UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE NEUROTOXINAS PRESENTES EN LA ANÉMONA *Bunodeopsis globulifera*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

ALEIDA JEANNETTE FLORES PÉREZ

DIRECTORA DE TESIS: Dra. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)

COMITÉ TUTORAL: Dr. JOSÉ ARTURO AVALOS FUENTES
CINVESTAV (IPN)

Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)

Dra. TATIANA FIORDELISIO COLL
FACULTAD DE CIENCIAS (UNAM)

Dr. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO
CINVESTAV (IPN)

Dr. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)

PUERTO MORELOS, Q. ROO., SEPTIEMBRE DE 2017

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.

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES
PUERTO MORELOS
MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

TESIS

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE NEUROTOXINAS PRESENTES EN LA ANÉMONA *Bunodeopsis globulifera*

PRESENTA: ALEIDA JEANNETTE FLORES PÉREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
COMITÉ TUTORAL: DR. JOSÉ ARTURO AVALOS FUENTES
DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL
DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO
DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

SEPTIEMBRE DE 2017

Este proyecto fue realizado en el laboratorio de Toxinología de cnidarios de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, en Puerto Morelos, Quintana Roo bajo la dirección de la Dra. Judith Sánchez Rodríguez, en colaboración con el laboratorio 7 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, Cd. de México a cargo del Dr. Benjamín Florán Garduño. Con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 711924 y el apoyo PAPIIT IN 202714.

A José Isabel Flores Martínez, quién nos educó bajo la
idea del compromiso, el respeto y la responsabilidad.
A usted, que a su manera nos demostró todo su amor.
Hoy damos un paso más, hacia la meta:
ser mejores personas de lo que somos hoy.
Agradezco su existencia, porque impulsa la mía.
Todo mi amor para usted abuelo, y espero que desde donde esté,
vea este hermoso mar, porque en él, yo lo veo a usted.

RECONOCIMIENTO

A la Dra. Judith Sánchez Rodríguez, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por el apoyo recibido y la confianza que depositó en mí.

A LOS INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Dra. Tatiana Fiordelisio Coll

Dr. Sergio Rodríguez Morales

A quienes agradezco su valiosa asesoría, orientación y por supuesto, el tiempo dedicado a este proyecto.

Al Dr. Benjamín Florán Garduño, por permitirme realizar parte del trabajo experimental en su laboratorio, por sus consejos y por brindarme todo lo necesario, siempre.

A mi asesor externo, el Dr. José Arturo Avalos Fuentes, por su apoyo teórico y práctico, por los comentarios siempre oportunos, por la paciencia, la amabilidad y sobre todo, por la disponibilidad que siempre recibí. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A Lety y a Miguel, porque son los mejores consejeros que he podido tener, siempre. Porque su amor y visión me han llevado al lugar en el que estoy. Es un orgullo para mí, el que sean mis padres.

A Lucely, Miguel y Estrella, gracias por estar siempre pendientes de mí, por hacerme reír a carcajadas con sus ocurrencias y por demostrarme su cariño, todos los días de nuestra vida.

A mi Emiliano adorado y a mi Itzayana rebelde, que con su sola presencia me llenan de alegría, amor y felicidad.

A mi familia: Alicia, Alondra, Aranza, Atzi, Beto, Caleb, Carol, César, Christian, Citla, Clara, Ericka, Eduardo, Ernesto, Felipe, Irvin, Ismael, Jesús, Karen, Lili, Moni, Oliver, Victor, Yoselin. Alicia, Divina, Elezar, Felipe, Fernando, Isabel, Lety, Mari, Martin, Pablo, Silvia, Soledad, Victor, por estar siempre al tanto de mí, alentándome. A mis abuelos *in memoriam:* Constancia, José Isabel, Rogelio y Guadalupe.

A mis amigos: Adrián, Ale Salas, Bety, Brenda, Carmen, Carlos, Ceci, Diego, Erick, Fer, Janeth, Miguel y Nidia. A mis queridas Less, Mari, Naye y Yes que siguen siendo las amigas perfectas. Ale Estrada tiene mención especial porque casi me trajo y me apoyó desde el inicio de este proyecto. Y Omar, que me aguantó una y mil quejas durante este tiempo, ¡los quiero!.

A Lupita, Raúl y Abel, que me recibieron en este lugar y me procuraron desde el primer día.

A Jaime Montesinos, que fue un pilar para mí durante esta etapa, por todas las atenciones, la disposición y el cariño, por procurarme siempre. Porque caminamos sabiendo que el final es trascender.

A mi querido Víctor Ayala, quien estuvo siempre presente, escuchándome, escribiéndome, haciéndome reir, cantar y pisar el suelo de la realidad. Gracias Vic.

A Ana María, Ceci, Dani, Indio, Ixquimilli, José, Laura, Manu, Mazatl, Rubí, Tonali, Victor y Zyanya. Porque conocerlos ha sido un placer y compartir la danza, con el caribe de fondo, ha sido extraordinario. Gracias por estar, por ser y compartir.

A mis amigos del laboratorio 7 de Neurociencias: Baruc, Dulce, Felipe, Israel, Lucero, Marina, Rodo, Santiago, a los auxiliares, Francisco y Silvia, al técnico, José Luis, por la ayuda y por la excelente convivencia.

A mis compañeros del laboratorio de Toxinología de cnidarios: Alondra, Amanda, Anatalia, Antònia, Gaby, Ilinova, Juan y Paolo, por su disposición y la ayuda brindada.

A Laura Celis, por el apoyo bibliográfico. A Francisco Rentería, Edgar Escalante y Amaury Mendoza, por el apoyo técnico en la UASA. Y a Diana Juárez, por su paciencia, eficiencia y amabilidad.

A mis queridas Sheila Narayan y Mariela, por su apoyo en las colectas, en las explicaciones académicas, en las salidas maratónicas y por todas las carcajadas. Compartir este camino con ustedes, hizo que fuera más fácil y porque al final de todo, nos lo merecemos, jajaja. Las quiero.

Finalmente, a Gabriel Abraxas, que está presente siempre, apoyándome en todo lo que quiero hacer, escuchándome, consintiéndome, retándome a ser mejor, abrazándome con su amor.

Índice

Abreviaturas…… 1

Resumen…… 2

Abstract…… 3

1. Introducción…… 4

2. Antecedentes generales…… 6

2.1 *Phylum* Cnidaria…… 6

2.1.1 Características generales…… 6

2.2 Clasificación taxonómica…… 7

2.2.1 Clase Anthozoa…… 7

2.2.2 Cnidocitos…… 8

2.2.3 Citolisinas y neurotoxinas: características generales…… 10

2.2.4 Canales iónicos afectados por neurotoxinas…… 11

2.3 *Bunodeopsis globulifera*…… 15

3. Antecedentes directos…… 16

4. Justificación…… 17

5. Preguntas de investigación…… 18

6. Objetivos…… 19

6.1 Objetivo general…… 19

6.2 Objetivos específicos…… 19

7. Área de estudio…… 20

8. Materiales y métodos…… 20

8.1 Colecta de *Bunodeopsis globulifera*…… 20

8.2 Obtención del extracto crudo…… 20

8.3 Cuantificación de proteínas…… 21

8.4 Separación del extracto crudo…… 21

8.4.1 Separación por ultrafiltración…… 21

8.4.2 Separación por Cromatografía de filtración en Gel…… 22

8.5 Ensayo de actividad biológica…… 22

8.6 Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE)…… 23

8.7 Ensayos de actividad neurotóxica…… 23

8.7.1 Liberación de [^{3}H]-glutamato…… 23
8.7.1.1 Obtención del tejido: rebanadas de corteza…… 23
8.7.1.2 Marca radiactiva ([^{3}H]-glutamato)…… 24
8.7.1.3 Desarrollo experimental…… 24
8.7.1.4 Cuantificación de [^{3}H]-glutamato liberado…… 25
8.7.2 Actividad motora…… 25
8.7.3 Proliferación celular…… 26
8.7.3.1 Línea celular…… 26
8.7.3.2 Actividad metabólica (ensayo MTT)…… 26
8.7.3.3 Apoptosis…… 27
8.8 Análisis estadístico…… 28
9. Resultados…… 29
9.1 Obtención del extracto crudo y cuantificación de proteínas…… 29
9.2 Ensayo de actividad biológica del extracto crudo…… 31
9.3 Separación del extracto crudo…… 32
9.3.1 Separación por ultrafiltración…… 32
9.3.2 Separación por cromatografía de filtración en gel…… 32
9.4 Ensayos de actividad biológica de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel…… 34
9.5 Electroforesis SDS-PAGE del extracto crudo y de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel…… 37
9.6 Ensayos de actividad neurotóxica…… 39
9.6.1 Liberación de [^{3}H]-glutamato…… 39
9.6.1.1 Liberación de [^{3}H]-glutamato en presencia del extracto crudo y alto potasio…… 39
9.6.1.2 Liberación de [^{3}H]-glutamato en presencia del extracto crudo y EDTA…… 41
9.6.2 Actividad motora…… 43
9.6.3 Proliferación celular…… 45
9.6.3.1 Actividad metabólica (ensayo MTT)…… 45
9.6.3.2 Apoptosis…… 48
10. Discusión…… 50
10.1 Obtención del extracto crudo…… 50
10.1.1 Separación por ultrafiltración…… 51

10.1.2 Separación por cromatografía de filtración en gel…….. 51
10.2 Ensayos de actividad biológica…….. 53
10.2.1 Extracto crudo…….. 53
10.2.2 Fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel……. 54
10.3 Electroforesis SDS-PAGE del extracto crudo y de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel…….. 56
10.4 Ensayos de actividad neurotóxica…… 57
10.4.1 Liberación de [^{3}H]-glutamato…….. 57
10.4.1.1 Liberación de [^{3}H]-glutamato en presencia del extracto crudo y alto potasio…… 57
10.4.1.2 Liberación de [^{3}H]-glutamato en presencia del extracto crudo y EDTA……. 59
10.4.2 Actividad motora…….. 62
10.4.3 Proliferación celular…….. 64
10.4.3.1 Actividad metabólica (MTT)…… 64
10.4.3.2 Apoptosis……. 66
11. Conclusiones……. 70
12. Referencias…… 71

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucléico
A. elegantissima	*Anthopleura elegantissima*
APAF	*Factor activador de proteasas pro-apoptóticas*
B. caissarum	*Bunodosoma caissarum*
B. globulifera	*Bunodeopsis globulifera*
Bg F	Fracción de *Bunodeopsis globulifera*
BSA	Albúmina sérica bovina
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbeco
EC	Extracto crudo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA	Food and Drug Administration
O. quadrata	*Ocypode quadrata*
RSK	Cinasa S6 ribosomal
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
STX	Saxitoxina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TTX	Tetrodoxina
[^{3}H]-glutamato	Glutamato marcado radiactivamente con tritio

Resumen

En las últimas décadas la obtención de compuestos bioactivos se ha extendido con éxito a especies marinas; se han registrado compuestos con actividad antimicrobiana, citolítica y neurotóxica, entre otras. La obtención de dichos compuestos ha permitido sintetizarlos y darles aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas. *Bunodeopsis globulifera* es una anémona que habita abundantemente en el Mar Caribe Mexicano, ha sido reportada por causar lesiones graves en la piel a quienes tienen contacto con este organismo y es considerada una especie altamente tóxica. *B. globulifera* fue colectada en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Q. Roo., y se obtuvo el extracto crudo (EC) por maceración y liofilización. La separación del EC se realizó por ultrafiltración, posteriormente se pre-purificó por cromatografía de filtración en gel y se obtuvieron cuatro fracciones: Bg FI, Bg FII, Bg FIII y Bg FIV.

En los ensayos de actividad biológica en el cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata),* se observó que la administración tanto del EC, así como cada una de las cuatro fracciones provoca dificultad para controlar el movimiento y muerte. Mediante electroforesis se registró que el EC contiene compuestos de entre 5 y 150 kDa; las fracciones presentaron compuestos de entre 2 y 10 kDa (Bg FI y Bg FIV) y de entre 2 y 25 kDa (Bg FII y Bg FIII), los compuestos de bajo peso molecular sugieren la presencia de compuestos de tipo neurotóxico, los cuales son el objetivo de este estudio. En los ensayos de neurotoxicidad se encontró que la liberación de [^{3}H]-glutamato en corteza de rata usando el EC (50 µg/mL) incrementó significativamente la liberación con respecto al pulso despolarizante (30 mM KCl). Por otro lado, el EC también incrementó la liberación de [^{3}H]-glutamato con respecto a la liberación basal. Posteriormente se evaluó la liberación basal estimulada por el EC en presencia de EDTA (1 mM), donde se registró una liberación de [^{3}H]-glutamato menor a los valores basales, indicando que la liberación estimulada por la toxina involucra un mecanismo dependiente de calcio, probablemente el blanco sean canales de sodio (permitiendo influjo de sodio, provocando una ligera despolarización) o directamente la apertura de canales de calcio. La actividad locomotora en ratones disminuyó significativamente tras la administración intraperitoneal del EC (100 y 500 mg de proteína/mL por Kg). Finalmente se evaluó la proliferación celular y la apoptosis en presencia del EC y la fracción Bg FIII sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Encontramos que el EC (10, 25, 50, 75 y 100 µg de proteína/mL) y la fracción Bg FIII (25 µg de proteína/mL) promueven un aumento significativo en la proliferación celular; sin embargo, solo el EC induce apoptosis (60 %). El EC y las cuatro fracciones obtenidas de *B. globulifera* provocan efectos de tipo neurotóxico sobre *Ocypode quadrata*, sobre roedores y sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Abstract

In the last decades the isolation of natural products has been successfully extended to marine species, compounds with antimicrobial, cytolytic and neurotoxic activity have been registered, among others. The aim to obtaining such compounds is synthesizing them and giving them biotechnological and pharmaceutical applications. *Bunodeopsis globulifera* is an abundant sea anemone in the Mexican Caribbean Sea, has been reported to cause serious injuries to the skin to those who have contact with this organism and is considered highly toxic specie. *B. globulifera* was collected in the reef lagoon of Puerto Morelos, Q. Roo., and the crude extract (CE) was obtained by maceration and lyophilization. CE was separated by ultrafiltration, followed by Gel Filtration chromatography given four fractions: Bg IF, Bg FII, Bg FIII and Bg FIV.

The biological activity assays in *Ocypode quadrata* crab, it was observed that the administration of both the CE, as well as each of the four fractions causes difficulty in controlling movement and death. By electrophoresis it was recorded that CE contains compounds between 5 and 150 kDa; the fractions contain compounds between 2 and 10 kDa (Bg FI and Bg FIV) and between 2 and 25 kDa (Bg FII and Bg FIII); those of low molecular weight suggest the presence of neurotoxic compounds, which are the objective of this study. In neurotoxicity assays, the release of [3 H] -glutamate in rat cortex using EC (50 µg / mL) significantly increased the release from the depolarizing pulse (30 mM KCl). On the other hand, EC also increased the release of [3 H] -glutamate relative to the basal release. Subsequently, the CE stimulated basal release was evaluated in the presence of EDTA (1 mM), where [^{3}H]-glutamate release was lower than baseline, indicating that the toxin stimulated release involves a calcium-dependent mechanism, probably the target are sodium channels (allowing sodium influx, provoking a slight depolarization) or directly opening of calcium channels. Locomotor activity in mice was decreased significantly by intraperitoneal administration of CE (100 and 500 mg protein/mL per kg). Finally, cell proliferation and apoptosis were evaluated in the presence of CE and the Bg FIII fraction in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line and found that CE (10, 25, 50, 75 and 100 µg protein/mL) and the Bg FIII fraction (25 µg protein/mL) promoted a significant increase in cell proliferation; however, only CE induces apoptosis (60%). The CE and the four fractions obtained from *B. globulifera* provoke neurotoxic effects on *Ocypode quadrata*, on rodents and on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line.

1. Introducción

El ambiente marino y sus características físicas, químicas y biológicas han permitido la evolución de las vías metabólicas de las especies que habitan dicho medio, produciendo así, eslabones de distintos niveles químicos. Los productos naturales de origen marino, exhiben un amplio rango de actividad y un amplio espectro de propiedades estructurales, por lo que han sido considerados como candidatos para nuevos fármacos. Se han reportado productos con actividad antimicrobiana, antiviral, antiparasitaria, anticoagulante, antinflamatoria y antitumoral, entre otras. También se han reportado productos con actividad cardiovascular, inmunológica y en el sistema nervioso. Sin embargo, la obtención de estos compuestos es complicada, dada su naturaleza. El medio marino es un gran reservorio de compuestos en espera de que sean descubiertas sus propiedades bioactivas y se considera que el potencial biotecnológico dentro del océano, aún no ha sido aprovechado (Mayer *et al*., 2010; Imhoff *et al.,* 2011; Guo *et al*., 2015).

El estudio de los compuestos de origen marino inició en 1950, tras varias décadas de investigación; en el 2004 una ω-conotoxina, obtenida de *Conus magus* (molusco) fue el primer tratamiento farmacológico de origen marino usado para el dolor crónico severo, aprobado por la Food and Drug Administration (FDA); para el 2008 ya se habían reportado 3,000 productos naturales bioactivos de origen marino y sus componentes habían sido aislados para su estudio.

Dentro de los compuestos activos que han sido aislados de organismos marinos y a los cuales se les ha dado un uso farmacológico se encuentran la ω-conotoxina MVIIA y la Trabectedina. La ω-conotoxina MVIIA fue obtenida de *Conus magus*; su forma sintética es conocida como ziconotide y es el principio activo del Prialt®, fármaco utilizado para controlar el dolor crónico. La ω-conotoxina o ziconotide bloquea los canales de calcio de tipo N, cuya función es la transmisión de la respuesta de dolor en los humanos; este compuesto tiene alta eficacia para disminuir el dolor crónico, al ser administrado intratecalmente en pacientes con enfermedades en fase terminal, principalmente y su

uso no provoca adicción ni genera resistencia (McGivern, 2006). Por otra parte, la Trabectedina, es un compuesto aislado de *Ecteinascidia turbinata* (tunicado) y es el principio activo del Yondelis®, fármaco utilizado como anticancerígeno. La Trabectedina interactúa con el surco menor de la doble hélice de ADN, afectando la transcripción de diferentes genes involucrados en la reparación de ADN facilitando el rompimiento de las hebras de la doble hélice, es decir, favorece la apoptosis celular. Yondelis® es administrado como tratamiento contra diferentes tipos de cáncer (Martínez-Serra *et al*., 2011).

Prialt® y Yondelis® son fármacos de uso comercial, cuyos principios activos fueron obtenidos de dos especies de invertebrados marinos (mencionadas anteriormente); actualmente los estudios sobre el aislamiento de compuestos o productos naturales de origen marino se ha diversificado ampliamente (Rojas *et al*., 2002; Imhoff *et al*., 2011); el grupo con mayor número de nuevos productos naturales extraídos es el *phylum* Porífera seguido por el *phylum* Cnidaria y diversos microorganismos. Hasta 2011 se habían descrito aproximadamente 3 000 compuestos bioactivos aislados de diferentes organismos pertenecientes a cnidarios (Maravilla-Ulloa, 2015).

Bunodeopsis globulifera pertenece al *phylum* Cnidaria, es una anémona que habita abundantemente en el Mar Caribe Mexicano y ha sido reportada por causar afecciones como urticaria, úlceras necróticas y abscesos a quienes tienen contacto (generalmente por accidente) con este organismo, motivo por el cual se considera una especie altamente tóxica, sin embargo los estudios sobre *B. globulifera* son escasos y la actividad de las toxinas que contiene aún no ha sido descrita (Milla *et al.,* 2003).

2. Antecedentes generales

2.1 *Phylum* Cnidaria

2.1.1 Características generales

El *phylum* Cnidaria es considerado de los más primitivos, por su anatomía tan “simple”. Agrupa alrededor de 11,000 especies que viven en ambientes acuáticos, mayoritariamente marinos. Este grupo incluye a los corales, medusas y anémonas (Laporta y Carranza, 2012).

Su morfología presenta dos formas estructurales: pólipo y medusa; ambas formas están constituidas por tejido epitelial (ectodermis) predominantemente; presentan células digestivas (gastrodermis) y fibras que participan en la conducción nerviosa, la cual es a través de una red o plexo nervioso; la mayor parte de su cuerpo está constituido por mesoglea (considerada como un tipo de tejido conectivo). No presentan aparato excretor, respiratorio ni circulatorio; todas estas funciones se realizan a través de la cavidad gastrovascular o de la ectodermis. Pueden vivir de manera individual o en colonias, fijados a un sustrato o de forma libre; algunos son nadadores (Chapman, 1974).

Su ciclo de vida presenta alternancia de generaciones. La forma pólipo (sésil) se reproduce asexualmente, por gemación, fisión longitudinal, fisión transversal o laceración pedal, mientras la forma medusa (nadadora) lo hace sexualmente (porta las gónadas y realiza dispersión externa). La reproducción asexual se lleva a cabo durante todo el año, mientras que la reproducción sexual es estacional.

2.2 Clasificación taxonómica

Los miembros del *phylum* Cnidaria se dividen en cinco clases:

Clase Anthozoa. Incluye anémonas y corales, presentan solo la forma pólipo. Son exclusivamente marinos y su reproducción es asexual.

Clase Hydrozoa. Solitarios o coloniales, Pólipo asexual y medusa sexual, medusas sin velo. Son de agua dulce y marinos.

