



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO PRELIMINAR DE TRES
ESPECIES DE PEPINO DE MAR DE LA FAMILIA
HOLOTHURIIDAE DE LAS COSTAS DE YUCATÁN COMO
FUENTE POTENCIAL DE COMPUESTOS
ANTIPARASITARIOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACO
BIOLOGA**

**P R E S E N T A
Ma. Margarita Acosta Ruiz**



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Aguilar Laurents María Isabel**

VOCAL: **Profesor: Gutiérrez Ramos Abel**

SECRETARIO: **Profesor: Rodríguez Morales Sergio**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Cordero Hernández José**

2° SUPLENTE: **Profesor: Fragoso Serrano Mabel Clara**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD QUÍMICA-SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

Rodríguez Morales Sergio _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

López Aguiar Korynthia _____

SUSTENTANTE:

Acosta Ruiz Ma. Margarita _____

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi gran familia y amigos, de los cuales,
aunque muy lejos estaba, no me olvide ni un instante

A mi mama, que adoro con toda el alma y me ejemplo a seguir

A mi papa, mi Ángel de la guarda que amo profundamente y extraño

Martin, Roxy y Fer

Daniel, Anita, Manolo y Danny

Manuel, Ángela, Chino e Itzel

Francisco, Paola, Aza y Paquito

A mi presente y futuro, Lalo

A mis padrinos y familia, Sergio Campos y Lourdes Valdez

AGRADECIMIENTOS

Estar lejos no fue fácil, pero tampoco imposible, la vida te pone en tu camino personas que te ayudan a serlo más liviano. No puedo negar que fue una experiencia increíble, de la cual aprendí mucho en todos los aspectos. Sin embargo el apoyo de mi familia fue un punto clave para concluir este gran proyecto de vida.

A mis padres, mi papá que ha sido y seguirá siendo el resto de mi vida mi Ángel que me protege y se que desde donde esta me llena de bendiciones. A mi mamá, por brindarme todas las posibilidades para llegar a ser quien soy, ser mi fuerza motivadora, por haberme dado las alas que necesitaba para poder volar. Ya que este logro alcanzado lo hicimos las dos. Martin, Daniel, Manuel, Francisco, con su respectiva familia, les agradezco el estar al pendiente de mí y mamá durante todo este proceso. Roxy tu apoyo ha sido importante y gracias por escucharme y apoyarme. Chinito fuiste el único de la familia que conoció Sisal, como olvidar esos cocodrilos, lindas vacaciones. Itzel bueno aunque solo tuvimos contacto por Messenger, también estuviste al pendiente de cómo me iba; Manolo, Danny, Fer, Aza, Paquito; gracias por siempre preguntar cómo estaba y por extrañarme. A mis padrinos y familia, de los cuales siempre hemos recibido apoyo incondicional durante todo este tiempo.

Agradezco a esa personita tan especial e importante en mi vida, de la cual siempre he recibido amor, comprensión y apoyo incondicional. La experiencia de vida que nos toco vivir en Tierras Sisalescas, aunque muy fuerte y difícil fue, también te lo tengo que agradecer porque gracias a eso valore muchas cosas. En mi presente y futuro estás tú....."FUTURO MANEJADOR, LALO". Sin duda alguna debo agradecer a la persona que dio vida a este gran ser, Roció Martínez; y también por todo el apoyo y las palabras de aliento que me brindaste durante este proceso.

Durante la carrera encontré a muchos compañeros, a los cuales los aprecio, pero en especial encuentras amigos. Los cuatro inseparables, Estrella, Pedro, Mario y Yo; con los cuales compartí muchos gratos y muy buenos momentos; mi Hermosita con la cual compartí clases, estancia; gracias por siempre estar ahí apoyándome y regañándome cuando ha sido necesario; no puede faltar Tere, una persona que contagia su buen humor y buena vibra, inolvidables esos días de clase en el laboratorio de analítica; Yasita como dejar de lado tu estado de cero estrés, cualidad que nunca pude copiarte pero era admirable, tu honestidad y tolerancia. Ana diablo, como olvidarla, una persona con la cual también estoy agradecida por aquellos buenos momentos que pasamos, como estudiantes en la facultad, en Sisal, etc. Luciérnaga increíbles esos días en perinato, los pasos de baile que tenemos memorizados, el viaje a Sisal, por eso y tu gran apoyo gracias. Al Güero y a Jaki, aunque no nos frecuentamos seguido se que estuvieron ahí y han estado cerca de mí, deseándome lo mejor así como yo a ellos. Ahora solo quedan todos estos buenos momentos, como bien dicen por ahí, el recordar es vivir...

A mi asesor Sergio, ya que desde el primer momento en el cual pise tierras Yucatecas tuve un gran apoyo en todos los sentidos.

Al Dr. Francisco Solís Marín, pieza fundamental para la identificación taxonómica del pepino de mar. ICMYL, UNAM

A la Dra. Rocy Moo Puc y Moisés, por la ayuda con las pruebas de actividad antiparasitaria. IMSS UADY, Yucatán.

A la M.C. Iveth Gabriela Palomino Albarrán y a Patricia Balam Uc por servirnos de artemias y por prestarnos su área de trabajo para concluir con la prueba. Alimento vivo, UMDI.

Al Ingeniero Richard Mena, al Biólogo Gamboa, a la M.C. Korynthia López y a todos los pescadores, por participar durante la colecta de pepino de mar.

A los chavitos del CETMAR, Clara y Leonardo, que me ayudaron durante mi estancia de 1 mes.

Gracias a todos, lo único que acierto a decir es gracias por todo el apoyo que me han brindado en el transcurso de mi vida, por toda la ayuda recibida ya que ha hecho más ligero mi camino y ahora que hago realidad uno de mis mas grandes metas quiero agradecer todo el amor, paciencia y comprensión para conmigo; por todo y mucho mas.....gracias.

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	6
III. OBJETIVO GENERAL	7
3.1 Objetivos particulares	7
IV. HIPÓTESIS	7
V. MARCO TEORICO	8
5.1. Obtención de nuevos fármacos	8
5.1.1. Nuevas tendencias en el descubrimiento de fármacos	8
5.1.2. Productos naturales de origen marino	9
5.2. Equinodermos	12
5.2.1. Pepino de mar	13
5.2.1.1. Generalidades	13
5.2.2. Taxonomía	15
5.2.3. Ubicación geográfica	16
5.2.4. Productos naturales aislados del pepino de mar	17
5.3. Parasitosis y su tratamiento	19
5.3.1. Productos naturales de origen marino con actividad antiparasitaria	21
5.3.2. Tricomoniasis	22
5.3.2.1 Epidemiología	24

5.3.2.2. Ciclo biológico	24
5.3.2.3. Patología	25
5.3.3. Giardiasis	26
5.3.3.1. Epidemiología	27
5.3.3.2. Ciclo biológico	27
5.3.3.3 Patología	29
5.3.4. Amibiasis	29
5.3.4.1. Epidemiología	29
5.3.4.2. Ciclo biológico	30
5.3.4.3. Patología	32
VI. METODOLOGIA.....	33
6.1. Material y equipo utilizado	33
6.2 Colecta de los especímenes de Pepino de mar	34
6.2.1 Localización de la zona de muestreo	34
6.2.2. Recolección, preservación e identificación taxonómica	35
6.2.3. Descripción y distribución de la especie	37
6.2.3.1. <i>Holothuria floridana</i>	37
6.2.3.2. <i>Holothuria grisea</i>	38
6.2.3.3. <i>Híbrido, H. floridana-H. mexicana</i>	39
6.3 Aislamiento y purificación de los componentes de los diferentes holotúridos colectados	40
6.3.1 Generación de los extractos generales	40
6.3.2 Prefraccionamiento mediante partición líquido-líquido	41
6.3.3 Primer fraccionamiento mediante columna Flash	41
6.3.4 Fraccionamiento mediante columna seca a vacío (Dry Column Chromatography)	42
6.3.5 Separación con Extracción de Fase Sólida (SEFS,SPE en inglés)	44

6.3.6 Separación del extracto activo mediante HPLC analítico	45
6.4. Ensayos de actividad	46
6.4.1. Determinación de la actividad tóxica de los extractos en nauplio del crustáceo <i>Artemia salina</i> en microplaca	46
6.4.2 Actividad antiparasitaria	47
6.4.3. Evaluación de la actividad hemolítica, modificado de Torres	49
VII. RESULTADOS Y DISCUSION	51
7.1. Pepinos de mar estudiados	51
7.2.1. Prefraccionamiento mediante partición líquido-líquido	53
7.2.2. Primer fraccionamiento mediante cromatografía en columna rápida (Flash Column Chromatography)	54
7.2.3. Fraccionamiento mediante columna seca al vacío (Dry Column Chromatography)	56
7.2.4. Separación con Extracción de Fase Sólida (SEFS)	58
7.2.5. Separación del extracto activo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) analítico	60
VIII. CONCLUSIONES	64
IX. BIBLIOGRAFÍA	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de las recolectas de pepino de mar	35
Tabla 2. Fracciones obtenidas a partir del extracto del <i>Híbrido</i> mediante cromatografía rápida en columna	43
Tabla 3. Fracciones obtenidas a partir del extracto crudo del <i>Híbrido H. floridana X H. mexicana</i>	45
Tabla 4 Ensayo de actividad contra parásitos	48
Tabla 5 Procedimiento de la evolución de actividad hemolítica	50
Tabla 6. Pesos de las especies de pepino de mar colectados	52
Tabla 7. Efecto de los extractos crudos de los diferentes pepinos de mar colectados, sobre <i>A. salina</i> , <i>G. intestinalis</i> y <i>T. vaginalis</i> .	53
Tabla 8. Datos de rendimiento y actividad biológica de los extractos generados por el prefraccionamiento Líq-Líqu, a partir del <i>Híbrido</i> .	54
Tabla 9. Subfracciones obtenidas a partir del extracto crudo del <i>Híbrido</i>	55
Tabla 10. Datos de actividad biológica de los extractos generados por el prefraccionamiento mediante cromatografía en columna rápida, partiendo del <i>Híbrido</i> .	55
Tabla 11. Fracciones obtenidas a partir del extracto crudo del <i>Híbrido (H. floridana- H. mexicana)</i>	56
Tabla 12. Datos de actividad biológica de los extractos generados por el prefraccionamiento mediante cromatografía en columna seca al vacío rápida	57
Tabla 13. Datos de rendimiento y actividad biológica de los extractos generados por el prefraccionamiento mediante SEFS	59
Tabla 14. Resultados de la separación de la F2 mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la trabectedina, anticancerígeno de amplio espectro	11
Figura 2 a) Vista externa de pepino de mar	14
Figura 2 b) Vista interna de pepino de mar	14
Figura 3. Moléculas bioactivas aisladas del pepino de mar	18
Figura 4. Estructura del holostano	19
Figura 5. Estructura de la 17-dehidroxiholoturinosida A (a), Griseasida A (b) moléculas aisladas de pepino de mar, <i>Holoturia grisea</i>	19
Figura 6. Estructura química del ácido kaínico	21
Figura 7. Porcentaje de compuestos aislados de organismos marinos divididos por clase química	22
Figura 8. Diferentes clases químicas de productos naturales antiparasitarios aislados de organismos marinos	23
Figura 9. Ciclo biológico de <i>Trichomona vaginalis</i>	25
Figura 10. Ciclo biológico de <i>Giardia intestinalis</i>	28
Figura 11. Ciclo biológico de <i>Entamoeba histolytica</i>	31
Figura 12 Zonas de muestreo en las costas de Yucatán	34
Figura 13. Foto de <i>H. floridana</i> , mostrando a un espécimen característico, espículas presentes en celoma	38
Figura 14. Foto de <i>H. grisea</i> , mostrando a un espécimen característico, espículas presentes en celoma	39
Figura 15. Foto de <i>H. mexicana</i> , mostrando a un espécimen característico, espículas presentes en celoma	40

Figura 16 Diagrama de flujo de la partición liquido-liquido del extracto metanólico	42
Figura 17 Esquema de montaje para el fraccionamiento mediante columna seca a vacío.	44
Figura 18 Fotos de los pepinos de mar colectados	51
Figura 19 Cromatograma primera corrida de la separación del extracto F2	61
Figura 20 Cromatograma optimizado para la separación del extracto F2	62

ABREVIATURAS

A(0%)	Absorbancia del control negativo
A(100%)	Absorbancia del control positivo
AcCN	Acetonitrilo
AcOet	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
AH(%)	Porcentaje de actividad hemolítica
Am	Absorbancia de la muestra
BuOH	Butanol
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CH₂Cl₂	Diclorometano
DCM	Diclorometano
DL₅₀	Dosis Letal 50
DMSO	Dimetil Sulfóxido
F2	Fracción 2
F3	Fracción 3
F4	Fracción 4
F5	Fracción 5
H₂O	Agua
HPLC/ CLAR	Cromatografía de Líquido de Alta Resolución
IC₅₀	Concentración Inhibitoria 50
MeOH	Metanol
MgCl₂	Cloruro de magnesio
NaCl	Cloruro de sodio

p/v	Peso/volumen
r.f.	Factor de retención
rpm	Revoluciones por minuto
SEFS	Separación con extracción en fase sólida
SSI	Solución Salina Isotónica
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
µg	Microgramos
µL	Microlitros

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias representan un serio impacto en el mundo, tanto en salud como en lo económico. En la literatura está reportado que al menos la mitad de la población mundial está infectada por un parásito, por ejemplo, tres protozoarios infectan a un tercio de la población mundial: *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomona vaginalis*. *G. intestinalis* parásita el intestino del ser humano causando diarrea y mala absorción de nutrientes, su prevalencia es principalmente en niños, disminuyendo su crecimiento y desarrollo.¹ La infección por *Entamoeba histolytica*, se encuentra en todo el mundo, es un comensal del intestino grueso, que en ocasiones invade la mucosa intestinal, y puede invadir hígado y otros órganos. La tricomoniasis vaginal es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuente, con más de 5 millones de casos reportados en EU en el 2003, que puede derivar en cáncer cérvico uterino en mujeres e infertilidad en hombres.² Como alternativas terapéuticas para estas enfermedades se han utilizado el Metronidazol, el Tinidazol y los Bencimidazoles antihelmínticos. Sin embargo, sus efectos secundarios y su variabilidad en la actividad evitan su eficacia, dando como resultado la aparición de cepas resistentes a dichos fármacos.³ Problema que se agrava debido a la escasa investigación en el área, que sólo ha desarrollado un fármaco en los últimos 49 años, convirtiéndose en un área de investigación de prioridad mundial en salud pública. Por lo anterior, existe la necesidad de obtener compuestos que eliminen a los parásitos responsables de enfermedades.

La búsqueda de nuevos fármacos y de estructuras moleculares novedosas con fines terapéuticos se ha incrementado considerablemente en los últimos años.

La existencia de enfermedades para las cuales no existen fármacos efectivos, la resistencia de los agentes patógenos, los avances en las técnicas de biología molecular que han propiciado la identificación de un número cada vez mayor de moléculas "blanco" y la correlación de anomalías estructurales y funcionales a nivel de receptores y canales iónicos con diferentes patologías, son algunos de los factores que han impulsado el interés en la búsqueda de nuevos fármacos capaces de ejercer acciones específicas y potentes.

Generalmente, lo que se descubre no es un fármaco, sino un compuesto o molécula líder, es decir, una molécula que posee características interesantes de actividad. Una vez encontrada y definida la molécula líder se lleva a cabo la modificación de su estructura, con el objetivo de hallar nuevos y mejores fármacos con actividad selectiva y específica, mejor disponibilidad, menor toxicidad y reacciones secundarias mínimas. Para descubrir nuevas moléculas líderes, se recurre a cuatro estrategias:

- 1) Modificación y optimización de una molécula activa, p.e. el diseño racional asistido por computadora.
- 2) Prueba sistemática de grupos de moléculas, elegidas arbitrariamente en bioensayos seleccionados, p.e. los bioensayos de alto volumen (HTS, por su siglas en inglés)
- 3) Exploración retroactiva de la información biológica, principalmente en plantas y bacterias
- 4) El diseño racional basado en el conocimiento de la causa molecular de la disfunción patológica.

En los últimos veinte años el mar se ha convertido en una de las principales fuentes naturales de moléculas bioactivas.⁴ Los organismos marinos están sometidos a condiciones únicas, lo que provoca que sinteticen moléculas que no tienen equivalencia con las terrestres.

La originalidad de las estructuras de los productos marinos y sus potentes actividades biológicas pueden constituir prototipos para posteriores modificaciones que nos puedan conducir al desarrollo de fármacos en áreas terapéuticas concretas, un ejemplo de estas investigaciones son el Prialt, que se aplica para tratamientos analgésicos en casos de enfermedades terminales, ya que multiplica cientos de veces la eficacia de la morfina con mejor tolerancia, y Yondelis, primer compuesto natural marino aprobado para el tratamiento del cáncer.⁵

Además, la potencialidad de los océanos como fuente de nuevos compuestos aún no ha sido explorada: cerca del 80% de los organismos vivos del reino animal habitan en el mar y, sin embargo, menos del 1% de las especies marinas han sido investigadas con este propósito. Por otra parte, la mayoría de los compuestos aislados de organismos marinos presentan actividad biológica potente mediante mecanismos no clásicos.

