



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE
EQUINODERMOS Y GORGÓNIDOS DE PUNTA
ARENA DE LA VENTANA, B. C. S., MÉXICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

FRANCISCO VARGAS BETANCOURT

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2014



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 26 del mes de Mayo del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE EQUINODERMOS Y GORGONIDOS
DE PUNTA ARENA DE LA VENTANA, B.C.S., MÉXICO"

Presentada por el alumno:

VARGAS

BETANCOURT

FRANCISCO

Apellido paterno

materno

nombre(s)

Con registro:

A	1	2	0	3	5	1
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis



DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO
Directora de Tesis



DRA. BARBARA GONZÁLEZ ACOSTA
2ª. Directora de Tesis



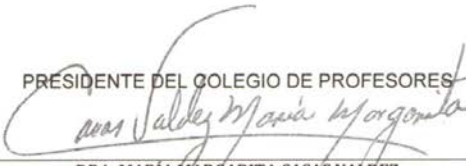
DRA. CHRISTINE JOHANNA BÁND SCHMIDT



DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ



DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 04 del mes junio del año 2014
el (la) que suscribe BM. FRANCISCO VARGAS BETANCOURT alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro A120351 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO Y DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA
y cede los derechos del trabajo titulado:

"POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE EQUINODERMOS Y GORGÓNIDOS
DE PUNTA ARENA DE LA VENTANA, B.C.S., MÉXICO"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: vicko13@gmail.com - cguerrer@ipn.mx - bgonzal@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


BM. FRANCISCO VARGAS BETANCOURT

nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas por haberme brindado la posibilidad de realizar este posgrado.

A CONACyT, por el apoyo económico otorgado durante mis estudios (443952). Al programa de beca Institucional de Posgrado. A las becas BEIFI (antes PIFI).

A mis directoras de tesis Dra. Claudia J. Hernández Guerrero y Dra. Bárbara González Acosta, por sus enseñanzas, su paciencia, su apoyo y amistad, los cuales fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al comité revisor, Dra. Christine Band Schmidt, Dr. Sergio Martínez Díaz y Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez, por formar parte del comité tutorial, por sus comentarios y observaciones a lo largo del camino.

Al Dr. José Borges y M. en C. Alejandra Chávez por su ayuda en las recolectas del material biológico y su grata compañía en las salidas de campo.

Un agradecimiento especial al M. en C. Antonio Nieto Camacho, del Laboratorio de Pruebas Biológicas, del Instituto de Química de la UNAM, quien me apoyó y enseñó durante la estancia de investigación bajo su dirección, quien además no sólo compartió su conocimiento, sino también su compañía y amenas conversaciones. A la M. en C. María Teresa Ramírez por su invaluable ayuda con las pruebas citotóxicas.

A mi esposa Karla toda mi gratitud y amor por su apoyo incondicional. Gracias a su ayuda profesional, ya que sin la cual me hubiese sido difícil continuar con mi trabajo. Por estar ahí al pie del cañón, por creer en mi.

Y por último y sin que sean menos importantes, a mis compañeros de laboratorio: Sonia, Ismael, Yessi, Cynthia, Noemí, César, Erika, Diana, Lina, Lalo, Román, Wanda, Conchita, Lucy, Liz, Erik y Carlos. Por el magnífico ambiente de trabajo, así como esas tardes de comida y baile, y también por sus consejos y motivación.

DEDICATORIA

Le dedico esta tesis a mi padres, Francisco Vargas Crivelli (†) y Silvia Betancourt quienes me enseñaron a trabajar y conseguir mis sueños. Nunca dejare de agradecerles todo los sacrificios. Los amo.

A mis hermanos Arturo y Hugo, por brindarme todo su apoyo y animos en las buenas y malas, este trabajo no seria posible sin su ayuda.

A mi ssobrinos Ian, Iara e Isis, quienes le dan vida y alegria a la casa de la abuela, para que ella no sienta que sus hijos han abandonado el nido.

A mi familia y amigos quienes me brindan su cariño y apoyo incondicional.

A Karla, por su amor, por compartir los momentos buenos y malos, por su confianza y apoyo en este escalón de la vida.

A la Suegra, quien me animo y apoyo cuando mas necesitaba, por sus platicas y su cariño a esas “peleas” que nos llevan a discernir, ya sabe que se le quiere mucho.

A mis directoras Claudia y Bárbara, sé que el camino no ha sido fácil, pero sus consejos y conocimiento lo hicieron ameno y simple. Siempre con la paciencia y confianza al momento de trabajar con ustedes, por sus regaños y recomendaciones que tienen para todos y cada uno de nosotros.

ESTE TRABAJO SE DESARROLLÓ GRACIAS A LOS APOYOS ECONÓMICOS
DE LOS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL SIP 20131532 Y 20140281.

ÍNDICE

GLOSARIO.....	10
ABREVIATURAS.....	12
ÍNDICE DE TABLAS.....	13
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. ANTECEDENTES.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS.....	24
5.1. Objetivo General.....	24
5.2. Objetivos Particulares.....	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
6.1. Recolecta de ejemplares.....	24
6.2. Obtención de extractos orgánicos.....	25
6.3. Bioensayos.....	26
6.3.1. Ensayos de actividad antibacteriana.....	27
6.3.2. Prueba de hemólisis.....	28
6.3.3. Actividad antiinflamatoria mediante edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol) en oreja de ratón (<i>in vivo</i>).....	29
6.4. Selección de organismos para continuar con su estudio químico.....	30
6.5. Fraccionamiento de extractos orgánicos.....	30
6.6. Pruebas de actividad biológica de fracciones orgánicas.....	30
6.6.1. Ensayo de actividad antibacteriana.....	30
6.6.2. Prueba de hemólisis.....	31
6.6.3. Modelos de inflamación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	31
6.6.3.1. Edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol) en oreja de ratón (<i>in vivo</i>).....	31
6.6.3.2. Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) (<i>in vitro</i>).....	31
6.6.4. Actividad Antioxidante.....	32

6.6.4.1.	Inhibición de la α -glucosidasa.	32
6.6.4.2.	Inhibición de la lipoperoxidación inducida con FeSO_4 , cuantificada por la técnica TBARS.....	33
6.6.5.	Citotoxicidad.....	35
6.6.5.1.	Ensayo de viabilidad celular determinada por la reducción del MTT.....	35
6.6.5.2.	Evaluación de la proliferación celular por el bioensayo de sulforodamina B. 36	
6.6.6.	Análisis estadístico.....	37
7.	RESULTADOS.	38
7.1.	Recolecta de organismos y obtención de extractos.	38
7.2.	Actividad biológica de los extractos crudos.....	38
7.2.1.	Ensayos de actividad antibacteriana.....	38
7.2.2.	Actividad hemolítica.	40
7.3.	Edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol) en oreja de ratón (<i>in vivo</i>).	40
7.4.	Selección de organismos para continuar con su estudio químico.	42
7.4.1.	Actividad biológica de fracciones orgánicas.	49
7.4.1.1.	Actividad antibacteriana.	49
7.4.1.2.	Actividad antifúngica.	49
7.4.1.3.	Prueba de hemólisis.....	50
7.4.2.	Modelos de inflamación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	51
7.4.2.1.	Edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol) en oreja de ratón (<i>in vivo</i>).	51
7.4.2.2.	Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) (<i>in vitro</i>).....	52
7.4.3.	Actividad Antioxidante.	54
7.4.3.1.	Inhibición de la α -glucosidasa.	54
7.4.3.2.	Inhibición de la lipoperoxidación inducida con FeSO_4 , cuantificada por la técnica TBARS.....	55
7.4.4.	Citotoxicidad.....	57
7.4.4.1.	Ensayo de viabilidad celular determinada por la reducción del MTT.....	57
7.4.4.2.	Evaluación de la proliferación celular por el Bioensayo de Sulforodamina B. 59	
8.	DISCUSIÓN.	62

8.1.	Actividad antibacteriana de extractos y fracciones.	62
8.2.	Actividad hemolítica de extractos y fracciones.	64
8.3.	Edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol) en oreja de ratón (<i>in vivo</i>).	65
8.4.	Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) (<i>in vitro</i>).	67
8.5.	Citotoxicidad.	69
9.	CONCLUSIONES.	72
10.	LITERATURA CITADA.	73
11.	ANEXOS.	89

GLOSARIO

Actividad biológica o bioactividad: Efecto benéfico o adverso de una sustancia sobre un organismo vivo.

Antibiótico: Sustancia química producida por un ser vivo o derivada sintéticamente que mata o inhibe el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles.

Antibacteriano: Compuesto que inhibe el crecimiento de bacterias.

Bioactivos: Sustancias que tiene algún efecto sobre un organismo vivo, tejido o célula.

Cepa: En microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que poseen la misma composición genética.

Citotóxico: Que es tóxico para las células.

Cromatografía: Conjunto de técnicas preparativas basadas en la separación de los componentes de una mezcla y su posterior detección.

Enzima: Proteína capaz de catalizar una reacción química.

Extracto: Producto obtenido a partir de un organismo o parte de él, el cual es extraído con un disolvente, ya sea orgánico o a base de agua.

Fármaco: Sustancia química purificada que se utiliza para el tratamiento, la cura, la prevención o el diagnóstico de alguna enfermedad o también para inhibir la aparición de un proceso fisiológico no deseado.

Farmacología: Ciencia que estudia el origen, las acciones y las propiedades que las sustancias químicas ejercen sobre los organismos vivos.

Gram positiva: Célula procariótica cuya pared celular está compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa.

Gram negativa: Célula procariótica cuya pared celular contiene relativamente poco peptidoglicano y presenta una membrana externa compuesta por lipopolisacárido, lipoproteína y otras macromoléculas complejas.

Halo: Zona alrededor de un disco o área impregnada con la sustancia activa en la que no se produce crecimiento bacteriano.

Hemolítica: Actividad biológica que consiste en la ruptura de la membrana del eritrocito.

Inhibidor: Sustancia química que evita que un proceso se detenga o se lleve a cabo.

Metabolito: Compuesto químico producido por un organismo.

Metabolito secundario: Compuesto orgánico sintetizado por el organismo que no tiene un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo, pero que pueden brindar ventaja competitiva.

Producto natural: Sea cualquier producto o sustancia producida u obtenida a partir de un organismo o parte de él, normalmente de naturaleza orgánica.

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
CC	Columna cromatográfica
CCF	Cromatografía en capa fina
Cel	Células
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Etanol
GSH	Glutación reducido
Hex	Hexano
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
MeOH	Metanol
MPO	Mieloperoxidasa
MTT	Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
nm	Nanómetros
PBS	Buffer de fosfatos
PDA	Agar papa dextrosa (siglas en inglés)
pH	Potencial de hidrógeno
PNP-G	4-Nitrofenil α -D-glucopiranosido
rpm	Revoluciones por minuto
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (siglas en inglés)
TBA	Reactivo cromógeno de ácido tiobarbitúrico
TMB	3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina
TCA	Ácido tricloro acético
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol
TSA	Agar soya trip casa (siglas en inglés)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productos de origen marino comercialmente disponibles y en desarrollo farmacológico (Pedpradab, 2010; www.marinepharmacology.midwestern.edu/)..	18
Tabla 2. Peso fresco de los organismos, y porcentaje de rendimiento de los extractos.....	39
Tabla 3. Actividad hemolítica en placas de agar sangre, halos de inhibición de extractos orgánicos (mm) (n=3).	41
Tabla 4. Organismos que presentaron los mejores resultados de actividad antibacteriana, hemolítica y antiinflamatoria.....	43
Tabla 5. Prueba de actividad antibacteriana y antifúngica, halos de inhibición de fracciones seleccionados (mm) (n=3).....	49
Tabla 6. Prueba de hemólisis en placas de agar sangre, halos de inhibición de fracciones de <i>Mithrodia bradleyi</i> (mm) (n=3).	50
Tabla 7. Efecto de la actividad inhibitoria de las fracciones sobre α -glucosidasa.	54
Tabla 8. Efecto de la actividad inhibitoria de las fracciones sobre la lipoperoxidación inducida con FeSO_4 , cuantificada por la técnica TBARS.....	55
Tabla 9. Porcentaje de viabilidad celular mediante el ensayo MTT sobre la línea celular de macrófagos murinos (J774) en presencia de las fracciones a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$	58
Tabla 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento por medio de la prueba de Sulforodamina B, sobre las líneas celulares: U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama, SKLU-1= pulmón. NC= no citotóxico. SA= sin actividad.....	60
Tabla 11. Fracciones que presentaron los mejores resultados de actividad antibacteriana, antifúngica, hemolítica, antiinflamatoria, antioxidante, citotóxica. .	61
Tabla 12. Concentración de albúmina y su densidad óptica a 540 nm por el método de Lowry.....	91
Tabla 13. Revisión bibliográfica de estudios químicos de los organismos seleccionados con mayor potencial bioactivo.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zona de recolecta de los organismos en Punta Arena de la Ventana, B.C.S., México.....	25
Figura 2. Halo de inhibición de los extractos del cuerpo y vísceras del erizo <i>Eucidaris thouarsii</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Figura 3. Actividad antiinflamatoria de los extractos crudos de invertebrados (1 mg oreja ⁻¹) de Punta Arena de La Ventana, B.C.S. Datos expresados como la media ± E.E.M., n = 3 (ANOVA post-test Dunnet: *p<0.05 y **p<0.01). (C = extracto cuerpo; V = extracto vísceras).....	42
Figura 4. Esquema de obtención de las fracciones etérea y butanólica del gorgónido <i>Leptogorgia rigida</i>	44
Figura 5. Esquema de la obtención de las fracciones del cuerpo del erizo <i>Eucidaris thouarsii</i>	45
Figura 6. Esquema de las fracciones de las vísceras del erizo <i>Eucidaris thouarsii</i>	46
Figura 7. Esquema de las fracciones del cuerpo de la estrella <i>Mithrodia bradleyi</i>	47
Figura 8. Esquema de las fracciones de las vísceras de la estrella <i>Mithrodia bradleyi</i>	48
Figura 9. Actividad antiinflamatoria de las fracciones de los extractos seleccionados (1 mg oreja ⁻¹). Datos expresados como la media ± E.E.M., n = 3 (ANOVA post-test Dunnet: *p<0.05 y **p<0.01). (E = extracto etanólico; B = extracto butanólico).	51
Figura 10. Porcentaje de inhibición de las fracciones sobre la enzima mieloperoxidasa (MPO) a una concentración de 1 mg oreja ⁻¹ A) <i>Eucidaris thouarsii</i> , B) <i>Mithrodia bradleyi</i> , C) <i>Leptogorgia rigida</i> . C = extracto del cuerpo, V = extracto de las vísceras, E = extracto etanólico, B = extracto butanólico, Indo = indometacina.	53
Figura 11. Curva estándar de albúmina para la determinación de proteína por el método de Lowry.....	91

RESUMEN

Los invertebrados marinos presentan un gran potencial como fuente de moléculas activas con aplicaciones terapéuticas en el campo de investigaciones biomédicas. En las costas de Baja California Sur, existe una alta biodiversidad de estos organismos y son pocos los estudios realizados que aborden la búsqueda de extractos y moléculas activas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana, hemolítica, antiinflamatoria y citotóxica de una colección de invertebrados de Punta Arena de La Ventana, B. C. S., México, con la finalidad de identificar aquellos organismos con potencial bioactivo. Se recolectaron 13 organismos mediante buceo SCUBA, pertenecientes a los grupos Echinodermata y Cnidaria. Los extractos del cuerpo y/o vísceras de los organismos se realizaron con una mezcla de acetona/metanol, dando lugar a un total de 22 extractos crudos, que posteriormente fueron separados en dos fases, etérea y butanólica. Los extractos crudos fueron sometidos a ensayos de actividad antibacteriana frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* mediante el método de difusión en agar. Los resultados de este bioensayo indicaron que únicamente el extracto de *Eucidaris thouarsii* presentó actividad frente a *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 12 mm. Frente a las otras cepas ningún extracto presentó actividad. En la prueba de hemólisis, los extractos butanólicos del cuerpo de *Mithrodia bradleyi*, *Acantaster planci* y *Holoturia pluricuriosa* fueron los que presentaron el mayor halo de lisis a las 24 horas. En cuanto a la actividad antiinflamatoria utilizando el modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA, fueron los extractos crudos de *Leptogorgia rigida* y *Mithrodia bradleyi*, probados a una dosis de 1 mg oreja^{-1} , los que mostraron un porcentaje de inhibición del edema mayor al 50%, en comparación con la indometacina (control positivo) que presentó una inhibición del 80%. Con base en la actividad y estudios químicos previos, se seleccionaron a *Leptogorgia rigida*, *Mithrodia bradleyi* y *Eucidaris thouarsii* para continuar con su estudio. Las fracciones de *M. bradleyi* y *E. thouarsii* obtenidas mediante cromatografía en columna mostraron una inhibición del contenido de MPO de entre el 51 y 65%. En cuanto a la inhibición de la lipoperoxidación de lípidos, se presentó actividad a concentraciones de 25, 250 y $2500\ \mu\text{g mL}^{-1}$ y fue la fracción 3 de *E. thouarsii* la que presentó la mejor actividad a $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ con un 94.68% de inhibición de la lipoperoxidación. Las fracciones de *Mithrodia bradleyi* y *Eucidaris thouarsii* presentaron una citotoxicidad muy alta frente a todas las líneas celulares cancerígenas. Resulta interesante continuar con el estudio químico de estos tres organismos para elucidar a las moléculas responsables de la bioactividad.

Palabras clave: Invertebrados marinos, antibacteriana, hemólisis, antiinflamatoria, citotóxica

ABSTRACT

The marine invertebrates have a great potential as a source of active molecules with therapeutic applications in the field of biomedical research. In Baja California Sur coasts, there is a high biodiversity of these organisms but studies that search for active extracts and molecules are few. The objective of this study was to evaluate hemolytic, antibacterial, anti-inflammatory and cytotoxic activity of a collection of invertebrates of Punta Arena de la Ventana, B. C. S., Mexico, with the purpose to identify organisms with bioactive potential. Thirteen organisms which belong to the Echinodermata and Cnidaria groups were collected by scuba diving. The body or viscera extracts was obtained with a mixture of acetone/methanol and separated into ethereal and buthanolic extracts. Crude extracts were tested against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains by agar diffusion method to determine their antibacterial activity. The antibacterial results showed that only the extract of *Eucidaris thouarsii* was active against *Staphylococcus aureus* with inhibition halo of 12 mm, while against other strains none of the extracts were active. In the test for hemolysis activity, the buthanolic extracts of the body of *Mithrodia bradleyi*, *Acantaster planci* and *Holoturia pluricuriosa* were found active and the biggest lysis halo was observed after 24 hours. As for the anti-inflammatory activity test using TPA induced mouse ear edema model, the crude extracts of *Leptogorgia rigida* and *Mithrodia bradleyi* tested at dose of 1 mg ear⁻¹, showed a percentage of inhibition of swelling greater than 50%, compared with indomethacin (positive control) which presented a 80% of inhibition. Based on detected activity and previous chemical studies, *Leptogorgia rigida*, *Mithrodia bradleyi* and *Eucidaris thouarsii* were selected to follow with the chemical study. Fractions of *M. bradleyi* and *E. thouarsii* obtained by column chromatography showed an inhibition of the MPO content of between 51 and 65%. In case of the inhibition of lipid lipoperoxidation, activity was detected at concentrations of 25, 250 and 2500 µg mL⁻¹ and the fraction 3 of *E. thouarsii* had the best activity with 94.7 percentage of lipoperoxidation inhibition. Fractions of *Mithrodia bradleyi* and *Eucidaris thouarsii* presented very high cytotoxicity against cancer cell lines. These results showed that is important to continue with the chemical study of these organism in order to elucidate the molecules responsible for such bioactivity.

Key words: Marine invertebrates, antibacterial activity, hemolysis, antiinflammatory activity, cytotoxic activity.

1. INTRODUCCIÓN.

A partir de la década de los 70's, los organismos marinos se han convertido en una importante fuente de nuevos productos naturales, debido a las novedosas estructuras que presentan, muchas de las cuales no habían sido registradas previamente de fuentes terrestres, así como también a las interesantes actividades biológicas que exhiben (Faulkner, 2000; Blunt *et al.*, 2006) y al hecho de estudiar un ambiente poco explorado en donde los océanos abarcan más del 70% de la Tierra.

La gran cantidad de compuestos bioactivos presentes en los organismos marinos muestra la amplia variabilidad química que reside dentro de la diversidad biológica de estas especies. Estos organismos viven en un medio muy competitivo donde se dan intensas interacciones ecológicas, por lo que han desarrollado sofisticadas herramientas bioquímicas y fisiológicas, como un mecanismo de defensa químico ante depredadores u organismos patógenos (McClintock *et al.*, 1993; Bull *et al.*, 2000; Faulkner, 2000; Butler, 2004; Blunt, 2006).

Un grupo de interés son los invertebrados marinos, los cuales presentan un gran potencial como fuente de moléculas bioactivas con aplicaciones terapéuticas en los campos de investigación del cáncer, en el control del crecimiento bacteriano, antifúngicas, antiviral, antiinflamatoria y en el contexto de aplicaciones técnicas como sustancias antiincrustantes (Rajeev & Xu, 2004; Petzelt, 2005).

En la región del Golfo de California, son pocos los estudios sobre actividad biológica que se han realizado con invertebrados sin contar a las esponjas (Keer-García, 1988; Encarnación *et al.*, 1989, 2006; Juárez-Espinoza, 2010). En específico para el área de Punta Arena de La Ventana, una zona que alberga una gran diversidad de organismos, se puede mencionar que presenta una alta riqueza de especies de equinodermos, además de corales blandos y esponjas. De estas, solamente se ha explorado la actividad biológica de la esponja *Aplysina gerardogreeni* (Montes-Plascencia *et al.*, 2010; Valencia-Agamí, 2010).

