



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO NOCICEPTIVO E INFLAMATORIO DE LOS  
EXTRACTOS ACUOSOS Y FRACCIONES OBTENIDAS A PARTIR DE LOS  
CNIDARIOS *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla  
helianthus***

**TESIS**

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**IQF. EDWIN JHONATAN GACHUZ VAZQUEZ**

**DIRIGIDA POR:**

**DR. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO**

**AGOSTO, 2020  
QUERÉTARO  
MÉXICO**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DEL EFECTO NOCICEPTIVO E INFLAMATORIO DE LOS  
EXTRACTOS ACUOSOS Y FRACCIONES OBTENIDAS A PARTIR DE LOS  
CNIDARIOS *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla  
helianthus*

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

IQF. EDWIN JHONATAN GACHUZ VAZQUEZ

DIRIGIDA POR:

DR. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

SINODALES

Dr. José Alejandro García Arredondo  
Presidente

\_\_\_\_\_

Dr. Mamadou Moustapha Bah  
Secretario

\_\_\_\_\_

Dra. Juana Isela Rojas Molina  
Vocal

\_\_\_\_\_

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera  
Suplente

\_\_\_\_\_

M. en C. José Héctor Zavala Gómez  
Suplente

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora Facultad de Ciencias Químicas

\_\_\_\_\_  
Dra. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro  
Agosto, 2020

**Dedico esta tesis a mi familia, quienes siempre han estado presentes para brindarme su apoyo incondicional.**

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado a través de la beca otorgada con número CVU: 926616 para realizar mis estudios de maestría.

Al Programa de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Querétaro, por permitirme cursar mis estudios.

A mis sinodales por sus aportaciones y sugerencias para la realización del presente proyecto.

Al Dr. Alejandro por permitirme trabajar en su línea de investigación y asesorarme.

Al Dr. Fernando Lazcano Pérez, por el apoyo con las muestras de cnidarios para la realización del trabajo.

A mis maestros, por permitirme aprender de ellos.

A mi madre y hermanos, por su apoyo incondicional.

A mis amigos, quienes me hacen pasar momentos agradables.

A mis compañeros de generación, por los momentos agradables que pasamos durante nuestra estancia.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 1. ÍNDICE GENERAL

1.	ÍNDICE GENERAL	3
2.	ÍNDICE DE FIGURAS	5
3.	RESUMEN	6
4.	SUMMARY	1
1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	4
2.1.1	Filo Cnidaria	4
2.1.2	Células que proveen de veneno a los cnidarios	6
2.1.3	Sistema de liberación del veneno	6
2.1.4	Composición del veneno	7
2.1.5	Intoxicación en humanos por cnidarios	8
2.1.6	Efectos nociceptivo e inflamatorio causado por cnidarios	8
2.1.7	Cuidados prehospitalarios en la intoxicación por cnidarios	9
2.1.8	Antecedentes de las especies involucradas en este proyecto	10
2.1.8.1	Carybdea marsupialis	10
2.1.8.2	Palythoa caribaeorum	10
2.1.8.3	Stichodactyla helianthus	11
2.2	Nocicepción	12
2.2.1	Clasificación del dolor	12
2.2.1.1	Dolor nociceptivo	13
2.2.1.2	Dolor neuropático	13
2.2.1.3	Dolor mixto	13
2.2.2	Receptores sensoriales cutáneos	13
2.2.3	Mecanismos de nocicepción	14
2.2.4	Modelos experimentales de dolor	15
2.3	Proceso de inflamación	17
2.3.1	Modelo de inflamación inducido por carragenina	18
3	JUSTIFICACIÓN	20
4	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22

5	HIPÓTESIS	22
6	OBJETIVOS	23
6.1	Objetivo general	23
6.2	Objetivos específicos	23
7	METODOLOGÍA	24
7.1	Animales de laboratorio	24
7.2	Manejo de residuos biológicos y de sustancias químicas	24
7.3	Colecta y preparación de los extractos acuosos	24
7.4	Ensayos biológicos	25
7.4.1	Efecto nociceptivo	25
7.4.2	Evaluación de la actividad edematogénica (inflamatoria)	26
7.4.3	Desnaturalización del contenido proteínico de los extractos	26
7.5	Ultrafiltración de los extractos	26
7.6	Análisis de las fracciones mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
7.7	Análisis estadístico	27
8	RESULTADOS	28
8.1	Recolección y preparación de los extractos acuosos	28
8.2	Ensayos biológicos	28
8.2.1	Efecto nociceptivo	28
8.2.2	Evaluación de la actividad edematogénica (inflamatoria)	31
8.3	Ultrafiltración	36
8.4	Perfil electroforético por SDS-PAGE de los extractos y fracciones	37
8.5	Evaluación de la actividad nociceptiva y edematogénica de las fracciones de los extractos.	42
9	DISCUSIÓN	44
10	CONCLUSIONES	50
11	REFERENCIAS	51

## 2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Topología de los principales linajes del filo cnidaria.	5
Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida típico de una especie de la clase Anthozoa	5
Figura 3. Visión general del sistema de liberación del veneno de los cnidarios	7
Figura 4. <i>Caribdea marsupialis</i>	10
Figura 5. <i>Palythoa caribaeorum</i> .	11
Figura 6. <i>Stichodactyla helianthus</i>	12
Figura 7. Mecanismo general de nocicepción	15
Figura 8. Prueba de formalina para evaluar la actividad nociceptiva de los extractos crudos.	29
Figura 9. Prueba de formalina para evaluar la actividad nociceptiva de los extractos desnaturalizados	30
Figura 10. Evaluación de la actividad inflamatoria mediante el ensayo de edema plantar de los extractos acuosos crudos.	31
Figura 11. Evaluación de la actividad inflamatoria mediante el ensayo de edema plantar del extracto crudo y desnaturalizado de la especie <i>Stichodactyla helianthus</i>	32
Figura 12. Evaluación de la actividad inflamatoria mediante el ensayo de edema plantar del extracto crudo, desnaturalizado del extracto acuoso de la zona de la campana de la especie <i>Carybdea marsupialis</i> .	33
Figura 13. Evaluación de la actividad inflamatoria mediante el ensayo de edema plantar del extracto crudo y desnaturalizados de la especie <i>Carybdea marsupialis</i>	34
Figura 14. Evaluación de la actividad inflamatoria mediante el ensayo de edema plantar del extracto crudo y desnaturalizados de la especie <i>Palythoa caribaeorum</i>	35
Figura 15. Gel SDS-PAGE del extracto y fracciones de alto y bajo peso molecular de <i>P. caribaeorum</i> y <i>S. helianthus</i> .	37
Figura 16. Gel SDS-PAGE del extracto y fracciones de alto y bajo peso molecular de <i>P. caribaeorum</i> y <i>S. helianthus</i> en condiciones reductoras.	39
Figura 17. Gel SDS-PAGE del extracto completo de <i>C. marsupialis</i> y fracciones de alto y bajo peso molecular de la zona de la campana	40
Figura 18. Prueba de formalina para evaluar la actividad nociceptiva del extracto crudo, desnaturalizado y fracciones de alto y bajo peso molecular de la zona de la campana de la especie <i>Carybdea marsupialis</i> .	41
Figura 19. Evaluación de la actividad inflamatoria	42

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDADES DE ESTUDIANTE**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentada en el documento.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

### 3. RESUMEN

El filo Cnidaria está integrado por especies acuáticas que habitan principalmente en ecosistemas marinos. Estas especies se caracterizan por la presencia de células urticantes, las cuales contienen un organelo especializado en el almacenamiento y la inyección de veneno. Al contacto, algunos cnidarios producen toxicidad en humanos que involucra dolor e inflamación con diferentes grados de severidad que dependen de la variabilidad en la composición del veneno que produce cada especie, a la capacidad de los nematocistos para penetrar la piel e inyectar el veneno, a la cantidad de veneno inyectado, o incluso a la susceptibilidad de la víctima. Hasta el momento, se han realizado pocos estudios con modelos biológicos para determinar la capacidad de generar dolor e inflamación de la mayoría de las especies de cnidarios. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar por vez primera el efecto nociceptivo e inflamatorio de los extractos acuosos y fracciones de los cnidarios *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla helianthus*. Se observó que los tres extractos crudos inducen nocicepción; siendo el extracto de *P. caribaeorum* el que mostró un efecto mayor durante la fase neurogénica del dolor en comparación con los otros extractos. Durante la fase inflamatoria el extracto de *P. caribaeorum* fue el único que presentó actividad nociceptiva. La evaluación del efecto inflamatorio mediante el ensayo de edema plantar mostró que los tres extractos produjeron inflamación, siendo el extracto de *P. caribaeorum* el que indujo mayor efecto. Al evaluar el efecto nociceptivo e inflamatorio de fracciones de alto y bajo peso molecular de *C. marsupialis* se observó que ninguna fracción genera dolor, no obstante, la fracción de alto peso molecular si generó actividad edematogénica. Los resultados obtenidos sugieren que la actividad nociceptiva de los extractos de los cnidarios evaluados en este estudio varía de una especie a otra y que dicha actividad es independiente de la respuesta inflamatoria que generan.

**Palabras clave:** *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum*, *Stichodactyla helianthus*, efecto nociceptivo, efecto inflamatorio.

#### 4. SUMMARY

The phylum Cnidaria includes aquatic species that inhabit mainly marine ecosystems. These species are characterized by the presence of stinging cells, which contains an organelle specialized in the storage and injection of venom. After contact, some cnidarians produce toxicity in humans involving pain and inflammation with varying degrees of severity that depends on the variability in the composition of the venom produced by each species, to the capacity of nematocysts to penetrate the skin and inject the venom, to the quantity of venom injected, and even the susceptibility of the victim. Until now, few studies have been conducted with biological models to determine the capacity to generate pain and inflammation of most cnidarian species. The present work aimed to evaluate for the first time the nociceptive and inflammatory effect of aqueous extracts and fractions of the cnidarians *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* and *Stichodactyla helianthus*. It was observed that the three raw extracts induce nociception; *P. caribaeorum* extract was shown a greater effect during the neurogenic phase of pain compared to the other extracts. During the inflammatory phase, *P. caribaeorum* extract was the only one with nociceptive activity. The assessment of the inflammatory effect by the plantar edema trial showed that the three extracts produced inflammation, the extract of *P. caribaeorum* induced the greatest effect. When evaluating the nociceptive and inflammatory effect of high and low molecular weight fractions of *C. marsupialis*, no fraction is observed to cause pain, however, the high molecular weight fraction if it generated edematogenic activity. The results suggested that the nociceptive activity of the extracts of the cnidarians evaluated in this study varies from one species to another and that such activity is independent of the inflammatory response it generates.

**Keywords:** *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum*, *Stichodactyla helianthus*, nociceptive effect, inflammatory effect

## 1 INTRODUCCIÓN

El filo Cnidaria, con más de 13,000 especies reconocidas hasta el momento, está integrado por organismos acuáticos que habitan mayormente en ecosistemas marinos. Las especies pertenecientes a este filo se caracterizan por la presencia de células urticantes, conocidas como cnidocitos, que están distribuidas principalmente en los tentáculos (Beckmann y Özbek, 2012). Cada cnidocito contiene un organelo capsular denominado nematocisto, el cual está cargado de veneno y se encarga de inyectarlo en las presas o depredadores mediante un filamento urticante (Özbek et al., 2009). Se ha documentado ampliamente que los venenos de los cnidarios están constituidos por una variedad de compuestos de naturaleza proteínica, entre los que se encuentran diversas citolisinas, neurotoxinas y algunas enzimas (Frazão et al., 2012; Jouiaei et al., 2015; Steele et al., 2011; Turk y Kem, 2009).

Se estima que alrededor de 100 especies de cnidarios producen toxicidad en humanos por contacto, y solo algunas de ellas son letales (Greene, 2017; Kayal et al., 2018). Generalmente las lesiones y síntomas que se generan varían según la especie. Inicialmente se generan erupciones papulares en la piel con sensación de ardor que pueden ser vesiculadas y evolucionar a pustulización, hemorragia y descamación. Estas lesiones pueden ir acompañadas de dolor local que va desde moderado a intenso. Los efectos sistémicos que se han observado son: debilidad, náuseas, cefaleas, dolor muscular, espasmos y alteraciones cardiacas. Sin embargo, no existe un tratamiento adecuado para estas intoxicaciones. Los remedios inespecíficos consisten en la inactivación de los nematocistos mediante la aplicación de vinagre o ácido acético en la lesión, aunque se ha reportado que algunas veces la aplicación de vinagre conduce a la descarga de los nematocistos en picaduras causadas por ciertas especies. Otra recomendación es lavar la zona afectada con agua de mar para evitar una descarga de los nematocistos. Además, también se recomienda el uso de compresas calientes, ya que se cree que esto ayuda en cierto grado a inactivar algunas de las toxinas del veneno y reducir así el grado de intoxicación (Greene, 2017; Tezcan y Gözer, 2015).

La variabilidad en la toxicidad puede deberse a la composición del veneno, a la capacidad de los nematocistos para penetrar la piel e inyectar el veneno o a la susceptibilidad de la víctima. Por ejemplo, se han reportado casos en los que algunas especies que no están catalogadas dentro de las que producen toxicidad en humanos pueden llegar a causar intoxicación por contacto en la piel delgada de niños pequeños y pieles dañadas o sensibles como las axilas y/o genitales (Tezcan y Gözer, 2015).

A pesar de que el dolor es un síntoma característico en los casos de intoxicación provocada por contacto con cnidarios, a la fecha existen pocos estudios acerca de su efecto nociceptivo y se conoce poco sobre los mecanismos de acción involucrados. Por ejemplo, se ha reportado que podría estar implicada la participación de los receptores TRPV1 (Cuyper et al., 2006). También se ha encontrado que la ATP2B1, una ATPasa transportadora de calcio que se encuentra en las membranas celulares periféricas podría ser indispensable en la generación de la toxicidad causada por cubomedusas. Además, se ha observado que la interacción de las toxinas de cubomedusas con el colesterol y la esfingomielina de las membranas celulares podría ser necesaria para desencadenar los síntomas locales de toxicidad (Lau et al., 2019).

Una problemática clara es que pocos estudios se han enfocado en la evaluación de los efectos nociceptivos e inflamatorio en humanos, mientras que el resto de los estudios toxicológicos de cnidarios se han dirigido a la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos y a la purificación de sus toxinas, por lo cual se evidencia la necesidad de generar información acerca de los efectos tóxicos que pueden llegar a generar los cnidarios de toxicidad baja o nula para los humanos.

Considerando lo anterior y tomando en cuenta que el dolor es uno de los principales síntomas tras la intoxicación por contacto con cnidarios, este estudio se enfocó en la evaluación del efecto nociceptivo de los extractos acuosos de tres especies de cnidarios que se encuentran habitualmente en el Caribe mexicano: *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla helianthus*. También se evaluó el efecto inflamatorio en modelos *in vivo* de estos extractos como un indicador de la

capacidad de la generación de las lesiones locales características de los cnidarios. Adicionalmente, se realizó un fraccionamiento de los extractos y se evaluó tanto su actividad biológica, así como su complejidad química con la finalidad de obtener información acerca de la naturaleza química de los compuestos responsables de la actividad biológica. Este es el primer estudio en el que se evalúa el efecto nociceptivo e inflamatorio de los extractos acuosos preparados a partir de los cnidarios: *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla helianthus* utilizando ratas como modelo biológico, constituyendo un primer acercamiento en la generación del conocimiento acerca de la toxicidad de estas especies. La información que se genera a partir de este estudio constituye las bases para el diseño de protocolos de nuevos estudios biodirigidos al aislamiento y purificación de las toxinas responsables de los efectos de nocicepción e inflamación de estos cnidarios.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1.1 Filo Cnidaria

El filo Cnidaria, con más de 13,000 especies reconocidas hasta el momento, está integrado por organismos acuáticos que habitan mayormente en ecosistemas marinos (Beckmann y Özbek, 2012). Los cnidarios son animales con una simetría radial, consiste en dos capas celulares: ectodermo y endodermo. Estos organismos poseen una matriz no celular llamada mesoglea que se encuentra entre las dos capas celulares. Estos animales han sido referenciados como coelenterados, debido a que poseen una única cavidad corporal, es decir su sistema digestivo (enterón) (Turk y Kem, 2009). El filo Cnidaria lo conforman tres clases principales: Anthozoa, Endocnidozoa y Medusozoa. La clase Anthozoa abarca más de la mitad (7,200 de 13,300) de las especies de cnidarios conocidos y consiste en Octocorallia (corales blandos), Hexacorallia (corales, anémonas de mar y zoantidos) y Ceriantharia (anémonas tubulares). La clase Endocnidozoa está integrada por parásitos que incluye alrededor de 2,200 especies de Myxozoa (endoparásitos diminutos de invertebrados y vertebrados con ciclos de vida complejos). Finalmente, el grupo de medusozoos está constituido por las clases: Cubozoa (45 especies de medusas), Hydrozoa (3,600 especies de hidroides, sifonóforos e hidromedusas), Scyphozoa (200 especies de medusas verdaderas) y Staurozoa (50 especies de medusas bentónicas) (Figura 1) (Kayal et al., 2018)

Los cnidarios pueden llegar a presentar dos tipos de ciclos de vida. En la clase Anthozoa, el pólipo es la forma que produce gametos y durante el ciclo pasa por un proceso que incluye fase de embrión, larva y pólipo. La clase Medusozoa generalmente tienen un ciclo de embrión, larva, pólipo y medusa, en el que la medusa es típicamente la forma sexual. La Figura 2 muestra un ciclo de vida típico de Anthozoa (Frazão et al., 2012).

