



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MARY Y LIMNOLOGÍA  
(QUÍMICA ACUÁTICA)

OBTENCIÓN DE MOLÉCULAS CON POSIBLE ACTIVIDAD BIOLÓGICA  
PRESENTES EN LA ANÉMONA *Bunodosoma cavernata* DE LA ZONA COSTERA  
DE YUCATÁN

T E S I S  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
ENRIQUE ÁLVAREZ BOHÓRQUEZ

COMITÉ TUTOR:

Dr. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES  
UNIDAD DE QUÍMICA, SISAL, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

Dr. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

Dr. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D. F. MARZO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología*  
*Universidad Nacional Autónoma de México*



Obtención de moléculas con posible actividad biológica presentes en la anémona

*Bunodosoma cavernata* de la zona costera de Yucatán.

## T E S I S

Que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias

(Química acuática)

P r e s e n t a:

Enrique Álvarez Bohórquez

Comité tutor:

Director de tesis: Dr. Sergio Rodríguez Morales

Tutora: Dra. Judith Sánchez Rodríguez

Tutor: Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Tutor: Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros

Tutor: Dr. José Estuardo López Vera

Ciudad de México, 2016

## Agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada, que permitió el desarrollo de mis estudios de posgrado y la conclusión del presente trabajo.

A S. Gabriela Cabello Trejo, por ser la persona con la insolencia necesaria para señalarme mis errores, presionarme, motivarme y no dejarme dar por vencido, y por todo el tiempo juntos.

A mi ahora exjefe Dr. Sergio Rodríguez, no sólo por su orientación académica, sino por su amistad y atención, y cada delicia culinaria que nos ha legado.

A mis amigos de gorduras, McCarthyzasos y desveladas, principales víctimas de productividad truncada: Adanely, Luis, Itzel, Eduardo y Mario, en serio extrañaré, con su carencia de redes sociales, distracciones, desconocimiento de los puntos cardinales, irresponsabilidad al volante y la habilidad de dormir 18 horas quejándose de insomnio. Por supuesto, a Yoli por haber sido mi vecina y la primer persona en confiar en mí y ser aliada de insurrecciones a la autoridad. A Magui, por enseñarme que hay alguien más quejumbroso que yo. A la Dra. Parera, por sus irreverencias y videos recreativos.

A mis adorables roomies, Carmen, Luis y Mariana, tuvimos momentos bajos, pero fueron incontables noches al llegar a casa con temas tan diversos y anécdotas simplemente inverosímiles.

A mis compañeros de trabajo, Chucho, Adriana y al Dr. Yam, por ser tan infinitamente amables como se cuenta de los yucatecos.

A mis alumnas Fernanda y Daniela, porque su presencia y ayuda me hizo trabajar el triple y avancé demasiado, además de su amistad y risas estridentes. Y a mis (no) alumnas, pero sí amigas, Jaqueline, Fernanda y Raquel, que me hicieron entrar a un mundo de palabras nuevas y frases y momentos extraños.

A mi familia, porque estuvieron para apoyarme en este viaje y en cada documento que llegué a olvidar.

Y, por supuesto, a mí, porque sí, me lo merezco.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN.....	9
1. ANTECEDENTES .....	13
1.1 Productos naturales como fuente de moléculas activas .....	13
1.1.1 De origen terrestre.....	13
1.1.2 De origen marino .....	14
1.2 Anémonas .....	17
1.2.1 Estructura anatómica .....	18
1.2.2 Nematocistos.....	19
1.2.3 Moléculas activas presentes en <i>Bunodosoma</i> .....	24
1.2.4 Clasificación filogenética y taxonómica .....	26
1.2.5 Distribución geográfica .....	28
2. HIPÓTESIS: .....	30
3. OBJETIVOS:.....	31
4. METODOLOGÍA:.....	32
4.1 Colecta de los organismos de estudio .....	33
4.2 Identificación taxonómica.....	33
4.3 Generación del extracto crudo .....	33
4.3.1 Generación del extracto a partir de organismos completos .....	34
4.3.2 Generación del extracto crudo de los nematocistos .....	35
4.4 Evaluación de la actividad biológica.....	36
4.4.1 Actividad neurotóxica in vivo sobre cangrejo .....	36
4.4.2 Prueba de letalidad en nauplio de <i>Artemia salina</i> .....	37

4.4.3	Actividad citotóxica en embriones de pez cebra .....	39
4.4.4	Actividad hemolítica.....	40
4.4.5	Actividad antiparasitaria por el método de subcultivos .....	41
4.5	Fraccionamiento biodirigido del extracto activo .....	42
4.5.1	Separación por ultrafiltración (exclusión molecular) .....	42
4.5.2	Separación por extracción en fase sólida de fase reversa (C18-U) .....	47
4.5.3	Separación por exclusión molecular en CLAR.....	47
4.5.4	Separación por CLAR de intercambio catiónico fuerte .....	47
4.6	Determinación del peso molecular .....	48
4.6.1	Por CLAR empleando gel permeable .....	48
4.6.2	Por SDS-PAGE con tricina.....	48
4.7	Determinación del perfil de aminoácidos de los compuestos bioactivos .....	51
4.7.1	Hidrólisis ácida por método de Pico-tag.....	51
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	53
5.1	Colecta/identificación .....	53
5.2	Extracciones y fraccionamiento (rendimientos y evaluación biológica) .....	55
5.2.1	Evaluación de la actividad biológica de los extractos crudos .....	57
5.2.2	Separación por exclusión molecular por ultrafiltración.....	59
5.2.3	Separación por extracción en fase sólida.....	65
5.2.4	Análisis por CLAR en fase reversa.....	66
5.2.5	Separación por gel permeable/intercambio catiónico en CLAR: .....	67
5.3	Determinación del peso molecular de la fracción A1-50-1b .....	72
5.4	Determinación de la naturaleza química del compuesto activo .....	76
6.	CONCLUSIONES.....	78
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	79

## Índice de figuras

FIGURA 1-1 EJEMPLOS DE MOLÉCULAS ANTIPARASITARIAS AISLADAS DE ORGANISMOS MARINOS ...	16
FIGURA 1-2 ANÉMONA .....	17
FIGURA 1-3 ESTRUCTURAS ANATÓMICAS MÁS REPRESENTATIVAS DE LAS ANÉMONAS .....	18
FIGURA 1-4 DESCARGA DEL NEMATOCISTO .....	19
FIGURA 1-5 TIPOS DE NEMATOCISTOS .....	20
FIGURA 1-6 ESQUEMA FILOGENÉTICO DEL FILO CNIDARIA .....	27
FIGURA 1-7 DISTRIBUCIÓN LATITUDINAL DE LA DIVERSIDAD DE ANÉMONAS .....	29
FIGURA 4-1 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA .....	32
FIGURA 5-1 ANÉMONA, VISTA LATERAL.....	54
FIGURA 5-2 ANÉMONA, VISTA SUPERIOR.....	54
FIGURA 5-3 SEPARACIÓN POR SDS-PAGE .....	62
FIGURA 5-4 CROMATOGRAMAS DE LAS FRACCIONES DE 1-3 kDa OBTENIDAS DE LA ULTRAFILTRACIÓN.....	64
FIGURA 5-5 CROMATOGRAMAS DE LAS FRACCIONES DE 1-3 kDa (A1) ELUÍDAS CON 95:5, 90:10 Y 50:50 % AGUA/ACN.....	66
FIGURA 5-6 CROMATOGRAMA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR DE LA FRACCIÓN A1-50.....	68
FIGURA 5-7 CROMATOGRAMA DE LA FRACCIÓN A1-50-1B ANALIZADA POR CLAR-C18 .....	69
FIGURA 5-8 CROMATOGRAMA DE LA FRACCIÓN A1-50-1B (17:51) ANALIZADA POR CLAR- INTERCAMBIO CATIONICO .....	70
FIGURA 5-9 CROMATOGRAMA DE LA FRACCIÓN A2-50 ANALIZADA POR CLAR-C18 .....	71
FIGURA 5-10 CROMATOGRAMA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR DE LA FRACCIÓN A2-50.....	72
FIGURA 5-11 CROMATOGRAMA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR DE LOS ESTÁNDARES DE PESO MOLECULAR .....	73
FIGURA 5-12 CROMATOGRAMA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR DE LA FRACCIÓN A1-50-1B.....	74
FIGURA 5-13 SDS-PAGE TRICINA DE LA FRACCIÓN A1-50-1B .....	76
FIGURA 5-14 PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE LA FRACCIÓN A1-50-1B.....	77



## RESÚMEN

México forma parte de un sector de países (en África, Asia y Latinoamérica) donde motivos económicos y de planeación han derivado en la prevalencia de enfermedades cuyos tratamientos son costosos, o bien, no son primordiales para la investigación farmacéutica; como las parasitosis, que afectan a cerca de un tercio de la población mundial y al cáncer, causante de más de 5 millones de muertes al año.

Debido a la riqueza natural del país, el actual proyecto se centró en la obtención de compuestos con actividad biológica de la anémona *Bunodosoma cavernata*, recientemente descrita en la costa de Yucatán<sup>1</sup>, con el fin de proveer de alternativas contra este tipo de enfermedades en las que no siempre suelen enfocarse el desarrollo de nuevos medicamentos. Esto se realizó basado en estudios previos sobre péptidos neurotóxicos y proteínas citolíticas aislados de otros organismos marinos que han demostrado actividad antibacteriana, anticancerígena y contra enfermedades autoinmunes.

Para ello, se generaron tres diferentes extractos por separado: acuoso del organismo completo; metanólico, también del organismo completo; y un tercero del contenido de los nematocistos. Los extractos fueron evaluados en cuatro bioensayos rápidos: neurotoxicidad en cangrejo, hemólisis en eritrocitos humanos, embriotoxicidad en pez cebra y letalidad en *Artemia salina*. Los resultados revelaron que las moléculas activas están contenidas en los nematocistos, sin embargo, el rendimiento que se obtiene es muy bajo, por lo que se trabajó con el extracto acuoso del organismo completo.

El extracto se sometió a separación por tamaño molecular mediante ultrafiltración para diferenciar neuropéptidos (principalmente fracciones menores a 10 kDa) de citolisinas (principalmente fracciones mayores a 10 kDa), y las fracciones activas fueron separadas mediante un esquema biodirigido.

Los resultados obtenidos revelaron actividad hemolítica y en las fracciones >10 kDa; sin embargo, nuestro enfoque se vio encaminado al aislamiento de fracciones <10 kDa (Hemólisis <58%), donde se buscaba evitar la acción inespecífica de proteínas citolíticas. Se encontró, por separación de peso molecular en ultrafiltración, que el efecto neurotóxico se hallaba en fracciones de 1 a 3 kDa (A1) que, basado en estudios previos sobre *Bunodosoma*, podía tratarse de un péptido neurotóxico.

El fraccionamiento por extracción en fase sólida C18 nos permitió eliminar a las sales, que constituían cerca del 70% de A1, y obtener una nueva fracción neurotóxica de menor complejidad (A1-50). La fracción A1-50 fue analizada mediante exclusión molecular en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) obteniendo la fracción activa A1-50-1b, con tiempo de retención de 17:51 dentro de la fracción de A1-50 (C18-EFS) cuyo análisis mediante intercambio catiónico en la misma técnica demostró ser una sola fracción. La determinación del perfil de aminoácidos mostró la presencia de 9 aminoácidos, por lo que demostró su naturaleza peptídica y un peso estimado de 1.77 kDa. El análisis detallado de la fracción A1-50-1b por exclusión molecular, así como la técnica de electroforesis en SDS-PAGE (tricina) comparándola con estándares de peso molecular conocido de 13.7, 6.5 y 1.4 kDa (ribonucleasa, aprotinina, bacitracina, respectivamente) permitieron determinar un peso molecular aproximado de  $\approx 1.6$  kDa.

## INTRODUCCIÓN

El avance en el conocimiento y su aplicación tecnológica en el campo farmacéutico ha permitido al hombre valerse de su entorno para desarrollar medicamentos para las enfermedades que lo aquejan. Los registros históricos constatan la importancia de la naturaleza como medio para encontrar remedios a casi cualquier problema de salud desde hace siglos. Recetas refinadas por la experiencia de la prueba y del error principalmente sentaron las bases para la creación de una ciencia que hoy por hoy aún se nutre de éstos métodos, pero que se ha visto enriquecida por su carácter multidisciplinario tanto como la existencia de equipos capaces de extraer y separar los compuestos activos.

Se ha evolucionado a partir del uso de la naturaleza en sí misma, al uso de sus extractos y posteriormente del aislamiento de biomoléculas, hasta la síntesis de moléculas análogas con actividad mejorada o minimización de algún efecto secundario. Esto ha abierto el campo a industrias farmacéuticas dedicadas a la síntesis y diseños de nuevos fármacos que, sin embargo, están limitadas por barreras económicas que las localizan en países de primer mundo y por ende, de las afecciones propias de éstos. La búsqueda de tratamientos para enfermedades como las parasitarias, principalmente aquellas que se relacionan con regiones de escasos recursos, tienen ahora mismo sus esfuerzos enfocados en esta riqueza natural. Asimismo, los recursos naturales se están empleando cada vez más como fuente de moléculas líder en el caso de otros problemas de salud tan graves como el cáncer y el VIH, por ejemplo.

El caso de los padecimientos de origen parasitario es un problema de gran relevancia debido a su alta incidencia alrededor del mundo, agravándose más en zonas específicas donde algunos factores como el clima, sobrepoblación, prácticas higiénicas deficientes e infraestructura inadecuada para su tratamiento son los catalizadores.

Los datos actuales indican que al menos un tercio de la población mundial está infestada por los protozoarios amitocondriados (organismos unicelulares eucariotas sin mitocondria): *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. A nivel global, existen reportados más de 58 millones de casos de diarrea protozoaria infantil por año<sup>2</sup>, a la par de estimaciones de que tan sólo en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de que niños menores a 5 años mueran a causa de enfermedades gastrointestinales puede alcanzar un 50 %, considerando su entorno socioeconómico y nutricional<sup>3</sup>.

Estas parasitosis protozoarias se tratan generalmente con metronidazol, aunque debido a problemas de efectos secundarios, lentamente se ha incrementado el uso de la nitazoxanida. Tras la aparición de resistencia, se usaron terapias con bencimidazoles como el albendazol, derivados de acridina de la quinacrina, o el aminoglucósido paramomicina en combinación con metronidazol<sup>4</sup>. Sin embargo, es importante señalar que el último fármaco antiparasitario se desarrolló hace 50 años debido a que los países de economías fuertes abandonaron su investigación. Esta carencia de medicamentos nuevos que ofrezcan mecanismos de acción diferentes a los actuales ha suscitado un reciente auge de estudios dirigidos a la búsqueda nuevas fuentes de moléculas antiparasitarias, principalmente de origen natural, entre ellos, de plantas<sup>5,6,7</sup> e insectos<sup>8,9</sup>. Esta prometedora búsqueda de fuentes potenciales de moléculas también ha empleado el ambiente marino como sitio de bioprospección; en el mar las condiciones físicas y químicas permiten la formación de complejas interacciones entre organismos, lo que conlleva una abundante biodiversidad química, lo que se ve reflejado en la obtención de numerosos metabolitos antiparasitarios<sup>10,11</sup>. Por ejemplo, se tienen trabajos donde se han aislado ácido alfa-kaínico y bengamida F, de algas como *Digenia simplex* y pepino de mar, respectivamente, contra protozoos parásitos, entre otros<sup>12</sup>.

Enfermedades como el cáncer también son un grave padecimiento que ha aumentado su incidencia con 14 millones de personas al año y produciendo la muerte de 8.2 millones, cifras que se estima aumentarán en 70% en dos décadas. El cáncer se presenta en múltiples formas y con orígenes diversos, su lista de blancos principales son el pulmón, próstata, estómago, mama, cérvix e hígado, principalmente por causas de dietas pobres y abuso de tabaco y alcohol, afectando principalmente (60%) a África, Asia y Centroamérica<sup>13</sup>. Una de las principales contribuciones a su desarrollo son las infecciones virales (Epstein-Bar, hepatitis, herpes y el virus de inmunodeficiencia humana) que generan el 100% de los carcinomas, siendo el carcinoma nasofaríngeo una enfermedad propia de regiones de bajo desarrollo (92% de los casos) que causa la muerte de cerca de 51,000 personas y la presencia de 87,000 nuevos casos en el 2012, mientras que en zonas de mayor desarrollo el linfoma no Hodgkin, por ejemplo, presenta hasta 38,000 nuevos casos el mismo año<sup>14</sup>. El estudio de productos naturales con actividad anticancerígena ha crecido a partir de regiones templadas, aprovechando el efecto citotóxico de moléculas como el taxol y más recientemente en organismos marinos como las esponjas y tunicados con macrólidos como las briostatinas, compuestos que se encuentran en baja proporción en los organismos marinos y que han derivado en su síntesis, también de gran dificultad debido a sus estructuras tan complejas, A la vez de esto, también se ha puesto atención en otros compuestos, como las proteínas citolíticas presentes en las anémonas, como la equinotoxina II<sup>15</sup>.

Como se ha mencionado, la investigación en productos naturales de origen marino ya está en desarrollo; sin embargo hay ciertos organismos más estudiados que otros. Por ejemplo, entre 2008 y 2010, entre 133 antiparasitarios reportados, el 65.4 % fueron hallados en esponjas, 15 % en hongos, 8.3 % en cianobacterias y el resto en algas, actinomicetos y corales<sup>10</sup>.

Las anémonas constituyen un campo cuyo estudio aún no es basto, pero que ha producido ya resultados, como las citolisinas efectivas contra *G. intestinalis* de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus*<sup>16</sup>, y *Stichodactyla gigantea* como agente antimicrobiano<sup>17</sup>. Asimismo, se conocen ya más de 32 especies de anémonas que producen péptidos citolíticos<sup>15</sup>.

Con este fin, y dada la riqueza en biodiversidad marina en el país, se plantea emplear como organismo proveedor de moléculas activas a las anémonas, en específico a *Bunodosoma cavernata* de la zona costera de Yucatán, como fuente de moléculas bioactivas.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Productos naturales como fuente de moléculas activas

Antes de la era de los fármacos puros, el humano ya empleaba los elementos naturales a su alcance con el fin de obtener beneficios sobre su salud. El uso de plantas es una práctica común en todas partes del mundo; una práctica que se ha arraigado desde que se tiene historia, y de la cual se han derivado algunos avances en el área farmacológica, enfocados en estudios dirigidos por el conocimiento popular de los usos de productos naturales<sup>18</sup>.

Las ventajas del análisis de los productos naturales se sostienen en la presencia de metabolitos secundarios. Estos metabolitos, aunque no son vitales para el organismo en estudio, tienen como características ser bioactivos, estar presentes en una gran variedad de estructuras químicas y poseer diversos mecanismos de acción que los hacen sumamente interesantes como candidatos a fármacos, considerando que también poseen algunas desventajas, como la dificultad de aislamiento y complejidad en su síntesis<sup>19</sup>.

#### 1.1.1 De origen terrestre

El descubrimiento de moléculas activas en organismos terrestres es una de las alternativas más empleadas debido principalmente a la facilidad de obtención de los especímenes y al mayor conocimiento que se tiene, en comparación con el entorno marino. Además, su estudio avanzado ya ha generado el aislamiento, la síntesis y hasta el uso como fármacos en la actualidad.

Anticancerígenos como la vinblastina y la vincristina<sup>20</sup>, aislados de la planta *Catharanthus roseus*, son, de hecho, ejemplos de los primeros productos naturales con un uso clínico en este campo, dentro del cual podemos encontrar a la camptotecina<sup>21</sup>, de *Camptotheca acuminata*, y el taxol<sup>22</sup>, de *Taxus brevifolia*,

ambos aislados por el mismo grupo de investigación en los 60's. También se puede hablar de otros que se encuentran en desarrollo preclínico, como la maytansina<sup>23</sup>, de la planta etíope *Maytenus serrata*, de la cual hay un análogo en Fase I; y las indirubinas, de *Indigofera tinctoria*<sup>24</sup>.

La michellamina B, de *Anticistrocladus korupensis*, representa a unos de los primeros productos naturales cuya síntesis permite tener esperanzas en análogos con efecto contra el VIH que puedan solventar el efecto neurotóxico<sup>25</sup>. Así mismo, un compuesto a la vez anticancerígeno, el ácido betulínico, ha sido reportado con actividad frente al VIH, y su derivado Bevirimat se encuentra en Fase IIb<sup>26</sup>.

En el ámbito de los antiparasitarios, se ha trabajado ya con algunas plantas como *Punica granatum*, *Artemisia campestris*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Achillea santolina*, que han mostrado tener efecto contra *G. intestinalis*<sup>5</sup>, al igual que *Dorstenia contrajerva*, *Senna villosa* y *Ruta chalepensis*<sup>6</sup>. En *E. histolytica* se conoce también el efecto de *Chiranthodendron pentadactylon*, *Annona cherimola* y *Punica granatum*, a concentraciones de microgramos por mililitro<sup>6</sup>. Por último, en *T. vaginalis* también se han probado extractos como los de *Carica papaya* y *Cocos nucifera*, con actividad tricomonocida (5.6-5.8 µg/mL)<sup>7</sup>. Además, se han aislado moléculas provenientes de insectos, aunque más encaminados a padecimientos como la malaria, leishmaniasis y tripanosomiasis<sup>8-9</sup>.

### 1.1.2 De origen marino

En comparación con los organismos de origen terrestre, la probabilidad de encontrar moléculas bioactivas en los organismos marinos es mucho mayor. De los 34 filos del reino Animalia, 33 tienen presencia en el ambiente acuático, siendo 15 exclusivos de este medio, mientras que solamente se conoce 1 filo con exclusividad terrestre<sup>27</sup>.