Dentro de los grupos de organismos marinos que se han estudiado, la atención se centra en especies que poseen cuerpo blando, sésiles o de movimiento lento, quienes solo se pueden defender liberando sustancias químicas que los ayudan contra sus depredadores o bien para mantener el espacio, principalmente. A este grupo de organismos pertenecen los equinodermos (Phylum Equinodermata), que agrupa principalmente a los Ofiuroideos, lirios, estrellas, erizos, margaritas, pepinos de mar, y se consideran el grupo de invertebrados marinos más común y probablemente también el más popular del litoral mexicano.⁶

Uno de los organismos que se ha estudiado desde tiempos ancestrales en Asia, es el pepino de mar. Estos se consumen como alimento, principalmente como polvo seco llamado Trepang, de alto valor en el mercado asiático.

Además, representan beneficios para la salud, ya que se ha reportado que contienen moléculas que han presentado diferentes bioactividades: antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antiinflamatoria, antiarteriosclerótica y antioxidante, entre otras.⁷

Un ejemplo de lo anterior, es la extracción de saponinas presentes en la piel y órganos internos de algunas especies de holoturoideos; éstas poseen principios activos capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales. Algunas de estas saponinas presentan actividad antiparasitaria, por ejemplo, de *Actynopyga lecanora* se aislaron las holothurinas A y B⁸ que resultaron moderadamente activas contra *Leishmania donovani*, tanto *in vitro* como *in vivo*, mientras que Dimayuga y col.⁹ aislaron las neothiosidas A-C, moléculas con actividad antiparasitaria, antifúngica y antibiótica. Por lo anterior, el pepino de mar tiene un enorme potencial para encontrar moléculas con una actividad biológica interesante.

Ahora bien, lo que se conoce como pepino de mar, es en realidad un grupo de organismos del que se conocen a más de 1200 especies de diferentes tallas y características,¹⁰ y que están agrupados en seis ordenes, que a su vez se subdividen en diversas Familias, por lo que la determinación taxonómica es una de las tareas importantes al trabajar con estos organismos. Una familia importante es la *Holothuriidae*, (orden Aspidochirotida), que se caracteriza principalmente por estar constituida con especímenes de los cuales se han aislado moléculas interesantes, además, la mayoría de talla grande, considerando que un organismo marino tiene un 90 % de agua, obteniendo al final solo el 10% de peso seco.

En el caso de México, los pepinos de mar se conocen en prácticamente todas las costas, específicamente en las costas de

Yucatán se han reportado cinco especies de la familia Holothuriidae, género *Holothuria*:¹¹ *Holothuria floridana*, *Holothuria thomasi*, *Holothuria mexicana*, *Holothuria grisea* y *Holothuria arenícola*.

Se sabe que México es uno de los países cuyos mares presentan mayor diversidad de estos organismos, siendo muy pocos los especialistas de nuestro país dedicados al estudio de estos importantes organismos marinos, por lo anterior, nos hemos dado a la tarea de realizar un estudio con dichas especies, basándonos principalmente en el alto potencial para encontrar moléculas con una actividad biológica interesante.

II. JUSTIFICACION

Las parasitosis son enfermedades que causan muchos estragos en la humanidad, que van desde la inactivación del paciente hasta su muerte, problema que se ve aumentado, si consideramos que en 49 años, solo se ha introducido una molécula para tratarlas. Por otro lado, aunque contamos con agentes antiparasitarios para tratar estas enfermedades, la inefectividad de algunos tratamientos, aunado a la aparición de parásitos resistentes, genera una necesidad urgente de contar con una mayor cantidad de opciones químicas para curarlas.

Los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas en torno a los productos naturales de origen marino son una alternativa para buscar nuevas moléculas antiparasitarias. Uno de estos organismos marinos, el pepino de mar que representa beneficios para la salud, contiene varias moléculas que han presentado actividades antitumorales, antiinflamatorias, antiarterioscleróticas, antioxidantes e inclusive antiparasitarias.

En la Península de Yucatán, se han reportado cinco organismos pertenecientes al género *Holothuria*, los cuales no han sido estudiados sistemáticamente como una fuente potencial de compuestos antiparasitarios.

Derivado de lo anterior, el presente trabajo de tesis pretende estudiar el pepino de mar que habita en las costas de Yucatán, con el fin de descubrir moléculas que presenten actividad antiparasitaria contra 3 protozoarios que infestan a un tercio de la población mundial.

III. OBJETIVO GENERAL

- Separar y aislar los productos naturales presentes en el pepino de mar del género *Holothuria* de las costas de Yucatán, mediante estudios biodirigidos, así como la elucidación estructural de los compuestos separados

3.1. Objetivos particulares

- Realizar la identificación taxonómica de pepinos de mar colectados
- Obtener el extracto crudo de cada uno de los pepinos colectados
- Evaluar la actividad tóxica a *Artemia salina* a cada uno de los extractos generados
- Separar mediante estudios biodirigidos a las moléculas responsables de la actividad biológica empleando técnicas de separación cromatográfica
- Evaluar la actividad antiparasitaria a cada uno de los extractos generados

IV. HIPÓTESIS

Las especies de pepino de mar del género *Holothuria* de las costas de Yucatán, contienen metabolitos secundarios los cuales mostrarán actividad importante contra parásitos.

V. MARCO TEORICO

5.1. Obtención de nuevos fármacos

Los productos farmacéuticos son agentes químicos utilizados terapéuticamente para tratar enfermedades. Actualmente, los medicamentos son usados para prevención, así como para el tratamiento de enfermedades o sus consecuencias. Otra aplicación importante de los medicamentos en la actualidad es mantener la salud y aliviar el dolor durante la enfermedad.

El proceso de investigación y desarrollo es largo y complejo, involucra grandes costos y pocas posibilidades de éxito. De las muchas moléculas identificadas y ensayadas muy pocas llegan a los estantes de las farmacias, siendo desechadas la mayoría en distintas etapas del proceso. En promedio, el proceso de estudiar y ensayar un nuevo fármaco dura 12-15 años y significa una inversión cercana a los 600 millones de dólares antes que ésta sea aprobada para su comercialización.¹² Uno de 5,000 fármacos que entren a la etapa de ensayos pre-clínicos será aprobado para uso terapéutico.¹³ En 1999, en los EEUU las compañías farmacéuticas invirtieron 24 mil millones de dólares en investigación, 14% más que el año anterior.

5.1.1. Nuevas tendencias en el descubrimiento de fármacos

En el pasado, el descubrimiento de nuevas moléculas tenía mucho de azar, en particular de azar afortunado (serendipity), en que accidentalmente se llegaba al desarrollo o descubrimiento de una molécula nueva activa en el tratamiento de ciertas enfermedades, o que una ya existente tenía otro efecto farmacológico no buscado.

Hoy en día, el proceso ha cambiado dramáticamente, tanto en la técnica como en la organización. Primero se identifica el objetivo

terapéutico y luego se realiza un tamizaje (screening) de miles de sustancias, tratando de seleccionar nuevas moléculas para este uso específico. A través de estos tamizajes se pueden evaluar varias decenas de miles de compuestos nuevos por semana, utilizando como herramientas sistemas robóticos y automatizados.¹⁴

Estas moléculas se logran a través de técnicas como la síntesis química combinatoria de alta velocidad, análisis genómico y un diseño racional de moléculas que incorpora avanzados conocimientos biológicos de receptores celulares y otras estructuras subcelulares. Es aquí, donde se busca estimular, bloquear o modificar esta función del receptor o enzima para llegar a seleccionar la molécula nueva de acción óptima.

El conocimiento y manipulación de genomas funcionales permitirá un manejo aún más directo y específico. Otro enfoque es evaluar compuestos naturales producidos por microorganismos o agentes del reino vegetal y determinar sus propiedades farmacológicas, como fue el clásico caso del descubrimiento de la penicilina y otros antibióticos.

5.1.2. Productos naturales de origen marino

Históricamente, las plantas han constituido la fuente principal de productos naturales de uso medicinal que muchas veces se han desarrollado tomando en cuenta el legado folclórico de diferentes culturas. En la actualidad, alrededor del 25% de todas las ventas de productos farmacéuticos son fármacos derivadas de productos naturales de plantas, y un 12% adicional está basado en productos naturales producidos por microorganismo.¹⁵

A pesar de que la diversidad de la flora y la fauna marina exceden a la terrestre y de que la existencia de sustancias naturales marinas con actividades útiles para el hombre se conoce desde la más remota

antigüedad, la farmacología marina es una ciencia nueva. Mientras que la obtención de estructuras químicas novedosas derivadas de microorganismos y plantas de origen terrestre ha declinado, el descubrimiento de compuestos químicos con estructuras químicas únicas provenientes de organismos marinos experimenta un sustancial aumento en los últimos años.¹⁶

Los organismos marinos están sometidos a condiciones únicas, lo que provoca que sintetizen moléculas que no tienen equivalencia con las terrestres. Además, la potencialidad de los océanos como fuente de nuevos compuestos aun ha sido explorada: cerca del 80% de los organismos vivos del reino animal habitan en el mar y, sin embargo, menos del 1% de las especies marinas han sido investigadas con este propósito.¹⁷

En la búsqueda de organismos marinos productores de moléculas de interés, la atención se centra en especies de cuerpo blando, sésiles o dotadas de un movimiento lento. La supervivencia de los organismos que las poseen no se basa en la velocidad de natación ni en defensa física (conchas o espinas), sino en la generación de arsenales químicos depurados, productos de un metabolismo secundario de elevada complejidad, que se utilizan para el ataque y la defensa frente a otras especies.

Las especies sésiles generan toxinas que impiden el asentamiento de otras. Para las especies que obtienen alimento mediante la filtración de agua, las toxinas operan como antibióticos frente a la multitud de organismos unicelulares con los que entran en contacto constante.

El mecanismo de acción de estas moléculas se dirige principalmente hacia motivos biológicos muy conservados en el curso de la evolución, por lo que resulta efectivo incluso contra especies terrestres. Estos compuestos pueden ser expulsados al agua en respuesta a una amenaza o inoculado mediante inyección con un

aguijón. También pueden ser simplemente acumulados en el organismo para matar al agresor que los ingiere, salvando así al resto de la colonia y disuadiendo a futuros atacantes.

Existe un extenso listado de medicamentos de origen marino en fases clínicas a punto de ser comercializados, casi 25 entidades químicas. Por ahora, tres fármacos marinos se encuentran en la terapéutica para curar el dolor intenso y el cáncer.¹⁸ Uno de los principales retos está en diseñar sistemas de producción a escala industrial de sustancias que se encuentran en partes por millón en las muestras biológicas estudiadas.

Un ejemplo interesante es el desarrollo de la trabectedina, (ET-743, Yondelis[®], Pharmamar, **(Figura 1)**, un alcaloide tetrahidroisoquinolínico aprobado en Europa para tratar diferentes tipos de cáncer, principalmente el sarcoma de tejido suave y el cáncer ovárico de pacientes refractarios a cisplatino; aislado del tunicado *Ecteinascidia turbinata*, encontrado en el mar Caribe y Mediterráneo.¹⁹

Debido a su complejidad molecular, la síntesis total presenta muchos inconvenientes industriales, que incrementarían su costo de comercialización. Para obtener la cantidad necesaria para su evaluación clínica y preclínica, se utilizó toda una estrategia biotecnológica para sintetizarlo a través de un intermediario (Ciano-safracin B) producido por *Pseudomonas fluorescens* y que implica 18 pasos, que permiten la obtención de trabectedina a nivel de kilogramos.²⁰

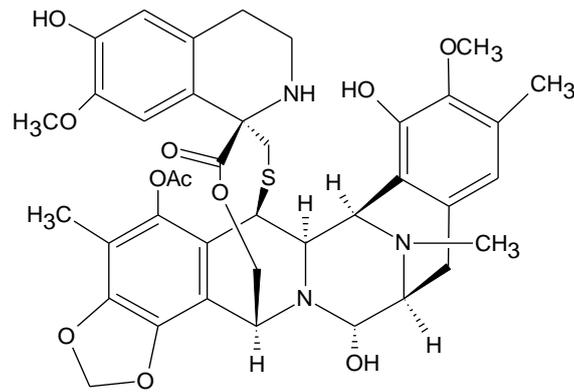


Figura 1. Estructura de la trabectedina, anticancerígeno de amplio espectro, utilizado en Europa.

5.2. EQUINODERMOS

Ofiuroideos, lirios, estrellas, erizos, pepinos y margaritas de mar conforman el grupo de invertebrados marinos más común y probablemente también el más popular del litoral mexicano, es decir, los **equinodermos**. Se han reconocido aproximadamente 13,000 especies de equinodermos en el registro fósil, pero la mayoría de ellos se han extinguido. Casi todas las 6000 especies que sobreviven se desarrollan en hábitats marinos. La pared del cuerpo del equinodermo presenta varias espinas que le confieren a la superficie corporal un aspecto verrugoso o espinoso, a lo cual se debe el nombre de equinodermos, que significa "*con piel espinosa*".

La costa del Pacífico de México es muy interesante, no sólo en cuanto al gran número de géneros característicos que ahí existen, sino también, por las estrechas relaciones que las especies endémicas tienen con las del Indo-Pacífico, Región Mediterránea y Mar Caribe. Los géneros de equinodermos litorales más representativos son: *Astropecten*, *Luidia*, *Nidorellia*, *Pharia*, *Phataria*, *Echinometra*, *Lytechinus*, *Encope*, *Clypeaster*, *Ophiocoma* y *Holothuria*.

5.2.1. PEPINO DE MAR

Los holoturoideos son una clase formada por unos 1000 equinodermos conocidos vulgarmente como pepinos de mar. El cuerpo de los holoturoideos no tiene brazos, la boca y el ano están en los polos opuestos. Sin embargo, los holoturoideos se diferencian de otros equinodermos por tener el eje polar muy alargado, lo cual les da su forma de pepino. **(Figura 2a)** La estructura interna de los holoturoideos presenta básicamente las siguientes partes: anillo calcáreo, pies ambulacrales que sirven para la locomoción de los equinodermos, gónadas, órganos arborescentes o árboles respiratorios y tubo digestivo, el cual se inicia en la boca.²¹ **(Figura 2b)**

5.2.1.1. GENERALIDADES

El aspecto externo de la holoturia es bastante fácil de describir. Los holoturoideos son animales alargados con forma y aspecto que se asemeja al de un salchichón, las especies más pequeñas miden menos de 3 cm. de longitud. La mayor parte de los pepinos de mar tienen color negro, marrón o verde aceituna, aunque también se observan otros patrones de coloración. Son animales lentos, viven en la superficie del fondo o se sepultan en arena y lodo, otras especies son excavadoras, y realizan mediante contracciones corporales agujeros en fondos blandos en los que permanecen largo tiempo.

Dos fenómenos característicos de ciertas especies de holoturoideos son la evisceración y la regeneración, que consiste en la expulsión de ciertas partes del cuerpo como respuesta ante el ataque de un depredador. La evisceración va seguida por la regeneración de la parte perdida; los restos de los órganos eviscerados o los mesenterios relacionados con ellos son los sitios de crecimiento regenerativo inicial.

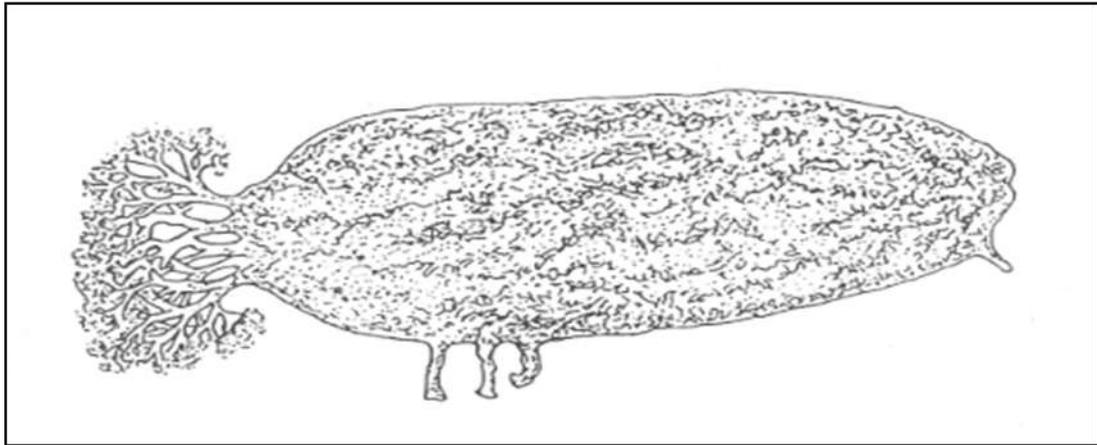


Figura 2 a) Vista externa de pepino de mar

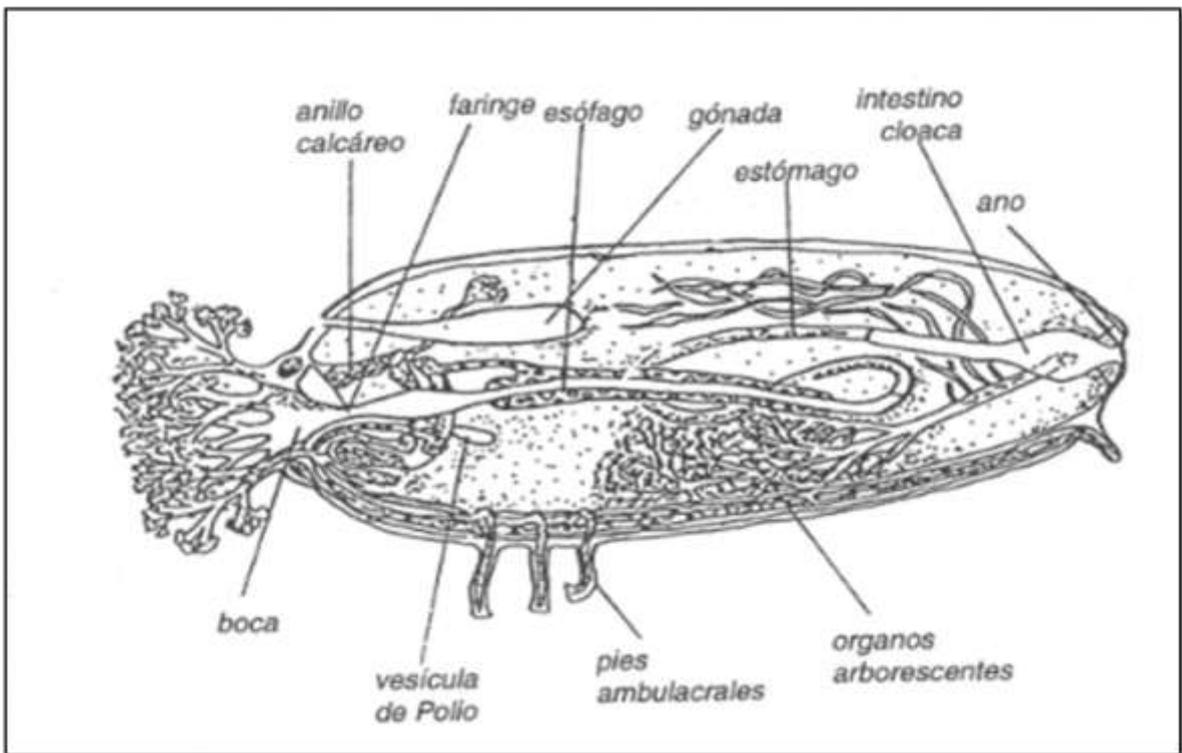


Figura 2 b) Vista interna de pepino de mar

5.2.2. TAXONOMÍA

En la actualidad se conocen alrededor de 1200 especies que se clasifican en seis órdenes. La clasificación taxonómica de los pepinos

de mar se basa en la descripción de caracteres morfológicos externos e internos, estos pertenecen al reino animal *Phylum equinodermata*.

