Trial. *PLOS ONE* **2017**, *12* (7), e0180762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180762>.
- (9) Monks, S. A.; Pallaghy, P. K.; Scanlon, M. J.; Norton, R. S. Solution Structure of the Cardiac Stimulant Polypeptide Anthopleurin-B and Comparison with Anthopleurin-A. *Structure* **1995**, *3* (8), 791–803. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00214-3).
- (10) Lu, W.-Y.; Li, H.-J.; Li, Q.-Y.; Wu, Y.-C. Application of Marine Natural Products in Drug Research. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *35*, 116058. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116058>.
- (11) Karthikeyan, A.; Joseph, A.; Nair, B. G. Promising Bioactive Compounds from the Marine Environment and Their Potential Effects on Various Diseases. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2022**, *20* (1), 14. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00290-4>.
- (12) Lillsunde, K.-E.; Tomašič, T.; Kikelj, D.; Tammela, P. Marine Alkaloid Oroidin Analogues with Antiviral Potential: A Novel Class of Synthetic Compounds Targeting the Cellular Chaperone Hsp90. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *90* (6), 1147–1154. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13034>.
- (13) Saha, D.; Stolarzewicz, I.; Bahadur, V.; Sharma, U. K.; Voskressensky, L. G.; Sharma, A.; Singh, B. K.; Van der Eycken, E. V. Palladium (II)-Catalysed Intramolecular CH Functionalizations: Efficient Synthesis of Kealiinine C and Analogues. *Mol. Catal.* **2018**, *455*, 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.06.007>.



- (14) Li, G.; Guo, J.; Wang, Z.; Liu, Y.; Song, H.; Wang, Q. Marine Natural Products for Drug Discovery: First Discovery of Kealiinines A–C and Their Derivatives as Novel Antiviral and Antiphytopathogenic Fungus Agents. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (28), 7310–7318. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02238>.
- (15) Burgess, G.; Williams, D. The Discovery and Development of Analgesics: New Mechanisms, New Modalities. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120* (11), 3753–3759. <https://doi.org/10.1172/JCI43195>.
- (16) Borah, A. J.; Goswami, P.; Barua, N. C.; Phukan, P. Synthesis of Unit-B of Cryptophycin-24 via Sharpless Asymmetric Dihydroxylation. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (52), 7128–7130. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.10.078>.
- (17) Catherine, J.; Jungels, C.; Durieux, V.; Deliens, C.; Grigoriu, B. Trabectedin-Related Heart Failure: Case Report and a Systematic Review of the Literature. *Front. Oncol.* **2021**, *11*.
- (18) D’Ambra, I.; Lauritano, C. A Review of Toxins from Cnidaria. *Mar. Drugs* **2020**, *18* (10), 507. <https://doi.org/10.3390/md18100507>.
- (19) Technau, U.; Steele, R. E. Evolutionary Crossroads in Developmental Biology: Cnidaria. *Development* **2011**, *138* (8), 1447–1458. <https://doi.org/10.1242/dev.048959>.
- (20) Collins, A. G. Recent Insights into Cnidarian Phylogeny. *Smithson. Contrib. Mar. Sci.* **2009**, No. 38.
- (21) Fautin, D. G. Structural Diversity, Systematics, and Evolution of Cnidae. *Toxicon* **2009**, *54* (8), 1054–1064. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.024>.
- (22) Östman, C. A Guideline to Nematocyst Nomenclature and Classification, and Some Notes on the Systematic Value of Nematocysts. *Sci. Mar.* **2000**, *64* (S1), 31–46. <https://doi.org/10.3989/scimar.2000.64s131>.
- (23) Moran, Y.; Genikhovich, G.; Gordon, D.; Wienkoop, S.; Zenkert, C.; Özbek, S.; Technau, U.; Gurevitz, M. Neurotoxin Localization to Ectodermal Gland Cells Uncovers an Alternative Mechanism of Venom Delivery in Sea Anemones. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2012**, *279* (1732), 1351–1358. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1731>.