Debido a la escasa información que se tiene de las propiedades bioactivas de las especies marinas más abundantes en nuestro país y la importancia que han adquirido los productos naturales de origen marino, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana, hemolítica, antiinflamatoria y citotóxica de los invertebrados más conspicuos de Punta Arena de La Ventana, B. C. S., con la finalidad de establecer su potencial farmacológico o industrial.

2. ANTECEDENTES.

Diversas investigaciones sobre productos naturales han demostrado que los organismos marinos son una fuente interesante de nuevos compuestos con diversas actividades biológicas que han dado lugar a que algunos de estos compuestos actualmente se encuentren comercialmente disponibles o en desarrollo farmacológico (Pedpradab, 2010) (Tabla 1).

Tabla 1. Productos de origen marino comercialmente disponibles y en desarrollo farmacológico (Pedpradab, 2010; www.marinepharmacology.midwestern.edu/).

Nombre Comercial	Marca Comercial	Estado Clínico	Organismo	Tipo de enfermedad tratada
Citarabina (Ara-C)	Cytosar-U®	Aprobado por FDA	Esponja	Cáncer
Vidarabina (Ara-A)	Vira-A®		Esponja	Antiviral
Ziconotido	Prialt®		Caracol cono	Dolor
E7389	Halaven®		Esponja	Cáncer
ET-743	Yondelis®		Tunicado	Cáncer
SGN-35	Adcetris®		Molusco/cianobacteria	Cáncer
Plitidepsina	Aplidin®	Fase III	Tunicado	Cáncer
Tetrodotoxina	Tectin®		Pez Globo	Dolor
GTS-21	No disponible	Fase II	Poliqueto	Esquizofrenia
PM00104	Zalypsis®		Molusco	Cáncer
PM1183	No disponible		Tunicado	Cáncer
CDX-011	No disponible		Molusco/cianobacteria	Cáncer
Salinosporamido A	No disponible	Fase I	Bacteria	Cáncer
PM060184	No disponible		Esponja	Cáncer
Briostatina	No disponible		Briozoario	Cáncer
SGN-75	No disponible		Molusco/cianobacteria	Cáncer
ASG-5ME	No disponible		Molusco/cianobacteria	Cáncer

Los invertebrados marinos sobre todo aquellos con poca o nula movilidad, (corales blandos, esponjas, tunicados, equinodermos) están sujetos a una intensa competencia y depredación, además de que habitan un medio hostil, con cambios de salinidad, pH y temperatura, en donde medran incontables depredadores, virus y bacterias (Bayer, 1961). Por lo que han tenido que desarrollar mecanismos químicos de defensa; estas adaptaciones les han permitido sintetizar diversos metabolitos secundarios, cuya actividad ha demostrado ser mucho más potente que la de sus contrapartes terrestres (De Lara, 1992; Simmons *et al.*, 2005).

El primer reporte sobre metabolitos secundarios aislados de invertebrados marinos aparece en el "Journal of Organic Chemistry" en 1942, en donde Kina y Bergman reportan varios metabolitos de tipo terpénico aislados de un coral caribeño. En 1958 los esposos Burkholder reportan en la revista "Science" antibióticos aislados de gorgonios recolectados en Puerto Rico (Burkholder & Burkholder, 1958). A partir de entonces se han realizado numerosos estudios químicos con invertebrados marinos, dando lugar al aislamiento de diversos metabolitos con actividades biológicas, que van desde antibacteriana, citotóxica, antimicótica, antihistamínica, antihipertensiva, antiviral, antiparasitaria, antioxidante, antiinflamatoria e inmunosupresora, entre otras (Mayer & Hamann, 2002; Takamatsu *et al.*, 2003 Munro & Blunt, 2007;). Algunos de estos compuestos se encuentran actualmente en fases clínicas avanzadas. Tal es el caso de la methopterosina, un compuesto aislado del coral *Pseudopterogorgia elisabethae* (Mayer *et al.*, 1998) el cual presenta actividad antiinflamatoria y se encuentra en fase clínica I (Haefner, 2003). Otro compuesto de interés aislado también de un coral suave, que dió lugar al compuesto OAS1000 (una methopterosina sintética), un antiinflamatorio que se encuentra en fase clínica II (Haefner, 2003).

Los equinodermos (que incluye los grupos de estrellas, pepinos, erizos y ofiuros), presentan un gran potencial como fuente de moléculas bioactivas con aplicaciones terapéuticas en los campos de investigación del cáncer, en el control

del crecimiento bacteriano y en el contexto de aplicaciones técnicas como sustancias antiincrustantes (Rajeev & Xu, 2004; Petzelt, 2005). Los primeros estudios químicos con equinodermos iniciaron a mediados de los años 50's con el aislamiento de naftoquinonas (Millot, 1956), y a partir de entonces se han aislado y caracterizado compuestos de tipo ceramidas, esteroides sulfatados (Levina *et al.*, 2002a, 2002b), péptidos, triterpenos glicosilados (saponinas) (Hedge *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002).

Aún cuando han sido menos estudiados en comparación con otros grupos, los equinodermos son candidatos muy promisorios para el desarrollo de compuestos con actividad antibacteriana y anticancerígena (Petzelt, 2005). En específico para pepinos de mar se han identificado actividades anticoagulantes (Nagase *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2011), antihipertensión, antiinflamatorias (Colin, 1998, 2004) y antitrombóticas (Mourao *et al.*, 1998; Pacheco *et al.*, 2000). A partir de extractos orgánicos, también se ha identificado potencial de bioactividad, así especies de las holoturias *Ludwigothuria mexicana*, *L. grisea*, *Istchopus badiotus*, *Trachytonidium occidentale* y *Fossothuria cubana*, presentaron actividad hemolítica y antibacteriana, atribuida a la posible presencia de saponinas (Fariñas & Liñero, 1997, 2001). En otro estudio con las especies *Holothuria atra* y *H. scabra*, los extractos presentaron actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Ridzwan *et al.*, 1995). Uma y Parvathavarthini en 2010 realizaron pruebas antibacterianas con el extracto de hexano del pepino de mar *Temnopleurus alexandri* frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, el cual mostró actividad antibacteriana. Los análisis de cromatografía de masas y espectrofotometría de masas revelaron la presencia de alcanos: pentadecano, heptadecano, eicosano, heneicosano, docosano como los compuestos mayoritarios del extracto.

Dentro del grupo de los corales blandos, también se ha observado que producen una gran diversidad de metabolitos secundarios como terpenos, diterpenos, sesquiterpenos y esteroides (Rinehart Jr. *et al.*, 1981; Pawlik *et al.*,

1987; Van Alstyne *et al.*, 1994; Higuchi *et al.*, 1998), alguno de los cuales han presentado actividad antineoplásica, ictiotóxica, citotóxica (Fenical *et al.*, 1981; Yamada *et al.*, 1997; Higuchi *et al.*, 1998; Garrido *et al.*, 2000), antimicrobiana, antiinflamatoria (Faulkner, 1993, 1999) y antitumoral contra el cáncer de colón y melanoma humano (Blunt *et al.*, 2011).

Los octocorales son uno de los invertebrados mas abundantes en los ambientes marinos tropicales y subtropicales (Bayer, 1961), y ademas producen una variedad de metabolitos con diversas estructuras químicas sin precedentes y con actividades biológicas significativas, tales como actividad antibacteriana, anticancerígena, antiinflamatoria, antitumoral, etc. Entre los compuestos que presentan estos organismos se encuentran los alcaloides, sesquiterpenos, diterpenos, ácidos grasos y en algunos casos, esteroides, altamente funcionalizados (Rodríguez, 1995).

Para la región de Baja California y el Golfo de California, los primeros estudios químicos con organismos marinos se llevaron a cabo a mitad de la década de los 70's. Investigadores a bordo del R/V "Alpha Helix" evaluaron de manera preliminar *in situ* la actividad antibacteriana, antiviral y citotóxica de 83 equinodermos y 72 cnidarios. Los resultados mostraron que 60% de los equinodermos y 30% de los cnidarios presentaron actividad antibacteriana (Rinehart Jr. *et al.*, 1981).

Posteriormente, Keer-García (1988) trabajó con varias especies de cnidarios y equinodermos recolectados en la parte sur del Golfo de California, realizó pruebas de actividad antimicrobiana con los extractos etanólicos obtenidos de las especies recolectadas, frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como frente al hongo levaduriforme *Candida albicans*. Realizó la detección de saponinas por medio de cromatografía en capa fina y con sus resultados propuso continuar los estudios con cinco especies de equinodermos: *Neothyone gibbosa*, *Pharia pyramidata*, *Linckia sp.*, *Oreaster occidentalis* y *Astronetis sertulifera*.

Un estudio realizado con el pepino de mar *Neothyone gibbosa*, dió lugar al aislamiento del compuesto Neothiosida A, un glucósido de naturaleza triterpénica, con actividad frente a *Candida albicans* (Encarnación *et al.*, 1989, 2006). Por otra parte, a partir del gorgonido *Leptogorgia laxa* recolectado en el Golfo de California, se aislaron dos nuevos diterpenos, las leptodienonas A y B, además de los compuestos conocidos lopholida, lophodiol B, lophodiona y lophotoxina. Los compuestos nuevos presentaron actividad citotóxica frente a tres líneas de células tumorales humanas (Ortega *et al.*, 2008).

Juárez–Espinoza (2010) realizó un estudio con *Diadema mexicanum* un erizo recolectado en la playa Calerita, B. C. S., a partir del cual obtuvo dos extractos etanólicos, uno a partir de vísceras y el otro calcáreo. Los cuales fueron sometidos a pruebas de actividad antibacteriana y hemolítica. Los resultados indicaron que el extracto visceral fue más activo frente a las cepas empleadas. Con estos resultados, se sugiere que *D. mexicanum* es una fuente potencial de compuestos orgánicos con potencial en el área biomédica.

En México, los trabajos publicados en el área de productos naturales de invertebrados marinos son escasos o no existen. Tal es el caso del erizo *Eucidaris thouarsii*, en donde los trabajos reportados están dirigidos a estudios ecológicos y presencia y ausencia de estos organismos en arrecifes coralinos (Solís-Marín *et al.*, 2005; Solís–Marín *et al.*, 2014). Un problema similar presenta el gorgónido *Leptogorgia rigida*, que aunque se han reportado trabajos con el género (Boonananwong *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2008), no existen conocimientos acerca de su potencial farmacológico. Con base en estos antecedentes se llevó a cabo la selección de los grupos de equinodermos y gorgónidos, como parte principal para la realización del presente estudio.

3. JUSTIFICACIÓN.

Los invertebrados marinos constituyen un grupo de organismos a partir de los cuales se han aislado una gran cantidad de compuestos de diversos tipos estructurales y que presentan interesantes actividades biológicas que podrían ser utilizados en la industria farmacéutica, cosmética y naviera. Es así como en las últimas décadas, las grandes compañías farmacéuticas han considerado los productos naturales, principalmente los marinos, como una alternativa para la búsqueda de nuevos medicamentos.

En las costas de Baja California Sur, existe una alta diversidad de invertebrados y son pocos los estudios que se han realizado desde un punto de vista químico enfocados en la búsqueda de productos naturales marinos, por lo que resulta importante ampliar el conocimiento sobre sustancias bioactivas de origen marino.

Dentro del Golfo de California, el arrecife rocoso de Punta Arena de La Ventana, B. C. S., presenta una zona de alta diversidad biológica y compleja estructura poblacional. Por lo que se estimó conveniente evaluar la actividad antibacteriana, hemolítica, antiinflamatoria y antiépibiótica de extractos orgánicos de equinodermos y cnidarios para identificar aquellos organismos con potencial para el aislamiento de sustancias bioactivas.

4. HIPÓTESIS.

Los invertebrados marinos se han destacado por presentar interesantes actividades biológicas con aplicación farmacológica, por lo que los equinodermos y gorgonidos del área de Punta Arena de La Ventana son una fuente de nuevas sustancias prometedoras y la gama de actividades dependerá del grupo estudiado. Siendo Asteroidea y Echinoidea los que presenten la mejor actividad.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo General.

Evaluar el potencial farmacológico de equinodermos y gorgónidos de Punta Arena de La Ventana, B.C.S., México.

5.2. Objetivos Particulares.

- Obtener una colección de extractos de los equinodermos y gorgónidos de Punta Arena de la Ventana, B.C.S.
- Evaluar la actividad antibacteriana, hemolítica, antiinflamatoria y citotóxica de los diferentes extractos obtenidos.
- Seleccionar los extractos con mayor potencial bioactivo y fraccionarlos.
- Evaluar la actividad biológica de fracciones semipurificadas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1. Recolecta de ejemplares.

Los organismos (equinodermos y gorgonidos más evidentes de la zona) fueron recolectados mediante buceo SCUBA en la zona de Punta Arena de La Ventana, B. C. S., en febrero de 2012 (Figura 1). Los organismos fueron transportados en hielo hasta el laboratorio de Microbiología del CICIMAR donde se evisceraron y pesaron, esto con la finalidad de obtener la parte calcarea o cuerpo de los organismos, y la parte de las vísceras que incluye todo su sistema digestivo y reproductivo, posteriormente se almacenaron a -20° C hasta su estudio.

Un ejemplar de cada especie fue utilizado para su identificación taxonómica, la cual fue realizada mediante claves taxonómicas (Brusca, 1980; Hickman, 1998; Solís-Marín, 2005) con la ayuda de la Dra. María Dinorah Herrero Perezrull (IPN-CICIMAR).

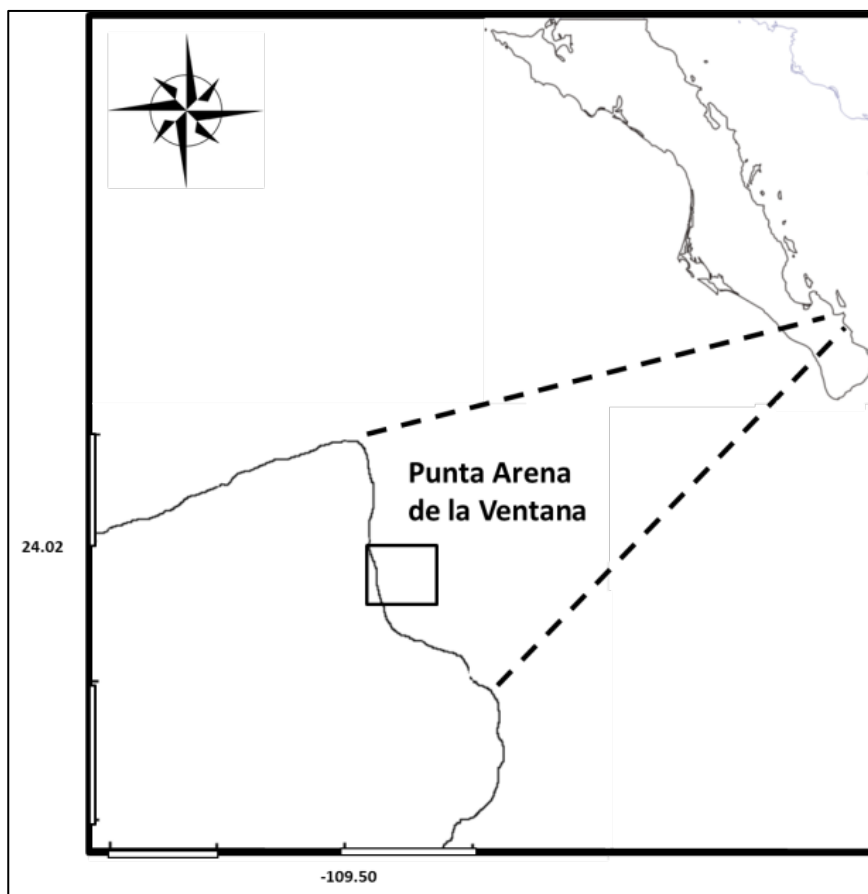


Figura 1. Zona de recolecta de los organismos en Punta Arena de la Ventana, B.C.S., México.

6.2. Obtención de extractos orgánicos.

Se registró el peso de los organismos y posteriormente se realizó una extracción del cuerpo y/o vísceras con una mezcla de acetona/metanol 1:1 a temperatura ambiente. La disolución se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida dando lugar al extracto crudo. Posteriormente se realizó una separación líquido-líquido. Para lo cual, al extracto crudo se le agregaron 50 mL de éter y 50 mL de agua, utilizando un embudo de separación. Las fases fueron separadas, la etérea fue concentrada a presión reducida dando lugar al extracto de éter y la fase acuosa fue reextraída nuevamente con n-butanol para obtener el extracto

butanólico. Se realizó un análisis preliminar de los extractos mediante cromatografía en capa fina (CCF).

6.3. Bioensayos.

Los bioensayos llevados a cabo en este trabajo fueron divididos en secciones. En la primera parte se llevaron a cabo los ensayos preliminares con los extractos crudos y las fracciones etanólica y butanólica de los organismos y fueron las siguientes:

- Actividad antibacteriana.
- Prueba de hemólisis.
- Modelos de inflamación *in vivo*: Actividad antiinflamatoria mediante edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol) en oreja de ratón.

En la segunda parte se llevaron a cabo todas las pruebas de la primera parte además de otras nuevas, pero solo sobre las fracciones de los organismos seleccionados que presentaron los mejores resultados de las actividades biológicas previamente realizadas, así como un análisis bibliográfico de estudios previos. Las pruebas para esta parte fueron:

- Actividad antibacteriana.
- Prueba de hemólisis.
- Modelos de inflamación *in vivo* e *in vitro*
 - Actividad antiinflamatoria mediante edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol) en oreja de ratón (*in vivo*).
 - Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) (*in vitro*).
- Actividad Antioxidante
 - Inhibición de la α -glucosidasa.
 - Inhibición de la lipoperoxidación inducida con FeSO₄, cuantificada por la técnica TBARS.

- Citotoxicidad.
 - Ensayo de reducción del MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico). Viabilidad celular.
 - Evaluación de la proliferación celular por el bioensayo de sulforodamina B.

6.3.1. Ensayos de actividad antibacteriana.

Los ensayos se llevaron a cabo mediante el método de difusión en agar descrito por Brock & Madigan (1993) frente a las cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA-42), *Escherichia coli* (ATCC BAA-196), *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802), *V. harveyi* (ATCC14126) y *V. proteolyticus* (ATCC15338).

Para la preparación de los sensidiscos, se realizó una dilución de los extractos a una concentración de 66 mg mL⁻¹. En los sensidiscos de papel filtro whatman #1 con un diámetro de 7 mm se colocaron 15 µL de esta dilución para obtener una concentración final de 1 mg disco⁻¹. La impregnación de los discos con los extractos se llevó a cabo en una campana de flujo laminar desinfectada con una solución de cloruro de benzalconio, sobre papel aluminio esterilizado en autoclave. Los discos se dejaron secar completamente y posteriormente fueron guardados en cajas de Petri de vidrio a -20° C. Los controles negativos se prepararon con los disolventes puros que se utilizaron y los controles positivos con 25 µL de ampicilina a una concentración de 15 µg µL⁻¹.

Las cepas se mantuvieron en medio inclinado agar soya tripticasa (TSA) (en el caso de las cepas de *Vibrio* se utilizó Agar Marino) y en refrigeración a 4° C, con resiembras cada tres meses. Al inicio de la serie de los bioensayos, se preparó un pre-inóculo de cada cepa en placas de medio sólido de TSA o agar marino, dependiendo de la cepa, los cuales fueron incubados por 24 h a 35° C. Posteriormente se preparó una suspensión celular con las cepas patógenas y se

ajustó a una densidad óptica de 1 a una λ de 580 nm, lo que corresponde aproximadamente a 1×10^8 cel mL⁻¹. Se tomaron 0.1 mL de esta suspensión y se procedió a realizar una siembra masiva con un hisopo estéril en placas con agar Müller-Hinton (cepas patógenas) o Agar Marino (Vibrios). Para preparar estos medios se utilizaron tubos de ensaye a los cuales se les agregaron 12 mL del medio de cultivo, los cuales posteriormente fueron esterilizados a 15 libras durante 15 min. En ambiente estéril el medio fue vaciado en cajas de petri de 10 cm de diámetro, para tener una capa de agar de un mismo espesor, esto permitió estandarizar la susceptibilidad del bioensayo, ya que se sabe que este es uno de los factores que pueden modificar la difusión de las sustancias sobre el agar.

Los sensidiscos fueron colocados en las placas inoculadas con la cepa patógena, así como sus controles positivo y negativo. De todas las pruebas se realizaron tres réplicas. Las cajas de Petri con los sensidiscos se colocaron en el refrigerador durante 2 h, con el fin de retardar el crecimiento microbiano mientras las sustancias antibióticas se difunden sobre el agar. Posteriormente, las cajas de Petri fueron incubadas a una temperatura de 35° C durante 24 h. El efecto sobre las bacterias fue registrado como negativo cuando no se observó inhibición del crecimiento y para los casos positivos, se tomó en cuenta el diámetro del halo de inhibición, el cual fue medido con ayuda de una regla graduada (mm).

6.3.2. Prueba de hemólisis.

La prueba de actividad hemolítica se realizó en medios de cultivo TSA con 5% de sangre de carnero. Se prepararon sensidiscos con cada uno de los extractos orgánicos a una concentración de 1 mg mL⁻¹. Los sensidiscos fueron colocados en las placas de agar sangre y posteriormente fueron incubadas a 35° C y se realizaron mediciones de los halos a las 6, 12, 24 y 48 h. Se utilizó como control negativo sensidiscos con el disolvente utilizado. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

6.3.3. Actividad antiinflamatoria mediante edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol) en oreja de ratón (*in vivo*).

Se empleó el ensayo de edema en la oreja del ratón utilizando como agente promotor al acetato de tetradecanoilforbol (TPA, Sigma) (De Young *et al.*, 1989).

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 de entre siete y diez semanas con un peso de 25 a 30 g (n = 3 ratones por extracto), suministrados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma de México (UAM).

