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

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA UNAM EN YUCATÁN
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM-SISAL, YUCATÁN
(QUÍMICA ACUÁTICA)

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS RESPONSABLES DEL EFECTO PARALIZANTE PRESENTES EN LAS GLÁNDULAS SALIVALES POSTERIORES DEL PULPO ROJO *OCTOPUS MAYA*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARICARMEN CORONA VÁZQUEZ

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES
DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES
UNIDAD DE QUÍMICA EN SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTORAL
DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ
UAY-SISAL, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LÍMNOLOGÍA, UNAM

SISAL, YUCATÁN - SEPTIEMBRE 2016

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS RESPONSABLES DEL EFECTO PARALIZANTE PRESENTES EN LAS GLÁNDULAS SALIVALES POSTERIORES DEL PULPO ROJO *OCTOPUS MAYA*

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

Maestra en Ciencias
(Química Acuática))

P r e s e n t a

MARICARMEN CORONA VÁZQUEZ

Director de Tesis: DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

Comité Tutoral: DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ
DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

Unidad Académica Sisal, Yucatán 2016

A María y Raúl…

“Usted no sabe cómo yo valoro su
sencillo coraje de quererme”

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto PAPITT TA200314-2 “Aislamiento de neuropéptidos presentes en la saliva del pulpo rojo de Yucatán (*Octopus maya*) y su evaluación como posible fármaco en el mal de Alzheimer”.

Al Proyecto No. **107350** Fondo Mixto CONACyT- Gobierno del Estado de Yucatán: “Obtención de Productos naturales de origen marino de la saliva del pulpo rojo (*Octopus maya*) como antiespasmódicos”.

Al posgrado de Ciencias del Mar y Limnologia y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada que permitió realizar mis estudios y concluir la maestría.

Al Dr. Sergio Rodríguez Morales por permitirme formar parte del proyecto, por sus conocimientos y el tiempo dedicado.

Al comité tutoral: Dr. Manuel Aguilar Ramírez, Dra. Judith Sánchez Rodríguez, Dr. Carlos Rosas Vázquez y Dr. Roberto Arreguín Espinoza de los Monteros, por sus aportaciones y sugerencias a este trabajo.

Al Dr. Alejandro Yam, por su dedicación, su entusiasmo, su apoyo, su amistad y sus ganas de transmitir sus conocimientos y pasión por la Química.

A Enrique, Ada y Edén por los consejos, la ayuda brindada en el laboratorio y todos los momentos agradables durante la estancia.

A mis amigos: Paulina, Perla, Omar, Ron, Henry, Arturo, Alejandro, Roberto, Ainhoa, Carlos, Tona, Fernando, Janet, Rodrigo, Diego, César, Rosa, Jeanin, me alegra haber coincidido en este camino.

A todas las personas de Sisal que me ofrecieron su hogar, sus historias y su amistad. Me quedo con todos los buenos recuerdos.

C O N T E N I D O

R E S U M E N 13

1 INTRODUCCIÓN 14

2 ANTECEDENTES 16

2.1 Estudio de productos naturales para el descubrimiento de nuevos fármacos..... 16

2.1.2 Ventajas del estudio de Productos Naturales de Origen Marino (PNM)…….....20

2.1.3 Principales compuestos activos aislados de organismos marinos…… 22

2.2 Cefalópodos como fuentes de productos naturales 25

2.2.1 Características generales de cefalópodos y su clasificación 25

2.2.2 Mecanismo de alimentación y defensa de cefalópodos..... 27

2.2.3 Aislamiento de compuestos con actividad biológica de saliva de Cefalópodos …… 27

2.3 O*ctopus maya* 28

2.3.1 Descripción de la especie 35

2.3.2 Importancia de *Octopus maya* 37

2.3.3 Moléculas bioactivas aisladas de las glándulas salivales posteriores (GSP) de *Octopus maya*..... 39

3 **JUSTIFICACIÓN…… 42**

4 HIPÓTESIS..... 43

5 OBJETIVOS 43

5.1 Objetivo general 43

5.2 Objetivos específicos 43

6 METODOLOGÍA..... 44

6.1 Materiales..... 44

6.2 Instrumentación..... 44

6.2.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) 44

6.2.2 Métodos Espectrométricos. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas(CG-EM) 45

6.2.3 Métodos espectroscópicos. Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Carbono (^{1}H y ^{13}C)

…….…… 46

6.3 Bioensayo 46

6.3.1 Bioensayo sobre cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*) para evaluar el efecto neurotóxico. 46

6.4 Obtención de muestras 47

6.5 Manejo de muestras..... 47

6.6 Obtención del extracto crudo 48

6.6.1 Extracción con Agua..... 48

6.6.2 Extracción en Metanol acidificado 49

6.7 Obtención de la fracción neurotóxica empleando el método de ultrafiltración..... 50

6.8 Separación de la fracción menor a 3 kDa mediante cartuchos de extracción en fase sólida (EFS) C-18 fase reversa. 51

6.9 Separación de la fracción FN_3 (90:10). 52

6.9.1 Análisis por CLAR fase reversa de la fracción FN_3 obtenida por EFS cartucho C18-U……. 52

6.9.2 Separación en cartucho de intercambio catiónico fuerte de la fracción $FN_{3.}$ 522

6.9.3 Análisis por CLAR fase reversa de la fracción FN_{3-5} (2% NH_4OH en MeOH) obtenidas por EFS e intercambio catiónico fuerte. 53

6.9.4 Análisis mediante CLAR por intercambio catiónico de la fracción FN_{3-5} (2% NH_4OH en MeOH) obtenida por CLAR semipreparativo fase reversa. 53

6.9.5 Aislamiento e identificación por RMN de la fracción $FN_{3-5.}$ 53

6.9.6 Determinación de PM de la fracción FN_{3-5} mediante técnicas espectrométricas (CG-EM)..... 54

6.9.7 Esquema de la separación biodirigida realizada al extracto obtenido a partir de las GSP de *Octopus maya.* Aislamiento de la fracción FN_{3-5}..... 55

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS 56

7.1 Obtención del extracto crudo a partir de las GSP de *Octopus maya* 56

7.2 Bioensayo sobre *Ocypode quadrata* para evaluar la actividad del extracto crudo a partir de las GSP de *Octopus maya* y las fracciones obtenidas a partir de él..... 59

7.4 Separación biodirigida del extracto neurotóxica mediante cartuchos de extracción en fase sólida (EFS) C-18 fase reversa. 62

7.5 Análisis mediante CLAR en fase reversa de la fracción FN_3 (90:10) y la fracción FN_2 (95:15)..... 63

7.6 Fracción FN_3 (90:10)..... 65

7.6.1 Separación en cartucho de intercambio catiónico fuerte de la fracción FN_3 (90:10)..... 65

7.6.2 Estudios de espectroscopía de RMN realizados a la Fracción FN_{3-5}..... 68

7.6.3 Estudios espectrométricos (CG-EM) realizados a la Fracción FN_{3-5} 73

8 CONCLUSIONES..... 81

9 BIBLIOGRAFÍA..... 82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxol – *Taxus brevifolia*…… 16
Figura 2. Medicamentos desarrollados o derivados de PNs…… 18
Figura 3*. a.* Ziconotide obtenido de *Conus magus. b.* Yondelis aislado de *Ecteinascidia turbinata*…….. 21
Figura 4. Países con mayor número de publicaciones sobre PNM…… 23
Figura 5*.* Venenos y toxinas de organismos marinos como fuente de péptidos con actividad biológica (caracol y anémona de mar)……. 24
Figura 6*.* Cefalópodos…… 26
Figura 7. Estructura interna de los octópodos…… 28
Figura 8 Estructura química de la tetrodotoxina…… 30
Figura 9*.* Aminas aisladas de las GSP de cefalópodos…… 31
Figura 10*.* Péptidos de la familia de taquicininas aislados de las GSP de Octópodos… 32
Figura 11. Similitud de secuencia entre taquicininas y la secuencia de la proteína Aβ (25-35)…… 33
Figura 12*. Octopus maya*……... 36
Figura 13*.* Distribución de *Octopus maya*……... 37
Figura 14*.* Porcentaje de captura de pulpo a nivel nacional……. 38
Figura 15*.* Arte de pesca jimba-gareteo…….. 40
Figura 17*.* Fracción causante del relajamiento-descoordinación-parálisis obtenida del extracto neurotóxico de las GSP de *Octopus maya*……... 41
Figura 18. *Ocypode quadrata*…… 47
Figura 19. Captura de pulpo en la zona de pesca correspondiente a la cooperativa “Tigres del Mar”…….. 48
Figura 20. Esquema de las tres diferentes metodologías empleadas para la extracción de péptidos…….. 49
Figura 21. Esquema de separación de $FN_{3\text{-}5}$..... 55
Figura 22*.* Evaluación del extracto crudo en el bioensayo neurotóxico sobre *O. quadrata* ……..... 60

Figura 23. Cromatograma de la fracción neurotóxica obtenida de la extracción con agua y analizada mediante CLAR en fase reversa (Pág. 42)…… .61

Figura 24.Cromatograma de las fracciones a. 95:5 y b. 90:10 (H_2O:AcCN) analizadas mediante CLAR en fase reversa…….. 64

Figura 25. Cromatogramas de las fracciones a. FN_{3-4} y b. FN_{3-5} analizadas mediante CLAR en fase reversa……... 67

Figura 26. Fracción FN_{3-5} analizada mediante RMN (^{13}C)

…… 69

Figura 27. Fracción FN_{3-5} *(*^{1}H RMN). Espectro parcial…….. 70

Figura 28. Fracción FN_{3-5} (^{1}H RMN). Espectro parcial…….. 71

Figura 29. Experimento HSQC FN_{3-5}…….. 72

Figura 30 Análisis del experimento HMBC. Conformación de la estructura de serotonina. Correlaciones entre protones y carbonos ubicados a dos (*^{2}J-Azul*) y tres (*^{3}J-Rojo*) enlaces de distancia……. 73

Figura 31. Cromatografía de la fracción FN_{3-5} analizada mediante CG-EM…… 74

Figura 32. Espectro de masas de la fracción FN_{3-5} analizada mediante CG-EM…….. 74

Figura 33. Espectro de masas correspondiente a estándar de serotonina……..75

Figura 34. Estándar de serotonina analizado por CLAR fase reversa……. 76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de *Octopus maya*. 35
Tabla 2. EFS C18-U Fase reversa elución..... 51
Tabla 3. Elución por intercambio catiónico fuerte 52
Tabla 4. Extracción con H_2O de las GSP de *Octopus maya*..... 57
Tabla 5. Extracción con metanol acidificado de las GSP de *Octopus maya*…… 58
Tabla 6. EFS C18 Fase reversa elución.). 63
Tabla 7. SCX Extracción fase sólida de intercambio catiónico fuerte.. 66

G L O S A R I O D E A B R E V I A T U R A S

- **GSP** - Glándulas Salivales Posteriores
- **FDA –** Food and Drug Administration
- **PNs -** Productos Naturales
- **PNM -** Productos Naturales Marinos
- **MOs -** Microorganismos
- **SPE/EFS** - Extracción en fase sólida
- **SCX** – Intercambio catiónico fuerte
- **RA** – Reactivo analítico.
- **MeOH** - Metanol
- **AcCN** - Acetonitrilo
- **AcOH** - Ácido acético
- **CLAR**–Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
- **g** - Gramos
- **p/v** - Peso/volumen
- **v/v** – Volumen/volumen
- **µg** - Microgramos
- **ml** - Mililitro
- **m** - Metro
- **µl**- Microlitros
- **uma-** Unidades de masa atómica
- **NOM** – Norma Oficial Mexicana
- **^{o}C**– Grados Centígrados
- **mbar** – Milibar
- **rpm** – Revoluciones por minuto
- **M** – Molar
- **mM**- Milimolar
- **mm** – Milímetro
- **CL-EM** – Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas

- **ELSD** – Detector de Difracción de Luz en Evaporación
- **kDa**– KiloDaltones
- **TFA** – Ácido trifluoroacético
- **Tr** – Tiempo de retención
- **5-HT-** Serotonina, 5-hidroxitriptamina
- **IP_3**- Inositol trifosfato
- **CG-EM** - Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
- **EM** – Espectrometría de masas
- **RMN** – Resonancia Magnética Nuclear
- **TMS** - Tetrametisilano

R E S U M E N

Los cefalópodos cuentan con un par de Glándulas Salivales Posteriores (GSP) productoras de saliva, la cual al ser inyectada en sus presas ocasiona problemas de locomoción, temblores, inmovilidad y la posterior muerte. El estudio de las GSP de distintas especies de cefalópodos ha llevado al aislamiento de enzimas, toxinas, aminas biogénicas y péptidos, algunos de importancia farmacológica.

En el presente proyecto de tesis se realizó la separación biodirigida de las GSP de *Octopus maya*, especie endémica de Yucatán, en busca de moléculas bioactivas. Para ello, se llevó a cabo la extracción acuosa de las GSP; luego el extracto crudo fue separado por tamaño molecular mediante ultrafiltración, con membranas con un tamaño de corte de 3 kDa. Se obtuvieron dos fracciones, las cuales al ser evaluadas en el modelo neurotóxico sobre el cangrejo *Ocypode quadrata* demostraron dos efectos: parálisis y la muerte posterior, identificada como metabólica (≥ 3 kDa); y descoordinación y parálisis, llamada neurotóxica (≤ 3 kDa). La fracción neurotóxica se separó mediante extracción de fase sólida en fase reversa empleando un gradiente de Agua:Acetonitrilo, resultando activas las fracciones 95.5 (FN_2) y 90:10 (FN_3). FN_3 se sometió a separación con EFS de intercambio catiónico; la elución de la fracción con 2% de NH_4OH en metanol llevó a la fracción activa $FN_{3\text{-}5}$, con una potente actividad sobre el cangrejo. La fracción $FN_{3\text{-}5}$ fue separada mediante Cromatografía de Líquidos de alta resolución semipreparativa, colectando el pico principal, el cual indujo la neurotoxicidad en el cangrejo en 10 s. Mediante RMN y CG-EM, $FN_{3\text{-}5}$ fue identificada como Serotonina, lo cual fue corroborado mediante la inyección de un estándar de Serotonina, cuyo tiempo de retención (16 min) fue indistinguible del de la fracción activa.

1 INTRODUCCIÓN

Los organismos marinos son una fuente inagotable de estructuras químicas con propiedades biológicas interesantes; estos organismos se desenvuelven en condiciones hostiles que les obliga a contar con mecanismos de supervivencia únicos, entre ellos, la síntesis de moléculas que no tienen semejanza con las terrestres, las cuales son herramientas de investigación y fuente de nuevos fármacos potenciales [1].

A pesar de que la diversidad marina excede la terrestre (representa el 15% de la biodiversidad mundial – 1,868,000 especies) y de que su potencial farmacológico es bien conocido desde la antigüedad, menos del 1% de las especies marinas han sido investigadas con este propósito, lo cual ofrece una área muy amplia para la exploración de estos recursos [2]. Más aún, ocho de los filos animales más importantes, se encuentran en el medio marino: los cnidarios, nematodos, anélidos, poríferos, moluscos, equinodermos, artrópodos y cordados [3]. En el grupo de los moluscos, se encuentran los cefalópodos, de gran interés científico como modelos en la parte congnitiva, y en últimas fechas, como fuente de moléculas bioactivas [4].

Los cefalópodos pertenecen a las estructuras tróficas de los océanos, formando parte importante en ellas al ser depredadores activos. Todos los cefalópodos son carnívoros siendo sus presas los crustáceos, bivalvos, gasterópodos y peces [5]. Para sujetar a su presa hacen uso de sus tentáculos los cuales cuentan con filas de ventosas que les facilitan la captura. Junto a la base de los brazos se encuentra el aparato mandibular, mejor conocido como pico de loro; la cavidad bucal presenta un órgano de alimentación único entre los moluscos, la rádula, que está recubierta de dentículos quitinosos curvos. La rádula cuenta con músculos que le permiten proyectarse fuera de la boca y en conjunto con el pico, logran perforar la estructura de sus presas por donde inyectan la saliva que se encuentra en las glándulas salivales posteriores (GSP) [6, 7].

La saliva de los cefalópodos tiene una doble función: logra una digestión externa parcial de la carne de los crustáceos en el interior del exoesqueleto antes de la ingestión, y presenta un efecto neurotóxico que paraliza a su presa evitando que escape [8]. Se ha observado que la secreción de las GSP es una mezcla de varias sustancias biológicamente activas, entre las cuales figuran aminas, enzimas y polipéptidos no enzimáticos, la composición química de los venenos no es idéntica entre una especie y otra, sin embargo presentan las mismas propiedades contra los crustáceos [9].

El pulpo rojo *Octopus maya* es una especie que habita exclusivamente en la Península de Yucatán, principalmente en áreas costeras de baja profundidad [10, 11]. Esta especie fue descrita por primera vez en 1966 por Voss y Solís-Ramírez [12]. En México la pesca de *Octopus maya* es de las más importantes en términos económicos [13].

Recientemente se estudió el extracto crudo de las glándulas salivales de *Octopus maya* del cual se separó la fracción metabólica/digestiva de la fracción neurotóxica. Los estudios se han concentrado en esta última fracción capaz de ocasionar el efecto relajante-paralizante en crustáceos sin ocasionar la muerte. En estudios previos, a partir de la fracción neurotóxica se aislaron dos fracciones, una de ellas ocasiona únicamente el efecto paralizante [14] y la otra ocasiona un efecto relajante-descoordinado- y parálisis [15]. Se han hecho algunos estudios de secuenciación y elucidación molecular a estas fracciones, sin embargo, las estructuras y propiedades biológicas de las moléculas causantes de la actividad aún no se han esclarecido.

Las GSP contienen una variedad de moléculas que podrían ser de interés farmacológico, por lo anterior, el objetivo del presente trabajo de tesis fue aislar todas las fracciones bioactivas que puedan ser extraídas con el fin de conocer su estructura y su potencial como posible terapia farmacéutica; con esto, el estudio aportara conocimientos para el mayor entendimiento ecológico de los venenos de octópodos y los sistemas asociados a ellos.

2 ANTECEDENTES

2.1 Estudio de productos naturales para el descubrimiento de nuevos fármacos

Los productos naturales (PNs) son definidos como compuestos químicos de bajo peso molecular (generalmente de 1,500 uma) sintetizados por los organismos [16].

Los PNs suelen ser metabolitos secundarios que se producen como mecanismos de defensa frente a los depredadores o como medios para capturar a sus presas y han sido el origen de muchos fármacos. Por ejemplo, el Paclitaxel (conocido comercialmente como Taxol) fue extraído de la corteza del tejo del Pacifico *Taxus brevifolia* y aprobado por la FDA en 1992 para tratar el cáncer avanzado de ovario y posteriormente tumores de mama (**Fig. 1**) [16].

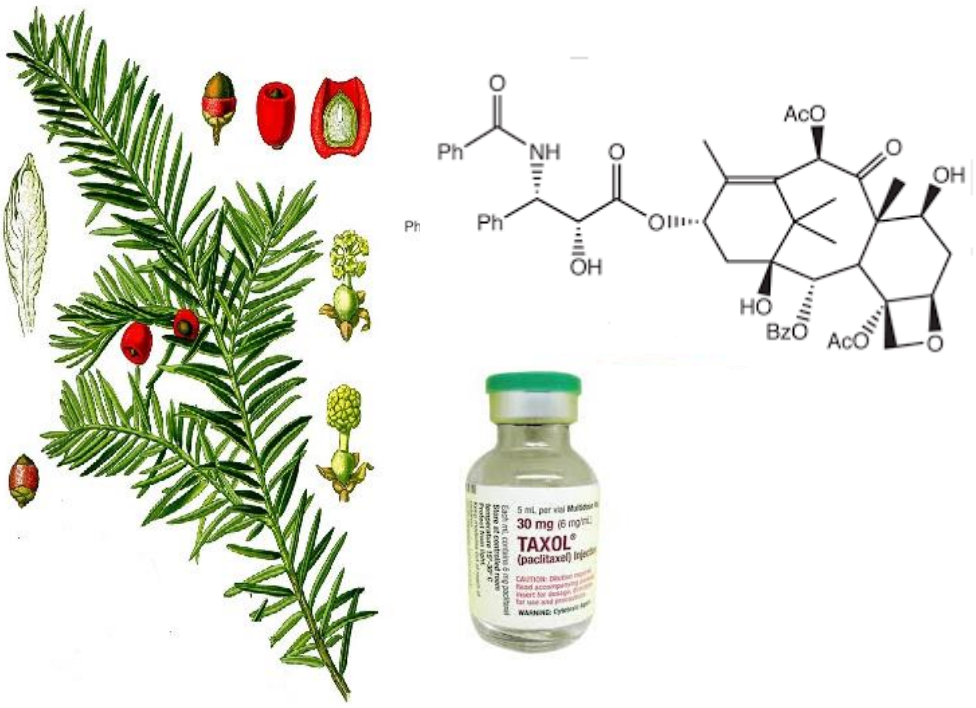


Figura 1. Taxol – *Taxus brevifolia*

Los PNs han sido reconocidos desde la antigüedad como fuentes de moléculas líderes para el desarrollo de nuevos fármacos; estas moléculas cuentan con características muy particulares entre las cuales puede destacarse las siguientes [17]:

- Poseen los requerimientos adecuados de efectividad y selectividad y cuentan con las propiedades farmacocinéticas para originar un agente terapéutico útil clínicamente.
- Presentan una mayor diversidad estructural y actividad biológica necesaria para conseguir una quimioteca de calidad.
- Propiedades biológicas confirmadas (altamente evolucionadas).
- Actúan sobre receptores, lo cual les da una alta especificidad.
- Tienen una gran variedad de dianas terapéuticas.
- En muchas ocasiones deben ser optimizados a partir de sus estructuras, siempre y cuando tengan un acceso sintético factible, multiplicando así su potencial como prototipo de nuevos fármacos.
- Al provenir de fuentes naturales, su obtención es más económica que la sintética.

Las estadísticas muestran claramente que el uso de PNs ha sido la estrategia más exitosa para el descubrimiento de nuevos fármacos. Aproximadamente el 60% de la población mundial depende casi por completo de las plantas para su tratamiento, de los 520 fármacos aprobados por la FDA, en el periodo de 1983 a 1994 el 39% fueron de PNs o sus derivados. En este mismo periodo de tiempo del 60 al 80% de moléculas antibacterianas y anticancerígenas fueron obtenidas de PNs. En 1999, 20 de los fármacos no proteicos más vendidos fueron derivados o desarrollados de PNs (**Fig. 2**) [18]. De 1994 al 2007 la mitad de fármacos aprobados estuvieron basados en PNs, como el Ziconotide, Exenatida, Ixabepilona, Metapamulina y Trabectedina [19].

