



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología



Universidad Nacional Autónoma de México

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS TOXINAS DE
LA ANÉMOMA *Stichodactyla helianthus* (Ellis, 1768)**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

**M A E S T R A E N C I E N C I A S
(B I O L O G Í A M A R I N A)**

P R E S E N T A :

BIOL. HEIDI IRAIS MONROY ESTRADA

**DIRECTORAS DE TESIS: DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
DRA. MA. DE LOURDES SEGURA PUERTAS**

**COMITÉ TUTORAL: DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA
DR. MANUEL AGUILAR RAMÍREZ
DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL**

Puerto Morelos, Quintana Roo, 2008



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.

DEDICATORIAS

A mis padres,

Por la vida.
Por su amor, apoyo y su guía.
Por los buenos y malos momentos.
Por ser mi motivación en la vida.
Simple y sencillamente...
Por ser ellos y enseñarme a ser yo.

A mis hermanos,

Por sus cuidados y apoyo.
Por estar conmigo.
Por ser parte de mi.
Por darme la dicha de ser Tía.

A mis sobrinos,

Fernando, Octavio y Karla
Por sus risas y abrazos.
Por esa ternura y amor.

A mis amigos,

Oscar, Ana, Erick, Raquel,
Sandra, Arte, Ara, Julián,
Lyz, Victor, Mélina, Adrien,
Emiliano y Karen por su apoyo,
sus consejos y su compañía.
Por ser mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis, la Dra. Judith Sánchez Rodríguez y la Dra. Ma. de Lourdes Segura Puertas por su valiosa participación y asesoría, así como por sus comentarios y sugerencias para la realización de esta tesis, sin ellas la realización de este trabajo hubiera sido imposible.

Al Dr. Abel Santamaría del Ángel y a la Dra. Sonia Galván Arzate del Instituto Nacional de Neurología y Neurociencias, por su por permitirme realizar con ellos parte de mi trabajo de tesis, así como el uso de sus instalaciones y equipos. De igual forma, también agradezco a sus estudiantes y a la M. en C. Dinora González por el apoyo brindado, la asesoría y los buenos momentos durante mi estancia con ellos.

A la Dra. Leopoldina Aguirre Macedo y al M. en C. Raúl Simá Álvarez del Centro de Investigación de Estudios Avanzados Unidad Mérida por su colaboración y asesoría durante mi estancia en el Laboratorio de Patología Acuática.

A los M. en C. Fernando Negrete Soto y Cecilia Barradas Ortíz de la Unidad Académica Puerto Morelos por su apoyo en la recolecta de las anémonas usadas en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A Diana, Lupita, Gaby y Chantal del Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, por su apoyo y asesoría en todos los trámites a realizar durante mi estancia en el posgrado.

A mi Comité Tutoral por las aportaciones, sugerencias y correcciones para realización de este trabajo.

RESUMEN

Stichodactyla helianthus es una anémona que se encuentra comúnmente en el Caribe; como todos los cnidarios posee compuestos con importante actividad biológica; dentro de los trabajos realizados para esta anémona se encuentran aquellos dedicados a entender su alta actividad hemolítica. El propósito de este estudio es evaluar su actividad en otros sistemas biológicos.

El extracto crudo presentó actividad antibacteriana en una cepa de *Aeromonas hydrophila* a concentraciones del 5% y sólo 3 de las fracciones pre-purificadas tuvieron una ligera actividad.

Al inyectar el extracto crudo vía intraperitoneal (i. p.) en peces de la especie *Oreochromis niloticus* se obtuvo la dosis letal media (LD₅₀) con la concentración de 25 mg/kg y el 100% de mortalidad se presentó con la dosis de 50 mg/kg. Se evaluó la actividad citotóxica en las branquias, hígado, bazo y cerebro de peces de la especie *O. niloticus*, donde se observó que el mayor daño causado por la actividad del extracto crudo de *S. helianthus* fue en las branquias; los daños que se observaron fueron hipertrofia, hiperplasia y aumento del flujo sanguíneo. En el hígado se presentó vacuolación, hiperemia y aumento del flujo sanguíneo, el bazo presenta un incremento en los centros melanomacrófagos y el cerebro no presentó daño alguno. Las fracciones pre-purificadas probadas presentaron actividad en las branquias observándose hipertrofia, hiperplasia y aumento del flujo sanguíneo. En hígado se observó aumento del flujo sanguíneo, hiperemia y hemorragia multifocal y en bazo hubo un incremento de los centros melanomacrófagos.

Se observó una importante actividad neurotóxica en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* causada por nueve de las fracciones pre-purificadas probadas en este estudio y muy poca actividad causada por el extracto crudo de *S. helianthus*.

El extracto crudo de *S. helianthus* causó daño hemolítico en eritrocitos de rata y humano, corroborando los trabajos que se han realizado; así mismo se observó que es capaz de provocar la peroxidación de lípidos en dichos eritrocitos. La actividad hemolítica en eritrocitos de rata es dependiente de la concentración del extracto crudo. Al aumentar la concentración extracto crudo se observó un incremento en la liberación de la hemoglobina. El 100 % de hemólisis se obtuvo con 0.3783 mg proteína/ml del extracto crudo de *S. helianthus*. En el caso de los eritrocitos humanos, la actividad hemolítica es dependiente del incremento en la concentración del extracto crudo. Los eritrocitos humanos fueron mucho más sensibles a las toxinas que los de rata. El 100% de hemólisis se obtuvo con sólo 0.094 mg proteína/ml. La peroxidación lipídica mostró una respuesta dependiente de la concentración del extracto crudo. Para eritrocitos de rata la peroxidación lipídica se presentó con 0.379 y 0.473 mg proteína/mL y para eritrocitos de humano con 0.473 mg proteína/mL.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVOS.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	18
METODOLOGÍA.....	19
Área de recolecta de <i>Stichodactyla helianthus</i>	19
Obtención del extracto crudo	20
Purificación parcial del extracto crudo	21
Cuantificación de proteína	23
Actividad antibacteriana	23
Actividad citotóxica	23
Actividad neurotóxica	25
Actividad hemolítica y peroxidación lipídica	25
RESULTADOS	27
Purificación parcial del extracto crudo	27
Cuantificación de proteína	41
Actividad antibacteriana	42
Actividad citotóxica	45
Actividad neurotóxica	55
Actividad hemolítica y peroxidación lipídica	56
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES.....	66

APÉNDICE I. Generalidades del Phylum Cnidaria	68
APÉNDICE II. Taxonomía de <i>Stichodactyla helianthus</i>	69
APÉNDICE III. Generalidades de los nematocistos	69
APÉNDICE IV. Técnicas de tinción Hematoxilina y Eosina	70
REFERENCIAS.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de los nematocistos	12
Figura 2. Los diferentes tipos de nematocistos	12
Figura 3. Morfología de espirocistos	13
Figura 4. Área de recolecta de <i>Stichodactyla helianthus</i>	19
Figura 5. Cromatografía Gel Sephadex G-50 M del extracto crudo de <i>S. helianthus</i>	27
Figura 6. Cromatografía de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25 de la fracción ShG50F2	27
Figura 7. Cromatografía Sephadex G-50 de la fracción ShG50F2/QAEF1	28
Figura 8. Cromatografía Sephadex G-50 de la fracción ShG50F2/QAEF2	28
Figura 9. Cromatografía Sephadex G-50 de la fracción ShG50F2/QAEF3	29
Figura 10. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 de la ShG50F2/QAEF1/G50F2	29
Figura 11. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 de la ShG50F2/QAEF1/G50F4	30
Figura 12. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 de la ShG50F2/QAEF2/G50F2	31
Figura 13. Cromatografía Sephadex G- 25 de la fracción ShG50F2/QAEF2/G50F2/FractoF1	31
Figura 14. Cromatografía Sephadex G- 25 de la fracción ShG50F2/QAEF2/G50F2/FractoF2	32

Figura 15. Cromatografía Sephadex G- 25 de la fracción ShG50F2/QAEF2/ G50F2/FractoF3	32
Figura 16. Cromatografía Sephadex G- 25 de la fracción ShG50F2/QAEF2/ G50F2/FractoF4	33
Figura 17. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 de la fracción ShG50F2/QAEF2/G50F3	33
Figura 18. Cromatografía Sephadex G- 25 de la fracción ShG50F2/QAEF2/ G50F3/FractoF1	34
Figura 19. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 de la fracción ShG50F2/QAEF2/G50F5	34
Figura 20. Cromatografía Sephadex G- 25 de la fracción ShG50F2/QAEF2/ G50F5/FractoF1	35
Figura 21. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 de la fracción ShG50F2/QAEF3/G50F1	35
Figura 22. Cromatografía Sephadex G- 25 de la fracción ShG50F2/QAEF3/ G50F1/FractoF4	36
Figura 23. Cromatografía de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25 de la fracción ShG50F4	36
Figura 24. Cromatografía Sephadex G-50 de la fracción ShG50F4/QAEF1	37
Figura 25. Cromatografía Sephadex G-50 de la fracción ShG50F4/QAEF2	37
Figura 26. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 de la fracción ShG50F4/QAEF2/G50F2	38
Figura 27. Cromatografía Sephadex G-25 de la fracción ShG50F4/QAEF2/ G50F2/FractoF2	38

Figura 28. Cromatografía en HPLC de la fracción con actividad citotóxica ShG50 F2/QAE F2/G50 F2/Fracto F1/G25 F2	39
Figura 29. Cromatografía en HPLC de la fracción con actividad citotóxica ShG50 F2/QAE F3/G50 F1/Fracto F4/G25 F1	39
Figura 30. Cromatografía en HPLC de la fracción con actividad neurotóxica ShG50 F2/QAE F1/G50 F2/Fractogel F3/G25 F2	40
Figura 31. Cromatografía en HPLC de la fracción con actividad neurotóxica ShG50 F2/QAE F1/G50 F1/Fractogel F1/G25 F1	40
Figura 32. Determinación de proteína del extracto crudo	41
Figura 33. Actividad antibacteriana del extracto crudo de <i>Stichodactyla helianthus</i> al 5% en la cepa de <i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	43
Figura 34. Actividad antibacteriana de la fracción pre-purificada de <i>S. helianthus</i> ShG50F2/QAEF2/G50F6/FractoF1/G25F3 al 1%	43
Figura 35. Actividad antibacteriana de la fracción pre-purificada de <i>S. helianthus</i> ShG50F2/QAEF2/G50F2/FractoF1/G25F2 al 1%	44
Figura 36. Actividad antibacteriana de la fracción pre-purificada de <i>S. helianthus</i> ShG50F2/QAEF1/G50F4/FractoF1/G25F3 al 5%	44
Figura 37. Branquias de un organismo control de <i>Oreochormis niloticus</i>	47
Figura 38. Hipertrofia en las branquias de <i>Oreochormis niloticus</i> provocada por las toxinas de <i>S. helianthus</i>	47
Figura 39. Hiperplasia en branquias de <i>Oreochormis niloticus</i> causada por el efecto citotóxico de las toxinas de <i>S. helianthus</i>	48
Figura 40. Telangiectasis en branquias de <i>Oreochormis niloticus</i> provocada por las toxinas de <i>S. helianthus</i>	48

Figura 41. Bazo de un organismo control de <i>Oreochormis niloticus</i>	49
Figura 42. Incremento de los centros melanomacrófagos en el bazo de <i>Oreochormis niloticus</i> , a causa de las toxinas de <i>S. helianthus</i>	49
Figura 43. Hígado de un organismo control de <i>Oreochormis niloticus</i>	50
Figura 44. Hiperemia en hígado de <i>Oreochormis niloticus</i> causado por las toxinas de <i>S. helianthus</i>	50
Figura 45. Vacuolación en hígado de <i>Oreochormis niloticus</i> , a causa de las toxinas de <i>S. helianthus</i>	51
Figura 46. Actividad hemolítica de las toxinas de <i>Stichodactyla helianthus</i>	56
A) Eritrocitos de rata	
B) Eritrocitos humanos	
Figura 47. Peroxidación lípidica causada por las toxinas de <i>S. helianthus</i>	58
A) Eritrocitos de rata	
B) Eritrocitos humanos	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones del HPLC para purificación de proteínas del extracto crudo de <i>S. helianthus</i>	22
Tabla 2. Determinación de proteína del extracto crudo	41
Tabla 3. Actividad antibacteriana del extracto crudo de <i>S. helianthus</i> a diferentes concentraciones porcentuales	42
Tabla 4. Actividad antibacteriana de las fracciones pre-purificadas al 1% y5% ...	42
Tabla 5. Mortalidad en peces de la especie <i>Oreochormis niloticus</i> causada por la inyección vía intraperitoneal (i. p.) del extracto crudo de <i>S. helianthus</i>	46
Tabla 6. Daño causado por el extracto crudo de <i>S. helianthus</i> en peces de la especie <i>Oreochromis niloticus</i>	52
Tabla 7. Daños causados por las fracciones pre-purificadas de <i>S. helianthus</i> en peces de la especie <i>Oreochromis niloticus</i>	53
Tabla 8. Extracto crudo y fracciones pre-purificadas con actividad neurotóxica en cangrejos de la especie <i>Ocypode quadrata</i>	55

INTRODUCCIÓN

El arrecife coralino es un ecosistema donde las interacciones entre los organismos resulta compleja; debido a esto, muchas especies han desarrollado a lo largo de su vida evolutiva mecanismos de defensa, siendo unos de ellos la producción de compuestos bioactivos para hacer frente a un medio competitivo por los recursos; dichos mecanismos son generalmente metabolitos secundarios que poseen características interesantes desde el punto de vista farmacológico (Garateix *et. al.*, 2003; Sobrino, 1996). Los metabolitos secundarios actúan como mensajeros químicos de acción selectiva sobre los receptores bioquímicos de los seres vivos (Braekman y Daloz, 1983); son poderosas mezclas de sustancias químicas, las cuales son capaces de afectar procesos vitales, tales como la transmisión neuromuscular, la circulación sanguínea, y la permeabilidad de las membranas, entre otros. La toxicidad de estos compuestos con actividad biológica es debida a que actúan particularmente sobre un tejido, células o receptores; poseen además una gran diversidad estructural y pueden ser absorbidos y metabolizados; por lo tanto estas toxinas obtenidas de los organismos marinos son drogas ideales por su alta selectividad sin dañar otros órganos y/o tejidos (Mebs, 2002; Garateix, 2005; Castañeda-Pasarón, 2000).

Un medicamento debe tener estas mismas propiedades (alta selectividad, poder ser absorbidos y metabolizados), por lo que los metabolitos secundarios, y en general las toxinas, constituyen una fuente importante de nuevos medicamentos. Actualmente, la industria farmacéutica destina gran cantidad de recursos humanos y financieros para la búsqueda de estos nuevos productos naturales (Garateix, 2005; Sobrino, 1996).

Las investigaciones sobre los productos naturales orgánicos de origen marino se iniciaron en los años 40's y 50's. Estos compuestos han sido aislados de diferentes phyla como protozoarios, esponjas, anélidos, artrópodos, moluscos, equinodermos y cordados. Sin embargo, uno de los phyla que ha llamado la atención de los investigadores y en donde se han desarrollado diversos estudios es el Cnidaria

(Southcott, 1979), debido, entre otras cosas, a que se ha encontrado que más de 32 especies de anémonas producen péptidos citolíticos (Anderluh y Maček, 2002).

El Phylum Cnidaria posee cerca de 9,000 especies (Morris y Baslow, 1969) e incluye a las medusas, anémonas, corales y a las hidras de agua dulce. Los cnidarios (Apéndice I) son importantes además desde el punto de vista médico, dado que varias especies son consideradas altamente tóxicas (Halstead, 1978), ocasionando problemas de salud pública en varias partes del mundo. Sin embargo, aun cuando algunas de las toxinas de estos cnidarios se encuentran entre los venenos más potentes hasta ahora conocidos, el conocimiento sobre sus efectos es aún limitado.

Una característica que distingue a este importante grupo de invertebrados es la presencia de los cnidocistos, considerados como los productos de secreción más complejos que se conocen en el reino animal. Los cnidocistos (Apéndice III) agrupan tres categorías de orgánulos capsulares: los nematocistos, los espirocistos y los picocistos (Williamson *et al.*, 1996). Los nematocistos están constituidos por una cápsula generalmente esférica de pared doble que contiene polipéptidos tóxicos y un filamento hueco, enrollado en espiral y ornamentado con espinas que varían en estructura y función (Fig. 1). La función principal de los nematocistos es la captura de las presas y la defensa de los depredadores, de ahí su potente efecto citolítico, neurotóxico y hemolítico, entre otros. Hasta el momento se han descrito 25 tipos diferentes de nematocistos (Mariscal, 1974; Kass-Simon y Scappaticci, 2002) (Fig. 2).

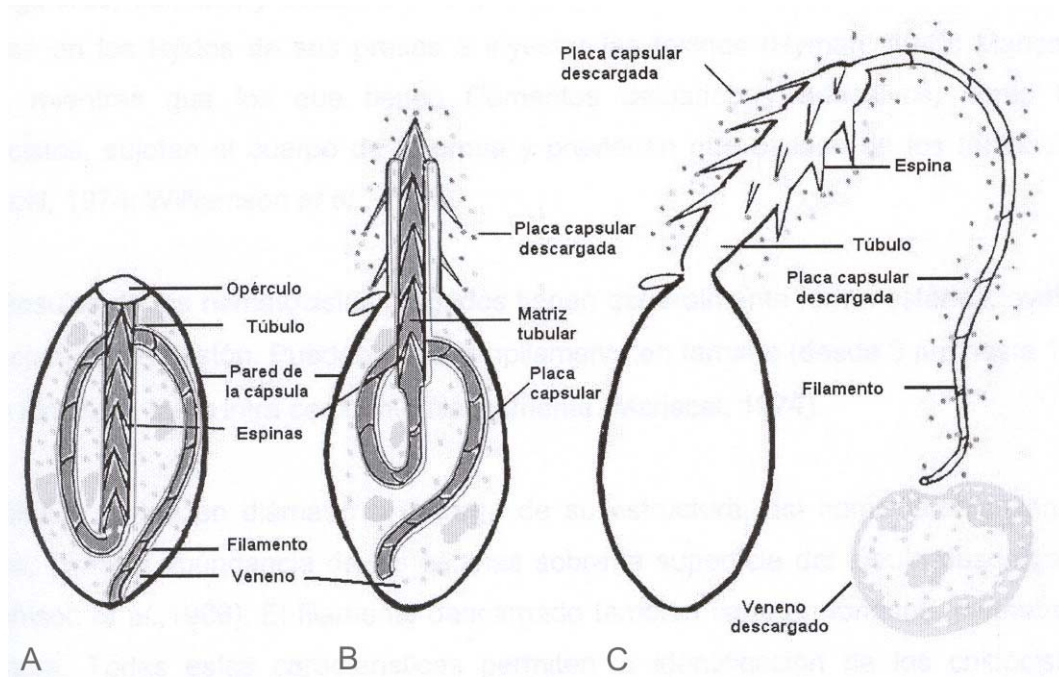


Figura 1. Estructura de un nematocisto cargado (A), parcialmente descargado (B) y completamente descargado (C). (Tomado de Williamson et al., 1996).

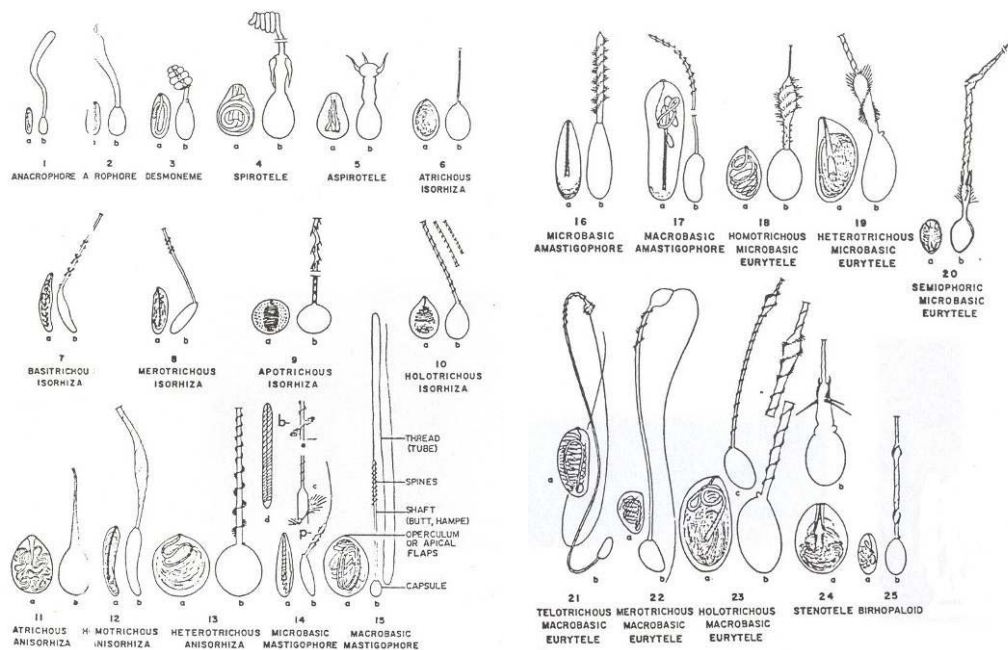


Figura 2. Diferentes tipos de nematocistos descritos por Mariscal, 1974.

