



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



ACTIVIDAD CITOTÓXICA ASOCIADA A LA  
MICROBIOTA Y AL EPITELIO DE LA ESPINA  
DE LA RAYA DIAMANTE *Hypanus dipterurus* DE  
LA PAZ B.C.S., MÉXICO

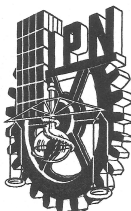
**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS

EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA  
ESTRELLA DEL CARMEN MAGDALENA MARRON GRIJALBA

LA PAZ, B.C.S., JULIO DEL 2019



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA 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 30 del mes de Mayo del 2019 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:

"ACTIVIDAD CITOTÓXICA ASOCIADA A LA MICROBIOTA Y AL EPITELIO  
DE LA ESPINA DE LA RAYA DIAMANTE *Hypanus dipterurus* DE LA PAZ, B.C.S., MÉXICO"

Presentada por el alumno:

**MARRÓN**

Apellido paterno

**GRIJALBA**

materno

**ESTRELLA DEL CARMEN MAGDALENA**

nombre(s)

Con registro:

|   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 1 | 7 | 0 | 7 | 4 | 1 |
|---|---|---|---|---|---|---|

Aspirante de:

**MAESTRIA 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. RUTH NOEMÍ ÁGUILA RAMÍREZ  
Directora de Tesis

DR. CÉSAR SALVADOR CARDONA FÉLIX  
2°. Director de Tesis

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA

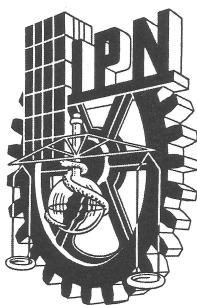
DR. VÍCTOR HUGO CRUZ ESCALONA

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO



I.P.N.  
CICIMAR  
DIRECCIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 05 del mes de Junio del año 2019

El (la) que suscribe QBC. ESTRELLA DEL CARMEN MAGDALENA MARRÓN GRIJALBA Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro B170741 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. RUTH NOEMÍ ÁGUILA RAMÍREZ Y DR. CÉSAR SALVADOR CARDONA FÉLIX

y cede los derechos del trabajo titulado:

"ACTIVIDAD CITOTÓXICA ASOCIADA A LA MICROBIOTA Y AL EPITELIO

DE LA ESPINA DE LA RAYA DIAMANTE *Hypanus dipterurus* DE LA PAZ, 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: estrelladel.marrongri0@hotmail.com - raguilar@pn.mx - ccardona@ipn.mx

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

QBC. ESTRELLA DEL CARMEN MAGDALENA MARRÓN GRIJALBA

*Nombre y firma del alumno*

## **Agradecimientos**

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

A CONACyT, por el apoyo económico otorgado durante mis estudios. Al programa de beca institucional de posgrado. A las becas BEIFI.

A mis directores de tesis Dra. Ruth Noemí Aguila Ramírez y Dr. César Salvador Cardona Félix, por sus enseñanzas, apoyo, paciencia y amistad.

A mi consejero de estudios Dr. Víctor Hugo Cruz Escalona, por todo el aprendizaje, y el gran apoyo en campo que tuve de su parte y el compromiso con el proyecto.

Al comité revisor, Dra. Christine Band Schmidt, Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, por formar parte del comité tutorial, por sus comentarios y observaciones a lo largo del camino.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, al Dr. Claudio Cabral y al Dr. René Hernández por el apoyo brindado durante mi estancia académica.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y a la Dra. Crisalejandra Rivera Pérez por los conocimientos transmitidos en mi segunda estancia académica.

A los proyectos de Ciencia Básica SEP-CONACyT CB/180894 y SIP-20195503.

A la embarcación del “Viejo cayuco” y a los pescadores que brindaron su apoyo con gran amabilidad para este proyecto, Don Juan, Dany y Sra. Teresa.



### **Dedicatoria**

A Dios por que nunca me suelta de su mano aún en los momentos más difíciles, porque siempre me ayuda a cumplir los sueños que sabe me harán feliz.

A mi hermosa familia que me ama incondicionalmente y que me apoyo para seguir adelante cuando más difícil fue para mí.

A mi madre que es mi sostén y mi refugio alguien con quien siempre puedo contar, estoy feliz que tú seas mi mamá.

Mi segunda madre mi tía María Luisa quien siempre ha estado con nosotras llenándonos de paz.

Mi primo Edén, eres la persona más noble que yo conozco, mi prima Sinaí y su esposo, mi prima Berenice, que nos llenaron de amor a mi padre, a mi mamá y a mí.

Mis amados sobrinos Luis Carlos y Daniel por llenarme de amor incondicional.

A mi tía Francisca y tío José por recibirme en su casa y apoyarme cuando lo necesite.

Y de una forma muy especial a ti que, aunque no te vea sigues viviendo en mí, para ti amado padre mío que sé que serias enormemente feliz de compartir este momento conmigo. Te amo papá.

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN) bajo la dirección de la Dra. Ruth Noemí Aguila Ramírez, Profesora-Investigadora del CICIMAR-IPN y el Dr. César Salvador Cardona Félix, Catedrático CONACyT comisionado al referido Centro de Investigación, con la asesoría de la Dra. Christine Johanna Band Schmidt, Dr. Víctor Hugo Cruz Escalona y Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, todos Profesores-Investigadores del CICIMAR-IPN, en el período comprendido de julio de 2017 a julio de 2019.

## **TABLA DE CONTENIDO**

|                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>                                                             | V   |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>                                                            | VI  |
| <b>GLOSARIO</b>                                                                     | VII |
| <b>ABREVIATURAS</b>                                                                 | IX  |
| <b>RESUMEN</b>                                                                      | X   |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                     | XI  |
| <b>1 INTRODUCCIÓN</b>                                                               | 1   |
| <b>2 MARCO TEÓRICO</b>                                                              | 3   |
| 2.1 Veneno en organismos marinos                                                    | 3   |
| 2.2 Especie objeto de estudio                                                       | 4   |
| <b>3 ANTECEDENTES</b>                                                               | 5   |
| <b>4 JUSTIFICACIÓN</b>                                                              | 8   |
| <b>5 HIPÓTESIS</b>                                                                  | 9   |
| <b>6 OBJETIVOS</b>                                                                  | 9   |
| 6.1 Objetivo general                                                                | 9   |
| 6.2 Objetivos particulares                                                          | 10  |
| <b>7 MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                       | 10  |
| 7.1 Área de estudio y trabajo de campo                                              | 10  |
| 7.2 Obtención muestras                                                              | 11  |
| 7.2.1 Obtención de mucus                                                            | 11  |
| 7.2.2 Obtención de epitelio                                                         | 11  |
| 7.2.3 Aislamiento de bacterias y obtención de sobrenadantes de cultivos bacterianos | 12  |
| 7.2.4 Obtención de productos extracelulares                                         | 13  |
| 7.2.5 Obtención de extractos bacterianos                                            | 14  |
| 7.3 Disección anatómica de <i>H. dipterurus</i>                                     | 14  |
| 7.4 Actividad hemolítica                                                            | 15  |
| 7.5 Actividad enzimática                                                            | 15  |
| 7.5.1 Proteólisis de caseína                                                        | 15  |
| 7.5.2 Proteólisis de caseína (Agar leche)                                           | 17  |

|          |                                                                                            |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.5.3    | Proteólisis de la gelatina                                                                 | 18 |
| 7.5.3.1  | Licuefacción de la gelatina                                                                | 18 |
| 7.5.3.2  | Licuefacción de la gelatina: Cepas de temporada fría y cálida                              | 18 |
| 7.6      | Ensayo de citotoxicidad                                                                    | 19 |
| 7.6.1    | Líneas celulares en estudio                                                                | 19 |
| 7.6.2    | Bioensayos de citotoxicidad                                                                | 19 |
| 7.6.3    | Condiciones del primer bioensayo de citotoxicidad                                          | 20 |
| 7.6.4    | Cultivo celular                                                                            | 20 |
| 7.6.5    | Bioensayo de citotoxicidad 1                                                               | 20 |
| 7.6.6    | Cultivo celular y ensayo de citotoxicidad fluorimétrica                                    | 21 |
| 7.6.7    | Condiciones del segundo bioensayo de citotoxicidad                                         | 24 |
| 7.6.8    | Bioensayo de citotoxicidad 2                                                               | 24 |
| 7.7      | Perfil bioquímico de los extractos de epitelio de espina de la raya <i>H. dipterurus</i> . | 25 |
| 7.7.1    | Actividad de tripsina                                                                      | 25 |
| 7.7.2    | Electroforesis en gel de poliacrilamida y tinciones                                        | 25 |
| 7.7.2.1  | Tinción con azul de Comassie (CBB)                                                         | 26 |
| 7.7.2.2  | Tinción de plata                                                                           | 26 |
| 7.7.2.3  | Tinción Schiff                                                                             | 27 |
| 7.7.2.4  | Tinción Stains all                                                                         | 27 |
| 7.8      | Caracterización bacteriana                                                                 | 27 |
| 7.8.1    | Caracterización bacteriana                                                                 | 27 |
| 7.8.2    | Identificación molecular                                                                   | 27 |
| 7.8.2.1  | Método 1: Extracción por choque térmico                                                    | 28 |
| 7.8.2.2  | Método 2: Fenol-Cloroformo                                                                 | 28 |
| 7.8.2.3  | Amplificación por PCR y secuenciación                                                      | 29 |
| <b>8</b> | <b>RESULTADOS</b>                                                                          | 30 |
| 8.1      | Disección anatómica de <i>H. dipterurus</i>                                                | 30 |
| 8.2      | Actividad hemolítica                                                                       | 30 |
| 8.3      | Actividad enzimática                                                                       | 31 |
| 8.3.1    | Proteólisis de caseína                                                                     | 31 |

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 8.3.2 Proteólisis de caseína (Agar leche)                                                                                                 | 31 |
| 8.3.3 Proteólisis de la gelatina                                                                                                          | 31 |
| 8.3.3.1 Licuefacción de la gelatina                                                                                                       | 31 |
| 8.3.3.2 Licuefacción de la gelatina: Cepas de temporada fría y cálida                                                                     | 32 |
| 8.4 Ensayo de citotoxicidad                                                                                                               | 35 |
| 8.4.1 Bioensayo de citotoxicidad 1                                                                                                        | 35 |
| 8.4.1.1 Línea HeLa (Henrietta Lack células cancerosas de cérvix) expuesta a los componentes asociados a la espina de <i>H. dipterurus</i> | 35 |
| 8.4.1.2 Línea FsGH (fibroblastos gingivales humanos) expuesta al epitelio de la espina de <i>H. dipterurus</i>                            | 36 |
| 8.4.1.3 Comparación del efecto del extracto del epitelio sobre las líneas celulares HeLa y FsGH                                           | 37 |
| 8.4.2 Cultivo celular y ensayo de citotoxicidad fluorimétrica                                                                             | 38 |
| 8.4.2.1 Microscopia de fluorescencia: Células HeLa expuestas al sobrenadante del epitelio y del mucus                                     | 38 |
| 8.4.2.2 Microscopia de fluorescencia: Células HeLa expuestas a sobrenadantes bacterianos de temporada fría y cálida                       | 39 |
| 8.4.2.3 Microscopia de fluorescencia: Células HeLa expuestas a extractos bacterianos de temporada fría y cálida                           | 40 |
| 8.4.3 Bioensayo de citotoxicidad 2                                                                                                        | 42 |
| 8.4.3.1 Línea HeLa (células cancerosas de cérvix) expuesta a los componentes asociados a la espina de <i>H. dipterurus</i>                | 42 |
| 8.5 Perfil bioquímico de los extractos de epitelio                                                                                        | 43 |
| 8.5.1 Actividad de tripsina                                                                                                               | 43 |
| 8.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción                                                                                   | 44 |
| 8.6 Caracterización bacteriana                                                                                                            | 46 |
| <b>9 DISCUSIÓN</b>                                                                                                                        | 48 |
| <b>10 CONCLUSIONES</b>                                                                                                                    | 63 |
| <b>11 RECOMENDACIONES</b>                                                                                                                 | 64 |
| <b>LITERATURA CITADA</b>                                                                                                                  | 65 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                 |                                                                                                                                                                                  |    |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> | Preparación de estándares para realizar la curva de calibración para protocolo en microplaca.                                                                                    | 17 |
| <b>Tabla 2.</b> | Muestras asociadas a la espina de <i>H. dipterurus</i> utilizadas para el estudio de actividad citotóxica (Bioensayo 1).                                                         | 20 |
| <b>Tabla 3.</b> | Muestras asociadas a la espina de <i>H. dipterurus</i> utilizadas para el estudio de actividad citotóxica (Bioensayo 2).                                                         | 24 |
| <b>Tabla 4.</b> | Concentración de geles discontinuos SDS-PAGE.                                                                                                                                    | 26 |
| <b>Tabla 5.</b> | Licuefacción de la gelatina por parte de los componentes asociados a la espina de <i>H. dipterurus</i> .                                                                         | 32 |
| <b>Tabla 6.</b> | Actividad proteolítica de cepas aisladas durante la temporada fría, temporada cálida, co-cultivo de temporada fría (CTF) y co-cultivo de temporada cálida (CTC) contra gelatina. | 33 |
| <b>Tabla 7.</b> | Actividad proteolítica contra gelatina por parte de sobrenadantes bacterianos de temporada fría, cálida y del sobrenadante del co-cultivo de ambas temporadas.                   | 34 |
| <b>Tabla 8.</b> | Pesos moleculares de las diferentes bandas observadas de los extractos EE-MQ y EE-PBS con ayuda de diferentes técnicas de tinción para geles SDS-PAGE.                           | 46 |
| <b>Tabla 9.</b> | Cepas bacterianas aisladas de la temporada fría (marzo) y temporada cálida (octubre), provenientes de la espina de la aleta caudal de la raya diamante <i>H. dipterurus</i> .    | 47 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                   |                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Localización del aparato espinoso de <i>H. dipterurus</i> .                                                                                                                     | 5  |
| <b>Figura 2.</b>  | Diagrama de evaluación para la proteólisis de caseína.                                                                                                                          | 16 |
| <b>Figura 3.</b>  | Disección anatómica de <i>H. dipterurus</i> .                                                                                                                                   | 30 |
| <b>Figura 4.</b>  | Determinación de la actividad proteolítica del epitelio de la espina expresada en U/mg.                                                                                         | 31 |
| <b>Figura 5.</b>  | Actividad citotóxica de los componentes asociados a la espina de la aleta caudal de <i>H. dipterurus</i> ante la línea celular HeLa.                                            | 36 |
| <b>Figura 6.</b>  | Actividad citotóxica de los componentes asociados a la espina de la aleta caudal de <i>H. dipterurus</i> ante fibroblastos gingivales humanos (FsGH).                           | 37 |
| <b>Figura 7.</b>  | Comparación del efecto del sobrenadante del epitelio que recubre la espina de la aleta caudal de la raya diamante <i>H. dipterurus</i> sobre dos líneas celulares: HeLa y FsGH. | 38 |
| <b>Figura 8.</b>  | Imágenes captadas de las células HeLa expuestas a epitelio y mucus de la espina, utilizando la técnica DIC (A) y merge (B).                                                     | 39 |
| <b>Figura 9.</b>  | Imágenes captadas de las células HeLa expuestas a sobrenadantes bacterianos utilizando la técnica DIC (A) y merge (B).                                                          | 40 |
| <b>Figura 10.</b> | Imágenes captadas de las células HeLa expuestas a extractos bacterianos utilizando la técnica DIC (A) y merge (B).                                                              | 42 |
| <b>Figura 11.</b> | Actividad citotóxica asociada a los componentes de la espina frente a la línea celular HeLa.                                                                                    | 43 |
| <b>Figura 12.</b> | Determinación de la actividad de tripsina de los extractos del epitelio de la espina de <i>H. dipterurus</i> expresada en unidades de absorción/mg.                             | 44 |
| <b>Figura 13.</b> | Tinción de los geles de poliacrilamida utilizando diferentes técnicas de tinción (Azul brillante de Commasie, Plata, Schiff y Stains all).                                      | 45 |

## GLOSARIO

**Agua tetradestilada:** Agua ultra pura, con grado de laboratorio que ha sido filtrada y purificada por ósmosis inversa.

**Citolítico:** Que tiene el poder de disolver o destruir una célula

**Citotóxico:** Que tiene un efecto tóxico sobre determinadas células.

**Hemólisis:** Llamada también eritrocateresis, es el fenómeno de la desintegración de los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes).

**Hidrólisis:** Reacción química entre una molécula de agua y otra molécula, en la cual la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar unión de otra especie química.

**Ictioacantotoxicosis:** Envenenamiento producido por peces.

**Metabolito secundario:** Compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción de éste. La ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, si bien se verá afectado por ella, a veces gravemente.

**Proteólisis:** Ocurre cuando una proteína es separada en sus partes constituyentes: los aminoácidos. Las proteínas hidrolizadas suelen provenir de fuentes animales o de fuentes vegetales.

**SDS-PAGE:** Método para separar proteínas mediante electroforesis utilizando un gel discontinuo de poliacrilamida como medio de soporte y dodecil sulfato de sodio (SDS) para desnaturalizar las proteínas. El método se llama electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

**Tinción Gram:** Tinción diferencial empleado en bacteriología para la visualización de bacterias. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias Gram positivas a las que se visualizan de color morado, y bacterias Gram negativas a las que se visualizan de color rosa, rojo o grosella.



**Toxina:** Sustancia tóxica producida en el cuerpo de los seres vivos por la acción de los microorganismos.

**Veneno:** Sustancia que, introducida en un ser vivo, es capaz de producir graves alteraciones funcionales e incluso la muerte (RAE).

## **ABREVIATURAS**

|                 |                                                                                                                               |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ADN</b>      | Ácido desoxirribonucleico                                                                                                     |
| <b>ADN pol</b>  | ADN polimerasas                                                                                                               |
| <b>EDTA</b>     | Ácido etilendiaminotetraacético                                                                                               |
| <b>DMSO</b>     | Dimetilsulfóxido                                                                                                              |
| <b>dNTP</b>     | Deoxinucleósido trifosfato                                                                                                    |
| <b>kDa</b>      | Kilo dalton                                                                                                                   |
| <b>MPM</b>      | Marcador de peso molecular                                                                                                    |
| <b>PCR</b>      | Polymerase Chain Reaction/ Reacción en Cadena de la Polimerasa                                                                |
| <b>SDS-PAGE</b> | Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis/ Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico |
| <b>TBE</b>      | Tris/Ácido Bórico/EDTA                                                                                                        |
| <b>TCA</b>      | Ácido tricloroacético                                                                                                         |
| <b>EM</b>       | Extracto de mucus                                                                                                             |
| <b>EE-PBS</b>   | Extracto de epitelio en PBS                                                                                                   |
| <b>EE- MQ</b>   | Extracto de epitelio en agua tetradestilada                                                                                   |
| <b>CTF</b>      | Co-cultivo de temporada fría                                                                                                  |
| <b>CTC</b>      | Co-cultivo de temporada cálida                                                                                                |
| <b>CAT</b>      | Co-cultivo de ambas temporadas                                                                                                |
| <b>SnTC</b>     | Sobrenadante bacteriano de temporada cálida                                                                                   |
| <b>SnTF</b>     | Sobrenadante bacteriano de temporada fría                                                                                     |
| <b>SnAT</b>     | Sobrenadante bacteriano de ambas temporadas                                                                                   |
| <b>EPS TF</b>   | Productos extracelulares de temporada fría                                                                                    |
| <b>EPS TC</b>   | Productos extracelulares de temporada cálida                                                                                  |
| <b>ETF</b>      | Extracto de temporada fría                                                                                                    |
| <b>ETC</b>      | Extracto de temporada cálida                                                                                                  |

## RESUMEN

En el océano, los organismos viven en entornos competitivos que les exigen la producción de moléculas activas específicas y potentes. Algunas de estas moléculas son venenos y/o toxinas, los cuales en algunos casos han sido utilizados como fármacos para el tratamiento de enfermedades humanas. La mayoría de los peces venenosos tienen una potente actividad citolítica. Esta actividad probablemente es el mecanismo detrás de muchos de sus efectos cardiovasculares y neuromusculares. Este es el caso de las rayas marinas, cuya lesión se debe a una penetración mecánica en el tejido de su aparato espinoso y posterior liberación de veneno. Es por ello que en este estudio se evaluaron los componentes del aparato espinoso de la raya marina *Hypanus dipterurus* que incluyen el epitelio, mucus y bacterias asociadas a éste, ya que se hipotetiza la presencia de sustancias con actividad citotóxica. Para demostrar lo anterior, se realizó el aislamiento de los componentes que recubren la espina de *H. dipterurus*, para evaluar su capacidad hemolítica, proteolítica y citotóxica en dos líneas celulares humanas, HeLa (células de cáncer de cérvix) y una línea sana de fibroblastos gingivales humanos (FsGH). Se aislaron 37 cepas bacterianas predominando en éstas las Gram negativas. No se observó actividad proteolítica contra caseína por parte del extracto del epitelio, ni de las bacterias. Sin embargo, se observó hidrólisis de la gelatina por parte de ambos componentes. Los extractos de los sobrenadantes bacterianos, así como los productos extracelulares bacterianos mostraron citotoxicidad en las dos líneas celulares utilizadas, el epitelio evidenció actividad citotóxica contra la línea celular HeLa pero no contra la línea celular FsGH, pudiendo tener cierta especificidad. La raya *H. dipterurus* posee una mezcla diversa de moléculas como proteínas de diferentes pesos moleculares y entre ellas una proteína aniónica glicosilada, enzimas y otros componentes farmacológicamente activos, por lo que se concluye que tanto las bacterias asociadas al mucus como el epitelio de la espina son una fuente potencial de moléculas con actividad citotóxica y proteolítica.

