



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Aislamiento de un péptido activo de la anémona
Anthopleura texaensis de la costa yucateca**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Química Farmacéutica Biológica

P R E S E N T A

Maldonado Valenciano Daisy

Director de Tesis

Dr. Sergio Rodríguez Morales

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: Mendoza Rodríguez Carmen Adriana

VOCAL: Profesor: Pedraza Chaverri José

SECRETARIO: Profesor: Cuevas Velázquez Cesar Luis

1er. SUPLENTE: Profesor: Rodríguez Morales Sergio

2º SUPLENTE: Profesor: Rebollar Ramos Daniela

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Unidad de Química en Sisal,
Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema: Dr. Sergio Rodríguez Morales _____

Supervisor técnico: Dr. Miguel Ángel Flores Ramos _____

SUSTENTANTE: Daisy Valenciano Maldonado _____

Índice General

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes.....	5
2.1. Phylum Cnidaria	5
2.1.1 <i>Disparo de nematocistos</i>	6
2.2. Anémonas	7
2.3. Toxinas de organismos marinos y anémonas de mar	9
2.3.1 <i>Citolisinas</i>	11
2.3.2 <i>Fosfolipasas A2</i>	13
2.3.3 <i>Neurotoxinas</i>	13
2.4. Técnicas de separación de moléculas	15
2.4.1 <i>Cromatografía de permeación en gel</i>	16
2.4.2 <i>Ultrafiltración</i>	17
2.4.3 <i>Cromatografía de Intercambio iónico</i>	18
2.4.4 <i>Electroforesis</i>	20
2.5. <i>Identificación de proteínas mediante cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (CL-EM)</i>	20
3. Justificación	25
4. Hipótesis y Objetivos	26
4.1 Hipótesis	26
4.2 Objetivo General	26
4.3 Objetivos Particulares	26
5. Desarrollo del proyecto	27
Capítulo 1. <i>Bunodosoma cavernata</i>	27
1.1 Metodología	27
1.1.1 <i>Área de colecta</i>	28
1.1.2 <i>Colecta e identificación de organismos</i>	28
1.1.3 <i>Disparo de nematocistos y cuantificación de proteínas</i>	29
1.1.4 <i>Generación del extracto crudo mediante el disparo químico</i>	30
1.1.5 <i>Evaluación de la actividad neurotóxica in vivo sobre O. quadrata</i>	31
1.1.6 <i>Modelo empleado para la separación biodirigida</i>	31
1.1.7 <i>Preparación de las muestras a evaluar</i>	32
1.1.8 <i>Bioensayo</i>	32

1.1.9	Perfil cromatográfico Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de los extractos generados.....	32
1.1.10	Determinación de la distribución de pesos moleculares mediante cromatografía en gel permeable (CGP)	33
1.2	Resultados y Análisis de resultados.....	34
1.2.1	Identificación y colecta.....	34
1.2.2	Disparo de nematocistos y cuantificación de proteínas.....	34
1.2.3	Obtención del extracto crudo	35
1.2.4	Evaluación de la actividad neurotóxica in vivo sobre <i>O. quadrata</i>	36
1.2.5	Perfil cromatográfico de los extractos crudos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	36
1.2.6	Perfil de los extractos crudos mediante cromatografía de gel permeable (CGP) para determinar la distribución de pesos moleculares.....	37
1.3	Conclusiones.....	39
Capítulo 2.	<i>Anthopleura texaensis</i>	40
2.1	Metodología	40
2.1.1	Área de colecta.....	41
2.1.2	Identificación y colecta.....	41
2.1.3	Generación del extracto crudo de <i>Anthopleura texaensis</i>	42
2.1.4	Evaluación de la actividad neurotóxica in vivo sobre <i>O. quadrata</i> y <i>A. salina</i> del extracto crudo	42
2.1.5	Modelos empleados para la separación biodirigida.....	43
2.1.6	Prefraccionamiento y desalado mediante Cromatografía de Extracción en Fase Sólida de fase reversa (EFS-FR)	43
2.1.7	Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de fase reversa C18 del extracto crudo	44
2.1.8	Separación de la fracción activa del estudio Extracción en fase solida fase reversa (EFS-FR) mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) semipreparativo	45
2.1.9	Análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (CL-EMAR) de la fracción activa	45
2.1.10	Identificación de los compuestos presentes en los extractos	47
2.2	Resultados y discusión.....	48
2.2.1	Identificación y colecta.....	48
2.2.2	Obtención del extracto crudo	49
2.2.3	Evaluación biológica en <i>O. quadrata</i> y <i>A. salina</i> del extracto activo.....	49

2.2.4	<i>Prefraccionamiento y desalado mediante Cromatografía de Extracción en Fase Sólida de fase reversa (EFS-FR)</i>	50
2.2.5	<i>Análisis Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de fase reversa C18 del extracto crudo de A. texaensis</i>	51
2.2.6	<i>Separación de la fracción activa del estudio EFS-FR mediante CLAR semipreparativo en fase reversa</i>	52
2.2.7	<i>Análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (CL-EMAR) de la fracción activa</i>	55
2.3	<i>Conclusiones</i>	57
6.-	<i>Bibliografía</i>	58

Índice Tablas

Tabla 1. Fármacos provenientes de organismos marinos [31].	10
Tabla 2. Clasificación estructural y farmacológica de toxinas de anémonas [51].	15
Tabla 3. Concentraciones de diferentes reactivos utilizados para el disparo de nematocistos.	30
Tabla 4. Estándares utilizados para la curva de calibración.	33
Tabla 5. Disparo de nematocistos utilizando diferentes reactivos para la cuantificación de proteínas utilizando a <i>B. cavernata</i> .	35
Tabla 6. Rendimientos de los extractos crudos liofilizados de AcOH (Ácido acético), MeOH (Metanol) y NH ₄ OH (Hidróxido de amonio).	36
Tabla 7. Evaluación de la actividad neurotóxica sobre cangrejo fantasma de los extractos generados.	36
Tabla 8. Gradiente para la separación cromatográfica de los extractos generados.	47
Tabla 9. Rendimiento obtenido de los especímenes utilizados.	49
Tabla 10. Comparación en el ensayo de neurotoxicidad para <i>A. salina</i> y cangrejo fantasma para la evaluación del extracto crudo.	50
Tabla 11. Rendimientos para el prefraccionamiento mediante EFS C18-T con Metanol al 25%.	50
Tabla 12. Evaluación de la actividad neurotóxica sobre <i>A. salina</i> de las fracciones obtenidas.	51
Tabla 13. Actividad neurotóxica de las fracciones F4 y F3 sobre <i>A. salina</i> de 24 h.	54

Índice de Figuras

Figura 1. Proceso de descarga de nematocistos [26].....	7
Figura 2. Anatomía de una anémona [28].	8
Figura 3. Estructura externa de la anémona <i>A. texaensis</i>	9
Figura 4. Estructuras de fármacos de origen marino.....	10
Figura 5. Representación de la técnica cromatografía de permeación en gel [52].....	17
Figura 6. Técnica de ultrafiltración.	18
Figura 7. Principio de la técnica de separación para intercambio iónico.....	19
Figura 8. Esquema de un equipo de HPLC.	21
Figura 9. Esquema de Espectrómetro de masas.....	22
Figura 10. Esquema del sistema CL-EM.	24
Figura 11. Diagrama de la metodología empleada para <i>B. cavernata</i>	28
Figura 12. Tentáculos de <i>B. cavernata</i> colocados en tubos de microcentrífuga de 2 mL a diferentes concentraciones.	30
Figura 13. Disparo de nematocistos para <i>B. cavernata</i> utilizando diferentes reactivos y concentraciones.....	31
Figura 14. Anémona <i>B. cavernata</i> . A) Anémonas adheridas a rocas vista frontal B) Vista superior de la anémona.	34
Figura 15. Cromatogramas en fase reversa por C18-U de los extractos generados de <i>B. cavernata</i>	37
Figura 16. Cromatograma y curva estándar para la determinación de los pesos moleculares de los extractos.....	38
Figura 17. Cromatogramas de los extractos para <i>B. cavernata</i> por gel permeable.	39
Figura 18. Diagrama de la metodología empleada para <i>A. texaensis</i>	40
Figura 19. Área de colecta en la costa de Chabihau, Yucatán.	41
Figura 20. Extracción y colecta de <i>A. texaensis</i> utilizando cincel y martillo.	42
Figura 21. Equipo CL-EMAR Agilent 6545 QTOF (UJAT-C.I.C.T.A.T).....	46
Figura 22. Anémona <i>Anthopleura texaensis</i> . A) Racimo de anémonas adheridas a una roca. B) Anémona vista de forma lateral.	48
Figura 24. Cromatograma de la fracción F4 analizada por CLAR-C18.	52
Figura 25. Cromatograma de la fracción F3 analizada por CLAR-C18.....	53
Figura 26. Cromatograma de la fracción F4 , analizada por CLAR C18..	54
Figura 27. Cromatograma de la fracción F3 , analizada por CLAR C18..	54

Figura 28. Perfil cromatográfico del extracto de <i>A texaensis</i> MeOH C18T F4 . El análisis se realizó en un sistema Agilent LC-MS QTOF 6545 de alta resolución	55
Figura 29. Identificación de la 5'-Deoxi-5'-(metilsulfinil)adenosina mediante CL-EMAR. .	56

Resumen

El filo de los Cnidarios que incluyen a las medusas, corales y anémonas han cobrado relevancia debido a que constituyen una fuente potencial de moléculas activas por las toxinas que liberan las estructuras de secreción (nematocistos) que poseen. Un ejemplo de ello es el fármaco Dalazatida, un péptido sintético aislado de la toxina de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus* efectivo para el tratamiento de la psoriasis. Es por ello que resulta de gran interés el estudio de este filo y en especial de las anémonas de mar.

El actual descubrimiento de la anémona *Anthopleura texaensis* encontrada en la costa yucateca es el objeto de estudio de este trabajo, pues no se tiene registrada ninguna información acerca de esta especie. Dicho lo anterior, para conseguir unas condiciones óptimas de disparo de nematocistos se empleó a la anémona *Bunodosoma cavernata* resultando el Ácido acético al 1.25% y Metanol al 25% como los idóneos para la inducción del disparo eficiente de los nematocistos.

Se colectaron 280 ejemplares de *A. texaensis* realizando la generación del extracto crudo mediante el disparo de nematocistos utilizando Metanol al 25%. Una vez obtenido el extracto crudo se hizo un prefraccionamiento mediante extracción en fase sólida de fase reversa C18-T, sin embargo, se obtuvo un rendimiento menor al 5%. A las fracciones obtenidas, así como al extracto crudo se le realizaron ensayos de neurotoxicidad en el cangrejo *O. quadrata* y en *A. salina* con la finalidad de identificar las fracciones activas, resultando conveniente utilizar a la *A. salina*. El extracto crudo mostró tener efectos de inmovilidad y sedación.

Se obtuvieron dos fracciones activas que fueron separadas mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia semipreparativa en fase reversa para finalmente obtener un perfil cromatográfico por Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas de Alta Resolución que a través de la base de datos MetLit que revelo la presencia de la 5'-Deoxi-5'-(metilsufinil) adenosina.

1. Introducción

El ecosistema acuático constituye una compleja y diversa fuente de recursos utilizados para la humanidad. Dentro de estos recursos, hay algunos organismos marinos que disponen de sustancias bioactivas con posibles propiedades terapéuticas, pues estos han ido evolucionando, adaptándose al medio y a las condiciones en que se encuentran. Lo anterior, los ha llevado a desarrollar mecanismos bioquímicos y fisiológicos que les permite producir compuestos bioactivos para diversos propósitos, tales como: protección, depredación, reproducción y comunicación. Sin embargo, a pesar de que los océanos abarcan una gran cantidad de la superficie terrestre, su exploración comenzó en 1970, con el surgimiento del esnórquel y el buceo [1].

Los primeros hallazgos que se obtuvieron de moléculas bioactivas fueron de organismos abundantes sencillos de recolectar, ya que en esa época no se tenían las herramientas para poder explorar en áreas más profundas del océano. Estos organismos fueron grandes algas rojas, esponjas y corales blandos donde se encontraron metabolitos con estructuras particulares, como los terpenos altamente halogenados y acetogeninas de las algas rojas, así como prostaglandinas encontradas en el coral *Plexaura homomalla* [2]. Gracias a estos descubrimientos, ha surgido mayor interés en estudiar a las especies de origen marino. En particular los animales invertebrados comprenden alrededor del 60% de todo el océano y se les atribuye como la fuente de 11,000 nuevos productos naturales [3].

Entre algunos fármacos extraídos del mar, se encuentran el Prialt®; un péptido natural aislado del veneno del caracol *Conus magus* utilizado como potente analgesico, [4]. Otro ejemplo, es el fármaco Yondelis®; un alcaloide aislado del tunicado marino caribeño *Ecteinascidia turbinata*, siendo el primer anticancerígeno aprobado por la Unión Europea para el tratamiento de sarcoma de tejidos blandos y cáncer de ovario recurrente [5]. Otro exitoso fármaco extraído de fuentes marinas es el Carragelose® un polisacárido sulfatado de algas rojas utilizado como un medicamento antiviral para el tratamiento de infecciones respiratorias [6].

Por lo tanto, los avances científicos en los últimos años han permitido la obtención de nuevos fármacos marinos que se van posicionando en el mercado. Por ejemplo, a finales de Enero del 2021, la empresa farmacéutica española PharmaMar, dio a conocer que el fármaco denominado Plitidepsina, que contiene como principio activo un anticancerígeno utilizado contra el mieloma múltiple y que su origen proviene de la ascidia *Aplidium albicans*, ha demostrado en modelos preclínicos ser más potente contra el Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) que el Remdesivir, el antiviral utilizado de primera línea [7]. Esta empresa planea demostrar su eficacia con ensayos en Fase III para su prueba en pacientes, necesaria para la comercialización final del producto.

Uno de los grupos interesantes que se ha estado estudiando debido a las sustancias que secretan es el filo de los Cnidarios, dentro de los que se incluyen a las medusas, los corales y las anémonas [8]. Son un grupo de animales invertebrados simétricos muy diversos que, según algunos datos moleculares y fósiles, sitúan su origen en el periodo Ediacárico, convirtiéndolos en el grupo más antiguo de animales venenosos [9].

Este filo se subdivide en tres clases: Hydrozoa, Scyphozoa y Anthozoa. La clase Anthozoa incluye 6,000 especies conocidas de anémonas de mar que tienen como característica ser animales cosmopolitas y depredadores, así como una organización solitaria o colonial, pero con gran diversidad morfológica en cuanto a color, tamaño y forma [10]. Dichos animales tienen células especializadas conocidas como cnidocitos, orgánulos con la propiedad de ser urticantes y adhesivas. Dentro de los cnidocitos se encuentran estructuras de secreción llamados nematocistos, estos poseen importancia médica debido a que penetran en la piel del humano y que han llegado a ser fatales en el caso de las medusas. Los nematocistos contienen una cápsula de pared doble donde se alojan las toxinas con un filamento para conferir protección contra los depredadores y la captura de presas, ya que este filamento es descargado como respuesta a un estímulo mecánico y/o químico.

Al ser estudiadas las toxinas que producen estos orgánulos, se ha encontrado que contienen una alta concentración de polipéptidos y proteínas como enzimas, hemolisinas, fosfolipasas A2 (FLA2) y neurotoxinas [11].

Se han aislado varias toxinas de anémona de mar en las que el peso molecular de las toxinas varía de 3,000 a 300,000 Da [12]. Estas toxinas poseen una diversidad estructural que ha permitido ejercer acciones específicas y potentes a nivel de canal iónico dependientes de voltaje con un peso molecular de 5,000 Da y citolisinas activas en la membrana con pesos moleculares de entre 15-20,000 Da que les permite tener una variedad de actividades biológicas: antitumorales, antiparasitarios, como agentes microbianos, entre otras. Por ejemplo, Dalazatida (anteriormente conocido como ShK-186 y SL5) que es un péptido sintético de 37 aminoácidos inhibidor específico del canal de potasio Kv1.3 dependiente de voltaje y que se emplea para el tratamiento de la psoriasis, fue derivado de la toxina del canal de K⁺ (ShK); aislada de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus* [13].

Por lo anterior, se ha tenido gran interés en las toxinas de los cnidarios, pues a pesar de que se han estudiado a lo largo de estos años, aún queda mucho que conocer acerca de los componentes individuales de cada toxina de estos organismos. Tal es el caso de la anémona *Anthopleura texaensis*, encontrada por primera vez en el arrecife de la Gallega en Veracruz y en la costa Yucateca [14], debido a que se desconoce el perfil de toxinas de *A. texaensis*, cualquier hallazgo que contribuya a la base de conocimiento sobre esta especie representa una buena oportunidad para su análisis, por lo que se procedió a realizar una separación biodirigida del extracto activo de la anémona para la posterior identificación y obtención de compuestos biológicamente activos.

2. Antecedentes

2.1. Phylum Cnidaria

El phylum Cnidaria comprende aproximadamente 13,400 especies, dentro de las cuales, la mayoría está constituida por organismos acuáticos [15] en los que se encuentran las medusas, las anémonas, los corales entre otras especies. Además, incluye cinco clases principales: Hydrozoa, Anthozoa, Scyphozoa, Cubozoa y Staurozoa [16]. Los dos primeros suelen formar diferentes tipos de colonias, mientras que, por el contrario, los Scyphozoa, Cubozoa y Staurozoa viven como organismos solitarios.

Los cnidarios se encuentran en todas las latitudes, desde aguas medias o cerca de la superficie, hasta cerca del fondo marino. Diversas especies poseen un ciclo de vida dimórfico, en el que se presenta dos fases adultas con morfología diferente: un estado polipoide y uno medusoide. Las clases Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa y Staurozoa tienen una etapa pelágica que nada libremente (medusa), que coexiste con la etapa de pólipo, a diferencia de los Anthozoa que solo tiene la etapa de pólipo.

Una de las características particulares que distingue a los cnidarios son las células especializadas conocidas como cnidocitos ("células urticantes") que contienen orgánulos llamados nematocistos, espirocistos y pticocistos. La clasificación de los cnidos se basa en la forma del eje y el tipo, así como la distribución de las espinas [17]. Dentro de las que destacan los nematocistos, ya que tienen como característica penetrar la piel del humano. Los nematocistos poseen una cápsula gruesa de pared doble donde se alojan las toxinas con un filamento hueco enrollado en espiral. Estos pueden variar en cuanto a la forma que se expande hacia el exterior de la célula para conferir protección contra los depredadores y captura de presas [18]. Además, la inyección de las toxinas induce parálisis en la mayoría de los organismos. Por el contrario, la cápsula de los espirocistos tiene una pared única que es más delgada, cuya función es capturar a la presa por adhesión, además el filamento tiene una composición químicamente diferente [19]. Mientras que los pticocistos se enfocan en la adhesión, incluso pueden adherirse a la arena.

2.1.1 Disparo de nematocistos

Los nematocistos son estructuras de secreción punzantes producidas por el aparato de Golgi de los cnidocitos que pueden activarse por diversos factores, como presión o cambios de osmolaridad [20]. Estos orgánulos especializados, son utilizados por el filo Cnidaria para una variedad de funciones importantes, dentro de las que se encuentran la depredación y la defensa, ya que estos liberan una mezcla compleja de compuestos, principalmente proteicos. Los nematocistos son las estructuras de inyección de toxinas más rápidas conocidas en el reino animal [21] y tienen una amplia variedad estructural en cuanto a morfología y función, pues se conocen 30 tipos diferentes, además, con frecuencia se encuentran múltiples tipos en el mismo organismo [22]. El proceso de eyección es similar para cualquier tipo de nematocisto [Figura 1], en el que se tiene como primera instancia que el opérculo se abre, permitiendo la descarga de los estiletos que van a perforar la membrana de la presa y es cuando el túbulo entra en la presa para liberar las toxinas, todo esto en fracciones de segundo [23].