Los espirocistos presentan una cápsula delgada de una sola membrana, no son venenosos ni penetrantes, presentan un filamento enrollado espiralmente sin espinas y de diámetro uniforme, su función es solamente adhesiva (Fig. 3). Los picocistos no son penetrantes y presentan cápsulas alargadas, sus filamentos carecen de espinas y su función es adhesiva para construir el tubo protector en el que viven algunas especies de anémonas, ambos tipos de cnidocistos son exclusivos de la clase anthozoa.

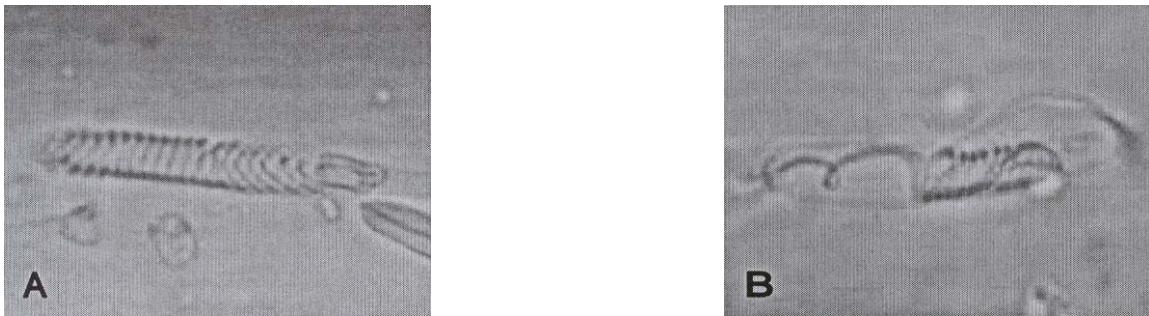


Figura 3. (A) Espirocisto cargado, puede observarse el túbulo enrollado (1200x). (B) Espirocisto parcialmente descargado (1200x). (Tomado de Zugasti, 2001).

En los extractos de tejido de cnidarios se han encontrado diferentes toxinas peptídicas que exhiben actividad en varios sistemas biológicos probados; entre éstas se encuentran fosfolipasas, citolisinas y una variedad de toxinas capaces de unirse a proteínas de membranas que conforman los canales iónicos en membranas excitables (Garateix *et. al.*, 2003).

En varias especies de anémonas se han aislado y caracterizado cuatro clases diferentes de polipéptidos con actividad citolítica. Esta caracterización se basó tomando en cuenta el peso molecular, dividiéndose en a) péptidos de 5-8 kDa con actividad antihistamínica, b) proteínas formadoras de poros de ~20 kDa, c) citolisinas con o sin actividad fosfolipasa A₂ de ~30 a 40 kDa y d) citolisinas de 80 kDa (Anderluh y Maček, 2002). Los polipéptidos que comprenden alrededor de ~20 kDa se conocen como Actinoporinas debido al orden *Actinaria* al que pertenecen (Mancheño *et al.*, 2001). Existe otra clasificación basada en el modo

de acción de los polipéptidos aislados de estos cnidarios, y se dividen en a) neurotoxinas que interactúan con los canales iónicos, b) citolisinas que dañan las membranas para formar poros o canales (Kem, 1988, citado en Samejima *et al.*, 2000). Las citolisinas son polipéptidos solubles en agua y tienen la propiedad de insertarse y acomodarse espontáneamente dentro de la membrana debido a su afinidad por los fosfolípidos membranales (Bernheimer y Avigad, 1976). Con base en su capacidad lítica y en la posibilidad de fijarse a un tejido específico, las citolisinas se han evaluado como posibles agentes antitumorales (Ávila *et al.*, 1998 y Pederzoli *et al.*, 1995, citados en Lanio *et al.*, 2001), también tienen propiedades cardioestimuladoras y anticoagulantes (Cline *et al.*, 1995 y Díaz *et al.*, 1992, citados en Lanio *et al.*, 2001). La producción de citolisinas en una anémona no excluye la coexistencia de neurotoxinas que afectan los canales de sodio y potasio (Kem *et al.*, 1989; Anderluh y Maček, 2002).

Stichodactyla helianthus (Apéndice II) es una anémona común en el Caribe que se distribuye, desde el sur de Florida hasta el norte de Panamá. Sus tentáculos son cortos con las puntas redondeadas formando una densa cubierta sobre el disco (Friese, 1993). Habitan zonas someras del arrecife, agrupándose en tapetes densos (Humann y Deloach, 2002). Existen dos tipos o variedades, las cuales difieren en el color de sus tentáculos que pueden ser de tonalidad café o verde (Dunn, 1981, citado en Martínez *et al.*, 2002a).

Los estudios realizados sobre las toxinas de *Stichodactyla helianthus* son numerosos, la mayoría de ellos enfocados principalmente a la citolisinas. En 1974, Devlin (citado en Álvarez *et al.*, 1998) fue el primero en observar en *S. helianthus* la presencia de un polipéptido básico de una sola cadena con peso molecular de 20 kDa, causante de la lisis de eritrocitos. Kem y Dunn (1998 citado en Martínez *et al.*, 2002a) realizaron la primera descripción de una potente proteína hemolítica llamada citolisina III usando eritrocitos de diversos organismos animales y observaron la interacción de la proteína presente en el veneno de *S. helianthus* con la esfingomielina (fosfolípido contenido en las membranas celulares), para la formación de poros, originando un desequilibrio coloido-osmótico debido a la

entrada de agua al interior de la célula, provocando generalmente la muerte celular (Mancheño *et al.*, 2001; Berheimer y Avigad, 1976).

Tomando como referencia estos estudios, se aislaron y purificaron dos citolisinas de *S. helianthus* a las que denominaron Sticholisina I y II, las cuales fueron también caracterizadas para determinar su estructura primaria y su actividad hemolítica. La comparación entre las propiedades de estas dos isotoxinas demostró que no tienen la misma identidad molecular, pero su secuencia homóloga indica que corresponden a isoformas de la misma hemolisina y la principal diferencia entre estas isoformas es la alta actividad de St II en lisar eritrocitos (Álvarez *et al.*, 1998; Lanio *et al.*, 2001; Huerta *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2001).

Álvarez *et al.* (1998) observaron que al incrementar la fuerza iónica en el medio donde se realiza el ensayo hemolítico de la Sticholisina I aumenta la actividad de esta Sticholisina. Asimismo, se ha observado que un incremento en la concentración de sales (NaCl) en la preincubación produce un notable aumento en la actividad hemolítica de esta toxina. Para esta misma Sticholisina se ha demostrado un efecto dependiente entre el aumento en la concentración de lípidos y la capacidad de la toxina para formar poros (Tejuca *et al.*, 1996)

Dado que la actividad de las toxinas, depende de la capacidad de asociación y organización de sus proteínas en las membranas, se realizaron estudios para observar si la actividad hemolítica de la Sticholisina II es sensible a la modificación de los radicales libres, observando que dicha actividad se reduce notablemente al aumentar los radicales libres que afectan principalmente a un solo aminoácido, el triptofano. Un pH ≥ 10 también puede llegar a afectar la capacidad de la toxina para formar poros en las membranas de las células rojas, además se ha demostrado que ambas sticholisinas pueden inducir la agregación plaquetaria en el plasma (Pazos *et al.*, 1998; Álvarez *et al.*, 2001; Díaz *et al.* 1999).

Debido a la existencia de variedades de *Stichodactyla helianthus* se realizó una comparación de las citolisinas purificadas en dos variedades de esta anémona (verde y café), encontrándose que ambas presentan la misma composición de

Evaluación de la actividad biológicas de las toxinas de la anémona *Stichodactyla helianthus* aminoácidos (Martínez *et al.*, 2002a). Posteriormente, se llevó a cabo una comparación en la capacidad de formación de poros en las membranas, entre la Sticholisina II y una variante recombinante, observando que la St II es inhibida por anticuerpos policlonales usados como inhibidores de la hemólisis ocasionada por la St II (Pazos *et al.*, 2003; Pico *et al.*, 2004).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar y caracterizar los compuestos bioactivos de la anémona *Stichodactyla helianthus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la toxicidad del extracto crudo mediante pruebas hemolíticas en eritrocitos de rata y humano.
- Evaluar la posible participación del estrés oxidativo en el patrón de daño celular inducido por el extracto crudo sobre eritrocitos de rata y humano.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos crudos y pre-purificados en la cepa de *Aeromonas hydrophila*.
- Evaluar la actividad neurotóxica de los extractos crudos y pre-purificados en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*.
- Determinar la Dosis Letal Media en peces de la especie *Oreochromis niloticus* y evaluar el daño a nivel histológico ocasionado por las toxinas.
- Evaluar el grado de pureza de los compuestos pre-purificados que presentan actividad antibacteriana, citotóxica y neurotóxica mediante cromatografía de líquidos (HPLC).

JUSTIFICACIÓN

Aunque el veneno de *Stichodactyla helianthus* ha sido objeto de numerosos estudios por su alta actividad hemolítica, los estudios para evaluar sus toxinas como agentes antibacterianos, citotóxicos y neurotóxicos, son escasos.

HIPÓTESIS

El veneno de *Stichodactyla helianthus* contiene metabolitos bioactivos, con actividad hemolítica, por lo que se espera que presente compuestos con actividad en otros modelos biológicos.

METODOLOGÍA

ÁREA DE RECOLECTA DE *Stichodactyla helianthus*

Actividades de campo

La recolección de los ejemplares de *S. helianthus* se llevó a cabo mediante buceo SCUBA en la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, Q. Roo en marzo y abril de 2005 y marzo de 2006. Una vez recolectados los ejemplares se colocaron en bolsas de plástico para su traslado al laboratorio.

La Laguna Arrecifal de Puerto Morelos se encuentra ubicada en la porción nororiental de la Península de Yucatán entre los 20° 52' N y los 86°51' O, en el estado de Quintana Roo (Ruiz-Rentería *et al.*, 1998). La laguna abarca la barrera coralina y la línea de costa con una extensión aproximada de 7 km y una amplitud entre 350 y 1600 m; presenta una profundidad variable de entre 1 y 8 m, teniendo en promedio 3 m (Merino y Otero, 1991) (Fig. 4).

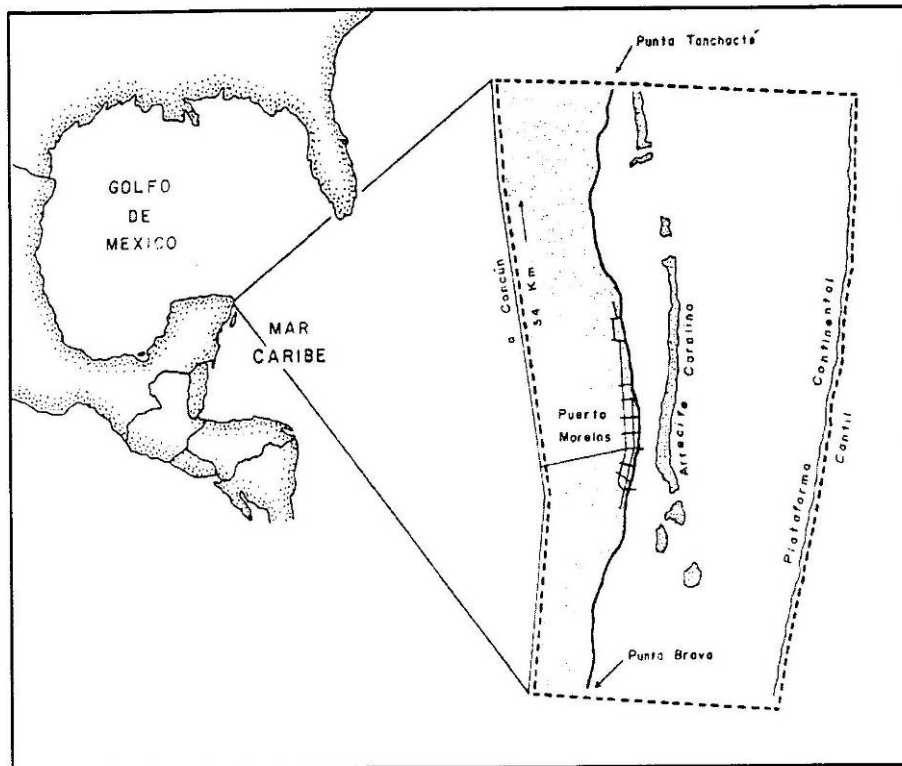


Figura 4. Área de recolecta de *Stichodactyla helianthus* (tomado de Merino y Otero, 1991).

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

Actividades de laboratorio

En el laboratorio los ejemplares de *S. helianthus* se congelaron a -60°C .

- Descarga de los nematocistos mediante cambios osmóticos y térmicos.

Con el objeto de aislar y descargar la mayoría de los nematocistos -en los cuales están contenidas las toxinas-, se empleó el método modificado de Kem *et al.* (1989). Doce ejemplares se colocaron en 500 mL de agua desionizada para descongelarlos, se agitaron con una espátula por un tiempo aproximado de treinta minutos hasta su total descongelación. Posteriormente, las anémonas se volvieron a congelar a -60°C durante treinta minutos. Este procedimiento se repitió 2 veces más. Una vez realizado lo anterior se tomó una muestra del extracto para observarla al microscopio y comprobar que la mayoría de los nematocistos, estuviesen descargados.

El extracto crudo se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C , en una centrífuga Eppendorf 5810R, se separó el sobrenadante del precipitado utilizando tubos de plástico previamente marcados, el sobrenadante se congeló a -60°C para su posterior empleo.

- Concentración del extracto crudo

El extracto crudo obtenido de *S. helianthus* se liofilizó en un aparato Freeze Drying Model 77500 (LABCONCO) a una temperatura de -45°C con el fin de preservar las muestras para su uso posterior. Se obtuvo un total de 29.45 g de extracto crudo.

PURIFICACIÓN PARCIAL DEL EXTRACTO CRUDO

Para la purificación de los compuestos de interés se emplearon los siguientes medios cromatográficos: Sephadex G-50 medio y Sephadex G-25 fino (Pharmacia Biotech) (Filtración en gel, basada en pesos moleculares), así como para desalinizar las muestras (Gel filtration, 2000). En la cromatografía de intercambio iónico (aniónico y catiónico), se emplearon las matrices: QAE Sephadex A-25 (Pharmacia Biotech) y Fractogel EMD SO_3^- 650 M (Merck). Durante el proceso de purificación sólo se realizó el bioensayo de actividad neurotóxica, debido al fácil acceso a los organismos y a la rápida obtención de resultados, una vez pre-purificadas las fracciones, se realizaron los bioensayos de actividad neurotóxica, antibacteriana y citotóxica.

1.- Sephadex G-50

El extracto crudo fue agregado a la columna (66 x 5.2 cm) de filtración en gel Sephadex G-50, eluída con ácido acético 0.7 M con un flujo constante de 3.5 mL/min, recolectándose 16 mL por tubo. Las fracciones obtenidas fueron concentradas al vacío y liofilizadas.

2.- Cromatografía de Intercambio aniónico QAE Sephadex A-25

En esta cromatografía (columna 33 x 1.6 cm), de las fracciones activas del paso anterior, se empleó un gradiente escalonado de acetato de amonio de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M pH 8.4. Las fracciones se recolectaron a un flujo constante de 1.5 mL/min y de 16 mL por tubo. Las fracciones obtenidas fueron concentradas al vacío y liofilizadas.

3.- Sephadex G-50

Las fracciones activas obtenidas de la cromatografía anterior correspondientes al gradiente molar de 0.01, 0.05 y 0.1 M, se agregaron a una columna de filtración Sephadex G-50 (71 x 2.4 cm), eluída con ácido acético 0.3 M. Las fracciones obtenidas fueron recolectadas a un flujo constante de 3.5 mL/min y un volumen de 16 mL por tubo, se concentraron y liofilizaron.

4.-Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO₃⁻ 650 M

Las fracciones activas obtenidas de la cromatografía anterior se pasaron por una columna Fractogel EMD SO₃⁻ 650 M eluída con un gradiente escalonado de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M de acetato de amonio pH 5.4. Las fracciones se recolectaron 16 mL por tubo a un flujo de 2.5 mL/min, se concentraron y liofilizaron.

5.- Sephadex G-25

Las fracciones con actividad se colocaron en una columna Sephadex G-25 fino para desalar a un flujo constante de 3.5 mL/min y un volumen de 16 mL por tubo, posteriormente se concentraron y liofilizaron.

Estas cromatografías se llevaron a cabo para todas las fracciones con actividad neurotóxica y se utilizó un equipo Pharmacia Biotech, con detector UV a 280 nm y un detector de conductividad modelo Rec 102.

Como parte final de la purificación se llevó a cabo la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de las fracciones parcialmente purificadas, utilizando Las soluciones A (composición; 0.1% (v/v) TFA en agua) y B (composición; 0.1% (v/v) TFA en acetonitrilo), y un gradiente lineal de 90% Sol. A/10% Sol B durante 1 minuto, para finalizar con 20% Sol. A/80% Sol. B en el minuto 60. El flujo fue de 1 mL/min. La longitud de onda utilizada para la detección fue de 280 nm (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones del HPLC para purificación de proteínas del extracto crudo de *S. helianthus*.

Tiempo (min)	Agua (%)	CH ₃ CN (%)	Flujo (mL/min)
0	90	10	1
1	90	10	1
60	20	80	1
75	90	10	1

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Mediante el método de Bradford (1976) se cuantificó la cantidad de proteína presente en el extracto crudo liofilizado, así como en las fracciones parcialmente purificadas, utilizando como estándar gamma globulina bovina (GGB) de la marca Bio –Rad.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se prepararon las cajas de Petri (100 x 15 mm) con Agar Muller-Hinton. Se utilizaron cultivos de *Aeromona hydrophila* (ATCC 49140) y el inóculo bacteriano se ajustó a 0.5 del Nefelómetro de MacFarland. La concentración del extracto crudo fue al 1, 3 y 5% (0.01, 0.03 y 0.05 g/ml) el cual fue filtrado previamente con filtros comerciales de 20 micrómetros de abertura de malla. También se probaron las fracciones pre-purificadas al 1 y 5%. Para el control positivo se utilizó una concentración de Amikacina de 300 µg/mL de una solución stock de 50 mg/mL y para el control negativo se utilizó agua desionizada. El extracto crudo y las fracciones pre-purificadas se diluyeron con agua desionizada, se aplicó un volumen de 100 µL y se incubaron a 36°C durante 24 horas, después de este tiempo se midió el halo de inhibición con una regla.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA

- Extracto crudo

Este bioensayo se llevó a cabo en el laboratorio de Patología Acuática del CINVESTAV-Unidad Mérida. Se utilizaron peces de la especie *Oreochromis niloticus* con un peso de entre 180 y 200 gramos. Con la finalidad de aclimatar a los organismos para su uso y evitar muertes por causas ajenas al experimento, se colocaron 2 ejemplares por estanque de 120 litros de capacidad y con aireación continua por dos días previos al experimento. Se emplearon cuatro dosis de extracto crudo (50, 25, 12.5 y 6.25 mg peso seco/kg). El experimento se realizó por

triplicado (en total 6 organismos para cada dosis) y se utilizaron dos individuos como control a los que se les inyectó agua destilada, también por triplicado. La inyección fue vía intraperitoneal (i. p.) con una alícuota de 1 mL de cada una de las dosis. Se registró el tiempo de supervivencia en un intervalo de 12 horas, así como el peso y las medidas de cada individuo.

- Fracciones pre-purificadas

Para todas las fracciones parcialmente purificadas se utilizó una sola dosis de 1 mg peso seco/mL, para cada una de dichas fracciones se inyectó una alícuota de 1 mL a dos organismos i. p., se registró el tiempo de supervivencia en un intervalo de 12 horas, así como el peso y las medidas de cada individuo.

La Dosis Letal media (DL₅₀), que indica la cantidad mínima de extracto crudo que mata al 50% de los individuos experimentales se obtuvo usando el método de Lehmann (1980) y tomando en cuenta a los organismos que murieron en un intervalo de 12 horas.

Los organismos de ambos bioensayos que sobrevivieron a las 24 horas que duró el experimento fueron sacrificados para realizar los cortes histológicos.

Con el propósito de evaluar el daño celular causado en los peces por la toxina de *S. helianthus*, se realizaron cortes histológicos de branquias, hígado, bazo y cerebro en cada uno de los individuos que murieron en el intervalo de monitoreo de 12 horas y los que sobrevivieron las 24 horas que duró el estudio. Los organismos que murieron después de las 12 horas de monitoreo fueron descartados debido a la rápida necrosis de los tejidos. Los órganos se colocaron en frascos debidamente etiquetados con formol tamponado para su fijación y se dejaron durante 48 horas. En seguida se colocaron las muestras en el Histokinet Reichert-Jung durante 24 horas para la deshidratación de los tejidos. Pasado este tiempo se procedió a la inclusión de las muestras en parafina, para su posterior corte en el microtomo Leitz Wetzlar 1512; una vez colocados los cortes en los portaobjetos se guardaron en la estufa para la eliminación del exceso de

Evaluación de la actividad biológicas de las toxinas de la anémona *Stichodactyla helianthus*

parafina. Posteriormente, se llevó a cabo la técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina (Apéndice IV); para el montaje de la placa se utilizó Bálsamo de Canadá. Las muestras fueron analizadas al microscopio.