Las ventajas que representa este campo pueden ser más claras si consideramos los factores que intervienen en el ambiente acuático. Dado que muchas de las especies marinas poseen una vida sedentaria, requieren valerse de mecanismos químicos para su defensa, los cuales son variados y diferentes debido a la gran diversidad marina<sup>28</sup>. Ahora bien, la diferencia de estos mecanismos químicos respecto a los que se puedan mostrar en los sistemas terrestres, es que en un entorno acuático tenderán a diluirse en el agua, por lo que es indispensable que estén dotados de gran potencia para poder ejercer su efecto a bajas concentraciones. Esto los convierte en atractivos candidatos como fuente de fármacos<sup>29</sup>. A pesar de lo anterior, cabe destacar que el uso de organismos marinos también conlleva contratiempos, de entre los cuales podemos enumerar la falta de información taxonómica, la reducida cantidad de metabolitos obtenidos (simplemente, para obtener 1 mg de dolastatina (un péptido anticancerígeno aislado de un organismo marino) se requiere 2 toneladas de *Dolabella auricularia*), la inestabilidad de metabolitos, la complicación en la purificación de compuestos solubles en agua y, por supuesto, los gastos económicos y de tiempo<sup>30</sup>.

El ácido alfa-kaínico del alga roja *Digenia simplex*, y la bengamida F del pepino de mar *Cucumaria echinata* (Figura 1-1) son ejemplos de agentes antiparasitarios aislados de organismos marinos<sup>12</sup>; estos organismos no pertenecen realmente a los más estudiados dentro de la investigación marina, pues como se ha mencionado ya, son las esponjas las que más se han estudiado y en menor medida, hongos, cianobacterias, algas, actinomicetos y corales<sup>10</sup>. Entre los compuestos antiparasitarios aislados de organismos marinos<sup>10</sup> se encuentran endoperóxidos (como el manadoperóxido A de la esponja *Plakortis simplex* activa contra *T. brucei*), alcaloides (como la isoaptamina en la esponja *Aaptosnigra* contra *T. brucei*), metabolitos halogenados (como la girolina en la esponja

*Cymbastela cantharella* contra *P. falciparum*) y esteroides (como el ácido norsélico, de la esponja *Crella sp.* efectiva en la leishmaniasis). Además de péptidos como la dragomabina, de la cianobacteria *Lyngbya majuscula*<sup>31</sup>, Figura 1-1.

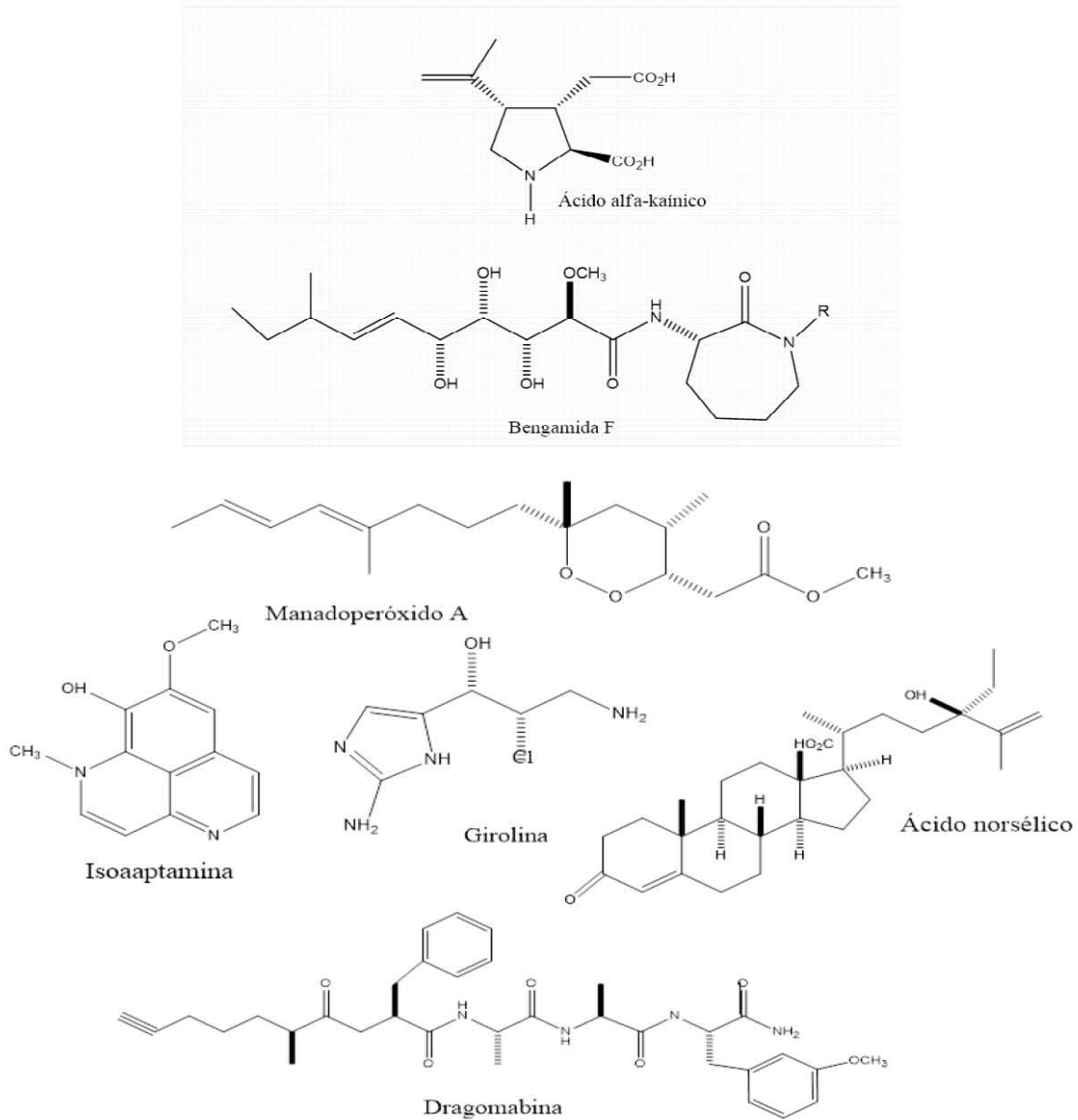


Figura 1-1 Ejemplos de moléculas antiparasitarias aisladas de organismos marinos.

Otros organismos marinos recién comienzan a ser estudiados debido al avance en su clasificación taxonómica y a la posibilidad de poder tener acceso a ellos debido al avance de técnicas como el buceo SCUBA. Los cnidarios son parte de estos nuevos estudios, y entre ellos se encuentran las anémonas (animales emparentados con las medusas y corales) distribuidas a lo largo y ancho del mundo en sustratos rocosos a diferentes profundidades, y son éstas el organismo investigado en la presente tesis.

## 1.2 Anémonas

Las anémonas (Figura 1-2) son animales marinos sésiles y bentónicos, comúnmente adheridos a rocas, presentes a lo largo y ancho del planeta, bajo casi cualquier hábitat marino<sup>32</sup>. Tienen un papel relevante en el desarrollo de ciertos organismos como algunas especies de peces y crustáceos, los cuales forman una asociación simbiótica con las anémonas a fin de protegerse de depredadores<sup>33</sup>, además de influir de manera aún más importante con otros organismos, como las algas, con los cuales también posee asociaciones simbióticas, en especial con las zooxantelas<sup>34,35,36</sup>. Así, con estas asociaciones puede incluso formar un sistema bajo el cual no sólo consigue amonio de los peces, sino azufre y fósforo que puede ser empleado por las algas.

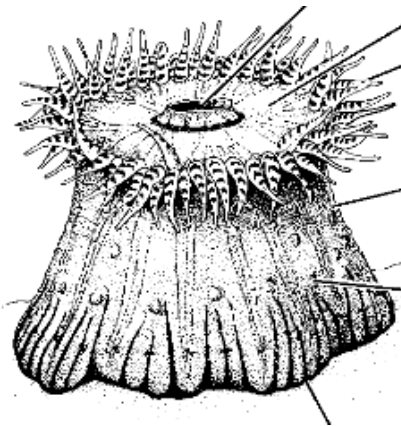


Figura 1-2 Anémona<sup>37</sup>.

### 1.2.1 Estructura anatómica

La estructura de las anémonas es cilíndrica, cuya base, o parte inferior, es el disco pedal, del que se vale para adherirse a rocas principalmente, mientras que la parte superior se encuentra conformada por tentáculos que rodean la boca de la cavidad gástrica (Figura 1-3).

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

A lo largo de las células epiteliales se encuentran células llamadas cnidoblastos, que contienen estructuras como los espirocistos, pticocistos y a los nematocistos, estos últimos capaces de poder liberar tubulos enrollados que se expulsan en presencia de presas o enemigos<sup>37</sup>. Además, éstos cnidoblastos pueden hallarse en estructuras como la acontia (delgados hilos en los extremos de los mesenterios bajo los filamentos) y el acrorhagi (crecimientos marginales en la pared del cuerpo de algunos géneros de Actiniaria).

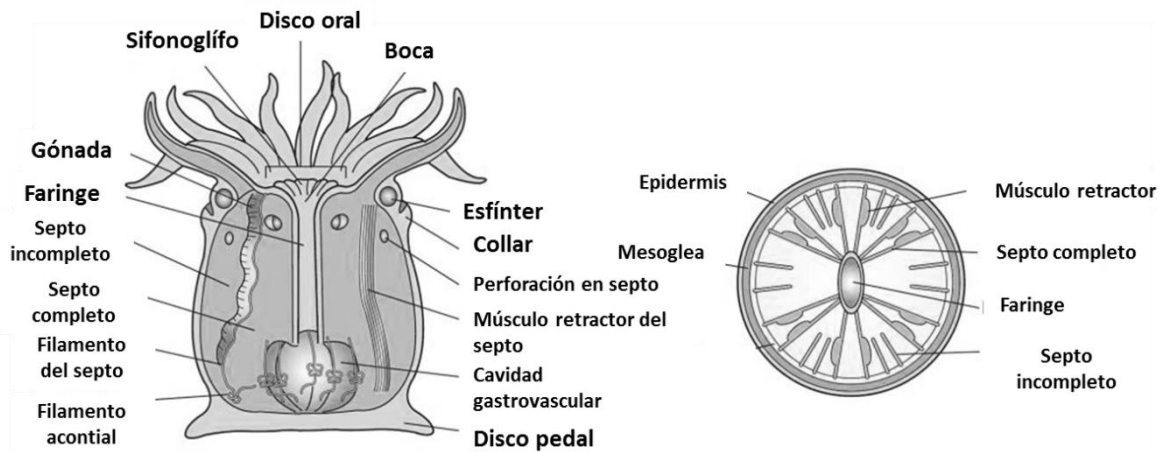


Figura 1-3 Estructuras anatómicas más representativas de las anémonas.

Modificado de Springer et al., 2013<sup>38</sup>.

### 1.2.2 Nematocistos

Los nematocistos (Figura 1-4) son el principal cnidoblasto de los cnidarios debido a que en ellos residen las toxinas del organismo. Están constituidos por una cápsula y un túbulo interno que se extiende al ser descargado. Se encuentran principalmente, pero no exclusivamente, en los tentáculos de las anémonas y tienen tres funciones principales: la obtención de alimento, la defensa contra depredadores (puesto que les inyectan toxinas) y adhesión al sustrato mientras realizan su locomoción<sup>39,40</sup>.

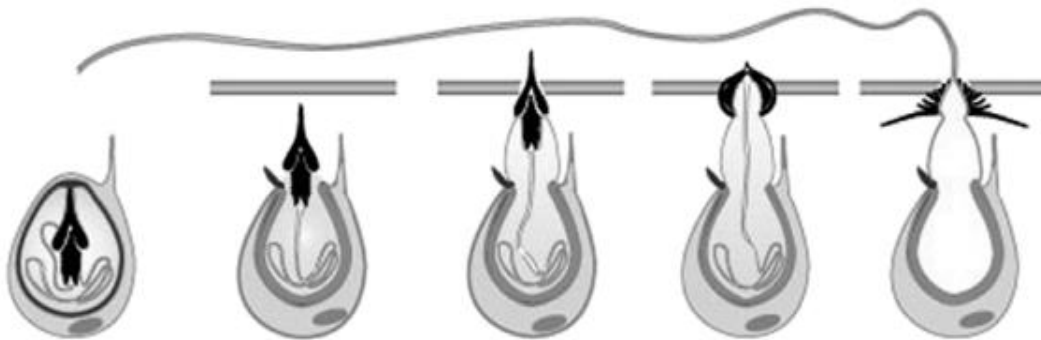


Figura 1-4 Descarga del nematocisto<sup>41</sup>.

De entre las toxinas presentes en los nematocistos, los péptidos y proteínas son las moléculas de mayor prevalencia y las más estudiadas, habiéndose aislado más de 40 péptidos tóxicos en un rango de 3 a 300 KDa, de diferentes anémonas<sup>42,43,44</sup>.

Los nematocistos pueden ser clasificados en dos categorías: haplonemas y heteronemas<sup>45</sup>, siendo dicha clasificación una herramienta útil en su diferenciación taxonómica.

Los haplonemas presentan tanto su tubo como su armadura espinosa sin regiones divididas. Pueden tener espinas, como los holotricos (isorhizos y anisorhizos), que poseen un tubo con un cambio gradual pero obvio en el diámetro, o carecer de ellas, como en los atricos<sup>45</sup> (Figura 1-5).

En los heteronemas, que siempre tienen espinas, el túbulo tiene un tallo basal distinto, diferente al tubo distal (filamento) ya que posee un mayor diámetro y/o espinas más largas. Existen dos tipos, los p-mastigóforos y los b-mastigóforos. En los primeros, el tallo es más grueso que el filamento, y su unión asemeja un embudo. En los p-mastigóforos macrobásicos, el tallo sin descargar es más largo que la cápsula, así que se encuentra replegado. En los p-mastigóforos microbásicos el tallo es más corto que la cápsula y se encuentra desplegado. En los b-mastigóforos (basitricos), el tallo sin salir se encuentra en la cápsula estrechándose en el filamento espinoso, rodeándolo<sup>46</sup>.

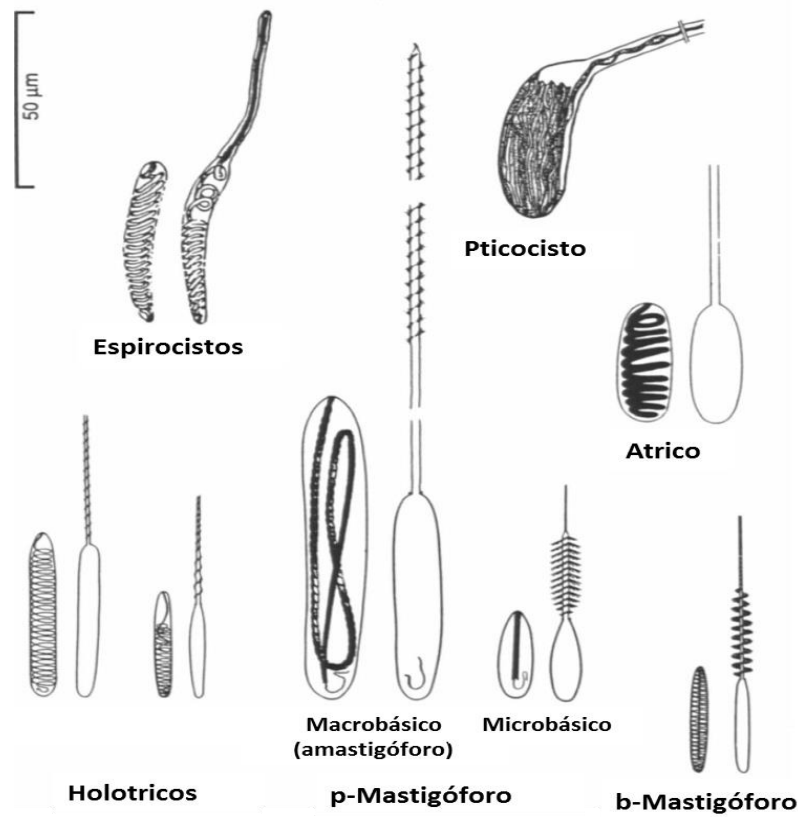


Figura 1-5 Tipos de nematocistos. Modificado de Shick, 1991<sup>45</sup>.

### 1.2.2.1 Citolisinas

Son los polipéptidos y proteínas básicas de los nematocistos cuyo peso molecular es elevado, de 16 a 20 kDa (o 5-80 kDa, dependiendo el autor) y más, conocidas también como actinoporinas (aisladas de anémonas como *Actinia equina*, *Stichodactyla helianthus* y *Heteractis magnífica*), muy solubles en agua y estables, cuya función es la lisis celular, ya sea formando poros en la membrana celular (mucho más potentes que las toxinas formadoras de poro bacterianas) o aumentando la permeabilidad de la misma<sup>43,44</sup>.

Se conocen más de 32 anémonas distintas que las producen<sup>15</sup>, con actividades hemolíticas y citotóxicas, que han sido estudiadas principalmente como agentes antitumorales y antiparasitarios<sup>44</sup>. *Stichodactyla helianthus* y *Stychodactyla gigantea* constituyen dos ejemplo de anémonas con citolisinas que poseen efecto como agentes antimicrobianos<sup>15,17</sup>.

Para su estudio se clasifican en cuatro grupos, de acuerdo a su peso molecular, entre 5-8 kDa, 20 kDa, 45 kDa y 80 kDa (Tabla 1-1<sup>15</sup>). Dentro de ellas, es el segundo grupo el que más se ha estudiado debido a su potencial farmacéutico. Como ejemplo se encuentra la equinotoxina II, de *Actinia equina* con efecto cardiotoxico a concentraciones nanomolares con alta actividad citolítica<sup>15</sup>, habiendo, además, demostrado efecto citotóxico contra líneas celulares de glioblastomas humanos<sup>47</sup>. Así mismo, de *Stichodactyla helianthus* se tiene a la esticolisina I (StI) posee efecto en células cancerosas, sirviendo para la síntesis de análogos<sup>48</sup>.

Tabla 1-1 Clasificación de péptidos y proteínas en nematocistos.

Tamaño molecular	Características	Bibliografía
5-8 kDa	Sin inhibición por esfingomielina, poco hemolíticas, antihistamínicas y posiblemente cardiotóxicas.	49
20 kDa	Inhibidas por la esfingomielina, son las más estudiadas; son proteínas monoméricas sin cisteínas, con $pI \approx 9$ . Algunas pueden ser oligoméricas en contacto con lípidos de membrana. Poseen efecto cardiotóxico, citotóxico y lítico elevado, razón por la cual se emplean como inmunotoxinas. Además, <i>G. intestinalis</i> ha mostrado ser muy sensible a este grupo (a nivel nanomolar)	16
$\approx 45$ kDa	Fosfolipasas citolíticas $A_2$ ( <i>A. pallida</i> ).	50
80 kDa	Metridiolisina, una proteína hemolítica y letal, se inhibe por colesterol.	51

#### 1.2.2.2 Neurotoxinas

Quizás sean de aun mayor interés desde el punto farmacológico. Son polipéptidos generalmente entre 3 y 6 kDa que actúan sobre canales iónicos de sodio y, más recientemente estudiados, en canales iónicos de potasio.

Aquellos que actúan sobre los canales de sodio se clasifican en tres grupos, 2 de 45-50 aminoácidos y otro de 27-32. Los primeros son subdivididos en tipo 1 (como la antopleurina A, ATXI, ATXII, y CgNa), si provienen de *Anthopleura*, *Anemonia* o *Condylactis*, y tipo 2 (como la calitoxina), de *Heteractis* y *Stichodactyla*. Estos dos grupos de péptidos asemejan las posiciones de sus 6 cisteínas formando 3 enlaces disulfuro<sup>42-43, 52</sup>. En concentraciones menores a 40



$\mu\text{g/kg}$  vía intramuscular en crustáceos es posible observar efectos de parálisis, excitabilidad, desorden cardíaco, convulsiones e incluso muerte. Su actividad es debida a su acción sobre neuronas (liberando masivamente neurotransmisores), así como sobre células cardíacas (con efectos ionotrópicos) y del músculo esquelético<sup>53</sup>.

La investigación en este campo tiene resultados en *Stichodactyla*, con extractos neurotóxicos activos en cangrejos de mar (*Ocyroide macropoda*)<sup>54</sup> y fracciones metanólicas/etanólicas con actividad antimicrobiana, presentes también en *H. magnifica*<sup>55</sup>. Toxinas como APETx2 han sido probadas en ratas para prevenir y tratar el dolor inflamatorio y post-operación<sup>48</sup>, mientras que, considerando la similitud genética entre los crustáceos y los insectos, es de esperarse un efecto insecticida, que se ha observado con Sh-I y Rp-II (de *Stichodactyla helianthus* y *Radianthus paumotensis*, respectivamente)<sup>56</sup>. Sumado a esto, las anthoepleurinas han mostrado efectos cardioestimulantes que podrían ser empleados en fármacos cardiotónicos<sup>57</sup>.

Las toxinas que ejercen su efecto sobre los canales de potasio representan una clase de toxinas de estudio más reciente, clasificadas en tres grupos, de acuerdo a su tamaño. Las toxinas del grupo I (cortas) poseen entre 35 a 37 aminoácidos, cuyo blanco es la subfamilia de canales Kv1. El grupo II (largas), tienen entre 58-59 aminoácidos, afectando con menor potencia a los canales Kv1, mientras que también tienen actividad inhibitoria de proteasas. El grupo III (medianas) con 42 o 43 aminoácidos, actúan, en cambio, sobre las subfamilias Kv3 o HERG.

