

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE
MEXICO**

293122 03097
6

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

CAMPUS UNAM-UAQ, JURIQUILLA QUERÉTARO

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VENENO DE LA MEDUSA
Cassiopea xamachana
Estudios electrofisiológicos y bioquímicos

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

P R E S E N T A

M. en C. MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS

293122

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera

Dr. Rogelio Arellano Ostoa

Mayo 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

CNEU/MDCB/105/2001

Dr. Edgar Heimer de la Cotera
Dr. Rogelio Arellano Ostoa
Dr. Carlos Arámburo de la Hoz
P r e s e n t e

Estimados Miembros del Comité Tutorial:

Por este conducto les informo que el Subcomité Académico del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, en su pasada reunión No. 61 del 30 de agosto del 2000, aprobó su solicitud para realizar los trámites del Examen de Grado de Doctora en Ciencias (Neurobiología) de la alumna: **TORRES RAMOS MÓNICA ADRIANA**, con número de cuenta 87525515, con el proyecto de tesis: **"Análisis de la actividad biológica del veneno de la medusa Cassiopea xachamana. Estudios electrofisiológicos y bioquímicos"**, asimismo se acordó que este Jurado queda constituido por los siguientes doctores:

Presidente	Mauricio Díaz Muñoz
Secretario	Edgar Heimer de la Cotera
1er. Vocal	Rogelio Arellano Ostoa
2º Vocal	Froylan Gómez Lagunas
3er. Vocal	María del Lourdes Segura-Puertas
1er. Suplente	María Alejandra Rojas Molina
2º Suplente	Manuel Aguilar Ramírez
Emergente	Luis Alfonso Vaca Domínguez

A t e n t a m e n t e

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Campus UNAM-UAQ, Juriquilla Querétaro a 20 de Marzo de 2001


Dra. Carmen Aceves Velasco

Responsable del Programa de Doctorado

Ccp. Dr. César Domínguez Pérez Tejada.- Coordinador del Programa.- presente
Mónica A. Torres Ramos.- Alumna.- presente
Comité tutorial.- presente
Jurado constituido.- presente

AGRADECIMIENTOS

A los directores de tesis que hicieron posible la realización de este proyecto.

Dr. Edgar P. Heimer de la Coterá
Dr. Rogelio Arellano Ostoa

A los miembros del comité tutorial, por su ayuda y comentarios durante estos estudios.

Dr. Carlos Arámburo de la Hoz
Dr. Manuel Aguilar Ramírez

A los miembros del jurado de examen de grado por aceptar tan amablemente revisar este trabajo.

Dra. María de Lourdes Segura-Puertas
Dra. María Alejandra Rojas Molina
Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Dr. Froylán Gómez Lagunas
Dr. Luis Vaca Domínguez

Al Biol. Andrés Falcón Alcántara y la Biol. María Eugenia Ramos, por su valioso apoyo técnico.

A la Lic. Pilar Galarza Barrios por su incondicional ayuda en la Biblioteca del Centro de Neurobiología.

Al Biol. Lenin Sánchez Calderón por su entusiasta participación en este proyecto.

Al personal del departamento de posgrado del Centro de Neurobiología: Leonor Casanova, Isabel Bolaños y Carmen Vázquez.

PRODUCCION ACADEMICA DEL PROYECTO

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VENENO DE LA MEDUSA *Cassiopea xamachana* Estudios electrofisiológicos y bioquímicos

Artículos

Mónica Torres, Manuel B. Aguilar, Andrés Falcón , Lenin Sánchez, Faisal F. Y. Radwan , Joseph W. Burnett , Edgar P. Heimer-de la Cotera and Rogelio O. Arellano ELECTROPHYSIOLOGICAL AND HEMOLYTIC ACTIVITY ELICITED BY THE VENOM OF THE JELLYFISH *Cassiopea xamachana*. *Toxicon*. (en prensa)

Faisal F.Y. Radwan., Joseph W. Burnett., David A. Bloom., Tracy Coliano T., Mohyee E. Eldefrawi, Holly Erdely, Laure Aurelian., **Mónica Torres**, Edgar P. Heimer de la Cotera. 2001. A COMPARISON OF THE TOXINOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TWO *CASSIOPEA* SPECIES. *Toxicon* 39, 245-257.

En preparación:

Mónica Torres, Lenin Sánchez, Andrés Falcón, Manuel B. Aguilar, Edgar P. Heimer-de la Cotera. CYTOLYTIC ACTIVITY ELICITED BY THE VENOM OF THE JELLYFISH *Cassiopea xamachana*.

Tesis de licenciatura

Estudiante: Lenin Sánchez Calderón

Grado obtenido: Biólogo

Institución: Universidad Autónoma de Querétaro.

Título de la tesis: Extracción y purificación parcial de toxinas con actividad hemolítica, provenientes de la medusa *Cassiopea xamachana*.

Director de Tesis: **Mónica Torres**

Fecha del examen profesional: 11 de enero 2001

Congresos Internacionales

XIIIth WORLD CONGRESS ON ANIMAL, PLANT AND MICROBIAL TOXINS
September 18-22, 2000 / PARIS / France

M. Torres, M. Ramos, E. Heimer and R.O. Arellano

IONIC CURRENT GENERATED IN *Xenopus* OOCYTES BY VENOM OF THE JELLYFISH *Cassiopea xamachana*.

Este trabajo fue realizado en el Centro de Neurobiología, en los laboratorios de:

Farmacología Marina y Bioquímica Analítica
Neurofisiología celular

Y en la Unidad Académica de Puerto Morelos, Quintana Roo del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.

Ambas dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Las Instituciones que otorgaron becas para la realización de este trabajo fueron:

Dirección de Estudios de Posgrado de la UNAM por la beca otorgada correspondiente a los estudios del programa de doctorado.

Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro por la beca otorgada para el término del escrito de tesis.

6th PANAMERICAN CONGRESS ON ANIMAL, PLANT AND MICROBIAL TOXINS,
MARGARITA ISLAND, VENEZUELA. SEPTIEMBRE 1998.

Torres M., Arellano R.O., Aguilar M., Falcón A. and Heimer de la Cotera E.
ELECTRICAL ACTIVITY OF THE VENOM OF THE JELLYFISH *Cassiopeia*
xamachana ELICITED IN *Xenopus laevis* OOCYTE.

Congresos Nacionales

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LA MEDUSA *Cassiopea xamachana* (CNIDARIA).
Sanchez L.C., Falcon A.A., Aguilar M.B., Heimer de la Cotera E y **M. Torres**. XLII
CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS
FISIOLÓGICAS, A.C., ZACATECAS, MÉXICO 1999.

ACTIVIDAD ELÉCTRICA PRODUCIDA POR EL VENENO DE LA MEDUSA
Cassiopea xamachana EN OVOCITOS DE *Xenopus laevis* **Torres M.**, Heimer de
la Cotera E., Aguilar M.B., Falcón A. A. y Arellano R.O. XLII CONGRESO
NACIONAL DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.,
ZACATECAS, MÉXICO 1999.

Este proyecto fue apoyado parcialmente por:

CONACyT (32364-N)
DGAPA-UNAM (IN-209596, IN - 200198)
CONCyTEQ (B11)

En memoria de dos grandes hombres

Mi padre Armando Torres

Mi maestro Javier Taboada

A mi madre Gloria Ramos que le debo todo

A mis hermanos Armando, Antonio y Silvestre

Agradezco profundamente a las personas que me han brindado una palabra de aliento, una palabra de ánimo, y sobre todo su amistad, porque ustedes fueron muy importantes durante y para el desarrollo de mi trabajo.