Debido a las cantidades tan pequeñas de toxinas que producen los cnidarios, representan un desafío para su constante estudio, ya que no existe una glándula grande que secrete cantidades en miligramos de estos compuestos, lo que dificulta su purificación y aislamiento para su cuantificación final. Es por ello que se han utilizado los ensayos de Lowry y Bradford para la cuantificación de proteínas utilizando diversos cnidarios; por ejemplo, se utilizó un microensayo de Bradford para el coral *Pseudodiploria strigosa*, la anémona *Aiptasia pallida* y la medusa *Cassiopea xamachana* [24]. Por su parte, para la anémona *Anthothoe chilensis* se utilizó el método de Lowry para la cuantificación de sus proteínas [25].

Se han incrementado las investigaciones y técnicas para la obtención de estos compuestos bioactivos de los cnidarios utilizando la descarga de nematocistos mediante estimulación física (ruptura mecánica, homogeneización y maceración), descarga eléctrica mediante varillas de grafito o agentes químicos como el etanol.

Con el avance de la tecnología, la secuenciación, así como la identificación y caracterización de toxinas con herramientas de transcriptómica y proteómica han proporcionado un conjunto de herramientas eficientes y robustas para obtener nuevas moléculas bioactivas con posibles efectos terapéuticos disminuyendo así, el tiempo de estudio.

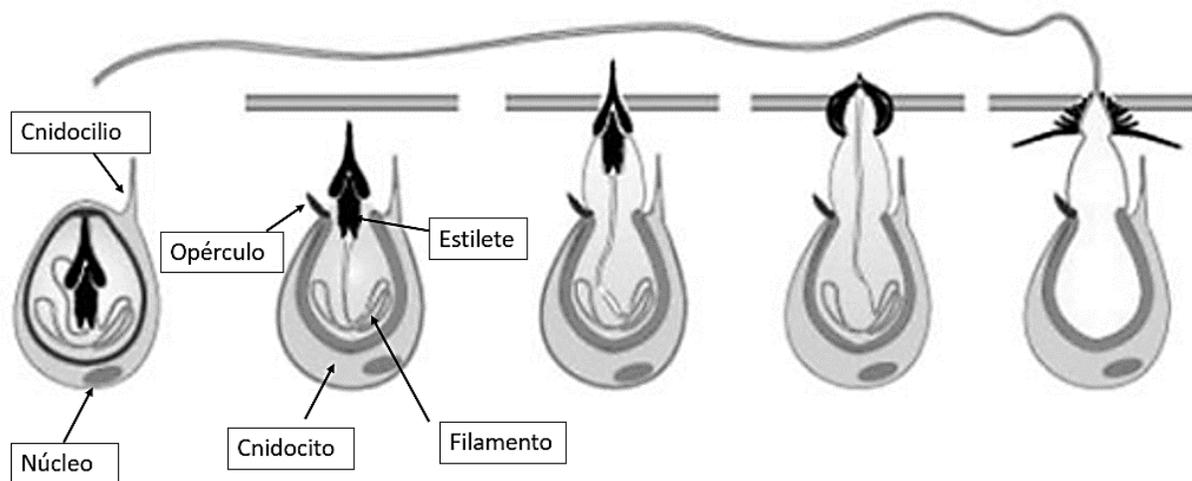


Figura 1. Proceso de descarga de nematocistos: Cuando el cnidocilio entra en contacto con la membrana, el opérculo se abre, permitiendo la descarga de los estiletes que van a perforar la membrana de la presa y es cuando el túbulo entra en la presa para liberar las toxinas [26].

2.2. Anémonas

Las anémonas de mar, muchas veces conocidas como “flores del mar”, son animales pertenecientes al filo Cnidaria y a la clase Anthozoa, que a diferencia de los demás cnidarios, carecen de una etapa de medusa de nado libre. Dentro de los Anthozoa, las anémonas forman el orden hexacorallia que contiene solo pólipos sésiles y bentónicos.

Los pólipos pueden ser de un solo sexo o hermafroditas, por lo que pueden reproducirse sexual o asexualmente. Su ciclo de vida sexual incluye cuatro etapas principales: huevo fertilizado, planula, pólipo y adulto. Mientras que para la asexual puede llevarse a cabo por gemación, fragmentación o por fisión binaria longitudinal y transversal [27]. Carecen de cefalización, sistema nervioso centralizado y de órganos respiratorios, por lo que dependen en gran medida de las toxinas para capturar a sus presas y defenderse de sus depredadores [10].

La anatomía de un antozoo [Figura 2], se representa con una estructura cilíndrica cuya base es el disco pedal del que se adhiere a las rocas y su distribución se basa en una estructura tubular, eje boral aboral, es decir, sin ano, epidermis interior, y cavidad gastrovascular, llamada también celenteron. Además, poseen dos capas de células (son animales diblásticos), una exterior, llamada ectodermo y otra interior conocida como endodermo, que delimita la cavidad gástrica. Estas capas se encuentran separadas por un tejido conjuntivo conocido como mesoglea, la cual da la consistencia gelatinosa característica que sostiene y le da forma al organismo, mientras que la boca del pólipo está rodeada de tentáculos, que facilitan la captura de presas. Para el caso de los antozoos, poseen una superficie de estabilización que la une al suelo, justo después del momento en que la larva encuentra el nuevo sitio para el establecimiento [10].

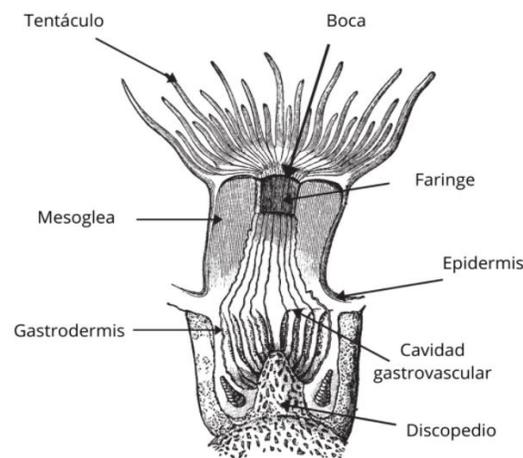


Figura 2. Anatomía de una anémona: Se basa en la adhesión del discopodio a una superficie, en donde el cuerpo es una estructura tubular, rodeada por la epidermis que contiene la cavidad gastrovascular y la mesoglea que le da el soporte a la estructura. Su boca esta rodeada por tentáculos. [28].

En cuanto a su alimentación, mediante los músculos longitudinales, así como los transversales, la anémona realiza contracciones que facilitan el movimiento de la presa, a través del celenteron para su posterior asimilación.

Adicionalmente, las anémonas tienen un papel importante en el desarrollo de algunos peces y crustáceos, pues forman una relación simbiote en la que la

anémoma brinda protección contra sus depredadores, además de obtener sus nutrientes faltantes, como es el caso de las algas con las que suele asociarse [9].

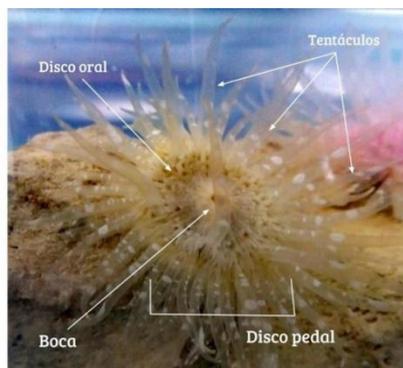


Figura 3. Estructura externa de la anémoma *A. texaensis*: El disco pedal se adhiere a la roca y se observa la boca rodeada del disco oral y sus tentáculos.

El primer registro de la especie *Anthopleura texaensis* para México fue en el arrecife de La Gallega, Sistema Arrecifal Veracruzano, dicha anémoma posee tentáculos lisos, delgados, ordenados hexámeramente con puntas afiladas de color verde oliva, algunas veces con manchas circulares blancas a lo largo de su extensión un disco pedal bien desarrollado de color beige [Figura 3]. Actualmente, existen tres especies del género *Anthopleura* para el Golfo de México y el Mar Caribe: *Anthopleura krebsi*, *Anthopleura pallida* y *Anthopleura texaensis* [7].

2.3. Toxinas de organismos marinos y anémonas de mar

A lo largo de la historia, la naturaleza y la medicina han tenido una estrecha relación con el uso de biomoléculas terapéuticas obtenidas de productos naturales utilizados desde años atrás, ya que desde la antigua Grecia y los primeros periodos de Bizancio, el uso y aplicación terapéutica de organismos marinos estuvo arraigada en las poblaciones mediterráneas, pues ellos tenían un particular interés en los invertebrados que eran utilizados para la fabricación de bebidas, productos pulverizados o ungüentos [29]. En la medicina china se utilizaban fórmulas de hierbas marinas que conforme avanzó el conocimiento, se convirtió en una especie de enciclopedia que recopila información importante acerca de cianobacterias, algas, animales marinos y minerales [30]. Todo esto nos lleva al interés por la

farmacología marina, se ha desarrollado desde la antigüedad, pues los productos naturales marinos tienen una variedad de estructuras únicas [Figura 4] que prometen aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades.

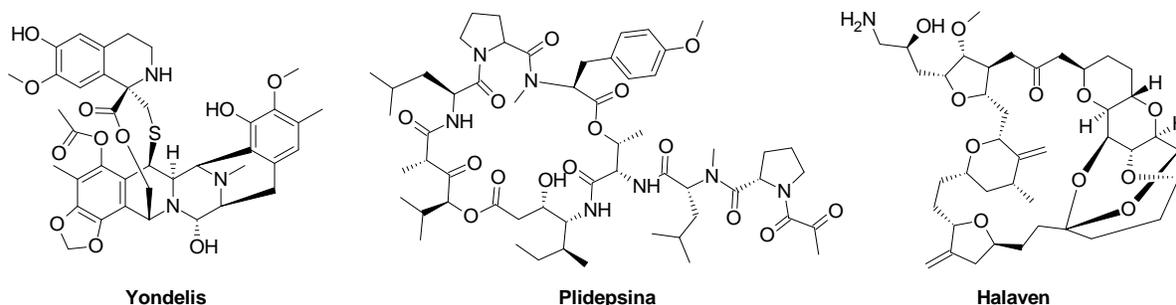


Figura 4. Estructuras de fármacos de origen marino. A) Yondelis, actividad anticancerígena obtenida de la ascidia *Ecteinascidia turbinata*. B) Plidepsina, actividad antiviral y anticancerígena obtenida de la ascidia *Aplidium albicans*. C) Halaven, anticancerígeno obtenido de la esponja *Halichondria okadai*.

Las principales sustancias bioactivas y fármacos comercializados para diferentes ensayos clínicos se derivan de esponjas, liebres marinas, caracolas, ascidias, moluscos, hongos marinos, bacterias, gusanos acuáticos, corales blandos y peces (Tabla 1). Estos organismos marinos se han estudiado y se han identificado moléculas con diferentes actividades biológicas como antibacterianos, inmunomoduladores, antifúngicos, antiinflamatorios, anticancerígenos, neuroprotectores, analgésicos, antiparasitarios, entre otros. Un ejemplo de ello es el ácido alfa-kaínico del alga roja *Digenia simplex*, y la bengamida F del pepino de mar *Cucumaria echinata* que actúan como agentes antiparasitarios [15]

Tabla 1. Fármacos provenientes de organismos marinos [31].

Nombre del compuesto	Organismo marino	Organismo Marino (Nombre científico)	Área clínica	Estado	Año
Ziconotida	Caracol conus	<i>Conus magus</i>	Dolor	Aprobado	2004
Brentuximab vedotin (SNG-35)	Liebre de mar	<i>Dolabella auricularia</i>	Cáncer	Aprobado	2011
Leconotida (AM336)	Caracol cónico	<i>Conus catus</i>	Dolor	Fase I	2002
Didemnin B	Ascidia	<i>Trididemnum cyanophorum</i>	Cáncer	Fase II, descontinuada	2000

Plitidepsina (Aplidin)	Tunicate	<i>Aplidium albicans</i>	Cáncer	Medicamento huérfano: MM, Fase III	2018
Elisidepsina	Molusco/alga	<i>Elysia rufescens</i>	Cáncer	Fase II, descontinuada	2016

Dichas propiedades se deben a que el ambiente marino ha propiciado que los organismos marinos que lo habitan desarrollen mecanismos de sobrevivencia, dentro de las que se encuentran las toxinas. El estudio de las toxinas marinas inicio en los años sesenta con el hallazgo de la tetrodotoxina (extraída del pez globo) y la saxitoxina (extraída de dinoflagelados), los cuales, por la especificidad de sus efectos, así como por la potencia de su respuesta biológica, han permitido profundizar en la caracterización estructural y funcional de los canales de sodio [32].

Como se ha mencionado, los Cnidarios y específicamente las anémonas de mar son animales de interés para el estudio de moléculas bioactivas, ya que producen toxinas que al ser estudiadas químicamente se ha encontrado que contienen, principalmente, componentes proteicos que funcionan como enzimas, hemolisinas, neurotoxinas o inhibidores de proteasas [11] que cumplen las funciones de defensa contra los depredadores o captura de sus presas. Algunas de estas enzimas que se han encontrado tienen carácter proteolítico y lipolítico, como es el caso de *Anthothoe chilensis* [33] que se han reportado fracciones proteicas con actividad proteolítica y actividad de fosfolipasa [34,35], y del veneno de *Aiptasia pallida* que se ha purificado y caracterizado una fosfolipasa [35]. Dicho lo anterior y de acuerdo con la familia estructural, así como su función, en este apartado se abordarán generalidades y ejemplos de moléculas encontradas en anémonas de mar.

2.3.1 Citolisinas

Las citolisinas son moléculas estables, en donde su función principal es la lisis celular, ya sea formando poros en la membrana o aumentando su permeabilidad. Se han aislado citolisinas de más de 30 especies diferentes de anémonas de mar y de acuerdo con su estructura primaria y propiedades funcionales, se clasifican en cinco tipos (tipos I-V) [36]. Las citolisinas tipo I son péptidos de 5-8 kDa que forman

poros en las membranas de fosfatidilcolina y que tienen actividad antihistamínica, se han reportado las citolisinas Rml y RmII de la anémona *Heteractis crispa* [37].

En el caso de las citolisinas tipo II, también conocidas como actinoporinas debido a su capacidad para unirse a los dominios de los fosfolípidos en la membrana del organismo y formar poros selectivos de cationes. Esta familia ha sido de las más estudiadas debido a su abundancia y se componen de un solo dominio de alrededor de 20 kDa que carece de residuos de cisteína [38]. Este tipo de citolisinas aparecen como familias multigénicas, lo que les da como propiedad tener muchas isoformas de proteínas, que les otorga diferencias en la solubilidad, así como en la actividad hemolítica y citolítica en general, lo que las hace tener una diversidad de actividades y funciones. Las citolisinas de tipo III tiene un peso de entre 25-45 kDa que pueden o no tener actividad enzimática que a diferencia de las citolisinas tipo II, estas poseen residuos de cisteína y causa la hemólisis de los glóbulos rojos en los mamíferos a concentraciones muy bajas; ese tipo de toxinas se han reportado en *Aiptasia pallida*, *Urticina crassicornis* y *U. piscivora* [39]. Las citolisinas de tipo IV está conformada por una única proteína aislada de la anémona *Metridium senile*, la metridiolisina, inhibidora del colesterol. Esta toxina tiene un peso de 80 kDa y actúa uniéndose de forma no específica a las membranas lipídicas, formando poros permeables al K⁺ [40]. Finalmente, las citolisinas de tipo V son parecidas a la familia de proteínas del complejo de ataque a membrana/perforina (MACPF) y se aisló por primera vez, de la anémona *Phyllodiscus semoni* [41]. Dicha familia, se considera como formadora de poros o mejor conocida como perforinas, utilizada en el sistema inmunológico como defensa del huésped. Tienen un peso de alrededor de 60 kDa, dentro de las que se encuentran: AvTx-60A de *Actinaria villosa* y PsTx-60A y PsTx-60B de *Phyllodiscus semoni* [42].

En general, las citolisinas han sido estudiadas principalmente como agentes antitumorales y antiparasitarios, aunque también como agente antimicrobiano, por

ejemplo, las citolisinas encontradas en *Stychodactyla helianthus* y *Stychodactyla gigantea*.

2.3.2 Fosfolipasas A2

Las Fosfolipasas A2 se han encontrado en los tentáculos de los Anthozoa, Schyphozoa, Hydrozoa y Cubozoa. Se ha demostrado actividad hemolítica en una fracción de la anémona de mar *Aiptasia pallida* [43]. Son una familia de enzimas que hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos, principalmente el ácido araquidónico y lisofosfolípidos [44]. Desempeñan un papel importante en las funciones vitales del cuerpo, incluido el catabolismo de los lípidos, procesos inflamatorios y transducción de señales. Existen dos clases de FLA2, las intracelulares o citosólicas (FLA2c), de masa molecular elevada (40-85 kDa) y las FLA2 de secreción (FLA2s), de masa molecular más pequeña (14-18 kDa). Las formas extracelulares de las FLA2 se encuentran comúnmente en las secreciones de las glándulas exocrinas como páncreas y glándulas venenosas de serpientes, abejas, escorpiones, así como en sitios inflamatorios [45].

2.3.3 Neurotoxinas

Otras de las sustancias peptídicas con más relevancia en las toxinas de las anémonas por su especificidad, son las neurotoxinas, que interfieren con la transmisión de los impulsos nerviosos alterando la función de los canales iónicos de las membranas celulares implicados en diversas funciones importantes del organismo. Debido a que las anémonas, son animales sésiles, las neurotoxinas les ayudan a inmovilizar a sus presas o defenderse de sus depredadores. Dentro de los canales con los que interactúan estas toxinas se encuentran los Acid sensing Ion Channels (ASIC), los canales Transient Receptor Potential (TRP), los canales sodio dependiente de voltaje y canales de potasio dependientes de voltaje [33]. Las toxinas con acción sobre canales de Na⁺ son polipéptidos con tres puentes disulfuro y tienen pesos moleculares de alrededor de 5 kDa [46]. Mientras que para los canales de potasio dependientes de voltaje (KV1), su bloqueo provoca una

hiperexcitabilidad neuronal y espasmos musculares. Las toxinas KV Tipo 3 están compuestas por 42-43 residuos de β -defensinas, dentro de las que se encuentran las toxinas aisladas de *Anthopleura elegantissima* (APETx1) y las toxinas aisladas de *Anemonia sulcata* (BDS-II) [47].

Esta última se caracterizó como un compuesto antihipertensivo y antiviral. Ambas toxinas provocan un cambio despolarizante dependiente de voltaje en la activación de KV 3.1 Y KV 3.2. Por otra parte, para los canales de sodio dependientes de voltaje (NaV) tipo 1 y 2, constan de 46-54 aminoácidos, siendo de los más grandes de las anémonas de mar, para el tipo 1, estas toxinas se unen a una región extracelular del sensor de voltaje en el sitio 3 [48].

Las anthopleurinas son un importante grupo de toxinas aisladas del género *Anthopleura* que se relacionan con los canales NaV tipo 1 han sido consideradas para aplicaciones terapéuticas cardiovasculares [49]. Para el caso de las toxinas NaV tipo 4, se componen de las isotoxinas: calitoxina I y calitoxina II, que contienen 46 aminoácidos, aisladas de *Calliactis parasitica* [50]. Uno de los primeros bloqueadores de los canales de Kv1 caracterizados fue ShK de *Stichodactyla helianthus* que es un péptido de 35-37 aminoácidos. Los residuos superficiales de ShK se unen a la entrada del canal Kv1 y bloquean la conducción de iones bloqueando el sitio con Lys22. Esta molécula, se ha estudiado como inmunomodulador potencial para la terapia de enfermedades autoinmunes debido a que desempeña un papel crítico en subconjuntos de linfocitos T y B.