Se manipularon de acuerdo con las condiciones establecidas en la NOM-062-ZOO-1999. Se colocaron en cajas de polipropileno traslúcidas de paredes continuas, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura controlada de 22 ± 1 °C y humedad 50-60 %, con acceso *ad libitum* de agua y dieta estándar de laboratorio. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico ($0.20 \mu\text{L mg}^{-1}$). Después de dos minutos estos recibieron $10 \mu\text{L}$ de TPA en una solución de acetona ($2.5 \mu\text{g}$ de TPA mL^{-1} acetona), en ambos lados de la oreja derecha. Los extractos (1 mg mL^{-1}) y el fármaco de referencia (indometacina) fueron diluidos en los disolventes adecuados y se administraron después de la aplicación de TPA. La oreja izquierda se utilizó como control y únicamente se le administró los vehículos en donde se disolvieron los extractos aplicados en la oreja derecha. Cuatro horas después de la administración de TPA los animales fueron sacrificados en cámara de CO_2 y se obtuvieron discos de 7 mm de diámetro de cada una de las orejas con ayuda de un sacabocados.

La inflamación se evaluó como la diferencia de pesos (en mg) entre la biopsia de la oreja derecha, respecto a la biopsia de la oreja izquierda de cada animal. Los porcentajes de inhibición del edema se calculó mediante la ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\Delta \text{ peso grupo control} - \Delta \text{ peso tratamiento})}{(\Delta \text{ peso grupo control})} * 100$$

Se consideró como actividad antiinflamatoria moderada la inhibición del edema del 35 al 65 % y como buen efecto antiinflamatorio un valor mayor al 65 %.

6.4. Selección de organismos para continuar con su estudio químico.

Con base en los resultados de las actividades biológicas previamente realizadas y el análisis bibliográfico de estudios previos con cada organismo se seleccionaron tres organismos para continuar con las pruebas de bioactividad. Se realizó nuevamente una recolecta en mayo de 2013 en la zona de estudio para obtener mayor biomasa, se realizaron nuevamente los extractos obteniendo una mayor cantidad para su posterior fraccionamiento.

6.5. Fraccionamiento de extractos orgánicos.

Para la obtención de las diferentes fracciones se realizó una cromatografía en columna (CC) a presión atmosférica, utilizando gel de sílice Merck (60-200 μm), compactada con el mismo disolvente a utilizar como primer eluyente de la columna. Las muestras se introdujeron disueltas en ese mismo disolvente. Para la elución de las columnas se utilizaron mezclas de disolventes en orden de polaridad creciente. Cada fracción fue seguida mediante cromatografía en capa fina y evaporada a presión reducida mediante un rotavapor.

6.6. Pruebas de actividad biológica de fracciones orgánicas.

6.6.1. Ensayo de actividad antibacteriana.

Las cepas bacterianas utilizadas en esta prueba fueron: *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA-42), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC BAA-196), *Salmonella entérica* (ATCC 14028) y *Candida albicans* (ATCC 10231). Para los bioensayos las cepas se sembraron en agar TSA y PDA para *C. albicans*, se incubaron por 24 h a 35° C. El procedimiento de este ensayo

se llevó a cabo con los extractos/fracciones descrito anteriormente en el apartado 6.3.1.

6.6.2. Prueba de hemólisis.

Esta prueba se llevó a cabo como el descrito en el apartado 6.3.2.

6.6.3. Modelos de inflamación in vivo e *in vitro*.

6.6.3.1. Edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol) en oreja de ratón (*in vivo*).

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Young *et al.* (1989) y siguiendo la descripción del apartado 6.3.3.

Al final del ensayo las biopsias fueron guardadas a -70° C, para su posterior evaluación de los extractos/fracciones sobre la enzima mieloperoxidasa (MPO).

6.6.3.2. Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) (*in vitro*).

La actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), contenida en los lisosomas de neutrófilos, es un indicador de la presencia de estos leucocitos en los exudados inflamatorios, por lo que su determinación a partir de las secciones de oreja obtenidas en el ensayo de TPA, indica el grado de infiltración de neutrófilos que ha tenido lugar durante el desarrollo del ensayo.

La evaluación de la actividad de los extractos y fracciones sobre la enzima MPO se llevó a cabo siguiendo los métodos descritos por Bradley *et al.* (1982) y Suzuki *et al.* (1983).

Las biopsias fueron trituradas con la ayuda de un homogeneizador metálico durante 30 s en 1 mL de HTAB 0.5% (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), se colocaron en hielo seco para mantener frías las muestras. Posteriormente se congelaron y descongelaron 3 veces, esto para ayudar a seguir rompiendo el tejido. Al término de este paso se centrifugaron durante 5 min a 12 000 rpm a 4° C. Se tomaron por cuadruplicado 10 µL del sobrenadante y se colocaron en pozos de una placa de 96 pozos. Como blanco se utilizaron 10 µL de HTAB 0.5%. Se le adicionaron 180 µL de buffer de fosfatos (PBS) sin HTAB, la placa se calentó a 37° C y se mantuvo a esta temperatura el resto del ensayo. Se agregaron 20 µL de H₂O₂ al 0.017%. Una vez hecho esto se dio inicio a la reacción adicionando 20 µL de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) 18.4 mM el cual fue disuelto en dimetilformamida (DMF) al 50% en agua, se incubó durante 5 min a 37° C con agitación suave. Una vez transcurrido este tiempo se detuvo la reacción agregando 20 µL de H₂O₂ 2M. La actividad enzimática se determinó colorimétricamente empleando un lector de placas, midiendo la absorbancia a 450 nm.

$$\% \text{ Inhibición de MPO} = ((\text{Abs}_{\text{TPA}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}) / \text{Abs}_{\text{TPA}}) * 100$$

6.6.4. Actividad Antioxidante.

6.6.4.1. Inhibición de la α-glucosidasa.

El ensayo para medir la inhibición de la actividad α-glucosidasa tipo I de los extractos/fracciones fue adaptado de Yuan *et al.* (2012).

Se tomaron por cuadruplicado 25 µL de las muestras (previamente disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO)) y se colocaron en pozos de una placa de 96 pozos. Se colocaron 150 µL de Buffer de fosfato de potasio (67 mM, pH 6.8, 1 L) y se incubó a 37° C manteniéndose a esta temperatura el resto del ensayo. Se adicionaron 25 µL de glutatión reducido (GSH) 3 mM en buffer de fosfatos

(0.922mg mL⁻¹), posteriormente se adicionaron 25 µL de α-glucosidasa Tipo I y se agitó durante 10 min para mezclar bien. Se colocaron 25 µL de 4-Nitrofeni α-D-glucopiranosido (PNP-G), 23.2 mM (6.989 mg mL⁻¹) y se incubó en agitación durante 15 min a 37° C. Se adicionaron 50 µL de Na₂CO₃ y se agitó nuevamente sin tapa durante 5 min. Se leyó a 405 nm. Se utilizó una solución de quercitina como inhibidor positivo. El porcentaje de inhibición de la actividad enzimática fue calculada por:

$$\% \text{ de inhibición} = [(Abs \text{ control} - Abs \text{ muestra}) / Abs \text{ control}] * 100$$

6.6.4.2. Inhibición de la lipoperoxidación inducida con FeSO₄, cuantificada por la técnica TBARS.

Se utilizó una técnica modificada de TBARS (especies reactivas del ácido tiobarbiturico, siglas tomadas del inglés “tiobarbituric reactive species”) a partir de lo descrito por De las Heras *et al.* (1998) y Liu *et al.* (2000). Para este ensayo se utilizaron cerebros de ratas machos Wistar (200-250 g) proporcionadas por el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Disección y homogenizado del cerebro.

Los animales se sacrificaron en cámara de CO₂. Se les extrajo el cerebro completo y se colocó en solución salina 0.9% fría. Los cerebros se lavaron con agua destilada para quitar el resto de sangre, fueron pesados y se les adicionaron 10 mL de buffer de fosfatos (9.5 mM, pH= 7.4) por cada gramo de cerebro (10 mL g⁻¹). Posteriormente fueron homogenizados por 60 s y se centrifugó por 10 min a 3000 rpm y se recuperó el sobrenadante.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry y ajuste a la concentración deseada.

Se tomaron por duplicado 5 μL de sobrenadante y fueron colocados en pozos de una placa de 96 pozos. Se agregaron 20 μL de H_2O destilada. Se adicionaron 150 μL de la siguiente mezcla: 0.98 mL de Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1N, 0.01 mL de tartrato de Na/K 2% y 0.01 mL de CuSO_4 1%, se agitó muy bien y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 25 μL de reactivo de Folin disuelto en agua (1:1), se mezcló bien y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 540 nm y el cálculo se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{Proteína } (\mu\text{g mL}^{-1}) = ((A_{540\text{nm}} - 0.05012) / 0.0028) * 40$$

Posteriormente se ajustó el contenido de proteína a 2.666 mg mL^{-1} con PBS (9.5 mM, pH= 7.4).

$$V_2 = \frac{C_1 V_1}{C_2}$$

Inducción del estrés oxidativo con FeSO_4 10 μM .

Se colocaron por triplicado 375 μL de sobrenadante (2.666 $\text{mg-proteína mL}^{-1}$) en tubos de 1.5 mL y se les agregaron 50 μL de EDTA 20 μM disuelto en PBS (concentración final 2 μM), los tubos se mantuvieron en baño de hielo y se adicionaron 25 μL de los extractos/fracciones (20 veces más concentrada) y se incubaron durante 30 min a 37° C con agitación. Se agregaron 50 μL de FeSO_4 100 μM fresco (concentración final 10 μM) y se incubaron durante 1 h a 37° C con agitación. Se adicionaron 500 μL de reactivo TBA y se incubaron durante 10 min en baño de hielo. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 12000 rpm a temperatura ambiente. En esta técnica, los botones eran tan compactos que es difícil que se resuspendan. Posteriormente se incubaron durante 30 min en baño

de agua a 70-80° C. Se procuró tapar y asegurar bien los tubos ya que en este paso se genera presión. Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y se destaparon para liberar la presión. Se tomaron por triplicado 200 µL de cada tubo y se colocaron en un pozo de una placa de 96 pozos. Se midió la absorbancia a 540 nm e interpolaron los valores en la curva estándar para obtener la concentración de TBARS en solución.

$$TBARS (\mu M) = \frac{A_{540nm} + 0.00877}{0.07558}$$

6.6.5. Citotoxicidad.

Las líneas celulares utilizadas en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química son: U251= glía del sistema nervioso central, PC-3 = cáncer de próstata, K562 = leucemia, HCT-15 = cáncer de colon, MCF-7 = cáncer de mama, SKLU = cáncer de pulmón., J774 = macrófagos murinos (células normales) y pertenecen al panel del Instituto Nacional de Cáncer (INC) de Estados Unidos, las cuales fueron adaptadas al medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con suero fetal bovino (10%), una mezcla de antibióticos-antimicóticos al 10% y 2 mM de glutamina.

6.6.5.1. Ensayo de viabilidad celular determinada por la reducción del MTT.

Los efectos de los extractos/fracciones en la viabilidad celular, se determinaron mediante el método colorimétrico de MTT ante la línea celular J774 (Mossman, 1983).

Para este método se preparó una disolución de MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) en buffer de fosfatos a una concentración final de 5 mg mL⁻¹. Enseguida, las disoluciones se adicionaron a las placas con

células tratadas ($10 \mu\text{L pozo}^{-1}$) posteriormente, la placa se incubó durante 4 h a 37°C , en atmósfera de CO_2 al 5 %. Lo cual lleva a la formación de cristales de formazán en las mitocindrias de las células viables. Estos cristales generados se disolvieron agregando con DMSO ($100 \mu\text{L}$) en cada pozo. La placa se mantuvo en agitación durante 10 min, y posteriormente se midieron las absorbancias a 515 y 690 nm de referencia. Los porcentajes de citotoxicidad se calcularon considerando las absorbancias de cada grupo de ensayo con respecto a las del grupo control.

6.6.5.2. Evaluación de la proliferación celular por el bioensayo de sulforodamina B.

Las líneas celulares de carcinoma del sistema nervioso central (U251), carcinoma de próstata humano (PC-3), carcinoma de colon (HCT-15), carcinoma de mama (MCF-7) y carcinoma de pulmón (SKLU-1) se adhieren a las botellas de cultivo y para cosecharlas se adicionó 1 mL de 0.05% de tripsina-EDTA. Enseguida que las células se desprenden del sustrato plástico, se les adicionaron de 5-10 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina. Las células en suspensión se depositaron en tubos cónicos y se centrifugaron por 3 min, ya formado el paquete celular se les agregó medio de cultivo para resuspenderlas. De la suspensión se tomaron 0.05 mL del inóculo y se resuspendió en 0.45 ml de azul de tripano, colorante que permite contar a las células vivas. Determinando el número de células mL^{-1} , se hicieron los ajustes necesarios para depositar el inóculo en un volumen de $100 \mu\text{L pozo}^{-1}$ a la densidad ya antes mencionada. Cada placa se inoculó con dos líneas celulares por triplicado y se preincubó por 24 h a 37°C con una atmósfera de 5 % de CO_2 y 100 % de humedad relativa, para favorecer la estabilidad de éstas antes de adicionar las sustancias a probar. Para un cernimiento primario (screening) de un compuesto puro se prueba la concentración mas alta permitida $50 \mu\text{M}$. Todas los extractos/fracciones fueron solubilizadas en dimetilsulfóxido (DMSO) 100 veces más concentradas que la concentración a probar. Inmediatamente después de la preparación de los extractos/fracciones en solución se agregaron $100 \mu\text{L}$, siendo el volumen final del

pozo de 200 μ L. Nuevamente la microplaca se incubó por 48 h bajo las condiciones antes mencionadas.

Al finalizar el periodo de incubación de los extractos/fracciones con las células, éstas se precipitaron (o fijaron) *in situ* añadiendo 50 μ L de una solución de TCA frío al 50% o al 80% para células adheridas y en suspensión, respectivamente, y se incubaron a 4° C por 60 min. Se desechó el sobrenadante y las placas fueron lavadas 5 veces con agua desionizada y secadas al ambiente. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo, se realizó con 100 μ L de una solución al 0.4% de SRB y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. La SRB no unida se removió con 3 lavados con ácido acético al 1% y se dejaron secar a temperatura ambiente. A las placas teñidas se les agregó 100 μ L de un buffer de tris y se agitaron por 10 min para favorecer la disolución del complejo; posteriormente se midió la densidad óptica en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm. Los datos se procesaron obteniendo el promedio de la densidad óptica de los 3 pozos/línea tratados con los extractos/fracciones (DOt), los 3 pozos tratados con DMSO (DOc) y 2 pozos de testigos, es decir aquellos que no tiene células pero si compuesto (DOb). El % de inhibición del crecimiento (%IC) se calculó con la siguiente expresión (Monks *et al.*, 1991):

$$\%IC = 100 - (DOt - DOb / DOc - DOb) * 100$$

6.6.6. Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media de los valores \pm SEM (error estándar de las medias, SD). La desviación típica y el error tipo de cada una de las medias obtenidas, así como la significación estadística de las diferencias, se determinó usando el ensayo de varianza ANOVA seguida de la prueba de Dunnett, para comparaciones múltiples. Los valores de $P < 0.05$ (*) se consideran significativos y los valores de $P < 0.01$ (**) se consideran altamente significativos.

7. RESULTADOS.

7.1. Recolecta de organismos y obtención de extractos.

Se recolectaron 12 individuos de los cuales, 10 pertenecen al grupo de los equinodermos (5 estrellas, 4 erizos y 1 pepino de mar) y 2 especies de gorgónidos. El listado sistemático de los invertebrados recolectados en la localidad de Punta Arena, B.C.S. se presenta en el anexo I. Se obtuvieron 21 extractos crudos, de los cuales 12 son de los cuerpos de los organismos y el resto fueron de sus vísceras. Se realizó una tabla con el peso inicial del organismo, peso del extracto y porcentaje de rendimiento (Tabla 2).

7.2. Actividad biológica de los extractos crudos.

7.2.1. Ensayos de actividad antibacteriana.

En cuanto a la prueba de actividad antibacteriana realizada frente a las cepas patógenas para el hombre, los extractos crudos del cuerpo y vísceras del erizo *Eucidaris thouarsii* presentaron actividad frente a *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 12 ± 0.58 y 13 ± 0.58 mm respectivamente. Frente a las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* ninguno resultó activo. Cabe señalar que el control positivo formó un halo de 16 y 12 mm respectivamente (Figura 2).

Tabla 2. Peso fresco de los organismos, y porcentaje de rendimiento de los extractos.

Clase o Familia	Especie	Sección del organismo	Peso Organismo (g)	Peso Extracto (g)	Rendimiento (%)
Gorgoniidae	<i>Pacifigorgia adamasi</i>	C	90.18	1.529	1.7
	<i>Leptogorgia rigida</i>	C	73.47	1.202	1.64
Holothuroidea	<i>Holoturia pluricuriosa</i>	C	67.29	1.110	1.65
		V	8.38	0.1938	2.31
Asteroidea	<i>Pentaceraster occidentalis</i>	C	106.6	1.088	1.02
		V	16	2.228	13.93
	<i>Acantaster planci</i>	C	91	1.769	1.94
		V	5.82	0.253	4.36
	<i>Phataria unifascialis</i>	C	56.29	0.631	1.12
		V	5.72	0.312	5.47
	<i>Pharia pyramidatus</i>	C	85	0.826	0.97
		V	5.61	0.334	5.96
	<i>Mithrodia bradleyi</i>	C	42.76	0.613	1.43
		V	7.24	0.561	7.75
Echinoidea	<i>Toxopneustes roseus</i>	C	124.77	2.274	1.82
		V	98	3.496	3.57
	<i>Centrostephanus coronatus</i>	C	67.44	0.956	1.42
		V	25.9	1.522	5.88
	<i>Echinometra vanbrunti</i>	C	102.81	1.033	1.01
		V	54	1.792	3.32
<i>Eucidaris thouarsii</i>	C	45.29	0.263	0.58	

C = Cuerpo, V = Vísceras

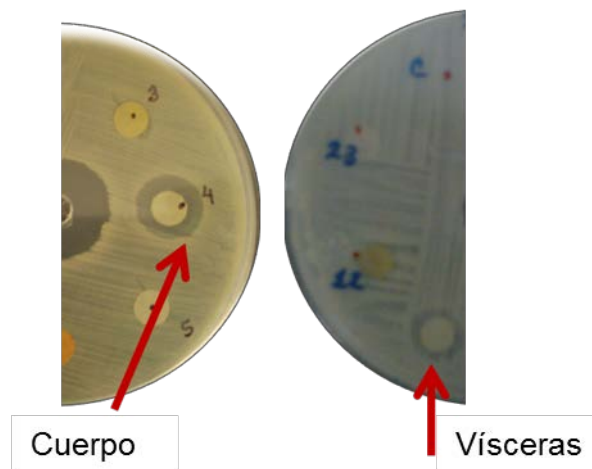


Figura 2. Halo de inhibición de los extractos del cuerpo y vísceras del erizo *Eucidaris thouarsii* frente a *Staphylococcus aureus*.

7.2.2. Actividad hemolítica.

Se realizó una primera prueba de hemólisis con los extractos crudos, de los cuales, diez fueron activos. Por lo que se realizó un segundo bioensayo con el extracto etanólico y butanólico de los organismos seleccionados (Tabla 3). Únicamente los extractos butanólicos fueron activos, siendo los del cuerpo de *Mithrodia bradleyi*, *Acantaster planci* y *Holoturia pluricuriosa* los que presentaron halos de lisis mayores a 25 mm.

7.3. Edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol) en oreja de ratón (*in vivo*).

Los resultados de la prueba antiinflamatoria realizada con los extractos crudos a una concentración de 1 mg mL^{-1} , mostraron de manera general, porcentajes de inhibición por abajo del 30%, sin embargo, los extractos crudos de *Leptogorgia rigida* y *Mithrodia bradleyi* resultan prometedores ya que presentaron un porcentaje de inhibición por arriba del 50%. El control positivo (indometacina) presentó un porcentaje de inhibición del 75% (Figura 3).

Tabla 3. Actividad hemolítica en placas de agar sangre, halos de lisis de extractos orgánicos (mm) (n=3).