**Palabras clave:** Bacterias, citotoxicidad, epitelio, espina, hemólisis, *Hypanus dipterurus*, mucus, proteólisis.

## ABSTRACT

In ocean, organisms live in competitive environments that require production of molecules with specific and powerful activity. Some of these molecules are poisons and/ or toxins, in fact some used currently in human diseases treatment. Most venomous fish have a potent cytolytic activity. It seems likely that toxicity is the mechanism behind many cardiovascular and neuromuscular effects. This is the case of the marine stingray whose injury is caused by mechanical spike penetration into tissue and poison release. In this study, the components of spike from *Hypanus dipterurus* were evaluated, including epithelium, mucus and associated bacteria to identify molecules with cytotoxic activity. Isolation of membrane-like sheath that covers components of the spike of *H. dipterurus* was carried out to evaluate its hemolytic, proteolytic and cytotoxic capacity in two human cell lines. HeLa cells, a tissue-culture cell line (derived from cervical cancer) and human gingival fibroblasts (HGFs). We isolated 37 bacterial strains mainly Gram-negative. No proteolytic activity against casein was observed by epithelium extract or bacteria. However, positive gelatin hydrolysis was observed by both components. Bacterial supernatants extract as well as extracellular bacterial products showed cytotoxic activity against both cell lines analyzed. Epithelium showed cytotoxic activity against the HeLa cells but not against FsGH cells. Stingray *H. dipterurus* possesses a diverse mixture of molecules such as proteins of different molecular weights and among them a glycosylated anionic protein, enzymes and other pharmacologically active components, therefore, we concluded that both mucus bacteria associated, and spike epithelium are a potential source of molecules with cytotoxic and proteolytic activity.

## Key words

Epithelium, bacteria, cytotoxicity, hemolysis, *Hypanus dipterurus*, mucus, proteolysis, spine.

## 1 INTRODUCCIÓN

Los organismos venenosos producen sustancias tóxicas que utilizan en interacciones depredatorias, defensivas y competitivas. Estos organismos llegan a poseer aparatos anatómicos especializados para la inyección de los compuestos tóxicos en el organismo objetivo (Wright, 2012).

Se conocen representantes venenosos de varios grupos taxonómicos que son el foco de muchos estudios ecológicos, toxicológicos y evolutivos. Sin embargo, el estudio de los venenos de peces en estos contextos ha sido prácticamente ignorado (Nelson, 2006). Una de las razones principales por las que estos vertebrados permanecen poco estudiados, es la dificultad para obtener, almacenar y extraer muestras de veneno (Gokulalakshmi *et al.*, 2018).

En este campo semántico de peces venenosos están los batoideos, entre los cuales se encuentran las rayas espinosas. Las rayas ocupan una variedad de ecosistemas acuáticos, desde áreas costeras continentales e insulares adyacentes, hasta el abismo profundo, así como en ríos y lagos (Last *et al.*, 2016).

Las rayas son el subgrupo más grande de los peces condricios. En la actualidad comprenden 26 familias y 633 especies nombradas. Sin embargo, existen otras 50 especies no reconocidas o no descritas por el momento (Last *et al.*, 2016). Desde el punto de vista taxonómico, el grupo se encuentra dividido en dos súper familias: Myliobatoidea y Dasytoidea (Parsons y Rutledge, 2015). Esta última se compone por tres familias, incluyendo Potamotrygonidae, Dasyatidae y Urolophidae. Habitando la primera en aguas dulces y las dos últimas en hábitats marinos (Cazorla *et al.*, 2009).

Debido a su amplia distribución y mayor número de especies, la familia Dasytidae, junto a la familia Urolophidae, son las rayas marinas que ocasionan la mayoría de los accidentes (ictioacantotoxicosis) en humanos (Cazorla *et al.*, 2009).

Las rayas de la familia Dasyatidae se caracterizan por presentar una aleta caudal modificada, a manera de látigo sobre la cual se encuentra dorsalmente el aguijón. Consta de una a tres espinas aserradas bilateralmente, las cuales tienen la capacidad de regenerarse si se pierden. Estas espinas suelen ser esbeltas, alargadas, con dentadura retro aserrada (desde el primer tercio inicial de la espina hasta la punta).

Las espinas están unidas a la cola de la raya y cuentan con ranuras ventrolaterales profundas y bien desarrolladas, con uno a cuatro vasos sanguíneos dentro de las ranuras, cubierta por una capa de vitrodentina, teniendo después un tejido epitelial celular, cubierto a su vez por una capa mucosa (Halstead *et al.*, 1955).

Esta capa de mucus en la superficie de los peces marinos está compuesta principalmente por agua y macromoléculas formadoras de gel, como la mucina y otras glicoproteínas (Nigam *et al.*, 2012; Guardiola *et al.*, 2014). El estudio del mucus en las rayas de agua dulce ha reflejado además una colonización simbiótica por bacterias, en su mayoría Gram negativas (Domingos *et al.*, 2011).

La familia Dasyatidae tiene una ventaja adaptativa para ejecutar su acción punzadora, ya que su aguijón es más largo y se encuentra ubicado; además de dorsalmente, más distalmente que el de sus congéneres. Dentro de esta familia, el género *Hypanus* (antes *Dasyatis*), comprende cerca de 24 especies que se encuentran distribuidas en las áreas marinas tropicales y subtropicales (Last *et al.*, 2016).

En el océano, los organismos viven en entornos competitivos y agresivos que difieren en muchos aspectos del ambiente terrestre. Se ha documentado que las rayas de río (Potamotrygonidae) poseen dos tipos diferentes de glándulas secretoras de proteínas como nucleotidasas y fosfodiesterasas, diseminadas alrededor de todo el tejido epidérmico de las espinas. Mientras que, en las rayas marinas se encuentran localizadas solamente en las cavidades ventrolaterales de la espina, lo que pudiera

explicar la mayor severidad de la sintomatología de una picadura de rayas de río con respecto a las marinas (Cazorla *et al.*, 2009). En cuanto a los componentes del veneno para especies marinas se conoce muy poco. Sin embargo, ha sido sugerido que la reacción inflamatoria local y la necrosis en accidentes con rayas de agua dulce, son debidas a la liberación dentro de la herida de varias proteínas con actividad enzimática, producidas por células secretoras que recubren la espina (Barbaro *et al.*, 2007; Pedroso *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2008; Antoniazzi *et al.*, 2011).

## **2 MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Veneno en organismos marinos**

Como punto de referencia, debe ser entendido que cuando se utiliza el término "venenoso", se está haciendo referencia a los animales que generan veneno a través de un tejido u órgano. Por ejemplo, una glándula venenosa. El veneno es inyectado a través de la aplicación parenteral con un aparato especializado, como nematocistos o espinas (Halstead, 1956). Estas secreciones venenosas por lo general contienen moléculas que interrumpen los procesos fisiológicos normales. La producción de estas toxinas es una estrategia importante que garantiza su supervivencia en un ecosistema altamente competitivo, ya sea para matar a sus presas y/o para defenderse a sí mismos o a sus territorios produciendo un número significativo de metabolitos. Estos metabolitos en combinación, dan como resultado una gran variedad de estructuras químicas y moléculas complejas (alcaloides, esteroides, péptidos y proteínas) con propiedades químicas y farmacológicas diferentes entre ellas (Russell, 1971).

Existen peces venenosos que pueden causar numerosas lesiones en los humanos, con síntomas como dolor intenso, necrosis de la piel, ampollas, úlceras, fiebre y raramente la muerte, la cual esta probablemente asociada a infecciones bacterianas. La mayoría de los peces venenosos tienen una potente actividad citolítica, y

probablemente esta actividad sea el mecanismo que causa los efectos cardiovasculares y neuromusculares (Church y Hodgson, 2002).

Más de 250 especies de peces marinos, se sabe o se sospecha que son venenosas, éstos representan casi dos tercios de la población de vertebrados venenosos. La gran mayoría de estos peces no son migratorios, se mueven lentamente y tienden a vivir en aguas poco profundas en hábitats protegidos, como el pez escorpión, pez cebra, pez piedra, pez sapo y rayas con espina (Maretic, 1988). Las rayas son peces cartilaginosos (clase *Condrictos* y subclase *Elasmobranchii*) de forma aplanada, redonda o romboidal. Pueden habitar en reservorios acuáticos fluviales (rayas de río) y marinos (rayas de mar). La lesión causada por las rayas se debe a una penetración mecánica en el tejido, debido a la introducción de su aparato espinoso y posterior liberación de veneno. Esto sucede cuando el dorso de la raya es estimulado y como respuesta a un acto reflejo la cola se contrae, trayendo como resultado la penetración de la espina dentro de la víctima, conduciendo al desarrollo de edema local, dolor intenso necrosis, laceración del tejido y casos de infección secundaria debido a las bacterias embebidas en el mucus que recubre la espina (Barbaro *et al.*, 2007; Garrone y Haddad, 2009; Dehghani *et al.*, 2010).

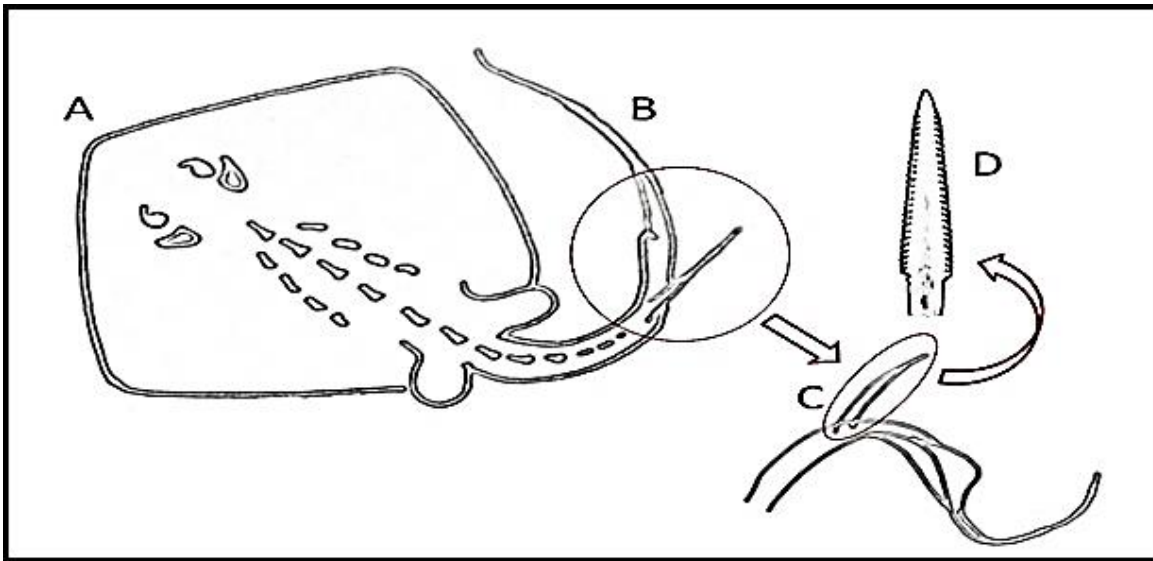
## **2.2 Especie objeto de estudio**

*Hypanus dipterurus* es una raya demersal que habita principalmente aguas costeras relativamente poco profundas, sobre fondos de arena y lodo o cerca de afloramientos rocosos y lechos de algas (Feder *et al.*, 1974; Eschmeyer *et al.*, 1983). Se encuentra ampliamente distribuida en el Pacífico, habitando desde el sur de California, Estados Unidos hasta Chile, el área incluye Islas Galápagos y Hawái. Esta raya tiene una vida de aproximadamente 28 años, así como una baja fecundidad que va de uno a cuatro individuos, además de baja tasa de aumento en sus poblaciones (Smith *et al.*, 2006).

Su cuerpo es en forma de disco tipo diamante con el ancho y el largo de tamaño similar. Teniendo un máximo de 122 cm de ancho, con un dorso café oscuro a



negruzco y coloración blanca para la parte ventral. Una fila de pequeñas espinas reposa en la línea media del disco y en la base de la cola, además de una hilera más corta a cada lado de la línea principal. La cola es sólo un poco más larga que la longitud total del disco, tiene un pliegue ventral y uno dorsal hacia la mitad de la cola, los dos terminan en el mismo sitio (Navia y Mejía-Falla, 2011). Un poco antes de estos pliegues en la parte de la cola en forma de látigo, se ubica el aparato espinoso de *H. dipterurus* (**Figura 1**).



**Figura 1.** Localización del aparato espinoso de *H. dipterurus*. A- Vista dorsal. B-Aleta caudal. C- Espina. D- Vista ventral detallada de la espina observándose la dentadura retro aserrada.

### 3 ANTECEDENTES

El estudio de los componentes asociados a la espina de la raya empieza en 1970 cuando Halstead y colaboradores documentan que la espina de algunos batomorfos está cubierta por células secretoras de veneno. Esta fue la primera vez que se utilizó esta palabra para describir a la naturaleza de las sustancias asociadas con la espina.

En el año 2006, Magalhães y colaboradores, estudian a las rayas *Potamotrygon scobina* y *P. orbygnyi*, encontrando que el veneno de estos peces tenía la capacidad de inducir necrosis y que además poseían un bajo nivel de actividad proteolítica. Así mismo, a partir de extractos obtenidos de rayas de este género se han detectado muchas enzimas, tales como proteasas y hialuronidasa (Haddad *et al.*, 2004; Barbaro *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2008). También se ha reportado que los extractos obtenidos del tejido que cubre las espinas de *P. falkneri*, tiene la capacidad para causar actividades tóxicas como nocicepción, edema, miotoxicidad, necrosis y mortalidad (Barbaro *et al.*, 2007). Antoniazzi y colaboradores (2011) en un estudio realizado en ratones, llegan a la conclusión de que el veneno de *P. falkneri* es responsable del desarrollo de una necrosis temprana con una reacción inflamatoria leve, debido a la acción directa del veneno y que el daño local severo es probablemente potenciado por el trauma mecánico causado por el aguijón.

En el 2015, Rajeshkumar y colaboradores, estudian a rayas de vida marina teniendo como objetivo determinar la actividad citotóxica del epitelio de las espinas de las rayas *Dasyatis sephen* y *Aetobatis narinari*. Los resultados de su estudio mostraron que los extractos del veneno de las dos especies de rayas presentaban actividad fibrinolítica, anticoagulante y gelatinolítica, siendo más evidente el efecto de la coagulación en *D. sephen*.

Domingos y colaboradores (2011) evaluaron la citotoxicidad del mucus de *Potamotrygon motoro*, su estudio mostró que el mucus fue tóxico para las células epiteliales humanas. Resultados similares fueron obtenidos por Magalhães y colaboradores (2006) que demostraron *in vivo* que la necrosis local inducida por el veneno de *Potamotrygon* spp. aumenta por la presencia de mucus.

Ziegman y colaboradores (2015) estudiaron rayas de agua dulce y marinas, demostrando que especímenes del género *Potamotrygon*, tienen moléculas citotóxicas asociadas a su espina capaces de hidrolizar ciertas proteínas como caseína, gelatina y fibrinógeno. Especies como, *P. henlei*, *P. scobina*, y *P. orbygnyi*

lisan caseína y gelatina, mientras que *P. falkneri* y la raya marina *D. guttata* pueden lisar a las tres proteínas citadas.

En el año 2015, en la India, Rajeshkumar y colaboradores, reportaron que el epitelio de la espina de la raya *D. sephen* exhibió un potente efecto anti proliferativo contra la línea celular de cáncer de cérvix, la línea celular HeLa. Mientras que Fuochi y colaboradores (2017) demostraron que el mucus aislado de la piel de *D. pastinaca* fue tóxico para las células de leucemia aguda (HL60) con una inhibición de la proliferación de alrededor del 52% a una concentración de 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Además de no observar efectos en células sanas por lo que refieren una toxicidad específica de los componentes del mucus.

La infección secundaria generalmente se ha encontrado en pacientes lesionados tanto por rayas marinas (Clark *et al.*, 2007; Dehghani *et al.*, 2009) como de agua dulce (Haddad *et al.*, 2004). En el trabajo realizado por Antoniazzi y colaboradores (2011), al probar el extracto del tejido tegumental de la espina de *P. falkneri* para determinar su capacidad de inducir cambios histopatológicos en la piel de ratones, encontraron que en dos de las muestras ocurrió una infección bacteriana, una a las 24 h y otra a las 96 h después de la inyección de veneno. Esto indica que el sitio de la lesión se convierte en un medio propicio para la proliferación y contaminación bacteriana. Así mismo, Domingos y colaboradores, (2011) Identificaron las especies de bacterias que se encuentran en el moco de la espina de *P. motoro* y evaluaron su capacidad para liberar toxinas y la lesión causada a las células epiteliales, encontrando que la mayoría de las cepas de *Aeromonas hydrophila* presentes en el moco tienen el potencial de ser patógenas y causar una infección secundaria grave, ya que son altamente hemolíticas y proteolíticas contra diferentes sustratos. Además, se midió el efecto tóxico de todos los sobrenadantes del cultivo de *A. hydrophila*, *A. sobria* y *Pseudomonas aeruginosa* en células epiteliales humanas, en la línea celular HEp-2 mediante el método MTT, el cual mide la viabilidad celular en términos de su capacidad metabólica mitocondrial. Los resultados mostraron que todos los sobrenadantes de cultivo analizados fueron tóxicos para las células epiteliales

#### 4 JUSTIFICACIÓN

El conocimiento sobre venenos y metabolitos secundarios, cómo es que se producen, las glándulas o células secretoras implicadas en su producción, la relevancia biológica y los patrones de evolución respecto a otros organismos, son muy útiles para entender preguntas biológicas fundamentales. Por ejemplo, ¿cómo es el efecto del veneno?, ¿porqué es que se produce?, ¿cuál es su utilidad?. Los venenos, toxinas, y metabolitos secundarios de animales, plantas y microorganismos, se han considerado durante mucho tiempo como un excelente recurso. Estas sustancias han contribuido de manera esencial al descubrimiento de nuevas moléculas biológicamente activas que tienen diversas aplicaciones en campos muy variados.

Sin embargo, es relativamente poca la información científica sobre venenos y/o metabolitos de bacterias asociadas a peces. Aunque sin duda alguna, los venenos representan una fuente potencial de compuestos biológicamente importantes como, por ejemplo, proteínas, péptidos o algunas otras moléculas de naturaleza química diversa. Esta falta de conocimiento se ve particularmente reflejada en las rayas marinas (familia Dasyatidae y Urolophidae), a pesar de ser uno de los grupos de peces marinos comúnmente involucrados en casos de ictiocantotoxicosis. Particularmente para la especie *H. dipterurus* la información es nula en este aspecto.

La información encontrada respecto a la familia Dasyatidae está enfocada a sus aspectos médicos. Con reportes de hasta 1500 picaduras por año en EE. UU., sus manifestaciones clínicas (efecto de vasoconstricción, neurotóxico, cardiotoxico, miotóxico, actividad insidiosa necrosante e intenso dolor). El tratamiento de las heridas, o las características morfológicas de diversas especies. A pesar de la relevante importancia de toxina de algunas rayas y el grado de importancia farmacológica que esta pudiera llegar a tener, su existencia y composición bioquímica no ha sido determinada con exactitud en *H. dipterurus*.

Se conoce la morfología de las espinas de las rayas, las cuales son causantes del trauma en el tejido de la víctima. No sólo por la lesión tisular que causan, sino por la gran cantidad de bacterias embebidas en el aparato de la espina que son inoculadas en el momento de la lesión, acompañadas de bacterias que habitan en el ambiente acuoso, aunque se desconoce con exactitud el grado de patogenia o daño celular que estas pueden causar.

Esto nos da una idea de lo imprescindible que es el estudio de los componentes asociados a la espina de la raya diamante *H. dipterurus* ya que, basándonos en trabajos anteriores, resulta interesante la posibilidad de encontrar compuestos que también presenten actividad, sentando en este trabajo las primeras bases de investigación.

## **5 HIPÓTESIS**

Es reconocido ampliamente que en varias especies de batoideos (rayas), principalmente de agua dulce, la espina presente en la aleta caudal contiene diferentes compuestos en su veneno, los cuales causan daños severos al momento de una picadura (daño mecánico y tóxico). Con base en lo anterior, la hipótesis del presente estudio postula que en las especies de rayas marinas también existen sustancias con capacidad citotóxica asociadas a los componentes que recubren la espina de la aleta caudal, para lo cual se toma como modelo de estudio a la raya diamante *H. dipterurus*, especie de batoideo dominante en las aguas someras de la Bahía de La Paz, B.C.S.