Las toxinas de las anémonas de mar se han clasificado tradicionalmente según su actividad, la similitud de la secuencia de aminoácidos y el patrón de puentes disulfuro (número y distribución de cisteínas) para de esta manera, dividir a las toxinas por su diana molecular y luego por su similitud y mecanismo de acción (Tabla 2).

Como se ha mencionado, las anémonas de mar son una rica fuente de proteínas y toxinas peptídicas, pero también poseen componentes no peptídicos de los que se sabe muy poco, de hecho, la primera molécula pequeña descrita de una anémona,

fue la caissarona, un derivado de purina aislado en 1986 de la especie brasileña *Bunodosoma caissarum*, que indujo espasmos en el plexomientérico de cobayo estimulado eléctricamente y que se atribuye a acciones antagónicas sobre el receptor de adenosina [50].

Tabla 2. Clasificación estructural y farmacológica de toxinas de anémonas [51].

Tipo de proteína	Familia estructural	Grupo
Enzimas	Endonucleasas	Desconocido
	Fosfolipasas A2	Citolisinas PLA2 Tipo III
	Serina proteasa S1	Desconocido
Proteínas no enzimáticas	Actinoporinas	Citolisinas Tipo II
	CAP	Desconocido
	Proteínas del dominio WSC	Desconocido
Neurotoxinas peptídicas	Neurotoxina ATX-III	NaV Tipo 3
	Similar a B-defensina	Canales ASIC (Acid sensing Ion Channels) NaV Tipo 1,2,3 y 4
	BBH (Boundless B-hairpin)	Canales ASIC KV Tipo 4
	Similar a Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Actividad EGF Receptores TRPV1
	Inhibidor del nudo de cistina (ICK)	Canales ASIC Kv Tipo 5
	Dominio Kunitz	Inhibidor de proteasa KV Tipo 2 Receptores TRPV1
	Horquilla β asimétrica con bisagras de prolina (PHAB)	KV Tipo 6
	Péptidos pequeños ricos en cisteína (SCRiP)	TRPA1
	ShK	KV Tipo 1

*CAP= Proteínas ricas en cisteína; WSC= Integridad de la pared celular y componente de respuesta al estrés; ShK= Toxina del canal de K⁺ de *Stichodactyla helianthus*; KV= Canal de potasio dependiente de voltaje; NaV= Canal de sodio dependiente de voltaje; TRPV1= Canal de potencial receptor transitorio tipo V1; TRPA1= Canal de potencial receptor transitorio tipo A1.

2.4. Técnicas de separación de moléculas

El incremento constante que se ha llevado en los últimos años, acerca de las aplicaciones en las proteínas en campos de la salud ha dado pie al desarrollo de procesos para el análisis y purificación de proteínas. Dado que estas moléculas varían en tamaño, carga e hidrosolubilidad, así como su afinidad de unión a ligandos específicos, no se puede utilizar un método general para su separación, por lo que se ha optado por recurrir a diversos métodos para llegar a la separación mediante sus propiedades fisicoquímicas de la muestra con el fin de aislar y concentrar el péptido o proteína de interés. Considerando que estos compuestos no están

relacionados con todo el organismo, sino solo con la presencia de moléculas específicas, son necesarios métodos de extracción eficientes. Actualmente, se utilizan diversos métodos que permiten obtener un extracto, que incluyen técnicas de separación y aislamiento, utilizando diferentes tipos de cromatografía y micro o nanofiltración. Luego, la estructura generalmente se analiza mediante técnicas espectroscópicas (resonancia magnética nuclear en una y dos dimensiones) y espectrométricas (espectrometría de masas) y, finalmente, el compuesto se evalúa en términos de efectos biológicos, toxicológicos y clínicos con el fin de identificar las actividades antiinflamatorias, antibacterianas, analgésicas entre otras mediante modelos *in vitro* o *in vivo*.

2.4.1 Cromatografía de permeación en gel

La cromatografía de permeación en gel (CPG) o conocida también como “exclusión molecular” es una técnica que permite separar moléculas de acuerdo con su tamaño molecular. Esta propiedad se debe a que, en el gel, hay una matriz que consta de un gran número de esferas porosas microscópicas que permiten la separación de las moléculas. Cada gel se caracteriza por un rango de fraccionamiento que depende del tamaño de sus poros. Dichas esferas están constituidas por largas cadenas de polímeros unidas entre sí que forman una red tridimensional.

La fase estacionaria de la cromatografía está constituida por geles insolubles en agua de naturaleza hidrofílica que constituyen grandes huecos esféricos, de diámetro específico y atravesados por numerosos poros de diámetro homogéneo. Las diferentes resinas utilizadas en este tipo de cromatografía se diferencian por sus capacidades de resolución (capacidad de separar moléculas de distinto tamaño) y su naturaleza química, pues existen resinas de origen natural (de polisacáridos o dextranos), tales como Sephadex, de origen sintético (geles de poliacrilamida), como Biogel P, y de tipo mixto (dextranos entrecruzados con poliacrilamida), como el Sephacryl.

Al colocar una mezcla que contiene diferentes moléculas de diversos tamaños y se hacen pasar a través de la columna, sucede lo siguiente:

Las moléculas de muy pequeño tamaño penetran en el interior de las esferas que componen el gel, por lo que no son extraídas de la columna hasta que no ha pasado a través de ella un volumen de líquido igual a su volumen total. Sin embargo, aquellas moléculas cuyo tamaño es mayor que el de los poros de las esferas del gel, no pueden penetrar en su interior y atraviesan la columna eluyendo en el volumen muerto, por lo que se dice que se “excluyen”, siendo las primeras en salir de la columna. Para el resto de las moléculas, de tamaño intermedio, éstas presentan una mayor o menor facilidad para difundir al interior de las esferas de acuerdo con su tamaño, siendo extraídas fraccionadamente con volúmenes que están comprendidos entre el volumen total y el volumen muerto [Figura 5].

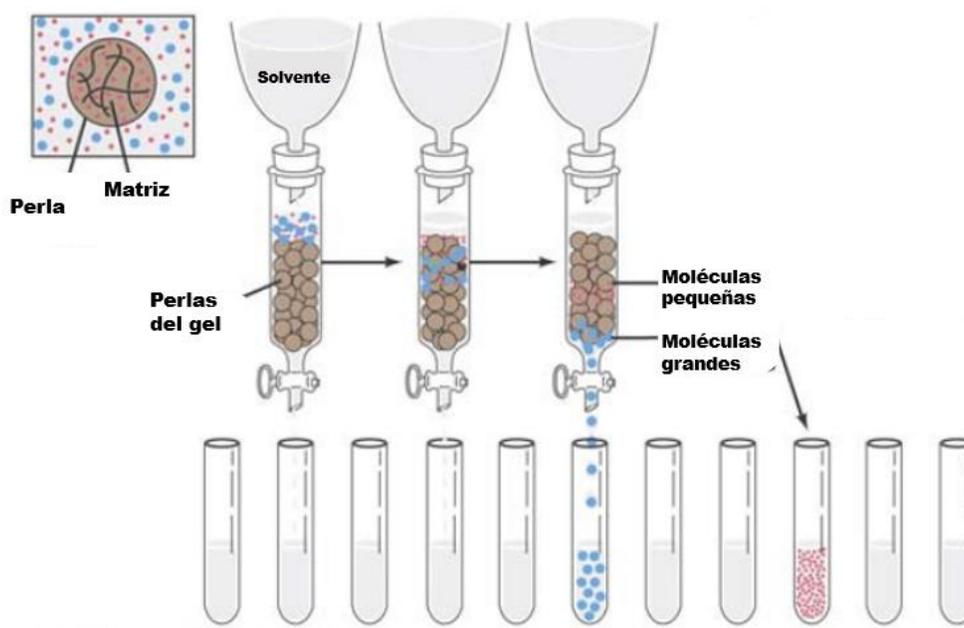


Figura 5. Representación de la técnica cromatografía de permeación en gel: Al colocar el analito a separar en la columna que contiene un gel con perlas de un diámetro específico y utilizando un disolvente definido, se obtiene la separación de la muestra, teniendo como resultado en primera instancia la separación de las moléculas grandes y posteriormente las moléculas pequeñas [52].

2.4.2 Ultrafiltración

La ultrafiltración es el proceso capaz de fraccionar, separar y concentrar sustancias sin que éstas sufran cambios de fase, en el cual se utiliza una membrana semipermeable con poros de tamaño definido, que determina el tamaño de las partículas que pasarán a través de ella, llamado “Cut off Molecular Weight” o tamaño

de corte [Figura 6]. Debido a que la membrana utilizada es semipermeable, es necesaria la presencia de una presión (entre 4 a 8 atm) que ayude a las partículas a fluir a través de esta. El tamaño del poro de las membranas empleadas en esta técnica oscila entre 0.001-0.01 μm con presiones comprendidas entre 1-10 bar.[53]

La caracterización de la membrana es necesaria para relacionar las propiedades estructurales de la membrana, como el tamaño de los poros, la distribución del tamaño de los poros, el volumen libre y la cristalinidad con las propiedades de separación de la membrana.

Las técnicas de separación con membranas son particularmente dirigidas a la extracción o purificación parcial de biomoléculas de gran solubilidad en agua, dado que no involucran agentes químicos y no generan desnaturalización térmica.

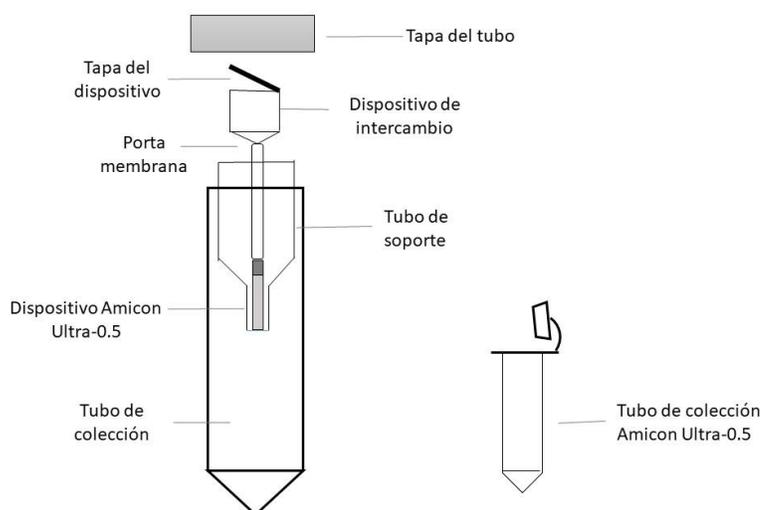


Figura 6. Técnica de ultrafiltración: Se muestra la composición del dispositivo de ultrafiltración que consiste en una membrana vertical que permite separar tamaños de partículas de distinta naturaleza.

2.4.3 Cromatografía de Intercambio iónico

La cromatografía por intercambio iónico se basa en las interacciones electrostáticas que se dan entre la muestra y la matriz que utiliza una resina para separar a las moléculas de acuerdo con su carga superficial. Esta matriz está formada por

polímeros insolubles que contiene grupos cargados unidos, por lo que las resinas que contienen grupos con carga positiva atraen solutos con carga negativa y se denominan resinas de intercambio aniónico. En cambio, las resinas con grupos cargados negativamente son intercambiadores de cationes. Posteriormente, se aplica una disolución buffer de concentración de sal más alta a la columna para que pueda competir con la resina por las proteínas unidas, y las proteínas unidas se pueden eluir a través del buffer con alto contenido de sal. Normalmente, las muestras se cargan en condiciones de baja fuerza iónica y el material unido se eluye utilizando una elución escalonada o en gradiente de la disolución buffer con mayor fuerza iónica [Figura 7].

La cromatografía de intercambio iónico se utiliza frecuentemente para la separación y purificación de diversas biomoléculas que expresan restos hidrófobos e iónicos porque la matriz de la columna puede interactuar fuertemente con las biomoléculas a través de la fuerza electrostática [26].

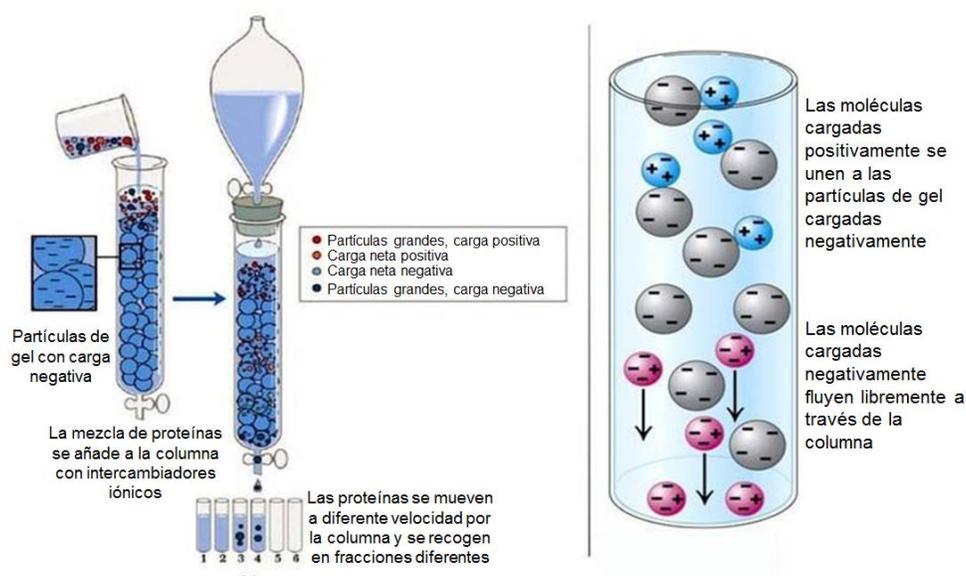


Figura 7. Principio de la técnica de separación para cromatografía de intercambio iónico: La mezcla a separar se añade a la columna de gel con partículas negativas en la que como primera instancia se unen las partículas cargadas positivamente a la columna, mientras que las negativas fluyen a través de la membrana, obteniéndose diferentes fracciones según sus propiedades [63].

2.4.4 Electroforesis

La electroforesis es una técnica para la separación de biomoléculas de acuerdo a su movilidad y naturaleza (generalmente proteínas o ácidos nucleicos) en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, cuya composición está relacionada con las características de la molécula a analizar, estas moléculas migran hacia el cátodo o ánodo dependiendo de la carga, peso molecular y estructura [54]. Dentro de las diversas variantes de la electroforesis, destacan la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) y la electroforesis bidimensional, sin embargo, nos centraremos en la primera, debido a que se puede conocer mediante esta técnica, las características ácido-base de las proteínas presentes en un extracto crudo que ayudaría a dar la información necesaria para posteriormente realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de carga.

Se ha ocupado dicha técnica para el aislamiento de péptidos con actividad biológica en anémonas [10,14].

2.5. Identificación de proteínas mediante cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (CL-EM)

La cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (CL-EM) se ha convertido en una tecnología generalizada que abarca diversos campos que van desde la investigación, la clínica, la industria farmacéutica, la industria alimentaria, las ciencias forenses, entre otras, que ha brindado conocimientos analíticos útiles y esenciales para cada área debido a su versatilidad y eficiencia. Su sensibilidad, selectividad y precisión la han convertido en una técnica de elección para detectar cantidades de microgramos o incluso nanogramos de una variedad de analitos que van desde metabolitos de fármacos, pesticidas y contaminantes de alimentos, hasta extractos de productos naturales.

De manera general, un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) permite separar los componentes de una muestra en función de su distribución en la fase estacionaria (columna) y la fase móvil que es impulsada por una bomba que

hace pasar este disolvente por todo el sistema a un flujo determinado, logrando así la separación de los compuestos en base a la interacción de éstos con la fase móvil y la fase estacionaria.

El equipo CLAR está compuesto por: un dispositivo de suministro de eluyentes, dispositivo de inyección, sistema de conductores, columna, detector [Figura 8] y registrador que arroja una representación gráfica de la concentración del o los analitos en función del tiempo de retención de estos, conocido como cromatograma.

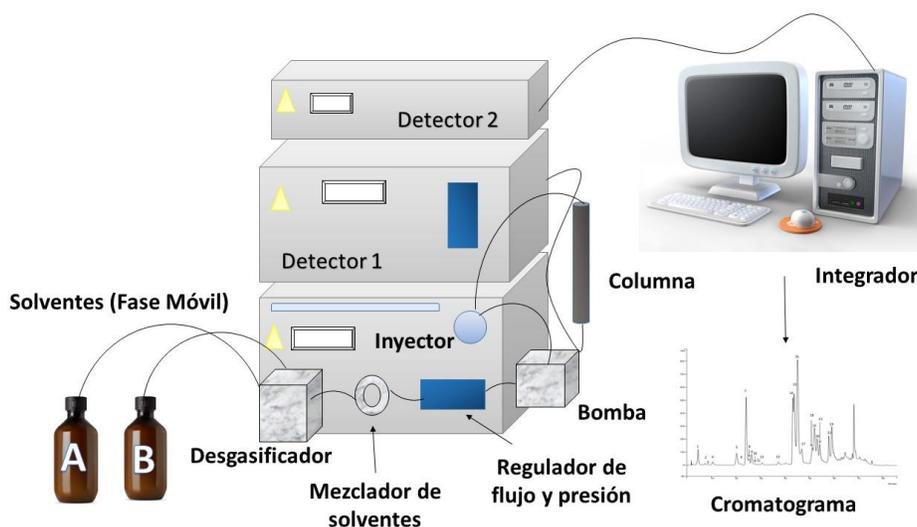


Figura 8. Esquema de un equipo de HPLC. Se presentan los principales componentes del equipo, comenzando con los solventes que pasan por el desgasificador hacia el puerto de inyección que mediante un sistema de conductores pasa por la columna hacia el detector, posteriormente al integrador para finalmente obtener el cromatograma correspondiente.

Mientras que un espectrómetro de masas consta de: un sistema de introducción de muestra, una fuente de ionización, un analizador, un detector y un sistema de integración [Figura 9]. Así mismo, para su funcionamiento, los espectrómetros de masas requieren de sistemas de bombeo que tengan la capacidad de generar un sistema de alto vacío de forma que el recorrido de los iones pueda ser libre y sin colisiones en su camino, los cuales pueden interferir en su trayectoria hasta el detector.

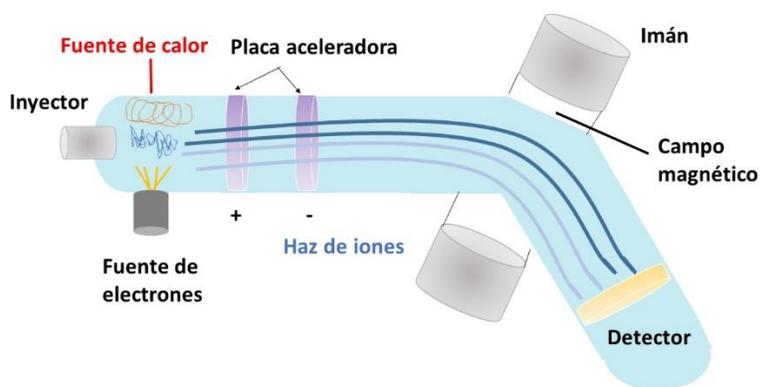


Figura 9. Esquema de Espectrómetro de masas: Consiste en un sistema de inyección de muestra que pasa a través del inyector hacia una fuente de ionización donde los iones formados son acelerados y guiados hasta el detector y el sistema de integración.