Especies	Sección del organismo	Extracto	Tiempo			
			6h	12h	24h	48h
<i>M. bradleyi</i>	C	E	S/A	S/A	S/A	S/A
	C	B	+	++	+++	++++
	V	B	+	+	++	++
<i>A. planci</i>	C	E	S/A	S/A	S/A	S/A
	C	B	+	++	+++	++++
	V	E	S/A	S/A	S/A	S/A
	V	B	+	+	++	++
<i>P. occidentalis</i>	C	E	S/A	S/A	S/A	S/A
	C	B	+	+	++	++
	V	E	S/A	S/A	S/A	S/A
	V	B	+	+	+	++
<i>H. pluricuriosa</i>	C	E	S/A	S/A	S/A	S/A
	C	B	+	++	+++	+++++
<i>E. thouarsii</i>	C	E	S/A	S/A	S/A	S/A
	C	B	S/A	S/A	S/A	S/A
<i>T. roseus</i>	C	E	S/A	S/A	S/A	S/A
	C	B	S/A	S/A	S/A	S/A
	V	E	S/A	S/A	S/A	S/A
	V	B	S/A	S/A	S/A	S/A
Metanol			S/A	S/A	S/A	S/A
Cloroformo			S/A	S/A	S/A	S/A
Blanco			S/A	S/A	S/A	S/A

C = Cuerpo; V = Vísceras; E = Éter; B = Butanol; S/A = sin actividad

Rango valores (mm)	Calificación
8-11	+
12-16	++
17-20	+++
21-24	++++
25-27	+++++

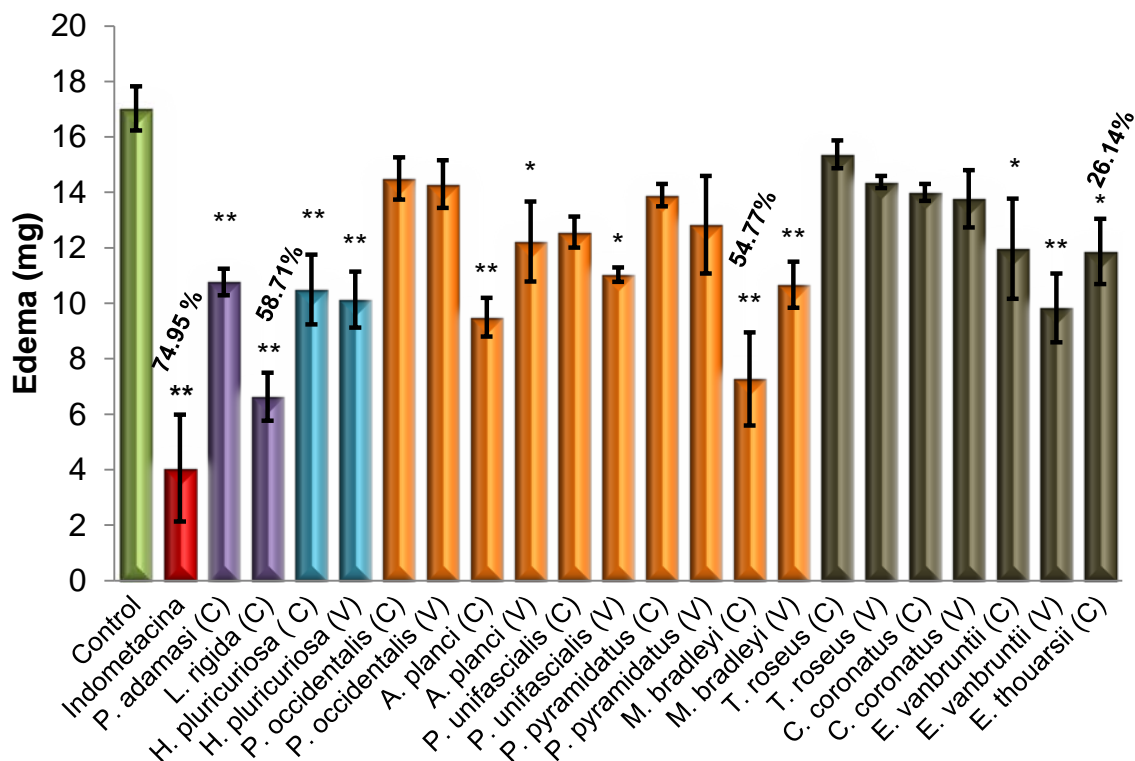


Figura 3. Actividad antiinflamatoria de los extractos crudos de invertebrados (1 mg oreja^{-1}) de Punta Arena de La Ventana, B.C.S. Datos expresados como la media \pm E.E.M., $n = 3$ (ANOVA post-test Dunnet: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$). (C = extracto cuerpo; V = extracto vísceras).

7.4. Selección de organismos para continuar con su estudio químico.

Los resultados de la actividad biológica de los extractos crudos de los diferentes organismos, permitieron detectar que los organismos con mayor potencial bioactivo fueron *Eucidaris thouarsii*, *Leptogorgia rigida*, *Mithrodia bradleyi*, *Acantaster planci* y *Holoturia pluricuriosa* (Tabla 4).

Una revisión bibliográfica específica de estudios químicos de estos géneros (Anexo III), puso de manifiesto que para *Eucidaris thouarsii* y *Mithrodia bradleyi* no existen reportes previos, por lo que se seleccionaron a *Eucidaris thouarsii*, *Leptogorgia rigida* y *Mithrodia bradleyi*, para continuar con el estudio químico.

A partir de *Leptogorgia rigida*, debido a la cantidad de extracto obtenido únicamente se pudieron obtener fracciones de éter y butanol (Figura 4). En el caso de *Eucidaris thouarsii* del cuerpo se obtuvieron cuatro fracciones (Figura 5) y de las visceras solamente la fracción eterea y butanólica (Figura 6).

Para *Mithrodia bradleyi*, del extracto del cuerpo se obtuvieron seis fracciones (Figura 7) y de las visceras la fracción eterea y butanólica (Figura 8).

Tabla 4. Organismos que presentaron los mejores resultados de actividad antibacteriana, hemolítica y antiinflamatoria.

Clase o familia	Especie	Sección del organismo	Actividad		
			antibacteriana	Hemolítica	Antiinflamatoria
Gorgoniidae	<i>Pacifigorgia adamasi</i>	C			
	<i>Leptogorgia rigida</i>	C			58.71%
Holothuroidea	<i>Holoturia pluricuriosa</i>	C		+++++	
		V			
Asteroidea	<i>Pentaceraster occidentalis</i>	C			
		V		++	
	<i>Acantaster planci</i>	C		++++	
		V			
	<i>Phataria unifascialis</i>	C			
		V			
	<i>Pharia pyramidatus</i>	C			
		V			
<i>Mithrodia bradleyi</i>	C		++++	54.77%	
	V		++++		
Echinoidea	<i>Toxopneustes roseus</i>	C			
		V			
	<i>Centrostephanus coronatus</i>	C			
		V			
	<i>Echinometra vanbrunti</i>	C			
		V			
<i>Eucidaris thouarsii</i>	C	12 a 16 mm			

C = Cuerpo, V = Visceras

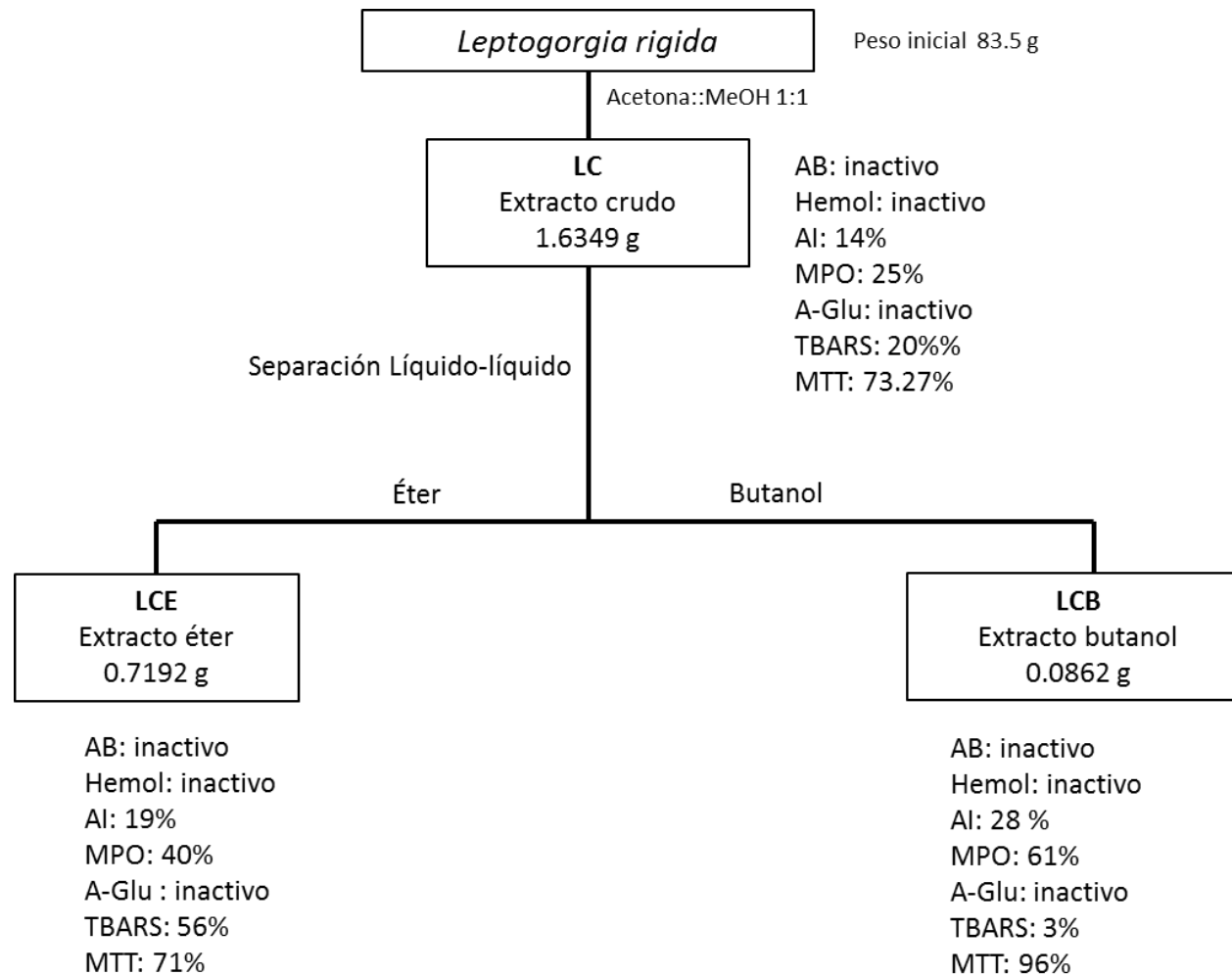


Figura 4. Esquema de obtención de las fracciones etérea y butanólica del gorgónido *Leptogorgia rigida*.

(Antibacteriana = AB; Hemolítica = Hemol; Antiinflamatorio = AI; Mieloperoxidasa = MPO; α -Glucosidasa = α -Glu; Lipoperoxidación = TBARS; Citotoxicidad (MTT) = MTT).

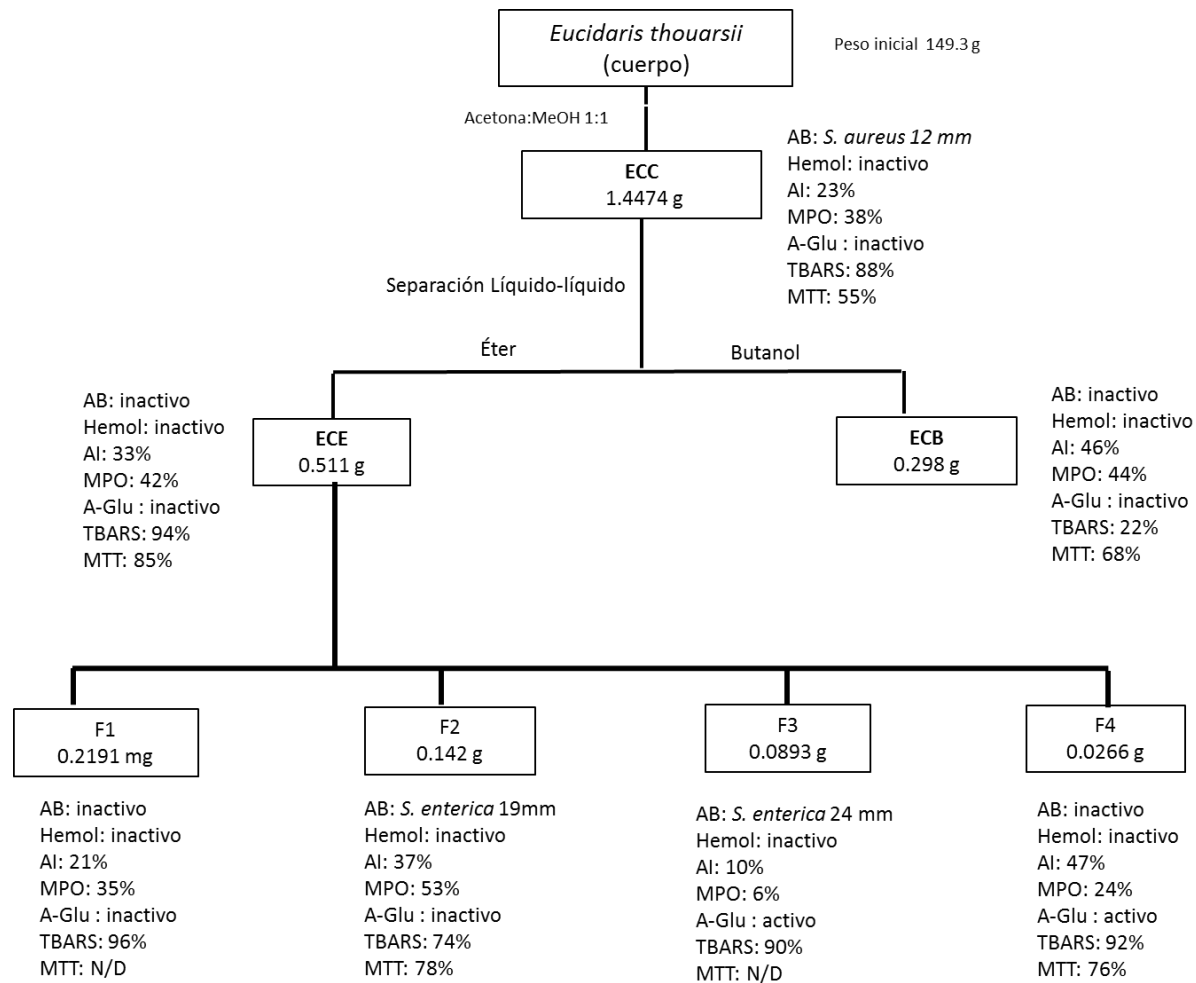


Figura 5. Esquema de la obtención de las fracciones del cuerpo del erizo *Eucidaris thouarsii*.

(Antibacteriana = AB; Hemolítica = Hemol; Antiinflamatorio = AI; Mieloperoxidasa = MPO; α -Glucosidasa = α -Glu; Lipoperoxidación = TBARS; Citotoxicidad (MTT) = MTT).

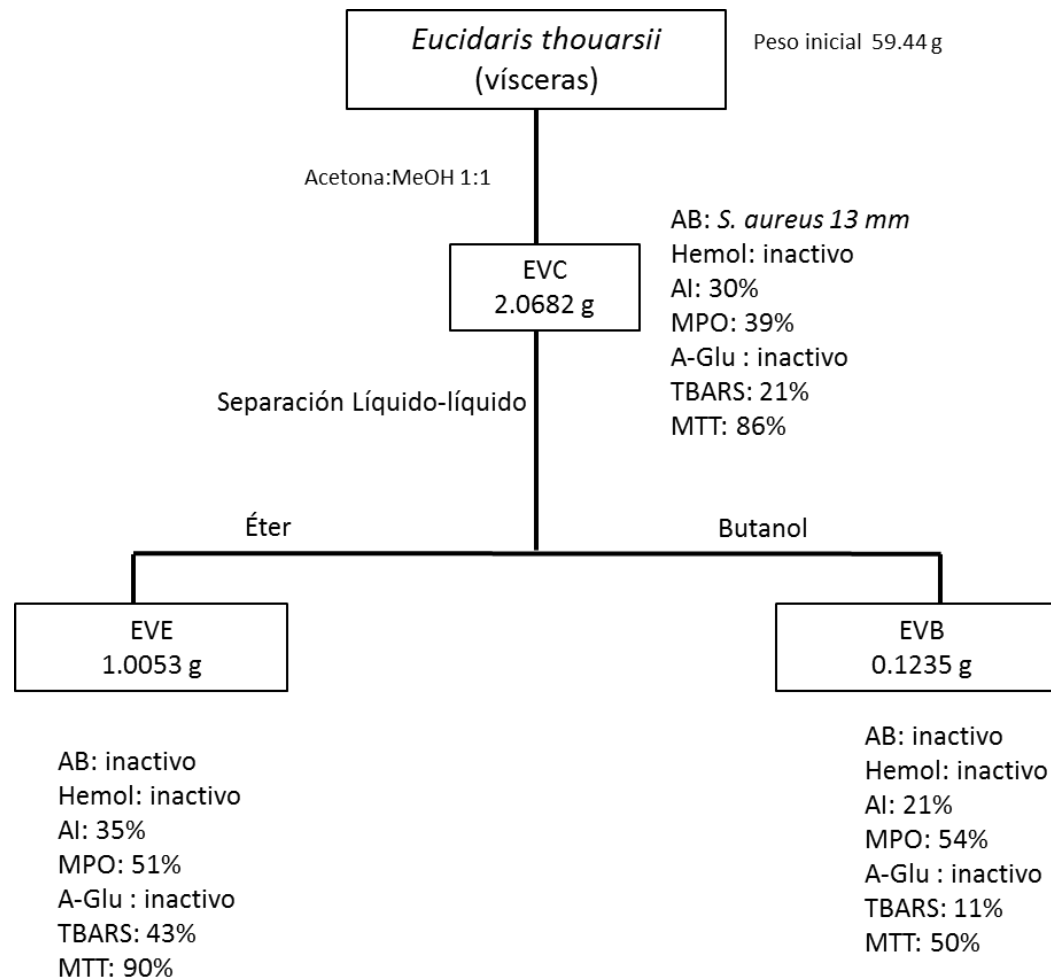


Figura 6. Esquema de las fracciones de las vísceras del erizo *Eucidaris thouarsii*.

(Antibacteriana = AB; Hemolítica = Hemol; Antiinflamatorio = AI; Mieloperoxidasa = MPO; α -Glucosidasa = α -Glu; Lipoperoxidación = TBARS; Citotoxicidad (MTT) = MTT).

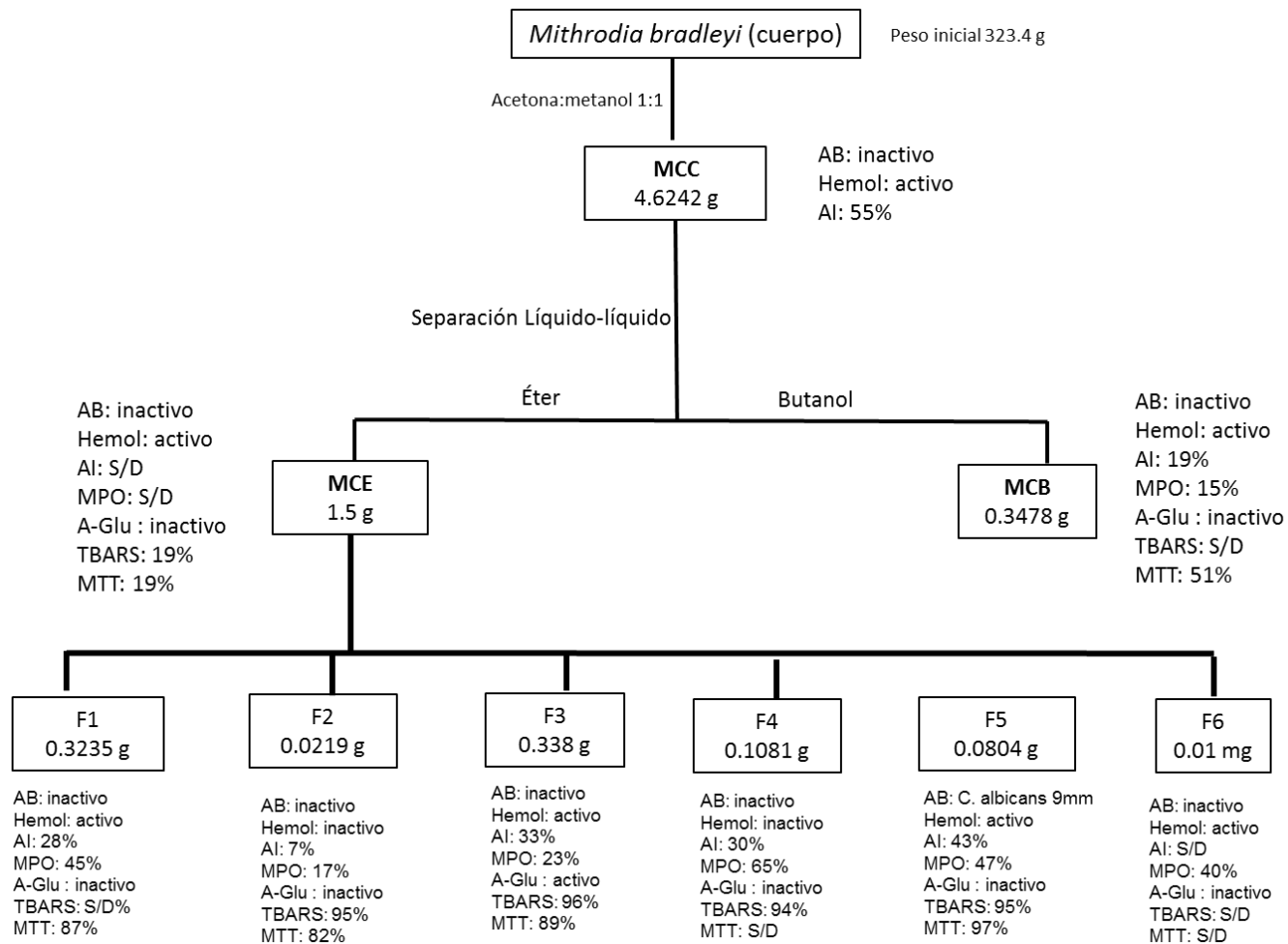


Figura 7. Esquema de las fracciones del cuerpo de la estrella *Mithrodia bradleyi*.

(Antibacteriana = AB; Hemolítica = Hemol; Antiinflamatorio = AI; Mieloperoxidasa = MPO; α -Glucosidasa = α -Glu; Lipoperoxidación = TBARS; Citotoxicidad (MTT) = MTT).