- (24) *Toxicidad del veneno de las medusas: composición*. Medusas Wiki. <https://medusas.wiki/toxicidad-del-veneno-de-las-medusas/> (accessed 2023-03-21).
- (25) Kaposi, K. L.; Courtney, R. L.; Seymour, J. E. Implications of Bleaching on Cnidarian Venom Ecology. *Toxicon X* **2022**, *13*, 100094. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2022.100094>.
- (26) Jouiaei, M.; Yanagihara, A. A.; Madio, B.; Nevalainen, T. J.; Alewood, P. F.; Fry, B. G. Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins* **2015**, *7* (6), 2251–2271. <https://doi.org/10.3390/toxins7062251>.
- (27) Santhanam, R.; Ramesh, S.; Shivakumar, G. *Biology and Ecology of Pharmaceutical Marine Cnidarians*; Biology and ecology of marine life book series; CRC Press: Boca Raton, Florida, 2019.
- (28) Murakami, M.; Kudo, I. Phospholipase A2. *J. Biochem. (Tokyo)* **2002**, *131* (3), 285–292. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003101>.
- (29) Romero, L.; Marcussi, S.; Marchi-Salvador, D. P.; Silva, F. P.; Fuly, A. L.; Stábeli, R. G.; da Silva, S. L.; González, J.; Monte, A. del; Soares, A. M. Enzymatic and Structural Characterization of a Basic Phospholipase A2 from the Sea Anemone *Condylactis Gigantea*. *Biochimie* **2010**, *92* (8), 1063–1071. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.05.007>.
- (30) Nevalainen, T. J.; Peuravuori, H. J.; Quinn, R. J.; Llewellyn, L. E.; Benzie, J. A. H.; Fenner, P. J.; Winkel, K. D. Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *139* (4), 731–735. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.006>.
- (31) Martins, R. D.; Alves, R. S.; Martins, A. M. C.; Barbosa, P. S. F.; Evangelista, J. S. A. M.; 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. Purification and



- Characterization of the Biological Effects of Phospholipase A2 from Sea Anemone *Bunodosoma Caissarum*. *Toxicon* **2009**, *54* (4), 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.05.005>.
- (32) Roelants, K.; Champagne, D.; Scheib, H.; Tyndall, J.; King, G.; Nevalainen, T.; Norman, J.; Lewis, R.; Norton, R.; Renjifo, C.; Rodríguez de la Vega, R. The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2009**, *10*, 483–511. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>.
- (33) Undheim, E. A. B.; King, G. F. On the Venom System of Centipedes (Chilopoda), a Neglected Group of Venomous Animals. *Toxicon* **2011**, *57* (4), 512–524. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.004>.
- (34) Fox, J. W.; Serrano, S. M. T. Structural Considerations of the Snake Venom Metalloproteinases, Key Members of the M12 Reprölysin Family of Metalloproteinases. *Toxicon* **2005**, *45* (8), 969–985. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012>.
- (35) Li, R.; Yu, H.; Xue, W.; Yue, Y.; Liu, S.; Xing, R.; Li, P. Jellyfish Venomics and Venom Gland Transcriptomics Analysis of *Stomolophus Meleagris* to Reveal the Toxins Associated with Sting. *J. Proteomics* **2014**, *106*, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.011>.
- (36) Jouiaei, M.; Casewell, N. R.; Yanagihara, A. A.; Nouwens, A.; Cribb, B. W.; Whitehead, D.; Jackson, T. N. W.; Ali, S. A.; Wagstaff, S. C.; Koludarov, I.; Alewood, P.; Hansen, J.; Fry, B. G. Firing the Sting: Chemically Induced Discharge of Cnidaria Reveals Novel Proteins and Peptides from Box Jellyfish (*Chironex Fleckeri*) Venom. *Toxins* **2015**, *7* (3), 936–950. <https://doi.org/10.3390/toxins7030936>.