A ustedes, con los que he compartido momentos de alegría, tristezas, frustraciones y éxitos.

A todos Ustedes

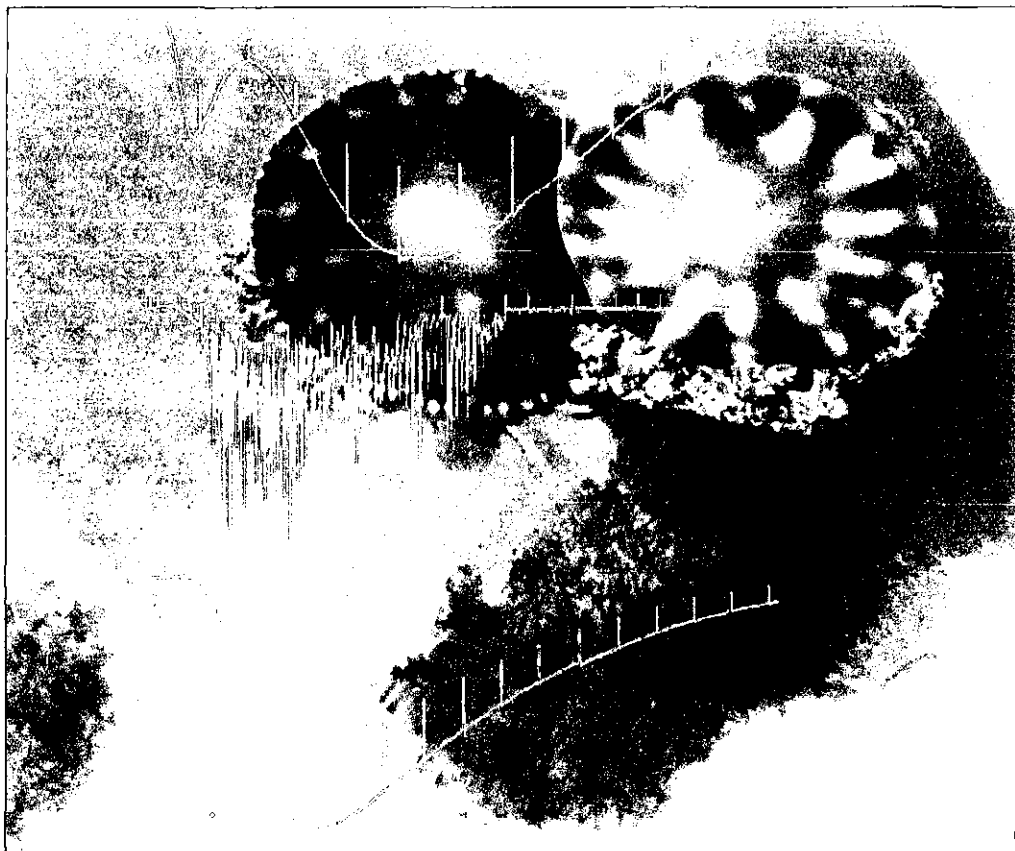
Gracias



ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA MEDUSA
Cassiopea xamachana

ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA**



MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS

INDICE

Resumen en español	iv
Resumen en Inglés	v
Indice de figuras y tablas	vi

INTRODUCCION

Toxinas con actividad sobre proteínas de membrana	4
Toxinas citolíticas que alteran la permeabilidad de la membrana	8
El phylum Cnidaria como fuente de toxinas	12
Evaluación de la actividad biológica	16
Actividad eléctrica en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	16
Actividad hemolítica	20

ANTECEDENTES

La medusa <i>Cassiopea xamachana</i>	23
Diagnosís	26
Hábitos alimenticios	28
Estudios bioquímicos y de actividad biológica	29

HIPOTESIS Y OBJETIVOS	31
-----------------------------	----

METODOS

Recolecta	33
Extracción del veneno	34
Purificación de los nematocistos	37

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VENENO DE <i>Cassiopea xamachana</i>	
Análisis electrofisiológico en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	38
Bases iónicas de la actividad eléctrica.....	40
Análisis de la actividad hemolítica	43
 BIOQUIMICA DEL VENENO DE <i>Cassiopea Xamachana</i>	
Naturaleza química de las toxinas bioactivas	45
Cuantificación de proteínas	46
Purificación parcial de las toxinas bioactivas	46
Electroforésis	50
Diseño experimental resumido	51
 RESULTADOS	
Nematocistos y extracción del veneno	53
Extracto de los brazos orales	
Determinación de la actividad hemolítica	56
Determinación y caracterización de la actividad electrofisiológica inducida por el veneno de <i>Cx</i> en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	57
Bases iónicas de I_{Cx}	63
 Mecanismo de acción involucrado en la generación de I_{Cx}	67
Relación I_{Cx} con la corriente nativa I_C	68
Relación de I_{Cx} con la corriente generada por palitoxina	69
I_{Cx} y la apertura de canales mecanosensibles (MS)	71
Purificación parcial de las toxinas bioactivas	83
Purificación parcial de la toxina que evoca a la I_{Cx}	75
Purificación parcial de la toxina con actividad hemolítica	78

Extracto de la secreción mucosa

Purificación parcial de la toxina con actividad electrofisiológica 79

Extracto de la estimulación eléctrica

Purificación parcial de las toxinas con actividad hemolítica 81

DISCUSION

Origen de las sustancias bioactivas 86

Actividad biológica del veneno de *Cx* 88

Actividad hemolítica producida por el veneno de *Cx* 88

Actividad eléctrica evocada por el veneno de *Cx* 90

Características de I_{Cx} 91

Mecanismo de acción de I_{Cx} 91

$I_{Cl(Ca)}$ evocada por el veneno de la medusa 95

Purificación parcial de las toxinas bioactivas 96

Toxinas con actividad hemolítica 97

Toxina (s) con actividad electrofisiológica 99

CONCLUSIONES 102

Referencias..... 104

Anexo 1. Control de voltaje

Anexo 2. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. (prueba de galera)