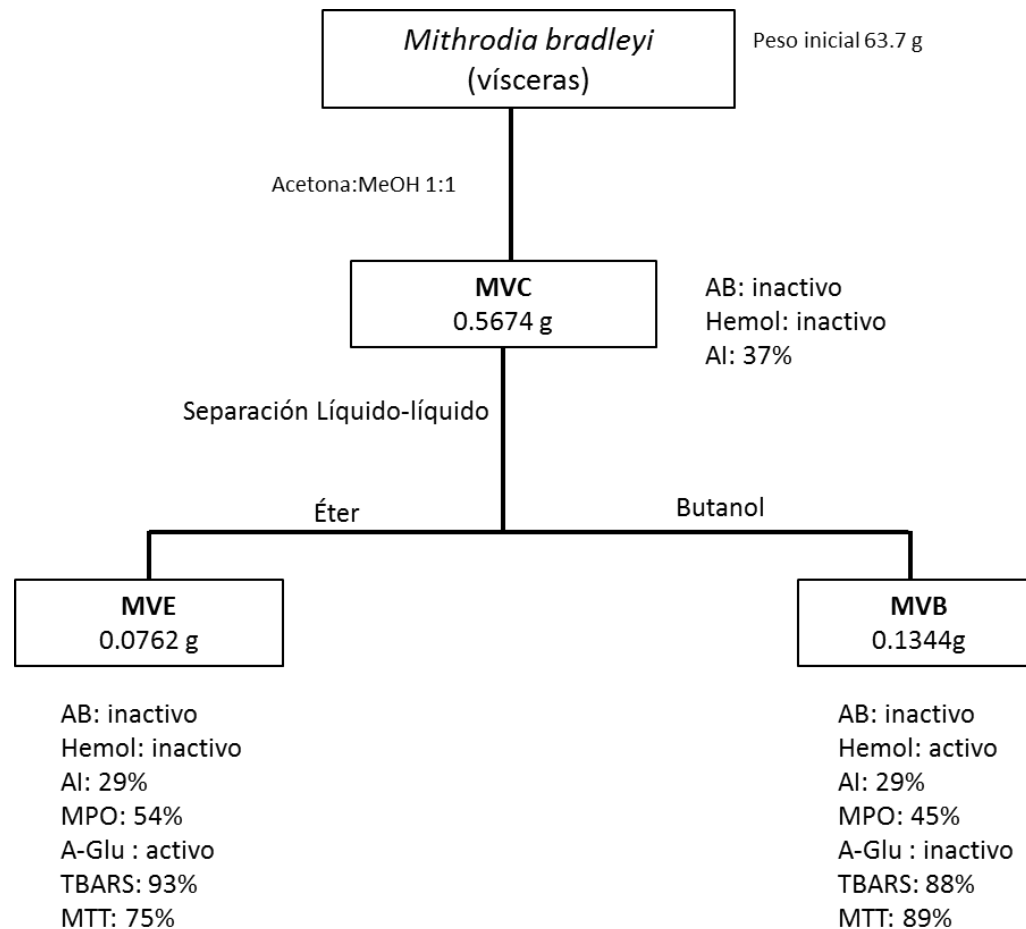


Figura 8. Esquema de las fracciones de las vísceras de la estrella *Mithrodia bradleyi*.

(Antibacteriana = AB; Hemolítica = Hemol; Antiinflamatorio = AI; Mieloperoxidasa = MPO; α -Glucosidasa = α -Glu; Lipoperoxidación = TBARS; Citotoxicidad (MTT) = MTT).

7.4.1. Actividad biológica de fracciones orgánicas.

7.4.1.1. Actividad antibacteriana.

En los bioensayos de actividad antibacteriana se probaron las fracciones de los tres organismos seleccionados frente a las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica*. La mejor actividad se presentó frente a *S. enterica* con halos de inhibición de 19 y 24 mm con las fracciones etanólicas F2 y F3 del extracto del cuerpo del erizo *E. thouarsi* respectivamente y el control positivo presentó un halo de 30.5 ± 0.8 mm (Tabla 6).

7.4.1.2. Actividad antifúngica.

En cuanto a los resultados de los ensayos realizados con las fracciones de los organismos seleccionados frente a la levadura *Candida albicans*, mostraron que únicamente la fracción F4 del extracto etanólico del cuerpo de *Mithrodia bradleyi* (MCEF4) presentó actividad con un halo de inhibición de 9 mm (Tabla 5).

Tabla 5. Prueba de actividad antibacteriana y antifúngica, halos de inhibición de fracciones seleccionados (mm) (n=3).

Especies	Sección del organismo	Extracto	Fracción	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aureginosa</i>	<i>S. enterica</i>
<i>M. bradleyi</i>	C	E	F4	S/A	9 ± 0.0	S/A	S/A
<i>E. thouarsi</i>	C	E	F2	S/A	S/A	S/A	19 ± 0.58
	C	E	F3	S/A	S/A	S/A	24 ± 0.0
	C	E	F4	S/A	S/A	S/A	S/A
C.P.				S/A	S/A	S/A	30.5 ± 0.8

C = cuerpo; E = extracto etanólico; C.P. = control positivo; S/A = sin actividad

7.4.1.3. Prueba de hemólisis.

En las pruebas de hemólisis solamente las fracciones de *Mithrodia bradleyi* presentaron hemólisis, la mayoría de ellos a partir de las 8 horas de incubación. Las fracciones más potentes fueron el extracto butanólico del cuerpo de *M. bradleyi* y la fracción F5 del extracto etanólico del cuerpo de *M. bradleyi* con halos de lisis de más de 25 mm a las 48 horas (Tabla 6).

Tabla 6. Prueba de hemólisis en placas de agar sangre, halos de lisis de fracciones de *Mithrodia bradleyi* (mm) (n=3).

Especie	Sección del organismo	Extracto	Fracción	Tiempo				
				4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
<i>M. bradleyi</i>	C	B		+	++	++	+++	++++
	C	E		++	++	++	++	+++
	C	E	F1	+	++	++	++	++
	C	E	F2	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
	C	E	F3	S/A	+	+	+	+
	C	E	F4	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
	C	E	F5	+	++	++	+++	++++
	C	E	F6	S/A	+	+	+	++
	V	B		+	+	+	++	++

C = cuerpo; E = extracto etanólico; B = extracto butanólico; S/A = sin actividad

Rango valores (mm)	Calificación
8-11	+
12-16	++
17-20	+++
21-24	++++
25-27	+++++

7.4.2. Modelos de inflamación *in vivo* e *in vitro*.

7.4.2.1. Edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol) en oreja de ratón (*in vivo*).

En la Figura 9 se muestran los resultados de la prueba antiinflamatoria realizada en el modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA y expresados como porcentaje de inhibición de la inflamación de las diferentes fracciones de *M. bradleyi*, *E. thouarsii* y *L. rigida* a una concentración de 1 mg mL⁻¹. Los cuales presentaron en su mayoría valores por debajo del 30 %, sin embargo las fracciones F4 y F5 de los extractos etanólicos del cuerpo de *M. bradleyi* (MCEF4 y MCEF5); el extracto butanólico del cuerpo de *E. thouarsii* y la fracción F4 del extracto etanólico del cuerpo de *E. thouarsii* (ECB y ECEF4) presentaron inhibiciones del 43, 46, 47 y 47 % respectivamente.

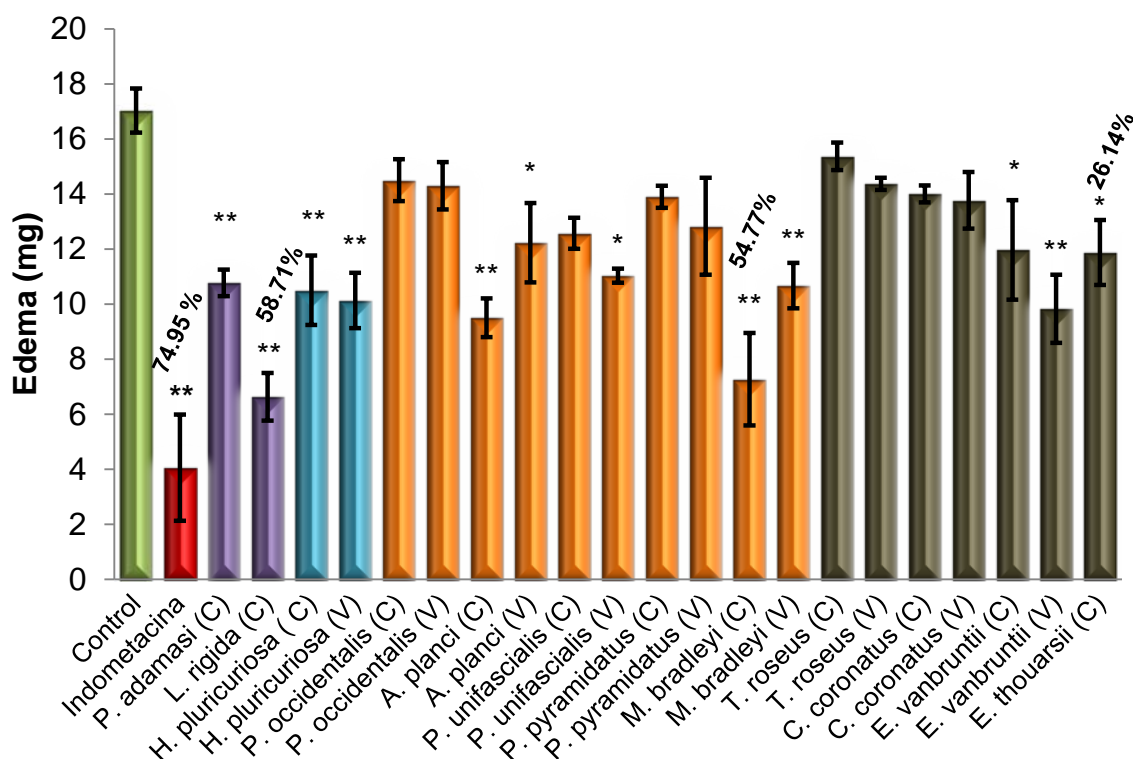


Figura 9. Actividad antiinflamatoria de las fracciones de los extractos seleccionados (1 mg oreja⁻¹). Datos expresados como la media \pm E.E.M., n = 3 (ANOVA post-test Dunnet: *p<0.05 y **p<0.01). (E = extracto etanólico; B = extracto butanólico).

7.4.2.2. Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) (*in vitro*).

La inhibición del contenido de MPO fue evaluada indirectamente utilizando TMB como sustrato del H₂O₂, el cual no logra ser transformado en HClO por la MPO residual. La indometacina inhibió el contenido de MPO en un 90% y en 96 % al edema. En el caso del erizo *E. thouarsii* podemos observar que la mayoría de las fracciones presentan una mayor inhibición del contenido de MPO en comparación con la inhibición del edema, siendo la F4 con un porcentaje de 76 % de inhibición de la MPO la de mayor actividad (Figura 10-A).

Las fracciones F4 y F6 de la estrella *M. bradleyi* presentaron valores de inhibición del contenido de MPO del 65 y 60 % (Figura 10-B) y de un 30 y 47 % de inhibición del edema respectivamente. La fracción butanólica del gorgónido *L. rigida* dió como resultado una inhibición del contenido de MPO del 55 % y un 28 % de inhibición del edema (Figura 10-C).

La mayoría de los resultados de las fracciones de los tres organismos muestran un mayor porcentaje de inhibición del contenido de MPO con respecto al porcentaje de inhibición del edema, no así la indometacina la cual tiene un comportamiento inverso, al inhibir en mayor proporción al edema.

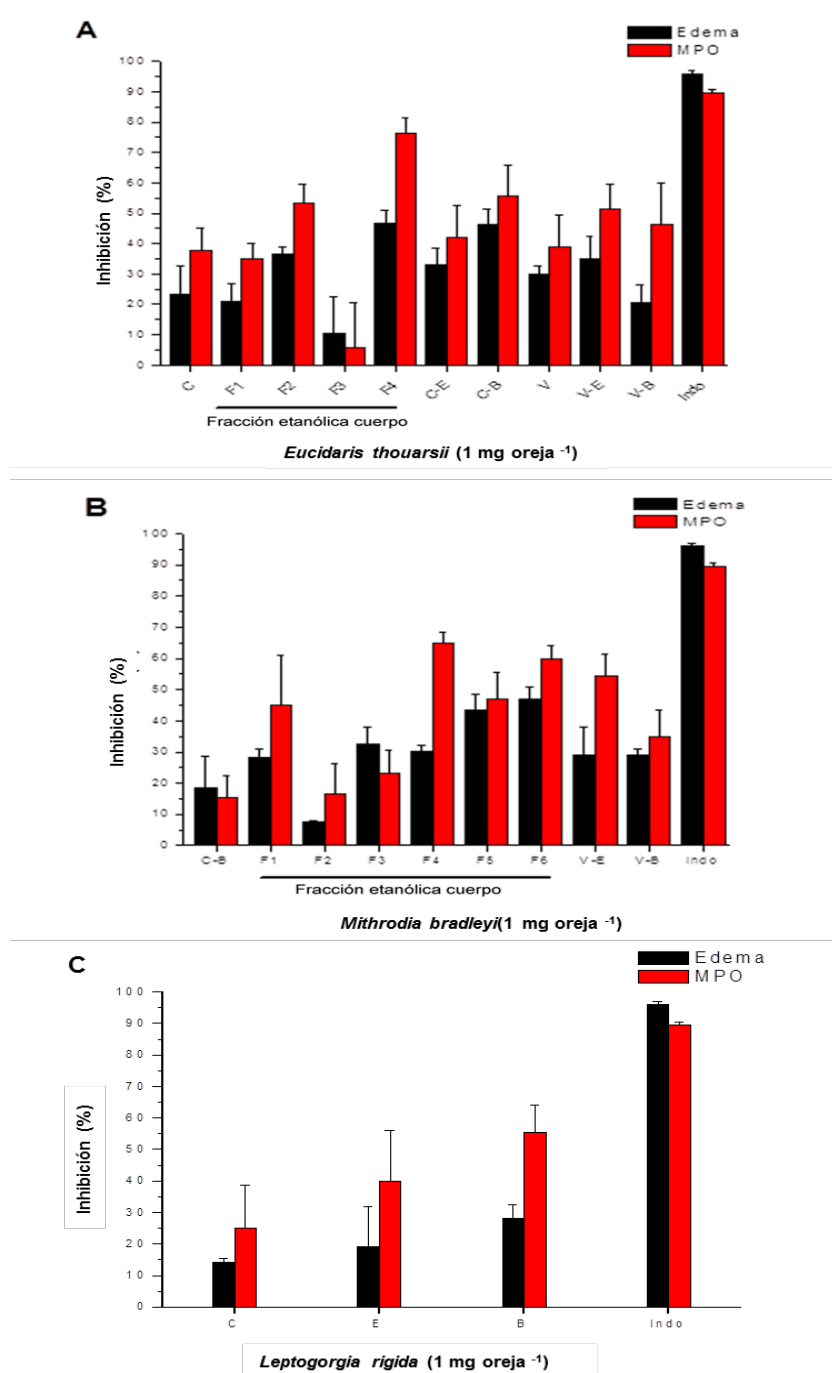


Figura 10. Porcentaje de inhibición de las fracciones sobre la enzima mieloperoxidasa (MPO) a una concentración de 1 mg oreja⁻¹ **A)** *Eucidaris thouarsii*, **B)** *Mithrodia bradleyi*, **C)** *Leptogorgia rigida*. C = extracto del cuerpo, V = extracto de las vísceras, E = extracto etanólico, B = extracto butanólico, Indo = indometacina.

7.4.3. Actividad Antioxidante.

7.4.3.1. Inhibición de la α -glucosidasa.

De todas las fracciones evaluadas solamente las fracciones F3 y F4 del extracto etanólico del cuerpo del erizo *E. thouarsii* (ECEF3 y ECEF4), así como el extracto crudo de vísceras de *M. bradleyi* y la fracción F2 del extracto etanólico del cuerpo de *M. bradleyi* (MVE y MCEF2), fueron los que presentaron actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa. En la tabla 7 se muestra el porcentaje de inhibición de estas fracciones, siendo MCEF2 y ECEF3 a una concentración de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ las que presentaron el mayor valor, con 96 % de inhibición para ambas fracciones, en comparación con el 82.89 % presentado por el inhibidor de referencia que fue la quercitina.

Tabla 7. Efecto de la actividad inhibitoria de las fracciones sobre α -glucosidasa.

Especie	Sección	Extracto	Fracción	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Inhibición (%)
<i>E. thouarsii</i>	C	E	F3	10	96
		E		100	100
		E		1000	100
	C	E	F4	1	6
		E		10	15
		E		100	26
<i>M. bradleyi</i>	C	E	F2	1	7
		E		10	96
		E		100	99
	V	E		1	12
		E		10	51
		E		100	97
Quercitina				1	6.71
				10	82.89

C = Cuerpo; V = Vísceras; E = Éter

7.4.3.2. Inhibición de la lipoperoxidación inducida con FeSO₄, cuantificada por la técnica TBARS.

En la tabla 8 se observa el porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación de lípidos de las fracciones de *M. bradleyi*, *E. thouarsii* y *L. rigida* a las concentraciones de 25, 250 y 2500 µg mL⁻¹; y 10, 100 y 1000 µg mL⁻¹. Así mismo, los resultados mostraron que la fracción etanólica F3 del cuerpo del erizo *E. thouarsii* presentó una actividad a 100 µg mL⁻¹ de 94.68% de inhibición de la lipoperoxidación, actividad seguida por las fracciones etanólicas F2 y F5 del cuerpo de la estrella *M. bradleyi*, las cuales presentaron una actividad a 100 µg mL⁻¹ de 51 y 68.44 % respectivamente.

Tabla 8. Efecto de la actividad inhibitoria de las fracciones sobre la lipoperoxidación inducida con FeSO₄, cuantificada por la técnica TBARS.

Especie	Sección del organismo	Extracto	Fracción	µg mL ⁻¹	% de inhibición
<i>M. bradleyi</i>	C	B		25	-4.74
	C	B		250	-5.07
	C	B		2500	-17.48
	C	E		25	2.76
	C	E		250	24.7
	C	E		2500	96.53
	C	E	F1	25	4.12
	C	E		250	49.44
	C	E		2500	94.68
	C	E	F2	10	8.27
	C	E		100	51
	C	E		1000	95.44
	C	E	F3	10	12.79
	C	E		100	44.9
	C	E		1000	95.76
	C	E	F4	10	6.53
	C	E		100	22.33
	C	E		1000	94.18

Tabla 8. Continuación...

Especie	Sección del organismo	Extracto	Fracción	µg mL⁻¹	% de inhibición
<i>M. bradleyi</i>	C	E	F5	10	-2.44
	C	E		100	68.44
	C	E		1000	94.66
	V	E		10	6.81
	V	E		100	46.84
	V	E		1000	93.46
	V	B		10	-4.53
	V	B		100	4.49
	V	B		1000	88.13
<i>E. thouarsii</i>	C	B		10	-3.69
	C	B		100	1.93
	C	B		1000	21.68
	C	E		10	-0.65
	C	E		100	2.57
	C	E		1000	88.31
	C	E	F1	10	1.56
	C	E		100	35.99
	C	E		1000	95.84
	C	E	F2	10	2.5
	C	E		100	8.75
	C	E		1000	74.12
	C	E	F3	10	25.87
	C	E		100	94.68
	C	E		1000	90.3
	C	E	F4	10	-1.69
	C	E		100	30.15
	C	E		1000	91.61
	V	E		10	4.35
	V	E		100	3.83
V	E		1000	43.2	
V	B		10	-5.85	
V	B		100	-5.53	
V	B		1000	11.02	

Tabla 8. Continuación...

Espece	Sección del organismo	Extracto	Fracción	$\mu\text{g mL}^{-1}$	% de inhibición
<i>L. rigida</i>	C			10	7.24
	C			100	5.54
	C			1000	10.93
	C		E	10	0.98
	C		E	100	2.06
	C		E	1000	55.67
	C		B	10	-4.49
	C		B	100	-1.68
	C		B	1000	20
Quercitina				10	95.65
α -Tocoferol				10	59
				100	79

C = cuerpo; V = vísceras; E = extracto etanólico; B = extracto butanólico

7.4.4. Citotoxicidad.

7.4.4.1. Ensayo de viabilidad celular determinada por la reducción del MTT.

En la Tabla 9 se muestran las fracciones de *M. bradleyi*, *E. thouarsii* y *L. rigida*. La mayoría de las fracciones presentaron baja toxicidad frente a la cepa de macrófagos murinos (J774) a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se observa que once de las fracciones presentaron una viabilidad mayor al 75 %. Las fracciones mas cercanas al 100 % de viabilidad fueron la fracción F5 del extracto etanólico del cuerpo de *M. bradleyi* (MCEF5) y el extracto butanólico de *L. rigida* con valores del 97.3 y 96.41 % respectivamente, y la fracción F1 del extracto etanólico del cuerpo de *M. bradleyi* (MCEF1) fue la que presentó la citotoxicidad más alta, con el 18.53 % de viabilidad celular.

Tabla 9. Porcentaje de viabilidad celular mediante el ensayo MTT sobre la línea celular de macrófagos murinos (J774) en presencia de las fracciones a una concentración de 50 µg mL⁻¹.

Espece	Sección del organismo	Extracto	Fracción	J774 (%)
<i>M. bradleyi</i>	C	B		51.46
	C	E	F1	18.53
	C	E	F2	86.65
	C	E	F3	81.66
	C	E	F4	88.58
	C	E	F5	97.3
	V	E		74.52
	V	B		88.87
<i>L. rigida</i>		Crudo		73.27
		E		71.49
		B		96.41
<i>E. thouarsii</i>	C	Crudo		54.59
	C	E		85.07
	C	B		67.54
	C	E	F2	78.36
	C	E	F4	75.67
	V	Crudo		86.22
	V	E		90.24
	V	B		50.36

C = Cuerpo; V = vísceras; E = extracto etanólico; B = extracto butanólico

7.4.4.2. Evaluación de la proliferación celular por el Bioensayo de Sulforodamina B.

La actividad inhibitoria de la proliferación celular de líneas de cáncer humano de las fracciones de *M. bradleyi*, *E. thouarsii* y *L. rigida* fueron evaluadas en las seis líneas celulares de tumores humanos. Los resultados se resumen en la Tabla 10 expresadas como % de inhibición del crecimiento a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Las fracciones etanólicas del cuerpo y de las vísceras del erizo *E. thouarsii* (EVC y EVE) presentaron nula citotoxicidad contra 5 de las líneas celulares de cáncer con excepción de la línea SKLU-1. La fracción etanólica F5 de la estrella *M. bradleyi*; los extractos crudo y butanólico del gorgónido *L. rigida*; así como las fracciones butanólica del cuerpo y las fracciones cruda, etanólica y butanólica de las vísceras del erizo *E. thouarsii* mostraron actividad citotóxica moderada contra todas las líneas celulares de cáncer con valores menores al 50%. La fracción etanólica F1 del cuerpo de la estrella *M. bradleyi*, las fracciones etanólica y F4 del cuerpo del erizo *E. thouarsii* presentaron una citotoxicidad muy alta contra todas las líneas celulares de cáncer con valores del 100%.