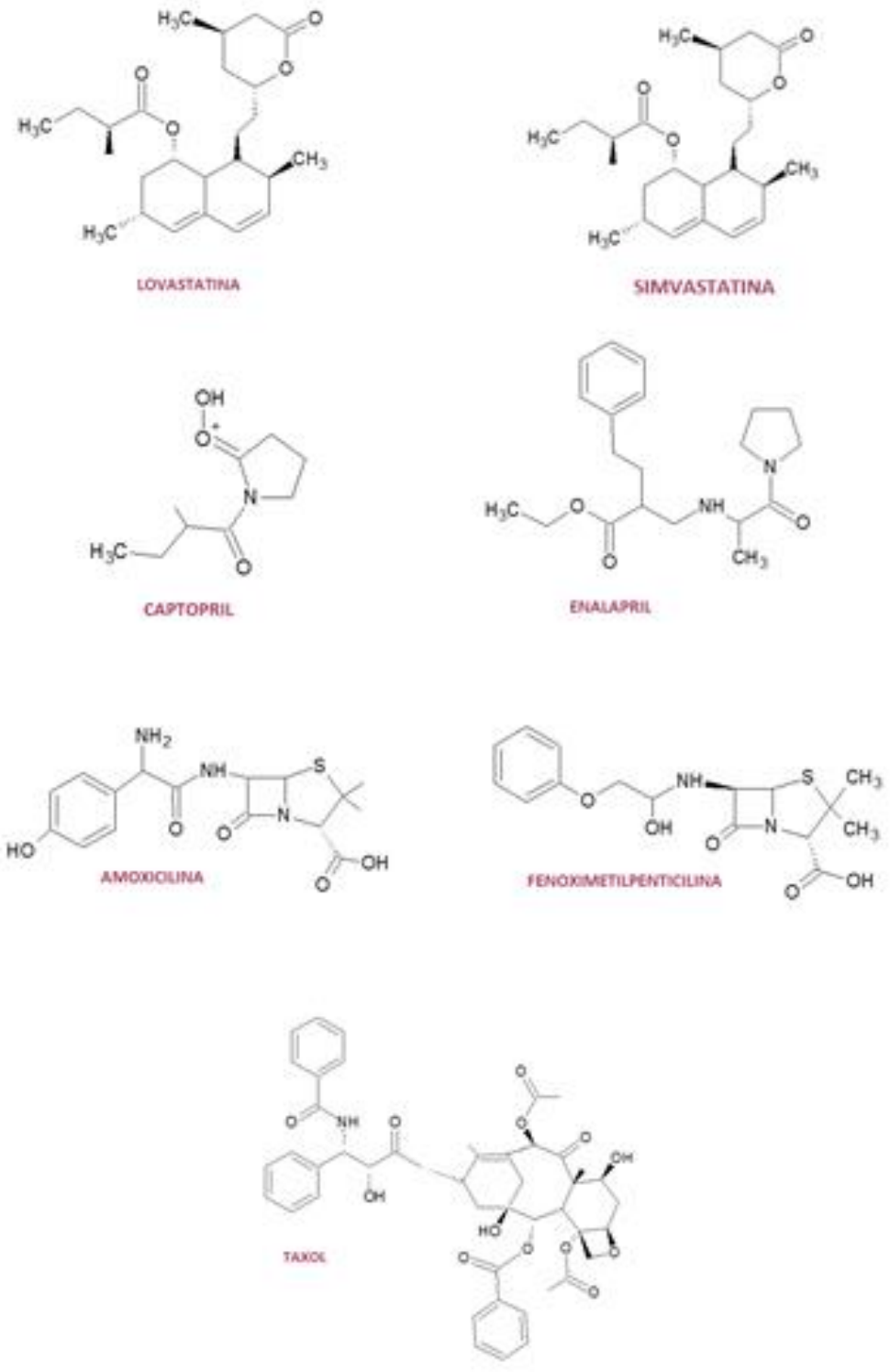


Figura 2. Fármacos desarrollados o derivados de PNs [18].

La búsqueda de estructuras moleculares novedosas con fines terapéuticos se ha incrementado en los últimos años, principalmente por la aparición de nuevas enfermedades (p.e. el Zika), o enfermedades emergentes más agresivas (malaria, tuberculosis, etc.) y otras sin una cura establecida. Aunado a esto, los efectos secundarios de algunos fármacos existentes, la resistencia de algunos antimicrobianos y la correlación de anomalías estructurales y funcionales a nivel de receptores, entre otras cosas, son algunos de los factores que han desatado la investigación constante de moléculas bioactivas provenientes de fuentes naturales capaces de ejercer acciones específicas y potentes [20]. En la actualidad existen muchos compuestos aislados de PNs que son candidatos a fármacos y adicional a ello, algunos están siendo utilizados como herramientas farmacológicas al revelar aspectos de la fisiología; por ejemplo la Morfina fue utilizada para describir el funcionamiento de los receptores opioides endógenos, la Muscarina, Nicotina y Tubocurarina ayudaron al entendimiento de los receptores de Acetilcolina [21].

El estudio de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales ofrece un gran número de ventajas; sin embargo, estos recursos representan una serie de desventajas que deben ser consideradas para su estudio. La extracción y caracterización estructural suele ser lenta y muy laboriosa. Los porcentajes de rendimiento son bajos y su síntesis química en ocasiones no es viable ya que algunas estructuras presentan numerosos centros quirales, lo cual dificulta su desarrollo como fármaco. La sinergia de los distintos componentes presentes en los extractos naturales hace que la actividad que manifiestan los PNs, una vez aislados, sea menor, en algunos casos, que la del extracto inicial; o la presencia de artefactos también se hace latente. Adicionalmente, existen problemas de reproducibilidad al intentar encontrar los mismos productos en la misma fuente natural debido a la gran variabilidad de su composición, influida a su vez por numerosos factores externos [16].

En la actualidad, estas desventajas han sido compensadas con la implementación de ciertas estrategias que han ayudado a mejorar la obtención de moléculas a

partir de las fuentes naturales, algunas de las cuales se mencionan a continuación [18]:

- Acceso eficiente a la biodiversidad, poniendo en práctica la sustentabilidad y preservación de los organismos.
- Técnicas analíticas sensibles y de bajo costo, además de la mejora en las existentes (RMN, CLAR, EM) [22].
- Técnicas desarrolladas para producir PNs de forma alterna, como cultivos de tejidos o genética combinatoria.
- Nuevos lugares para búsqueda de biodiversidad. Aumento en el estudio de MOs tanto terrestres como acuáticos, búsqueda en una gama más amplia de Filos, y búsqueda de nuevos organismos que se encuentran en hábitats inexplorados, como insectos o microalgas.

2.1.1 Potencial de los Productos Naturales de Origen Marino (PNM) en la búsqueda de moléculas con actividad biológica

A pesar de que la diversidad marina excede la terrestre (representa el 15% de la biodiversidad mundial – 1,868,000 especies [2, 3]) y de que su potencial como fuentes de fármacos es bien conocida desde la antigüedad, la química de productos naturales relacionada a las especies marinas es aparentemente reciente (75 años) si se compara con las primeras extracciones que se hicieron de plantas, como el caso de la Morfina, la cual fue purificada a partir de la adormidera alrededor de 1804 en Alemania [20, 23]. Esto es debido en gran parte al gran conocimiento etnomédico que se tenía sobre las plantas, más la falta de tecnología para acceder a las fuentes de origen natural marino y que las técnicas para su obtención no eran las adecuadas.

En 1950 Bergman aisló por accidente dos compuestos a partir de organismos marinos, la Spongouridina y la Spongotimidina; 15 años después se supo que eran un anticancerígeno y un antigripal, respectivamente. A partir de 1970 un grupo de investigadores se enfocó a asilar y elucidar compuestos a partir de PNM [23]. El interés aumentó a partir del hallazgo de dos compuestos: la Tetrodotoxina

(extraída de los peces globo) y la Saxitoxina (extraída de dinoflagelados), los cuales tienen una importante aplicación en el campo de la biomedicina por la especificidad de sus efectos sobre los canales de sodio y por la potencia de sus acciones [1]. En el 2004 se logra la aprobación del primer fármaco marino; una omega-conotoxina conocida con el nombre de Ziconotide, aislada a partir del caracol *Conus magus,* [17]. En el 2007 se aprobó el fármaco Yondelis obtenido de *Ecteinascidia turbinata*, empleado para el tratamiento de sarcoma de tejido blando (**Fig. 3**). Los avances en las técnicas de biología molecular, en las tecnologías de DNA recombinante y en los análisis genómicos han propiciado la identificación de un número cada vez mayor de dianas o blancos moleculares para incluir en los nuevos programas de búsqueda de fármacos [24]. Adicionalmente la colaboración entre químicos de productos naturales, farmacólogos moleculares, bioquímicos y biólogos celulares ha hecho de este campo una fuente potencial de nuevos fármacos con expectativas futuras elevadas [16]. En la última década existe un reporte de más de 8,000 moléculas con actividad biológica que están siendo estudiadas [20]. Actualmente existen 6 medicamentos aprobados por la FDA y 11 compuestos en Fase I, II y III de desarrollo clínico provenientes de moléculas sintetizadas por organismos marinos [25].

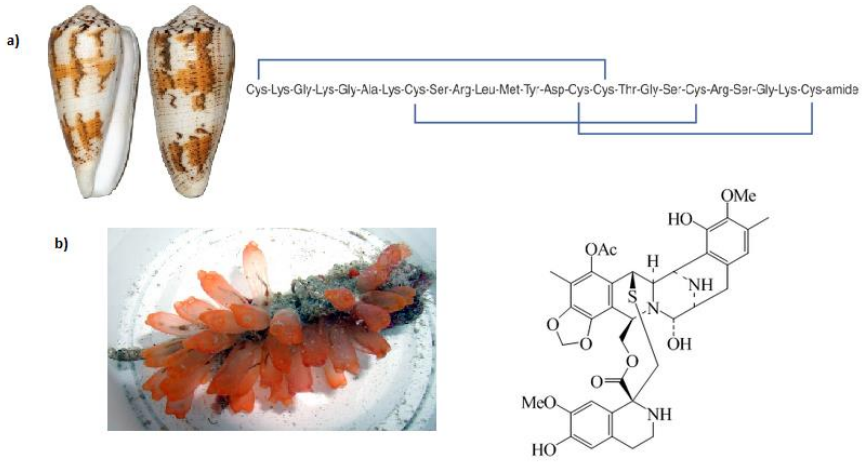


Figura 3*. a*. Ziconotide obtenido de *Conus magus.* ***b.*** Yondelis aislado de *Ecteinascidia turbinata.*

2.1.2 Ventajas del estudio de PNM

Los productos naturales obtenidos a partir de organismos marinos han adquirido una gran relevancia e interés por tener ciertas ventajas ante los organismos terrestres. Los organismos marinos viven en estrecha relación, tienen numerosas interacciones bióticas y se desarrollan en una gran variedad de condiciones naturales que los obliga a tener una enorme capacidad de adaptación, por lo que se ven obligados a desarrollar diferentes mecanismos de supervivencia, entre los cuales figura la síntesis de metabolitos secundarios. Estos metabolitos secundarios cumplen diferentes funciones como de señalización y comunicación, disuasión de depredadores, supresión del desplazamiento por organismos vecinos (competencia), protección de la radiación UV, etc. Estos metabolitos secundarios son moléculas con estructuras novedosas, potentes, específicas, muy solubles en H_2O, y tienen una gran diversidad química que no tiene equivalencia con las de las moléculas obtenidas a partir de plantas [26].

A estas características se les debe aumentar el hecho de que el 80% de organismos vive en el mar y menos del 1% de las especies marinas han sido investigadas con este propósito, lo cual ofrece una brecha muy amplia para la exploración potencial de estos recursos [1].

México es uno de los cuatro países con mayor diversidad biológica en el mundo, superado tan sólo por Brasil, Colombia e Indonesia. En un territorio que representa apenas 1.4 % de la superficie de la Tierra, México alberga entre el 10 y 12% de todas las especies conocidas en el planeta y muchas de estas especies son endémicas del país. Sin duda, la fauna marina cuenta con la mayor biodiversidad, debido a la gran extensión de sus litorales y la posesión de regiones biológicamente ricas como los arrecifes coralinos del Mar Caribe, cuyo frente se extiende por más de 200 km: esponjas, medusas, camarones, pepinos de mar, erizos y una gran cantidad de especies aún no descritas. México es el único país con un mar propio: el mar de Cortés, que alberga diversos ecosistemas y variadas formas de vida; en él se han registrado 2,184 especies de peces, cifra superada únicamente por el Pacífico Asiático [27, 28].

A pesar de ser uno de los países megadiversos, México no figura dentro de los países con mayor número de publicaciones en cuanto a estudios relacionados a la búsqueda de compuestos bioactivos a partir de PNM (**Fig. 4**) [1]. México tiene una gran ventaja que debería ser aprovechada aumentando los esfuerzos de investigación en este campo.

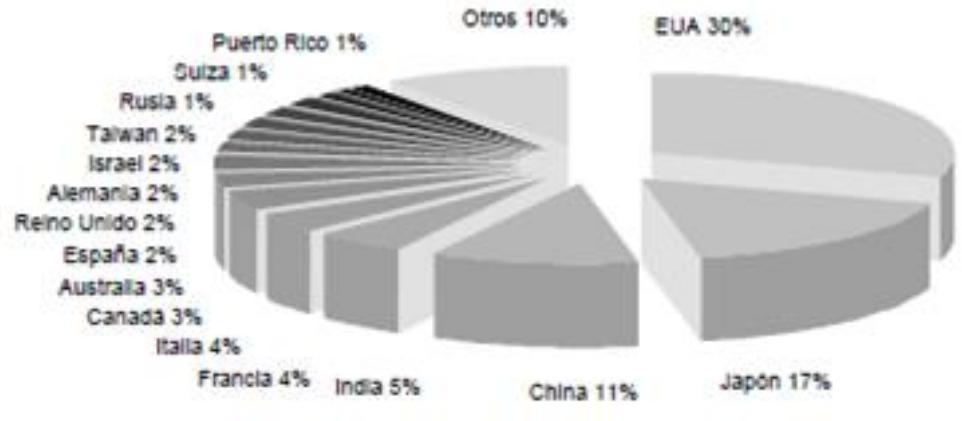


Figura 4*.* Países con mayor número de publicaciones sobre PNM [1].

2.1.3 Principales compuestos activos aislados de organismos marinos

Una gran variedad de compuestos se han aislado de organismos marinos, utilizando distintos métodos de extracción; los cuales fueron aplicados a todo el organismo en estudio, a estructuras especificas del organismo en las cuales se encuentran contenidos los venenos y a residuos o subproductos de pesca, como cabezas, vísceras, y piel, los cuales se sabe, en algunas ocasiones, tienen mayor concentración de compuestos bioactivos [29].

Dentro de los compuestos aislados más representativos, se encuentran los polifenoles con actividad antioxidante, lípidos (diacilgliceroles, fosfatidilglicerol, esteroles) con actividad antiinflamatoria, carbohidratos que han sido utilizados como prebióticos, inmunomoduladores y antineoplásicos; también se han asilado terpenos, alcaloides y policétidos [29].

Muchos de los venenos y toxinas encontrados en los organismos marinos han demostrado ser herramientas de investigación y son fuente de nuevas terapias potenciales (**Fig. 5**). Diversas investigaciones han revelado que algunos de los compuestos activos más importantes de estos venenos son los péptidos. Muchos de los compuestos peptídicos tienen como sitio blanco receptores importantes en los sistemas nervioso y cardiovascular. Ciertas características de los péptidos los convierte en constituyentes ideales del veneno: son moléculas relativamente compactas y conformacionalmente estables, se difunden por el organismo hasta que se unen a sus receptores blanco donde muestran una alta especificidad debido a su complejidad estructural, y actúan rápidamente y con potencia, lo cual es altamente deseable para los compuestos de uso terapéutico. Debido a que estos péptidos no son moléculas señalizadoras endógenas, no están regulados por degradación enzimática; tienen dos estrategias básicas para resistir las peptidasas circulantes y, por tanto, aumentar su estabilidad in vivo. En primer lugar, muchos poseen terminales amino o carboxilo modificados. En segundo lugar, presentan puentes disulfuro entrecruzados, lo que induce conformaciones rígidas. Por estos y otros atributos es que tales péptidos constituyen fármacos muy prometedores [16].

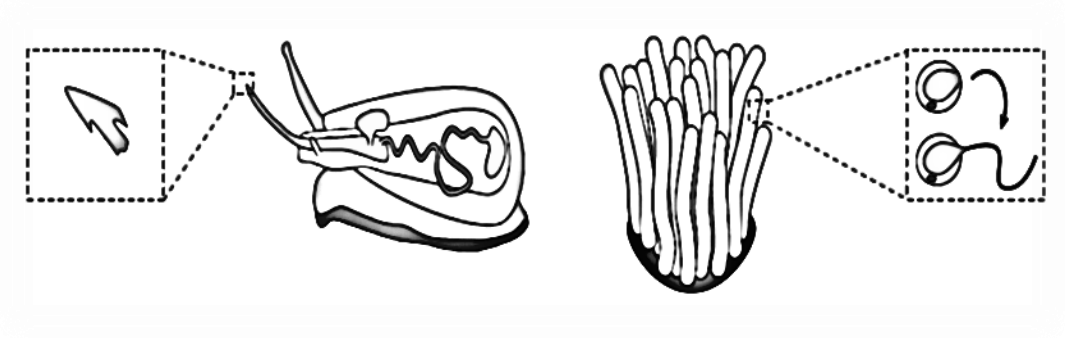


Figura 5. Venenos y toxinas de organismos marinos como fuente de péptidos con actividad biológica (caracol y anémona de mar).

Los nuevos enfoques genómicos y el uso de nuevas técnicas analíticas están siendo utilizados con el fin de revelar el papel ecológico de los compuestos bioactivos encontrados en los PNM y así permitir la aplicación como herramientas farmacológicas y la obtención de productos biomédicos [29].

2.2 Cefalópodos como fuente de productos naturales

En el medio marino se encuentran ocho de los Filos animales más importantes: los cnidarios, nematodos, anélidos, poríferos, moluscos, equinodermos, artrópodos y cordados. Sin embargo, la mayor cantidad de investigaciones de PNM se ha concentrado en el Phylum de los poríferos, en gran parte por la fácil accesibilidad que se tiene a ellos [5]. Es importante ampliar la búsqueda y estudiar los distintos tipos de organismos marinos para acrecentar la probabilidad de éxito.

2.2.1 Características generales de cefalópodos y su clasificación

Los cefalópodos son organismos invertebrados que constituyen una de las ocho clases del Phylum Mollusca, cuyos principales representantes comprenden a calamares, sepias, pulpos y nautilos; estos organismos cuentan con aproximadamente 800 especies conocidas, y alrededor de 175 son consideradas recursos de interés comercial, debido a su abundancia, rápido crecimiento y a su valor nutritivo rico en proteínas y bajo en grasas [4]. Los cefalópodos se distinguen de otros moluscos debido al amplio desarrollo de su sistema nervioso central, por lo que algunas especies son utilizadas como modelos biológicos en las neurociencias; otros tantos son modelos para la comprensión de sus procesos biológicos, su comportamiento y evolución [30].

Estas especies muestran una variación muy amplia en forma, tamaño y hábitat, se encuentran en todos los océanos, algunos son bentónicos y otros viven en profundidades superiores a 7,000 metros; se encuentran desde climas tropicales hasta la Antártida [4].

Los cefalópodos están adaptados a las diferentes condiciones del medio marino. Muchas especies experimentan migraciones a lo largo de su ciclo de vida,

relacionadas a factores ambientales (luz, masas de agua) y biológicos (reproducción, alimentación). Generalmente se considera que los cefalópodos son estenohalinos, de forma que la salinidad es un factor limitante de la distribución de la mayoría de las especies; así, salinidades comprendidas entre 27 y 35 partes por mil constituyen normalmente barreras impenetrables para ellos [4].

A pesar de que la clasificación de cefalópodos aún está inconclusa y que existen muchos géneros y especies que aún no son bien identificadas, en términos generales los cefalópodos actuales están clasificados en dos subclases y cinco órdenes. La subclase Nautiloidea, cuyo único orden y género es Nautilus, representa a los cefalópodos con concha externa. La subclase Coleoidea, que incluye a todos los demás y corresponde a aquellos con cocha interna, vestigial o ausente [4]. En esta última subclase podemos encontrar el orden Octopoda que se caracteriza por tener ocho brazos, umbrela mediana a pequeña, carencia de aletas, concha interna muy reducida o ausente. El género *Octopus* forma parte de este orden (**Fig. 6**) [6]**.**

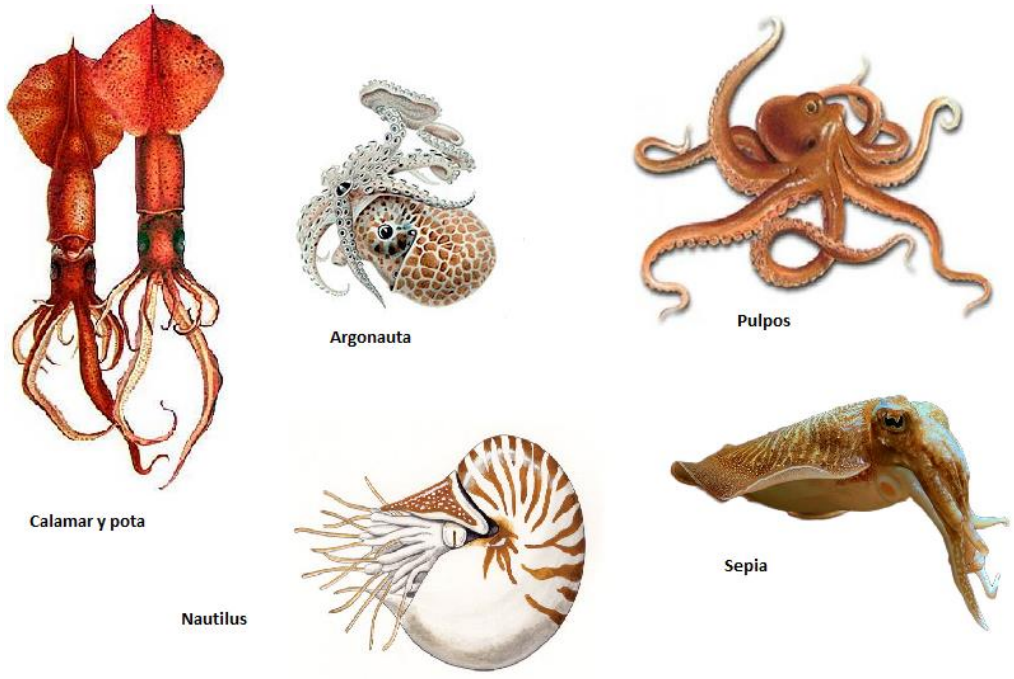


Figura 6. Cefalópodos.

2.2.2 Mecanismo de alimentación y defensa de cefalópodos

Los cefalópodos son un elemento importante en los sistemas tróficos de los ecosistemas marinos en todo el mundo. Son presas de un gran número de especies de peces, aves y mamíferos marinos y al mismo tiempo ocupan generalmente el rol de depredadores subdominantes. Su etología de alimentación es casi la misma en todas las clases, se alimentan principalmente de crustáceos, peces y moluscos [9].

En octópodos el ataque se determina por un objeto en movimiento. Nadan en busca de su presa, que capturan con sus brazos y/o tentáculos, los cuales están cubiertos por ventosas que les facilitan la captura. Poseen un aparato mandibular conocido como pico de loro que en conjunto con un órgano especializado denominado rádula, logra perforar la estructura de sus presas. La rádula cuenta con músculos que le permiten proyectarse fuera de la boca y está recubierta de dentículos quitinosos curvos (**Fig. 7**) [7].

Los cefalópodos cuentan con un par de Glándulas Salivales Posteriores (GSP) productoras de saliva, la cual es descargada en la presa a través de un conducto común [31].

En 1888, Salvatorre describió por primera vez la toxicidad que la saliva del pulpo tenía contra los crustáceos, siendo estos su principal fuente de alimentación. Los octópodos realizaban un agujero por el caparazón dorsal (la perforación puede realizarse en el ojo, dependiendo del tamaño del octópodo y de la presa [32]) por el cual descargaban su saliva, cuya composición era desconocida hasta entonces, pero se observaba que dentro de sus efectos estaba el ocasionar dificultad en la locomoción, temblor irregular en los periopodos torácicos, seguido de inmovilidad y la posterior muerte [33]. Actualmente se ha confirmado que varias especies de cefalópodos utilizan el envenenamiento como un mecanismo para neutralizar a la presa capturada y/o como una defensa contra los depredadores [34].