RESUMEN

La actividad biológica del veneno de la medusa *Cassiopea xamachana* (*Cx*) fue caracterizada utilizando técnicas electrofisiológicas y ensayo de hemólisis. Las toxinas responsables de la actividad fueron parcialmente purificadas utilizando diversos métodos bioquímicos. Para esto, fueron estandarizados tres métodos de extracción del veneno de *Cx*, para los tres extractos fue determinada la actividad biológica en dos modelos celulares: 1) hemólisis en eritrocitos humanos y de oveja, y 2) actividad eléctrica en ovocito de *Xenopus laevis*. El veneno de *Cx* produjo hemólisis en ambas especies, siendo mas potente en los eritrocitos de humano. El estudio electrofisiológico mostró que el veneno de la medusa genera en el ovocito una mezcla compleja de corrientes entrantes, todas asociadas con un incremento de la conductancia de la membrana. Dos de los componentes de la respuesta no se presentaron en todas las células, el primero correspondió con la apertura de canales catiónicos inespecíficos que provocan una corriente rápida (2.2 ± 0.8 s) y lisa que se inactivó aún en presencia del veneno. El segundo componente fue una corriente oscilatoria con características similares a la producida por la apertura de canales de Cl^- dependiente de Ca^{2+} intracelular ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$). El tercer componente que fue generado en todos los ovocitos estudiados fue debido a la apertura de canales catiónicos inespecíficos provocando una corriente lisa, con un curso temporal lento (25.74 ± 0.9 s) que fue llamada I_{Cx} . La amplitud de la corriente I_{Cx} fue dependiente de la concentración del veneno. I_{Cx} tuvo un potencial de inversión de -10.3 ± 0.4 mV, el cual sugirió una vía de selectividad no específica. Esto último fue confirmado con estudios de sustitución iónica. Los resultados apoyan la idea de que el mecanismo de activación de I_{Cx} involucra la apertura de canales nativos del ovocito. Un estudio comparativo con tres de los canales catiónicos endógenos más importantes presentes en ovocito (i.e., 1. hemicanales de uniones comunicantes, 2. canales sensibles a ouabaina activados por palitoxina, y 3. canales mecanosensibles) mostró que I_{Cx} podría corresponder con la apertura de canales mecanosensibles o con la activación de un canal catiónico aún no descrito. El estudio bioquímico del veneno de *Cx* sugirió principalmente cuatro cosas: 1) las sustancias bioactivas fueron de naturaleza peptídica, 2) el veneno crudo presentó al menos dos hemolisinas, 3) la toxina que evocó I_{Cx} tiene carga neta positiva a pH 7, y 4) en su actividad podrían estar participando mas de una entidad molecular.

ABSTRACT

Venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana* (*Cx*) was extracted by three methods and its biological activity was determined in two cell models: 1) hemolysis of human and sheep erythrocytes, and 2) electrical activity in *Xenopus laevis* oocytes. The *Cx* venom produced hemolysis in both species, and was more potent toward human red blood cells. The electrophysiological study showed that the *Cx* venom elicited a complex combination of inward currents and all were associated with an increase in membrane conductance. Two components of the response were not elicited in all tested cells, the first was provoked by the opening of non-specific cationic channels, producing a fast (2.2 ± 0.8 s) and smooth current that was inactivated in presence of the venom. The second component was an oscillatory current with characteristics similar to the response provoked by opening chloride channels dependent on an increase of intracellular Ca^{2+} ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$). The third component, was generated in all oocytes studied and corresponded to the opening of the non-specific cationic channels, which produced a slow (25.74 ± 0.9 s) and smooth current, named I_{Cx} .

The amplitude of the I_{Cx} current was dependent on the venom concentration. I_{Cx} had a reversal potential of -10.3 ± 0.4 mV indicating a non-specific selectivity pathway. This was confirmed by ionic substitution studies. The results suggested that the action mechanism involved in I_{Cx} was the opening of a native cationic channel in the oocytes. A comparative study with three distinct endogenous cationic channels present in the oocyte membrane (i.e. 1. hemi-gap-junction channels, 2. mechanosensitive channels, and 3. the ouabain-sensitive channel activated by palytoxin), showed that I_{Cx} might correspond to opening of mechanosensitive channels or to activation of an unknown cationic channel. The biochemical study of the *Cx* venom suggested that: 1) the bioactive substances were of peptidic nature, 2) the crude venom contained at least two hemolysins, 3) the toxin that elicited I_{Cx} has a net positive charge, and 4) that more than one molecular entity may contribute to its activity.

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema de una sinapsis química mostrando ejemplos de los canales iónicos y receptores que sirven como blanco de diferentes toxinas de origen marino	6
Figura 2. Esquema de dos modelos propuestos para la formación de poros en la membrana celular por citolisinas	11
Figura 3. Nematocisto	13
Figura 4. Descarga del nematocisto	13
Figura 5. Esquema que muestra las diferentes capas que rodean al ovocito de <i>Xenopus laevis</i>	17
Figura 6. Registros electrofisiológicos característicos de respuestas a diferentes agonistas y condiciones experimentales en ovocito de <i>Xenopus laevis</i>	19
Figura 7. Anatomía general de un cnidario	24
Figura 8. Organismos adultos de <i>Cassiopea xamachana</i>	26
Figura 9. Esquema anatómico de <i>Cassiopea xamachana</i>	27
Figura 10. Area de colecta de la medusa <i>Cassiopea xamachana</i>	34
Figura 11. Esquema general de la estrategia usada para determinar la actividad electrofisiológica del veneno de la medusa <i>Cassiopea xamachana</i>	39
Figura 12. Relación corriente-voltaje (<i>I/V</i>)	43
Figura 13. Nematocistos de <i>Cassiopea xamachana</i>	53
Figura 14. Ejemplo de las preparaciones de nematocistos de <i>Cx</i> obtenidos con cada uno de los diferentes métodos de extracción	54
Figura 15. Evaluación de la actividad hemolítica	57
Figura 16. Ejemplos típicos de corrientes iónicas membranales generadas por el veneno de <i>Cx</i> en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	58
Figura 17. Relaciones corriente-voltaje de la respuesta rápida	59
Figura 18. Independencia de Ca^{2+} intracelular de la activación de I_{Cx}	61

Figura 19. Relación concentración-respuesta en la generación de I_{Cx}	63
Figura 20. Desensibilización de I_{Cx}	62
Figura 21. Relación corriente-voltaje (I/V) de I_{Cx}	63
Figura 22. Relación I/V de la respuesta de I_{Cx} sustituyendo en diferentes proporciones el Na^+ en la solución RN por $NMDG^+$	65
Figura 23. Relación corriente-voltaje de I_{Cx} con diferentes sustituciones iónicas	66
Figura 24. I_{Cx} y maduración	68
Figura 25. Relación de I_{Cx} e I_C	70
Figura 26. Coaplicación de ouabaina y el veneno de Cx	71
Figura 27. Efecto de Gd^{3+} sobre I_{Cx}	72
Figura 28. Naturaleza química de las toxinas bioactivas	74
Figura 29. Perfil de elución de HPLC con la actividad electrofisiológica y hemolítica del extracto de brazos orales de Cx	75
Figura 30. Corriente iónica generada por F25	76
Figura 31. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% de extracto crudo y F25	77
Figura 32. Perfiles de elución de F25 y F25B por HPLC	78
Figura 33. Perfil de elución por HPLC del veneno de Cx de la secreción mucosa	79
Figura 34. Perfil de elución y actividad electrofisiológica del fraccionamiento de F24 del extracto de la secreción mucosa	80
Figura 35. Primera etapa de purificación del extracto de la estimulación eléctrica	82
Figura 36. Segunda etapa de purificación del extracto de la estimulación eléctrica	83
Figura 37. Segunda etapa de purificación del extracto de la estimulación eléctrica utilizando alta concentración de sales	84

Tabla I. Respuestas electrofisiológicas nativas caracterizadas en ovocitos desfoliculados de <i>Xenopus laevis</i>	18
Tabla II. Concentración de proteína y actividad biológica obtenida de los tres diferentes métodos de extracción	55
Tabla III. Relación entre nematocistos cargados y descargados en muestras nuevas y con un año de almacenamiento	56
Tabla IV. Potenciales de inversión de las diferentes sustituciones iónicas durante la activación de I_{Cx}	66
Cuadro 1. Diseño general de la estrategia seguida durante este trabajo de investigación	51