Clase Scyphozoa. Medusas. Solitarios; estado pólipo reducido o ausente. Con forma de campana sin velo, mesoglea gelatinosa muy engrosada, borde de la campana con ocho escotaduras en donde se ubican órganos sensoriales. Todos marinos.

Clase Cubozoa. Medusas. Solitarios; estado pólipo reducido. La sección transversal de la campana es cuadrada, tentáculos suspendidos en cada vértice de la campana, sin velo. Todos marinos.

Clase Staurozoa. Incluye medusas que viven adheridas a un sustrato, antes ubicadas dentro de Scyphozoa. Exclusivamente marinas (Laporta y Carranza, 2012).

2.2.1 Clase Anthozoa

La Clase Anthozoa agrupa a todas las especies de corales y anémonas.

Las anémonas se caracterizan por presentar una morfología radial, con un pie o pedal, una columna, un disco oral y tentáculos alrededor de éste (figura 1); su tamaño varía según la especie y pueden medir desde mm hasta varios cm de alto. Las anémonas presentan una coloración variada y pueden establecer simbiosis con zooxantelas. Generalmente son organismos de hábitos sésiles, a pesar de tener capacidad locomotora; se alimentan de pequeños moluscos, crustáceos y peces que capturan con sus tentáculos, los cuales contienen una gran cantidad de células especializadas llamadas cnidocitos (Smith y Blumenthal, 2007; Spano *et al*., 2013).

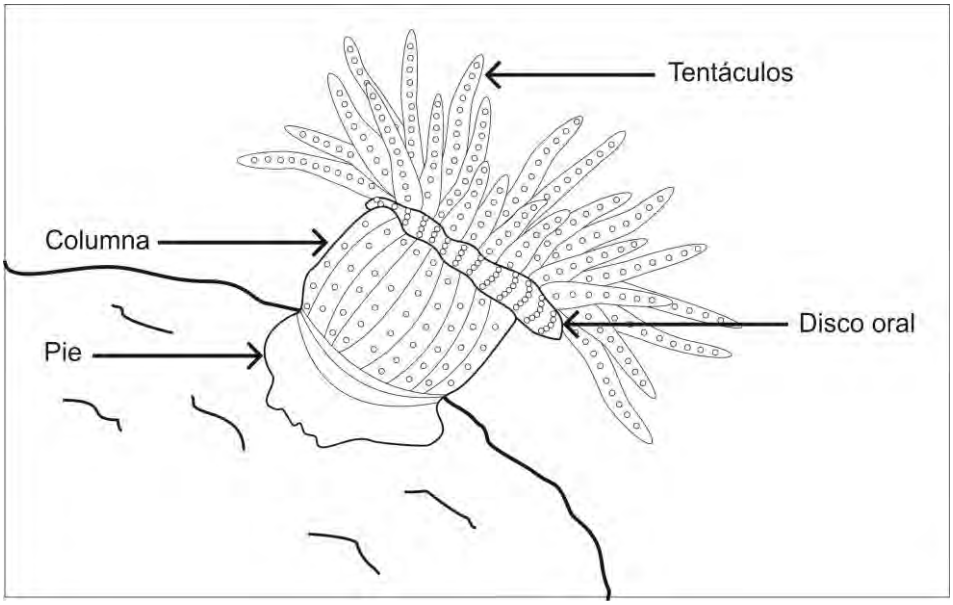

Figura 1. Morfología externa de una anémona. El tamaño de éstos organismos varía según la especie (puede ir desde mm hasta varios cm de longitud). Los círculos (o) indican la presencia de cnidocitos, células que contienen sustancias tóxicas para otros organismos.

2.2.2 Cnidocitos

Los cnidocitos, son la característica principal del *phylum* Cnidaria. Se ha descrito que con base en su morfología y función, podrían ser de las células más complejas que se conocen en el reino animal. Existen 28 tipos morfológicamente distintos, que son divididos en tres subcategorías: 1) nematocistos (25 tipos diferentes), que tienen la propiedad de penetrar a la presa e inmovilizarla; 2) espirocistos (2 tipos), cuya función es capturar a la presa por adhesión; y 3) pticocistos (1 tipo), los cuales también tienen función adhesiva, incluso pueden adherirse a arena. De estas tres subcategorías, solo los nematocistos inyectan toxinas al ser descargados (Mariscal, 1974; Mariscal *et al.,* 1977; Sánchez-Rodríguez *et al*., 2006).

Los nematocistos son células especializadas; que producen sustancias tóxicas con las cuales los cnidarios capturan presas para alimentarse o usan esas toxinas como defensa contra la depredación (figura 2), por lo cual son considerados una de las armas más letales del reino animal. La descarga de nematocistos parece implicar aumentos

en la presión osmótica intracapsular como consecuencia de la liberación de calcio unido dentro de la cápsula. Existen pruebas de que la descarga se inicia como una exocitosis dependiente de calcio, desencadenada por una señal eléctrica resultante de la transducción de estímulos mecánicos recibidos en el cnidocilo del nematocisto (Kass-Simon y Scappaticci, 2002).

Los nematocistos de las anémonas contienen complejas mezclas de componentes biológicamente activos, como se mencionó anteriormente, los cuales consisten en péptidos y proteínas. El estudio de estos organismos ha derivado en el aislamiento de algunas de las toxinas y se ha demostrado que dichas toxinas actúan como cardiotoxinas, citolisinas, y/o neurotoxinas (Sánchez-Rodríguez *et al*., 2006).

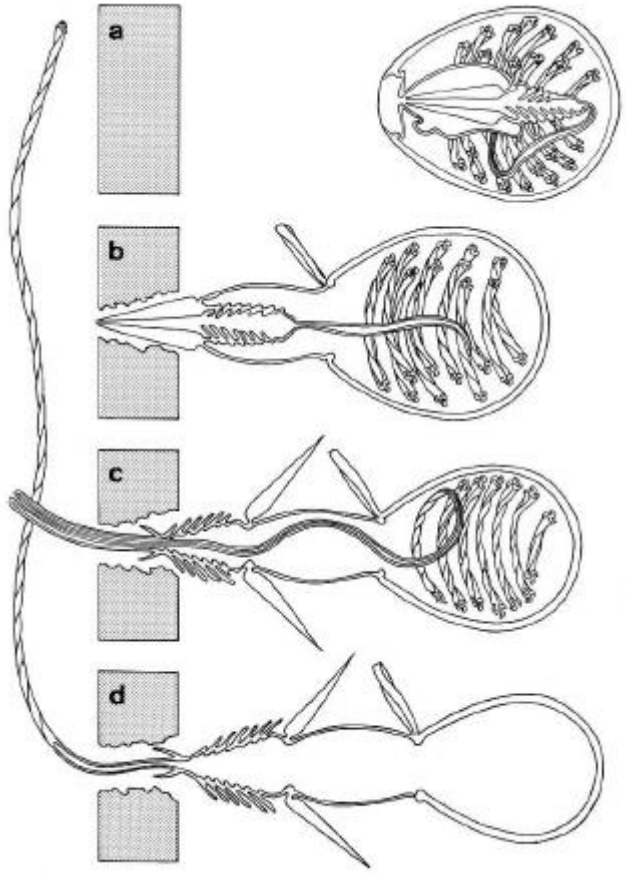

Figura 2. Esquema de la descarga de toxinas de un nematocisto. Son células especializadas para alimentarse o como defensa principalmente, y están presentes únicamente en los animales del *phylum* cnidaria. En a) se observa al nematocisto en estado basal, en b) perfora la cutícula de su presa o depredador, en c) everte el cnidocilo y en d) descarga las toxinas. La descarga de estas células generalmente causa inmovilidad del organismo al que le sean inyectados. Modificado de Kass-Simon y Scappaticci, 2002.

La actividad de las neurotoxinas generalmente consiste en bloquear o alterar la comunicación celular que se da en el Sistema Nervioso Central, provocando que el organismo al que le sean inyectadas dichas toxinas (ya sea presa o depredador), quede inmovilizado. El blanco común son los canales iónicos y los receptores de membrana. Los canales iónicos son esenciales para un amplio rango de funciones fisiológicas, incluyendo la señalización neuronal, contracción muscular, el ritmo cardíaco y la secreción hormonal, entre otras (Colom-Casasnovas, 2015).

2.2.3 Citolisinas y neurotoxinas: características generales

Dentro de los compuestos aislados de cnidarios, se reconocen dos grupos importantes, que, con base en estudios bioquímicos y farmacológicos de su estructura y sus propiedades funcionales, se han denominado como citolisinas y neurotoxinas (Anderluh y Maček, 2002).

Las citolisinas provocan la ruptura de la membrana celular, formando poros en la célula. Se ha reportado que una de las respuestas más comunes causada por citolisinas es la hemólisis; sin embargo se ha reportado también, que dicha actividad hemolítica puede ser inhibida por esfingomielina. Estas toxinas han sido clasificadas en cuatro grupos de acuerdo con su peso molecular. El grupo I consiste en péptidos de 5-8 kDa, y se encuentra en especies del género *Radianthus*; el grupo II es el más numeroso y comprende proteínas de 20 kDa; se encuentra en organismos de los géneros *Stichodactyla* y *Actinia*; en el grupo III se encuentran proteínas de 30 a 40 kDa, conocidas por su alta actividad enzimática; se encuentra en especies del género *Aiptasia*, por ejemplo; y en el grupo IV se encuentran citolisinas con un peso de hasta 80 kDa, como es el caso de la aislada del género *Metridium*. Las citolisinas son modelo de estudio para ver interacciones proteína-membrana lipídica y han sido examinadas para sus uso en la erradicación de células tumorales y parásitos (Khoo *et al*., 1995; Anderluh y Maček, 2002).

Por otra parte, las neurotoxinas son compuestos que afectan el funcionamiento del sistema nervioso. Son polipéptidos con un peso molecular de entre 3 y 10 kDa y se han clasificado de la siguiente manera: Tipo-I, poseen de 46 a 49 aminoácidos y están unidos por tres puentes disulfuro; se encuentra en especies del género *Actinia*. El Tipo II solo difiere con el Tipo-I en la secuencia de sus aminoácidos; el Tipo-III está formado por péptidos de 27-32 aminoácidos, unidos por cuatro puentes disulfuro; solo han sido identificadas pocas especies pertenecientes a este grupo. Las neurotoxinas del Tipo-IV presentan 46 aminoácidos y son características de *Calliactis parasitica* (Calitoxina I y II). Estas toxinas actúan sobre canales iónicos, en particular sobre el canal de $Na_{v1.x}$. Se ha reportado que hay una interacción canal de $Na_{v1.2}$-toxina, específicamente entre los segmentos 3 y 4 del dominio IV del canal de Na^+. Dicha región es la responsable de la rápida inactivación de las corrientes de Na^+ y es potentemente disminuida por estas toxinas, lo que se traduce en un incremento de la duración del potencial de acción (Wanke *et al*., 2009).

2.2.4 Canales iónicos afectados por neurotoxinas

Es muy amplio el estudio de la organización estructural y la función de los canales iónicos; uno de los campos más estudiados es el de moléculas que son tóxicas o que impiden el correcto funcionamiento de dichos canales.

Se ha demostrado que neurotoxinas de anémonas de entre 3 y 5 kDa actúan sobre canales de Na^+ voltaje-dependientes, mientras que neurotoxinas de entre 3.5 y 6.5 kDa actúan sobre canales de K^+ voltaje-dependientes. El estudio de estas interacciones, ha demostrado que dichas neurotoxinas tienen una alta especificidad y afinidad por los canales mencionados (Honma y Shiomi, 2006). En el caso de los canales de K^+, se sabe que las toxinas afectan principalmente a células excitables, interfiriendo con el sitio de unión de la dendrotoxina, por ejemplo, y pueden bloquear varias subunidades de los canales Kv, modificando su conductancia (Castañeda y Harvey, 2009).

Con respecto a las toxinas que actúan sobre canales de sodio, encontramos a la tetrodoxina (TTX) y a la saxitoxina (STX), cuyo efecto es bloquear la actividad del canal, mientras que la veratridina, la batracotoxina, la aconitina y la grayanotoxina despolarizan la membrana provocando una activación persistente de los canales de Na^+ (Vincent *et al*., 1980).

La estructura del canal de sodio ya ha sido determinada (figura 3) y se ha encontrado que dicho canal, en cerebro de rata, corazón y músculo esquelético son homólogos; sin embargo, la función *in vivo* de estos canales es diversa. Una diferencia muy marcada es la sensibilidad para ser bloqueados por tetrodoxina o por saxitoxina (Heineman *et al*., 1992).

Los canales de Na^+ voltaje-dependientes son los responsables de la conducción de impulsos eléctricos en muchos de los tejidos excitables en la mayoría de los animales (excepto nematodos), y son blancos importantes de toxinas de animales venenosos, no solo de anémonas y escorpiones, sino también de moluscos, serpientes y algunos peces. Durante su evolución, diferentes animales han desarrollado un set de péptidos ricos en cisteína capaces de unirse a diferentes sitios extracelulares de estos canales. Una cuestión importante, es si todas las toxinas causan un efecto farmacológico distinto y/o actúan sobre sitios distintos del canal (Wanke *et al*., 2009).

Las neurotoxinas de escorpiones y anémonas, como mencionamos anteriormente, provocan que sea más lento el cierre (o la inactivación) del canal de sodio sensible a voltaje, el cual participa en la generación del potencial de acción (Vincent *et al*., 1980; Kem *et al*., 1989). El potencial de acción es el cambio en la permeabilidad de la membrana, que permite la entrada de iones sodio a la célula, con lo cual se genera una respuesta que se propaga a lo largo de las células nerviosas, mismas que se encargan de recibir estímulos internos y externos del medio y responder a ellos (Catterall, 1980).

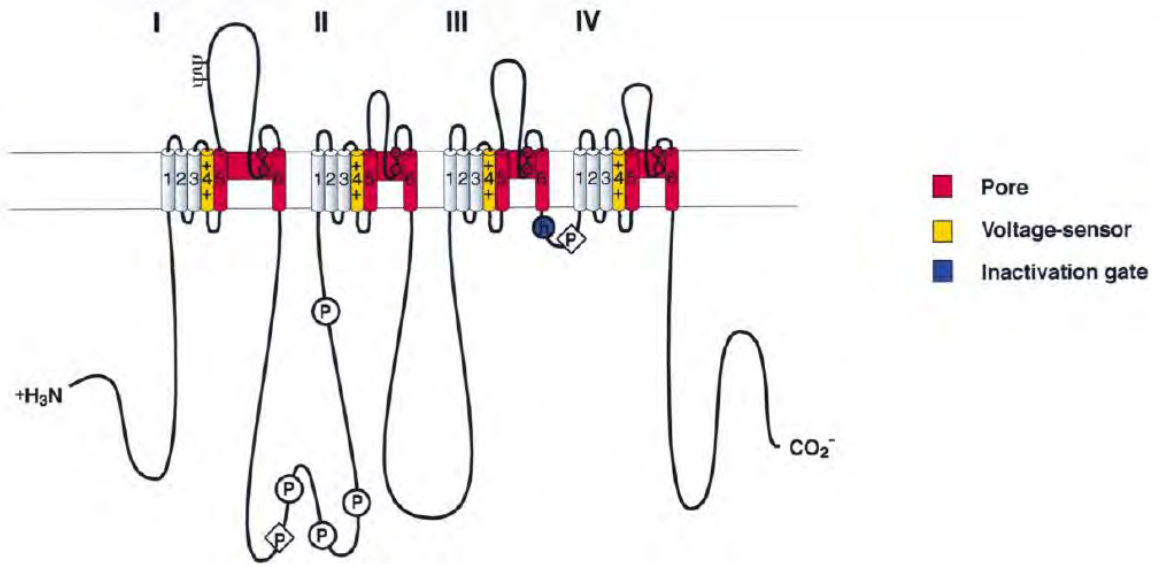

Figura 3. Estructura del canal de Na^+ subunidad α. El canal está formado por cuatro dominios, marcados como I, II, III y IV; cada dominio posee seis regiones o "loops" transmembranales (indicadas con los cilindros numerados); la unión del "loop" 5 y 6 de cada dominio forman el poro del canal (en rojo) y las cargas positivas marcadas en la región 4 de cada dominio representa el "sensor" de voltaje (en amarillo); en azul indica el sitio de inactivación. Modificado de Cèstele y Catterall, 2000.

Una vez recibido el estímulo, por la terminal nerviosa, se genera un cambio en el voltaje de la membrana celular; estos cambios de voltaje provocan la liberación de neurotransmisores, los mensajeros químicos del cerebro. Los neurotransmisores se liberan en las terminales sinápticas, se difunden a través de la hendidura sináptica y se unen a receptores en la superficie de la célula blanco (figura 4). Estos receptores actúan como interruptores de encendido-apagado para la siguiente célula. Cada receptor tiene una región o forma distintiva que reconoce selectivamente a un mensajero químico en particular, de tal forma que, cuando el mensajero está en el sitio de unión, esta interacción modifica el potencial de membrana de la célula blanco y dispara una respuesta, tal como la contracción de un músculo, la estimulación de la actividad enzimática o la inhibición de la liberación de neurotransmisores por la célula blanco (Mayer, 2017).

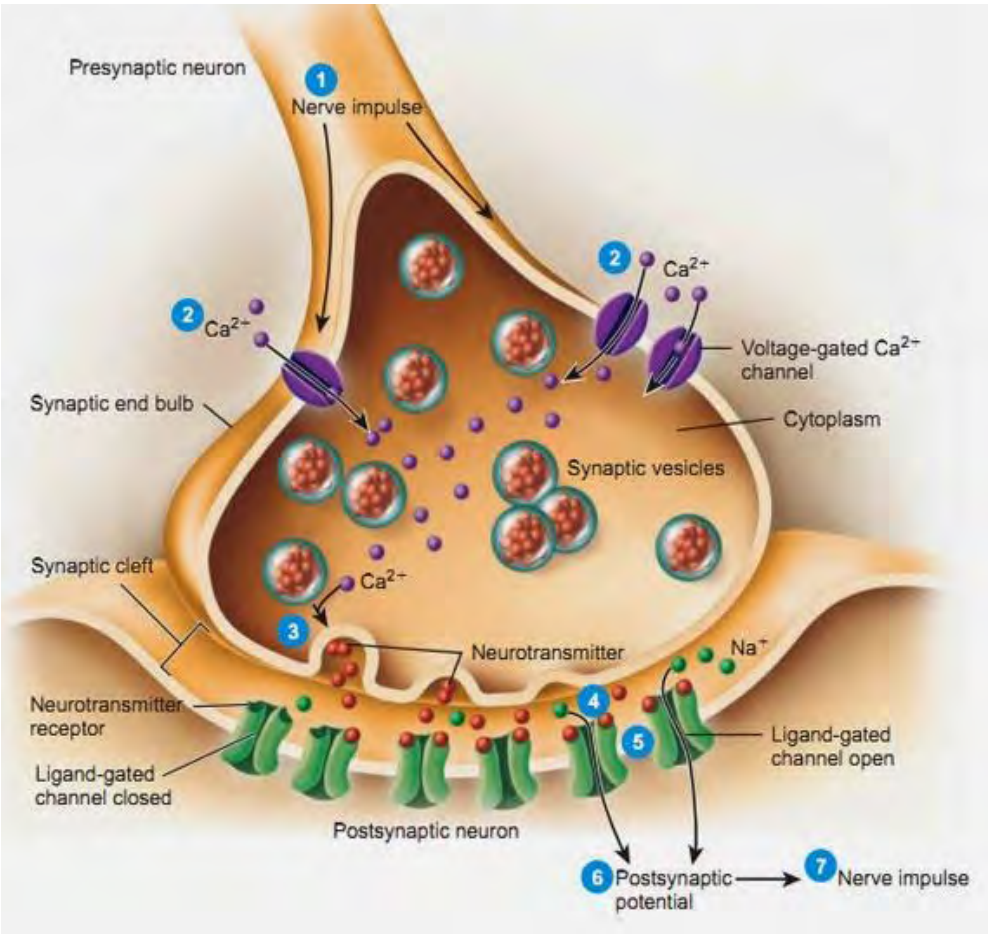

Figura 4. Esquema general de la sinapsis. La comunicación entre las neuronas es precisa y permite el intercambio de información. El impulso nervioso (o estímulo) llega a la terminal presináptica (1), con ello se abren los canales iónicos dependientes de voltaje, principalmente Ca^{2+} (2), entra el calcio extracelular a la terminal nerviosa y esto facilita la fusión de vesículas sinápticas en la membrana plasmática (3) para posteriormente liberar el neurotransmisor a la hendidura sináptica (4) y se abren los receptores-canales de la terminal post-sináptica o célula blanco (5) para la entrada de iones que van a generar un potencial en la terminal (6) con el cual se da una nueva respuesta o impulso nervioso (7).

El cambio en el voltaje de las neuronas modifica también la actividad de los canales iónicos presentes en la membrana celular. Las neuronas mantienen un potencial eléctrico negativo, con relación al medio extracelular, porque su membrana es relativamente permeable a potasio y relativamente impermeable a sodio, cloro y calcio. El flujo de estos iones a través de la membrana permite que se lleven a cabo diferentes funciones. Los iones como Na^{+}, K^{+} y Ca^{2+}, tienen un rol principal en el funcionamiento celular; por ejemplo, los canales de Na^{+} son blancos de múltiples fármacos importantes, incluyendo anestésicos locales. La activación de los canales de K^{+} participa en la despolarización de las neuronas, mientras que la activación de canales de Ca^{2+}, tiene un rol importante en la liberación de neurotransmisores y la activación de cascadas de señalización celular. Las mutaciones en canales iónicos es la causa de diversos desórdenes neurológicos, notablemente en desórdenes neuromusculares severos (Nestler *et al*., 2001).