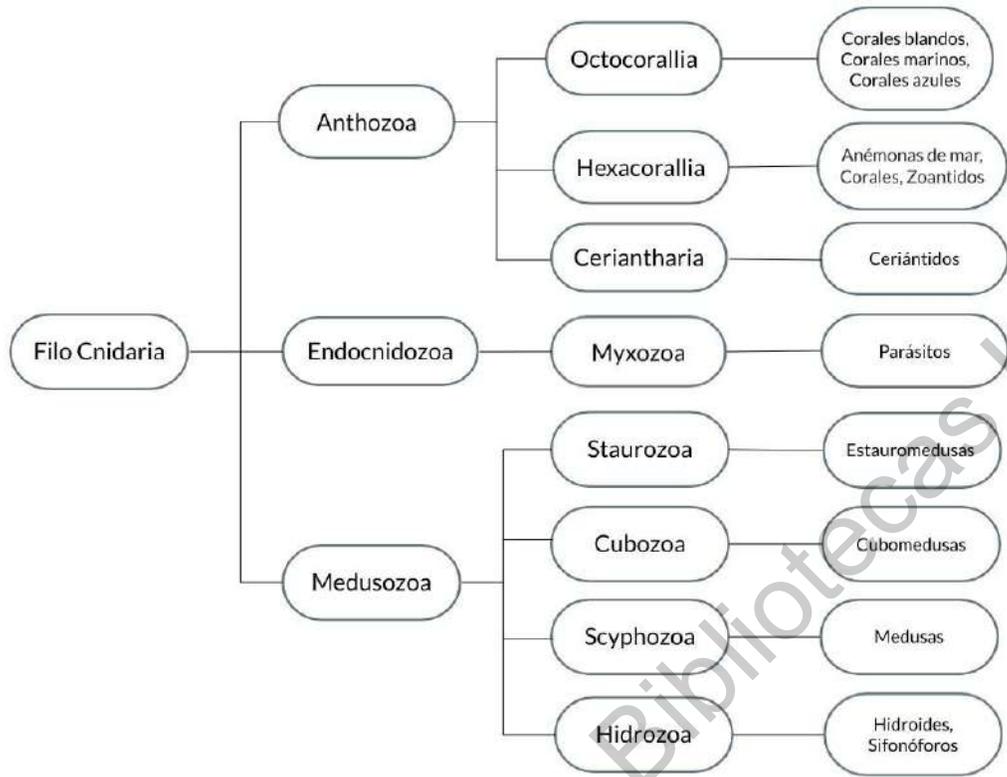


Figura 1. Topología de los principales linajes del filo cnidaria. Modificado de Kayal et al., 2018.

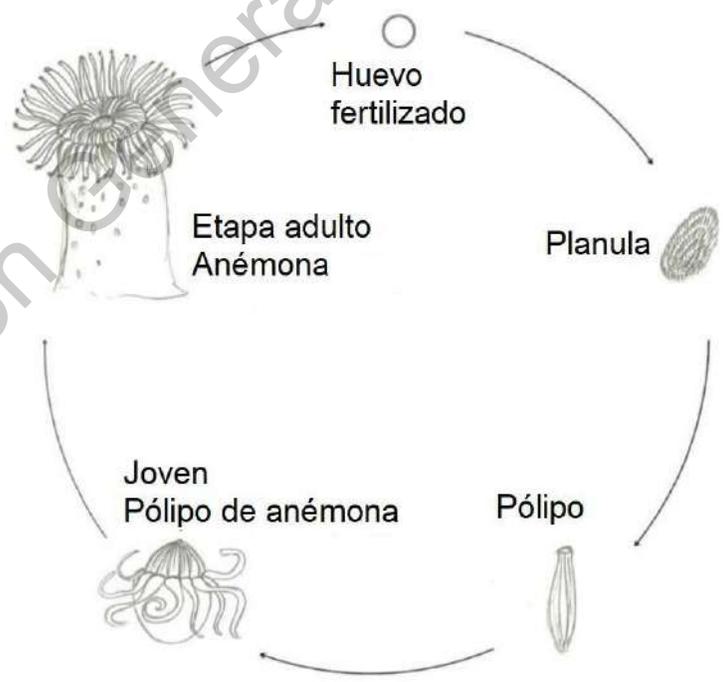


Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida típico de una especie de la clase Anthozoa. Modificado de Frazão et al., 2012.

### **2.1.2 Células que proveen de veneno a los cnidarios**

Los cnidocitos o nematocitos se derivan de células madre denominadas cnidoblastos o nematoblastos. La superficie del cnidocito posee una estructura sensorial, el cnidocil responsable de responder a los estímulos de presa o depredador y desencadenar la descarga del cnidocito. Los cnidocitos están innervados y, por lo tanto, están en comunicación con el resto del organismo cnidario, pero también pueden ser estimulados individualmente para descargar, es decir, son efectores independientes. Los cnidocitos contienen organelos celulares especializados denominados cnidocistos, los cuales se utilizan para capturar presas, generalmente mediante la inyección de un veneno (Jouiaei et al., 2015; Kitatani et al., 2015).

Los cnidocistos se pueden clasificar en tres tipos: nematocistos, espirocistos y pticocistos. Los nematocistos suministran el veneno a través de la piel, mientras que los espirocistos son adhesivos y los pticocistos están involucrados en la protección. Especies de la clase Anthozoa tienen los tres tipos de cnidocistos, mientras que los medusozoos (escifozoos y cubozoos) contienen solo nematocistos. Las funciones biológicas de las toxinas liberadas por los nematocistos incluyen la captura de presas, la digestión, la repulsión de depredadores y la competencia espacial intraespecies (Frazão et al., 2012).

### **2.1.3 Sistema de liberación del veneno**

El mecanismo de descarga de los nematocistos en respuesta a estímulos externos (estímulos mecánicos y químicos) todavía no se entiende completamente. La hipótesis osmótica/tensión propone que la presión osmótica del líquido intracapsular aumenta temporalmente como resultado de la exposición de los cnidocitos a la solución externa y la posterior exocitosis de los cationes de la cápsula. Las diferencias de presión osmótica a través de la pared de la cápsula existen hasta el punto de que la presión intracapsular preexistente supera un valor umbral crítico y desencadena la descarga del cnidocito. El contenido de la cápsula (veneno) se encuentra en la superficie interna del túbulo invertido que, durante la descarga (extensión de la eversión del túbulo), se realiza de manera tal que el exterior está

ahora expuesto e inyectado en la presa (Figura 3). El interior del túbulo permanece contiguo con el interior de la cápsula y el contenido del nematocisto se expulsa hacia abajo del eje del túbulo hueco (Jouiaei et al., 2015).

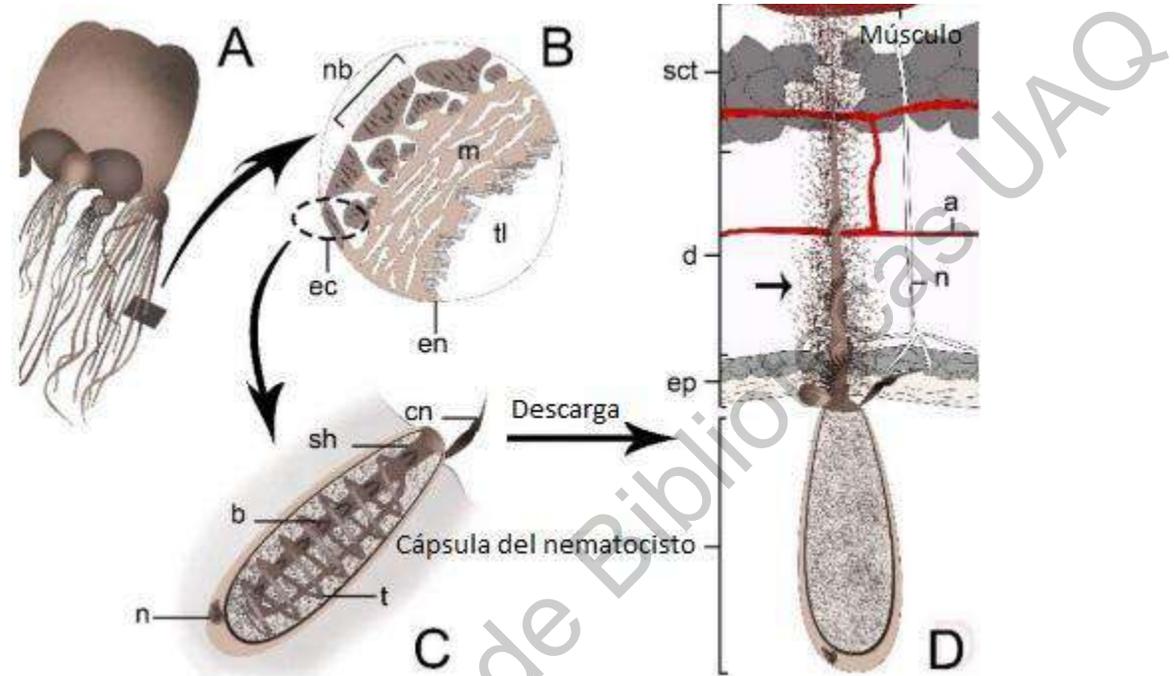


Figura 3. Visión general del sistema de liberación del veneno de los cnidarios. A. Imagen representativa de una medusa; B. Sección transversal de un tentáculo que muestra dos capas de células epiteliales, ectodermo (ec) y endodermo (en), divididas por la mesoglea (m), varios tipos de cnidocitos colocados en baterías de nematocistos (nb) y en las células que recubren el tentáculo, lumen (tl); C. Nematocisto sin descargar. La cápsula de nematocistos contiene un cóctel de toxinas, eje (sh), túbulo (t) enrollado en espiral, púas (b) y núcleo (n). El cnidocil (cn) actúa como un mecano-receptor que, al activarse, estimula el mecanismo de descarga; D. Nematocisto descargado. Epidermis (ep), dermis (d), tejido subcutáneo (sct), arteria (a), nervio (n). La mezcla de toxinas se inyecta en la piel de la presa y en los tejidos subcutáneos (flecha). Modificado de Jouiaei et al., 2015.

#### 2.1.4 Composición del veneno

La diversidad de componentes del veneno varía, se pueden encontrar moléculas como: catecolaminas, histamina, hialuronidasa, fibrinolisin, cininas, fosfolipasas y varios hemolíticos, toxinas cardiopépticas y dermatonecroticas. Algunos tipos de familias de toxinas identificadas previamente en otros animales venenosos comprenden el arsenal de venenos de los cnidarios. Un ejemplo son los péptidos inhibidores de proteasa de tipo Kunitz, los cuales se expresan en anémonas de mar,

caracoles cono, insectos, escorpiones, arañas, reptiles, garrapatas y murciélagos vampiros. Otro ejemplo de expresión convergente de toxinas es el péptido bloqueador de canales de potasio Kv1, que no solo evolucionó convergentemente en escorpiones y anémonas de mar, sino que incluso usa los mismos residuos para bloquear los poros de los canales, además, también se pueden encontrar fosfolipasas, metaloproteasas, toxinas formadoras de poro, inhibidores de canales iónicos sensibles a ácidos (ASIC), etc. (Castañeda y Harvey, 2009; Greene, 2017; Jouiaei et al., 2015).

### **2.1.5 Intoxicación en humanos por cnidarios**

Se sabe poco acerca de los componentes del veneno de cnidarios, se especula que pueden inducir alergias e intoxicaciones. En el caso de las alergias, la respuesta inmune a los compuestos del veneno es similar a la de cualquier alérgeno o antígeno. Los componentes del veneno que ingresan a la piel desencadenan una cascada de señalizaciones bioquímicas e interacciones celulares. Las intoxicaciones pueden causar neurotoxicidad al actuar sobre los canales de sodio y potasio, o pueden causar citólisis al formar poros en las membranas celulares. Los efectos sistémicos que se pueden presentar son: edema pulmonar, presión arterial variable, taquicardia, debilidad, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, espasmo muscular, fiebre, palidez, dificultad respiratoria, parestesias, insuficiencia renal aguda, hemólisis, infarto de miocardio y paro cardiopulmonar (Greene, 2017; Tezcan y Gözer, 2015).

### **2.1.6 Efectos nociceptivo e inflamatorio causado por cnidarios**

A la fecha, el momento la información acerca de los mecanismos de intoxicación de los cnidarios es escasa, sin embargo, se sabe que en el proceso de nocicepción están relacionados distintos receptores, los cuales interactúan con algunas de las moléculas presentes en los venenos. Las neurotoxinas son un grupo de moléculas capaces de bloquear a canales y receptores que participan en el inicio y la transducción del dolor y la hiperalgesia, por ejemplo, el receptor vainilloide 1 (TRPV1) y canales iónicos sensibles a ácidos (ASIC). También se sabe que los

componentes bioactivos no proteínicos como la serotonina o la histamina presentes en los venenos de cnidarios producen un dolor agudo mediante la activación de los receptores 5-hidroxitriptamina (5-HT), por lo que en algunas ocasiones se recomienda tratar a las personas intoxicadas con antihistamínicos para aliviar los síntomas (Jouiaei et al., 2015).

Por otra parte, se sabe que el cuerpo humano activa una respuesta inmune a los venenos en donde están implicados queratinocitos, macrófagos tisulares, células dendríticas y mastocitos, siendo estos mediadores celulares clave. Los queratinocitos además de representar una defensa protectora en la piel también tienen la capacidad de liberar linfopoyetina del estroma tímico que activa a las células T para producir citoquinas. Posteriormente las células dendríticas capturan y presentan antígenos a las células T o migran a los ganglios linfáticos regionales que evocan reacciones alérgicas de hipersensibilidad inmunes o retardadas. Los mastocitos son células que desencadenan el proceso de inflamación al liberar histamina, el factor activador de plaquetas, prostaglandinas, leucotrienos, proteasas y citoquinas. Los mastocitos pueden ser activados directamente por aminas o lípidos bioactivos presentes en los venenos; por los componentes del tubo del nematocisto o del veneno los cuales pueden activar a los receptores de reconocimiento de patrones presentes en los mastocitos; y por cambios físicos (hiposmolaridad, acidificación, especies reactivas de oxígeno) en el sitio de la picadura (Tibballs et al., 2012).

### **2.1.7 Cuidados prehospitalarios en la intoxicación por cnidarios**

Durante una intoxicación por cnidarios es importante detener la descarga de los nematocistos para evitar el empeoramiento de los síntomas. Se ha sugerido inactivar los nematocistos mediante el lavado con solución de vinagre o ácido acético al 4 o 6 %, posteriormente, eliminar los tentáculos y nematocistos sin descargar realizando lavados con agua de mar y la aplicación de agua caliente; para disminuir el dolor leve se recomienda el uso de analgésicos por vía oral como ibuprofeno y acetaminofén y para el dolor intenso se prescriben analgésicos parenterales o narcóticos (Greene, 2017; Staggs et al., 2020).

## 2.1.8 Antecedentes de las especies involucradas en este proyecto

### 2.1.8.1 *Carybdea marsupialis*

*Carybdea marsupialis* (Figura 4), es una cubo-medusa venenosa que se distribuye ampliamente en las aguas tropicales del Océano Atlántico y se encuentra en grandes agregaciones a lo largo del Mar Caribe. El contacto con sus tentáculos causa dolor severo, sensación de ardor, erupción eritematosa-vesicular y edema local. La investigación sobre los venenos de *C. marsupialis* ha sido limitada, Rottini et al., (1995) reportaron que estos inducen hemólisis; Sánchez-Rodríguez et al., (2006) purificaron parcialmente una neurotoxina y tres citolisinas de la misma especie usando métodos cromatográficos clásicos. La neurotoxina tiene un peso molecular aparente de 120 kDa por SDS-PAGE y es letal en cangrejos. Las citolisinas tienen pesos de 220, 139 y 36 kDa y mostraron actividad contra los eritrocitos humanos.



Figura 4. *Caribdea marsupialis*. Tomado de Acevedo et al., 2019.

### 2.1.8.2 *Palythoa caribaeorum*

*Palythoa caribaeorum* se encuentra en grandes cantidades a lo largo de las costas, dando formación a colonias densas e incrustadas sobre sustratos rocosos en aguas poco profundas (Figura 5). Posee un esqueleto duro, mientras que la superficie exterior está cubierta con cálices grandes y redondos rodeados por una cresta baja y redondeada; los tejidos están impregnados con sedimentos. Su desarrollo es vegetativo con altas tasas de regeneración. Durante la marea baja, cuando están expuestos al aire, producen una sustancia gelatinosa que los protege de la sequedad. La mayoría de las sustancias bioactivas aisladas a partir de zoantidos

marinos del género *Palythoa* corresponden a metabolitos secundarios que comprenden: ácidos grasos, ceramidas, esteroides o prostaglandinas liberadas de sus ésteres con el glicerol y compuestos nitrogenados (De Alencar et al., 2015).