- (37) Messerli, S. M.; Greenberg, R. M. Cnidarian Toxins Acting on Voltage-Gated Ion Channels. *Mar. Drugs* **2006**, *4* (3), 70–81. <https://doi.org/10.3390/md403070>.
- (38) Frazão, B.; Vasconcelos, V.; Antunes, A. Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Mar. Drugs* **2012**, *10* (8), 1812–1851. <https://doi.org/10.3390/md10081812>.
- (39) Moran, Y.; Gordon, D.; Gurevitz, M. Sea Anemone Toxins Affecting Voltage-Gated Sodium Channels – Molecular and Evolutionary Features. *Toxicon* **2009**, *54* (8), 1089–1101. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.028>.
- (40) Smith, J. J.; Blumenthal, K. M. Site-3 Sea Anemone Toxins: Molecular Probes of Gating Mechanisms in Voltage-Dependent Sodium Channels. *Toxicon* **2007**, *49* (2), 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.020>.
- (41) Kalina, R. S.; Peigneur, S.; Zelepuga, E. A.; Dmitrenok, P. S.; Kvetkina, A. N.; Kim, N. Y.; Leychenko, E. V.; Tytgat, J.; Kozlovskaya, E. P.; Monastyrnaya, M. M.; Gladkikh, I. N. New Insights into the Type II Toxins from the Sea Anemone *Heteractis Crispa*. *Toxins* **2020**, *12* (1), 44. <https://doi.org/10.3390/toxins12010044>.
- (42) Liao, Q.; Feng, Y.; Yang, B.; Lee, S. M.-Y. Cnidarian Peptide Neurotoxins: A New Source of Various Ion Channel Modulators or Blockers against Central Nervous Systems Disease. *Drug Discov. Today* **2019**, *24* (1), 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.08.011>.
- (43) Honma, T.; Shiomi, K. Peptide Toxins in Sea Anemones: Structural and Functional Aspects. *Mar. Biotechnol.* **2006**, *8* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-5093-2>.
- (44) Kvetkina, A. N.; Leychenko, E. V.; Yurchenko, E. A.; Pilyagin, E. A.; Peigneur, S.; Tytgat, Y.; Isaeva, M. P.; Aminin, D. L.; Kozlovskaya, E. P. A New Iq-Peptide of the Kunitz Type from the *Heteractis Magnifica* Sea Anemone Exhibits Neuroprotective Activity in a Model of Alzheimer's Disease. *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2018**, *44* (4), 416–423. <https://doi.org/10.1134/S106816201804012X>.
- (45) Kvetkina, A.; Leychenko, E.; Chausova, V.; Zelepuga, E.; Chernysheva, N.; Guzev, K.; Pilyagin, E.; Yurchenko, E.; Menchinskaya, E.; Aminin, D.; Kaluzhskiy, L.; Ivanov, A.; Peigneur, S.; Tytgat, J.; Kozlovskaya, E.; Isaeva, M. A New Multigene HCIQ Subfamily from the Sea Anemone *Heteractis Crispa* Encodes Kunitz-Peptides Exhibiting Neuroprotective Activity



- against 6-Hydroxydopamine. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 4205. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61034-x>.
- (46) Fernandes, E.; Fernandes, M.; Keeble, J. The Functions of TRPA1 and TRPV1: Moving Away from Sensory Nerves. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166* (2), 510–521. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x>.
- (47) Logashina, Y. A.; Mosharova, I. V.; Korolkova, Y. V.; Shelukhina, I. V.; Dyachenko, I. A.; Palikov, V. A.; Palikova, Y. A.; Murashev, A. N.; Kozlov, S. A.; Stensvåg, K.; Andreev, Y. A. Peptide from Sea Anemone Metridium Senile Affects Transient Receptor Potential Ankyrin-Repeat 1 (TRPA1) Function and Produces Analgesic Effect *. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (7), 2992–3004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.757369>.