## **6 OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Determinar la presencia de actividad citotóxica en los componentes del aparato espinoso de la raya marina *H. dipterurus* que incluyen el epitelio, mucus y bacterias asociadas a este.

## 6.2 Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad hemolítica de los componentes del aparato espinoso de la raya *H. dipterurus*.
- Evaluar la capacidad proteolítica de los componentes del aparato espinoso de la raya *H. dipterurus*.
- Evaluar la toxicidad de los componentes del aparato espinoso en células humanas.
- Realizar un perfil bioquímico de los extractos del epitelio de la espina de la raya diamante *H. dipterurus*.
- Identificar a las bacterias asociadas al mucus que recubre el epitelio de la espina de la raya *H. dipterurus*.

## 7 MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Área de estudio y trabajo de campo

Fue tomado como área de estudio, el cuerpo de agua de la Bahía de La Paz, B.C.S., México. Se realizaron dos muestreos, uno en la temporada cálida (mes de octubre del 2017) y otro en la temporada fría (mes de marzo del 2018) para la realización de las diferentes pruebas. Los organismos se capturaron a través de la técnica de pesca artesanal con la ayuda de pescadores locales, utilizando para esto redes de enmalle tipo agalleras con paños de 100 m de longitud de monofilamento de nylon, 1.5 m de caída y una luz de malla de 10 pulgadas de amplitud.

Las redes de pesca fueron colocadas durante la noche y retiradas en la mañana posterior. Una vez obtenidos los organismos, estando en la embarcación, se retiraron

las espinas de los peces y se enjuagaron con agua de mar estéril. Fueron depositadas en los medios de preservación correspondientes, los cuales fueron: PBS 1mM (Haddad *et al.*, 2004), agua tetradestilada (Milli Q) con glicerol al 10% (Pérez Bravo, 2018) y el medio de cultivo caldo marino.

## 7.2 Obtención de muestras

Las espinas colocadas en PBS y agua tetradestilada fueron utilizadas para la recuperación de mucus y epitelio de la espina. Debido a la poca cantidad de muestra de epitelio y mucus obtenido en ambos muestreos, se realizó una mezcla de cada uno de ellos con toda la muestra recuperada, sin diferenciar entre temporadas. Mientras que para las muestras bacterianas se realizó distinción entre temporada fría (mes de marzo) y cálida (mes de octubre).

### 7.2.1 Obtención de mucus

Con la ayuda de un bisturí estéril, se realizó un raspado del mucus (primera capa que cubre la espina). Este mucus se suspendió en PBS 1mM a un pH de 7.4 y fue colocado en un agitador tipo Vórtex durante 30 segundos. La solución fue centrifugada a 13500 rpm durante 20 minutos con la finalidad de separar cualquier célula y restos bacterianos. El sobrenadante se recuperó y se filtró a través de membranas de 0.2 µm. Posteriormente fue depositado en tubos estériles, los cuales fueron conservados a -20°C para la realización de las diferentes pruebas. A esta fracción se le llamará **extracto de mucus (EM)** en el resto del documento. Una fracción del mucus fue conservada sin ningún tratamiento dado que fue utilizado directamente en los bioensayos de actividad hemolítica y actividad caseinolítica. Lo anterior con la finalidad de observar el efecto del mucus sin sesgar su actividad por el solvente vehículo en el cual se suspendió.

### 7.2.2 Obtención de epitelio

Una vez retirado el mucus, el epitelio que recubre la espina de *H. dipterurus* se recuperó a través de la técnica de raspado, con la ayuda de un bisturí estéril. El

epitelio fue suspendido en PBS 1mM a un pH de 7.4. Posteriormente fue macerado en un mortero de porcelana y colocado en un agitador Vórtex durante 30 s. La solución fue centrifugada a 3500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se filtró a través de membranas de acetato de celulosa con poros de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro, para obtener un extracto estéril. Éste fue colocado en un tubo estéril y fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de las diferentes pruebas. A esta fracción, se le llamará en el resto del documento **extracto de epitelio en PBS (EE-PBS)**. El anterior procedimiento fue repetido, cambiando el solvente por agua tetradestilada con 10% de glicerol en lugar de PBS. A este tratamiento se le llamará en lo sucesivo **extracto de epitelio en agua tetradestilada (EE-MQ)**.

Una fracción del epitelio fue conservada sin ningún tratamiento dado que fue utilizado directamente en los bioensayos de actividad hemolítica y caseinolítica. Lo anterior con la finalidad de observar el efecto del mucus sin sesgar su actividad por el solvente vehículo en el cual se suspendió.

### **7.2.3 Aislamiento de bacterias y obtención de sobrenadantes de cultivos bacterianos**

Las espinas inoculadas en caldo marino fueron utilizadas para identificar a las bacterias asociadas al mucus que recubre el epitelio de la espina de la raya. Para ello, se realizaron diluciones hasta  $10^5$ , con la finalidad de poder distinguir las diferentes morfologías bacterianas. De las diluciones se tomaron 100  $\mu\text{L}$ , que fueron depositados en placas de agar marino y sembradas en masivo. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ .

Una vez obtenidas las colonias bacterianas de ambas temporadas, se procedió a determinar la pureza de las cepas, mediante la morfología colonial y tinción Gram. Las cepas puras fueron inoculadas en caldo marino durante 24 h a  $35^{\circ}\text{C}$ , a este cultivo en medio líquido se le llamará de ahora en adelante **cultivo bacteriano**.



Paralelamente se realizaron co-cultivos, los cuales consistieron en inocular todas las cepas aisladas en un mismo cultivo. Se realizó uno con las cepas de temporada fría al que se le llamó co-cultivo de temporada fría (**CTF**). Otro co-cultivo con las cepas de temporada cálida al que se le denominó, co-cultivo de temporada cálida (**CTC**). Finalmente, un tercer co-cultivo que contenía las cepas de ambas temporadas el cual fue denominado co-cultivo de ambas temporadas (**CAT**).

Se recuperaron los sobrenadantes de cada uno de los co-cultivos, los cuales se centrifugaron a 13500 rpm por un lapso de 20 minutos, posteriormente fueron filtrados con membranas de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro y almacenados en microtubos para su posterior uso. En lo sucesivo a esta fracción de los co-cultivos libres de células se les llamará sobrenadantes bacterianos. Realizándose uno para cada temporada: sobrenadante bacteriano de temporada cálida (**SnTC**), sobrenadante bacteriano de temporada fría (**SnTF**) y sobrenadante bacteriano de ambas temporadas (**SnAT**).

#### **7.2.4 Obtención de productos extracelulares**

Las cepas puras de ambas temporadas fueron inoculadas cada una en solución salina al 2.5%. Esta suspensión se sembró en placas de agar marino, las cuales fueron recubiertas en su superficie con papel celofán de celulosa.

Una vez sembradas las cepas se incubaron durante 24 h a 35°C. Después de la incubación, se hizo un raspado de la superficie del celofán para recuperar las bacterias y sus productos extracelulares.

Todas las cepas de temporada fría y sus productos extracelulares se concentraron en un sólo tubo al cual se le agregó agua destilada estéril, en una proporción de 0.04 g de biomasa / 1 mL de agua destilada. Lo anterior se centrifugó a 3000 rpm por 15 min. El sobrenadante fue recuperado y se filtró en membranas 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro. A este sobrenadante filtrado se le llamará en adelante **productos extracelulares de temporada fría** o **EPS TF**. El mismo procedimiento se realizó con las cepas de

temporada cálida y su sobrenadante filtrado se etiquetó como **productos extracelulares de temporada cálida o EPS TC**.

#### **7.2.5 Obtención de extractos bacterianos**

Los extractos fueron obtenidos de los sobrenadantes bacterianos de los co-cultivos de las bacterias aisladas. Uno para temporada fría (extracto de temporada fría o **ETF**) y otro para la cálida (extracto de temporada cálida o **ETC**).

Las cepas bacterianas de cada temporada fueron inoculadas en caldo marino en tubos de ensayo de 13x1.5 cm y se incubaron a 35°C durante 24 h, colocando una colonia bacteriana en 10 mL de medio. Estos co-cultivos bacterianos sirvieron como inóculo para 250 mL de caldo marino en matraces Erlenmeyer de 1 L. Ambos matraces se mantuvieron en agitación durante cuatro días. El contenido fue centrifugado, el sobrenadante clarificado fue colocado en un embudo de separación agregando acetato de etilo en una relación 1:1 (sobrenadante-disolvente). Fue agitado vigorosamente durante 1 minuto y mantenido en reposo durante aproximadamente 20 minutos para la separación de fases, posteriormente se recuperó la fase orgánica. El mismo procedimiento fue realizado tres veces. El disolvente se evaporó a sequedad en un rotavapor de la marca Yamato modelo BM 500 a 37°C y 120 rpm. Los extractos resultantes fueron almacenados en viales a -20°C hasta su evaluación.

#### **7.3 Disección anatómica de *H. dipterurus***

Antes de iniciar con el estudio de los compuestos citotóxicos asociados a la espina de *H. dipterurus*, primeramente, se realizó la búsqueda de una glándula macroscópica productora de compuestos citotóxicos. Esto mediante la disección y el estudio anatómico de algunos especímenes de la raya *H. dipterurus*.

#### 7.4 Actividad hemolítica

Para la realización de esta prueba, fueron utilizadas diferentes muestras: el extracto del mucus, extracto de epitelio (**EE-PBS**), sobrenadante bacteriano de ambas temporadas (**SnAT**) y co-cultivo de ambas temporadas (**CAT**). Paralelamente, el mucus que recubre la espina fue adicionado de manera directa en la placa de agar sangre y el epitelio que recubre la espina también fue incorporado de manera directa en la placa. Lo anterior fue realizado por triplicado en placas de agar sangre TSA, las cuales fueron incubadas durante 24 h a 35°C. Como controles positivos fueron utilizados discos impregnados con extracto estandarizado de agave.

#### 7.5 Actividad enzimática

Para efectuar la prueba de actividad enzimática se utilizaron dos sustratos caseína y gelatina.

##### 7.5.1 Proteólisis de caseína

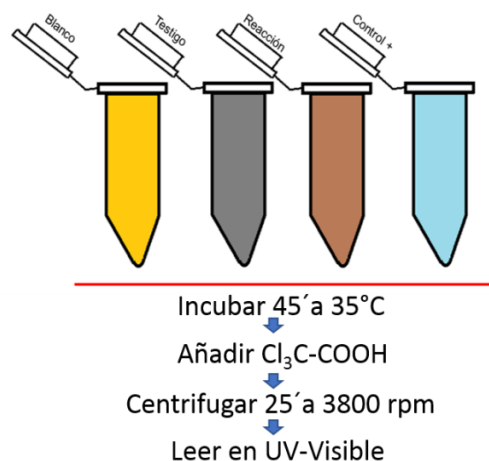
La actividad proteolítica fue analizada utilizando caseína como sustrato tal como lo describen Mandelbaum *et al.* (1990). La muestra problema fue el extracto de epitelio (**EE-PBS**). Fueron utilizados tubos blancos, testigo, reacción y control positivo. Todos por triplicado (**Fig. 2**).

A todos los tubos se les agregó 950 µL de solución de caseína al 1% (pH 7.5; solución Tris 0.1 molar + caseína), y dependiendo del tratamiento se le adicionó la diferente muestra: a los tubos blanco se les agregó 50 µL de regulador Tris, a los testigos 50 µL de PBS 1mM, a los tubos de reacción 50 µL de **EE-PBS** y a los tubos de control positivo de hidrólisis 50 µL de tripsina.

Todos los tubos (blancos, testigo, reacción y control) fueron incubados 1 h a 30°C, posteriormente se añadió 1 mL de ácido tricloroacético al 5%. Los tubos fueron centrifugados a 3800 rpm durante 25 min, la absorbancia del sobrenadante fue determinada a 280 nm en un espectrofotómetro de UV- Visible (Evolution 201). Como blanco fue utilizado el regulador Tris. La actividad proteolítica fue expresada en

Unidades/mg, dividiendo la absorbancia por los miligramos de proteína presentes en la muestra y multiplicando la relación anterior por 100:

$$U/mg = (A_{280} / \text{mg de proteína}) * 100$$



**Figura 2.** Diagrama de evaluación para la proteólisis de caseína

Para llevar a cabo la prueba de actividad enzimática utilizando caseína como sustrato, la cantidad de proteína disuelta en el extracto del epitelio fue cuantificada utilizando el kit comercial “Pierce™BCA Protein Assay” (ThermoScientific). El método es colorimétrico, se utiliza para cuantificar el contenido de proteína total y se basa en la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  realizada por las proteínas presentes en la muestra (las cuales tienen que estar en ambiente alcalino) realizando la detección colorimétrica de los iones cobre  $\text{Cu}^{1+}$  en presencia de ácido bicinconínico (BCA).

El kit fue utilizado siguiendo las instrucciones e información del fabricante. Para ello, la concentración de proteínas fue determinada en referencia a la proteína BCA. Para ello, se prepararon una serie de diluciones de concentración conocida (**Tabla 1**) y fueron evaluadas en microplacas de 96 pozos al mismo tiempo que las muestras de epitelio en estudio. Con base en las muestras de referencia se cuantificó la cantidad de proteína total de la solución **EE-PBS**.

*Tabla 1.* Preparación de estándares para realizar curva de calibración para protocolo en microplaca.

| <b>Vial</b> | <b>Volumen del Diluyente* (μL)</b> | <b>Volumen y fuente de BSA (μL)</b> | <b>Concentración final de BSA (μg/mL)</b> |
|-------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|
| A           | 0                                  | 300 de stock                        | 200                                       |
| B           | 125                                | 375 de stock                        | 1500                                      |
| C           | 325                                | 325 de stock                        | 1000                                      |
| D           | 175                                | 175 del vial B                      | 750                                       |
| E           | 325                                | 325 del vial C                      | 500                                       |
| F           | 325                                | 325 del vial E                      | 250                                       |
| G           | 325                                | 325 del vial F                      | 125                                       |
| H           | 400                                | 100 del vial G                      | 25                                        |
| I           | 400                                | 0                                   | 0= Blanco                                 |

\*El diluyente utilizado fue PBS 1mM.

De cada estándar y de cada muestra a cuantificar, fueron agregados 25 μL en los pocillos de la microplaca (rango de trabajo de 20 - 2000 μg/mL). Posteriormente, fueron agregados 200 μL del reactivo de trabajo (RT) a cada pocillo y fue mezclado durante 30 s. La placa fue cubierta e incubada a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, la placa fue retirada y enfriada a temperatura ambiente. Posteriormente, en un lector de placa fue realizada la lectura de la absorbancia a 562 nm. Los valores de concentración de proteína fueron graficados con el valor del blanco restado.

### **7.5.2 Proteólisis de caseína (Agar leche)**

Para evaluar la capacidad proteolítica fueron utilizadas placas de agar marino suplementadas al 10% con leche en polvo descremada y deslactosada (Svelty). La actividad proteolítica se manifiesta mediante una zona clara alrededor del área donde fue colocada la muestra. Las muestras utilizadas para esta prueba fueron el co-cultivo bacteriano de ambas temporadas (**CAT**), el sobrenadante bacteriano de ambas temporadas (**SnAT**), el extracto del epitelio (**EE-PBS**) y el mucus de forma

directa. El ensayo fue realizado por triplicado agregando 40  $\mu$ L por cada una de estas réplicas.

### **7.5.3 Proteólisis de la gelatina**

La realización de esta prueba fue realizada en dos etapas. En primer lugar, fue estudiado el efecto del **EM**, **EE-PBS**, **CTC** y **CTF**, utilizando gelatina como sustrato. En un segundo experimento, fue estudiado el efecto de cada una de las cepas que componen los co-cultivos de temporada fría y cálida y los sobrenadantes de estas cepas (de forma individual para cada cepa) utilizando también gelatina como sustrato.

#### **7.5.3.1 Licuefacción de la gelatina**

Para la medición de la actividad proteolítica empleando gelatina como sustrato, fue utilizada grenetina comercial al 2.8%. En tubos de ensayo estériles se agregaron 800  $\mu$ L de grenetina estéril, además a cada uno de los tubos les fueron añadidos 200  $\mu$ L de las muestras **EM**, **EE-PBS**, **CTC** (ajustado a una densidad óptica de 1.0 a 585 nm), **CTF** (ajustado a una densidad óptica de 1.0 a 585 nm), **SnTC** y **SnTF**.

Posteriormente, los tubos con las muestras fueron incubados por un periodo de 3.5 h a 35°C, incubando después en un baño con hielo durante 10 min a 7°C aproximadamente. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, incluido el control positivo el cual fue Proteinasa K y el control negativo, para el cual se utilizó grenetina sin ningún otro aditivo. Los testigos utilizados para este ensayo fueron grenetina más PBS y grenetina más caldo marino.

#### **7.5.3.2 Licuefacción de la gelatina: Cepas de temporada fría y cálida**

Se realizó un segundo experimento con gelatina comercial al 2.8% como sustrato, con la finalidad de medir la actividad proteolítica de cada una de las cepas aisladas de las espinas obtenidas durante la temporada fría y cálida. Así también, propiedades de licuefacción de la gelatina debido a los metabolitos secundarios de

las cepas de ambas temporadas obtenidos a través de los sobrenadantes bacterianos de las cepas de cada temporada.

## **7.6 Ensayo de citotoxicidad**

Para determinar los efectos citotóxicos se utilizó el método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Este método se caracteriza por medir la viabilidad de las células en términos de su capacidad metabólica mitocondrial. El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico en el que se utilizan placas de microtitulación, añadiendo la sal de MTT. El principio se basa en que, la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa reduce el MTT soluble y amarillo, produciendo la formación de cristales insolubles de formazán de color violeta (Vicente *et al.*, 1997).

### **7.6.1 Líneas celulares en estudio**

Para la realización de los bioensayos de citotoxicidad fueron utilizadas dos líneas celulares: fibroblastos gingivales humanos (FsGH) y línea de cáncer cervicouterino (HeLa).

### **7.6.2 Bioensayos de citotoxicidad**

El extracto de epitelio (**EE-PBS**), extracto de epitelio (**EE-MQ**), extracto del mucus (**EM**), sobrenadante bacteriano de temporada fría (**SnTF**), sobrenadante bacteriano de temporada cálida (**SnTC**), productos extracelulares de temporada fría (**EPS TF**), productos extracelulares de temporada cálida (**EPS TC**), extractos de temporada fría (**ETF**) y extracto de temporada cálida (**ETC**), fueron obtenidos de acuerdo a lo descrito en el apartado “Obtención de mucus, epitelio, bacterias, extractos bacterianos y productos extracelulares”.

Se realizaron dos bioensayos de citotoxicidad. El diseño experimental del segundo fue ajustado según los primeros resultados, cambiando las condiciones de obtención y preservación de las muestras, las cuales se detallan más adelante.

### 7.6.3 Condiciones del primer bioensayo de citotoxicidad

En la **Tabla 2** se presentan las cantidades y concentraciones de las muestras que fueron utilizadas para el bioensayo de toxicidad 1.

*Tabla 2.* Muestras asociadas a la espina de *H. dipterurus* utilizadas para el estudio de actividad citotóxica.

| Muestra | Concentración final de las muestras en la placa de 96 pozos |
|---------|-------------------------------------------------------------|
| EE-PBS  | 0.023 µg/µL                                                 |
| EM      | 0.04 mg/mL                                                  |
| SnTF    | D.O. 0.78                                                   |
| SnTC    | D.O 1.22                                                    |
| ETF     | 15 mg/mL                                                    |
| ETC     | 25 mg/mL                                                    |

**EE-PBS:** Extracto de epitelio en PBS, **EM:** Extracto de mucus, **SnTF:** Sobrenadante bacteriano de temporada fría, **SnTC:** Sobrenadante bacteriano de temporada cálida, **ETF:** Extracto de temporada fría, **ETC:** Extracto de temporada cálida.

### 7.6.4 Cultivo celular

La línea HeLa y los FsGH fueron cultivados en medio basal Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% (SFB) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 0.25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a 37°C en un ambiente humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub> (Hernández *et al.*, 2017).

### 7.6.5 Bioensayo de citotoxicidad 1

Las células fueron sembradas en placas de microtitulación de 96 pozos con una confluencia celular de  $\sim 2.5 \times 10^5$  células por pozo, las cuales estaban contenidas en 100 µL de DMEM. Las células fueron incubadas durante un día en las microplacas



bajo las condiciones mencionadas previamente en el punto **7.6.4**, con la finalidad de lograr una adherencia de éstas a las placas y formar una monocapa en el fondo del pocillo.

Transcurridas las 24 h de incubación, fueron añadidos 100  $\mu$ L de las muestras en estudio en las concentraciones mencionadas y 100  $\mu$ L de los controles y testigos, a cada una de las dos líneas celulares utilizadas, los bioensayos fueron realizados por triplicado para todos los tratamientos.

Como control positivo a la toxicidad, para la línea HeLa se usó NaClO y en la línea FsGH fue utilizado el detergente CTAB. Las líneas celulares en su medio de crecimiento fueron utilizadas como control negativo. Los testigos para estos estudios fueron caldo marino y PBS 1 mM a un pH de 7.4.