ACTIVIDAD NEUROTÓXICA

Para probar el extracto crudo y 25 fracciones pre-purificadas se recolectaron 26 cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* con un peso de entre 10 y 20 gramos. Para cada muestra se inyectó una alícuota de 0.1 mL de una concentración de 1 mg peso seco /mL a un cangrejo con el objeto de determinar las fracciones con actividad neurotóxica. Nueve de las fracciones prepurificadas presentaron actividad neurotóxica. Posteriormente, se recolectaron 40 cangrejos, utilizando 4 organismos para el extracto crudo y 4 para cada una de las fracciones pre-purificadas que presentaron actividad, de igual manera se inyectó una alícuota de 0.1 mL de una concentración de 1 mg/mL.

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (ERITROCITOS DE HUMANO Y DE RATA)

Estos bioensayos se realizaron en el Laboratorio de Aminoácidos Excitadores del Instituto de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".

Para la prueba de actividad hemolítica, se utilizaron eritrocitos de ratas con un peso de entre 200 y 250 g las cuales fueron anestesiadas con éter. Posteriormente, se les realizó una punción cardíaca. De la sangre obtenida se agregaron 0.4 mL a tubos Eppendorf los cuales contenían 0.1 mL de heparina y 1.5 mL de Alsever (dextrosa 0.116 M, NaCl 0.071 M, citrato de sodio 0.027 M y ácido cítrico 0.002 M), se centrifugaron a 1500xg por 5 min. a 4°C. El sobrenadante se removió y el procedimiento se repitió 2 veces más, los "pellets" fueron resuspendidos en Alsever. Los eritrocitos fueron incubados a 37°C durante 30 min en un baño de incubación (incubation bath) Lab-Line Dubnoff en presencia de diversas

concentraciones del extracto crudo (0.16, 0.32, 0.48, 0.64 y 1 mg/mL). Posteriormente, se centrifugaron a 1200xg por 4 min a 4°C. Las muestras se leyeron en un espectrómetro UV/Visible ThermoSpectronic Genesys a 415 nm. Los eritrocitos humanos se obtuvieron de donantes sanos del laboratorio de Aminoácidos excitadores del Instituto de Neurología y Neurociencia y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente.

El bioensayo de peroxidación lipídica se realizó con base en el método descrito por Ríos y Santamaría (1991). A alícuotas de 250 µL de ambos tipos de eritrocitos previamente incubados (como se describe arriba y con las mismas concentraciones de extracto crudo) se les adicionó 1.5 mL de reactivo de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0.375g TBA + 15 g ácido tricloroacético + 2.5 mL HCl aforado a un L), se calentaron a baño de ebullición durante 30 min y se centrifugaron a 3000xg por 15 min. La lectura del sobrenadante se realizó a 532 nm. Como control positivo se utilizó FeSO₄ 50 µM

Para el análisis estadístico de los ensayos de hemólisis y peroxidación de lípidos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey y una prueba múltiple de comparación por el método de Dunn's (Statistical software Sigma Stat, version 2.0).

RESULTADOS

PURIFICACIÓN PARCIAL DEL EXTRACTO CRUDO

El extracto crudo (29.45 g) de *S. helianthus* se pasó a través de una columna de Sephadex G-50 M, eluída con ácido acético 0.7 M. Las fracciones de 16 mL recolectadas se agruparon en 10 fracciones (Fig. 5).

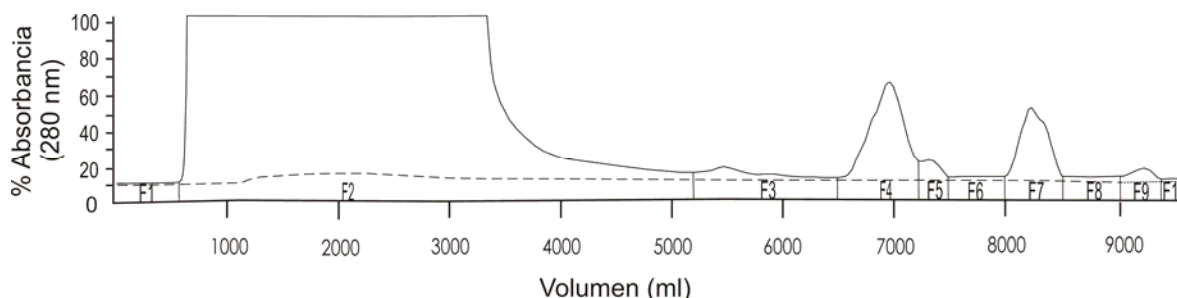


Figura 5. Cromatografía de filtración en Gel Sephadex G-50 M del extracto crudo de *S. helianthus*.

Se continuó la purificación de las fracciones activas (Fr. 2 y Fr. 4), para ello se pasaron por una columna de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25, para la fracción 2 se obtuvieron 7 fracciones (Fig. 6). La fracciones 1, 2 y 3 (**ShG50F2/QAEF1**, **ShG50F2/QAEF2** y **ShG50F2/QAEF3**) resultantes de esta cromatografía presentaron actividad neurotóxica en cangrejos de la especie *O. quadrata*.

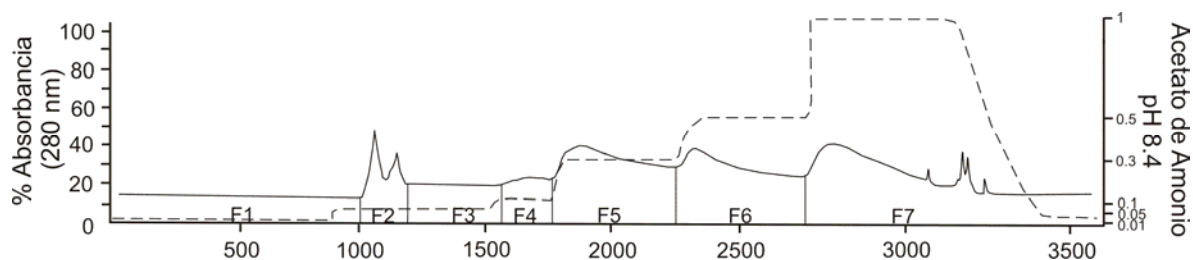


Figura 6. Cromatografía de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25 de la fracción **ShG50F2** de Sephadex G-50 M.

Las fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico se pasaron a una columna Sephadex G-50 para desalinizarlas, de la fracción **ShG50/QAEF1** se obtuvieron 4 fracciones (Fig. 7), para la fracción **ShG50F2/QAEF2** se obtuvieron 6 fracciones (fig. 8) y para la fracción **ShG50F2/QAEF3** fueron 3 fracciones obtenidas , sólo la fracción 1 tuvo actividad (Fig. 9).

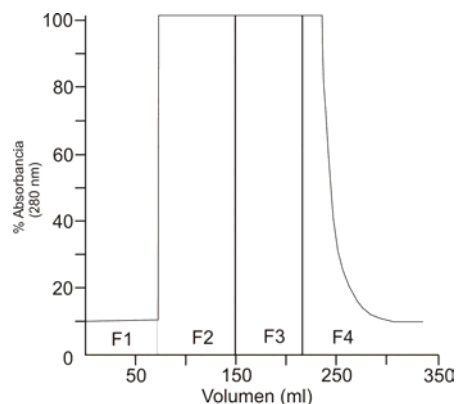


Figura 7. Cromatografía Sephadex G-50 de la fracción **ShG50F2/QAEF1**

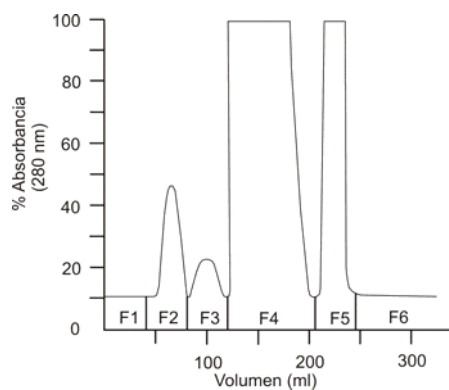


Figura 8. Figura 8. Cromatografía Sephadex G-50 de la fracción **ShG50F2/QAEF2**

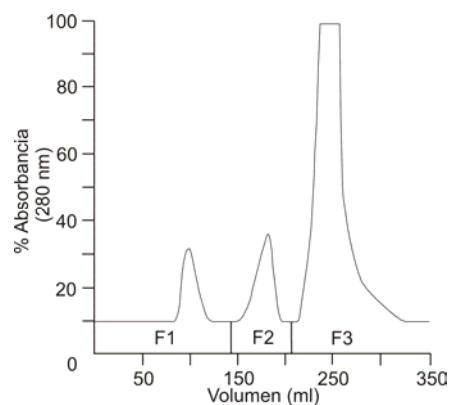


Figura 9. Cromatografía Sephadex G-50 de la fracción **ShG50F2/QAEF3**.

De las 4 fracciones obtenidas de la cromatografía Sephadex G-50 de la fracción **ShG50F2/QAEF1** sólo las fracciones 1, 2 y 4 se pasaron por una columna cromatográfica de Fractogel EMD SO_3^- 650, resultando 4 fracciones de la fracción 1 sólo la fracción 1 de esta (**ShG50F2/QAEF1/G50F1/Fracto1/G25F1**) tuvo actividad neurotóxica, 5 fracciones de la fracción 2 (Fig. 10) y 3 de la fracción 4 (Fig. 11).

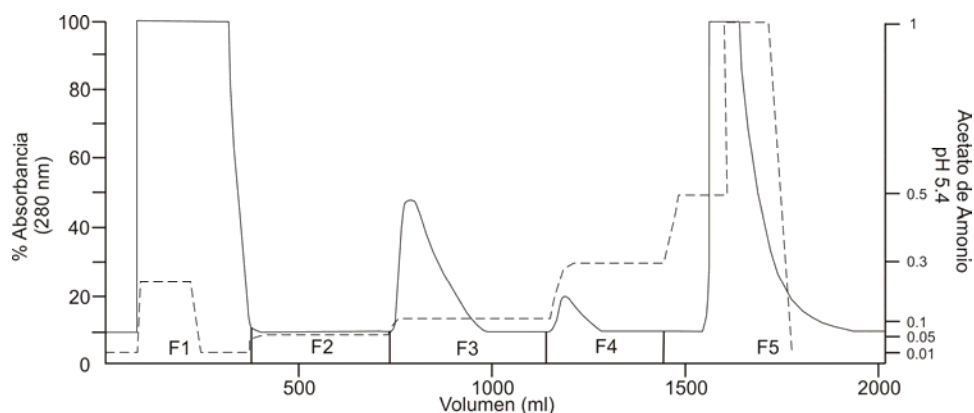


Figura 10. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650 de la fracción **ShG50F2/QAEF1/G50F2**.

Las fracciones 1, 2, 3, y 4 con actividad neurotóxica obtenidas de esta purificación se pasaron por una columna Sephadex G25 para desalar las muestras, obteniéndose como resultado final las fracciones **ShG50F2/QAEF1/G50F2/FractoF1/G25F2** y **ShG50F2/QAEF1/G50F2/FractoF1/G25F3**, para la fracción 1 de la cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650, para la fracción 2 se obtuvieron como fracciones finales

ShG50F2/QAEF1/G50F2/FractoF2/G25F1 y **ShG50F2/QAEF1/G50F2/FractoF2/G25F2**, para la fracción 3 de Fractogel se obtuvieron las siguientes fracciones finales **ShG50F2/QAEF1/G50F2/FractoF3/G25F2** y **ShG50F2/QAEF1/G50F2/FractoF3/G25F3**, y finalmente para la fracción 4 se obtuvo la fracción **ShG50F2/QAEF1/G50F2/FractoF4/G25F1**.

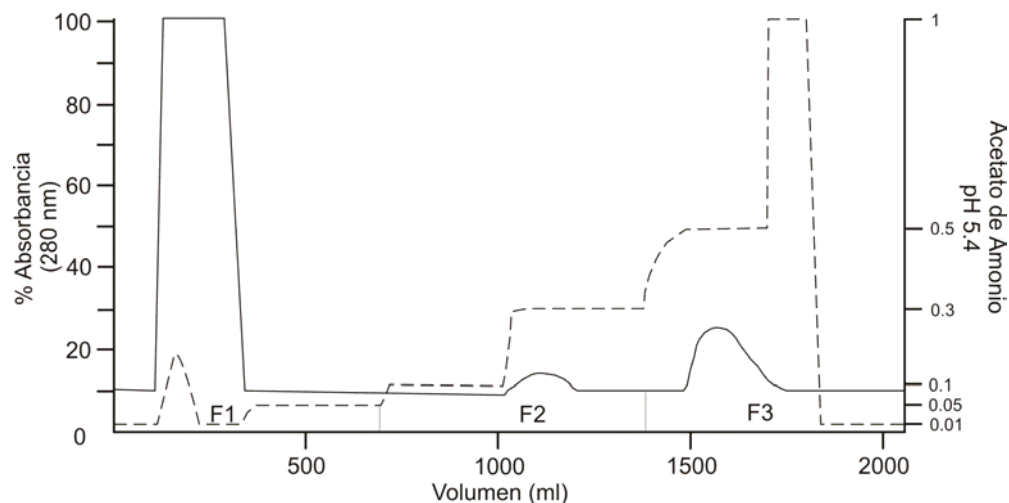


Figura 11. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650 de la fracción **ShG50F2/QAEF1/G50F4**.

Las fracciones 1 y 2 de la cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650 presentaron actividad neurotóxica y se pasaron por una columna de Sephadex G25 para desalar las muestra y como fracciones finales con actividad en diversos sistemas biológicos son **ShG50F2/QAEF1/G50F4/FractoF1/G25F2** y **ShG50F2/QAEF1/G50F4/FractoF1/G25F3** pertenecientes a la fracción 1 y de la fracción 2 se obtuvo **ShG50F2/QAEF1/G50F4/FractoF2/G25F2**.

Las fracciones **ShG50F2/QAEF2/G50F2**, **ShG50F2/QAEF2/G50F3** y **ShG50F2/QAEF2/G50F5** se pasaron por cromatografía de Fractogel EMD SO_3^- 650, resultando 5 fracciones de la fracción 2 obtenida en la cromatografía Sephadex G50 para desalar las muestras. Las fracciones 1, 2, 3 y 4 presentaron actividad neurotóxica (Fig. 12).

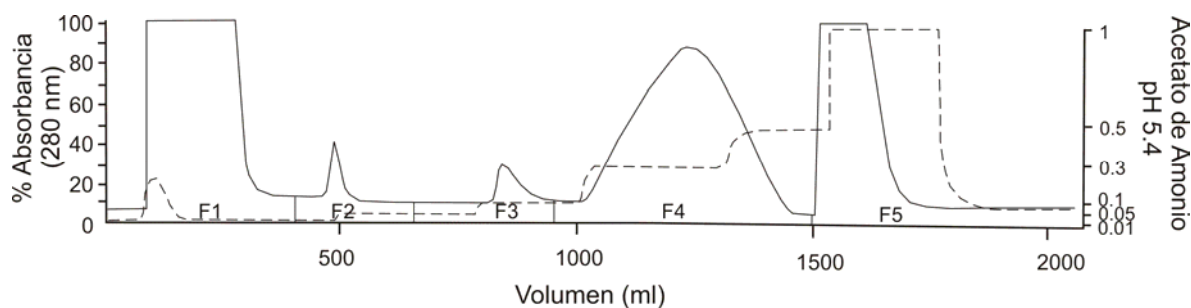


Figura 12. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650 de la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F2**.

Las fracciones **ShG50F2/QAEF2/G50F2/Fracto1**, **ShG50F2/QAEF2/G50F2/Fracto2**, **ShG50F2/QAEF2/G50F2/Fracto3** y **ShG50F2/QAEF2/G50F2/Fracto4** se pasaron por una cromatografía Sephadex G25 para desalar las muestras y tener las fracciones pre-purificadas (Figs. 13, 14, 15 y 16).

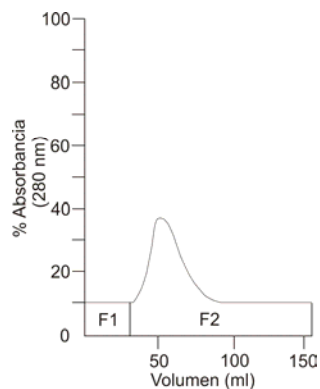


Figura 13. Cromatografía Sephadex G- 25 de la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F2/FractoF1**, como resultado final de este proceso de purificación se obtuvo la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F2/FractoF1/G25F2**

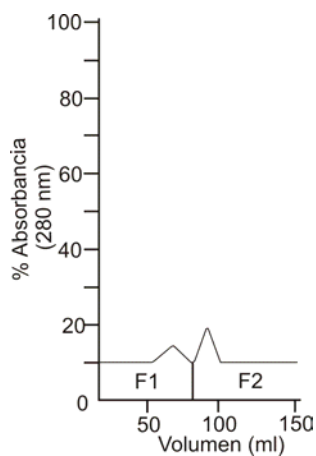


Figura 14. Cromatografía Sephadex G-25 de la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F2/FractoF2**, como resultado final de este proceso de purificación se obtuvo la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F2/FractoF2/G25F2**

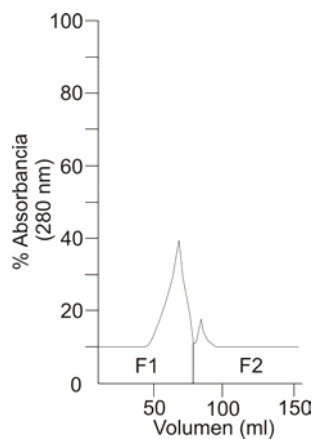


Figura 15. Cromatografía Sephadex G-25 de la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F2/FractoF3**, como resultado final de este proceso de purificación se obtuvo la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F2/FractoF3/G25F1**

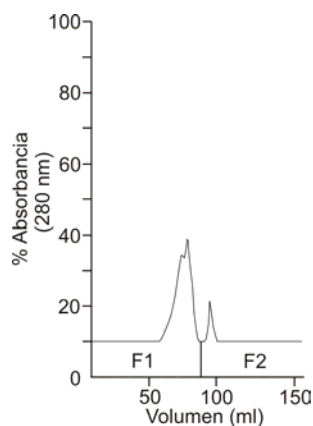


Figura 16. Cromatografía Sephadex G-25 de la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F2/FractoF4**, como resultado final de este proceso de purificación se obtuvo la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F2/FractoF4/G25F1**

La fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F3** se pasó por una columna de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650, sólo la fracción 1 presento actividad neurotóxica (Fig. 17)

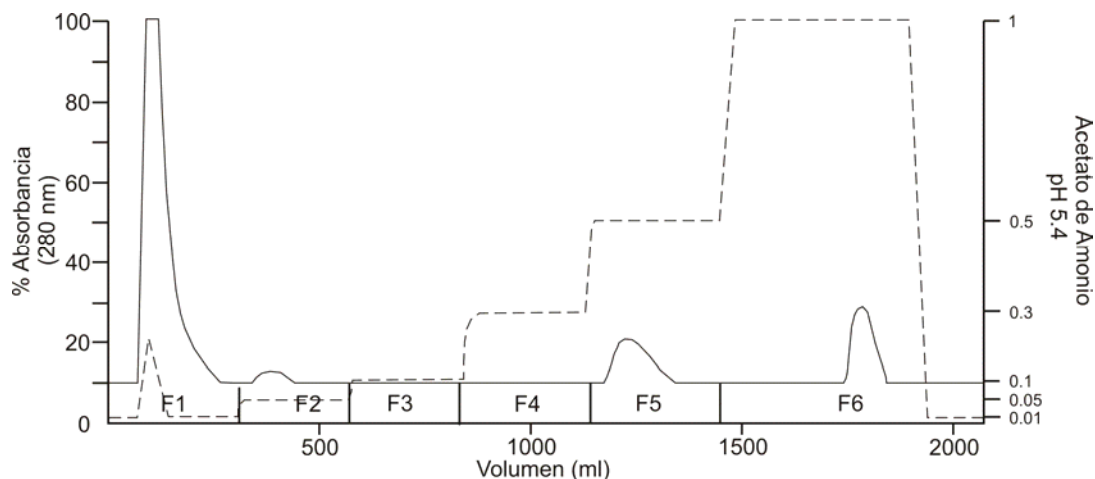


Figura 17. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650 de la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F3**.

Como paso final de esta purificación, la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F3/FractoF1** se pasó por una columna Sephadex G25 para desalar la muestra, obteniéndose como fracción final **ShG50F2/QAEF2/G50F3/FractoF1/G25F1** (Fig. 18).