Phylum:	Echinodermata
Subphylum:	Echinozoa
Clase:	Holothuroidea
Orden:	Aspidochirotida
Familia:	Holothuriidae
Género:	<i>Holothuria</i>

De manera general, los individuos de la Orden Aspidochirotida, presentan tentáculos en forma de escudos en número de 15 a 30, los arboles respiratorios están presentes, el asa posterior del intestino se encuentra adherida al mesenterio ventral derecho. Los músculos longitudinales forman cinco bandas dobles, y las gónadas se disponen en un solo penacho. Las espículas incluyen generalmente tablas. El Orden cuenta con muchas de las especies grandes de Holoturoideos en el mundo y algunas formas más conspicuas presentes en aguas someras. Las tres familias (Holothuriidae, Stichopodidae y Synallactidae) y las más de 300 especies correspondientes, se distinguen en la estructura gonadal (1 o 2 penachos) y la presencia o ausencia de ámpulas tentaculares. Los aspidoquirótidos tienen una pared corporal gruesa, por lo que sus depredadores son contados.²²

En cuanto a la Familia Holothuriidae, esta comprende a los organismos más grandes, que llegan a medir hasta 300 mm de longitud, la pared del cuerpo es gruesa y la superficie dorsal rugosa; en la superficie ventral hay un gran número de pies ambulacrales a diferencia de la superficie dorsal; muchas de las especies tienen la capacidad de expulsar los túbulos de Cuvier, los cuales utilizan para

repeler a sus agresores y/o para distraer a sus depredadores. Las espículas de la pared del cuerpo, por lo general, tienen forma de barras, barrotes o rosetas

5.2.3. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Las especies de pepino de mar tienen una distribución mundial, encontrándoseles en los diferentes océanos. En México, su distribución es en todas las costas, e inclusive existen excelentes referencias que presentan a los individuos, y su distribución. ²²⁻²⁴

En la península de Yucatán se han reportado varias especies de pepino de mar del género *Holothuria*,²⁴ y una especie de la Familia *Stichopodiidae*, las cuales se enlistan a continuación:

CLASE HOLOTHUROIDEA

Orden Aspidochirotida Grube, 1840

Familia Holothuriidae Ludwig, 1894

Género *Holothuria* Linnaeus, 1767

Subgénero *Cystipus* Haackel, 1880

Holothuria occidentalis Ludwig, 1874

Subgénero *Halodeima* Pearson, 1914

Holothuria floridana Pourtalès, 1851

Holothuria mexicana Ludwig, 1874

Subgénero *Theelothuria* Deichmann, 1958

Holothuria princeps Selenka, 1867

Subgénero *Thymiosycia* Pearson, 1914

Holothuria arenicola Semper, 1868

Subgénero *Vaneyothuria* Deichmann, 1958

Holothuria lentiginosa (Marenzeller, 1893)

Familia Stichopodidae Haeckel, 1896

Género *Isostichopus* Deichmann, 1958

Isostichopus badionotus (Selenka, 1867)

5.2.4. PRODUCTOS NATURALES AISLADOS DEL PEPINO DE MAR

Los pepinos de mar, y en general los equinodermos, producen un rango pequeño de moléculas bioactivas que otros invertebrados marinos, como las esponjas o las ascidias, debido a su habilidad para disuadir a sus enemigos por otros medios, tales como la evisceración o la constitución de su piel, la cual esta compuesta de proteínas insolubles que hacen al organismo desfavorable como presa. Aun así, de los pepinos de mar, se han aislado moléculas interesantes como el ácido glicín-mucosporínico, el ácido 12-metiltetradecanoico y la Holothurina B, con actividad antioxidante, anticancerígena y antiparasitaria respectivamente. **(Figura 3)**

Ahora bien, los compuestos característicos de los pepinos de mar son las saponinas, principalmente glicósidos triterpénicos, específicos para cada grupo taxonómico, y que representan un buen modelo para estudios evolutivos.

Químicamente, Estas saponinas, llamadas de manera genérica holothurinas, son derivadas del "holostano" o la lactona del ácido (20S)-hidroxi-5 α -lanostan-18-carboxílico **(Figura 4)** y contienen de 1 a 6 residuos de carbohidratos, que pueden ser lineales o ramificados.

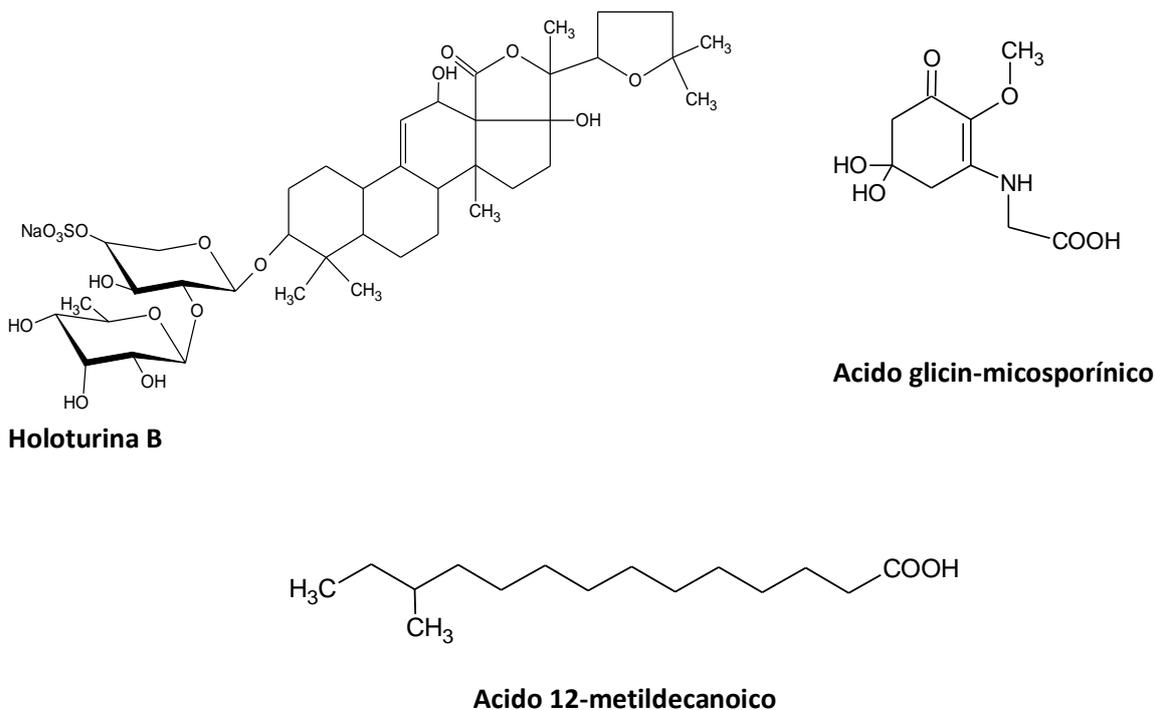


Figura 3 Moléculas bioactivas aisladas del pepino de mar.

De manera específica, la Familia Holothuriidae presenta glicósidos triterpénicos que tienen a la holos-9(11)-en-12a-hydroxy-aglicona, y en general las agliconas que tienen un doble enlace en la posición 9-11 ($\Delta^{9,11}$) son características del orden Aspidochirotida, mientras que una insaturación en 7 (Δ^7), corresponde a organismos del orden Dendrochirotida.²⁶ Un ejemplo claro son la 17-dehidroholoturinosida A y griseasida A (**Figura 5**), aisladas de *Holothuria grisea*, y que presentaron una potente actividad citotóxica contra varias líneas de células tumorales humanas.²⁷

Al ser estas saponinas específicas, son utilizadas para resolver problemas taxonómicos en la clase Holothurioidea. Por ejemplo, el estatus taxonómico del organismo *Bohadschia graeffei* se revisó, y se reclasificó en un nuevo género *Pearsonothuria* con base a su composición de los glicósidos triterpénicos.²⁸

un tercio de la población mundial: *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomona vaginalis*.³⁰ Estas enfermedades constituyen verdaderos problemas de Salud Pública, especialmente en los países en desarrollo, en los que, debido a diversos factores sanitarios, económicos y culturales, suele ser frecuente el desarrollo de patrones de tipo endémico, que se asocian no sólo a morbilidad importante, como ya se mencionó anteriormente, sino también a un considerable costo económico.³⁰

La ausencia de vacunas para cualquier parásito hace que la prevención para todas y cada una de las enfermedades parasitarias se siga basando, como en el pasado, en medidas ecológicas como el saneamiento ambiental o el control vectorial según sea el ciclo biológico, y en pequeña medida, en los fármacos antiparasitarios.

Pero cuando se ha adquirido la enfermedad, sólo resta la utilización de medicamentos. Como alternativas terapéuticas se ha utilizado el Metronidazol, la nitazoxanida, el Tinidazol y los Bencimidazoles antihelmínticos. Sin embargo, sus efectos secundarios y su variabilidad en la actividad evitan su eficacia, dando como resultado la aparición de cepas resistentes a dichos fármacos.

Problema que se agrava debido a la escasa investigación en el área, que sólo ha desarrollado un fármaco en los últimos 49 años, convirtiéndose en un área de investigación de prioridad mundial en salud pública.³¹

5.3.1. Productos naturales de origen marino con actividad antiparasitaria

Existen ejemplos clínicos bien conocidos de agentes antiparasitarios derivados de plantas y de fermentaciones microbianas, p.e. la quinina. Por otro lado, se debe mencionar el uso que la medicina tradicional del Japon (Kempo) ha dado como antihelmíntico al ácido kainico (**Figura 6**) (2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenil-pirrolidina) obtenido a partir del alga marina *Digenea simplex*.³²

En años recientes, los productos naturales de origen marino empiezan a sobresalir por su actividad contra helmintos y protozoarios, tanto sensibles como resistentes a otros agentes antiparasitarios, causantes de las enfermedades que azotan a la humanidad.

La mayor diversidad química de estos metabolitos secundarios proviene de las algas, esponjas, cnidarios y ctenophoros, y de manera alterna de los tunicados, los briozoos y los equinodermos de los cuales se han aislado moléculas antiparasitarias novedosas.

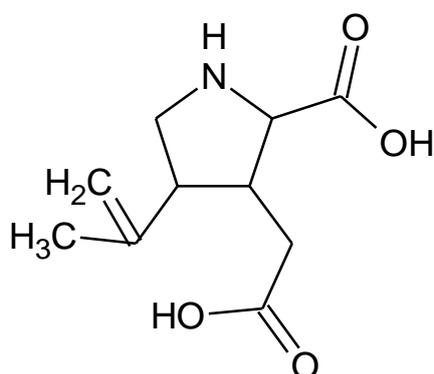
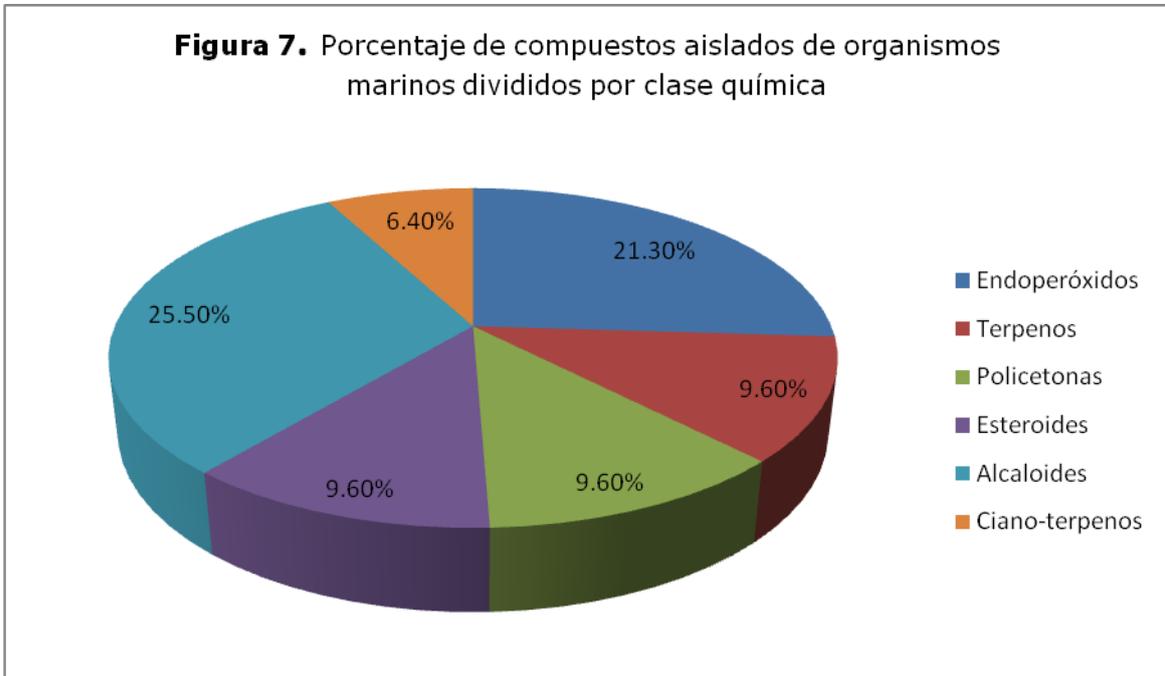


Figura 6. Estructura química del ácido kaínico

Aunque existen diferentes productos naturales de origen marino con actividad antitumoral, antiviral, antimicrobiana, o antifúngica, la evaluación antiparasitaria es escasa, aunque va incrementándose en los últimos tres años, impulsada principalmente por la iniciativa mundial de las enfermedades desatendidas (DNDi, por sus siglas en

inglés). ³³⁻³⁴ En la **Figura 7** se presentan las diferentes clases químicas de productos naturales marinos, y en la **Figura 8** se presentan las moléculas más representativas de cada grupo, con la actividad reportada.



5.3.2. Tricomoniasis

Trichomona vaginalis, es el agente causal de la forma más común de enfermedad parasitaria, sexualmente transmitida, que afecta a hombres y mujeres; cada año alrededor de 170 millones de mujeres son afectadas por este protozoo en el mundo.³⁴

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) constituyen un severo problema de salud pública a nivel mundial.