- (48) Logashina, Y. A.; Solstad, R. G.; Mineev, K. S.; Korolkova, Y. V.; Mosharova, I. V.; Dyachenko, I. A.; Palikov, V. A.; Palikova, Y. A.; Murashev, A. N.; Arseniev, A. S.; Kozlov, S. A.; Stensvåg, K.; Haug, T.; Andreev, Y. A. New Disulfide-Stabilized Fold Provides Sea Anemone Peptide to Exhibit Both Antimicrobial and TRPA1 Potentiating Properties. *Toxins* **2017**, *9* (5), 154. <https://doi.org/10.3390/toxins9050154>.
- (49) Osmakov, D. I.; Kozlov, S. A.; Andreev, Y. A.; Koshelev, S. G.; Sanamyan, N. P.; Sanamyan, K. E.; Dyachenko, I. A.; Bondarenko, D. A.; Murashev, A. N.; Mineev, K. S.; Arseniev, A. S.; Grishin, E. V. Sea Anemone Peptide with Uncommon β -Hairpin Structure Inhibits Acid-Sensing Ion Channel 3 (ASIC3) and Reveals Analgesic Activity *. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (32), 23116–23127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.485516>.
- (50) Rodríguez, A. A.; Salceda, E.; Garateix, A. G.; Zaharenko, A. J.; Peigneur, S.; López, O.; Pons, T.; Richardson, M.; Díaz, M.; Hernández, Y.; Ständker, L.; Tytgat, J.; Soto, E. A Novel Sea Anemone Peptide That Inhibits Acid-Sensing Ion Channels. *Peptides* **2014**, *53*, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.06.003>.
- (51) Kalina, R.; Gladkikh, I.; Dmitrenok, P.; Chernikov, O.; Koshelev, S.; Kvetkina, A.; Kozlov, S.; Kozlovskaya, E.; Monastyrnaya, M. New APETx-like Peptides from Sea Anemone Heteractis Crispa Modulate ASIC1a Channels. *Peptides* **2018**, *104*, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.04.013>.
- (52) Tysoe, C.; Withers, S. G. Structural Dissection of Helianthamide Reveals the Basis of Its Potent Inhibition of Human Pancreatic α -Amylase. *Biochemistry* **2018**, *57* (37), 5384–5387. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00825>.
- (53) Sintsova, O.; Gladkikh, I.; Kalinovskii, A.; Zelepuga, E.; Monastyrnaya, M.; Kim, N.; Shevchenko, L.; Peigneur, S.; Tytgat, J.; Kozlovskaya, E.; Leychenko, E. Magnificamide, a β -Defensin-Like Peptide from the Mucus of the Sea Anemone Heteractis Magnifica, Is a Strong Inhibitor of Mammalian α -Amylases. *Mar. Drugs* **2019**, *17* (10), 542. <https://doi.org/10.3390/md17100542>.
- (54) Macrander, J.; Daly, M. Evolution of the Cytolytic Pore-Forming Proteins (Actinoporins) in Sea Anemones. *Toxins* **2016**, *8* (12), 368. <https://doi.org/10.3390/toxins8120368>.
- (55) Los, F. C. O.; Randis, T. M.; Aroian, R. V.; Ratner, A. J. Role of Pore-Forming Toxins in Bacterial Infectious Diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, *77* (2), 173–207. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-12>.
- (56) Menezes, C.; Thakur, N. L. Sea Anemone Venom: Ecological Interactions and Bioactive Potential. *Toxicon* **2022**, *208*, 31–46. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.01.004>.
- (57) Satoh, H.; Oshiro, N.; Iwanaga, S.; Namikoshi, M.; Nagai, H. Characterization of PsTX-60B, a New Membrane-Attack Complex/Perforin (MACPF) Family Toxin, from the Venomous Sea Anemone Phyllodiscus Semoni. *Toxicon* **2007**, *49* (8), 1208–1210. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.01.006>.
- (58) PubChem. *PubChem*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 2023-03-21).



- (59) Brusca, R. C.; Moore, W.; Shuster, S. M.; Haver, N. *Invertebrates*, Third edition.; Sinauer: Sunderland, Massachusetts, 2016.