INTRODUCCIÓN

Los animales venenosos como las serpientes, una gran variedad de artrópodos y en particular organismos marinos de diferentes phyla, usan una mezcla compleja de toxinas para capturar a su presa o para defenderse. Muchas de estas toxinas contenidas en el veneno interactúan con diferentes componentes de la membrana celular, teniendo como blancos a moléculas membranales importantes funcionalmente tales como: canales iónicos, receptores, fosfolípidos y otras (Kem et al., 1990; Norton, 1991; Adams y Olivera, 1994; Bernheimer y Rudy, 1986; Othman y Burnett, 1990; Rottini et al., 1995, Burnett et al., 1995, Burnett, 1990, Blumenthal, 1995; Rappuoli y Montecucco, 1997). Esta interacción ha permitido que las toxinas sean utilizadas como poderosas herramientas en el propio estudio de las moléculas sobre las que actúan, ayudando a definir también eventos y mecanismos moleculares en los que están involucradas. Además, la importancia de los efectos que pueden ejercer sobre la función membranal ha permitido desarrollar estrategias para usarlas como armas terapéuticas y de diagnosis (Rappuoli y Montecucco, 1997, Monje et al., 1993; Bowersox y Luther, 1998).

La membrana es la estructura que delimita a la célula, y que actúa como una barrera de permeabilidad selectiva. Su estructura básica está determinada principalmente por lípidos y proteínas, también contiene una importante cantidad de agua, diferentes iones y carbohidratos. Los lípidos que forman a la membrana son de naturaleza anfipática, debido a la presencia de una región polar hidrofílica la cual está orientada hacia las interfases acuosas (i.e., citosol y medio extracelular), y una región no polar hidrofóbica localizada entre los polos hidrofílicos. Esta anfipatía les permite a los lípidos adquirir la configuración de bicapa descrita para esta estructura celular.

Los lípidos de membrana son de tres tipos principalmente: fosfolípidos, esfingolípidos y lípidos neutros. Los primeros son los más abundantes y en la mayoría de los casos son fosfoglicéridos. Los esfingolípidos derivan de la esfingosina, un aminoalcohol con una larga cadena hidrocarbonada en la que el grupo amino se une a un ácido graso y constituyen a una ceramida. Cuando el grupo alcohol de la esfingosina es esterificado con fosforilcolina forma a la

esfingomielina. De este modo, todos los esfingolípidos tienen dos cadenas largas hidrocarbonadas hidrofóbicas en un extremo y una región hidrofílica en el otro. Dentro de los lípidos neutros el colesterol, molécula más pequeña que las anteriores y menos anfipática, es la mejor representada en las células eucariontes y juega un papel fundamental en la fluidez de la membrana. Como veremos más adelante la composición lipídica de las membranas es importante en la actividad de diferentes toxinas.

Por otro lado, las proteínas de una membrana son las macromoléculas que determinan esencialmente el grado de especialización celular. Estas proteínas han sido divididas principalmente en dos grupos. Al primero pertenecen aquellas que atraviesan la bicapa lipídica, conocidas como proteínas transmembranales, en este grupo de proteínas se encuentran por ejemplo, ATPasas, canales iónicos y receptores. Al segundo tipo pertenecen las proteínas que se asocian directamente a alguno de los lípidos de la misma, pero que no poseen un segmento transmembranal, por ejemplo las proteínas G. El tipo de asociación de una proteína con la bicapa lipídica depende de forma importante de la estructura de la proteína, y en especial de sus áreas hidrofóbicas e hidrofílicas, por ejemplo, las proteínas transmembranales tienen un mayor número de regiones hidrofóbicas que forman a los segmentos que atraviesan la bicapa.

Las proteínas de membrana tienen un papel central en varios procesos, entre otros: a) el intercambio de información con el medio extracelular, b) los procesos que median las interacciones entre las células, c) procesamiento de señales intracelulares a través de las membranas que conforman los diferentes compartimientos citosólicos, y d) la generación de compuestos macroenergéticos necesarios para el metabolismo celular. Estos fenómenos celulares complejos tienen como base funcional el transporte activo y pasivo de iones y metabolitos. También, de forma importante, participan en estas funciones especializadas la transducción de señales a través de receptores membranales a hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, y la generación de segundos mensajeros que regulan vías metabólicas importantes de la función celular.

Es por lo tanto evidente que efectos provocados por toxinas que interactúan con los componentes de membrana podrían ser significativos, ya que lograrían alterar de diversas formas los mecanismos celulares mencionados.

Están descritos diferentes mecanismos de interacción de las toxinas producidas por animales marinos con la membrana celular. Dos grupos son importantes en el contexto del presente trabajo. I. Al primer grupo pertenecen las toxinas que tienen actividad directa sobre proteínas de membrana como canales iónicos y receptores. II. Al segundo grupo pertenecen las toxinas citolíticas que se unen a lípidos alterando la permeabilidad de la membrana.

I. Toxinas con actividad sobre proteínas de membrana.

Una de las estrategias más utilizadas por las toxinas de origen animal es el bloquear o alterar la comunicación celular que se lleva a cabo principalmente a través de las sinapsis químicas (Fig. 1). Esto le permite al cazador inmovilizar a su presa o defenderse de un depredador potencial de forma rápida, que es importante, sobre todo para aquellos organismos carnívoros sésiles, rastreros y algunos pelágicos que habitan el océano. Esta estrategia se basa principalmente en la unión toxina-canal o toxina-receptor, que interfiere con las funciones neuronales y/o musculares.

Está bien documentado que la actividad de este grupo de toxinas sobre las proteínas opera de diferentes formas, por ejemplo: a) aquellas que alteran los mecanismos de compuerta de los canales iónicos, b) las que bloquean el flujo de iones a través del poro del canal, y c) aquellas toxinas que actúan como agonistas o antagonistas de un receptor. Todas las toxinas estudiadas hasta ahora utilizan alguno de estos mecanismos de actividad cuando tienen como blanco a canales iónicos y receptores.

Uno de los ejemplos más representativos y de gran interés en neurobiología, es la tetrodotoxina (TTX) y su relación con los canales de Na^+ en células excitables. El nombre de TTX hace referencia al pez tetrodóntido del que fue aislada, sin embargo, actualmente se encuentra en debate el origen de esta toxina

ya que también se atribuye su síntesis a *Shewanella algae* un dinoflagelado simbiote del pez (Yasumoto y Murata, 1993; Whittle y Gallacher, 2000). En 1964, T. Narahashi y colaboradores, demostraron que la toxicidad de esta sustancia se debía principalmente a la capacidad de bloquear el incremento de la conductancia de Na^+ asociado con la fase de disparo del potencial de acción en células excitables. A partir de estos estudios y utilizando a la TTX como herramienta experimental, se generó un campo amplio de investigación en donde diversos grupos han participado y que muestran, por ejemplo, la estructura y especificidad de la toxina, los sitios de unión en el canal (Catteral et al., 1992; Blumenthal, 1995), y los procesos fisiológicos y biofísicos que están implicados en esta unión.