Una vez que las células fueron expuestas a las muestras, continuaron nuevamente en incubación por 24 h más. Enseguida fueron agregados 10  $\mu$ L de MTT a cada pozo. Se incubaron dos horas al 5% de CO<sub>2</sub>, las placas fueron observadas al microscopio para verificar la ausencia de contaminación y finalmente el medio fue retirado. Los cristales de formazán obtenidos fueron disueltos agregando 100  $\mu$ L de DMSO a cada uno de los pocillos. Para finalizar, las microplacas fueron leídas a 570 nm. Los datos fueron analizados para determinar el número de células viables y el grado de toxicidad de acuerdo con la norma ISO 10993-5, la cual establece que cuando la viabilidad permanece por arriba del 80% la sustancia en estudio no se considera tóxica, de 80% a 60% se considera una citotoxicidad débil, de 60% a 40% es una citotoxicidad moderada y menos del 40% indica que la sustancia en estudio es muy tóxica.

#### **7.6.6 Cultivo celular y ensayo de citotoxicidad fluorimétrica**

Para el ensayo fluorimétrico se utilizaron dos marcadores de fluorescencia. El primero de ellos fue el colorante Syto 9 Green. Las tinciones realizadas con este colorante son permanentes y emiten un gran aumento de la fluorescencia tras la

unión de ácidos nucleicos con Syto 9. Por tanto, este fluorocromo se puede utilizar para teñir ARN y ADN en células eucarióticas tanto vivas como muertas, así como en bacterias Gram Positivas y Gram Negativas. Otro de los usos de este colorante es para denotar viabilidad y citotoxicidad celular. El segundo marcador fluorescente utilizado fue el fluorocromo DAPI (4', 6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro) el cual es específico para teñir el ADN, y por tanto permitir la visualización de núcleos celulares (Hernández *et al.*, 2017).

Este ensayo fue realizado sólo con la línea celular HeLa. Las células fueron sembradas en cámaras de cultivo celular (4 x 2 pocillos separables, estéril, exento de pirógenos/endotoxinas, no citotóxicas, de tapa adherente, con una superficie de 1.9 cm<sup>2</sup> por pozo y capacidad volumétrica de 1 mL, con marco despegable), con una confluencia celular de  $\sim 5.0 \times 10^5$  células por pozo, las cuales estaban contenidas en 200  $\mu$ L de solución (Medio DMEM, DMEMF12 más las células). Las células fueron incubadas durante 24 h bajo las condiciones físicas antes mencionadas con la finalidad de lograr una adherencia de éstas a las placas y formar una monocapa en el fondo del pocillo.

Transcurridas las 24 h de incubación fueron añadidos 200  $\mu$ L de las muestras en estudio en las concentraciones antes mencionadas y 200  $\mu$ L del control y testigos. Las líneas celulares en su medio de crecimiento fueron utilizadas como control negativo. Los testigos para estos estudios fueron PBS 1mM a un pH de 7.4, caldo marino y agua de mar.

Una vez que las células fueron expuestas a los extractos y a los sobrenadantes, continuaron en incubación por 24 h. Finalmente, el medio fue retirado y las células fueron lavadas tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Posteriormente fueron añadidos 200  $\mu$ L de formalina al 10% a cada pocillo con la finalidad de fijar las muestras dejando transcurrir 10 min, para después retirar el medio y realizar un segundo lavado con PBS. El PBS fue retirado y en cada pocillo fueron agregados 200  $\mu$ L del colorante Syto 9 Green Fluorescent, el cual

previamente se disolvió en DMSO teniendo una solución final con una concentración 5  $\mu$ M. Los cultivos de las líneas celulares más el marcador fueron incubados durante 30 min en oscuridad, posteriormente el colorante fue retirado y fueron agregados 200  $\mu$ L del colorante DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) incubándose en oscuridad por 5 min más. Finalmente, el DAPI fue desechado y fue añadida solución de montaje. Las placas fueron observadas bajo un microscopio de fluorescencia a 495 nm para el Syto 9 y 461 nm para DAPI. Las observaciones realizadas en el microscopio fueron utilizadas para validar de alguna manera los datos “cuantificables” obtenidos por espectrofotometría.

Las células también fueron observadas utilizando la técnica de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC), la cual está basada en el contraste de fases que permite visualizar estructuras transparentes tomando en consideración los cambios del índice de refracción. Este es un efecto óptico, así que es utilizada para observar especímenes vivos sin tinción, pero también en conjunto con la fluorescencia se hacen visibles las características morfológicas del espécimen.

### 7.6.7 Condiciones del segundo bioensayo de citotoxicidad

En la **Tabla 3** se presentan las cantidades y concentraciones de las muestras que fueron utilizadas para el bioensayo de toxicidad 2.

*Tabla 3.* Muestras asociadas a la espina de *H. dipterurus* utilizadas para el estudio de actividad de citotóxica.

| <b>Muestra</b> | <b>Concentración final de las muestras en la placa de 96 pozos</b> |
|----------------|--------------------------------------------------------------------|
| EE-MQ          | 0.024 µg/µl                                                        |
| EPS TF         | 0.04 mg/mL                                                         |
| EPS TC         | 0.04 mg/mL                                                         |
| ETF            | 1.5 mg/mL                                                          |
| ETC            | 1.5 mg/mL                                                          |

**EE- MQ:** Extracto de epitelio en agua tetradestilada, **EPS TF:** Productos extracelulares de temporada fría, **EPS TC:** Productos extracelulares de temporada cálida, **ETF:** Extracto de temporada fría, **ETC:** Extracto de temporada cálida.

### 7.6.8 Bioensayo de citotoxicidad 2

En este caso sólo se utilizó la línea celular HeLa, el ensayo fue realizado por triplicado, y fue llevado a cabo como se explica en el apartado previo del bioensayo de citotoxicidad 1 (7.6.5).

Como control positivo a toxicidad, para la línea HeLa se usó el detergente CTAB. Las líneas celulares en su medio de crecimiento fueron utilizadas como control negativo. Los testigos para estos estudios fueron agua tetradestilada con glicerol al 10%, acetato de etilo concentrado y la solución en la cual se obtuvieron los EPS.

## 7.7 Perfil bioquímico de los extractos de epitelio de espina de la raya *H. dipterurus*.

### 7.7.1 Actividad de tripsina

Se realizó un perfil bioquímico basándonos en la actividad proteolítica de los extractos **EE-PBS** y **EE-MQ**, utilizando BAPNA (N-benzoil-arginina-p-nitroanilida) como sustrato. Este es un inmunoensayo basado en anticuerpos que proporciona datos que indican la cantidad de proteína de tripsina presente en una muestra. La prueba BAPNA detecta la tasa de actividad enzimática en la muestra, es decir, la escisión enzimática de la molécula BAPNA. En otras palabras, la prueba BAPNA indica cuánta actividad enzimática está presente.

Para ello, se colocó por triplicado en una microplaca de 96 pozos cada uno de los extractos en estudio (**EE-PBS** y **EE-MQ**) utilizando como blanco agua destilada. Se colocaron 10 µL de la muestra o blanco más 250 µL de solución BAPNA por pozo. Lo anterior se leyó a una  $\lambda=415$  nm en una cinética de 10 minutos.

Las unidades de actividad de tripsina se calcularon bajo la siguiente formula:

$$UA/mg = \frac{(Absorbancia\ 415\ nm/min)(1000)(Volumen\ de\ Rx)}{(8800)(Cantidad\ de\ proteína\ en\ mg)}$$

### 7.7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y tinciones.

Se realizó un análisis del perfil bioquímico de las soluciones **EE-PBS** y **EE-MQ** utilizando las técnicas de electroforesis en gel SDS-PAGE y tinciones específicas para estos geles, las tinciones realizadas fueron Azul brillante de Comassie (Comassie brilliant blue CBB), tinción con plata, tinción Schiff y Stains all. Los geles se realizaron bajo las siguientes condiciones de concentración: Se realizaron cuatro geles SDS-PAGE discontinuos a una concentración de 12% para gel separador y 4% para gel concentrador bajo las proporciones mencionadas en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Concentración de geles discontinuos SDS-PAGE

| Reactivo                   | 12%    | 4%     |
|----------------------------|--------|--------|
| Acrilamida                 | 4.0 mL | 1.3 mL |
| Regulador 8.8              | 2.5 mL | -      |
| Regulador 6.8              | -      | 2.5 mL |
| SDS 10%                    | 100 µL | 100 µL |
| H <sub>2</sub> O destilada | 3.5 mL | 6.1 mL |
| PSA 10%                    | 50 µL  | 50 µL  |
| TEMED                      | 5 µL   | 5 µL   |
| Total del monómero         | 10 mL  | 10 mL  |

Las muestras en estudio se prepararon bajo las siguientes condiciones: 60 µL de la muestra respectiva (**EE-MQ**, **EE-PBS** u Ovoalbúmina) y 20 µL de LB. Posteriormente se calentaron a 100°C durante diez minutos y se centrifugaron 1 min a 10000 RPM para después colocar 15 µL de cada una de las muestras por carril en los geles de poliacrilamida, utilizando ovoalbúmina como control, se corrieron las muestras a una potencia de 90 V.

#### 7.7.2.1 Gel con tinción azul brillante de Comassie (CBB)

Se retiró el gel de la cámara de electroforesis y fue colocado en un recipiente hermético de vidrio, se añadieron 50 mL de la solución de tinción (0.25 g Azul Brillante Comassie R-250, 450 mL metanol, 100 mL ácido acético glacial), se incubó 12 h en agitación continua, después el gel fue desteñido, se incubó en 50 mL de solución desteñidora (200 mL de metanol, 150 mL de ácido acético y 650 mL de agua BD) durante una hora y se repitió el procedimiento dos o tres veces más hasta que se observaron las bandas teñidas de azul y el fondo casi transparente.

#### 7.7.2.2 Gel con tinción plata

El gel se fijó añadiéndole una solución al 10% de etanol absoluto y 0.5% de ácido acético, durante 5 min, posteriormente el gel fue lavado 3 veces por 5 min con agua

destilada, después el gel se impregno durante 6 a 7 min en una solución de 1.5 g de  $\text{AgNO}_3$ / L más 1.5 mL de  $\text{HCOH}$  al 37%, finalmente la reacción se detuvo agregando al gel una solución de etanol absoluto al 10% más ácido acético al 0.5% dejando reposar por dos minutos.

#### **7.7.2.3 Gel con tinción Schiff**

El gel se embebió en la solución TCA 5%, por 5 min. Después se sumergió en solución de ácido peryodico al 0.8% y acetato de sodio al 0.3% durante 5 min. Posteriormente se lavó dos veces con agua destilada, se le agrego el reactivo Schiff y se incubo en oscuridad durante 10 min, el gel se embebió en la solución de ácido nítrico al 3% por 3 min (este último paso se repitió dos veces más) y finalmente se le agrego al gel la solución de  $\text{HCl}$  al 0.01N, dejándola actuar por menos de 1 minuto.

#### **7.7.2.4 Gel con tinción Stains all**

El gel se lavó con isopropanol al 25% por 60 min, después se eliminó el isopropanol y se agregaron 20 mL de solución stains all, se incubo en oscuridad con agitación constante durante toda la noche. Posteriormente el gel se lavó con 20 mL de isopropanol al 25% por 20 min en oscuridad y finalmente se lavó con agua destilada.

### **7.8 Caracterización bacteriana**

#### **7.8.1 Caracterización bacteriana**

Las cepas aisladas del mucus de la espina fueron observadas en un microscopio (Zeiss, modelo Stemi SV 11) con la finalidad de diferenciar la morfología y el color de la colonia. Posteriormente cada una de las cepas obtenidas (las de temporada fría y cálida) fueron teñidas con tinción Gram.

#### **7.8.2 Identificación molecular**

Para la identificación molecular después de incubar 24 h los cultivos, se extrajo el ADN de cada una de las colonias mediante dos métodos: Extracción de ADN por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989) y extracción con fenol-cloroformo (Sambrook

& Russell, 2001). El método de extracción de ADN por choque térmico se basa en la ruptura mecánica de las membranas por choque térmico. Obteniéndose ADN genómico unido al material celular y a proteínas desnaturalizadas, esto conlleva a que en ocasiones no se encuentre totalmente expuesto para ser detectado en electroforesis en gel o amplificado mediante la técnica de PCR. Teniendo la ventaja de lapsos muy cortos para extracción de material genético. Por otro lado en el método de extracción por fenol-cloroformo el ADN extraído se encuentra purificado y separado del resto del material celular, libre de inhibidores y de las histonas que son degradadas por la proteinasa K, teniendo un ADN de alta pureza. Presentando la desventaja de tiempos largos para la obtención de ADN. Debido a la variación de las cepas aisladas y la complejidad para obtener el ADN de cada una de ellas fue que se decidió utilizar dos métodos de extracción diferentes.

#### **7.8.2.1 Método 1: Extracción por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989)**

Con una punta estéril fue tomada una pequeña cantidad de biomasa de las colonias de interés. La biomasa se resuspendió, en 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  tetradestilada estéril. La suspensión bacteriana fue calentada en un termociclador (ESCO 6.5) a  $95^\circ\text{C}$  durante 5 minutos. La suspensión bacteriana fue centrifugada durante min a 1000 rpm en una centrifuga (PRISM R), este se utilizó como templado para la realización de la amplificación de ADN.

#### **7.8.2.2 Método 2. Fenol-Cloroformo (Sambrook & Russell, 2001)**

Fueron tomados 1.5 mL del cultivo de la cepa en estudio y centrifugados a 14000 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue desechado. La biomasa remanente fue resuspendida en 575  $\mu\text{L}$  de TE, posteriormente fueron agregados 30  $\mu\text{L}$  de SDS al 10% y 3  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K (20 mg/mL) para dar una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$ . La mezcla anterior fue homogenizada e incubada 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Se agregó 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M y se mezcló, posteriormente se agregó 80  $\mu\text{L}$  de CTAB y se mezcló. Esto se incubó 10 min a  $65^\circ\text{C}$ , para después incubarlo en hielo 5 min, seguidamente se incubó 10 min a  $80^\circ\text{C}$  para realizar una incubación final en hielo por 5 min. Se agregó de 700  $\mu\text{L}$  a 800  $\mu\text{L}$  de fenol:  $\text{CHCl}_3$ :IsoOH, se mezcló y centrifugó a 14000



rpm por 10 minutos. Se removió la interfase y se pasó a un tubo nuevo y estéril, posteriormente se agregaron 800  $\mu$ L de  $\text{CHCl}_3$ :IsoOH y se mezcló. Se centrifugó 5 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, el paso siguiente consistió en agregar 500  $\mu$ L de isopropanol y se mezcló cuidadosamente hasta precipitar el ADN. Se dejó reposar a  $-20^\circ\text{C}$  toda la noche. Fue centrifugado a 14000 rpm a  $4^\circ\text{C}$  por 20 min y se decantó y agregó 500  $\mu$ L de etanol frío al 70%. Se centrifugó a 14000 rpm a  $4^\circ\text{C}$  por 10 min y se decantó el sobrenadante repitiéndose este paso. Se dejó secar el botón de ADN y se resuspendió en 50  $\mu$ L de TE, después se agregó 1  $\mu$ L de RNAsa (10 mg/mL) y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 2 h. Finalmente se incubaron los tubos tapados a  $65^\circ\text{C}$  por 10 min y esto se utilizó como templado para realizar la amplificación de ADN.

### **7.8.3 Amplificación por PCR y secuenciación**

La amplificación de las muestras de ADN se llevó a cabo mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), con los siguientes componentes para una reacción de 50  $\mu$ L: oligonucleótidos específicos para bacterias: 27F/1385R (Sentido: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTA-3'; Anti-sentido: 5'-CGGTGTGTTCAAGGCC-3'), en concentración de 1  $\mu$ L, 5  $\mu$ L de regulador Taq, 2  $\mu$ L de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), 4  $\mu$ L de  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu$ L de templado, 0.25  $\mu$ L de Taq polimerasa y 35.75  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril libre de nucleasas.

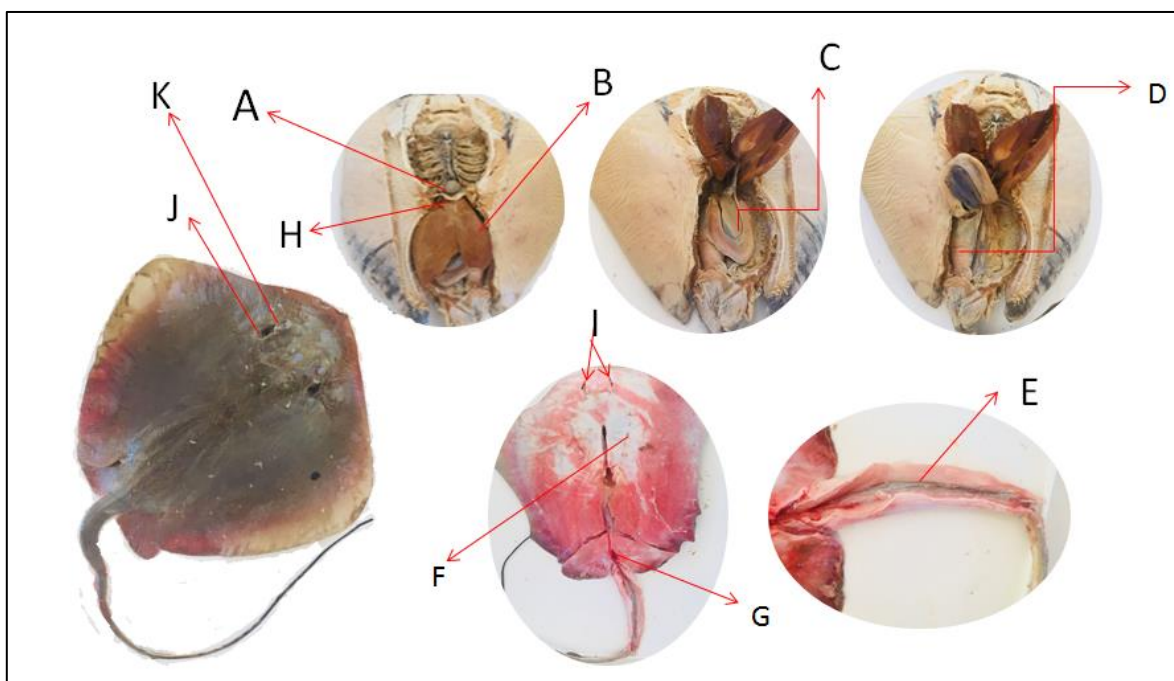
La reacción se llevó a cabo en un termociclador con la siguiente programación para los oligonucleótidos 27F/1385R: una desnaturalización inicial a  $95^\circ\text{C}$  por 3 min, 29 ciclos de desnaturalización a  $95^\circ\text{C}$  por 30 s, el alineamiento de oligonucleótidos a  $58^\circ\text{C}$  por 30 s, la extensión y síntesis a  $72^\circ\text{C}$  por 1:23 min, y finalmente una última extensión a  $72^\circ\text{C}$  por 10 min.

La amplificación positiva de ADN por la técnica de PCR, fue evaluada en un gel de agarosa al 1% con regulador TBE 1X. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara con una fuente de poder a 100 V.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Disección anatómica de *H. dipterurus*

Se realizó una disección convencional anatómica de un espécimen de *H. dipterurus* con la finalidad de encontrar una glándula especializada secretora de toxinas. Sin embargo, después de una revisión cuidadosa se verificó que no hay la existencia de dicha glándula. En la **Figura 3** se muestran los órganos y parte de la anatomía de *H. dipterurus*.



**Figura 3.** Disección anatómica de *H. dipterurus*. A- Corazón; B- Hígado; C- Estómago; D- Gónadas; E- Cartílago del látigo; F- Hendiduras branquiales; G- Cloaca; H- Cintura escapular; I- Narinas; J- Espiráculo; K- Ojos.

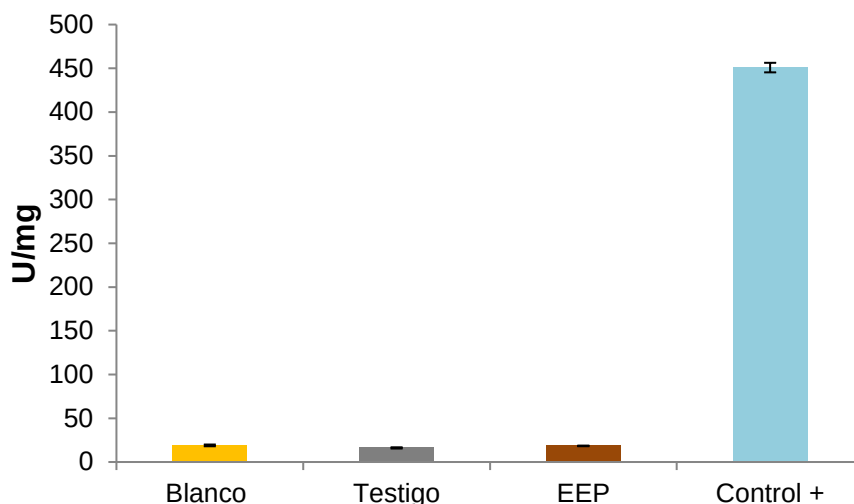
### 8.2 Actividad hemolítica

Bajo las condiciones de este experimento, ninguna de las muestras presentó actividad hemolítica frente a glóbulos rojos de sangre de carnero, en ninguna de las réplicas.