- (60) Wood, L. *Sea Fishes of the Mediterranean Sea: Including Marine Invertebrates*; Bloomsbury: London, England, 2015.
- (61) Beckmann, A.; Özbek, S. The Nematocyst: A Molecular Map of the Cnidarian Stinging Organelle. *Int. J. Dev. Biol.* **2012**, *56* (6-7-8), 577-582.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.113472ab>.
- (62) Cheng, K. Learning in Cnidaria: A Systematic Review. *Learn. Behav.* **2021**, *49* (2), 175-189.
<https://doi.org/10.3758/s13420-020-00452-3>.
- (63) Anderson, P. A. V.; Bouchard, C. The Regulation of Cnidocyte Discharge. *Toxicon* **2009**, *54* (8), 1046-1053. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.023>.
- (64) Karabulut, A.; McClain, M.; Rubinstein, B.; Sabin, K. Z.; McKinney, S. A.; Gibson, M. C. The Architecture and Operating Mechanism of a Cnidarian Stinging Organelle. *Nat. Commun.* **2022**, *13* (1), 3494. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31090-0>.
- (65) Arrecife, M. *Armas biológicas: Los nematocistos*. Mi Arrecife.
<https://www.miarrecife.digital/post/armas-biológicas-los-nematocistos> (accessed 2023-03-21).
- (66) *Word list of Actiniaria - Anthopleura texaensis (Carlgren & Hedgepeth, 1952)*.
<https://www.marinespecies.org/actiniaria/aphia.php?p=taxdetails&id=410990> (accessed 2023-02-19).
- (67) Oliveira, J. S.; Zaharenko, A. J.; Ferreira, W. A.; Konno, K.; Shida, C. S.; Richardson, M.; Lúcio, A. D.; Beirão, P. S. L.; de Freitas, J. C. BclV, a New Paralyzing Peptide Obtained from the Venom of the Sea Anemone *Bunodosoma Caissarum*. A Comparison with the Na⁺ Channel Toxin BclII. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2006**, *1764* (10), 1592-1600.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.08.010>.
- (68) McCommas, S. A. Biochemical Genetics of the Sea Anemone *Bunodosoma Cavernata* and the Zoogeography of the Gulf of Mexico. *Mar. Biol.* **1982**, *68* (2), 169-173.
<https://doi.org/10.1007/BF00397603>.
- (69) González-Muñoz, R. *Anémonas (Anthozoa: Actiniaria, Corallimorpharia y Zoanthidea) del Arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2009*.
- (70) *Google Maps*. Google Maps.
https://www.google.com.mx/maps/place/Playa+Bonita,+Camp./@18.0000198,-90.0087549,15z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x8f5f558007878801:0xb320a6445cc3a903!8m2!3d17.9999999!4d-90.0000001!16s%2Fg%2F1tg5_pws (accessed 2022-11-04).
- (71) Kohno, Y.; Satoh, H.; Iguchi, A.; Nagai, H. Characterization of a New Hemolytic Protein Toxin from the Sea Anemone *Anthopleura Asiatica*. *Fish. Sci.* **2009**, *75* (4), 1049-1054.
<https://doi.org/10.1007/s12562-009-0112-2>.
- (72) Norton, T. R. Cardiotoxic Polypeptides from *Anthopleura Xanthogrammica* (Brandt) and *A. Elegantissima* (Brandt). *Fed. Proc.* **1981**, *40* (1), 21-25.
- (73) 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. Isolation and Characterisation of Five Neurotoxic and Cardiotoxic Polypeptides from the Sea Anemone *Anthopleura Elegantissima*. *Toxicon* **2001**, *39* (5), 693-702.
[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00199-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00199-9).
- (74) Diochot, S.; Baron, A.; Rash, L. D.; Deval, E.; Escoubas, P.; Scarzello, S.; Salinas, M.; Lazdunski, M. A New Sea Anemone Peptide, APETx2, Inhibits ASIC3, a Major Acid-Sensitive Channel in Sensory Neurons. *EMBO J.* **2004**, *23* (7), 1516-1525.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600177>.