Una vez generado este sistema de vacío, se procede a la introducción de la muestra que puede ser directa o estar acoplado a algún equipo (cromatógrafo de gases o líquidos) para posteriormente pasar a la fuente de ionización, en el que actualmente se utiliza Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI) y Electro spray (ESI). Esta última técnica ha sido de las más utilizadas debido a que es capaz de analizar moléculas de amplio rango de masas moleculares con una alta sensibilidad y exactitud, además es utilizada especialmente para muestras de origen biológico (44).

Una vez formados los iones del analito y en fase gaseosa, éstas son aceleradas y guiadas hasta el analizador de masas, donde se separarán en relación con su masa/carga (m/z). El movimiento de los iones en el analizador puede manipularse mediante lentes electromagnéticas que permiten dirigir los iones hacia el detector (b). Existen varios tipos de analizadores que les va a conferir resolución, sensibilidad, exactitud de masa y posibilidad de fragmentar los iones analitos ionizados dependiendo de los propósitos que se tengan. Dentro de los analizadores más utilizados se encuentran: tiempo de vuelo (en inglés, time of flight, TOF), triple cuadrupolo (TQ), trampa de iones y el ciclotrón de iones por transformada de Fourier (FT-ICR).

Finalmente, la corriente de iones va a llegar al detector dentro de los que se pueden encontrar: la caja de Faraday, el Multiplicador de Electrones y la Placa fotográfica, cada uno de estos detectores se puede utilizar de acuerdo con los fines deseados. La función del detector es registrar la carga inducida cuando un ion pasa cerca o golpea una superficie, para producir un gráfico de acuerdo con su relación carga/masa (m/z) del analito.

Es importante señalar que las técnicas APCI y ESI, son técnicas de ionización suave y no inducen fragmentaciones durante el análisis por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas. La fragmentación se puede inducir si el equipo cuenta con una celda de colisión, y para ello se utilizan pequeñas cantidades de un gas como el metano o isopentano que al ser ionizado produce una serie de iones que colisionan con el compuesto original M , transfiriéndole un protón (y a veces alguno de los iones reactivos generados por el gas), muy empleado en equipos híbridos de masas (QTOF, y TQ) con la capacidad de realizar masas en tándem.

Es así, que el acoplamiento de la Cromatografía de líquidos asociado a Espectrometría de masas implica la separación del analito seguida de su detección basada en masas [Figura 10] y éste a su vez puede ser utilizado para elucidación estructural o bien identificación de un compuesto conocido.

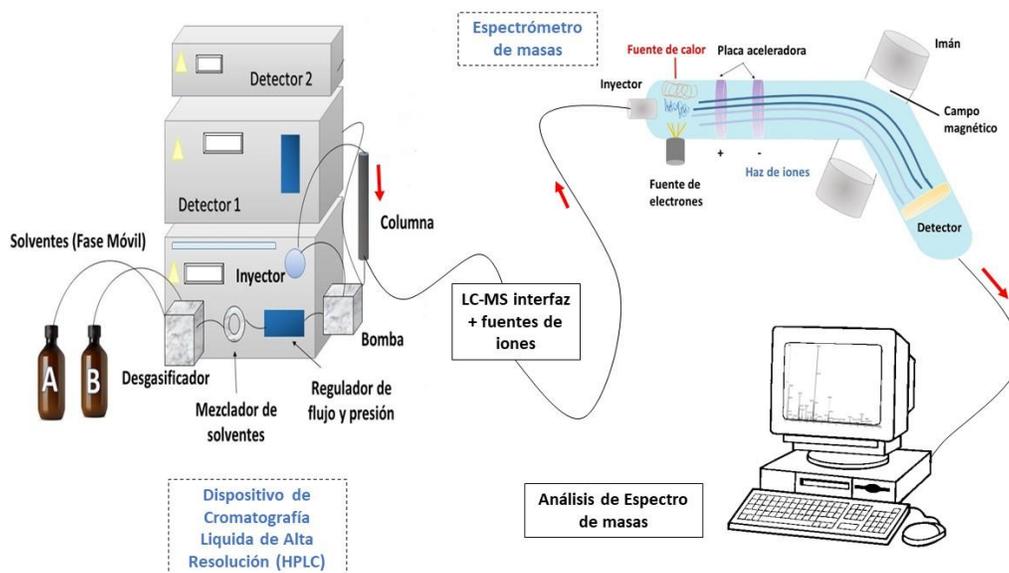


Figura 10. Esquema del sistema CL-EM. Su función principal de la unión de estos equipos implica la separación de los analitos seguida de su detección basado en masas

Ahora bien, el espectro obtenido del equipo de espectrometría de masas brinda información acerca de la molécula de estudio, en la que incluye la relación masa/carga (m/z) y la intensidad relativa de cada señal. Dentro de este espectro de masas, destaca la señal más intensa denominada “pico base” que corresponde al 100% de abundancia relativa y que por lo tanto es el más estable. Mientras que el “ion molecular” es el ion que resulta tras la pérdida de un electrón por parte de la molécula que corresponde al peso molecular de la molécula. Sin embargo, cabe destacar que cada espectro de masas debe de interpretarse tomando en cuenta estas señales, pero también las reglas de fragmentación correspondientes.

3. Justificación

La búsqueda de nuevos fármacos y estructuras de moléculas con fin terapéutico es un tema que va a estar presente día con día debido a la variedad de enfermedades que existen y existirán. Estos compuestos han sido estudiados en su mayoría a partir de fauna y flora terrestre debido a la cantidad y relativa facilidad con la que se pueden obtener moléculas bioactivas, sin embargo, se sabe que el ecosistema marino abarca un área más grande que ha sido poco estudiada. Dentro de ella se encuentra el filo de los Cnidarios y en específico las anémonas de mar, pues estos animales han cobrado relevancia debido al aspecto terapéutico-farmacológico que poseen por las estructuras de secreción, ya que estas liberan toxinas de diversidad estructural que proporciona una variedad de actividades biológicas. Tal es el caso de la anémona *Anthopleura texaensis* recién encontrada en la costa de Yucatán. Debido a que no se han realizado estudios acerca de este espécimen y considerando el potencial de moléculas activas que pueda poseer, es de importancia considerar cualquier información que aporte a la investigación ésta especie.

4. Hipótesis y Objetivos

4.1 Hipótesis

La separación biodirigida del extracto de la anémona *Anthopleura texaensis* presente en la costa de Yucatán permitirá la identificación y obtención de péptidos biológicamente activos.

4.2 Objetivo General

Evaluar a la anémona *Anthopleura texaensis* de la costa yucateca como posible fuente de péptidos bioactivos.

4.3 Objetivos Particulares

1. Realizar un estudio prospectivo en *Bundosoma cavernata* a fin de encontrar las mejores condiciones del disparo de nematocistos mediante medios químicos.
2. Colectar e identificar a la anémona *Anthopleura texaensis* de la costa Yucateca.
3. Generar el extracto crudo de la anémona recolectada.
4. Evaluar la actividad biológica del extracto crudo mediante bioensayos rápidos.
5. Realizar la separación biodirigida del extracto crudo bioactivo.
6. Determinar los perfiles cromatográficos de las fracciones más prometedoras con el fin de obtener compuestos bioactivos.
7. Determinar la naturaleza química de los componentes activos.

5. Desarrollo del proyecto

El desarrollo del proyecto se dividió en dos capítulos. En el capítulo 1 se muestra el estudio retrospectivo de la evaluación, selección y concentración ideal de los reactivos, con la finalidad de inducir eficientemente el disparo de los nematocistos de la anémona *Bunodosoma cavernata* para la obtención de un extracto activo. En el capítulo 2 se procedió a utilizar las condiciones óptimas de los reactivos inductores del disparo de nematocistos en *B. cavernata*, para desarrollar la metodología en la búsqueda de péptidos bioactivos sobre el organismo objetivo de este proyecto, *Anthopleura texaensis*.

Capítulo 1. *Bunodosoma cavernata*

1.1 Metodología

El siguiente estudio se llevó a cabo con el propósito de utilizar una especie de anémona distinta (*B. cavernata*) al espécimen de interés (*A. texaensis*) debido a que esta última presenta un tamaño y peso menor (menos de 1 cm y 1 g de peso húmedo) en comparación con *B. cavernata* (7 cm y 20 g de peso húmedo); por lo que fue conveniente utilizar un menor número de especímenes y evitar así la depredación innecesaria para realizar el estudio del disparo de nematocistos. Además, estudios previos han demostrado que estas especies coexisten en la misma región [55].

Con el fin de simplificar la estructura metodológica del presente proyecto de investigación, se muestra el diagrama de la parte experimental [Figura 11].

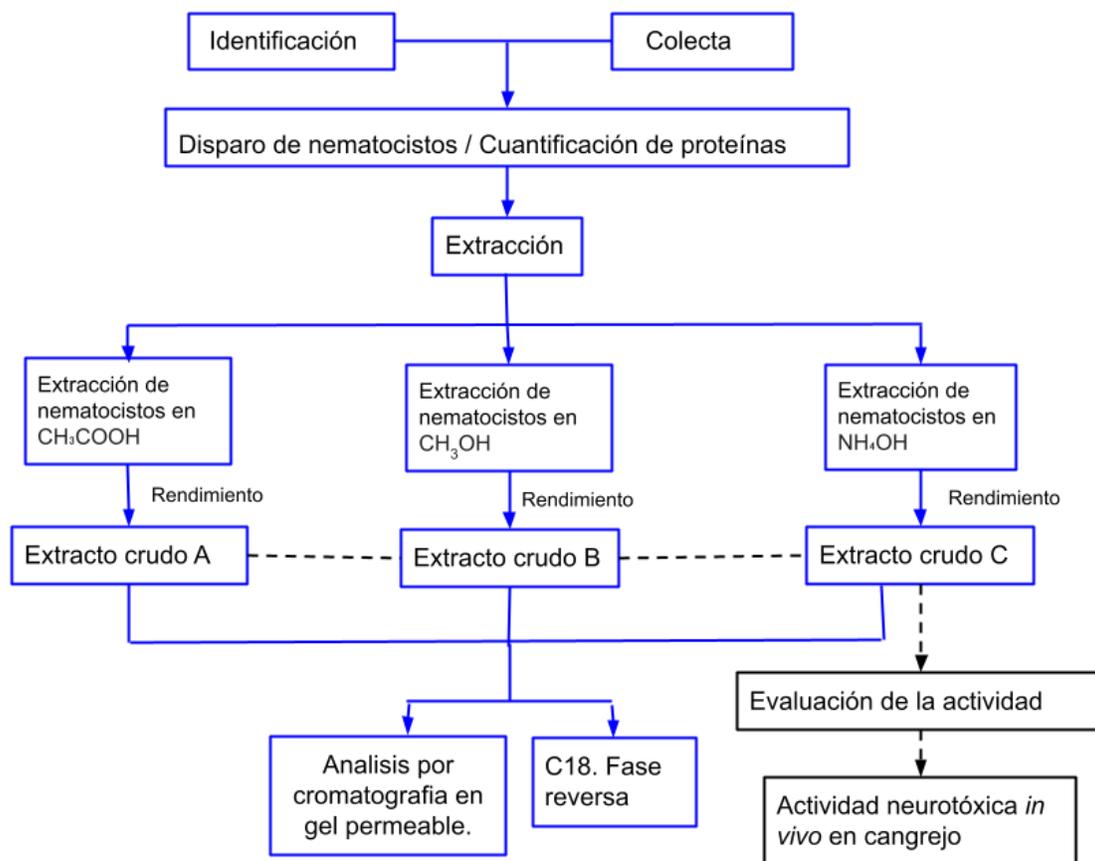


Figura 11. Diagrama de la metodología empleada para *B. cavernata*.

1.1.1 Área de colecta

Estudios previos realizados por González-Muñoz [55] en la costa de Sisal, Yucatán (21° 09' 48.17"N, 90° 02' 57.35" O) dieron pauta para escoger dicho sitio de colecta, ya que ahí fue donde se encontraron un número aceptable de especímenes para emplearlos en la metodología.

1.1.2 Colecta e identificación de organismos

Para la colecta se realizó la inspección de rocas, ya que se ha observado la presencia de la anémona *B. cavernata*, las cuales suelen adherirse. Posteriormente, los organismos se extrajeron utilizando cincel y martillo. Después se colocaron en contenedores con agua de mar para así realizar su traslado a la Unidad de Química

en la Unidad Académica de Sisal, UNAM. La identificación se realizó mediante la observación macroscópica previamente descrita por E. González [55]. Las anémonas se colocaron en una pecera con agua de mar, aireación continua y cristales de mentol para su relajación.

1.1.3 Disparo de nematocistos y cuantificación de proteínas

Se realizó la disección de los tentáculos de dos anémonas *B. cavernata* previamente sedadas con mentol. Para el proceso de sedación, se colocaron aproximadamente 300 mg de mentol en la pecera que contenía a las anémonas durante 7 h. Posteriormente, tres tentáculos fueron disectados y agregados a cada tubo de microcentrífuga de 2 mL [Figura 12], los cuales tenían los reactivos a evaluar en diferentes concentraciones, Tabla 3. Para la preparación de las disoluciones a evaluar, se partió de una concentración conocida y enseguida se realizaron diluciones dobles, estas disoluciones nos ayudaron a determinar la concentración adecuada para un eficiente disparo de los nematocistos. Por lo anterior, se empleó ácido acético (AcOH) al 40% (rango de trabajo 0.156-20%), metanol (MeOH) al 40% con agua de mar (rango de trabajo 0.156-20%) e hidróxido de amonio (NH₄OH) al 40% (rango de trabajo 0.156-20%), así como metanol (rango de trabajo 100-0.1%) (Tabla 3). Como la mayoría de las toxinas presentes en las anémonas son de origen peptídico, se realizó la cuantificación de proteínas mediante un equipo Nanodrop (ThermoFisher, Inc). Para ello, se colocó 1 µL de cada disolución generada por el disparo de los nematocistos en el lector del equipo Nanodrop, y se realizó la lectura de la absorbancia a 280 nm.

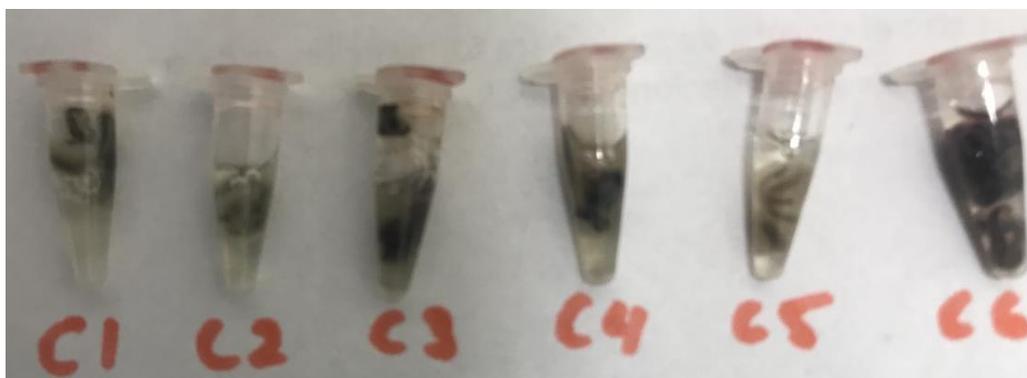


Figura 12. Tentáculos de *B. cavernata* colocados en tubos de microcentrifuga de 2 mL a concentraciones de: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625% para los reactivos de AcOH, MeOH y NH₄OH.

Tabla 3. Concentraciones de diferentes reactivos utilizados para el disparo de nematocistos.

Reactivos	Concentración (%)										
AcOH al 40%											
MeOH con agua de mar al 40%	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156			
NH ₄ OH al 40%											
MeOH al 100%	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.10

*MeOH= Metanol; AcOH=Acido acético; NH₄OH= Hidróxido de amonio.

1.1.4 Generación del extracto crudo mediante el disparo químico

Después de analizar el disparo de los nematocistos con los diferentes reactivos, se seleccionaron las concentraciones de ácido acético, metanol e hidróxido de amonio que generaron la mayor concentración de proteínas, para obtener tres extractos crudos y evaluar la actividad biológica y su complejidad molecular mediante el perfil cromatográfico.

La obtención del extracto crudo se realizó mediante el disparo de nematocistos de los tentáculos de las anémonas sedadas, al sumergirlas por 1 min en una disolución por separado de ácido acético, metanol e hidróxido de amonio a diferentes concentraciones (Tabla 3), se realizaron movimientos circulares con la finalidad de liberar la mayoría de las toxinas de estos organismos [Figura 13]. Después se centrifugaron a 5000 rpm durante 8 min. Se separó el sobrenadante y se neutralizó a pH de 7, (con hidróxido de potasio (1 M) o ácido fosfórico concentrado) utilizando un potenciómetro de la marca Hatch para finalmente colocarlos en tubos Falcon de 50 mL para su posterior

liofilización (Equipo LabConco, Freezone 2.5, -40 °C y 0.200 mBar), separación biodirigida y análisis del perfil cromatográfico.



Figura 13. Disparo de nematocistos para *B. cavernata* utilizando diferentes reactivos y concentraciones.

1.1.5 Evaluación de la actividad neurotóxica *in vivo* sobre *O. quadrata*

Para determinar si los extractos contenían neurotoxinas o citolisinas, se sometieron a la evaluación biológica en el modelo neurotóxico de cangrejo fantasma, *Ocypode quadrata*. Mediante este bioensayo rápido se determinaron los efectos de las neurotoxinas (parálisis, temblor y descoordinación) y las citolisinas (mortalidad) de manera cualitativa al observar el comportamiento del organismo desde el momento de la administración y hasta las dos horas. Observando, a los segundos o minutos los efectos del extracto [14].

1.1.6 Modelo empleado para la separación biodirigida

Se recolectaron cangrejos fantasmas (*O. quadrata*) de la playa del puerto de Sisal, los cuales fueron colocados en bandejas con arena con el fin de disminuir su estrés. Estudios previos han demostrado que se utiliza esta especie por la asequibilidad y por el comportamiento muy activo, logrando observar los efectos del extracto de manera más evidente, en comparación con otros crustáceos [56].

1.1.7 Preparación de las muestras a evaluar

Se pesaron 4 mg del extracto crudo o fracción de estudio y se disolvieron en 1 mL de agua desionizada. Como blanco negativo se utilizó agua desionizada.

1.1.8 Bioensayo

Para realizar el bioensayo se tomaron en cuenta el peso y tamaño aproximado de los cangrejos. El extracto crudo o fracción por evaluar se inyectó en la membrana artrodial del tercer pereiópodo, esto, en función del tamaño del cangrejo, inyectando 50 μ L para los de menor tamaño (peso entre 4-6 g) y 100 μ L para los de mayor tamaño (peso entre 10-15 g). Consecutivamente, se procedió a observar y anotar los efectos del extracto o fracción sobre el cangrejo, durante el tiempo de la evaluación (0 a 120 min).

1.1.9 Perfil cromatográfico Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de los extractos generados

Una vez generados los extractos por el disparo de los nematocistos empleando diferentes agentes químicos, se procedió a determinar la complejidad del perfil cromatográfico. Para ello, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución de la marca Varian Polaris 211 que consta de un sistema dual de Bombas 211, inyector automático 471, y un detector de UV 335 (Varian Inc.).

Para el análisis del Perfil cromatográfico Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) se utilizó una columna de fase reversa, Omega 5 μ m PS-C18 (100 Å, 250 X 4.6 mm, Phenomenex Inc), empleando H₂O como fase móvil A y Acetonitrilo como fase móvil B en un método de gradiente: comenzando con 100% de fase A por 5 minutos, luego un gradiente de 15% de fase B en 10 min para posteriormente tener un gradiente de 15-50% de fase B en 10 min, y terminar con 50-100% de fase B en 3 min. Este análisis se llevó a cabo empleando un detector UV a una longitud de onda de 215 nm (UV, enlace peptídico) con flujo de 1 mL/min por un tiempo de 30 min por análisis. Se inyectaron 20 μ L (4 mg/mL) de cada extracto crudo.