### 8.3 Actividad enzimática

#### 8.3.1 Proteólisis de caseína

En la **Figura 4** se muestran los resultados de la actividad proteolítica expresada en unidades de actividad enzimática (U/mg) del extracto del epitelio (**EE-PBS**). No hay diferencias con respecto al testigo, blanco y muestra. Lo anterior indica que no hay proteólisis de la caseína en esta concentración por parte del epitelio.



**Figura 4.** Determinación de la actividad proteolítica del epitelio de la espina expresada en U/mg. **Blanco:** Caseína + Tris; **Testigo:** Caseína + PBS; **EEP:** Caseína + Extracto de epitelio PBS; **Control +:** Caseína + Tripsina.

#### 8.3.2 Proteólisis de caseína (agar leche)

Bajo las condiciones de este experimento, no se registró hidrólisis de la caseína contenida en el agar leche en ninguna de las réplicas.

#### 8.3.3 Proteólisis de la gelatina

##### 8.3.3.1 Licuefacción de la gelatina

En la **Tabla 5**, se muestran los resultados de la licuefacción de la gelatina (proteólisis total) por efecto del extracto del epitelio (**EE-PBS**), los sobrenadantes bacterianos de ambas temporadas (**SnTC** y **SnTF**) y el co-cultivo bacteriano de

temporada fría (**CTF**). El co-cultivo bacteriano de temporada cálida (**CTC**) produjo licuefacción total de la gelatina en dos de las tres réplicas realizadas. En el caso del mucus (**EM**), éste no presentó actividad proteolítica contra esta proteína.

*Tabla 5.* Licuefacción de la gelatina por parte de los componentes asociados a la espina de *H. dipterurus*.

| Muestra             | Licuefacción |        |        |
|---------------------|--------------|--------|--------|
|                     | Tubo 1       | Tubo 2 | Tubo 3 |
| EM                  | -            | -      | -      |
| EE-PBS              | +            | +      | +      |
| SnTC                | +            | +      | +      |
| SnTF                | +            | +      | +      |
| CTC                 | +            | +      | +/-    |
| CTF                 | +            | +      | +      |
| Testigo PBS         | -            | -      | -      |
| Testigo CM          | -            | -      | -      |
| Control - Grenetina | -            | -      | -      |
| Control+            |              |        |        |
| Proteinasa K        | +            | +      | +      |

(**Testigo CM**); testigo caldo marino; (+) licuefacción total de gelatina; (-) sin evidencia de licuefacción; (+/-) licuefacción parcial de gelatina.

### 8.3.3.2 Licuefacción de la gelatina: cepas de temporada fría y cálida

En la **Tabla 6**, se muestran las cepas de temporada cálida y temporada fría (cultivo con células) que mostraron tener licuefacción de la gelatina y la densidad óptica final de su cultivo. Los resultados muestran que los co-cultivos de ambas temporadas y la mayoría de las cepas de temporada cálida pueden hidrolizar la gelatina, mientras que de la temporada fría, sólo una cepa presenta esta actividad, lo que sugiere un posible efecto de sinergia por parte de las bacterias de temporada fría para licuar la gelatina.

**Tabla 6.** Actividad proteolítica de cepas aisladas durante la temporada fría, temporada cálida, co-cultivo de temporada fría (CTF) y co-cultivo de temporada cálida (CTC) contra gelatina.

| <b>Licuefacción de la gelatina</b> |                           |                                       |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| <b>Cepas temporada cálida</b>      | <b>Cultivo bacteriano</b> | <b>Densidad óptica final a 585 nm</b> |
| <i>Vibrio alginolyticus</i>        | Positiva                  | 0.8304                                |
| <i>Vibrio</i> sp.                  | Positiva                  | 0.7563                                |
| <i>Salinivibrio costicola</i>      | Positiva                  | 0.7085                                |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i>     | Positiva                  | 0.7695                                |
| <i>Vibrio</i> sp.                  | Positiva                  | 0.8474                                |
| <i>Vibrio harveyi</i>              | Positiva                  | 0.91                                  |
| <i>Octadecabacter</i> sp.          | Positiva                  | 0.8801                                |
| No identificada                    | Positiva                  | 0.9274                                |
| <i>Vibrio alginolyticus</i>        | Positiva                  | 0.879                                 |
| No identificada                    | Positiva                  | 0.8452                                |
| <i>Vibrio</i> sp.                  | Positiva                  | 0.8765                                |
| <i>Vibrio natriegens</i>           | Positiva                  | 0.8697                                |
| <i>Vibrio</i> sp.                  | Positiva                  | 0.9042                                |
| No identificada                    | Negativa                  | 0.0762                                |
| No identificada                    | Positiva                  | 0.8832                                |
| No identificada                    | Parcialmente positiva     | 0.3173                                |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i>     | Positiva                  | 0.9224                                |
| CTC                                | Positiva                  | 1.0704                                |
| <b>Cepas temporada Fría</b>        | <b>Cultivo bacteriano</b> | <b>Densidad óptica final a 585 nm</b> |
| 4                                  | Positiva                  | 0.7614                                |
| CTF                                | Positiva                  | 0.9819                                |

En la **Tabla 7** se muestran los resultados de la capacidad proteolítica de los metabolitos secundarios liberados en los sobrenadantes libres de células de cada una de las cepas de temporada cálida y fría. Así como los resultados de la actividad observada en el sobrenadante del co-cultivo de temporada cálida y la actividad del sobrenadante del co-cultivo de temporada fría.

*Tabla 7.* Actividad proteolítica contra gelatina por parte de sobrenadantes bacterianos de temporada fría, cálida y del sobrenadante del co-cultivo de temporada fría (CTF) y co-cultivo de temporada cálida (CTC).

| <b>Licuefacción de la gelatina</b> |                                |
|------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Cepas temporada cálida</b>      | <b>Sobrenadante bacteriano</b> |
| <i>Vibrio alginolyticus</i>        | Positiva                       |
| <i>Vibrio</i> sp.                  | Positiva                       |
| <i>Salinivibrio costicola</i>      | Parcialmente positiva          |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i>     | Positiva                       |
| <i>Vibrio</i> sp.                  | Negativa                       |
| <i>Vibrio harveyi</i>              | Positiva                       |
| <i>Octadecabacter</i> sp.          | Positiva                       |
| No identificada                    | Positiva                       |
| <i>Vibrio alginolyticus</i>        | Positiva                       |
| No identificada                    | Negativa                       |
| <i>Vibrio</i> sp.                  | Positiva                       |
| <i>Vibrio natriegens</i>           | Positiva                       |
| <i>Vibrio</i> sp.                  | Positiva                       |
| No identificada                    | Positiva                       |
| No identificada                    | Positiva                       |
| No identificada                    | Parcialmente positiva          |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i>     | Positiva                       |
| CTC                                | Positiva                       |
| <b>Cepas temporada Fría</b>        | <b>Sobrenadante bacteriano</b> |
| Cepa 4                             | Negativa                       |
| CTF                                | Parcialmente positiva          |

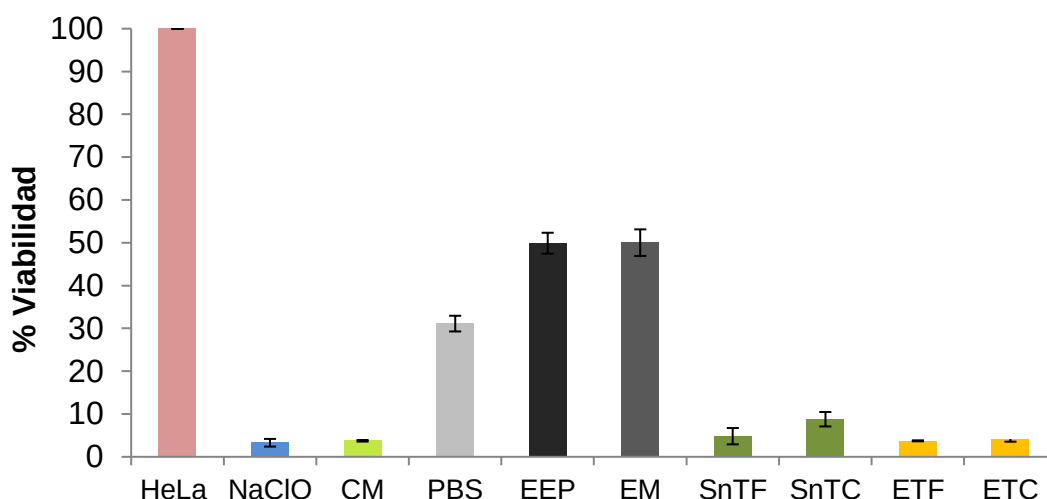
Durante la temporada cálida fue observado que un mayor número de bacterias liberaron metabolitos con actividad proteolítica, mientras que para la temporada fría el sobrenadante libre de células de la cepa 5 que anteriormente había hidrolizado la gelatina, ahora no mostró actividad. Así mismo, el sobrenadante del co-cultivo de temporada fría solo mostró una actividad parcial.

## **8.4 Ensayo de citotoxicidad**

### **8.4.1 Bioensayo de citotoxicidad 1**

#### **8.4.1.1 Línea HeLa (Henrietta Lack: células cancerosas de cérvix) expuesta a los componentes asociados a la espina de *H. dipterurus***

La línea HeLa fue susceptible a los componentes asociados a la espina. De acuerdo con los puntos de referencia citados en la norma ISO 10993-5, para esta línea, los extractos de epitelio y del mucus mostraron una toxicidad moderada. El extracto de mucus y epitelio fueron disueltos en PBS, el cual resultó ser tóxico para esta línea celular, aún con este grado de toxicidad. Las células expuestas a la solución epitelio-PBS, muestran un porcentaje de viabilidad más alto que las que sólo están en PBS (Control). En el caso de los sobrenadantes bacterianos, se utilizó como control el caldo marino y se observó que éste causa una disminución en la viabilidad de las células, resultando ser tóxico. Por lo anterior, es dudoso aseverar si la toxicidad de los sobrenadantes bacterianos es debida a la solución en la que están disueltos o por su naturaleza misma, motivo por el cual la citotoxicidad bacteriana se estudió a través de la obtención de sus productos extracelulares (EPS) en un segundo bioensayo. Los extractos bacterianos de ambas temporadas resultaron ser altamente tóxicos para células HeLa a la concentración probada (**Fig. 5**).

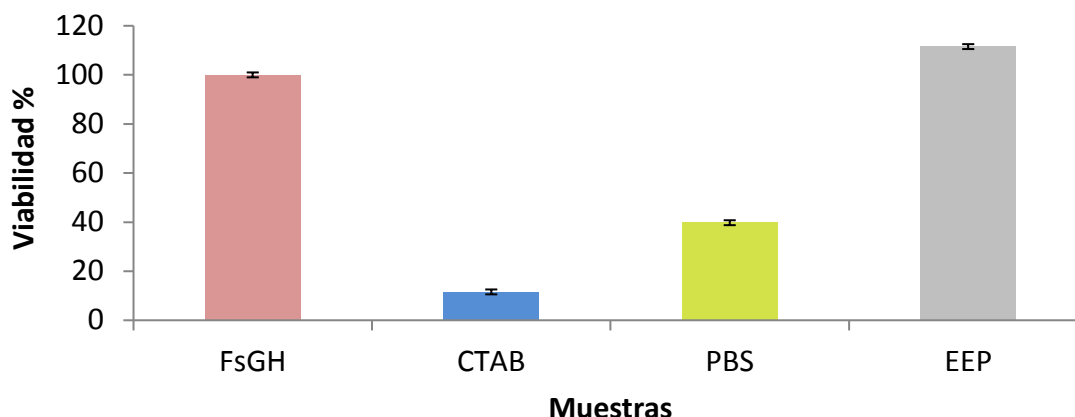


**Figura 5.** Actividad citotóxica de los componentes asociados a la espina de la aleta caudal de *Hypanus dipterurus* ante la línea celular HeLa. **HeLa:** Control negativo para toxicidad, Células de cáncer de cervix (Línea HeLa) sólo en medio de cultivo DMEM; **NaClO:** Control positivo para toxicidad; **CM:** caldo marino; **PBS:** testigo; **EEP:** Extracto de epitelio PBS; **EM:** Extracto de mucus; **SnTF:** Sobrenadante de temporada fría; **SnTC:** Sobrenadante de temporada cálida; **ETF:** Extracto temporada fría; **ETC:** Extracto de temporada cálida.

#### 8.4.1.2 Línea FsGH (fibroblastos gingivales humanos) expuesta al epitelio de la espina de *H. dipterurus*

Como se mencionó anteriormente, el extracto de epitelio esta disuelto en PBS, el cual resultó ser tóxico para la línea celular FsGH. Sin embargo, esto no afectó la viabilidad de las células expuestas a la solución epitelio-PBS, caso contrario la viabilidad estuvo por arriba del 100% (**Fig. 6**).

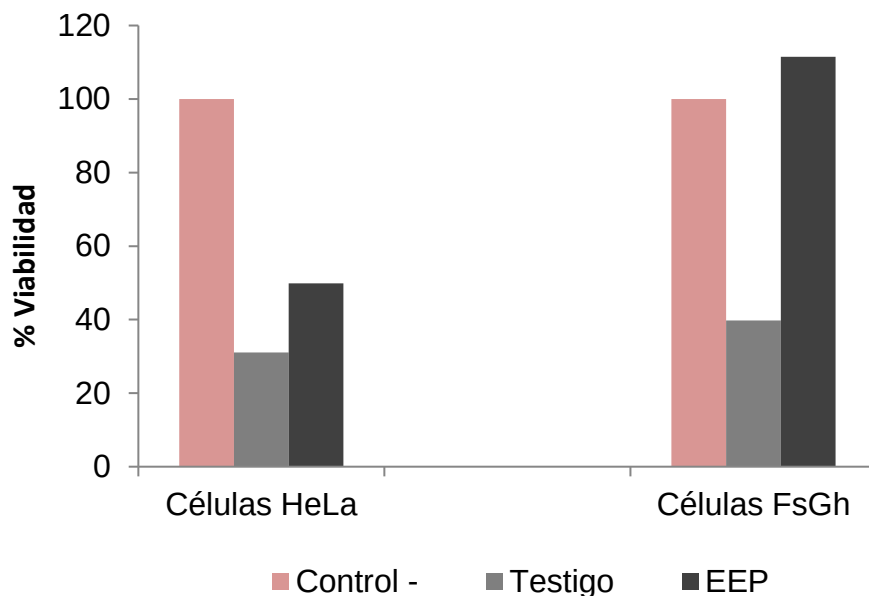




**Figura 6.** Actividad citotóxica de los componentes asociados a la espina de la aleta caudal de *H. dipterurus* ante fibroblastos gingivales humanos (FsGH). **FsGH:** Control negativo para toxicidad, fibroblastos orales humanos sólo en medio de cultivo DMEM; **CTAB:** Control positivo para toxicidad; **PBS:** testigo; **EEP:** Extracto de epitelio PBS.

#### 8.4.1.3 Comparación del efecto del extracto del epitelio sobre las líneas celulares HeLa y FsGH

En la **Figura 7** se observa el efecto del extracto de epitelio de la espina de la raya diamante frente a dos líneas celulares distintas; HeLa (células cancerosas) y FsGH (fibroblastos gingivales humanos). En la Figura se muestra cómo el epitelio resulta ser tóxico para la línea de células cancerosas. Sin embargo, ante células sanas (sin su ciclo celular alterado), parece que el extracto del epitelio no tiene ningún efecto sobre ellas, por el contrario, su viabilidad aumenta. El PBS se muestra tóxico para la línea HeLa y para los FsGH, toxicidad que es amortiguada por la solución epitelio-PBS.



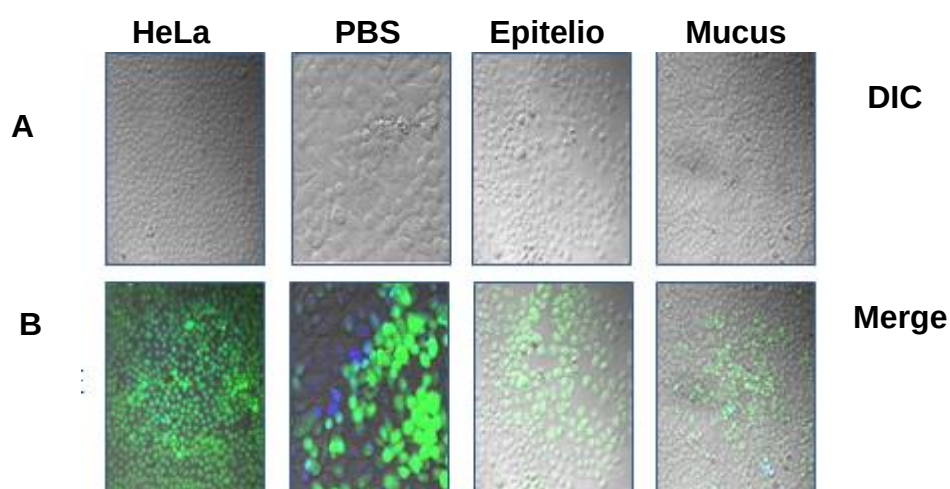
**Figura 7.** Comparación del efecto del sobrenadante del epitelio que recubre la espina de la aleta caudal de la raya diamante *H. dipterurus* sobre dos líneas celulares: HeLa y FsGH. **Control-:** control negativo para toxicidad, células sólo en medio de cultivo DMEM; **Testigo:** PBS; **EEP:** extracto de epitelio PBS.

#### 8.4.2 Cultivo celular y ensayo de citotoxicidad fluorimétrica

##### 8.4.2.1 Microscopia de fluorescencia: células HeLa expuestas al sobrenadante del epitelio y del mucus de la espina de la aleta caudal de *H. dipterurus*

Es importante mencionar que esta técnica no es cuantitativa para determinar viabilidad celular, sino cualitativa y es complementaria a las pruebas espectrofotométricas previamente realizadas. Con base en las pruebas espectrales y a las imágenes derivadas del microscopio, es posible observar una buena confluencia celular en la muestra control de células HeLa, con membranas intactas y células bien teñidas. Se observa también como la confluencia celular permanece en el tratamiento con el testigo, extracto de epitelio y mucus, con menor abundancia que el control negativo a toxicidad. Esto refleja los mismos valores obtenidos a través de la prueba de MTT.

En la **Figura 8A** se observan las células (20  $\mu$ ) utilizando la técnica DIC. En el primer recuadro se pueden observar las células HeLa sin ningún tratamiento, las cuales fueron utilizadas como control negativo a toxicidad. En el segundo recuadro están representadas las células expuestas a PBS el cual fue utilizado como testigo. En el tercer recuadro las células expuestas al extracto del epitelio y finalmente el cuarto recuadro son mostradas las células expuestas al extracto de mucus. En la **Figura 8B** se observa el mismo campo utilizando la aplicación de merge en donde es posible visualizar la fluorescencia verde la cual nos indica confluencia y viabilidad celular.



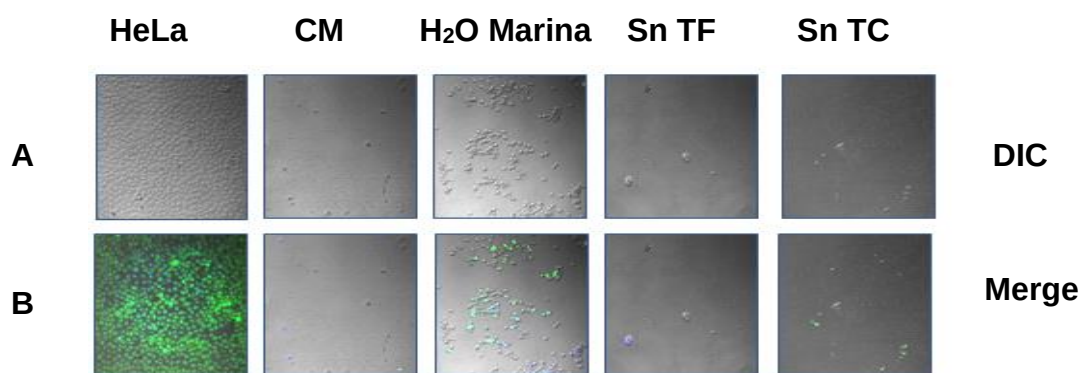
**Figura 8.** Imágenes captadas de las células HeLa expuestas a epitelio y mucus de la espina, utilizando la técnica DIC (A) y merge (B).

#### 8.4.2.2 Microscopía de fluorescencia: Células HeLa expuestas a sobrenadantes bacterianos de temporada fría y cálida

En la **Figura 9A** se observan las células utilizadas con la técnica DIC. En el primer recuadro se observan las células HeLa sin ningún tratamiento, mismas que fueron utilizadas como control negativo de toxicidad. En el siguiente recuadro están presentes las células en caldo marino (CM), seguidas de las células expuesta a agua de mar (H<sub>2</sub>O Mar), ambos tratamientos fueron utilizados como testigos. Se utilizó agua de mar como testigo, ya que el caldo marino se prepara con agua de mar estéril.