- (75) Sunahara, S.; Muramoto, K.; Tenma, K.; Kamiya, H. Amino Acid Sequence of Two Sea Anemone Toxins from *Anthopleura Fuscoviridis*. *Toxicon* **1987**, *25* (2), 211–219. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90243-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90243-1).
- (76) Kelso, G. J.; Blumenthal, K. M. Identification and Characterization of Novel Sodium Channel Toxins from the Sea Anemone *Anthopleura Xanthogrammica*. *Toxicon* **1998**, *36* (1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00064-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00064-0).
- (77) Minagawa, S.; Ishida, M.; Shimakura, K.; Nagashima, Y.; Shiomi, K. Isolation and Amino Acid Sequences of Two Kunitz-Type Protease Inhibitors From the Sea Anemone *Anthopleura Aff. Xanthogrammica*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *118* (2), 381–386. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00174-0](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00174-0).
- (78) *Phytochemistry of Medicinal Plants*; Arnason, J. T., Mata, R., Romeo, J. T., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1995. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1778-2>.
- (79) Pieters, L.; Vlietinck, A. J. Bioguided Isolation of Pharmacologically Active Plant Components, Still a Valuable Strategy for the Finding of New Lead Compounds? *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100* (1), 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.029>.
- (80) *Pharmacognosy - 1st Edition*. <https://www.elsevier.com/books/pharmacognosy/delgoda/978-0-12-802104-0> (accessed 2022-10-03).
- (81) Cox, P. A.; King, S. Bioprospecting. In *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)*; Levin, S. A., Ed.; Academic Press: Waltham, 2013; pp 588–599. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00350-6>.
- (82) Leal, M. C.; Puga, J.; Serôdio, J.; Gomes, N. C. M.; Calado, R. Trends in the Discovery of New Marine Natural Products from Invertebrates over the Last Two Decades – Where and What Are We Bioprospecting? *PLoS ONE* **2012**, *7* (1), e30580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030580>.
- (83) *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas: Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*; Castillo Morales, G., Ed.; IMTA ; IDRC: México : Canadá, 2004.
- (84) Dong, M. W. *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*; John Wiley & Sons, 2019.
- (85) Coskun, O. Separation Techniques: Chromatography. *North. Clin. Istanb.* **2016**, *3* (2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>.
- (86) *Advances in Chromatography Volume 57 | Nelu Grinberg, Peter W. Carr |*. <https://www-taylorfrancis-com.pbidi.unam.mx:2443/pdfviewer/> (accessed 2022-10-06).
- (87) Kromidas, S. *Gradient HPLC for Practitioners: RP, LC-MS, Ion Analytics, Biochromatography, SFC, HILIC*; John Wiley & Sons, 2019.
- (88) Kong, R. 17 - LC/MS Application in High-Throughput ADME Screen. In *Separation Science and Technology*; Ahuja, S., Dong, M. W., Eds.; Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC; Academic Press, 2005; Vol. 6, pp 413–446. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(05\)80061-3](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(05)80061-3).
- (89) Poole, C. F.; Poole, S. K. 2.14 - Principles and Practice of Solid-Phase Extraction. In *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*; Pawliszyn, J., Ed.; Academic Press: Oxford, 2012; pp 273–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00041-7>.
- (90) *Solid Phase Extraction Products-SPE Tubes and Sample Preparation Products from Phenomenex*. <https://www.phenomenex.com/sample-preparation/solid-phase-extraction> (accessed 2022-10-07).
- (91) *Solid Phase Extraction Users Manual*. <https://interactivepdf.uniflip.com/2/41719/301496/pub/html5.html> (accessed 2022-10-07).
- (92) Lazcano-Pérez, F.; Arellano, R. O.; Garay, E.; Arreguín-Espinosa, R.; Sánchez-Rodríguez, J. Electrophysiological Activity of a Neurotoxic Fraction from the Venom of Box Jellyfish



- Carybdea Marsupialis. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *191*, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.10.010>.