Tabla 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento por medio de la prueba de Sulforodamina B, sobre las líneas celulares: U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama, SKLU-1= pulmón.

Especie	Sección del organismo	Extracto	Fracción	% de inhibición del crecimiento					
				U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
<i>M. bradleyi</i>	C	B		39.74	72.58	N/C	34.31	23.14	85.7
	C	E	F1	100	100	N/C	100	100	97.05
	C	E	F2	N/C	4.44	7.71	85.04	54.07	26.68
	C	E	F3	68.59	64.17	69.42	56.96	100	63.23
	C	E	F4	N/C	20.67	45.47	6.87	56.05	22.09
	C	E	F5	1	0.78	32.96	2.63	12.21	10.91
	V	E		44.53	65.3	100	100	32.46	73.3
V	B		7.48	37.24	85.1	47.54	12.59	10.78	
<i>L. rigida</i>		Crudo		6.54	19.93	49.58	47.59	12.47	41.1
		E		66.75	72.9	46.15	100	61.95	83.17
		B		9.86	NC	3	2.23	N/C	13.49
<i>E. thouarsii</i>	C	E	F2	55.08	2.27	97	100	100	82.17
	C	E	F4	100	100	100	100	76.1	100
	C	Crudo		N/C	N/C	49.1	73.49	27.14	9.04
	C	E		100	100	100	100	54.65	100
	C	B		2.35	10.47	34.2	31.7	N/C	26.34
	V	Crudo		S/A	N/C	N/C	N/C	N/C	3.96
	V	E		S/A	N/C	N/C	N/C	N/C	11.26
V	B		0.47	N/C	2.8	0.18	N/C	11.99	

C = Cuerpo; V = vísceras; E = extracto etanólico; B = extracto butanólico; N/C= no citotóxico. S/A= sin actividad

Resulta interesante la gama de actividades que presentaron las diferentes fracciones de *M. bradleyi*, *E. thouarsii* y *L. rigida*. En la tabla 11 se muestra un concentrado de los valores de actividad en las diferentes pruebas realizadas.

Tabla 11. Fracciones que presentaron los mejores resultados de actividad antibacteriana, antifúngica, hemolítica, antiinflamatoria, antioxidante, citotóxica.

	Sección	Extracto	Fracción	Anti Bacteriana (mm)	Antifúngica (mm)	Hemolítica	Anti inflamatoria (%)	% Inh. MPO	α-GLUC	TBARS 1mg mL ⁻¹	MTT	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	
<i>L. rigida</i>		Crudo									73							
		E									71		73		100		83	
		B						55			96							
<i>E. thouarsii</i>	C	Crudo		12						88					73			
	C	E								94	85	100	100	100	100		100	
	C	B					46	56										
	C	E	F1							96								
	C	E	F2	19					53	74	78			97	100	100	82	
	C	E	F3	24					†	90								
	C	E	F4				47	76	†	92	76	100	100	100	100	76	100	
	V	Crudo		13							86							
	V	E									90							
	V	B																
<i>M. bradleyi</i>	C	E				†						100	100		100	100	97	
	C	B				†							73				86	
	C	E	F1			†									85			
	C	E	F2							95	87					100		
	C	E	F3			†			†	96	82							
	C	E	F4						65	94	89							
	C	E	F5		9	†	43			95	97							
	C	E	F6			†			60									
	V	E							54	†	93	75			100	100		73.3
	V	B				†				88	89				85			

C = cuerpo, V = vísceras, E = extracto etanólico, B = extracto butanólico, † = activo

8. DISCUSIÓN.

Los invertebrados marinos son considerados como organismos con gran potencial en el aislamiento de compuestos con interesantes actividades farmacológicas (Blunt, 2011). Los equinodermos, son de amplia distribución geográfica, en el Pacífico se distribuyen del Golfo de California hasta Centroamérica y las Islas Galápagos; siendo el Golfo de California donde se presentan en mayor variedad y abundancia (Solis-Marín *et al.*, 2014), lo que hace de este sitio un lugar idóneo para el estudio químico de estos organismos. Los resultados de las pruebas de actividad biológica realizadas con los extractos y fracciones de los diez equinodermos y dos gorgónidos de punta Arena de La Ventana, B.C.S., mostraron una amplia gama de actividades y fueron *Eucidaris thouarsii*, *Mithrodia bradleyi* y *Leptogorgia rigida* los que presentaron el mayor potencial. Diversas investigaciones han indicado la capacidad de estos organismos sésiles para biosintetizar compuestos activos (Fenical, 1982; Faulkner, 1984; Marcano & Hasegawa, 2002; Blunt, 2011), las cuales pueden tener aplicación farmacológica o industrial (McLaughlin *et al.*, 1991).

8.1. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones.

Los equinodermos al ser organismos bentónicos son susceptibles a la colonización bacteriana (Bryan *et al.*, 1994), por lo que sería de esperar que sintetizarán una gran variedad de compuestos con actividad antibacteriana, de hecho, estudios químicos preliminares realizados con equinodermos de Baja California y del Golfo de California pusieron de manifiesto que entre el 43 y 58% de los organismos sometidos a esta prueba presentaron actividad antibacteriana (Shaw *et al.*, 1976; Rinehart Jr. *et al.*, 1981), de igual forma un estudio realizado en el norte del Golfo de México también indicó que el 80% de los equinodermos sometidos a actividad antibacteriana fueron activos (Bryan *et al.*, 1994). En el presente trabajo de los 21 extractos obtenidos a partir de los 12 invertebrados, sólo los extractos de cuerpo y vísceras de *Eucidaris thouarsii* presentaron

actividad frente a la cepa patógena *Staphylococcus aureus*, lo cual representa el 9.5% de organismos activos. Este resultado fue menor al esperado y no se presentó actividad frente a bacterias Gram-negativas, lo que puede estar relacionada con el hecho de que muchas bacterias Gram-negativas son resistentes a agentes tóxicos del medio ambiente, debido a la barrera de lipopolisacáridos de su membrana externa (Morton *et al.*, 1998). Observaciones similares se han realizado en estudios con compuestos antibacterianos aislados de gorgónidos (Correa, 2012).

De las fracciones obtenidas a partir del extracto crudo de *Eucidaris thouarsii*, ninguna fracción fue activa frente a *S. aureus*, lo que posiblemente se debe a un efecto sinérgico de los diferentes compuestos y al irse fraccionando perdieron actividad. Es de notar que frente a la cepa *Salmonella enterica* dos de las fracciones fueron activas, una de ellas con un halo muy similar al presentado por el control positivo.

A partir de equinodermos se han aislado una gran cantidad de compuestos con actividad antibacteriana de tipo peptídico y proteico (Li *et al.*, 2010). En específico para erizos a partir de extractos del celoma y cuerpo de *S. droebachiensis* se observó actividad antibacteriana y los compuestos responsables fueron de naturaleza proteica (Haug *et al.*, 2002). De igual forma en extractos de huevos de *Paracentrotus lividus*, fue una lisozima la responsable de la actividad antibacteriana (Stabili *et al.*, 1992).

En este trabajo la metodología utilizada no fue dirigida al aislamiento de péptidos o compuestos de tipo proteico, por lo que la actividad debe estar dada por compuestos de otra naturaleza (como polifenoles, esteroides, terpenos entre otros). Del erizo *E. thouarsii* no se encontraron precedentes de actividad antibacteriana, pero si se ha observado que extractos de hexano e hidroalcohólicos del erizo *Temnopleurus alexandri* mostraron actividad frente a diferentes cepas patógenas tanto Gram positivas como Gram negativas y un

análisis mediante cromatografía de gases indicó que los compuestos mayoritarios del extracto eran el pentadecano, heptadecano, eicosano y docosano para el extracto de hexano (Uma & Parvathavarthini, 2010), mientras que en el extracto hidroalcohólico se observó la presencia de esteroides como son, colesterol, pelargonato, desmosterol y crinosterol, los cuales sean posiblemente los responsables de dicha actividad (Parvathavarthini & Uma, 2014).

Por otra parte, en este trabajo, sólo las fracciones obtenidas a partir del cuerpo de *Eucidaris thouarsii* fueron activas, mientras que las fracciones de vísceras no presentaron actividad antibacteriana, contrario a esto, en extractos de metanol y cloroformo de gónadas, vísceras y espinas-cuerpo del erizo *Tripneustes gratilla*, la mejor actividad se presentó en gónadas mientras que el cuerpo no fue activo (Abubakar *et al.*, 2012).

8.2. Actividad hemolítica de extractos y fracciones.

Los extractos de butanol de *Mithrodia bradleyi*, *Acantaster planci* y *Holoturia pluricuriosa* fueron los que presentaron los mejores halos de lisis. La actividad hemolítica en equinodermos ha sido atribuida a dos agentes, las hemolisinas y las saponinas (Stabili *et al.*, 1992).

Las hemolisinas son proteínas capaces de originar la lisis o ruptura de la integridad estructural de los eritrocitos (Bennington, 1993). Las saponinas son sustancias glicosídicas, capaces de alterar la permeabilidad de las membranas celulares dando como resultado una reacción hemolítica, ya que ocasionan ruptura o destrucción de los eritrocitos; estas sustancias son fuertemente líticas, hidrosolubles y estables a altas temperaturas (Marcano & Hasegawa, 2002). La mayoría de las actividades que provocan estas sustancias, son consecuencia de su interacción con el esteroide presente en las membranas, causando interferencias en la integridad de las mismas, lo cual podría conducir a la lisis celular (Stonik *et al.*, 1999).

Originalmente se pensaba que las saponinas eran exclusivas de plantas, diversas investigaciones han puesto de manifiesto que los equinodermos son los únicos animales que presentan este tipo de compuestos (Matranga, 2005), siendo específicos para los grupos Asteroidea (estrellas) y Holoturoidea (pepinos) (Burnell & ApSimon, 1983; Maier *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Esto concuerda con lo reportado en el presente trabajo ya que de los diferentes equinodermos sometidos al bioensayo, únicamente las estrellas (*Mithrodia bradleyi*, *Acantaster planci* y *Pentaceraster occidentalis*) y el pepino de mar (*Holoturia pluricuriosa*) presentaron actividad.

En el ambiente, estos organismos utilizan a las saponinas como potentes venenos contra depredadores como peces, ya que por su estructura surfactante “detergentes”, generan resistentes espumas por agitación en solución acuosa, que tienen acción antibacteriana, estimulante del sistema nervioso central, antipirética, sedante, expectorante y antiinflamatoria (Marcano & Hasegawa, 2002; Hernández & Fariñas, 2005).

8.3. Edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol) en oreja de ratón (*in vivo*).

A pesar de los esfuerzos médicos realizados para tratar las enfermedades inflamatorias, la eficacia clínica de las terapias antiinflamatorias no es satisfactoria y los medicamentos clínicamente importantes para controlar estas patologías se asocian con múltiples reacciones adversas sistémicas que a veces son limitantes para el tratamiento (Arnstein, 2012). La búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios continúa, y en este sentido, los compuestos aislados de invertebrados marinos pueden desempeñar un importante papel como una fuente alternativa para el tratamiento de numerosas enfermedades que producen inflamación. El modelo de edema auricular inducido por TPA es ampliamente utilizado para evaluar la actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de productos naturales (Rodríguez *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2008; González *et al.*,

2011). En este trabajo se puede observar que en general todos los extractos lograron inhibir en algún grado el desarrollo del edema producido por la aplicación de TPA. Tal es el caso de *Leptogorgia rigida*, *Mithrodia bradleyi* (cuerpo), *Acantaster planci* (cuerpo) y *Holoturia pluricuriosa* (vísceras), los cuales se destacan por presentar porcentajes de inhibición superiores al 40%, criterio usado para considerar un extracto como promisorio (Tincani *et al.*, 2007), lo que confirma que los invertebrados marinos presentan un amplio potencial como posibles fuentes de metabolitos con actividad antiinflamatorias. Los ésteres de forbol, incluyendo el 13-acetato de 12-O-tetradecanoiforbol (TPA) son diterpenos aislados de especies de la familia Euphorbiaceae, que tienen acción inflamatoria y pro carcinogénica (Hecker, 1968). La aplicación tópica de TPA en la oreja del ratón induce una respuesta inflamatoria prolongada, intensa y bifásica en la epidermis. Así mismo se observa un aumento de la actividad de la mieloperoxidasa, entre otros eventos (Sánchez & Moreno, 1999; Murakawa *et al.*, 2006).

En este sentido, los extractos crudos de *Leptogorgia rigida* y *Mithrodia bradleyi* probados a una dosis de 1 mg oreja⁻¹, mostraron un porcentaje de inhibición del edema mayor al 50 %, catalogándolos como un extracto promisorio (Tincani *et al.*, 2007) en comparación con la indometacina (control positivo) que presentó una inhibición del 80 %. Las fracciones de *M. bradleyi* presentaron una inhibición menor al 50 % con respecto al extracto crudo, sin embargo las fracciones de *E. thouarsii* aumentaron su porcentaje de inhibición a un poco mas del doble con respecto al extracto crudo. Este resultado concuerda con lo reportado por Correa *et al.* (2009) donde mencionan que las fracciones de *Pseudopterogorgia elisabethae* presentaron una inhibición de la inflamación mayor a lo obtenido con los extractos crudos.

El modelo de edema inducido por TPA en oreja de ratón, es un modelo clásico de una inflamación aguda que permite evaluar las propiedades antiinflamatorias de extractos y fracciones, así como también, es un estudio que

sirve para ver la presencia de mediadores antiinflamatorios en el sitio de inflamación (Correa *et al.*, 2009).

8.4. Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) (*in vitro*).

Durante un evento en el que se produce inflamación, los leucocitos polimorfonucleares (también llamados neutrófilos) son las primeras células que son reclutadas desde la sangre periférica hasta el sitio de inflamación, seguidas tiempo después por los monocitos. La infiltración de estas células al tejido infectado y dañado está regulada y mediada por moléculas de adhesión, citosinas y componentes de la matriz extracelular tanto en paredes de los vasos sanguíneos como en el tejido adyacente (Muller, 2002; Taylor & Gallo, 2006). Una de las funciones de los polimorfonucleares es la liberación de proteínas y generación de radicales libres, los cuales contribuyen a la defensa contra patógenos, a la regulación del proceso inflamatorio y a combatir el daño causado al tejido. Un producto peculiar de los polimorfonucleares es la enzima mieloperoxidasa (MPO) que es almacenada en grandes cantidades en los gránulos azurófilos de estas células (Klebanoff, 2005). Una de las sustancias que aumenta la infiltración de polimorfonucleares en los tejidos es el TPA, lo cual se ve reflejado en un aumento de la actividad de la MPO (Murakawa *et al.*, 2006). Los resultados de las fracciones muestran que existe una correlación entre la inhibición de la MPO y la infiltración de neutrófilos en las orejas de ratón. La indometacina inhibe la infiltración de polimorfonucleares (Issekutz, 1983) y así mismo inhibe la formación de HClO, propiedad que comparte con varios AINEs como piroxicam, salicilato, sulindac, ibuprofeno y aspirina. Esta capacidad de inhibición se correlaciona parcialmente con el rango de dosis terapéuticas antiinflamatorias en cada fármaco (Shacter *et al.*, 1991). En nuestros resultados podemos observar que la fracción F4 del erizo *E. thouarsii* presentó un porcentaje de inhibición de la MPO del 76 % el cual es similar a la indometacina y a otros AINEs, por lo tanto la inhibición de la

infiltración celular sea un mecanismo que explique en parte la inhibición de la infiltración de esta fracción.

Actividad antioxidante.

Inhibición de la α -glucosidasa.

Las enzimas glucosidasas localizadas en los vellos de la superficie de la membrana intestinal, son enzimas clave en la digestión de carbohidratos. La administración oral de inhibidores de glucosidasas retarda la digestión y absorción de carbohidratos y modulan así, la elevación de la glucosa postprandial en sangre (Sevilla-Ascencio *et al.*, 2013). En el alga parda *Ecklonia cava* se ha determinado que compuestos de tipo floroglucinales presentan esta actividad por lo que se las propuesto como nutraceuticos (Lee *et al.*, 2009). En el presente estudio los resultados preliminares mostrados por fracciones de *E. thouarsii* y *M. bradleyi* con altos porcentajes de inhibición de la α -glucosidasa permiten indicar que pueden ser utilizados en el manejo de la hiperglucemia postprandial.

Inhibición de la lipoperoxidación.

La peroxidación de lípidos expuestos al oxígeno es responsable del daño a los tejidos *in vivo*; los cuales pueden producir cáncer, enfermedades inflamatorias, aterosclerosis y envejecimiento (Ramos-Escudero *et al.*, 2010). Las fracciones de *E. thouarsii* y *M. bradleyi* mostraron interesantes porcentajes de inhibición (94.68 y 68.44 %, respectivamente) estos valores fueron más altos a los reportados para extractos del molusco *Sepia officinalis* y del bivalvo *Coelatura aegyptiaca*, que mostraron porcentajes de inhibición entre el 40 y 60 % a la misma concentración probada de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fahmy & Soliman, 2013). El mismo comportamiento se observó al comparar los resultados con plantas como fue el caso de *Dioscorea*

trifida (porcentaje de inhibición del 66.7 %), que contiene altas concentraciones de polifenoles, flavonoides, taninos y antocianinas.

Los resultados de este trabajo indican que los extractos de *E. thouarsii* y *M. bradleyi* pueden inhibir *in vitro* el daño producido por radicales libres y por lo tanto presentan un buen efecto protector *in vitro*.

8.5. Citotoxicidad.

Los equinodermos junto con las esponjas se caracterizan por contener una gran cantidad de esteroides en comparación con otros invertebrados terrestres. Se ha observado que en animales que presentan agentes citotóxicos, puede existir una relación con alteraciones bioquímicas, en comparación con especies relacionadas que no presentan dichos compuestos tóxicos. Tales alteraciones se pueden presentar en el contenido de esteroles de las membranas, lo que ha sido observado en equinodermos que contienen glucósidos o esteroides polisulfatados (Stonik, 1986). La acción de los glucósidos esteroides aislados de organismos marinos se basa en la capacidad de unirse con el colesterol de la membrana (Elyakov & Stonik, 1988).

El efecto citotóxico de compuestos del tipo de los glucósidos, se da a nivel de daño de la membrana celular, en contraste con las sapogeninas y polihidroxiesteroides que poseen actividad hemolítica. Existe una correlación entre la estructura del compuesto y las relaciones de actividad hemolítica y citotóxica (Prokofeva *et al.*, 2003). Como puede observarse con las fracciones de *M. bradleyi* que presentaron una actividad hemolítica considerable y su actividad citotóxica fue alta, pudiendo deberse a su contenido de saponinas.

El ensayo de citotoxicidad empleando el Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) descrito por Mosmann en 1983, se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial deshidrogenasa de las células viables para

romper el anillo tetrazolio que le confiere el color amarillo al MTT y formar cristales de formazán de color azul oscuro. El número de células viables es directamente proporcional a los niveles de formazán producidos, y por lo tanto, refleja la supervivencia de las células en presencia de un compuesto prueba, así como la citotoxicidad del compuesto. La fracción F4 del cuerpo de *M. bradleyi* presentó uno de los halos mas grandes en la actividad hemolítica, y esto corresponde con el mayor porcentaje de viabilidad celular frente a la línea celular J774. Resulta interesante continuar con el estudio químico de esta fracción para elucidar las moléculas responsables de la actividad.

En general, los citotóxicos de agentes químicos sobre células pueden incluir: alteración de la morfología celular, debilitamiento de la célula por el ataque con sulfatos o cambios en los procesos celulares: crecimiento, muerte y desintegración (Acosta & Rodríguez, 1992). El efecto citotóxico puede ser explicado por un daño a las membranas celulares y/o nuclear o, indirectamente, a través de la modulación de la membrana, permeabilidad de transición y por lo tanto la apoptosis. El balance de las aminos oxidasas y las enzimas antioxidantes parecen ser un punto crucial para la inhibición o aumento del cáncer. Un desequilibrio de larga duración de estas enzimas parece ser cancerígeno, en tanto que para tiempo corto, las aminos oxidasas son citotóxicas para células cancerosas (Toninello *et al.*, 2006).

Normalmente, la división celular, el transporte intracelular, la motilidad celular, la señalización celular y el mantenimiento de la forma celular son todas dependientes de la dinámica altamente regulada por procesos de inestabilidad del sistema tubulina/microtúbulo. El complejo de microtúbulos ha demostrado ser un objetivo importante en el desarrollo de agentes terapéuticos contra el cáncer, los alcaloides vinca y paclitaxel (Taxol aislado del árbol *Taxus brevifolia*), ha demostrando ser un agente que interactúa significativamente con microtúbulo, suceso clínico de importancia en el tratamiento de los cánceres de mama, pulmón y ovario (Isbrucker *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción del paclitaxel incluye la polimerización prematura de la tubulina, resultando hiperestable la formación de microtúbulos, la inhibición de la proliferación celular en la fase G₂/M del ciclo celular, la desorganización del huso mitótico y la muerte celular. A pesar del éxito clínico del paclitaxel y sus derivados semi-sintéticos como el docetaxel (Taxotere), el uso de estos compuestos ha sido limitado por la baja solubilidad, efectos secundarios indeseables, baja biodisponibilidad, limitada eficacia a la P-glicoproteína (P-gp) que expresan resistencia múltiple a las drogas en varios tipos de cáncer. Debido a estas incongruencias se ha hecho hincapié en la necesidad de mayor eficacia y de nuevos agentes que interactúen con microtúbulos. Los organismos marinos han demostrado ser una rica fuente de metabolitos secundarios bioactivos con potenciales propiedades anticancerígenas (Isbrucker *et al.*, 2003).