En el cuarto recuadro las células expuestas a SnTF y finalmente, en el quinto recuadro se muestran las células expuestas al SnTC. En la **Figura 9B** en el mismo campo, se presentan los mismos tratamientos utilizando la aplicación de merge para visualizar la fluorescencia y por tanto confluencia y viabilidad celular.

Con base en las pruebas espectrales y a las imágenes derivadas del microscopio, es posible observar una buena confluencia celular en el tratamiento control de células HeLa. Se observa también como esta confluencia disminuye con los testigos de caldo marino y agua de mar, y es prácticamente nula en las células expuestas a los sobrenadantes bacterianos. Lo anterior demuestra una relación directa de los valores obtenidos a través de la prueba de MTT en ensayos espectrofotométricos.



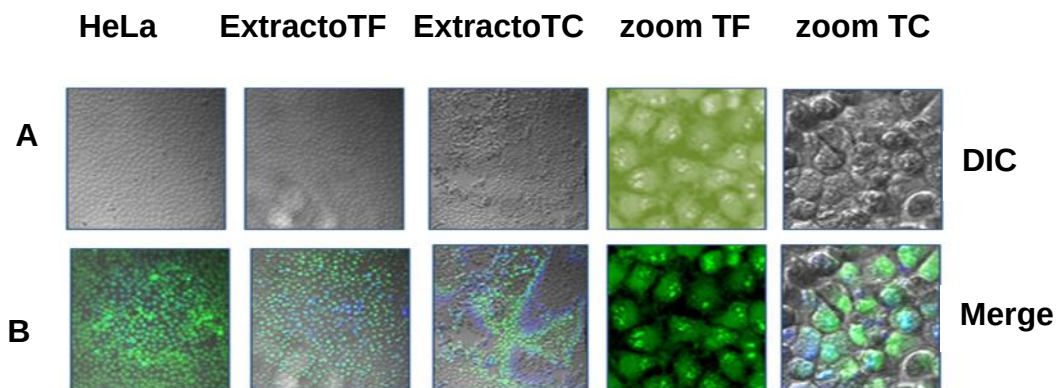
**Figura 9.** Imágenes captadas de las células HeLa expuestas a sobrenadantes bacterianos utilizando la técnica DIC (A) y merge (B).

#### **8.4.2.3 Microscopía de fluorescencia: células HeLa expuestas a extractos bacterianos de temporada fría y cálida.**

En la **Figura 10A** se observan las células utilizando la técnica DIC. En el primer recuadro se pueden observar las células HeLa sin ningún tratamiento, las cuales fueron utilizadas como control negativo de toxicidad. En el segundo recuadro están representadas las células expuestas al extracto bacteriano de temporada fría (ETF), seguidas de células expuestas al extracto bacteriano de temporada cálida (ETC). En el cuarto recuadro se observa un acercamiento de las células expuestas a

extractos de temporada fría (zoom TF) y finalmente un acercamiento de las células expuestas a extractos de temporada cálida (zoom TC). En la **Figura 10B** en el mismo campo se muestran los mismos tratamientos utilizando la aplicación de merge, donde se visualiza la fluorescencia y por tanto la confluencia y viabilidad celular.

En el tratamiento control se observa una buena confluencia celular de células HeLa, con membranas intactas y células bien teñidas. También se logra observar como esta confluencia celular permanece en el tratamiento con los extractos bacterianos de ambas temporadas. Sin embargo, el patrón de tinción resulta inusual en ambas fotografías observándose en la **Figura 11B** de ETF y ETC, campos de coloración totalmente azules por parte del DAPI. Este es un colorante que sólo se adhiere al ADN, por tanto al estar teñida toda la célula se podría pensar en una lisis de membrana nuclear celular tiñiendo así el resto del cuerpo celular. Infiriendo con éste un evidente daño celular. En las imágenes zoom TF y zoom TC, se realizó un acercamiento sólo para observar un artefacto en la tinción, observando que en las células expuestas a los extractos de temporada fría se aprecia un cambio nuclear parecido a la telofase del ciclo celular. Sin embargo, los núcleos son irregulares y atípicos de estas células, por lo que esto supone un daño en el núcleo o al material genético. Poniendo de manifiesto el daño en núcleos de células expuestas a extractos de temporada fría en comparación con el daño en núcleos de células tratadas con extractos de temporada cálida. Correlacionándose este último punto con el dato espectrofotométrico de la prueba de MTT donde se observó una toxicidad más aguda por parte de extractos de temporada fría que los de temporada cálida.

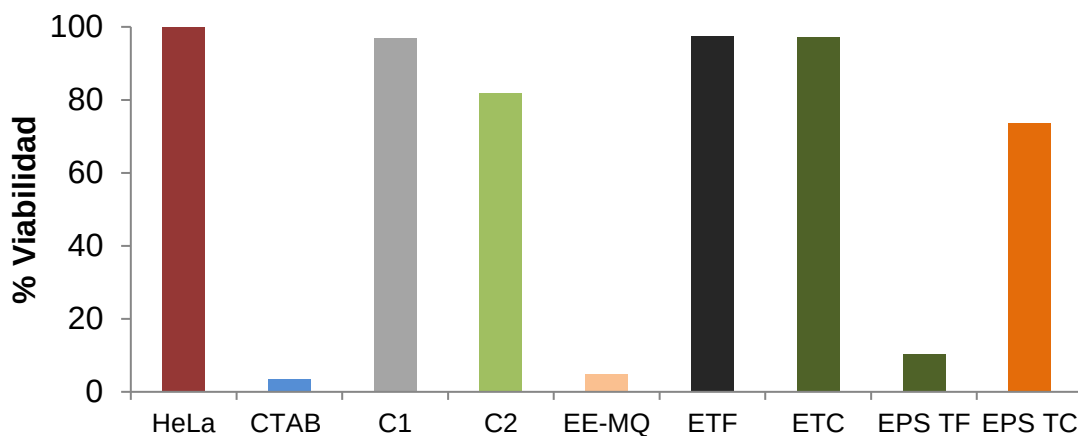


**Figura 10.** Imágenes captadas de las células HeLa expuestas a extractos bacterianos utilizando la técnica DIC (A) y merge (B).

### 8.4.3 Bioensayo de citotoxicidad 2

#### 8.4.3.1 Línea HeLa (células cancerosas de cérvix) expuesta a los componentes asociados a la espina de *H. dipterurus*.

En la **Figura 11** se muestran los resultados del segundo bioensayo para toxicidad. En este ensayo el medio utilizado para disolver el epitelio fue agua tetradestilada con glicerol al 10%. Podemos observar que los controles produjeron los resultados esperados ya que el detergente CTAB se mostró tóxico y los controles C1 y C2 no mostraron toxicidad. El extracto de epitelio mostró una toxicidad evidente para la línea HeLa. Los extractos en sus concentraciones más bajas no mostraron toxicidad. El EPS TF resultó ser altamente tóxico mientras que EPS TC fue levemente tóxico, esto de acuerdo a la norma ISO 10993-5.

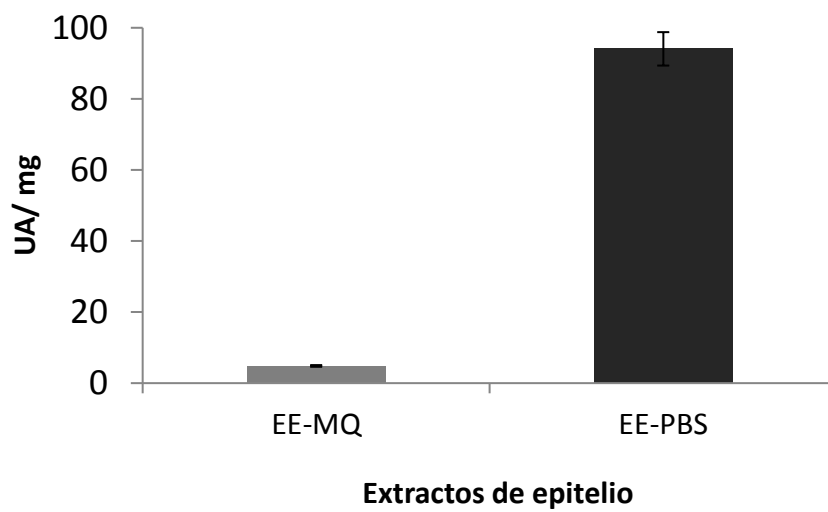


**Figura 11.** Actividad citotóxica asociada a los componentes de la espina frente a la línea celular HeLa. **HeLa:** Control negativo para toxicidad, células de cáncer de cérvix (Línea HeLa) sólo en medio de cultivo DMEM; **CTAB:** control positivo para toxicidad; **C1:** control solución de epitelio (agua tetradestilada con glicerol); **C2:** control de EPS; **EE-MQ:** extracto de epitelio; **ETF:** extracto temporada fría, **ETC:** extracto de temporada cálida; **EPS TF:** extracto de temporada fría; **EPS TC:** extracto de temporada cálida.

## 8.5 Perfil bioquímico de los extractos de epitelio de la espina de la raya *H. dipterurus*.

### 8.5.1 Actividad de tripsina

En la **Figura 12** se observa que ambos extractos (EE-MQ y EE-PBS) poseen actividad de tripsina. Sin embargo, ésta resultó ser 89 veces mayor para el extracto EE-PBS.

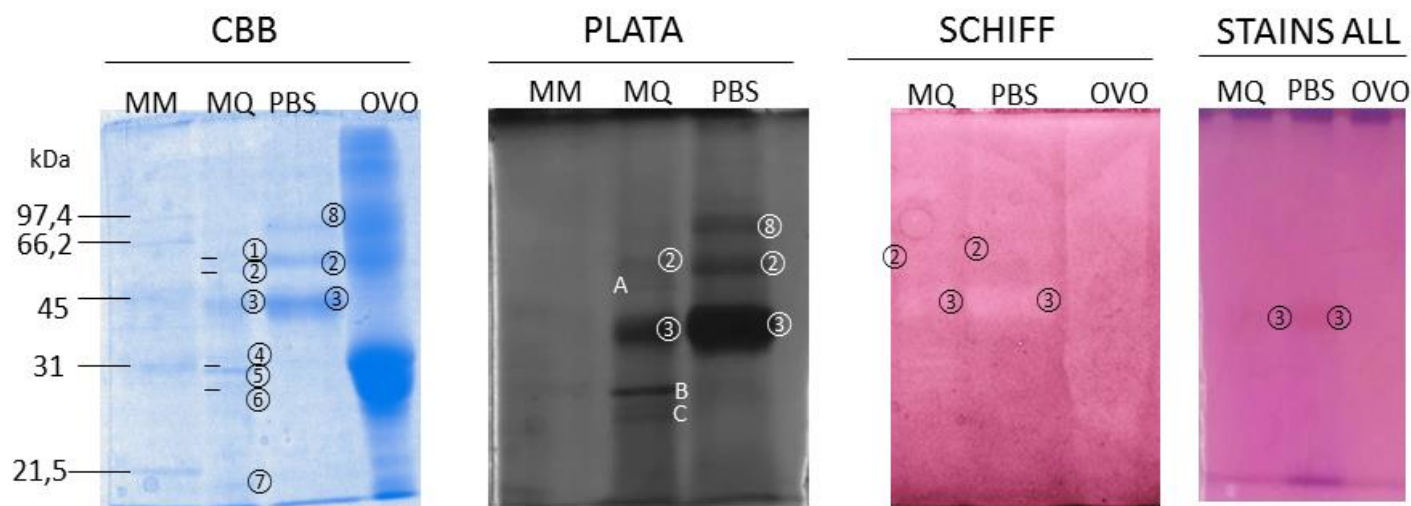


**Figura 12.** Determinación de la actividad de tripsina de los extractos del epitelio de la espina de *H. dipterurus* expresada en unidades de absorción/ mg. **EE-MQ:** Extracto de epitelio en agua tetradestilada; **EE-PBS:** Extracto de epitelio en PBS.

#### 8.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción

Con las técnicas de tinción utilizadas se pudieron apreciar diferentes bandas de productos presentes en los extractos de epitelios (EE-PBS y EE-MQ). En la **Figura 13** se pueden observar estos resultados.





**Figura 13.** Tinción de los geles de poliacrilamida utilizando diferentes técnicas de tinción (Azul brillante de Commasie, Plata, Schiff y Stains all). **MM:** marcador molecular; **MQ:** Extracto de epitelio en agua tetradestilada; **PBS:** Extracto de epitelio en PBS; **OVO:** ovoalbúmina. Los números y letras se refieren a las diferentes bandas encontradas.

En la **Tabla 8** se presentan los resultados de las bandas encontradas en los geles con las diferentes tinciones y sus pesos moleculares. Con la tinción de azul brillante de Comassie (CBB) se lograron identificar un total de siete bandas para la solución EE-MQ y un total de tres bandas proteicas para la solución EE-PBS. Con la tinción de plata se lograron identificar cinco bandas proteicas para la solución EE-MQ y tres bandas para la solución EE-PBS. Para la tinción con Shiff se logró visualizar nuevamente la banda número 2 y número 3 tanto para la solución EE-MQ como para la solución EE-PBS. Y con respecto a la tinción Stains all podemos observar que sólo se visualiza la banda número 3 para ambos extractos de epitelio (EE-PBS y EE-MQ). Las bandas 2 y 3 de pesos moleculares 52.82 y 39.04 KDa se pudieron observar en todos los geles para ambos extractos de epitelio.

*Tabla 8.* Pesos moleculares de las diferentes bandas observadas de los extractos EE-MQ y EE-PBS con ayuda de diferentes técnicas de tinción para geles SDS-PAGE.

| Número de Banda | Peso Molecular (KDa) | CBB                       | Plata   | Shiff   | Stains all |
|-----------------|----------------------|---------------------------|---------|---------|------------|
|                 |                      | Extractos (EE-MQ ,EE-PBS) |         |         |            |
| 1               | 56.97                | MQ                        |         |         |            |
| 2               | 52.82                | MQ; PBS                   | MQ; PBS | MQ; PBS |            |
| 3               | 39.04                | MQ; PBS                   | MQ; PBS | MQ; PBS | MQ; PBS    |
| 4               | 28.85                | MQ                        |         |         |            |
| 5               | 26.749               | MQ                        |         |         |            |
| 6               | 23.88                | MQ                        |         |         |            |
| 7               | 12.55                | MQ                        |         |         |            |
| 8               | 66.28                | PBS                       | PBS     |         |            |
| A               | 42.1                 |                           | MQ      |         |            |
| B               | 22.14                |                           | MQ      |         |            |
| C               | 18.32                |                           | MQ      |         |            |

## 8.6 Caracterización bacteriana

Se obtuvieron un total de 36 cepas de las cuales 19 corresponden a la temporada fría y 17 a la temporada cálida, en las cepas de ambas temporadas predominaron colonias con tinción negativa al Gram. En la **Tabla 9** se muestran las 36 cepas aisladas durante ambas temporadas, su morfología, el resultado del Gram correspondiente y en el caso de las que fue posible, la identificación molecular.

Tabla 9. Cepas bacterianas aisladas de la temporada fría (marzo) y temporada cálida (octubre), provenientes de la espina de la aleta caudal de la raya diamante *H. dipterurus*.

| Cepas temporada fría              | Morfología        | Gram        | Género y especie               |
|-----------------------------------|-------------------|-------------|--------------------------------|
| 1                                 | Coco              | Negativo    | No identificada                |
| 2                                 | Bacilo            | Negativo    | <i>Psychroflexus tropicus</i>  |
| 3                                 | Bacilo            | Negativo    | <i>Psychroflexus tropicus</i>  |
| 4                                 | Bacilo            | Negativo    | No identificada                |
| 5                                 | Bacilo            | Negativo    | <i>Psychroflexus tropicus</i>  |
| 6                                 | Bacilo            | Negativo    | <i>Octadecabacter</i> sp.      |
| 7                                 | Bacilo            | Negativo    | No identificada                |
| 8                                 | Bacilo            | Negativo    | No identificada                |
| 9                                 | Coco              | Negativo    | No identificada                |
| 10                                | Bacilo            | Negativo    | <i>Psychroflexus tropicus</i>  |
| 11                                | Coco              | Negativo    | No identificada                |
| 12                                | Bacilo            | Negativo    | <i>Marinobacter litoralis</i>  |
| 13                                | Coco              | Negativo    | No identificada                |
| 14                                | Coco              | Negativo    | No identificada                |
| 15                                | Coco              | Positivo    | <i>Salinicoccus siamensis</i>  |
| 16                                | Coco              | Negativo    | No identificada                |
| 17                                | Coco              | Negativo    | No identificada                |
| 18                                | Coco              | Negativo    | No identificada                |
| 19                                | Coco              | Negativo    | No identificada                |
| <b>Cepas temporada<br/>cálida</b> | <b>Morfología</b> | <b>Gram</b> | <b>Género y especie</b>        |
| 1                                 | Bacilo            | Negativo    | <i>Vibrio alginolyticus</i>    |
| 2                                 | Bacilo            | Negativo    | <i>Vibrio</i> sp.              |
| 3                                 | Bacilo            | Negativo    | <i>Salinivibrio costicola</i>  |
| 4                                 | Bacilo            | Negativo    | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> |
| 5                                 | Bacilo            | Negativo    | <i>Vibrio</i> sp.              |

|    |        |          |                                |
|----|--------|----------|--------------------------------|
| 6  | Bacilo | Negativo | <i>Vibrio harveyi</i>          |
| 7  | Bacilo | Negativo | <i>Octadecabacter</i> sp.      |
| 8  | Coco   | Negativo | No identificada                |
| 9  | Bacilo | Negativo | <i>Vibrio alginolyticus</i>    |
| 10 | Coco   | Negativo | No identificada                |
| 11 | Bacilo | Negativo | <i>Vibrio</i> sp.              |
| 12 | Bacilo | Negativo | <i>Vibrio natriegens</i>       |
| 13 | Bacilo | Negativo | <i>Vibrio</i> sp.              |
| 14 | Coco   | Negativo | No identificada                |
| 15 | Coco   | Negativo | No identificada                |
| 16 | Coco   | Negativo | No identificada                |
| 17 | Bacilo | Negativo | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> |

## 9 DISCUSIÓN

### Disección anatómica de *H. dipterurus*

La real academia de la lengua define anatómicamente la palabra glándula como un órgano cuya función es producir una secreción que puede verterse a través de la piel o de las mucosas. Por ello, se realizó la búsqueda de una glándula macroscópica productora de compuestos citotóxicos. La disección anatómica de la raya diamante, permitió identificar diferentes órganos vitales del organismo y diferentes estructuras anatómicas previamente conocidas. No obstante, no se identificó la presencia de una glándula macroscópica evidente, encargada de la producción de compuestos citotóxicos (**Fig. 4**). Esto coincide con lo observado por otros autores (Pedroso *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2006), quienes señalan además que la citotoxicidad de las rayas es debida a la producción de sustancias secretadas por el epitelio de la espina de la raya.

### Actividad hemolítica

La literatura señala que casi todos los venenos de peces poseen actividad hemolítica, esta actividad en los venenos también se ha encontrado en muchas otras clases de animales (Ziegman *et al.*, 2015). Para corroborar la presencia o ausencia de actividad hemolítica por parte de los componentes asociados a la espina de la aleta caudal de la raya diamante, se utilizaron placas de agar de soya tripticaseína suplementado con sangre de carnero al 10%. La hemólisis total (llamada  $\beta$ -hemólisis), se reconoce por la presencia de un halo totalmente claro alrededor de la muestra. La estrategia empleada para observar actividad hemolítica utilizando glóbulos rojos de carnero como sustrato, no muestra dicha actividad por parte de los componentes asociados a la espina de *H. dipterurus*. Lo anterior, ya que ni el mucus, el epitelio, el extracto de epitelio, extracto del mucus, el cultivo bacteriano, ni el sobrenadante bacteriano, mostraron halos de hemólisis alrededor de la zona de colocación de las muestras.

Si bien no hay evidencia para asegurar que los componentes de la espina de la raya induzcan a la hemólisis bajo nuestras condiciones experimentales de trabajo, esto no elimina la probabilidad de que presenten actividad hemolítica, ya que sólo se utilizaron glóbulos rojos de una especie. De acuerdo a la literatura, algunos compuestos bioactivos de peces muestran actividad hemolítica sólo contra glóbulos rojos de ciertas especies, mientras en otras no tienen este efecto (Ziegman *et al.*, 2015). Por ejemplo, el veneno del bagre *Arius maculatus* es aproximadamente cuatro veces más potente para la sangre de pollo que para la sangre de ovejas y humanos (Abirami *et al.*, 2014). También se ha demostrado que el veneno de *Trachinus draco* es altamente hemolítico hacia los eritrocitos de conejo y sólo un poco a los de los ratones (Chhatwal y Dreyer, 1992). Un estudio que analizó cuatro especies estrechamente relacionadas de pez león y dos de pez piedra mostró que la actividad hemolítica de cada una era altamente selectiva para los eritrocitos de conejo, y que sólo el veneno de *Synanceia verrucosa* era capaz de producir hemólisis débil en las células de cobaya (Shiomi *et al.*, 1989), al igual que para la especie *Pterois volitans*,

en donde sólo observaron actividad hemolítica contra eritrocitos de conejo y no se observó en células de humano (Ziegman *et al.*, 2015).