Sin duda alguna, la toxina más estudiada sea probablemente ShK (péptido aislado de *Stichodactyla helianthus*) que evita la proliferación de linfocitos T y tiene efecto sobre enfermedades autoinmunes, lo que ha derivado en la síntesis de análogos que ahora mismo se encuentran en fases de pruebas preclínicas<sup>58</sup>.

### 1.2.3 Moléculas activas presentes en *Bunodosoma*

De manera específica, en las anémonas pertenecientes al género *Bunodosoma* se han reportado extractos crudos de *Bunodosoma cavernata* donde se ha observado efecto de hipotensión en ratas a concentraciones de hasta 8 microgramos de proteína por kg, mientras a dosis mayores se ha presentado hipertensión dosis-dependiente<sup>57</sup>; asimismo, extractos crudos de *B. caissarum* inducen convulsiones tras inyección intracerebro-ventricular en ratones.

Citolisinas como la Bc2 de *Bunodosoma caissarum*, tienen efectos análogos a los mostrados por la equinotoxinas II<sup>15</sup> y es capaz además, de modificar el transporte de neurotransmisores, al mismo tiempo de ejercer su actividad sobre las células de glioblastoma humano<sup>47</sup>.

$\delta$ -AITX-Bcg1a/b (*B. cangicum*), Bc III y CGTX II (*B. caissarum*), así como BgII y BgIII (*B. granulifera*), pertenecen a los neuropéptidos bloqueadores de canales de sodio largos (45-50 aminoácidos) de tipo 1, cuyo efecto sobre crustáceos, como se ha mencionado, puede ser señal de la presencia de un efecto insecticida, aunque de menor estudio que los péptidos de *Anthopleura sp* y *Stichodactyla sp*.

Bgk, por otro lado, es una neurotoxina bloqueadora de canales de potasio de *Bunodosoma granulifera* que posee efectos parecidos a Shk, demostrando actividad en células leucémicas al igual que éste<sup>53</sup>. BcIV de *B. caissarum* es estructuralmente homóloga a APETx1 y APETx2, sin ser aun demostrada su actividad sobre canales de potasio<sup>53</sup>.

No sólo compuestos peptídicos sino moléculas como la bunodosina 391(BDS 391) de *B. cangicum* han sido aislados. Éste ácido acilamino exhibe actividad analgésica administrándose en ratas<sup>59</sup>.

Un resumen de las neurotoxinas más importantes (Norton, 2009)<sup>42</sup> se muestra en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2 Tipos de toxinas presentes en anémonas (Modificado de Norton, 2009).

Tipo	P.M. kDa	Toxina	Especies	Blanco	Separación
Toxinas de canales de Na <sup>+</sup>					
Largas, tipo 1		ATX 1	<i>Anemonia sulcata</i>	Na <sub>v</sub> 1	
		Antopleurina A (AP-A)	<i>Anthopleura xanthogrammica</i>	Na <sub>v</sub> 1	
		Antopleurina B (AP-B)	<i>Anthopleura xanthogrammica</i>	Na <sub>v</sub> 1	
		CgNa	<i>Condylactis gigantea</i>	Na <sub>v</sub> 1	
		δ -AITX- Bcg1a/b <sup>60</sup>	<i>Bunodosoma cangicum</i>		Nematocistos <sup>61</sup> /Sephadex- G50 y HPLC fase reversa C18
	4.8	CGTX II <sup>62</sup>	<i>Bunodosoma caissarum</i>		Nematocistos <sup>61</sup> /Sephadex- G50 y HPLC fase reversa C18
	4.9	Bc III	<i>Bunodosoma caissarum</i>	Na <sub>v</sub> 1.5	Nematocistos <sup>61</sup> /Sephadex- G50 y HPLC fase reversa C18
Largas, tipo 2		Shl	<i>Stichodactyla helianthus</i>	Na <sub>v</sub> 1	
Cortas (tipo 3)		ATX III	<i>Anemonia sulcata</i>	Na <sub>v</sub> 1	

		Bcg III	<i>Bunodosoma cangicum</i>	Na <sub>v</sub> 1.1-1.6	Nematocistos <sup>61</sup> /Sephadex-G50 y HPLC fase reversa C18
	4.7	BcIV	<i>Bunodosoma caissarum</i>	Na <sub>v</sub> 1.1-1.6	Nematocistos <sup>61</sup> /Sephadex- G50 y HPLC fase reversa C18
Otras		APET <sub>x</sub> 2	<i>Anthopleura elegantissima</i>	ASIC3	
	5	Bg II, Bg III <sup>63</sup>	<i>Bunodosoma granulifera</i>		EtOH, Sephadex G-50, intercambio catiónico Fractogel EMD SO <sub>3</sub> - 650M
Toxinas de canales de K <sup>+</sup>					
	4.1	BcxTx1 <sup>64</sup>	<i>Bunodosoma caissarum</i>	KCNA/Kv 1	Nematocistos <sup>61</sup> /Sephadex- G50 y HPLC fase reversa C18
		ShK	<i>Stichodactyla helianthus</i>	Kv1, IKCa	
	4.3	BgK <sup>65</sup>	<i>Bunodosoma granulifera</i>	Kv1, IKCa	Sephadex G-50 y HPLC intercambio catiónico BioGel SP 5 PW
		BDS-I	<i>Anemonia sulcata</i>	Kv3.4	
		APET <sub>x</sub> 1	<i>Anthopleura elegantissima</i>	HERG	

#### 1.2.4 Clasificación filogenética y taxonómica

Las anémonas forman parte del filo Cnidaria (Figura 1-6), y se caracterizan por la presencia de orgánulos llamados cnidocitos (en el caso de las anémonas, nematocisto).

Debido a su desarrollo exclusivamente como pólipos, con capacidad de reproducirse tanto de manera sexual como asexual, se les clasifica dentro de la clase Anthozoa, que agrupa 7500 especies, y pueden encontrarse de manera colonial, clonales o solitarias<sup>66</sup>.

Pertenece además a la subclase Hexacorallia, que contiene 4300 especies, con base en su simetría hexamérica predominante, y al orden Actinaria, haciendo referencia a pólipos solitarios de cuerpo blando, con tentáculos sin pinado (alado) que crecen a partir del disco, que reúne a 1200 especies en 46 familias diferentes<sup>66</sup>.

A pesar de lo anterior, existen organismos que pueden considerarse como anémonas, pertenecientes al orden de Ceriantharia (que no poseen disco pedal), Corallimorpharia (con características de corales) y Zoanthidea (formadores de colonias)<sup>1</sup>.

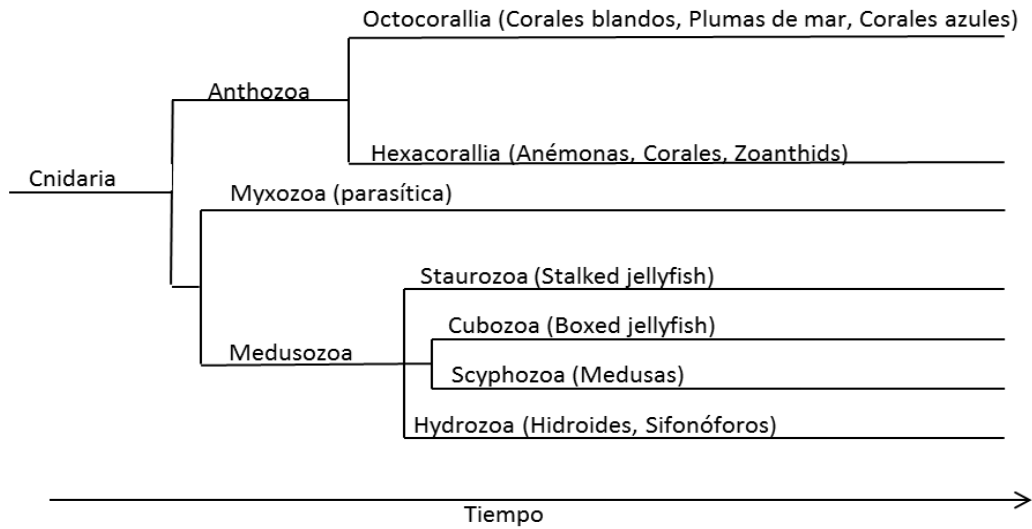


Figura 1-6 Esquema filogenético del filo Cnidaria. Modificado de Turk, 2009<sup>67</sup>.

La identificación taxonómica del orden Actinaria ha empleado como herramienta el estudio de los nematocistos, y las diferencias de éstos a lo largo de las diferentes familias. De hecho, se han reconocido aproximadamente 25 tipos de nematocistos, aunados al número de espirocistos<sup>68</sup>. Para cada familia es posible realizar el análisis tanto del número de nematocistos como del tipo. A pesar de ser una herramienta ampliamente usada desde 1940, existen desacreditaciones a su aplicación y la variabilidad de los nematocistos<sup>69</sup>.

También es posible emplear información sobre el número y arreglo de mesenterios, morfología y arreglo de los tentáculos, y presencia de estructuras especializadas (como acontias). La anatomía del pólipo puede ser más precisa pero más difícil de determinar, además de que existe una carencia de especies previamente identificadas con las cuales poder realizar comparaciones<sup>66</sup>.

Las técnicas actuales también permiten la identificación a partir de estudios moleculares empleando marcadores mitocondriales<sup>70</sup>.

#### 1.2.5 Distribución geográfica

Las anémonas se encuentran en hábitats en los océanos de todo el mundo, ocupando diversas profundidades. Su abundancia es mayor en los trópicos o en lugares donde las aguas cálidas tropicales son transportadas: en los océanos Índico y Pacífico, principalmente, con menor presencia en zonas polares<sup>71</sup> (Figura 1-7).

En nuestro país, la distribución geográfica de las anémonas ha sido un campo desatendido, de manera probable por la carencia de identificación taxonómica primordialmente.

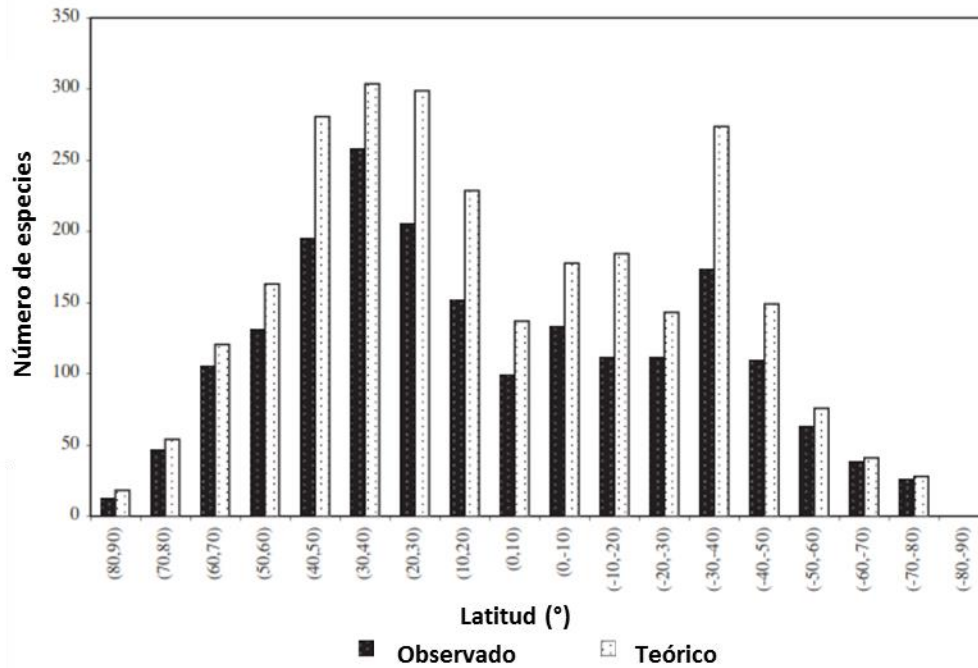


Figura 1-7 Distribución latitudinal de la diversidad de anémonas, modificado de Fautín, 2013<sup>71</sup>.

Los trabajos del Dr. Ricardo González<sup>1</sup> proporcionan el atlas más desarrollado a la fecha tanto en el aspecto taxonómico, como en el biogeográfico de las anémonas, en las zonas de la Península de Yucatán (banco de Campeche, arrecifes de Yucatán), en el Golfo de México (arrecifes de Veracruz) y en el Mar Caribe (Isla Mujeres, Punta Cancún, Puerto Morelos, Cozumel, Akumal, Tulum, Majahual, Xcalak).

Concretamente, en las zonas de la Península de Yucatán las principales especies encontradas son *Anthopleura pallida* (Alacranes), *Anemonia sargassensis* (Alacranes, Cayo Arenas) y, en menor medida, *Bunodosoma granulifera* (Alacranes) y *Actinostella flosculifera* (Alacranes, Madagascar)<sup>1</sup>.

## 2. HIPÓTESIS:

La separación biodirigida del extracto de la anemona *Bunodosama cavernata* presente en la costa de Yucatán permitirá la identificación y obtención de compuestos biológicamente activos.



### 3. OBJETIVOS:

#### Objetivo General:

Realizar la evaluación de la anémona *Bunodosama cavernata* presente en la zona costera de Yucatán como posible fuente potencial de moléculas con actividad biológica.

#### Objetivos particulares

- 1.- Recolectar e identificar a la anémona *Bunodosama cavernata* presente en la costa de Yucatán.
- 2.- Generar el extracto crudo de la anémona recolectada.
- 3.- Prefraccionar por tamaño molecular mediante ultrafiltración al extracto crudo.
- 4.- Evaluar mediante bioensayos rápidos la actividad biológica del extracto generado.
- 5.- Determinar el perfil cromatográfico de las fracciones generadas mediante CLAR analítica para determinar su complejidad molecular
- 6.-Realizar la separación biodirigida de la fracción más prometedora, a fin de aislar a los componentes bioactivos.
- 7.-Identificar la naturaleza química de los constituyentes activos.

#### 4. METODOLOGÍA:

A manera de resumen, en la Figura 4-1 se detalla la estructura metodológica del presente proyecto de investigación:

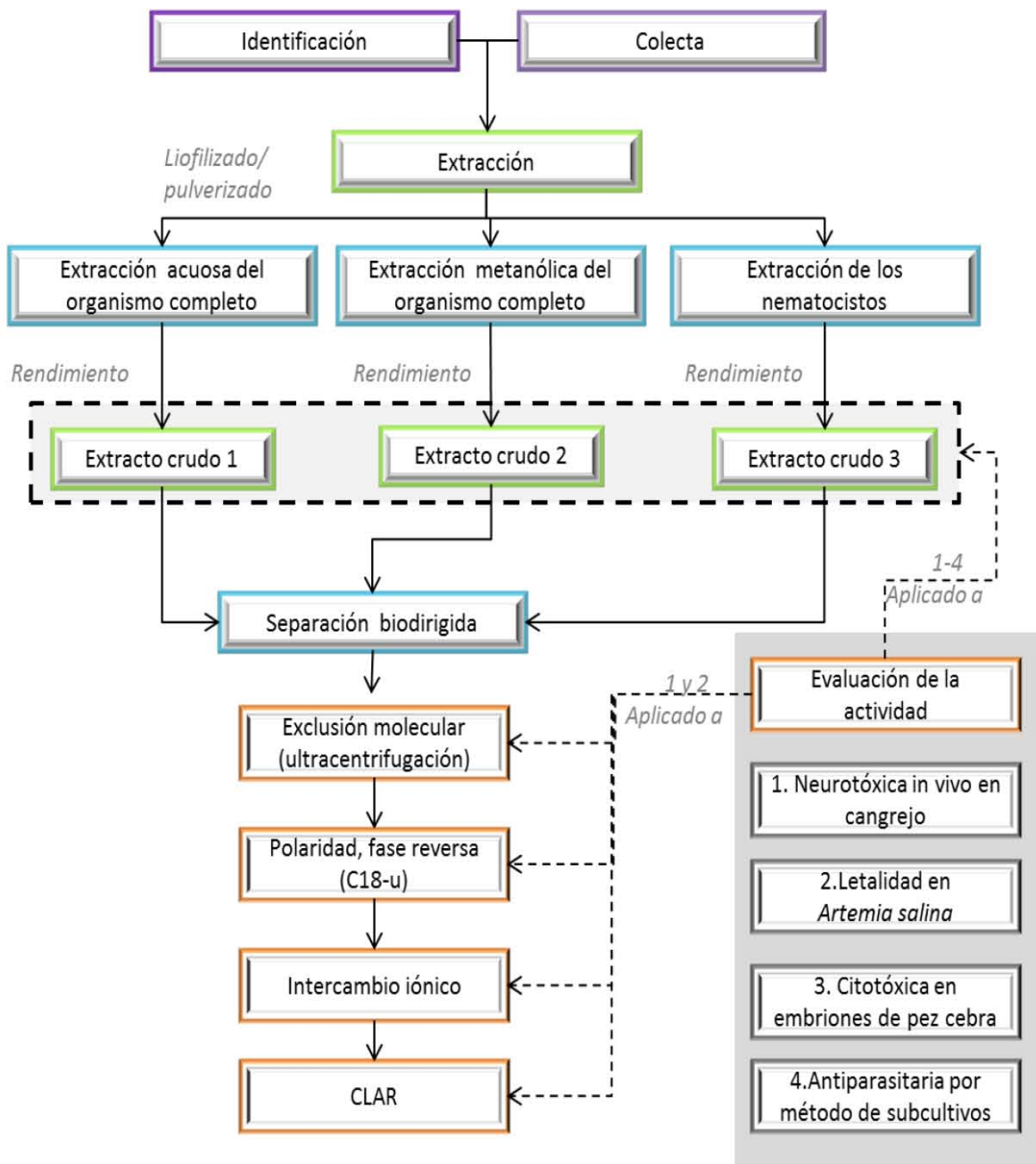


Figura 4-1 Diagrama esquemático de la metodología empleada.

#### 4.1 Colecta de los organismos de estudio

Basado en estudios previos<sup>1</sup>, se estudió la zona de la costa norte de Yucatán, que comprende la costa de Sisal (21° 09 ´ 48.17" N, 90° 02 ´ 57.35" O) donde se han observado la presencia de anémonas.

Se realizó la inspección de rocas a las cuales las anémonas se hallan adheridas, a través de buceo libre para su posterior extracción del sustrato, empleando cincel y martillo. Después se colocaron en recipientes con agua de mar y hielo, a los cuales se les adicionó unos cristales de MgCl<sub>2</sub> para sedar a los especímenes colectados y realizar su traslado a la Unidad de Química en la Unidad Académica Sisal, donde se realizó tanto la identificación taxonómica como la conservación de los organismos hasta su empleo en un ultracongelador Revco a -70° C.

#### 4.2 Identificación taxonómica

Durante la recolección e identificación de la anemona se contó con la asesoría del Dr. Ricardo González Muñoz, taxónomo especializado en anémonas. La identificación se realizó mediante la observación macroscópica de los caracteres morfológicos descritos para *Bunodosama cavernata* (patrones de coloración, dimensiones del organismo), previa relajación de los especímenes con 5% de MgCl en agua de mar<sup>72</sup>.

#### 4.3 Generación del extracto crudo

La obtención de extractos crudos se realizó tanto del organismo completo como de los nematocistos por separado, con la finalidad de determinar si los metabolitos secundarios están presentes sólo en los nematocistos, o bien en toda la estructura del cnidario, ya que se ha reportado la presencia en otras estructuras diferentes como los acroraghi o bien acontia<sup>73</sup>. Adicionalmente, se procedió a determinar si los compuestos bioactivos eran productos naturales orgánicos de bajo peso molecular al realizar la extracción con metanol, puesto

que tiene la propiedad de precipitar a los polímeros, incluidas las proteínas, eliminando así a las citolisinas.

En el caso de los organismos completos, éstos fueron conservados mediante liofilización (equipo LabConco, Freezone 2.5, -40° C y 0.200 mBar); posteriormente se procedió a su pulverización en mortero de porcelana para incrementar la superficie de contacto con el disolvente.

#### 4.3.1 Generación del extracto a partir de organismos completos

Para cada una de las muestras liofilizadas y homogenizadas se realizaron dos condiciones diferentes de extracción, una llevada a cabo con agua desionizada y la otra con metanol. Esta distinción se hizo en función de los compuestos que de cada una de las extracciones se desea conseguir, y se realizó empleando maceración debido a que ésta técnica no implica aumentos de temperatura que comprometan la estabilidad de las moléculas, no requiere de equipamiento especial y tiene grandes rendimientos<sup>74</sup>.

##### 4.3.1.1. Extracción acuosa

En el caso de la maceración en agua desionizada, la extracción originó una solución en la cual se encuentran todos los compuestos solubles en agua, incluyendo proteínas, polipéptidos, péptidos y sales.

Por cada 30 gramos de organismos liofilizados y pulverizados se emplearon 450 mL de agua para la extracción. El sistema se colocó en refrigeración a 5° C para evitar el crecimiento microbiano. La maceración se efectuó por 1 día (puesto que es proclive a contaminación microbiana); sin embargo, se demostró que se obtenían los mismos resultados acelerando el proceso mediante agitación para realizar la extracción en sólo una hora. El macerado se filtró y se liofilizó. El extracto crudo seco se cuantificó mediante una balanza analítica Ohaus, Explorer Pro, y se registró el rendimiento. Con el fin de obtener la mayor cantidad de

extracto crudo, la materia orgánica se extrajo una segunda y hasta una tercera vez.

#### 4.3.1.2. Extracción metanólica

Para la maceración en metanol el objetivo seguía siendo moléculas polares incluyendo moléculas orgánicas medianamente polares de bajo peso molecular; además, el metanol produce la precipitación de polímeros (incluyendo proteínas)<sup>75</sup>, por lo que se realiza con la finalidad de determinar si *B. cavernata* produce compuestos orgánicos bioactivos.