Se ha descrito que la saliva no solo tienen como finalidad la parálisis de la presa; tiene una doble función al lograr una digestión externa parcial de la carne de los crustáceos en el interior del exoesqueleto antes de la ingestión [8].

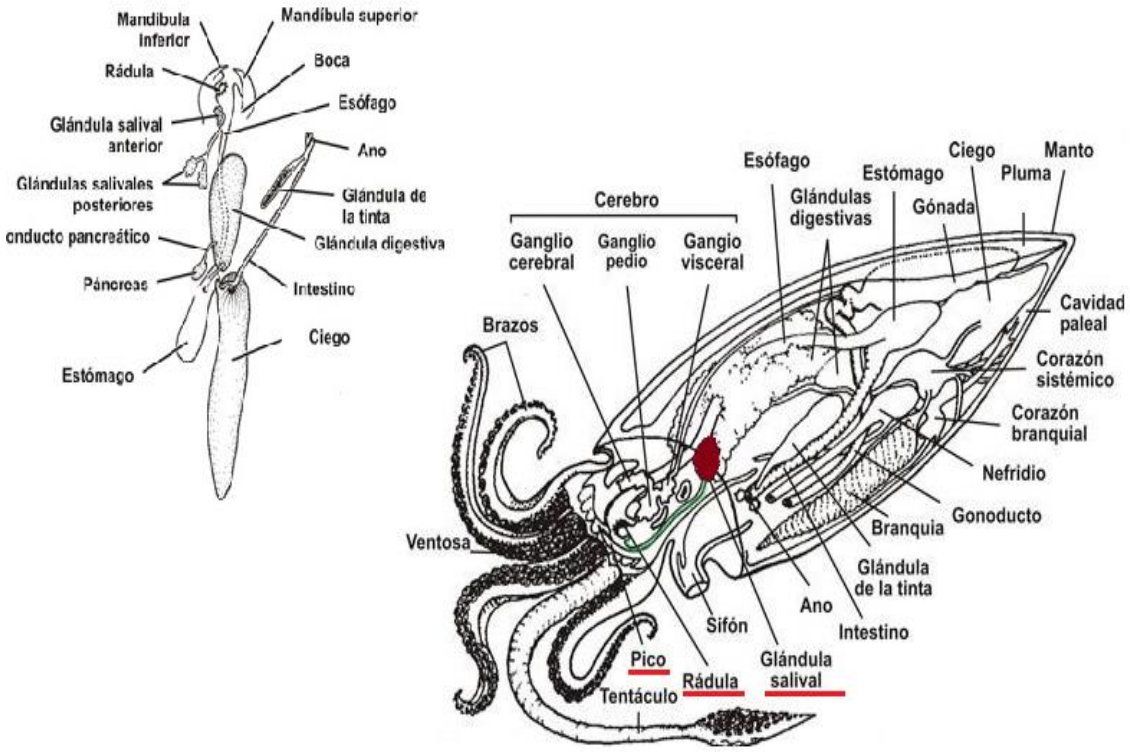


Figura 7. Estructura interna de los octópodos.

2.2.3 Aislamiento de compuestos con actividad biológica de saliva de cefalópodos

El estudio de la saliva producida por organismos marinos es muy reducido, taxonómicamente hablando; como consecuencia, varios grupos de animales con sistemas de veneno perfectamente conocidos han permanecido inexplorados, y entre estos grupos figuran los cefalópodos [35].

Las GSP de los cefalópodos siempre han merecido mucha atención. Se ha observado que su composición química no es idéntica entre las especies de

cefalópodos, a pesar de mostrar las mismas propiedades contra los crustáceos. La secreción de las GSP es una mezcla de varias sustancias biológicamente activas, entre las cuales figuran aminas, enzimas y polipéptidos [9].

a. Enzimas

Se han aislado enzimas digestivas a partir las glándulas salivales de algunos octópodos, entre las cuales podemos encontrar Tripsina, Quimiotripsina, Catepsina, varias peptidasas, amilasas, lipasas, quitinasas, carboxipeptidasas [36] Todas estas enzimas están involucradas en la predigestión, acto que permite a los octópodos liberar selectivamente el músculo del cangrejo del caparazón .

b. Toxinas

A partir de *Octopus vulgaris* se aisló una glicoproteína denominada Cefalotoxina, la cual ha demostrado ser la responsable de la muerte de los crustáceos (Ghiretti, 1959, 1960). Años después se encontró que al menos dos cefalotoxinas, α y β, se producen en las glándulas del pulpo y actúan en la sinapsis inhibiendo la transmisión [37]. En el 2008 se aisló la denominada SE-Cefalotoxina a partir de las GSP de *Sepia esculenta,* la cual ocasiona parálisis y muerte en cangrejos. Esta fue la primera neurotoxina de naturaleza proteica extraída de un cefalópodo [38].

A partir de las GSP de *Hapalochlaena maculosa*, mejor conocido como el pulpo de anillos azules, cuya mordedura es mortal al hombre (**Fig. 8**), se aisló e identificó la Tetrodotoxina. La observación de altas concentraciones del neurotóxico en las GSP, indican que es uno de los principales componentes de la saliva en esta especie. Sin embargo, se ha demostrado que la tetrodotoxina es producida por bacterias endosimbiontes del género Vibrio [39].

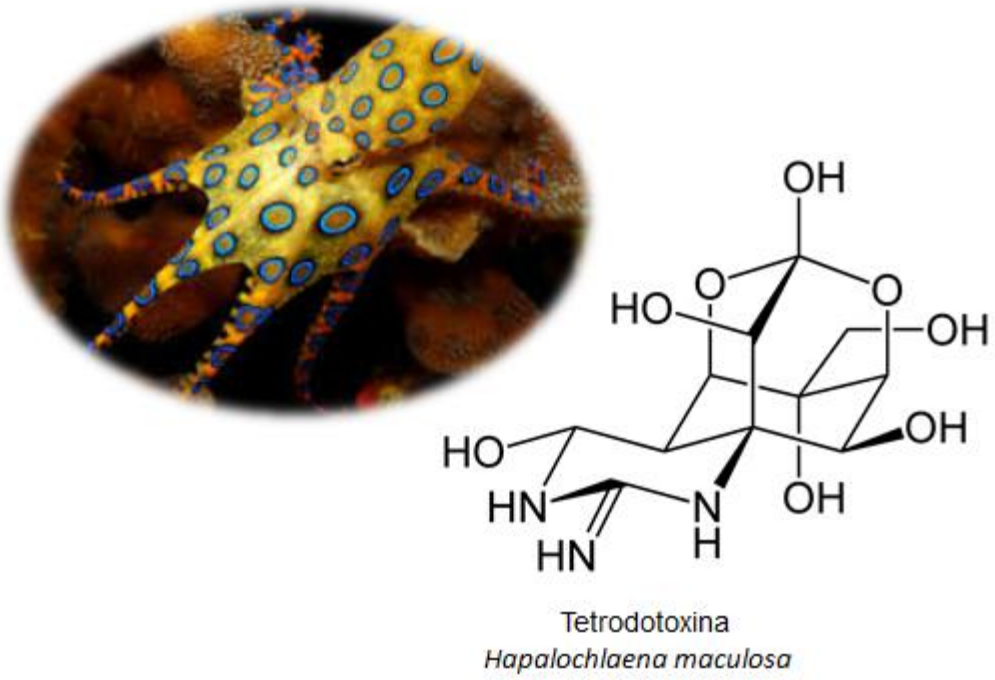


Figura 8 Estructura química de la Tetrodotoxina (PM. 319.27 g/mol).

c. Aminas biológicamente activas

La primera amina detectada en las GSP fue la Tiramina, aislada de *O. vulgaris* en 1913. Posteriormente se aisló Taurina, Noradrenalina, Histamina, y Acetilcolina [36]. Erspamer en 1948, logra el aislamiento de Octopamina y Serotonina, la cual había aislado anteriormente pero con el nombre de Enteramina [40] (**Fig. 9**). Diferentes estudios revelaron que cada una de estas aminas tiene efecto de parálisis sobre crustáceos; sin embargo ninguna es capaz de ocasionar su muerte [36]. La presencia de alguna de estas aminas ha sido relacionada con la actividad secretora de las células enterocromafines [9].

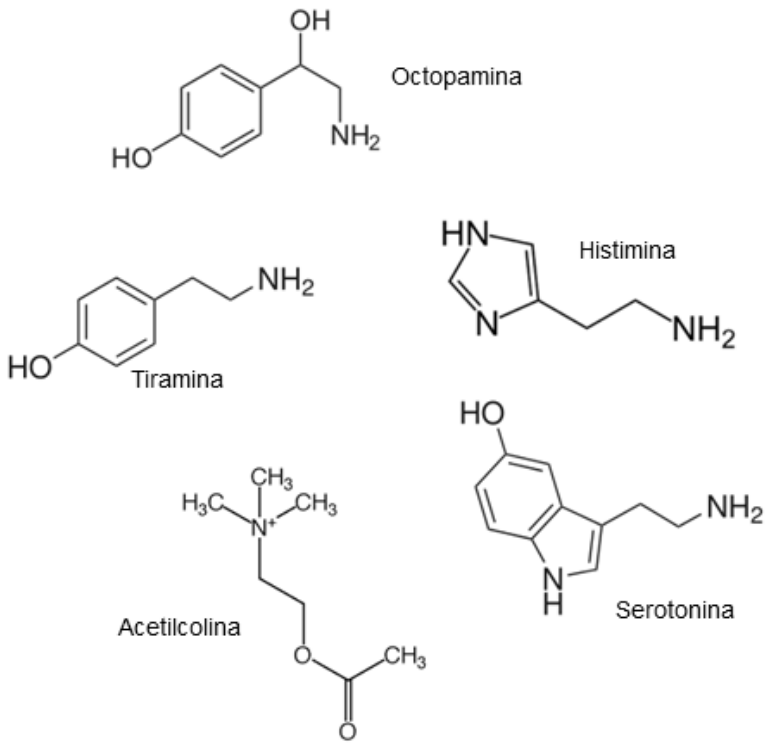


Figura 9. Aminas aisladas de las GSP de cefalópodos.

.

d. Taquicininas

Las Taquicininas son una familia de péptidos que se encuentran en invertebrados y vertebrados animales. Poseen como característica común la secuencia C-terminal: Phe - X - Gly - Leu -Met - NH_2, donde X es un residuo aromático o alifático. Estos péptidos tienen funciones como neurotransmisores y neuromoduladores tanto en el Sistema Nervioso Central como en el Periférico. En los mamíferos las neurotaquicininas A, B y sustancia P son neuropéptidos sensoriales con funciones en la nocicepción y la inflamación. Además están implicadas en vías del sistema nervioso central que median el dolor, la ansiedad, la coordinación motora y la cognición. Las acciones de los péptidos de taquicinina son mediados por uno o más receptores de taquicininas, receptores de neuroquinina 1 (NK_1R), receptor de neuroquinina 2 (NK_2R), y receptor de neuroquinina 3 (NK_3R).

Tres péptidos de la familia de las taquicininas han sido identificados de las GSP de pulpos (Eledoisina, OctTK-1 y OcTK-2); para dos de ellos se determinó la secuencia completa que codifica su precursor. Las taquicininas OctTK-1 y OcTK-2, fueron asiladas a partir de *Octopus vulgaris* [41, 42]. Posteriormente, de las GSP de *Octopus kaurna*, se aisló la taquicinina denominada OctTK-3, la cual resultó ser más potente que las dos primeras [35]. Las taquicininas son conocidas por actuar sobre el músculo liso, provocando contracciones tanto en vertebrados como invertebrados.

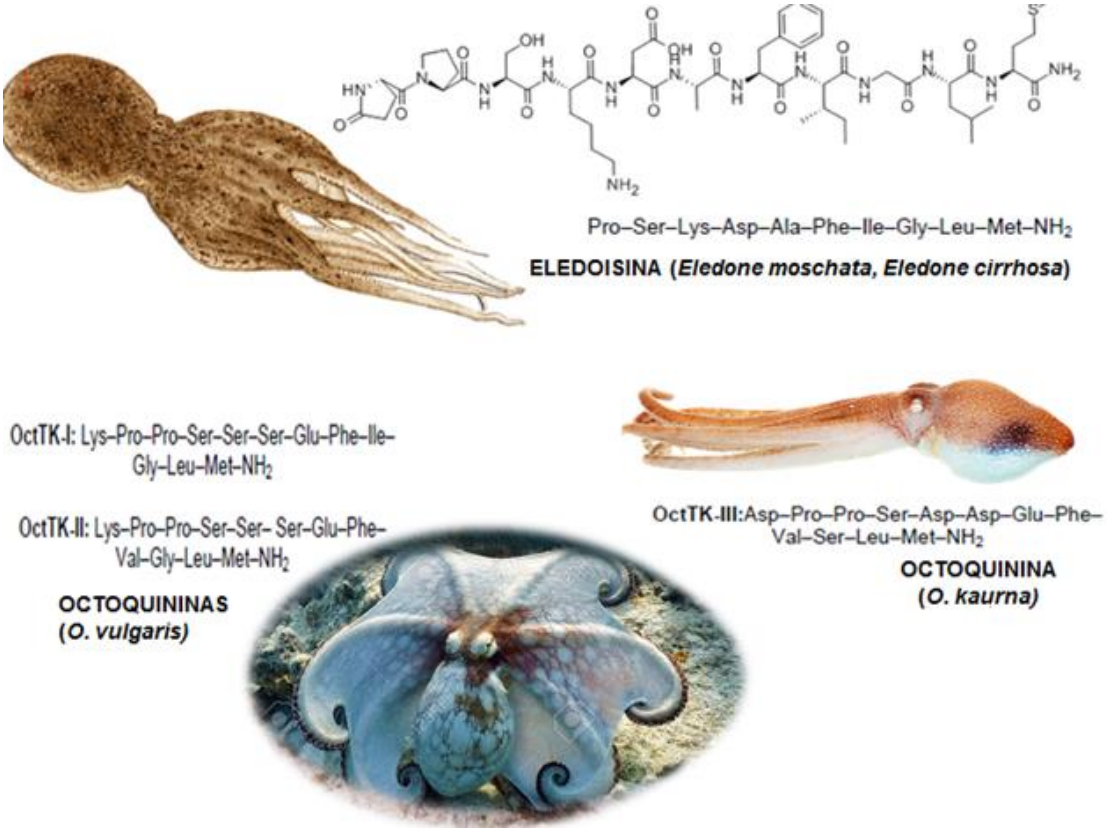


Figura 10. Péptidos de la familia de taquicininas aislados de las GSP de octópodos.

La Eledoisina es un undecapéptido que tiene propiedades vasodilatadoras y acciones estimulantes sobre el músculo liso de mamíferos; se encuentran en las glándulas salivales posteriores de los pulpos del Mar Mediterráneo *Eledone moschata* y *Eledone aldrovandi.* La eledoisina muestra espectros farmacológicos similares a los de la sustancia P, el mediador de las señales en las fibras sensoriales primarias de cerebro de los mamíferos [41, 42].

Un estudio reciente, demuestra que las taquicininas pueden invertir el efecto neurotóxico de la proteína amiloide Aβ (1-40) en las neuronas cultivadas, y desempeñar un papel en la enfermedad de Alzheimer. El mecanismo por el que afectan la neurotoxicidad por Aβ todavía no se entiende; algunos estudios sugieren que la similitud entre las secuencias de las taquicininas y la proteína amiloide provoca que se coensamblen entre sí, disminuyendo la neurotoxicidad (Fig. 11) [43].

PEPTIDO	SECUENCIA
Aβ (25-35)	GSN**K**GA**IIGLM**
NEUROQUININA B	DM**H**D**FFVGLM**
NEUROQUININA A	H**K**IDS**FVGLM**
SUSTANCIA P	R**PK**PQQ**FFGLM**
ELEDOISINA	E**P**S**K**DA**FIGLM**

Figura 11. Similitud de secuencia entre taquicininas y la proteína Aβ (25-35).

e. Otros

Se han aislado otras proteínas de algunas especies, como la proteína PLA_2, que es una fosfolipasa tipo A_2 obtenida a partir de las GSP de *Sepia latimanus*. A partir de *H. maculosa* se aisló una proteína desconocida a la que se le llamó proteína CAP, la cual ha sido encontrada únicamente en esta especie [35].

En las GSP de *Enteroctopus dofleini* se encontró un componente proteico que ocasiona toxicidad en los crustáceos, y que tiene un PM aproximado de 23,000 Da [44]

Diferentes toxinas proteicas se han aislado de varias especies de Octópodos, aunque en algunos casos se desconoce la estructura primaria, a través del análisis comparativo se identifican mezclas complejas de proteínas, de las cuales algunas pueden ser péptidos novedosos con características estructurales únicas y con actividad biológica de importancia

2.3 *Octopus maya*

El pulpo rojo *Octopus maya* es una especie que habita exclusivamente en la Península de Yucatán, principalmente en áreas costeras de baja profundidad. Habita en zonas rocosas que se caracterizan por estar cubiertas por *Thalass*ia *testudium* y diversas algas [10,11], situación que le permite esconderse de sus depredadores y desovar. Constituye una sola población debido a la inexistencia de barreras físicas y/o biológicas que pudieran impedir el intercambio genético de individuos en la zona. Esta especie fue descrita por primera vez en 1966 por Voss y Solís-Ramírez [12] (**Tabla 1**).

Tabla 1 Taxonomía de *Octopus maya*.

Reino: Animalia
Phylum: Mollusca
Clase: Cephalopoda (Cuvier, 1979)
Subclase: Coleoidea (Bather, 1888)
Suborden: Octobrachia (Young y asociados, 1998)
Orden: Octopoda (Leach, 1818)
Suborden: Incirrina (Grimpe, 1916)
Familia: Octopodidae (Orbigny, 1840)
Género: *Octopu*s (Cuvier, 1797)
Especie: *Octopus maya* (Voss y Solís-Ramírez, 1966)

2.3.1 Descripción de la especie

Las características más representativas de la especie son: la presencia de un par de manchas redondeadas obscuras (en forma de lunar) por debajo de los ojos, entre éstos y la base del segundo y tercer brazo. La forma del hectocótilo o brazo copulador del macho, el cual presenta un surco espermatofórico a todo lo largo del brazo. La coloración que adquieren varía con las características del medio ambiente, presentan coloración blanquecina cuando están en reposo, y parda cuando se les irrita o al alimentarse (**Fig. 12**) [12].

O. maya pertenece al grupo de pulpos de desarrollo embrionario directo el cual tiene una duración de entre 40 y 50 días, sin fase larvaria. El número de huevos por puesta oscila entre 1,000-2,000. Las áreas de desove se localizan en aguas de poca profundidad cercanas a la costa y los huevos son fijados en racimos. La hembra se encarga de airear los huevos lanzando por el sifón agua fresca y los limpia con las ventosas de los extremos de los brazos para evitar que se depositen

partículas sobre ellos. Después de cuatro o cinco semanas los huevos eclosionan, la hembra abandona el área de desove y muere días después por inanición [12].

Octopus maya es un depredador activo y carnívoro durante todos los estadios del ciclo de vida. Su alimentación se basa principalmente en crustáceos, aunque también consume algunos peces. Dentro de sus presas más conocidas se encuentra *Melongena bispinosa, Tangelus divisus, Stroombus pugilis, Calinectes similis y Libinia dubia.*

Figura 12*. Octopus maya.*

El pulpo *Octopus maya* se distribuye en la plataforma continental de la Península de Yucatán, en donde el viento, los patrones de corriente, presión atmosférica y sobre todo la salinidad y temperatura, son los principales factores que determinan la distribución de la especie.

Se distribuye en aguas someras cercanas a Cd. Del Carmen, Campeche, la parte Norte de las costas de la Península de Yucatán y también desde la punta Norte de

Yucatán hasta Isla Mujeres, a una profundidad máxima de 32 brazas (60 m) (**Fig. 13)** [12].

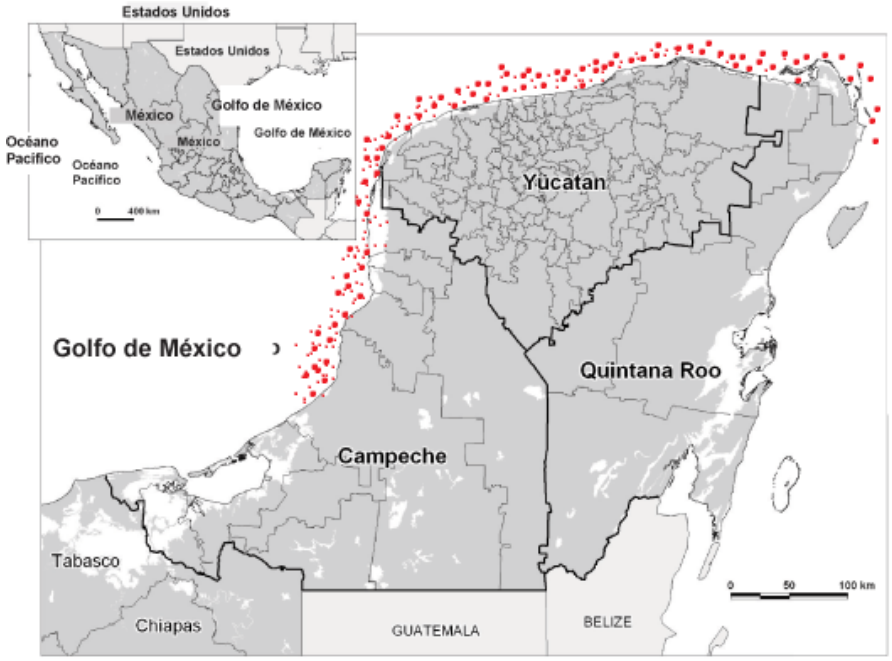


Figura 13. Distribución de *Octopus maya.*

2.3.2 Importancia de *Octopus maya*

Los octópodos son un recurso importante en las pesquerías de muchas regiones costeras del mundo. En México la pesca de pulpo está basada principalmente en 5 especies pertenecientes al género *Octopus*, de las cuales *Octopus maya* y *Octopus vulgaris* son los más importantes en términos económicos. La pesquería de estas especies en el Golfo de México y Mar Caribe mexicano es la tercera en importancia nacional (**Fig. 14**), se encuentra en onceavo lugar de producción pesquera en México, en cuarto lugar por su valor comercial y ocupa el séptimo lugar en exportaciones. Estas cifras sitúan a *Octopus maya* entre las pesquerías de pulpo con mayor potencial mundial [13].