2.3 *Bunodeopsis globulifera*

Es una anémona que se caracteriza por su tejido “delicado”, tentáculos elongados retráctiles que rodean al disco oral y una columna corta, seguida de un pedúnculo con vesículas que se adhieren al sustrato. Su talla va de 5 hasta 20 mm, es generalmente transparente y se encuentra asociada a los pastos marinos de entre uno y cuatro metros de profundidad (figura 5). Se encuentra abundantemente en el Mar Caribe Mexicano (Duerden y Fellow, 1902) y se ha reportado que el contacto físico con esta anémona provoca urticaciones graves (Milla *et al*., 2003); sin embargo, el conocimiento acerca de las propiedades que presentan las toxinas de esta anémona, es escaso.

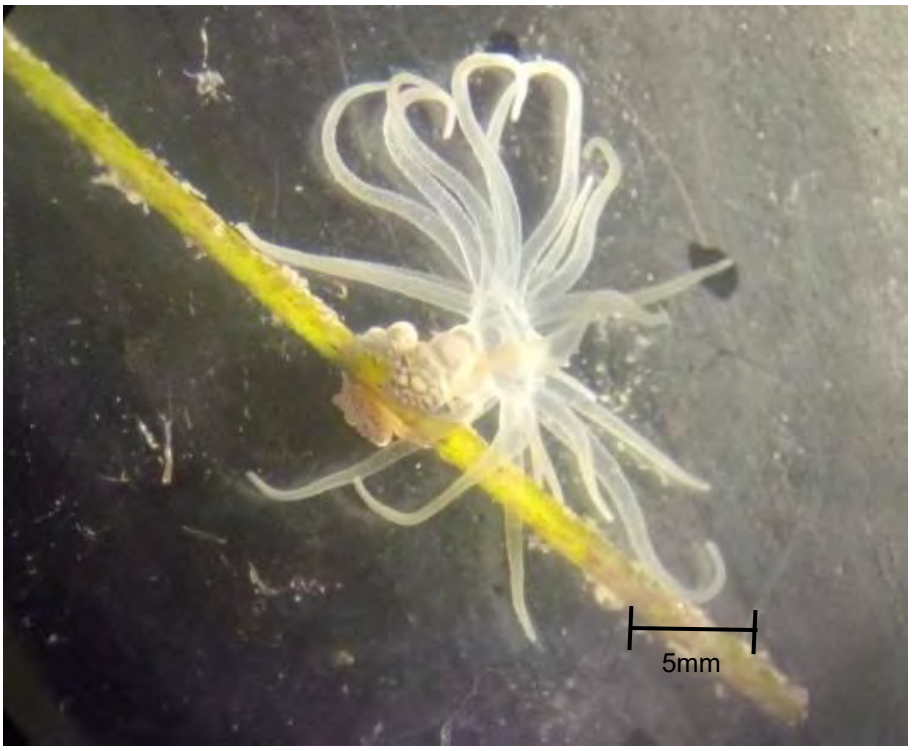

Figura 5. ***Bunodeopsis globulifera*** adherida a una lámina foliar de pasto marino. Fotografía tomada con un microscopio estereoscópico, por Aleida J. Flores.

3. Antecedentes directos

Bruhn *et al.* (2001) reportaron que las toxinas aisladas de la anémona *Anthopleura elegantissima* provocan parálisis a cangrejos. El mismo grupo de trabajo sugirió (mediante experimentos de "patch-clamp"), que las toxinas de *A. elegantissima* modifican la corriente a través de canales de sodio en células de neuroblastoma, lo cual conduce a la inactivación retardada e incompleta de dichos canales.

Gondran *et al.* (2002) demostraron que el extracto crudo de la anémona *Bunodosoma caissarum* provoca convulsiones en ratones al ser administrado intracerebro-ventricularmente y que este efecto está involucrado con el sistema glutamatérgico de los roedores, ya que el EC disminuye la unión de glutamato y aumenta la liberación del mismo, en corteza de ratón.

Sánchez-Rodríguez *et al.* (2006) encontraron que las neurotoxinas producidas por la anémona *Bartholomea annulata* provocan hiperactividad seguida de parálisis severa en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, y sugieren que las toxinas actúan a través del sistema neuromuscular del cangrejo (y de otras especies), afectando la función de los canales de sodio dependientes de voltaje y a las células musculares.

Finalmente, Monroy-Estrada *et al*. (2013) reportaron que tanto el extracto crudo, como las fracciones I y II obtenidas de la anémona *Bunodeopsis globulifer*a tienen efecto citotóxico sobre células tumorales de pulmón (A549); al administrar cisplatino con las toxinas de la anémona se obtiene una reducción significativa en la proliferación celular, por lo cual proponen que la administración de la toxina puede ayudar a disminuir las dosis de cisplatino en pacientes y disminuir a su vez, los efectos adversos provocados por éste fármaco.

4. Justificación

El estudio de las neurotoxinas es de gran interés para la investigación biomédica, debido a los efectos que provocan en la fisiología de los animales.

Bunodeopsis globulifera es una anémona que se encuentra en el Mar Caribe Mexicano y ha sido reportada por provocar urticaciones graves, asociadas a las substancias activas que contiene. Sin embargo, no todos los beneficios que puede aportar esta especie han sido documentados.

El estudio de los efectos fisiológicos causados por las toxinas presentes en *Bunodeopsis globulifera* es muy importante debido a su potencial uso terapéutico y la realización de este estudio nos permitirá dar una primera aproximación documentada sobre el probable mecanismo de acción de las neurotoxinas presentes en esta anémona.

5. Preguntas de investigación

¿Qué neurotoxinas están presentes en la anémona *Bunodeopsis globulifera*?

¿Las neurotoxinas presentes en *Bunodeopsis globulifera,* afectan la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central?

¿Las neurotoxinas de *Bunodeopsis globulifera,* pueden afectar el sistema motor de ratones?

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Aislar y pre-purificar neurotoxinas presentes en la anémona *Bunodeopsis globulifer*a y dilucidar un posible mecanismo de acción, mediante ensayos en roedores.

6.2 Objetivos específicos

Aislar substancias activas presentes en la anémona *Bunodeopsis globulifera* mediante la obtención del extracto crudo.

Pre-purificar el extracto crudo mediante ultrafiltración y cromatografía de líquidos.

Evaluar la actividad biológica del extracto crudo y de las fracciones pre-purificadas, mediante bioensayos en cangrejos (*Ocypode quadrata*).

Evaluar la actividad biológica del extracto crudo, sobre la liberación de glutamato en corteza de rata.

Evaluar la actividad biológica del extracto crudo, sobre la actividad motora de ratones.

Evaluar la actividad biológica del extracto crudo, sobre la proliferación celular en cultivos neuronales tumorales.

7. Área de estudio

La Laguna Arrecifal de Puerto Morelos está ubicada en el área norte de la costa de Quintana Roo (Mar Caribe Mexicano). La laguna se extiende desde la línea de costa hasta un arrecife coralino que corre ligeramente en diagonal a una distancia de ~500 a 2000 m de la costa. La profundidad en la laguna arrecifal es de aproximadamente 1 a 4 m y está compuesta principalmente por arena calcárea estabilizada por amplias praderas de pastos marinos, aunque en algunas partes aflora el pavimento calcáreo. La temperatura del agua es típicamente más alta en julio-septiembre (29.4-29.5°C), y más baja durante enero-marzo (25.1-25.8 °C) (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010)

8. Materiales y métodos

8.1 Colecta de *Bunodeopsis globulifera*

La colecta de los organismos se realizó mediante buceo libre*. Bunodeopsis globulifera* se encuentra en la zona de pastos y vive adherida a éstos; por lo anterior los ejemplares se recolectaron manualmente en la laguna arrecifal de Puerto Morelos y fueron transportados al laboratorio de Toxinología de Cnidarios de la UASA del ICMyL, dentro de bolsas “Ziploc” conteniendo agua de mar, con la finalidad de mantener a los organismos en óptimas condiciones para la extracción. Una vez en el laboratorio, los ejemplares fueron procesados.

8.2 Obtención del extracto crudo

La obtención del extracto crudo (EC) se realizó sometiendo a los organismos a maceración usando un homogeneizador (con 1 mL de agua desionizada), con la finalidad de obtener el máximo de las substancias activas que se encuentran dentro de los cnidocitos. Posteriormente el tejido fue centrifugado a 4 000 rpm durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se separó y se mantuvo en refrigeración y el tejido se trató con

ultrasonido en un sonicador Cole Parmer modelo 08895-52 en 4 ciclos de 10 minutos y se volvió a separar mediante centrifugación.
El sobrenadante (extracto crudo) fue almacenado en tubos cónicos para centrifuga de 50 mL y congelado a -60°C para su posterior liofilización en un equipo Freeze Drying modelo 77500 (Labconco ®) a una temperatura de -45°C para deshidratar por completo el extracto crudo.

8.3 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976), haciendo reaccionar 20 µL de extracto crudo (disuelto en agua desionizada) con 1 mL de reactivo de Bradford (Bio-Rad®) y leyendo la absorbancia de la reacción a 595 nm en celdas de poliestireno (Sigma-Aldrich) en un espectrofotómetro Turner® modelo Sp-830. Se usó agua como blanco.

Para asociar la absorbancia registrada con una concentración de proteína se elaboró una curva patrón empleando como estándar albúmina sérica bovina (BSA) de Bio-Rad® por triplicado.

8.4 Separación del extracto crudo

8.4.1 Separación por ultrafiltración

El fraccionamiento inicial del extracto crudo se realizó mediante ultrafiltración en una celda con agitación, empleando membranas (Millipore®) con corte por peso molecular de 10kDa. Se disolvieron 5 g de EC en 250 mL de agua desionizada, los cuales se hicieron pasar por la cámara de ultrafiltración. Para evitar la colmatación de las membranas, al término de cada filtración la membrana fue sonicada durante 45 minutos. La solución filtrada fue congelada en tubos Falcon y permanecieron a -60°C hasta su tratamiento.

8.4.2 Separación por cromatografía de filtración en gel

Para la purificación de la fracción igual o menor a 10 kDa obtenida por ultrafiltración (180 mL), se realizó cromatografía de filtración en gel. La muestra se descongeló y se agitó con un “vortex” durante cinco minutos aproximadamente; posteriormente se realizaron dos corridas cromatográficas con 90 mL de muestra (cada una), la cual se colocó en una columna (5.0 cm de diámetro x 82.5 cm de alto) rellena con Sephadex G50-M (Pharmacia Biotech®) y equilibrada con ácido acético 0.3M, con un flujo de 2 mL/min.

Las fracciones fueron separadas de acuerdo con el perfil de elución (usando una longitud de onda de 280 nm para detectar la elusión de proteínas) obtenido mediante el software Primeview® y concentradas a presión reducida en un Rotavapor Buchi®R-205 a 30°C. Posteriormente las fracciones fueron liofilizadas, pesadas y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (1976).

8.5 Ensayo de actividad biológica

Se realizó un monitoreo de la actividad del extracto crudo y de las fracciones obtenidas, utilizando el bioensayo con cangrejos propuesta por Béress y Béress (1971); esto con el fin de saber si tanto el extracto crudo, como las fracciones obtenidas presentan actividad neurotóxica. La prueba se realizó en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata,* colectados en la playa de Puerto Morelos; a los organismos se les inyectó 50 µL del tratamiento correspondiente, en el tercer apéndice caminador. Se tuvo un grupo control, al cual se le administró el vehículo (agua desionizada); un grupo al cual se le inyectó el EC (0.725 mg de proteína/mL); y otro grupo al que se le administró cada una de las fracciones obtenidas (100 µg/mL). Posteriormente se observaron y registraron los síntomas que presentó cada organismo.

8.6 Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE)

Se realizó electroforesis en geles de acrilamida al 12% con amortiguador de Tris-HCl (pH 8.8) para evaluar el peso molecular de los compuestos presentes en el extracto crudo y en las fracciones pre-purificadas de *Bunodeopsis globulifera*. Las muestras se desnaturalizaron en amortiguador de carga, en una dilución 1:3 por 4 minutos. Se usaron 4 µL de marcador de peso molecular (Precisión Plus Protein™ Dual Xtra Standards, Bio-Rad®) y el extracto crudo se cargó a una concentración de 300 µg de proteína/mL, mientras que las cuatro fracciones obtenidas por cromatografía en gel permeable (Sephadex G50-M) se colocaron a una concentración de 100 µg/mL cada una. Posteriormente se hizo pasar una corriente de 20 mA para la migración de las proteínas en el gel y finalmente se tiñó con plata usando el kit "ProteoSilver, Silver Stain Kit, SIGMA-Aldrich®".

8.7 Ensayos de actividad neurotóxica

Los experimentos se realizaron en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Sede Zacatenco, Ciudad de México. La liberación de [^{3}H]-glutamato y actividad motora, se evaluaron en el Laboratorio Siete del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias a cargo del Dr. Benjamín Florán Garduño y bajo la tutoría del Dr. José Arturo Avalos Fuentes. Las pruebas de proliferación celular y apoptosis se realizaron en el Laboratorio 13 del Departamento de Farmacología, a cargo del Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo.

8.7.1 Liberación de [^{3}H]-glutamato

8.7.1.1 Obtención del tejido: rebanadas de corteza

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, de entre 200 y 230 g de peso. Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y rápidamente decapitadas para la obtención del cerebro, el cual fue fijado al fondo de una caja Petri cubierta con solución Krebs Normal (NaCl 118.25 mM, KCl 1.75 mM, $MgSO_4$ 1 mM, KH_2PO_4 1.25 mM, $NaHCO_3$ 25 mM,

$CaCl_2$ 2 mM, D-glucosa 10 mM, pH 7.4, previamente oxigenado en una mezcla de O_2 (95%) y CO_2 (5%)/ 4 ºC) y se realizaron cortes coronales de 300 µm de espesor con ayuda de un vibratomo (CAMPDEN Instruments Ltd). Las rebanadas se colocaron en un portaobjetos y por microdisección se obtuvo la corteza, la cual fue identificada de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson, con ayuda de un microscopio estereoscópico. Las rebanadas obtenidas fueron colocadas en un vial con solución Krebs Normal y estabilizadas a 37°C con burbujeo constante de O_2 (95%)/CO_2 (5%) por 20 minutos.

8.7.1.2 Marca radiactiva ([^{3}H]-glutamato)

Una vez trascurrido el tiempo de estabilización, las rebanadas fueron resuspendidas en solución fisiológica con [^{3}H]-glutamato (5 µL/mL) por 30 min, en presencia de ácido aminoxiacético (20 µg/mL) para evitar su degradación. Posteriormente se realizaron tres lavados con solución Krebs Normal para retirar el exceso de marca radiactiva no capturada.

8.7.1.3 Desarrollo experimental

Las rebanadas ya incubadas con [^{3}H]-glutamato fueron transferidas a cámaras de perfusión acopladas a un colector de fracciones, donde se trataron con el extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera*, a una concentración de 50 µg de proteína/mL, seguido de las condiciones particulares para cada estrategia experimental. Después de un periodo de estabilización y lavado de 10 min, se colectaron 2 fracciones de 4 min c/u de liberación basal, 2 fracciones con el extracto crudo y posteriormente se aplicó un pulso despolarizante cambiando la solución Krebs Normal por una de alto potasio (solución con alto potasio: Krebs K^+ (NaCl 106.25 mM, KCl 28.75 mM, $MgSO_4$ 1 mM, KH_2PO_4 1.25 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, D-glucosa 10 mM, pH 7.4), para inducir la liberación de [^{3}H]-glutamato por despolarización.

Adicionalmente se realizaron experimentos de liberación con EDTA, en donde se colectaron tres fracciones de liberación basal, tres fracciones con el EC y

posteriormente se aplicó EDTA [1 mM] para quelar el calcio y registrar si la liberación de [^{3}H]-glutamato es dependiente de calcio. En cada experimento se corrieron 10 muestras, cinco para cada condición experimental, por triplicado.

8.7.1.4 Cuantificación de [^{3}H]-glutamato liberado

Para cuantificar la radiactividad, se adicionó a cada fracción colectada 9 mL de líquido de centelleo. Al término de cada experimento, las rebanadas fueron extraídas de las cámaras de perfusión y se les adicionó 1 mL de HCl 1N, con el fin de desintegrar la membrana y cuantificar la radioactividad remanente en el tejido, mediante un contador de centelleo líquido; los resultados fueron obtenidos como liberación fraccional, la cual se obtuvo de la siguiente relación:

$$F.L. = R.P.F. / R.P.T.$$

Dónde: F.L. es la fracción liberada, calculada mediante la división de la radioactividad presente por fracción (R.P.F.), sobre la radioactividad remanente en el tejido (R.P.T.). La F.L. se expresó en las gráficas como el cociente de la fracción "X" entre la fracción en la cual se aplicó el extracto crudo, es decir, entre la fracción 2 para los experimentos de [^{3}H]-glutamato+EC y entre la fracción 3 para los experimentos de [^{3}H]-glutamato+EC+EDTA, esto con la finalidad de expresar la fracción liberada por arriba del valor basal en la curva.

8.7.2 Actividad motora

Para esta prueba se usaron ratones CD-1 de entre 30 y 35 g de peso, los cuales fueron mantenidos en condiciones de bioterio: 18-23°C, un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y alimentación *ad libitum*. Se formaron cuatro grupos experimentales, de seis individuos cada uno, los cuales fueron tratados con el extracto crudo a diferentes concentraciones (mg de proteína/mL), diluido en solución salina 0.9% y administrado de forma intraperitoneal. Los grupos fueron divididos de la siguiente manera: grupo 1 Control, al

cual se le administró solución salina al 0.9%; grupo 2 EC a una concentración de 10 mg de proteína/kg, grupo 3 EC a una concentración de 100 mg de proteína/kg y grupo 4 EC a una concentración de 500 mg de proteína/kg. Para evaluar la actividad motora, los ratones fueron colocados en cajas especializadas de la marca “Med Associates Inc.”, durante 45 minutos y se tomaron en cuenta los parámetros de distancia ambulatoria, velocidad promedio y cuentas verticales (el número de veces que el ratón se apoyó solo sobre sus extremidades posteriores, levantando el cuerpo); cada ratón tuvo siete minutos de adecuación y posteriormente se les administró el tratamiento correspondiente. Después de evaluar la actividad motora, los animales fueron sacrificados.

8.7.3 Proliferación celular

8.7.3.1 Línea celular

Se usó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y; las células fueron cultivadas en medio DMEM/F12, suplementado con suero fetal bovino al 10 %, 100 µL/mL de penicilina y estreptomicina. Se incubaron a 37º C y atmósfera con 5 % de CO_2.

8.7.3.2 Actividad metabólica (ensayo MTT)

La proliferación celular se estudió por medio del método MTT, el cual mide la actividad metabólica (viabilidad celular). Las células se sembraron en placas de 96 pozos y la proliferación celular se evaluó por el método colorimétrico basado en la conversión de las sales de tetrazolium [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, o MTT] a cristales de formazán, por la actividad de la enzima deshidrogenasa en la mitocondria. Para esto se usó el “Cell Proliferation Kit I”, obtenido de Boehringer Mannheim GmbH. Las células se incubaron durante 24 h en presencia del EC disuelto en el medio de cultivo. El EC se aplicó en concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 200

µg de proteína/mL y se usó medio de cultivo como vehículo. El MTT (0.5 mg/mL) fue adicionado 4 h antes del término del tratamiento. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, se agregó SDS (al 10% en HCl) para disolver los cristales. Finalmente, los valores de absorbancia fueron obtenidos mediante un fotómetro de microplaca (Sunrise Touchscreen). El ensayo contó con cuatro repeticiones.

8.7.3.3 Apoptosis

En las células normales la distribución de los fosfolípidos de la membrana es asimétrica, la membrana interna contiene fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina (PS) y la externa fosfolípidos neutros. En la célula apoptótica se produce la translocación de moléculas de PS de la membrana interna a la externa; esto ocurre durante la apoptosis temprana donde se mantiene la integridad de la membrana. La anexina-V es una proteína con gran afinidad a las moléculas de PS; por lo tanto la anexina se puede unir a las células apoptóticas por exponer moléculas de PS al exterior, discriminando así las células apoptóticas de las normales. Dado que la membrana de las células necróticas se permeabiliza estas pueden unir también anexina por lo que para distinguirlas de las células apoptóticas se usa el ioduro de propidio (IP) el cual se une al ADN; por lo tanto solo las células necróticas podrán capturar el IP.