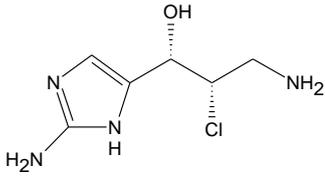
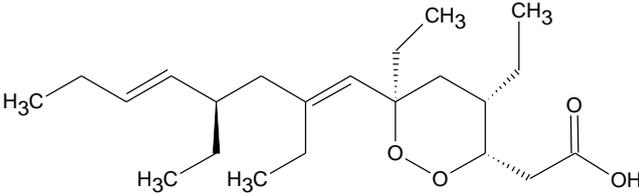
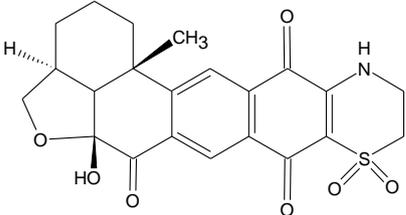
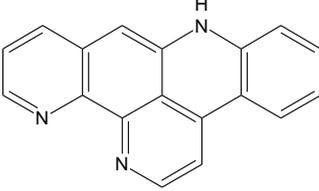
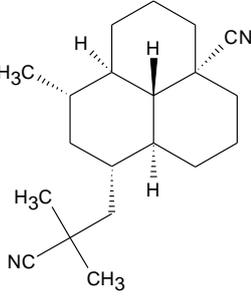
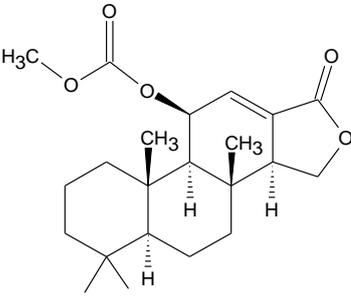
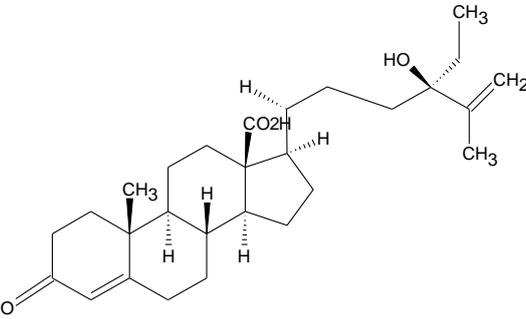
<p>Metabolito Halogenado</p>  <p>Girolina P.f. CQR: 0.1</p>	<p>Endoperóxidos</p>  <p>Plakortida P T.c. 6.3; L.d.e 5.2</p>
<p>Policétido</p>  <p>Alisiaquinona C P.f. CQR:0.08</p>	<p>Alcaloide</p>  <p>12-deoxiascididemin T.b.:0.08</p>
<p>Ciano-Terpenos</p>  <p>8,15-diisociano-11(20)-amflecteno P.f. CQR: 0.09</p>	<p>Terpeno</p>  <p>11-β-acetoxispongi-12-en-16-ona *T.c. 12.1; L.d. 2.0</p>
<p>Esteroides</p>  <p>Acido Norselico D L.d.: 2.0</p>	

Figura 8. Diferentes clases químicas de productos naturales antiparasitarios aislados de organismos marinos seleccionados y su actividad antiparasitaria (μM), *Parasito: P.f. CQR= *P. falciparum* cepa resistente a cloroquina, T.b. *T. brucei*, T.c.= *T. cruzi*, L.d.= *L. donovani*. Adaptado de Watts et al.³²

5.3.2.1 Epidemiología

Vaginitis, cervicitis y uretritis por *T. vaginalis* constituyen algunas de las enfermedades de transmisión sexual más conocidas en el mundo; se estima que entre 120 - 180 millones de mujeres sufren la infección anualmente en el mundo.

La vaginitis producida por *Trichomonas* tiene su incidencia máxima entre los 16³⁵ y los 35 años, por ser éste el período de máxima actividad sexual, lo que apoya la teoría de que esta parasitosis se contagia fundamentalmente por vía venérea. Se considera que el varón es en la mayoría de los casos un portador asintomático causante de la propagación de la infección.

5.3.2.2. Ciclo biológico

La trichomona se reproduce por división binaria en fase de trofozoíto y se transmite a través de secreciones de las distintas cavidades donde se alojan, tracto genitourinario. Como no tiene forma de resistencia, se requiere la transferencia de secreciones frescas; por esto la tricomoniasis es principalmente una enfermedad contagiosa.

No se ha demostrado que formen quistes; solamente se ha observado la aparición de formas esféricas, inmóviles, que pueden corresponder a tricomonas degeneradas o formas quizá aptas para la transmisión, pero no están protegidas por membrana quística. Los trofozoítos de las tricomonas son los que resisten la acción osmótica del agua libre de sales. **(Figura 9)**

5.3.2.3. Patología

La principal causa de la afección producida por *T. vaginalis* se encuentra en la acción mecánica del parásito sobre las mucosas genitales, que deriva en procesos inflamatorios, y en la acción tóxico-alérgica producida por las alteraciones citoplásmicas y nucleares de las células de las mucosas.

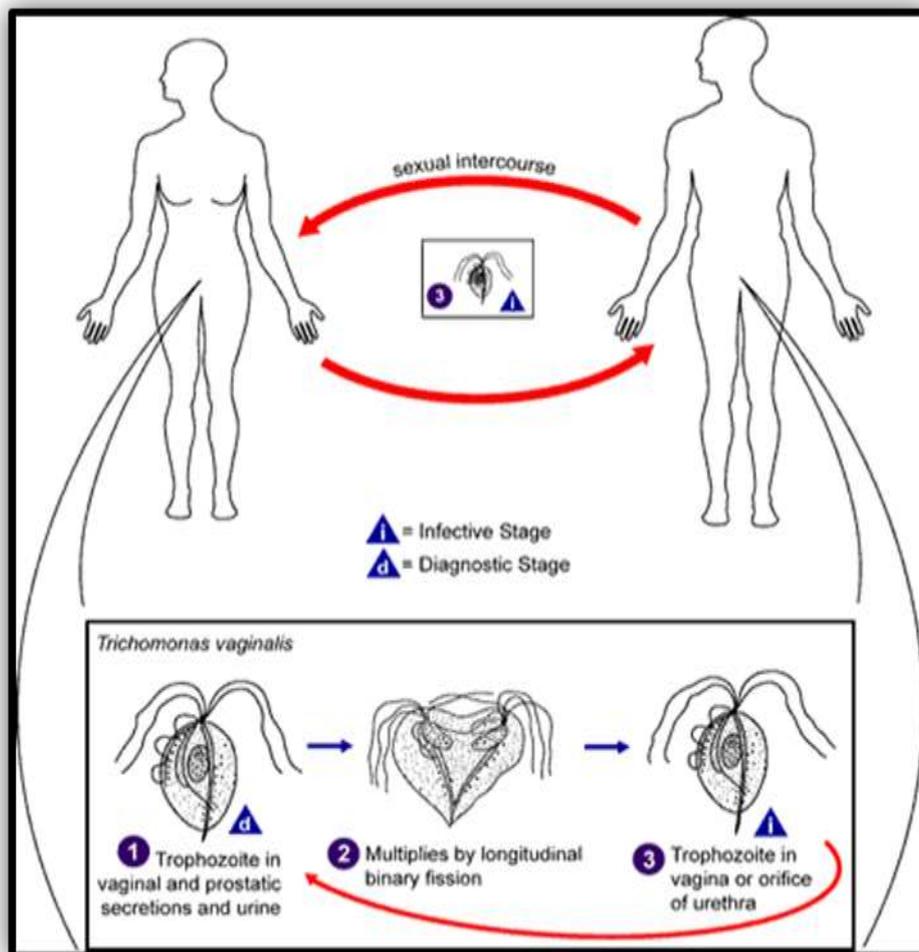


Figura 9. Ciclo biológico de *Trichomona vaginalis*

La mujer presenta un período de incubación de 5 a 25 días que desemboca en una vulvo vaginitis con leucorrea, prurito vulvar y ardor vaginal. Aparecen petequias y se producen secreciones amarillentas en la fase aguda y blanquecinas en la fase crónica, donde abundan trofozoítos, glóbulos blancos y células muertas de las mucosas. Si la infección alcanza la uretra podrá producirse una uretritis. Los principales factores que van a determinar el curso de la infección son el pH y la flora bacteriana de la vagina. En el varón, el parásito no encuentra unas condiciones óptimas para su desarrollo por lo que la infección cursa en el hombre casi siempre de forma asintomática, por lo que es considerado portador. En los excepcionales casos que presentan síntomas, éstos son producidos por una uretritis, una prostatitis o una epididimitis, que cursan con ardor al miccionar, secreciones uretrales y edema prepucial. En estos casos, el parásito se ve favorecido cuando existe estrechez uretral.³⁶

5.3.3. Giardiasis

El género *Giardia* está formado por protozoos flagelados que parasitan el aparato digestivo del ser humano y de ciertos animales. El género *Giardia* comprende diversas especies, pero la infección que afecta a las personas (giardiasis) suele atribuirse a la especie *Giardia intestinalis*, también conocida como *Giardia lamblia* o *Giardia duodenalis*.

La mayor parte de las veces, la infección por *G. intestinalis* permanece asintomática, situación más común en adultos que en niños. Pueden producir duodenitis, caracterizada por dolor abdominal tipo cólico y diarrea. Las heces fecales son muy olorosas ya que cuando hay un problema de defecto de absorción, el trabajo de desintegración bacteriano hace que se torne este olor. También puede originar náusea y acompañarse de anorexia, palidez y pérdida de peso.³⁷

5.3.3.1. Epidemiología

Esta parasitosis es de distribución cosmopolita. Su frecuencia varía de acuerdo al nivel educativo de la gente y de las condiciones sanitarias y climatológicas de cada región. De este modo se presenta más en niños que en adultos, y en regiones tropicales que en zonas frías. La infección se adquiere por vía oral mediante la ingesta de alimentos y bebidas contaminadas con quistes de *Giardia intestinalis*.³⁸ La giardiasis es considerada la infección por parásitos más común que afecta a los humanos en el mundo.³⁹

5.3.3.2. Ciclo biológico

Los quistes son formas resistentes y son responsables de la transmisión de la giardiasis. En heces se pueden encontrar tanto quistes como trofozoítos (estados diagnósticos). Los quistes pueden sobrevivir varios meses en agua fría. La infección ocurre mediante la ingestión del quiste que se encuentra en agua o alimentos contaminados o por vía fecal-oral. Ya ingerido el quiste pasa por la parte alta del tubo digestivo, en estomago se reblandece la pared quística mediante la acción de los jugos gástricos. Posteriormente en el duodeno se rompe dicha pared dando origen a trofozoítos tetranucleados, los cuales se dividen originando dos trofozoítos binucleados. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria longitudinal y permanecen en el lumen donde se pueden encontrar en forma libre o unidos a la mucosa duodenal gracias a su disco suctor. El quiste es el estado que se encuentra más comúnmente en las heces formadas. Puede salir también como trofozoíto cuando no le da tiempo de transformarse en quiste, esto es cuando el tránsito intestinal esta acelerado. Al salir como trofozoítos se desintegra porque no tiene las condiciones para resistir el medio ambiente pero los quistes producen nuevas infecciones.³⁹ **(Figura 10)**

Las amebas se multiplican como trofozoítos no invasivos en la luz intestinal, colonizando el colon y transformándose posteriormente en quistes. En los cuadros sintomáticos el proceso evoluciona en tres fases: adherencia, penetración y propagación.

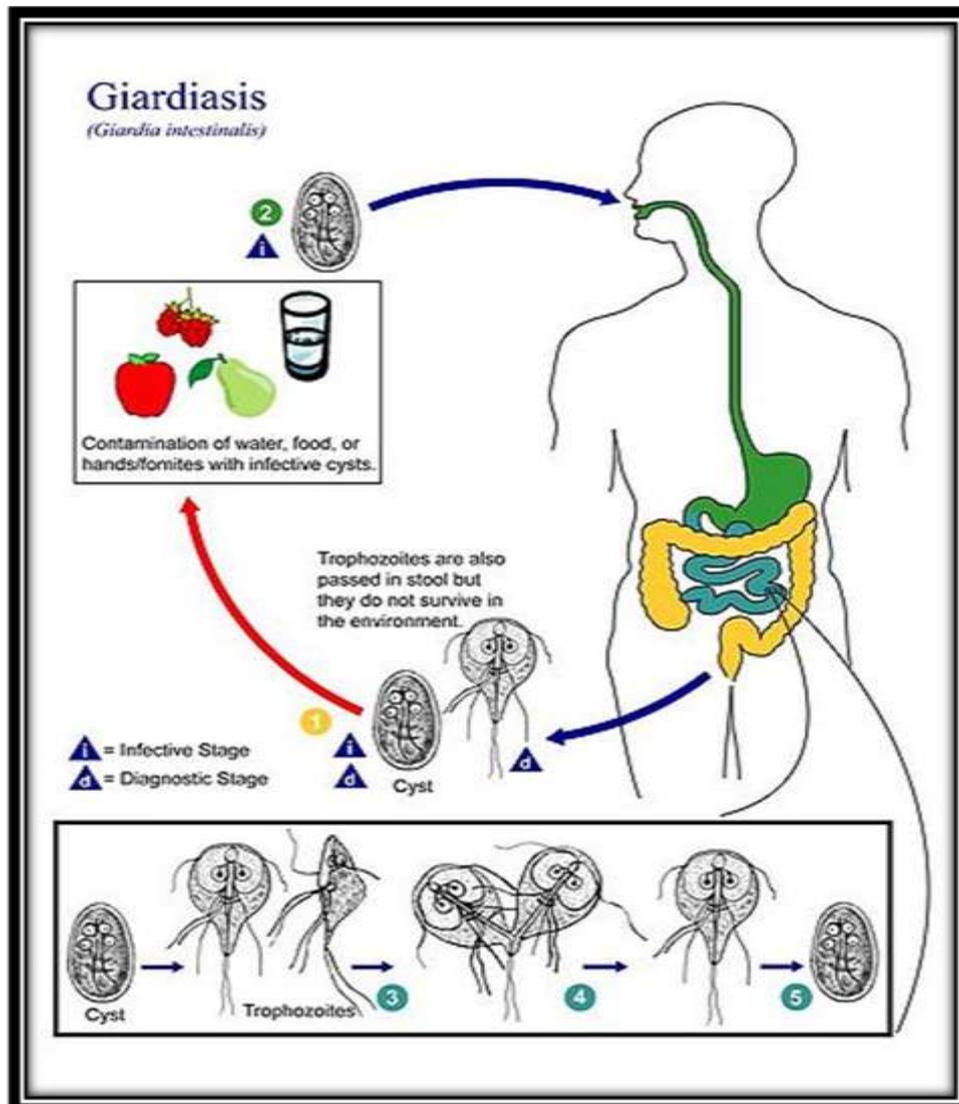


Fig. 10 Ciclo biológico de *Giardia intestinalis*

5.3.3.3. Patología

En el intestino *Giardia* puede adherirse a la pared intestinal mediante una estructura rígida que le permite penetrar un poco la mucosa. Este es el mecanismo de daño de la giardiasis ya que al adherirse firmemente a la pared intestinal genera una absorción deficiente de los nutrientes. Se observa también la secreción de moco como producto de la irritación que produce la presencia de los trofozoítos en la pared del epitelio intestinal.

5.3.4. Amibiasis

Entamoeba histolytica, protozoo comensal del intestino grueso, que en ocasiones invade la mucosa intestinal, y puede diseminarse por vía hemática, es el agente responsable de la amebiasis. Este protozoo pertenece al subphylum *Sarcodina*, que incluye a los protozoos móviles dotados de pseudópodos.⁴⁰

El cuadro clínico producido por *E. histolytica* se conoce tradicionalmente como amebiasis. La amebiasis se clasifica por sus manifestaciones en sintomática y asintomática, por su localización en intestinal y extraintestinal y por su evaluación en aguda y crónica. La infección asintomática es relativamente frecuente.

5.3.4.1. Epidemiología

La infección por este protozoo, se encuentra en todo el mundo, desde climas muy fríos hasta zonas tropicales.⁴¹ Sin embargo estos protozoos se encuentran en proporciones pequeñas en países industrializados. En general se habla de que las áreas con clima templado o caluroso son las de mayor endemia. Se presenta más en varones adultos y está muy influida por el nivel higiénico-sanitario de la población y medio ambiente.

Por su mecanismo de transmisión la amibiasis pertenece al grupo de las protozoosis transmitidas por fecalismo, ya que las formas infectantes (quistes), se ingieren al llevar a la boca bebidas, alimentos, manos o fómites que contengan materiales fecales de personas parasitadas con el protozoo, con sintomatología o sin ella. Estos últimos son llamados, portadores, excretan quistes y con fuente de infección.⁴²

Aproximadamente el 10% de la población mundial está infectada, sin embargo el 90% de las personas infectadas no presentan síntomas. De los 50 millones de casos sintomáticos que ocurren cada año, hasta el 100,000 son fatales. Después de la malaria, es posible que *E. histolytica* sea la segunda causa de muerte por protozoarios en el mundo.

5.3.4.2. Ciclo biológico

Los quistes son transmitidos a través de las heces. La infección con *E. histolytica* ocurre por la ingestión de quistes maduros en agua, alimento o manos contaminadas con material fecal. El quiste maduro desciende en el tubo digestivo hasta llegar al intestino, donde previo al contacto con jugos digestivos, se inicia el proceso de desenquistamiento; en el cual la pared de resistencia se reblandece, los núcleos se duplican a ocho y finalmente se liberan pequeñas formas trofozoíticas llamadas amébulas metaquísticas, las que crecen a trofozoítos maduros que migran hacia el intestino grueso.

Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria formando quistes, los cuales son expulsados con las heces. Gracias a la protección que les confieren sus paredes, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el ambiente exterior y son los responsables de la transmisión. En muchos casos, los trofozoítos se mantienen en el lumen intestinal de

los individuos que son portadores asintomáticos, eliminando los quistes en las heces.