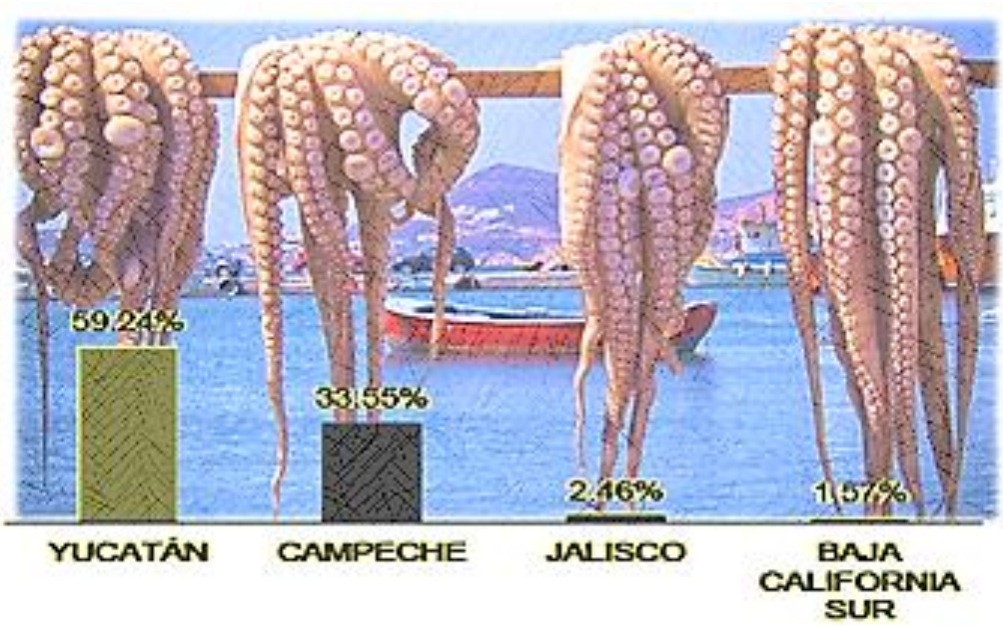


Figura 14. Porcentaje de captura de pulpo a nivel nacional.

La importancia de *Octopus maya* y el hecho de tener ciclos de vida cortos y variables tasas de crecimiento, lo convierte en una especie vulnerable. La captura de *Octopus maya* para consumo está clasificada oficialmente como una pesquería que se encuentra en su máximo aprovechamiento sustentable. Se han emitido dos normas fundamentales para lograr este aprovechamiento, la NOM-008-PESC-1993 y NOM-009-PESC-1993. En la primera se indica la talla mínima de captura (que es 110 mm de longitud de manto) y la cuota de captura (la cual varía con los años pero se sugiere que no sobrepase las 14 mil toneladas), y se específica los tipos de arte de pesca permitidos, los cuales consisten en la navegación a la deriva (gareteo) con carnadas dispuestas en ambos flancos de la embarcación o "jimbas" (**Fig. 15**). La segunda Norma hace mención al tiempo de veda, el cual transcurre del 16 de diciembre al 31 de julio [45, 46].

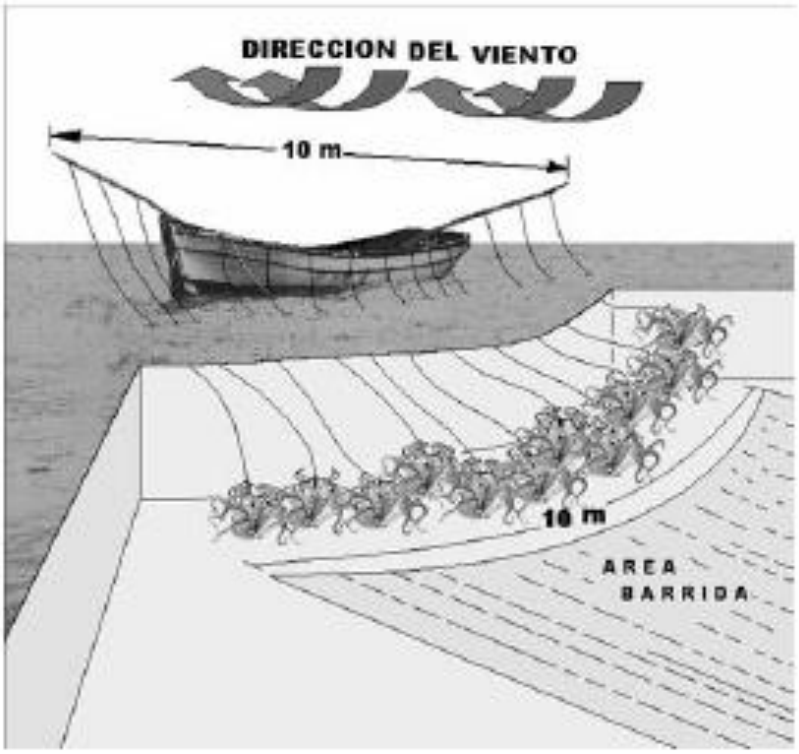


Figura 15. Arte de pesca jimba-gareteo.

Hasta el momento, los cambios en la distribución y abundancia de *Octopus maya* han sido atribuidos a factores ambientales como la marea roja y el cambio climático; sin embargo, el no respetar la talla mínima o las cuotas de captura, puede comprometer la sustentabilidad de esta actividad productiva, la cual debe ser llevada a cabo de tal manera que se favorezca la capacidad de renovación de la población de pulpo, manteniendo un tamaño de stock desovante con base proporcional al tamaño de la población capturada [47].

2.3.3 Moléculas bioactivas aisladas de las glándulas salivales posteriores (GSP) de *Octopus maya*

A la fecha se han realizado dos estudios a las glándulas salivales posteriores de la especie *Octopus maya,* ambos con la finalidad de buscar moléculas bioactivas que tengan futuras aplicaciones farmacológicas. En el primer estudio se logró el

aislamiento de una fracción causante de un efecto paralizante y se determinó su composición química. Se encontró que la fracción estaba formada por Alanina, Ácido Glutámico, Prolina, Valina, Isoleucina, Serina, Talosa y Glucosa [14] (**Fig. 16**).

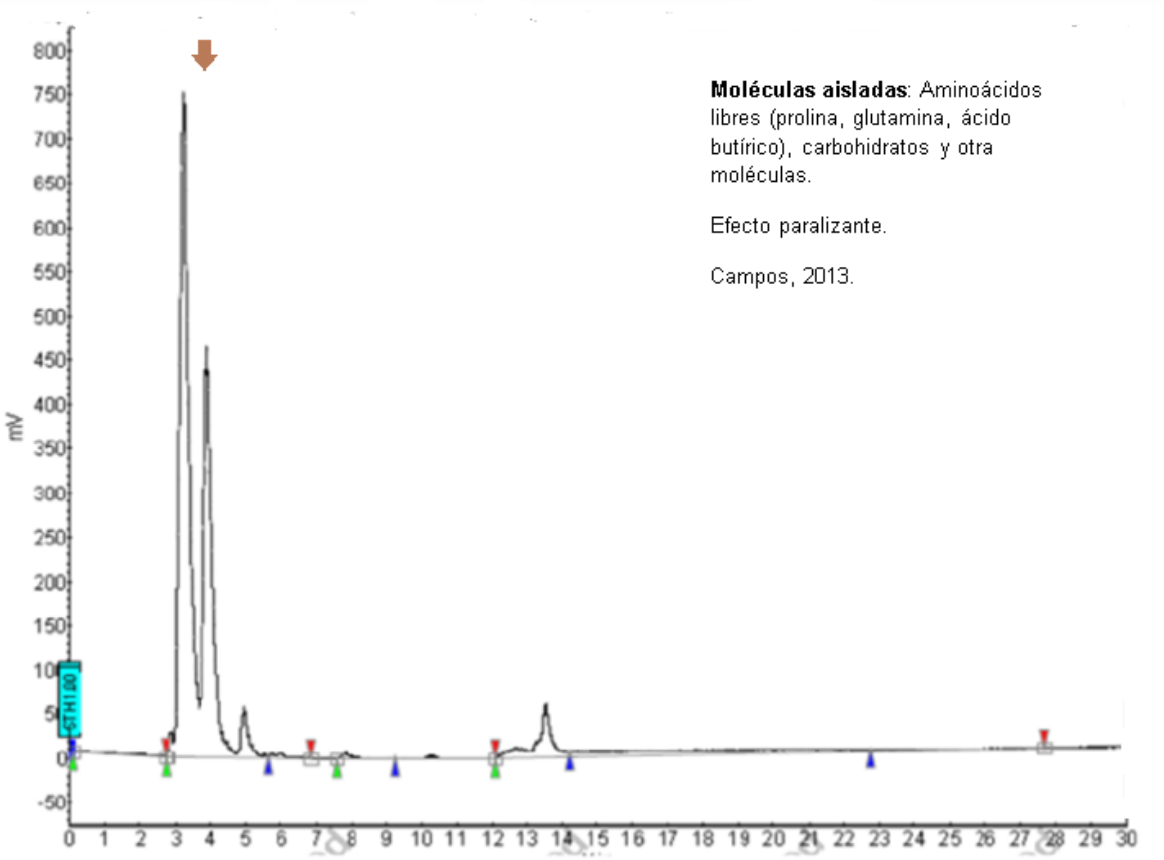


Figura 16. Fracción paralizante obtenida del extracto neurotóxico de las GSP de *Octopus maya*.

En un segundo estudio se logró el aislamiento de un compuesto que causa relajamiento, descoordinación y parálisis formado por 9 aminoácidos (Alanina, Treonina, Serina, Valina, Prolina, Histidina, Arginina, Metionina y Fenilalanina), amidado en el C terminal; se determinó un PM aproximado de 1,045.0051 m/z y se intentó dar a conocer la secuencia, llegando a establecer 6 de los 9 aminoácidos presentes en el polipéptido X-X-X-Thr-Phe-Ser-Ala-Pro-Arg-NH_2 [15] (**Fig.17**).

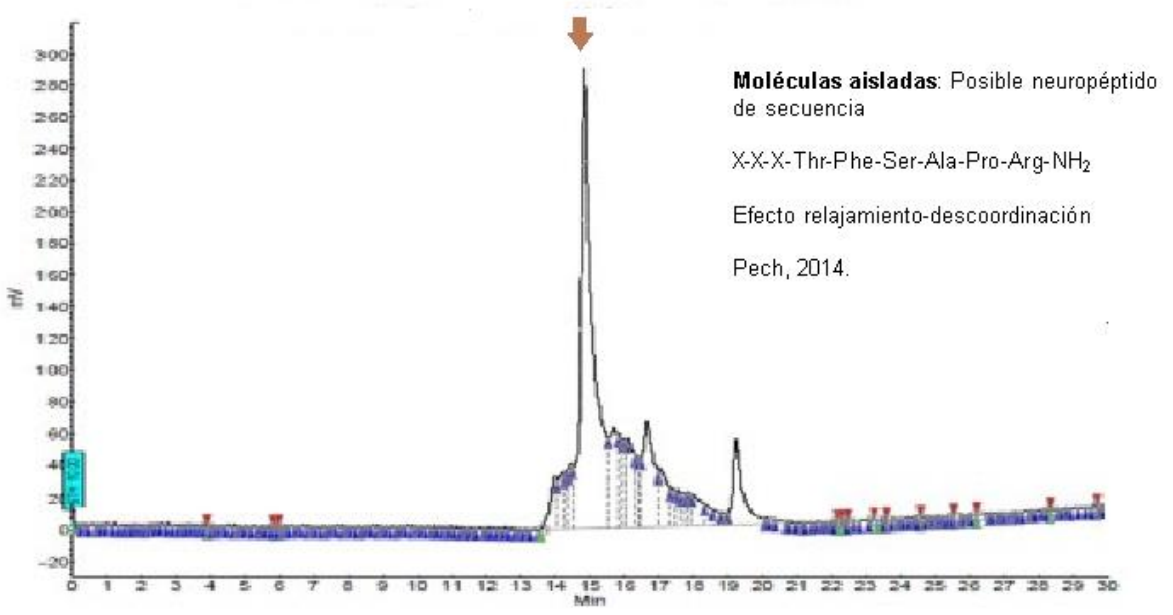


Figura 17. Fracción causante del relajamiento-descoordinación-parálisis obtenida del extracto neurotóxico de las GSP de *Octopus maya***.**

3 JUSTIFICACIÓN

México es considerado uno de los principales países megadiversos y su fauna marina cuenta con la mayor diversidad debido a la extensión de sus litorales y la posesión de regiones biológicamente ricas. A pesar de las ventajas que esto representa en la búsqueda de Productos Naturales Marinos, son escasos los estudios en esta área de la investigación.

Octopus maya es una especie endémica de la Península de Yucatán y tiene un gran valor comercial, tanto a nivel nacional como internacional. Presenta ciclos de vida cortos y tasas de crecimiento variables, lo que lo convierte en una especie que puede caer fácilmente en riesgo, por lo que existen distintas normas que regulan su aprovechamiento, logrando que hasta la fecha el uso del recurso sea sustentable. El cambio climático, las mareas rojas y el incumplimiento en alguno de los requisitos establecidos para su captura, pueden ocasionar un descenso que ponga en peligro a la población. Es por ello que se deben buscar estrategias alternas que ayuden a su conservación. Aunque una posibilidad es desarrollar la acuacultura, existen otras técnicas, como lo es la generación de subproductos de la pesca, la cual podría dar lugar al aprovechamiento total de todos los componentes de la especie. En la actualidad las vísceras de pulpo son desechadas perdiéndose ahí muchos elementos de importancia biológica que podrían también ser aprovechados. Las GSP pertenecen a estos componentes, ya que son consideradas desechos, por lo que utilizarlas como fuentes de moléculas potencialmente farmacológicas le da un valor agregado a la especie.

Los cefalópodos tienen un mecanismo de defensa perfectamente conocido que involucra la producción de saliva en sus GSP; este veneno es una mezcla de sustancias biológicamente activas, algunas de las cuales han sido aisladas por su aplicación médica, como lo es la Eledoisina. Se ha observado que, a pesar de ejercer el mismo efecto sobre los crustáceos, la composición química de los venenos no es idéntica entre las especies cefalópodos.

Como resultado de su ecología y evolución adaptativa, *Octopus maya* posiblemente puede contener en su veneno estructuras químicas con diversidad farmacológica distintas a las de otras especies de cefalópodos.

4 HIPÓTESIS

El veneno de las GSP de *Octopus maya* contiene una fracción responsable de la actividad neurotóxica observada en los crustáceos, la cual puede estar formada por uno o varios péptidos con características estructurales únicas y con posible potencial farmacológico.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Realizar el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad neurotóxica presentes en las GSP de *Octopus maya* y determinar su estructura.

5.2 Objetivos específicos

A. Obtener las glándulas posteriores del pulpo de los desechos de la pesca comercial.
B. Establecer las condiciones instrumentales a nivel analítico y preparativo de las técnicas cromatográficas para la obtención de extractos a partir de las glándulas salivales posteriores de *Octopus maya*.
C. Separar los compuestos bioactivos presentes en el extracto obtenido a partir de las GSP de *Octopus maya*, empleando una metodología de separación biodirigida en la cual se evaluará el efecto neurotóxico, utilizando para esto al cangrejo *Ocypode quadrata.*
D. Determinar la estructura molecular de los compuestos aislados mediante la aplicación de métodos espectrométricos y espectroscópicos (CL-EM, EM, RMN).

6 METODOLOGÍA

6.1 Materiales

Los disolventes y reactivos utilizados en todos los casos fueron grado RA (Reactivo Analítico) y los disolventes empleados para CLAR fueron grado HPLC.

6.2 Instrumentación

6.2.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

EQUIPO 1. Sistema cromatográfico Polaris 211

El sistema cromatográfico Polaris 211 (Varian, Inc) cuenta con dos bombas 211, un inyector automático 410, un colector de fracciones 701, y dos detectores: un detector evaporativo de dispersión de luz ICE 2100 (DEDL o ELSD en inglés) y un detector ultravioleta 335 (UV) [48, 49].

Condiciones de análisis o separación:

A) **Fase reversa – condiciones analíticas.** Se utilizó una columna LUNA fase reversa C-18 (250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm) (Phenomenex; Torrence, CA, USA). Para el detector ELSD: Temperatura de Nebulización = 40 ^{o}C, Temperatura de Evaporación = 70 ^{o}C, Flujo de nitrógeno = 1.0 ml/min y se inyectaron 25 µl del extracto o fracción (1 µg/µl). Detector de UV a 215 µm. Como fase móvilse utilizaron las soluciones A (0.1% (v/v) de Ácido Trifluoroacético en Agua) y B (0.1% (v/v) de Ácido Trifluoroacético en Acetonitrilo), en un gradiente de 0 a 40% de Acetonitrilo en un tiempo de 25 minutos de análisis; al minuto 25 se realiza un gradiente de 40 a 100% de Acetonitrilo en 2 minutos, para que después de un tiempo de cinco minutos regrese a la condición inicial (100% A).

B) **Fase reversa – condiciones semipreparativas.** Se utilizó una columna LUNA C-18 (250 x 10.0 mm, tamaño de partícula 10 µm) (Phenomenex). Se inyectaron 25 µl del extracto o fracción (1 mg/10 µl) con un flujo de 3.0 ml/min. Detector de UV a 215 nm. Como fase móvil Agua:Acetonitrilo, en un

gradiente de 0 a 40% de Acetonitrilo en un tiempo de 23 minutos de análisis, al minuto 27 se realiza un gradiente de 40 a 100% de Acetonitrilo, para que en un tiempo de cinco minutos regresa a la condición inicial (100% A) [50].

C) **Intercambio catiónico.** Se utilizó como fase estacionaria una Columna LUNA 5µm SCX 150 x 4.6 mm (Phenomenex). La composición de la fase móvil A fue Fosfato de Potasio (20 mM pH 2.5: Acetonitrilo (75:25) y la fase B Cloruro de Potasio 0.5 M (en amortiguador de Fosfato de Potasio 20 mM pH 2.5):acetonitrilo (75:25). Se usó un gradiente lineal de 0% de B a 100% de B durante 40 minutos. Para todos los análisis la temperatura de la columna se mantuvo a 35 ^{o}C y el flujo fue de 1.0 ml/min durante todo el análisis [51, 52].

6.2.2 Métodos espectrométricos. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

Para el análisis se empleó un Cromatógrafo de Gases Agilent Technologies 6850 Network, con Detector de Masas 5975B-VL; se manejó una columna Zebron ZB-5MSi de Phenomenex, 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de grosor de película.

Condiciones de análisis: Temperatura inicial del horno 50 ^{o}C en 1 min, incremento de 15 ^{o}C hasta 350 ^{o}C durante 4 min, temperatura del inyector 350 ^{o}C, modo de inyección Split, razón de Split 50:1, inyección manual, volumen de inyección 1 µl, gas acarreador Helio, temperatura de la línea de transferencia 290 ^{o}C. Espectrómetro de masas, modo de análisis, detección en modo de barrido total del espectro (SCAN) de 50 a 550 m/z.

Los datos obtenidos del espectro de masas son comparados con ayuda del programa The NIST Mass Spectral Program, a través de la base de datos Agilent Technologies Wiley Registry 7th Edition with NIST =% MS Spectra Revision D.05.01 [15, 53].

6.2.3 Métodos espectroscópicos. Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Carbono (^{1}H y ^{13}C)

Todos los espectros fueron realizados en un equipo de RMN Bruker Avance III 400 spectrometer (Bruker Inc) de 400 MHz empleando una sonda de nitrógeno criogénica. Para el análisis de los experimentos se utilizó el programa Standard Bruker Topspin 2.1. Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (22°C) en Deuterocloroformo (Sigma, 151856), el cual presenta una señal de disolvente en 7.27 ppm (1H) o 77.0 (13C) vs. TMS respectivamente.

6.3 Bioensayo

6.3.1 Bioensayo sobre cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*) para evaluar el efecto neurotóxico

El efecto neurotóxico de las fracciones obtenidas se evaluó sobre el cangrejo *Ocypode quadrata* mejor conocido como cangrejo fantasma (**Fig. 18**), el cual fue colectado en las playas de Sisal, Yucatán (pesos entre los 10 y 15 g) [15, 54, 55].

Para la preparación de las muestras se pesaron 4 mg de la fracción a estudiar y se diluyeron con agua destilada para generar una concentración de 4 mg/ml. Para el control negativo se utilizó agua destilada (100 µl) [15].

El extracto crudo o fracción (100 µl) se inyectaron en la base del tercer periópodo (membrana artrodial) [56], anotando las conductas que presentó el cangrejo. Se tomaron como reacciones positivas la relajación seguida de contracciones de las extremidades del cangrejo y por último parálisis, se tomaron los tiempos en los cuales ocurrieron dichos eventos.

Figura 18. *Ocypode quadrata***.**

6.4 Obtención de muestras

El poniente de las costas yucatecas es la zona de pesca de *Octopus maya* correspondiente a la Cooperativa Ribereños de Sisal de RL de CV (antes Tigres del Mar) de Sisal, Yucatán. Abarca desde la localidad llamada la Bocana hasta Celestún (**Fig. 19**). De acuerdo a la NOM-009-PESC-1993 se establece un periodo de veda que abarca del 16 de diciembre al 31 de julio [46]. Las muestras de GSP se obtuvieron en los meses en los que opera la flota comercial de pescadores ribereños de Sisal. Las glándulas fueron colectadas manualmente y presevadas hasta su análisis.

6.5 Manejo de muestras

Las GSP se extrajeron de cada uno de los organismos capturados y se colocaron en frascos de plástico de color ámbar previamente pesados e identificados, los cuales fueron trasladados al laboratorio en camas de hielo. Las GSP fueron congeladas a -70 ^{o}C en un ultracongelador REVCO y posteriormente fueron liofilizadas a -45^{o}C/0.200mbar.

6.6 Obtención del extracto crudo

Se evaluaron tres diferentes metodologías específicas para la extracción de péptidos. Con el fin de utilizar el mejor procedimiento de extracción, se hizo una valoración del rendimiento, manejo de la muestra, pureza, tiempo y evaluación de la actividad biológica [56].

Figura 19. Captura de pulpo en la zona de pesca correspondiente a la cooperativa "Tigres del Mar".

6.6.1 Extracción con Agua

Las GSP, previamente liofilizadas, se trituraron utilizando un mortero con pistilo; una vez pulverizadas se disolvieron con agua bidestilada (1:20 p/v) hasta obtener una mezcla homogénea. Inmediatamente la solución se trasvasó a tubos Falcon, y se centrifugó uniformemente (5,000 rpm/15 min).

El sobrenadante fue colectado y congelado a -70 °C en un ultracongelador (REVCO, Thermo-Science,) para posteriormente ser liofilizado y generar el extracto crudo [15] (**Fig. 20**).

6.6.2 Extracción en Metanol acidificado

El tejido liofilizado y previamente pulverizado fue colocado en un vaso de vidrio en baño de hielo y se le añadió metanol (8 ml/g de tejido); se mantuvo en agitación magnética durante una hora. La mezcla se transfirió a tubos Falcon y se centrifugó (5,000 rpm/15 min). El sobrenadante se transfirió a un matraz bola de 1 L y se eliminó el metanol a presión reducida utilizando un sistema de evaporación rotatoria (Buchi; Modelo Rotavapor RE-III). El extracto acuoso restante se centrifugó, y el sobrenadante recuperado fue diluido con un volumen igual de 0.2 % (v/v) de Ácido Trifluoroacético/Agua; esta solución es llevada a sequedad mediante rotaevaporación, determinando el rendimiento obtenido [56].