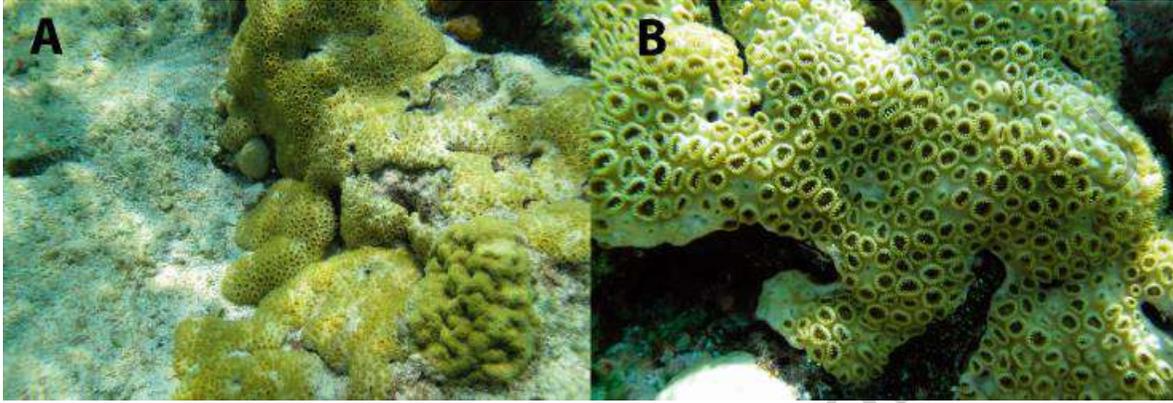


Figura 5. *Palythoa caribaeorum*: A. en su hábitat natural; B. Pólipos abiertos que muestran tentáculos. Tomado de Lazcano-Pérez et al., 2016.

### 2.1.8.3 *Stichodactyla helianthus*

*Stichodactyla helianthus* (Figura 6), es una anémona relativamente abundante en los mares de Cuba que presenta grandes potencialidades como fuente de polipéptidos bioactivos. Desde que en 1974 se informó por primera vez la presencia en este organismo de un polipéptido con actividad lítica sobre eritrocitos, muchos han sido los esfuerzos dirigidos a la caracterización de los componentes presentes en el veneno producido por esta anémona. Entre los polipéptidos que componen este veneno se encuentran inhibidores de proteasas, un bloqueador de canales de  $K^+$  voltaje dependiente, una fosfolipasa y 2 citolisinas: Sticolisina I (StI) y Sticolisina II (StII) (Castañeda y Harvey, 2009; Manchen et al., 2009).



Figura 6. *Stichodactyla helianthus*. Tomado de Manchen et al., 2009.

## 2.2 Nocicepción

La nocicepción, derivada del latín nocere que significa "herir/dañar", es el nombre que se le da al proceso por el cual los organismos detectan estímulos potencialmente dañinos. En los seres humanos, la base de este sistema es una clase dedicada de agentes sensoriales llamados nociceptores (Smith y Lewin, 2009).

### 2.2.1 Clasificación del dolor

El dolor se puede clasificar de diferentes maneras:

- Basado en el mecanismo fisiopatológico (dolor nociceptivo o neuropático).
- Basado en la duración (aguda, crónica o subclasificación).
- Basado en etiología (maligno o no maligno).
- Basado en la ubicación anatómica del dolor.

La clasificación por mecanismo fisiopatológico se divide en:

- Dolor nociceptivo
- Dolor neuropático
- Dolor mixto.

### **2.2.1.1 Dolor nociceptivo**

El dolor nociceptivo se desarrolla debido a una lesión tisular que estimula los receptores del dolor llamados nociceptores. En función de la ubicación de los nociceptores, este tipo de dolor se puede en dolor somático o visceral:

- Dolor somático: causado por la estimulación de nociceptores en tejidos superficiales (por ejemplo, piel y mucosa), también tejidos profundos (por ejemplo, huesos, articulaciones y músculos).
- Dolor visceral: causado por la estimulación de nociceptores en las vísceras (por ejemplo, órganos abdominales internos). Por lo general es un dolor difuso y se puede llegar a presentar calambres. Este dolor se puede referir a las partes de la piel suministradas por las mismas raíces sensoriales que el órgano enfermo (Abd-Elseyed y Deer, 2019).

### **2.2.1.2 Dolor neuropático**

El dolor neuropático es causado por una lesión a las células nerviosas del sistema nervioso periférico o central. Algunas características sensoriales asociadas con el dolor neuropático son: alodinia, hiperalgesia, hipoalgesia, parestesia y disestesia. El dolor se describe como agujas, hormigueo, ardor agudo (Abd-Elseyed y Deer, 2019).

### **2.2.1.3 Dolor mixto**

El dolor mixto se refiere a la presencia o sensación de dolor nociceptivo y neuropático, por ejemplo: quemaduras que dañan la piel y las terminaciones nerviosas (Abd-Elseyed y Deer, 2019).

## **2.2.2 Receptores sensoriales cutáneos**

Los sensores cutáneos aferentes, cuyos cuerpos celulares se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (DRG), se pueden dividir en dos grupos principales según el calibre de los axones y la mielinización: los de diámetro grande, neuronas de fibras A $\delta$  mielinizadas y diámetro pequeño; neuronas de fibra C no mielinizadas. Varios axones de fibra C se empaquetan en paquetes de Remak individuales, que

están envueltos por una célula de Schwann no mielinizada. Como consecuencia del calibre de los axones y el estado de mielinización, las fibras A $\delta$  conducen los potenciales de acción mucho más rápido que las fibras C (velocidad de conducción fibras A $\delta$ = 1.2–40 m/s; velocidad de conducción fibras C= 0.3 – 1.2 m/s) (Smith y Lewin, 2009).

Las fibras A $\beta$  tienen un diámetro grande y una vaina de mielina gruesa. Éstas son fibras conductoras muy rápidas que participan en la detección de estímulos mecánicos no nocivos. Las fibras A $\delta$  tienen un diámetro de axón más pequeño y una vaina de mielina más delgada. Estos axones conducen lentamente y se clasifican como mecanorreceptores activados por estímulos nocivos de alta intensidad A $\delta$  -mecanorreceptores. Mientras que las fibras A $\beta$  inervan una variedad de estructuras deshilachadas en la piel vellosa de los roedores, como los folículos pilosos y los corpúsculos de Meissner, las fibras A $\delta$  pierden su mielina y terminan como terminaciones libres en la epidermis. Burgess y Perl, (1967) fueron los primeros en examinar las fibras A $\delta$  con gran detalle, señalando que "respondieron solo a la estimulación dañina de la piel" (Smith y Lewin, 2009).

Las fibras C no mielinizadas que, como los mecanorreceptores A $\delta$ , terminan en la piel como terminaciones libres, son mucho más abundantes que las fibras A $\delta$ . En general, se considera que las fibras C responden solo a estímulos (Smith y Lewin, 2009).

### **2.2.3 Mecanismos de nocicepción**

La información nociceptiva está mediada a través del ganglio de la raíz dorsal (DRG por sus siglas en inglés) que se transmite al cerebro a través de tractos espinotalámicos o a través del ganglio trigémino de la cabeza. Cada tracto asciende a varias áreas del cerebro, incluida la formación reticular, sustancia *gris* periacueductal (PAG), el sistema límbico, el hipotálamo, los ganglios basales y las cortezas cingulada insular y somatosensorial, por mencionar algunas (Sneddon, 2018).

Muchas moléculas y sus receptores se han relacionado con la nocicepción, por ejemplo, los canales iónicos sensibles al ácido (ASIC) que median la nocicepción ácida. Solo se destacarán dos: los canales con potencial de receptor transitorio (TRP, por sus siglas en inglés) implicados en la noción térmica, y los receptores de opioides y sustancias endógenas intrínsecas a la analgesia mediada por opioides. Estos canales iónicos TRP activados por ligando, subyacen a la detección de estímulos mecánicos y químicos mediante la activación de nociceptores. Los canales de TRP controlan una variedad de sensaciones, que incluyen cambios de temperatura, mecánicos y estímulos dolorosos. Hay una serie de canales TRP, incluidos TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 y TRPA1, que se expresan en nociceptores (Figura 7). Los canales TRP constituyen un primer paso esencial para la percepción del dolor, ya que traducen estímulos nocivos en corrientes (Sneddon, 2018).

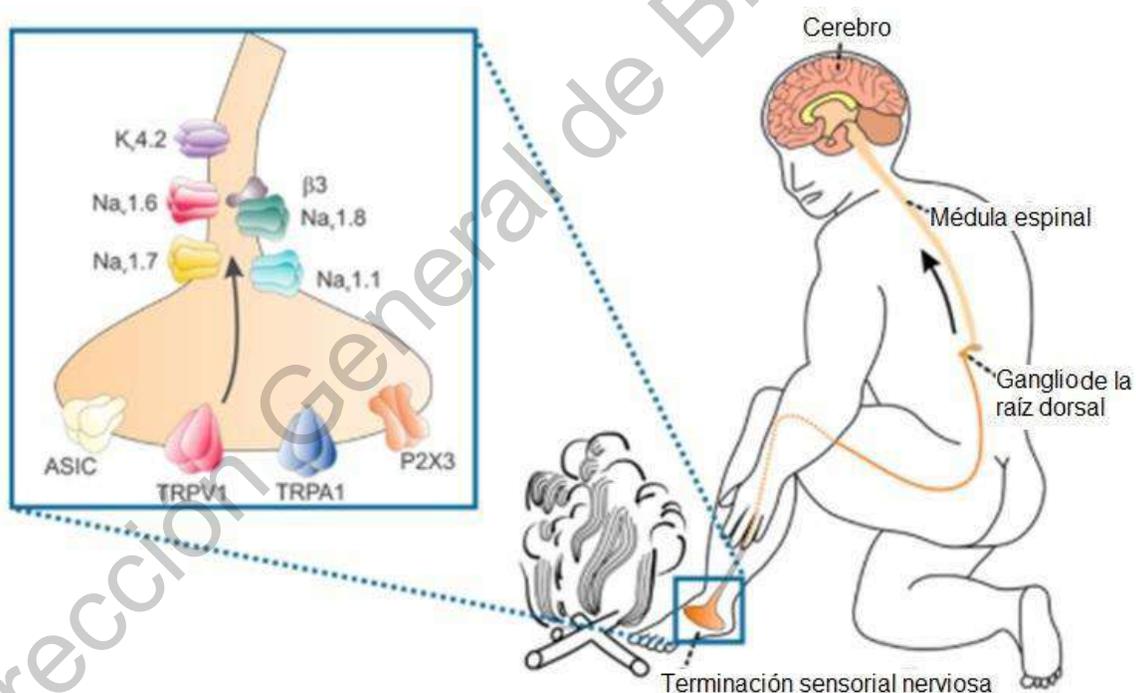


Figura 7. Mecanismo general de nocicepción. Adaptado de Jami et al., 2018.

## 2.2.4 Modelos experimentales de dolor

Las pruebas nociceptivas utilizan estímulos eléctricos, térmicos, mecánicos o químicos, los resultados que se obtienen en la mayoría de las pruebas nociceptivas

muestran una variabilidad interindividual relativamente baja en comparación con otros estudios conductuales. Los estímulos pueden ser fijos y basarse en la latencia de aparición de un comportamiento de evitación, el cual puede presentarse como un reflejo de abstinencia de la pata o cola. Las pruebas que utilizan estimulación fija son: la prueba de movimiento de cola, las pruebas de placa caliente o fría, y la prueba de retirada de pata de calor radiante (Barrot, 2012).

Las pruebas nociceptivas también pueden basarse en el umbral de estímulo necesario para obtener un comportamiento de evitación, el estímulo puede ser variable y con un valor creciente. En este tipo de pruebas incluyen los filamentos von Frey, la prueba de Randall-Selitto o la prueba de presión de la pata, y pruebas basadas en medidores de tensión mantenidos por fórceps o dedos. Algunas pruebas nociceptivas están basadas en la observación y puntuación de comportamientos específicos, los cuales son causados por estímulos químicos inflamatorios o irritantes (Barrot, 2012).

En el Cuadro 1 se presentan las pruebas clásicas empleadas en roedores despiertos.

Cuadro 1. Ensayos de nocicepción

Prueba	Modalidad	Estimulo	Parámetro	Especie
Retirada de cola	Térmica, calor	Temperatura fija	Latencia de retirada (s)	Rata o ratón
Placa caliente	Térmica, calor	Temperatura fija (48-55°C)	Latencia de retirada/salto (s)	Rata o ratón
Plantar®	Térmica, calor	Temperatura fija	Latencia de retirada (s)	Rata o ratón
Placa fría	Térmica, frío	Temperatura fija	Puntuación	Rata o ratón
Prueba de acetona	Térmica, frío	Aplicación por goteo	Puntuación o duración del comportamiento (s)	Rata o ratón
Placa dinámica caliente	Térmica, calor	Rampa de temperatura	Puntuación y umbral de respuesta (T)	Rata o ratón
Placa dinámica fría	Térmica, frío	Rampa de temperatura	Puntuación y umbral de respuesta (T)	Rata o ratón
Von Frey	Mecánica	Presión fija múltiple	Umbral de retirada (g)	Rata o ratón
Randall–Selitto	Mecánica	Rampa de presión	Umbral de retirada (g)	Rata

Medidores de tensión	Mecánica	Rampa de presión	Umbral de retirada (g)	Rata
Prueba de formalina	Química	Inyección química	Puntuación	Rata o ratón

s, segundos; T, temperatura; g, gramos.

Para inducir un estímulo nociceptivo, se pueden emplear diferentes agentes químicos irritantes. Por ejemplo, el más usual es la formalina. La formalina actúa principalmente a través del canal con potencial de receptor transitorio de anquirina 1, un miembro de la familia de los canales con potencial transitorio. Se puede administrar intradérmicamente en la superficie dorsal o plantar de una pata delantera o trasera, resultando en movimientos como la retirada de la pata, lamido, mordedura o sacudida, los cuales son cuantificables (Barrot, 2012).

En roedores, la inyección intradérmica de formalina produce una reacción conductual bifásica, con una fase inicial dentro de los primeros minutos después de la inyección, seguida de un período de reposo de alrededor de 10 minutos y una segunda fase de comportamientos nociceptivos que duran 20 - 40 minutos. La primera fase está relacionada con la estimulación directa de los nociceptores y es sensible a los anestésicos locales, mientras que la segunda fase implica tanto mecanismos inflamatorios como sensibilización central dentro del hasta dorsal. En la prueba de retorcimiento, los agentes irritantes se administran por vía intraperitoneal, en roedores inducen un comportamiento estereotipado caracterizado por contracciones abdominales, que se cuantifican (Barrot, 2012).

### 2.3 Proceso de inflamación

La inflamación es una respuesta de protección controlada por el organismo en el lugar de la lesión. La pérdida de este control local o la aparición de una respuesta hiperactivada condicionan una respuesta sistémica que se conoce como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o SIRS. Una vez iniciada la respuesta inflamatoria se ponen en marcha mecanismos compensadores concertados y la evolución (resolución, síndrome de disfunción multiorgánica SDMO o muerte) depende del balance entre el SIRS y estos mecanismos (García et al., 2013).

La defensa natural del organismo se basa en tres elementos: barrera externa, sistemas inespecíficos, y respuestas antígeno-específicas. La inflamación es la respuesta inicial e inespecífica del organismo ante estímulos mecánicos, químicos o microbianos. Es una respuesta rápida y ampliada, controlada humoral y celularmente (complemento, cininas, coagulación y cascada fibrinolítica) y desencadenada por la activación conjunta de fagocitos y células endoteliales (García et al., 2013).

En 1996, Bone describió tres fases del desarrollo de la respuesta inflamatoria. En la fase I, como respuesta a la agresión, se liberan localmente citocinas que inducen la respuesta inflamatoria, reparan los tejidos y reclutan células del sistema retículo endotelial. En la fase II, se liberan pequeñas cantidades de citocinas a la circulación para aumentar la respuesta local. Se reclutan macrófagos y plaquetas y se generan factores de crecimiento. Se inicia una respuesta de fase aguda, con disminución de los mediadores proinflamatorios y liberación de los antagonistas endógenos. Estos mediadores modulan la respuesta inflamatoria inicial. Esta situación se mantiene hasta completar la cicatrización, resolver la infección y restablecer la homeostasis. Si la homeostasis no se restablece aparece la fase III o reacción sistémica masiva. Las citocinas activan numerosas cascadas humorales de mediadores inflamatorios que perpetúan la activación del sistema retículo endotelial, con pérdida de la integridad microcirculatoria y lesión en órganos diversos y distantes (Eming et al., 2017).

Los cambios hemodinámicos producen los cuatro síntomas clásicos asociados a la inflamación local: rubor (eritema), tumor (edema), calor y dolor. Si no aparece una segunda agresión, estas alteraciones fisiológicas locales y sistémicas persisten de tres a cinco días y desaparecen de siete a diez días (León et al., 2016).

### **2.3.1 Modelo de inflamación inducido por carragenina**

El edema de la pata de rata inducido por carragenina es una prueba utilizada para determinar la actividad antiinflamatoria y constituye un modelo animal simple y rutinario para la evaluación del dolor en el sitio de la inflamación sin lesión o daño

en la pata inflamada. Se utiliza comúnmente una solución recién preparada que va del 1 al 3 % de carragenina en solución salina, se administra vía intraplantar en dosis de 50 a 150  $\mu$ l en la pata trasera de la rata (Mortari et al., 2012).

El desarrollo de edema después de la inyección de carragenina se ha descrito como un evento bifásico, dependiente de la edad y el peso, en el que varios mediadores operan en secuencia para producir la respuesta inflamatoria. Hay varios mediadores involucrados en la inflamación. La histamina, la serotonina y la bradicinina son los primeros mediadores detectables en la fase temprana de la inflamación inducida por carragenina; las prostaglandinas (PG) están involucradas en el aumento de la permeabilidad vascular y son detectables en la fase tardía de la inflamación. La inflamación local y/o sistémica se asocia con niveles de citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. La fase inicial del edema se ha atribuido a la liberación de histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT) y bradicinina. La segunda fase de aceleración de la inflamación no solo se ha correlacionado con la producción elevada de prostaglandinas, sino que más recientemente se ha atribuido a la inducción de ciclooxigenasa inducible (COX-2) en la pata trasera (Necas y Bartosikova, 2013).