Al igual que la extracción acuosa, se emplearon 30 gramos de organismos liofilizados y 450 mL de metanol para la extracción. La maceración se efectuó por 3 días (ya que no se tenía el problema de la contaminación microbiana), aunque también se demostró que se obtenían los mismos resultados acelerando el proceso mediante agitación para realizar la extracción en sólo una hora.

Al finalizar, el macerado se filtró y el disolvente se evaporó. El extracto crudo se cuantificó y se registró el rendimiento. Con el fin de obtener la mayor cantidad de extracto crudo, la materia orgánica se extrajo una segunda y hasta una tercera vez.

#### 4.3.2 Generación del extracto crudo de los nematocistos

Se empleó el método modificado de Kem y colaboradores (1989)<sup>76</sup>, en el cual, 300 mL de agua desionizada, a temperatura ambiente, se añade a los organismos congelados (200 g) para agitarse por 15 minutos para realizar la extracción por cambios osmóticos y térmicos. Las anémonas son retiradas del líquido y congeladas nuevamente por 30 minutos a  $-60^{\circ}$  C. El procedimiento se repite 2 veces más, juntando los líquidos obtenidos.

El extracto crudo fue llevado a sequedad, cuantificado su rendimiento.

#### 4.4 Evaluación de la actividad biológica

Cada uno de extractos crudos generados y sus fraccionamientos consecuentes, fueron evaluados para determinar su potencialidad farmacológica. Para ello, en el laboratorio se realizaron tres bioensayos para avanzar en la separación biodirigida, además de la prueba en pez cebra en el extracto crudo acuoso, y finalmente se evaluó su actividad antiparasitaria por el método de subcultivos en las fracciones más activas. Los bioensayos fueron:

- a) Determinación del potencial neurotóxico sobre cangrejo
- b) Evaluación del potencial antiparasitario mediante el bioensayo de letalidad en nauplios de *Artemia salina*; bioensayo que ha demostrado buena correlación con la actividad antiparasitaria.
- c) Evaluación de la actividad hemolítica.
- d) Evaluación del efecto citotóxico en embriones de pez cebra (únicamente en extracto crudo).
- e) Todos los extractos activos en el ensayo de letalidad en *Artemia salina* fueron probados al menos con un protozoario parásito de interés (*Gardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* ó *Entamoeba histolytica*) mediante el método de subcultivos.

##### 4.4.1 Actividad neurotóxica in vivo sobre cangrejo

Esta es una prueba rápida en la que los resultados se muestran desde un periodo entre algunos segundos y hasta un par de minutos. Las observaciones en el cambio de comportamiento, contracciones tetánicas e incluso muerte se registraron, al igual que el tiempo que les tomó. El uso de este ensayo para pruebas de neuroactividad, además, también puede evaluar convulsiones y parálisis<sup>77</sup>. Estudios previos<sup>78</sup> han demostrado que se pueden utilizar cualquier cangrejo, sin embargo, debido a la asequibilidad y determinación del efecto paralizante, el cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*) es el cangrejo más

apropiado para fracciones abundantes; sin embargo para las que están limitadas por muy bajos rendimientos se empleó el cangrejo violinista (*Uca sp.*), cuyas dimensiones son menores y por ende se requiere menor cantidad de muestra.

#### Muestras

Se pesaron 10 mg del extracto o fracción de estudio y se diluyeron en solución isotónica fisiológica (SIF) en un rango de trabajo de 1000 a 0.1 µg/mL.

Como control negativo se utilizó SIF.

#### Organismos

Los cangrejos fueron recolectados en la duna de la zona costera del puerto de Sisal, Yucatán, manteniéndose en un contenedor amplio con arena, con el fin de evitar su estrés.

#### Ensayo

La actividad de cada una de las fracciones, y/o extracto crudo, se determinó a través de la inyección de 0.1 mL, de cada concentración, en la membrana artrodial del tercer pereiópodo del cangrejo fantasma. Esta dosis se encuentra basada en un peso promedio entre 10 y 15 g del crustáceo, por lo que pesos superiores o inferiores deberá ajustar para evitar variaciones debidas a sobredosis o dosis insuficientes. Se registra, en función del tiempo, si existe parálisis, aumento en la actividad motora y si existe efecto letal en el organismo.

#### 4.4.2 Prueba de letalidad en nauplio de *Artemia salina*

Mediante esta prueba se evaluó también el efecto tóxico de las fracciones, y/o extracto crudo, en la supervivencia de nauplios de *Artemia salina*.

Este ensayo tiene uso para la detección de constituyentes con actividad farmacológica de productos naturales debido a que el organismo es vulnerable a

la toxicidad de una amplia variedad de compuestos activos, además, es una prueba rápida y de fácil implementación<sup>79</sup>, que ha probado ser útil en la identificación de extractos con bioactividad citotóxica y pesticida<sup>80</sup>.

Primeramente se hidrataron con agua de mar artificial filtrada por 1 hora los quistes de *A. salina*; después, se colocaron en un recipiente de eclosión y se añadió 1 L de agua de mar filtrada (en aeración y luz por 24 horas). Los nauplios se recolectaron con una malla de 100 micras y se lavaron con agua de mar.

### Muestras

Se tomaron 10 mg del extracto a estudiar y se disolvieron en 1 mL de agua destilada, a partir de esta concentración (10 mg/mL) se realizaron diluciones logarítmicas con agua de mar filtrada para generar un rango de trabajo de 10,000 a 0.1 g/mL. Como control negativo se utilizó agua de mar, mientras que el control positivo fue dicromato de potasio.

### Artemias

La solución con artemias fue diluida con agua de mar filtrada, guiando a los organismos mediante una luz blanca, se tomó una alícuota de nauplios y se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 20 mL con agua de mar, hasta obtener una concentración aproximada de 15 a 20 organismos por cada 100  $\mu$ L.

### Ensayo

El ensayo se lleva a cabo en una microplaca de 96 pozos de fondo plano. Para ello, se adicionaron 100  $\mu$ L de agua de mar a cada pozo, posteriormente 100  $\mu$ L de la solución de *A. salina* preparada y homogenizada, y finalmente 100  $\mu$ L de cada concentración del extracto o de las soluciones control a evaluar, cada ensayo se realizó por duplicado.

Cada uno de los pozos fue aforado hasta su máximo volumen con agua de mar filtrada y la placa fue colocada en una incubadora durante 24 horas en presencia



de luz a una temperatura aproximada de 27° C con agitación moderada a 3 RCF (150 rpm). Después de 12 horas existe pérdida importante por evaporación en los pozos, por lo que éstos se volvieron a aforar con agua desionizada.

Una vez transcurridas las 24 horas, se cuantificaron el total de artemias vivas y muertas en cada uno de los pozos y se calcula la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) por medio del análisis estadístico Probit. Fue importante observar que el control negativo debe mostrar 100% de supervivencia para demostrar que los organismos no son hipersensibles, mientras el control positivo debió asegurar que éstos no presentaran resistencia (CL<sub>50</sub> reportada 23 mg/L<sup>81</sup>).

#### 4.4.3 Actividad citotóxica en embriones de pez cebra

Mediante esta prueba en embriones de pez cebra es posible determinar el efecto tóxico de moléculas evaluando la interrupción del desarrollo del organismo. Además, estudiando el nivel de desarrollo alcanzado, es posible determinar un posible mecanismo de acción del extracto a probar<sup>82</sup>.

##### Muestras

50 mg de cada extracto crudo se disolvieron en 100 mL de agua [500 µg/mL]. A partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución de 2. Obteniendo al menos 4 concentraciones (250, 125, 62.5 y 31.25 µg/mL).

##### Organismos

Se emplearon embriones de máximo 2 horas de desarrollo que no muestren coagulación, los cuales se distinguen por ser transparentes y no blanquecinos.

##### Ensayo

El ensayo se realizó en placas de 24 pozos, cada una de las cuales se emplea para cada una de las concentraciones de la serie de diluciones: 20 pozos con la

concentración de extracto a probar y 4 más con agua purificada en lugar de extracto, como control positivo de desarrollo del organismo.

Cada pozo fue observado en microscopio a las 24 y 48 horas para determinar el grado de desarrollo de los embriones y compararlos con sus respectivos controles positivos.

#### 4.4.4 Actividad hemolítica

Se siguió la metodología empleada por Torres, et al. (2001)<sup>83</sup> y modificaciones por Acosta-Ruiz(2011)<sup>84</sup>.

##### Eritrocitos

Se transfirieron 500  $\mu$  L de sangre humana (certificada por el banco de sangre del Hospital Agustín O'Horan) a un tubo de centrifuga de 15 mL. Se adicionó lentamente 5 mL de solución salina fisiológica (SSF, 0.9 % NaCl) hasta homogenizar para proceder a centrifugación por 5 minutos a 348 RCF (1,500 rpm). El paquete celular fue resuspendido nuevamente en 5 mL de SSF. Este proceso se realizó tres veces. Finalmente se tomaron 20  $\mu$  L de los eritrocitos y se disolvieron en 2 mL de SSF para obtener una suspensión de glóbulos rojos al 1%.

##### Muestra

Se tomaron 10 mg de cada fracción a evaluar, disolviendo en 1 mL de agua desionizada, de la cual se realizaron diluciones seriadas desde 1000 hasta 0.1  $\mu$  g/mL en SSF.

##### Ensayo

Se emplearon tubos Eppendorf de 1.5 mL a los que se les añadió 900  $\mu$  L de SSF, 50  $\mu$  L de eritrocitos al 1% en SSF, y 50  $\mu$  L de extracto o fracción por duplicado (o 50  $\mu$  L de agua desionizada y 50  $\mu$  L de SSF para los controles

positivo y negativo, respectivamente). Los tubos se incubaron por 30 minutos a 37° C, para después centrifugar por 4 minutos a 223 RCF (1,200 rpm). Los sobrenadantes se cuantificaron por absorbancia a 415nm en espectrofotómetro en celda de cuarzo.

El porcentaje de actividad hemolítica se calculó mediante la siguiente relación:

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

Donde: AH= Actividad hemolítica;

Am=Absorbancia de la muestra;

A(100%)= Absorbancia del control positivo

A(0%)= Absorbancia del control negativo

#### 4.4.5 Actividad antiparasitaria por el método de subcultivos

La prueba antiparasitaria se realizó basada en el método de Hil, et al. (1986)<sup>85</sup>, con las modificaciones implementadas por Cedillo-Rivera (1992)<sup>86</sup> y de estudios previos<sup>84</sup>.

##### Parásitos

Se usaron los parásitos: *Gardia intestinalis* IMSS:0696:1 y *Trichomonas vaginalis* GT3 en medio TYI-S-33 enriquecido con 10% de suero de ternera y bilis bovina para el caso de *G. intestinalis* y 10% de suero bovino en *T. vaginalis*. Éstos fueron incubados por 48 horas a 37° C (crecimiento 100 %).

## Muestras

10 mg de cada extracto se disolvieron en 1 mL de agua hasta obtener una concentración de 50 mg/mL y éste se diluyó 100 veces hasta obtener la solución de trabajo (500 µg/mL).

## Ensayo

Se realizó en tubos Eppendorf®, adicionando 50 µL del medio de cultivo con el parásito estudiado; se añadió lo suficiente de la solución de trabajo para obtener al menos 4 concentraciones desde 50 µg/mL y hasta 1 µg/mL. Para los controles negativos se realizó el ensayo sin extracto, mientras que los controles positivos estuvieron constituidos por metronidazol.

Cada ensayo por triplicado fue incubado 48 horas, o lo suficiente para obtener un crecimiento entre 80 y 100%. En este punto se colocaron en refrigeración por 30 minutos y se cuantificaron los parásitos en una cámara de Neubauer. Por último se calculó la IC<sub>50</sub> mediante la prueba estadística Probit.

### 4.5 Fraccionamiento biodirigido del extracto activo

Los extractos que resultaron activos fueron fraccionados por la estrategia de separación biodirigida, empleando los datos de actividad generados en los bioensayos. Para seleccionar los extractos que se separaron, se utilizó como criterio tanto el perfil cromatográfico como farmacológico.

#### 4.5.1 Separación por ultrafiltración (exclusión molecular)

Los extractos crudos liofilizados con actividad biológica se disolvieron en la mínima cantidad de agua destilada, luego se colocaron en la celda para ultracentrifugación con membrana Amicon Millipore® de corte molecular de 30 kDa (en tubos falcon de 50 mL con volumen máximo de 15 mL) para luego someterlos a centrifugación (3,864 RCF por 30 min). Se colectó el filtrado (< 30 kDa) y se separó de nuevo en una membrana con corte molecular de 10 kDa;

posteriormente el tubo se centrifugó de igual forma durante 30 min a 3,864 RCF (5,000 rpm). De manera análoga, el proceso se repitió para membranas con corte molecular de 3 kDa además de una última separación a través de una celda de ultrafiltración acondicionada con nitrógeno y una membrana con corte de 1 kDa (Celda 8053, membrana de 4.4 cm). Posteriormente se procedió a la liofilización, pulverización, cálculo de rendimiento y evaluación biológica, de cada una de las fracciones.

#### 4.5.1.1 Cuantificación de proteína por método de Bradford en microplaca

Esta metodología tiene como principio la unión del colorante Azul de Coomassie con las proteínas, convirtiéndose a su forma estable desprotonada con absorbancia máxima en 595 nm, distinta a su forma de catión (470 nm) y anión (650 nm).

##### Muestras

Se tomaron 5 mg de las muestras a analizar y se disolvieron en 1 mL de agua desionizada. Esta concentración fue diluida 1:10 hasta obtener una concentración de trabajo de 0.5 mg/mL.

##### Ensayo

100  $\mu$ L de la solución de la muestra (0.5mg/mL) fue añadido a 200  $\mu$ L de agente colorante (1x) en pozos de microplaca. Al mismo tiempo la curva estándar se realizó empleando 250  $\mu$ L de agente colorante y 5  $\mu$ L de estándar, en diluciones que permitieran obtener concentraciones finales de 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL del estándar de Albúmina sérica bovina 2mg/mL (BioRad).

Las soluciones se mezclaron y se incubaron por 5 minutos. La microplaca fue leída a 595 nm. en lector de microplacas, y las concentraciones de proteína calculadas en comparación con la curva estándar.

#### 4.5.1.2 Análisis de la separación por SDS-PAGE

Con el fin de comprobar la separación por tamaño molecular, las fracciones separadas fueron llevadas a geles de acrilamida, empleando la metodología de Laemmli (1970)<sup>87</sup> con algunas modificaciones.

##### Geles

Los geles se realizaron en cristales de 1.5 mm previamente limpiados con isopropanol. Se empleó un gel de separación al 15% de acrilamida, cuyo contenido y orden de adición se muestra en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1 Preparación del gel separador para SDS-PAGE (Tris).

Reactivo	Cantidad
Agua	2.24 mL
Aciamida-Bis 30%	5 mL
Amortiguador Tris pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	100 $\mu$ L
Persulfato de amonio 10%	100 $\mu$ L
TEMED	4 $\mu$ L

Se tomaron aproximadamente 4-5 mL para cada gel y 1 mL de MeOH sobre él para homogenizar la parte superior.

Una vez gelificado, y retirado el MeOH, se añadió sobre él el gel compactador, Tabla 4-2, (necesario para depositar la muestra) al 5% de acrilamida, del cual se emplearon 2 mL por gel, y se colocó el peine de 9 canales hasta gelificación.

Tabla 4-2 Preparación del gel compactador para SDS-PAGE (Tris).

Reactivo	Cantidad
Agua	3.4 mL
Acriamida-Bis 30%	850 $\mu$ L
Amortiguador Tris pH 6.8	650 $\mu$ L
SDS 10%	50 $\mu$ L
Persulfato de amonio 10%	50 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L

#### Muestras

Con base en la determinación de proteínas por el método de Bradford, se calculó, para cada fracción, un total de 100  $\mu$ g de proteína en 7  $\mu$  L de agua destilada que fueron desnaturalizados a 95° C por 5 minutos en presencia de 8  $\mu$  L de amortiguador de carga.

#### Separación

Para las muestras se aplicaron los 15  $\mu$  L a los canales, mientras que para el marcador Precision Plus Protein (BioRad) se empleó únicamente 4  $\mu$  L (predigeridos por el fabricante). Los geles se colocaron en su soporte (dos por soporte) y éste se introdujo en la cámara de electroforesis. La cámara fue llenada con 1 L de amortiguador de corrida y cerrada, luego se conectó a una fuente de poder para realizar la separación a 120 V, por aproximadamente 2 horas.

## Tinción

Al finalizar, los geles fueron revelados mediante la tinción negativa basada en el trabajo de Fernández-Patron, et al. (1992)<sup>88</sup>, mediante el lavado de los geles con agua destilada para su posterior incubación en una solución de imidazol 0.2 M por 15 minutos y un revelado en sulfato de zinc 0.2 M por 30 segundos, cuya reacción es detenida por un nuevo lavado con agua, una vez que el fondo se ha tenido de blanco y las bandas de las proteínas se muestran incoloras. También se empleó la tinción con azul de Coomassie, fijando los geles con metanol 50%/ácido acético 10% en agua desionizada por 45 minutos, tñiendo con azul de Coomassie (0.025%), en ácido acético (10%) por 90 minutos y destiñiendo en lapsos de 15 minutos con ácido acético y acetato de amonio (10%).

### 4.5.1.3 Determinación del perfil cromatográfico por CLAR analítico

Las fracciones separadas por peso molecular que demostraron ser activas se analizaron mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), empleando un equipo CLAR binario Varian 211 con una columna de fase reversa LUNA C18 (100 Å, 5 µm, 250x4.6 mm), como fase móvil mezclas de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético en un gradiente de 0 a 50% de acetonitrilo en 30 minutos de corrida. Las condiciones de detección del detector de Difracción de Luz Evaporativo (ELSD, por sus siglas en inglés) fueron: temperatura de nebulización de 40° C, temperatura de evaporación de 70° C, flujo de nitrógeno de 1 mL/min; mientras que la detección por UV fue a 215 nm).

### 4.5.1.4 Selección de la fracción a separar

La separación se realizó sólo con la fracción con mejor actividad biológica, por lo que se empleó el bioensayo de neurotoxicidad para seguir la separación.



#### 4.5.2 Separación por extracción en fase sólida de fase reversa (C18-U)

A fin de prefraccionar y eliminar las sales presentes en la fracción de 1-3 kDa, se realizó una extracción en fase sólida mediante un cartucho C18-U Phenomenex Strata®, el cual previamente fue lavado con 5 mL de MeOH y acondicionado con 5 mL de agua destilada. Luego, se aplicó 2 mL de muestra (200 mg disueltos en agua grado HPLC) de la fracción activa, para enseguida eluir mediante un gradiente de 5 mL de: 1) agua 100%, 2) Agua:ACN 95:5%, 3) Agua:ACN 90:10%, 4) Agua:ACN 80:20% y Agua:ACN 50:50%. Para cada fracción, se procedió a su liofilización, pulverización, cálculo de rendimiento y evaluación biológica.

Las fracciones que demostraron ser activas (en la prueba neurotóxica, como se discutirá más adelante) se analizaron mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) C18 y se evaluaron de acuerdo a su neurotoxicidad. La fracción más activa fue separada entonces por exclusión molecular en CLAR.

#### 4.5.3 Separación por exclusión molecular en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Esta separación se realizó para obtener cortes moleculares más finos, empleando una columna Yarra SEC-2000 (1-300 kDa, 145 Å, 3  $\mu$  m, 300x7.8 mm) por CLAR, empleando un equipo CLAR binario Varian 211, bajo flujo isocrático de agua/AcN (90:10) por 30 minutos, con lectura a 215 nm.

#### 4.5.4 Separación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de intercambio catiónico fuerte

La fracción separada por exclusión molecular en el paso anterior fue luego analizada y separada también por CLAR, empleando un equipo CLAR binario Varian 211, usando una columna SCX LUNA (100 Å, 5  $\mu$  m, 250x4.6 mm), con un gradiente de 0 a 100 % de fase B, siendo la fase A fosfato de potasio 20mM (pH 2.5) y la fase B una mezcla de fosfato de potasio 20 mM pH 2.5/KCl 0.5 M:

acetonitrilo (75:25), con detector de UV a 215 nm, e inyección manual en asa de 20  $\mu$  L.

#### 4.6 Determinación del peso molecular

##### 4.6.1 Por CLAR empleando gel permeable

Se utilizó una columna Yarra SEC-2000 (1-300 kDa, 145 Å, 3  $\mu$  m) por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), empleando un equipo CLAR binario Varian 211, bajo flujo isocrático en amortiguador de fosfatos 0.2 M (610 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /390 mL  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7), y detector de UV a 215 nm.

Se emplearon como estándares ribonucleasa (13.7 kDa, Sigma-Aldrich, R6513), aprotinina (6.5 kDa, Sigma-Aldrich, A1153) y bacitracina (1.4 kDa, Sigma-Aldrich, B0125), cada uno en soluciones de 4 mg/mL, de los cuales se inyectaron al sistema 20  $\mu$ L independientemente; además de un análisis más con la mezcla de los tres para determinar si existían interacciones entre ellos que afectaran la separación.

La determinación se realizó al relacionar el peso molecular en función del tiempo de retención y compararlo con el de la muestra.

##### 4.6.2 Por SDS-PAGE con tricina

Basado en los protocolos de Shägger(2006)<sup>89</sup> y Biorad (también basados en trabajos anteriores de Shägger (1987)<sup>90</sup> con algunas modificaciones. Esta técnica realiza la separación en un gel constituido por tres secciones, el gel compactador (4% de acrilamida), uno intermedio (10%), y el separador (16%) cuya finalidad es aumentar la eficiencia en bajos pesos moleculares.