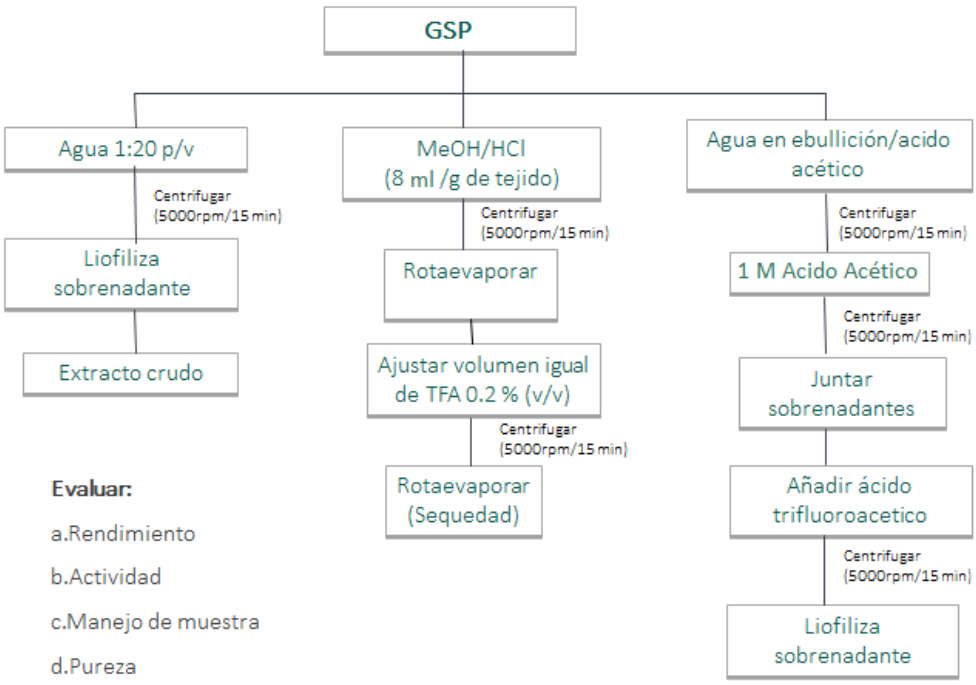


Figura 20. Esquema de las tres diferentes metodologías empleadas para la extracción de péptidos.

6.6.3 Extracción con Agua en ebullición/1 M de Ácido Acético

El Agua (400 ml) se llevó a ebullición y se mantuvo a una temperatura de 90 ^{o}C durante al menos 15 min; después de este tiempo el tejido liofilizado se añadió en una proporción de 10 ml de agua/g de tejido. La muestra se mantuvo en el baño de agua durante 10 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente se centrifugó la muestra (5,000 rpm/20 min/23°C), el sobrenadante se retiró y al precipitado se le agregó 10 ml de Ácido Acético 1 M; se homogenizó durante 30 segundos y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones y se separó el sobrenadante. Los sobrenadantes obtenidos del agua hirviendo y de las extracciones con ácido acético se combinaron y se les añadió Ácido Trifluoroacético para dar una concentración final de 0.1%, esta solución es liofilizada para obtener el extracto crudo [56].

6.7 Obtención de la fracción neurotóxica empleando el método de ultrafiltración

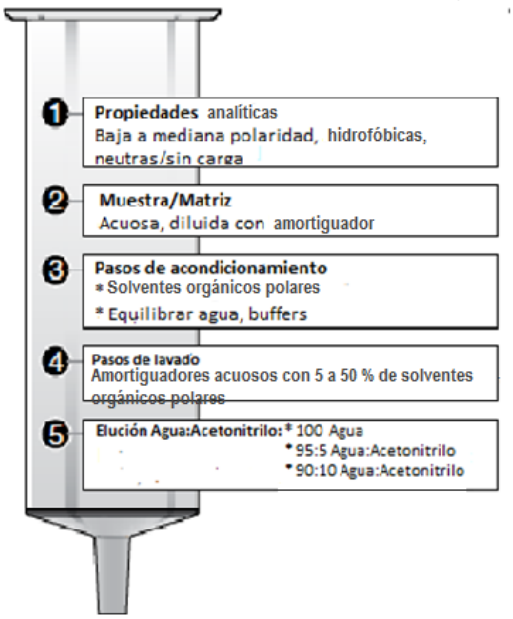
El extracto crudo de cada método, una vez liofilizado, fue pesado y resuspendido con agua bidestilada usando la cantidad mínima de volumen en la cual podía disolverse el liofilizado, se centrifugó en un tubo Falcon por 15 minutos a 5,000 rpm/23ºC. El sobrenadante fue pasado por membranas de ultrafiltración con un tamaño de corte de 3 kDa y 15 ml de volumen (Amicon, Ultracel, 3000 MWCO Millipore); se centrifugó a 5,000 rpm/23 °C durante una hora hasta obtener un volumen de 250 µl en la membrana. Se colectó la fracción que se encontraba en la parte inferior de la membrana (aproximadamente 14 ml). Las fracciones obtenidas de los extractos fueron recolectadas en frascos ámbar previamente pesados y rotulados para evaluar el rendimiento. Todas las fracciones fueron congeladas y liofilizadas. A la fracción neurotóxica se le realizó un análisis mediante CLAR fase reversa para observar su complejidad [57].

6.8 Separación de la fracción menor a 3 kDa mediante cartuchos de extracción en fase sólida (EFS) C-18 fase reversa

A la fracción que se obtuvo por ultrafiltración con tamaño menor a 3 kDa se le dio el nombre de fracción neurotóxica (FN), y se sometió a un cartucho de extracción en fase sólida C-18U fase reversa (55 μm, 70 Å, Strata C18-U de Phenomenex®) para separar las moléculas por polaridad [15, 58]. El cartucho se lavó con Metanol y posteriormente se acondicionó con Agua bidestilada; en todos los casos se aplicaron 5 ml del disolvente seleccionado. Se pesaron 300 mg de muestra la cual fue disuelta en 3 ml de Agua, y se aplicó al cartucho, se realizaron tres lavados con agua bidestilada y se eluyó con mezclas de Agua:Acetonitrilo [58] (Tabla **2)**.

Se realizó un ensayo biodirigido en el cual se colectaron las fracciones que demostraron tener actividad biológica; de estas fracciones se obtuvo su perfil cromatográfico empleando CLAR fase reversa, esto con el fin de evaluar su complejidad y trabajar con la fracción que estuviera más cercana de ser un solo compuesto. Se empleó como ensayo biológico la prueba de neurotoxicidad sobre *O. quadrata.*

Tabla 2. EFS C18-U Fase reversa elución**.**



FRACCIÓN	Elución (H_2O:AcCN)	ml
FN_1	100	5
FN_2	95:5	5
FN_3	90:10	5
FN_4	80:20	5
FN_6	50:50	5

6.9 Separación de la fracción FN_3 (90:10)

6.9.1 Análisis por CLAR fase reversa de la fracción FN_3 obtenida por EFS cartucho C18-U

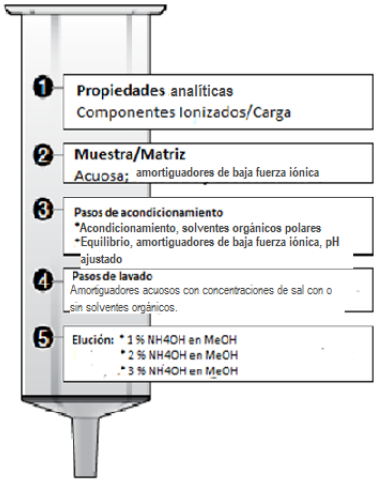
La fracción FN_3 fue colectada y llevada a sequedad utilizando un rotaevaporador (BUCHI R-215) para evaluar su rendimiento; la actividad se evaluó mediante el bioensayo *in vivo* en el cangrejo fantasma. La fracción fue analizada por CLAR en fase reversa modo analítico (pág. 41).

6.9.2 Separación en cartucho de intercambio catiónico fuerte de la fracción FN_3

La fracción FN_3 obtenida del cartucho C18 fue aplicada a un cartucho de intercambio catiónico fuerte (SXC-Strata de Phenomenex®), en todos los casos se aplicaron 5 ml del disolvente seleccionado [58].

El cartucho se lavó con metanol y posteriormente se acondicionó con 10% de Ácido Trifluoroacético (TFA) en agua. Se pesaron 100 mg de muestra (FN_3) y se disolvieron en 3 ml de Agua con TFA; dicha solución se aplicó al cartucho al cual se le realizaron tres lavados consecutivos con agua. La elución de la muestra se realizó empleando las mezclas de NH_4OH y Metanol mostradas en la Tabla **(3)**.

Tabla 3. Elución por intercambio catiónico fuerte.



FRACCIÓN	ELUCIÓN	ml
FN_{3-1}	H_2O:TFA 90:10	5
FN_{3-2}	HCl 0.1 N en H_2O	5
FN_{3-3}	HCl 0.1 N en MeOH	5
FN_{3-4}	1% NH_4OH en MeOH	5
FN_{3-5}	2% NH_4OH en MeOH	5
FN_{3-6}	4% NH_4OH en MeOH	5
FN_{3-7}	5% NH_4OH en MeOH	5

6.9.3 Análisis por CLAR fase reversa de la fracción FN_{3-5} (2% NH_4OH en MeOH) obtenida por EFS intercambio catiónico fuerte

La fracción FN_{3-5} obtenida de la separación en cartucho de intercambio catiónico fuerte se inyectó en un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) en condiciones analíticas de fase reversa para comprobar que se haya realizado la separación correctamente(pág. 43).

La fracción de 2 % de NH_4OH en MeOH fue colectada con un análisis de CLAR fase reversa modo semipreparativo y llevada a sequedad utilizando un rotaevaporador (BUCHI R-215), se determinó el rendimiento, y se sometió al bioensayo de neurotoxicidad para comprobar la actividad.

6.9.4 Análisis mediante CLAR por intercambio catiónico de la Fracción FN_{3-5} (2% NH_4OH en MeOH) obtenida por CLAR semipreparativo fase reversa

La fracción FN_{3-5} obtenida por CLAR semipreparativa (en fase reversa C18) se inyectó en un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) en condiciones analíticas utilizando una columna de intercambio catiónico, con el fin de comprobar la presencia de una sola señal (pág. 44).

6.9.5 Aislamiento e identificación por RMN de la fracción FN_{3-5} purificada mediante CLAR en fase reversa semipreparativa

Una vez aislada la fracción FN_{3-5} se realizaron estudios de RMN para establecer la estructura del compuesto aislado y comprobar dicho resultado con el PM obtenido por CG-EM. Se hizo una comparación con los resultados obtenidos por Pech en el 2014. El estudio se realizó en la Unidad de Graduados del Instituto Tecnológico de Tijuana (pág. 45).

6.9.6 Determinación de PM de la fracción FN_{3-5} purificada, mediante técnicas espectrométricas (CG-EM)

Para la determinación del PM se empleó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). El estudio se realizó en la Unidad de Graduados del Instituto Tecnológico de Tijuana (pág. 44).

6.9.7 Esquema de la separación biodirigida realizada al extracto obtenido a partir de las GSP de *Octopus maya.* Aislamiento de la fracción FN_{3-5}

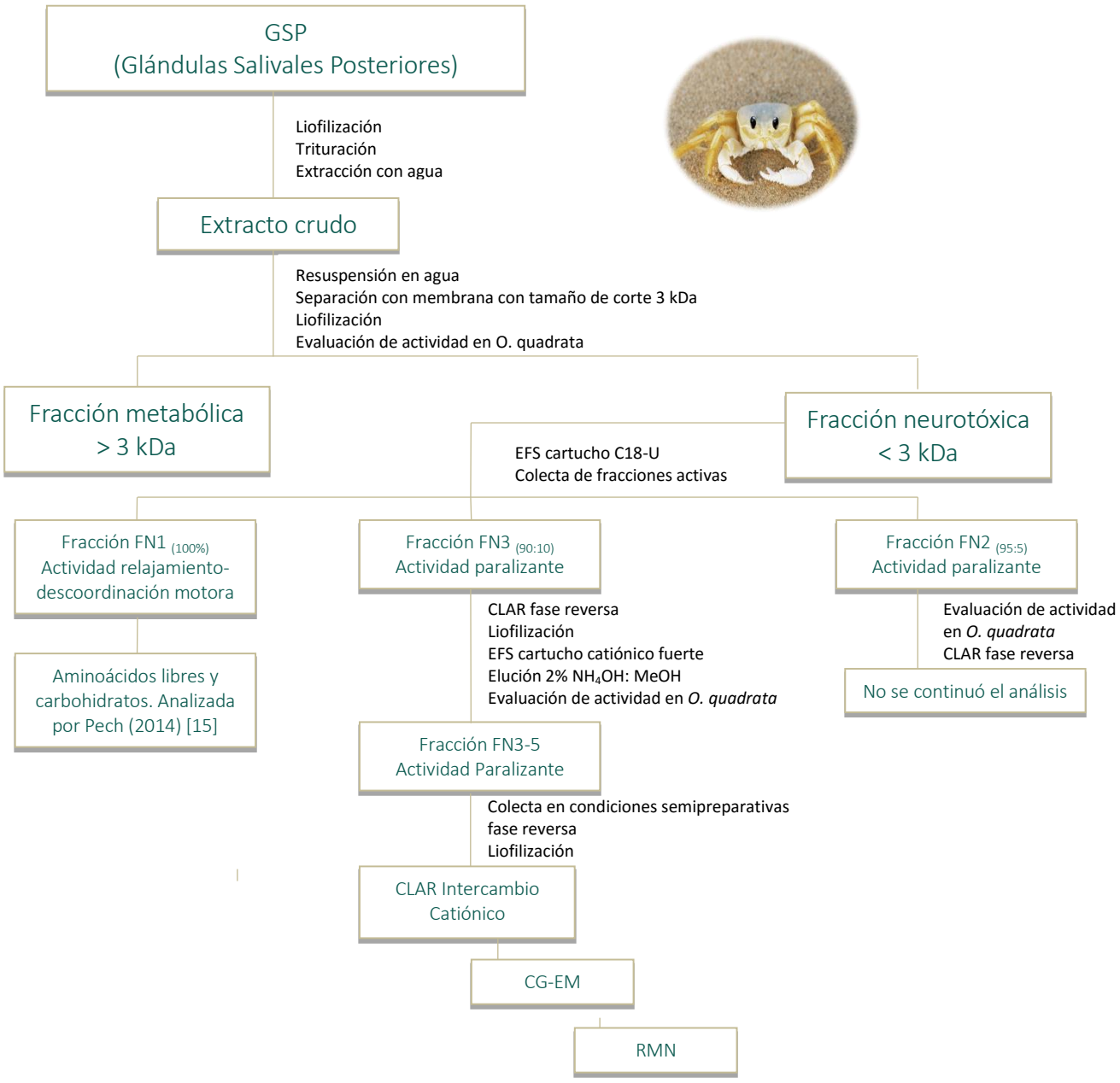


Figura 21. Esquema de purificación de FN_{3-5}. [Pech, 2014]

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Obtención del extracto crudo a partir de las GSP de *Octopus maya*

Diversas investigaciones sobre venenos producidos por organismos marinos han demostrado que algunos de los compuestos activos más importantes encontrados en ellos son péptidos. Sus principales características, como su especificidad, su potencia y rapidez al actuar, así como el hecho de ser moléculas pequeñas, hacen que estos compuestos sean de gran potencial farmacéutico [16]. En el caso de los octópodos, se han aislados, a partir de las GSP, cuatro péptidos de la familia de las taquicininas entre los cuales resalta la Eledoisina, cuyas funciones farmacológicas son de relevancia médica [41, 54].

Por estos motivos, para la obtención del extracto crudo a partir de las GSP de *Octopus maya*, se evaluaron tres técnicas selectivas para la extracción de péptidos. Los péptidos varían en sus características de peso molecular, carga e hidrofobicidad, y es por ello que existen diferentes métodos de extracción que permiten, de acuerdo a sus particularidades, optimizar su aislamiento [56]. De cada metodología se valoró el rendimiento, manejo de muestra, pureza, tiempo de extracción y actividad biológica.

a. **Extracción con Agua**

En la **Tabla 4** se muestran los resultados obtenidos de la extracción de las GSP con Agua, la cantidad obtenida, porcentaje de rendimiento y el resultado de la evaluación neurotóxica en el bioensayo en cangrejo fantasma.

El Agua permite extraer todos los compuestos polares presentes en el tejido por lo que no es una metodología selectiva, sin embargo los péptidos suelen tener características de polaridad que hacen que la técnica sea idónea para el objetivo

Tabla 4. Extracción con H_2O de las GSP de *Octopus maya*.

Fase	Total (g)	Rendimiento (%)	Evaluación biológica
GSP liofilizadas	30	100	No determinada
Extracto crudo	10.6743	35.581	Positiva
Fracción Neurotóxica (FN_{acu})	2.9682	9.8994	Positiva

La extracción con agua de las GSP de *Octopus maya*, por las cantidades del disolvente empleado, requiere forzosamente la liofilización para eliminarlo, y esto implica un tiempo de extracción mayor (2 días). Al agregar Agua a las glándulas se forma una masa gelatinosa que ocasiona cierto problema al momento del manejo.

Dejando de lado estas desventajas, los rendimientos de los extractos son buenos y el efecto neurotóxico ocasionado en *Ocypode quadrata* se presenta en menor de 1 minuto.

b. Extracción con Metanol acidificado

Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 5.** Las muestras tratadas con Metanol fueron fáciles de manejar y se realizó una extracción en un tiempo aproximado de tres horas menor que el empleado para el procedimiento con H_2O.

Además, la técnica permite pasar rápidamente de la extracción a la separación por tamaño mediante ultrafiltración y de ésta a la extracción en fase sólida, debido a que el disolvente es retirado con facilidad.

En cuanto a rendimientos, estos son muy parecidos a los obtenidos con la extracción con H_2O. Sin embargo, el perfil cromatográfico de la fracción neurotóxica obtenida a partir del extracto metanólico es más complejo. Además,

cuando se realizó una EFS del extracto neurotóxico siguiendo el mismo perfil de elución empleado para el extracto obtenido con agua, se encontró que no se obtenían fracciones activas para el ensayo de neurotoxicidad.

Otra problemática que se presentó con esta metodología fue la oxidación de los extractos; las muestras tenían que protegerse constantemente de la luz y los extractos que se obtenían no eran fácilmente manejables.

Tabla 5. Extracción con Metanol acidificado de las GSP de *Octopus maya*.

Pasos de extracción	Total (g)	Rendimiento (%)	Evaluación biológica
GSP liofilizadas	30	100	No determinada
Extracto crudo	Nd	Nd	Positiva
Fracción Neurotóxica (FN_{acu})	2.7371	9.1236	Positiva

c. Extracción con Agua en ebullición/1 M Ácido Acético

La extracción con H_2O/Ácido Acético da lugar a una muestra difícil de manejar, aún más gelatinosa que la obtenida con Agua; después de liofilizar se obtuvo un extracto con una coloración negra indicativa de oxidación y un rendimiento mucho más bajo que el obtenido con la extracción con H_2O. La consistencia de la muestra, al momento de realizar la ultrafiltración, impidió el paso por las membranas, las cuales quedaban obstruidas totalmente. A pesar de ser una técnica reportada como la ideal para la extracción de péptidos pequeños e hidrófilos como la Neuroquinina A o Sustancia P, e incluso para el aislamiento de

Octoquininas a partir de GSP de *Octopus vulgaris* [41], se descartó inmediatamente por no obtener los resultados deseados.

Cada metodología presentó desventajas; sin embargo, al hacer un análisis comparativo de cada extracción, se concluyó que, en este caso, la técnica con la cual se obtuvieron los mejores resultados es aquella en la que se emplea únicamente agua como disolvente. Esta metodología llevaba como ventaja que ya había sido empleada anteriormente sobre las GSP de *Octopus maya* [14, 15], por lo que únicamente se reprodujeron los pasos, obteniéndose resultados similares a los reportados. Al utilizar extracciones selectivas para péptidos se deseaba que la extracción fuera en menor tiempo, encontrar fracciones más puras, en mayor cantidad y que conservaran la actividad biológica, situación que únicamente se logró con la extracción acuosa.

7.2 Bioensayo sobre *Ocypode quadrata* para evaluar la actividad del extracto crudo a partir de las GSP de *Octopus maya* y las fracciones obtenidas a partir de él

Para evaluar la actividad biológica se empleó el modelo neurotóxico *in vivo* sobre el cangrejo fantasma (**Fig. 22**). Los bioensayos en cangrejos han sido utilizados por varios autores [37, 54, 55]. En este caso, se presentaba una doble ventaja, el principal alimento de los octópodos son crustáceos, por lo que al inyectar al cangrejo una solución diluida del extracto crudo, podía apreciarse el efecto que la saliva de los octópodos tiene en sus presas naturales.

Las reacciones que se observaron fueron relajación, temblor, descoordinación y finalmente parálisis, las cuales fueron consideradas como acciones indicadoras de actividad biológica. Después de un tiempo el animal muere. Estas observaciones coinciden con lo reportado por Salvatorre en 1888, el cual describió por primera vez la toxicidad que la saliva del pulpo tenía contra los crustáceos, la cual ocasionaba dificultad en la locomoción, temblor irregular en los periopodos torácicos, seguido de inmovilidad y la posterior muerte [33].

Figura 22. Evaluación del extracto crudo en el bioensayo neurotóxico sobre *O. quadrata*.

7.3 Obtención de las fracciones neurotóxica y metabólica a partir del extracto crudo empleando ultrafiltración

Una vez obtenido el extracto crudo, se realizó un prefraccionamiento por tamaño molecular utilizando la técnica de ultrafiltración. Se utilizaron membranas AMICON con un tamaño de corte de 3 kDa [57].

Se obtuvieron dos fracciones, a la mayor a 3 kDa se le llamó fracción metabólica. La solución con esta fracción, al ser inyectada al cangrejo, ocasionó la muerte, tal y como había sido observado previamente. La fracción menor a 3 KDa fue denominada fracción neurotóxica (FN) por ser responsable de dicho efecto. En el ensayo *in vivo* sobre el cangrejo fantasma esta fracción ocasiono relajamiento, descoordinación y parálisis, efectos que son reversibles después de un tiempo [15]. En la **Tabla 4** (pág. 55) se indica el rendimiento obtenido para esta fracción.

El análisis de la FN por CLAR en fase reversa obtenida a partir del extracto acuoso se observa en la **Fig. 23.** Se observan 9 señales con tiempos de retención

distintos. A partir del minuto 23 de la corrida inicia la fase de lavado, en donde se elimina todo aquello que haya quedado fuertemente adherido a la columna, por lo que la señal 9 no es de nuestro interés. Cada señal observada en el cromatograma, de la 2 a la 8, nos indica que es un compuesto o una mezcla de compuestos; uno de ellos o el conjunto de varios o de todos ellos pueden ser responsables de la respuesta paralizante en los crustáceos.

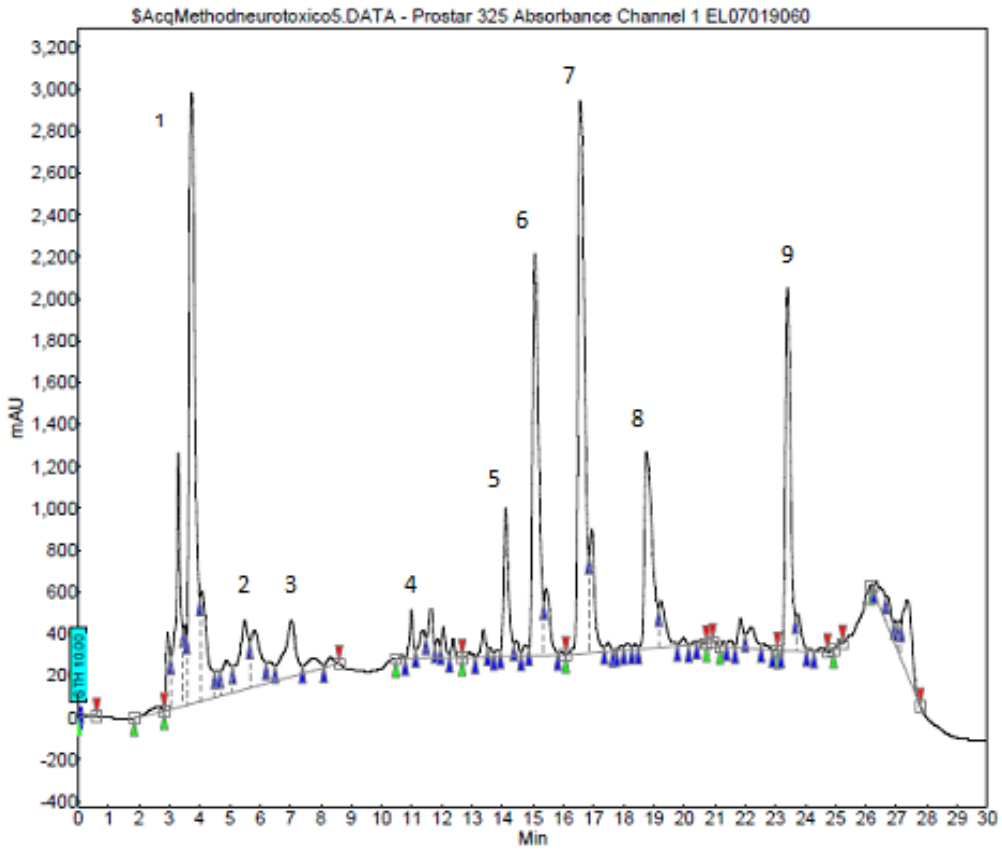


Figura 23. Cromatograma de la fracción neurotóxica obtenida de la extracción con agua y analizada mediante CLAR en fase reversa (pág. 43).