### 3 JUSTIFICACIÓN

Existen aproximadamente 13,000 especies de cnidarios y se estima que alrededor de 100 especies son tóxicas para los humanos, siendo letales solo algunas de ellas (Greene, 2017; Kayal et al., 2018). Generalmente las lesiones y síntomas que se generan varían según la especie. Inicialmente se generan erupciones papulares en la piel con sensación de ardor que pueden ser vesiculadas y evolucionar a pustulización, hemorragia y descamación. Estas lesiones pueden ir acompañadas de dolor local que va desde moderado a intenso. Los efectos sistémicos que se han observado son: debilidad, náuseas, cefaleas, dolor muscular, espasmos y alteraciones cardíacas. Sin embargo, no existe un tratamiento adecuado para estas intoxicaciones, los remedios inespecíficos consisten en la inactivación de los nematocistos con vinagre o ácido acético, aunque se ha reportado que algunas veces la aplicación de vinagre conduce a la descarga de los nematocistos en picaduras causadas por ciertas especies. Otra recomendación es lavar la zona afectada con agua de mar para evitar una descarga de los nematocistos. Además, también se recomienda el uso de compresas calientes, ya que se cree que esto ayuda en cierto grado a inactivar algunas de las toxinas del veneno y reducir así el grado de intoxicación (Greene, 2017; Tezcan y Gözer, 2015).

La variabilidad en los efectos observados en las intoxicaciones causadas por cnidarios puede deberse a la composición del veneno, a la capacidad de los nematocistos para penetrar la piel e inyectar el veneno o a la susceptibilidad de la víctima. Por ejemplo, se han reportado casos en los que algunas especies que no están catalogadas dentro de las que producen toxicidad en humanos pueden llegar a causar intoxicación por contacto en la piel delgada de niños pequeños y pieles dañadas o sensibles como las axilas y/o genitales (Tezcan y Gözer, 2015).

A pesar de lo anterior, pocos estudios se han enfocado en evaluar el grado de toxicidad de los cnidarios. De hecho, generalmente, estos estudios se centran en los cnidarios que inducen toxicidad media o alta. Considerando esto, es evidente la necesidad de generar información acerca de los efectos tóxicos que pueden llegar a generar los cnidarios que no son tóxicos para los humanos. Dado que el dolor es

un síntoma característico tras la intoxicación por contacto con cnidarios, el presente estudio se enfocó en la evaluación *in vivo* de los efectos nociceptivo e inflamatorio de los extractos acuosos de tres especies de cnidarios habituales en el Caribe mexicano: *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla helianthus*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

#### **4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Los extractos acuosos de los cnidarios *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla helianthus* contienen toxinas de naturaleza proteínica capaces de causar dolor y/o inflamación en modelos *in vivo*?

#### **5 HIPÓTESIS**

Los extractos acuosos de los cnidarios *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla helianthus* contienen toxinas termolábiles de naturaleza proteínica capaces de inducir dolor y/o inflamación al ser administradas en ratas Wistar como modelo *in vivo*.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto nociceptivo e inflamatorio de los extractos acuosos y fracciones de los cnidarios *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla helianthus* utilizando ratas Wistar como modelo biológico.

### 6.2 Objetivos específicos

- 6.2.1 Determinar el efecto nociceptivo de los extractos acuosos mediante el ensayo de formalina.
- 6.2.2 Evaluar el efecto inflamatorio de los extractos acuosos mediante el ensayo de edema plantar.
- 6.2.3 Obtener las fracciones de alto y bajo peso molecular (>10 y <10 kDa respectivamente) de los extractos acuosos y evaluar sus efectos nociceptivo e inflamatorio.
- 6.2.4 Determinar el peso molecular relativo de los compuestos presentes en las fracciones bioactivas mediante SDS-PAGE.
- 6.2.5 Determinar la estabilidad de las toxinas responsables de los efectos nociceptivo e inflamatorio posterior a la desnaturalización térmica de su contenido proteínico.

## 7 METODOLOGÍA

### 7.1 Animales de laboratorio

Se emplearon 32 ratas macho (cepa Wistar) de aproximadamente 250 g. las cuales se adquirieron conforme a su requerimiento. Se adquirieron en el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro. Durante las etapas de adaptación (4 días) y experimental (1 día), los animales se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Química de la UAQ. Los animales se mantuvieron en condiciones de agua y alimento (alimento ABENE BDL-7100 para animales de laboratorio en fase de mantenimiento) *ad libitum* (NOM-062-ZOO-1999 apartado 5.1). Una vez concluidos los ensayos, se indujo la eutanasia de los animales mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 120 mg/kg (NOM-062-ZOO-1999 apartado 9.4).

### 7.2 Manejo de residuos biológicos y de sustancias químicas

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos fueron debidamente etiquetados y almacenados de acuerdo con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 por un periodo no mayor a 30 días. Con respecto a los residuos químicos, éstos se manejaron y almacenaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998. Periódicamente, se contrató un servicio especial dedicado a la recolección, tratamiento y procesamiento de los residuos que opera bajo estas normas (Transporte y Recolección Integral de Residuos Peligrosos, S.A. de C.V.).

### 7.3 Colecta y preparación de los extractos acuosos

Se colectaron especímenes de *C. marsupialis* mediante inmersiones de buceo en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Cancún, Quintana Roo, México. Los especímenes de *P. caribaeorum* y de *S. helianthus* se colectaron mediante inmersiones de buceo en arrecifes de coral situados en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos. Una vez recolectados, los especímenes se congelaron

inmediatamente a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la preparación de los extractos. La recolección e identificación de las especies se realizó con el apoyo de personal especializado de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

El extracto de *C. marsupialis* se preparó mediante la agitación de los especímenes completos y de la zona de la campana en agua destilada durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 4,000 rpm durante 15 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y los sobrenadantes se liofilizaron (Monroy-Estrada et al., 2013). Los extractos de *P. caribaeorum* y *S. helianthus* se prepararon colocando los especímenes en agua destilada; los tentáculos se estimularon mecánicamente para que liberaran su contenido. La solución resultante se centrifugó dos veces a 4,000 rpm por 15 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el sobrenadante se liofilizó (Lazcano-Pérez et al., 2017). Los extractos se almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se determinó su contenido de proteína mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976), utilizando una curva estándar preparada con albúmina de suero bovino.

## **7.4 Ensayos biológicos**

### **7.4.1 Efecto nociceptivo**

La capacidad de los extractos para inducir dolor se evaluó mediante el ensayo de la formalina (Dubuisson & Dennis, 1977). Se disolvieron los extractos y fracciones (40  $\mu\text{g}$  de proteína/pata, disueltos en 50  $\mu\text{l}$  de solución salina estéril) y se administraron por vía intraplantar en la región anterior del miembro posterior derecho ( $n = 4$ ). Durante el ensayo, cada rata se colocó en un contenedor de vidrio para su observación. El comportamiento nociceptivo se registró midiendo el tiempo de lamido, estremecimiento y levantamiento de la pata trasera inyectada utilizando cronómetros. El periodo de observación se realizó en dos fases: fase neurogénica, de 0 a 10 min después de la administración; fase inflamatoria, de 10 a 50 min después de la inyección. Se utilizó un grupo control positivo al que se le administró 50  $\mu\text{l}$  de formalina al 2.5% y un grupo control negativo al que se le administró 50  $\mu\text{l}$

de solución salina estéril. Se grabaron todos los experimentos en video para propósitos de respaldo.

#### **7.4.2 Evaluación de la actividad edematogénica (inflamatoria)**

Se evaluó la actividad edematogénica de los extractos y fracciones a una concentración de 40 µg de proteína/pata, disueltos en 50 µl de solución salina estéril y se administró por vía subcutánea en la región anterior del miembro posterior derecho (n = 4). Mediante el ensayo de la carragenina (Mortari et al., 2012). Para lo anterior, se midieron los cambios del volumen de la pata, con un hidropletismómetro manual. Se calculó el volumen de la pata basal antes de la inyección del extracto y cada hora posterior a la inyección durante 4 horas. Se considero un grupo control negativo, al cual se le administraron 50 µl de solución salina estéril y al grupo control positivo se le administraron 50 µl de carragenina al 1.5% empleando solución salina como disolvente.

#### **7.4.3 Desnaturalización del contenido proteínico de los extractos**

Se determinó la estabilidad de las proteínas mediante un proceso de desnaturalización por calentamiento. Los extractos se incubaron a 96°C durante 20 minutos; se dejaron a temperatura ambiente y posteriormente se evaluó la actividad biológica mediante los ensayos previamente descritos.

#### **7.5 Ultrafiltración de los extractos**

A partir de los extractos liofilizados de las especies de cnidarios *C. marsupialis*, *P. caribaeorum* y *S. helianthus* se prepararon soluciones a una concentración de 60 mg/mL. Posteriormente, se llevó a cabo el fraccionamiento de los extractos acuosos utilizando dispositivos Amicon® Ultra-2mL (Millipore) con punto de corte nominal de 10 kDa. Se centrifugaron alícuotas de 1.5 mL a 6,500 rpm durante 20 minutos. Finalmente, se cuantificó el contenido de proteína de las fracciones obtenidas (>10 kDa y <10 kDa), se liofilizaron y almacenaron a -70° C.

## **7.6 Análisis de las fracciones mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Se realizó un análisis de los extractos mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras (Laemmli, 1970). En condiciones no reductoras, las muestras se disolvieron en relación 1:1 en una solución amortiguadora de muestra (Bio-Rad, cat #161-0737). Para las condiciones reductoras, las muestras se diluyeron en proporciones 1:1 en una solución amortiguadora de muestra que contenía  $\beta$ -mercaptoetanol y se calentó a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se prepararon geles de poliacrilamida al 12%. La separación se llevó a cabo a 120 V durante 2 horas a 4 °C, utilizando Tris-Glicina como solución amortiguadora (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3, Bio-Rad, cat #161-0734). Las bandas de proteínas se visualizaron utilizando una solución de tinción con azul brillante de Coomassie R-250 (Bio-Rad, cat #161-0437), y las masas moleculares relativas se determinaron mediante comparación con un estándar de polipéptidos de amplio rango (Bio-Rad, cat #161-0376).

## **7.7 Análisis estadístico**

Los datos y los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico Prisma 5.0 (GraphPad Software, Inc., EE. UU.). Todos los resultados se expresaron como medias  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M.), de cuatro repeticiones. Se realizaron comparaciones múltiples mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba *post-hoc* de Dunnett. En todos los casos, la significancia estadística está indicada por  $p < 0.05$ .

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Recolección y preparación de los extractos acuosos

Se realizó la colecta de las especies de *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla helianthus* en Puerto Morelos, Quintana Roo, México. Mediante la determinación de proteína (Cuadro 2). Se obtuvo que la especie *S. helianthus* fue la que presentó un mayor contenido de proteína en el extracto liofilizado.

Cuadro 2. Cuantificación de proteína de los extractos acuosos mediante el método Bradford

Especie	µg proteína/mg de extracto
<i>Carybdea marsupialis</i>	
Campana (cam)	27.62
Extracto completo	18.26
<i>Palythoa caribaeorum</i>	27.78
<i>Stichodactyla helianthus</i>	205.2

### 8.2 Ensayos biológicos

#### 8.2.1 Efecto nociceptivo

Se evaluó el efecto nociceptivo de los extractos acuosos mediante el ensayo de la formalina a una concentración de 40 µg de proteína/pata. En la Figura 8 se presentan los resultados obtenidos de la fase neurogénica (fase 1) y fase inflamatoria (fase 2), se aprecia que el extracto de *P. caribaeorum* induce un mayor efecto nociceptivo en ambas fases, el cual es significativamente diferente en comparación con el control negativo.

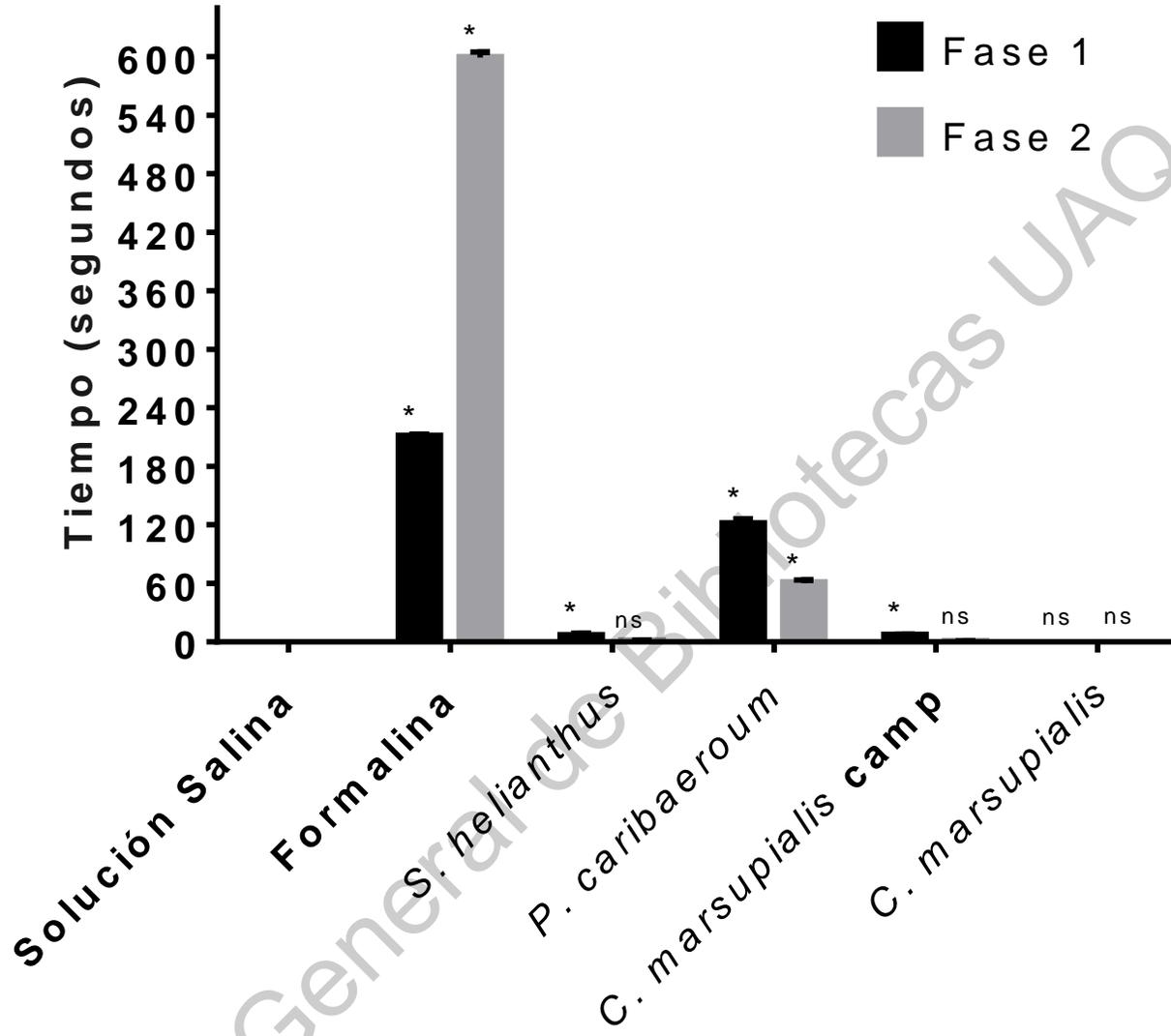


Figura 8. Prueba de formalina para evaluar la actividad nociceptiva de los extractos acuosos en ratas a una dosis de 40 µg de proteína/pata. El comportamiento nociceptivo en la fase 1 (0–10 min después de la inyección) y en la fase 2 (10–50 min después de la inyección) se cuantificó como la cantidad de tiempo que pasó lamiendo, sacudiendo y levantando la pata. \* Diferencia estadísticamente significativa (p <0.05) en comparación con el control negativo inyectado con solución salina mediante una prueba de Dunnett; ns, diferencia no significativa.

En la figura 9 se presentan los resultados de las fases neurogénica e inflamatoria respectivamente de los extractos desnaturalizados a una temperatura de 96 °C. Durante la fase 1, el extracto desnaturalizado de *Carybdea marsupialis* fue el que

mostró un mayor efecto. Sin embargo, en la fase 2, ningún extracto desnaturalizado presentó actividad.