En algunos pacientes los trofozoítos invaden la mucosa intestinal, o a través del flujo sanguíneo, sitios extraintestinales como el hígado, cerebro y pulmones, resultando en manifestaciones patológicas.⁴³

(Figura 11)

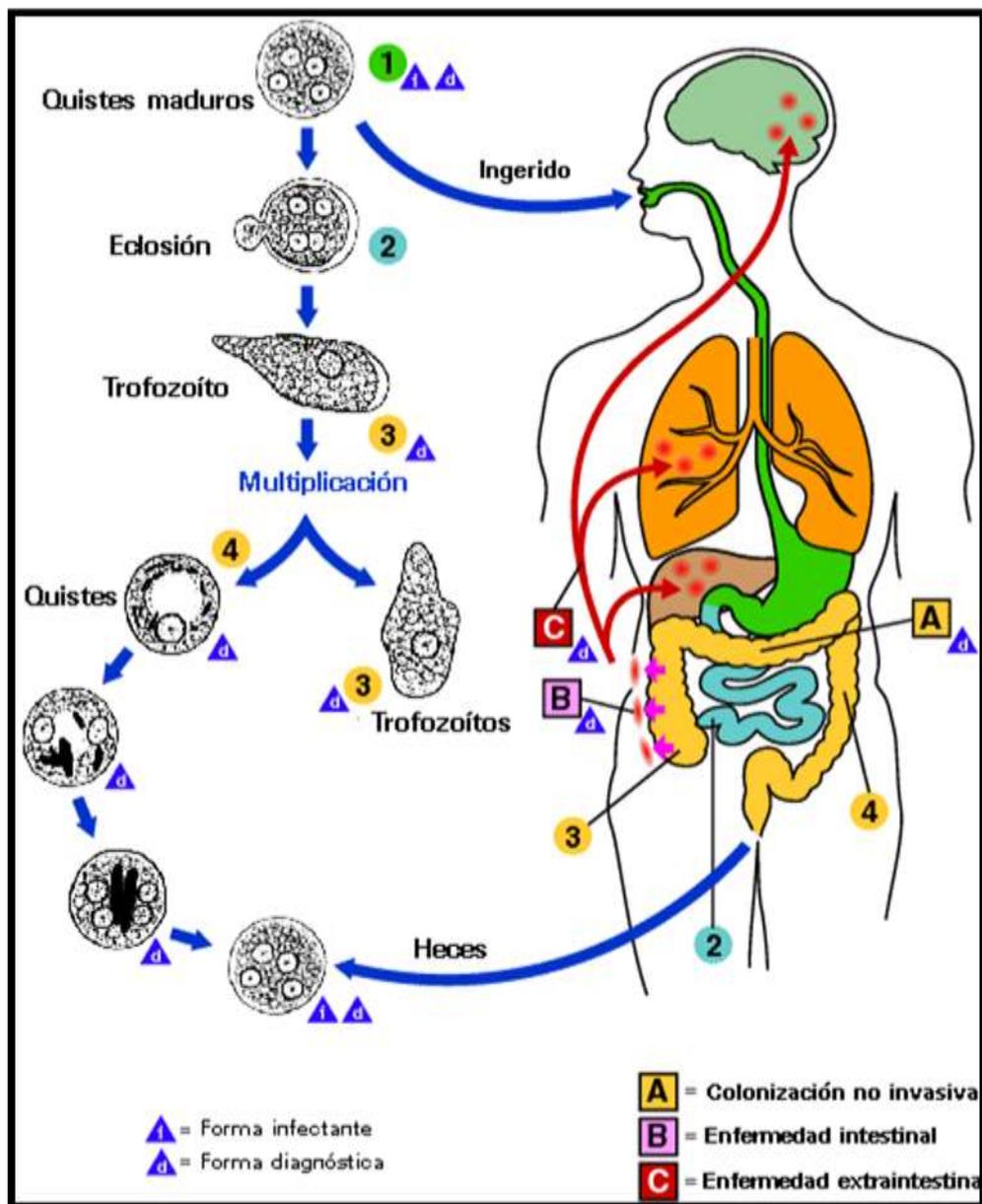


Figura 11. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*

5.3.4.3. Patología

La **adherencia** intestinal se realiza fundamentalmente con las células del epitelio de descamación.

Para que se lleve a cabo la **penetración** es necesario que se altere la mucosa, debido a que esta circunstancia ocasiona una disminución de su resistencia. La penetración se realiza por las zonas interglandulares del epitelio debido a la menor resistencia de estas áreas. Como consecuencia de la adherencia se lisan las células del epitelio, destrucción que es potenciada por la fagocitosis que realiza la propia ameba.⁴⁴ La penetración se realiza con la intervención de las enzimas líticas (proteasas, mucopolisacaridasas, etc.) y con ayuda del propio movimiento amebiano. Una vez que los trofozoítos penetran en la mucosa, se forman en ella pequeños nódulos a consecuencia de la reacción inflamatoria tisular, que se ulceran en el centro. El daño intestinal es más frecuente a nivel ciego y recto sigmoides, en virtud de que en estos sitios el tránsito intestinal es menor y con ello se concentra mayor número de trofozoítos, algunos de los cuales llegan a invadir paredes.

Los parásitos pueden propagarse a zonas adyacentes del intestino y provocar una intensa reacción inflamatoria y dar lugar a un ameboma.

En ocasiones, los trofozoítos entran en el torrente circulatorio y a través del sistema portal llegan a cualquier parte del organismo, especialmente al hígado, y dan origen a la llamada amebiasis extraintestinal. Al alcanzar el hígado, las amebas producen inicialmente una reacción inflamatoria con posterior necrosis tisular y formación de uno o varios abscesos.

El daño que produce *Entamoeba histolytica* se debe en primer lugar a la acción de sus enzimas, entre las que destacan mucinasa,

hialuronidasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, etc., las que lisan los tejidos y permiten la invasión de órganos, aparatos y sistemas del hospedero. Otro mecanismo de daño es la eritrofagia, gracias al cual el trofozoítos introduce eritrocitos que posteriormente son destruidos en el citoplasma amibiano. El tercer mecanismo de daño es el traumatismo directo tisular que los trofozoítos ejercen al golpear directa y constantemente los tejidos, con lo que se van separando una célula de otra. El más importante en la fisiopatogenia es el mecanismo enzimático.⁴⁵

VI. METODOLOGÍA

6.1. Material y equipo utilizado

Los disolventes y reactivos utilizados en todos los casos fueron grado QP y destilados previo uso.

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios con gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor en fase normal (AL SIL G Whatman) como fase estacionaria y aluminio como material de soporte. Como reveladores cromatográficos se utilizaron una lámpara de Luz U.V. marca UVP, modelo UVGL-58 de longitud de onda a 254 y 365 nm y una solución de p-anisaldehído al 15%.⁴⁶

Para la cromatografía en columna Flash se utilizó gel de sílice 60 (malla 0.063-0.200 mm, Sigma Aldrich), y una bomba de vacío Marca Felisa.

6.2 Colecta de los especímenes de Pepino de mar

6.2.1 Localización de la zona de muestreo

La colecta de los especímenes se realizó en dos localidades reportadas como zonas "pepineras" de Yucatán (**Figura 12**):⁴⁶ la primera en las costas Dzilam de bravo (georeferencia: **latitud** 21°23'22.3"N y **longitud** 88°56'48.56"O) donde se encuentran zonas de pastos marinos con claros de arena, comúnmente conocidos como "blanquizales". La segunda fueron las costas de Celestún (georeferencia: latitud 21°03'31.35"N **longitud** 90°35'59.94"O) también en zona de pastos marinos altos, con blanquizales.



Figura 12 Zonas de muestreo en las costas de Yucatán

6.2.2. Recolección, preservación e identificación taxonómica

La colecta de pepino de mar se llevó a cabo en las zonas de muestreo mediante buceo autónomo y snorkel, con la ayuda del Biólogo José Luis Gamboa y del Ingeniero Richard Mena Loria, la fecha, organismos recolectados y su peso se presentan en la **tabla 1**.

Una vez que los organismos se colocaron en una bolsa de malla de buceo, se procedió a llevarlos a la superficie, donde se les colocó en un recipiente con agua de mar, a la cual se le añadió enseguida unos cristales de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), el cual funciona como anestésico.²²

Tabla 1. Datos de las recolectas de pepino de mar

Recolecta	Fecha	No. de Organismos	Peso húmedo (Kg)	Localización
1	19/09/2009	12	5.2	Dzilam de Bravo, enfrente de Sta. Clara
2	22/04/2010	19	15	Bajos de Celestún, pastos marinos
3	16/06/2010	14	2.4	Bajos de Celestún, pastos marinos
4	30/07/2010	25	8.3	Dzilam de Bravo, Pastizales de la grieta

Una vez en el muelle, los organismos son colocados en un recipiente de 200 L (rotoplast) acondicionado con una bomba con recirculación de aire con 100 L de agua de mar. Los organismos fueron trasladados al laboratorio de Biotecnología Alimentaria, Productos Nutraceuticos y Farmaceuticos de la unidad de Química-Sisal, en donde son procesados para la identificación taxonómica de la siguiente forma:

- 1) Los organismos son separados y agrupados mediante la observación morfológica. Se seleccionaron dos especímenes

representativos de cada grupo y se fijaron para su conservación. Para fijarlo, el organismo sedado es sumergido en una solución de etanol al 70%, inyectándole después de 5 minutos esta solución por la boca y el ano con una jeringa de 10 mL.

- 2) Un espécimen se utilizó para la confirmación de la especie, mientras que el segundo espécimen se donó para la Colección Nacional de Equinodermos Mexicanos "Dra. Ma. Elena Caso Muñoz" a cargo del Dr. Francisco Solís y con sede en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM (ICMyL-UNAM).
- 3) La confirmación de la identidad de cada especie, se realizó con la ayuda del taxónomo de equinodermos, Dr. Francisco Solís Marín del ICMyL-UNAM de la UNAM mediante la observación de las espículas de los especímenes, utilizando la siguiente metodología:
 1. Se cortó un pedazo de piel del dorso del pepino y se colocó en un porta objetos
 2. Se agregó 3 gotas de una solución de hipoclorito de sodio al 7% (Cloralex) al trozo de piel por un minuto
 3. La muestra se observó al microscopio, iniciando con una baja resolución, hasta llegar a 20x. Mediante la comparación de estas estructuras (espículas) con las reportadas para cada especie se determinó su taxonomía inequívoca.

6.2.3. Descripción y distribución de la especie:

Durante los dos muestreos, se colectaron tres especies del género *Holothuria* de las cuales se presenta su distribución y descripción.

6.2.3.1. *Holothuria floridana*:

Es una especie de tamaño moderado y alcanza un largo máximo de 25 cm, su cuerpo es generalmente cilíndrico y delgado, la boca casi siempre es ventral y está rodeada por 20 tentáculos perlados con pequeñas ramificaciones de lado. En la superficie ventral tiene numerosos pies ambulacrales. Su pared es delgada y suave, pero las verrugas son muy prominentes en las terminaciones anteriores y posteriores y a través de los márgenes anteriores del cuerpo, los cuales son muy pronunciados en los individuos pequeños.

Las espículas son tablas y rosetas, las tablas son grandes y están compuestas de 4 pilares, cada columna termina en tres dientes: una vertical y dos horizontales. Las rosetas pequeñas están agrupadas en montones que están visibles con poco aumento.¹⁰ **(Figura 13)**

La coloración varía mucho, algunos individuos son de un color uniforme gris a un color amarillo oscuro, café, e inclusive rojo, pero otros tienen pequeñas motas de color negro, café o amarillo en la superficie ventral. Generalmente los individuos pequeños son moteados. **(Figura 13)**

En la superficie ventral, las puntas de los pies son de color amarillo con tres franjas de pigmento negro que van a lo largo del organismo. Los tentáculos de los organismos vivos o preservados tienen una coloración transparente a negra con tintes amarillos.

H. floridana habita en los pastos marinos, esteros y ciénagas de mangle, cerca de la línea de costa. Este holotúrido se encuentra desde la Península de Yucatán hasta Colombia, incluyendo Bahamas, Jamaica, Cuba y Aruba. Se le encuentra en la Florida, en todo el lado del golfo de Florida, a profundidades de 1-1.5 m.

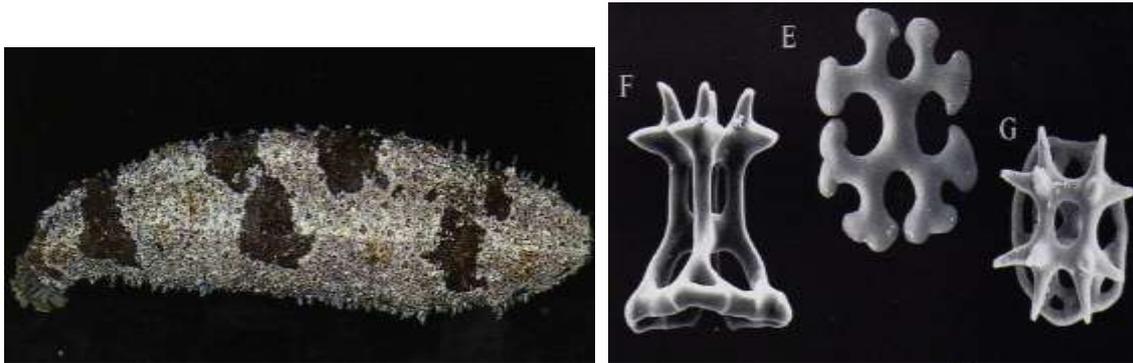


Fig. 13 Foto de *H. floridana*, mostrando a un espécimen característico y las espículas presentes en celoma: (F) tablas con terminación dentada (G) y rosetas (E). Adaptado de Hendler y cols.¹⁰

6.2.3.2. *Holothuria grisea*

También se le conoce como holoturia arlequín, el color base de los organismos vivos (rojo o amarillo rojizo), contrasta con el moteado café y con las papilas blancas con puntas amarillas de la parte superior del cuerpo. Los pies en la suela tienen puntas amarillas, y los tentáculos son de color amarillo. **(Figura 14)**

Los individuos de esta especie pueden alcanzar hasta 25 cm de largo, y su cuerpo es cilíndrico con una suela plana distintiva cubierta de pies ambulacrales cilíndricos.

Las espículas de la pared de cuerpo son tablas con espinas marginales (12) en el disco, y son puntuales. Presenta además, botones con dos o cuatro agujeros centrales y algunos hoyos periféricos pequeños, las orillas de los botones presentan dientes despuntados. **(Figura 14)**

Estos organismos se distribuyen en Florida, Bahamas, Puerto Rico, Jamaica, Antillas, Curazao, Panamá, Colombia, el Norte de Brasil y el Sur de África, en profundidades menores a 5 m.



Figura 14. Foto de *H. grisea*, mostrando a un espécimen característico, espículas presentes en celoma: (A-H) tablas con terminación dentada (C-G) rosetas y botones. Adaptado de Hendler y cols.¹⁰

6.2.3.3. Híbrido, *H. floridana*- *H. mexicana*.

En algunos lugares, donde los rangos de distribución se traslapan, *H. floridana* y *H. mexicana* producen híbridos de características intermedias, lo cual dificulta su identificación. *H. mexicana* tiene un cuerpo robusto que se estrecha poco, y que la superficie final tiene terminaciones despuntadas. El cuerpo es extremadamente rígido, y las verrugas y pies casi siempre son conspicuos. Por otro lado, la parte dorsal casi siempre contrasta con la parte ventral que casi siempre es de color rojo intenso, anaranjado, amarillo o blanco.

(Figura 15)

Las espículas de la pared del cuerpo del dorso son tablas con pequeñas perforaciones (15-20 aproximadamente) en la base, las tablas son muy similares a las de *H. floridana*; con contorno circular y compuesto por cuatro pilares como agujas altas. **(Figura 15)**

H. mexicana casi siempre se encuentra a profundidades de 2 a 10 m. Características que son diferentes a los de *H. floridana* (*vida infra*). La

identificación es realizada por la observación de las espículas que presenta una mezcla de las dos especies. ⁴⁸



Figura 15. Foto de *H. mexicana*, mostrando a un espécimen característico, espículas presentes en celoma: (H) tablas, vista lateral; (I) tablas, vista dorsal; (J,K) bases perforadas. Adaptado de Hendler y cols.¹⁰

6.3 Aislamiento y purificación de los componentes de los diferentes holotúridos colectados

6.3.1 Generación de los extractos generales

Posterior a la identificación taxonómica, se sacrificaron los especímenes sedados de cada grupo utilizando un bisturí quirúrgico, realizando un corte en el dorso para efectuar la evisceración, luego se cortaron en pedazos pequeños y se licuaron a velocidad alta (Licuadora industrial Waring, 12 L de capacidad).

El licuado se colocó en frascos de plástico previamente pesados y se determinó el peso total, enseguida el licuado se transfirió a vasos para liofilizadora, y se colocaron en un ultracongelador (Revco Elite plus) a -60°C durante toda la noche. Al día siguiente, los licuados congelados, se colocaron en la liofilizadora (LabConco, freezone 2.5) para llevarlos a sequedad total.

El producto seco fue molido (micro molino IKA MF 10 basic) hasta polvo fino obteniendo, con la finalidad de que las partículas se

encuentren en mayor contacto con el solvente, posteriormente se colocó en un matraz Erlenmeyer de 5 L y se le vertió metanol (1:10 p/v), dejando en maceración durante 1 semana aproximadamente a 5 °C. Al término de la maceración, el extracto metanólico se llevo a sequedad a presión reducida a 37 °C, mediante Rotavapor (Rotavapor BUCHI R-215). El sólido remante se pesó, luego se transfirió a viales color ámbar y se calculó su rendimiento.

6.3.2 Prefraccionamiento mediante partición líquido-líquido

Al extracto crudo se le sometió a un prefraccionamiento con partición líquido-líquido, utilizando el esquema de Houssen y col.⁴⁹ a fin de quitar las sales contenidas en el extracto. **(Figura 16)** Las fracciones obtenidas se concentraron, evaporando por completo el solvente en el cual estaban disueltas mediante el empleo del Rotavapor; se analizan las fracciones por medio de Cromatografía en Capa Fina (CCF), por último se realizaron las pruebas de actividad biológica. Sólo aquellas fracciones que resultaron activas se les llevaron a un segundo fraccionamiento.

6.3.3 Primer fraccionamiento mediante columna Flash

Se pesaron 10g del extracto crudo y se disolvieron en 50 mL de diclorometano:metanol (CH_2Cl_2 :MeOH)95:5, luego se agrego 20g de gel de sílice, agitando para homogenizar la suspensión, la cual se transfirió a un matraz bola de 250 mL y se llevó a sequedad con el rotaevaporador. El extracto impregnado en la gel de sílice se montó en una columna para cromatografía Flash con 500 g de gel de sílice y se eluyó con mezclas crecientes de acetato de etilo-diclorometano y después de diclorometano-metanol de polaridad creciente (volumen de cada mezcla 500 mL). **(Tabla 2)**. Sin embargo, debido a la gran

absorción de los componentes polares del extracto crudo y al gasto excesivo de disolventes se decidió explorar el uso de otras técnicas cromatográficas para la separación de los componentes.