7.4 Separación biodirigida de la fracción neurotóxica mediante cartuchos de extracción en fase sólida (EFS) C-18 fase reversa

Para una separación más fina, para concentrar, quitar sales y purificar los compuestos deseados, la fracción neurotóxica se sometió a extracción de fase solida [56] por polaridad [58]. Para ello se utilizó un cartucho C-18U fase reversa (55 μm, 70A, Strata C18-U de Phenomenex®), eluyendo con distintos porcentajes de Agua:AcCN.

De las fracciones colectadas, tres son activas ante la prueba de neurotoxicidad. La primera fue obtenida a partir de la elución con 100% de Agua. Esta fracción es causante únicamente del efecto de parálisis y ha sido analizada en estudios previos [14, 15], encontrándose en ella la presencia de aminoácidos libres, principalmente el Ácido Glutámico. Esta fracción corresponde a las señales identificadas con los números 2 y 3 observadas en el perfil cromatográfico del extracto neurotóxico.

Las otras dos fracciones activas fueron 95:5 (FN_2) y 90:10 (FN_3), que ocasionaron relajación, descoordinación y parálisis en el cangrejo, efecto que se revirtió con el tiempo.

En la **Tabla 6** se observan los resultados obtenidos de la extracción en fase sólida que se realizó al extracto neurotóxico; en dicha tabla se señalan las fracciones que resultaron ser activas para el ensayo de actividad neurotóxica y los rendimientos obtenidos.

Tabla 6. Separación de los componentes de la fracción neurotóxica mediante EFS C18. La tabla muestra las eluciones que se realizaron al extracto neurotóxico acuoso. Las fracciones que resultaron bioactivas fueron marcadas: Negativa (-), Positiva (+), No determinado (Nd).

FRACCIÓN	EXTRACTO H_2O Elución % (H_2O:AcCN)	PESO (RENDIMIENTO)	ACTIVIDAD NEUROTOXICA
FN_1	100	Nd	**+**
FN_2	**95:5**	**25.5 mg (0.085 %)**	**+**
FN_3	**90:10**	**60.93 mg (0.2031 %)**	**+**
FN_4	80:20	Nd	-
FN_5	50:50	Nd	-

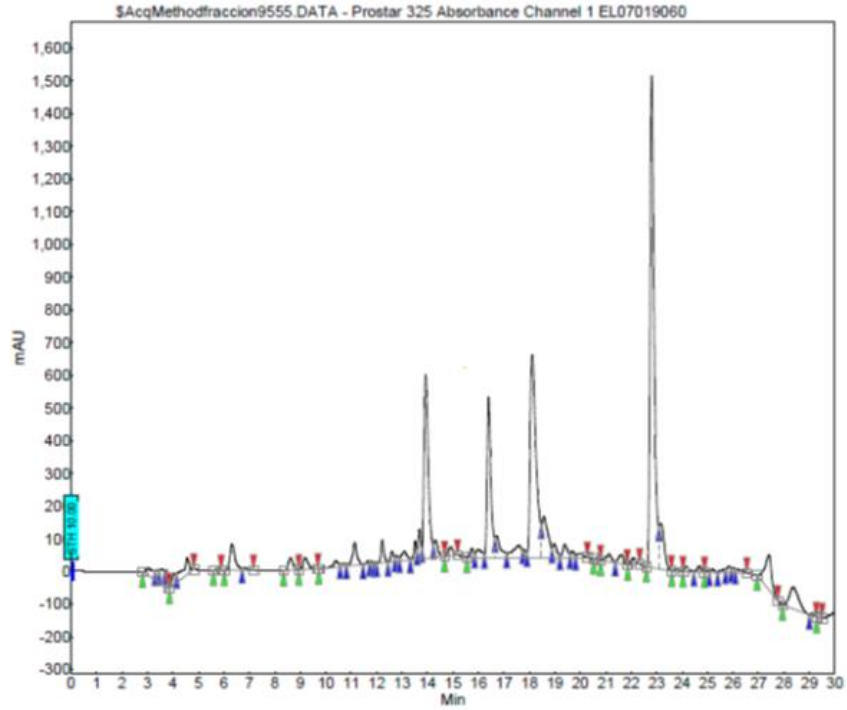
7.5 Análisis mediante CLAR en fase reversa de la fracción FN_3 (90:10) y la fracción FN_2 (95:15)

Las fracciones FN_2 y FN_3 fueron analizadas por CLAR fase reversa, los cromatogramas se muestran en la **Fig. 24**.

La fracción FN_3 tiene un mayor rendimiento, es activa en un menor tiempo y el efecto es más prolongado; su cromatograma muestra una señal mayoritaria que debido a la concentración en la que aparece podría ser la principal responsable del efecto paralizante. El perfil de esta fracción es menos complejo en comparación con el de la fracción FN_2 en el que aparecen varias señales. Por tales motivos el estudio se enfocó a la fracción FN_3. Es importante destacar que esta fracción había sido aislada anteriormente [15]; en el estudio realizado por Pech en el 2014 se sugirió que esta fracción contenía un péptido de mediana polaridad; el

principal objetivo del presente trabajo fue su aislamiento y obtención de la estructura o secuencia.

a.



b.

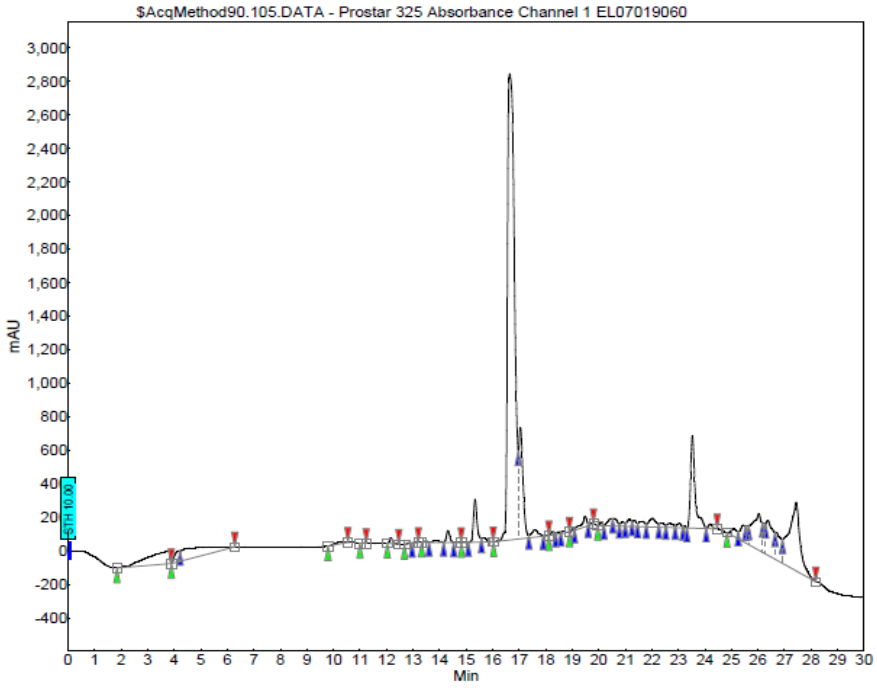


Figura 24. Cromatograma de las fracciones **a.** 95:5 y **b**. 90:10 (H_2O:AcCN) analizada mediante CLAR en fase reversa.

7.6 Fracción FN_3 (90:10)

7.6.1 Separación en cartucho de intercambio catiónico fuerte de la fracción FN_3 (90:10)

A la fracción FN_3 se le realizó una extracción en fase sólida de intercambio catiónico fuerte (SCX), con el fin de separar por carga los componentes presentes en ella.

En la **Tabla 7** se presentan los resultados, en donde se muestra el rendimiento de las fracciones que tuvieron actividad biológica. Las eluciones que se llevan a cabo con 1% y 2% de NH_4OH en MeOH son activas para el ensayo de cangrejo fantasma. La fracción del 2% (FN_{3-5}) muestra actividad en un menor tiempo y el efecto es más prolongado. Al ser analizada por CLAR fase reversa se obtiene un cromatograma sencillo, en el cual se observa una única señal en el tiempo de retención de 16 minutos (**Fig. 25b**), a diferencia de la fracción obtenida de la elución al 1% (FN_{3-4}), cuyo perfil muestras tres señales (**Fig. 25a**).

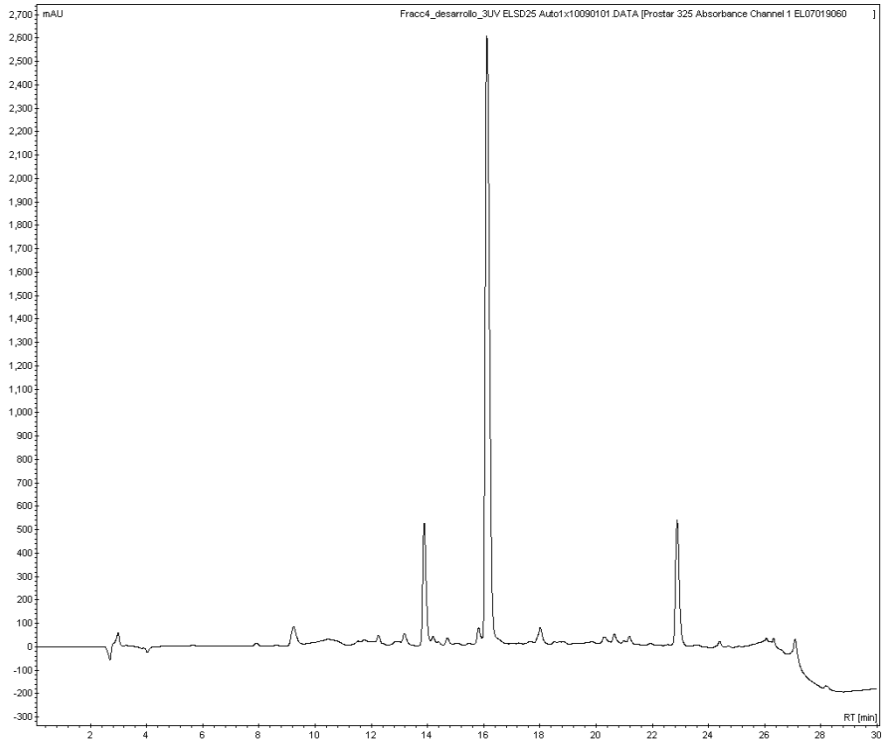
Por lo anterior, FN_{3-5} reveló ser la fracción que tenía una mayor pureza y potencia, y la presencia de una sola señal indicaba una gran probabilidad de ser un solo compuesto.

Para comprobar este resultado y verificar la presencia de un solo compuesto, a la fracción FN_{3-5} se le realizó un análisis CLAR con una columna de intercambio catiónico (Luna SCX). El perfil mostro una única señal.

Tabla 7. Separación de los componentes de la fracción FN_3, mediante extracción en fase sólida de intercambio catiónico fuerte. La tabla muestra las eluciones que se realizaron a la fracción bioactiva FN_3. Negativa (-), Positiva (+), no determinado (Nd).

FRACCIÓN (FN_{acu3})	ELUCIÓN	Peso (rendimiento)	ACTIVIDAD
FN_{3-1}	H_2O:TFA 90:10 FN_{acu3-1}	Nd	-
FN_{3-2}	HCl 0.1 N en H_2O FN_{acu3-2}	Nd	-
FN_{3-3}	HCl 0.1 N en MeOH FN_{acu3-3}	Nd	-
FN_{3-4}	1% NH_4OH en MeOH FN_{acu3-4}	11.2 mg (0.037 %)	+
FN_{3-5}	**2% NH_4OH en MeOH FN_{acu3-5}**	**11.2 mg (0.037%)**	**+**
FN_{3-6}	4% NH_4OH en MeOH FN_{acu3-6}	Nd	-
FN_{3-7}	5% NH_4OH en MeOH FN_{acu3-7}	Nd	-

a



b.

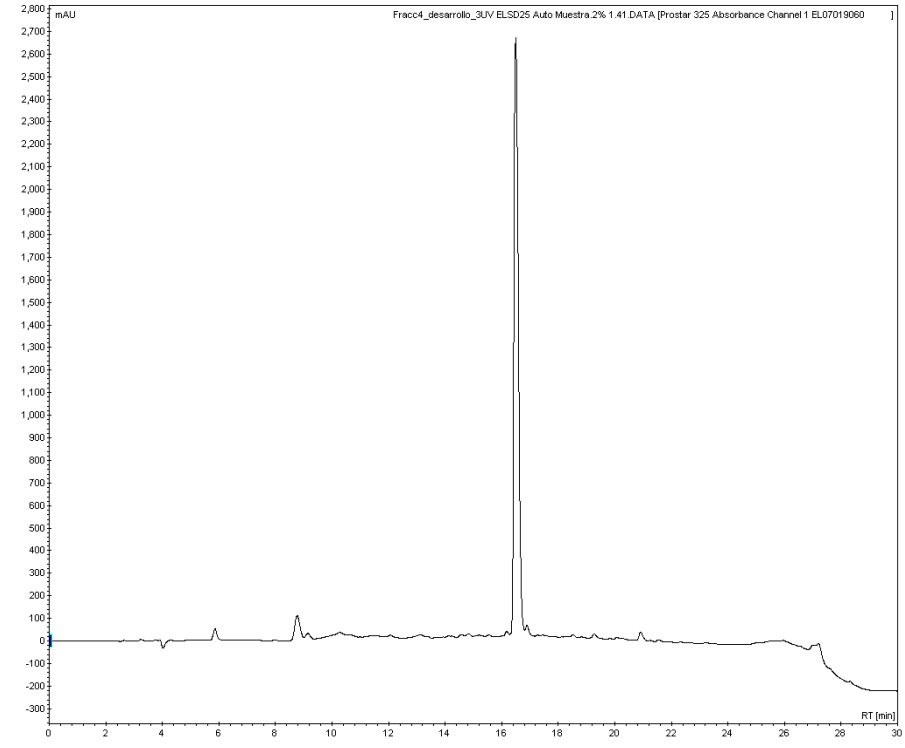


Figura 25. Cromatogramas de las fracciones **a.** FN_{3-4} y **b.** FN_{3-5} analizadas mediante CLAR en fase reversa.

7.6.2 Estudios de espectroscopia de RMN realizados a la fracción FN_{3-5}

Debido a que los resultados de CL-EM no concordaban con lo propuesto por Pech en el 2014, se especuló que probablemente la Fracción FN_{3-5} está compuesta por un péptido y otro compuesto. Para aprobar o descartar la hipótesis, se realizó un estudio de RMN.

La fracción FN_{3-5} se inyectó en CLAR semipreparativo en una columna C18 Luna fase reversa, y se colectaron 2 mg de la señal con un tiempo de retención de 16 min los cuales se analizaron por RMN.

El espectro de ^{13}C RMN de FN_{3-5} purificada (llamada simplemente FN_{3-5} de aquí en adelante) (**Fig. 26**) mostró la presencia de un total de 10 señales de átomos de carbono, de entre las cuales, dos señales (22.56 y 39.60 ppm) correspondieron a átomos de carbono de hibridación sp^3 y las ocho señales restantes (102.46, 108.40, 111.86, 112.86, 125.33, 127.06, 131.61 y 148.78 ppm) se asignaron a átomos de carbono con hibridación sp^2.

La fórmula molecular de la Serotonina $C_{10}H_{12}N_2O$, de acuerdo con el cálculo del índice de deficiencia de hidrógeno, sugiere una estructura con 6 sitios de instauración, concordante con el espectro de ^{13}C RMN de la fracción FN_{3-5}.

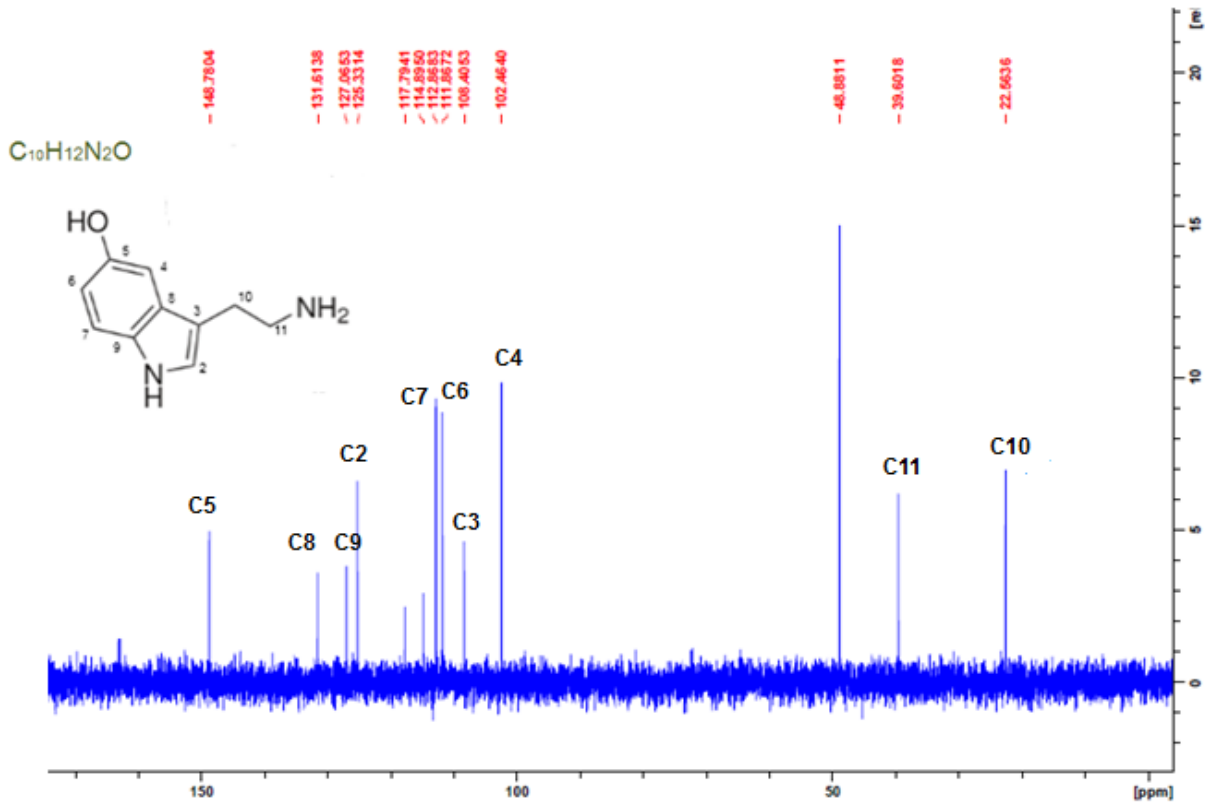


Figura 26. Fracción FN_{3-5} analizada mediante RMN (^{13}C).

El espectro ^{1}H RMN de FN_{3-5} mostró la presencia de 4 señales de protones aromáticos entre 6.8-7.5 ppm, de las cuales tres de ellas presentaron desdoblamientos correspondientes a sus acoplamiento con otros protones en posiciones orto y meta. El protón a 6.89 ppm (dd, 1H, *J*= 2.3, 8.7) mostró características propias de un protón con un acoplamiento en orto y en meta; el protón a 7.11 ppm (d, 1H, *J*=2.3 Hz) mostró un acoplamiento en meta; así mismo el protón a 7.43 ppm (d, 1H, *J*= 8.7 Hz) mostró acoplamiento en orto. Dada las multiplicidades de estos tres protones aromáticos y sus multiplicidades observadas y confirmadas en el ^{1}H-^{1}H- COSY, se comprobó la presencia de un sistema 1,2,4 trisustituido. El cuarto protón aromático a 7.30 ppm (s) indicó la presencia de un segundo anillo aromático con un único protón aislado sin ningún acoplamiento. La

presencia de estas señales de protones de dos anillos aromáticos confirma las señales de carbonos sp^2 observados en el ^{13}C RMN (**Fig. 27**).

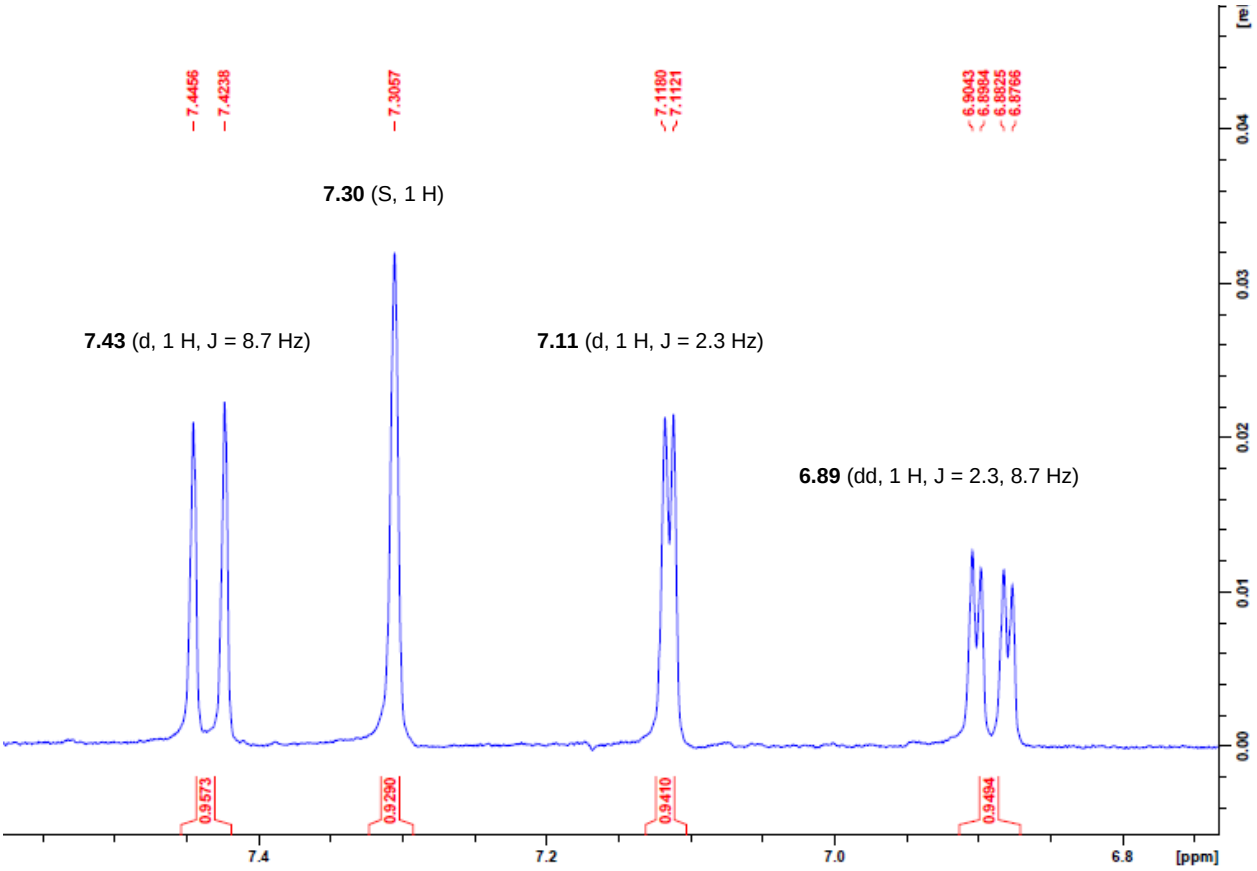


Figura 27. Fracción $FN_{3\text{-}5}$ (^1H RMN). Espectro parcial.