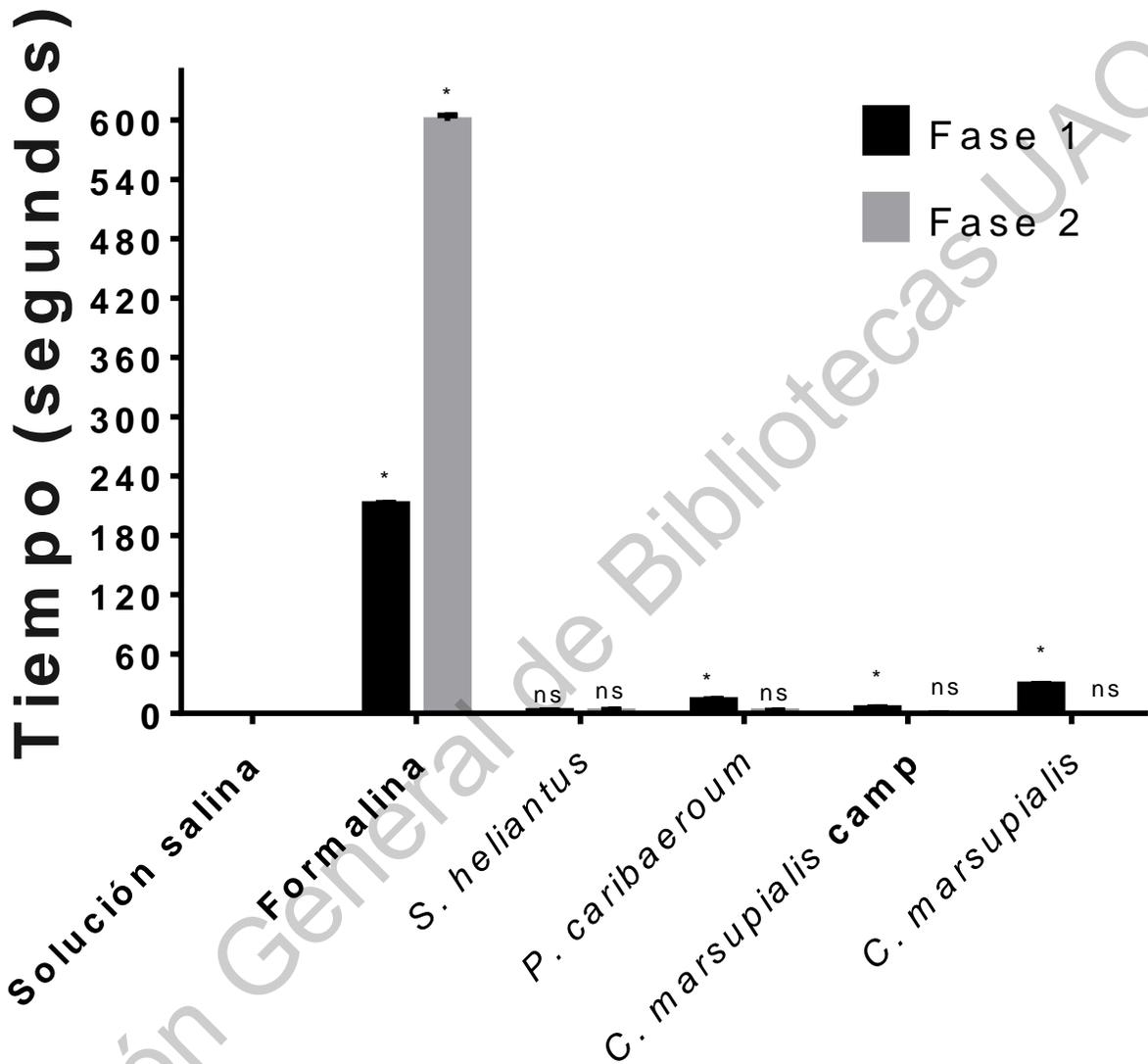


Figura 9. Prueba de formalina para evaluar la actividad nociceptiva de los extractos desnaturalizados en ratas a una dosis de 40  $\mu$ g de proteína/pata. El comportamiento nociceptivo en la fase 1 (0–10 min después de la inyección) y en la fase 2 (10–50 min después de la inyección) se cuantificó como la cantidad de tiempo que pasó lamiendo, sacudiendo y levantando la pata.

\* Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control negativo inyectado con solución salina mediante una prueba de Dunnett; ns, diferencia no significativa.

### 8.2.2 Evaluación de la actividad edematogénica (inflamatoria)

Se evaluó la actividad edematogénica mediante el ensayo de la carragenina. En la Figura 10, se presentan los resultados de los extractos acuosos, en los cuales se observa que durante la primer hora posterior a la administración, el extracto de *P. caribaeorum* es el que indujo un mayor nivel de inflamación al igual que en la segunda hora, mientras que los extractos de las especies *C. marsupialis* campana y *S. helianthus* muestran niveles de inflamación similares, pero en menor medida que la carragenina empleada como control positivo y que además, es sostenido el efecto durante las dos horas posteriores a la administración. Por otra parte, se observa el mismo efecto sostenido en el extracto de *C. marsupialis*, aunque en menor medida en comparación con los demás extractos.

Dirección General de Bibliotecas UAO

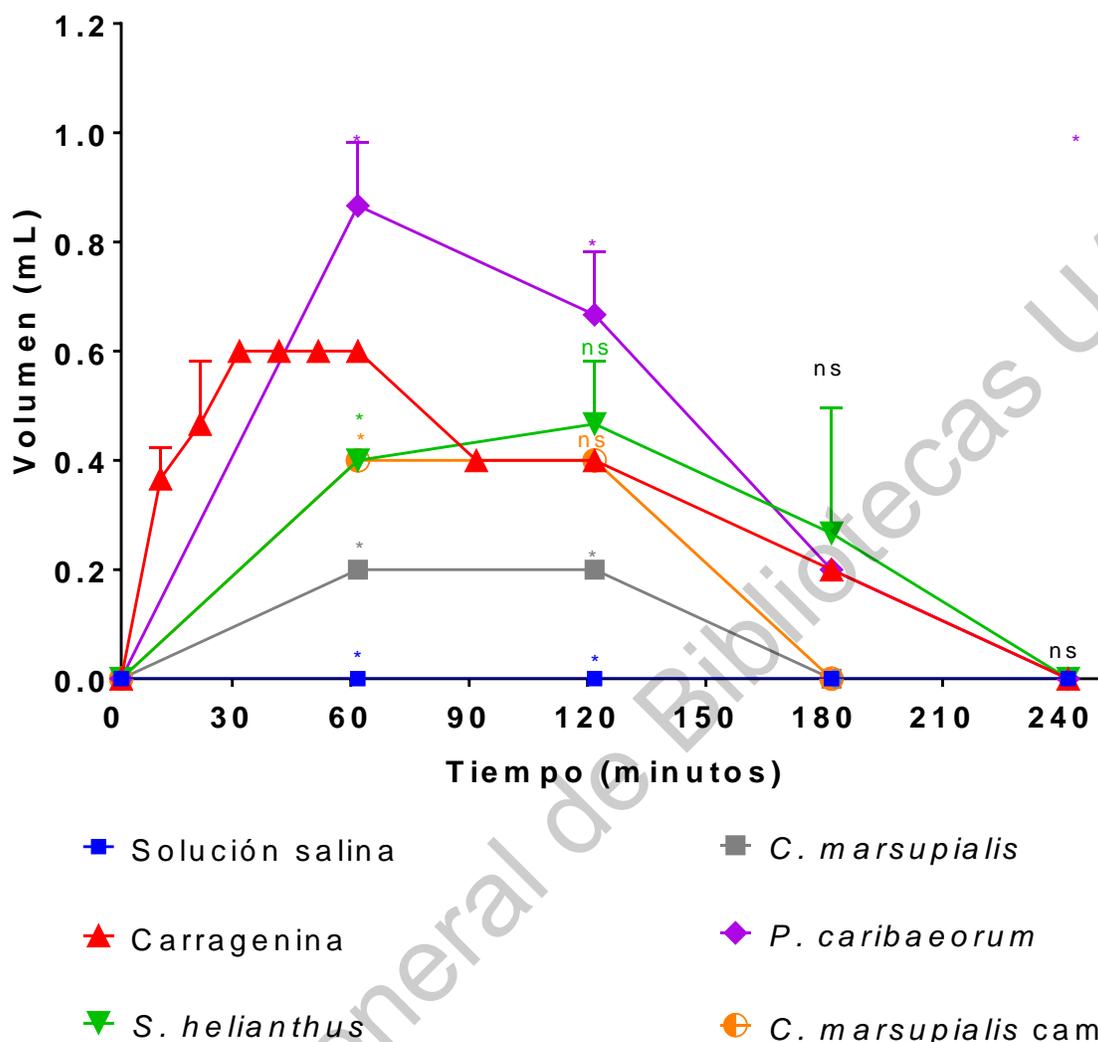


Figura 10. Evaluación de la actividad inflamatoria mediante el ensayo de edema plantar de los extractos acuosos de las diferentes especies en ratas a una dosis de 40 µg de proteína/pata. Los niveles de inflamación se calcularon mediante la medición del volumen generado por el edema.

\* Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control positivo inyectado con carragenina usando solución salina como vehículo; ns, diferencia no significativa.

En las Figuras 11, 12, 13 y 14, se observa la gráfica correspondiente a la comparación de la actividad inflamatoria generada por cada extracto acuoso y extracto desnaturalizado de las distintas especies. Los extractos de *Carybdea marsupialis* (campana) y *Stichodactyla helianthus* presentaron un efecto sostenido por 60 minutos después de una hora posterior a la administración.

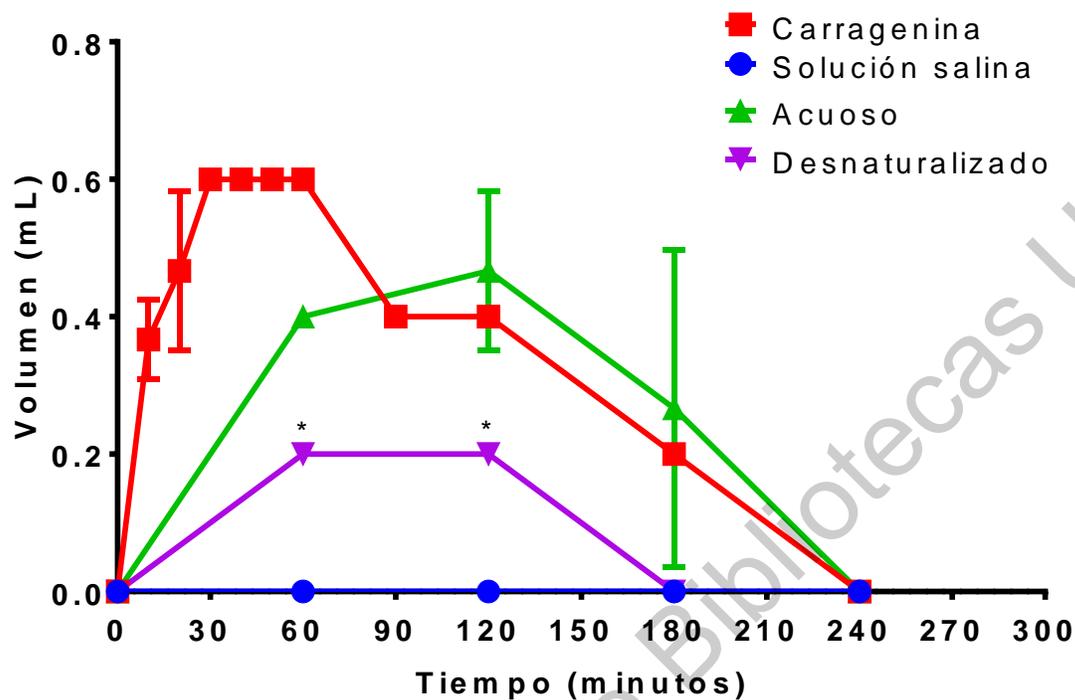


Figura 11. Evaluación de la actividad inflamatoria mediante el ensayo de edema plantar del extracto acuoso y desnaturalizado de *Stichodactyla helianthus* en ratas a una dosis de 40 µg de proteína/pata. Los niveles de inflamación se calcularon mediante la medición del volumen generado por el edema.

\* Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el extracto acuoso.

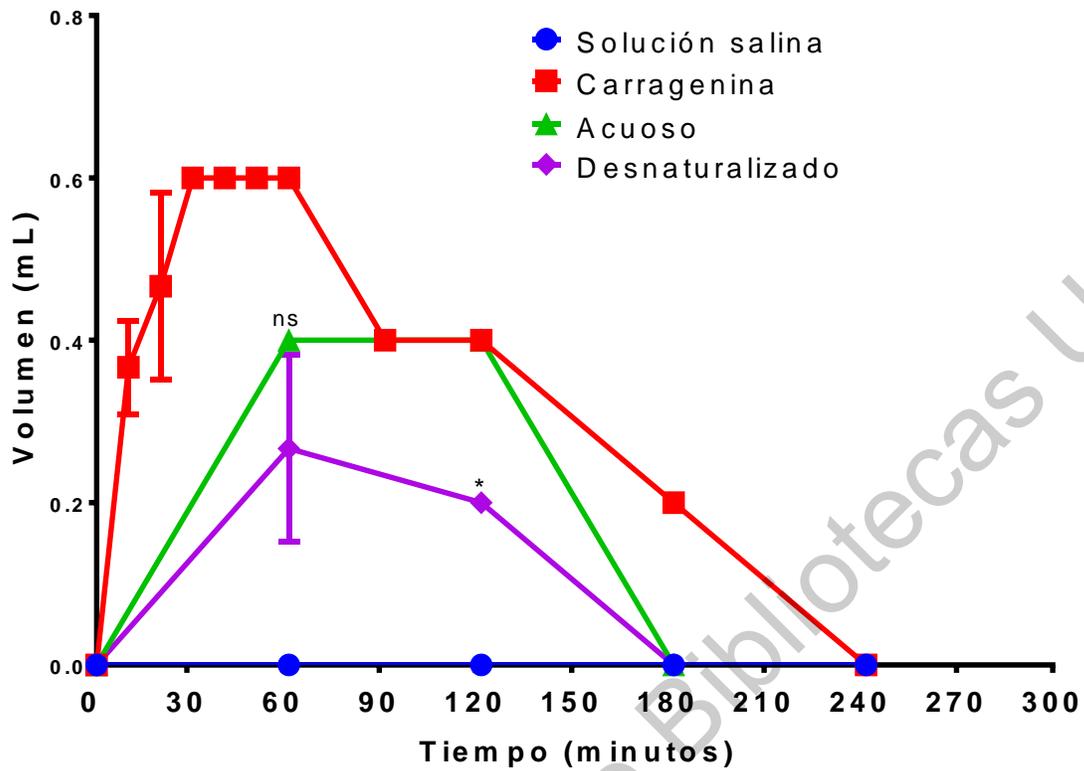


Figura 12. Evaluación de la actividad inflamatoria mediante el ensayo de edema plantar del extracto acuoso y desnaturalizado del extracto acuoso de la zona de la campana de *Carybdea marsupialis* en ratas a una dosis de 40  $\mu$ g de proteína/pata. Los niveles de inflamación se calcularon mediante la medición del volumen generado por el edema.  
 \* Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el extracto acuoso; ns, diferencia no significativa.

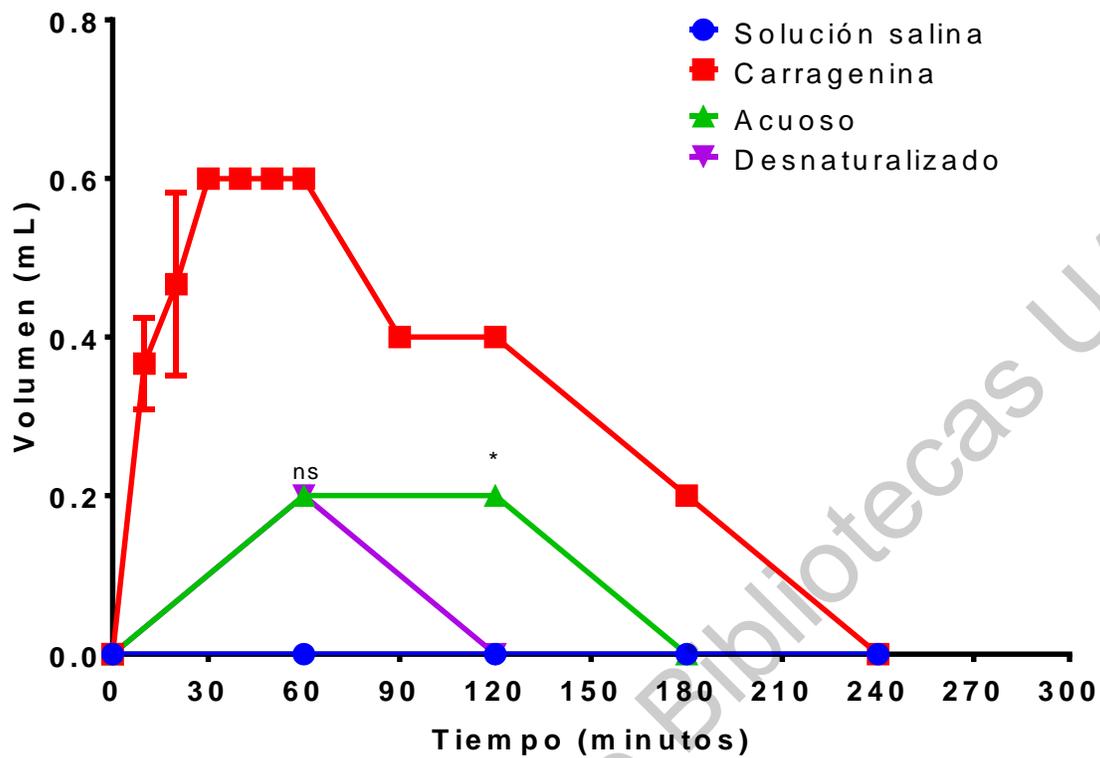


Figura 13. Evaluación de la actividad inflamatoria mediante el ensayo de edema plantar del extracto acuoso y desnaturalizados de *Carybdea marsupialis* en ratas a una dosis de 40  $\mu$ g de proteína/pata. Los niveles de inflamación se calcularon mediante la medición del volumen generado por el edema.

\* Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el extracto acuoso; ns, diferencia no significativa.