De hecho, los canales de Na^+ son el blanco principal para una gran variedad de toxinas, actualmente se ha establecido la presencia de cuatro diferentes sitios de unión para diferentes toxinas en la subunidad α del canal de Na^+ . Estos sitios son: a) el sitio de unión de la tetrodotoxina (TTX) y saxitoxina (SXT) que bloquea el paso de Na^+ (Catteral et al., 1992), b) un sitio que provoca activación persistente estabilizando la forma abierta del canal, este sitio interactúa con moléculas lipofílicas como los alcaloides batraciotoxina, veratridina y guayanotoxina, así como la ciguatoxina y la brevetoxina (Catteral et al., 1992; Norton, 1991), c) la unión de diferentes polipéptidos aislados de escorpiones (α -toxinas) y de anémonas de mar como la ATXII aislada de la *Anemonia sulcata* (Norton, 1991; Catteral et al., 1992; y Mantegazza et al., 1998) a un sitio específico provoca el retraso en la inactivación del canal, y d) el sitio sobre el que actúa el grupo al que pertenecen las β -toxinas de escorpión que alteran la dependencia al voltaje del proceso de la inactivación del canal (Catteral et al., 1992; Blumenthal, 1995).

También se han descrito numerosas toxinas en particular de origen marino con alta selectividad diferencial para los distintos canales de Ca^{2+} . Por ello, actualmente entre las mejores herramientas utilizadas para diferenciar los diferentes subtipos de estos canales destacan las ω -conotoxinas, por ejemplo, las ω GVIA y ω GVIIA, neurotoxinas paralizantes aisladas del gasterópodo *Conus*

geographus (Olivera et al., 1994) que bloquean canales de Ca^{+2} neuronales del subtipo N (Olivera et al., 1994; Bowersox y Luther, 1998).

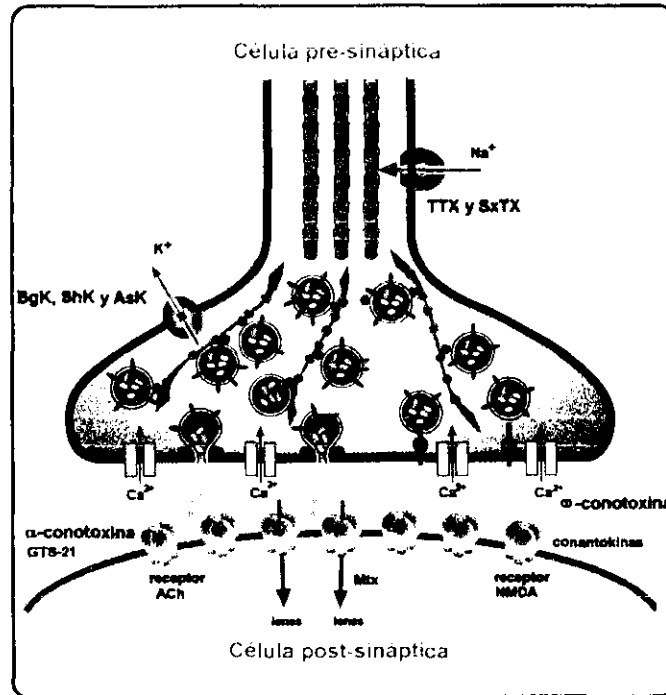


Figura 1. Esquema de una sinapsis química mostrando ejemplos de los canales iónicos y receptores que sirven como blanco de diferentes toxinas de origen marino

Tetrodotoxina (TTX) aislada de un pez tetrodóntido, saxitoxina (SxTX) y maitotoxina (Mtx) aisladas de dinoflagelados. BgK, ShK, y AsK, toxinas aisladas de anémonas. ω -conotoxinas, α -conotoxinas y conantokinas aisladas de gasterópodos. GTS-21 aislada de nemertinos. Modificado de Rappuoli y Montecucco (1997).

Otras toxinas tienen actividad sobre canales de K^+ . Por ejemplo, pequeños péptidos (35 a 37 residuos), con secuencias homólogas, bloquean canales de K^+ dependientes de voltaje en diferentes tipos celulares, estos péptidos han sido

aislados de diferentes géneros de anémonas, como la BgK aislada de *Bunodosoma granulifera*, la ShK de *Stichodactyla helianthus*, y la AsK de *Anemonia sulcata* (Dauplais et al., 1997; Cotton et al., 1997). También se han estudiado extractos de anémonas que bloquean canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (Garateix et al., 2000; Pennington, et al., 1997).

Entre las toxinas que se unen a diferentes receptores se encuentra la GTS-21 aislada de los gusanos marinos llamados nemertinos, esta toxina es agonista del receptor-canal de acetilcolina α_7 pero débilmente antagonista de los $\alpha_4\beta_2$ (Kem, 2000). Además, se han purificado y caracterizado toxinas que bloquean receptores a glutamato como las llamadas conantokinas (Olivera y Steel, 1997; Hammerland et al., 1992).

Han sido descritos otros mecanismos de interacción de las toxinas aisladas de organismos marinos con proteínas de membrana, por ejemplo, se postula que la palytoxina una sustancia aislada del coral *Palythoa* sp. es activa sobre la Na^+-K^+ ATPasa provocando que se comporte como un canal catiónico inespecífico (Wang y Horisberger, 1997). Otro ejemplo lo representa la maitotoxina producida por el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* que parece activar y quizá promover la inserción de canales catiónicos inespecíficos en la membrana celular e incrementa el nivel de Ca^{2+} intracelular (Weber et al., 2000; Bielfeld-Ackermann et al., 1998; Martínez et al., 1999). Por último, a partir de dinoflagelados simbioses del género *Symbiodinium* se han aislado metabolitos secundarios como la simbioramida, un activador de la Ca^{2+} -ATPasa en retículo sarcoplásmico (Kobayashi et al., 1988).

De estos estudios es evidente que la diversidad en las interacciones con la membrana celular confiere a las toxinas naturales un potencial invaluable como herramientas en la investigación, ya que han demostrado ser moléculas claves para elucidar diferentes procesos fisiológicos celulares gracias a su alta selectividad y potencia; así como para identificar, purificar y caracterizar proteínas de membrana ayudando a entender los detalles moleculares de su estructura y función.

La complejidad de la mayoría de los procesos celulares se atribuye a la amplia diversidad de proteínas de membrana que son expresadas en diferentes células. Esta diversidad ha surgido a través de varios mecanismos conocidos, como lo es la expresión de genes homólogos, el corte y empalme (splicing) alternativo y la edición de RNA que generan isoformas moleculares con diferentes propiedades farmacológicas, bioquímicas y fisiológicas. Esto, entre otros motivos, fundamenta el incremento en los últimos años de la búsqueda de toxinas altamente selectivas, para un estudio detallado de ambas moléculas: las toxinas y sus blancos biológicos.

II. Toxinas citolíticas que alteran la permeabilidad de la membrana.

Las membranas biológicas forman un ambiente compartimentalizado que mantiene la integridad celular, y además, en organismos unicelulares es una barrera protectora cuando éstos se encuentran con ambientes hostiles, no es sorprendente entonces, que el rompimiento o alteración de la estructura de las membranas sea una vía efectiva para dañar y eventualmente matar a una célula. Las toxinas que utilizan este mecanismo son llamadas citolisinas (Hessinger, 1988; Kem, 1988b).

Las citolisinas son polipéptidos que no tienen receptores membranales proteínicos, éstas se unen directamente o cortan a los fosfolípidos, esteroides u otros componentes de las membranas (Kem, 1988b; Rossjohn et al., 1997; Anderluh et al., 1999).