##### Soluciones de trabajo

Se realizaron tres soluciones, AB-3, AB-6 y el amortiguador de gel, Tablas 4-3 y 4-4:

Tabla 4-3 Preparación de soluciones AB-3 y AB-6 para SDS-PAGE (Tricina).

Reactivo	AB-3	AB-6
Acrilamida	48 g	46.5 g
Bisacrilamida	1.5 g	3 g
	100 mL	100 mL

Tabla 4-4 Preparación del amortiguador del gel.

Reactivo	Cantidad	Aforo
Tris	36.3 g	100 mL
HCl	9.854 mL	
SDS	3 g	
Ajuste a pH 8.45 con HCl puro		

Amortiguador de elución del ánodo (10x) (1 M Tris, 0.225 M HCl, pH 8.9),  
 Tabla 4-5 y; amortiguador de elución del cátodo (10x) (1 M Tris, 1 M tricina, 1  
 % SDS, pH 8.25), Tabla 4-6.

Tabla 4-5 Preparación del amortiguador de elución del ánodo para SDS-PAGE  
 (Tricina).

Reactivo	Cantidad	Aforo
Tris base	121.14 g	1000 mL
HCl	22.17	

Tabla 4-6 Preparación del amortiguador de elución del cátodo para SDS-PAGE.  
(Tricina)

Reactivo	Cantidad	Aforo
Tris	121.14 g	1000 mL
Tricina	179.17 g	
SDS	10 g	

#### Preparación de geles

Se realizó siguiendo el esquema de la Tabla 4-7.

Tabla 4-7 Preparación de los geles para SDS-PAGE (Tricina).

	Separador	Intermedio	Compactador
Agua	2.33 mL	2 mL	2.66 mL
AB-3	---	1.2 mL	0.33 mL
AB-6	3.33 mL	---	---
Amortiguador de gel	3.33 mL	2 mL	1 mL
Glicerol	1 mL	0.8 mL	---
Persulfato de amonio 10%	33.3 $\mu$ L	30 $\mu$ L	30 $\mu$ L
TEMED	3.33 $\mu$ L	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L

#### Aplicación de muestras

La técnica está diseñada para 20  $\mu$ g de proteína por pozo, por lo que se emplearon soluciones de los estándares, ribonucleasa (13.7 kDa), aprotinina (6.5

kDa) y bacitracina (1.4 kDa) a una concentración de 4 mg/mL de los cuales se tomaron 7.5  $\mu$  L que se incubaron a 95° C por 5 minutos en presencia de 5  $\mu$  L de glicerol y 5  $\mu$  L de amortiguador de muestra. Finalmente se aplicaron al gel.

Para la muestra final que se aplicó se tomó la fracción colectada por duplicado de A1-50-17 (2 mg de A1-50 eluidas en C18 CLAR) y se diluyeron en 7.5  $\mu$  L para ser trabajada igual que los estándares.

#### Elución

Los geles preparados y cargados fueron eluidos por aproximadamente 2 horas, con un voltaje inicial de 30 por 20 mins y 110 V posteriormente en refrigeración.

#### Tinción

La tinción se realizó con azul de Coomassie, de la misma manera que en el apartado 4.5.1.

### 4.7 Determinación del perfil de aminoácidos de los compuestos bioactivos

La fracción activa separada por intercambio catiónico, fue llevada a hidrólisis ácida por el método Pico-tag de Waters.

#### 4.7.1 Hidrólisis ácida por método de Pico-tag

Se tomó 0.5-1 mg de la fracción activa en un vial, el cual fue colocado en un reactor Pico-tag, añadiendo 1 mL de HCl 6 N. El reactor fue cerrado tras eliminar el aire mediante desplazamiento con nitrógeno (para que el reactor quedara en atmósfera inerte) y se transfirió a la estación de calentamiento de Pico-tag a 106° C por 18 horas.

Al terminar la hidrólisis, el contenido fue diluido en 0.5 mL de agua grado HPLC (CLAR) y filtrada usando filtros Acrodisc (13 mm, 0.45  $\mu$  m) para su posterior derivatización con el kit de AccQ Fluor Reagent de Waters.

### Preparación del agente derivatizante

Para detectar los aminoácidos mediante fluorescencia se empleó el derivatizante 6-aminiquinolil-N-carbamato de hidroxisuccinimidilo (AQC) disuelto en 1 mL de acetonitrilo, agitado por 10 segundos y colocado en calentador de bloques a 55° C por 10 min.

### Derivatización de la muestra

Se disolvió la muestra en 10  $\mu$ L y se añadieron 70  $\mu$ L de amortiguador de boratos (2C, AQC Fluor Reagent Kit) y 20  $\mu$ L de AQC. La mezcla se agitó por 10 segundos y por un minuto se dejó que llegara a temperatura ambiente, luego se colocó en calentador de bloques a 55° C por 10 min. Para determinar los aminoácidos presentes en la muestra, se derivatizaron 10  $\mu$ L de una solución estándar de aminoácidos (Thermo Amino acid Standard H Pierce cat. # 20088; 18 aminoácidos en una concentración de 2.5 mM).

### Análisis de la muestra

Se empleó bajo el método AccQ-TAG de Waters en CLAR, empleando un equipo cromatográfico Waters 1525 acoplado a un detector de fluorescencia de onda múltiple Waters 2475 y como fase estacionaria una columna AccQ-TAG (3.9 x 150 mm, tamaño de partícula 4  $\mu$ m, Waters Inc. USA) y fase móvil A (eluente A/agua, en dilución 1:10 volumen/volumen, siendo el eluente A un disolvente propio del fabricante, sin especificar) y fase móvil B (acetonitrilo:agua, 60:40 v/v) con tiempo de análisis de 40 minutos, longitud de onda de excitación de 250 nm y longitud de onda de emisión de 395 nm, inyectando 25  $\mu$ L de muestra. De manera similar se inyectó el estándar de aminoácidos (previamente derivado), para identificar los aminoácidos que componen la fracción activa y al mismo tiempo cuantificar cada uno de ellos (por comparación con las correspondientes áreas bajo la curva de los respectivos estándares).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de presentar los resultados y la manera en que estos determinaban la dirección de la separación, se presenta la discusión de los mismos en este apartado. Así, la información de cada una de las técnicas de separación empleada se ha agrupado en diferentes secciones con la intención de clarificar mejor la relevancia de todas ellas individualmente.

### 5.1 Colecta/identificación

Se realizaron varias colectas, dos principales en 2014, una de ellas a finales de enero y la segunda a finales de agosto, consiguiéndose 7 y 36 ejemplares, respectivamente. Adicionalmente, en enero y febrero del 2015 se llevó a cabo una tercera y cuarta colecta de un número cercano a 30 anémonas en la zona del puerto de abrigo de Sisal, Yucatán ( $21^{\circ} 09'51.6''$  N,  $90^{\circ} 02'54.8''$  O). Las anémonas se encontraban presentes en los sustratos rocosos de los espigones, adheridos a ellas por medio de su disco pedal, a una profundidad somera. La mayoría de los organismos eran de difícil acceso bajo estructuras rocosas que forman una especie de cueva, posiblemente con la finalidad de dotar de protección a las anémonas.

La identificación se realizó mediante comparación de los caracteres macroscópicos (Figura 5-1 y 5-2, Tabla 5-1). En este aspecto, las anémonas colectadas se encuentran dentro de las dimensiones descritas para el color característico del disco oral, columna, tentáculos y disco pedal. Una vez llevados a sequedad, los organismos en conjunto tenían un peso de 10.82 g y 61.12 g, en las fracciones trabajadas del año 2014 y 33.2 g en las 22 anémonas colectadas en 2015 que fueron empleadas para la extracción metanólica y acuosa (el resto se emplearon para la extracción de nematocistos aun vivas).



Figura 5-1 Anémona, vista lateral. (izq, *B. cavernata*<sup>1</sup>; der, organismo colectado).



Figura 5-2 Anémona, vista superior. (izq, *B. cavernata*<sup>1</sup>; der, organismo colectado). Barra de escala: 10 mm.



Tabla 5-1 Descripción morfológica de las anémonas colectadas (*B. cavernata*).

Estructura	Descripción de <i>B. cavernata</i> <sup>1</sup>	Descripción de los organismos colectados
Disco oral	Liso y totalmente expandido Café-amarillento, café rojizo o verde oliva pálido Diámetro: 10-22 mm	Liso y totalmente expandido. Café-rojizo o verde oliva pálido Diámetro: 18-23 mm
Tentáculos	Delgados, lisos, cónicos, contráctiles Verde-oliva, rojizos o naranjas pálidos, con puntos blancos o amarillos en el lado oral 2-5 mm (internos más largos que externos) Diámetro de 20-38 mm	Delgados, liso, cónicos, contráctiles Verde-oliva 7-9mm (internos más largos que externos) Diámetro de 19 mm
Columna	Cilíndrica, gruesa, con verrugas Ligeramente café, naranja, rojizo, amarillento o verde olivo Alto: 7-15 mm Diámetro: 12-22 mm	Cilíndrica, gruesa, con verrugas Ligeramente café, verde-olivo Alto: 23 mm Diámetro: 24 mm
Disco pedal	Ligeramente café, naranja, rojizo, amarillento o verde-olivo Diámetro: 12-19 mm	Ligeramente café o verde-olivo Diámetro: 15 mm

## 5.2 Extracciones y fraccionamiento (rendimientos y evaluación biológica)

Para las extracciones del organismo completo, se observó, a partir de extracciones preliminares, rendimientos similares tanto para maceraciones prolongadas de 1 o 3 días (en agua y metanol, respectivamente) como para las maceraciones por periodos de 1 hora en agitación, [Tabla 5-2](#). En el caso de la extracción rápida acuosa el rendimiento parece mucho mayor debido a la presencia de restos de tejidos que no fueron filtrados. Aun así, es clara la ventaja que da la aceleración de la extracción, ya sea por conveniencia de tiempos de

trabajo, como el hecho de que reducir el tiempo cuando se emplea agua evita el crecimiento bacteriano.

Tabla 5-2 Comparación entre extracción rápida y lenta.

	Tiempo extracción	MeOH	Agua
	(h)	Rendimiento (%)	
Extracción lenta (7 anémonas, 10.82 g)	24-72	21.5	10.3
Extracción rápida (36 anémonas, 61.12 g)	1	20.9	33.6

Para la extracción acuosa rápida, el extracto seco presentó un peso de 10.09 g (rendimiento del 34 %), Mientras para la extracción metanólica se obtuvieron 5.26 g (rendimiento total del 20.86%). En la extracción de nematocistos se tomaron 10 organismos de los cuales se obtuvieron, tras filtración rápida, 22.97 g de extracto crudo. Los rendimientos obtenidos para cada extracto se presentan en la Tabla 5-3.

Como en el caso del extracto acuoso del organismo completo, la extracción de nematocistos llevó consigo una considerable cantidad de tejidos que debieron ser filtrados posteriormente, tanto por filtración rápida como por filtración al vacío con membranas de 0.4  $\mu$ m. En el extracto metanólico, a pesar de no obtener esta cantidad de tejidos, es importante señalar que los extractos resultantes tenían apariencia cerosa debida, muy posiblemente, a la extracción de éstas por parte del metanol.

### 5.2.1 Evaluación de la actividad biológica de los extractos crudos

Una vez generados los extractos crudos, esto fueron sometidos a los bioensayos rápidos, a fin de generar el perfil farmacológico de cada uno de ellos, los resultados se presentan en la Tabla 5-3.

Tabla 5-3 Rendimientos y evaluación biológica de extractos crudos obtenidos de la maceración con agua, metanol y de nematocistos.

Peso g	Extracto crudo	Proteína mg	N		L CL <sub>50</sub> (mg/mL)	H %	Z CL <sub>50</sub> μg/mL
			Tiempo (s)	Efecto			
10.09 (18 an.)	Acuoso	1,825.61	195	Muerte	1.12	100	48.82
4.77 (4 an.)	Metanólico	41.4	0 30 420	Temblor Relajación muscular Muerte	NA	35	ND
22.97 (10 an.)	Nematocistos	ND	0 240	Temblor Muerte	NA	ND	ND

N: Actividad neurotóxica en *O. quadrata*; L:Letalidad en *A. salina*; H:Hemólisis; Z: Citotoxicidad en pez cebra. ND: No determinado; NA: no activo.

En todos los casos anteriores, la prueba neurotóxica fue realizada en una concentración de 10 mg/mL basado en la evaluación, por duplicado, del efecto del extracto crudo metanólico sobre *O. quadrata* (Tabla 5-4), donde se encontró que el efecto era evidente a una concentración de 1 mg/mL, pero se emplea una concentración diez veces mayor para evitar falsos negativos por concentración del extracto. Aquí también es posible observar que en esta prueba incluso el extracto crudo metanólico es letal para los cangrejos, lo cual implica que si bien rompe con la estructura terciaria de las proteínas, aún hay compuestos que pueden ejercer su efecto. Además, al ser una mezcla compleja de compuestos, la letalidad puede presentarse sin necesidad de ser parte del efecto de las neurotoxinas.

Tabla 5-4 Evaluación del efecto neurotóxico en *O. quadrata* del extracto metanólico.

[Extracto] (mg/mL)	Tiempo promedio	Efecto
Control negativo (agua desionizada)	--	Sin efecto
0.001	60 seg	Quelípedos bajos
0.01	24 seg 60 seg	Quelípedos bajos Temblor
1	8 seg 200 seg 230 seg	Quelípedos bajos Parálisis Muerte
10	5 seg 60 seg	Espasmos Muerte

En esta prueba neurotóxica realizada sobre *O. quadrata* (10 mg/mL, 100 uL inyectados) todos los extractos crudos mostraron un efecto letal, pero difieren en el tiempo en el cual inducen la respuesta. El más rápido fue el extracto acuoso luego el extracto de los nematocistos, mientras que el efecto del extracto metanólico tardó el doble de tiempo que los dos anteriores. Estos resultados nos indican que la actividad biológica letal en cangrejos (actividad en extracto acuoso), posiblemente se encuentra en los nematocistos (actividad en extracto de nematocistos) y, de ser así, es muy probable que sea por proteínas de alto peso molecular (actividad más baja en el extracto metanólico).

Se observa, además, que el efecto en *A. salina* sólo es considerable en el extracto acuoso debido a la presencia de las citolisinas. Esto puede comprobarse con los resultados del extracto metanólico, donde se eliminan las proteínas y no existe efecto en las artemias. De igual manera, la ausencia de actividad en el extracto de nematocistos puede ser explicada también por una reducida presencia de estas citolisinas así como un bajo potencial letal en las neurotoxinas, o bien, a una

inadecuada descarga de los nematocistos (esto no se comprobó por observación al microscopio). Por otra parte, la hemólisis presente tan sólo en el extracto crudo acuoso reafirma esta suposición sobre la presencia de citolisinas como moléculas responsables de la letalidad. La prueba en *A. salina* se correlaciona con la actividad antiparasitaria; sin embargo, mediante la prueba antiparasitaria por el método de subcultivos no se halló tal actividad para ninguno de los extractos crudos en un intervalo de 1 a 50 µg/mL.

Por otra parte, la hemólisis, como se ha mencionado, también fue observada principalmente en el extracto crudo acuoso (100%) de efecto, mientras que en el extracto metanólico fue muy débil (35 %). Resultado esperado, dado que el bioensayo está correlacionado con el efecto citolítico. Debido a la cantidad de muestra requerida para el ensayo, no fue posible realizarlo en el extracto de nematocistos.

El ensayo en pez cebra se realizó únicamente con el extracto crudo acuoso debido a su complejidad y a la cantidad de extracto requerido. La importancia de esta prueba radica en hacer evidente la existencia de actividad, puesto que se sabe que este organismo es uno de los mejores modelos para identificar actividad biológica basada en el fenotipo<sup>91</sup>. Esto significa que frente a un mismo compuesto o extracto, el pez cebra presenta efectos muy parecidos a los que se esperan en humanos, una correlación incluso mejor que al ser probado en mamíferos, por ejemplo en ratones. La dosis letal del extracto acuoso ( $CL_{50} = 48.82 \mu\text{g/mL}$ ), indica la sensibilidad del pez cebra frente a la citolisinas.

### 5.2.2 Separación por exclusión molecular por ultrafiltración

Una vez realizadas las diferentes extracciones, los extractos fueron resuspendidos en agua, filtrados y separados por tamaño molecular empleando membranas de 1, 3, 10 y 30 kDa, sus rendimientos y actividad biológica se presentan en la Tabla 5-5 (extracto acuoso),

Tabla 5-6 (extracto metanólico) y Tabla 5-7 (extracto de nematocistos).

Tabla 5-5 Rendimientos y evaluación biológica de la maceración con agua.

Fracción (10 mg/mL)	Peso g	Rendimiento %	Proteína mg	N		L CL <sub>50</sub> (mg/mL)	H %
				Tiempo (s)	Efecto		
>30 kDa	1.0328	10.2	212.06	16 124 246	Temblor Parálisis Muerte	0.86	105
30-10 kDa	0.1034	1.0	9.79	0 66 146	Temblor Parálisis Muerte	0.83	107
10-3 kDa	0.0806	0.8	0	53 460	Temblor Temblor mayor Muerte	2.67	58
3-1 kDa	0.2104	2.1	0	240-480	Relajamiento	>4.8 g/mL	4.5
<1 kDa	0.9992	9.9	0	---	Sin efecto	>9 g/mL	2

N: Actividad neurotóxica en *O. quadrata*; L:Letalidad en *A. salina*; H:Hemólisis.

Tabla 5-6 Rendimientos y evaluación biológica de la maceración con metanol.

Fracción	Peso g	Rendimiento %	Proteína mg	N		L CL <sub>50</sub> (mg/mL)	H %
				Tiempo (s)	Efecto		
Extracto crudo	30.06	-	-	-	--	--	--
> 30 kDa	0.8230	2.74	44.9			NA	27.5
30-10 kDa	0.0203	0.3	ND	40 270	Temblor Muerte		7.9
10-3 kDa	0.0464	0.7	ND	10 246	Temblor Muerte		1.8
3-1 kDa	0.1031	1.6	ND	40	Quelas		12.6

				143 265 23 min 28 min	bajas Temblor Relajación Espasmos Muerte	
< 1 kDa	1.4408	23.0	ND	--	Sin efecto	5.5

N: Actividad neurotóxica en *O. quadrata*; L:Letalidad en *A. salina*; H:Hemólisis.

ND: No determinado; NA: no activo.

Tabla 5-7 Rendimientos y evaluación biológica del extracto de nematocistos.

Fracción	Cantidad g	Rendimiento %	Proteína mg/g	N		L CL <sub>50</sub> (mg/mL)
				Tiempo (s)	Efecto	
> 30 kDa	0.4101	1.8	611.1	25 101 236	Parálisis Convulsión Muerte	NA
30-10 kDa	0.0775	0.3	33.2	10 81 220	Temblor Parálisis Muerte	
10-3 kDa	0.2234	1.0	0	8 72 220	Temblor/extensión Parálisis Muerte	
3-1 kDa	0.0186	0.1	0	8 108 295 380	Hiperactividad Parálisis/extensión Convulsión Muerte	
< 1 kDa	1.0103	4.4	0	ND	NA	

N: Actividad neurotóxica en *O. quadrata*; L:Letalidad en *A. salina*. ND: No determinado; NA: no activo.

Los extractos obtenidos se analizaron mediante la técnica de SDS-PAGE para determinar la eficiencia de la separación por tamaño molecular llevada a cabo mediante ultrafiltración (Figura 5-3).

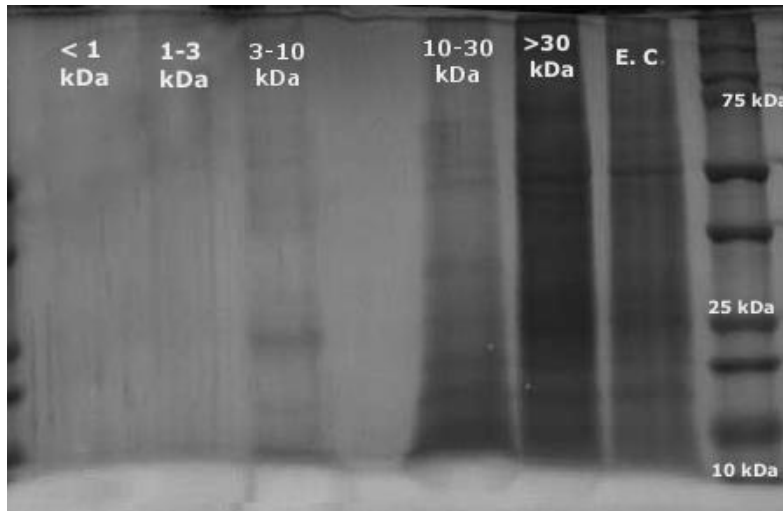


Figura 5-3 Separación por SDS-PAGE (15% acrilamida) del fraccionamiento por peso molecular en ultracentrifugación, empleando tinción con azul de Coomassie. E.C.= extracto crudo; el último carril a la derecha muestra al marcador Precision Plus Protein. Corrida a 120 V, 2 horas con 100  $\mu$ g de muestra en cada pozo.

Los resultados del SDS PAGE demuestran que la ultrafiltración es una técnica que permite fraccionar en grupos de tamaños específicos de manera más rápida y a mayor escala, lo que permite analizar grupos discretos y no cada peso molecular.