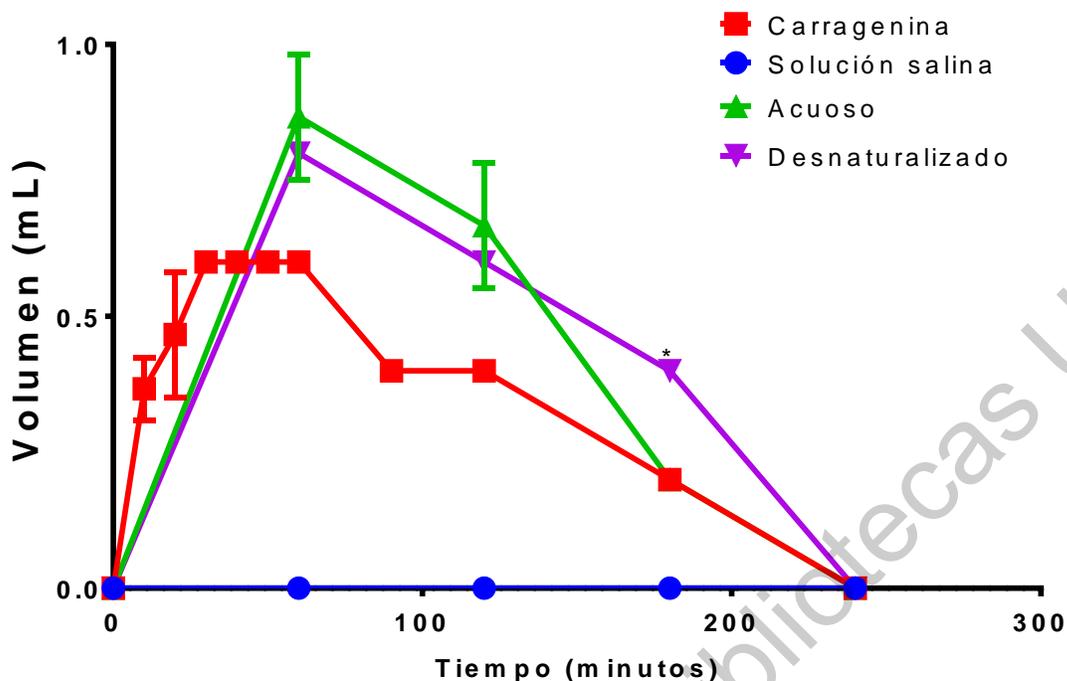


Figura 14. Evaluación de la actividad inflamatoria mediante el ensayo de edema plantar del extracto acuoso y desnaturalizados de *Palythoa caribaeorum* en ratas a una dosis de 40  $\mu$ g de proteína/pata. Los niveles de inflamación se calcularon mediante la medición del volumen generado por el edema.

\* Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el extracto acuoso; ns, diferencia no significativa.

### 8.3 Ultrafiltración

Se llevó a cabo la ultrafiltración de los extractos acuosos de las especies de cnidarios *C. marsupialis*, *P. caribaeorum* y *S. helianthus* usando dispositivos con un corte nominal de peso molecular de 10 kDa. Posteriormente, se cuantificó el contenido proteínico de cada fracción por el método de Bradford (Cuadro 3). Se obtuvo que la fracción de alto peso molecular del extracto proveniente de *S. helianthus* fue quien presentó una mayor concentración de proteína.

Cuadro 3. Determinación de proteína de las fracciones de los extractos acuosos mediante método Bradford.

Especie	µg proteína/mg de extracto liofilizado
<i>Carybdea marsupialis</i> camp	
Fracción >10 kDa	25.76
Fracción <10 kDa	0
<i>Palythoa caribaeorum</i>	
Fracción >10 kDa	21.71
Fracción <10 kDa	5.91
<i>Stichodactyla helianthus</i>	
Fracción >10 kDa	292.52
Fracción <10 kDa	1.22

#### 8.4 Perfil electroforético por SDS-PAGE de los extractos y fracciones

Los extractos acuosos y fracciones de alto peso molecular (>10 kDa) y bajo peso molecular (<10 kDa) de las especies de *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla helianthus* se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras y no reductoras.

En la Figura 15 se presenta el gel SDS-PAGE (12% acrilamida) del extracto y fracciones de alto y bajo peso molecular de *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla helianthus* (10 µg de proteína) en condiciones no reductoras. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de amplio rango, el carril 2 corresponde al extracto de *Palythoa caribaeorum*. Se observan bandas que tienen un peso molecular estimado entre 10 kDa y 200 kDa, en el carril 3 se observa las bandas correspondientes a la fracción de alto peso molecular (>10 kDa), las cuales tienen un peso estimado entre 10 kDa y 200 kDa. El carril 4 pertenece a la fracción de bajo peso molecular (<10 kDa) de *Palythoa caribaeorum*, se observa una sola banda con

un peso molecular estimado en 50 kDa. En el carril 5 se ubica el extracto de *Stichodactyla helianthus*, donde se aprecian bandas con un peso molecular estimado entre 10 kDa y 200 kDa. En el carril 6 está la fracción de alto peso molecular (>10 kDa), se aprecian bandas con un peso molecular estimado de 10 kDa y 200 kDa. Finalmente, el carril 7 pertenece a la fracción de bajo peso molecular (<10 kDa) de *Stichodactyla helianthus*, en este carril no se aprecia ninguna banda.

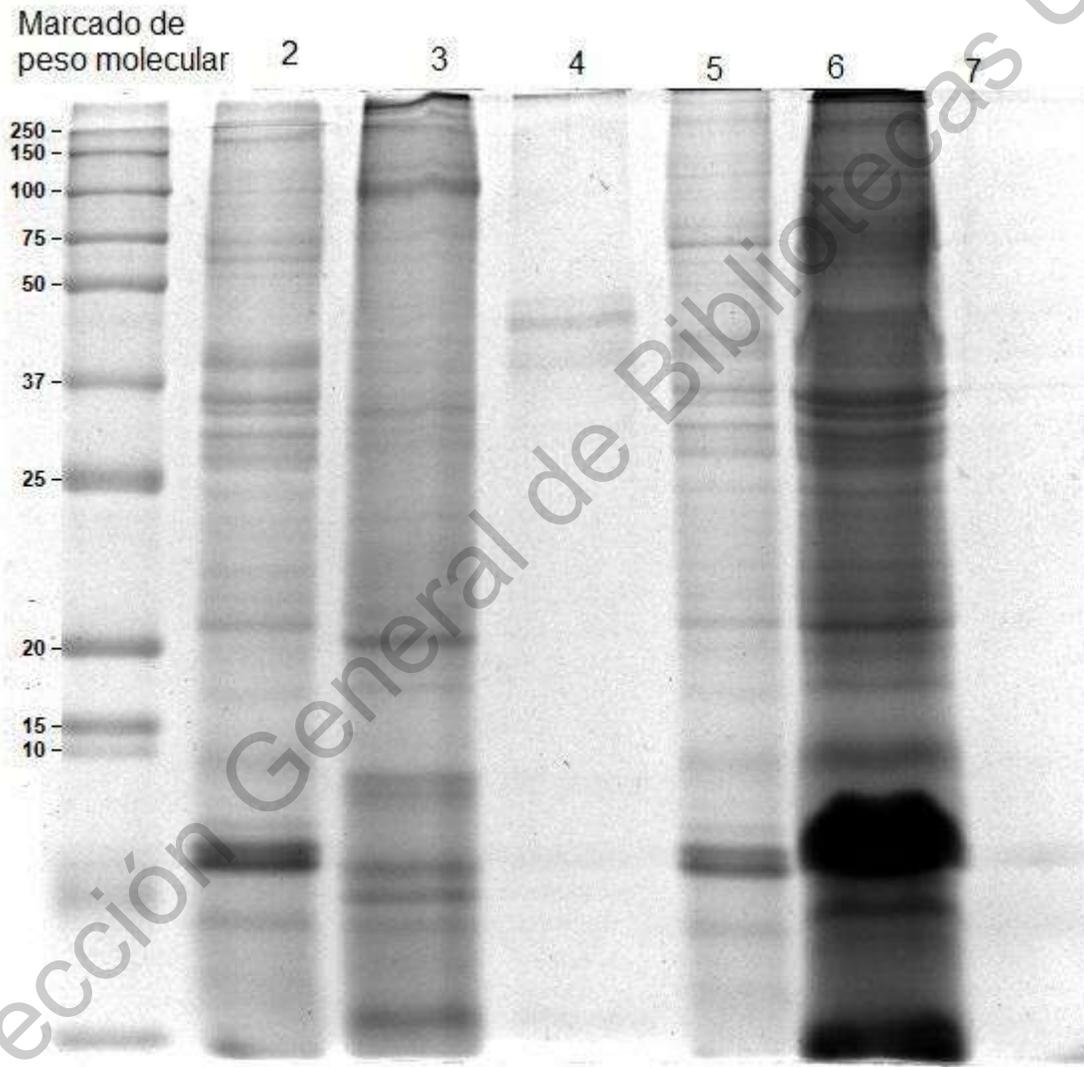


Figura 15. Gel SDS-PAGE (12% acrilamida) del extracto y fracciones de alto y bajo peso molecular de *P. caribaeorum* y *S. helianthus* (10 µg de proteína) en condiciones no reductoras. En el carril 2 se observa el extracto de *P. caribaeorum*, carril 3 fracción de alto peso molecular (>10 kDa) y carril 4 fracción de bajo peso molecular (<10 kDa) de *P. caribaeorum*, carril 5 extracto de *S. helianthus*, carril 6 fracción de alto peso molecular (>10 kDa) y carril 7 fracción de bajo peso molecular (<10 kDa) de *S. helianthus*.

En la Figura 16 se presenta el gel SDS-PAGE (12% acrilamida) del extracto y fracciones de alto y bajo peso molecular de *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla helianthus* (10 µg de proteína) en condiciones reductoras, usando β-mercaptoetanol como agente reductor. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de amplio rango, el carril 2 corresponde al extracto de *Palythoa caribaeorum*, se observan bandas que tienen un peso molecular estimado entre 10 kDa y 200 kDa, en el carril 3 se observa dos bandas correspondientes a la fracción de alto peso molecular (>10 kDa), las cuales tienen un peso estimado entre 30 kDa y 40 kDa, el carril 4 pertenece a la fracción de bajo peso molecular (<10 kDa) de *Palythoa caribaeorum*, se observa una sola banda con un peso molecular estimado de 40 kDa; en el carril 5 se ubica el extracto de *Stichodactyla helianthus*, donde se aprecian bandas con un peso molecular estimado entre 10 kDa y 200 kDa, en el carril 6 está la fracción de alto peso molecular (>10 kDa), se aprecian bandas con un peso molecular estimado de 10 kDa y 200 kDa; finalmente el carril 7 pertenece a la fracción de bajo peso molecular (<10 kDa) de *Stichodactyla helianthus*, en este carril se aprecia una banda con peso estimado menor a 10 kDa.

En la Figura 17 se presenta el gel SDS-PAGE (12% acrilamida) del extracto de *Carybdea marsupialis* y fracciones de alto y bajo peso molecular del extracto perteneciente a la campana de *C. marsupialis* (10 µg de proteína) en condiciones no reductoras y reductoras, usando β-mercaptoetanol como agente reductor. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de amplio rango, los carriles 2 y 3 corresponde al extracto de *C. marsupialis* en condiciones no reductoras y reductoras respectivamente, se observan bandas que tienen un peso molecular estimado entre 20 kDa y 140 kDa, los carriles 4 y 5 corresponden a la fracción de alto peso molecular (>10 kDa) del extracto perteneciente a la zona de la campana de *C. marsupialis*, se observan 6 bandas con un peso estimado entre 20 kDa y 140 kDa, en los carriles 6 y 7 pertenecientes a la fracción de bajo peso molecular (<10 kDa) de la zona de la campana de *C. marsupialis*, no se aprecia ninguna banda.

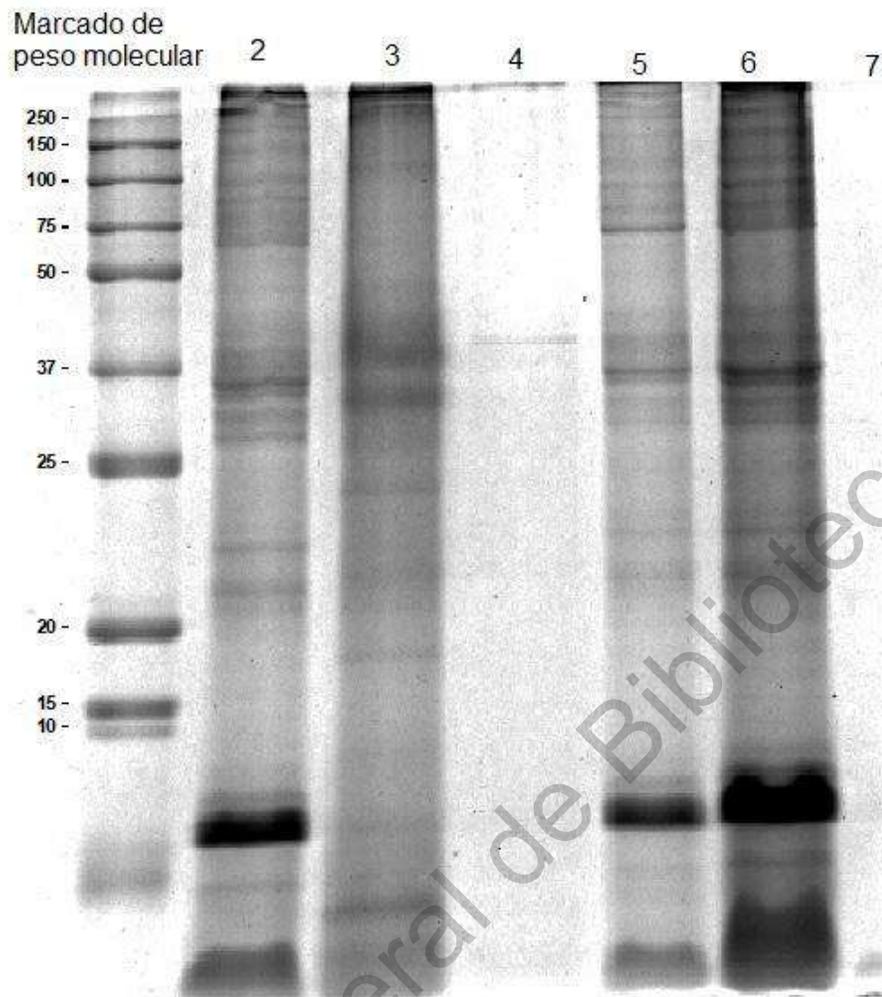


Figura 16. Gel SDS-PAGE (12% acrilamida) del extracto y fracciones de alto y bajo peso molecular de *P. caribaeorum* y *S. helianthus* (10  $\mu$ g de proteína) en condiciones reductoras. En el carril 2 se observa el extracto de *P. caribaeorum*, carril 3 fracción de alto peso molecular (>10 kDa) y carril 4 fracción de bajo peso molecular (<10 kDa) de *P. caribaeorum*, carril 5 extracto de *S. helianthus*, carril 6 fracción de alto peso molecular (>10 kDa) y carril 7 fracción de bajo peso molecular (<10 kDa) de *S. helianthus*.

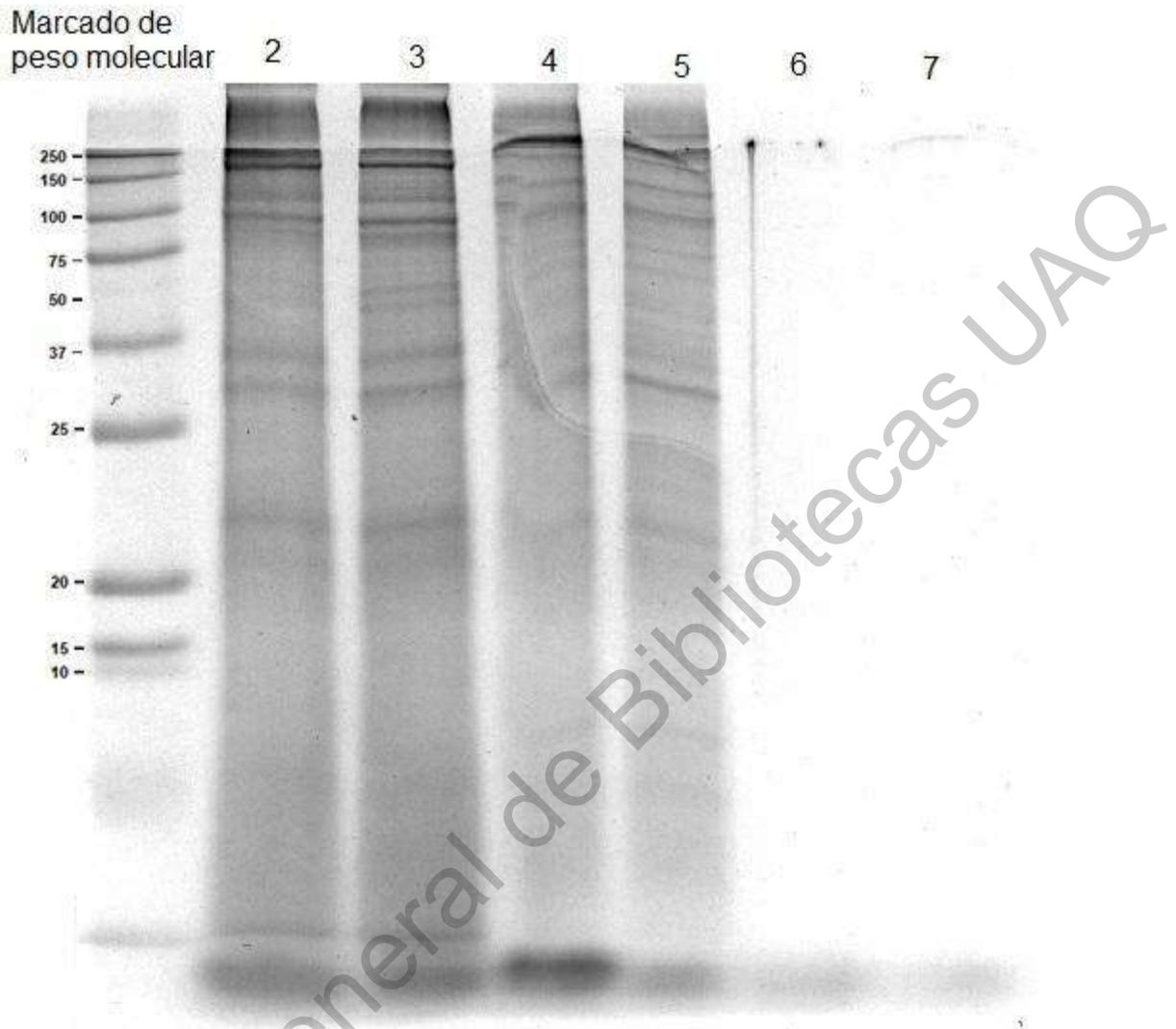


Figura 17. Gel SDS-PAGE (12% acrilamida) del extracto completo de *C. marsupialis* y fracciones de alto y bajo peso molecular de la zona de la campana (10  $\mu$ g de proteína) en condiciones reductoras y no reductoras. En el carril 2 y 3 se observan el extracto completo de *C. marsupialis* en condiciones no reductoras y reductoras, carriles 4 y 5 fracción de alto peso molecular (>10 kDa) perteneciente a la zona de la campana de *C. marsupialis* en condiciones no reductoras y reductoras, en los carriles 6 y 7 fracción de bajo peso molecular (<10 kDa) de perteneciente a la zona de la campana de *C. marsupialis* en condiciones no reductoras y reductoras.