1.1.10 Determinación de la distribución de pesos moleculares mediante cromatografía en gel permeable (CGP)

Con la finalidad de determinar la presencia de citolisinas de alto peso molecular (Peso Molecular esperado: 8-40 kDa) o neurotoxinas de bajo peso molecular (Peso Molecular esperado: 3-10 kDa), se realizó el perfil cromatográfico mediante cromatografía en gel permeable (CGP). Lo anterior, nos sirvió para separar compuestos en función del tamaño molecular. Para ello, se utilizó una columna Yarra SEC-2000 (3 μ m, 300 X 7.8 mm, Phenomenex Inc.) con rango de trabajo de 0.5-40 kDa. Para determinar el peso molecular aparente, se procedió a calibrar la columna.

Calibración de la columna Yarra SEC-2000.

Se emplearon diferentes compuestos tales como uracilo, bacitracina y albúmina con diferente peso molecular como estándares para la curva de calibración (Tabla 4).

Tabla 4. Estándares utilizados para la curva de calibración.

Estándar	Peso molecular (kDa)	[mg/mL]
Uracilo	0.132	0.5
Bacitracina	1.422	0.2
Albúmina	66.00	0.5

Cada estándar se analizó en el sistema cromatográfico Polaris de 211 Varian. Las condiciones de análisis fueron: columna Yarra 3u SEC-2000 con un flujo de 1 mL/min, con un método isocrático 90:10 de H₂O/ CH₃CN, una inyección de 20 μ L y 17 min de análisis para cada estándar. De cada análisis se determino el volumen de exclusión (X) y el Log del Peso Molecular de cada estándar y se realizó la regresión lineal para obtener la ecuación de línea recta.

Una vez realizada la curva de calibración, se inyectaron 20 μ L (4 mg/mL) de los extractos de ácido acético, metanol e hidróxido de amonio en la columna para obtener sus respectivos perfiles cromatográficos utilizando las condiciones anteriormente descritas.

1.2 Resultados y Análisis de resultados

1.2.1 Identificación y colecta

Bunodosoma cavernata fue localizada en las hendiduras rocosas de la costa de Sisal, Yucatán (21° 09' 48.17"N, 90° 02' 57.35" O), su extracción fue mediante el uso de martillo y cincel, para posteriormente, colocar las anémonas en recipientes con agua de mar y así disminuir su estrés. De acuerdo con la descripción realizada por González [57], estas anémonas presentan un disco oral liso extendido café rojizo, con tentáculos delgados lisos cónicos verde oliva y una columna cilíndrica gruesa con verrugas ligeramente color café, así como un disco pedal verde olivo [Figura 14]. Para este estudio se colectaron 5 ejemplares.

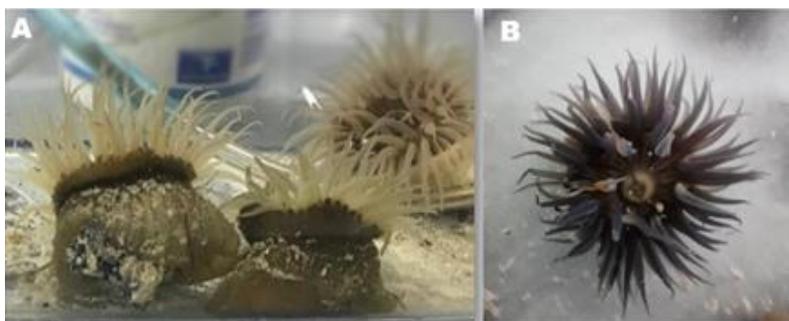


Figura 14. Anémona *B. cavernata*. A) Anémonas adheridas a rocas vista frontal B) Vista superior de la anémona.

1.2.2 Disparo de nematocistos y cuantificación de proteínas

En la Tabla 5, se presentan los resultados de la inducción del disparo de los nematocistos con concentraciones crecientes de los diferentes agentes químicos empleados. Se utilizaron dichos reactivos debido a que en estudios anteriores [58], se trataban las picaduras de las medusas con productos que tenían a la mano pero que Birsa y sus colaboradores [58], demostraron que en lugar de aliviar el dolor, éstos estimulaban la secreción de los nematocistos en los cnidarios. Se puede observar que las concentraciones que mejores resultados presentaron en el disparo de nematocistos fueron: 1.25% de Hidróxido de amonio, 25% de Metanol y 10% de Ácido acético. Para el caso del Ácido acético a una concentración del 10%, a pesar

de que proporcionó la mayor cantidad de proteínas, se optó por emplear la concentración de 5% debido a que muy probablemente el valor de la lectura en 10% está acompañado de contaminantes que podrían haber incrementado su valor y al utilizar una concentración menor la diferencia no es muy notable. Por otra parte, se observaron precipitados al utilizar el agua de mar sobre algunas de las disoluciones de metanol e hidróxido de amonio, lo que evitó la lectura de las concentraciones. Además, en algunas concentraciones de hidróxido de amonio se observó desintegración de tejidos. Los resultados demuestran que el disparo de nematocistos depende del pH y que es mejor utilizar un ácido que una base.

Tabla 5. Disparo de nematocistos utilizando diferentes reactivos para la cuantificación de proteínas utilizando a *B. cavernata*.

Concentración (%)	AcOH	Concentración de proteínas (mg/mL)		MeOH al 100%	
		MeOH/H ₂ O de mar	NH ₄ OH	Concentración MeOH (%)	Concentración de proteínas (mg/mL)
20	SL	1.340	SL	100	0.097
10	3.154	0.260	SL	50	1.521
5	SL	0.026	2.447	25	2.179
2.5	1.457	0.061	SL	12.5	0.201
1.25	SL	0.069	3.466	6.25	SL
0.625	2.655	0.068	1.973	3.12	0.038
0.312	0.512		0.295	1.56	SL
0.156	SL			0.78	0.340
				0.39	SL
				0.19	0.88
				0.10	0.021

*SL= sin lectura; Metanol= MeOH; Acido acético= AcOH; Hidróxido de amonio= NH₄OH

1.2.3 Obtención del extracto crudo

Para las primeras extracciones se utilizó ácido acético al 1.25%, hidróxido de amonio al 5% y metanol al 25% con la finalidad de obtener una mayor cantidad de extracto crudo, los resultados se presentan en la Tabla 6. Se determinó que el reactivo con mejor rendimiento fue el ácido acético, seguido del metanol y al final el hidróxido de amonio. Sin embargo, estos extractos presentan sales, debido a la presencia de agua de mar y por la neutralización del agente químico empleado en el disparo de los nematocistos. Por lo anterior, se llevó a cabo la desalación empleando técnicas cromatográficas para realizar un estudio comparativo.

Tabla 6. Rendimientos de los extractos crudos liofilizados de AcOH (Ácido acético), MeOH (Metanol) y NH₄OH (Hidróxido de amonio).

Extracto	Rendimiento (mg)
MeOH al 25%	380.41
AcOH 1.25 %	1307.00
NH ₄ OH 5%	153.00

1.2.4 Evaluación de la actividad neurotóxica *in vivo* sobre *O. quadrata*

Una vez generados los extractos crudos de cada reactivo (Metanol al 25%, Ácido acético al 1.25% e Hidróxido de amonio al 5%) estos fueron sometidos a bioensayos rápidos de actividad neurotóxica en el que se inyectaron 100 µL (4 mg/mL); obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 7. Estos resultados demuestran que la duración y el efecto fue mayor empleando una disolución de Ácido acético al 1.25%, sin embargo, éste llevó a la muerte del cangrejo fantasma y al realizarse la disección, se observó que los músculos presentan una textura gelatinosa debido probablemente a la presencia de citolisinas. En cuanto a los extractos de metanol e hidróxido de amonio después de cierto tiempo, el cangrejo logró recuperarse.

Tabla 7. Evaluación de la actividad neurotóxica sobre cangrejo fantasma de los extractos generados.

Extracto	Tiempo transcurrido	Actividad
MeOH al 25%	30 min	Parálisis, movimiento involuntario, espuma en la boca, descoordinación, cambio de tonalidad blanca, quelípedos bajos, mostró recuperación.
AcOH al 1.25%	2 horas	Parálisis, movimiento involuntario, quelípedos bajos, espuma en la boca, cambio de tonalidad blanca y finalmente muerte.
NH ₄ OH al 5%	20 min	Parálisis, movimiento involuntario, espuma en la boca, descoordinación, cambio de tonalidad blanca, quelípedos bajos, mostró recuperación.

*MeOH= Metanol; AcOH=Acido acético; NH₄OH= Hidróxido de amonio.

1.2.5 Perfil cromatográfico de los extractos crudos por CLAR

Los perfiles cromatográficos obtenidos de los extractos crudos del análisis de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) fase reversa C18 se

presentan en la Figura 15, en donde se puede observar la separación de los compuestos de acuerdo con su polaridad. Cabe destacar la presencia de moléculas polares que salen con el frente de elución. Además, se observa diferencias significativas entre los perfiles y el área bajo la curva (concentración) de los tres reactivos inductores del disparo (metanol, hidróxido de amonio y metanol). Lo anterior, podría explicar la diferencia de la evaluación en la actividad sobre el cangrejo fantasma.

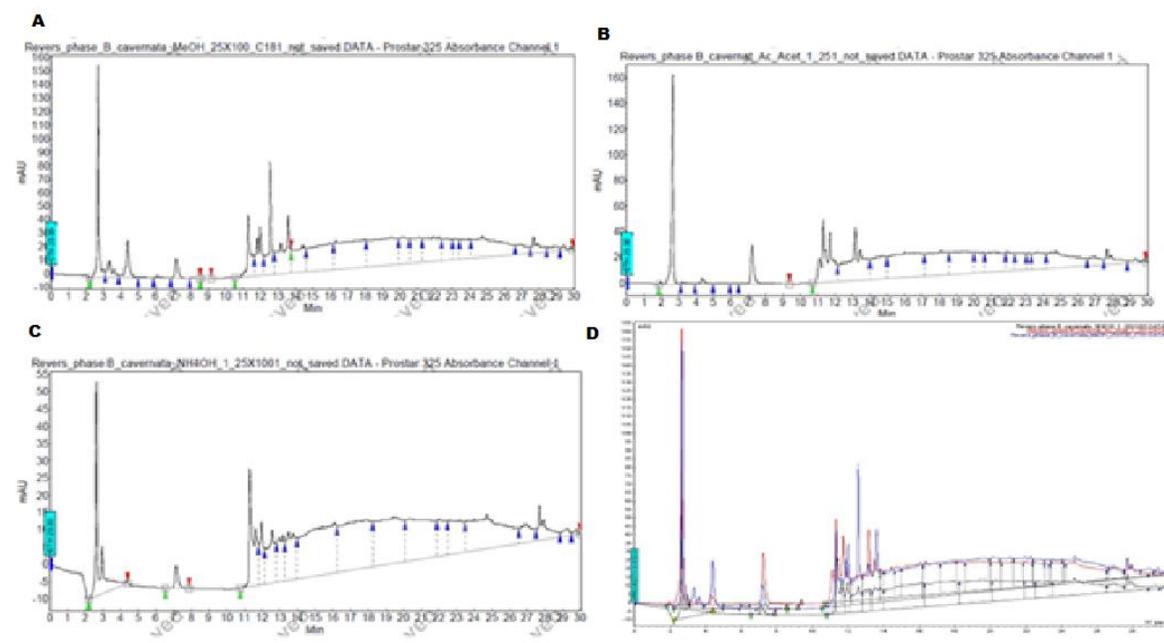


Figura 15. Cromatogramas en fase reversa por C18-U de los extractos generados de *B. cavernata*. (A) Perfil del extracto de ácido acético; (B) Perfil de extracto de metanol; (C) Perfil de hidróxido de amonio. (D) Comparación de perfiles para todos los extractos. Detección a 215 nm (UV, enlace peptídico). 20 μ L (4 mg/mL) del extracto crudo.

1.2.6 Perfil de los extractos crudos mediante Cromatografía de Gel Permeable (CGP) para determinar la distribución de pesos moleculares

Calibración de la columna Yarra SEC-2000.

Para el análisis de la distribución de pesos moleculares mediante cromatografía en gel permeable (CGP), fue necesaria la calibración de la columna Yarra utilizando estándares de peso molecular conocido. Los resultados de las inyecciones se

presentan en la Figura 16. Adicionalmente, se muestra la regresión lineal de la curva estándar generada y los datos estadísticos obtenidos.

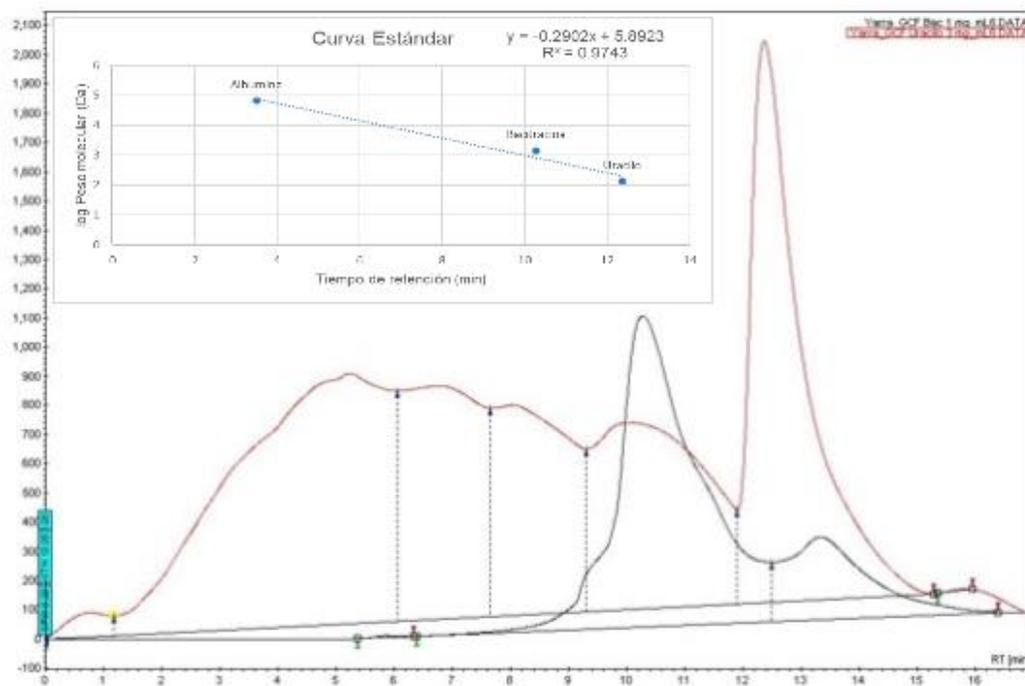


Figura 16. Cromatograma y curva estándar para la determinación de los pesos moleculares de los extractos, utilizando bacitracina (negro, 1.422 kDa), albúmina y uracilo (rojo, 0.132 kDa).

Una vez calibrada la columna, se realizó el análisis de los extractos generados, los cuales se presentan en la Figura 17. Los perfiles por cromatografía en gel permeable revelan que la distribución de pesos moleculares en los tres extractos es similar (3-5 kDa); por lo que se pueden esperar citolisinas del grupo 1 y neurotoxinas; sólo el extracto de metanol resulto con una señal de pesos moleculares bajos, muy parecidos al uracilo. Más aún, la actividad biológica revela que todos los extractos fueron activos, siendo el extracto de ácido acético el de mayor rendimiento, pero con el efecto indeseable de letalidad.

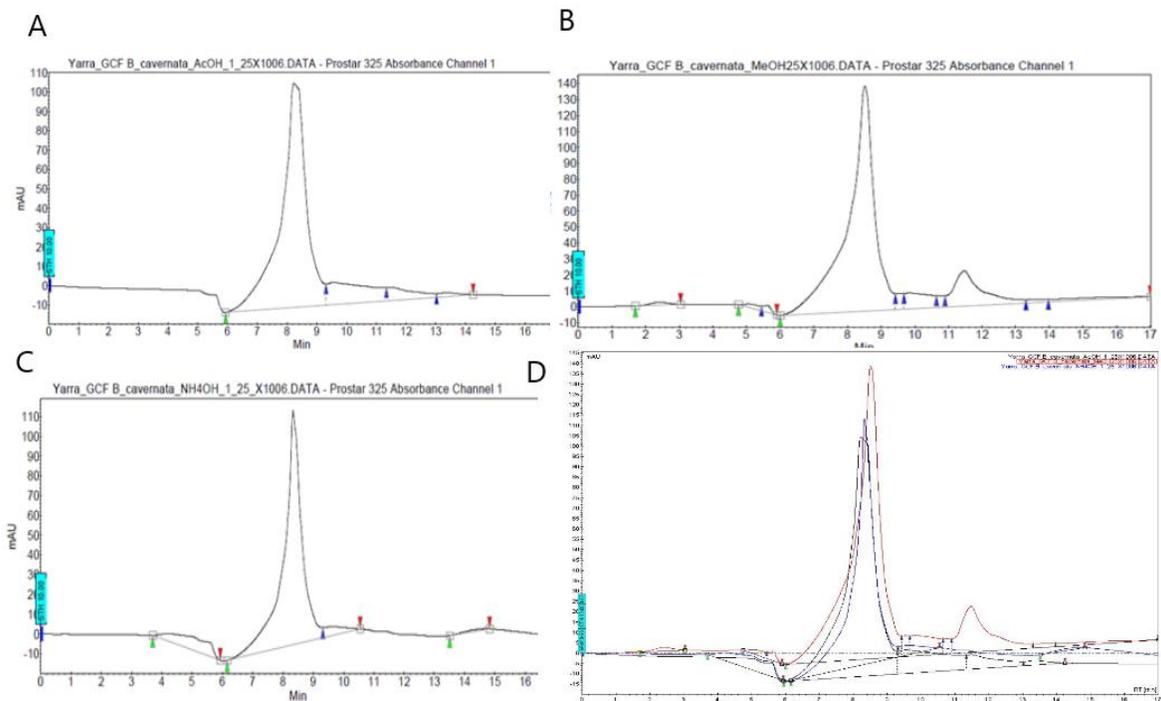


Figura 17. Cromatogramas de los extractos para *B. cavernata* por gel permeable. (A) Perfil para Ácido acético (3.21 kDa). (B) Perfil para metanol al 25% (2.65 kDa). (C) Perfil para hidróxido de amonio (2.98 kDa). (D) Comparación de todos los extractos sobrepuestos.

1.3 Conclusiones

Se colectó e identificó a la anémona *B. cavernata* de la costa de Yucatán.

La extracción selectiva en ácido acético 1.25% de los tentáculos de *B. cavernata* fue la que mejor rendimiento obtuvo, además de ser el extracto que mejor actividad presentó, seguida del Metanol al 25%.

Las condiciones probadas en *B. cavernata* permitieron obtener un extracto activo, sin embargo, el extracto presenta una gran cantidad de sales.

Capítulo 2. *Anthopleura texaensis*

Después de realizar el estudio retrospectivo en *B. cavernata*, se procedió a utilizar las condiciones óptimas en el organismo objetivo de este proyecto: *Anthopleura texaensis*. La metodología empleada para este capítulo se presenta en la Figura 18.

2.1 Metodología

Con el propósito de hacer más comprensible el desarrollo metodológico de este proyecto de investigación se muestra en la Figura 18 el diagrama de la parte experimental.