La interacción de las citolisinas con la membrana celular está dada principalmente por dos mecanismos: a) Las citolisinas catalíticas, y b) las citolisinas que forman poros en la membrana .

a) Las citolisinas catalíticas. A este grupo pertenecen un tipo de toxinas con actividad de fosfolipasas (enzimas capaces de hidrolizar a los fosfolípidos). Estas

toxinas alteran la permeabilidad y/o la estructura de la membrana celular por cambios químicos debido a su actividad enzimática (Hessinger, 1988; Rowe y Welch, 1994). Se han estudiado citolisinas inhibidas por esfingomielina que forman canales acuosos por degradación directa de fosfolípidos mediante la activación de fosfolipasa A₂ y la consecuente liberación de ácido araquidónico (Galettis y Norton, 1990). Toxinas con actividad de fosfolipasas inhibidas por esfingomielina han sido aisladas de venenos de artrópodos terrestres, serpientes, bacterias y cnidarios (Bernheimer y Rudy, 1986; Turk, 1992; Rowe y Welch, 1994; Rottini et al., 1990, 1995; Grotendorst y Hessinger, 1999; Miguez et al., 1999; Radwan et al., 2001).

b) Citolisinas que forman poros en la membrana celular. Se han sugerido diferentes modelos para describir el posible mecanismo en la formación de estos poros. Uno de los modelos mejor detallados molecularmente es el propuesto por Rossjohn y cols. (1997) para la toxina perfringolisina O aislada de *Clostridium perfringens* una de las citolisinas activadas por tioles (SH-). En este tipo de toxinas el colesterol de la membrana parece actuar como aceptor (Berheimer y Rudy, 1986 ; Rossjohn, et al., 1997), puesto que su actividad citolítica disminuye cuando se agrega colesterol al medio. La formación del poro comienza cuando la citolisina monomérica se une en la superficie de la membrana al colesterol, estudios de mutagénesis y modificaciones químicas sugieren que el sitio de enlace es en un motivo rico en triptofano y un residuo de cisteína de la toxina. Así, esta toxina se concentra en las zonas de la membrana ricas en colesterol promoviendo la oligomerización de monómeros, los oligómeros entonces forman un arco o anillo y se insertan en la membrana hasta atravesarla formando el poro (Fig. 2A). Otro modelo de acción se propone para la α -toxina de *Staphylococcus aureus* en donde se asume a la toxina como un monómero soluble, con sus regiones N- y C-terminales conectados por un asa flexible rica en glicina. Este monómero, se enlaza a la membrana celular comúnmente a través de fosfatidilcolina o colesterol. Posteriormente, a través de un proceso dependiente de la temperatura, diferentes monómeros se oligomerizan formando un hexámero anfifílico, y finalmente, el

oligómero se inserta en la membrana hasta atravesarla formando un canal transmembranal. El poro formado deja pasar iones y pequeñas moléculas hasta un PM aproximado de 2000 (Manestrina y Ferreras 1997; Fig. 2 B). A partir de la caracterización de la citolisina aislada de la anémona *Metridium senile* (Bernheimer et al., 1979), llamada metridiolisina, el estudio de citolisinas formadoras de poros e inhibidas por colesterol, se ha incrementado considerablemente en los últimos años en diferentes especies de anémonas y en otros organismos del phylum Cnidaria (Bernheimer y Rudy, 1986; Alvarez 1998; Anderluh et al., 1999). Sin embargo, el mecanismo de acción detallado a nivel molecular de estas toxinas aún no es entendido por completo.

Gracias a sus propiedades líticas, estas toxinas se han utilizado como herramientas biológicas para permeabilizar diversos tipos de células y organelos, y de esta forma, analizar diferentes funciones del metabolismo celular (Alouf, 1997). Debido a la actividad citotóxica se ha sugerido su uso terapéutico, por ejemplo proponiendo el diseño de conjugados moleculares acoplados a la citolisina unida a una molécula que reconozca específicamente a una célula tumoral (Kem et al., 1990).

Por otro lado, también se han reportado citolisinas de anémonas de mar que interfieren con algunos eventos de la transmisión sináptica, por ejemplo, en la recaptura de GABA y colina (Khoo et al., 1995), y en la liberación de neurotransmisores como el glutamato (Migues et al., 1999).

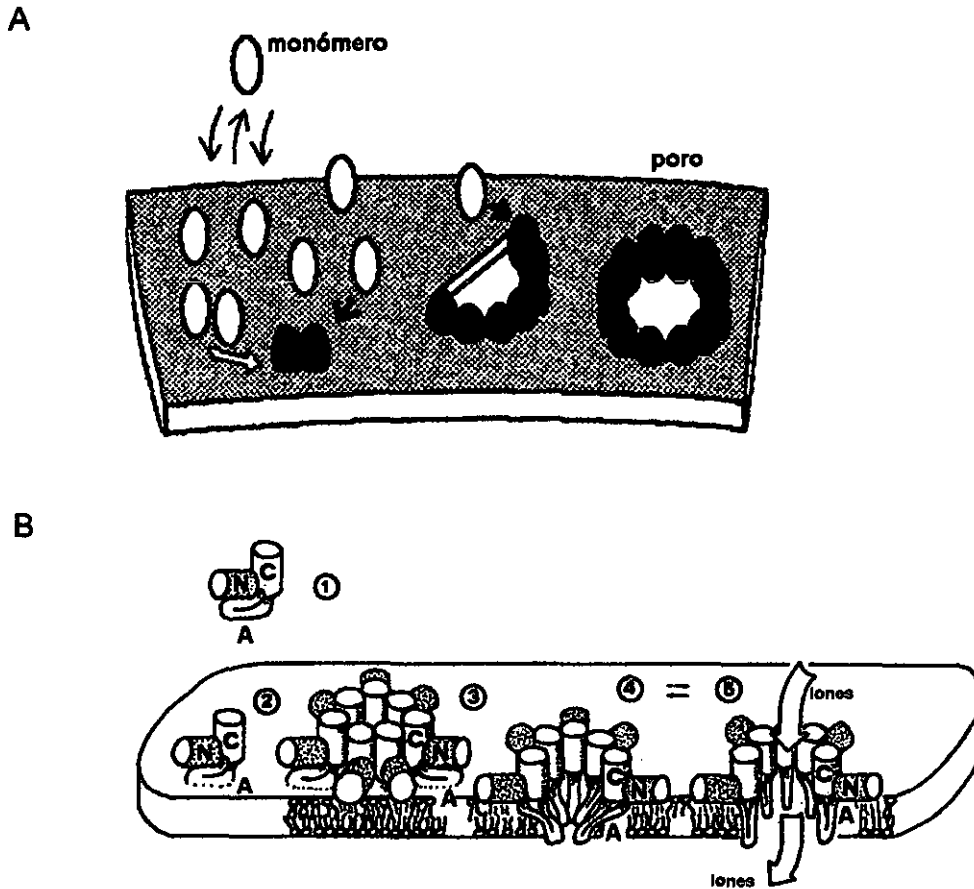


Figura 2. Esquema de dos modelos propuestos para la formación de poros en la membrana celular por citolisinas

A) las toxinas monoméricas se unen al colesterol en la superficie de la membrana, los monómeros se oligomerizan y la inserción de oligómeros en forma de arco y/o anillo en la membrana forman un poro. Modificado de Bhakdi (1997) B) ejemplo de la α -toxina de *Staphylococcus aureus*. 1) la toxina se asume como un monómero soluble con sus regiones N- y C- terminales, conectados por un asa (A) flexible rica en glicina. 2) En un mecanismo independiente de la temperatura, el monómero se enlaza a la membrana celular comúnmente a través de fosfatidilcolina o colesterol. 3) A través de un proceso dependiente de la temperatura, diferentes monómeros se oligomerizan formando un hexámero anfifílico. 4) El oligómero se inserta en la membrana hasta atravesarla formando un canal transmembranal. 5) Poro que deja pasar iones y pequeñas moléculas. Modificado de Manestrina y Ferreras (1997).