### 8.5 Evaluación de la actividad nociceptiva y edematogénica de las fracciones de los extractos.

Debido al rendimiento de los extractos, solo fue posible evaluar una especie. En la Figura 18 se presentan los resultados de las fases 1 y 2 del efecto generado por el extracto crudo y desnaturalizado perteneciente a la zona de la campana de *Carybdea marsupialis*, así como la fracción de alto peso y bajo peso molecular; se observa que ninguna de las fracciones produjo una respuesta nociceptiva.

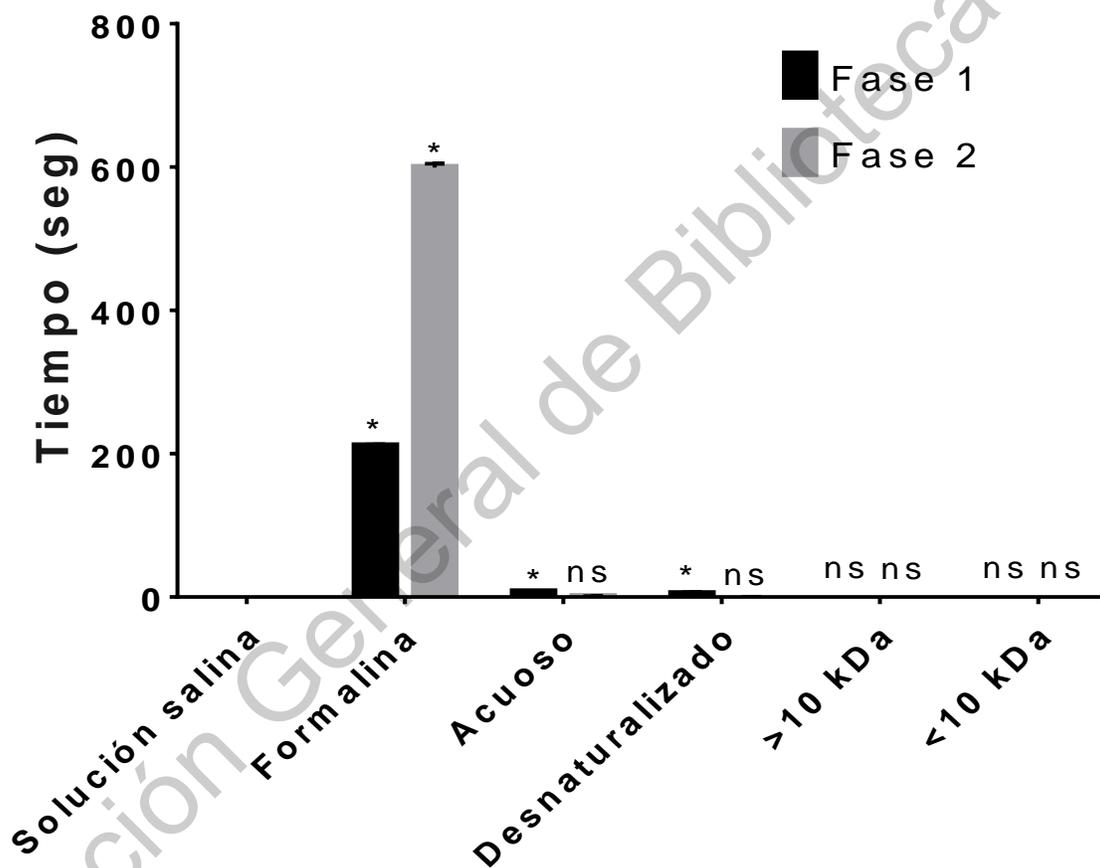


Figura 18. Prueba de formalina para evaluar la actividad nociceptiva del extracto acuoso, desnaturalizado y fracciones de alto y bajo peso molecular perteneciente a la zona de la campana de la especie *Carybdea marsupialis* en ratas a una dosis de 40  $\mu$ g de proteína/pata. El comportamiento nociceptivo en la fase 1 (0–10 min después de la inyección) y en la fase 2 (10–50 min después de la inyección) se cuantificó como la cantidad de tiempo que pasó lamiendo, sacudiendo y levantando la pata.

\* Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control negativo inyectado con solución salina mediante una prueba de Dunnett; ns, no significativo.

Finalmente, en la Figura 19 se presentan los resultados de la actividad edematogénica generado por el extracto crudo y desnaturalizado perteneciente a la zona de la campana de *Carybdea marsupialis*, así como la fracción de alto y bajo peso molecular; se aprecia que la fracción de bajo peso molecular no indujo inflamación, así mismo, la fracción de alto peso molecular indujo un nivel similar al extracto crudo y desnaturalizado durante la primera hora posterior a su administración.

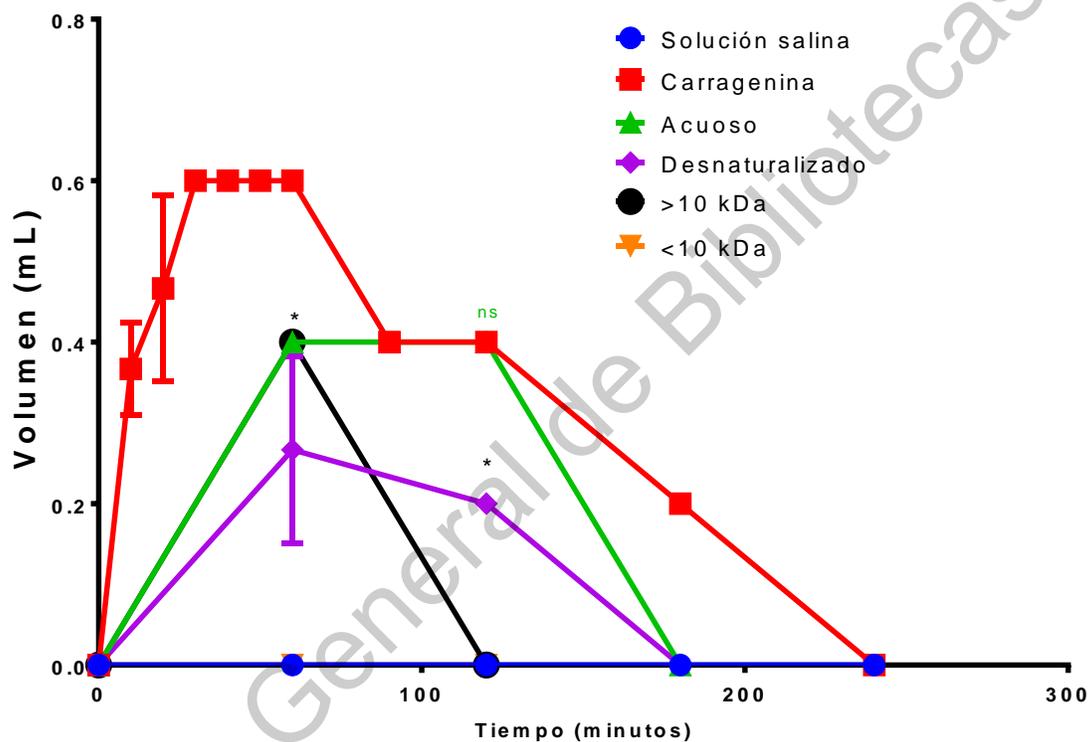


Figura 19. Evaluación de la actividad inflamatoria mediante el ensayo de edema plantar del extracto acuoso, desnaturalizado y fracciones de alto y bajo peso molecular perteneciente a la zona de la campana de la especie *Carybdea marsupialis* en ratas a una dosis de 40  $\mu$ g de proteína/pata. Los niveles de inflamación se calcularon mediante la medición del volumen generado por el edema.

\* Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control positivo inyectado con carragenina usando solución salina como vehículo; ns, no significativo.

## 9 DISCUSIÓN

Las cnidarios son organismos acuáticos venenosos que suelen producir diferentes grados de toxicidad que varían dependiendo de la especie y de la susceptibilidad de la víctima (Tezcan & Gözer, 2015). La generación de información que contribuya a una mejor comprensión de los efectos y mecanismos de toxicidad de todos los cnidarios, meta que requiere de la colaboración de distintas disciplinas, constituye un primer avance para el futuro desarrollo de terapias adecuadas para tratar las intoxicaciones causadas por cnidarios en humanos. Gran parte de los estudios de toxicidad de cnidarios se enfocan principalmente en especies que causan un alto grado de toxicidad, dejando a un lado a las especies de toxicidad baja y media que también podrían aportar información valiosa. Considerando esto, este estudio se enfocó en la evaluación del efecto nociceptivo e inflamatorio de los extractos acuosos de tres especies representativas de diferentes tipos de cnidarios que se encuentran habitualmente en el Caribe mexicano: *Carybdea marsupialis*, *Palythoa caribaeorum* y *Stichodactyla helianthus*. Se reportaron los efectos biológicos relacionados a concentraciones de proteína debido a que se sabe que los venenos de cnidarios están compuestos principalmente por péptidos y proteínas (Turk & Kem, 2009). Sin embargo, las actividades biológicas podrían estar relacionadas con algunos metabolitos secundarios y componentes no peptídicos presentes en los extractos, por lo cual se reportó el rendimiento de proteína por mg de polvo liofilizado. Es importante mencionar que las variaciones en los rendimientos pueden deberse a las características morfológicas de cada especie y a las variaciones en los métodos de extracción que dependen también de las características de la especie.

Debido a que el dolor es uno de los principales síntomas tras la intoxicación por contacto con cnidarios, este estudio se enfocó en evaluar por primera vez la capacidad de los extractos de *C. marsupialis*, *P. caribaeorum* y *S. helianthus* para generar nocicepción en ratas. Como resultado de esta evaluación, se observó que los tres extractos crudos inducen nocicepción; siendo el extracto de *P. caribaeorum* el que mostró un efecto mayor durante la fase neurogénica del dolor (fase 1) en

comparación con los otros extractos que indujeron una respuesta nociceptiva significativamente menor. Durante la fase inflamatoria (fase 2), el extracto de *P. caribaeorum* fue el único que presentó actividad nociceptiva. En un estudio previo, se evaluó el efecto nociceptivo de los extractos acuosos de tres corales escleractíneos del Caribe mexicano mediante el ensayo de formalina en el que se encontró que éstos tienen respuestas nociceptivas significativas durante la fase neurogénica (García-Arredondo et al., 2016). El conjunto de estos resultados sugiere que los extractos de los cnidarios, independientemente de la capacidad de sus nematocistos para inyectar el veneno, podrían contener toxinas que generan respuestas nociceptivas neurogénicas en mayor o menor grado.

Estudios previos han reportado que las especies del género *Carybdea* producen niveles altos del dolor (Killi & Mariottini, 2018), no obstante Bordehore et al., (2015) han reportado la picadura de *Carybdea marsupialis* como indolora. Sin embargo, hasta el momento no se conocen reportes de dolor causado por especies del género *Palythoa*, sólo se sabe de algunos casos de dermatitis y lesiones en la piel humana que se han asociado a la presencia de palitoxina, un compuesto químico polihidroxiado altamente tóxico que se ha encontrado en algunos corales blandos y especies del género *Palythoa* (Tartaglione et al., 2016). Con respecto a las especies del género *Stichodactyla* tampoco se conocen casos de dolor asociados a intoxicación en humanos por especies de este género, pero se sabe que la toxina gigantoxina I, aislada de *Stichodactyla gigantea*, activa de manera indirecta al receptor vainilloide con potencial del transitorio 1 (TRPV1) (Cuypers et al., 2011). De manera general se conoce poco sobre los mecanismos de acción involucrados en la generación de dolor de los venenos de los cnidarios, se ha reportado que el receptor TRPV1 y los canales iónicos sensibles a ácidos (ASIC) presentes en neuronas nociceptivas son un componente clave en la vía de transducción del dolor generado por las intoxicaciones de cnidarios (Cuypers et al., 2006, 2011). También se sabe que los componentes bioactivos no proteínicos como la serotonina o la histamina presentes en los venenos de cnidarios producen un dolor agudo mediante la activación de los receptores 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Jouiaei et al., 2015).

Como se mencionó anteriormente, se sabe que los venenos de cnidarios están compuestos principalmente por péptidos y proteínas (Turk & Kem, 2009), por lo que es probable que los compuestos responsables de la actividad nociceptiva presentes en los extractos de las especies que se evaluaron en este estudio sean péptidos o proteínas susceptibles a la desnaturalización térmica y a la consiguiente pérdida de actividad biológica como usualmente ocurre con otras toxinas comunes de cnidarios como las citolisinas (García-Arredondo et al., 2014). Con la finalidad de determinar la estabilidad de la actividad biológica de las toxinas responsables de la actividad nociceptiva de los extractos ante la desnaturalización térmica, los extractos se incubaron a ebullición y posteriormente se evaluó su actividad mediante el ensayo de la formalina. Los resultados mostraron que la actividad nociceptiva del extracto de *S. helianthus* se perdió y del extracto de *P. caribaeorum* disminuyó después del tratamiento térmico en ambas fases, sugiriendo una alta probabilidad de que los compuestos responsables de la actividad nociceptiva provocada por estos extractos son péptidos o proteínas termolábiles. En el caso del extracto de *C. marsupialis* ocurrió un comportamiento diferente en su actividad biológica después del tratamiento térmico, ya que el extracto completo sin tratamiento no produjo actividad nociceptiva, pero después del tratamiento térmico sí indujo actividad nociceptiva en la fase neurogénica. Una posible explicación para este comportamiento podría ser la presencia de una combinación de compuestos analgésicos termolábiles y toxinas nociceptivas termoestables en el extracto de *C. marsupialis*. La presencia de toxinas proteínicas con efecto analgésico en extractos de cnidarios ya se ha reportado anteriormente; por ejemplo, el péptido de 29 aminoácidos Ugr 9-1, aislado de la anémona *Urticina grebelnyi*, produce un efecto inhibitorio de los receptores ASIC tipo 3 y disminuye significativamente el efecto nociceptivo e inflamatorio inducido en ratones (Osmakov et al., 2013).

Además del efecto nociceptivo, una característica común después del contacto con cnidarios suele ser la presencia de una respuesta inflamatoria (Haddad et al., 2010). En este estudio, los resultados de la evaluación de la actividad edematogénica mostraron que los extractos de las tres especies indujeron inflamación, siendo el extracto de *P. caribaeorum* fue el que indujo un mayor nivel de inflamación, incluso

superior al inducido por la carragenina, seguido del extracto de *S. helianthus* y de *C. marsupialis*. La información sobre la evaluación de la actividad edematogénica de los cnidarios es escasa, sólo un estudio sugiere que la actividad edematogénica de los cnidarios está asociada principalmente a enzimas con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>; por ejemplo, dos toxinas aisladas de la anémona *Anthothoe chilensis* con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>, anch TX-I y Anch TX-II, fueron capaces de inducir edema de una manera dependiente de la dosis en un modelo de edema plantar en ratas (Landucci et al., 2012). En venenos de serpiente, también se ha evidenciado la relación entre la actividad edematogénica con toxinas con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (Maung-Maung-Thwin et al., 1995). De ser cierto esto, es probable que la actividad edematogénica de los cnidarios se disminuya drásticamente tras el tratamiento térmico, ya que la actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> de los cnidarios es termolabil (García-Arredondo et al., 2015). Para comprobar esto, se evaluó la actividad edematogénica de los extractos después de someterlos a un tratamiento térmico para desnaturalizar el contenido proteínico. Los resultados mostraron que efectivamente el tratamiento térmico provoca una disminución de la actividad edematogénica de los extractos después de este tratamiento, sin embargo, el extracto de *P. caribaeorum* mantuvo niveles similares al extracto crudo. Un dato interesante de este estudio es el hecho de que la actividad edematogénica podría no estar relacionada con el efecto nociceptivo, ya que, aunque algunos extractos no generan dolor, estos sí generan inflamación. Es conocido que durante la respuesta inflamatoria se pueden activar los receptores de reconocimiento de patrones presentes en los mastocitos por las aminas o lípidos bioactivos presentes en los venenos; por los componentes del tubo del nematocisto o del veneno y por cambios físicos (hiposmolaridad, acidificación, especies reactivas de oxígeno) en el sitio de la picadura (Tibballs et al., 2012).