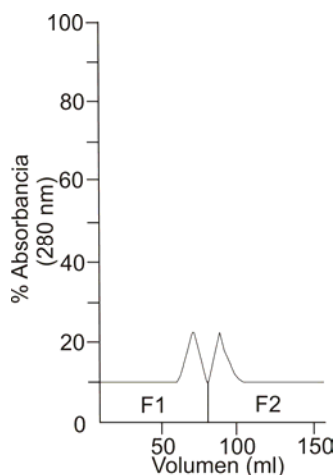


Figura 18. Cromatografía Sephadex G-25 de la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F3/FractoF1**.

La fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F5** se pasó por una cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650, se obtuvieron 5 fracciones, de las cuales sólo la fracción 1 presento actividad neurotóxica (Fig. 19).

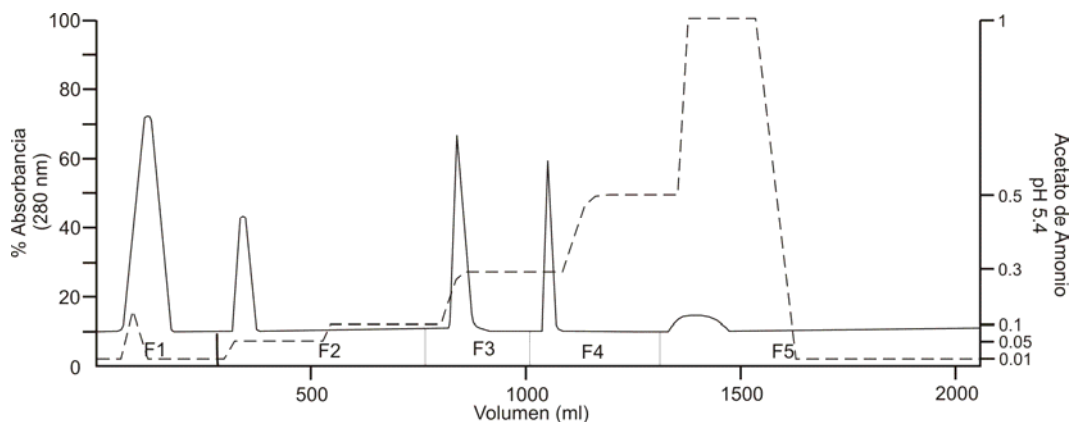


Figura 19. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650 de la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F5**.

La fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F5/FractoF1** como parte final se paso por una cromatografía Sephadex G25 para desalar la muestra, la fracción 3 presento actividad neurotóxica (Fig. 20), como resultado final de este proceso de purificación se obtuvo la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F5/FractoF1/G25F3**.

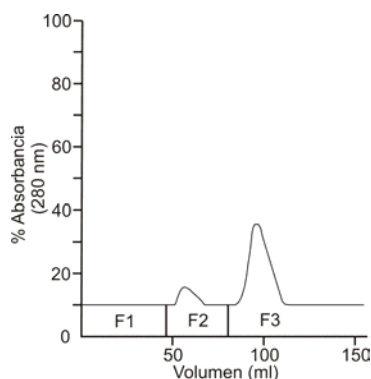


Figura 20. Cromatografía Sephadex G-25 de la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F5/FractoF1**.

La **ShG50F2/QAEF3/G50F1** obtenida de la cromatografía Sephadex G50 se paso por cromatografía de Fractogel EMD SO_3^- 650, dando por resultado 6 fracciones (Fig. 21).

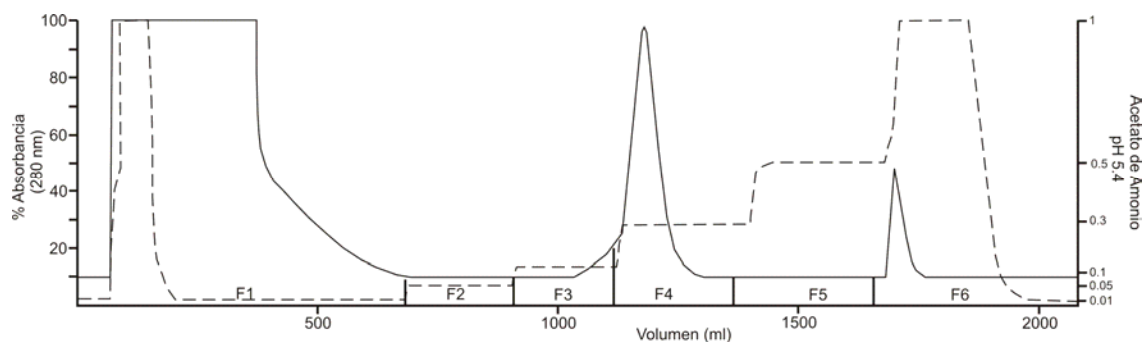


Figura 21. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650 de la fracción **ShG50F2/QAEF3/G50F1**.

Finalmente, la fracción **ShG50F2/QAEF3/G50F1/FractoF4** obtenida de la cromatografía Fractogel EMD SO_3^- 650 y se pasó por una columna Sephadex G-25 para desalar las muestras (Fig. 22), como resultado final de este proceso de purificación se obtuvo la fracción **ShG50F2/QAEF3/G50F1/FractoF4/G25F1**

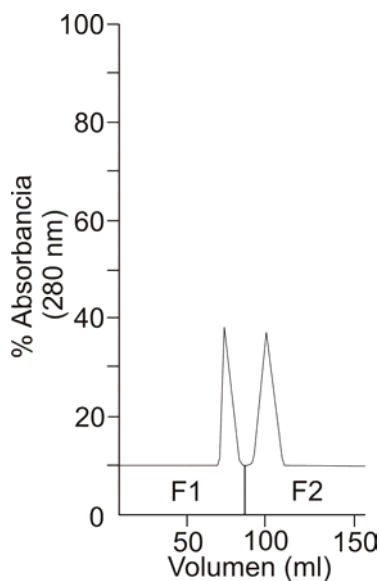


Figura 22. Cromatografía Sephadex G-25 de la fracción **ShG50F2/QAEF3/G50F1/FractoF4**.

La fracción 4 obtenida de la columna de filtración Sephadex G-50 M inicial, se pasó por una columna con un intercambiador aniónico QAE Sephadex A-25. Se obtuvieron 8 fracciones de las cuáles sólo las fracciones 1 y 2 presentaron actividad neurotóxica (Fig. 23), las cuales fueron concentradas al vacío para pasarlas por una columna Sephadex G-50 para desalarlas.

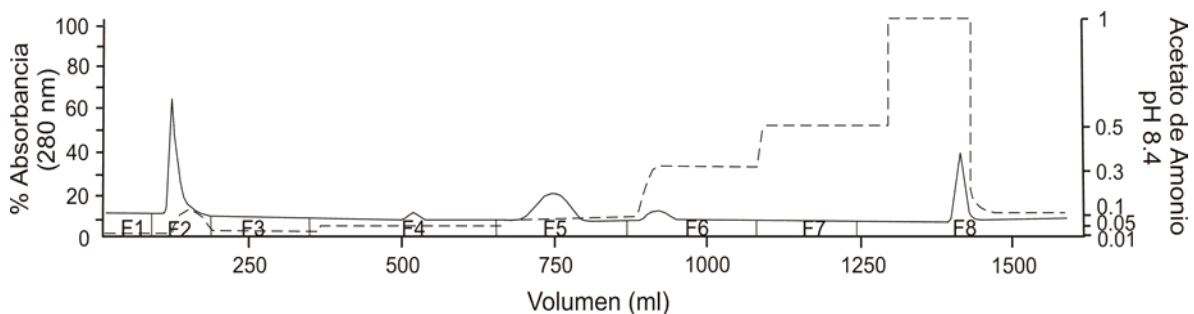


Figura 23. Cromatografía de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25 de la fracción **ShG50F4**.

Las fracciones 1 y 2 obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico se pasaron a una columna Sephadex G-50 para desalinizarlas, obteniéndose 4 fracciones de la fracción 1 (Fig. 24) y 4 fracciones de la fracción 2 (Fig. 25).

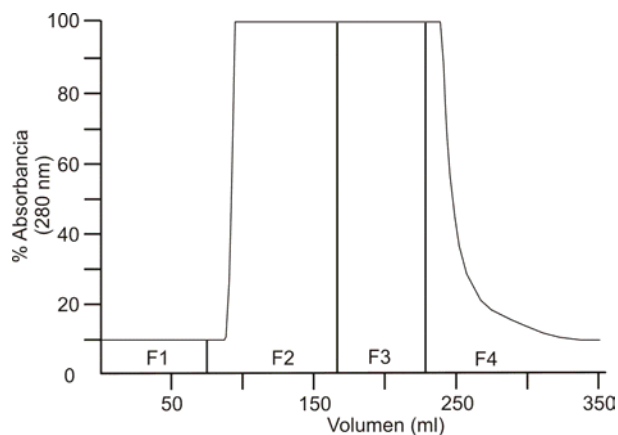


Figura 24. Cromatografía Sephadex G-50 de la fracción **ShG50F4/QAEF1**.

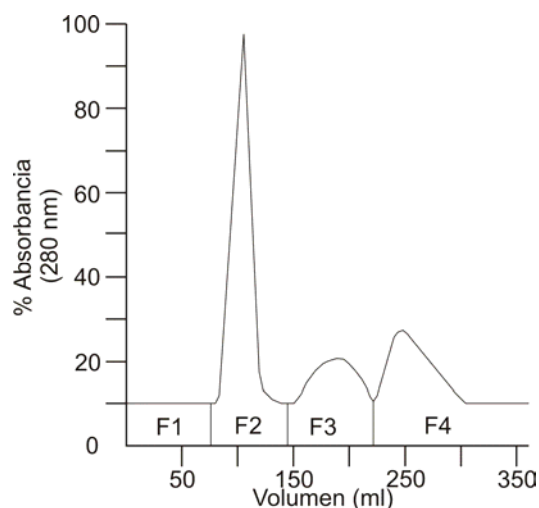


Figura 25. Cromatografía Sephadex G-50 de la fracción **ShG50F4/QAEF2**.

Las fracciones 1 y 2 obtenidas de la columna de Sephadex G-50 pertenecientes a la fracción **ShG50F4/QAEF2**, se agregaron a una columna empacada con Fractogel EMD SO_3^- 650 M donde se obtuvieron 5 fracciones para la fracción **ShG50F4/QAEF2/G501**, y 6 fracciones para la fracción 2 (**ShG50F4/QAEF2/G50F2**) de las cuáles sólo las fracciones 1 y 2 presentaron actividad neurotóxica en cangrejos de la especie *O. quadrata* (Fig. 26).

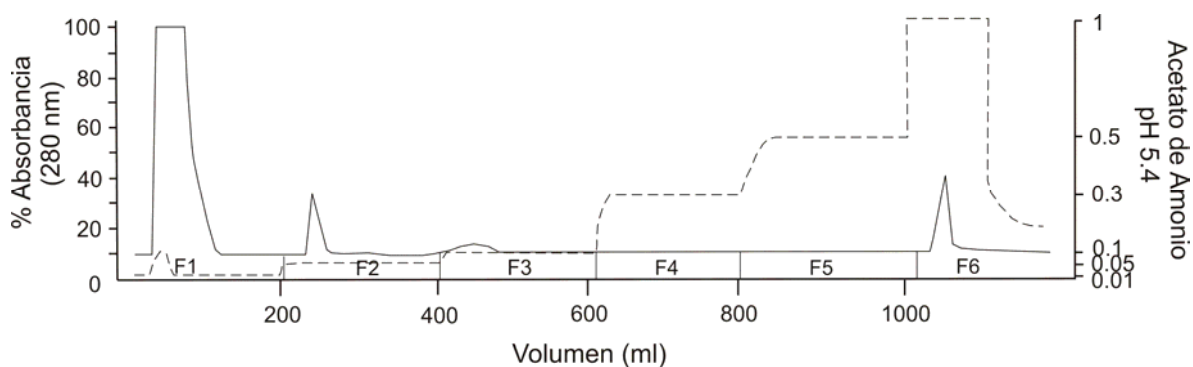


Figura 26. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650 de la fracción **ShG50F4/QAEF2/G50F2**.

Para finalizar, la fracción **ShG50F4/QAEF2/G50F2/FractoF2** se desaló utilizando como matriz Sephadex G-25, posteriormente se concentró al vacío y se liofilizó, la fracción resultante es **ShG50F4/QAEF2/G50F2 /FractoF2/G25F1** (Fig. 27).

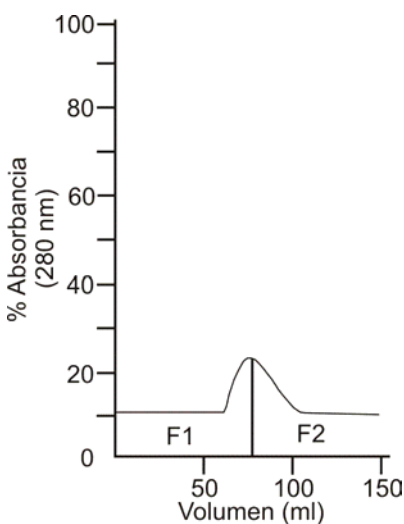


Figura 27. Cromatografía Sephadex G-25 de la fracción **ShG50F4/QAEF2/G50F2/FractoF2**.

Se analizaron con HPLC 4 fracciones que presentaron actividad biológica. Las Figuras 28 y 29 muestran los cromatogramas obtenidos con el HPLC de dos fracciones con actividad citotóxica y las Figuras 30 y 31 son dos de las fracciones con actividad neurotóxica.

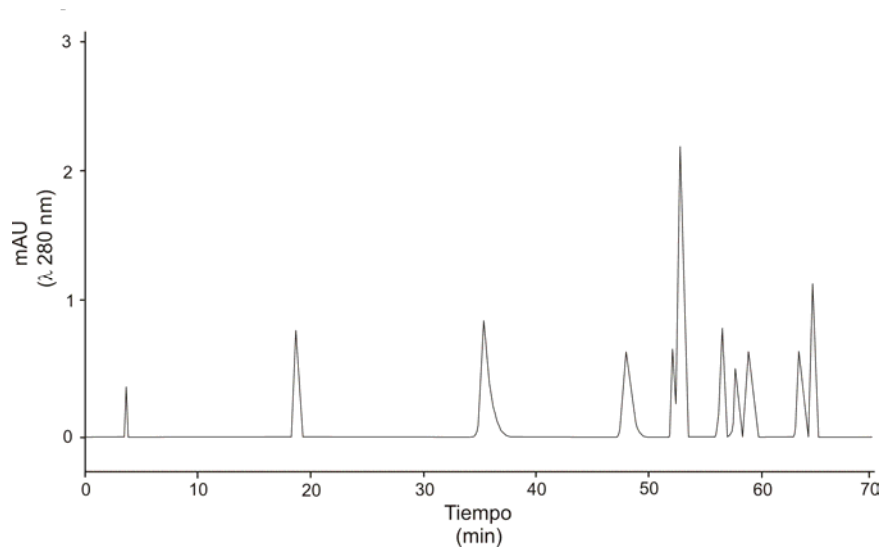


Figura 28. Cromatografía en HPLC de la fracción con actividad citotóxica **ShG50 F2/QAE F2/G50 F2/Fracto F1/G25 F2.**

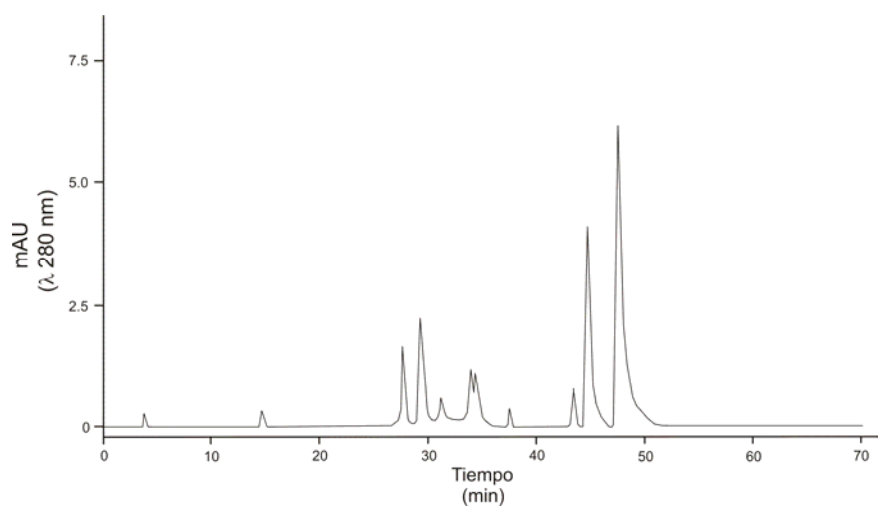


Figura 29. Cromatografía en HPLC de la fracción con actividad citotóxica **ShG50 F2/QAE F3/G50 F1/Fracto F4/G25 F1.**

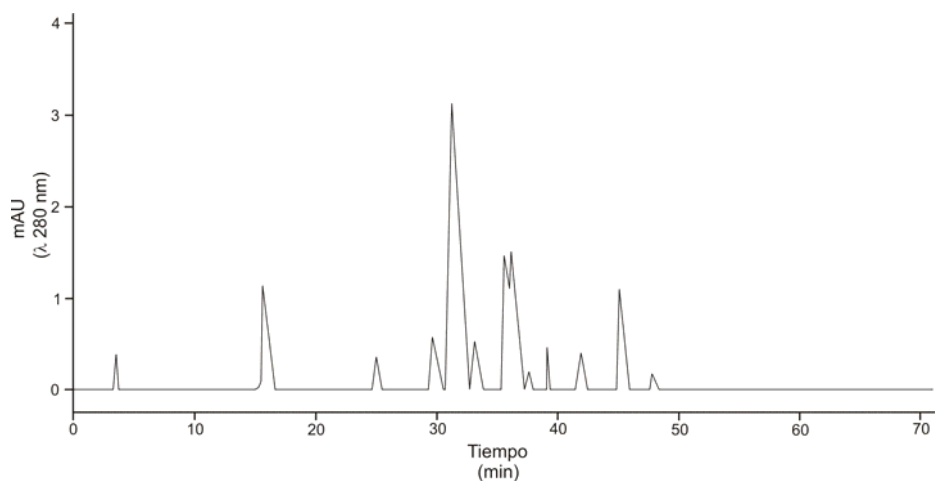


Figura 30. Cromatografía en HPLC de la fracción con actividad neurotóxica **ShG50 F2/QAE F1/G50 F2/Fractogel F3/G25 F2.**

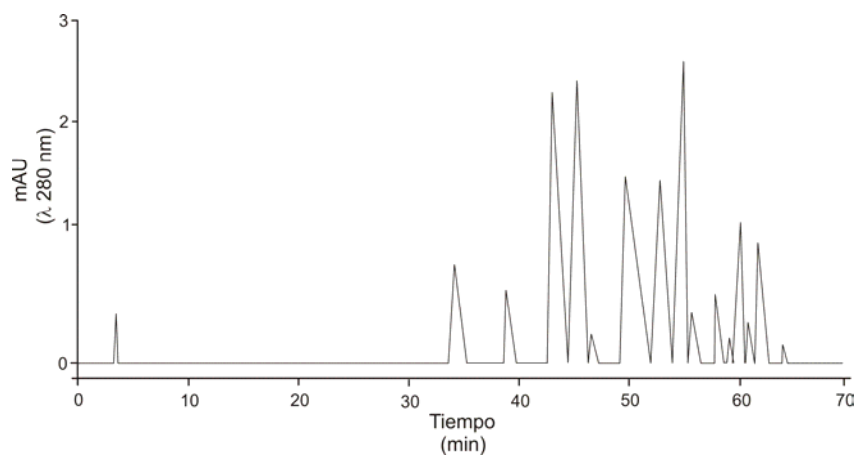


Figura 31. Cromatografía en HPLC de la fracción con actividad neurotóxica **ShG50 F2/QAE F1/G50 F1/Fractogel F1/G25 F1.**

Las muestras obtenidas mediante HPLC no fue posible probarlas en los bioensayos, debido a que no se obtuvo material suficiente para su realización.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se realizó la determinación de proteínas usando el método colorimétrico de Bradford (1976). Se utilizaron para el ensayo las concentraciones de 7.5, 15, 30 y 60 mg/ml de extracto crudo liofilizado y los resultados se presentan en la Figura 32.