Perspectivas de estudio.

La diversidad química encontrada en los invertebrados marinos, es resultado de la necesidad evolutiva de defenderse en un medio altamente competitivo, por lo que se han desarrollado mecanismos bioquímicos que les permiten producir compuestos bioactivos para múltiples propósitos (Darias-Jerez, 1998). Los resultados de este trabajo permitieron determinar que los equinodermos y gorgónidos estudiados presentaron una amplia gama de actividades biológicas que pueden ser de interés desde el punto de vista farmacéutico. En específico, para el erizo *E. thouarsii* y la estrella de mar *M. bradleyi* los resultados son bastante prometedores y de acuerdo a la revisión bibliográfica, los estudios son prácticamente nulos para estas especies, por lo que resulta prioritario continuar con su estudio químico hasta aislar y elucidar las moléculas responsables de dicha actividad. Por otra parte, la bioprospección y el establecimiento de especies con potencial farmacológico también debe ser abordado desde un punto de vista de uso sostenible de la biodiversidad y una distribución equitativa entre los beneficios y la conservación (Melgarejo *et al.*, 2002).

9. CONCLUSIONES.

Para la prueba de actividad antibacteriana, los extractos de cuerpo y vísceras del erizo *Eucidaris thouarsii* fueron activos frente a *Staphylococcus aureus*.

Por otra parte los resultados de las pruebas de hemólisis y actividad antiinflamatoria fueron más prometedores. Los extractos que presentaron la mejor hemólisis fueron *Mithrodia bradleyi*, *Holoturia pluricuriosa* y *Acantaster planci*, lo cual posiblemente se debe a la presencia de saponinas y/o hemolisinas.

En el caso de la actividad antiinflamatoria fueron los extractos de *Mithrodia bradleyi* y *Leptogorgia rigida* los que presentaron los mejores resultados.

El estudio químico de los organismos más activos *Leptogorgia rigida*, *Eucidaris thouarsii* y *Mithrodia bradleyi* indicaron que presentan una buena actividad antiinflamatoria, antioxidante, hemolítica y citotóxica.

Con este estudio, se hace evidente que los invertebrados analizados, provenientes de las costas de Baja California Sur, representan una excelente opción para el descubrimiento de sustancias con potencial farmacológico.

Una investigación más profunda de la química de cada uno de estos organismos, puede representar una valiosa información en el campo de los productos naturales marinos. La actividad que mostraron los extractos y fracciones de los organismos seleccionados, sugieren que se pueden aislar compuestos químicos con actividades biológicas significativas de interés farmacológico y clínico.

10. LITERATURA CITADA.

- Abubakar, L., C. Mwangi, J. Uku & S. Ndirangu. 2012. Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinoidea). *Afr. J. Pharm. Therap.*, 1(1): 19-23.
- Acosta, A. L. & A. D. Rodríguez. 1992. 11-oxoaerotherionin: a cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *J. Nat. Prod.*, 55(7): 1007-1012.
- Aniya, Y. 1997. Plancinin A, its isolation from *Acanthaster planci*, and blood coagulation inhibitors containing it. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, JP 09216896 A 19970819.
- Arnstein, P. M. 2012. Evolution of tropical NSAIDs in the guidelines for treatment of osteoarthritis in elderly patients. *Drugs Aging.*, 29(7): 523-531.
- Bayer, F. M. 1961. The Shallow Water Octocorallia of the West Indian Region. Nijhoff, The Hague, 373 pp.
- Bennington, D. M. 1993. Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico. *Médica Panamericana*, Buenos Aires, Argentina. 1535 p.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2006. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 23: 26–78.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, R. A. Keyzers, M. H. G. Munro & M. R. Prinsep. 2011. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 29: 144-222.
- Boonananwong, S., K. Boonsong & K. Ngampong. 2008. Synthesis and biological evaluation of 3,16,20-polyoxygenated steroids of marine origin and their analogs. *Kasetsart J.Nat. Sci.*, 42(3): 531-542.
- Bradley P. P. , D. A. Priebat, R. D. Christansen & G. Rothstein. 1982. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Inv. Derm.*, 78: 206-209.
- Bradley, E. E., P. Greenspan, J. L. Hargrove, L. Wicker & D. K. Hartle. 2008. Topical anti-inflammatory activity of *Polygonum cuspidatum* extract in the TPA model of mouse ear inflammation. *J. Inflamm.*, 5(1): 1-7.

- Brook, T. D. & M. T. Madigan. 1993. *Microbiología*. Prentice Hall Hispaniamericana, S. A., Estado de México. 956 p.
- Brusca, R. C. 1980. Common intertidal invertebrates of the Gulf of California. 2a. Ed. Univ. Arizona Press, Tucson. 413 pp.
- Bryan, P. J., J. B. McClintock, S. A. Watts, K. R. Marion & T. S. Hopkins. 1994. Antimicrobial activity of ethenolic extracts of echinoderms from the northern Gulf of Mexico. In: B. David, A. Guille, J. P. Feral & M. Roux. *Echinoderms Trough Time*, Balkema, Rotterdam, 17-23 pp.
- Bull, A., A. Ward & M. Good-fellow. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Micro. Mol. Biol. Rev.*, 64(3): 573-606.
- Burkholder, P. R. & L. M. Burkholder. 1958. Antimicrobial Activity of Horny Corals. *Science*, 1174-1175.
- Burnell, D. J. & J. W. ApSimon. 1983. Echinoderm saponins. In, *Mar. Nat. Prod: Chem. Biol. Perspec.*, 5-287 p.
- Butler, M.S. 2004. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J. Nat. Prod.*, 64: 2141-2153.
- Chen, S., C. Xue, L. Yin, Q. Tang, G. Yu & W. Chai. 2011. Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers. *Carbohydr. Polym.*, 83: 688–696.
- Clare, A. S., D. Rittschof, D. J. Gerhart, I. R. Hooper & J. Bonaventura. 1999. Antisettlement and narcotic action of analogues of diterpene marine natural product antifoulants from octocorals. *Mar. Biotechnol.*, 1(5): 427-436.
- Collin, P. D. 1998. Tissue fraction of sea cucumber for the treatment of inflammation. *United State Patent*, 5: 770,205.
- Collin, P. D. 2004. Peptides having anti-cancer and anti-inflammatory activity. *United State Patent*, 6: 767-890, 27.
- Correa, H. 2012. Estudios de Bioprospección del coral blando *Pseudopterogorgia elisabethae* como fuentes de sustancias con actividad biológica. Tesis doctoral, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. 344 p.

- Correa, H., A. L. Valenzuela, L. F. Ospina & C. Duque. 2009. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *J. Inflamm.*, 6:5.
- Costlow, J. D., I. R. Hooper & D. Rittschof. 1988. Tricyclic anti-fouling compounds from natural sources. U.S., US 4788302 A 19881129.
- Darias-Jerez, J. 1998. La biodiversidad de las algas marinas como fuente de interés farmacológico. *Medio Amb. Can.*, 9: 15-19.
- D'Auria, M.V., M. Iorizzi, L. Minale & R. Riccio. 1990. Starfish saponins. Part 40. Structures of two new asterosaponins from the starfish *Patiria miniata*: patirioside A and patirioside B. *J. Chem. Socie.*, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999), 4: 1019-1023.
- De Lara, G. 1992. Toxic properties of some marine algae. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 43: 81-85.
- De las Heras, B., K. Slowing & J. Benedi. 1998. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *J. Ethnop.*, 6: 161-166.
- De Young, L. M., J. K. Kheifets, S. J. Ballaron & J. M. Young. 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agen. and Act.*, 26: 335-341.
- Elyakov, G. B. & V. A. Stonik. 1988. Terpenoidy morskikh organizmov (Terpenoids from Marine Organisms). Nauka, Moskow. 206 p.
- Encarnación-Dimayuga, R., J. I. Murillo-Álvarez, C. Christophersen, M. Chan-Bacab, M. L. García-Reirz & S. Zacchino. 2006. Leismancidal, antifungal and cytotoxic activity of triterpenoid glycosides isolated from the sea cucumber *Neothyone gibbosa*. *Nat. Prod. Commun.*, 1(7): 541-548.
- Encarnacion, R., D. G. Carrasco, M. Espinoza, U. Anthoni, P. N. Nielsen & C. Christophersen. 1989. Nephthyside A, Proposed structure of a triterpenoid tetraglycoside from the Pacific sea cucumber, *Neothyone gibbosa*. *J. Nat. Prod.*, 52(2): 248-251.

- Esmat, A.Y., M.M. Said, A.A. Soliman, K.S.H. El-Masry & E. Abdel Badiea. 2013. Bioactive compounds, antioxidant potential, and hepatoprotective activity of sea cucumber (*Holothuria atra*) against thioacetamide intoxication in rats. *Nutrition* (New York, NY, United States), 29(1): 258-267.
- Fahmy, S. R. & A. M. Soliman. 2013. *In vitro* antioxidant, analgesic and cytotoxic activities of *Sepia officinalis* ink and *Coelatura aegyptiaca* extracts. *Afr. J. Pharm. Pharmac.*, 7(22): 1512-1522.
- Fariñas, M. & I. Liñero 1997. Producción de hemólisis y hemaglutinación por extractos acuosos de invertebrados marinos. *Saber*, 9(2): 56-61.
- Fariñas, M. & I. Liñero 2001. Actividad antimicótica de extractos acuosos obtenidos a partir de invertebrados marinos. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente*, 40(1-2): 67-70.
- Faulkner, D. J. 1984. Marine Natural Products: Metabolites of Marine Invertebrates. Literature from 1977-1984. *Nat. Prod. Rep.*, 1. 551.
- Faulkner, D. J. 1986. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 3: 1-4.
- Faulkner, D. J. 1993. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 9. 323-539.
- Faulkner, D. J. 1999. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 16. 155-198..
- Faulkner, D. J. 2000. Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). *Nat. Prod. Rep.*, 17: 1-6.
- Fenical, W. 1982. Natural products chemistry in the marine environment. *Science*, 215: 923-928.
- Fenical, W., R. K. Okuda, M. M. Bandurraga, P. Culver, & J. Roberts. 1981. Lophotoxin: a novel neuromuscular toxin from pacific sea whips of the genus *Lophogorgia*. *Science*, 212: 1512-1514.
- Fusetani, N., Y. Kato, K. Hashimoto, T. Komori, Y. Itakura & T. Kawasaki. 1984. Biological activities of asterosaponins with special reference to structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.*, 47(6): 997-1002.
- Garrido, L., E. Zubia, M. J. Ortega, & J. Salva. 2000. Isolation and structure elucidation of new cytotoxic steroids from the gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*. *Steroids*, 65: 85-88.

- Gerhart, D. J., D. Rittschof & S. W. Mayo. 1988. Chemical ecology and the search for marine antifoulants. Studies of a predator-prey symbiosis. *J. Chem. Ecol.*, 14(10): 1905-17.
- González-Guevara, M. C., L. F. Ospina-Giraldo & Rincón-Velandia. 2011. Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de *Myrcianthes leucoxila*, *Calea prunifolia*, *Curatella americana* y *Physalis peruviana* en los modelos edema auricular por TPA, edema plantar por carragenina y artritis inducida por colágeno. *Biosalud*. 10(1): 9-18.
- Guenther J., G. Walker-Smith, A. Warren & R. De Nys. 2007. Fouling-resistant surfaces of tropical sea stars. *Biofouling*, 23(5-6): 413-8.
- Gutiérrez, M., T.L. Capson, H.M. Guzmán, J. González, E. Ortega-Barria, E. Quinoa & R. Riguera. 2005. Leptolide, a new furanocembranolide diterpene from *Leptogorgia alba*. *J. Nat. Prod.*, 68(4): 614-61.
- Haefner, B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drugs Disc. Today*, 8(12): 536-544.
- Halliwell, B. & J. M. C. Gutteridge. 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.* 8: 89-193.
- Han, H., Y.H. Yi, W. Zhang, X.H. Wang, M.X. Pan & L. Li. 2012. Cytotoxic triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Zhongguo Yaoxue Zazhi* (Beijing, China), 47(15): 1194-1198.
- Haug, T., A. K. Kjuul, O. B. Styrvold, E. Sandsdalen, O. M. Osen & K. Stensvag. 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *J. Invertebr. Pathol.*, 81: 94-102.
- Hecker, E. 1968. Cocarcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae. *Can. Res.*, 28: 2338-2349.
- Hegde, V. R., T. M. Chan, H. Pu, V. P. Gullo, M. G. Patel, P. Das, N. Wagner, P. S. Parameswaran & C. G. Naik. 2002. Two selective novel triterpene glycosides from sea cucumber, *Telenota Ananas*: inhibitors of chemokine receptor-5. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12: 3203-3205.

- Herencia, F., A. Ubeda, M. L. Ferrandiz, M. C. Terencio, M. J. Alcaraz, M. Garcia-Carrascosa, R. Capaccioni & M. Paya. 1998. Anti-inflammatory activity in mice of extracts from Mediterranean marine invertebrates. *Life Sci.*, 62(9): PL115-PL120.
- Hernández, G. & M. Fariñas. 2005. Propiedades biológicas de extractos acuosos de órganos de cuvier, piel y músculo de *Brandothuria impatiens* (Forsk., 1776) (Echinodermata: Holothuroidea). *Saber*, Universidad de Oriente, Venezuela, 17(2): 118-124.
- Hickman, C. P. 1998. A field guide to sea stars and other echinoderms of Galápagos. *Sugar Spring Press*. L., Vir., 83 pp.
- Higuchi, R., T. Miyamoto, K. Yamada & T. Komori. 1998. Cytotoxic and ichthyotoxic compounds from marine ophisthobranchia and soft coral. *Toxicon*, 36: 1703-1705.
- Inagaki, M., R. Isobe, Y. Kawano, T. Miyamoto, T. Komori & R. Higuchi. 1998. Isolation and structure of three new ceramides from the starfish *Acanthaster planci*. *Eur. J. Org. Chem.*, 1: 129-131.
- Isbrucker, R. A., J. Cummins, S. A. Pomponi, R. E. Longley & A. E. Wright. 2003. Tubulin polymerizing activity of dictyostatin-1, a polyketide of sponge origin. *Biochem. Pharmacol.*, 66: 75-82.
- Issekutz, A. C., M. Ripley & J. R. Jackson. 1983. Role of neutrophils in the deposition of platelets during acute inflammation. *PuMed*, 49(6): 716-724.
- Juárez-Espinoza, P. A. 2010. Determinación de la actividad biológica de los extractos orgánicos del erizo de mar *Diadema mexicanum* (A. Agassiz, 1863). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 39 p.
- Kanazawa, A., S. Teshima, S. Tomita & T. Ando. 1974. Gorgostanol, a novel C30 sterol from an asteroid, *Acanthaster planci*. *Nippon Suisan Gakk.*, 40(10): 1077.
- Karasudani, I., T. Koyama, S. Nakandakari & Y. Aniya. 1996. Purification of anticoagulant factor from the spine venom of the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*. *Toxicon*, 34(8): 871-879.

- Kawano, Y., R. Higuchi & T. Komori. 1990. Biologically active glycosides from Asteroidea. XIX. Glycosphingolipids from the starfish *Acanthaster planci*. 4. Isolation and structure of five new gangliosides. *Liebigs Ann. Chem.*, 1: 43-50.
- Keer-García, S. 1988. Selección antimicrobiana de esponjas, cnidarios y equinodermos marinos y detección de saponinas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 63 p.
- Keyzers, R.A., C.A. Gray, M.H. Schleyer, C.E. Whibley, D.T. Hendricks & M.T. Davies-Coleman. 2006. Malonganenones A-C, novel tetraprenylated alkaloids from the Mozambique gorgonian *Leptogorgia gilchristi*. *Tetrahedron*, 62(10): 2200-2206.
- Kitagawa, I. & M. Kobayashi. 1977. On the structure of the major saponin from the starfish *Acanthaster planci*. *Tetrahedron Lett.*, 10: 859-62.
- Kitagawa, I. & M. Kobayashi. 1978. Saponin and sapogenol. XXVI. Steroidal saponins from the starfish *Acanthaster planci* L. (crown of thorns). (2). Structure of the major saponin thornasteroside A. *Chem. Pharm. Bull.*, 26(6): 1864-73.
- Klebanoff, S. J. 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leuk. Biol.* 77(5): 598-625.
- Komori, T., R. Higuchi & Y. Kono. 1990. Isolation of sphingoglycolipids from *Acanthaster planci* for treatment of brain disorders. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, JP 02200696 A 19900808.
- Koyama, T., K. Noguchi, Y. Aniya & M. Sakanashi. 1998. Analysis for sites of anticoagulant action of plancinin, a new anticoagulant peptide isolated from the starfish *Acanthaster planci*, in the blood coagulation cascade. *Gen. Pharmacol.*, 31(2): 277-282.
- Lee, S. H., Yong-Li, F. Karadeniz, M. M. Kim & S. K. Kim. 2009. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of phloroglucinal derivatives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *J. Sci. Food Agric.*, 89: 1552–1558.

- Levina, E. V., P. V. Andriyashchenko, A. I. Kalinovsky, P. S. Dmitrenok & V. A. Stonik. 2002a. Steroid compounds from the far eastern starfish *diplopteraster multiples*. *Russ. J. BioorgChem.*, 28: 189-193.
- Levina, E. V., P. V. Andriyashchenko, A. I. Kalinovsky, P. S. Dmitrenok, V. A. Stonik & N. G. Prokof'eva. 2002b. Steroid compounds from the starfish *Lysastrosoma anthosticta* collected in the Sea of Japan. *Russ. Chem. Bull.*, 51: 535-539.
- Levina, E. V., A. I. Kalinovskii, S. P. Ermakova & P. S. Dmitrenok. 2012. Steroid Compounds from Pacific Starfish *Mithrodia clavigera* and their toxicity to human melanoma cells. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 38(5): 520-525 pp.
- Lesniak, A. P. & E. H. Liu. 1982. Characterization of a hemagglutinin from *Leptogorgia virgulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochem. Mol. Biol. Int.*, 71B(2): 305-308.
- Li, C., T. Haug & K. Stesvag. 2010. Antimicrobial peptides in Echinoderms. *Invertebr. Surv. J.*, 7(1): 132-140.
- Liu, F. T. & B. Ng. 2000. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal plants. *Life Sci.*, 66: 725-735.
- Luo, P., C. Hu, J. Xia, C. Ren & X. Jiang. 2011. Chemical constituent analysis of the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* and potential utilization value of the starfish as feed ingredient for animals. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(62): 13610-13616.
- Maier, M. S. A. J. Roccatagliata, A. Kuriss, H. Chludil, A. M. Seldes, C. A. Pujol & E. B. Damonte. 2001. The new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from Antarctic sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*. *J. Nat. Prod.*, 64: 732-736.
- Maoka, T., N. Akimoto, Y. Terada, S. Komemushi, R. Harada, N. Sameshima & Y. Sakagami. 2010. Structure of Minor Carotenoids from the Crown-of-Thorns Starfish, *Acanthaster planci*. *J. Nat. Prod.*, 73(4): 675-678.
- Marcano, D. & M. Hasegawa. 2002. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela, Caracas. 588 pp.
- Matranga, V. 2005. Echinodermata. *Springer*. 275 p.

- Mayer, A. M. S., P. B. Jacobson, W. Fenical, R. S. Jacobs & K. B. Glaser. 1998. Pharmacological characterization of the pseudoaterosins: novel anti-inflammatory natural products isolated from the Caribbean soft coral, *Pseudoaterogorgia elisabethae*. *Life Sci.*, 62: 401–407.
- Mayer, A. M. S & M. T. Hamann. 2002. Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities; affecting the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems; and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 132: 315–39.
- McClintock, J., M. Slattery, D. Baker & J. Heine. 1993. Chemical ecology of Antarctic sponges from McMurdo sound, Antarctica: Ecological aspects. *J. Antarct.*, 28(5): 134-135.
- McLaughlin, J. L., C. J. Chang, D. L. Smith. 1991. “Bench-Top” bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: Rahman A. *Studies in Nat. Prod. Chem.*, 9: 383-409.
- Melgarejo, L. M., J. Sánchez, A. Chaparro, F. Newmark, M. Santos-Acevedo, C. Burbano & C. Reyes. 2002. Aproximación al estado actual de la bioprospección en Colombia Bogotá: Cargraphics, 10: 334.
- Melek, F.R., M.M. Tadros, F. Yousif, M.A. Selim & M.H. Hassan. 2012. Screening of marine extracts for schistosomicidal activity *in vitro*. Isolation of the triterpene glycosides echinosides A and B with potential activity from the sea cucumbers *Actinopyga echinites* and *Holothuria polii*. *Pharm. Biol.* (London, United Kingdom), 50(4): 490-496.
- Millot, N. 1956. Naphthaquinone pigments in the tropical sea urchin *Diadema antillarum* (Philippi). *Nature*, 178(4543): 2051-2053.
- Miyamoto, T., A. Yamamoto, M. Wakabayashi, Y. Nagaregawa, M. Inagaki, R. Higuchi, M. Iha & K. Teruya. 2000. Biologically active glycosides from asteroidea, 40 two new gangliosides, acanthagangliosides I and J from the starfish *Acanthaster planci*. *Eur. J. Org. Chem.*, (12): 2295-2301.