De manera preliminar, se realizó una separación de los extractos en dos fracciones mediante ultrafiltración. De esta manera se obtuvo una fracción catalogada como de alto peso molecular (>10 kDa) y otra de bajo peso molecular (<10 kDa). El extracto de *P. caribaeorum* contenía en su mayoría compuestos de bajo peso molecular. Sin embargo, debe de considerarse que las sales presentes en los

extractos acuosos se quedan retenidos principalmente en esta fracción, aportando así un porcentaje en la masa total de la fracción. Los extractos provenientes a la campana de *C. marsupialis* y *S. helianthus* las moléculas que predominan son las de alto peso molecular. Al realizar la cuantificación de proteína, se encontró que el extracto de *C. marsupialis* en la fracción de bajo peso molecular no había proteínas, mientras que en los extractos de *P. caribaeorum* y *S. helianthus* las concentraciones eran de 5.9 µg proteína/mg de extracto y 1.2 µg proteína/mg de extracto respectivamente. Encontrando una mayor concentración de proteína en las fracciones de alto peso molecular, sin embargo, el extracto de *S. helianthus* fue el que mayor cantidad presento tanto en el extracto crudo como en la fracción de alto peso molecular.

El perfil proteínico obtenido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE del extracto acuoso de *Palythoa caribaeorum* bajo condiciones no reductoras mostro la presencia de bandas con pesos moleculares mayores a 30 kDa, por lo que se puede encontrar en este rango la fosfolipasa reportada por Cuevas-Cruz et al., (2019), así mismo se detectan bandas con pesos moleculares menores a 10 kDa. Sin embargo, en el perfil de la fracción de alto peso molecular (>10 kDa) se observan cinco bandas con pesos aproximados a 20 kDa, 33 kDa, 104 kDa y 128 kDa, además, se observa un aumento en el número de bandas con pesos moleculares a 10 kDa, por lo que se podría asumir que corresponden a subunidades monoméricas de las proteínas que durante el proceso de ultrafiltración pudieran perder su conformación tridimensional. No obstante, en el perfil obtenido bajo condiciones reductoras de la fracción de alto peso molecular, se observan bandas con pesos aproximados a 39 kDa y 33 kDa y una banda con un peso menor a 10 kDa. En el perfil de la fracción de bajo peso molecular (<10 kDa) se aprecia solo una banda con un peso de 45 kDa, mientras que en el perfil bajo condiciones reductoras se presenta una banda con un peso de 40 kDa.

Para el perfil proteínico de *Stichodactyla helianthus*, se aprecia una banda con peso molecular aproximados a 20 kDa, lo cual es consistente con lo reportado por Gómez et al., (1989) perteneciente a las citolisinas, además se observan otras bandas con

pesos entre 30 kDa y 120 kDa. En el perfil correspondiente a la fracción de alto peso molecular bajo condiciones reductivas y no reductivas se aprecian bandas en el mismo rango antes mencionado, finalmente en el perfil de la fracción de bajo peso molecular no se aprecian bandas en ambas condiciones. Finalmente, en el perfil proteínico de *Carybdea marsupialis* se aprecian bandas con pesos moleculares estimados entre 22 y 150 kDa, dentro de este rango se encuentran una neurotoxina que tiene un peso molecular aparente de 120 kDa (Sánchez-Rodríguez et al., 2006) y tres citolisinas con pesos de 220, 139 y 36 kDa (Brinkman y Burnell, 2008). mientras que en la fracción de alto peso molecular perteneciente a la zona de la campana se observa la ausencia de algunas bandas en comparación con el extracto completo de dicha especie, por otra parte, en la fracción de bajo peso molecular no se presenta ninguna banda, esto es consistente con los resultados obtenidos de la cuantificación de proteína.

Debido a los rendimientos de los extractos, solo fue posible realizar la evaluación nociceptiva e inflamatoria de las fracciones de alto y bajo peso molecular del extracto proveniente de la zona de la campana de *C. marsupialis*, se observó que ninguna fracción genero dolor; por otra parte, en la actividad edematogénica, la fracción de alto peso molecular fue quien indujo inflamación, lo que podría indicar que las moléculas responsables de la inflamación en mayor medida se encuentran en esta fracción. La actividad inflamatoria podría atribuirse a la presencia de compuestos de alto peso molecular. Podrían ser citolisinas las responsables de este efecto al degradar el enlace éster de los glicerofosfolípidos de las células, desencadenando así una respuesta inflamatoria (Cuevas-Cruz et al., 2019).

## 10 CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, los cnidarios *C. marsupialis*, *P. caribaeorum* y *S. helianthus* contienen toxinas de origen proteínico capaces de causar dolor y/o inflamación en modelos *in vivo*; sin embargo, son respuestas que al parecer no están relacionadas con el mismo tipo de componentes, ya que los extractos de *C. marsupialis* y *S. helianthus* a pesar de no haber mostrado respuesta nociceptiva si presentaron una respuesta inflamatoria. Por otra parte, *P. caribaeorum* presento una respuesta nociceptiva e inflamatoria mayor en comparación con las otras dos especies.

*C. marsupialis* podría presentar compuestos termolábiles capaces de generar analgesia y compuestos termoestables que inducen dolor.

Los compuestos de origen no proteínico de *P. caribaeorum* inducen niveles de inflamación, ya que, al desnaturalizar el extracto, el efecto no se perdió. Sin embargo, las toxinas responsables del efecto nociceptivo no son termoestables, ya que al desnaturalizarlas se pierde el efecto.

El presente estudio tiene las siguientes limitaciones: hace falta evaluar la actividad nociceptiva e inflamatoria de las fracciones obtenidas de los extractos acuosos de *P. caribaeorum* y *S. helianthus*, para posteriormente poder indagar sobre el peso molecular de los componentes responsables de estas actividades y en un futuro establecer un diseño experimental adecuado para purificar e identificar dichos componentes.

## 11 REFERENCIAS

Acevedo, M. J., Straehler-Pohl, I., Morandini, A. C., Stampar, S. N., Bentlage, B., Matsumoto, G. I., Yanagihara, A., Toshino, S., Bordehore, C., y Fuentes, V. L. (2019). Revision of the genus *Carybdea* (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeidae): Clarifying the identity of its type species *Carybdea marsupialis*. En *Zootaxa*, 4543, 515–548. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4543.4.3>

Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041>

Beckmann, A., y Özbek, S. (2012). The nematocyst: A molecular map of the cnidarian stinging organelle. *International Journal of Developmental Biology*, 56, 577–582. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113472ab>

Bordehore, C., Nogué, S., Gili, J. M., Acevedo, M. J., y Fuentes, V. L. (2015). *Carybdea marsupialis* (Cubozoa) in the mediterranean sea: The first case of a sting causing cutaneous and systemic manifestations. *Journal of Travel Medicine*, 22, 61–63. <https://doi.org/10.1111/jtm.12153>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brinkman, D., y Burnell, J. (2008). Partial purification of cytolytic venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, 51, 853–863. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.12.017>

Burgess, P. R., y Perl, E. R. (1967). Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *The Journal of Physiology*, 190, 541–562. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1967.sp008227>

Castañeda, O., y Harvey, A. L. (2009). Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. *Toxicon*, *54*, 1119–1124. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.032>

Cuevas-Cruz, M., Lazcano-Pérez, F., Hernández-Guzmán, U., de la Vega-Castañeda, K. H. D., Román-González, S. A., Valdez-Cruz, N. A., Velasco-Bejarano, B., Colín-González, A. L., Santamaría, A., Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., y Arreguín-Espinosa, R. (2019). A novel phospholipase A2 isolated from palythoa caribaeorum possesses neurotoxic activity. *Toxins*, *11*, 1–13. <https://doi.org/10.3390/toxins11020089>

Cuypers, E., Peigneur, S., Debaveye, S., Shiomi, K., y Tytgat, J. (2011). TRPV1 channel as new target for marine toxins: Example of gigantoxin I, a sea anemone toxin acting via modulation of the PLA2 pathway. *Acta Chimica Slovenica*, *58*, 735–741.

Cuypers, E., Yanagihara, A., Karlsson, E., y Tytgat, J. (2006). Jellyfish and other cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels. *FEBS Letters*, *580*, 5728–5732. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.030>

De Alencar, D. B., Melo, A. A., Silva, G. C., Lima, R. L., Pires-Cavalcante, K. M. S., Carneiro, R. F., Rabelo, A. S., Sousa, O. V., Vieira, R. H. S. F., Viana, F. A., Sampaio, A. H., y Saker-Sampaio, S. (2015). Antioxidant, hemolytic, antimicrobial, and cytotoxic activities of the tropical Atlantic marine zoanthid *Palythoa caribaeorum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *87*, 1113–1123. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140370>

Dubuisson, D., y Dennis, S. G. (1977). The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, *4*, 161–174. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(77\)90130-0](https://doi.org/10.1016/0304-3959(77)90130-0)

Eming, S. A., Wynn, T. A., y Martin, P. (2017). Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science*, 356, 1026–1030.

<https://doi.org/10.1126/science.aam7928>

Frazão, B., Vasconcelos, V., y Antunes, A. (2012). Sea anemone (cnidaria, anthozoa, actiniaria) toxins: An overview. *Marine Drugs*.

<https://doi.org/10.3390/md10081812>

García-Arredondo, A., Murillo-Esquivel, L. J., Rojas, A., y Sanchez-Rodriguez, J. (2014). Characteristics of hemolytic activity induced by the aqueous extract of the Mexican fire coral *Millepora complanata*. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 20, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-49>

García-Arredondo, A., Rojas-Molina, A., Bah, M., Ibarra-Alvarado, C., Gallegos-Corona, M. A., y García-Servín, M. (2015). Systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora complanata* and partial purification of thermostable neurotoxins with lethal effects in mice. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 169, 55–64.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.12.004>

García-Arredondo, A., Rojas-Molina, A., Ibarra-Alvarado, C., Lazcano-Pérez, F., Arreguín-Espinosa, R., & Sánchez-Rodríguez, J. (2016). Composition and biological activities of the aqueous extracts of three scleractinian corals from the Mexican Caribbean: *Pseudodiploria strigosa*, *Porites astreoides* and *Siderastrea siderea*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 22, 32.

<https://doi.org/10.1186/s40409-016-0087-2>

García de Lorenzo Mateos, A., López Martínez, J., & Sánchez Castilla, M. (2013). Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Medicina Intensiva*, 24, 353–360. [https://doi.org/10.1016/s0210-5691\(00\)79622-7](https://doi.org/10.1016/s0210-5691(00)79622-7)

Greene, S. (2017). Cnidaria Envenomation. *Medscape*, 1–11.

<http://emedicine.medscape.com/article/769538-overview>

Haddad, V., Da Silveira, F. L., y Migotto, Á. E. (2010). Skin lesions in envenoming by cnidarians (Portuguese man-of-war and jellyfish): Etiology and severity of accidents on the Brazilian coast. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 52, 47–50. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000100009>

Jami, S., Erickson, A., Brierley, S. M., y Vetter, I. (2018). Pain-causing venom peptides: Insights into sensory neuron pharmacology. *Toxins*, 10, 1–15. <https://doi.org/10.3390/toxins10010015>

Jouiaei, M., Yanagihara, A. A., Madio, B., Nevalainen, T. J., Alewood, P. F., Fry, B. G. (2015). Ancient venom systems: A review on cnidaria toxins. *Toxins*, 7, 2251–2271. <https://doi.org/10.3390/toxins7062251>

Kayal, E., Bentlage, B., Sabrina Pankey, M., Ohdera, A. H., Medina, M., Plachetzki, D. C., Collins, A. G., y Ryan, J. F. (2018). Phylogenomics provides a robust topology of the major cnidarian lineages and insights on the origins of key organismal traits. *BMC Evolutionary Biology*, 18, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1142-0>

Killi, N., y Mariottini, G. L. (2018). Cnidarian Jellyfish: Ecological Aspects, Nematocyst Isolation, and Treatment Methods of Sting. En *Results and Problems in Cell Differentiation*, 65. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92486-1\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92486-1_21)

Kitatani, R., Yamada, M., Kamio, M., y Nagai, H. (2015). Length is associated with pain: Jellyfish with painful sting have longer nematocyst tubules than harmless jellyfish. *PLoS ONE*, 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135015>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Landucci, E. C. T., Dias, Q. C., Marangoni, F. A., Vilca-Quispe, A., Valeriano-Zapana, J. A., Torres-Huaco, F. D., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S., y Ponce-Soto, L. A. (2012). Purification and inflammatory edema induced by two PLA2 (Anch TX-I and Anch TX-II) from sea anemone *Anthothoe chilensis* (Actiniaria: Sagartiidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 161, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.11.003>

Lau, M. T., Manion, J., Littleboy, J. B., Oyston, L., Khuong, T. M., Wang, Q. P., Nguyen, D. T., Hesselson, D., Seymour, J. E., y Neely, G. G. (2019). Molecular dissection of box jellyfish venom cytotoxicity highlights an effective venom antidote. *Nature Communications*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09681-1>

Lazcano-Pérez, F., Arellano, R. O., Garay, E., Arreguín-Espinosa, R., y Sánchez-Rodríguez, J. (2017). Electrophysiological activity of a neurotoxic fraction from the venom of box jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 191, 177–182.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.10.010>

Lazcano-Pérez, F., Castro, H., Arenas, I., García, D. E., González-Muñoz, R., y Arreguín-Espinosa, R. (2016). Activity of *Palythoa caribaeorum* venom on voltage-gated ion channels in mammalian superior cervical ganglion neurons. *Toxins*, 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8050135>

León Regal, M., Alvarado Borges, A., De Armas Gardía, J., Miranda Alvarado, L., Varens Cerdeño, J., y Cuesta del Sol, J. (2016). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista Finlay*, 5, 47–62.

Manchen, M., Carlos, A., y Pazos, F. (2009). Toxicon Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: Their interaction with membranes. *Toxicon*, 54, 1135–1147.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.022>

Maung-Maung-Thwin, Gopalakrishnakone, P., Yuen, R., y Tan, C. H. (1995). A major lethal factor of the venom of Burmese Russell's viper (*Daboia russelli siamensis*): Isolation, n-terminal sequencing and biological activities of daboitoxin. *Toxicon*, 33, 63–76. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)00133-S](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)00133-S)

Mortari, M. R., do Couto, L. L., dos Anjos, L. C., Mourão, C. B. F., Camargos, T. S., Vargas, J. A. G., Oliveira, F. N., Gati, C. D. C., Schwartz, C. A., y Schwartz, E. F. (2012). Pharmacological characterization of *Synoeca cyanea* venom: An aggressive social wasp widely distributed in the Neotropical region. *Toxicon*, 59, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.002>

Necas, J., & Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: A review. *Veterinarni Medicina*, 58, 187–205. <https://doi.org/10.17221/6758-VETMED>

Norma Secretaria Del Trabajo y Previsión Social. (1998). NORMA Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas. *Diario Oficial de La Federación*, 1–11.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de La Federación*, 1–58.

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental -Salud ambiental- Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo. (2003). *Diario Oficial de La Federación*, 1, 1–12.

Osmakov, D. I., Kozlov, S. A., Andreev, Y. A., Koshelev, S. G., Sanamyan, N. P., Sanamyan, K. E., Dyachenko, I. A., Bondarenko, D. A., Murashev, A. N., Mineev, K. S., Arseniev, A. S., y Grishin, E. V. (2013). Sea anemone peptide with uncommon  $\beta$ -hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 288(32), 23116–23127.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.485516>

Özbek, S., Balasubramanian, P. G., y Holstein, T. W. (2009). Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon*, 54(8), 1038–1045.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.006>

Rottini, G., Gusmani, L., Parovel, E., Avian, M., y Patriarca, P. (1995). Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*.

*Toxicon*, 33, 315–326. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)00174-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)00174-7)

Sánchez-Rodríguez, J., Torrens, E., y Segura-Puertas, L. (2006). Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolytins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom. *Archives of Toxicology*, 80, 163–168.

<https://doi.org/10.1007/s00204-005-0023-7>

Sisco, M. (2019). Different Types of Pain. *Abd-Elsayed A. (eds) Pain. Springer, Cham*, 261–265. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-99124-5>

Smith, E. S. J., y Lewin, G. R. (2009). Nociceptors: a phylogenetic view. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, 195, 1089–1106. <https://doi.org/10.1007/s00359-009-0482-z>

Sneddon, L. U. (2018). Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology*, 33, 63–73. <https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2017>

Staggs, R., Pay, J. L., y Johns, S. (2020). *Cnidaria Toxicity*. 3–5.

Steele, R. E., David, C. N., y Technau, U. (2012). A genomic view of 500 million years of cnidarian evolution Robert. *Bone*, 23(1), 1–7.

<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Tartaglione, L., DellAversano, C., Mazzeo, A., Forino, M., Wieringa, A., y Ciminiello, P. (2016). Determination of Palytoxins in Soft Coral and Seawater from a Home Aquarium. Comparison between Palythoa- and Ostreopsis-Related Inhalatory Poisonings. *Environmental Science and Technology*, 50, 1023–1030.

<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05469>

Tezcan, Ö. D., y Gözer, Ö. (2015). Severe Toxic Skin Reaction Caused by a Common Anemone and Identification of the Culprit Organism. *Journal of Travel Medicine*, 22, 269–271. <https://doi.org/10.1111/jtm.12223>

Tibballs, J., A. Yanagihara, A., C. Turner, H., y Winkel, K. (2012). Immunological and Toxinological Responses to Jellyfish Stings. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 10, 438–446. <https://doi.org/10.2174/187152811797200650>

Turk, T., y Kem, W. R. (2009). The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.031>

Dirección General de Bibliotecas UAQ