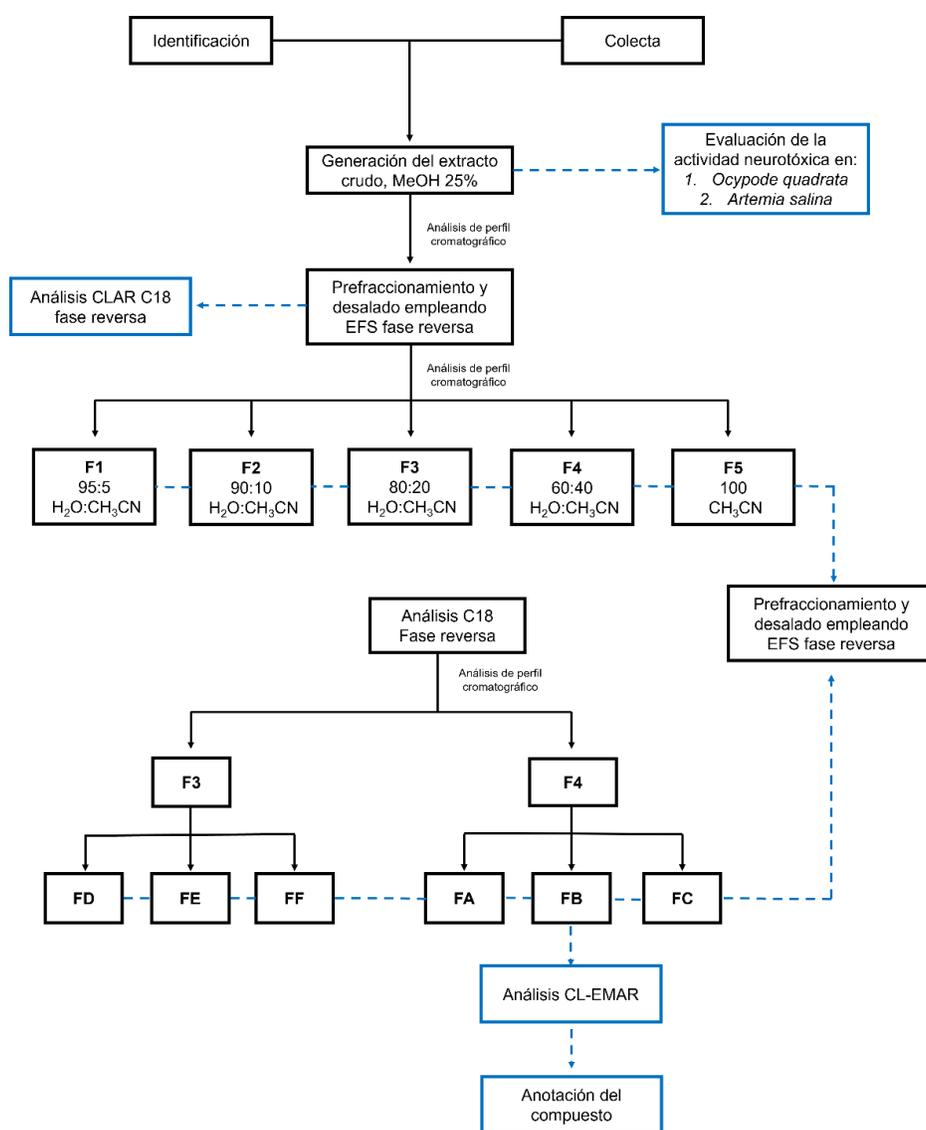


Figura 18. Diagrama de la metodología empleada para *A. texaensis*.

2.1.1 Área de colecta

Se realizó la inspección de rocas en la costa de Chabihau, Yucatán ($21^{\circ}21'28.8''\text{N}$, $89^{\circ}06'41.2''\text{W}$) en donde se encontraron colonias de anémonas, el área de colecta se muestra en la Figura 19.



Figura 19. Área de colecta en la costa de Chabihau, Yucatán.

2.1.2 Identificación y colecta

La identificación se realizó mediante la observación macroscópica de los caracteres (dimensiones, coloración, forma, etc.) descritos para *A. texaensis*. Los organismos fueron removidos de sus sustratos mediante el uso de cincel y martillo [Figura 20], para posteriormente trasladarse a la unidad de Química en Sisal, Yucatán. Para este estudio se colectaron 280 anémonas las cuales fueron trasvasadas a una pecera con aireación y cristales de mentol para su relajación.



Figura 20. Extracción y colecta de *A. texaensis* utilizando cincel y martillo.

2.1.3 Generación del extracto crudo de *Anthopleura texaensis*

La generación del extracto crudo se realizó mediante el disparo de nematocistos de los tentáculos de 280 anémonas previamente sedadas. Cada anémona se colocó en 15 mL de la disolución de metanol al 25% realizando movimientos circulares durante 1 min. Se utilizaron 10 anémonas por cada 15 mL de la disolución de metanol al 25%, estas disoluciones fueron trasvasadas a tubos Falcon de 25 mL. Después, se centrifugaron (equipo Universal 320) a 5000 rpm durante 8 min. Se separó el sobrenadante para colocarlo en un matraz bola de 500 mL y eliminar el disolvente orgánico mediante el uso de un sistema de rotaevaporación (Büchi; Modelo Rotavapor RE-III). Finalmente, esta última disolución se colocó en tubos Falcon de 50 mL para su liofilización (Equipo LabConco, Freezone 2.5, -40 °C y 0.200 mBar), separación biodirigida y análisis del perfil cromatográfico.

2.1.4 Evaluación de la actividad neurotóxica *in vivo* sobre *O. quadrata* y *A. salina* del extracto crudo

Para realizar los ensayos de neurotoxicidad en el cangrejo fantasma (*O. quadrata*) del extracto crudo se utilizó la misma metodología descrita para *B. cavernata*.

(Capítulo 1, sección 1.2.4). Se implementó un ensayo de neurotoxicidad utilizando como modelo a *Artemia salina* [59], a fin de minimizar la cantidad de muestra requerida. Estudios previos han utilizado este ensayo para observar el comportamiento del organismo a los segundos de su administración, resaltando la utilización de cantidades pequeñas de la sustancia de interés. Este comportamiento incluye descoordinación, parálisis, reducción de la movilidad y hasta la muerte.

2.1.5 Modelos empleados para la separación biodirigida

Se obtuvieron 200 mL de nauplios de *Artemia salina* del laboratorio de Alimento vivo de la Unidad de la UNAM en Sisal, con flujo de aireación (2-3 burbujas por segundo) a una temperatura de 23-25 °C a las 24 y 48 horas. Posteriormente, se colocó una luz por fuera del recipiente de los organismos con el fin de tomar alícuotas con artemias funcionales. Se tomaron 8 alícuotas con una micropipeta de los organismos para pasarlos a un matraz de 50 mL con agua de mar. De la disolución anterior, se tomaron 100 µL conteniendo 10-12 artemias, las cuales se colocaron para cada pozo en una placa de ELISA. Consecutivamente, las artemias se observaron durante 30 segundos mediante un microscopio estereoscópico para evaluar el comportamiento (moviendo y orientación), a continuación, se aplicó cada fracción para evaluar el efecto durante el mismo tiempo (30 segundos).

- Muestras

Se pesaron 10 mg del extracto crudo y se disolvieron en 1 mL de agua desionizada.

- Administración

Se colocaron 50 µL del extracto o fracción a evaluar por cada pozo de la placa utilizada.

2.1.6 Prefraccionamiento y desalado mediante Cromatografía de Extracción en Fase Sólida de fase reversa (EFS-FR)

En general, los extractos de organismos marinos contienen una gran cantidad de sales y en nuestro caso, se incrementaron cuando se neutralizan los extractos crudos generados con ácido acético o hidróxido de amonio. En este sentido, fue necesario desalar los extractos crudos empleando Cromatografía de Extracción en

Fase Sólida de fase reversa (EFS-FR) y lavar los cartuchos con suficiente agua (5 mL de H₂O tres veces por cartucho) para eliminar las sales, mientras que el emplear un gradiente (agua:acetonitrilo) ayuda al prefraccionamiento del extracto crudo.

Para el proceso, se utilizaron tres cartuchos de extracción en fase sólida C18-T de fase reversa previamente acondicionados con 5 mL de metanol y luego 5 mL de agua (Strata C18-T, 1 g fase/6 mL; 55 µm, 140 Å, Phenomenex Inc.). Consecutivamente, se colocaron 5 mL del extracto crudo (600 mg/5 mL por cartucho, 4 g), después se lavó con 5 mL de agua tres veces, y se eluyeron diferentes sistemas 95:5, 90:10, 80:20, 60:40 de agua:acetonitrilo y 100% de acetonitrilo, colectando cada sistema por separado. Posteriormente, se eliminó el acetonitrilo al vacío mediante el uso de un sistema de rotaevaporación (Büchi; Modelo Rotavapor RE-III), para finalmente colocar la disolución en tubos Falcon de 50 mL, someterlos a congelación y llevarlos a sequedad mediante liofilización para determinar el rendimiento.

2.1.7 Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de fase reversa C18 del extracto crudo

Para determinar la complejidad del extracto crudo generado, así como el prefraccionamiento realizado con Cromatografía de Extracción en Fase Sólida de fase reversa (EFS-FR), se procedió a generar el perfil cromatográfico en Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) empleando el sistema Polaris 211 (Capítulo 1, sección 1.1.9). En este sentido, se usó una columna LUNA Omega 5 µm PS C18 (250 x 4.6 mm, 100 Å; Phenomenex, Inc; USA) y un detector de UV a 215 nm. Para el análisis se utilizó agua (A) y acetonitrilo (B), empleando el correspondiente sistema para su elución. Comenzando con un gradiente de 100% de A, luego de 100-85% A en 15 minutos, de 85-65% de A durante 20 minutos, de 65-50% de A durante 15 minutos, para posteriormente, en un tiempo de 20 minutos pasar a 100% B. Se inyectaron 20 µL del extracto crudo o fracción con un flujo de 1.0 mL/min con un tiempo de análisis de 30 min. (Método: Pulpo_Analítico_1_Manual_UV325.METH-Fase reversa).

2.1.8 Separación de la fracción activa del estudio Extracción en fase sólida fase reversa (EFS-FR) mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) semipreparativo

Una vez realizado el análisis de las fracciones activas por CLAR-FR y CLAR-CGP, se seleccionó el extracto a separar por CLAR semipreparativo en función de la actividad, simplicidad del perfil cromatográfico y rendimiento.

La separación se llevó a cabo en una columna Luna C18 semipreparativa (10 µm, 250 X 10 mm; 100 Å, Phenomenex Inc.), como fase móvil se emplearon agua (fase móvil A) y acetonitrilo (fase móvil B) comenzando con un gradiente de 90:10 (A: B) a un flujo de 2 mL/min, a los 10 min 80:20 (A: B), a los 20 min 60:40 (A: B) y de 25-28 min 100% de B, finalmente de 28-30 min 100% de A, con un tiempo de análisis de 30 min. Se inyectaron 50 µL de una concentración de 0.02 g/mL por fracción. La detección se realizó a 215 nm (Método: Método 2_Atex_Man_2ml_UV_215). Se realizaron 3 análisis empleando el mismo método y en cada uno de ellos se colectaron las mismas fracciones, las cuales se colocaron en un vial ámbar para la evaporación del acetonitrilo, ultracongelándolos a -70° C para su posterior liofilización y determinación de rendimiento. Las muestras generadas en el primer análisis se sometieron a la determinación de la actividad biológica, el segundo análisis se utilizó para evaluar la fracción activa por CLAR-FR y CLAR-CGP, mientras que el tercer análisis se sometió a la determinación de su peso molecular por CL-EMAR.

2.1.9 Análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (CL-EMAR) de la fracción activa

Muestras: la muestra generada de la separación cromatográfica (Atex_MeoH_C18T_60_40) se diluyó con agua grado Cromatografía de Líquidos Espectrometría de Masas (CL-EM) y después se realizaron las correspondientes diluciones para llegar a una concentración de 10 µg/mL. De manera análoga se realizó la preparación de un blanco de disolventes y de la muestra, para así eliminar el ruido de las muestras.

Equipo: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrómetro de Masas (CL-EMAR).

Sistema CLAR Agilent 1260 LC acoplado a un detector de masas 6545 QTOF/HRMS de alta resolución con una fuente ionización por Electrospray de tipo Jet [Figura 21], operado en modo positivo (ESI+) a la fase móvil se le adicionó 0.1% de ácido fórmico a las muestras para generar la ionización de los compuestos.

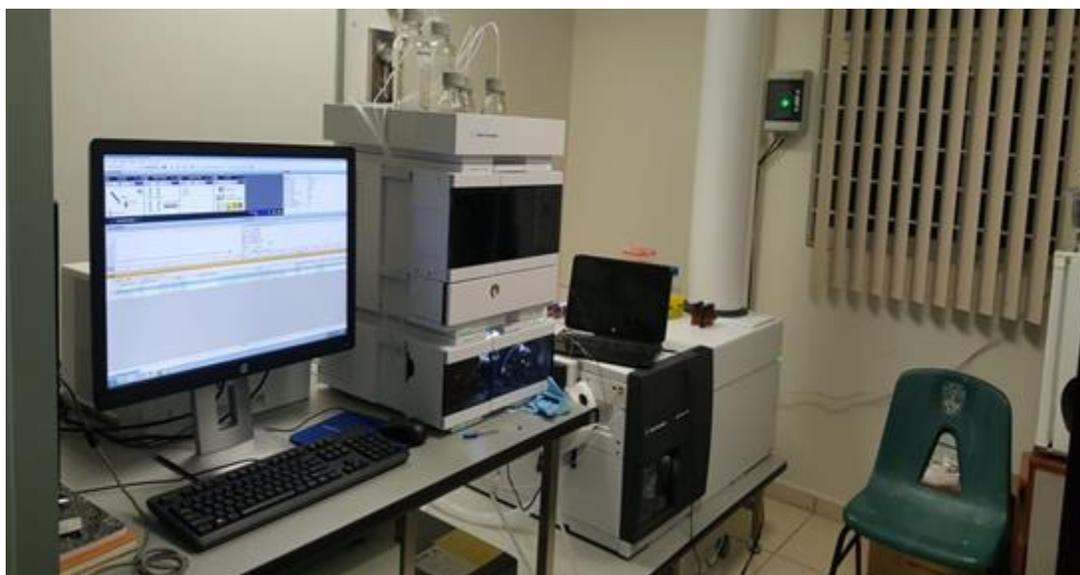


Figura 21. Equipo CL-EMAR Agilent 6545 QTOF (UJAT-C.I.C.T.A.T).

Las condiciones de análisis del detector de masas fueron:

Voltaje del capilar 3500 V, gas para secado: N₂, 10 mL/min a 300 °C, gas de envoltura 10 mL/min 350 °C, voltaje del nozzle 1000 V, fragmentador 70 eV/1614 kcal/mol, Skimmer 65 V. Para sintonizar las masas, se utilizaron los estándares siguientes: 121.0509 m/z (purine, C₅H₅N₄) y 922.0098 m/z (hexakis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine, C₁₈H₁₉O₆N₃P₃F₂₄). El detector de masas fue operado en modo 2 GHz extendido, rango dinámico, y una velocidad de adquisición de 3 segundos (all ions Ms/Ms).

Análisis cromatográfico: Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18 XB (1.7 mm de tamaño de partícula, 100 X 21 mm, Phenomenex Inc, USA).

Como fase móvil se utilizó H₂O:CH₃CN empleando un gradiente de acuerdo con la Tabla 8, con un flujo de 0.2 mL/min durante 30 min de análisis. Después de la separación, la muestra se llevó al detector de masas donde se realizó el análisis.

Tabla 8. Gradiente para la separación cromatográfica de los extractos generados.

	Tiempo (min)	A (%)	B (%)	Flujo (mL/min)	Presión (bar)
1	3.00	100.00	0.00	0.200	1300
2	8.00	85.00	15.00	0.200	1300
3	10.00	50.00	50.00	0.200	1300
4	15.00	0.00	100.00	0.200	1300
5	19.00	0.00	100.00	0.200	1300
6	26.00	100.00	0.00	0.200	1300
7	30.00	100.00	0.00	0.200	1300

2.1.10 Identificación de los compuestos presentes en los extractos

Mediante los estudios de CL-EMAR, se separó la fracción activa, se obtuvieron los pesos moleculares de alta resolución y el tiempo de retención de las señales del extracto activo. Los cuales fueron comparados con la base de datos Met-Lin [Metabolitos naturales, 10000 compuestos, base de datos Agilent implementada en el programa PCLD de MassHunter, Agilent Inc.] para realizar la identificación (o más bien una anotación) de los compuestos presentes.

2.2 Resultados y discusión

Con el propósito de presentar resultados y ser claro en el proceso de separación, cada una de las técnicas utilizadas se han agrupado en secciones diferentes con el objetivo de especificar la importancia de cada una de ellas.

2.2.1 Identificación y colecta

Para la colecta de la anémona *Anthopleura texaensis* se extrajeron 280 ejemplares en las coordenadas de la costa de Chabihau mencionadas anteriormente. Con respecto a la taxonomía de *Anthopleura texaensis*, destaca que los tentáculos son lisos, delgados, totalmente expandidos con puntas afiladas de color transparente, con manchas de color blanco a lo largo de su extensión, disco oral plano, liso, de color verde oliva, con disco pedal desarrollado [Figura 22]. Además de que el sitio en donde se encontraron, se observó la distribución en colonias, algunas se encontraban superficialmente en las rocas, pero la mayoría estaban en las hendeduras profundas (estructuras tipo cueva) ya que les confiere cierta protección a las anémonas. Cabe destacar que la identificación se realizó mediante la comparación de los caracteres macroscópicos descritos por González-Muñoz [55].

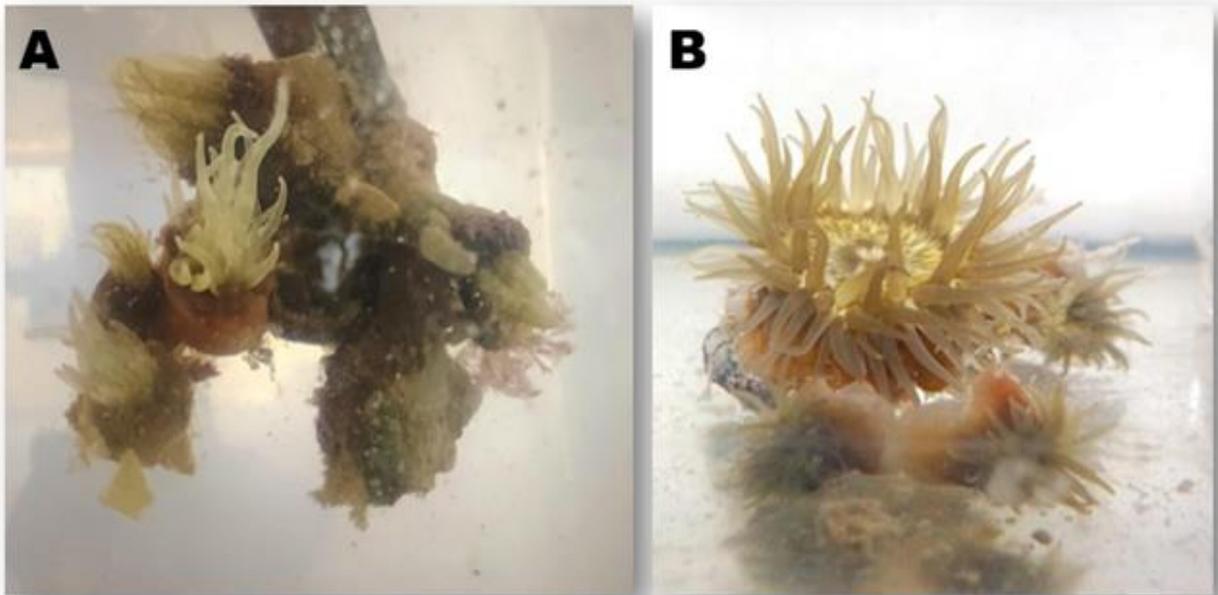


Figura 22. Anémona *Anthopleura texaensis*. A) Racimo de anémonas adheridas a una roca. B) Anémona vista de forma lateral.