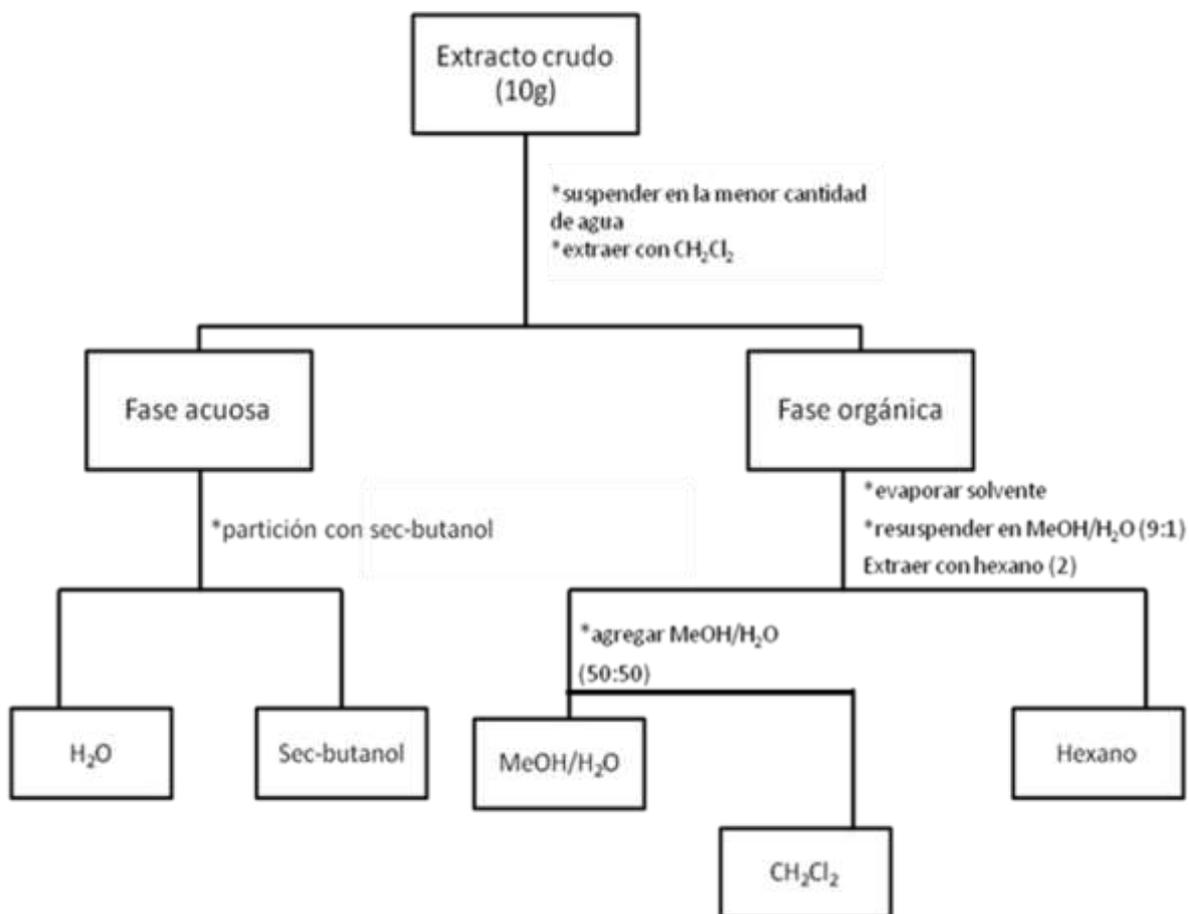


Figura 16 Diagrama de flujo de la partición líquido-líquido del extracto metanólico

6.3.4 Fraccionamiento mediante columna seca a vacío (Dry Column Chromatography)

Se pesaron 10 g del extracto crudo del holotúrido Híbrido, y se impregnaron de la misma forma utilizada para la cromatografía Flash (*vida infra*). Este gel de sílice impregnado con el extracto se adicionó a un embudo Büchner de 12 cm de diámetro, el cual se le colocó previamente un papel filtro y 80 g de gel de sílice para columna, tratando de dejar las dos fases lo más parejo posible.⁵⁰ **(Figura 17)**

Una vez vertido el extracto impregnado, se adicionaron 5 g de perlas de vidrio cubriendo todo el gel de sílice, a fin de evitar el levantamiento de la fase estacionaria al adicionar la fase móvil.

Tabla 2. Fracciones obtenidas a partir del extracto del *Hibrido* mediante cromatografía rápida en columna.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones reunidas
AcOet	100%	1-10
AcOet- CH₂Cl₂	90:10	11-20
AcOet- CH₂Cl₂	80:20	21-30
AcOet- CH₂Cl₂	70:30	31-40
AcOet- CH₂Cl₂	60:40	41-50
AcOet- CH₂Cl₂	50:50	51-60
AcOet- CH₂Cl₂	60:40	61-70
AcOet- CH₂Cl₂	70:30	71-80
AcOet- CH₂Cl₂	80:20	81-90
AcOet- CH₂Cl₂	90:10	91-100
CH₂Cl₂	100	101-111
CH₂Cl₂:MeOH	97.5:2.5	111-120
CH₂Cl₂:MeOH	95:5	121-130
CH₂Cl₂:MeOH	92.5:7.5	131-140
CH₂Cl₂:MeOH	90:10	141-150
CH₂Cl₂:MeOH	87.5:12.5	151-160
CH₂Cl₂:MeOH	85:15	161-170
CH₂Cl₂:MeOH	82.5:17.5	171-180
CH₂Cl₂:MeOH	80:20	181-198

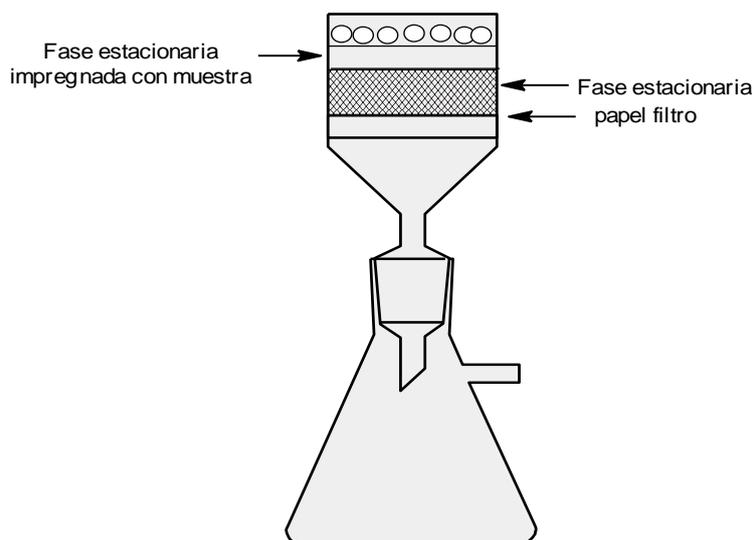


Figura 17 Esquema de montaje para el fraccionamiento mediante columna seca a vacío.⁵⁰

Una vez montado el sistema, se eluyó utilizando diferentes disolventes y mezclas de disolventes de creciente polaridad en Fracciones de 300 mL, obteniéndose 5 fracciones que se presentan en la **tabla 3**. La última fracción se obtiene al quitar cuidadosamente la fase estacionaria impregnada con el extracto, y se extrae con diclorometano-metanol 50:50. Una vez secas las fracciones, se procedió a la determinación de la actividad.

6.3.5 Separación con Extracción de Fase Solida (SEFS, SPE en inglés)

Debido a que el análisis de los extractos activos obtenidos mediante fraccionamiento en columna seca a vacío mostraba compuestos con diferente polaridad, se procedió a fraccionar más la muestra mediante la técnica de Separación con Extracción de Fase Solida (SEFS, o SPE en inglés). Básicamente, se utilizó como una técnica para la purificación de la muestra, previo a su análisis por HPLC analítico.

Así, El cartucho de SEFS (Strata-X, fase reversa para compuestos polares, de 12 mL, con 1 g de fase estacionaria, Phenomenex Inc.) se acondicionó de la siguiente manera: se paso por el cartucho 5 mL

de metanol para lavarlo, luego se equilibró con 5 mL agua bidestilada.

Tabla 3. Fracciones obtenidas a partir del extracto crudo del Híbrido H. floridana X H. mexicana

Eluyente	Proporción
Hexano	100%
AcOet	100%
CH₂Cl₂	100%
CH₂Cl₂:MeOH	90:10
CH₂Cl₂:MeOH	70-30
CH₂Cl₂:MeOH	50:50

Enseguida se agregó la muestra (100mg de la fracción activa disuelta en 5 mL metanol), la elución se llevó a cabo adicionando 5 ml de los siguientes disolventes: metanol (2X, lavado), metanol/ácido acético (AcOH)1%, metanol/acetonitrilo 50:50 (v/v), y por ultimo 5mL de Acetonitrilo/ácido acético al 1%. En cada uno de los pasos se colectaron las fracciones, y se llevaron a sequedad con rotaevaporador.

6.3.6 Separación del extracto activo mediante HPLC analítico

El extracto activo del fraccionamiento por SEFS, se separó mediante HPLC analítico, utilizando las siguientes condiciones:

Sistema HPLC: Sistema Binario Varian 211 (Varian Inc. USA), con inyector automático 410, colector de fracciones 701, con dos detectores: un 335 de U.V, y un Detector Evaporativo de Difracción de Luz (DELD, ELSD en inglés).

Condiciones de separación: Columna LUNA (C18, fase reversa, 250 X 4.6 mm, 5µm de partícula Phenomenex, INC. USA) Fase móvil, AcCN:MeOH, en gradiente de 0 a 50 % Acetonitrilo en un tiempo de 20 minutos de corrida.

Detección, ELSD, Temp. nebulización=40°C Temp. evaporación=70 °C, flujo de nitrógeno= 1.0 mL/min; U.V. a 230 nm

Se inyectaron 20 mL del extracto (5 mg extracto/mL, 5µg/µL).

Con base al cromatograma, se determinó separar cuatro diferentes fracciones mediante la técnica Overload, a fin de colectar un 5µg en cada corrida (20 en total). Las fracciones colectadas se llevaron a sequedad mediante el uso de rotaevaporador. Después Las fracciones se sometieron al ensayo bioactivo.

6.4. Ensayos de actividad

Todos los extractos generados se sometieron a las siguientes pruebas biológicas: Actividad tóxica en nauplio de *Artemia salina*⁵⁰ en microplaca, hemolisis de glóbulos rojos y actividad antiparasitaria mediante el método de subcultivo.

6.4.1. Determinación de la actividad tóxica de los extractos en nauplio del crustáceo *Artemia salina* en microplaca

Generación de los organismos: La cantidad de quistes a eclosionar se hidrataron por 1 hora en agua dulce, así 1 g de quistes generará 250,000 nauplios, si se considera el 100% de eclosión. Una vez hidratados, los quistes se colocaron en un recipiente, cilindro cónico transparente de 2L (recipiente de eclosión) el cual tiene una llave de salida en la parte cónica inferior y se adiciona 1 L de agua de mar (salinidad 2.5 %, 28 °C, pH de 7.7 a 8, con corriente de 2 mg/L). El recipiente de eclosión se dejó en aeración y luz por 24 horas. Una vez que eclosionan los nauplios, se cosecharon con un cernidor con malla de 100 micras. Se abre la llave inferior del recipiente para sacar los quistes no eclosionados, se enjuagan los nauplios con agua de mar muy bien y se colocan en un recipiente con volumen conocido.

Preparación de las muestras: Se pesaron 10mg del extracto crudo disolviéndolo en 1 mL de metanol (concentración final, 10,000 µg/mL). Partiendo de esta solución, se realizaron diluciones seriadas, tomando una alícuota de 100 µL y llevando a un volumen final de 1 mL con agua de mar, para generar un rango de 1000 µg/mL a 0.1µg/mL, las cuales se prepararon utilizando un vial ámbar de 5 mL. Como control negativo se utilizo agua de mar y como control positivo metanol al 100%.

Bioensayo: En una microplaca de 96 pozos de fondo plano se adiciona a cada pozo 100 µL de agua de mar, luego se añade 100µL de compuesto a evaluar, seguido de 100 µL de la solución de nauplio de *A. salina* de acuerdo al punto 6.4.1. Cada pozo de la microplaca se afora hasta su máximo nivel. Los ensayos de cada compuesto, así como de los controles se realizan por triplicado. La microplaca se tapó e incubó durante 24 hrs. con luz a una temperatura de 22-29°C, con agitación suave. Transcurrido el tiempo de incubación se contabilizan los crustáceos sobrevivientes, y el resultado se expreso como la DL50. El cálculo se realizó mediante el programa estadístico Probit de la EPA, V.1.5.⁵¹

6.4.3 Actividad antiparasitaria

Los ensayos de susceptibilidad in vitro contra *Trichomona vaginalis* y *Giardia intestinalis*, se llevo a cabo utilizando el método de subcultivo, mediante la técnica descrita por Cedillo Rivera et al. (2002).⁵²

Parásitos: Para el ensayo se utilizó *T. vaginalis* GT3 y *G. intestinalis* IMSS:0696:1; las cuales se mantuvieron en medio TYI-S-33 enriquecido con 10% de suero bovino para *T. vaginalis* y 10% de suero de ternera para *G. intestinalis* IMSS:0696:1.

Crecimiento de parásitos: Los parásitos se resembraron un día antes de realizar la prueba y se incubaron a 37°C durante 24hrs, con la finalidad de hacer crecer al parásito. Pasado el tiempo de incubación se verificó si el porcentaje de crecimiento se encuentra entre el 90-100%, y se dejó incubando de 12-24 h más. El porcentaje de crecimiento se establece al observar en microscopio la parte media del tubo, estando este tapizado con el parásito pegado al tubo, por ello podemos decir que hay un 90-100% de crecimiento.

Solución de extracto: El extracto es proporcionado en un vial con una cantidad de 10mg, se disuelve en 200µL de DMSO (Dimetil Sulfoxido) teniendo así una concentración de 50mg/ml.

Ensayo: Esta prueba consiste en colocar en un tubo eppendorf® de 1.5 mL lo indicado en la **tabla 5**:

Tabla 4 Ensayo de actividad contra parásitos

Concentración (µg/mL)	Solución de extracto(µL)	Parásitos (µL)	Medio de cultivo (µL)
1	3	50	1447
10	30	50	1420
20	60	50	1390
50	150	50	1300
Control	0	50	1450

Después de preparar los tubos como marca la tabla, se colocaron en incubación aproximadamente 48 hrs observando cada día los controles para verificar el crecimiento adecuado.

Después de 48 h, los tubos se colocaron en el refrigerador a una temperatura aproximadamente de 10 °C por 30 min, para despegar

a los parásitos del tubo, luego se contaron en una cámara de Neubauer, contando solo los parásitos de los cuadrantes las esquinas. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa estadístico, Probit; calculando la IC₅₀. Cada ensayo se realizó por triplicado.

6.4.3. Evaluación de la actividad hemolítica, modificado de Torres et al.⁵²

Éste modelo, representa una mayor efectividad para denotar la actividad de cada extracto.

Generación de la solución estándar de eritrocitos. Se colocaron 500 µL de sangre humana certificada en un tubo para centrífuga de 15 mL, y se adicionaron 5 mL de solución salina isotónica (0.9 % de NaCl) lentamente para homogeneizar la suspensión, la cual es centrifugada a 1500 rpm durante 5 min. Se decanta el líquido, y el botón es lavado dos veces más con 5 mL de SSI. Se tomaron 20 µL del botón final, y se resuspendieron en 1980 µL de SSI, para generar 2 mL de una solución al 2% de eritrocitos, suficiente para 19 muestras por duplicado

Preparación de las muestras: Se pesaron 10 mg de cada fracción obtenida, y se disolvieron en 1 mL de metanol, (concentración final, 10,000 µg/mL). Partiendo de esta solución, se realizaron diluciones seriadas, tomando una alícuota de 100 µL y llevando a un volumen final de 1 mL con agua de mar, para generar un rango de 1000 µg/mL a 0.1µg/mL, las cuales se prepararon utilizando un vial ámbar de 5 mL. El control positivo fue agua desionizada y metanol (choque osmótico) y el control negativo, SSI 0.9%, de acuerdo a la **tabla 4**:

Bioensayo. Tanto las muestras como los blancos, se incubaron a 37°C por 30 minutos, y una vez concluido el tiempo se centrifugaron a 2500 rpm por 4 minutos. El sobrenadante fue colocado en una

celda de cuarzo y se midió la absorbancia a 415nm en un espectrofotómetro. Cada muestra se realizó por duplicado.

Tabla 5 Procedimiento de la evolución de actividad hemolítica

Tipo de muestra	Extracto diluido en SSI	SSI 0.9%	Eritrocitos	MeOH	Agua desionizada
Control positivo	---	---	50 µL	50µL	950 µL
Control negativo	---	950 µL	50 µL	---	---
Muestra a ensayar	50 µL	900 µL	50 µL	---	---

Se calculó la actividad hemolítica mediante la siguiente fórmula:

$$AH(\%) = \frac{Am}{A(100\%) - A(0\%)} * 100$$

Donde:

AH(%)- Porcentaje de la Actividad hemolítica

Am – Absorbancia de la muestra

A(100%)- Absorbancia correspondiente al control positivo

A(0%) Absorbancia del control negativo.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

Para una mejor comprensión de los temas desarrollados, me permitiré presentar los resultados obtenidos y la discusión de ellos, para concluir el trabajo experimental.