### **Actividad enzimática**

La actividad enzimática es común en los venenos de los animales, lo cual no es sorprendente ya que es la vía de la desintegración nociva de estructuras fisiológicas. Las enzimas pueden causar daño por sí mismas, o pueden actuar como factores de propagación para las otras toxinas del veneno. La actividad proteolítica ha sido confirmada en los venenos de muchas especies de peces e incluso se ha sugerido que las enzimas proteolíticas podrían ser parcialmente responsables de la extrema labilidad de los otros componentes del veneno (Ziegman *et al.*, 2015).

### **Actividad proteolítica (Caseína)**

Bajo las condiciones experimentales establecidas en esta investigación, no se observó actividad proteolítica en ninguna de las muestras derivadas de la espina de la aleta caudal de la raya diamante probados sobre la caseína. Lo anterior es contrario a lo que se ha reportado en otros estudios en los cuales prueban la actividad proteolítica del epitelio de rayas de agua dulce como *Potamotrygon falkneri* y rayas marinas como *Dasyatis guttata* (Barbaro *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos también son opuestos a la información de Ziegman y colaboradores (2015), ya que mencionan que rayas de agua dulce como *P. falkneri*, *P. scobina*, *P. orbygnyi* y la raya marina *D. guttata* presentan epitelios recubriendo sus espinas con moléculas capaces de hidrolizar a la caseína. Sin embargo, también se ha encontrado que rayas de agua dulce del mismo género *Potamotrygon* no muestran esta actividad, como es el caso de *P. henlei*.

Las bacterias asociadas a la espina de *H. dipterurus* tampoco mostraron actividad con capacidad de hidrolizar la caseína, bajo las condiciones experimentales estipuladas (uso de agar leche). Sin descartarse que probablemente bajo otras condiciones, estas puedan presentar actividad proteolítica contra la caseína, ya que bacterias aisladas de espinas de rayas de agua dulce sí han mostrado tener

metabolitos secundarios con capacidad de hidrolizar la caseína. Bacterias aisladas del género *Potamotrygon*, como *Aeromona sobria*, *A. hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter freundii* muestran en sus sobrenadantes caseínasa (Domingos *et al.*, 2011), a diferencia de las bacterias identificadas en el género *Potamotrygon*. En *H. dipterurus* la mayor parte de las bacterias identificadas fueron del género *Vibrio* spp. y aunque *Vibrio* no produce caseínasa, si tiene la capacidad de hidrolizar otras proteínas como la gelatina (Gómez *et al.*, 2003). Además, está el hecho que no todas las bacterias aisladas lograron identificarse molecularmente por lo que no se descarta el hecho de que alguna de estas bacterias bajo condiciones de cultivo diferentes a las utilizadas en este experimento produzca caseínasa.

### **Actividad proteolítica (gelatina)**

El colágeno, el más común de los componentes orgánicos de los tejidos conectivos, es el material estructural dominante en el reino animal y componente de la matriz extracelular. Se encuentra en los tejidos de todos los tipos de organismos pluricelulares, incluidos en el humano (Limorte y Albert, 1982). Es, sin duda, la proteína más abundante en los mamíferos, y es conocido desde hace tiempo que cuando los tejidos colagenosos se calientan a temperaturas moderadas en agua o en disoluciones acuosas de ácidos o bases, se disuelven parcialmente. A la porción de proteína solubilizada, se le da el nombre genérico de gelatina (Limorte y Albert, 1982).

Al realizar la prueba de actividad proteolítica utilizando gelatina comercial como sustrato, el extracto de epitelio, los sobrenadantes bacterianos de ambas temporadas y el cultivo bacteriano de temporada fría mostraron que pudieran contener enzimas que digieren la proteína, ya que presentaron actividad proteolítica contra la gelatina. El cultivo bacteriano de temporada cálida sólo hidrolizó la gelatina en dos de las tres réplicas, mostrando una licuefacción parcial en la tercera réplica. Esto demuestra que los componentes asociados a la espina de *H. dipterurus* poseen capacidad hidrolítica contra la gelatina la cual es obtenida de tejidos colagenosos. Al ser el colágeno el principal componente de la gelatina y ser también el principal componente de tejidos

orgánicos y matriz extracelular, es posible inferir que los componentes del aparato espinoso de la raya diamante, podrían contribuir en la degradación de proteínas como el colágeno presente en la matriz extracelular, favoreciendo así el daño al tejido y dando lugar a lesiones celulares locales (Barbaro *et al.*, 2007). Al degradarse la matriz extracelular se da paso a la circulación de diversas citocinas las cuales también son causantes de daño celular.

Se ha reportado que además de toxinas, el veneno de varios peces posee enzimas como la proteasa gelatinolítica (Sp-Gp) que se purificó del veneno del pez escorpión *Scorpaena plumieri* (Carrijo *et al.*, 2005). Al utilizar una zimografía de gelatina en el veneno de *P. volitans*, se detectó la presencia de una enzima proteolítica con un peso molecular de 45 kDa (Balasubashini *et al.*, 2006). La presencia de enzimas proteolíticas también se ha reportado en los venenos del pez sapo *Thalassophryne natterii* y *T. maculosa* (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998; Sosa-Rosales *et al.*, 2005).

Al observar la actividad proteolítica por parte de los co-cultivos de ambas temporadas, se procedió a estudiar por separado la actividad proteolítica de cada una de las cepas de ambas temporadas. La mayoría de las cepas de temporada cálida, mostraron que tienen capacidad para hidrolizar la gelatina, mientras que, en las cepas de temporada fría, sólo se encontró que la cepa número 5 tiene la capacidad de hidrolizar a la gelatina. Lo anterior, lleva a pensar que es un efecto de sinergia de las cepas de temporada fría lo que conlleva a la producción de metabolitos con actividad proteolítica frente a proteínas como la gelatina, los cuales pudieran ser enzimas extracelulares.

Como se mencionó anteriormente, la cepa 5 aislada durante la temporada fría mostró actividad proteolítica, sin embargo, el sobrenadante libre de células de esta cepa no hidrolizo la gelatina, así mismo, el sobrenadante libre de células del co-cultivo de temporada fría sólo mostró una actividad parcial de licuefacción de la gelatina. Cuando las células bacterianas se encontraban presentes en el sobrenadante si se observó licuefacción de la gelatina, probablemente debido a que los metabolitos con



actividad gelatinolítica de estas cepas son intracelulares y requieren la presencia de las células bacterianas para que puedan ser liberados al medio y ejercer su acción proteolítica.

De acuerdo con los resultados de este y otros trabajos con venenos de peces, los resultados sugieren que las proteasas producidas por los componentes asociados a éstos podrían ser una parte importante de la toxicidad ejercida por las secreciones de peces venenosos. Magalhães y colaboradores (2006) han demostrado que cuando se inyecta veneno de una raya *Potamotrygonidae* junto con moco, la mionecrosis se duplica.

La mayor parte de la producción de enzimas está destinada a la obtención de proteasas. Las aplicaciones de estas biomoléculas con fines terapéuticos son muy variadas (Barret, 1999). Algunas se conocen como remedios naturales y otras son fármacos modificadores de la respuesta biológica. En el campo de la salud se le atribuyen varias acciones, entre las que se destaca la capacidad que tienen de inducir la diferenciación de células tumorales y atenuar el crecimiento del tumor (Kelly, 2005).

### **Actividad citotóxica**

#### **Mucus y epitelio**

El regulador de fosfatos salinos (PBS) es una solución amortiguadora de pH. Su osmolaridad y concentración de iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ), es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución es isotónica y teóricamente no causa toxicidad en las células, sin embargo, en los ensayos realizados en el presente estudio resultó ser tóxica para las líneas celulares utilizadas. Esto probablemente se deba al cambio abrupto de osmolaridad que se presenta en el momento de introducir el PBS como control con las células y realizar la incubación con las sales del regulador durante 24 horas. La concentración del PBS utilizado en los diferentes bioensayos fue de 1 mM. Esta concentración convierte al regulador en una solución

hipotónica (valor promedio de 3 mOsm/Kg) respecto a la osmolaridad celular humana la cual se mantiene en un promedio de 285 mOsm/Kg.

Lo anterior se debe a que cuando la osmolaridad extracelular se incrementa, el agua fluye desde el interior hacia el exterior de la célula, con el objetivo de compensar el gradiente osmótico establecido. Ocurriendo lo contrario cuando la osmolaridad extracelular disminuye. Los cambios en el contenido de agua intracelular también generan cambios en el volumen, pero la célula posee mecanismos para compensar estos cambios osmóticos y mantener su volumen dentro de un rango que asegure su adecuado funcionamiento y su supervivencia (Sánchez, 2004).

Estos mecanismos implican la activación del transporte de solutos para inducir transporte de agua en un sentido u otro; sin embargo, durante este proceso se altera la composición intracelular y las concentraciones de diversos iones cambian, lo cual afecta la homeostasis celular, las membranas celulares y por lo tanto la viabilidad celular (Sánchez, 2004). Por lo tanto, la cantidad de sales disueltas en el PBS pudiesen haber ocasionado cambios en la homeostasis celular.

Este regulador de fosfatos ha sido utilizado en diversos ensayos de actividad citotóxica sin registrar algún problema como el ocurrido en el presente estudio (Domingos *et al.*, 2011; Rajeshkumar *et al.*, 2015). Sin embargo, ninguno de estos trabajos menciona haberlo utilizado como control en sus ensayos por lo que se desconoce su efecto sin la muestra a analizar.

A pesar de esta disminución de la viabilidad celular debida al PBS, las células que estuvieron en contacto con el extracto de epitelio en PBS mostraron menos afección que cuando sólo se les trató con PBS (control), teniendo una viabilidad de 111.5% para la línea FsGH y una viabilidad del 49% para la línea HeLa. Esto puede sugerir la presencia de factores de crecimiento, ya que los extractos fueron realizados con el epitelio de la espina de las rayas, la cual es una espina que muda. Por lo tanto,

constantemente esta embebida en factores estimulantes de crecimiento. El factor de crecimiento es una hormona polipeptídica que estimula el crecimiento de una variedad de tejidos (Starkey y Orth, 1977), la forma en que una célula se replica y entra a la mitosis abandonando su fase G0 y entrando en su fase G1 es gracias a los complejos ciclinas y a las cinasas dependientes de ciclinas y estos complejos son altamente sensibles a factores de crecimiento (Peralta *et al.*, 1977). Estos factores además de ser responsables de la replicación celular se encargan de la supervivencia celular, por lo que inferimos con base en los resultados, que los extractos pueden tener factores de regulación en el crecimiento celular.

También se ha observado una especificidad por parte de los extractos del epitelio de la espina, ya que mientras EE-PBS fue tóxico para células cancerígenas (HeLa), fue inocuo en células sanas (FsGH). Fuochi y colaboradores (2017) demostraron que el mucus aislado de *D. pastinaca* resulta tóxico para las células de leucemia aguda (HL60) con una inhibición de la proliferación de alrededor del 52% a una concentración de 1000 µg/mL, y tampoco observaron efectos en células sanas. Los resultados anteriores coinciden con los resultados obtenidos en el presente estudio, por lo que refieren una toxicidad específica de los componentes del mucus. Tal como mencionan Hernández y colaboradores (2013) estos datos indican la necesidad de determinar la selectividad de los extractos sobre células tumorales y su concentración citotóxica media en estudios posteriores con el extracto del epitelio de *H. dipterurus*, ya que corroborando esta selectividad sobre células tumorales, en este caso HeLa, los resultados obtenidos podrían contribuir a validar este extracto como un recurso, con posible enfoque de tratamiento con aplicación antitumoral (Hernández *et al.*, 2013).

La muerte celular es causada por dos procesos primarios: necrosis y apoptosis. Clínicamente, el efecto más común e importante del envenenamiento a través de toxinas de peces es la necrosis local del tejido. Los estudios con células cancerosas han demostrado que el veneno de varios peces induce la apoptosis. Por ejemplo, el veneno del pez león induce apoptosis en ratones con carcinoma de ascitis de

Ehrlichs mediante la activación de Caspasa-3, que se evidenció por fragmentación nuclear (Balasubashini *et al.* 2006). Un péptido (7.6 KDa) del veneno de pez león en células HEP2 y HeLa cultivadas demostró el papel de la apoptosis y este péptido se dirige de manera selectiva a las células cancerosas sin afectar a las células normales (Balasubashini *et al.* 2006). También los estudios sobre los efectos mitogénicos y citotóxicos de *S. verrucosa* e *Hypodytes rubripinnis* en líneas celulares normales y tumorales mostraron efectos mitogénicos hacia las células normales, mientras que para las líneas celulares tumorales hubo una citotoxicidad significativa inducida por el veneno crudo, así como ciertas fracciones aisladas (Sato *et al.*, 2002).

Respecto al extracto del mucus se observó una actividad citotóxica para la línea HeLa (viabilidad del 50%), sin embargo, dicha actividad pudiera estar afectada por el PBS en el cual se encuentra disuelto. Dejando abierta la pregunta si la actividad citotóxica del mucus de la espina es real.

Después de encontrar los resultados anteriores se realizó un segundo bioensayo en donde se modificaron las condiciones del experimento, utilizando agua tetradestilada en lugar de PBS para realizar la suspensión de epitelio, y en donde se descarta el estudio de la actividad citotóxica por parte del mucus de la espina debido a la poca cantidad de mucus obtenido en los muestreos.

Una vez realizado el segundo experimento con la línea HeLa como modelo experimental, se pudo corroborar el efecto citotóxico que tiene el epitelio de la espina de *H. dipterurus* sobre la línea celular de cáncer de cérvix, ya que la viabilidad de las células disminuyó hasta el 4.9% considerándose como muy tóxico según la norma antes mencionada. Esto coincide con lo reportado por Rajeshkumar *et al.* (2015) quienes señalan que el epitelio de la raya marina *D. sephen* presenta compuestos (moléculas) con actividad antiproliferativa contra la línea celular HeLa. Por otra parte, contrasta con los resultados de datos de citotoxicidad de otras moléculas consideradas como tóxicas, por ejemplo, el veneno del alacrán *Centruroides limpidus*

*limpidus*, el cual se probó en células cancerosas HeLa y macrófagos sanos teniendo como resultado la supervivencia de las células HeLa y una muerte celular de los macrófagos cercana al 90% (Contreras *et al.*, 2013). Esto da una idea de las ventajas biológicas que tiene el extracto del epitelio de la raya *H. dipterurus* ya que presenta actividad citotóxica para células con ciclos celulares alterados, pero no para líneas sanas.

### **Sobrenadantes bacterianos y EPS**

El porcentaje de viabilidad celular de los sobrenadantes bacterianos de temporada cálida y fría osciló entre el 4.8% y el 8.7% para la línea HeLa. Esta línea tuvo una viabilidad del 4.8% para células tratadas con SnTF y del 8.7% para las células que se expusieron a SnTC. Sin embargo, la toxicidad reflejada en estas líneas no se puede atribuir a que sea por parte de los metabolitos secundarios bacterianos en el sobrenadante, ya que los cultivos fueron realizados en caldo marino y éste muestra una toxicidad severa dejando a las células con una viabilidad de 3.7% en la línea celular HeLa.

Lo anterior difiere con lo reportado por otros autores (p.e. Domingos *et al.*, 2011) quienes estudian la actividad citotóxica de los sobrenadantes bacterianos de las cepas aisladas de las rayas de agua dulce del género *Potamotrygon*, con la prueba de MTT, en donde el medio de crecimiento es TSB. La cantidad de sales disueltas en TSB es mucho menor que el medio de crecimiento de caldo marino utilizado en este estudio, motivo por el cual es difícil hacer una comparación más profunda de esas pruebas de toxicidad para sobrenadantes bacterianos obtenidos de las bacterias embebidas en el mucus de rayas de agua dulce y la raya *H. dipterurus* de agua marina.

Al observar los resultados obtenidos con los sobrenadantes, y para evitar el efecto de las sales, se procedió a estudiar la actividad de los EPS de ambas temporadas mediante la técnica de MTT. Los valores encontrados fueron de una viabilidad del

10.3% para células tratadas con EPS de TF y una viabilidad del 73.5% para células expuestas a EPS de temporada cálida. Es decir, los EPS de temporada fría son altamente tóxicos mientras que los EPS de temporada cálida son levemente tóxicos. Esto coincide con los resultados de las células tratadas con SnTF y con SnTC en donde se mostró más tóxico el SnTF que el SnTC, es decir, los resultados obtenidos tanto de los sobrenadantes como de los productos extracelulares muestran que los metabolitos secundarios bacterianos de temporada fría son más tóxicos que los de temporada cálida.

### **Extractos bacterianos**

La línea HeLa fue susceptible a los tratamientos con los extractos, ya que para el ETF se mostraron valores de viabilidad del 3.7% y para ETC se manifestó una viabilidad del 4.1%. Se puede entonces concluir que utilizando altas concentraciones de los extractos (15 mg/mL para ETF y 15 mg/mL para ETC), la viabilidad de las células disminuye drásticamente considerando a los extractos de ambas temporadas como citotóxicos. Sin embargo, al bajar las concentraciones de los extractos a una concentración de 1.5 mg/mL, no hubo toxicidad con los extractos bacterianos de ninguna de las temporadas. Lo anterior contrasta con el trabajo de Sagar *et al.* (2013), en donde se demostró que los extractos de la mayoría de las cepas bacterianas marinas aisladas del agua del Mar Rojo poseen un efecto inhibitor significativo en el crecimiento y el efecto apoptótico sobre varias líneas celulares de cáncer entre ellas la línea HeLa a una concentración de 1 mg/mL.

### **Actividad de tripsina**

La prueba BAPNA indica cuánta actividad enzimática tipo tripsina tenemos presente en una muestra, en nuestro ensayo es evidente la actividad tipo tripsina para los extractos de epitelio probados en los ensayos citotóxicos, sin embargo, la actividad para EE-MQ es de 4.84 Unidades de actividad mientras que para EE-PBS es de

94.07 Unidades de actividad. Esto probablemente se deba a que la cantidad de proteína presente en EE-PBS es más abundante que en EE-MQ. Esto lo podemos observar en las tinciones realizadas en los geles de poliacrilamida donde se muestra una banda constante en todos los geles en todas las tinciones probadas, la banda 3, la cual es mucho más intensa en EE-PBS que en EE-MQ, por lo que se puede atribuir que debido a la presencia de esta proteína ambos extractos muestran actividad de tripsina.

## **Electroforesis en gel y tinciones**

### **Tinción CBB**

El azul brillante de Coomassie es un compuesto coloreado de color café-naranja que al unirse con el grupo amino de las proteínas mediante una interacción de tipo Van Der Waals genera un complejo azul. Esta técnica puede detectar cantidades de proteína menores a 1.0 µg con pesos moleculares superiores a 3000 kDa (Sedmak y Grossberg, 1997).

Basándonos en esto podemos observar diferentes bandas proteicas obtenidas a través de los diferentes tipos de solvente que se utilizaron para cada uno de los extractos de epitelio. En el extracto de epitelio obtenido con agua tetradestilada podemos observar que se extrajeron más variedades de proteínas que con el extracto realizado con PBS, sin embargo, la intensidad de las bandas es mayor que en el extracto obtenido con PBS.

Las bandas 4, 5, 6 y 7 solo se observan en el extracto realizado con agua tetradestilada, por lo que podemos inferir que estas proteínas de bajo peso molecular presentes son las responsables de la citotoxicidad observada sobre las células HeLa, debido a que estas bandas no se encuentran en el extracto obtenido con PBS, coincidiendo con que el extracto EE-PBS resulto menos citotóxico que el EE-MQ.

## **Tinción plata**

La tinción con plata es una técnica que permite la detección y cuantificación de proteínas en geles de poliacrilamida (Wray *et al.*, 1981), la cual tiene una sensibilidad incluso de nanogramos de proteína en un rango de 2-5 ng (Blum *et al.*, 1987). En el gel teñido con esta técnica podemos observar en el segundo carril el cual pertenece a la solución EE-MQ, cuatro bandas proteicas de diferente peso molecular, en el carril que corresponde a la solución EE-PBS observamos la presencia de tres bandas, observando claramente como las bandas 2 y 3 aparecen en ambos geles, pero con mayor intensidad para el de EE-PBS. Probablemente esta mayor cantidad de proteína se deba a que el PBS es un amortiguador de proteínas y la estabilidad de la proteína del extracto se vea beneficiada. Observamos que las bandas A, B y C solo se observan en la solución EE-MQ probablemente debido a que el agua MQ con glicerol este extrayendo proteínas que con el PBS no se lograron extraer. Comparando esta tinción con la técnica Comassie observamos que solo se repiten en ambas tinciones las bandas 2, 3, y 8 además apareciendo en la tinción con plata las bandas A, B y C, esto se puede explicar a que la técnica de tinción con plata es más sensible a cantidades pequeñas de proteínas, las cuales no se pueden detectar con la técnica Comassie.

Retomando nuevamente el ensayo de citotoxicidad podemos responsabilizar a las bandas B y C de la citotoxicidad observada en las células HeLa por parte de la solución EE-MQ, citotoxicidad que es moderada para las células tratadas con EE-PBS probablemente por la ausencia de estas proteínas observadas en las bandas B y C del extracto EE-MQ.