- (93) Sánchez-Rodríguez, J.; Cruz-Vazquez, K. Isolation and Biological Characterization of Neurotoxic Compounds from the Sea Anemone *Lebrunia Danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860). *Arch. Toxicol.* **2006**, *80* (7), 436–441. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0059-3>.
- (94) Shrimps, B. A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent". *J Med. Plant Res. Planta Medica* **1982**, *45*, 31–34.
- (95) Moon, H.-S.; Jacobson, E. M.; Khersonsky, S. M.; Luzung, M. R.; Walsh, D. P.; Xiong, W.; Lee, J. W.; Parikh, P. B.; Lam, J. C.; Kang, T.-W.; Rosania, G. R.; Schier, A. F.; Chang, Y.-T. A Novel Microtubule Destabilizing Entity from Orthogonal Synthesis of Triazine Library and Zebrafish Embryo Screening. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (39), 11608–11609. <https://doi.org/10.1021/ja026720i>.
- (96) Mandrekar, N.; Thakur, N. L. Significance of the Zebrafish Model in the Discovery of Bioactive Molecules from Nature. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31* (2), 171–179. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9868-1>.
- (97) Lima-Filho, J. V.; de Aguiar Cordeiro, R. In Vitro and In Vivo Antibacterial and Antifungal Screening of Natural Plant Products: Prospective Standardization of Basic Methods. In *Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology*; Albuquerque, U. P., Cruz da Cunha, L. V. F., de Lucena, R. F. P., Alves, R. R. N., Eds.; Springer Protocols Handbooks; Springer: New York, NY, 2014; pp 275–291. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8636-7_17.
- (98) Lalitha, M. K. Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Perform. Stand. Antimicrob. Test. Twelfth Informational Suppl.* **2004**, *56238*, 454–456.
- (99) Torres, M.; Aguilar, M. B.; Falcón, A.; Sánchez, L.; Radwan, F. F. Y.; Burnett, J. W.; Heimer-de la Cotera, E. P.; Arellano, R. O. Electrophysiological and Hemolytic Activity Elicited by the Venom of the Jellyfish *Cassiopea Xamachana*. *Toxicon* **2001**, *39* (9), 1297–1307. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00081-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00081-2).
- (100) Herrera-Bojórquez, L. G.; González-Muñoz, R.; León-Deniz, L. V.; Arjona-Torres, G.; Sima-Álvarez, R.; Herrera-Bojórquez, L. G.; González-Muñoz, R.; León-Deniz, L. V.; Arjona-Torres, G.; Sima-Álvarez, R. Sea Anemones (Anthozoa: Actiniaria) from the Coast of Yucatán, Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.* **2020**, *91*. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.3195>.
- (101) Russell, F. E.; Saunders, P. R. *Animal Toxins: A Collection of Papers Presented at the First International Symposium on Animal Toxins, Atlantic City, New Jersey, U.S.A., April 9–11, 1966*; Elsevier, 2016.
- (102) Keen, T. E. B. Comparison of Tentacle Extracts from *Chiropsalmus Quadrigatus* and *Chironex Fleckeri*. *Toxicon* **1971**, *9* (3), 249–254. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(71\)90077-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(71)90077-8).
- (103) Turner, R. J.; Freeman, S. E. Effects of *Chironex Fleckeri* Toxin on the Isolated Perfused Guinea Pig Heart. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* **1969**, *7* (4), 277–286. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(69\)90028-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(69)90028-2).
- (104) Carrette, T.; Seymour, J. A Rapid and Repeatable Method for Venom Extraction from Cubozoan Nematocysts. *Toxicon* **2004**, *44* (2), 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.04.008>.
- (105) Yanagihara, A. A.; Shohet, R. V. Cubozoan Venom-Induced Cardiovascular Collapse Is Caused by Hyperkalemia and Prevented by Zinc Gluconate in Mice. *PLOS ONE* **2012**, *7* (12), e51368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051368>.