Esta técnica se realizó para poder hacer una primera separación entre las moléculas de alto peso molecular, donde se encuentran las citolisinas, y las de bajo peso molecular, donde las neurotoxinas están presentes. Esto se ve reflejado en la actividad biológica ejercida por las fracciones. Una vez más se puede comprobar que la hemólisis, letalidad en *A. salina* y el efecto letal en *O. quadrata* va aumentando a mayor peso molecular de las fracciones, obteniendo  $CL_{50} \approx 0.8$  mg/mL para las mayores de 10 kDa. Mientras que esta letalidad es muy baja en las fracciones de bajo peso molecular ( $CL_{50}$  ya en niveles de g/mL) para las menores a 3 kDa, así como la presencia de efecto neurotóxico considerable en la fracción de 1 a 3 kDa.



Las fracciones de alto peso molecular resultan interesantes debido a su alta actividad hemolítica y letalidad en *A. salina*; basado en lo conocido hasta el día de hoy en otras especies de anémonas, es posible esperar que demuestren ser base para estudios en líneas celulares cancerosas como en el caso de Bc2<sup>15</sup>. No obstante, la presencia de actividad neurotóxica en fracciones de menor peso molecular fue interesante debido a que podría tratarse de un efecto mucho más específico que el de las citolisinas; además, que hasta la fecha no existen reportes en la literatura de péptidos de bajo peso aislados de esta especie de *Bunodosoma*. Aunado a esto, la facilidad de síntesis de polipéptidos, y por ende de análogos de moléculas menos complejas con interés farmacéutico hicieron que finalmente se optara por trabajar con esta fracción.

El enfoque de este trabajo se dirigió entonces en las fracciones de bajo peso molecular con efecto neurotóxico en *O. quadrata* (menores a 10 kDa), donde se mostró efecto de relajación y baja letalidad en la que corresponde a 1-3 kDa, que, además, está libre de una gran porción de sales (fracción menor a 1 kDa) y polipéptidos de alto peso molecular (fracción mayor a 3 kDa). Como se ha mencionado en los antecedentes, en la literatura se han descrito polipéptidos neurotóxicos de alrededor de 5 kDa a partir de extractos de *B. cangicum*<sup>60</sup>, *B. caissarum*<sup>61, 64</sup> y *B. granulifera*<sup>53, 63, 65</sup>, por lo que resulta interesante separar y determinar a los polipéptidos presentes en esta fracción.

El análisis de las fracciones de 1 a 3 kDa (denominadas A1) de los diferentes métodos de extracción por CLAR analítico C18 (Figura 5-4) reveló perfiles cromatográficos similares, independientemente de su método de extracción. Considerando este resultado, se pretendió utilizar metanol como disolvente, debido a su capacidad para eliminar desde un inicio a las proteínas y evitar la gran cantidad de tejidos derivados de la extracción de nematocistos. Al final, se decidió trabajar con el extracto acuoso a fin de realizar una biblioteca de

fracciones para estudios posteriores, por lo que los resultados mostrados a partir de esta sección se limitarán a los datos obtenidos de éste.

La Figura 5-4 además, nos permite observar, mediante ELSD, la presencia de una gran concentración de sales, mientras que los demás componentes no logran apreciarse y, ya que es un detector universal, se puede inferir que gran parte del extracto está dada por las sales.

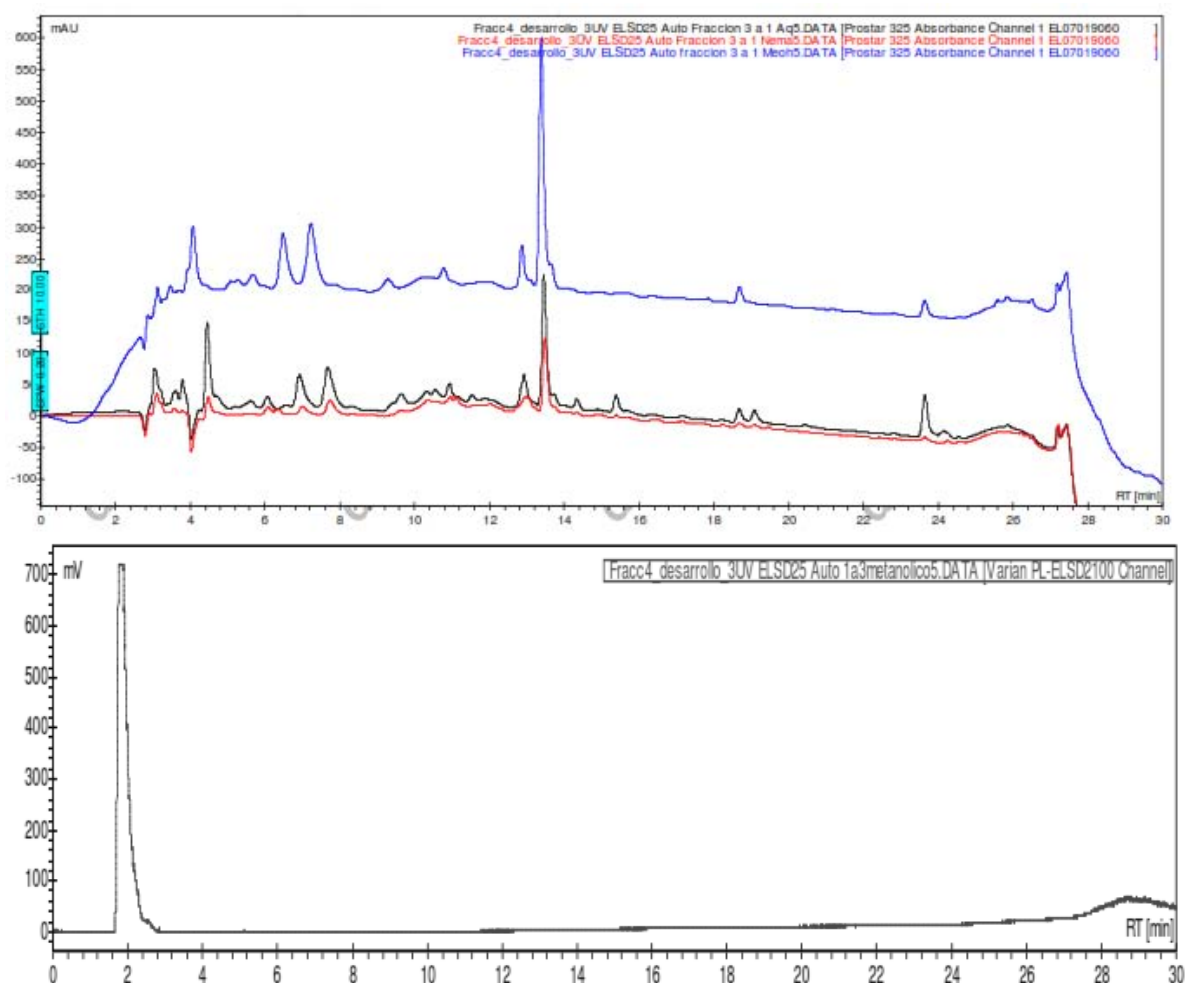


Figura 5-4 Cromatogramas de las fracciones de 1-3 kDa obtenidas de la ultrafiltración. Arriba, empleando detección por UV a 215 nm; abajo, ELSD. HPLC Varian 211, UV, 215 nm, ELSD Ice 2100, LUNA (C18). Gradiente de

Agua/TFA 0.1% de 100% a 0% en 30 min. Flujo 1 mL/min; 20  $\mu$  L;. (Azul: MeOH, Negro: Acuoso, Rojo: Nematocistos).

### 5.2.3 Separación por extracción en fase sólida

El empleo de cartuchos de extracción en fase sólida (EFS) C18 nos permitió por una parte eliminar las sales en la fracción y por otra, prefraccionar mediante polaridad al extracto neurotóxico.

Los rendimientos mostrados en la Tabla 5-8 del extracto acuoso muestran que casi un 69% de la fracción A1 eluye con un 100% de agua, lo que implica, como se ha explicado, que quizás esto se deba a la presencia de sales. Además, los metabolitos eluidos al reducir la polaridad no suman entre ellos más del 7% de la fracción A1 original, y sólo 2% representa la parte activa con mayor efecto, eluida en la fracción 50:50 de agua/acetonitrilo, es decir, la menos polar de A1.

Tabla 5-8 Rendimientos y evaluación biológica obtenidos de la separación por extracción en fase sólida en C18 de los extractos acuosos entre 1 y 3 kDa de *B. cavernata*.

Fase móvil (5 mL)	Cantidad mg	Rendimiento %	Actividad neurotóxica (10 mg/mL)	
			Tiempo (s)	Efecto
Agua 1	137.94	68.97	---	Sin efecto
Agua 2	4.22	2.11	---	Sin efecto
Agua 3	2.3	1.15	---	Sin efecto
Agua/AcN 95:5	2.2	1.10	---	Sin efecto
Agua/AcN 90:10	3.9	1.95	181	Reducción de movimiento
Agua/AcN 80:20	3	1.5	---	Sin efecto
Agua/AcN 50:50	4	2.00	25	Reducción de movimiento
			74	Parálisis
			420	Muerte

## 5.2.4 Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) en fase reversa

Todas las fracciones A1 anteriores separadas por EFS se analizaron por CLAR para evaluar su complejidad química; sin embargo, en la [Figura 5-5](#) se muestran solamente los cromatogramas de las subfracciones provenientes de las eluciones con 95:5, 90:10 y 50:50, como ejemplos de los cambios en la complejidad.

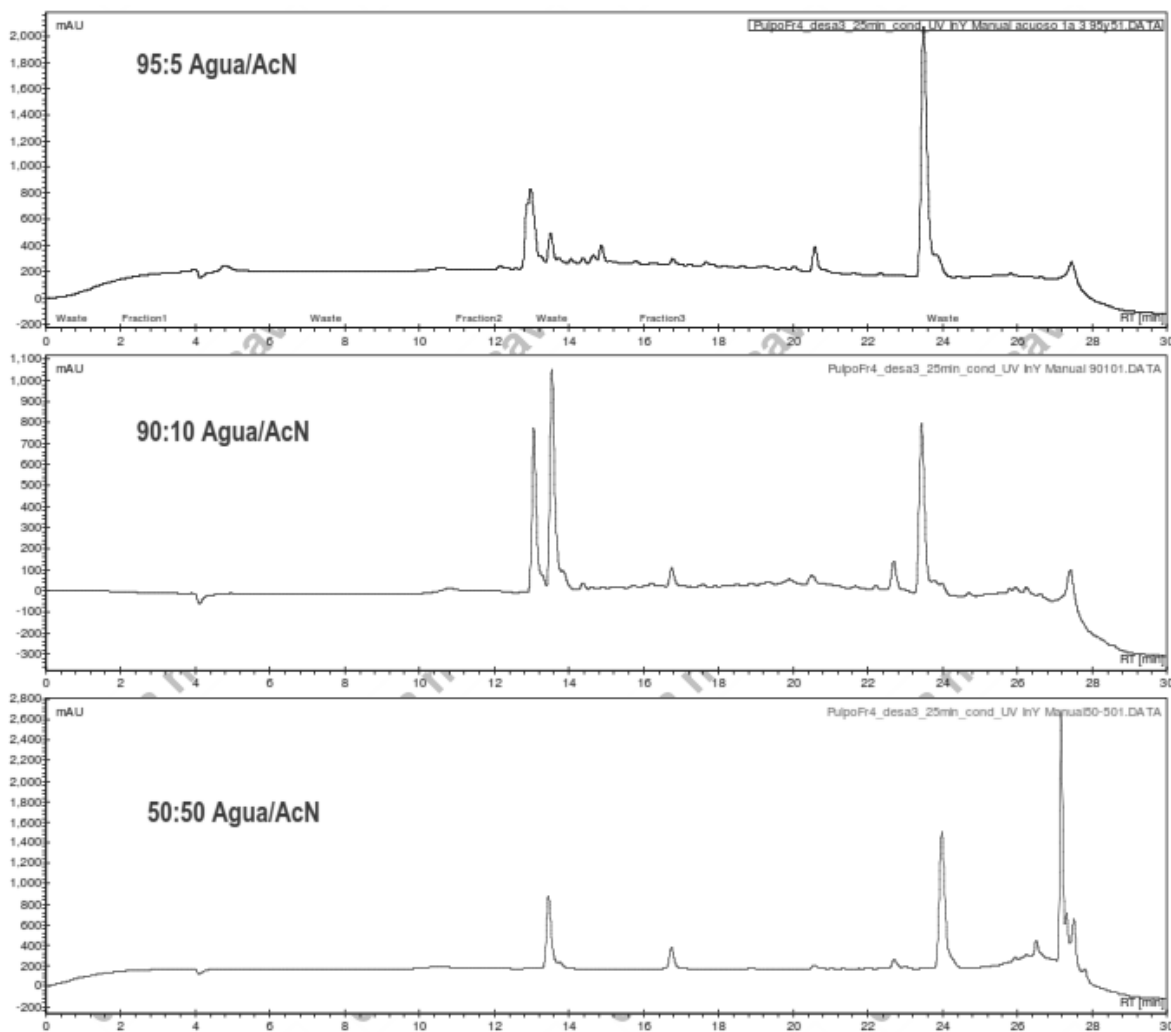


Figura 5-5 Cromatogramas de las fracciones de 1-3 kDa (A1) eluidas con 95:5, 90:10 y 50:50 % Agua/AcN. HPLC Varian 211, ELSD Ice 2100, LUNA (C18). Gradiente de Agua/TFA 0.1% de 100% a 0% en 30 mins. Flujo 1 mL/min; 20  $\mu$  L. Detección en UV 215 nm.

La actividad neurotóxica de mayor efecto fue observada en la subfracción eluída a 50:50 agua/AcCN (denominada A1-50), mostrando la presencia de dos señales con tiempo de retención de 13 y 17 minutos en CLAR con una columna LUNA C18. Se puede observar que, si bien ambas señales parecen estar presentes en la fracción 90:10 que también mostró efecto, la señal a los 17 minutos es la única que no parece aparecer en la fracción 95:5, donde no se expresó actividad, de lo cual se podría considerar a esta señal como la activa.

#### 5.2.5 Separación por gel permeable/intercambio catiónico en CLAR:

La fracción A1-50, con sus dos señales, fue analizada por gel permeable con una columna Yarra-2000, con un rango de trabajo de 1 a 300 kDa que permitió observar la presencia de tres conjuntos de picos que fueron colectados, que abarcan los tiempos de retención de 9-14 min (A1-50-1), 14-15.30 min (A1-50-2) y 20-26 min (A1-50-3), Figura 5-6. La decisión de llevar a cabo esta segunda separación por peso molecular se tomó como medida para acotar más finamente el rango de tamaño de las moléculas; es decir, primero se consideró realizar la ultracentrifugación para obtener intervalos de corte amplios para obtener pocas fracciones que pudiesen ser evaluadas rápidamente, para, posteriormente, con la fracción activa, realizar un nuevo corte que nos diera un indicio más claro del peso molecular real, ya que aquí el corte se hace en una fracción donde los pesos esperados se restringen a un intervalo de 1 a 3 kDa

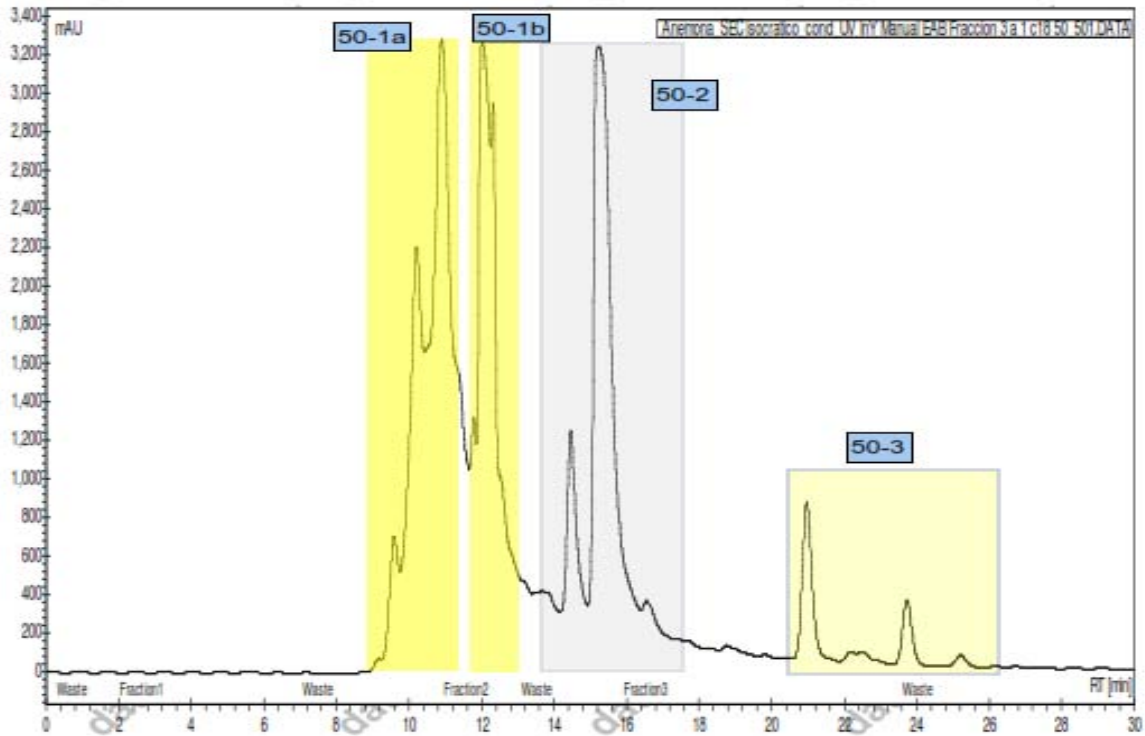


Figura 5-6 Cromatograma de exclusión molecular de la fracción A1-50. HPLC Varian 211, Yarra SEC 200. Gradiente de Agua/TFA 0.1% de 100% a 0% en 30 mins. Flujo 1 mL/min; 20  $\mu$ L; Detección a 215 nm.

Estas nuevas fracciones fueron evaluadas en su actividad biológica, obteniendo efecto tanto en la de A1-50-1 (a y b) como en la A1-50-3, siendo mucho más intenso y rápido el efecto por el primer conjunto de señales.

La fracción A1-50-1 fue dividida en dos: 9-11 (A1-50-1a) y 11-13 mins (A1-50-1b), siendo la primera fracción letal al instante de la inyección, mientras que 50-1b ocasionó descoordinación motora en el cangrejo y reducción de su actividad a los 20 y 90 segundos, respectivamente, perdiendo efecto en 30 min.

1 mg de la fracción A1-50-1b se analizó por CLAR empleando fase reversa, obteniendo un cromatograma que demostraba la presencia de al menos 4 señales (Figura 5-7), cuyo señal principal tenía tiempo de retención ( $t_r$ ) de 17.51 min, al

evaluar la actividad en cada uno de los componentes del cromatograma, se encontró que era también el responsable de la actividad.

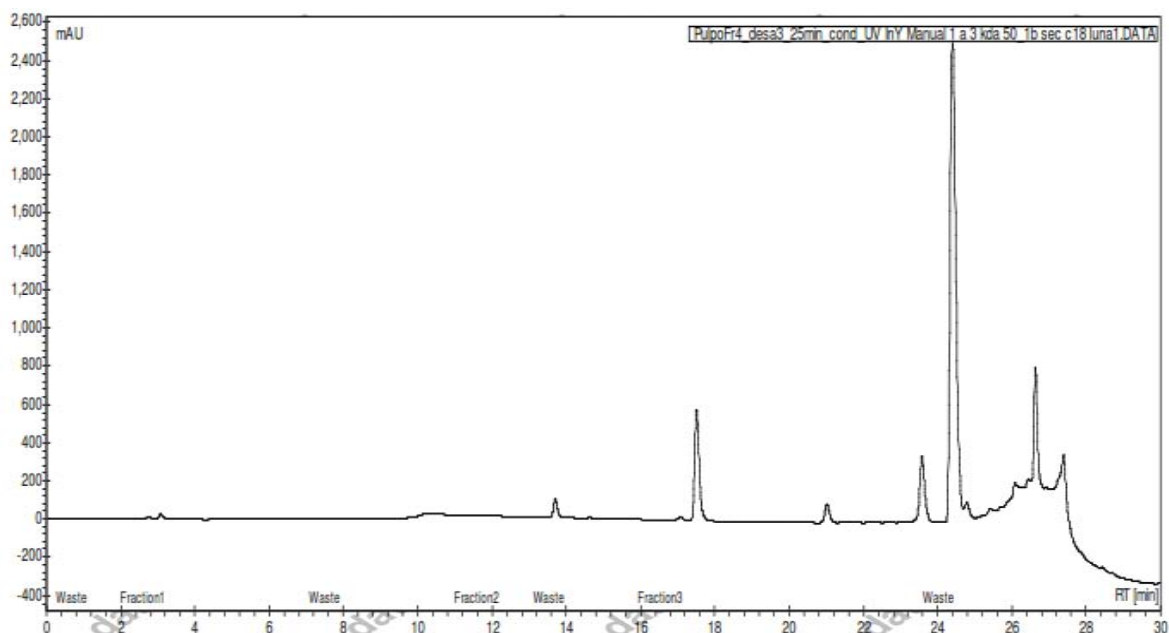


Figura 5-7 Cromatograma de la fracción A1-50-1b analizada por CLAR-C18. HPLC Varian 211, LUNA (C18). Gradiente de Agua/TFA 0.1% de 100% a 0% en 30 min. Flujo 1 mL/min; 20  $\mu$  L; detección a 215 nm.

Se separó y colectó la señal con tr 17:51 por CLAR en fase reversa, se procedió a realizar su análisis por CLAR, empleando una columna de intercambio catiónico fuerte (LUNA 5  $\mu$  SCX, 4.5 X 250 mm, Phenomenex), cuyo cromatograma (Figura 5-8), muestra la presencia de solo una señal.