## **Tinción Schiff**

En esta tinción el ácido peryodico que contiene la solución oxida las uniones de los enlaces C-C de los azúcares formando grupos aldehídos, es decir, si hay carbohidratos presentes son oxidados, el reactivo de Schiff reacciona con estos aldehídos dando como resultado una coloración fucsia (Mantle y Allen, 1978).



Podemos observar en el gel teñido con el reactivo de Schiff la presencia de las bandas 2 y 3 en la solución EE-MQ y EE-PBS, lo que nos indica la presencia de dos proteínas glicosiladas con diferente peso molecular (la proteína 2 con un peso molecular de 52.82 kDa y la proteína 3 con un peso de 39.04 kDa)

### **Tinción stains all**

Esta tinción contiene un colorante carbocianina que tiñe proteínas aniónicas, ácidos nucleicos y polisacáridos aniónicos entre otros. La presencia de proteínas anionicas es detectada mediante la presencia de bandas teñidas de un color rosado (Goldberg y Warner, 1997).

En el gel teñido con esta técnica se puede detectar tanto para la solución EE-MQ como para la solución EE-PBS la presencia de la banda 3, la cual está presente en todas las tinciones, con una coloración rosada, por lo que podemos concluir que independientemente del método de extracción tenemos una proteína que es constante en todas las tinciones, es glicosilada y tiene carga aniónica, logrando extraer una mayor cantidad con la técnica de extracción con PBS. Esta proteína tiene un peso molecular de 39.04 kDa, difiriendo con la literatura en donde el extracto del epitelio de las rayas *P. falkneri* y *D. guttata*, muestra un peso de 84 kDa (Barbaro *et al.*, 2007).

Retomando los resultados de la toxicidad de todos los componentes asociados a la espina de *H. dipterurus*, se ha mencionado que las proteínas y los péptidos citolíticos desempeñan un papel importante en la realización de acciones ofensivas y defensivas en un gran número de organismos mediante la lisis de las células a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Varios péptidos marinos han mostrado un alto grado de actividad antitumoral, sin embargo, el papel de los componentes activos de los venenos de peces y en particular de rayas, su aislamiento, y las vías de señalización a través de las cuales causan apoptosis en las células cancerosas aún se encuentran en sus primeras etapas de estudio (Sivan, 2009).

Por otro lado, cabe mencionar que el estudio y la exploración del potencial contenido en los venenos de los peces puede contribuir a una mejor comprensión de los procesos fisiológicos complejos, como el dolor inducido por el envenenamiento, y al descubrimiento de nuevos fármacos, sin mencionar el desarrollo de formas más eficientes para tratar las lesiones causadas por estos animales (Campos *et al.*, 2016).

### **Aislamiento y caracterización bacteriana**

La caracterización morfológica de las bacterias asociadas al mucus que recubre el epitelio de la espina de la raya *H. dipterurus*, evidencia una variedad de cepas más amplia para la temporada fría que para la temporada cálida. Los resultados de la tinción Gram coinciden con los reportados en la literatura (Domingos *et al.*, 2011), ya que para ambas temporadas predominan las formas Gram-negativas. Existe una ligera variación para la temporada fría, en donde la cepa *Salinicoccus siamensis* fue Gram positiva. Además, en la temporada fría se encontraron morfologías en su mayoría cocoides, mientras que para la temporada cálida predominaron los bacilos (**Tabla 9**). La variación en el número de cepas y diferenciación de especies entre temporadas probablemente se deba a que los muestreos de temporada fría se realizaron en el mes de marzo, mes en el cual la especie en estudio está en época de apareamiento y reproducción (Informe técnico final Proyecto SEP-CONACyT 180894). Otra de las causas de la variación de las cepas puede ser el hecho de que los hábitats sufren variaciones temporales y espaciales, teniendo un efecto sobre la diversidad de las especies que lo habitan (García, 2009), por lo que al cambiar las bacterias del medio marino también cambian las bacterias con las cuales el mucus de la espina tiene contacto, probablemente esta interacción del mucus de la espina con diferentes bacterias, sea la responsable del cambio de la microbiota asociada a la espina, lo que sugiere que esta microbiota puede ser transitoria y su presencia es dependiente, de si se encuentra o no en el medio marino.

## 10 Conclusiones

En este trabajo se propuso como hipótesis la existencia de sustancias con capacidad citotóxica asociadas a los componentes de la espina presente en la aleta caudal, de la raya *Hypanus dipterurus* implicadas en el daño celular. Esta hipótesis es aceptada debido a que, el extracto del epitelio de la raya diamante presenta citotoxicidad, siendo específicamente tóxico para líneas celulares de cáncer (HeLa) y no tóxico para líneas celulares sanas en esta caso FsGH, además de que ambos extractos de epitelio (EE-PBS y EE-MQ) causaron pérdida de viabilidad en la línea celular HeLa aunque con diferente porcentaje de viabilidad, corroborando que independientemente del medio en el que se realice el extracto, se conservan las propiedades citotóxicas.

Otra de las razones con la cual se comprueba que la hipótesis propuesta se acepta es el hecho de que el extracto del epitelio de *H. dipterurus* tiene la capacidad de hidrolizar la gelatina. Esta misma actividad esta conferida a co-cultivos de temporada fría y temporada cálida, siendo la gelatina el principal componente del colágeno, por tanto, si los componentes de la espina dañan el soporte de la matriz extracelular (colágeno), desencadenarían un proceso inflamatorio provocando de manera indirecta un daño celular.

Se comprobó que la toxicidad no está dada por actividad hemolítica ni caseinolítica, ya que, bajo las condiciones experimentales estipuladas, en ninguno de los ensayos se observó hidrolisis de la caseína, ni  $\beta$ -hemólisis, efectuada por parte de ninguno de los componentes asociados a la espina.

También se encontró otro tipo de toxicidad que fue dada por los metabolitos secundarios producidos por las bacterias embebidas en el mucus que recubre la espina de la raya. Fue posible observar que, aunque a bajas concentraciones los extractos de las bacterias de la espina no fueron tóxicos, pero a altas concentraciones si lo fueron, además los productos extracelulares de ambas temporadas demostraron ser citotóxicos en el ensayo de MTT.

Con los resultados obtenidos se puede inferir que los componentes de la espina de *H. dipterurus* poseen una mezcla diversa de moléculas como proteínas de diferentes pesos moleculares y entre ellas una proteína aniónica glicosilada, enzimas y otros componentes farmacológicamente activos, concluyendo que *H. dipterurus* posee en los componentes de su espina, sustancias con actividad citotóxica, producidas tanto por las bacterias asociadas a su aparato espinoso, como por las propias células del epitelio que recubre la espina, ya que no existe una glándula macroscópica productora de compuestos citotóxicos.

## 11 Recomendaciones

1. El ensayo se realizó con líneas celulares continuas. Este tipo de línea celular tiende a mantenerse viable siempre y cuando este en las condiciones adecuadas. Se sugiere repetir el estudio en líneas celulares sanas de cultivo celular primario y no continuo para observar si se repite el fenómeno de aumento de viabilidad (como en el caso de FsGH) y poder hacer la presunción de una sustancia con posible regeneración celular. Esta inferencia se hace debido a que la espina de *H. dipterurus* muda por lo que debe excretar sustancias de proliferación celular que hagan que las células pasen de la fase G0 a G1 iniciando proliferación celular contribuyendo así a la regeneración celular.
2. Repetir el ensayo realizando los extractos de epitelio en agua tetradestilada más glicerol al 10% en diferentes líneas celulares sanas para observar si la toxicidad del epitelio de *H. dipterurus* es específica. Es decir, si este epitelio sólo se muestra tóxico para células cancerígenas, pero no para células sanas.
3. Evaluar la toxicidad del epitelio de la raya *H. dipterurus* mediante diferentes técnicas de extracción y medio de conservación.
4. Extraer los metabolitos de cada una de las bacterias por separado para conocer quien o quienes son las responsables de la actividad citotóxica sobre las líneas celulares.

5. Realizar la purificación de cada una de las bandas observadas en los geles SDS-PAGE, una vez purificada la proteína, probar su citotoxicidad en diferentes líneas celulares y realizar la identificación de las proteínas con actividad citotóxica.
6. Realizar el mismo estudio en rayas marinas de otra especie.

### **Literatura citada**

1. Abirami, P., Arumugam, M., Giji, S., Nagarajan, S. (2014). Bio-prospecting of catfish sting venom *Arius maculatus* available along South East coast of India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 110-5.
2. Antoniazzi, M.M., Benvenuti, L.A., Lira, M.S., Jared, S.G., Neto, D.G., Jared, C., Barbaro, K.C. (2011). Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stingers of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays. *Toxicon*, 57(2), 297-303.
3. Barbaro K.C., Lira M.S, Malta M.B., Soares S.L., Garrone Neto D., Cardoso J.L.C., Santoro M.L., Vidal Haddad Jr. (2007) Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. *Toxicon*, 50, 676-687.
4. Barrett, A. J. (1999). Peptidases: a view of classification and nomenclature. In *Proteases New Perspectives* (pp. 1-12).
5. Balasubashini, M. S., Karthigayan, S., Somasundaram, S. T., Balasubramanian, T., Rukkumani, R., & Menon, V. P. (2006). FV peptide induces apoptosis in HEp 2 and HeLa cells: an insight into the mechanism of induction. *Journal of Carcinogenesis*, 5, 27.
6. Balasubashini, M., Karthigayan, S., Somasundaram, S.T., Balasubramanian, T., Viswanathan, P. and Menon, V.P.(2006) *In vivo* and *in vitro* characterization of the biochemical and pathological changes induced by lionfish [*Pterios volitans*] venom in mice. *Toxicology Mechanisms and Methods* 16, 525–531.
7. Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93-99.

8. Campos, F. V., Menezes, T. N., Malacarne, P. F., Costa, F. L., Naumann, G. B., Gomes, H. L., & Figueiredo, S. G. (2016). A review on the *Scorpaena plumieri* fish venom and its bioactive compounds. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 22(1), 35.
9. Cazorla D., Loyo J., Lugo L., Acosta M. (2009). Aspectos clínicos, epidemiológicos y de tratamiento de 10 casos de envenenamiento por raya marina. *Revista de Investigación Clínica*, 61 (1), 11-17.
10. Chhatwal, I., Dreyer, F. (1992). Biological properties of a crude venom extract from the greater weever fish *Trachinus draco*. *Toxicon*, 30(1), 77-85.
11. Church, J. E., Hodgson, W. C. (2002). The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*, 40(8), 1083-1093
12. Clark R.F., Heister Girard R., Rao D., Binh T. Ly, Davis D. P. (2007) "Stingray envenomation: A retrospective review of clinical presentation and treatment in 119 cases". *The Journal of Emergency Medicine*, 33 (1), 33-37.
13. Contreras-Ortiz, J. M. E., Vázquez-Chagoyán, J. C., Martínez-Castañeda, J. S., Estrada-Franco, J. G., Aparicio-Burgos, J. E., Acosta-Dibarrat, J., & Barabosa-Pliego, A. (2013). Resistance of cervical adenocarcinoma cells (HeLa) to venom from the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 19(1), 20.
14. Dehghani, H., Sajjadi, M. M., Rajaian, H., Sajedianfard, J., & Parto, P. (2009). Study of patient's injuries by stingrays, lethal activity determination and cardiac effects induced by *Himantura gerrardi* venom. *Toxicon*, 54(6), 881-886.
15. Dehghani, H., Sajjadi, M.M., Parto, P., Rajaian, H., Mokhlesi, A. (2010). Histological characterization of the special venom secretory cells in the stinger of rays in the northern waters of Persian Gulf and Oman Sea. *Toxicon*, 55(6), 1188-1194.
16. Domingos M.O., Franzolin M.R., Tavares dos Anjos M., Thais M.P., Franzolin, Cabette Barbosa Albes R., Ribeiro de Andrade G., Lopes Rossivan J.L., Barbaro K.C. (2011). The influence of environmental bacteria in freshwater stingray wound healing. *Toxicon*, 58,147-153.

17. Eschmeyer, W. N., Herald, E. S., Hamman, H. (1983). A field guide to Pacific coast fishes of North America from the Gulf of Alaska to Baja California. Peterson Field Guide Ser. 28.
18. Feder, H. M., Turner, C. H., Limbaugh, C. (1974). Observations on fishes associated with kelp beds in southern California. Sacramento, CA: State of California, Resources Agency of California, Department of Fish and Game.
19. Fuochi, V., Li Volti, G., Camiolo, G., Tiralongo, F., Giallongo, C., Distefano, A., Di Rosa, M. (2017). Antimicrobial and anti-proliferative effects of skin mucus derived from *Dasyatis pastinaca* (Linnaeus, 1758). *Marine drugs*, 15(11), 342.
20. Garrone, N. D., Haddad, J. (2009). Acidentes por arraias. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Editora: Sarvier 2ª ed, São Paulo, 295-305.
21. Gokulalakshmi, N. Sri Kumaran, R. Vijayaraj. (2018). A mini review on bioprospecting of fish venom. *IJCRT* 6(2): 2320-2882.
22. Goldberg, H. A., & Warner, K. J. (1997). The staining of acidic proteins on polyacrylamide gels: enhanced sensitivity and stability of “Stains-all” staining in combination with silver nitrate. *Analytical biochemistry*, 251(2), 227-233.
23. Gómez, J. M., Fajardo, R., Patiño, J. F., Arias, C. A. (2003). Necrotizing fasciitis due to *Vibrio alginolyticus* in an immunocompetent patient. *Journal of clinical microbiology*, 41(7), 3427-3429.
24. Guardiola, F. A., Cuesta, A., Abellán, E., Meseguer, J., Esteban, M. A. (2014). Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. *Fish & shellfish immunology*, 40(1), 24-31.
25. Haddad Jr, V., Neto, D. G., de Paula Neto, J. B., de Luna Marques, F. P., Barbaro, K. C. (2004). Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. *Toxicon*, 43(3), 287-294.
26. Halstead, B. W., Ocampo, R. R., & Modglin, F. R. (1955). A study on the comparative anatomy of the venom apparatus of certain North American stingrays. *Journal of Morphology*, 97(1), 1-21.

27. Hernández Sosa, E., Mora González, N., Morris Quevedo, H. J., Delgado Cobas, L., Martínez Manrique, C. E. (2013). Actividad citotóxica de extractos acuosos de hojas de *Trichilia hirta* sobre células tumorales humanas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(1), 93-101.
28. Kang, C., Munawir, A., Cha, M., Sohn, E. T., Lee, H., Kim, J. S., Kim, E. (2009). Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(1), 85-90.
29. Kelly, T. (2005). Fibroblast activation protein- $\alpha$  and dipeptidyl peptidase IV (CD26): cell-surface proteases that activate cell signaling and are potential targets for cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 8(1-2), 51-58.
30. Last P.R., Gavin J.P. Naylor, Manjaji-Matsumoto B.M. (2016) "A revised classification of the family Dasyatidae (Chondrichthyes: Myliobatiformes) based on new morphological and molecular insights. *Zootaxa* 4139 (3), 345-368.
31. Last, P., Naylor, G., Séret, B., White, W., de Carvalho, M., Stehmann, M. (Eds.). (2016). *Rays of the World*. CSIRO publishing.
32. Limorte, M. B., & Albert, G. L. (1982). Estudio del proceso de transformación del colágeno en gelatina. *Anales de la Universidad de Murcia (Ciencias)*, 135-146.
33. Lopes-Ferreira, M., Barbaro, K. C., Cardoso, D. F., Moura-da-Silva, A. M., & Mota, I. (1998). Thalassophryne nattereri fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*, 36(2), 405-410.
34. Magalhães K.W., Lima C., Piran Soares A.A., Marquesa E.E., Hiruma Lima C.A., Lopes Ferreira M. (2006). Biological and biochemical properties of the Brazilian Potamotrygon stingrays: *Potamotrygon* cf. *scobina* and *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. *Toxicon*, 47, 575-583.
35. Magalhães, M.R., da Silva, N.J., Ulhoa, C.J. (2008). A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. *Toxicon*, 51(6), 1060-1067



36. Mandelbaum, F.R., Reichl, A.P., Assakura, M.T. (1990) Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*, 28, 1293–1301
37. Maretic, Z., & Tu, A. T. (1988). Marine toxins and venoms. *Handbook of Natural Toxins*, 10th ed. New York: Marcel Dekker, 379-444.
38. Mantle, m., y Allen, a. (1978). A colorimetric assay for glycoproteins based on the periodic acid/Schiff stain.
39. Navia, A. F., Mejía-Falla, P. A., & Caicedo, J. (2011). Guía para la identificación de especies de tiburones y rayas comercializadas en el Pacífico colombiano. Squalus, Fundación Colombiana para la Investigación y Conservación de Tiburones y Rayas.
40. Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.
41. Nigam, A. K., Kumari, U., Mittal, S., Mittal, A. K. (2012). Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches. *Fish physiology and biochemistry*, 38(5), 1245-1256.
42. Rajeshkumar, R. K., Vennila, R., Kanchana, S., Arumugam, M., & Balasubramaniam, T. (2011). Fibrinogenolytic and anticoagulant activities in the tissue covering the stingers of marine stingrays *Dasyatis sephen* and *Aetobatis narinari*. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 31(4), 464-471.
43. Rajeshkumar, R. K., Vennila, R., Karthikeyan, S., Prasad, N. R., Arumugam, M., Velpandian, T., Balasubramaniam, T. (2015). Antiproliferative activity of marine stingray *Dasyatis sephen* venom on human cervical carcinoma cell line. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 21(1), 41.
44. Russell, F. E. (1971). Marine Toxins and Venomous and Poisonous Marine Animals: Findlay E. Russell. TFH Publications.
45. Parsons K., Rutledge D.N., (2015) Stingray Envenomation Treatment Recommendations. *The Journal for Nurse Practitioners*, 11, 360-363
46. Pedroso C.M., Jared C., Charvet Almeida P., Almeida M.P., Garrone Neto D.G, Lira M.S., Vidal Haddad Jr, Barbaro K.C., Antoniazzi M.M. (2007). Morphological

- characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. *Toxicon*, 50 688-697.
47. Peralta-Zaragoza, O., Bahena-Román, M., Díaz-Benítez, C. E., & Madrid-Marina, V. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud pública de México*, 39, 451-462.
48. Pérez Bravo, Á. A. (2018). Análisis preliminar de los componentes proteicos del veneno del pez león *Pterois volitans* de la costa de Santa Marta y evaluación de su actividad biológica (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá).
49. Sáenz, A., Ortiz, N., Lomonte, B., Rucavado, A., Díaz, C. (2017). Comparison of biochemical and cytotoxic activities of extracts obtained from dorsal spines and caudal fin of adult and juvenile non-native Caribbean lionfish (*Pterois volitans/miles*). *Toxicon*, 137, 158-167.
50. Sagar, S., Esau, L., Hikmawan, T., Antunes, A., Holtermann, K., Stingl, U., Kaur, M. (2013). Cytotoxic and apoptotic evaluations of marine bacteria isolated from brine-seawater interface of the Red Sea. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 29.
51. Sánchez, J. C. (2004). Efectos de la osmolaridad extracelular sobre el potencial de membrana en condrocitos articulares. *Actual Biol*, 26(81), 99-104.
52. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
53. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition.
54. Satoh, F., Nakagawa, H., Yamadai, H. et al.(2002) Fishing for bioactive substances from Scorpionfish and some sea urchin. *J.Nat.Toxins* 11, 297–304.
55. Sedmak, J. J., & Grossberg, S. E. (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical biochemistry*, 79(1-2), 544-552.
56. Shiomi, K., Hosaka, M., Fujita, S., Yamanaka, H., Kikuchi, T. (1989). Venoms from six species of marine fish: lethal and hemolytic activities and their neutralization by commercial stonefish antivenom. *Marine Biology*, 103(3), 285-289.

57. Sivan, G. (2009). Fish venom: pharmacological features and biological significance. *Fish and fisheries*, 10(2), 159-172
58. Smith, W.D., Bizzarro, J.J. & Lamilla, J. (2006). *Dasyatis dipterura*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2006*: e.T60152A12314148
59. Sosa-Rosales, J. I., D'suze, G., Salazar, V., Fox, J., & Sevcik, C. (2005). Purification of a myotoxin from the toadfish *Thalassophryne maculosa* (Günther) venom. *Toxicon*, 45(2), 147-153.
60. Sosa-Rosales, J. I., Piran-Soares, A. A., Farsky, S. H., Takehara, H. A., Lima, C., & Lopes-Ferreira, M. (2005). Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. *Toxicon*, 45(2), 155-161.
61. Starkey, R. H., & Orth, D. N. (1977). Radioimmunoassay of human epidermal growth factor (urogastrone). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 45(6), 1144-1153
62. Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P., Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 118(1), 197-203.
63. Wright J. 2012. The evolutionary ecology of venomous catfishes, with a focus on members of the North American family Ictaluridae (Teleostei: Siluriformes). Thesis doctoral. Universidad de Michigan, E.U.
64. Ziegman R., Alewood P. (2015). Bioactive components in fish venoms. *Toxins*, 7, 1497-1531.