2.2.2 Obtención del extracto crudo

En relación con los resultados del estudio retrospectivo en *B. cavernata* se eligió utilizar MeOH al 25% debido a que contiene una mayor concentración de proteínas en el extracto activo. En la Tabla 9 se muestran los pesos de los organismos colectados antes y después de llevarlos a sequedad.

Tabla 9. Rendimiento obtenido de los especímenes utilizados

	Peso (g)
Peso húmedo de una anémona	0.9003
Peso total de anémonas recolectadas	139.00
Peso del extracto crudo liofilizado	4.5672

Con estos resultados se puede observar que a pesar de que se recolectaron un número grande de especímenes (280 ejemplares), la cantidad total una vez llevados a sequedad es mínima, ya que la especie en sí es pequeña (menos de 5 cm y 1 g de peso húmedo), además, se tiene reportado que el rendimiento de productos naturales marinos es de 10% en promedio [59].

2.2.3 Evaluación biológica en *O. quadrata* y *A. salina* del extracto activo

Los nauplios de *Artemia salina* se han utilizado en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos como un método práctico y económico para la determinación de bioactividad de productos naturales. Dentro de las ventajas se encuentra el hecho de que se disponen de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica que conlleva a ensayos reproducibles y rápidos. Para los ensayos de neurotoxicidad y al utilizar extractos de productos naturales, la respuesta biológica basada en la reacción del espécimen da pauta para detectar y aislar los extractos y/o fracciones activas.

Por otro lado, los ensayos de neurotoxicidad en *O. quadrata* [56] han demostrado utilidad para extractos de productos marinos debido a la facilidad de observar el comportamiento del espécimen. Dicho lo anterior y considerando los resultados obtenidos, utilizando *B. cavernata* se procedió a utilizar estos dos modelos (*A. salina* y *O. quadrata*) para la evaluación biológica del extracto de *A. texaensis*.

De acuerdo con la Tabla 10 y comparando el ensayo de neurotoxicidad utilizando al cangrejo fantasma y *A. salina*, se observó que para ambos ensayos se obtuvo un efecto de inmovilidad y sedación e incluso la letalidad para el cangrejo fantasma.

Tabla 10. Comparación en el ensayo de neurotoxicidad para *A. salina* y cangrejo fantasma para la evaluación del extracto crudo.

Organismos	Concentración [mg/ml]	Cantidad [μL]	Actividad
Nauplios de <i>A. salina</i> a las 24 h	10	50	Se observa descoordinación. Algunas se aglomeran en un solo lugar y otras se paralizan.
Nauplios de <i>A. salina</i> a las 48 h	10	50	Hay descoordinación con movimientos más lentos.
Cangrejo fantasma	4	100	Se observan movimientos involuntarios en los pereiópodos, se bajaron las quelas. Al minuto tres se paralizó completamente el organismo y a los veinte minutos murió.

2.2.4 Prefraccionamiento y desalado mediante Cromatografía de Extracción en Fase Sólida de fase reversa (EFS-FR)

Posterior a la extracción metanólica, se procedió a la desalación y prefraccionamiento con el propósito de separar el extracto crudo y obtener fracciones con diferente polaridad. Los resultados obtenidos que se observan en la Tabla 11 muestran un rendimiento menor al 0.5% para cada fracción, siendo las fracciones **F3** y **F4** las de mayor rendimiento, en donde se encuentran metabolitos polares y de mediana polaridad, correspondientes a nuestras moléculas de interés, mientras la fracción **F5** obtuvo el rendimiento más bajo.

Los bajos rendimientos obtenidos para cada fracción se deben principalmente a la gran cantidad de sales que tiene el extracto.

Tabla 11. Rendimientos para el prefraccionamiento mediante Extracción en Fase solida (EFS C18-T) Metanol al 25%.

Fracción	Sistema (H ₂ O:CH ₃ CN)	Cantidad (mg)	Rendimiento (%)
F1	95:5	3.3	0.072
F2	90:10	3.4	0.074
F3	80:20	5.1	0.112
F4	60:40	4.6	0.101
F5	100*	2.9	0.063

*100% de CH₃CN: Acetonitrilo

Una vez obtenidas las fracciones a partir de la EFS-FR para el extracto de *A. texaensis*, se realizaron evaluaciones de la actividad neurotóxica en *A. salina* para cada una de ellas, debido a que las cantidades obtenidas para cada fracción fueron muy pequeñas. De acuerdo a la Tabla 12, las fracciones que mostraron actividad fueron **F3** y **F4**, destacando la descoordinación y movimientos lentos de los nauplios.

Tabla 12. Evaluación de la actividad neurotóxica sobre *A. salina* de las fracciones obtenidas.

Fracciones	Sistema (H ₂ O:CH ₃ CN)	Actividad en nauplios 24 h	Actividad en nauplios 48 h	Cantidad (mg)	Concentración (mg/mL)
F1	95:5	Sin efecto	Sin efecto	1.5	15
F2	90:10	Sin efecto	Sin efecto	1.5	15
F3	80:20	Descoordinación, movimientos lentos	Descoordinación, movimientos lentos	1.5	15
F4	60:40	Parálisis, descoordinación y movimientos lentos	Descoordinación y movimientos lentos	1.5	15
F5	100*	Sin efecto	Sin efecto	1.5	15

*100% de CH₃CN: Acetonitrilo

2.2.5 Análisis de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de fase reversa C18 del extracto crudo de *A. texaensis*

Para conocer y evaluar la complejidad química de la muestra del extracto crudo, se utilizó una columna de C18 para analizarse CLAR fase reversa, obteniéndose así un cromatograma mostrado en la Figura 23, en el que se observan varias señales después del minuto catorce correspondientes a moléculas medianamente polares, además de que se observa una pequeña señal aislada en el minuto nueve correspondiente a moléculas de mayor polaridad.

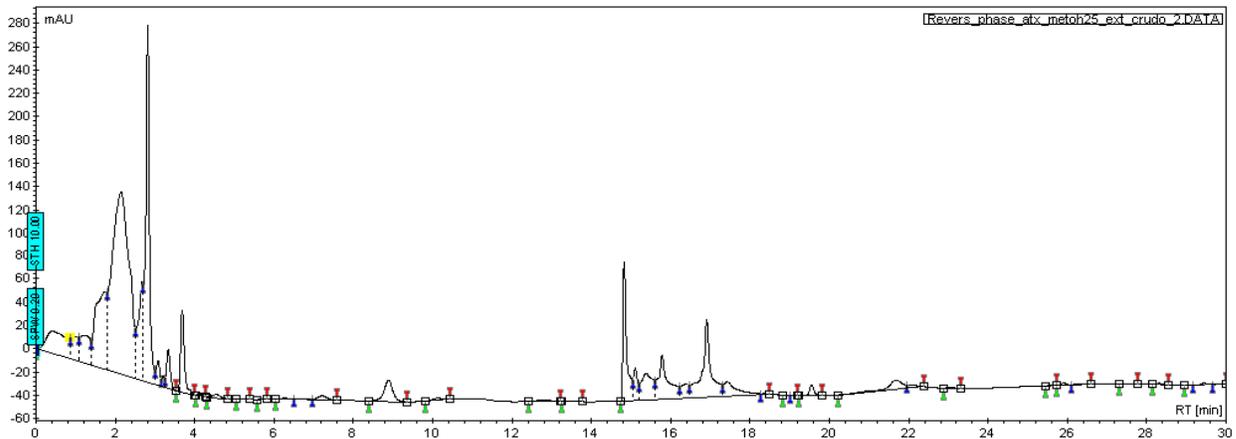


Figura 23. Cromatograma del extracto crudo para *A. texaensis* empleando detección UV a 215nm. HPLC Varian 211, LUNA C18. Método en gradiente de H₂O:CH₃CN, flujo 1 mL/min.

2.2.6 Separación de la fracción activa del estudio EFS-FR mediante CLAR semipreparativo en fase reversa

Posterior a la realización de los perfiles cromatográficos tanto de complejidad química como por peso molecular del extracto, se procedió a estudiar las fracciones **F3** y **F4** que resultaron ser activas. Los cromatogramas para cada fracción se obtuvieron de la separación llevada a cabo con una columna Omega C18 semipreparativa mostrados en las Figuras 24 y 25.

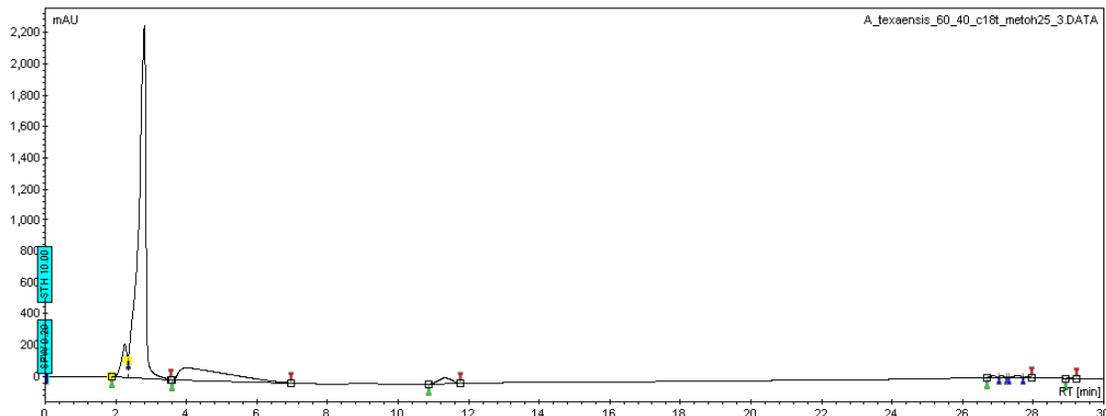


Figura 24. Cromatograma de la fracción **F4** analizada por CLAR-C18, HPLC Varian 211, OMEGA(C18). Gradiente de H₂O:CH₃CN. Flujo 1 mL/min en 30 min; 20 µL; detección 215 nm.

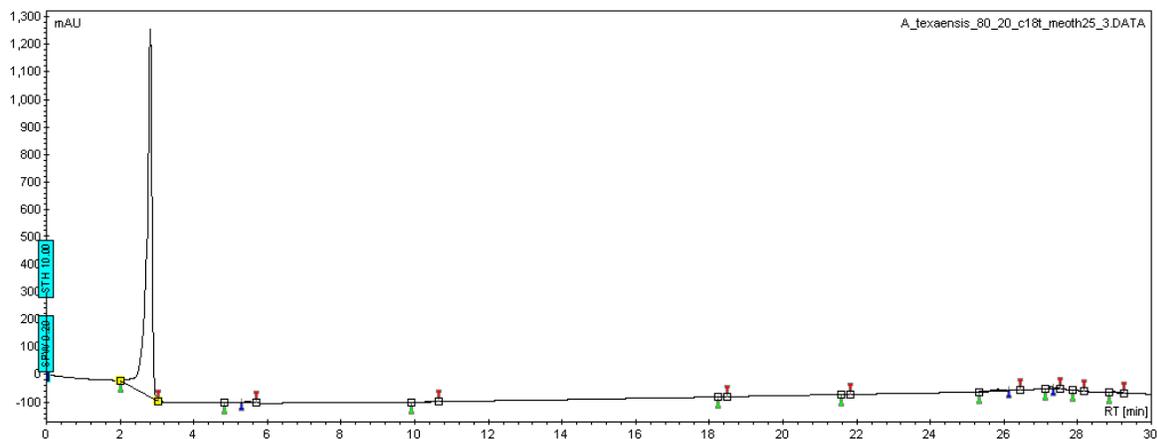


Figura 25. Cromatograma de la fracción **F3** analizada por CLAR-C18, HPLC Varian 211, OMEGA(C18). Gradiente de H₂O:CH₃CN, flujo 1 mL/min durante 30 min; 20 µL; detección 215 nm.

Para el cromatograma de la fracción **F4** representado por la Figura 24, se puede observar un pico grande en los primeros cuatro minutos que corresponde a moléculas muy polares que no fueron retenidas por la columna. Sin embargo, también se observan dos pequeñas señales, una en el minuto cuatro y otra entre el minuto once y doce. Por su parte, para el cromatograma de la fracción **F3** representado por la Figura 25, solo se observa el pico grande en los primeros tres minutos de las moléculas no retenidas por la columna, esto podría deberse a la pequeña cantidad que se administró (1.5 mg/100 µL).

Siguiendo con la separación biodirigida, se aislaron las fracciones **F3** y **F4** con una columna Luna 10u (C18). Obteniéndose tres fracciones para cada una; **FA** (tr=9-11 min), **FB** (tr=13-15 min), **FC** (tr=20-23 min) para la fracción **F4** y **FD** (tr=5-6 min), **FE** (tr=6-8 min), **FF** (tr=20-22 min) para la fracción **F3**, representados en la Figura 26, Figura 27 y Tabla 13.

Se colectaron esas fracciones debido a que se observan aisladas esas señales, aunque para la separación de la fracción **F3** entre el minuto cinco y ocho, las señales se encontraban muy juntas, por lo que fueron colectadas en diferentes tubos para así obtener la fracción **FD** y **FE**.

Cada fracción fue evaluada utilizando el ensayo de neurotoxicidad en *A. salina* obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 13.

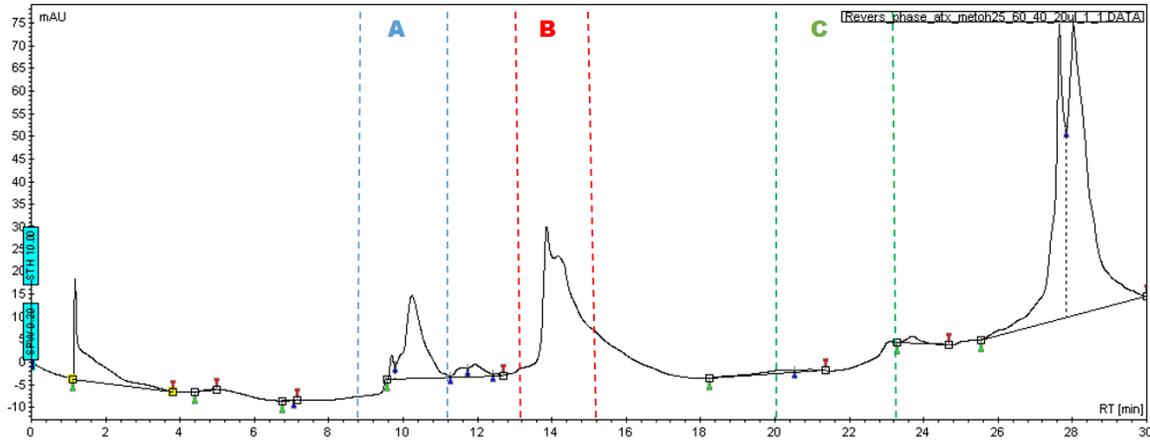


Figura 26. Cromatograma de la fracción **F4**, analizada por CLAR C18 HPLC Varian 211, Gradiente $H_2O:CH_3CN$, flujo 2 mL/min en 30 min; 50 μ L; detección UV 215 nm.

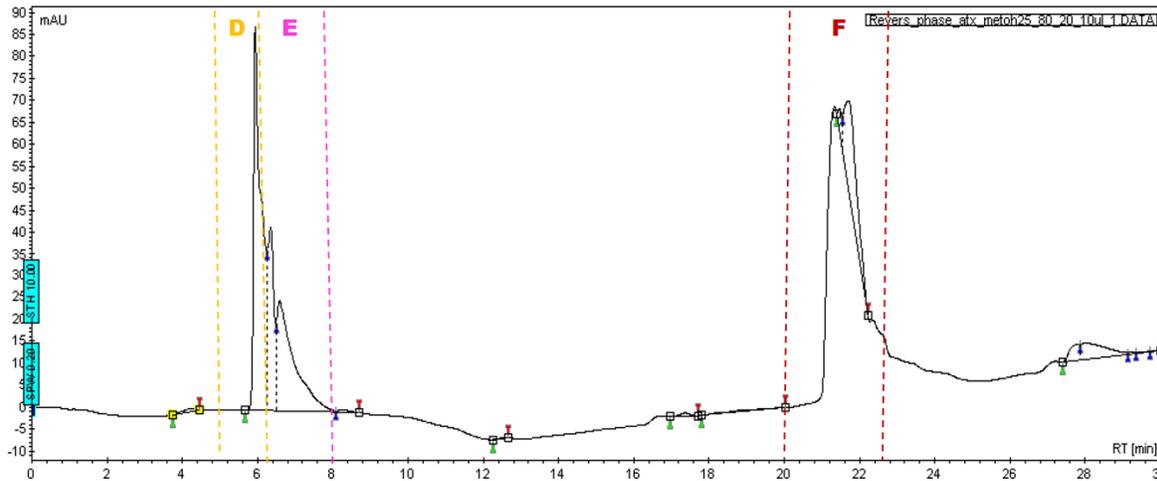


Figura 27. Cromatograma de la fracción **F3**, analizada por CLAR C18 HPLC Varian 211, Gradiente $H_2O:CH_3CN$, flujo 2 mL/min en 30 min; 50 μ L; detección UV 215 nm.

Tabla 13. Actividad neurotóxica de las fracciones **F4** y **F3** sobre *A. salina* de 24 h.

Fracción	Actividad en nauplios de 24 h	Cantidad (mg)	Concentración (mg/mL)
FA	Descoordinación y movimientos lentos	1	10
FB	Parálisis, descoordinación y movimientos lentos	1	10
FC	Sin actividad	1	10
FD	Descoordinación y movimientos lentos	1	10
FE	Sin actividad	1	10
FF	Sin actividad	1	10

2.2.7 Análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (CL-EMAR) de la fracción activa

En la Figura 28 se presenta el cromatograma obtenido de la fracción analizada **FA**. Los resultados obtenidos de la separación semipreparativa realizados en columna C18 revelaron que la señal activa es la que tiene un tiempo de retención de 9.5 a 11 min. Desafortunadamente, la fracción aislada solo alcanzo para realizarle la evaluación biológica, sin embargo, la fracción resultante de la separación por EFS en cartucho (C18T **F4**), se sometió al análisis por CL-EMAR, y en el cromatograma aparece la señal correspondiente a este tiempo de retención (10.4-10.7 min). El espectro de masas obtenido se presenta en la Figura 29, se observa que las moléculas que se presentan en este extracto son de bajo peso molecular, lo cual fue inesperado, dado que toda la separación biodirigida fue realizada en la búsqueda de polipéptidos.