- Monks, A., D. Scudeiro, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull & D. Vistica. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Nat. Can. Inst.*, 83: 757.
- Montes-Plasencia, C. I., C. J. Hernández-Guerrero, B. González-Acosta & R. N. Águila-Ramírez. 2010. Seasonal variation of antibacterial activity of *Aplysina gerardogreeni* from the Gulf of California. *CICIMAR-Océanides*, 25(1): 79-81.
- Morton, L. H. G., D. L. A. Greenway, C. C. Gaylarde & S. B. Surman. 1998. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *Biodeter. Biodegr.* 41: 247-259.
- Mossman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Inmmu. Meth.* 65(1-2): 55-63.
- Mourao, P. A. S., B. Guimaraes, B. Mulloy, S. Thomas & E. Gray. 1998. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: Sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. *Br. J. Haematol.*, 10(1): 647–652.
- Muller, W. A. 2002. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab. Invest.* 82: 521-533.
- Munro, M. H. G. & J. W. Blunt. 2007. MARINLIT, a database of the marine natural products literature. Department of Chemistry, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand, vpc 12.5.
- Murakawa, M., Y. Kumiko, T. Yoshitana & F. Yoshiaki. 2006. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Bioch. Pharm.*, 71: 1331-1336.
- Mutee A.F., S.M. Salhimi, F.C. Ghazali, A.F. Aisha, C.P. Lim, K. Ibrahim & M.Z. Ahmed. 2012. Evaluation of anti-cancer activity of *Acanthester planci* extracts obtained by different methods of extraction. *Pak. J. Pharma. Scien.*, 25(4): 697-703.
- Nagase, H., K. Enjoji, K. Minamiguchi, K. T. Kitazato, K. Kitazato, H. Saito & H. Kato. 1995. Depolymerized holothurian glycosaminoglycan with novel

- anticoagulant actions: Antithrombin III and heparin cofactor II-independent inhibition of factor X activation by factor IXa-factor VIIIa complex and heparin cofactor II-dependent inhibition of thrombin. *Blood*, (85): 1527–1534.
- Nomoto, M., T. Yamamoto, Y. Kajiwara & S. Tanaka. 1974. Proteases of *Acanthaster planci*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, JP 49047585 A 19740508.
- Ojika, M., J. Qi, Y. Sakagami & T. Mamiya. 2006. *Acanthaster planci* steroid glycosides for screening preventive and therapeutic to treat aging-associated cerebral dysfunction. *PCT Int. Appl.*, WO 2006090910 A1 20060831.
- Ortega, M., E. Zubia; M. C. Sánchez & J. L. Carballo. 2008. Cembrane diterpenes from the gorgonian *Leptogorgia laxa*. *J. of Nat. Prod.*, 71(9): 1637-1639.
- Pacheco, R. G., C. P. Vicente, P. Zancan & P. A. S. Mourão. 2000. Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm. *Blood Coagul. Fibrin.*, 11: 563–573.
- Parvathavarthini, R. & B. Uma. 2014. Antibacterial activity of hydroalcoholic extract of sea urchin *Temnopleurus alexandri* (Bell, 1884). *Ind. J. App. Res.*, 4: 557-559.
- Pawlik, J. R., M. T. Burch & W. Fenical. 1987. Patterns of chemical defense among caribbean gorgonian corals: a preliminary survey. *J. Exper. Mar. Biol. And Ecol.*, 108: 55-56.
- Pedpradab, P., W. Molex, V. V. Nukoolkarn & U. Darumas. 2010. Biological activities of the extracts from the Andaman sea sponges, Thailand. *EurAsia. J. BioSci.*, 4 (8): 63-69.
- Petzelt, C. 2005. Are echinoderms of interest to biotechnology?. 2-4. En: V. Matranga (Ed.). *Progress in molecular and subcellular biology. Sub. Mar. Mole. Biotech.*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 39: 1-6.
- Pizza, C., P. Pezzullo, L. Minale, E. Breitmaier, J. Pusset & P. Tirard. 1985. Starfish saponins. Part 20. Two novel steroidal glycosides from the starfish *Acanthaster planci* (L.). *J. Chem. Res., Synopses*, 3: 76-7.

- Pocsidio, G.N. 1983. Holothurin of some Philippine holothurians and its hemolytic activity. *Philipp. J. Scie.*, 112(1-2): 13-28.
- Prokofeva, N. G., E. L. Chaikina, A. A. Kicha & N. V. Ivanchina. 2003. Biological activities of steroid glycosides from starfish. *Comp. Biochem. Phys. A.* 134: 695-701.
- Qu, S. 2012. Sea cucumber extract used for skin-caring cosmetics and processing method thereof. *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 102512351 A 20120627.
- Rajeev, K. J., & Z. R. Xu. 2004. Biomedical Compounds from Marine organisms. *Mar. Drugs*, 2: 123-146.
- Ramos-Escudero, F., A. M. Muñoz, C. Alvarado-Ortiz Ureta & J. A. Yáñez. 2010. Antocianinas, polifenoles, actividad antioxidante de sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L.) y evaluación de lipoperoxidación en suero humano. *Rev. Soc. Quim. Perú.* 76(1): 61-72.
- Ridzwan, B. H., M. A. Kaswandi, Y. Azman & M. Fuad. 1995. Screening for antibacterial agents in three species of sea cucumbers from coastal areas of Sabah. *Gen. Pharmacol. Vasc. S.*, 26 (7): 1539-1543.
- Rinehart Jr., J. L., P. D. Shaw, L. S. Shield, J. B. Gloer, G.C. Harbour, M. E. S. Koker, D. Samain, R. E. Schwartz, A. A. Tymiak, D. L. Weller, G. T. Carter, M. H. G. Munro, R. G. Hughes, H. E. Renis, E. G. Swynenberg, D. A. Stringfellow, J. J. Vavra, J. H. Coats, G. E. Zurenko, S. L. Kuentzel, L. H. Li, G. J. Bakus, R. C. Brusca, L. L. Craft, D. N. Young & J. L. Connor. 1981. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial and antineoplastic agents. *Pure Appl. Chem.*, 53: 795-817.
- Rodríguez, A. D. 1995. The natural product chemistry of the west Indian gorgonian octocorals. *Tetrahedron*, 51(16): 4571-4618.
- Rodríguez, M., N. Vergel, L. F. Ospina, J. Calle & R. Pinzón. 2005. Evaluación de actividades enzimáticas elastasa y mieloperoxidasa como marcadores de desgranulación leucocitaria en modelos de inflamación aguda. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, 34(1): 35-45.

- Rodríguez, J., R. Castro & R. Riguera. 1991. Holothurinosides: new antitumor non sulfated triterpenoid glycosides from the sea cucumber *Holothuria forskalii*. *Tetrahedron*, 47(26): 4753-62.
- Roussis, V., W. Fenical, J. Miralles & J.M. Kornprobst. 1991. Piccolamine, an unusual N,N-dimethylaminomethylfuranosesquiterpene and related terpenoids from the gorgonian *Leptogorgia piccolo*. *New J. Chem.*, 15(12): 959-961.
- Ruppert E. E. & R. D. Barnes. 1996. Zoología de los invertebrados. Sexta edición. McGraw-Hill- Interamericana. 1114 p.
- Sánchez, T. & J. J. Moreno. 1999. Role of leucocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induce by phorbol ester and arachidonic acid in skin. *Biom. Pharm.*, 58: 877-879.
- Savitri, I.K.E., Muhamadsahlan, F. Ibrahim & A. Wijanarko. 2012. Isolation and characterization of phospholipase A2 from the spines venom of the crown-of-thorns starfish isolated from Papua island. *Int. J. Pharma Bio Sciences*, 3(4): 603-608.
- Selvin, J. & A.P. Lipton. 2004. Antifouling activity of bioactive substances extracted from *Holothuria scabra*. *Hydrobiologia*, 513: 251-253.
- Sevilla-Ascencio, O. A., O. Dublán-García, L. M- Gómez-Oliván & L. X. López-Martínez. 2013. Actividad inhibitoria sobre α -glucosidasa y α -amilasa de extractos acuosos de algunas especies utilizadas en la cocina mexicana. *Biotec. Ciencias Agrop.*, 26(2): 42-47.
- Simmons T. L., E. Adrianasolo, K. McPhail, P. Flatt & W. H. Gerwick. 2005. Marine natural products as anticancer drugs. *Mol. Cancer Therm.*, 4(2): 333–342.
- Shacter, E., R. L. Lopez & S. Patia. 1991. Inhibition of the myeloperoxidase H₂O₂-Cl⁻ system of neutrophils by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharm.*, 41: 975-984.
- Shapo, J.L., P.D. Moeller & S.B. Galloway. 2007. Antimicrobial activity in the common seawhip, *Leptogorgia virgulata* (Cnidaria: Gorgonaceae). *Com. Biochem. Phys. B.*, 148B(1): 65-73.

- Shaw, P. D., W. O. McClure, G. Van Blaricom, J. Sims, W. Fenical & J. Rude. 1976. Antimicrobial activities from marine organisms. In: Food-Drug from the sea proceeding, H. H. Webber & G. D. Ruggieri. *Mar. Tech. Soc.*, Washington DC, 429-433 pp.
- Shimada, S. 1965. Holotoxin. no corporate source data available, DE 1199923 19650902.
- Shimizu, Y. 1971. Antiviral substances in starfish. *Experientia*, 27(10): 1188-1190.
- Shiomi, K., S. Midorikawa, M. Ishida, Y. Nagashima & H. Nagai. 2004. Plancitoxins, lethal factors from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci*, are deoxyribonucleases II. *Toxicon*, 44(5): 499-506.
- Shiroma, N., K. Noguchi, T. Matsuzaki, Y. Ojiri, K. Hirayama & M. Sakanashi. 1994. Hemodynamic and hematologic effects of *Acanthaster planci* venom in dogs. *Toxicon*, 32(10): 1217-1225.
- Solís-Marín, F. A., A. Laguarda-Figueras, A. Durán-González, C. G. Ahearn & J. Torres-Vega. 2005. Equinodermos (Echinodermata) del Golfo de California, México. *Rev. Biol. Trop.*, 53(3): 123-137.
- Solís-Marín, F. A., A. Laguarda-Figueras & M. Honey-Escandón. 2014. Biodiversidad de equinodermos (Echinodermata) en México. *Rev. Mex. Biod.*, 85: S441-S449.
- Stabili, L., P. Pagliari M. Metrangolo & C. Canicatti. 1992. Comparative aspects of echinoidea cytolytins: The cytolytic activity of *Spherechinus granularis* (Echinoidea) coelomic fluid. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A: 553-556.
- Stonik, V. A. 1986. Some terpenoid and steroid derivatives from echinoderms and sponges. *Pure Appl. Chem.*, 58(3): 423-436.
- Stonik, V. A., V. I. Kalinin & S. A. Avilov. 1999. Toxins from sea cucumbers (Holothuroids): chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution. *J. Nat. Tox.*, 8(2): 235-248.
- Suzuki, K., H. Ota, S. Sasagawa, T. Sakatani & T. Fujikura. 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Ana. Bioche.* 132: 345-352.

- Takamatsu, S., T. W. Hodges, I. Rajbhandari, W.H. Gerwick, M.T. Hamann & D.G. Nagel. 2003. Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *J. Nat. Prod.*, 66: 605-608.
- Taylor, K. R. & R. L. Gallo. 2006. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular pattern for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 20: 9-22.
- Tincani, A., L. Andreoli, C. Bazzani, D. Bosiso & S. Sozzani. 2007. Inflammatory molecules: A target for treatment of systemic autoimmune diseases. *Autoimm. Revi.* 7: 1-7 p.
- Toninello, A., P. Pietrangeli, U. De Marchi, M. Salvi & B. Mondovi. 2006. Amine oxidases in apoptosis and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1765: 1-13.
- Uma, B. & R. Parvathavarthini. 2010. Antibacterial effect of hexane extract of sea urchin, *Temnopleurus alexandri* (Bell, 1884). *Int. J. PharmTech. Res.*, 2(3): 1677-1680.
- Valencia-Agami, S. S. 2010. Actividad antibacteriana del extracto y fracciones semipurificadas de la esponja *Aplysina gerardogreeni*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 44 p.
- Van Alstyne, K. L., C. W. Wyle & V. J. Paul. 1994. Antidepredator defenses in tropical Pacific soft corals (Coelenterata: Alcyonaria). II. Relative importance of chemical and structural defenses en three species of *Sinularia*. *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.*, 178: 17-34.
- Wang, G. H., A. F. Ahmed, Y. H. Kuo & J. H. Sheu. 2002. Two new subergane-based sesquiterpenes from a taiwanese gorgonian coral *Subergorgia suberosa*. *J. Nat. Prod.*, 65: 1033-1036.
- Wang, J., A. Pansky, J. M. Venuti, D. Yaffe U. Nudel. 2004. Cytotoxic sterols and saponins from the starfish *Certonardoa semiregularis*. *J. Nat. Prod.* 67: 584-591.
- Wu, J., Y. Yi, H. Wu, Q. He & S. Zhang. 2007. Studies on the *in vitro* antifungal and antitumor activities of nobiliside A from the sea cucumber *Holothuria nobilis selenka*. *Zhongguo Yaolixue Tongbao*, 23(1): 139-140.

- Yamada, K., T. Ujiie, K. Yoshida, T. Miyamoto & R. Huguichi. 1997. Sinulobatins A-D, new amphilectane-type diterpenoids from the japaneses soft coral *Sinularia nanolobata* . *Tetrahedron*, 53: 4569-4578.
- Yara, A., K. Noguchi, J. Nakasone, N. Kinjo, K. Hirayama & M. Sakanashi. 1992. Cardiovascular effects of *Acanthaster planci* venom in the rat: possible involvement of PAF in its hypotensive effect. *Toxicon*, 30(10): 1281-1289.
- Yi, Y., G. Sun, L. Li & P. Sun. 2008. Purification of triterpene saponin compound griseaside A from *Holothuria grisea selenka* for cancer therapy and antitumor agent development. *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 101157718 A 20080409.
- Yuan, T., C. Wan, K. Liu & N.P. Seeram. 2012. New maplexins FI and phenolic glycosides from red maple (*Acer rubrum*) bark. *Tetrahedron*, 68(4): 959-964.
- Zou, Z. R., Y. H. Yi, J. H. Wu, C. C. Liaw & K. H. Lee. 2003. Intercedensides A-C, three new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert. *J. Nat. Prod.* 66: 1055-1060.

11. ANEXOS.

Anexo I. Listado taxonómico.

Cnidaria Hatschek, 1888

Anthozoa Ehrenberg, 1834

Gorgonacea Lamouroux, 1816

Gorgoniidae Verrill, 1896

***Pacifigorgia adamasii* Verrill, 1868**

***Leptogorgia rigida* Verrill, 1864**

Echinodermata Klein, 1734

Astroidea de Blainville, 1830

Spinulosida Perrier, 1884

Acanthasteridae

***Acanthaster planci* Linnaeus, 1758**

Mithrodiidae Viguiet, 1878

***Mithrodia bradleyi* Fisher, 1906**

Valvatida Perrier, 1884

Ophidiasteridae Verrill, 1870

***Pharia pyramidatus* Gray, 1840**

***Phataria unifascialis* Gray, 1849**

Oreasteridae Fisher, 1911

Pentaceraster occidentalis

Echinoidea Leske, 1778

Cidaroida Claus, 1880

Cidaridae Gray, 1825

***Eucidaris thouarsii* Valenciennes, 1846**

Diadematoidea Duncan, 1889

Diadematidae Gray, 1855

***Centrostephanus coronatus* Verill, 1867**

Echinoida Leske, 1778

Echinometridae Troschel, 1872

***Echinometra vanbrunti* Agassiz, 1863**

Temnopleuroidea Mortensen, 1942

Toxopneustidae Troschel, 1872

***Toxopneustes roseus* A. Agassiz, 1863**

Holothuroidea de Blainville, 1834

Aspidochirotida Grube, 1840

Holothuriidae Ludwig, 1894

***Holothuria pluricuriosa* Deichmann, 1937**

Anexo II. Curva estándar de proteína (albúmina) para el método de Lowry.

Se realizaron 3 experimentos independientes para cada una de las concentraciones (tabla 21) y posteriormente se realizó la curva (figura 49) con el promedio obtenido de estos experimentos para obtener la ecuación de la recta, con la cual se determinó la cantidad de proteína presente en el cerebro de la rata.

Tabla 12. Concentración de albúmina y su densidad óptica a 540 nm por el método de Lowry.

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Densidad óptica a 540 nm			
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio
0	0	0	0	0
25	0.1495	0.1485	0.1	0.133 \pm 0.01634
50	0.1865	0.1825	0.1965	0.189 \pm 0.00416
75	0.2815	0.2885	0.2765	0.282 \pm 0.00348
100	0.3625	0.3645	0.3815	0.370 \pm 0.00603
150	0.4625	0.4815	0.487	0.477 \pm 0.00742
200	0.6375	0.595	0.593	0.609 \pm 0.01451
250	0.704	0.726	0.7505	0.727 \pm 0.01343

Curva estándar de proteína por el método de Lowry

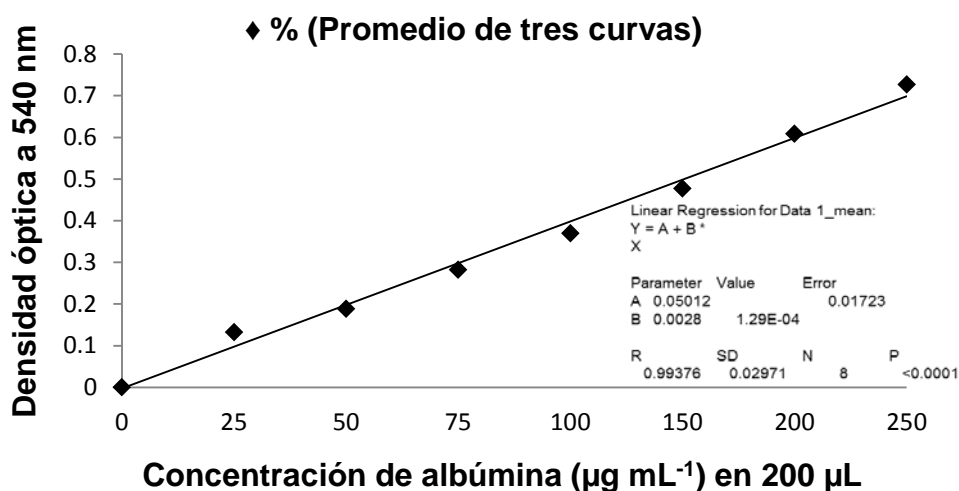


Figura 11. Curva estándar de albúmina para la determinación de proteína por el método de Lowry.

Anexo III.

Tabla 13. Revisión bibliográfica de estudios químicos de los organismos seleccionados con mayor potencial bioactivo.

ORGANISMO	ACTIVIDAD	REFERENCIAS
<i>Leptogorgia</i> <i>ceratophyta</i> <i>gilchristi</i> <i>laxa</i> <i>piccola</i> <i>sarmentosa</i> <i>setacea</i> <i>virgulata</i>	Antitumoral Citotóxico Antibacteriano Cáncer antiesofágico Antiinflamatorio Fungiestático Antiincrustante Hemoglutinante	Lesniak & Liu, 1982 Faulkner, 1986 Costlow <i>et al.</i> , 1988 Gerhart <i>et al.</i> , 1988 Roussis <i>et al.</i> , 1991 Rodríguez, 1995 Herencia <i>et al.</i> , 1998 Clare <i>et al.</i> , 1999 Garrido <i>et al.</i> , 2000 Gutiérrez <i>et al.</i> , 2005 Keyzers <i>et al.</i> , 2006 Shapo <i>et al.</i> , 2007 Boonananwong <i>et al.</i> , 2008 Ortega <i>et al.</i> , 2008
<i>Acanthaster</i> <i>planci</i>	Toxicidad en ratones DNAasas Anticoagulante Efectos hemodinámicos y hematológicos en perros Efectos cardiovasculares en ratones Alzheimer Parkinson	Shimizu, 1971 Nomoto <i>et al.</i> , 1974 Kanazawa <i>et al.</i> , 1974 Kitagawa y Kiboyashi, 1977 Kitagawa y Kobayashi, 1978 Fusetani <i>et al.</i> , 1984 Pizza <i>et al.</i> , 1985 D'Auria <i>et al.</i> , 1990 Kawano <i>et al.</i> , 1990 Komori <i>et al.</i> , 1990 Yara <i>et al.</i> , 1992 Shiroma <i>et al.</i> , 1994

Tabla 13. Continuación...

ORGANISMO	ACTIVIDAD	REFERENCIAS
<i>Acanthaster planci</i>	Antiviral Anticancerígena Actividad meioneocrótica Antiincrustante	Karasudani <i>et al.</i> , 1996 Aniya, 1997 Inagaki <i>et al.</i> , 1998 Koyama <i>et al.</i> , 1998 Miyamoto <i>et al.</i> , 2000 Shiomi <i>et al.</i> , 2004 Ojika <i>et al.</i> , 2006 Guenther <i>et al.</i> , 2007 Maoka <i>et al.</i> , 2010 Luo <i>et al.</i> , 2011 Mutee <i>et al.</i> , 2012 Savitri <i>et al.</i> , 2012
<i>Holoturia</i> <i>atra</i> <i>leucospilota</i> <i>spp</i> <i>polii</i> <i>grisea</i> <i>nobilis</i> <i>scabra</i> <i>tubulosa</i> <i>forskalii</i> <i>fuscocinerea</i> <i>pulla</i>	Antioxidante y hepatoprotectiva en ratones Antitumoral Cosméticos (cuidado de la piel) Actividad schistosomicida Antifúngico Antiincrustante Antiinflamatoria Antibacterial Antiviral Hemolítica	Shimada, 1965 Pocsidio, 1983 Rodríguez <i>et al.</i> , 1991 Ridzwan <i>et al.</i> , 1995 Herencia <i>et al.</i> , 1998 Selvin & Lipton, 2004 Wu <i>et al.</i> , 2007 Yi <i>et al.</i> , 2008 Han <i>et al.</i> , 2012 Melek, 2012 Qu, 2012 Esmat <i>et al.</i> , 2013
<i>Mithrodia clavigera</i>	Citotóxico	Levina <i>et al.</i> , 2011