Viables: No se unen a anexina ni a IP
Apoptosis temprana: Se unen a anexina-V
Apoptosis tardía: Se unen a anexina e IP
Necrosis: Se unen a IP mayormente

Las células se sembraron en cajas de cultivo de 60 mm y se incubaron durante 24 h con el medio de cultivo solo o en presencia del extracto crudo (75 µg de proteína/mL) o presencia de la fracción correspondiente (25 µg de proteína/mL), obtenidos de *Bunodeopsis globulifera*, o vehículo (medio de cultivo). Camptotecina (inductor de apoptosis) y metanol (inductor de la necrosis) se usaron como controles positivos, los

cuales fueron adicionados 4 horas antes del término del tratamiento. La apoptosis se determinó mediante la unión de la anexina V-FITC a la fosfatidilserina y a la tinción del DNA con yoduro de propidio (PI) [Annexin V-FITC kit (Invitrogen Co.)]. Los experimentos se llevaron a cabo por medio de citometría de flujo [cytometer CYAN ADP (Dako, Glostrup)]. Se realizaron seis repeticiones. El porcentaje de células viables (FITC y PI negativas), de células apoptóticas (FITC positivas y PI negativas), y de células en apoptosis tardía (FITC y PI positivas) se obtuvieron por medio del análisis de cuadrantes usando el Software Summit 4.3.

8.8 Análisis Estadístico

Las curvas obtenidas en cada uno de los experimentos de liberación de [^{3}H]-glutamato fueron analizadas para obtener el área bajo la curva, usando el software GraphPad Prism 5. Las áreas obtenidas para cada condición experimental fueron comparadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba t de Student. Para determinar si hubo cambio significativo de los tratamientos sobre la actividad motora se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los datos obtenidos del ensayo de proliferación celular y apoptosis se analizaron aplicando ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. El valor de $p<0.05$ fue tomado como como valor mínimo de significancia aceptable entre los grupos.

9. Resultados

En este estudio trabajamos con anémonas de la especie *Bunodeopsis globulifera;* obtuvimos el extracto crudo y se determinó, con base en la descripción morfológica de Kass-Simon y Scappaticci (2002), que los cnidocitos contenidos en el extracto pertenecen a la subcategoría nematocisto (figura 6), del tipo "basitrichous isorhiza" y "microbasic mastigophore", lo cual concuerda con lo descrito para esta especie (Dueerden y Fellow, 1902).

9.1 Obtención del extracto crudo y cuantificación de proteínas

Se realizaron 6 muestreos durante el período de febrero a mayo de 2016, en donde se colectaron organismos que fueron identificados como *Bunodeopsis globulifera*. Se registró el peso húmedo (tabla 1) y posteriormente los organismos fueron macerados como se describió anteriormente; se monitoreó la descarga de cnidocitos, para corroborar que al menos el 85 % de ellos se dispararon y obtener así las toxinas (figura 6). El extracto obtenido se centrifugó, se recuperó el sobrenadante y posteriormente se liofilizó. Se registró el peso seco, se determinó el rendimiento tomando el peso húmedo como el 100 % comparado con el peso seco obtenido (tabla 1) y se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford. La concentración de proteína en el extracto crudo de *Bunodeopsis globulifera* fue de 0.145 mg de proteína/ mg de extracto crudo.

Tabla 1. Registro del muestreo de *Bunodeopsis globulifera* en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, durante los meses de febrero, marzo, abril y mayo de 2016.

Muestreo	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Rendimiento (%)
1	12.3	---	---
2	10.4	---	---
3	20.1	---	---
4	19.8	---	---
5	54.1	---	---
6	45.9	---	---
Total: 6	162.6	6.54	4.02

Figura 6. Nematocistos presentes en *Bunodeopsis globulifera* (40x). Las flechas rojas indican en A) nematocisto cargado con toxinas, y en B) nematocistos descargados por medio de maceración.

9.2 Ensayo de actividad biológica del extracto crudo

Se realizaron pruebas de actividad biológica del extracto crudo en cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*); se colectaron seis cangrejos fantasma en la playa de Puerto Morelos y fueron transportados al laboratorio. Se dividieron en dos grupos de tres individuos cada uno. El grupo uno corresponde al control, se le inyectó el vehículo (50 µL de agua desionizada) y se observaron síntomas característicos posteriores a la manipulación del individuo, estado de alerta y exaltación durante aproximadamente 10 minutos posteriores a la inyección, una vez transcurrido ese tiempo, los tres individuos regresaron a un estado de comportamiento basal.

El segundo grupo fue inyectado con EC disuelto en agua desionizada (50 µL a una concentración de 0.725 mg de proteína/mL) y se observaron respuestas similares en los tres organismos, en el siguiente orden: temblores, oscurecimiento del caparazón, movimiento descoordinado de ojos y extremidades posteriores, parálisis, burbujeo por la boca, muerte.

Una vez concluida la observación se realizó la disección de los 3 organismos inyectados con el EC. Los órganos de los tres cangrejos se encontraban aparentemente saludables (figura 7), no se observó necrosis.

Figura 7. Disección de *Ocypode quadrata*, posterior a la inyección de 50 µL de extracto crudo de la anémona *Bunodeopsis globulifera* a una concentración de 0.725 mg de proteína/mL. Los órganos se ven "saludables"; no hubo necrosis causada por las toxinas de la anémona, lo cual indica que los efectos como el temblor y la parálisis observados en el cangrejo tras la administración del extracto crudo, pueden deberse a actividad neurotóxica. n=3.

9.3 Separación del extracto crudo

9.3.1 Separación por ultrafiltración

La siguiente estrategia experimental fue la pre-purificación del extracto crudo mediante ultrafiltración. Se pesaron 5 g de EC y se diluyeron en 250 mL de agua desionizada, posteriormente la muestra fue colocada (en muestras de ±50 mL c/u) en la cámara de ultrafiltración, la cual contenía una membrana con corte molecular de 10 kDa, la fracción ultrafiltrada (180 mL) fue congelada a -60°C para su posterior purificación por cromatografía en gel permeable.

9.3.2 Separación por cromatografía de filtración en gel

La muestra obtenida por ultrafiltración fue colocada en una columna con gel permeable Sephadex G50-M; se realizaron dos corridas con 90 mL de muestra cada una y con base en el perfil de elución (figura 8) la muestra colectada se dividió en cuatro fracciones, que en adelante se mencionarán como Bg FI, Bg FII, Bg FIII y Bg FIV. Una vez que se obtuvieron las cuatro fracciones, éstas fueron liofilizadas; posteriormente se pesaron y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (1976). Finalmente se realizó un cálculo para conocer el rendimiento final, tomando como el 100 % los 5 g de EC utilizados para esta separación, con relación al peso final de cada fracción.

El peso seco, la concentración de proteína y el rendimiento obtenido para cada fracción se muestra en la tabla 2. La fracción Bg FIII presentó el mayor peso, mientras que la fracción Bg FI fue la que obtuvo el menor peso; encontramos que la fracción Bg FI fue la que presentó la mayor concentración de proteína con respecto a las demás, mientras que la fracción Bg FIV presentó la concentración de proteína más baja; Bg FIII tuvo un mayor rendimiento, mientras que Bg FI fue la que registró el menor, con respecto a las demás fracciones.

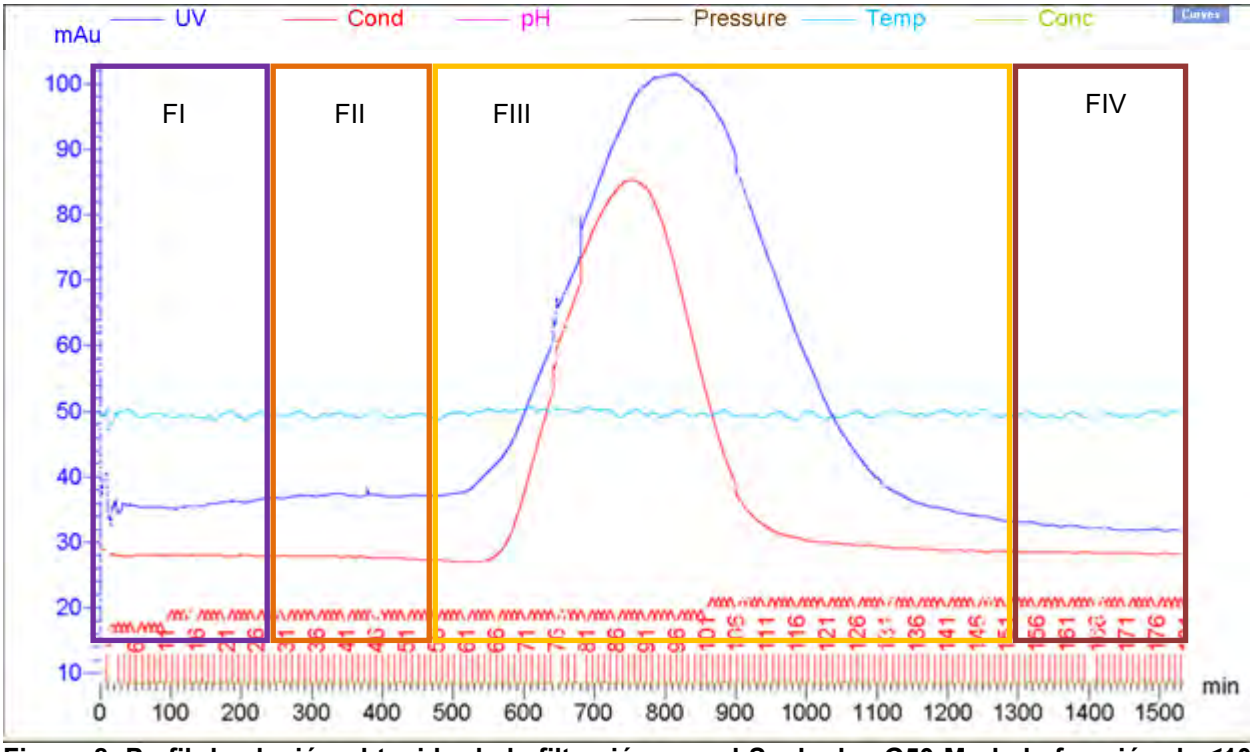

Figura 8. Perfil de elución obtenido de la filtración en gel Sephadex G50-M, de la fracción de ≤10 kDa obtenida por ultrafiltración, del extracto crudo de *Bunodeopsis globulifera*. La muestra colectada fue dividida en cuatro fracciones; en morado se indica la fracción uno (FI), en naranja se indica la fracción dos (FII), en amarillo se indica la fracción tres (FIII) y en café se indica la fracción cuatro (FIV). La concentración de proteína más alta se encontró en la FI (304 µg/mL), mientras que la concentración de proteína más baja la obtuvo la FIV (18.5 µg/mL). Para la detección de proteínas se usó una longitud de onda de 280 nm.

Tabla 2. Peso, concentración de proteína y rendimiento de las cuatro fracciones (Bg FI, Bg FII, Bg FIII y Bg FIV) obtenidas por cromatografía de filtración en gel (Sephadex G50-M), del extracto crudo de *Bunodeopsis globulifera*. Bg FI fue la fracción con menor rendimiento (0.82 %); sin embargo, fue la que presentó la mayor concentración de proteína (304 µg/mL). La fracción con mayor rendimiento fue Bg FIII, con 18.94 %, pero su concentración de proteína fue baja (36 µg/mL), comparada con las demás. La fracción con menor concentración de proteína fue Bg FIV (18.5 µg/mL).

Fracción	Peso (g)	Concentración de proteína (µg/mL)	Rendimiento (%)
Bg FI	0.041	304.0	0.82
Bg FII	0.947	94.5	18.94
Bg FIII	1.667	36	33.34
Bg FIV	0.175	18.5	3.50
Total	2.830	453.0	56.60

9.4 Ensayos de actividad biológica de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel

Se realizaron pruebas de actividad biológica de las cuatro fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel Sephadex G50-M, sobre cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*); se colectaron cuatro cangrejos en la playa de Puerto Morelos y fueron transportados al laboratorio. Se utilizó un individuo para cada una de las cuatro fracciones; a cada individuo se le inyectó una alícuota de 50 µL con una concentración de 100 µg de proteína/mL (disuelta en agua desionizada) de la fracción correspondiente y se observó la respuesta de cada organismo (se tomó como referencia al grupo control usado en el ensayo de actividad biológica del EC).

Las cuatro fracciones provocaron en *O. quadrata* las reacciones registradas en la tabla 3, en el orden en que se presentan; a excepción del cangrejo inyectado con la Bg FIV, todos los organismos murieron. Durante las reacciones que se observaron, cabe resaltar lo siguiente:

Bg FI provocó temblores intensos durante 20 min, aproximadamente, mientras que el resto de las fracciones provocó temblores de menor intensidad y menor duración. La parálisis fue observada en las 10 extremidades y el movimiento descoordinado de los ojos tuvo una duración mayor, comparada con las tres fracciones restantes.

Bg FII provocó parálisis solo en extremidades posteriores y la reacción fue intensa pero de corta duración; el organismo murió aproximadamente, 20 min después de la inyección; fue el que murió en menor tiempo.

Bg FIII le causó temblores durante cerca de 2 h al cangrejo; a pesar de que los temblores no fueron de igual intensidad a la observada en las fracciones Bg FI y Bg FII, sí fueron los de mayor duración; cabe mencionar que este organismo presentó “saltos” durante 10 min aproximadamente, 15 min después de la inyección.

Bg FIV fue la fracción que generó las reacciones menos intensas en *O. quadrata*; sin embargo, fue la que presentó una mayor duración de las mismas. La inyección de la fracción no provocó la muerte del organismo (al final fue sacrificado).

Finalmente, se realizó la disección de cada uno de los cuatro organismos y se encontró que los cangrejos inyectados con Bg FI y Bg FIV no presentaron necrosis y los órganos se observaron "saludables", como se muestra en la figura 9; el cangrejo inyectado con Bg FIII no presentó necrosis pero sí oscurecimiento del tejido, mientras que el cangrejo al cual se le inyectó Bg FII sí presentó necrosis.

Tabla 3. Actividad biológica de las fracciones obtenidas del extracto crudo de *Bunodeopsis globulifera*, por cromatografía de filtración en gel Sephadex G50-M sobre *Ocypode quadrata* (cangrejo fantasma). Bg FI, Bg FII, Bg FIII y Bg FIV fueron inyectadas a una concentración de 100 µg/mL (un cangrejo por cada fracción). Las cuatro fracciones provocaron cambios en la conducta motora de los cangrejos y a excepción de Bg FVI, todas las fracciones causaron la muerte de los organismos.

Fracción	Temblores	Oscurecimiento del caparazón	Movimiento descoordinado de ojos y extremidades	Parálisis	Burbujeo por la boca	Muerte
Control	---	---	---	---	---	---
Bg FI	X	X	X	X	X	X
Bg FII	X	X	X	X	X	X
Bg FIII	X	X	X	X	X	X
Bg FIV	X	X	X	X	X	----

Figura 9. Efecto de las fracciones obtenidas del extracto crudo de *Bunodeopsis globulifera*, por cromatografía de filtración en gel Sephadex G50-M sobre *Ocypode quadrata* (cangrejo fantasma). Bg FI, Bg FII, Bg FIII y Bg FIV fueron inyectadas a una concentración de 100 µg de proteína/mL (un cangrejo por cada fracción). Se muestra en A) Bg FI, en B) Bg FII, en C) Bg FIII y en D) Bg FIV. Bg FI y Bg FIV no provocaron necrosis, Bg FIII causó oscurecimiento del tejido, mientras que Bg FII si provocó necrosis (círculo rojo) en un 50 % del tejido del organismo, aproximadamente, lo cual nos indica que los efectos mostrados en la tabla 3 pudieron ser provocados por compuestos de tipo neurotóxico, presentes en las fracciones Bg FI y Bg FIV, mientras que las fracciones Bg FII y Bg FIII podrían contener compuestos de tipo citolítico.

9.5 Electroforesis SDS-PAGE del extracto crudo y de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel

Se realizaron ensayos de electroforesis SDS-PAGE (acrilamida 12 %) para determinar el peso molecular de las proteínas contenidas tanto en el extracto crudo como en las cuatro fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel (Sephadex G50-M). En el extracto crudo encontramos que hay compuestos proteicos de entre 5 y 150 kDa, como se muestra en la figura 10. Las bandas que se marcan con mayor claridad son las que van de los 5 a los 100 kDa, pero en la imagen se puede apreciar una banda ligeramente marcada cerca de los 75 kDa y otra cerca de los 150 kDa. En este proyecto nuestro interés está en las proteínas de bajo peso molecular, ya que las neurotoxinas de anémonas que se han reportado tienen un peso molecular de entre 3 y 10 kDa.

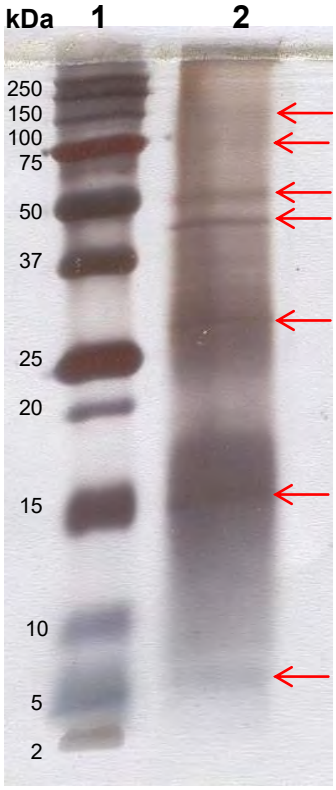

Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE (acrilamida 12 %) del extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera*. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (Dual Xtra Standards, Bio-Rad®), el carril 2 corresponde al extracto crudo de *B. globulifera*, a una concentración de 300 µg de proteína/mL. Se observan bandas (señaladas en rojo) que van desde los 150 hasta los 5 kDa, lo cual nos indica la presencia de compuestos proteicos en la muestra. Los compuestos que nos interesan son los de bajo peso molecular (de entre 3 y 10 kDa).

En las muestras de las fracciones encontramos bandas de entre 5 y 10 kDa, como se muestra en la figura 11. Podemos observar que en los carriles correspondientes a cada una de las 4 fracciones se marca una banda cerca de los 10 kDa y otra entre 2 y 5 kDa, sin embargo, es en la fracción Bg FI en donde se aprecia la banda con mejor claridad. A pesar de que la carga de proteína fue igual para las 4 fracciones (100µg/mL), no se logró obtener bandas de la misma densidad óptica; en las 3 repeticiones de este experimento se marcó con mayor rapidez y claridad la banda de la fracción Bg FI, mientras que la banda que apareció al último fue la correspondiente a la fracción Bg FIV.

También se observó que en la Bg FII y Bg FIII se marcan ligeramente bandas en el peso de 15 kDa y en 25 kDa, lo cual indica la presencia de compuestos proteicos con posible actividad citolítica. Las bandas con peso de entre 2, 5 y 10 kDa en las muestras de cada una de las cuatro fracciones, nos sugieren la presencia de compuestos proteicos con posible actividad neurotóxica.

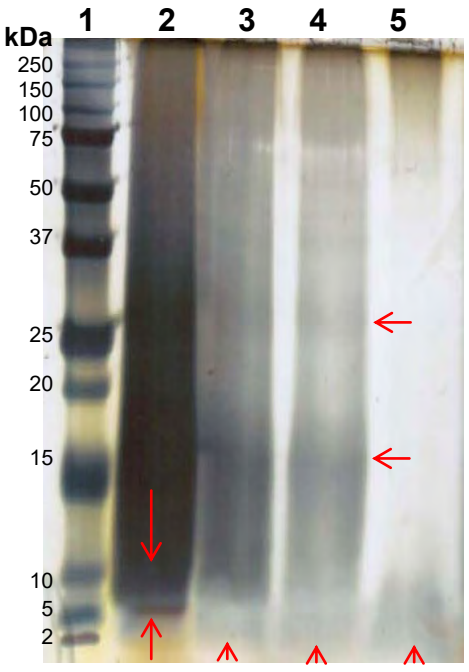

Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE (acrilamida 12 %) de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel Sephadex G50-M, del extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera*. Se muestra en el carril 1 marcador de peso molecular (Dual Xtra Standards, Bio-Rad®), en el carril 2 Bg FI, en el carril 3 Bg FII, en el carril 4 Bg FIII y en el carril 5 Bg FIV (100 µg de proteína/mL cada una). Con flechas rojas se indican las bandas observadas. En Bg FI, fue en donde las bandas se marcaron con mayor rapidez. En Bg FII y Bg FIII se observan bandas ligeramente marcadas cerca de 2 kDa, así como en 15 y en 25 kDa, lo cual indica la presencia de compuestos posiblemente citolíticos en ambas fracciones. Éste ensayo nos indica la presencia de compuestos proteicos de bajo peso molecular en las cuatro fracciones.

9.6 Ensayos de actividad neurotóxica

9.6.1 Liberación de [^{3}H]-glutamato

9.6.1.1 Liberación de [^{3}H]-glutamato en presencia del extracto crudo y alto potasio

En los experimentos de liberación de [^{3}H]-glutamato se utilizaron rebanadas de corteza de rata, las cuales fueron tratadas con 50 µg de proteína de extracto crudo. El tejido fue colocado en 10 cámaras de perfusión, 5 para cada condición (control+EC) y después de 10 minutos de lavado, se colectaron 10 fracciones de 4 min c/u. Las primeras dos fracciones corresponden a la liberación basal, la fracción tres y cuatro corresponden a la liberación provocada por la presencia del EC; posteriormente se administró el pulso despolarizante con alto potasio (KCl 30mM) con el cual se promueve un aumento en la liberación de [^{3}H]-glutamato, efecto visible a partir de la fracción cinco, en la figura 12A. Encontramos que al administrar únicamente el extracto crudo, hay un aumento en la liberación de [^{3}H]-glutamato con respecto a lo observado en el control; al medir el área bajo la curva de esta respuesta, encontramos que el aumento provocado por el EC es de 850 % aproximadamente, sobre la liberación basal (figura 12B); por otra parte, al aplicar el pulso despolarizante con alto potasio en presencia del EC, observamos un aumento significativo en la liberación, de 120% aproximadamente, comparado contra el control (**$p<0.005$), como se muestra en la figura 12C. Nuestros resultados indican que el extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera*, promueve un aumento significativo en la liberación de [^{3}H]-glutamato en rebanadas de corteza de rata, tanto en condiciones basales como en condiciones de despolarización.