El phylum Cnidaria como fuente de toxinas

Uno de los phyla de invertebrados marinos de mayor interés en la búsqueda de toxinas, es el Cnidaria. Este phylum contiene al mayor número de especies tóxicas de todos los phyla de animales, han sido descritas mas de 10,000 especies (Kem, 1988a). Los organismos pertenecientes a este grupo son principalmente marinos, solo algunos hidrozooos son dulceacuícolas. Su distribución es preferentemente en la región tropical (Barnes y Rupert, 1996).

Los cnidarios están divididos en cuatro clases: 1) Hydrozoa, al que pertenecen las hidras, el organismo marino mejor conocido de esta clase es la *Physalia physalis*, comúnmente llamada fragata portuguesa; 2) Schyphozoa, grupo formado por las llamadas medusas verdaderas; 3) Cubozoa, constituida por pequeñas medusas en forma de campana llamadas en inglés "boxjellies" y 4) Anthozoa, clase a la que pertenecen los organismos sésiles conocidos como corales y anémonas (Barnes y Rupert, 1996).

Los Cnidarios son los únicos animales que presentan células especializadas llamadas cnidocitos (Fig. 3A), estas células generan y secretan pequeñas cápsulas de diferentes tipos conocidas como cnidas, de los cuales, los llamados nematocistos son los de mayor importancia (Fig. 3B y C) y se encuentran en todos los cnidarios. Los otros dos tipos de cnidas los spirocitos y los pticocistos solo se han visto en anthozoos. La función principal de los nematocistos es ayudar en la captura de la presa inyectando el veneno que está contenido dentro de las cápsulas. Cuando un nematocisto descarga su contenido, los filamentos son capaces de desplegarse a una gran velocidad. De esta forma, penetran, inoculan el veneno y paralizan a la presa (Rifkin et al., 1996).

Los nematocistos se encuentran distribuidos en todas las partes del cuerpo del cnidario, incluyendo los tentáculos, las regiones oral y estomacal y la epidermis, con base en su morfología han sido descritos diferentes tipos. Los cnida pueden ser estructuralmente similares de una especie a otra, sin embargo, la composición del veneno puede ser muy diferente.

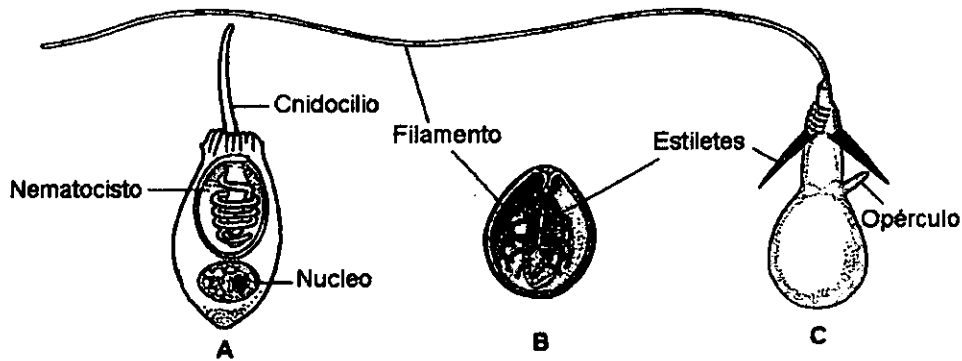


Figura 3. Nematocisto

A) cnidocito, B) nematocisto cargado y C) nematocisto descargado.
Modificado de Nielsen (1995)

Experimentalmente, los estímulos químicos, mecánicos, osmóticos y eléctricos producen el desprendimiento y la descarga de los nematocistos, algunos de estos estímulos podrían provocar la respuesta del cnidario ante la presencia de la presa o del depredador. La mayoría de los estudios sugieren que la descarga (Fig. 4) de los cnida *in situ*, bajo condiciones naturales, requiere principalmente de los estímulos químicos y mecánicos (Rifkin et al., 1996).

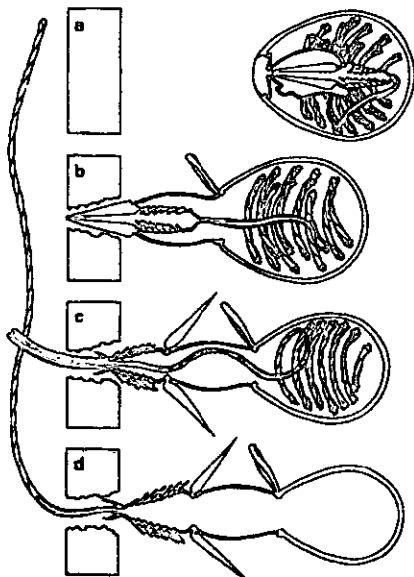


Figura 4. Descarga del nematocisto

a) nematocisto cargado
b) el opérculo se abre y los estiletes rompen el tegumento
c) los estiletes se retraen y el filamento se evagina
d) el filamento termina de evaginarse
Modificado de Tardent (1988).

A pesar de que la toxicidad de los cnidarios es atribuida principalmente al contenido de los nematocistos, también se han investigado extractos de otros tejidos, encontrando también compuestos con actividad biológica en diversos sistemas (Endean et al., 1993; Nagai et al., 2000 a y b).

Han sido realizados diversos estudios que muestran que los componentes del veneno contenido en los nematocistos y en los tejidos de cnidarios presentan una gran variedad de estructuras moleculares, principalmente péptidos y proteínas con una amplia gama de actividad. Por ejemplo, algunas tienen actividad enzimática como: colagenasas, proteasas, elastasas, fosfolipasas y nucleasas (Pong-Prayoon et al., 1991). Otras, por diferentes mecanismos moleculares, presentan actividad neurotóxica (Norton, 1991; Endean et al., 1993), miotóxica (Shyrock y Bianchi, 1983; Endean et al., 1993), cardiotoxica (Ho et al., 1987; Norton et al., 1990), citotóxica (Houck et al., 1996; Carli et al., 1996), vasodilatadora y vasoconstrictora (Loredo et al., 1986; Nagase et al., 1987), hemolítica y/o citolítica (Klung et al., 1988; Cariello et al., 1988; Othman y Burnett, 1990; Rottini et al., 1995; Allavena et al., 1998), entre otras.

Se encuentra bien documentado que estos organismos producen diversas lesiones en humanos, dichas lesiones pueden ser desde ligeras hasta letales dependiendo de la cantidad de veneno inyectada, la susceptibilidad de cada individuo y la composición del veneno. Se ha observado que la mezcla de las diferentes sustancias en el veneno de los nematocistos pueden producir severas reacciones tóxicas sistémicas, crónicas y/o locales como dermatonecrosis, espasmos vasculares, dolor ligero, urticaria, inflamación, dolor agudo, anafilaxis y en algunos casos pueden llegar a ser letales, como lo es el veneno del cubozoo *Chironex fleckerii* uno de los más potentes reportados en animales (Burnett et al., 1995; Bloom et al., 1998).