Finalmente el espectro de ^1H RMN de $FN_{3\text{-}5}$ también mostró la presencia de dos señales a 3.13 ppm (t, 2H, *J*= 7 Hz) y 3.32 ppm (t, 2H, *J*= 7Hz) que corresponden a dos metilenos adyacentes y cuyo desplazamiento es característico de protones unidos a carbono enlazados a un sustituyente electronegativo (oxígeno o nitrógeno) y además en posición bencílica, confirmando de esta manera a los dos átomos de carbono sp^3 que se observaron en el ^{13}C RMN (**Fig. 28**).

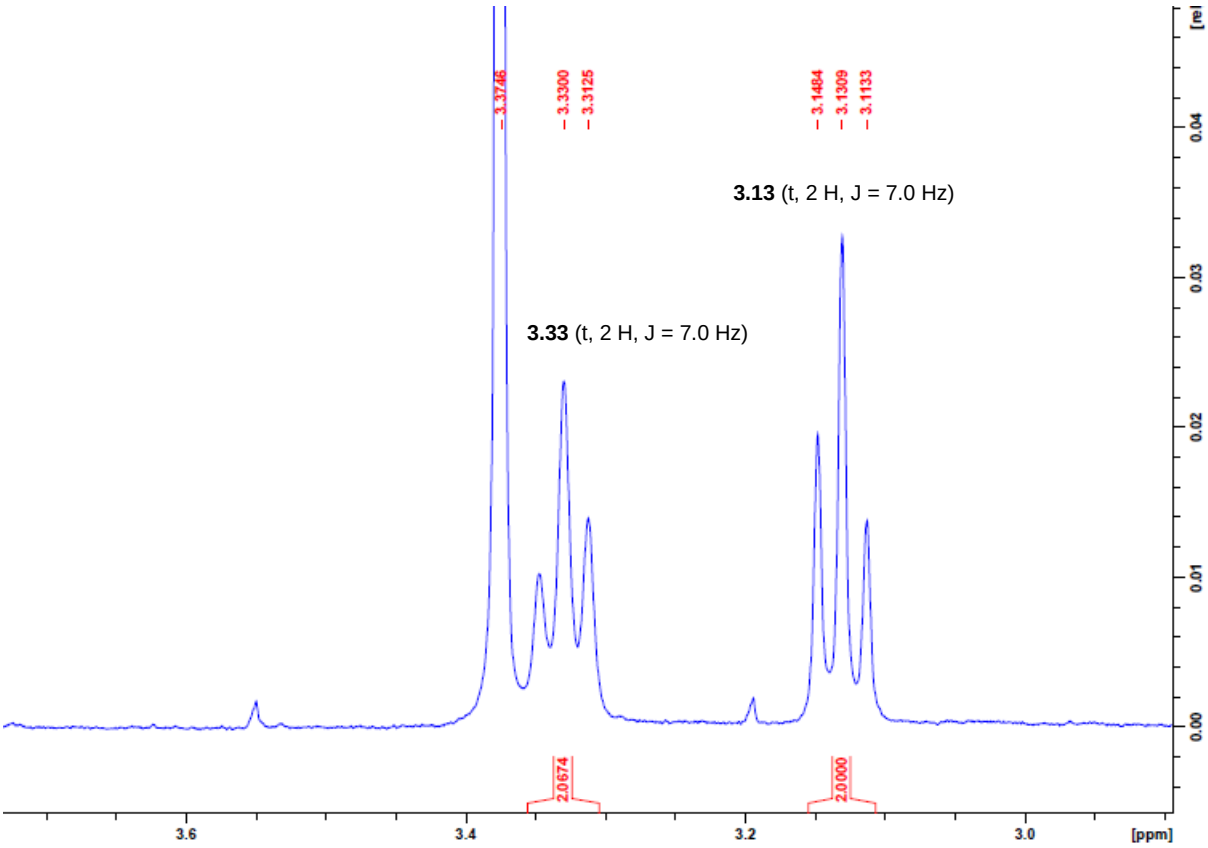


Figura 28. Fracción $FN_{3\text{-}5\ \text{purificada}}$ (^{1}H RMN). Espectro parcial.

La naturaleza química de cada uno de los átomos de carbono de $FN_{3\text{-}5}$ fue definida mediante un análisis combinado de su espectro de ^{13}C RMN y del experimento HSQC (**Fig. 29**). El análisis de las señales indicó que la estructura de $FN_{3\text{-}5}$ purificada incluye dos metilenos, 4 metinos y 4 carbonos cuaternarios. El desplazamiento de uno de los carbonos cuaternarios (148.78) indicó claramente su naturaleza aromática y su unión a Oxígeno. El análisis detallado del HSQC permitió asignar cada uno de los protones observados a sus respectivos carbonos. La suma de los protones correspondientes a los grupos metilo, metileno y metino de $FN_{3\text{-}5}$, sugiere que los tres protones faltantes en los espectros corresponden al grupo oxhidrilo (OH) y al grupo amino (NH_2) presentes en la serotonina.

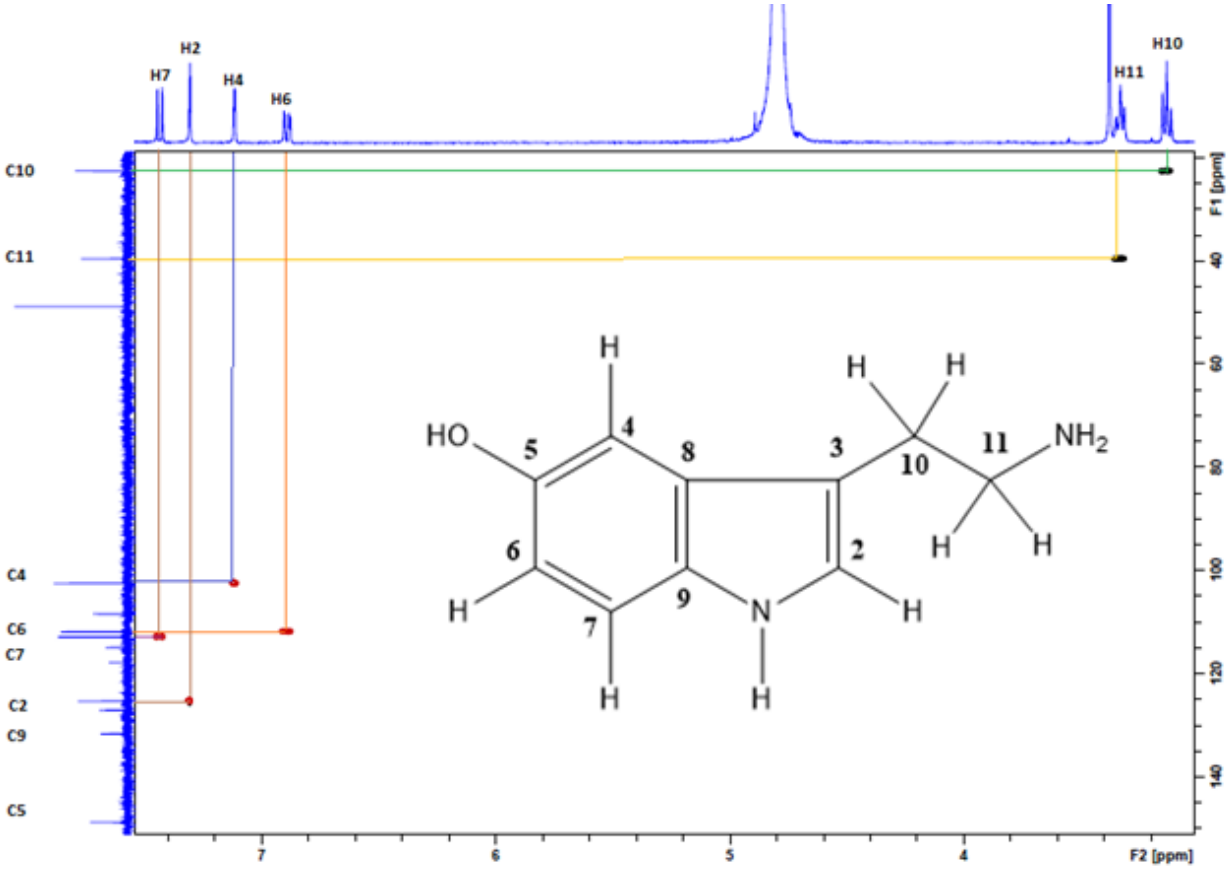


Figura 29. Experimento HSQC de la fracción $FN_{3\text{-}5}$ purificada.

Para concluir el estudio espectroscópico de $FN_{3\text{-}5}$, tentativamente identificada como Serotonina, se realizó el análisis de su experimento HMBC (**Fig. 30**), el cual muestra las correlaciones entre protones y carbonos ubicados a dos (^2J) y tres (^3J) enlaces de distancia. Los resultados de la interpretación del HMBC de $FN_{3\text{-}5}$ mostraron varias correlaciones que permitieron confirmar la estructura de la molécula.

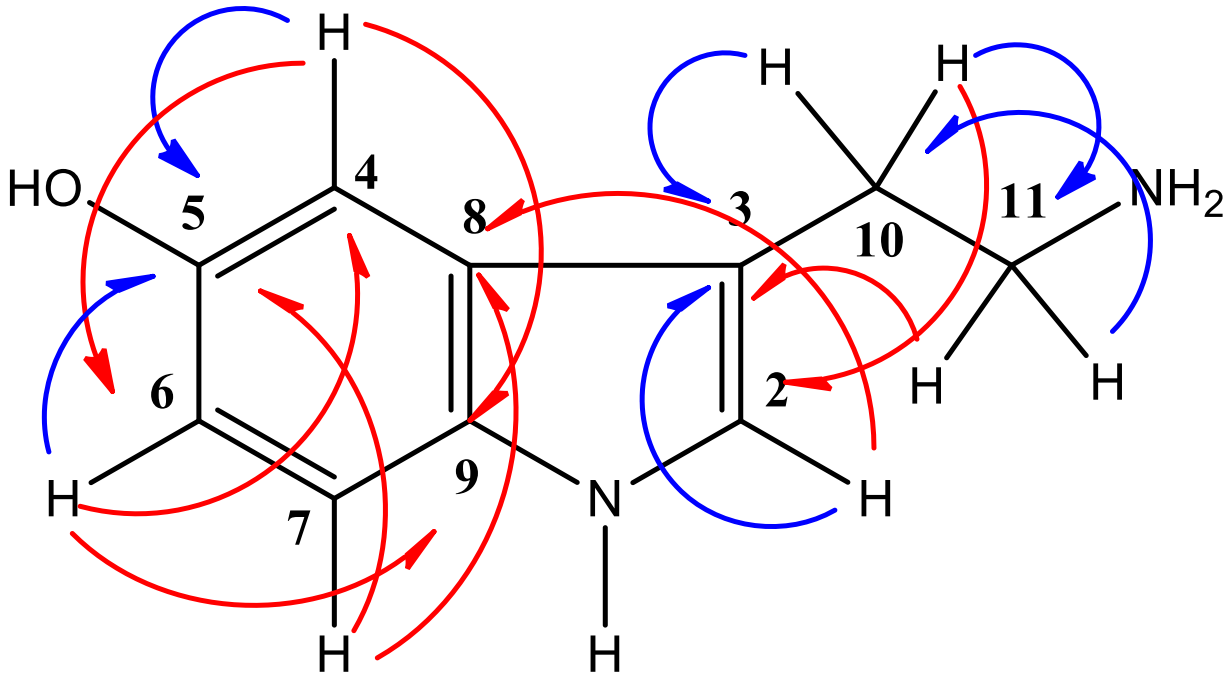


Figura 30. Análisis del experimento HMBC. Conformación de la estructura de Serotonina. Correlaciones entre protones y carbonos ubicados a dos (^{2}*J-Azul*) y tres (^{3}*J-Rojo*) enlaces de distancia.

7.6.3 Estudios espectrométricos (CG-EM) realizados a la fracción $FN_{3\text{-}5}$

Una vez concluidos los experimentos de RMN, se evaporó el disolvente de la muestra, reconstituyó en cloroformo, y se analizó por CG-EM, mediante introducción directa.

En la **Fig. 31** se muestra el cromatograma de la fracción $FN_{3\text{-}5}$, en donde puede observarse una sola señal que se encuentra en un tiempo de retención de 3.265 minutos.

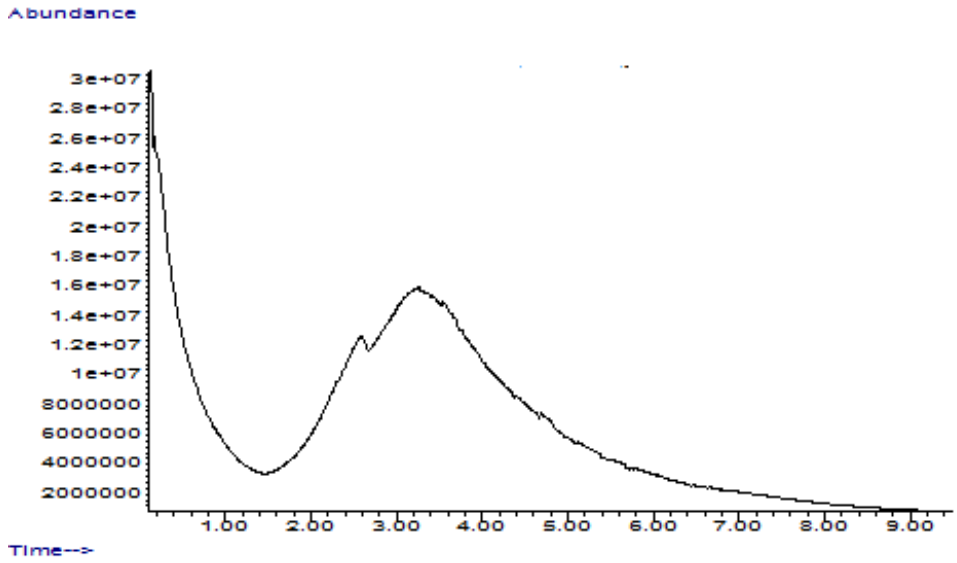


Figura 31. Cromatograma de la fracción $FN_{3\text{-}5}$ analizada mediante CG-EM.

El espectro de masas de alta resolución de esta señal mostró un ion molecular de 179.10 m/z, que corresponde a una masa molecular de 178.10 Da (**Fig. 32**).

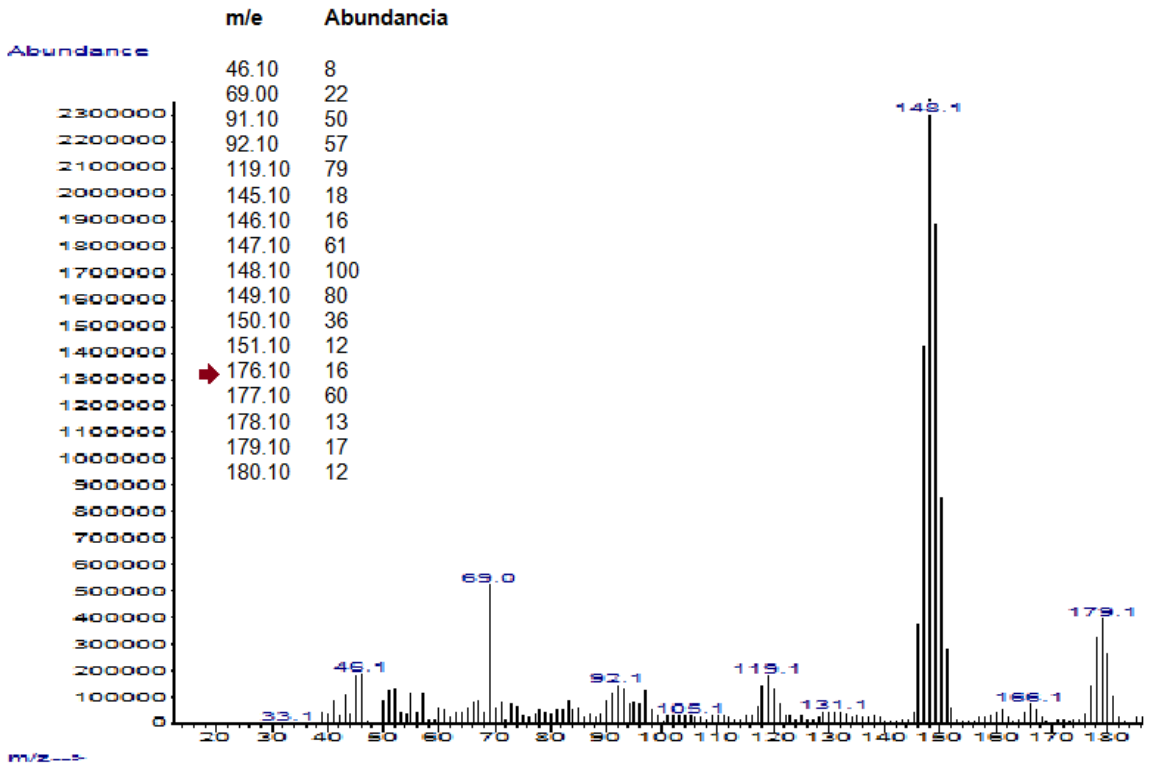


Figura 32. Espectro de Masas de la fracción $FN_{3\text{-}5}$ analizada mediante CG-EM.

Se realizó una búsqueda en la literatura y en bases de datos tratando de ubicar una estructura que correspondiera al PM señalado y a los patrones de fraccionamiento y abundancia relativa obtenidos. Los resultados sugirieron que el PM de $FN_{3\text{-}5}$, correspondía a la Serotonina (**Fig. 33**), la cual tiene una fórmula molecular $C_{10}H_{12}N_2O$ ([M]= 176 Da; su estructura está formada por un sistema aromático bicíclico, un grupo hidroxilo y un grupo amino. La diferencia (2 Da) del peso molecular determinado es debida a que la muestra inyectada en el sistema CG-EM provenía del experimento de RMN, para el cual se disolvió en Cloroformo deuterado, por lo que la muestra está deuterada. Inclusive los fragmentos obtenidos en la muestra exponen las diferencias de la deuteración de los fragmentos.

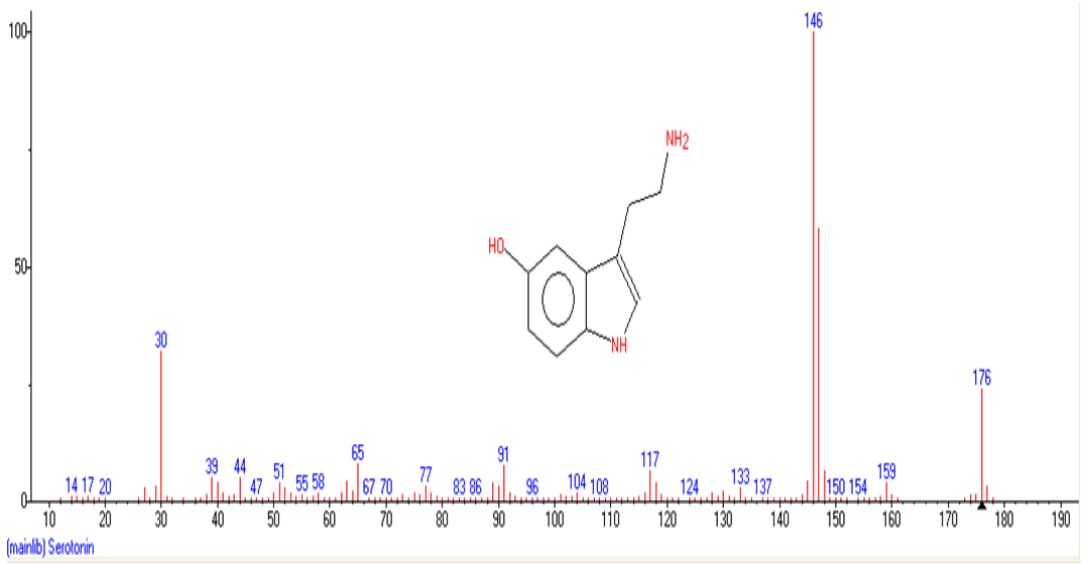


Figura 33. Espectro de masas correspondiente a un estándar de serotonina.

Para reafirmar estos resultados se inyectó por CLAR analítico en fase reversa un estándar de Serotonina a la par de la fracción $FN_{3\text{-}5}$. El cromatograma de la **Fig. 34** muestra que la Serotonina inyectada bajo las mismas condiciones aparece en el mismo tiempo de retención que la fracción $FN_{3\text{-}5}$.

Adicionalmente, se inyectó al cangrejo fantasma con el mismo estándar de Serotonina, observándose que el efecto de parálisis y descoordinación que era ocasionado por la fracción FN_{3-5} es igual que el producido por el estándar.

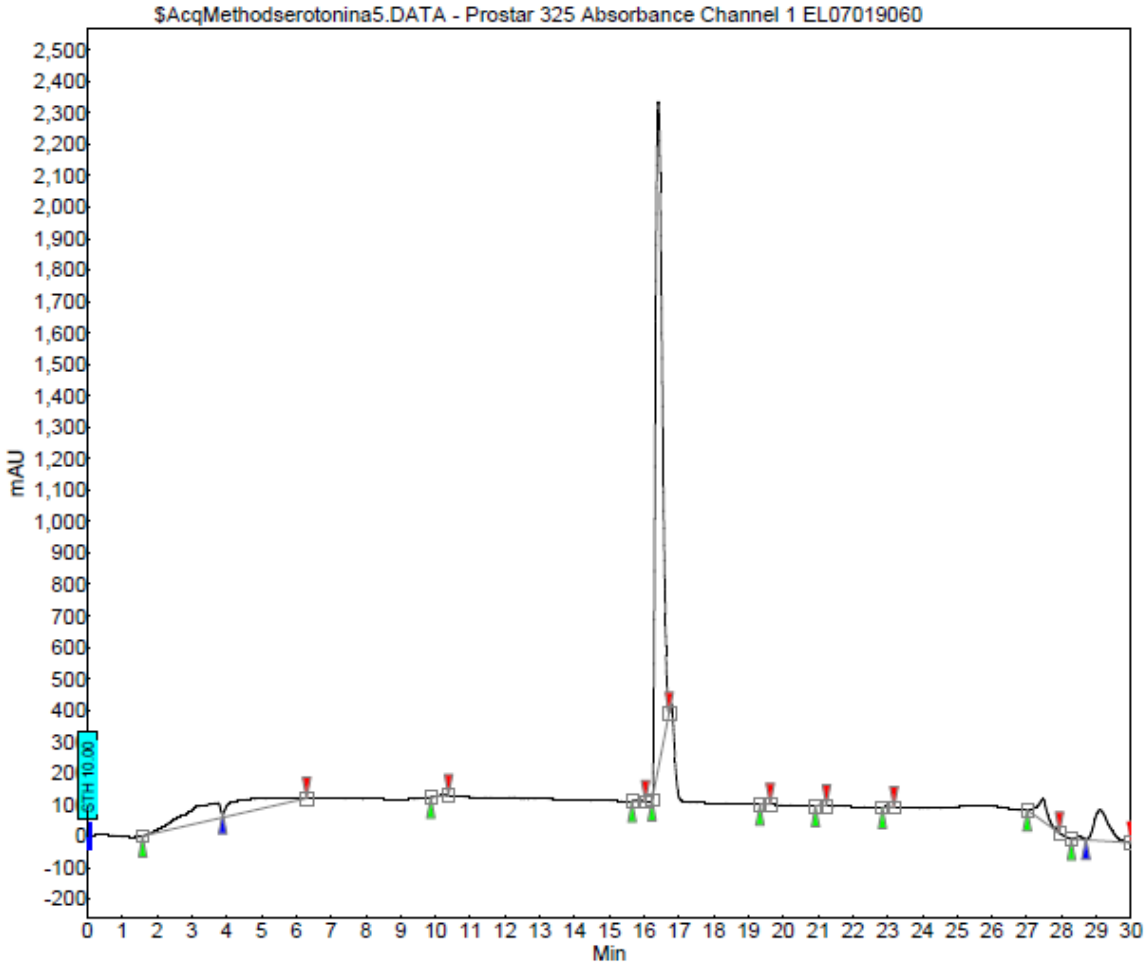


Figura 34. Estándar de serotonina analizado por CLAR fase reversa.