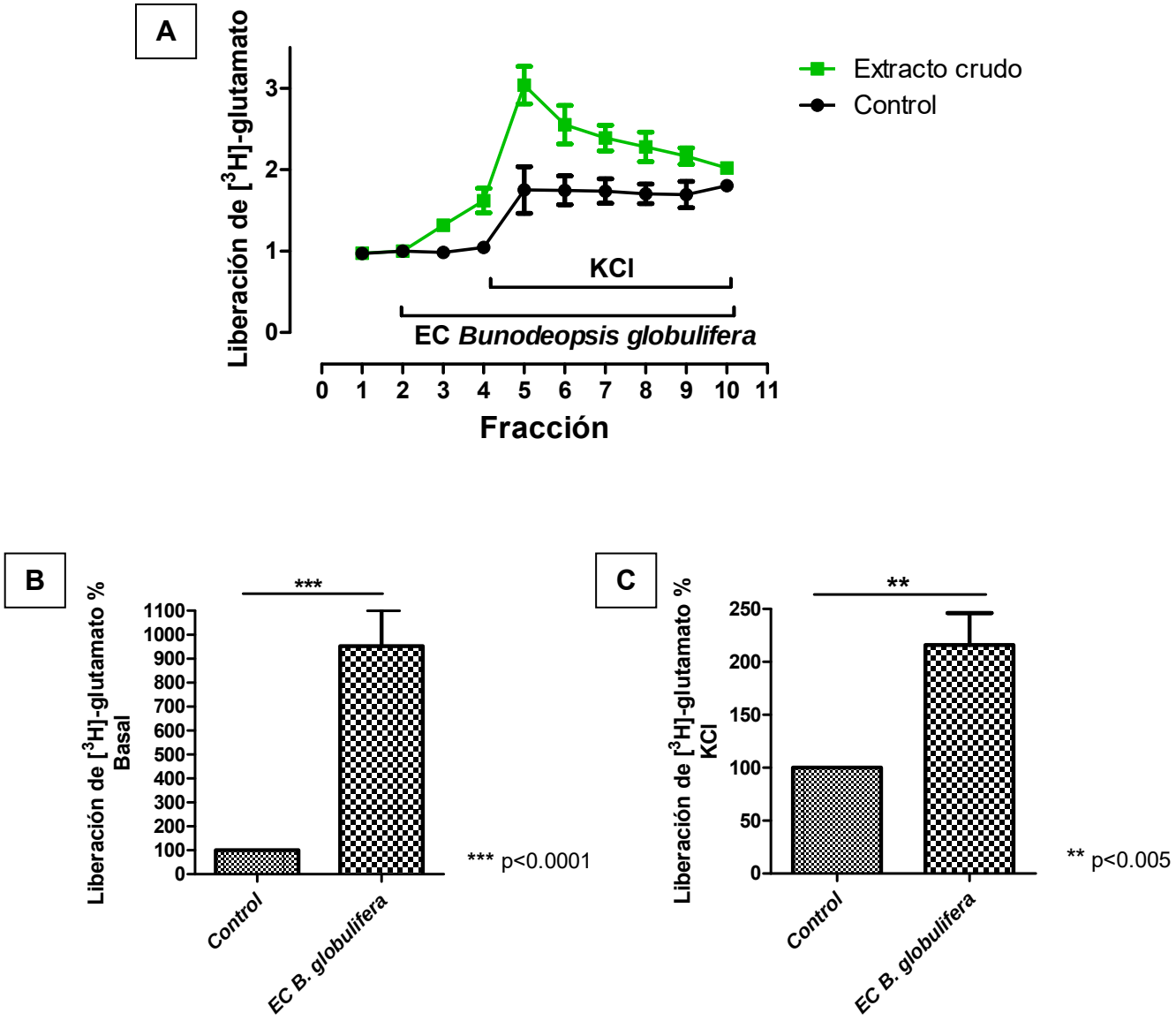

Figura 12. Efecto del extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera,* sobre la liberación de [^{3}H]-glutamato en rebanadas de corteza. En el panel A se muestra la liberación basal (en negro) y al aplicar 50 µg de proteína de extracto crudo (en verde). En el panel B se muestra el área bajo la curva obtenida de la liberación basal de cada condición, expresada en porcentaje. Se observa que el EC estimula significativamente (850 % aprox.) la liberación de [^{3}H]-glutamato por sí solo con respecto a la liberación basal. En el panel C se muestra que el efecto del EC se mantiene aún con el pulso despolarizante con KCl [30mM], el aumento en la liberación, en esta condición fue de 120 % aprox. ***p<0.0001, **p<0.005 vs. control. ANOVA de una vía seguido de una post-prueba T de Student. n=3.

9.6.1.2 Liberación de [^{3}H]-glutamato en presencia del extracto crudo y EDTA

Para este procedimiento se utilizaron rebanadas de corteza de rata tratadas con 50 µg de proteína de extracto crudo. El tejido fue colocado en 10 cámaras de perfusión, 5 para cada condición: Extracto crudo y Extracto crudo+EDTA, después de 15 minutos de lavado, se colectaron 12 fracciones de 4 min c/u. Las primeras tres fracciones corresponden a la liberación basal, la fracción cuatro, cinco y seis corresponden a la liberación provocada por la presencia del EC; posteriormente se administró EDTA para quelar el calcio presente en el medio y observar si la liberación de [^{3}H]-glutamato es dependiente del calcio basal, efecto visible a partir de la fracción siete, en la figura 13A. Encontramos que en presencia del extracto crudo hay un aumento en la liberación de [^{3}H]-glutamato con respecto al control (50 % aproximadamente); al administrar EDTA en presencia del EC observamos que la liberación de [^{3}H]-glutamato disminuyó significativamente, un 60 % aproximadamente, como se muestra en la figura 13B. Nuestros resultados indican que la liberación de [^{3}H]-glutamato en rebanadas de corteza de rata, inducida por el extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera,* puede ser dependiente del calcio extracelular.

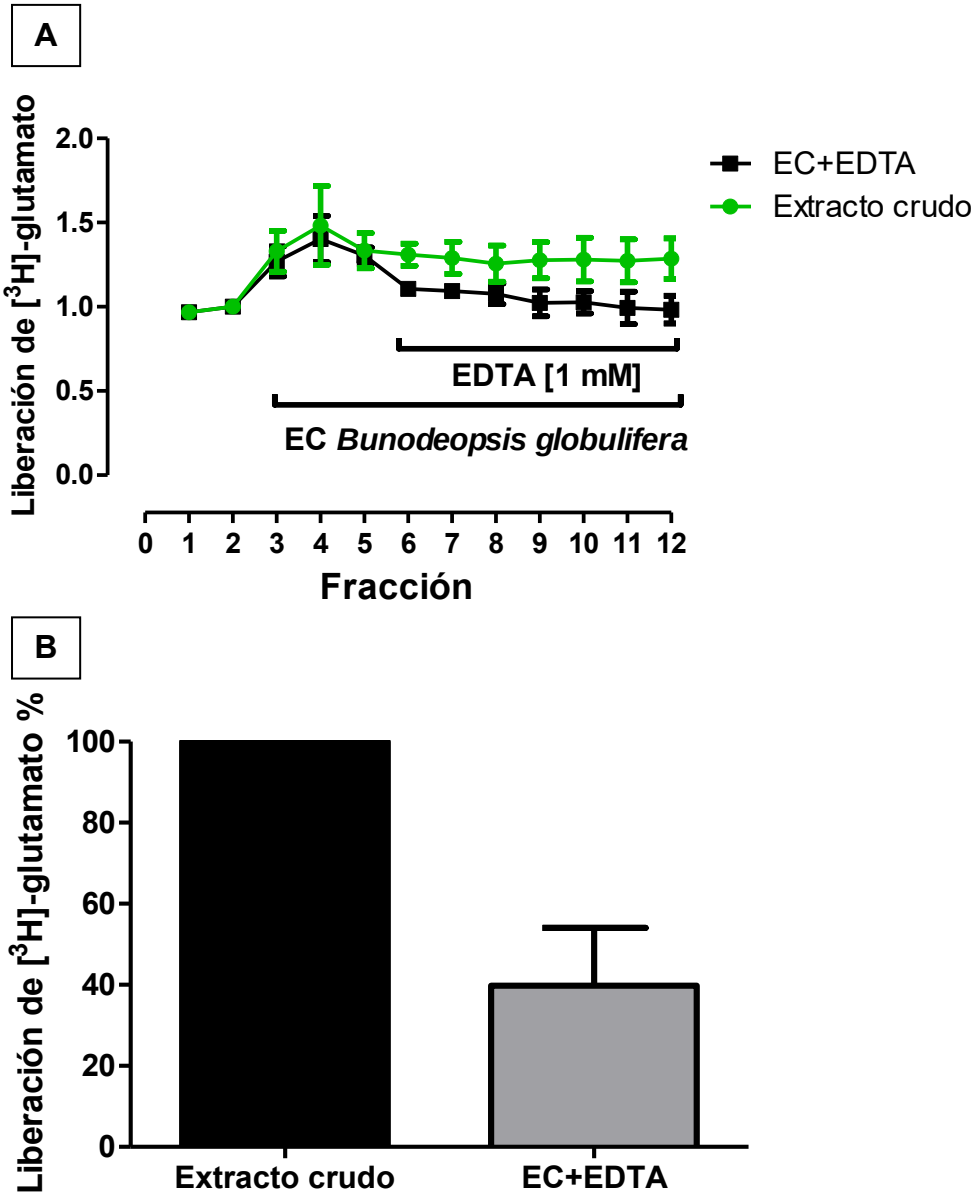

Figura 13. Efecto del extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera,* sobre la liberación de [^{3}H]-glutamato en rebanadas de corteza, en presencia de EDTA. En el panel A se muestra en verde la liberación basal (fracciones 1-3) y al aplicar 50 µg de proteína de extracto crudo (fracciones 3-12); en negro se muestra la liberación basal (fracciones 1-3), la liberación en presencia del EC (fracciones 3-6) y la liberación en presencia del EC+EDTA [1 mM] (fracciones 6-12). En el panel B se muestra el área bajo la curva obtenida de la liberación en presencia del EC y EC+EDTA expresada en porcentaje. Se tomó la liberación de [^{3}H]-glutamato en presencia del EC como 100 % y se comparó con el área bajo la curva del EC+EDTA. Se observa que el EDTA promueve la disminución de la liberación de [^{3}H]-glutamato en presencia del EC (60 % menos), lo cual sugiere la participación de calcio en la liberación de [^{3}H]-glutamato en corteza de rata en presencia del EC. n=3.

9.6.2 Actividad motora

En la prueba de actividad motora se usaron ratones CD-1, a los cuales se les administró de manera intraperitoneal una dosis del EC (10, 100 o 500 mg de proteína/kg según correspondiera); se colocó un ratón por cada caja de actividad locomotora y se midieron los siguientes parámetros: distancia ambulatoria (expresada como distancia acumulada), velocidad promedio y cuentas verticales; durante 45 minutos. Se tuvo un grupo control, al cual se le administró el vehículo (solución salina 0.9%). En nuestros resultados observamos que en la distancia acumulada de los animales tratados con 10 mg/kg de EC no hay diferencia significativa comparada con el control (figura 14 A y B); de igual manera ocurrió en la velocidad promedio (figura 14 C y D) y en las cuentas verticales (figura E y F). En el grupo al que se administraron 100 mg/kg se registró diferencia significativa en los tres parámetros medidos con respecto al control; hubo disminución del 67, 65 y 75 % aproximadamente, en la distancia acumulada, la velocidad promedio y las cuentas verticales, respectivamente, comparado contra el control. Finalmente, en el grupo al que se le administraron 500 mg/kg también observamos cambios estadísticamente significativos en la actividad motora, ya que la distancia acumulada disminuyó 46 %, la velocidad promedio fue 65 % menor y las cuentas verticales 60 % menos, comparadas contra el control; es importante mencionar que los animales de este último grupo murieron aproximadamente ±15 minutos posteriores a la inyección. Algunas conductas que se observaron durante la aplicación de las diferentes concentraciones del EC fueron: i) dificultad para mover las extremidades posteriores, ii) pelo erizado, iii) temblores y iv) espasmos.

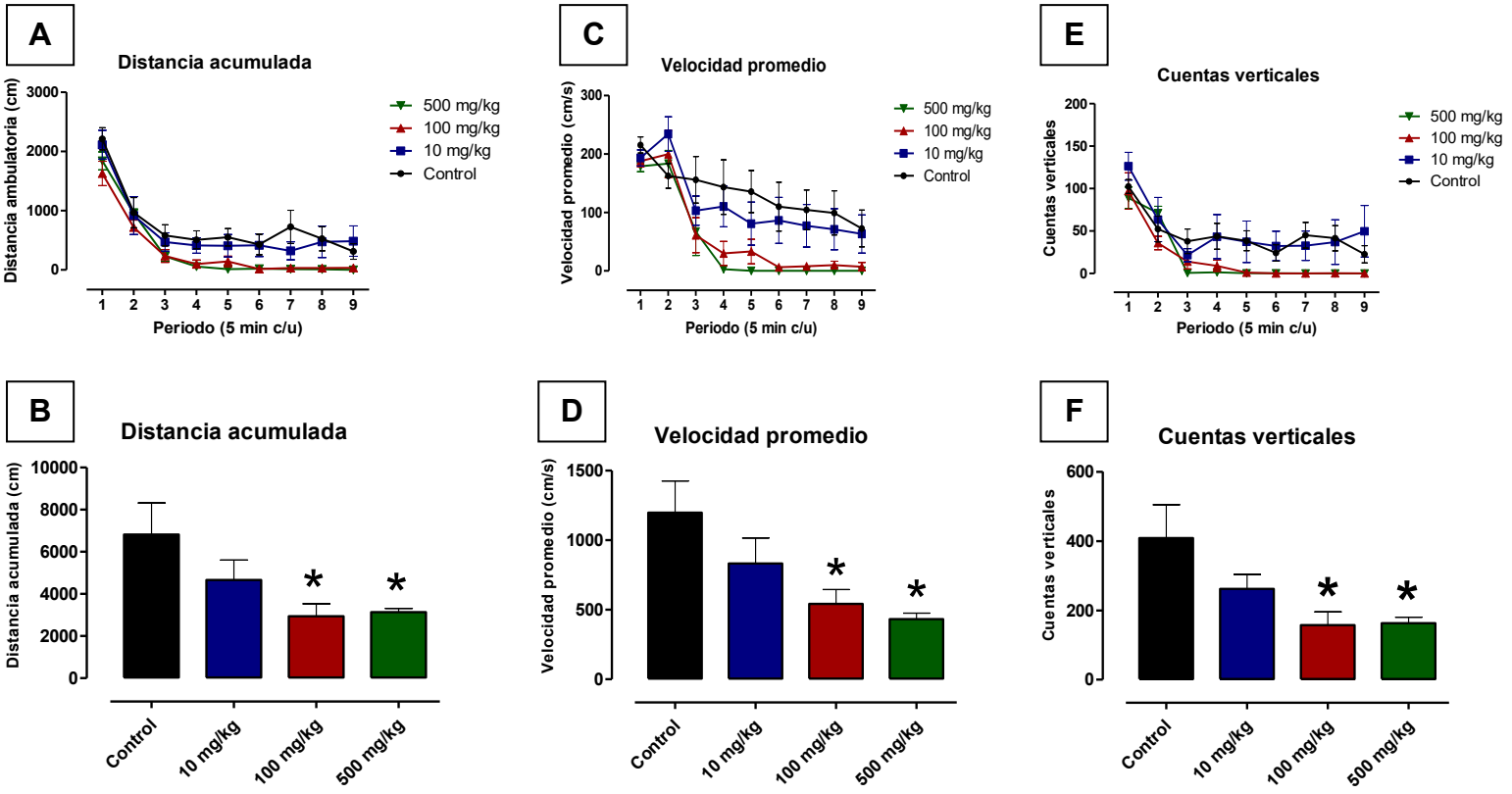

Figura 14. Efecto del extracto crudo obtenido de la anémona *Bunodeopsis globulifera* sobre la actividad motora de ratones. El EC se administró de manera intraperitoneal entre el periodo 1 y 2 (al minuto siete de registro, aproximadamente.), en dosis de 10, 100 y 500 mg de proteína/kg; al grupo control se le administró solución salina (0.9%). La actividad motora se registró en cajas especializadas, durante 45 minutos. En los paneles A, C y E se muestra el curso temporal de registro, dividido en 9 periodos de cinco minutos cada uno para la distancia acumulada, la velocidad promedio y las cuentas verticales respectivamente. En B, D y F se muestra la gráfica de la sumatoria de los datos obtenidos para cada condición experimental. Para las concentraciones de 100 y 500 mg/kg se registró una disminución significativa en la distancia acumulada (67 y 46 %), la velocidad promedio (65 y 65 %) y las cuentas verticales (75 y 60 %), respectivamente, con respecto al control. Los resultados indican que el EC de *B. globulifera* disminuye la actividad locomotora de ratones. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. *p<0.01 vs. control, n=6.

9.6.3 Proliferación celular

9.6.3.1 Actividad metabólica (ensayo MTT)

En los ensayos de proliferación celular se cultivaron células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y se les administraron dosis crecientes del EC y de la fracción Bg FIII, obtenida mediante cromatografía en gel permeable (la fracción de mayor peso seco). La viabilidad celular se evaluó mediante actividad metabólica, medida con MTT (detecta actividad mitocondrial). Las dosis aplicadas fueron 10, 25, 50, 75, 100 y 200 µg de proteína/mL.

Al analizar los datos obtenidos, observamos que el tratamiento con el EC favorece el aumento en la actividad metabólica, desde la concentración de 10 µg de proteína/mL, hasta 100 µg de proteína/mL, lo cual se traduce en una mayor proliferación celular. El mayor aumento se registró con la concentración de 75 µg/mL, ya que el aumento en la proliferación celular fue de 45 % aproximadamente, con respecto al control (figura 15A). El resto de las concentraciones presentaron un aumento de entre 20 y 35 % aproximadamente. Las células que fueron tratadas con la Bg FIII presentaron un efecto parecido al mostrado en el tratamiento con el EC, con la diferencia de que el aumento en la proliferación celular fue ligeramente menor, entre un 8 y 15 % aproximadamente. La única concentración administrada que tuvo un cambio significativo con respecto al control fue la de 25 µg de proteína/mL, al registrar un aumento de 23 % (figura 15B).

En cuanto a cambios en la morfología externa de las células, encontramos que las células sufren algunas modificaciones conforme aumenta la concentración del EC y de la Bg FIII. El cambio más evidente es el que se muestra con el tratamiento de 200 µg de proteína/mL, en donde se observaron células redondeadas y formando glomérulos, como se puede observar en la figura 15. Por lo anterior, podemos decir que tanto el EC administrado en concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 µg de proteína/mL, como la Bg FIII a una concentración de 25 µg de proteína/mL estimulan la proliferación celular en cultivos neuronales SH-SY5Y (neuroblastoma humano); sin embargo, a una

concentración de 200 µg de proteína/mL no hay diferencia contra el control y las células a esta última concentración cambian su morfología y forman glomérulos o racimos (figura 16).