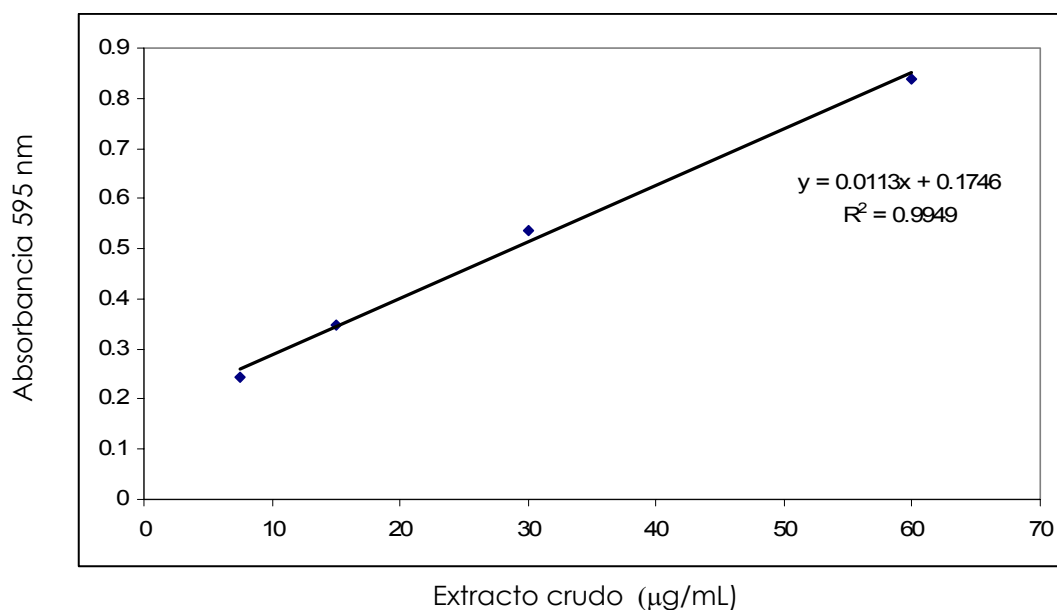


Figura 32. Determinación de proteínas del extracto crudo de *S. helianthus*.

El cálculo de la cantidad de proteínas contenida en el extracto crudo se realizó empleando la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración de gamma globulina bovina (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de proteínas contenidas en el extracto crudo de *Stichodactyla helianthus*.

Extracto crudo	Concentración de proteína
1 mg/mL (extrapolación)	28.98 µg/mL
7.5 µg/mL	0.531 µg/mL
15 µg/mL	0.741 µg/mL
30 µg/mL	1.128 µg/mL
60 µg/mL	1.737 µg/mL

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

De las concentraciones probadas del extracto crudo de *Stichodactyla helianthus* (1, 3 y 5%), sólo la concentración al 5% mostró actividad antibacteriana en la cepa de *Aeromona hydrophila* ATCC 49140 (Fig. 33), registrándose un halo de inhibición de 13 mm de diámetro (Tabla 3). De las concentraciones al 1% de las fracciones pre-purificadas, sólo las fracciones **ShG50F2/ QAEF2 /G50F5 /FractoF1 /G25F3** (Fig. 34) y **ShG50F2/ QAEF2/ G50F2/ FractoF1 /G25F2** (Fig. 34) mostraron un pequeño y poco perceptible halo de inhibición de 10 mm y 9 mm de diámetro respectivamente. La fracción **ShG50F2/ QAEF1/ G50F4/ FractoF1/ G25F3** (Fig. 36) mostró actividad con una concentración al 5%, observándose, de igual manera, un halo de inhibición poco notorio de 7 mm (Tabla 4). El control negativo no mostró actividad antibacteriana, el control positivo (Amikacina) mostró un halo de inhibición bien definido de 21 mm.

Tabla 3. Actividad antibacteriana del extracto crudo de *S. helianthus* a diferentes concentraciones porcentuales.

Extracto crudo de <i>S. helianthus</i>	Halo de inhibición del extracto crudo (mm)	Halo de inhibición de la Amikacina (mm)
1%	-----	21
3%	-----	
5%	13	

Tabla 4. Actividad antibacteriana de las fracciones pre-purificadas al 1 y 5%.

Fracciones pre-purificadas	Concentración (%)	Halo de inhibición de las fracciones pre-purificadas (mm)	Halo de inhibición de la Amikacina (mm)
ShG50F2/QAEF2/G50F5/ FractoF1/G25F3	1	10	22
ShG50F2/QAEF2/G50F2/ FractoF1/G25F2	1	9	
ShG50F2/QAEF1/G50F4/ FractoF1/G25F3	5	7	

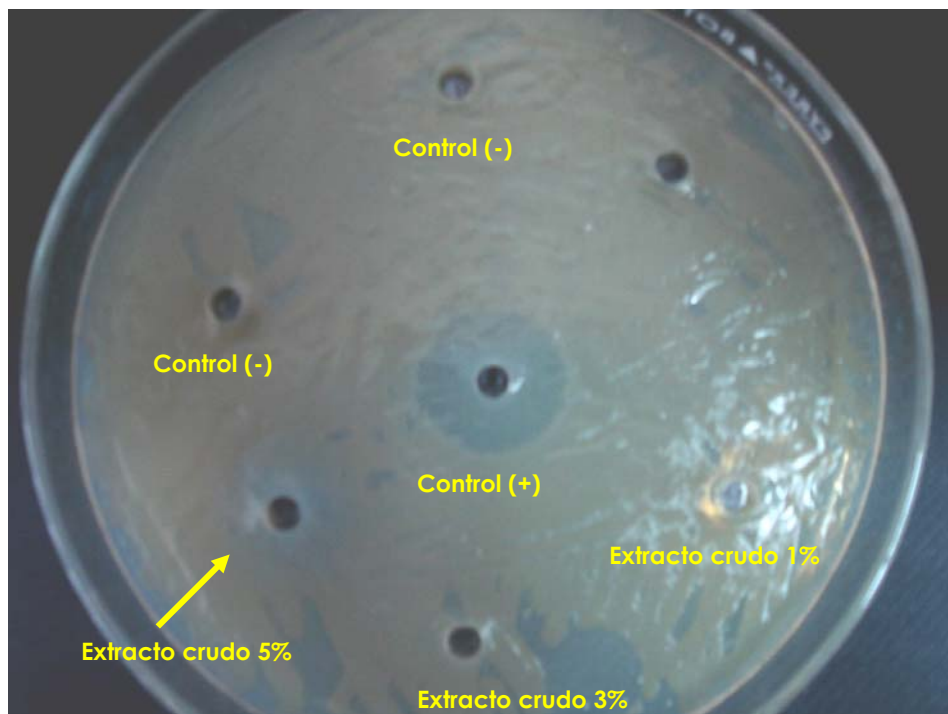


Figura 33. Actividad antibacteriana del extracto crudo de *Stichodactyla helianthus* al 5% en la cepa de *A. hydrophila* ATCC 49140. Se observa un halo de inhibición de 13 mm de diámetro.

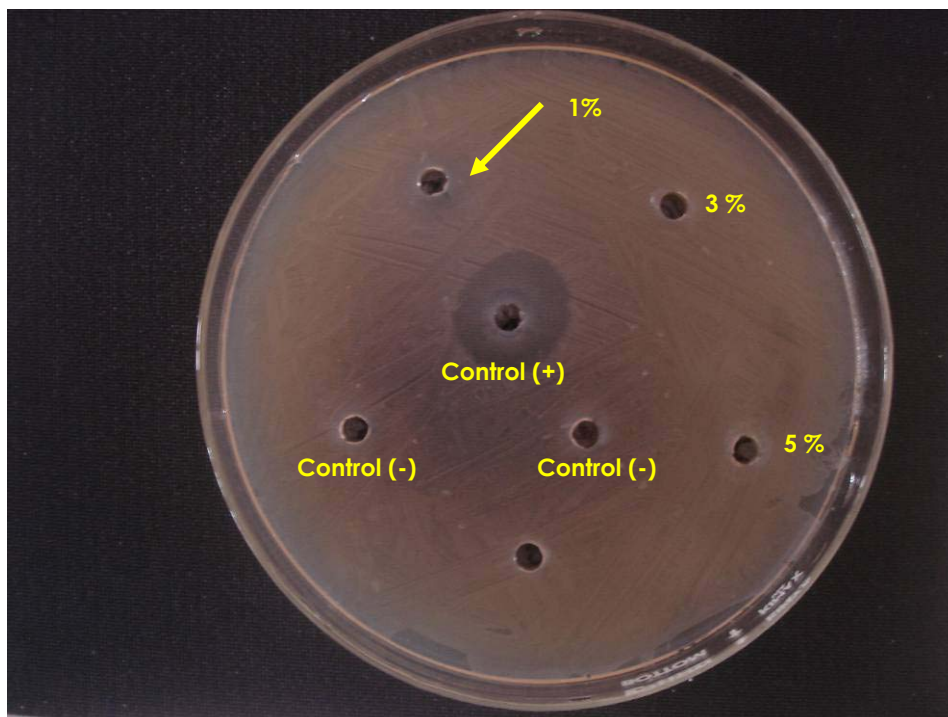


Figura 34. Actividad antibacteriana de la fracción pre-purificada de *S. helianthus* **ShG50F2/QAEF2/G50F6/FractoF1/G25F3** al 1%. Se observa un pequeño y poco perceptible halo de inhibición de 10 mm de diámetro.

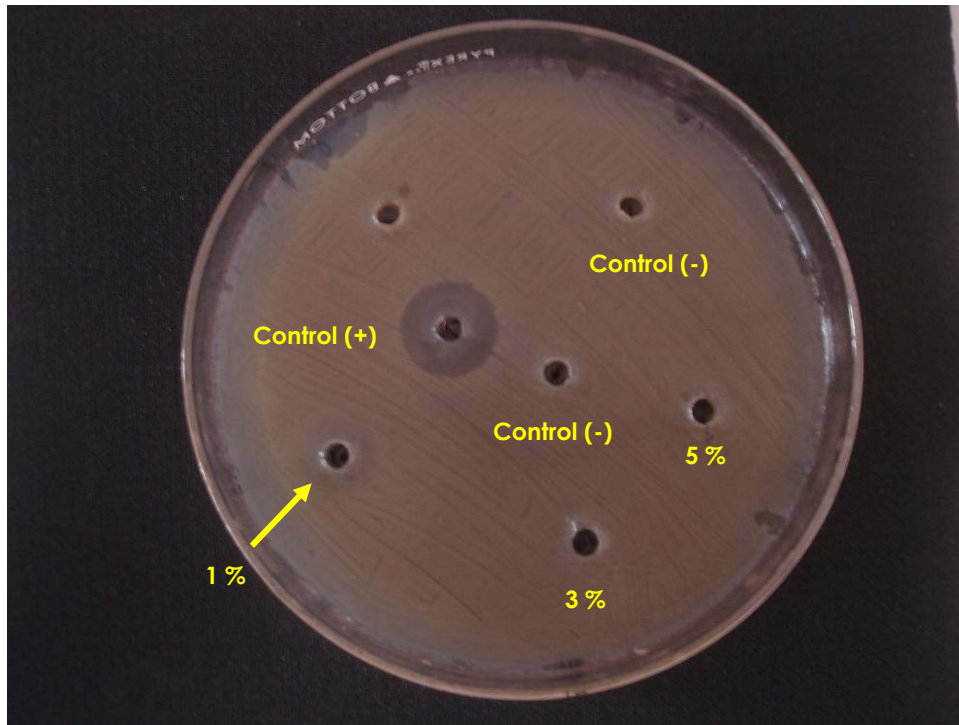


Figura 35. Se observa un pequeño halo de inhibición poco definido de 9 mm de diámetro con la fracción **ShG50F2/QAEF2/G50F2/FractoF1/G25F2** al 1%.

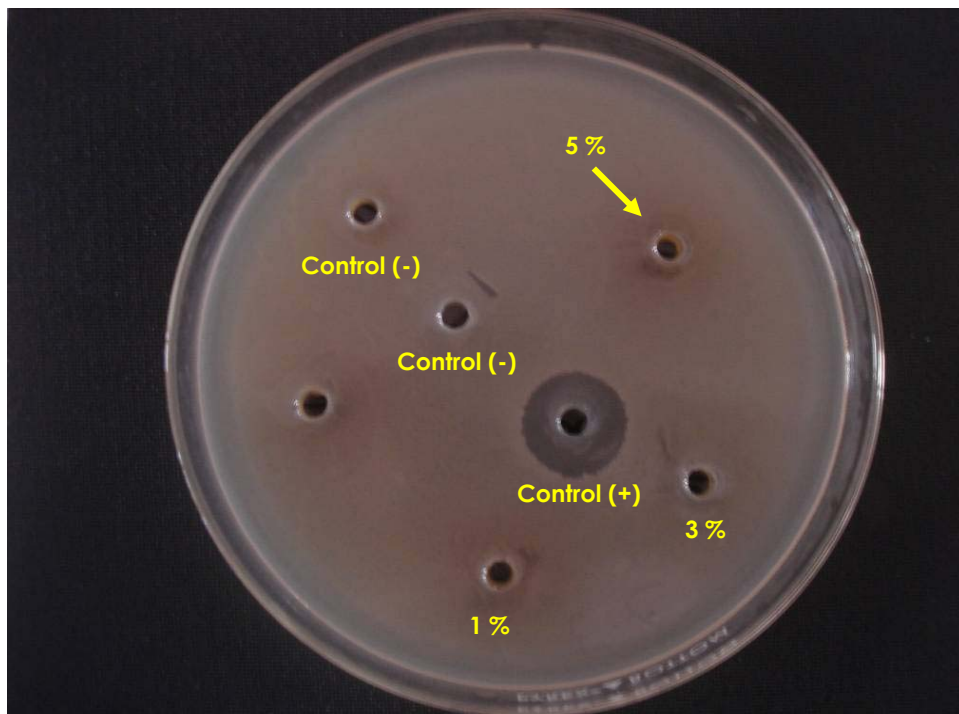


Figura 36. Ligera actividad antibacteriana en la cepa de *A. hydrophyla* ATCC 49140 con la fracción pre-purificada **ShG50F2/QAEF1/G50F4/FractoF1/G25F3** al 5%, con un halo de inhibición de 7 mm de diámetro.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA

La dosis letal media (LD₅₀) obtenida en peces de la especie *Oreochromis niloticus* con el extracto crudo fue de 25 mg/kg. La dosis en la que se obtuvo el 100% de mortalidad fue la de 50 mg/kg en un tiempo de 9 horas. En la Tabla 5 se observa el tiempo transcurrido hasta su muerte; los organismos que se encuentran en la columna < 12 hrs son aquellos que murieron durante la primeras 12 horas de monitoreo, los individuos que murieron en las siguientes 12 horas después del intervalo de monitoreo se encuentran en la columna marcada como > 12 hrs, estos últimos no fueron disectados debido a su descomposición y en la última columna se encuentra el número de organismos sacrificados y disectados después de las 24 horas que duró el estudio, con la finalidad de observar si presentaban daño en hígado, bazo, branquias y cerebro.

Tabla 5. Mortalidad en peces de la especie *Oreochormis niloticus* causada por la inyección vía intraperitoneal (i. p.) del extracto crudo de *S. helianthus*.

Estanque	Concentración (mg/kg)	Peces (n)	Peso (g)	Talla (cm)	Hora muerte		
					< 12 h	> 12 h	Sacrificado
1	control	2	155.90 160.23	21.7 22.1			2
2	control	2	190.55 209.23	22.7 23.4			2
3	control	2	171.61 161.81	23.2 23.0			2
4	6.25	2	207.50 186.75	23 22.4	7 h	1	
5	6.25	2	216.95 210.52	22.5 23.8		1	1
6	6.25	2	172.10 171.26	21.6 21.7		2	
7	12.5	2	198.20 182.20	22.5 23.0	9 h		1
8	12.5	2	145.55 159.80	18.5 21.2			2
9	12.5	2	199.88 148.16	21 21.6	3 h		1
10	25	2	150.05 151.99	20.5 20.5	10 min		1
11	25	2	182.28 200.22	22.1 23.2	3 h		1
12	25	2	175.44 197.17	21.7 22.8	4 h	1	
13	50	2	200.52 133.25	23.5 19.5	1 h 1 h		
14	50	2	145.89 140	19.2 20	3 h 9 h		
15	50	2	199.89 192.06	23.2 21.7	2 h 2 h		

El principal órgano dañado por la actividad del extracto crudo fueron las branquias (Fig. 37), observándose hipertrofia (Fig. 38), hiperplasia y aumento del flujo sanguíneo (Fig. 39) y sólo un organismo presentó telangiectasis (Fig. 40). En el bazo (Fig. 41) se observó un incremento en los centros melanomacrófagos (Fig. 42) con las dosis de 12.5 y 50 mg/kg. El hígado (Fig. 43) presentó hiperemia y aumento del flujo sanguíneo (Fig. 44) vacuolación (Fig. 45) y con dosis de 25 y 50 mg/kg. En el cerebro no se registró ningún daño (Tabla 6).

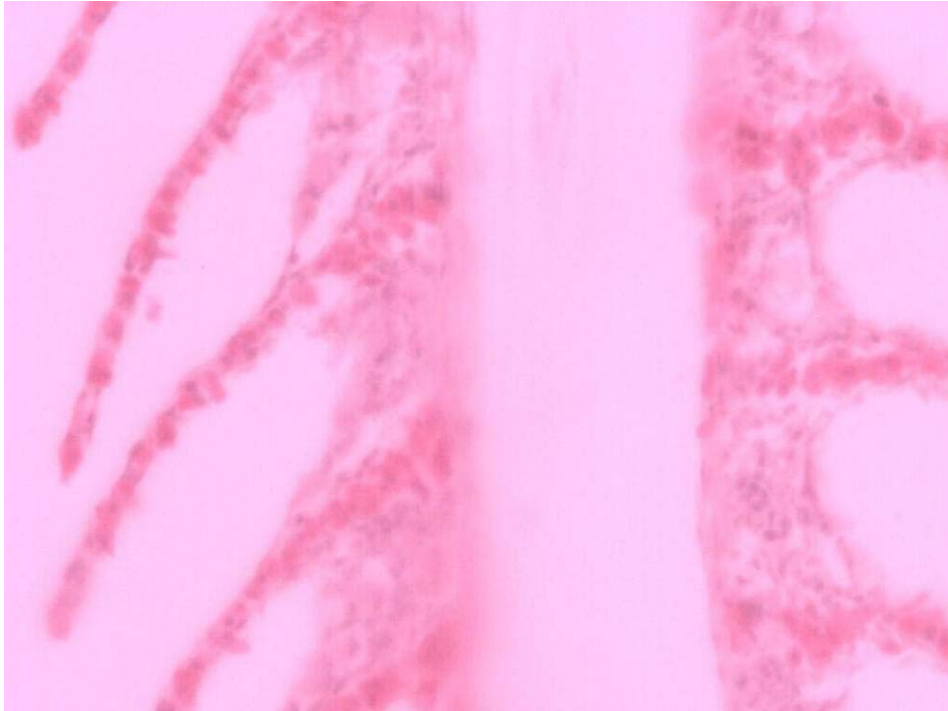


Figura 37. Branquias disecadas de *Oreochormis niloticus* de un organismo control.



Figura 38. Hipertrofia (deformación) en las branquias, en las lamelas secundarias ocasionada por la actividad de las toxinas de *S. helianthus*.



Figura 39. Hiperplasia en branquias (unión de las lamelas secundarias debido a un incremento celular) causada por el efecto citotóxico de las toxinas de *S. helianthus*.

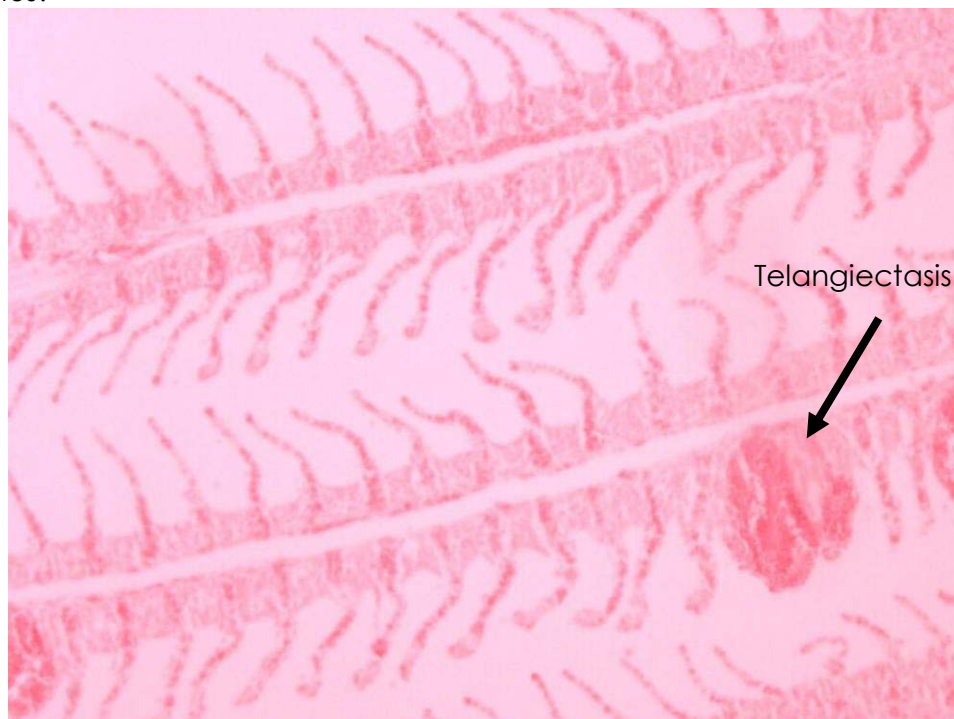


Figura 40. Telangiectasis (rompimiento de una célula pilar de la lamela secundaria) en branquias provocada por las toxinas de *S. helianthus*.