7.1. Pepinos de mar estudiados

La colecta de las especies de *Holothuria grisea*, *Holothuria floridana* e híbrido entre *H. floridana* y *H. mexicana* (**Figura18**) se llevó a cabo en las costas de Dzilam de Bravo y Celestún, Yucatán. Como resultado se obtuvieron tres especies diferentes. Su identificación se realizó mediante observación morfológica, y la confirmación de la identidad de cada una de las especies por la observación microscópica de las espículas. En las siguientes imágenes se muestran las tres especies que se trabajaron, así como las espículas para cada uno. Todos los pepinos empleados se evisceraron, tratando de evitar a los glucósidos triterpénicos; moléculas bioactivas características de esta especie, y que se sintetizan en los túbulos de Cuvier. Estas saponinas, aunque son bioactivas, son hemolíticas, y por ende, es muy difícil su desarrollo como líderes para la obtención de nuevos fármacos.⁵⁴



Holothuria grisea



Holothuria floridana



Híbrido

Figura 18 Fotos de los pepinos de mar colectados.

La pared o celoma de los pepinos se secó y se pulverizó, y se extrajo con MeOH por una semana a 5°C aproximadamente. Aunque existen diferentes técnicas de extracción reportadas en la literatura (extracción con diferentes disolventes, extracción con metanol en ebullición, extracción exhaustiva (soxhlet), percolación)^{7-8, 25, 28}, se decidió utilizar la maceración por una semana a temperatura baja, para disminuir la posible oxidación de los compuestos bioactivos. El extracto metanólico se concentró hasta sequedad, obteniendo un residuo seco (extracto crudo). El número de especies se muestra en la **tabla 6**, así como el peso húmedo y extracto crudo obtenido a partir de lo colectado. En la **tabla 7** se presentan las actividades de los extractos crudos en las pruebas de letalidad en *Artemia salina* y antiparasitaria sobre *T. vaginalis* y *G. intestinalis*.

Los tres extractos crudos resultaron activos en ambos bioensayos, resaltando la actividad del *H. grisea*. Sin embargo, el tamaño del organismo y su poca asequeabilidad, impidieron seguir adelante en la búsqueda de compuestos antiparasitarios. Se realizaron dos colectas en Dzilam, donde se encontraron estos organismos, pero solo se ubicaron dos organismos con un tamaño de 10 cm.

Tabla 6. Pesos de las especies de pepino de mar colectados

Especie	No. de Organismos	Peso húmedo (Kg)	Extracto crudo seco (g)
<i>H. grisea</i>	11	1.0	3
<i>H. floridana</i>	14	1.7	10.3
<i>Hibrido</i>	20	2.5	60.0

Tabla 7. Efecto de los extractos crudos de los diferentes pepinos de mar colectados, sobre *A. salina*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

EXTRACTO CRUDO		Letalidad <i>A. salina</i>	Actividad antiparasitaria	
		LD ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	
			<i>G. intestinalis</i>	<i>T. vaginalis</i>
EXTRACTO CRUDO	H. grisea	1.12	344.8	22.25
	H. floridana	1319	395.8	15.64
	Híbrido	461	1615	23.04

Ahora bien, con base en la actividad antiparasitaria sobre *T. vaginalis*, y la prueba de letalidad en *A. salina*, así como la abundancia encontrada de los organismos, se decidió seguir con la búsqueda de compuestos antiparasitarios en los pepinos híbridos de *H. floridana* X *H. mexicana*.

7.2.1. Prefraccionamiento mediante partición líquido-líquido

10 g de extracto del holothurido híbrido se sometieron a una partición líquido-líquido con la finalidad de quitar las sales contenidas en el extracto y realizar un prefraccionamiento rápido. Una vez colectadas las 5 fracciones se llevaron a sequedad y cada extracto se sometió a los bioensayos de actividad, los datos obtenidos se presentan en la **tabla 8**.

Los extractos crudos probados contra *G. lamblia* y *T. vaginalis* presentan una baja actividad, sin embargo, después de hacer el prefraccionamiento de los extractos crudos de *H. floridana* e híbrido, la actividad se ve favorecida considerablemente contra *G. lamblia*, especialmente las fases polares (MeOH/AGUA, BuOH, y Diclorometano)

Tabla 8. Datos de rendimiento y actividad biológica de los extractos generados por el prefraccionamiento LÍQ-LÍQ, a partir del Híbrido

	Rendimiento	Letalidad <i>A. Salina</i>	Actividad antiparasitaria	
	(g)	LD50 (µg/mL)	IC50 (µg/mL)	
			<i>G. lamblia</i>	<i>T. vaginalis</i>
Extracto Crudo		1275.56	1615	23.04
Hexano	0.22	>1300	>1700	>1000
BuOH	0.51	>1300	7.61	>1000
MeOH/AGUA	0.27	>1300	4.22	>1000
DICLOROME	0.24	>1300	4.42	>1000
AGUA	6.73	>1300	>1700	>1000

El análisis de las fracciones por CCF reveló que las tres fracciones activas presentaban compuestos polares, dado que presentaban R_f menores a 0.2 en un sistema de fase normal con elusión con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5. Por lo anterior se decidió fraccionar el extracto crudo empleando cromatografía en columna de fase normal, iniciando con acetato de etilo como fase inicial.

7.2.2. Primer fraccionamiento mediante cromatografía en columna rápida (Flash Column Chromatography)

El extracto crudo se disolvió en diclorometano (10 g/100 mL de CH_2Cl_2), y se aplicó en una columna de sílica gel (500 g), la elución se llevó a cabo con mezclas crecientes de acetato de etilo-diclorometano y después de diclorometano-metanol de polaridad creciente (0-50 %), a una velocidad de 10 mL por minuto; obteniéndose 198 fracciones de 50 mL.

Todas las fracciones se analizaron mediante CCF y se agruparon en 12 subfracciones de acuerdo a su similitud, **(Tabla 9)** aquellas fracciones con un peso mayor a 10 mg se les realizó la prueba de letalidad en *A. salina*. Los resultados demostraron que solo las subfracciones O y P presentaron actividad tóxica, por lo que se sometieron a la prueba antiparasitaria. Ambas presentaron solo inhibición para el parásito de *G. intestinalis*. **(Tabla 10)** Es importante notar que estas dos fracciones no presentaron actividad tricomonocida.

Tabla 9. Subfracciones obtenidas a partir del extracto crudo del *Híbrido*

Subfracciones Clave	Fracciones	Rendimiento (mg)
A,D	1,6-8	107.3
B	2-4	17.3
C	40	4.0
E	9-19	24.2
F	20	124.1
G	21	5.0
H-K	22-39	3.3
L,Q,R	5,156-171,174-175	3.0
M	41-92	124.3
N	93-126	11.9
O	127-143	116.1
P	144-155, 162-173, 176-198	158.5

Tabla 10. Datos de actividad biológica de los extractos generados por el prefraccionamiento mediante cromatografía en columna rápida, partiendo del híbrido

	Actividad tóxica <i>A. Salina</i>	Actividad antiparasitaria	
	LD50 (µg/mL)	IC50 (µg/mL)	
		<i>G. intestinalis</i>	<i>T. vaginalis</i>
Fracción "O"	>10,000	17.56	>100
Fracción "P"	3439.743	8.468	>100

7.2.3. Fraccionamiento mediante columna seca al vacío (Dry Column Chromatography)

Debido a la alta retención de la sílica gel por el extracto crudo, se incrementó la cantidad de disolvente empleado, así como el tiempo de elución y el bajo rendimiento de las fracciones. Por lo que se evaluó la técnica de Fraccionamiento mediante columna seca al vacío (Dry Column Chromatography) a fin de obtener un prefraccionamiento rápido con un mejor rendimiento.

Cuando se aplicó esta técnica para la separación de extracto crudo del pepino híbrido, se obtuvieron 6 fracciones, las cuales se concentraron a sequedad y se les determinó su actividad sobre letalidad en *A. salina* y antiparasitaria. Los resultados se presentan en la **tabla 11 y 12**. Solo las 3 fracciones de mayor polaridad presentaron actividad sobre *A. salina*; y en la prueba antiparasitaria, solo la fracción DCM/MeOH 70:30, presentó actividad inhibiendo el crecimiento de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*. El análisis de las fracciones por CCF, mostró que estas fracciones presentan un perfil muy parecido, varios compuestos polares con r.f. menor a 0.3, y algunos compuestos menos polares con r.f. mayor a 0.5.

Tabla 11. Fracciones obtenidas a partir del extracto crudo del Híbrido (*H. floridana*- *H. mexicana*).

Eluyente	Proporción	Rendimiento (mg)
Hexano	100%	
AcOet	100%	0.3126
CH ₂ Cl ₂	100%	0.9830
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	90:10	0.6842
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	70-30	1.1955
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	50:50	2.7442

Tabla 12. Datos de actividad biológica de los extractos generados por el prefraccionamiento mediante cromatografía en columna seca al vacío rápida.

	Actividad tóxica <i>A. Salina</i>	Actividad antiparasitaria		Hemólisis
	LD50 (µg/mL)	% Inhibición a 100 µg/mL		AH%
		<i>G. lamblia</i>	<i>T. vaginalis</i>	
Acetato	>1000	0	0	3
CH₂Cl₂	>1000	0	0	5
DCM-MeOH 90:10%	493.576	0	0	94
DCM-MeOH 70:30%	335.967	65	65	91
DCM-MeOH 50:50%	685.223	0	0	87

Comparando el perfil cromatográfico de los extractos obtenidos por esta técnica, aunado a los obtenidos por la técnica de cromatografía en columna rápida, es notorio que la actividad la presentan compuestos polares.

Por otro lado, la coloración de los compuestos presentes en los extractos (morado), la pueden presentar los glicósidos triterpénicos,⁵⁵ por lo anterior, y tratando de elucidar si en las fracciones activas se presentan este tipo de compuestos, se evaluó la actividad hemolítica empleando la técnica modificada de Torres.⁵³ Los resultados se anexan en la **tabla 12**. Estos demuestran que las fracciones más polares, son hemolíticas, especialmente la que presenta la actividad antiparasitaria. Aun así, se decidió fraccionar aun más este extracto bioactivo, para establecer si la actividad antiparasitaria es debida a otro tipo de molécula.

Dado que ya se contaba con una mayor cantidad de extracto, a un gramo de extracto activo, se le intentó fraccionar mediante columna

abierta en gel de sílice, sin embargo, la unión irreversible del extracto, evitó su uso. Para seguir el fraccionamiento, se procedió a utilizar la metodología de HPLC en fase reversa para la separación más eficiente y rápida de los compuestos.

7.2.4. Separación con Extracción de Fase sólida (SEFS)

Sin embargo, para evitar tiempos largos de corrida, fue necesario someter al extracto a un prefraccionamiento con SEFS, a fin de separar los compuestos menos polares de la fracción bioactiva. Para ello, y considerando que los compuestos pueden tener diferente naturaleza química, se empleó un cartucho con fase reversa, que por un lado es no polar, y que por el otro puede servir para separar compuestos ácidos y básicos debido a su estructura (bencil-2-oxa-pirrolidina). Además, la SEFS tiene como ventajas el ser un procedimiento relativamente rápido con un gasto bajo de disolvente.

Una vez aplicada la técnica se obtuvieron 5 fracciones, las cuales se presentan en la **tabla 13**. Adicionalmente en la misma tabla se presentan los datos de actividad hemolítica y letal sobre *A. salina*.

Los datos revelaron que la actividad se mantiene en las fracciones más polares, dado que eluyen más rápido en fase reversa. El análisis de CCF en fase normal mostró que las fracciones F2 y F3 solo difieren en la parte no polar (r_f de 0.6), sin embargo, las fracciones F4 y F5, que presentan mayor cantidad de estos compuestos no polares resultaron inactivos. Por lo anterior, se consideró pertinente la separación de la fracción F2 por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) analítico.

Tabla 13. Datos de rendimiento y actividad biológica de los extractos generados por el prefraccionamiento mediante SEFS

	Rendimiento	Actividad tóxica <i>A. Salina</i>	Hemolisis
	(mg)	LD50 (µg/mL)	AH%
Muestra (F1)	33	>1000	1
Metanol 100% (F2)	57	545.227	95
MeOH-AcOet1% (F3)	7	107.354	90
MeOH-AcCN 50:50 AcOH1% (F4)	3	>1000	4
AcCN:AcOH1% (F5)	1.3	>1000	4

7.2.5. Separación del extracto activo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) analítico

Para la separación del extracto bioactivo, se procedió a la utilización del detector de evaporación de difracción de Luz (ELSD), un detector universal para la detección de moléculas, de reciente uso en la separación de productos naturales. Para ello, se empleó un método general para la separación de glicósidos triterpénicos en plantas (Varian database), que utiliza AcCN/H₂O en un gradiente de 35 a 50% en una hora. Utilizando estas condiciones, solo se observó un pico en el cromatograma (**Figura 19**), lo cual no coincide con el análisis de CCF del extracto.

La modificación de la fase móvil, incrementando el disolvente polar aprótico (AcCN) a un 100% en los primeros 5 min, seguido de un gradiente con un disolvente más polar prótico orgánico (0-50% MEOH, 10 min.), llevó a una mejor separación, como se muestra en la **figura 20**. La cantidad inyectada por corrida fue de 0.5 µg.

Para separar mas extracto por corrida, dado que se tiene una buena resolución entre los dos picos principales, se utilizó el método de sobrecarga en la columna (Overload),⁴⁹ lo que nos permitió separar 10 veces más por corrida (5µg).

Después de 20 corridas, se consiguió suficiente cantidad para determinar las pruebas biológicas de letalidad sobre *A. salina* y hemólisis. Las fracciones separadas, con sus tiempos de retención, rendimiento y datos de actividad se enlistan en la **tabla14**.

Tabla 14 Resultados de la separación de la F2 mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), fracciones obtenidas, tiempo de retención y actividad hemolítica y letalidad en *A. salina*.

Fracción	Tiempo de retención	Rend.	Actividad tóxica <i>A. Salina</i>	Hemolisis
	(minutos)	(mg)	LD50 (µg/mL)	AH%
I	0-4	3.1	>1000	94
II	4-7	2	321	100
III	7-11	1.2	>1000	96
IV	11-20	8.2	>1000	92

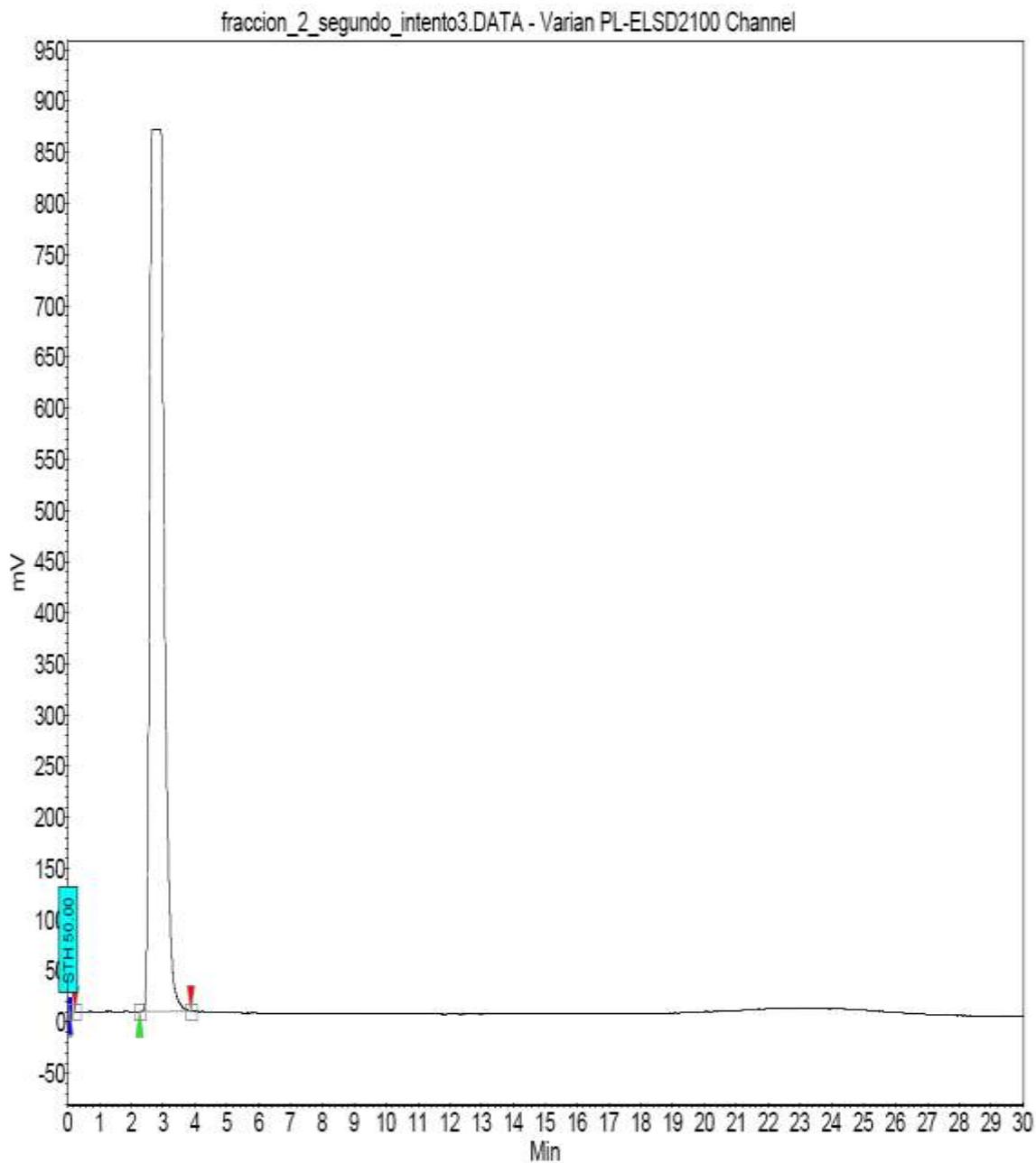


Figura 19 Cromatograma de la primera corrida del extracto F2, mediante fase reversa con un tiempo de análisis de 30 minutos. Columna: Luna, C18, fase reversa, 250 X 4.6 mm, 5 μ m, Fase móvil, AcCN:Agua, gradiente de 35 a 50 %, en 30 min. Detección, ELSD, Temp. nebulización=40°C Temp. evaporación=70 °C, flujo de nitrógeno= 1.0 mL/min. Vol. iny.: 20 μ L del extracto (0.5 mg extracto/mL, 0.5 μ g/ μ L).