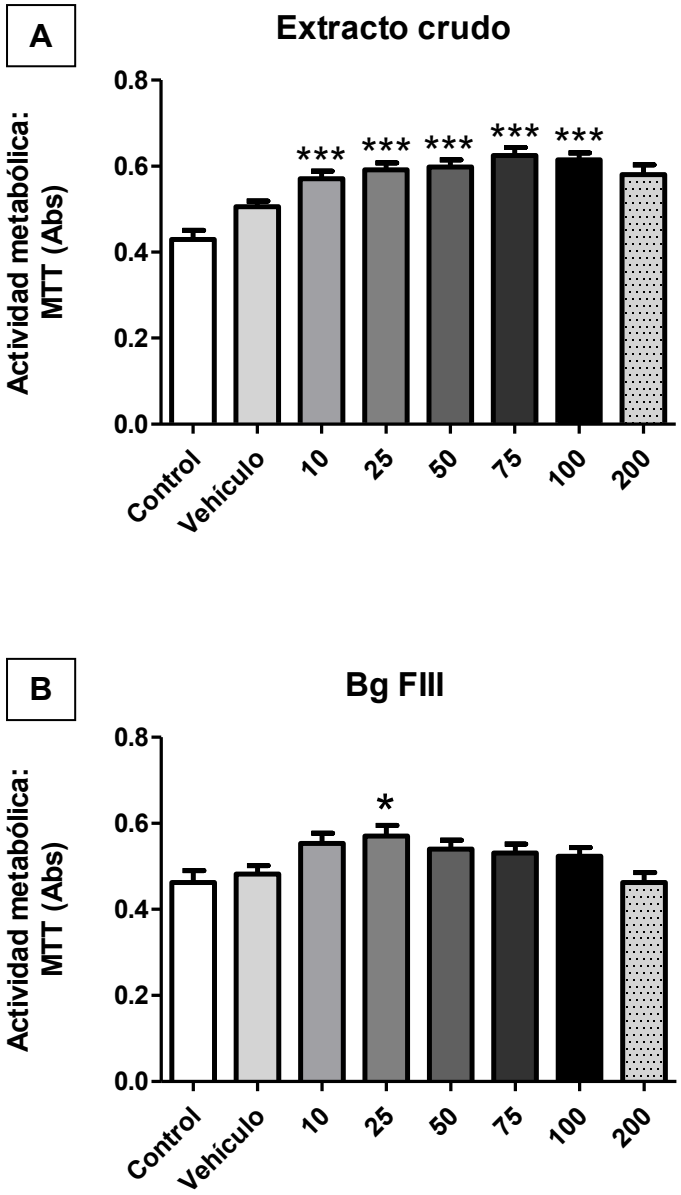

Figura 15. Efecto del extracto crudo (A) y de la fracción Bg FIII (B) obtenidos de la anémona *Bunodeopsis globulifera* sobre la viabilidad celular en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Las células fueron incubadas con dosis crecientes del EC y de la fracción Bg FIII durante 24 h a 37º C. Las dosis aplicadas fueron 10, 25, 50, 75, 100 y 200 µg de proteína/mL. Se realizaron cuatro réplicas. El ensayo de viabilidad celular fue mediante la técnica de MTT. El EC administrado en concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 µg de proteína/mL así como la Bg FIII a una concentración de 25 µg de proteína/mL, estimulan la proliferación celular en cultivos neuronales SH-SY5Y. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

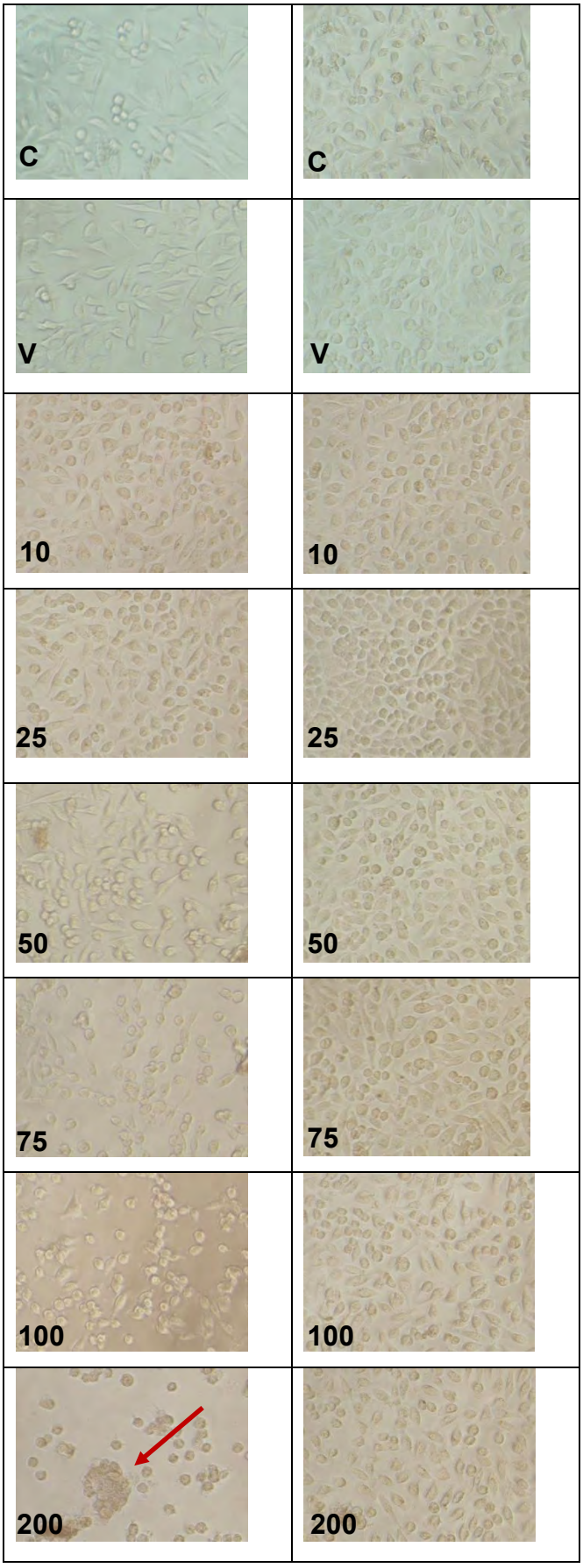

Figura 16. Efecto del extracto crudo y de la fracción Bg FIII de la anémona *Bunodeopsis globulifera* sobre la proliferación de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Las células fueron incubadas con dosis crecientes del EC y de la fracción Bg FIII durante 24 h a 37º C. Las dosis aplicadas fueron 10, 25, 50, 75, 100 y 200 µg de proteína/mL. Se muestra en la columna izquierda: Extracto crudo, en la columna derecha: fracción Bg FIII. Imágenes (20X), de cada una de las condiciones experimentales, incluidos el control y el vehículo (medio de cultivo) antes de realizar la prueba de actividad mitocondrial (MTT). El EC administrado en concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 µg de proteína/mL así como la fracción Bg FIII a una concentración de 25 µg de proteína/mL estimulan la proliferación celular en cultivos neuronales SH-SY5Y (neuroblastoma); sin embargo, a una concentración de 200 µg de proteína/mL no hay diferencia contra el control y las células a esta última concentración cambian su morfología y forman glomérulos o racimos, como se indica con la flecha roja en la columna izquierda.

9.6.3.2 Apoptosis

Para este experimento se utilizaron solo las concentraciones con las que se registró la mayor significancia estadística en proliferación celular; es decir, aquellas que provocaron la respuesta más alta, que en el caso del EC fue 75 µg de proteína/mL y en el caso de Bg FIII fue 25 µg de proteína/mL, con la finalidad de observar si ambos tratamientos estaban participando en el mecanismo de apoptosis de la línea celular estudiada (SH-SY5Y). En los resultados encontramos que la fracción Bg FIII no causó cambios sobre la línea celular, mientras que el EC provocó que las células viables disminuyeran un 60 %, e incrementó la apoptosis tardía en un 60 % de las células (figura 17).

Este resultado indica que el extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera* participa en el proceso apoptótico de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, favoreciendo la muerte celular.

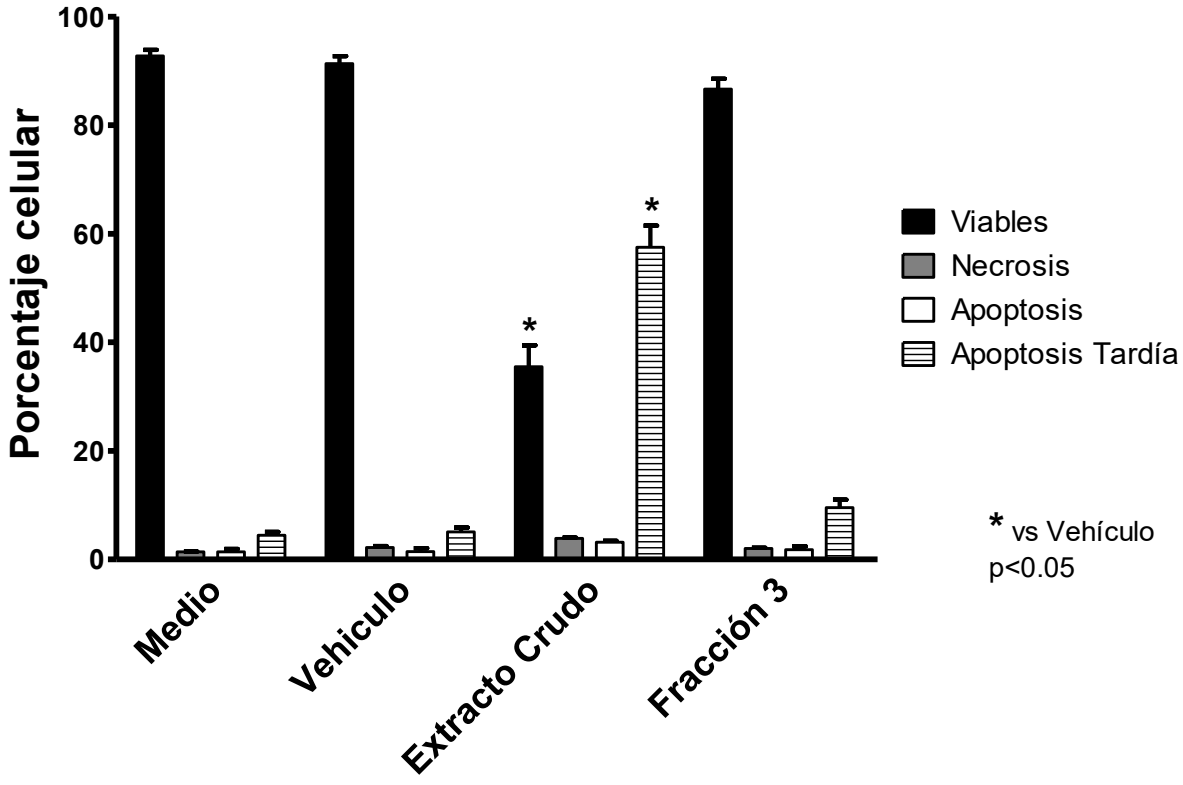

Figura 17. Efecto del extracto crudo y de la Bg FIII de *Bunodeopsis globulifera* sobre apoptosis en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Se administraron dosis crecientes del EC y de Bg FIII; las células se trataron por 24 h con EC y Bg FIII para apoptosis mediante el método de la anexina V. Se observa que el EC disminuye significativamente la viabilidad celular (60 %) e induce apoptosis tardía en el 60 %, de las células, mientras que la fracción Bg FIII no causó cambios significativos en cuanto necrosis y apoptosis, con respecto al control. Se probaron tres cultivos independientes con tres repeticiones cada uno. *p<0.05 vs. vehículo.

10. Discusión

En las últimas décadas la exploración de organismos marinos ha aumentado con el afán de obtener compuestos bioactivos y darles aplicaciones biotecnológicas, como la producción sintética de dichos compuestos para uso farmacéutico, nutricional y cosmético (Imhoff *et al.,* 2011; Guo *et al*., 2015).

Está demostrado que diversas especies de anémonas contienen péptidos con actividad biológica. La identificación de estos péptidos, generalmente involucra la obtención de extractos crudos, separaciones cromatográficas, evaluaciones farmacológicas y determinación de la estructura química (Rodríguez *et al*., 2012).

10.1 Obtención del extracto crudo

El rendimiento del extracto crudo fue de 4.02 % (tabla 1); se ha reportado que el rendimiento de productos naturales marinos es de 10 % en promedio; esto debido a la complejidad de las estructuras moleculares presentes (Colom-Casasnovas, 2015). El rendimiento del extracto crudo de *Bunodeopsis globulifera* se encuentra un 50 % por debajo del rendimiento promedio; sin embargo, el rendimiento puede variar según la especie que se está estudiando. Es importante tener en cuenta que uno de los problemas que se tienen en la obtención de compuestos bioactivos marinos es que los organismos contienen hasta 90 % de agua, como en el caso de anémonas y medusas, lo cual limita la extracción de compuestos con actividad biológica.

La concentración de proteína del EC fue de 0.145 mg de proteína/mg de extracto crudo; al igual que el rendimiento, la concentración de proteína es variable de acuerdo a la especie; Monroy-Estrada *et al.,* en 2013 reportaron que la concentración de proteína para el EC obtenido de *B. globulifera* fue de 0.032 mg/mL; es decir, fue más baja que la obtenida en este estudio, a pesar de haber usado el mismo método de extracción; sin embargo en un estudio realizado con *Bunodeopsis antillensis* se reportó que la concentración de proteína del EC fue de 0.142 mg/mL, concentración muy

similar a la que aquí reportamos para el mismo género, pero para la especie *B. globulifera* (Fenton-Navarro *et al*., 2003).

10.1.1 Separación por ultrafiltración

La ultrafiltración por corte molecular es un método de separación semi-preparativo y es usado para purificar. Fue empleado en este estudio como primer paso para pre-purificar el extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera*, dado que uno de los objetivos principales de este estudio fue aislar y pre-purificar neurotoxinas, que son proteínas de bajo peso molecular (de igual o menor peso a 10 kDa). La ultrafiltración es un método rápido de separación (comparado con técnicas cromatográficas, por ejemplo) aunque no garantiza que en la separación haya únicamente compuestos de bajo peso molecular (en este caso), tomando en cuenta que hay compuestos proteicos de mayor peso a 10 kDa que por su conformación logran cruzar la membrana, sin embargo, es una técnica que se recomienda ya que el rendimiento es mayor que en otras técnicas de separación.

10.1.2 Separación por cromatografía de filtración en gel

La cromatografía de líquidos es una de las técnicas de separación más usadas, para la purificación de compuestos bioactivos de origen marino (Migues *et al*., 1999; Houssen y Jaspars, 2005). La muestra obtenida por ultrafiltración se filtró en una columna con gel permeable Sephadex G50-M; se realizaron dos separaciones cromatográficas (90 mL de muestra c/u) y la muestra colectada fue fraccionada con base en el perfil de elución (figura 8). Se obtuvieron cuatro fracciones: Bg FI, Bg FII, Bg FIII y Bg FIV. Las fracciones fueron concentradas y liofilizadas, y posteriormente se pesaron y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (1976).

En el perfil de elución se observaron señales pequeñas en las primeras fracciones, que son los correspondientes a la Bg FI y Bg FII, tomando en cuenta que una señal pequeña no necesariamente representa una cantidad menor de proteína y de manera

inversa, una señal muy grande no necesariamente indica una mayor concentración de proteína. La señal más amplia fue la de Bg FIII y probablemente es la señal en la que se encuentra la mayor cantidad de sales, ya que con base en la línea que registra la conductividad en el perfil de elución, en dicha señal la conductividad es mayor.

La finalidad de fraccionar el extracto crudo, es separar la mezcla de compuestos presentes en el EC y, posteriormente, poder comparar las características y la complejidad de los componentes que contiene. A pesar de que la cromatografía líquida es altamente recomendada para este tipo de purificaciones, hay que considerar que una de las desventajas de esta técnica, es que aún después de filtrar en el gel, las muestras (algunas fracciones) aún contienen sales (dado su origen marino); también se debe considerar la presencia de compuestos no proteicos en las muestras. La obtención de compuestos bioactivos de origen marino se caracteriza por la dificultad de purificación, sobre todo para eliminar las sales presentes en la muestra. La presencia de sales puede interferir con la actividad de los compuestos aislados y quizá afectar los ensayos realizados, causando así, falsos positivos o falsos negativos (Shimizu, 1985). Sin embargo, de acuerdo con la literatura, al purificar el EC con Sephadex G50, se garantiza la filtración por exclusión molecular (Houssen y Jaspars, 2005). Para reducir la cantidad de sales presentes en las muestras, se recomienda el uso de ultrafiltración por corte molecular, usando una membrana con poro de 1kDa, ya que las sales presentan un peso molecular muy bajo.

En cuanto a las fracciones obtenidas, el peso seco, la concentración de proteína y el rendimiento de las cuatro fracciones se muestra en la tabla 2. La fracción Bg FIII presentó el mayor peso, mientras que la fracción Bg FI fue la que obtuvo el menor peso, sin embargo, la concentración de proteína de Bg FI fue la más alta (304 µg/mL) y Bg FIV fue la menor (18.5 µg/mL), notando que a pesar de que las señales observadas en la Bg FI fueron pequeñas, fue en esta fracción en donde se presentó la mayor cantidad de proteína, mientras que la señal más grande, correspondiente a la Bg FIII tuvo una cantidad muy por debajo de la Bg FI.

Comparando nuestros datos con los obtenidos por Monroy-Estrada *et al.* (2013), encontramos que coinciden las concentraciones de proteína de las fracciones; este grupo de trabajo reportó que las fracciones I y II de las 4 obtenidas con el mismo método que nosotros usamos, fueron las que presentaron la mayor concentración de proteína, mientras que la fracción IV fue la que presentó la menor concentración; el grupo de Fenton-Navarro *et al*. (2003) reportó que las cuatro fracciones obtenidas del EC de *B. antillensis*; también presentaron el mismo patrón en la concentración de proteína.

Finalmente se calculó el rendimiento final, tomando como el 100 % los 5 g de EC utilizados para esta separación, con relación al peso final de cada fracción; Bg FI, Bg FII, Bg FIII y Bg FIV tuvieron un rendimiento de 0.82 %, 18.94 %, 33.34 % y 3.5 %, respectivamente; encontramos que Bg FIII tuvo un mayor rendimiento, mientras que Bg FI fue la que registró el menor, con respecto a las demás fracciones (tabla 2). El rendimiento total fue de 56.6 %, que es un rendimiento alto, tomando en cuenta que el promedio en el rendimiento de cnidarios, generalmente es del 10 %. Podemos decir que la separación y purificación del EC usando la técnica de ultrafiltración junto a la cromatografía en gel permeable, fueron favorables para este estudio.

10.2 Ensayos de actividad biológica

10.2.1 Extracto crudo

Al evaluar la actividad del extracto crudo en cangrejos fantasma (*Ocypode quadrata*) observamos que después de inyectarles 0.725 mg de proteína de extracto crudo, sufrieron temblores intensos, movimiento descoordinado de ojos y extremidades, seguido de parálisis y burbujeo por la boca. Después de 80 minutos aproximadamente, murieron; se realizó la disección de los organismos y los órganos se encontraban “saludables” (figura 7). Cabe mencionar, que los individuos del grupo control (inyectados con agua desionizada) no presentaron síntomas distintos a los basales. En el año 2001 Bruhn *et al*. reportaron que las toxinas aisladas de la anémona *A.*

elegantissima, provocan parálisis en cangrejos (*Carcinus maenas*), mientras que en el 2006, Sánchez-Rodríguez *et al*. encontraron que las neurotoxinas producidas por la anémona *Bartholomea annulata* provocan hiperactividad seguida de una parálisis severa en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, y sugieren que las toxinas actúan a través del sistema neuromuscular del cangrejo (y de otras especies), afectando la función de los canales de sodio dependientes de voltaje y a las células musculares. Apoyados en estos datos podríamos decir que los efectos observados en los cangrejos tratados con el extracto crudo de *Bunodeopsis globulifera* fueron provocados por actividad neurotóxica.

10.2.2 Fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel

En las pruebas de actividad biológica de las cuatro fracciones obtenidas por cromatografía en gel permeable Sephadex G50-M, sobre cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*), se utilizó un individuo para cada una de las cuatro fracciones y se le inyectó una alícuota de 50 µL con una concentración de 100 µg de proteína/mL de la fracción correspondiente.

Las cuatro fracciones provocaron en *O. quadrata* las mismas reacciones que al inyectar el EC (tabla 3); es importante mencionar que Bg FI provocó temblores de mayor intensidad, la parálisis se presentó en las 10 extremidades y el movimiento descoordinado de los ojos tuvo una duración mayor, comparada con las tres fracciones restantes. Por otra parte, Bg FII causó parálisis solo en extremidades posteriores, la reacción fue intensa pero de corta duración y el organismo murió 20 min posteriores a la inyección; Bg FIII le provocó temblores durante casi 2 h al cangrejo fantasma; a pesar de que los temblores no fueron de igual intensidad a la observada en las fracciones Bg FI y Bg FII, cabe mencionar que este organismo presentó “saltos” durante 10 min aproximadamente, 15 minutos después de la inyección. Finalmente, Bg FIV fue la fracción que generó las reacciones menos intensas en *O. quadrata* y no derivó en la muerte del organismo.

Al realizar la disección de los cuatro organismos se observó que los cangrejos inyectados con Bg FI y Bg FIV no presentaron necrosis y los órganos se observaron "saludables"; como se muestra en la figura 9, el cangrejo inyectado con Bg FIII no presentó necrosis pero sí oscurecimiento del tejido, mientras que el cangrejo al cual se le inyectó Bg FII sí presentó necrosis; este resultado puede deberse a que en ambas fracciones se encuentran compuestos con un peso molecular de entre 15 y 25 kDa, (figura 11); dichos compuestos posiblemente sean proteínas con actividad citolítica, de acuerdo a la clasificación de Anderluh y Maček, 2002.

El ensayo de actividad biológica en crustáceos es ampliamente usado porque su anatomía permite evaluar de manera rápida el efecto de los extractos y las fracciones a estudiar. El sistema nervioso de estos organismos es bilateral, formado por axones gigantes; se sabe que las diez extremidades de los cangrejos son controladas por interneuronas y éstas son responsables del enderezamiento, el nado y la ubicación espacial, sin mencionar que una de sus funciones más destacadas es la aceleración angular, clásica en estos decápodos. Estas respuestas son moduladas por interneuronas ubicadas entre las extremidades caminadoras (2-4), que le dan soporte y equilibrio al organismo (Sandeman y Atwood, 1982). Al inyectar la fracción en la coxa (unión de la extremidad con el tórax) de la tercera extremidad caminadora, los compuestos presentes en dicha fracción tienen la facilidad de actuar directamente sobre el sistema nervioso. Se ha reportado que los "saltos" en estos organismos, indican daño nervioso, reacción que observamos al inyectar la Bg FIII. Los síntomas observados en los cuatro cangrejos nos sugieren un efecto de las fracciones sobre el sistema motor y respiratorio de los organismos (comparado con el grupo control, que no presentó síntomas). La presencia de necrosis en el cangrejo inyectado con la Bg FII (figura 9) señala la presencia de compuestos citolíticos en dicha fracción; recordemos que hay citolisinas de bajo peso molecular. Tampoco se puede descartar la presencia de citolisinas en la Bg FIII, ya que el tejido si bien no está necrosado, sí presentó un oscurecimiento muy evidente. Finalmente, podemos decir que las cuatro fracciones obtenidas por cromatografía en gel permeable provocan daño al sistema nervioso de *O. quadrata*.