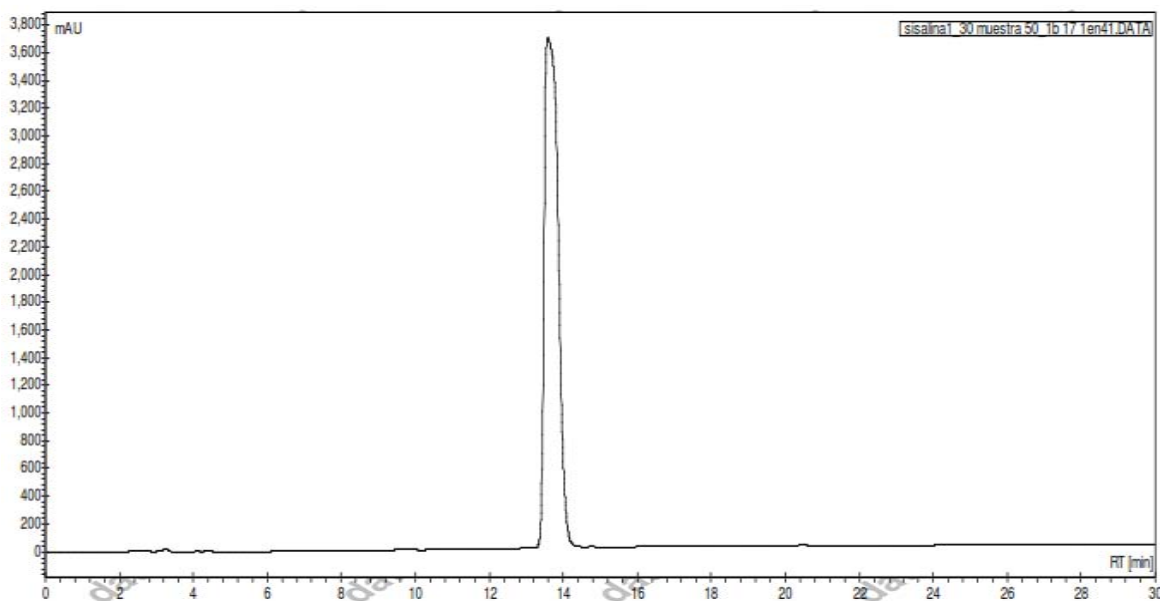


Figura 5-8 Cromatograma de la fracción A1-50-1b (17:51) analizada por CLAR-intercambio catiónico. HPLC Varian 211, LUNA 5u SCX 100A. . Flujo 1 mL/min; 20  $\mu$  L; detección a 215 nm.

Al determinar que solo existe una sola señal y que la misma es la más abundante en la separación por C18 ([Figura 5-7](#)) se observó la correlación del cromatograma de C18 con el realizado previa separación por exclusión molecular ([Figura 5-5](#)). Es posible observar que al reducir la complejidad de la muestra mediante el seguimiento de la actividad, se muestran constantes dos picos por C18, a los 13 y 17 minutos tanto en la fracción eluída a partir de extracción en fase sólida como en su posterior purificación por exclusión molecular, sin embargo, se evidencia que el pico a los 13 minutos se ha reducido considerablemente en el último paso de separación, lo que nos indicaría que el efecto neurotóxico encontrado es consecuencia de la acción del pico a los 17.51 min (por C18), tal y como se expresó en la sección 5.2.4.

#### 5.2.5.1 Separación mediante método alternativo

Como parte de un nuevo análisis para determinar la reproducibilidad del aislamiento de la fracción A1-50-17sec se realizó de nuevo el procedimiento, sustituyendo la separación de 5 kDa y 3 kDa mediante ultracentrifugación por ultrafiltración en membranas Amicon Millipore acondicionadas con nitrógeno de



las mismas medidas. Esto generó que la actividad fuese observada en la fracción de 3 a 5 kDa pero también conservó su efecto la subfracción 50:50 agua/AcCN por EFS.

La fracción A2-50 por otra parte podría confirmar que el pico en 17.51 en C18 sea el activo. En el caso de A2-50 la columna empleada fue distinta (columna pelicular Aeris Widepore C18, Phenomenex., 2.7  $\mu\text{m}$ , 45x150 mm) en lugar de la columna LUNA C18 y se encontró que el efecto se halla a los 16 min (Figura 5-9). Esta señal al ser separada por gel permeable en HPLC muestra también una sola señal principal con actividad neurotóxica coincidiendo con el tiempo de retención de A1-50-1b, a los 11.83 minutos en flujo de agua: 0.1% TFA/acetonitrilo (Figura 5-10). Esto nos indica que es, de hecho, más eficiente la separación de la fracción activa a partir de una columna C18.

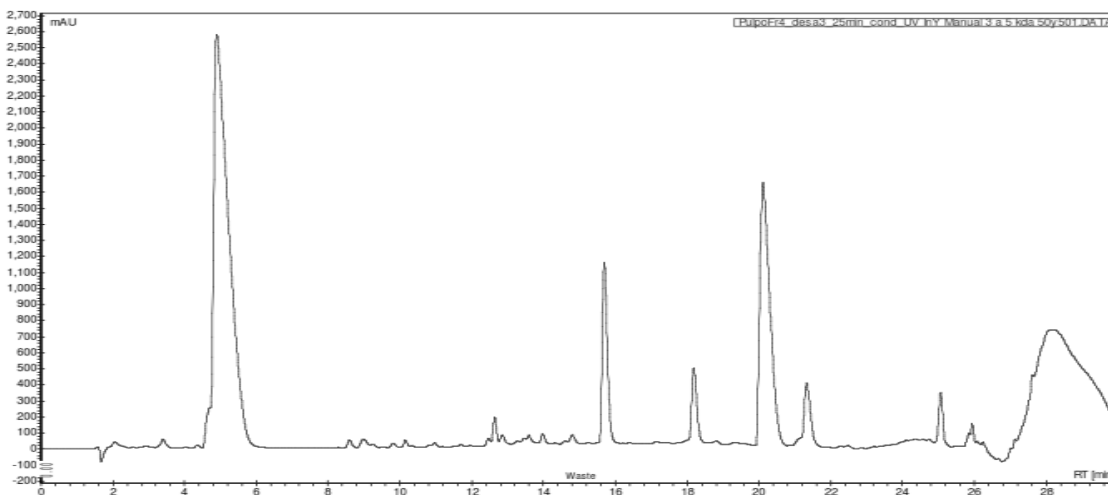


Figura 5-9 Cromatograma de la fracción A2-50 analizada por CLAR-C18. HPLC Varian 211, AERIS Widepore (C18). Gradiente de Agua/TFA 0.1% de 100% a 0% en 30 mins. Flujo 1 mL/min; 20  $\mu\text{L}$ ; detección a 215 nm.

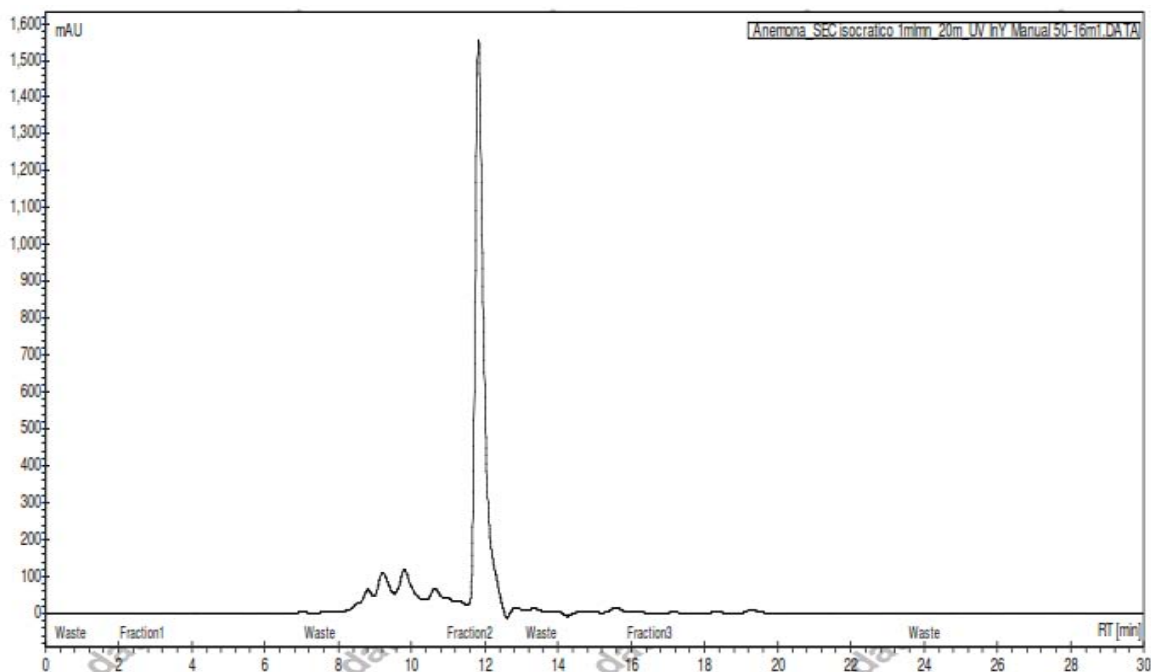


Figura 5-10 Cromatograma de exclusión molecular de la fracción A2-50. HPLC Varian 211, Yarra SEC 200. Flujo isocrático de Agua/TFA 0.1%acetonitrilo (90:10) Flujo 1 mL/min; 20  $\mu$  L; detección a 215 nm.

### 5.3 Determinación del peso molecular de la fracción A1-50-1b

La separación de A1-50-1b (equivalente a A2-50-17sec) empleó gel permeable en un flujo isocrático de agua/TFA:AcCN (90:10) con la intención de evitar el uso de sales para su elución. Sin embargo, para determinar el tamaño molecular con precisión la muestra fue analizada con flujo isocrático de amortiguador de fosfatos 0.2 M, para evitar interacciones con la fase estacionaria. Para determinar el peso molecular se calibró la columna con estándares de bajo peso molecular: ribonucleasa (13.7 kDa), aprotinina (6.5 kDa) y bacitracina (1.4 kDa). Los tiempos de retención de cada uno de los estándares de la Figura 5-11 y la muestra (Figura 5-12) se muestra a continuación en la Tabla 5-9.

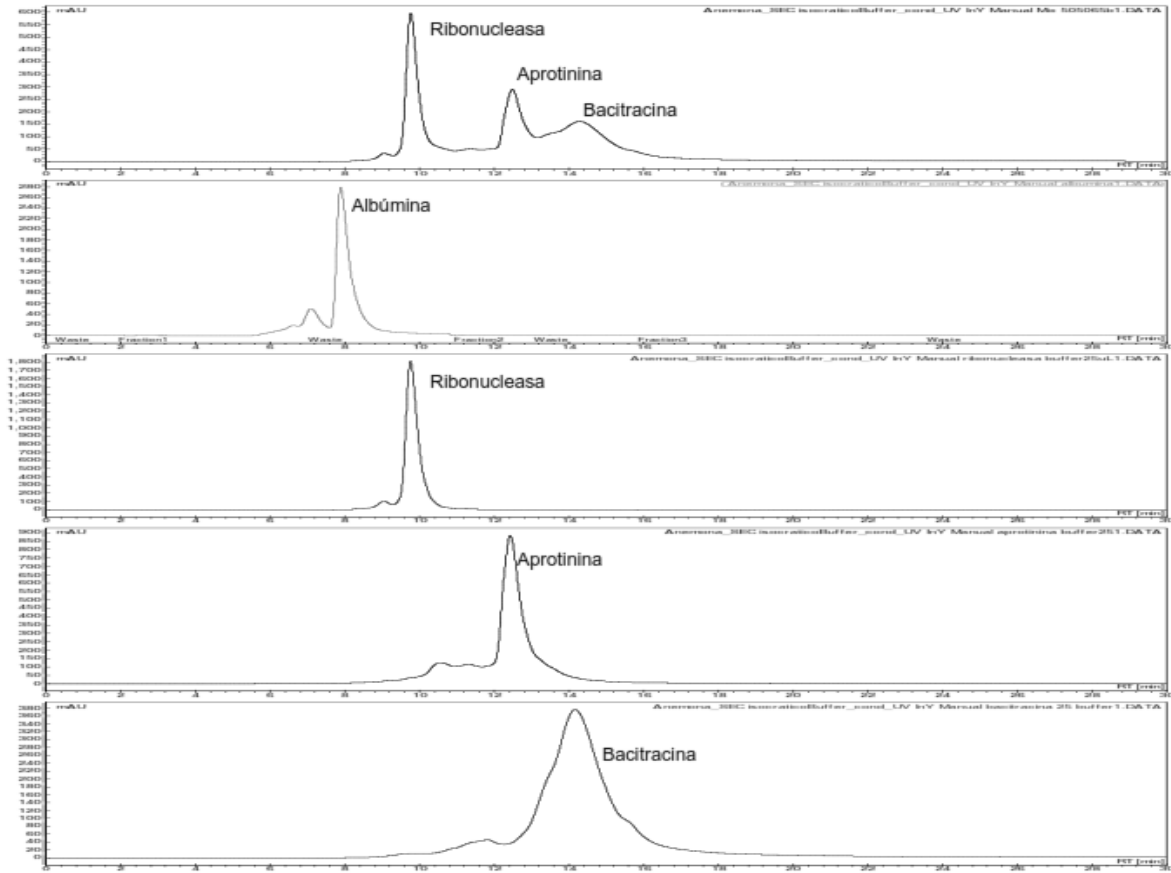


Figura 5-11 Cromatograma de exclusión molecular de los estándares de peso molecular. HPLC Varian 211, Yarra SEC 200. Flujo isocrático de amortiguador de fosfatos 0.2 M (610 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/390 mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7) fosfatos, 30 min. Flujo 1 mL/min; 20 μL; UV 215 nm.

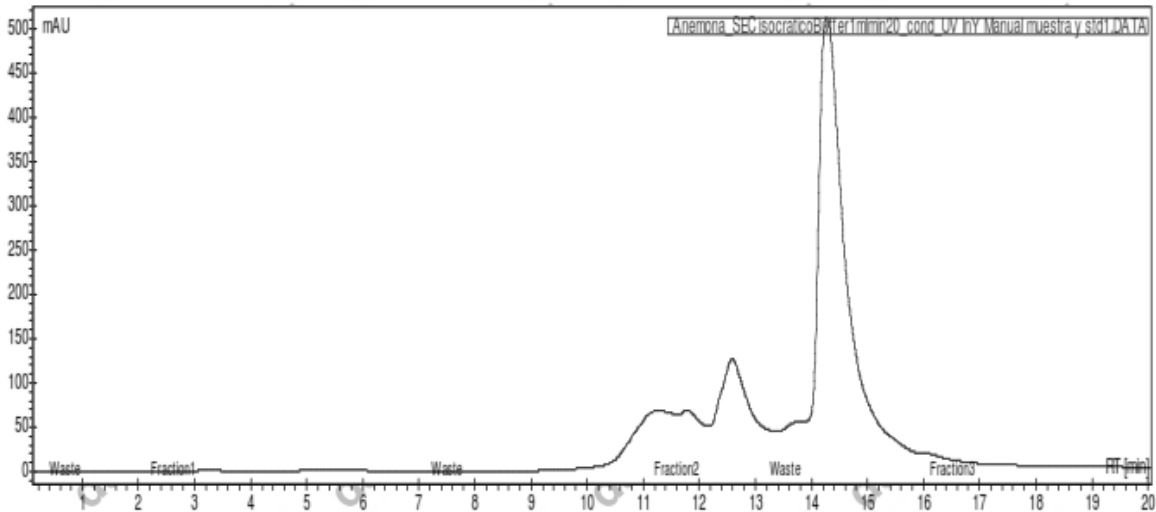
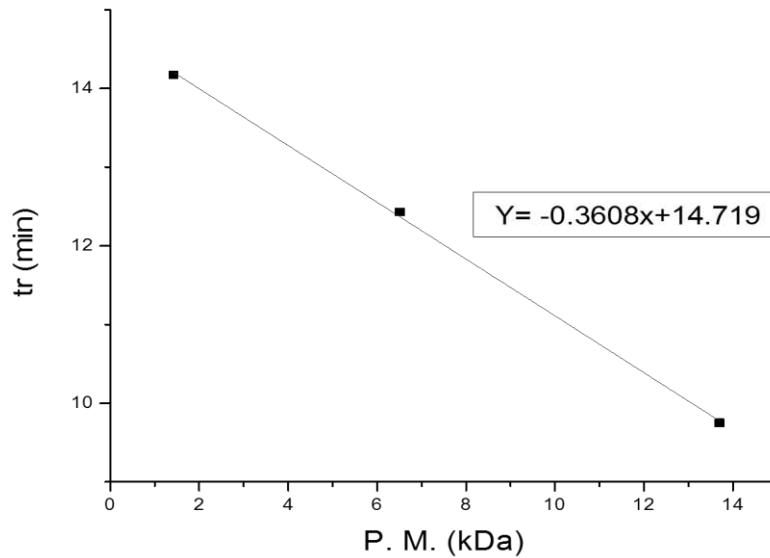


Figura 5-12 Cromatograma de exclusión molecular de la fracción A1-50-1b. HPLC Varian 211, Yarra SEC 200. Flujo isocrático de fosfatos 0.2 M, 30 min. Flujo 1 mL/min; 20  $\mu$ L; 215 nm.

Tabla 5-9 Pesos moleculares y tiempos de retención de ribonucleasa, aprotinina y bacitracina separados por gel permeable en CLAR. Datos obtenidos de las Figuras 5-11 y 5-12. Tiempo de retención (tr), peso molecular (P.M.)

	P. M (kDa).	tr (min)
Ribonucleasa	13.7	9.75
Aprotinina	6.511	12.43
Bacitracina	1.422	14.17
Muestra	--	14.14



Realizando un ajuste lineal se obtuvo una ecuación ( $r^2=0.9994$ ) para describir la dependencia del tamaño molecular con el tiempo de retención:

$$Y = -0.3608x + 14.719$$

$$P.M. = \frac{14.14 - 14.719}{-0.3608} = 1.604 \text{ kDa}$$

donde Y representa el tiempo de retención y x el tamaño molecular, con la que se determinó que A2-50-17sec con  $tr = 14.14$  tiene aproximadamente 1.6 kDa. Esta masa corresponde a 14-15 residuos de aminoácido, considerando 110 Da/residuo de aminoácido.

Adicionalmente, se decidió corroborar el resultado mediante SDS-PAGE pero empleando una técnica con tricina, especial para pesos moleculares bajos. El resultado se muestra en la Figura 5-13 donde se observa la presencia de la muestra (con la letra F) entre la aprotinina (6.5 kDa) y la bacitracina (1.4 kDa), como se esperaba.

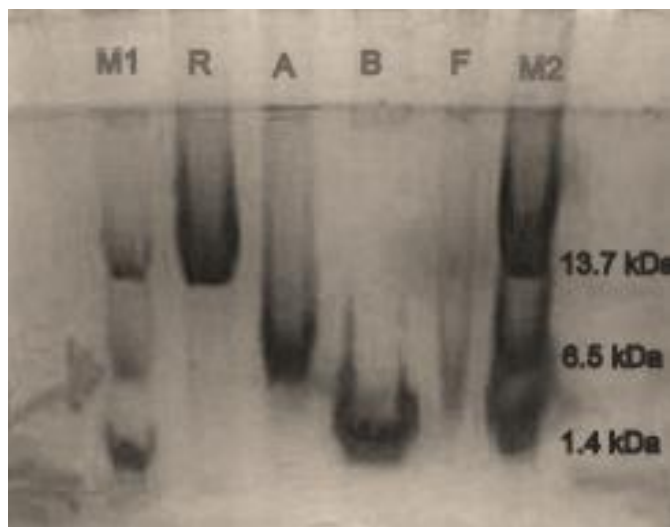


Figura 5-13 SDS-PAGE tricina de la fracción A1-50-1b. Tinción con azul de Coomassie. R: ribonucleasa; A: aproinina; B: bacitracina; M1: Mezcla de R, A y B; M2: Mezcla de R, A y B (concentración doble); F: muestra A1-50-1b. Elución en 2 horas (30 V los 20 mins. iniciales y 110 V al final) con 2 mg de muestra por pozo.

#### 5.4 Determinación de la naturaleza química del compuesto activo

La fracción A1-50-1b (correspondiente al pico de 13.80 min en intercambio catiónico) fue hidrolizada para efectuar un análisis en CLAR para determinar la presencia de aminoácidos.

Tras efectuarse la hidrólisis, se determinó la naturaleza peptídica con la presencia de 9 aminoácidos, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, arginina, alanina, prolina, valina, lisina, y leucina, cuya área de sus señales se encontraba dentro de las concentraciones de la curva estándar (12.5-400 pmoles/ $\mu$ L).