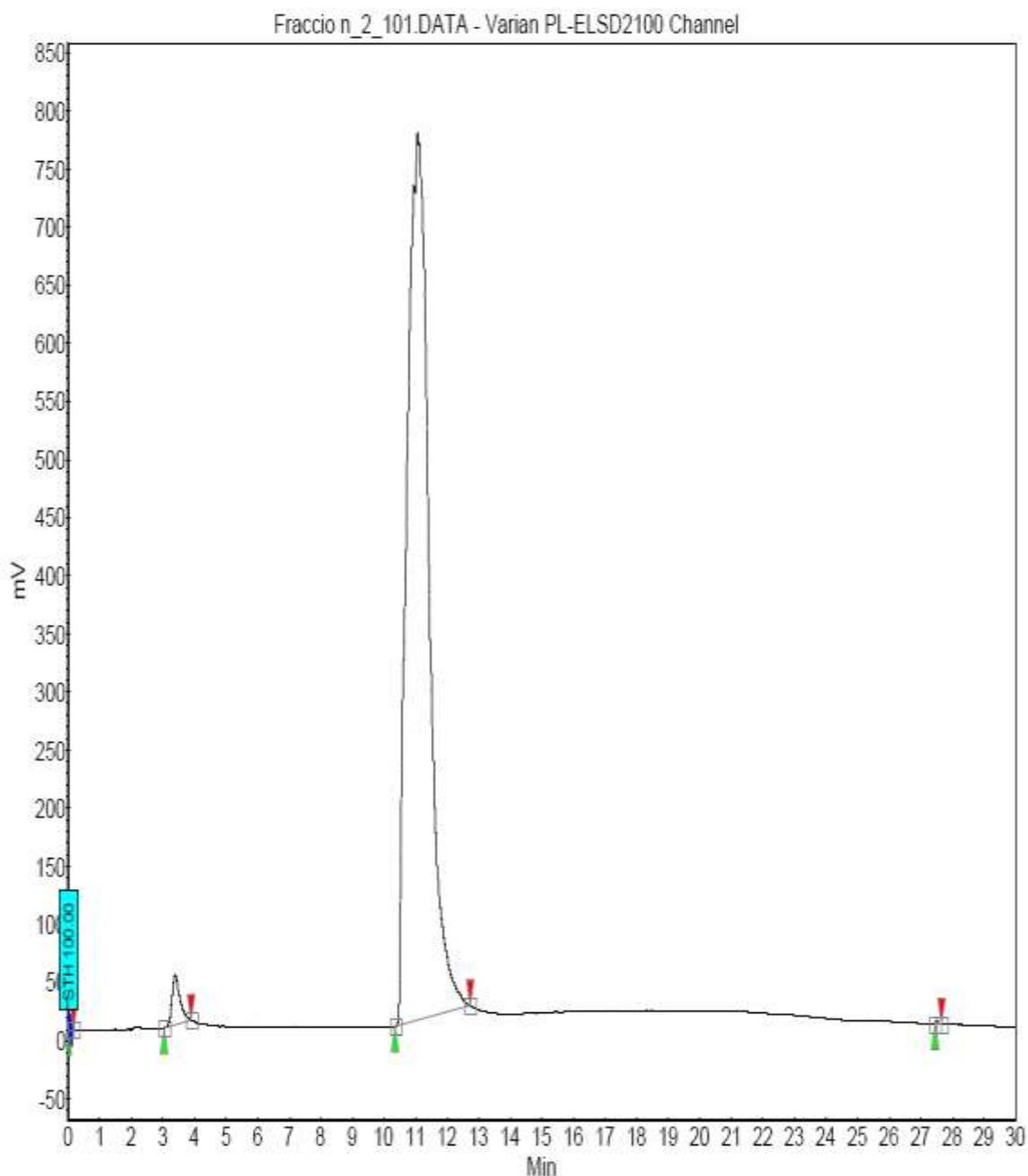


Figura 20 Cromatograma optimizado para la separación del extracto F2, mediante fase. Columna: Luna, C18, fase reversa, 250 X 4.6 mm, 5 μ m, Fase móvil, AcCN:MeOH, 100 % AcCN en 5 min, gradiente de 0 a 50 % MeOH en 15 min, 100 % de AcCN en 10 min. Detección, ELSD, Temp. nebulización=40°C Temp. evaporación=70 °C, flujo de nitrógeno= 1.0 mL/min. Vol. iny.: 20 μ L del extracto (0.5 mg extracto/mL, 0.5 μ g/ μ L).

De los resultados resalta que sólo la fracción II presenta actividad sobre *A. salina*, y que las cuatro fracciones generan hemólisis. Además el análisis de CCF de la FII muestra una sola mancha en fase normal, de color púrpura, lo cual implica que muy probablemente el (los) compuesto(s) presentes en esta fracción pertenecen al grupo de los glicósidos triterpénicos. Es importante señalar, que en este periodo se pensó en realizar una inyección el cromatografo de Gases/Masas, para realizar dereplicación y saber si los compuestos aislados ya han sido reportados, sin embargo, uno de los problemas de estas saponinas, es que dan aductos al ser sometidos a impacto directo,⁵⁶ por lo que el método general para el espectro de Masas es por FAB, y para ello es necesario contar con una sola molécula.

VIII. CONCLUSIONES

- Se colectaron e identificaron tres especies de pepino de mar del género *Holothuria*, las cuales fueron identificadas taxonómicamente como *H. floridana*, *H. grisea* e *Híbrido entre H. floridana y H. mexicana*.
- Los extractos metanólicos de la pared de los tres holotúridos demostraron buena actividad antiparasitaria. Aunque, *H. grisea* resultó ser el extracto más activo, su tamaño y poca asequibilidad evitaron su estudio como fuente de productos naturales antiparasitarios.
- Se logró el prefraccionamiento del extracto general del holotúrido híbrido mediante separación biodirigida. El cual llevo a la fracción II que se obtuvo después de tres fraccionamientos mediante diferentes técnicas cromatográficas.
- Esta última fracción tiene la propiedad de ser un compuesto polar y hemolítico; evidencia que nos lleva a pensar que muy probablemente se trate de una saponina
- Sin embargo, será necesario algunos experimentos adicionales para conocer la identidad del (los) compuesto(s) responsables de la actividad antiparasitaria.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Robertson, L.J; Hanevik, K. Escobedo, A. Merch, K.; Langeland, N. "Giardiasis-why do the symptom sometimes never stop?" *Trends in Parasitology*, **2009**, 26(2), 75-82
2. Soper, David. "Trichomoniasis: Under control or undercontrolled" *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **2004**, 190, 281-90
3. Upcroft, J.; Dunn, L.; Wright, J.; Benakli, K.; Upcroft, P.; Vanelle, P. "5-Nitroimidazole Drugs Effective against Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2006**, 50(1), 344-347.
4. Wermuth, C. "Strategies in the search of new lead compounds or original hypotheses" in "The practice of Medicinal Chemistry" Wermuth, Camille, Ed. 2nd Ed. Academic Press (London), **2003**, Chapter 5
5. Jimenez José C., Marfil Marta, Francesh Andrés M., Cuevas Carmen, Alvarez Mercedes, Albericio Fernando. *Productos naturales de origen marino*. Investigación y ciencia, **2007**, 75-77.
6. Solís Marin Francisco A. "Un espacio sobre los equinodermos en México" marzo 2007.
7. Kelly, M.S. "Echinoderms: Their culture and bioactive compounds" in Echinodermata, Valeria Matranga (ed), Springer-Verlag (New-York) *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, **2005**, 39
8. Singh, N.; Kumar, R.; Gupta, S.; Dube, A.; Lakshmi, V., "Antileishmanial activity in vitro and in vivo of constituents of

- sea cucumber *Actinopyga lecanora*" *Parasitology Research* **2008**, *103* (2), 351-354
9. Dimayuga, E. Murillo-Alvarez, JI. Christophersen, C. Chan-Bacab, M. García Reiriz, ML. Zacchino, S. "Leishmaniacidal, antifungal, and cytotoxic activity of triterpenoid glycosides isolated from the sea cucumber *Neothyone gibbosa*" *Natural Product Communications* **2006**, *1*(7), 541-47.
 10. Hendler G.; Miller, J.; Pawson, D.; Kier, P. "Sea stars, sea urchins, and allies: echinoderms of the Florida and the caribbean" Smithsonian Institution Press, Washington, **1995**.
 11. Durán-González, A.; Laguarda-Figueras, A.; Solís-Marín, F.A. "Equinodermos (Echinodermata) de las aguas mexicanas del Golfo de México" *Revista de Biología Tropical* **2005**, *53 Suppl 3*, 123-37.
 12. Brown T, Srikanthan S. Building commercial success into R & D. *Scrip Magazine* **1998**; *70*: 43-5.
 13. Dimasi JA. Success rates for new drugs entering clinical testing in the United States. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **1995**; *58*: 1-14.
 14. Banerjee P, Rosfsky M. Drug discovery: the quest for innovation and productivity. *Scrip Magazine* **1997**; *62*, 35-8.
 15. Carté B. Biomedical Potential of Marine Natural Products. *Bioscience* *6*, **1996**, 4.
 16. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.; Munro, M. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. (**2007**). Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rev.*, *24*: 81-86.

17. Garateix Anoland. El mar: fuente de nuevos fármacos, Ciencia y Cultura, 12 (garateix, 2005).
18. Glaser, K.; Mayer, A. A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality. *Biochemical Pharmacology* **2009**, 78, 440-448
19. Mayer, A.; Glaser, K.; Cuevas, C.; Jacobs, R.S.; Kem, W.; Little R.D.; McIntosh, J.M.; Newman, D.J.; Potts, B.C.; Shuster, D.E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective *Trends in Pharmacological Sciences*, **2010**, 31 (6), 255-265
20. Proksch, Peter, Edrada, Ru, Lin, Wen. "Implications of marine biotechnology on drug discovering", in Proksch, P and Müller W. *Frontiers in marine Biotechnology*, Horizons Bioscience Ed., (Great Britain), **2006**, Chapter 1.
21. Roberto, B. (1989). *Zoología de los invertebrados*. Mc Graw-Hill.
22. Solís-Marín, F.A.; Arriaga-Ochoa, J.A.; Laguarda-Figueras, A.; Frontana-Uribe, S.C.; Duran-González, A. *Holothuroideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California*. 1era Ed. ICMYL Edit (UNAM), **2009**, Cap 1.
23. Falcón, M.G; Maqueda, O.; Acatitla, M.A. Elaboración de una propuesta para el estudio prospectivo de las poblaciones naturales del pepino de mar (*Holothuria spp.*) y del erizo de mar (*Strongylocentrotus spp.*) en las costas de los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, México. *Oceanología*. **1996**, 1 (9), 51-99

24. Laguarda-Figueras A, Solis-Marín FA, Durán-González A, Ahearn CG, Buitrón-Sánchez BE, Torres-Vega J. *Rev Biol Trop.* **2005** 53 Suppl 3:109-22.
25. Chludil, H et al. 2003, Chludil, H. Murray, A.; Seldes, A.; Maier, M. Biologically active triterpene glycosides from sea cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata) *Studies in natural Products Chemistry* **2003**, 28, 587-615
26. Halstead, B.W. **1992**. Dangerous aquatic animal of the world. Mosby Year Book. USA. pp. XVII – XVIII.
27. Moraes, G.; Northcote, P. T.; Kalinin, V.; Avilov, S.; Silchenko, A.; Dmitrenok, P.; Stonik, V.; Levin, V. Structure of the major triterpene glycoside from the sea cucumber *Stichopus mollis* and evidence to reclassify this species into the new genus *Australostichopus*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2004**, 32, 637–650
28. WHO. 10 facts on malaria URL: <http://www.who.int/features/factfiles/malaria/>, Acceso abril **2009**.
29. Jong Wong, L. WHO: Report of the Third Global Meeting of the Partners for Parasite Control, Geneva, Ch. Nov 29-30, 2004, World Health Organization, Geneva Ch., **2005**.
30. Aparicio P, Rodríguez E, Gárate T, Molina R, Soto A, Alvara J. **2003. Terapéutica antiparasitaria.** *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 21(10): 579 – 594.
31. World Health Organization. An overview of selected curable sexually transmitted diseases, p 2-27. In World Health Organization (ed.), In Global Program on AIDS. 1997 World Health Organization, Geneva, Switzerland.

32. Watts, K.R.; Tenney, K.; Crews, P. The structural diversity and promise of antiparasitic marine invertebrate-derived small molecule" *Current Opinion in Biotechnology*, **2010**, *21*, 808-818
33. Crews, o.; Hunter, L.M. The search for antiparasitic agents from marine animals. In *Marine Biotechnology*, Edited by Attaway D.H, Zaborsky, OR. Plenum Press; **1993**, 343-389
34. McCormack WM, Evrard JR, Laughlin CF, Rosner B, Alpert S, Crockett VA. Sexually transmitted conditions among women college students. *Am J Obstet Gynecol* **1981**;139:130-3.
35. Ris HW, Dodge RW. Trichomonas and yeast vaginitis in institutionalized adolescent girls. *Wis Med J* **1973**; 72:150.
36. Markell, E.K., Voge, M., y John D.T. **1990**.-*Parasitología médica*. Interamericana. McGraw-Hill. Madrid.
37. Biagi F. Enfermedades Parasitarias. Ediciones Cientificas La Prensa Medica Mexicana, 2ª ed. Mexico D.F., **1988**.
38. Tay Zavala J. Microbiología y Parasitología Médicas. Méndez editores, México D.F., **1993**.
39. Kucik C.; Martin G.; Sortor B. *Common Intestinal Parasites. American Family Physician*. **2004**; 5: 1161-1169.
40. Weiss J.; van Keulen H.; Nash T. Classification of subgroups of *Giardia lamblia* based upon ribosomal RNA gene sequences using the polymerase chain reaction. *Molecular Biochemical Parasitology* **1992**; 54: 73-86.
41. Pumarola A., et al. Microbiología y Parasitología Médica. Ediciones Científicas y Técnicas, 2ª ed. Barcelona, España, **1991**.

42. Petri W.; Mann B. Molecular mechanisms of invasión by *Entamoeba histolytica*. *Cell Biology* 4. **1993**; 30: 305-313.
43. Romero R. *Microbiología y Parasitología Humana*. Editorial Medica Panamericana, Mexico D.F., **1993**.
44. Clark C.; Diamond LS. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa. *Archives Medical Research* **1992**; 23: 15-19.
45. Leippe M.; Muller-Eberhard H. *The pore-forming peptide of Entamoeba histolytica, the protozoan parasite causing human amoebiasis. Toxicology*. **1994**;5: 18-34.
46. Stahl, E. *Thin-Layer Chromatography* 2nd ed., Springer-Verlag, New York, NY, **1969**
47. Zetina-Moguel, C.; Ríos, L, Hernández, H.I.; Cuevas, O.M.; Ortiz, A.E.; Pool, G.J. "Catálogo de especies de pepino de mar comercializables del estado de Yucatán" UADY, Ed. 1era Ed. **2003**
48. Housen, W.E; et al. "Isolation of marine natural products" in Sarker, S.; Latif, Z.; Gray, E. *Methods in Biotechnology: Natural products isolation*", 2nd Ed. Humana Press. **2006**, Chapter 15
49. Hostettmann, K.; Marston, A.; Hostettmann, M. "Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation" 2nd. Ed. Springer-Verlag (london) **1998**, Chapter 4
50. Rahman, A.; Choudhary, I.; Thomsen, W. *Toxicity Assays, Bioassay techniques for drug development* " 2nd ed. OPA Publisher (London) **2001**, Chapter 2
51. EPA Probit Analysis, Version 1.5.
<http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>

52. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. "In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents" *Journal of Medical Microbiology* **1992**, 37, 221
53. Torres M., Aguilar M.B., Falcon A., Sanchez L., Radwan F.F.Y., Burnett J.W., Heimer-de la Coteria E.P., Arellano R.O. "Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*" *Toxicon* **2001**, 39 (9), 1297-1307
54. Beutler, J.A. "Natural Products as Foundation for Drug Discovery" *Current Protocols in Pharmacology*, **2009**, 9.11.1-911-21, Sup. 46
55. Hostettmann, K.; Marston, A.;. "Saponins" in Phillipshon et al. *Chemistry and Pharmacology of Natural Product*. Ed. Cambridge University Press (cambridge) **1995**, Chapter 3
56. Luigi Minale, Raffaele Riccio, Franco Zollo "Structural studies on chemical constituents of echinoderms" *Studies in Natural Products Chemistry* **1995**, 15 (3), 43-110