10.3 Electroforesis SDS-PAGE del extracto crudo y de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel

En este proyecto nuestro interés está en las proteínas de bajo peso molecular, ya que las neurotoxinas de anémonas que se han reportado, tienen un peso molecular de entre 3 y 10 kDa. Por lo tanto se realizaron ensayos de electroforesis SDS-PAGE (acrilamida 12 %) para determinar el peso molecular de las proteínas contenidas tanto en el extracto crudo como en las cuatro fracciones obtenidas por cromatografía en gel permeable (Sephadex G50-M). En el extracto crudo encontramos que hay compuestos proteicos de entre 5 y 150 kDa (figura 10), lo que indica que en el EC puede haber tanto neurotoxinas como citolisinas, de acuerdo con la clasificación de Wanke *et al.* (2009) y Anderluh y Maček (2002).

En las muestras de las fracciones encontramos bandas de entre 5 y 10 kDa, lo cual sugiere fuertemente la presencia de proteínas con posible actividad neurotóxica. En la figura 11 podemos observar que en los carriles correspondientes a cada una de las 4 fracciones se marca una banda cerca de los 10 kDa; sin embargo, es en la fracción Bg FI en donde se aprecia la banda con mejor claridad, incluso entre los 2 y 5 kDa. A pesar de que la carga de proteína fue igual para las 4 fracciones (100µg de proteína/mL), no se logró obtener bandas de la misma densidad óptica; se realizó la tinción de los geles con plata, recomendada para la detección de menores cantidades de proteína, con esta tinción se pueden obtener bandas cuyos compuestos oscilen hasta en 2 kDa; es decir, es una técnica más sensible. En las tres repeticiones de este experimento, al revelar los geles, se marcó con mayor rapidez y claridad la banda de la fracción I en 10 kDa, mientras que la banda que apareció al último fue la correspondiente a la fracción Bg FIV.

No hay reportes de *Bunodeopsis globulifera* en el que se haya realizado este ensayo, por lo tanto, este es un primer acercamiento con respecto a los compuestos proteicos presentes en el EC y en las fracciones obtenidas. Hay reportes para otras especies de anémonas (Sánchez-Rodríguez *et al*., 2006), en donde se realiza electroforesis en dos

dimensiones y posteriormente se realiza la secuenciación de compuestos, lo cual es una perspectiva de este trabajo.

10.4 Ensayos de actividad neurotóxica

10.4.1 Liberación de [^{3}H]-glutamato

Una vez que observamos que el extracto crudo presentó actividad biológica en *Ocypode quadrata*, decidimos evaluar si el EC tenía efecto también en mamíferos. Los reportes de actividad biológica de compuestos aislados de anémonas, sobre mamíferos, son escasos; uno de los motivos principales es quizá que, para estos ensayos se requiere una mayor cantidad de EC y/o de las fracciones obtenidas.

10.4.1.1 Liberación de [^{3}H]-glutamato en presencia del extracto crudo y alto potasio

Migues *et al.*, en 1999 reportaron que Bc2, fracción obtenida de la anémona *Bunodosoma caissarum,* induce la liberación de [^{3}H]-glutamato en sinaptosomas de corteza de rata y que esta respuesta es dosis-dependiente. Nuestros resultados de liberación de [^{3}H]-glutamato, son similares al reporte mencionado, ya que al administrar el extracto crudo obtenido de la anémona *Bunodeopsis globulifera* en rebanadas de corteza de rata, observamos que la liberación aumenta significativamente (850 % vs. control), como se muestra en la figura 12B. El efecto fue observado durante todo el experimento, aun cuando se aplicó el pulso despolarizante con KCl (30mM) para promover la liberación de [^{3}H]-glutamato (ver figura 18); el aumento en la liberación provocado por el EC siguió siendo mayor (120 %) que el observado en el control, resultado que también concuerda por el obtenido por el grupo de trabajo de Migues *et al.*, en 1999.

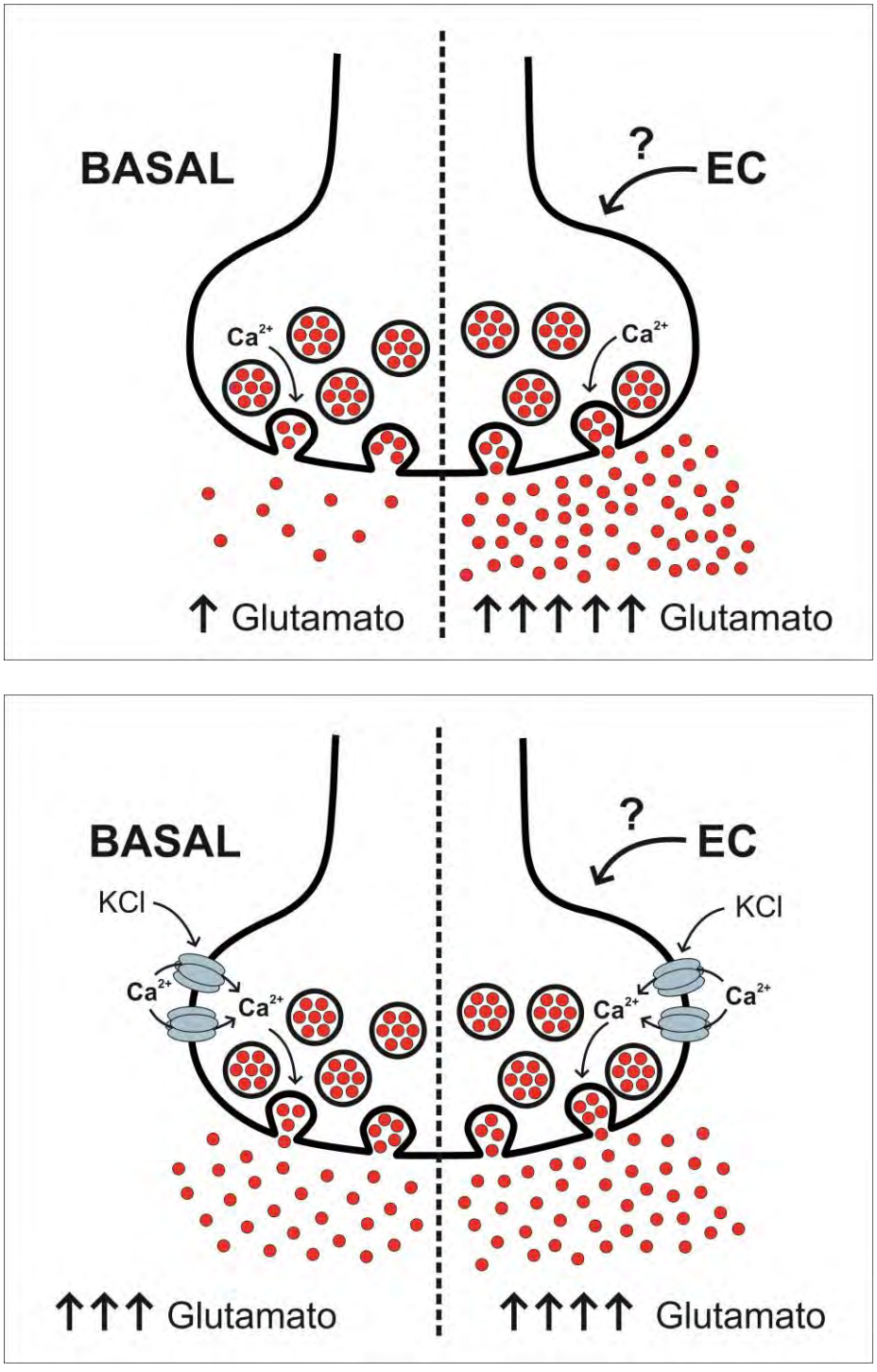

Figura 18. Esquema del efecto del extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera* sobre la liberación de [^{3}H]-glutamato en corteza. En el panel superior, se muestra en la izquierda, la terminal en condiciones basales y en la derecha, la respuesta generada por la presencia del EC. En el panel inferior, se muestra de lado izquierdo, la terminal en condiciones basales en presencia de KCl, y en la derecha, la terminal en presencia del EC y KCl. Se indica con las flechas el aumento en la liberación de glutamato, en cada una de las condiciones. La liberación es mayor en condiciones basales en presencia del EC.

En el cerebro el mayor neurotransmisor excitatorio es el glutamato; el mayor neurotransmisor inhibitorio es el GABA (ácido γ-aminobutírico). El glutamato en altas concentraciones genera problemas neurales severos, algunos de importancia médica, como la epilepsia (Nestler *et. al*., 2001). En este estudio encontramos que el EC de *B. globulifera* tiene un efecto importante sobre el sistema nervioso central, al aumentar de manera significativa la liberación de glutamato; por lo tanto, inferimos que el EC puede causar toxicidad sobre el Sistema Nervios Central (SNC) y afectar o comprometer el adecuado funcionamiento, en este caso, de la corteza. La liberación de glutamato en la corteza está asociada a la generación de respuestas motoras (entre otras respuestas), que van del SNC al SNP y que se reflejan en la ejecución del movimiento voluntario o involuntario.

10.4.1.2 Liberación de [^{3}H]-glutamato en presencia del extracto crudo y EDTA

La liberación de neurotransmisores depende de vesículas sinápticas, las cuales a su vez dependen del influjo de calcio a la terminal nerviosa para fusionarse con la membrana presináptica y liberar el contenido al espacio sináptico (Migues *et al.*, 1999). Al observar que el EC obtenido de *B. globulifera* aumenta significativamente la liberación de [^{3}H]-glutamato en corteza de rata (figura 12 B), se realizaron réplicas del mismo experimento, en condiciones basales y en presencia de EDTA (agente quelante de calcio), con el fin de observar si la liberación de glutamato promovida por el EC es dependiente del calcio extracelular. Observamos que en presencia del extracto crudo hay un aumento en la liberación de [^{3}H]-glutamato con respecto al control (50 % aproximadamente) y al administrar EDTA en presencia del EC, observamos que la liberación de [^{3}H]-glutamato disminuyó significativamente, un 60 % aproximadamente, como se muestra en las figuras 13B y 19, resultado que indica que el Ca^{2+} extracelular es importante para la liberación de glutamato en presencia del extracto crudo.

El calcio juega un rol esencial en el proceso de excitación nerviosa, liberación de neurotransmisores y en la contracción muscular. Estas respuestas se derivan del influjo

de calcio extracelular a través de canales dependientes de voltaje y/o liberación de Ca^{2+} de reservorios internos por mensajeros internos como los fosfoinosítidos.

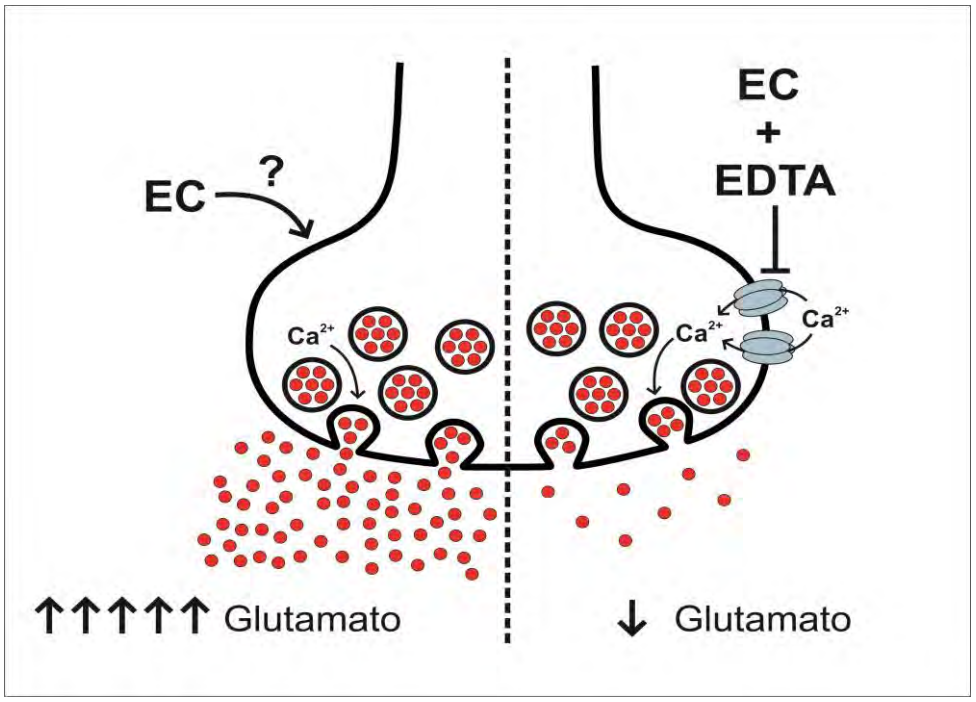

Figura 19. Esquema del efecto del extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera* sobre la liberación de [^{3}H]-glutamato en corteza, en presencia de EDTA. Se muestra en la izquierda, la terminal en condiciones basales en presencia del EC y en la derecha, la respuesta generada por la presencia del EC+EDTA. Se indica con las flechas el aumento o la disminución en la liberación de glutamato, en cada una de las condiciones. La liberación es mayor en condiciones basales en presencia del EC y la disminución provocada por la presencia del EDTA, nos sugiere la participación de calcio en la respuesta observada.

En 2002, Rojas *et al*. reportaron que la fracción obtenida del coral *Millepora complanata* provoca la disminución en la frecuencia de las contracciones en íleon de cobayo, efecto que se ve prevenido al remover el calcio extracelular; posteriormente al aplicar nifedipino se constató que la respuesta involucra canales de calcio dependientes de voltaje (tipo L), localizados en la membrana celular.

Anteriormente se reportó que la fracción II obtenida de la anémona *Actinia equina*, llamada EqTII fue administrada de manera intravenosa *in vivo* en ratón, durante 45

minutos y provocó la disminución en el flujo coronario, pero al quelar el calcio, el flujo coronario no sufrió cambios, lo que sugiere que la respuesta a la toxina es dependiente de Ca^{2+} extracelular (Drevenšek *et al*., 2000).

Nuestros datos concuerdan con que la respuesta observada con el EC obtenido de *B. globulifera* puede ser dependiente de calcio extracelular, al igual que las respuestas observadas en los reportes de Rojas *et al*. (2002) y Drevenšek *et al*. (2000).

Por otra parte, Migues *et al.*, en 1999, con el EC obtenido de *Bunodosoma caissarum*, encontraron que la liberación de glutamato en sinaptosomas de rata en presencia del EC es independiente de Ca^{2+} y de Na^{+}, ya que al aplicar EGTA y TTX en presencia del EC, la liberación no fue modificada. Este grupo de trabajo propone que el mecanismo de acción de este EC puede estar relacionado con otras vías de señalización, que involucren receptores acoplados a proteínas G, por ejemplo, como ocurre con la α-latrotoxina, producida por la viuda negra (arácnido); esta toxina interactúa con el receptor acoplado a proteína G de la sinaptotagmina, en ausencia de calcio, causando la liberación masiva de neurotransmisores y provocando la muerte del organismo al que le fue administrada.

El extracto crudo de *B. globulifera* promueve el aumento de la liberación de [^{3}H]-glutamato en corteza de rata y esta respuesta depende del calcio extracelular; recordemos que el calcio participa en la fusión vesicular que permite la liberación de neurotransmisores y probablemente sea este mecanismo lo que favorece la respuesta del EC; podría suceder que el EC active canales de calcio, con lo cual habría un aumento de calcio intracelular, favoreciendo así, la liberación. Otro mecanismo que podría estar participando es por canales de sodio, que al despolarizar la terminal, las toxinas presentes en el EC se unan al canal de Na^{+} y retarden el cierre del canal (como se ha reportado para otras anémonas); por lo tanto, habría una mayor entrada de Na^{+}, que podría mantener despolarizada la terminal por más tiempo y por lo tanto, generar una respuesta prolongada, lo cual explicaría también porqué la respuesta que observamos se mantiene durante todo el experimento, en condiciones de

despolarización, aunque la respuesta es menor, que la respuesta en condiciones basales. Una perspectiva de este estudio es realizar experimentos para determinar si el sodio participa en la liberación de glutamato en presencia del EC de *B. globulifera*, administrando agentes quelantes de Na^+ o con bloqueadores de estos canales.

La actividad mostrada por el EC de *B. globulifera* indica que esta especie representa una fuente interesante de componentes bioactivos. No hay reportes del efecto del EC o de las fracciones obtenidas de anémonas que habiten aguas mexicanas sobre liberación de neurotransmisores. Nuestros resultados son un aporte importante al estudio de compuestos bioactivos, en este caso de *B. globulifera,* y dan una primera aproximación acerca del mecanismo de acción mediante el cual las toxinas presentes en el EC inducen cambios en el sistema nervioso, en particular, sobre la liberación de [^{3}H]-glutamato.

10.4.2 Actividad motora

Dado que el EC aumenta la liberación de [^{3}H]-glutamato en corteza, inferimos que dicha respuesta a nivel del SNC podría verse reflejada en la actividad motriz. Para ello realizamos pruebas de actividad locomotora, en las cuales se registró distancia ambulatoria (acumulada), velocidad promedio y cuentas verticales en ratones inyectados de manera intraperitoneal con el EC. Los resultados muestran que al administrar EC 10 mg de proteína/kg, no hay un cambio en los parámetros registrados, con respecto al control (solución salina 0.9%). Sin embargo, la administración de EC 100 mg de proteína/kg sí provoca cambios en la actividad motora de los ratones (figura 14); disminuye la distancia acumulada (67 %), la velocidad promedio (65 %) y las cuentas verticales (75%) con respecto al control. Al administrar 500 mg de proteína/kg de EC también registramos una disminución significativa en la actividad motora, con la diferencia de que los ratones de este último grupo murieron, aproximadamente 15 minutos posteriores a la administración del extracto crudo.

Gondran *et al*., en 2002, reportaron que el extracto crudo obtenido de la anémona *Bunodosoma caissarum* induce convulsiones en ratones, al ser administrado

intracerebroventricularmente; agregan que la severidad y la latencia de las convulsiones es dosis-dependiente; demostraron también, mediante experimentos de "binding", que el EC inhibe la unión de glutamato a sus sitios de unión, por lo cual concluyen que el EC afecta al sistema glutamatérgico.

Con base en este último reporte y en los resultados que obtuvimos en este estudio, tanto de liberación de [^{3}H]-glutamato como de actividad motora, podemos decir que el extracto crudo de *Bunodeopsis globulifera* tiene un efecto sobre el sistema nervioso, afectando probablemente al sistema glutamatérgico. No aseveramos que el sistema glutamatérgico sea el único que se vea afectado por la administración del EC, ya que en la prueba de actividad motora, al aplicar la inyección de manera intraperitoneal, se tiene que considerar la probabilidad de que los efectos observados sobre los ratones pudiera ser provocada por una afectación al sistema nervioso entérico, como reportaron Rojas *et al*. (2002) (toxinas de *Millepora complanata* afecta la contracción en íleon de cobayo), y Vincent *et al*. (1980) quienes realizaron experimentos en ratones tratados con toxinas de la anémona *Anemonia sulcata* y encontraron que ATXII a una concentración de 170 µg/kg y ATX I y III a una concentración de 15 mg/kg, afectan al sistema nervioso, cardíaco y esquelético. Para poder comparar las concentraciones usadas por Vincent *et al*., requerimos realizar curvas dosis-respuesta, lo cual es una perspectiva de este estudio.

Sugerimos también, realizar la réplica de esta prueba administrando el EC de manera central, ya sea en corteza o intracerebroventricularmente y observar si la respuesta motora es similar a la que aquí reportamos. Es importante mencionar que algunos de los síntomas que presentaron los ratones durante la prueba de actividad motora fueron: dificultad para mover las extremidades posteriores, pelo erizado, temblores y espasmos (saltos), síntomas que coinciden con lo documentado por Sánchez-Rodríguez *et al*. (2006), quienes al administrar compuestos activos aislados de la anémona *Bartholomea annulata*, en ratas, observaron también temblores, pelo erizado, espasmos y rigidez en la cola.

Las especies del phylum Cnidaria producen compuestos que tienen efecto sobre los sistemas nervioso y circulatorio de los humanos. Las toxinas de los cnidarios, como

algunos corales y medusas, puede modificar el transporte iónico, inducir la formación de poros membranales y afectar canales neurales y musculares, así como interactuar con receptores para neurotransmisores y/o alterar las membranas intracelulares de los orgánulos (Rojas *et al*., 2002).

El estudio de las especies de cnidarios como fuente de compuestos biológicamente activos y su uso como herramientas farmacológicas en modelos como el íleon de cobayo y ratón, permiten el análisis de los mecanismos de acción de estas toxinas.