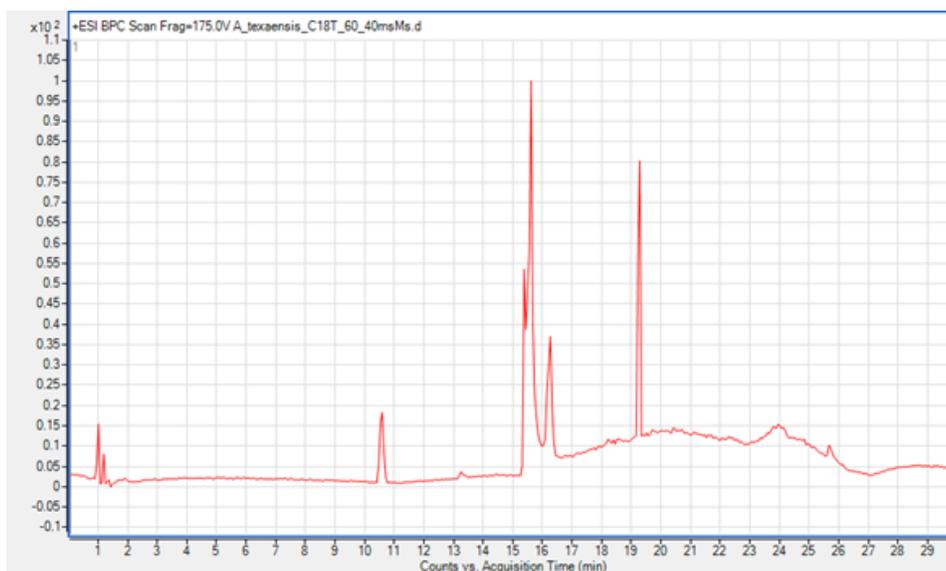


Figura 28. Perfil cromatográfico del extracto de *A. texaensis* MeOH C18T **F4**. El análisis se realizó en un sistema Agilent LC-MS QTOF 6545 de alta resolución

La identidad de los compuestos se logró determinar mediante la búsqueda de las masas de alta resolución en la base datos MetLin. Los resultados obtenidos revelan la presencia de dos compuestos: la 5'-Deoxi-5'-(metilsulfinil)adenosina, y un compuesto no identificado (FM: $C_5H_2N_4O$, MM: 134.0229 uma).

La identidad de este último compuesto se trató de realizar mediante la búsqueda sistemática en la base de datos internacional SCIfinder (CAS, American Chemical Society), donde se encontraron 534 compuestos con esa fórmula molecular, sin embargo, ninguno de los compuestos fue aislado de algún organismo marino [62]. Por lo anterior, no es factible indicar la estructura de este último compuesto. La 5'-Deoxi-5'-(metilsulfinil)adenosina, es un compuesto que ya fue identificado en un hongo marino [59] y en un estudio metabolómico en una ostra [60]. Se ha demostrado que la metiltioadenosina tiene actividad como aglutinante de plaquetas [61].

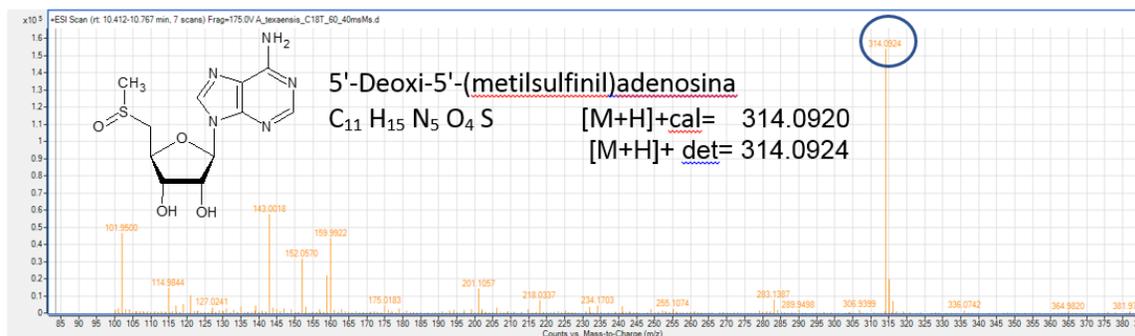


Figura 29. Identificación de la 5'-Deoxi-5'-(metilsulfinil)adenosina mediante CL-EMAR. En la figura se muestra el espectro de masas de alta resolución obtenido del tiempo de retención del cromatograma, donde el ion de la masa monoisotópica correspondiente al compuesto señalado.

2.3 Conclusiones

Se identificaron y colectaron 280 ejemplares de la anémona *A. texaensis* encontradas en la costa de Chabihau, Yucatan

Se obtuvo un rendimiento menor al 5% de peso seco utilizando como reactivo el metanol al 25% para el disparo de nematocistos.

Se realizó una comparación de bioensayos rápidos de neurotoxicidad utilizando al cangrejo *O. quadrata* y *A. salina* para las evaluaciones de los analitos, resultando conveniente emplear a *A. salina* en las fracciones obtenidas.

Al realizar el prefraccionamiento mediante EFS C18-T se obtuvieron rendimientos menores al 0.5% para las cinco fracciones, siendo las fracciones F3 y F4 las de mayor rendimiento, así como las que presentaron actividad neurotóxica sobre *A. salina*.

Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de las fracciones F3 y F4 aislando las señales que correspondían a moléculas de mediana polaridad y realizando su separación de cada una de ellas, obteniéndose seis fracciones que al ser evaluadas mediante el ensayo de neurotoxicidad en *A. salina*, la fracción FA y FD presentan actividad.

Mediante un análisis por CL-EMAR se obtuvo un perfil cromatográfico en el que se observaron moléculas de bajo peso molecular, que a través de la base de datos MetLin se obtuvo el compuesto 5'-Deoxi-5'-(metilsulfinil) adenosina.

Bibliografía

- [1] A. Martins, H. Vieira, H. Gaspar, S. Santos, Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success, *Mar. Drugs*. 12 (2014) 1066–1101. <https://doi.org/10.3390/md12021066>.
- [2] W.H. Gerwick, B.S. Moore, Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology, *Chem. Biol.* 19 (2012) 85–98. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2011.12.014>.
- [3] J.W. Blunt, B.R. Copp, R.A. Keyzers, M.H.G. Munro, M.R. Prinsep, Marine natural products, *Nat. Prod. Rep.* 31 (2014) 160–258. <https://doi.org/10.1039/c3np70117d>.
- [4] M. Mcintosh, L.J. Cruz, M.W. Hunkapiller, \$ W R Gray, B.M. Olivera, Isolation and Structure of a Peptide Toxin from the Marine Snail *Conus magus*, *Arch. Biochem. Biophys.* 218 (1982) 329–334.
- [5] I. González-Gallego Rivera, *Trabectedina (Yondelis): Un agente antitumoral aislado de la ascidia Ecteinascidia turbinata*, Tesis de Licenciatura. Universitat D´Alacant, 2016.
- [6] M. Morokutti-Kurz, P. Graf, A. Grassauer, E. Prieschl-Grassauer, SARS-CoV-2 in-vitro neutralization assay reveals inhibition of virus entry by iota-carrageenan, *BioRxiv*. (2020) 2020.07.28.224733. <https://doi.org/10.1101/2020.07.28.224733>.
- [7] K.M. White, R. Rosales, S. Yildiz, T. Kehrer, L. Miorin, E. Moreno, S. Jangra, M.B. Uccellini, R. Rathnasinghe, L. Coughlan, C. Martinez-Romero, J. Batra, A. Rojc, M. Bouhaddou, J.M. Fabius, K. Obernier, M. DeJozes, M.J. Guillén, A. Losada, P. Avilés, M. Schotsaert, T. Zwaka, M. Vignuzzi, K.M. Shokat, N.J. Krogan, A. García-Sastre, Plitidepsin has potent preclinical efficacy against SARS-CoV-2 by targeting the host protein eEF1A, *Science* (80-.). 371 (2021) 926–931. <https://doi.org/10.1126/science.abf4058>.
- [8] J.F. Lazcano Pérez, Z. Salazar Campos, H. González-Márquez, Anémonas, corales y medusas: los cnidarios y su importancia médica, *Rev. Digit. Univ.* 21 (2020). <https://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2020.v21n2.a4>.
- [9] A. Cuya, E. Escobar, Estudio bioquímico del veneno de la anémona de mar *Phymactis papillosa* (Actiniidae), *Rev. Peru. Biol.* 24 (2017) 303–309. <https://doi.org/10.15381/rpb.v24i3.13901>.
- [10] S.N. Chávez Villela, *Aislamiento, purificación y caracterización de la actividad citolítica de los compuestos presentes en la anémona Lebrunia danae del Caribe mexicano*, UNAM, 2017.
- [11] B. Frazão, V. Vasconcelos, A. Antunes, Sea anemone (cnidaria, anthozoa, actiniaria) toxins: An overview, *Mar. Drugs*. 10 (2012) 1812–1851. <https://doi.org/10.3390/md10081812>.
- [12] J. Sánchez-Rodríguez, K. Cruz-Vazquez, Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860), Springer, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0059-3>.

-
- [13] E.J. Tarcha, C.M. Olsen, P. Probst, D. Peckham, E.J. Muñoz-Elías, J.G. Kruger, S.P. Iadonato, Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial, *PLoS One*. 12 (2017) e0180762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180762>.
- [14] E. Álvarez Brohórques, Obtención de moléculas con posible actividad biológica presentes en la anémona *Bunodosoma cavernata* de la zona costera de Yucatán, UNAM, 2016.
- [15] B.J.G. A., Brusca Richard, *Invertebrados*, 2a. ed., McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid, 2005.
- [16] M.N. Arai, *A Functional Biology of Scyphozoa*, Springer Netherlands, 1996. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1497-1>.
- [17] I. D'ambra, C. Lauritano, marine drugs A Review of Toxins from Cnidaria, (n.d.). <https://doi.org/10.3390/md18100507>.
- [18] R. MARISCAL, NEMATOCYSTS., in: NEMATOCYSTS., 1974: pp. 129–178.
- [19] E. Voultziadou Eleni, Therapeutic properties and uses of marine invertebrates in the ancient Greek world and early Byzantium, *J. Ethnopharmacol.* 130 (2010) 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.041>.
- [20] C.A. González, R.A. Bertrand, *Olindias sambaquiensis* on the Atlantic coast of Argentina, *Acta Toxicol. Argent.* 25 (2017) 52–57.
- [21] C. Hamlet, W. Strychalski, L. Miller, Fluid dynamics of ballistic strategies in nematocyst firing, *Fluids*. 5 (2020) 20. <https://doi.org/10.3390/fluids5010020>.
- [22] P. Tardent, The cnidarian cnidocyte, a hightech cellular weaponry, *BioEssays*. 17 (1995) 351–362. <https://doi.org/10.1002/BIES.950170411>.
- [23] A.A. Yanagihara, R. V. Shohet, Cubozoan Venom-Induced Cardiovascular Collapse Is Caused by Hyperkalemia and Prevented by Zinc Gluconate in Mice, *PLoS One*. 7 (2012) e51368. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0051368>.
- [24] J. Rivera Ortega, *Actividad antimicrobiana del mucus de cnidarios simbióticos*, Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, 2018.
- [25] Y.M. Garrido Quiroz, *Estudio de las toxinas de la anémona de mar *Anthothoe chilensis**, Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2005.
- [26] S. Özbek, P.G. Balasubramanian, T.W. Holstein, Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge, *Toxicon*. 54 (2009) 1038–1045. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.006>.
- [27] B. Galliot, V. Schmid, Cnidarians as a model system for understanding evolution and regeneration, *Int. J. Dev. Biol.* 46 (2002) 39–48. <https://doi.org/10.1387/ijdb.11902686>.
- [28] A. Grabau, *A textbook of geology*, D.C. Heath & Co., Boston ;New York, 1920.
- [29] X.M. Fu, M.Q. Zhang, C.L. Shao, G.Q. Li, H. Bai, G.L. Dai, Q.W. Chen, W. Kong, X.J. Fu, C.Y. Wang, Chinese marine materia medica resources: Status and potential, *Mar. Drugs*. 14

-
- (2016). <https://doi.org/10.3390/md14030046>.
- [30] G. Blunden, Biologically active compounds from marine organisms, *Phyther. Res.* 15 (2001) 89–94. <https://doi.org/10.1002/PTR.982>.
- [31] W.Y. Lu, H.J. Li, Q.Y. Li, Y.C. Wu, Application of marine natural products in drug research, *Bioorganic Med. Chem.* 35 (2021) 116058. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116058>.
- [32] W.A. Catterall, From Ionic Currents to Molecular Mechanisms, *Neuron.* 26 (2000) 13–25. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81133-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81133-2).
- [33] M.W. Parker, S.C. Feil, Pore-forming protein toxins: from structure to function, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 88 (2005) 91–142. <https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2004.01.009>.
- [34] E.C.T. Landucci, Q.C. Dias, F.A. Marangoni, A. Vilca-Quispe, J.A. Valeriano-Zapana, F.D. Torres-Huaco, D. Martins-de-Souza, S. Marangoni, L.A. Ponce-Soto, Purification and inflammatory edema induced by two PLA2 (Anch TX-I and Anch TX-II) from sea anemone *Anthothoe chilensis* (Actiniaria: Sagartiidae), *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 161 (2012) 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.11.003>.
- [35] F. Retuerto, E. Arbaiza, Y. Quiroz-Garrido, R. Estrada, J. Zavala, Actividad biológica del veneno de *Anthothoe chilensis* (Lesson, 1830) (Actiniaria: Sagartiidae, *Rev. Peru. Biol.* 14 (2007) 277–282. <https://doi.org/10.15381/rpb.v14i2.1800>.
- [36] T.A. Zykova, M.M. Monastyrnaya, O. V. Apalikova, T. V. Shwets, E.P. Kozlovskaya, Low-molecular cytolytic toxins and trypsin inhibitors from sea anemone *radianthus macrodactylus*: Isolation and partial characterization, *Russ. J. Bioorganic Chem.* 24 (1998) 446–453.
- [37] D.S. Uput, In vivo effects of cnidarian toxins and venoms, (2009). <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.001>.
- [38] D.A. Hessinger, H.M. Lenhoff, Assay and properties of the hemolysis activity of pure venom from the nematocysts of the acontia of the sea anemone *Aiptasia pallida*, *Arch. Biochem. Biophys.* 159 (1973) 629–638. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90500-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90500-6).
- [39] B. AW, A. LS, K. K, Comparison fo metridiolysin from the sea anemone with thiol-activated cytolytins from bacteria, *Toxicon.* 17 (1979). [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(79\)90257-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(79)90257-5).
- [40] C.C. Liu, C.M. Walsh, J.D.E. Young, Perforin: structure and function, *Immunol. Today.* 16 (1995) 194–201.
- [41] N.H. Putnam, M. Srivastava, U. Hellsten, B. Dirks, J. Chapman, A. Salamov, A. Terry, H. Shapiro, E. Lindquist, V. V. Kapitonov, J. Jurka, G. Genikhovich, I. V. Grigoriev, S.M. Lucas, R.E. Steele, J.R. Finnerty, U. Technau, M.Q. Martindale, D.S. Rokhsar, Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization, *Science* (80-.). 317 (2007) 86–94. <https://doi.org/10.1126/science.1139158>.
- [42] E. Salceda, O. López, A.J. Zaharenko, A. Garateix, E. Soto, The sea anemone *Bunodosoma caissarum* toxin BcIII modulates the sodium current kinetics of rat dorsal root ganglia neurons and is displaced in a voltage-dependent manner, *Peptides.* 31 (2010) 412–418. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2009.12.005>.
- [43] G. Costas, Cnidarios: medusas, corales, anémonas, hydras... | *Ciencia y Biología*, (n.d.).
-

<https://cienciaybiologia.com/filo-cnidaria/> (accessed February 24, 2022).

- [44] D.A. Six, E.A. Dennis, The expanding superfamily of phospholipase A 2 enzymes: classification and characterization, (n.d.). www.elsevier.com/locate/bba (accessed September 1, 2021).
- [45] K.A. Talvinen, T.J. Nevalainen, Cloning of a novel phospholipase A2 from the cnidarian *Adamsia cariniopados*, *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 132 (2002) 571–578.
- [46] S. Diochot, E. Loret, T. Bruhn, L. Béress, M. Lazdunski, APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels, *Mol. Pharmacol.* 64 (2003) 59–69. <https://doi.org/10.1124/mol.64.1.59>.
- [47] P. Liu, S. Jo, B.P. Bean, Modulation of neuronal sodium channels by the sea anemone peptide BDS-I, *J. Neurophysiol.* 107 (2012) 3155–3167. <https://doi.org/10.1152/jn.00785.2011>.
- [48] T.R. Norton, S. Shibata, M. Kashiwagi, J. Bentley, Isolation and characterization of the cardiotoxic polypeptide anthopleurin-a from the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*, *J. Pharm. Sci.* 65 (1976) 1368–1374. <https://doi.org/10.1002/jps.2600650927>.
- [49] L. Cariello, A. de Santis, F. Fiore, R. Piccoli, A. Spagnuolo, L. Zanetti, A. Parente, Calitoxin, a Neurotoxic Peptide from the Sea Anemone *Calliactis parasitica*: Amino Acid Sequence and Electrophysiological Properties, *Biochemistry.* 28 (1989) 2484–2489. <https://doi.org/10.1021/bi00432a020>.
- [50] J. de Freitas, M.I. Sawaya, Anomalies in sea-urchin egg development induced by a novel purine isolated from the sea-anemone *Bunodosoma caissarum*, *Toxicon.* 24 (1986) 751–755. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90099-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90099-1).
- [51] B. Madio, G.F. King, E.A.B. Undheim, Sea anemone toxins: A structural overview, *Mar. Drugs.* 17 (2019) 1–26. <https://doi.org/10.3390/md17060325>.
- [52] C.W.P. Donald Voet, Judith G. Voet, *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*, 2nd Edition, 2016. <https://www.abebooks.com/Fundamentals-Biochemistry-Life-Molecular-Level-2nd/1346355380/bd> (accessed March 4, 2022).
- [53] K. Sridhar, B.S. Inbaraj, B.H. Chen, Recent developments on production, purification and biological activity of marine peptides, *Food Res. Int.* 147 (2021) 110468. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110468>.
- [54] J. Luis, C. Repullo, J.M. Blanco, E.M. Cañete, 3. Cromatografía de filtración en gel, (n.d.).
- [55] R.E. González Muñoz, *Análisis taxonómico de las especies de anémonas arrecifales (Cnidaria: anthozoa) del Golfo de México y Mar Caribe mexicano, caracterización y análisis morfológico y genético de las variaciones intraespecíficas entre los morfotipos de la especie *Phymanthus**, UNAM, 2014.
- [56] D.J. Puch Pech, *Obtención de compuestos bioactivos presentes en las glándulas salibales posteriores del pulpo Octopus maya*, Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
- [57] R.E. González Muñoz, *Análisis taxonómico de las especies de anémonas arrecifales*,

-
- [58] Birsa LM, Verity PG, Lee RF. Evaluation of the effects of various chemicals on discharge of and pain caused by jellyfish nematocysts. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2010; 151(4):426-30
- [59] W. van Losenoord, J. Krause, S. Parker-Nance, R. Krause, S. Stoychev, C.L. Frost, Purification and biochemical characterisation of a putative sodium channel agonist secreted from the South African Knobbly sea anemone *Bunodosoma capense*, *Toxicon*. 168 (2019) 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.222>.
- [60] J.W. Blunt, B.R. Copp, W.P. Hu, M.H.G. Munro, P.T. Northcote, M.R. Prinsep, *Marine natural products*, Royal Society of Chemistry, 2009. <https://doi.org/10.1039/b805113p>.
- [61] Z. Liu, Y. Zhang, Z. Zhou, Y. Zong, Y. Zheng, C. Liu, N. Kong, Q. Gao, L. Wang, L. Song, Metabolomic and transcriptomic profiling reveals the alteration of energy metabolism in oyster larvae during initial shell formation and under experimental ocean acidification, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62963-3>.
- [62] J.W. Blunt, *Dictionary of Marine Natural Products*, Taylor & Francis, 2008. <https://doi.org/10.1021/jm8000218>.
- [63] Lehninger, A. L., Nelson, D. L. (. L., Cox, M. M., Cuchillo, C. M., & Suau León, P. (2006). *Principios de bioquímica*. Omega. Barcelona