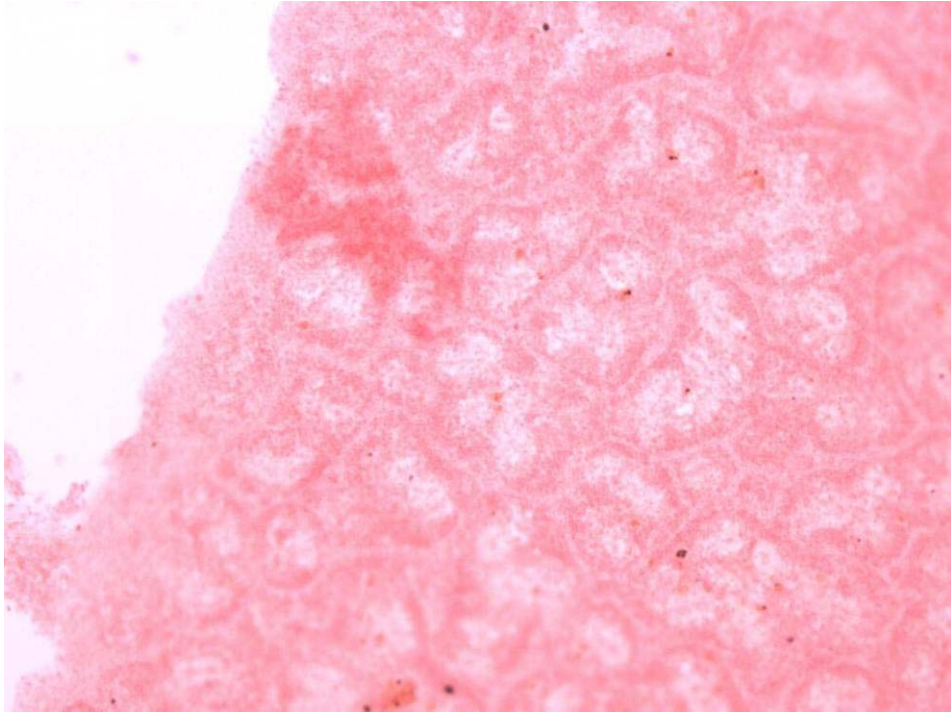


Figura 41. Bazo de un organismo control. No hay presencia de daño en los centros melanomacrófagos.

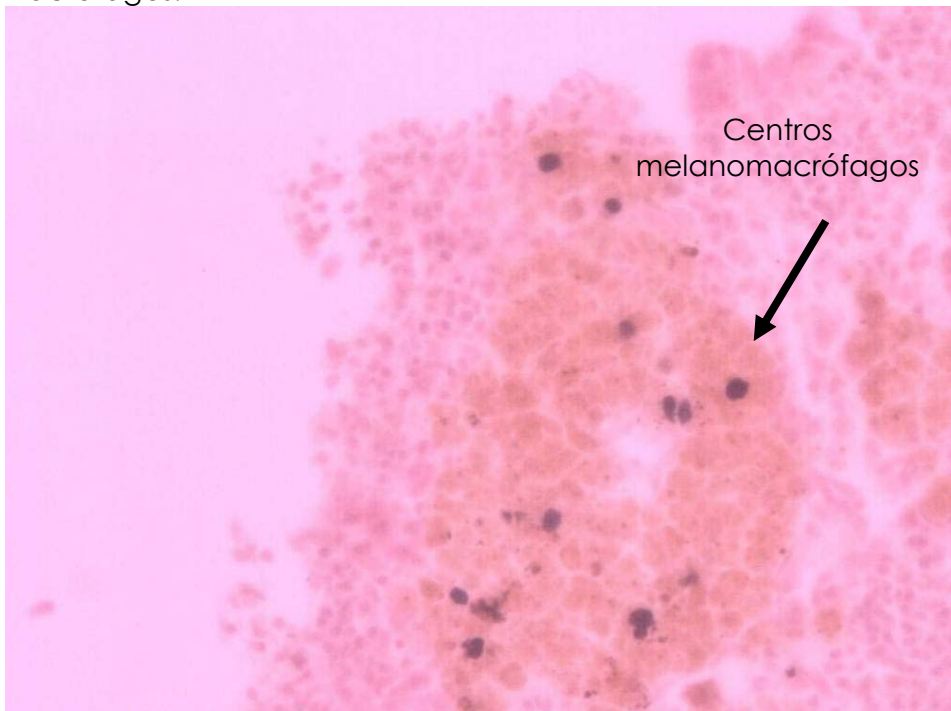


Figura 42. Incremento de los centros melanomacrófagos en el bazo a causa de las toxinas de *S. helianthus*.

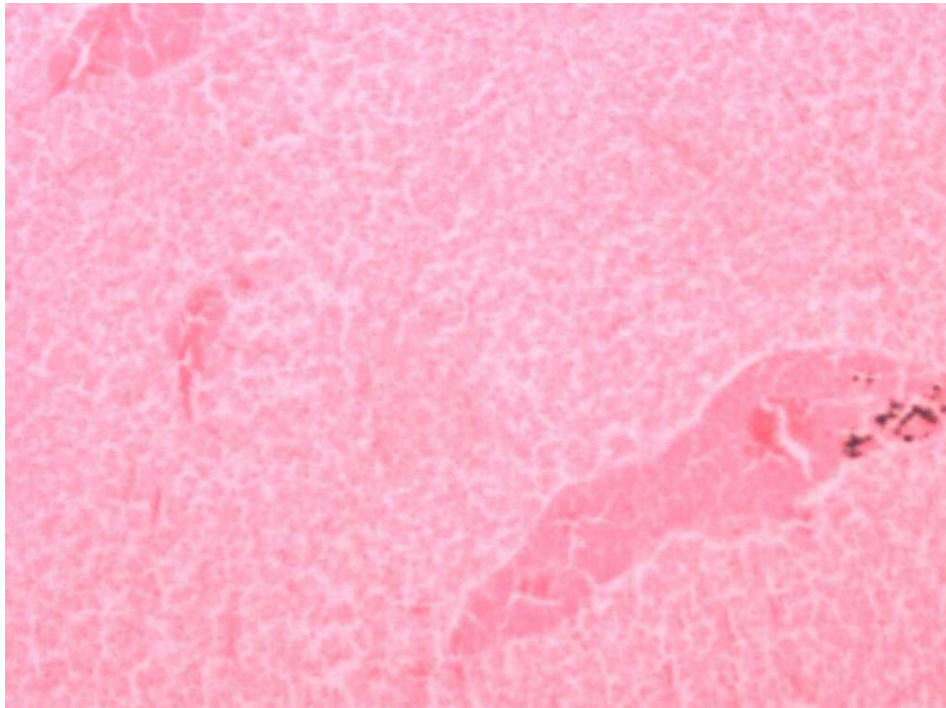


Figura 43. Hígado sin daño de un organismo control.

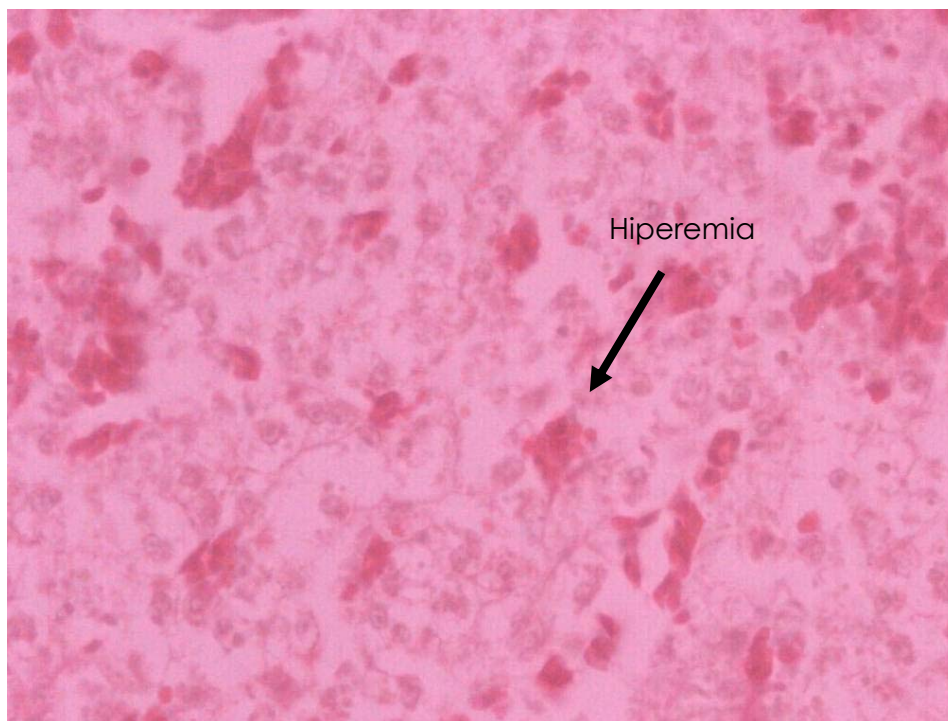


Figura 44. Hiperemia (incremento celular) en hígado causado por las toxinas de *S. helianthus*.

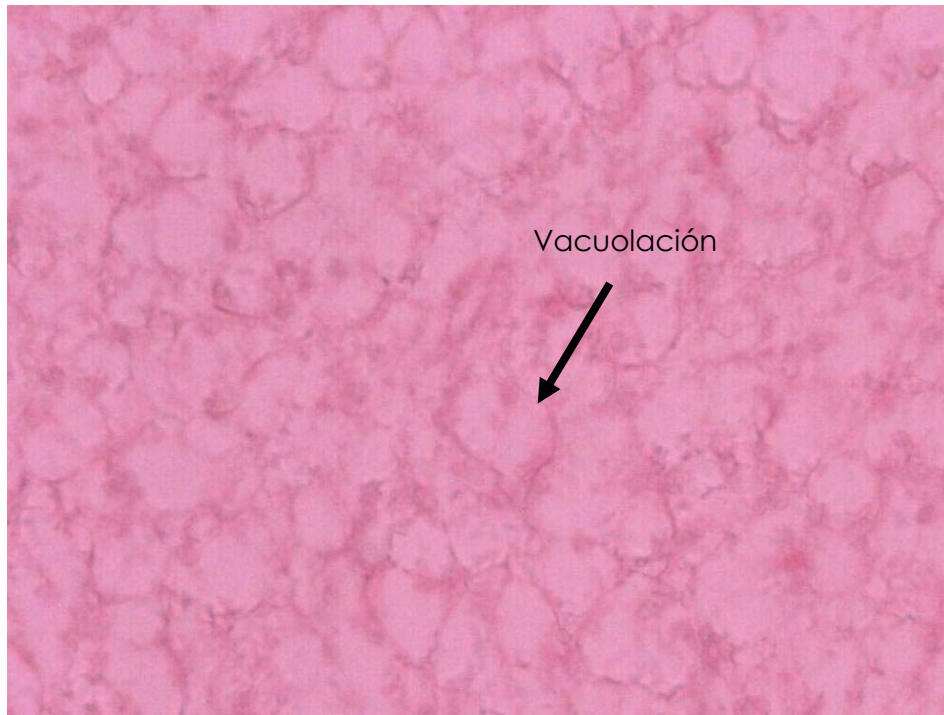


Figura 45. Vacuolación (destrucción en células hepáticas) en hígado a causa de las toxinas de *S. helianthus*.

Tabla 6. Daño causado a peces de la especie *Oreochromis niloticus* por la inyección de 4 concentraciones diferentes del extracto crudo de *S. helianthus*.

Concentración (mg/kg)	Branquias	Hígado	Bazo
Estanque 1 Control			
Estanque 2 Control			
Estanque 3 Control			
Estanque 4 6.25	Ligera hipertrofia, Hiperplasia Organismo muerto > 12 h monitoreo, no se disecto.		
Estanque 5 6.25	Hipertrofia, hiperplasia Aumento flujo sanguíneo Organismo muerto > 12 h monitoreo		
Estanque 6 6.25	Hipertrofia, hiperplasia Aumento flujo sanguíneo		
Estanque 7 12.5	Incremento flujo sanguíneo, hipertrofia Hipertrofia		Incremento de centros melanomacrófagos
Estanque 8 12.5	Hipertrofia Incremento flujo sanguíneo, hipertrofia		Incremento de centros melanomacrófagos
Estanque 9 12.5	Hipertrofia Hipertrofia		
Estanque 10 25	Hiperplasia, hipertrofia Hiperplasia severa	Vacuolación, hiperemia hiperemia	
Estanque 11 25	Hipertrofia, aumento flujo sanguíneo hipertrofia		
Estanque 12 25	Hiperplasia, aumento flujo sanguíneo Organismo muerto > 12 h monitoreo		
Estanque 13 50	Hipertrofia, aumento flujo sanguíneo Hipertrofia, aumento flujo sanguíneo		
Estanque 14 50	Hiperplasia, Flujo sanguíneo Hiperplasia, telangiectasis	hiperemia	
Estanque 15 50	Hiperplasia, hipertrofia hipertrofia	vacuolación hiperemia	Incremento de centros melanomacrófagos incremento de centros melanomacrófagos

En la Tabla 7 se muestran los efectos causados en peces de la especie *Oreochromis niloticus* por la inyección vía intraperitoneal de las fracciones pre-purificadas de *S. helianthus*. Se observó daño en las branquias, hipertrofia (Fig. 38), hiperplasia y aumento del flujo sanguíneo (Fig. 39). En el bazo se observó un incremento de los centros melanomacrófagos (Fig. 42) y en el hígado se registró un aumento del flujo sanguíneo, hiperemia y hemorragia multifocal (Fig. 44) y vacuolación (Fig. 45). El cerebro no presentó daño alguno.

Tabla 7. Daños causados a peces de la especie *Oreochromis niloticus* al inyectar vía intraperitoneal (i.p.) las fracciones pre-purificadas de *S. helianthus*.

Fracción	Branquias	Hígado	Bazo
Control			
ShG50F2/QAEF3/G50F1/ Fractogel F4/G23F1	Hipertrofia Hipertrofia		
ShG50F2/QAEF2/G50F2/ Fractogel F1/G25F2	Hipertrofia, hiperplasia focal Hipertrofia		Incremento de centros melanomacrófagos Incremento de centros melanomacrófagos
ShG50F4/QAEF2/G50F1/ Fractogel F1/G25F1	Hipertrofia Hipertrofia, hiperplasia focal	Hemorragia multifocal Hiperemia	
ShG50F2/QAEF1/G50F2/ Fractogel F1/G25F2	Hipertrofia, hiperplasia focal Hiperplasia, hipertrofia		
ShG50F2/QAEF2/G50F2/ Fractogel F4/G25F1	Hipertrofia, hiperplasia Hipertrofia, hiperplasia		
ShG50F2/QAEF2/G50F2/ Fractogel F3/G25F1	Hipertrofia Hipertrofia, incremento flujo sanguíneo		Incremento de centros melanomacrófagos
ShG50F2/QAEF1/G50F4/ Fractogel F1/G25F2	Hipertrofia, hiperplasia Hiperplasia, hipertrofia	Hiperemia focal	
ShG50F2/QAEF1/G50F2/ Fractogel F1/G25F3	Hipertrofia, hiperplasia, aumentado flujo sanguíneo Hipertrofia, aumento flujo sanguíneo	Hiperemia focal	
ShG50F4/QAEF2/G50F1/ Fractogel F2/G25F1	Hipertrofia, aumento flujo sanguíneo Hipertrofia, aumento flujo sanguíneo	Hiperemia	
ShG50F2/QAEF1/G50F2/ Fractogel F3/G25F2	Hipertrofia, aumento flujo sanguíneo Hipertrofia, aumento flujo sanguíneo		

Evaluación de la actividad biológicas de las toxinas de la anémona *Stichodactyla helianthus*

ShG50F2/QAEF1/G50F2/ Fractogel F2/G25F2	Hiperplasia, hipertrofia aumento flujo sanguíneo		
ShG50F2/QAEF2/G50F2/ Fractogel F2/G25F2	Hipertrofia, hiperplasia aumento flujo sanguíneo		
	Hipertrofia, hiperplasia aumento flujo sanguíneo		
ShG50F2/QAEF1/G50F4/ Fractogel F2/G25F2	Hipertrofia, hiperplasia aumento flujo sanguíneo		
	Hipertrofia, hiperplasia aumento flujo sanguíneo		
ShG50F2/QAEF1/G50F4/ Fractogel F1/G25F3	Hiperplasia, hipertrofia		
	Hipertrofia, hiperplasia aumento flujo sanguíneo		
ShG50F2/QAEF2/G50F5/ Fractogel F1/G25F3	Hipertrofia		
	Hipertrofia, aumento flujo sanguíneo		
ShG50F2/QAEF2/G50F3/ Fractogel F1/G25F1	Hipertrofia, aumento flujo sanguíneo		
	Hipertrofia		
ShG50F2/QAEF1/G50F2/ Fractogel F3/G25F3	Hiperplasia, hipertrofia aumento flujo sanguíneo		
	Hipertrofia, aumento flujo sanguíneo		

ACTIVIDAD NEUROTÓXICA

El extracto crudo, así como las fracciones pre-purificadas se probaron en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, observándose que el extracto crudo presentó menos potencia en la actividad neurotóxica que las fracciones pre-purificadas como se describe en la Tabla 8.

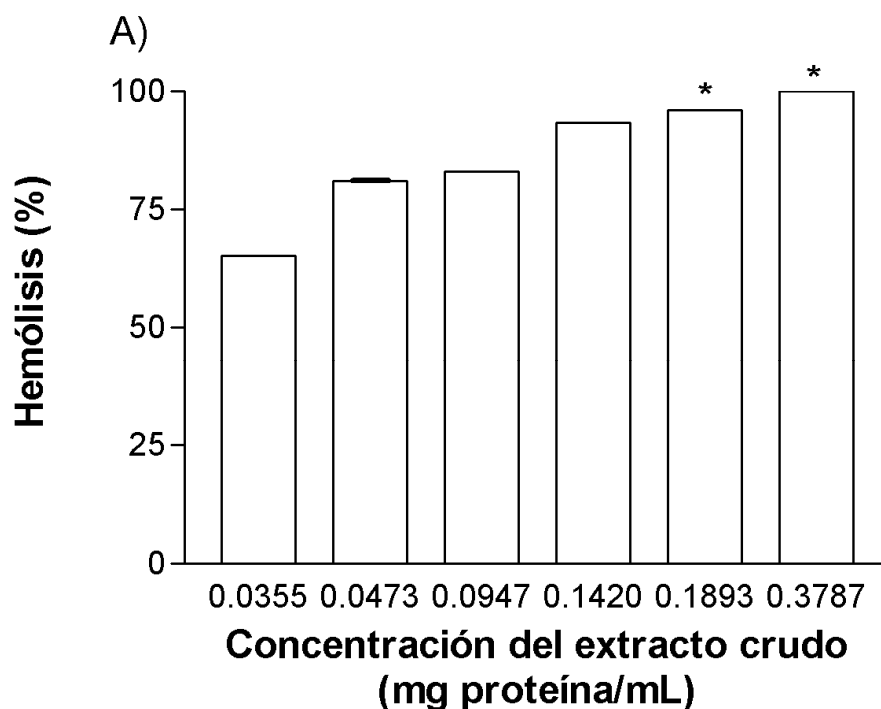
Tabla 8. Extracto crudo y fracciones prepurificadas con actividad neurotóxica en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*.

Fracción	Hr inyección	Hr muerte	Sexo	Reacción
Extracto crudo	10:59	6:14	H	Ligeros movimientos tetánicos después de 20 a 30 min, seguidos de una alternancia de movimientos rápidos y lentos; espuma por la boca
	11:02	6:27	H	
	11:04	6:40	H	
	11:06	6:33	M	
ShG50F2/QAEF1/G50F1/ Fractogel F1/G25F1	21:29	21:49	H	Inmediatamente se presentaron movimientos tetánicos, espuma por la boca, pérdida del control de los apéndices caminadores
	21:32	21:48	H	
	21:39	22:00	H	
	21:51	22:08	H	
ShG50F2/QAEF1/G50F2/ Fractogel F1/G25F1	9:53	10:19	M	Movimientos tetánicos, pérdida del control de los apéndices caminadores, espuma, parálisis total hasta la muerte
	9:55	10:26	H	
	10:00	10:26	H	
	10:08	10:40	H	
ShG50F2/QAEF1/G50F2/ Fractogel F1/G25F2	22:10	22:45	H	Movimientos tetánicos inmediatamente, pérdida del control de los apéndices locomotores, parálisis total, muerte.
	22:11	22:50	M	
	22:14	22:48	H	
	22:15	22:40	H	
ShG50F2/QAEF1/G50F2/ Fractogel F2/G25F1	21:09	21:40	H	Convulsiones tetánicas, pérdida del apéndice caminador, pérdida del control de los apéndices caminadores, espuma.
	21:12	21:40	H	
	21:18	21:36	M	
	21:23	21:50	H	
ShG50F2/QAEF1/G50F2/ Fractogel F3/G25F2	21:55	22:20	H	Convulsiones tetánicas, pérdida del control de los apéndices caminadores, parálisis total hasta la muerte.
	21:56	22:18	M	
	21:59	22:20	H	
	22:07	22:25	H	
ShG50F2/QAEF1/G50F2/ Fractogel F4/G25F1	21:35	22:51	M	Pérdida del apéndice locomotor inyectado, convulsiones tetánicas, pérdida del control de los apéndices caminadores, parálisis.
	21:38	21:55	M	
	21:41	22:02	H	
	21:45	22:10	H	
ShG50F2/QAEF2/G50F2/ Fractogel F1/G25F2	9:35	10:10	H	Movimientos tetánicos inmediatamente, espuma, pérdida del control de los apéndices caminadores, parálisis, muerte.
	9:44	10:17	M	
	9:47	10:18	M	
	9:50	10:19	H	
ShG50F4/QAEF1/G50F2/ Fractogel F1/G25F2	9:07	9:23	H	Pérdida del apéndice caminador inyectado, movimientos tetánicos, parálisis total hasta la muerte.
	9:17	9:50	H	
	9:20	9:55	H	
	9:26	9:55	M	
ShG50F4/QAEF2/G50F2/ Fractogel F2/G25F1	10:02	10:24	M	Pérdida del apéndice caminador inyectado, convulsiones tetánicas, espuma, parálisis total hasta la muerte.
	10:05	10:25	H	
	10:07	10:32	H	
	10:15	10:29	H	

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La actividad hemolítica en eritrocitos de rata es dependiente de la concentración del extracto crudo, la cual se expresa en % de hemólisis por mg proteína/mL. A medida que se incrementó la concentración del extracto crudo se observó un incremento en la liberación de la hemoglobina. El 100 % de hemólisis se obtuvo con 0.3783 mg proteína/mL (Fig. 46A).