Con estos resultados se comprobó que la fracción FN_{3-5} contiene únicamente Serotonina y que el perfil de aminoácidos reportado por Pech en el 2014 fue resultado de una fracción probablemente contaminada durante la manipulación de la muestra o que no alcanzó a purificarse totalmente durante el proceso de separación.

Las aminas tienen un carácter básico y son aceptoras de protones al estar en medios ácidos [59, 60]. Es por ello que cuando se aplicó la técnica de intercambio catiónico para la separación de FN_3, se obtuvo una fracción que indicaba la existencia de un compuesto con carga positiva.

Se han aislado aminas biogénicas a partir de la saliva y de las GSP de algunas especies de octópodos, como la Tiramina, la Noradrenalina, la Histamina, y la Acetilcolina [36]. Erspamer en 1948, logró el aislamiento de Octopamina y Serotonina [40]. Los estudios revelan que por separado, cada una de estas aminas tiene efecto de relajamiento, descoordinación y parálisis sobre cangrejos; sin embargo ninguna es capaz de ocasionar la muerte [36].

Muchos de los venenos encontrados en distintitas especies, actúan como agonistas, antagonistas o moduladores de los receptores monoaminérgicos o efectúan la liberación, recaptación o síntesis de monoaminas [61].

En el presente estudio se ha fraccionado el extracto de GSP de *O. maya* y el componente mayoritario ha sido identificado como serotonina, la cual fue inyectada directamente sobre *O. quadrata* comprobando que el efecto neurotóxico prevalece y ocurre en un menor tiempo que cuando se inyecta el extracto completo, por lo que esta monoamina podría ser la responsable de dicho efecto.

La Serotonina se genera y almacena en un sistema particular de células conocido como células enterocromafines. Este sistema se encuentran en vertebrados y algunos grupos de invertebrados y se distribuyen generalmente en la mucosa gastrointestinal, en la piel o en formaciones glandulares bien definidas, como es el caso de las GSP de cefalópodos [62, 63]. Cuando se aisló por primera vez, se le dio el nombre de Enteramina por las células de las cuales provenía; tiempo después se confirmó que era idéntica a la Serotonina aislada en 1949 por Rapport [61]. La concentración de Serotonina en los tejidos responsables de su formación y liberación así como en la saliva, es variable, siendo las GSP las que tienen mayor concentración, seguidas de la saliva. Se pueden encontrar concentraciones

muy pequeñas en los centros salivales del cerebro y en los nervios de las GSP [64].

La Serotonina actúa sobre receptores específicos, hasta el momento se han identificado 7 familias de receptores de 5-HT y se han clonado 20 subpoblaciones de ellos; la gran cantidad de receptores explica la versatilidad de la molécula en cuanto a su intervención en distintos procesos fisiológicos y patológicos. Estos receptores se encuentran en su mayoría ligados a proteínas G y activan un sistema de segundos mensajeros (IP_3 y cAMP) que actúan sobre receptores y canales iónicos en la membrana celular [61, 65].

Algunos estudios demuestran que las secuencias y acoplamientos de segundos mensajeros de los receptores de 5-HT son relativamente bien conservados a través de todas las especies, aunque los perfiles farmacológicos pueden variar significativamente entre vertebrados e invertebrados [66, 67]. Los octópodos utilizan los componentes de sus venenos no solo para atacar a su presa, sino también como mecanismo de defensa y por ello es la importancia de que las características de los receptores entre especies sean conservadas y tengan una convergencia evolutiva [61].

Se ha estudiado el efecto que tiene la Serotonina contenida en algunos venenos sobre distintas especies de invertebrados. En algunos moluscos ocasiona vasodilatación permitiendo acelerar los efectos del veneno en la presa. La Serotonina contenida en el veneno del caracol *Conus imperialis* ocasiona relajación muscular en su presa. La mayoría de venenos inducen parálisis muscular en las presas, pero este efecto es atribuido a sus moléculas activas que son péptidos o proteínas. En el caso del caracol marino de La Coruña, esto no ocurre, y la serotonina es la responsable de la parálisis muscular de los bivalvos ocasionando una relajación del músculo liso [61].

En el caso de los crustáceos, se ha observado que la Serotonina desempeña múltiples papeles, los cuales pueden ser observados dependiendo de la dosis, duración y método por el cual ha sido administrada la amina. Esto sucede porque

los crustáceos expresan diferentes tipos de receptores 5-HT y su expresión o señalización puede variar en respuesta a estímulos ambientales. Los subtipos de receptores difieren, uno del otro, en su afinidad por la Serotonina, su ubicación y acciones en el Sistema Nervioso y su farmacología. Se han realizado estudios en algunas especies de crustáceos y se ha observado que bajas concentraciones de Serotonina reducen la locomoción y mayores concentraciones inducen distintas posturas durante tiempos prolongados. Estos dos efectos han sido relacionados con los receptores de serotonina $5HT_1$ y $5HT_2$, receptores acoplados a proteínas G que incrementan los niveles celulares de IP_3 (inositol trifosfato) y DAG (diacilglicerol), ocasionando respuestas contráctiles de una gran variedad de tejidos que contienen músculo liso. La serotonina actúa sobre las neuronas motoras y la unión neuromuscular localizadas en el músculo flexor abdominal, el cual es esencial para las distintas posturas observadas en el crustáceo [68, 69].

El canibalismo es un comportamiento muy extendido en los octópodos, por distintas causas: territoriales o cuando la tasa de alimentación es superior al alimento disponible. También es una estrategia que les permite reaccionar ante condiciones ambientales adversas por el aumento y reducción de su número [70]. No existe información sobre cómo un pulpo depreda a una misma especie congénere. Los resultados de algunos estudios sugieren que una de las maneras de matar a su víctima es la asfixia, sin embargo la inyección del contenido de sus GSP no puede ser descartada [71].

Pech en el 2014, como parte de su estudio, inyectó la fracción FN_{3-5} sobre *O. maya,* sin saber que ésta era Serotonina. En este estudio se reportó que la amina ocasionó un efecto de parálisis parcial en el octópodo [15]. Se ha reportado que la inyección de Serotonina en la aorta cefálica de los cefalópodos ocasiona un cambio de coloración, la cual mostró un patrón moteado ocasionado por la contracción periódica de músculos y expansión de cromatóforos [72]. En un estudio *in vitro* se demostró que la Serotonina ocasiona un aumento en la frecuencia cardiaca, ya que la amplitud del pulso aparece inicialmente reducida y después aumenta [73].

A pesar de que el efecto de los venenos contenidos en las GSP de los cefalópodos es el mismo en todas sus presas, su composición no lo es. Esto puede ser debido a procesos de adaptación biológica específica la cual esta directamente ligada con las características de su hábitat.

Por ejemplo, la concentración de serotonina en las GSP varía con las especies, siendo *O. vulgaris* y *E. cirrhosa* en las que mayor concentración se ha encontrado. En algunos octópodos como *O. macropus*, *L. vulgaris* y *S. officinalis* no se ha detectado la presencia de 5-HT en sus venenos. En 1973, Juorio y Killick señalan que estas especies tienen un pico y una rádula más desarrollados que los hace más eficientes al momento de alimentarse. La sugerencia es que las especies con pico y rádula menos eficiente, secretan las aminas con el fin de mejorar la absorción o prolongar el efecto de sus toxinas o péptidos, en caso de que estos estén presentes en sus GSP [62].

Dicho lo anterior, no se puede afirmar que la Serotonina contenida en las GSP de *Octopus maya* es la única responsable del efecto de parálisis, ya que durante la separación del extracto obtenido a partir de las GSP, se obtuvo una fracción (FN2) con actividad biológica sobre los crustáceos que no fue estudiada hasta ahora. Esta fracción podría ser un péptido y la Serotonina podría estar prolongado su efecto, como lo observado para otras especies de octópodos, como *O. vulgaris o E. cirrhosa*, quienes cuentan con una concentración elevada de Serotonina y otras monoaminas en sus GSP, pero también contienen péptidos de la familia de las taquicininas.

8 CONCLUSIONES

- La extracción acuosa de las GSP de *Octopus maya* permitió obtener fracciones más puras, con mayor potencia y en mayor cantidad, en comparación con las extracciones en las que se emplearon Ácido Acético y Metanol como disolventes.
- El extracto acuoso obtenido a partir de las GSP de *O. maya* ocasiona relajación, descoordinación, parálisis y posteriormente la muerte sobre *O. quadrata.*
- Al realizar la separación por tamaño molecular del extracto acuoso, se obtuvieron dos fracciones: Una fracción menor a 3 kDa con efecto neurotóxico reversible (FN) y una fracción mayor a 3 kDa con efecto metabólico (FM), causante de la muerte.
- La separación biodirigida de la FN utilizando EFS, dio lugar a dos fracciones con actividad biológica FN_2 y FN_3.
- A partir de FN_3, se aisló la fracción FN_{3-5} la cual, con ayuda de técnicas espectroscópicas y espectrométricas, fue identificada como Serotonina.
- La fracción FN_{3-5} ocasiona relajación, descoordinación y parálisis sobre *O. quadrata*.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Garateix, A., El mar: fuente de nuevos fármacos. *Ciencia y Cultura Elementos*. **2005**,12, 39-47.
2. Bouchet, Philippe. The magnitude of marine biodiversity. Duarte, C. ed. *The exploration of marine biodiversity: Scientific and technological challenges*. France. **2006**, 33-64.
3. Reaka-Kudla, M. L. The global biodiversity of coral reefs: a comparision with rain forest- In M. L. Reaka-Kudla, D. E. Wilson and E. O. Wilson, eds. *Biodivesity II*. Washington: Joseph Henry Press, **1997**, 83-108.
4. Rocha, F. Biología, ecología, cultivo y pesquerías de cefalópodos; Instituto de Investigaciones Marinas: Vigo, España, **2003**.
5. Boletzky, S. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. **1983**.
6. Budelman, U. B., Shipp, R., Von Boletzky, S., Cephalopoda. Wiley Liss Inc. **1997**,6, 119-414.
7. Boucaud, E.; Boucher, R. Feeding and Digestion in Cephalopods. *The Mollusca*, **1983**, 5.
8. Grisley, M. S., Separation and partial characterization of salivary enzymes expressed during prey handling in the octopus *Eledone cirrhosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, **1993**,105 (1), 183-192.
9. Guerra, A.; Allcock, L.; Pereira, J. Cephalopod life history, ecology and fisheries: An introduction. *Fisheries Research*, **2010**, 106, 117–124
10. Rosas, C., Caamal, C., Cázares, R., Rodríguez, D., Romero, M. y Chay, D. **2006**. Manual preliminar para el cultivo del pulpo *Octopus maya*. Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 36 p.
11. Rosas, C.; Gallardo, P.; Mascaró, M.; Caamal, C. *Octopus maya*. In J. Iglesias et al. (eds.), Cephalopod Culture, Springer Science Business **2014.**
12. Solís Ramírez, M. Aspectos biológicos del pulpo : *Octopus maya*. Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras: México, **1967**.

13. Comisión Nacional De Acuacultura y Pesca (**2014**). Anuario estadístico de acuacultura y pesca. SECRETARÍA DE AGRICULTURA, G., DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN
14. Campos, G. Estudio Químico del efecto paralizante de la saliva del pulpo rojo de Yucatán (Octopus maya). Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, **2013**.
15. Pech, D. Obtención de compuestos bioactivos presentes en las Glándulas saivales posteriores del pulpo *Octopus maya*. Universidad Nacional Autónoma de México, México,DF, **2014**.
16. Jiménez, C., El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. **2013**,2, 134-141.
17. Lewis, R., García, ML, Therapeutic potential of venom peptides. **2003**.
18. Harvey, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*. **2000**, 5 (7), 294-300.
19. Harvey, A. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*. **2008**, 13 (19), 895-901.
20. Blunt, J., Buckingham, J., Munro, M., Taxonomy and Marine Natural Products Research. In Handbook of Marine natural Products, E. Fattorusso, W. H. G., O. Taglialatela-Scafati, Ed. **2012**.
21. Cragg, G.; Newman D. Drug Discovery and Development from Natural Products: The Way Forward. 11th NAPRECA Symposium Book of Proceedings, Antananarivo, Madagascar, 56-69
22. Rollinger, J.; Stuppner, H.; Langer, T. Virtual screening for the discovery of bioactive natural products. Frank Petersen and René Amstutz, Eds. Progress in Drug Research, Vol. 65, **2008**. 213-249
23. Chin, Y.; Balunas, M.; Byung, H. Drug Discovery from Natural Sources. R. S. Rapaka and W. Sadée, eds. Drug Addiction. American Association of Pharmaceutical Scientists. **2008**, 17-39.
24. Houssen, W.; Jaspars, M. Isolation of Marine Natural Products. Satyajit D. Sarker and Lutfun Nahar (eds.), Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology, vol. 864, Springer Science Business Media, **2012**, 367-392.

25. Mayer, A. M. S.; Rodríguez, A. D.; Taglialatela-Scafati, O.; Fusetani, N., Marine pharmacology in 2009-2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Drugs* **2013**,11 (7), 2510-2573.
26. Helmholz, H. Natural Substances of Marine Origin with Toxic Properties. M. Quante et al. (eds.), Persistent Pollution – Past, Present and Future. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* **2011**, 319-335.
27. Jiménez, C.; Torres, R.; Corcuera, P. Biodiversidad. Una alerta. Casa del Tiempo **2010**, 3 (36), 9-16.
28. Comisión Nacional para el Conocimeinto y Uso de la Biodiversida (CONABIO), Capital natural y bienestar social, México, CONABIO. Capital Natural de México:conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad, México, CONABIO, **2009**.
29. Ibañez, E.; Herrero, M.; Mendiola, J.; Castro, M. Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. M. Hayes, ed, Marine Bioactive *Compounds: Sources, Characterization and Applications*, Springer Science Business Media, **2012**, 55-98.
30. Sykes, A.; Koueta, N.; Rosas, C. Historical Review of Cephalopods Culture. J. Iglesias et al. (eds.), *Cephalopod Culture*., Springer Science Business Media Dordrecht **2014**
31. Corneta, V.; Henry, J.; Corred, E.; Le Corguilled, G.; Zanuttinie, B. Dual role of the cuttlefish salivary proteome in defense and predation. Elsevier **2014**.
32. Grisley, M. S. et al. Factors affecting prey handling in lesser octopus (*Eledone cirrhosa)* feeding on crabs (*Carcinus maenas*), *Journal of Marine Biology*, 79(6), **1999**, pp. 1085-1090.
33. Ghiretti, F., Toxicity of octopus saliva against Crustacea. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1959**,90, 726-741.
34. Norman, M.D. & A. Reid **2000**. A Guide to Squid, Cuttlefish and Octopuses CSIRO Publishing, Victoria, 96 pages.

35. Fry, B., Tentacles of Venom: Toxic Protein Convergence in the Kingdom Animalia. *Journal of Molecular Evolution* **2009**,68 (4), 311-321.
36. Guiretti, F. Cephalotoxin: the crab-paralysing agent of the posterior salivary glands of cephalopods. *Nature*. **1960**. 183, 1192-1193.
37. Cariello, L.; Zanetti, L. α- and β-cephalotoxin: two paralyzing proteins from posterior salivary glands of *Octopus vulgaris*. Comparative Biochemistry and Physiology. **1977**. 57, 169-173.
38. Ueda, A.; Nagai, H.; Ishida, M.; Nagashima, Y.; Shiomi, K. Purification and molecular cloning of SE-cephalotoxin, a novel proteinaceous toxin from the posterior salivary gland of cuttlefish *Sepia esculenta*. *Toxicon*. **2008**. 52, 574-581.
39. Scheumack, D. D.; Howden, M. E.; Spence, I; Quinn, R. J. Maculotoxin: a neurotoxin from the venom glands of the octopus *Hapalochlaena maculosa* identified as tetradotoxine. *Science* **1978**. 199, 188-189.
40. Erspamer, V. Active Substances in the posteriori salivary glands of octopoda. Enteramine Like Substance. *Acta Pharmacologica et Toxicologia* **1948**. 4 213-223.
41. Kanda, A.; Iwakoshi-Ukena, E.; Takuwa-Kuroda, K.; Minakata, H., Isolation and characterization of novel tachykinins from the posterior salivary gland of the common octopus *Octopus vulgaris*. *Peptides* **2003**,24 (1), 35-43.
42. Kanda, A.; Takuwa-Kuroda, K.; Aoyama, M.; Satake, H., A novel tachykinin-related peptide receptor of *Octopus vulgaris* - Evolutionary aspects of invertebrate tachykinin and tachykinin-related peptide. *Federation of European Biochemical Societies Journal* **2007**, 274 (9), 2229-2239.
43. Flashner, E.; Raviv, U.; Friedler, A., The effect of tachykinin neuropeptides on amyloid β aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2011**,407 (1), 13-17.
44. Songdahl, J.H.; Shapiro, B. J. Purification and composition of a toxin from the posterior salivary gland of Octopus *dofleini*. *Toxicon* **1974**. 12, 109-115.
45. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Evaluación de la población de pulpo (*Octopus maya*) en la península de

Yucatán 2007 Centro Regional de Investigación Pesquera Yucalpetén Centro Regional de Investigación Pesquera Lerma Julio **2007**.

46. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACION (DOF). 2014. Plan de manejo de pulpo (*O. maya y O. vulgaris*) del Golfo de México y mar caribe. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación, 28. Marzo-**2014**.
47. Blancas, R. Evaluación de la pesquería del pulpo rojo *Octopus maya* en el Puerto de Sisal, Yucatán, México. Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, **2014**.
48. Aguilar, M. (**2004**). HPLC of Peptides and Proteins. Methods and Protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
49. The LC Handbook. Guide to LC Columns and Method Development. Agilent Technologies Inc. USA. 5990-7595EN. **2011**.
50. Huber, U.; Majors, R. Principles in preparative HPLC. Agilent Technologies Inc. Germany. 5989-6639EN. **2007**.
51. Walte, S.; McGinley, M. Peptide Separations by Cation Exchange Chromatoraphy using Luna SCX. Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA. TN-1024. **2005**.
52. GE Healthcare Bio-Sciences AB (**2010**). Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing. Principles and Methods. Sweden: Autor.
53. Qiu, Y; Ree, D. Gas Chromatography in Metabolomics Study. Licensee InTech. Creative Commons **2014**.
54. Key, L. N.; Boyle, P. R.; Jaspars, M., Novel activities of saliva from the octopus *Eledone cirrhosa* (Mollusca; Cephalopoda). *Toxicon* **2002**,40 (6), 677-683.
55. Sánchez-Rodríguez, J.; Cruz-Vazquez, 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.
56. Cutler, P., Protein purification protocols. Humana Press: Totowa, N.J., **2004**. Amicon Ultra-15. Centrifugal Filter Devices for volumes up to 15 mL. User

Guide. MILLIPORE CORPORATION. ALL RIGHTS RESERVED. PR02842 Rev. B, **10/09**.

57. Strata Silica-Based. Solid Phase Extraction (SPE) Sorbents. 25 Cleanup Solutions for a Variety of Samples. Phenomenex, Inc. BR87100213_W. **2013**.
58. Morrison, R. T. y Boyd, R. N., Química Orgánica, 5a Edición, México, Ed. Addison Wesley Longman de México, S.A. de C.V., **1998**.
59. Mathews, C. K.; Van Holde, K. E.; Ahern, K. G. Bioquímica. 3a Edición (**2002**). Pearson Educación S. A.
60. Weisel, A.; Libersat, F. Venom effects on monoaminergic systems. *Journal of Comparative Physiology A* (**2004**) 190: 683-690.
61. Juorio, A: V: and Killick, S. W. The distribution of monoamines and some of their acid metabolites in the posterior salivary glands and viscera. *Comparative Biochemestry and Physiology* **1973**, Vol. 44A: 1059 - 1067.
62. Matus, A. I. Histochemical Localization of Biogenic Monoamines in the Posterior Salivary Glands of Octopds. *Tissue & Cell* **1971,** 3 (3): 389-394.
63. Barlow, J. J.; Juourio, A. V. Monoamine Transport in the Octopus Posterior Salivary Gland Nerves. *Journal Comparative Physiology* **1974**, 89, 105-122
64. Pytliak, V.; Vargová, V.; Mechirová, V.; Felsoci, M. Serotonin Receptors-From Molecular Biology to Clinical Applications. *Physiology Research* **2011**, 60: 15-25.
65. Djokaj, S.; Cooper, R. L.; Rathmayer, W. Presynaptic effects of octopamine, serotonin, and cocktails of the two modulators on neuromuscular transmission in crustaceans. *Journal Comparative Physiology A* **2001**, 187: 145-154
66. Spitzer, N.; Edwards, D. H.; Baro, D. J. Conservation of structure, signaling and pharmacology between two serotonin receptor subtypes from decapod crustaceans, *Panulirus interruptus* and *Procambarus clarkii*. *The Journal of Experimental Biology* **2008**, 211:92-105.
67. Livingstone, M.S.; Harris-Warrick, R. M.; Kraits, E. A. Serotonin and Octopamine Produce Opposite Postures in Lobsters. *Science* **1980**, 208: 76-79.

68. Wood R. A.; Gleeson, C.; Derby, D. Modulation of behavior by biogenic amines and peptides in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal Comparative Physiology* **1995**, 177:321-333
69. Ibáñez, C. M.; Key, F. Cannibalism in cephalopods. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **2010**, 20:123–136.
70. Hernández, J.; Garci, M.; Roura, A.; González, A. Cannibalistic Behavior of Octopus (*Octopus vulgaris*) in the Wild. *Journal of Comparative Psychology* **2014**, 128(4), 427–430
71. Andrews, P. L. R.; Messenger, J. B.; Tansey, E. M. Colour changes in cephalopods after neurotransmitter injection into the cephalic aorta. *Proceedings of the Royal Society of London* **1981**, 213, 93-99.
72. Foti, L.; Trara, I.; Agnisola, G. In vitro cardiac performance in *Octopus vulgaris* (lam). *Comparative Biochemestry and Physiology* **1985**, 82 (2): 483-488.