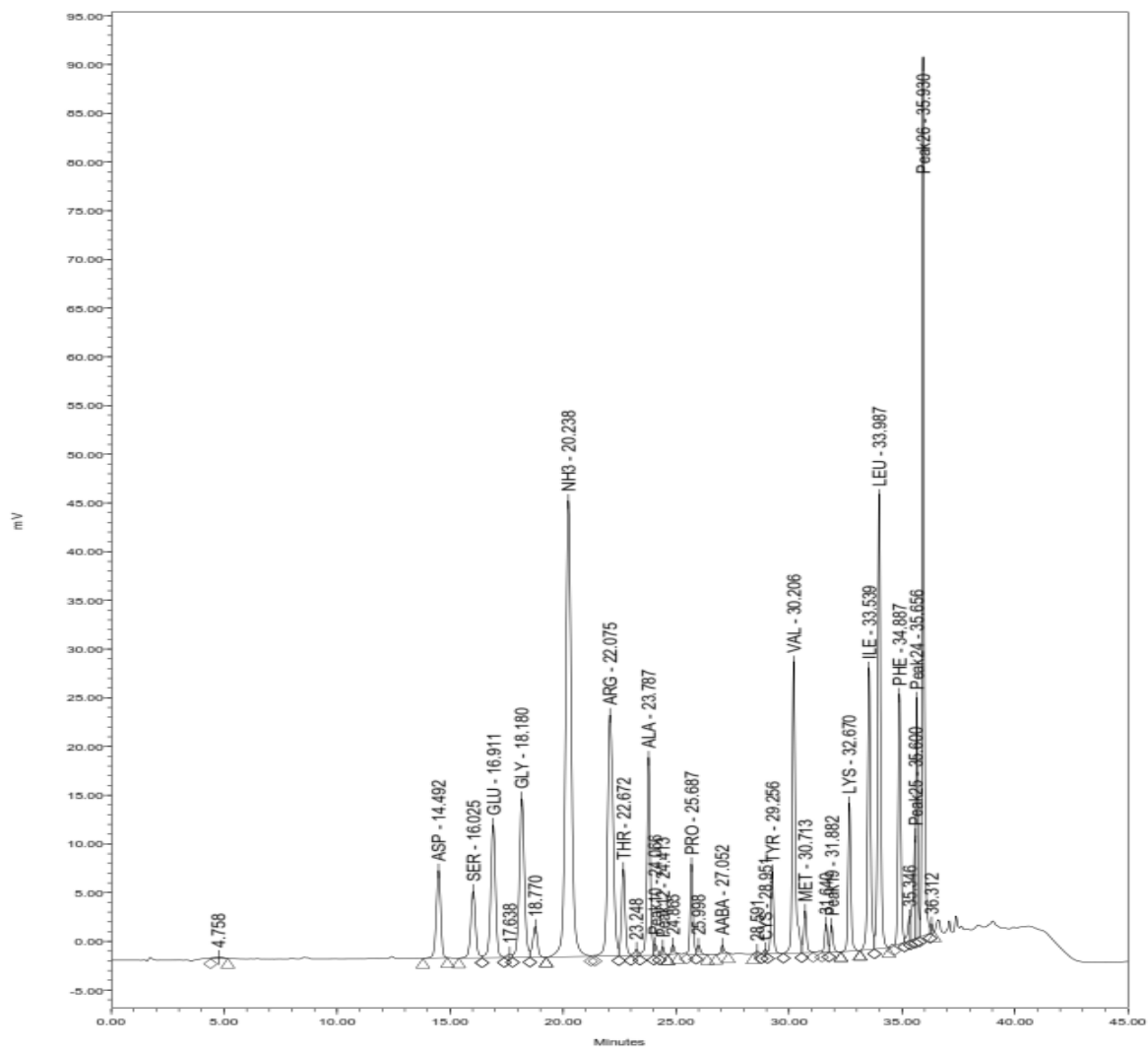


Figura 5-14 Perfil de aminoácidos de la fracción A1-50-1b. HPLC Waters 1525, detector de fluorescencia de onda múltiple Waters 2475, columna AccQ-TAG (3.9 x 150 mm, tamaño de partícula 4  $\mu$ m, Waters Inc. USA). Fase móvil A (eluyente A:agua, 1:10 v/v) y fase móvil B (acetonitrilo:agua, 60:40 v/v) con tiempo de análisis de 40 minutos, excitación 250 nm/emisión 395 nm.

## 6. CONCLUSIONES

Se colectó e identificó taxonómicamente a la anémona *Bunodosoma cavernata* en la zona costera de Yucatán.

La extracción del organismo completo en agua y metanol difieren en la presencia de proteínas en el primer caso, pero sus rendimientos son similares. La extracción de nematocistos conlleva menor rendimiento y mayor contaminación por tejidos.

Se demostró que las técnicas de separación con mejor rendimiento y actividad son las del organismo completo, si bien la extracción metanólica tiene la ventaja de eliminar las proteínas, y con ello, el efecto hemolítico y letal.

No se muestra actividad antiparasitaria en las fracciones con actividad en *A. salina*.

La actividad biológica letal de los extractos de la anémona *Bunodosoma cavernata* es debida a compuestos de alto peso molecular (>10 kDa) y se encuentra poco presente en los nematocistos, esto se corresponde con la actividad hemolítica.

La actividad biológica neurotóxica no letal de los extractos de la anémona *Budonosoma cavernata* es debida a compuestos entre 1 y 3 kDa, dentro de los cuales logró aislar una molécula peptídica de aproximadamente 1.6 kDa.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. González-Muñoz, R. Análisis taxonómico de las especies de anémonas arrecifales (Cnidaria: Anthozoa) del Golfo de México y mar Caribe mexicano. caracterización y análisis morfológico y genético de las variaciones intraespecíficas entre los morfotipos de la especie *Phymanthus crucifer* (Le Sueur, 1817). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 2014.
2. Savioli, L.; Smith, H.; Thompson, A., Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology* **2006**, *22* (5), 203-208.
3. Vila, J.; Álvarez-Martínez, M. J.; Buesa, J.; Castillo, J., *Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales*. **2013**; Vol. 31, p 406-411.
4. *Giardia a model organism*. Wien: Springer, 2011.
5. Al-kaissi, I. N., The effect of Aqueous some plants Extract on *Giardia lamblia* in vitro *Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences* **2010**, *3* (2), 48-58.
6. Calzada, F.; Yepez-Mulia, L.; Aguilar, A., In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* **2006**, *108* (3), 367-370.
7. Calzada, F.; Yépez-Mulia, L.; Tapia-Contreras, A., Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *113* (2), 248-251.
8. Bahar, A. A.; Ren, D., Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* **2013**, *6* (12), 1543-75.
9. Pretzel, J.; Mohring, F.; Rahlfs, S.; Becker, K., Antiparasitic peptides. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **2013**, *135*, 157-92.
10. Watts, K. R.; Tenney, K.; Crews, P., The structural diversity and promise of antiparasitic marine invertebrate-derived small molecules. *Current Opinion in Biotechnology* **2010**, *21* (6), 808-818.
11. Fattorusso, E.; Gerwick, W. H.; Tagliatela-Scafati, O. Handbook of marine natural products. <http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-3834-0>.
12. Blunden, G., Biologically active compounds from marine organisms. *Phytotherapy Research* **2001**, *15* (2), 89-94.

13. Stewart, B. W.; Wild, C. P. World cancer report 2014. <http://alltitles.ebrary.com/Doc?id=11014806>.
14. Oh, J. K.; Weiderpass, E., Infection and cancer: global distribution and burden of diseases. *Annals of Global Health* **2014**, *80* (5).
15. Anderluh, G.; Maček, P., Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* **2002**, *40* (2), 111-124.
16. Tejuca, M.; Anderluh, G.; Macek, P.; Marcet, R.; Torres, D.; Sarracent, J.; Alvarez, C.; Lanio, M. E.; Dalla Serra, M.; Menestrina, G., Antiparasite activity of sea-anemone cytolytins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-Giardia antibodies. *International journal for parasitology* **1999**, *29* (3), 489-98.
17. Thangaraj, S.; Bragadeeswaran, S.; Suganthi, K.; Kumaran, N. S., Antimicrobial properties of sea anemone *Stichodactyla mertensii* and *Stichodactyla gigantea* from Mandapam coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2011**, *1* (1, Supplement), S43-S46.
18. Olaya Flórez, J. M., *Guía de plantas y productos medicinales*. Convenio Andrés Bello: Bogotá, 2003.
19. Beutler, J. A., Natural products as a foundation for drug discovery. In *Current protocols in pharmacology*, 2009.
20. Cragg, G. M.; Newman, D. J., Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, *100* (1-2), 72-9.
21. Moertel, C. G.; Schutt, A. J.; Reitemeier, R. J.; Hahn, R. G., Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. *Cancer Chemotherapy Reports* **1972**, *56* (1), 95-101.
22. Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T., Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93* (9), 2325-7.
23. Cassady, J. M.; Chan, K. K.; Floss, H. G.; Leistner, E., Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **2004**, *52* (1), 1-26.
24. Meijer, L.; Skaltsounis, A. L.; Magiatis, P.; Polychronopoulos, P.; Knockaert, M.; Leost, M.; Ryan, X. P.; Vonica, C. A.; Brivanlou, A.; Dajani, R.;

Crovace, C.; Tarricone, C.; Musacchio, A.; Roe, S. M.; Pearl, L.; Greengard, P., GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chemistry & biology* **2003**, *10* (12), 1255-66.

25. McMahon, J. B.; Currens, M. J.; Gulakowski, R. J.; Buckheit, R. W., Jr.; Lackman-Smith, C.; Hallock, Y. F.; Boyd, M. R., Michellamine B, a novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus-induced cell killing by at least two distinct mechanisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1995**, *39* (2), 484-8.

26. Lee, K. H., Discovery and Development of Natural Product-derived Chemotherapeutic Agents Based on a Medicinal Chemistry Approach. *Journal of Natural Products*. **2010**, *73* (3), 500-516.

27. Heywood, V. H., *Global biodiversity assessment*. Cambridge University Press: Cambridge; New York, NY, USA, 1995.

28. Iler, W. E. G.; Batel, R.; Schroder, H. C.; Muller, I. M., Traditional and Modern Biomedical Prospecting: Part I, the History. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2004**, *1* (1), 71-82.

29. Haefner, B., Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today* **2003**, *8* (12), 536-544.

30. Houssen, W. E.; Jaspars, M., Isolation of marine natural products. *Methods in Molecular Biology* **2012**, *864*, 367-92.

31. McPhail, K. L.; Correa, J.; Linington, R. G.; Gonzalez, J.; Ortega-Barria, E.; Capson, T. L.; Gerwick, W. H., Antimalarial linear lipopeptides from a Panamanian strain of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products* **2007**, *70* (6), 984-8.

32. Eash-Loucks, W. E.; Fautin, D. G., *Taxonomy and distribution of sea anemones (Cnidaria : Actiniaria and Corallimorpharia) from deep water of the northeastern Pacific*. Magnolia Press: Auckland, 2012.

33. Mebs, D., Chemical biology of the mutualistic relationships of sea anemones with fish and crustaceans. *Toxicon* **2009**, *54* (8), 1071-4.

34. Fautin, D. G., *The clownfish sea anemones : Stichodactylidae (Coelenterata/ Actiniaria) and other sea anemones symbiotic with Pomacentrid fishes*. American Philosophical Society: Philadelphia, 1981.

35. Briones-Fourzan, P.; Negrete-Soto, F.; Barradas-Ortiz, C.; Lozano-Alvarez, E.; Perez-Ortiz, M., Ecological traits of Caribbean sea anemones and symbiotic crustaceans. *Marine Ecology Progress Series* **2012**, *470*, 55-68.
36. Muller-Parker, G.; Cook, C. B.; D'Elia, C. F., Feeding affects phosphate fluxes in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pallida*. *Marine Ecology Progress Series* **1990**, *60*, 283-290.
37. Brusca, R. C.; Brusca, G. J., *Invertebrates*. Sinauer: Sunderland (Mass.), 2002.
38. Springer, J.; Holley, D., *An introduction to zoology : investigating the animal world*. Jones & Bartlett Learning: Boston, 2013.
39. Watson, G. M.; Mire-Thibodeaux, P., The Cell Biology of Nematocysts. In *International Review of Cytology*, Kwang, W. J.; Jonathan, J., Eds. Academic Press: 1994; Vol. Volume 156, pp 275-300.
40. Sánchez-Rodríguez, J., Isolation and prepurification of active compounds in venom from *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa: Pelagiidae) from the Caribbean Sea. *Ciencias Marinas* **2011**, *37* (3), 369-377.
41. Özbek, S.; Balasubramanian, P. G.; Holstein, T. W., Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon* **2009**, *54* (8), 1038-1045.
42. Norton, R. S., Structures of sea anemone toxins. *Toxicon* **2009**, *54* (8), 1075-88.
43. Kastin, A. J., *Handbook of biologically active peptides*. Academic Press: Amsterdam; Boston, 2006.
44. Ravindran V. S.; Kennan L.; Venkateshvaran, K., Biological activity of sea anemone proteins: II. Cytolysis and cell line toxicity. *Indian journal of experimental biology* **2010**, *48* (12), 1233-6.
45. Shick, J. M., *A functional biology of sea anemones*. Chapman & Hall: London; New York, 1991.
46. Williamson, J. A.; Fenner, P. J.; Burnett, J. W., *Venomous and poisonous marine animals : a medical and biological handbook*. University of New South Wales Press ; Surf Life Saving Queensland: Sydney, Australia; Fortitude Valley, Qld., Australia, 1996.

47. Soletti, R. C.; de Faria, G. P.; Vernal, J.; Terenzi, H.; Anderluh, G.; Borges, H. L.; Moura-Neto, V.; Gabilan, N. H., Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. *Anti-cancer drugs* **2008**, *19* (5), 517-25.
48. Mizuno, M.; Ito, Y.; Morgan, B. P., Exploiting the Nephrotoxic Effects of Venom from the Sea Anemone, *Phyllodiscus semoni*, to Create a Hemolytic Uremic Syndrome Model in the Rat. *Marine drugs* **2012**, *10* (7), 1582-1604.
49. Zykova, T. A.; Monastyrnaia, M. M.; Apalikova, O. V.; Shvets, T. V.; Kozlovskaiia, E. P., Low-molecular cytolysins and trypsin inhibitors from sea anemone *Radianthus macrodactylus*. Isolation and partial characterization]. *Bioorganic Chemistry* **1998**, *24* (7), 509-16.
50. Grotendorst, G. R.; Hessinger, D. A., Purification and partial characterization of the phospholipase A2 and co-lytic factor from sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon* **1999**, *37* (12), 1779-1796.
51. Bernheimer, A. W.; Avigad, L. S., A cholesterol-inhibitable cytolytic from the sea anemone *Metridium senile*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1978**, *541* (1), 96-106.
52. Aneiros, A.; Garateix, A., Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical Life Sciences* **2004**, *803* (1), 41-53.
53. Diochot, S.; Lazdunski, M., Sea Anemone Toxins Affecting Potassium Channels. **2009**, *46*, 99-122.
54. Sangappellai, T.; Subramanian, B., Assessment of biomedical and pharmacological activities of sea anemones *Stichodactyla mertensii* and *Stichodactyla gigantea* from Gulf of Mannar Biosphere Reserve, southeast coast of India. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* **2012**, *18* (1), 53-61.
55. Subramanian, B.; Sangappellai, T.; Rajak, R. C., Pharmacological and biomedical properties of sea anemones *Paracondactylis indicus*, *Paracondactylis sinensis*, *Heteractis magnifica* and *Stichodactyla haddoni* from East coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2011**, *4* (9), 722-726.

56. Bosmans, F.; Tytgat, J., Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na(+) channels. *Toxicon* **2007**, *49* (4), 550-560.
57. Šuput, D., In vivo effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon* **2009**, *54* (8), 1190-1200.
58. Chi, V.; Pennington, M. W.; Norton, R. S.; Tarcha, E. J.; Londono, L. M.; Sims-Fahey, B.; Upadhyay, S. K.; Lakey, J. T.; Iadonato, S.; Wulff, H.; Beeton, C.; Chandy, K. G., Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon* **2012**, *59* (4), 529-46.
59. Zaharenko, A. J.; Picolo, G.; Ferreira, W. A., Jr.; Murakami, T.; Kazuma, K.; Hashimoto, M.; Cury, Y.; de Freitas, J. C.; Satake, M.; Konno, K., Bunodosine 391: an analgesic acylamino acid from the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Journal of Natural Products* **2011**, *74* (3), 378-82.
60. Zaharenko, A. J.; Ferreira, W. A., Jr.; Oliveira, J. S.; Richardson, M.; Pimenta, D. C.; Konno, K.; Portaro, F. C.; de Freitas, J. C., Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics Proteomics* **2008**, *3* (3), 219-25.
61. Malpezzi, E. L.; de Freitas, J. C.; Muramoto, K.; Kamiya, H., Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* **1993**, *31* (7), 853-64.
62. Zaharenko, A. J.; Ferreira, W. A., Jr.; de Oliveira, J. S.; Konno, K.; Richardson, M.; Schiavon, E.; Wanke, E.; de Freitas, J. C., Revisiting cangitoxin, a sea anemone peptide: purification and characterization of cangitoxins II and III from the venom of *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon* **2008**, *51* (7), 1303-7.
63. Goudet, C.; Ferrer, T.; Galan, L.; Artiles, A.; Batista, C. F.; Possani, L. D.; Alvarez, J.; Aneiros, A.; Tytgat, J., Characterization of two *Bunodosoma granulifera* toxins active on cardiac sodium channels. *British journal of pharmacology* **2001**, *134* (6), 1195-206.
64. Orts, D. J.; Peigneur, S.; Madio, B.; Cassoli, J. S.; Montandon, G. G.; Pimenta, A. M.; Bicudo, J. E.; Freitas, J. C.; Zaharenko, A. J.; Tytgat, J., Biochemical and electrophysiological characterization of two sea anemone type 1

potassium toxins from a geographically distant population of *Bunodosoma caissarum*. *Marine drugs* **2013**, *11* (3), 655-79.

65. Aneiros, A.; Garcia, I.; Martinez, J. R.; Harvey, A. L.; Anderson, A. J.; Marshall, D. L.; Engstrom, A.; Hellman, U.; Karlsson, E., A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1993**, *1157*(1), 86-92.

66. Daly M, B. M.; Cartwright P; Collins AG; Dawson MN; Fautin DG; France SC; Mcfadden CS; Opresko DM; Rodriguez E; Romano SL; JL, S., The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* **2007**, *1668*, 127-182.

67. Turk, T.; Kem, W. R., The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon* **2009**, *54* (8), 1031-1037.

68. Fautin, D. G., Importance of nematocysts to actinian taxonomy. In *The Biology of Nematocysts*, Lenhoff, H., Ed. 1988; pp 487-500.

69. Schmidt, H., Die Nesselkapseln der Anthozoen und ihre Bedeutung für die phylogenetische Systematik. *Helgolander Wiss. Meeresunters Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* **1972**, *23* (4), 422-458.

70. Daly, M.; Gusmão, L. C.; Reft, A. J.; Rodríguez, E., Phylogenetic signal in mitochondrial and nuclear markers in sea anemones (Cnidaria, Actiniaria). *Integrative and Comparative Biology* **2010**, *50* (3), 371-88.

71. Fautin, D. G.; Malarky, L.; Soberón, J., Latitudinal diversity of sea anemones (Cnidaria: Actiniaria). *The Biological Bulletin* **2013**, *224* (2), 89-98.

72. González-Muñoz, R.; Simoes, N.; Sánchez-Rodríguez, J.; Rodríguez, E.; Segura-Puertas, L., First Inventory of Sea Anemones (Cnidaria: Actiniaria) of the Mexican Caribbean. *Zootaxa* **2012**, (3556), 1-38.

73. Frazão, B.; Vasconcelos, V.; Antunes, A., Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Marine drugs* **2012**, *10* (8), 1812-1851.

74. Rostagno, M. A.; Prado, J. M., Extraction of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects. In *Natural product extraction principles and applications*, Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2013; pp 58-88.

75. Yoshikawa, H.; Hirano, A.; Arakawa, T.; Shiraki, K., Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. *International journal of biological macromolecules* **2012**, *50* (3), 865-71.
76. Kem, W. R.; Parten, B.; Pennington, M. W.; Price, D. A.; Dunn, B. M., Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* **1989**, *28* (8), 3483-3489.
77. Sánchez-Rodríguez, J.; Cruz-Vázquez, K., Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860). *Archives of Toxicology* **2006**, *80* (7), 436-441.
78. Pech Puch, D. J. Obtención de compuestos bioactivos presentes en las glándulas salivales posteriores del pulpo octopus maya. Universidad Nacional Autónoma de México, Yucatán, México, 2014.
79. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L., Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica* **1982**, *45* (05), 31-34.
80. Colegate, S. M.; Molyneux, R. J., *Bioactive natural products : detection, isolation, and structural determination*. CRC Press: Boca Raton, 1993.
81. Davoren, M.; Fogarty, A. M., A test battery for the ecotoxicological evaluation of the agri-chemical Environ. *Ecotoxicology and environmental safety* **2004**, *59* (1), 116-22.
82. Nagel, R., DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*-a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* **2002**, *19 Suppl 1*, 38-48.
83. Torres, M.; Aguilar, M. B.; Falcon, A.; Sánchez, L.; Radwan, F. F.; Burnett, J. W.; Heimer-de la Cotera, E. P.; Arellano, R. O., Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon* **2001**, *39* (9), 1297-307.
84. Acosta Ruíz, M. M. Estudio químico y biológico preliminar de tres especies de pepino de mar de la familia Holothuriidae de las costas de Tucatán como fuente potencial de compuestos antiparasitarios. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 2011.



85. Hill, D. R.; Pohl, R.; Pearson, R. D., *Giardia lamblia*: a culture method for determining parasite viability. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **1986**, *35* (6), 1129-33.
86. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O., In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology* **1992**, *37* (3), 221-224.
87. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680-5.
88. Fernández-Patrón, C.; Castellanos-Serra, L.; Rodríguez, P., Reverse staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts: sensitive detection of unmodified proteins. *BioTechniques* **1992**, *12* (4), 564-73.
89. Schagger, H., Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* **2006**, *1* (1), 16-22.
90. Schagger, H.; von Jagow, G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* **1987**, *166* (2), 368-79.
91. MacRae, C. A.; Peterson, R. T., Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**, *14* (10), 721-31.