- (106) Hartwick, R.; Callanan, V.; Williamson, J. Nematocyst Inhibition in *Chironex Fleckeri*. *Med. J. Aust.* **1980**, *1* (1), 15–20. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1980.tb134566.x>.
- (107) Birsa, L. M.; Verity, P. G.; Lee, R. F. Evaluation of the Effects of Various Chemicals on Discharge of and Pain Caused by Jellyfish Nematocysts. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *151* (4), 426–430. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.01.007>.



- (108) Rifkin, J. F.; Fenner, P. J.; Williamson, J. A. H. First Aid Treatment of the Sting from the Hydroid *Lytocarpus Philippinus*: The Structure of, and in Vitro Discharge Experiments with Its Nematocysts. *J. Wilderness Med.* **1993**, *4* (3), 252–260. <https://doi.org/10.1580/0953-9859-4.3.252>.
- (109) Beress, L. Biologically Active Compounds from Coelenterates. *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54* (10), 1981–1994. <https://doi.org/10.1351/pac198254101981>.
- (110) Sánchez-Rodríguez, J.; Zugasti, A.; Santamaría, A.; Galván-Arzate, S.; Segura-Puertas, L. Isolation, Partial Purification and Characterization of Active Polypeptide from the Sea Anemone *Bartholomea Annulata*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *99* (2), 116–121. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_428.x.
- (111) Bastos Junior, C. L. Q.; Bialves, T. S.; Foguesatto, K.; Arantes, E. M.; de Souza, G. B.; Garcia, T. O.; Varela, A. S.; Boyle, R. T. The Effects of Vesicle Toxin from the Sea Anemone *Bunodosoma Canguicum* on the Behavior of a Freshwater Shrimp, *Palaemon Argentinus*, and Shore Crab, *Neohelice Granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2021**, *242*, 108941. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108941>.
- (112) Sun, M.; Qin, J.; Kang, Y.; Zhang, Y.; Ba, M.; Yang, H.; Duan, Y.; Yao, Y. 2-Methoxydiol Derivatives as New Tubulin and HDAC Dual-Targeting Inhibitors, Displaying Antitumor and Antiangiogenic Response. *Bioorganic Chem.* **2022**, *120*, 105625. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105625>.
- (113) Bär, S. I.; Dittmer, A.; Nitzsche, B.; Ter-Avetisyan, G.; Föhling, M.; Klefenz, A.; Kaps, L.; Biersack, B.; Schobert, R.; Höpfner, M.; Bär, S. I.; Dittmer, A.; Nitzsche, B.; Ter-Avetisyan, G.; Föhling, M.; Klefenz, A.; Kaps, L.; Biersack, B.; Schobert, R.; Höpfner, M. Chimeric HDAC and the Cytoskeleton Inhibitor Broxam as a Novel Therapeutic Strategy for Liver Cancer. *Int. J. Oncol.* **2022**, *60* (6), 1–19. <https://doi.org/10.3892/ijo.2022.5363>.
- (114) Ravindran, V. S.; Kannan, L.; Venkateshvaran, K. Biological Activity of Sea Anemone Proteins: II. Cytolysis and Cell Line Toxicity. **2010**.
- (115) Anderluh, G.; Maček, P. Cytolytic Peptide and Protein Toxins from Sea Anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* **2002**, *40* (2), 111–124. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00191-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00191-X).
- (116) Orts, D. J. B.; Peigneur, S.; Madio, B.; Cassoli, J. S.; Montandon, G. G.; Pimenta, A. M. C.; Bicudo, J. E. P. W.; Freitas, J. C.; Zaharenko, A. J.; Tytgat, J. Biochemical and Electrophysiological Characterization of Two Sea Anemone Type 1 Potassium Toxins from a Geographically Distant Population of *Bunodosoma Caissarum*. *Mar. Drugs* **2013**, *11* (3), 655–679. <https://doi.org/10.3390/md11030655>.