En el caso de los eritrocitos humanos se observó el mismo comportamiento; la actividad hemolítica es dependiente del incremento en la concentración del extracto crudo. Sin embargo, los eritrocitos humanos fueron mucho más sensibles a las toxinas que los de rata. El 100% de hemólisis se obtuvo con sólo 0.094 mg proteína/ mL (Fig. 46B).



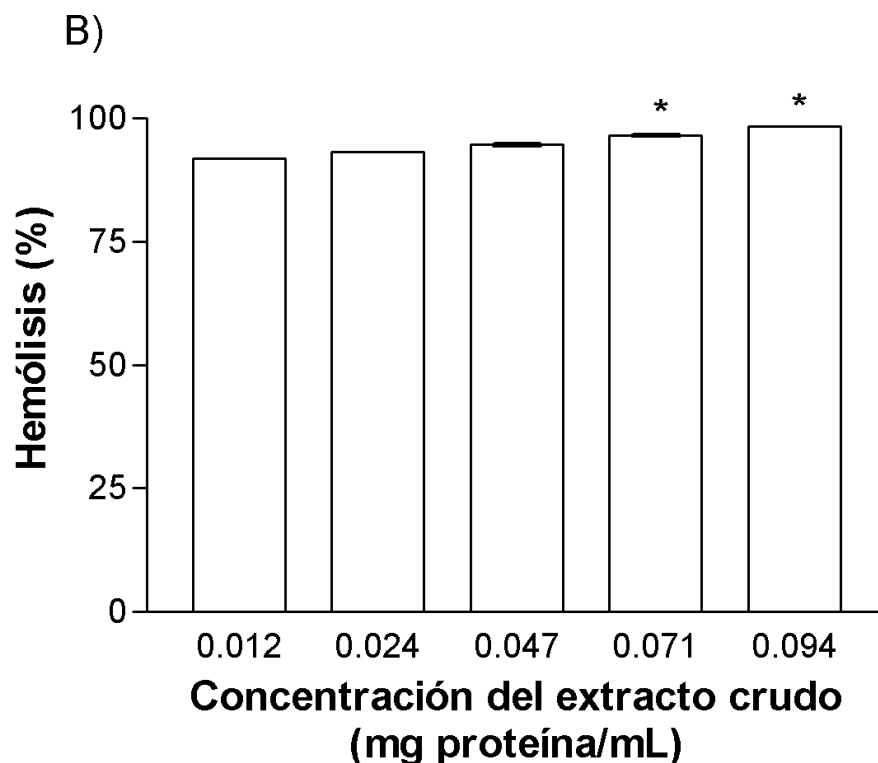


Figura 46. Actividad hemolítica de las toxinas de *Stichodactyla helianthus*. A) En eritrocitos de rata, B) En eritrocitos humanos

La peroxidación de lípidos expresada como la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), presenta una respuesta dependiente del incremento en la concentración del extracto crudo. Las concentraciones que mostraron los valores significativos ($P < 0.05$) de peroxidación en eritrocitos de rata fueron de 0.379 y 0.473 mg/proteína (Fig. 47A). Con los eritrocitos humanos esta significancia se observó sólo con 0.473 mg/proteína (Fig. 47B). Como control positivo de la peroxidación lipídica se utilizó FeSO_4 .

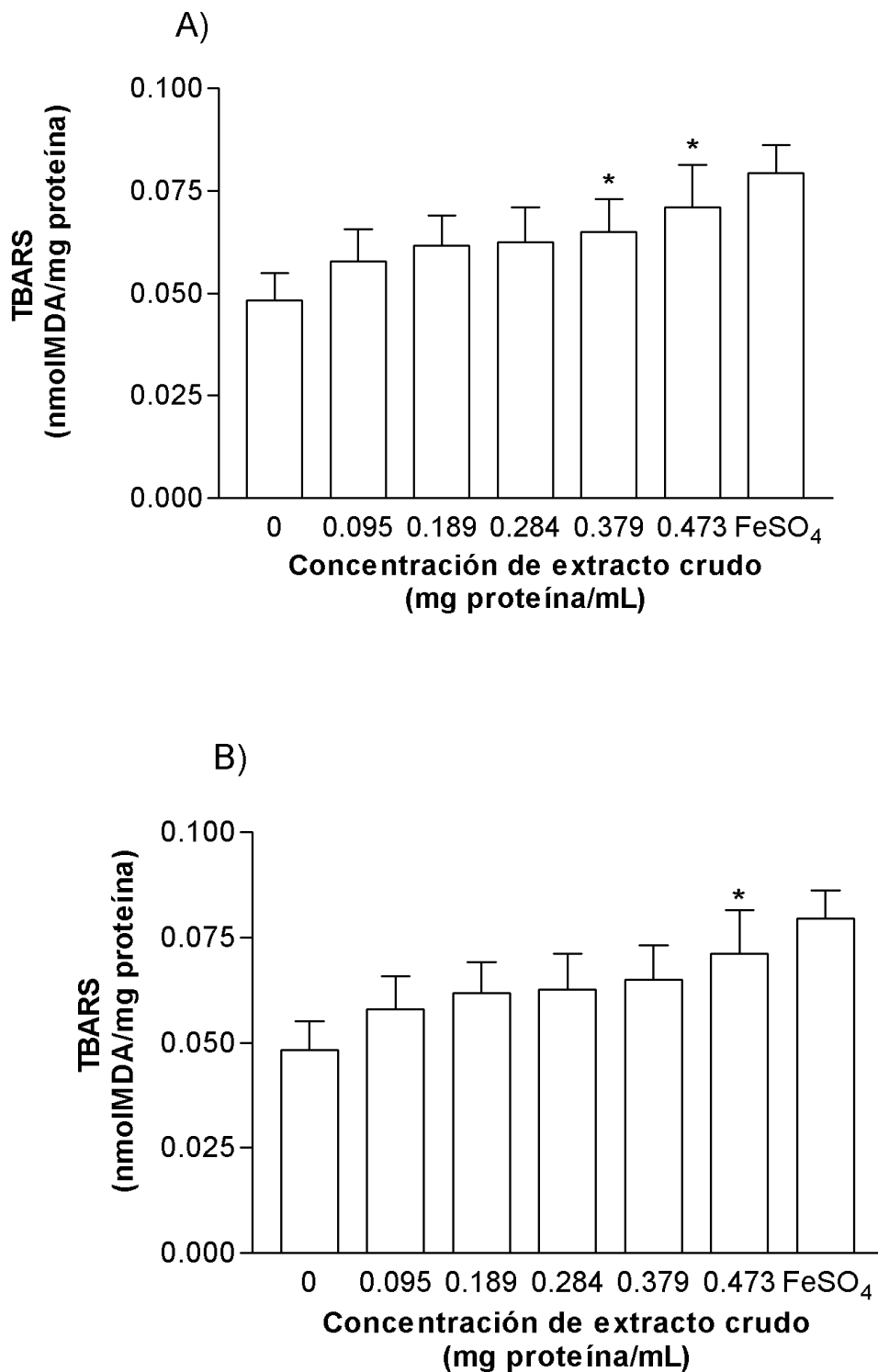


Figura 47. Peroxidación lipídica causada por las toxinas de *S. helianthus*. A) En eritrocitos de rata, B) En eritrocitos humanos.

DISCUSIÓN

La purificación del extracto crudo de *Stichodactyla helianthus* se realizó en el laboratorio de Toxicología de Cnidarios de la Unidad Académica Puerto Morelos, basándose en las propiedades de separación de los diferentes medios cromatográficos empleados. El primer paso de la cromatografía fue filtración en gel, también llamada cromatografía de exclusión molecular, usada para separar los componentes del extracto crudo por tamaño, para lo cual se utilizó una columna de Sephadex G-50 eluída con ácido acético 0.7 M; de las 10 fracciones obtenidas, las fracciones 2 y 4 se pasaron a través de una columna de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25 (aminoetil cuaternario), el gradiente usado fue de tipo escalonado de acetato de amonio de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M pH 8.4 a un flujo constante de 1.5 ml/min. El tercer paso de la purificación de las fracciones obtenidas fue a través de una columna Sephadex G-50 para desalar las muestras eluída con ácido acético 0.7 M, a un flujo constante de 3.5 ml/min; el siguiente paso fue una columna de intercambio catiónico Fractogel EMD SO₃⁻ 650 M (metacrilato), eluída con un gradiente escalonado de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M de acetato de amonio pH 5.4 a un flujo de 2.5 ml/min. El paso final del proceso de purificación se llevó a cabo en una columna Sephadex G-25 a un flujo de 3.5 ml/min eluída con ácido acético 0.3 M.

Este proceso de purificación difiere al descrito por Lanio y colaboradores (2001) quienes purificaron 500 mg de extracto crudo de *S. helianthus*. El primer paso de la purificación fue a través de una columna Sephadex G-50 medio (4 x100 cm) equilibrada con un "buffer" de acetato de amonio 0.2 M, pH 5 y eluída con el mismo "buffer" a un flujo constante de 36 ml/h. De esta cromatografía se obtuvieron 5 picos de los cuales el segundo presentó una mayor actividad hemolítica respecto al primer pico y los picos 3, 4 y 5 presentaron actividad neurotóxica. La segunda fracción obtenida de la cromatografía Sephadex G-50 fue cromatografiada en una columna de intercambio catiónico de celulosa CM-52 con una matriz de carboximetil, la cual es usada para el fraccionamiento de proteínas básicas y neutras, equilibrada con "buffer" de acetato de amonio 0.1 M

pH 5 y eluída con un gradiente lineal de 0.1 M a 0.4 M del mismo "buffer" a un flujo constante de 23 ml/h. Los resultados obtenidos en este trabajo difieren a los obtenidos por Lanio y colaboradores (2001), donde con el primer paso cromatográfico (Sephadex G-50) obtuvieron 5 picos bien definidos; en nuestro caso tuvimos 6 picos bien definidos pero lo separamos por fracciones siendo en total 10, en su segundo y último de paso de purificación (cromatografía de intercambio catiónico CM-52) obtuvieron 2 picos siendo St I y St II. En el presente trabajo se siguió otro proceso de purificación donde se incluyeron más pasos (para desalar las muestras y cromatografías de intercambio aniónico y catiónico) y debido a esto se obtuvieron más fracciones, por lo cual es difícil hacer una comparación de los resultados obtenidos.

Con respecto a lo resultados obtenidos en el bioensayo de la actividad antibacteriana, se observó que cuando se utilizan altas concentraciones del extracto crudo de *S. helianthus* se aprecia claramente el efecto en la formación de un halo de inhibición bien definido en cepas de *A. hydrophila* ATCC 49140. Por el contrario, con las fracciones pre-purificadas se obtuvo una baja actividad antibacteriana. Dado que no existen estudios enfocados a evaluar la actividad antibacteriana de las toxinas de *S. helianthus* con esta cepa, es imposible realizar una comparación de resultados. Sin embargo, hay un estudio previo realizado con el extracto de *S. helianthus* y otras cinco especies de cnidarios (dos especies de anémonas (*Bartholomea annulata* y *Lebrunia danae*) y tres especies de medusas (*Carybdea marsupiales*, *Cassiopea xamachana* y *Linuche unguiculata*), en el que se probaron cepas bacterianas Gram⁺ como *Streptococcus faecalis* ATCC 10741, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 y Gram⁻ como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Serratia marcescens* ATCC 9986 y *Salmonella typhi* ATCC 6539, así como en *Candida albicans* ATCC 10231 y el protozooario *Giardia lamblia* imss 0989:1; los resultados derivados de este estudio mostraron, que el extracto crudo de estos cnidarios no presentó actividad antibacteriana en ninguna de las cepas probadas. Sin embargo, *L. unguiculata* mostró actividad antifúngica con *C. albicans*, y la actividad antiprotozoaria se observó en casi todas las especies de cnidarios,

excepto con *C. marsupialis* (Morales-Landa, et. al., 2007). Mahnir y colaboradores (1993) realizaron un monitoreo biológico probando diferentes extractos de 22 anémonas recolectadas en el Pacífico Norte en bacterias Gram⁺ como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633, y en bacterias Gram⁻ como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* KMM 433, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, así como *Candida albicans* KMM 455. Los resultados obtenidos por estos autores fueron negativos, no encontrando actividad antibacteriana ni antifúngica. Por otro lado, Encarnación y colaboradores (2000) realizaron un monitoreo biológico de 53 extractos crudos del mismo número de organismos marinos de Baja California Sur, pertenecientes a 6 diferentes clases (demospongia, anthozoa, asteroidea, malascotraca, ascidiaceae y florideophyceae) en cepas Gram⁺ de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecalis* y una bacteria Gram⁻ *Escherichia coli* (ATCC 25922);, demostraron que, de los 25 organismos pertenecientes a la clase antochoza, 6 tuvieron actividad en *Staphylococcus aureus* (*Epizoanthus* sp RED-9602 Y RED 9606, coral (sp. n.i.) RED 9639A, *Muricea appressa* RED 9634, *Muricea austera* RED 9628, *Muricea* sp. RED 9638, y coral (sp. n.i.) RED 9612 tuvo actividad en *Candida albicans*. Es importante señalar que el presente trabajo es el primer estudio realizado con *A. hydrophila* ATCC 49140, con el extracto crudo y fracciones pre-purificadas de *S. helianthus*. Para incrementar el conocimiento del efecto de los extractos crudos y pre-purificados obtenidos de *S. helianthus* y de las diferentes especies de anémonas sobre la actividad antibacteriana en diversas cepas, se requiere realizar un mayor número de estudios.

Al probar el extracto crudo de *S. helianthus* en peces de la especie *Oreochromis niloticus*, se observó daño en branquias, hígado y bazo, incrementándose al aumentar la concentración de dicho extracto. Así mismo, se observó que la dosis letal media (LD₅₀) se obtuvo con una concentración de 25 mg/kg y a una dosis de 50 mg/kg se obtiene el 100% de mortandad. En un estudio realizado por Morales-Landa y colaboradores (2007) se probó el extracto crudo de *S. helianthus* a altas concentraciones (25, 50, 100 y 200 mg/kg), en comparación a las utilizadas en este trabajo. La LD₅₀ se obtuvo con una concentración de 104 mg/kg,

observándose una pérdida de estabilidad y coordinación de los peces posterior a la inyección del extracto crudo, registrándose el mismo daño en branquias que con bajas concentraciones, por lo que no es necesario aplicar una alta concentración para alcanzar la LD₅₀ y observar los daños hispatológicos.

Tanto el extracto crudo, como las fracciones pre-purificadas presentaron actividad citotóxica en branquias. Sin embargo, los resultados obtenidos con las fracciones pre-purificadas mostraron una pérdida de la actividad citotóxica debido posiblemente al proceso de purificación. Las branquias son un órgano multifuncional especializado en funciones como el intercambio respiratorio, la osmoregulación, la eliminación de productos de desecho del metabolismo del nitrógeno (Girard y Payan, 1980, citado en Martínez-Pereda, 1996). Este proceso de eliminación de sustancias hace que la toxina inyectada pase a través de las branquias por lo que este órgano es más susceptible a ser dañado. En hígado y bazo no se observó una pérdida notoria de actividad. En el cerebro no se detectó daño alguno debido a que la exposición ante la toxina fue corta. Para observar si hay daño o no en el cerebro, es necesaria una exposición a la toxina prolongada y periódica (Aguirre Macedo, L., comunicación personal).

Son escasos los trabajos que se han realizado sobre la actividad neurotóxica de las toxinas de *S. helianthus*. En el presente estudio se observó que las fracciones pre-purificadas de *S. helianthus* presentaron una elevada actividad neurotóxica en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, a diferencia del extracto crudo.

Entre los pocos trabajos que hacen mención a la actividad neurotóxica destaca el de Kem *et al.* (1989), quienes encontraron que las citolisinas de *S. helianthus* interfieren con el ensayo neurotóxico en cangrejos de la especie *Uca pugilator*; la actividad neurotóxica sólo se observó en las fracciones purificadas, después de separar las neurotoxinas de las citolisinas; las neurotoxinas son polipéptidos que rara vez exceden una masa molecular de 5 kDa e interactúan con los canales iónicos (Samejima *et al.*, 2000). Los polipéptidos neurotóxicos de *S. helianthus* obtenidos por Kem y colaboradores (1989) presentan una masa molecular de

5200 Da, siendo similares a la masa molecular de los fracciones obtenidas en el estudio de Samejima *et al.* (2000). Trabajos realizados en nuestro laboratorio con *Bartholomea annulata* (Zugasti, 2001) y *Carybdea marsupialis* (Torrens, 2004), mostraron que las toxinas de estos cnidarios presentan actividad neurotóxica en cangrejos de la especie *O. quadrata*, siendo mayor con las fracciones pre-purificadas. Asimismo, se han realizado estudios con otras especies de anémonas y medusas que demuestran la actividad neurotóxica de sus toxinas en diferentes especies de crustáceos (Kem *et al.*, 1989), corroborando así que los polipéptidos neurotóxicos bloquean los canales de sodio y potasio de vertebrados y crustáceos, causando contracciones tetánicas, pérdida de movilidad y hasta la muerte (Anderluh y Maček 2002). Con base en esto es posible explicar el efecto causado por el extracto crudo y las fracciones pre-purificadas de *S. helianthus* en los cangrejos de la especie *O. quadrata*.

Por lo que se refiere a la respuesta hemolítica de los eritrocitos de rata y humano, se observó que esta actividad es dependiente de la concentración del extracto crudo, siendo los eritrocitos humanos más sensibles a la toxina (0.094 mg proteína/mL), comparada con la concentración necesaria para causar la hemólisis en eritrocitos de rata (0.3787 mg proteína/mL). Los principales componentes de las membranas de estas células son lípidos y proteínas. Los eritrocitos humanos contienen por lo general un 40% de lípidos, un 52% de proteínas y un 8% de glúcidos, pudiendo variar dependiendo del sexo, edad y otros factores (Garrido-Pertierra, 2002). Los fosfolípidos encontrados en mayor cantidad en células de mamíferos son fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidiletanolamida y fosfatidilserina. Generalmente la fosfatidilcolina y la esfingomielina forman el 60% de lípidos en las eritrocitos de mamíferos (Bretscher, 1973). Los polipéptidos de la toxina de *S. helianthus* interactúan con la bicapa lipídica de los eritrocitos, principalmente por su contenido de esfingomielina (Basulto *et al.*, 2006). Las citolisinas de *S. helianthus* son polipéptidos que se insertan en las membranas celulares formando poros oligoméricos de aproximadamente 1 nm de radio (De los Ríos *et al.*, 1998), originando un desequilibrio coloido-osmótico debido a la entrada descontrolada de agua al

interior de la célula, lo cual generalmente provoca muerte celular (Martínez *et al.*, 2002b). Se ha observado que la presencia de esfingomiélin no es un requisito imprescindible en la formación del poro, pero su presencia en la composición lipídica favorece la velocidad de formación del poro causada por St II y que la presencia conjunta de esfingomiélin y colesterol incrementa la asociación a la membrana y su capacidad permeabilizante (Martínez, *et al.*, 2006). La diferencia de sensibilidad de los eritrocitos humanos y los eritrocitos de rata puede deberse a la diferencia de composición lipídica de sus membranas, siendo mayor la cantidad de esfingomiélin en los eritrocitos humanos. Bernheimer y Avigaid (1976) realizaron un estudio con *S. helianthus* demostrando que los eritrocitos humanos (12,000 HU) fueron más sensibles a la toxina que los eritrocitos de rata (30,000 HU), los resultados fueron indicados en unidades de hemólisis (HU) necesarias para lograr el 100% de hemólisis. Estos autores sugieren que la esfingomiélin es el receptor membranal específico de la toxina. Rottini *et al.*, (1995), en un estudio realizado con las toxinas de *Carybdea marsupialis*, sugieren que los carbohidratos son el vínculo receptor de la toxina, mientras que la esfingomiélin está implicada en la formación del poro.