10.4.3 Proliferación celular

10.4.3.1 Actividad metabólica (MTT)

Finalmente, realizamos una prueba para evaluar el efecto del extracto crudo y de la fracción Bg FIII, obtenidos de la anémona *Bunodeopsis globulifera,* sobre la viabilidad celular en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Las células fueron incubadas con dosis crecientes del EC y de la fracción Bg FIII durante 24 h. La viabilidad celular fue medida con la técnica de MTT. El EC administrado en concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 µg de proteína/mL, así como la fracción Bg FIII a una concentración de 25 µg de proteína/mL, estimulan la proliferación celular (figura 15). Estos resultados son muy interesantes, dado que varias de las pruebas de proliferación celular realizadas con compuestos activos obtenidos de otras especies de anémonas disminuyen la viabilidad celular, como en el reporte de Monroy-Estrada *et al*. (2013), quienes demostraron que al administrar el extracto crudo y la fracción I y II obtenidas de la anémona *Bunodeopsis globulifera* disminuye la proliferación celular en la línea de cáncer de pulmón A549.

Considerando que todas las células tienen distintos mecanismos fisiológicos, puede ser que las células de neuroblastoma aquí estudiadas presenten alguna vía de señalización que está siendo favorecida o modificada por el EC, así como por la fracción Bg FIII (en menor proporción). Una de éstas vías podría ser la vía Akt, presente en células tumorales, la cual permite a las células evitar la apoptosis, al inactivar factores pro-apoptóticos mediante fosforilación, con lo cual promueve la

proliferación celular; otra vía de señalización que podría estar involucrada en la respuesta que observamos en este estudio, es la vía de las MAP cinasas, que activa la proteína cinasa RSK, la cual también fosforila (e inactiva) factores pro-apoptóticos y por lo tanto, favorece la proliferación celular (Lieberman y Ricer, 2014).

Ahora bien, tenemos que considerar que las células fueron incubadas con los tratamientos durante 24 h, y a pesar de que a concentraciones menores a 200 µg de proteína/mL registramos un aumento en la proliferación celular, también encontramos que a 200 µg de proteína/mL la proliferación celular fue similar a la del control; por lo tanto, consideramos que es necesario realizar esta prueba aumentando el periodo de incubación a 48 y 72 h con los tratamientos, como se realiza en la mayoría de los reportes de proliferación celular, con el fin de registrar si aún en periodos largos en presencia del EC y de la fracción Bg FIII la proliferación celular se mantiene por arriba de la que presenta el control o disminuye.

Por otro lado, los resultados mostraron células sin daño citolítico aparente, como se observa en la figura 16. Las micrografías permiten ver que no hay cambios significativos en la morfología de las células a lo largo de las diferentes concentraciones administradas. Únicamente se registró un cambio en la morfología de las células con la dosis de 200 µg de proteína/mL, las cuales se observaron “redondeadas” y formando pequeños glomérulos; a pesar de ello, su viabilidad fue similar a la observada en el control.

Quizá el motivo por el cual las células no presentan un daño morfológico marcado es porque la línea celular que estudiamos (SH-SY5Y) corresponde a células nerviosas y hay reportes de toxinas de anémonas (*Actinia equina* y *Heteractis magnifica)* en donde se demuestra que dichas toxinas modifican la captura de GABA y colina, en sinaptosomas de corteza, pero no provocan daños en la membrana celular. Es decir, las citolisinas de anémonas no crean poros en sinaptosomas, pero si afectan el funcionamiento de dichas terminales nerviosas (Khoo *et al*., 1995). Gondran *et al*. (2002) observaron que el extracto crudo de *Bunodosoma caissarum* provoca un aumento en la liberación de glutamato en corteza de ratón, efecto que se ve revertido en presencia de esfingomielina, un lípido presente en el tejido nervioso, cuya función es

proteger las fibras nerviosas. Sería interesante realizar una réplica de los experimentos de proliferación celular en presencia del EC y la fracción Bg FIII agregando esfingomielina, para ver si el efecto que observamos aquí es inhibido.

Con base en lo anteriormente mencionado, podemos inferir que tanto el EC como la Bg FIII obtenidos de *Bunodeopsis globulifera*, contienen compuestos bioactivos que modifican el funcionamiento de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, aumentando la proliferación celular pero no causan daño citolítico, a concentraciones menores a 200 µg de proteína/mL.

10.4.3.2 Apoptosis

Al observar que el extracto crudo y la fracción Bg FIII obtenidas de *Bunodeopsis globulifera* promueven la proliferación celular en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, realizamos los experimentos de apoptosis, en la misma línea celular, en presencia del EC y la fracción Bg FIII en la concentración que presentó el mayor aumento en proliferación celular, las cuales fueron 75 µg de proteína/mL y 25 µg de proteína/mL, respectivamente (figura 15). Encontramos que la fracción Bg FIII no provocó cambios en las células, con respecto al control; es decir, no está promoviendo apoptosis. Por otro lado, que el extracto crudo sí causó la disminución del 60 % de las células viables y provocó apoptosis en un 60 % de las células (figura 17). Este resultado indica que el EC promueve el proceso de apoptosis en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y. Esta respuesta podría estar ligada con la que observamos en proliferación celular, de tal forma que el EC induzca un aumento en la apoptosis de las células y éstas a su vez, respondan aumentando el proceso de proliferación celular; o quizá, el EC actúa por vías celulares distintas, afectando por un lado la proliferación celular y por otro, la apoptosis.

Generalmente en los experimentos de proliferación celular, en donde se prueba algún compuesto activo, ya sea fármaco o toxina, se observa que el tratamiento puede

favorecer la apoptosis y disminuir la proliferación celular o a la inversa, favorecer la proliferación celular y disminuir la apoptosis; es decir, o favorece el crecimiento celular, o lo limita. Es interesante ver que en el caso de las toxinas presentes en el EC de *B. globulifera* no ocurre lo mismo.

La mayoría de los reportes sobre toxinas de anémonas van dirigidos a actividad citolítica y se ha visto que dichas toxinas, promueven la muerte celular. Las citolisinas forman poros en la membrana plasmática de los tejidos, de acuerdo a lo descrito por Anderluh y Maček (2002); a excepción del tejido nervioso (Khoo *et al*., 1995), lo que provoca un cambio osmótico y la pérdida del equilibrio celular interno, derivando en un daño celular serio que causa la muerte de las células (Monroy-Estrada *et al*., 2013).

Es importante recordar que el ciclo celular posee mecanismos que permiten a la célula reproducirse cuando el organismo lo requiere, y a su vez, existen procesos que impiden la reproducción celular, como la necrosis y la apoptosis. La necrosis es una respuesta celular ante la presencia de toxinas o a falta de oxígeno, por ejemplo, donde la célula se hincha, sus orgánulos se deterioran y finalmente las células se rompen, generando una respuesta inflamatoria en el organismo. Dicha respuesta es mediada por citocinas, como las opsinas, los pirógenos, algunas inmunoglobulinas, bradicininas, interferones, interleucinas, lisocimas, perforinas, TNF (Factor de Necrosis Tumoral, por sus siglas en inglés) y grancimas, entre otras, y una de las reacciones más frecuentes provocadas por estas proteínas, es afectar el crecimiento de la célula dañada y en algunos casos, inducir apoptosis (Silverthorn, 2014).

La muerte celular programada o apoptosis, es un proceso de autodestrucción celular, que no incluye inflamación. La célula apoptótica se encoge, la cromatina se condensa, el núcleo se fragmenta, la membrana celular forma ampollas y finalmente la célula se rompe en vesículas que serán engullidas por macrófagos, impidiendo así, que se dañen células vecinas. Este mecanismo de autodestrucción puede ser iniciado por estrés ambiental, por la pérdida de integridad mitocondrial, por daños en el ADN, por mutaciones en las enzimas reparadoras del ADN, por mutaciones en los genes que

modulan el crecimiento y la división celular normal o por fallas en los genes supresores tumorales (como la proteína p53, por ejemplo). La presencia de cualquiera de los factores antes mencionados inicia el mecanismo de apoptosis, ejecutado mediante caspasas (cisteína proteasas), en donde participan también proteínas Bcl-2, consideradas como integradoras de señales pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, para determinar si la célula debe desarrollar apoptosis. Las respuestas mediante las cuales, la célula apoptótica puede autodestruirse, incluyen la formación de canales iónicos en la membrana mitocondrial, que permiten la salida del citocromo c desde la membrana mitocondrial interna, el cual se une en el citoplasma a APAF (Factor Activador de Proteasas pro-apoptóticas), que se une a caspasas y desencadena la señal apoptótica (Lieberman y Ricer, 2014; Lodish *et al*., 2016).

Con base en lo anteriormente mencionado, podríamos inferir que el EC afecta el ciclo celular de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y por diferentes factores, es decir, la presencia del EC podría causar estrés celular, causar daños en el ADN de las células, como ocurre con la trabectedina (principio activo de Yondelis®), o podría estar provocando daño mitocondrial y por lo tanto, vemos un aumento en la actividad apoptótica de la línea celular estudiada.

Los reportes de toxinas de anémonas con actividad pro-apoptótica o anti-apoptótica, son escasos; sin embargo, en 2010, Fedorov *et al*. reportaron que toxinas aisladas de la anémona *Heteractis crispa* tienen propiedades anticancerígenas, ya que inducen apoptosis independiente de p53 en células de cáncer mamario. Recordemos que la línea celular aquí estudiada corresponde a un tipo de cáncer, y si como se registró en este primer ensayo de apoptosis, el EC de *B. globulifera* tiene propiedades pro-apoptóticas, podría ser considerado como potencial uso terapéutico.

Como sabemos, la presencia de diversos tipos de cánceres provoca una elevada mortalidad en la población mundial; los efectos adversos provocados por las terapias farmacológicas actuales y la alta demanda de las mismas, nos obliga a investigar y a

buscar nuevos blancos terapéuticos que permitan mejorar las terapias para estas enfermedades.

El aumento en la proliferación celular observada en esta prueba, así como el aumento en el proceso de apoptosis, nos sugiere que el EC obtenido de *Bunodeopsis globulifera* probablemente modifica los mecanismos de reproducción celular de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Sin embargo, es necesario realizar más ensayos que nos permitan dilucidar cuál es el blanco o el mecanismo de acción del EC sobre dicha línea celular.

En este estudio realizamos pruebas para evaluar la actividad neurotóxica del extracto crudo y de las fracciones Bg FI, Bg FII, Bg FIII y Bg FIV, obtenidas de la anémona *Bunodeopsis globulifera*; los resultados aquí mostrados son un primer indicio sobre la actividad biológica de las toxinas presentes en esta anémona y nos marcan una pauta para conocer más sobre la función de dichas toxinas.

11. Conclusiones

El extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera* contiene compuestos proteicos de entre 5 y 150 kDa.

Las fracciones Bg FI, Bg FII, Bg FIII y Bg FIV presentan compuestos proteicos que van de 2 a 25 kDa.

El extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera* y las fracciones Bg FI, Bg FII, Bg FIII y Bg FIV presentan actividad biológica sobre *Ocypode quadrata*, sugiriendo la presencia de sustancias de tipo neurotóxico.

El extracto crudo de *Bunodeopsis globulifera* aumenta la liberación de [^{3}H]-glutamato en rebanadas de corteza de rata, de manera basal y en condiciones de despolarización.

La liberación de [^{3}H]-glutamato en rebanadas de corteza de rata provocada por el extracto crudo obtenido de *B. globulifera,* se ve disminuida en presencia de EDTA, lo que sugiere la participación de calcio extracelular en dicha respuesta.

El extracto crudo de *Bunodeopsis globulifera* disminuye la actividad motora en ratones.

El extracto crudo y la fracción Bg FIII de *Bunodeopsis globulifera* estimulan la proliferación celular en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y.

El extracto crudo obtenido de *Bunodeopsis globulifera* induce apoptosis en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

12. Referencias

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

Béress, L. y Béress, R. 1971. Reinigung zweier krabbenlahmender Toxine aus der Sea anemone *Anemonia sulcata*. *Kiel. Meeresforsch* 27: 117-127.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Bruhn, T., Schaller, C., Schulze, C., Sánchez-Rodríguez, J., Danmmeier, C., Ravens, U., Heubach, J. F., Schmidtmayer, J., Schmidt, H., Aneiros, A., Wachter, E., Béress, L. 2001. Isolation and characterization of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Toxicon* 39: 693-702.

Castañeda, O., Harvey, A. L. 2009. Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. *Toxicon* 54: 1119-1124.

Catterall, W. A. 1980. Neurotoxins that act on voltage-sesitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 20:15-43.

Cèstele, S., Catterall, W. A. 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82: 883-892.

Chapman, D. M.: Cnidarian Histology. In.: *Coelenterate biology, reviews and new perspectives.* Eds.: H. M. Lenhoff & L. Muscatine. Academic Press, New York, 1974. 2-23p.

Colom-Casasnovas, M. A. 2015. Aislamiento y caracterización de algunas neurotoxinas de la anémona *Bartholomea annulata*. Tesis de Maestría. UNAM. Puerto Morelos, Quintana Roo. 121p.

Drevenšek, G., Bunc, M., Budihna, M., Šuput, D. 2000. Lowering of the coronary flow in isolated rat heart by equinatoxin II depends upon extracellular Ca^{2+} concentration. *European Journal of Physilogy* 439: R150-R151.

Duerden, J. E., Fellow, B. 1902. On the Actinian *Bunodeopsis globulifera*, Verrill. *Sec. Linn. Soc.* 297- 319.

Fedorov, S., Dyshlovoy, S., Monastyrnaya, M.,Shubina, L., Leychenko, E., Kozlovskaya, E., Jin, J., Kwak, J., Bode, A. M., Dong, Z., Stonik, V. 2010. The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (=*Radianthus macrodactylus*). *Toxicon* 55:811-817.

Fenton-Navarro, B., Arreguín-L, B., García-Hernández, E., Heimer, E., Aguilar, M. B., Rodríguez-A, C., Arreguín-Espinosa, R. 2003. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillensis*. *Toxicon* 42: 525-532.

Gondran, M., Eckeli, A. L., Migues, P. V., Gabilan, N. H., Rodrigues, A. L. S. 2002. The crude extract from the sea anemone, Bunodosoma caissarum elicits convulsions in mice: posible involvement of the glutamatergic system. *Toxicon* 40: 1667-1674.

Guo, Y., Ding, Y., Xu, F., Liu, B., Kou, Z., Xiao, W., Zhu, J. 2015. Systems pharmacology-based drug discovery for marine resources: An example using sea cucumber (Holothurians). *Journal of Ethnopharmacology* 165: 61-72.

Heinemann, S. H., Terlau, H., Imoto, K. 1992. Molecular basis for pharmacological differences between brain and cardiac sodium channels. *European Journal of Physiology* 422: 90-92.

Honma, T., Shiomi, K. 2006. Peptide Toxins in Sea Anemones: Structural and Functional Aspects. *Marine Biotechnology* 8: 1-10.

Houssen, W. E., Jaspars, M. 2005. *Isolation of Marine Natural Products* in Methods of Biotecnology. *Natural Products Isolation* 20: 353-390

Imhoff, J. F., Labes, A., Wiese, J. 2011. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnology Advances* 29: 468-482

Kass-Simon, G and Scappaticci, A. A. Jr. 2002. The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Can. J. Zool* 80: 1772-1794.

Kem, W. R., Parten, Benne., Penninton, M. W., Price, D. A., Dunn, B. M. 1989. Isolation, Characterization, and Amino Acid Sequence of a Polypeptide Neurotoxin Occurring in the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 28: 3483-3489.

Khoo, H. E., Lim, J. P. C., Tan, C. H. 1995. Effects of the sea anemone (*Heteractis magnifica* and *Actinia equina*) cytolysins on synaptosomal uptake of GABA and choline. *Toxicon* 33 (10): 1365-1371.

Laporta, P., Carranza, A. 2012. Práctico No 2-Filo CNIDARIA (anémonas, corales, medusas). Centro Universitario de la región Este-Universidad de la República, Uruguay. 1-7p.

Lieberman, M. A., Ricer, R. 2014. Bioquímica, biología cellular y genética. 6ª ed. Ed. Wolters Klumer Healt, Lippincott Williams & Wilkins, S. A. USA. 450p.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M P. 2016. Biología cellular y molecular. 7ª ed. Ed. Médica Panamericana. México. 1154p.

Maravilla-Ulloa, I. 2015. Extracción y caracterización de compuestos con actividad antitumoral de *Cassiopea xamachana.* Tesis de Maestría. UNAM. Puerto Morelos, Quintana Roo. 73p.

Mariscal, R. N.:Nematocyst. In.: *Coelenterate biology, reviews and new perspectives.* Eds.: H. M. Lenhoff & L. Muscatine. Academic Press, New York, 1974. 129-166p.

Mariscal, R. N., Conklin, E. J., Bigger, C. H. 1977. The Ptychocysts, a Major New Category of Cnida Used in Tube Construction by a Cerianthid Anemone. *Biological Bulletin* 152 (3): 392-405.

Martínez-Serra, J., Maffiotte, E., Martín, J., Bex, T., Navarro-Palou, M., Ros, T., Plazas, J. M., Vogler, O., Gutiérrez, A., Amat, J. C., Ramos, R.,Saus, C., Ginés, J., Alemany, R., Diaz, M., Besalduch, J. 2011. Yondelis® (ET-743, Trabedectina) sensitizes cáncer cell lines to CD95-mediated cell death: New molecular insight into the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology* 658: 57-64.

Mayer, M. L. 2017. The structure and function of glutamate receptors: Mg2+ block to X-ray diffraction. *Neuropharmacology* 112: 4-10.

McGivern, J. G. 2006. Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. *Drug Discovery Today* 11(5): 245-253.

Migues, P. V., Leal, R. B., Mantovani, M., Nicolau, M., Gabilan, N. H. 1999. Synaptosomal glutamate reléase induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *NeuroReport* 10: 67-70.

Milla, L., Sánchez-Rodríguez, J., Segura-Puertas, L. 2003. Dermatitis por contacto con *Bunodeopsis globulifera* (Cnidaria anthozoa). *Dermatología Rev Mex* 47 (3): 140-141.

Monroy-Estrada, H. I., Chirino, Y. I., Soria-Mercado, I. E., Sánchez-Rodríguez, J. 2013. Toxins from the Caribbean sea anemone *Bunodeopsis globulifera* increase cisplatin-induced cytotoxicity of lung adenocarcinoma cells. *Journal of Venomous Animals and Toxins includin Tropical Diseases* 19: 12-20.

Nestler, E. J., Hyman, S. E., Malenka, R. C. 2001. Molecular Neuropharmacology. Ed. McGraw-Hill. New York, USA. 539 p.

Rodríguez, A. A., Silva, C. J., Sa, F., Qiang, D. Z., Freitas, J C., Pimenta, A. M. C., Lima, M. E., Konno, K., Yuen, L. S. M., Garateix, A., Zaharenko, A. J. 2012. Peptide fingerprinting of the neurotoxic fractions isolated from the secretions of sea anemone *Stichodactyla helianthus* and *Bunodosoma granulifera*. New members of the APETx-like family identified by a 454 pyrosequencing approach. *Peptides* 34: 26-38.

Rodríguez-Martínez, R. E., Ruíz-Rentería, F., Van Tussenbroek, B., Barba-Santos, G., Escalante-Mancera, E., Jordán-Garza, G., Jordán-Dahlgren, E. 2010. Environmental state and tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Rev. Biol. Trop*. 58: 23-43.

Rojas, A., Torres, M., Rojas, I., Feregrino, A., Heimer-de la Cotera, E. P. 2002. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon* 40: 777-785.

Sánchez-Rodríguez, J., Zugasti, A., Santamaría, A., Galván-Arzate, S., Segura-Puertas, L. 2006. Isolation, Partial Purification and Characterization of Active Polypeptide from the Sea Anemone *Bartholomea annulata*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicity* 99: 116-121.

Sandeman, D. C., Atwood, H. L. 1982. Neural Integration and Behavior. Ed. Academic Press. Vol. 4. USA. 327 p.

Shimizu, Y. 1985. Bioactive Marine Natural Products, with emphasis on Handling of watter-soluble compounds. *Journal of Natural Products* 48(2): 223-235.

Silverthorn, D. U. 2014. Fisiología Humana. 6ª ed. Ed. Médica Panamericana. México. 1013p.

Smith, J. J., Blumenthal, K. M. 2007. Site-3 sea anemone toxins: Molecular probes of gating mechanisms in voltage-dependent sodium channels. *Toxicon* 49: 159-170.

Spano, C., Rozbaczylo, N., Häussermann, V., Bravo, R. 2013. Redescription of the sea anemones *Anthopleura hermaphrodítica* and *Bunodactis hermafrodítica* (Cnidaria: Anthozoa: Actinaria) from Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 48 (3):521-534.

Vincent, J. P., Balarna, M., Barhanin, J., Fosset, M., Lazdunski, M. 1980. Binding of sea anemone toxin to receptor sites associated with gating system of sodium channel in synaptic nerve endings in vitro. *Neurobiology* 77 (3): 1646-1650.

Wanke, E., Junqueira, Z. A., Redaelli, E., Schiavon, E. 2009. Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltaje-gated sodium cannel isoforms. *Toxicon* 54: 1102-1111.