La peroxidación lipídica también muestra una respuesta dependiente de la concentración del extracto crudo, en ambos casos (rata y humano) se obtuvo a la misma concentración del veneno. En un estudio previo realizado con la anémona *Bartholomea annulata* (Santamaría *et al.*, 2002) se observó que esta especie emplea el estrés oxidativo como una estrategia tóxica. Las respuestas hemolítica y de peroxidación lipídica en eritrocitos de ratón también fueron dependientes de la concentración del extracto crudo para *B. annulata*, obteniéndose a la misma concentración (0.150 mg proteína/ml) ambos efectos, hemólisis y peroxidación lipídica, lo que sugiere que la respuesta peroxidativa contribuye al efecto hemolítico. A diferencia de los resultados obtenidos por Santamaría *et al.* (2002) con *B. annulata*, los datos obtenidos en este estudio con *S. helianthus* muestran que el daño oxidativo no es la causa primaria de la hemólisis, dado que se requiere una mayor concentración del extracto crudo

Evaluación de la actividad biológicas de las toxinas de la anémona *Stichodactyla helianthus* para causar la respuesta oxidativa, en relación a la cantidad necesaria del extracto crudo para causar la hemólisis.

CONCLUSIONES

- El método utilizado para la extracción del extracto crudo fue eficiente al obtenerse una gran cantidad de nematocistos descargados, lo cual pudo corroborarse al microscopio.
- La metodología empleada para la purificación del extracto crudo de *S. helianthus* demostró ser eficiente para la separación de sus compuestos, debido a que en el bioensayo neurotóxico se potenció la actividad.
- El extracto crudo de *S. helianthus* al 5% mostró actividad antibacteriana en la cepa de *Aeromona hydrophila* ATCC 49140 con un halo de inhibición bien diferenciado. Por el contrario, las fracciones pre-purificadas mostraron un pequeño y poco perceptible halo de inhibición.
- La dosis letal media (LD₅₀) en peces de la especie *Oreochromis niloticus* se obtuvo con una concentración del extracto crudo de *S. helianthus* de 25 mg/kg. El 100% de mortalidad se alcanzó con una dosis de 50 mg/kg.
- Las branquias de *Oreochromis niloticus* fueron el principal órgano dañado por la actividad citotóxica tanto del extracto crudo, como de las fracciones pre-purificadas, observándose hipertrofia, hiperplasia y aumento del flujo sanguíneo.
- En el hígado y el bazo se presentó la misma actividad citotóxica con el extracto crudo y con las fracciones pre-purificadas. En el hígado se observó vacuolación, hiperemia y aumento del flujo sanguíneo. En el bazo se registró un incremento en los centros melanomacrófagos. En cerebro no se presentó ningún daño.

- La actividad neurotóxica evaluada en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* fue menor con el extracto crudo que con nueve de las fracciones pre-purificadas.
- La actividad hemolítica en eritrocitos de rata y eritrocitos humanos es dependiente de la concentración del extracto crudo. Al aumentar la concentración del extracto crudo se observó un incremento en la liberación de la hemoglobina. Los eritrocitos humanos fueron mucho más sensibles a las toxinas que los de rata. El ~100% de hemólisis se obtuvo con sólo 0.094 mg proteína/ ml, en comparación con los 0.3783 mg proteína/ml empleados para causar el ~100% de hemólisis en eritrocitos de rata.
- La peroxidación lipídica también mostró una respuesta dependiente de la concentración del extracto crudo, para ambos tipos de eritrocitos. Se concluyó que el daño oxidativo no es la causa primaria de la hemólisis.

APÉNDICE I

1. Generalidades del Phylum Cnidaria

Este phylum incluye a las hidras de agua dulce, las medusas, los corales y las anémonas.

Son organismos diblásticos, poseen un ectodermo y un endodermo separados por una capa gelatinosa llamada mesoglea.

Poseen una simetría radial, pueden presentar o no alternancia de generaciones (fase polipoide y/o medusoide).

Su principal característica es la presencia de células llamadas cnidocistos, las cuales producen orgánulos denominados nematocistos, espirocistos y picocistos.

Los cnidocistos se encuentran esparcidos por toda la epidermis y son especialmente abundantes en los tentáculos. Los nematocistos los emplean para capturar a sus presas y para defenderse de sus depredadores. Los espirocistos son característicos de las anémonas y son los encargados de entrelazar a sus presas. Los picocistos son distintivos de las "anémonas tubo" y su función es adhesiva para construir el tubo en el que viven. (Barnes, 1997 ; Brusca y Brusca, 1990).

1.1 Clase Anthozoa

Esta clase incluye a las anémonas, los corales y las plumas de mar. Son organismos polipoides exclusivamente marinos, solitarios y/o coloniales (Brusca y Brusca, 1990). La boca conduce a una faringe tubular, la cual deriva del ectodermo invaginado. La cavidad gastrovascular está dividida por tabiques o mesenterios longitudinales. Las gónadas son gastrodérmicas y los nematocistos no poseen opérculo ni cnidocilo (Barnes, 1997).

Las anémonas habitan aguas costeras, siendo abundantes en aguas tropicales. Viven adheridas a rocas, conchas, corales, etc. La mayor parte del cuerpo está formada por una fuerte columna, en el extremo aboral presentan un disco pedal

Evaluación de la actividad biológicas de las toxinas de la anémona *Stichodactyla helianthus*

aplanado que les sirve para fijarse al sustrato. El extremo oral en forma de disco presenta tentáculos, en el centro del cual se encuentra la boca (Barnes, 1997).

APÉNDICE II

Taxonomía de *Stichodactyla helianthus*

- **Phylum** Cnidaria
 - **Clase** Anthozoa
 - **Subclase** Hexacorallia (Zoantharia)
 - **Orden** Actinaria
 - **Familia** Stichodactylidae
 - **Género** *Stichodactyla*
 - **Especie** *helianthus* (Ellis, 1768)

(<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/classification/Stichodactylidae.html#Stichodactylidae>)

APÉNDICE III

3. Generalidades de los nematocistos

3.1 Estructura general

Cápsula con un filamento interior hueco y enrollado en espiral; su tamaño es variable (3 μm hasta 100 μm de longitud). El filamento descargado puede variar en longitud, diámetro y estructura, generalmente presenta espinas de diferente forma y tamaño, lo cual permite identificar el tipo de nematocisto.

3. 2 Clasificación

Weill (1930, 1940 citado en Mariscal, 1974) elaboró un sistema de nomenclatura basado en las características morfológicas del filamento.

3.2.1 Nematocistos. La cápsula posee una doble pared y contiene un filamento ornamentado con espinas, son los que inyectan las toxinas.

3.2.2 Espirocistos. Presentan una cápsula delgada de una sola membrana, tienen un filamento enrollado sin espinas.

3.2.3 Picocistos. Son exclusivos de la clase anthozoa, presentan cápsulas alargadas y sus filamentos carecen de espinas.

APÉNDICE IV

4. Técnicas de tinción Hematoxilina y Eosina

Xilol 1	5 minutos
Xilol 2	5 minutos
Alcohol absoluto	10 minutos
Alcohol 96%	5 minutos
Agua destilada	10 minutos
Hematoxilina	5 minutos
Agua de la llave	5 minutos
Alcohol ácido	1 minuto
Eosina	1 minuto
Alcohol 96%	2 minutos
Alcohol absoluto	2 minutos
Alcohol absoluto	2 minutos
Xilol 3	5 minutos
Xilol 4	5 minutos

Montaje de la placa usando Bálsamo de Canadá.

4.1 Preparación de reactivos

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina 3 g

Oxido rojo de mercurio 1.5 g

Sulfato de aluminio y potasio (o amonio) alumbre 60 g

Alcohol etílico absoluto 30 mL

Agua destilada 600 mL

Se disuelve la hematoxilina en alcohol absoluto, calentando a baño maría y tapándolo; en otro recipiente se disuelve el alumbre en 300 mL de agua destilada; se mezclan las soluciones y se añaden los 300 mL de agua destilada restante. Se hierve la mezcla y se agrega el óxido de mercurio cuidadosamente (puede explotar) hasta que la solución adquiera un color púrpura. En seguida se enfría con hielo y se filtra diez veces. Se le agregan de tres a cinco gotas de ácido acético por cada 10 mL de solución.

NOTA: debe filtrarse cada vez que se usa y guardarse en un frasco ámbar.

Alcohol-Ácido

Alcohol etílico 96% 700 mL

Agua destilada 300 mL

Ácido clorhídrico 10 mL

Solución madre de Eosina

Eosina 1 g

Alcohol 96% 100 mL

Solución de trabajo de Eosina

Solución madre de Eosina 80 mL

Alcohol 70%

Ácido acético 5 mL

REFERENCIAS

ALVAREZ, C., Lanio, M.E., Tejuca, M., Martínez, D., Pazos, F., Campos, A.M., Encinas, M.V., Pertinhez, T., Schreier, S., Lissi E.A. 1998. The role of ionic strength on the enhancement of the hemolytic activity of Sticholysin I, a cytolysin from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 36:165-178.

ALVAREZ, C., Pazos, F.I., Lanio, M.E., Martínez D., Schreier, S., Casallanovo, F., Campos, A., Lissi E. 2001. Effect of pH on the conformation, interaction with membranes and hemolytic activity of sticholysin II, a pore forming cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 39: 539-553.

ANDERLUH, G., Maček, P. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria). *Toxicon* 40: 111-124.

ÁVILA, A.D, Mateo de Acosta, C., Lage, A., 1988. Anew immunotoxin built by linking a hemolytic toxin to a monoclonal antibody specific for immature T lymphocytes. *Int. J. Cancer* 142, 568-571.

BARNES, R.D. 1997. *Zoología de los invertebrados*. Quinta edición. McGraw-Hill. pp 957.

BASULTO P.A., Casadelvalle, P.I., Otero, G.A., Pico, B.M. 2006. Sticholysin II, a cytolysin isolated from the caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*, interacts with serum lipoproteins, Freund adjuvant and specific antibodies to this protein. *Rev. Invest. Mar.* 29: 41-48.

BERNHEIMER, A.W., Avigad, L.S. 1976. Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73: 467-471.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 48-254.

BRAEKMAN, J.C., Daloz, D. 1983. *Los Medicamentos del Mar.* Mundo Científico 26: 42-57.

BRETSCHER, M.S. 1973. Membrana Structure: Some General Principles. *Science* 181: 622-629.

BRUSCA, R.C., Brusca, G.J. 1990. *Invertebrates.* Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. pp 922.

CASTAÑEDA-PASARÓN, O. 2000. Toxinas animales: acciones facilitadoras de la transmisión colinérgica. *Rev.Biol.* 14: 1-14.

CLINE, E.I., Wiebe, L.I., Young, J.D., Samuel, D. 1995. Toxic effects of the novel protein Upl from the sea anemone *Urticina piscivora* (Sebens and Laakso). *Pharm. Sci.* 1: 155 – 162.

DE LOS RIOS, V., Mancheño, M.J., Martínez, P.A., Alfonso, C., Rivas, G., Oñaderra, M., Gavilanes, G.J. 1998. Sticholysin II, a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*, is a monomer-tetramer associating protein. *FEBS Letters* 455: 27-30.

DEVLIN, J.P. 1974. Isolation and partial purification of hemolytic toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*. *J. Pharm. Sci.* 63: 1478 – 1480.

DÍAZ C.A., Brito, M.A., Tejuca, M., Álvarez C., Lanio, M.E, Almagro, D., Estrada, M. 1999. Efecto agregante plaquetario de 2 citolisinas: StI y St II purificadas de la anémona marina *Stichodactyla helianthus*. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 15:182-189.

Evaluación de la actividad biológicas de las toxinas de la anémona *Stichodactyla helianthus*

ENCARNACIÓN, D. R., Franzblau, S. G., Tapia, C. A., Cedillo-Rivera, R. 2007. Screening Of Marine Organisms For Antimicrobial And Antiprotozoal Activity, *Pharmaceutical Biology*, 38:5, 379 – 384.

FRIESE, E.U. 1993. *Sea anemones...as hobby*. T.F.H. Publications, Inc. USA. pp 320.

GARATEIX, A. 2005. El mar: fuente de nuevos fármacos. *Elementos* 58: 39-47.

GARATEIX, A., Salceda, E., Aneiros, A., Soto, E. 2003. *Bunodosoma granulífera*: fuente de péptidos con acción sobre canales iónicos. *Avicennia* 16: 13-21.

GARRIDO-PETIERRA. A. 2002. Genética molecular de la deficiencia eritrocitaria humana en piruvato quinasa. Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. pp 77. (www.ucm.es/BUCM/tesis/far/ucm-t25661.pdf)

GEL FILTRATION. 2000. *Principles and Methods*. 6ª. Ed. Pharmacia Biotech. 102 pp.

GIRARD, J.P y Payan, P. 1980. Ion exchanges through respiratory and chloride cells in freshwater and sea water adapted teosteons. *Am. J. Physio.* 238: 260-268.

HALSTEAD, B.W. 1978. *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World*. The Darwin Academic Press Inc. New Jersey. pp 301.

<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/classification/Stichodactylidae.html#Stichodactylidae>

HUERTA, V., Morera, V., Guanche, Y., China, G., González, L.J., Betancourt, L., Martínez, D., Álvarez, C., Lanio, M.E., Besada, V. 2001. Primary structure of two cytolysin isoforms from *Stichodactyla helianthus* differing in their hemolytic activity. *Toxicon* 39: 1253-1256.

HUMANN, P., Deloach, N. 2002. Reef creature identification. 2nd. New World Publications, Inc. Florida, USA. pp. 448.

KASS-SIMON, G., Scappaticci, A.A. 2002. The behavioral and developmental physiology of nematocysts. Can. J. Zool. 80: 1772-1794.

KEM, W.R. 1988. Sea anemone toxins: Structure and action. In: Hessinger, D.A., Lenhoff, M.H. (Eds.), The Biology of Nematocysts. Academy Press, San Diego, pp 375 – 405.

KEM, W.R., Dunn, B.M. 1988. Separation and characterization of four different amino acid sequence variants of a sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolyisin. Toxicon 26, 997-1008.

KEM, R.W., Parten, B., Pennington, W.M., Price, A.D., Dunn, M. 1989. Isolation, characterization and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. Biochemistry 28: 3483-3489.

LANIO, M.E., Morera, V., Álvarez C., Tejuca, M., Gómez, T., Pazos, F., Besada, V., Martínez, D., Huerta, V., Padrón, G., Chávez, M. 2001. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. Toxicon 39: 187-194.

LEHMANN, A.L. 1980. *Dosis Letal Media: un cálculo manual fácil y rápido*. Archivos de farmacología y toxicología 6:161-178.

MAHNIR, V.M., Shumilov, U.N., Kovalevskaya, A.M, Romanemko, L.A., Grebelny, S. D. 1993. Evidence for several types of biologically active substances in north Pacific sea anemones. Comp. Biochem. Physiol. 106: 661-665.

MANCHEÑO, J., De Los Ríos, V., Martínez, P.A., Lanio, M.E., Oñaderra, M., Gavilanes, G. J. 2001. Partially folded status of the cytolytic protein sticholysin II. *Biochim. Biophys. Acta* 1545: 122-131.

MARISCAL, R.N. 1974. Nematocysts. *In*: Muscatine, L. & H. Lenhoff (Eds.). *Coelenterate Biology*. Academic Press Inc., London, pp 129-178.

MARTÍNEZ, D., Campos, A.M., Pazos, F., Álvarez, C., Lanio, M.E., Casallanovo, F., Schreier, S., Salinas, R.K., Vergara, C., Lissi, E. 2001. Properties of St I and St II, two isotoxins isolated from *Stichodactyla helianthus*: a comparison. *Toxicon* 39:1547-1560.

MARTÍNEZ, D., Morera, V., Alvarez, C., Tejuca, M., Pazos, F., García, Y., Paida, M., Padrón, G., Lanio, M.E. 2002a. Identity between cytolytins purified from two morphos of the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 40: 1219-1221.

MARTÍNEZ, D., Soto, C., Casallanovo, F., Pazos, F., Álvarez. C., Campos, A.M., Schereier, S., Lanio, M.E., Lissi, E. 2002b. Influencia del estado de fase de la membrana sobre la asociación de Sticholysina II, una toxina formadora de poros de *Stichodactyla helianthus*. *Rev. Biol.* 16: 85-92.

MARTÍNEZ, D., Álvarez, C., Tejuca, M., Pazos, F., Valle, A., Calderón, L., Ros-Quincoces, U., Díaz, I., Pentón, D., Lanio, M.E. 2006. Los lípidos de la membrana actúan como moduladores de la actividad permeabilizante de Sticholisina II, una toxina formadora de poros con aplicaciones biomédicas. *BA.* 23: 251- 254.

MARTÍNEZ-PEREDA, C.J.A. 1996. La Perfusión de branquias como modelo de valoración de la calidad de agua y su relación con la producción intensiva de truchas. Tesis Doctoral. Facultad de veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. pp 142.

MEBS, D. 2002. *Venomous and Poisonous Animals: a handbook for biologists, toxicologists and toxinologists, physicians and pharmacists*. Medpharm Scientific Publishers. Stuttgart, Alemania. pp 329.

MERINO, M., L. Otero, 1991. *Atlas Ambiental Costero, Puerto Morelos - Quintana Roo*. Ed. por el Centro de Investigaciones de Quintana Roo, México. pp 80.

MORALES-LANDA, J.L., Zapata-Pérez, O., Cedillo-Rivera, R., Segura-Puertas, L., Simá-Álvarez, R., Sánchez-Rodríguez, J. 2007. Antimicrobial, antiprotozoal and toxic activities of cnidarian extracts from the mexican Caribbean sea. *Pharm. Biol.* 45: 37-43.

MORRIS, H., Baslow, D. 1969. *Marine Farmacology. A study of toxins and other biologically active substances of marine origin*. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, USA, pp 100-115.

PAZOS, F., Álvarez, C., Lanio, M.E., Martínez, D., Morera, V., Lissi E.A. 1998. Modification of Sticholysin II hemolytic activity by free radicals. *Toxicon* 36: 1383-1393.

PAZOS, F., Martínez, D., Tejuca, M., Valle, A., Del Pozo, A., Álvarez, C., Lanio, M.E., Lissi, E.A. 2003. Comparison of pore-forming ability in membranes of a native and a recombinant variant of Sticholysin II from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 42: 571-578.

PICO, C., Basulto, A., Del Monte, A. Hidalgo, A., Lanio, M.E, Álvarez, C., Felicó, E., Otero, A. 2004. Cross-reactivity and inhibition of haemolysis by polyclonal antibodies raised against St II, a cytolyisin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 43:167-171.

RÍOS, C., Santamaría, A. 1991. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem. Res.* 16: 1139-1143.

ROTTINI, G., Gusmani, L., Parovel, E., Avian., M., Patriarca, P. 1995. Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Toxicon* 33: 315-326.

RUIZ-RENTERÍA, F., Van Tussenbroek, B.I., Jordan Dahlgren, E. 1998. Puerto Morelos, Quintana Roo, México. En: Caribbean Coral Reef, seagrass and mangrove sites. B. Kjerve (Ed.) UNESCO, Paris, pp 374.

SAMEJINA, Y., Yanagisawa, M., Aoki-Tomomatsu, Y., Iwasaki, E., Ando, J., Mebs, D. 2000. Amino acid sequence studies on cytolytic toxins from anemone *Heteractis magnifica*, *Entacmaea quadricolor* and *Stichodactyla mertensii* (Anthozoa). *Toxicon* 38: 259 – 264.

SANTAMARÍA, A., Sánchez-Rodríguez, J., Zugasti, A., Martínez, A., Galván-Arzate., Segura-Puertas, L. 2002. A venom extract from the sea anemone *Bartholomea annulata* produces haemolysis and lipid peroxidation in mouse erythrocytes. *Toxicology* 173: 221-228.

SOBRINO, A.S. 1996. Detección de sustancias bioactivas en organismos bentónicos del Golfo de Tehuantepec. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. pp 69.

SOUTHCOTT, R.V. 1979. Marine Toxins. pp 25-106 In: Handbook of Clinical Neurology. Vinken P.J. and G:W: Brown (Eds). Elsevier/North-Holland. Publishing. Company. Germany. pp 25-106

TEJUCA, M., Dalla, S.D., Ferreras, M., Lanio, M.E., Menestrita, G. 1996. Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolytin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 35: 14947-14957.

TORRENS, R.E. 2004. Aislamiento y purificación de proteínas con actividad hemolítica y neurotóxica de la cubomedusa *Carybdea marsupialis* (Lineé 1758). Tesis de Maestría. Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 94.

WILLIAMSON, J.A., Fenner, P.J., Burnett, J.W., Rifkin J.F. (Eds.). 1996. Venomous and Poisonous Marine Animals. A medical and biological handbook. University of New South Wales Press, Sydney. pp 504.

ZUGASTI, C.A. 2001. Caracterización toxinológica de péptidos bioactivos de la anémona *Bartholomea annulata*. Tesis de Maestría. Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 77.