Existe un gran número de especies de cnidarios descritas e incluso están siendo caracterizadas nuevas especies como por ejemplo la *Chrysaora achlyos* (Martin et al., 1997). Todos estos organismos representan un campo muy extenso de estudio, si consideramos que cada uno de ellos posee su propio equipamiento

de nematocistos con diferentes toxinas actuando probablemente a través de diversos mecanismos.

El veneno producido por los cnidarios que habitan los ecosistemas marinos mexicanos ha sido escasamente estudiado. Estos animales son fuente potencial de sustancias con diferentes mecanismos de actividad biológica, así como de nuevas y diferentes estructuras moleculares.

Evaluación de la actividad biológica

Cada vez se hace de mayor importancia utilizar diferentes estrategias de búsqueda de la actividad toxicológica a nivel molecular, con la finalidad de elucidar y caracterizar en detalle el mecanismo por el cual las toxinas producidas por diferentes organismos provocan sus efectos. En este trabajo fueron utilizadas dos estrategias para estudiar algunos aspectos de la actividad producida por toxinas provenientes de organismos marinos del phylum Cnidaria sobre componentes de la membrana celular: I. Análisis de la actividad eléctrica en ovocitos de *Xenopus laevis*, y II. Análisis de la actividad hemolítica.

I. Análisis de la actividad eléctrica en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Los ovocitos y folículos (el ovocito en comunicación con sus células foliculares) de *Xenopus laevis* debido a su tamaño (aproximadamente 1.2 mm de diámetro) y disponibilidad, permiten ser estudiados con mayor facilidad que otras células aisladas. Contienen una gran diversidad de canales iónicos y receptores nativos que responden a diferentes neurotransmisores, hormonas y péptidos. Además, es un sistema en el cual se pueden expresar receptores y proteínas de membrana de diferentes tejidos a partir de la inyección de mRNA o cDNA exógeno (Miledi et al., 1989a; Goldin y Sumikawa 1992; Arellano et al., 1996).

El folículo ovárico de *Xenopus laevis* es un sistema multicelular complejo formado por un ovocito, rodeado de diferentes capas celulares y no celulares, la capa mas interna llamada vitelina es acelular y separa al ovocito de las células foliculares las cuales se encuentran rodeadas de una membrana basal formada principalmente por colágena. La membrana basal marca una separación entre las células foliculares y los tejidos de la teca en donde se encuentran fibroblastos y vasos sanguíneos. La última capa celular, la más externa del folículo es el epitelio interno (Dumont, 1972; Fig. 5).

Las respuestas eléctricas nativas en ovocito de *Xenopus* están divididas en corrientes iónicas que requieren de la presencia de células foliculares (algunos

ejemplos se muestran en la Fig. 5) y las corrientes que son independientes de ellas, esto es, son generadas en ovocitos desfoliculados (Tabla 1).

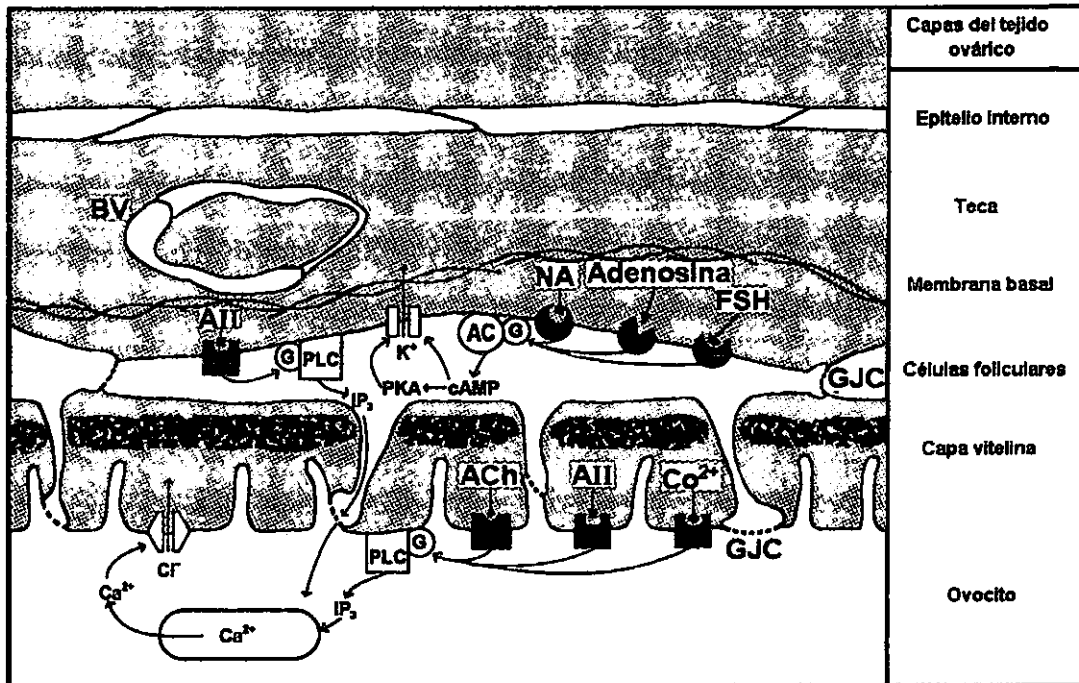


Figura 5. Esquema que muestra las diferentes capas que rodean al ovocito de *Xenopus laevis*

El folículo consiste de cinco distintas capas celulares y no celulares que rodean al ovocito. El acoplamiento eléctrico y metabólico que se mantiene entre las células foliculares y el ovocito es a través de uniones comunicantes. También se ilustran algunos ejemplos de canales iónicos y receptores con diferentes mecanismos de activación. El sombreado indica los espacios extracelulares: BV, vasos sanguíneos; GJC, uniones comunicantes; G, proteína G; AC, adelinato ciclasa; PKA, proteína cinasa A; PLC, fosfolipasa C; FSH, hormona foliculo estimulante; NA, noradrenalina, AII, angiotensina II; ACh, acetilcolina (Modificado de Arellano et al., 1996).

Todas las respuestas que pueden ser utilizadas como sistema de bioensayo para diferentes reacciones membranales, se pueden dividir en dos grandes grupos de acuerdo a su mecanismo de activación:

1) Actividad sobre receptores de membrana que se acoplan preferentemente a dos de los sistemas de segundos mensajeros mejor conocidos (Fig. 5):

a) Activación de receptores acoplados a proteínas G que vía adenilato ciclasa (AC) estimulan la síntesis de cAMP activando a su vez canales selectivos a K^+ o Cl^- (Miledi y Woodward 1989; Arellano y Miledi 1993, 1994). Este mecanismo es activado por sustancias transmisoras como dopamina, noradrenalina, adenosina (Fig. 6D), hormona foliculo estimulante (Fig. 6E), y prostaglandinas, entre otros (Arellano et al., 1996).

Tabla I. Respuestas electrofisiológicas nativas caracterizadas en ovocitos desfoliculados de *Xenopus laevis*

Principal Ion	Propiedades del canal	Referencias
Na^+	-Activados por despolarización prolongada -Activados por NH_4^+ -Sensibles a amiloride	79, 26, 42 29 168
K^+	-Bloqueados por TEA^+ y Ba^{2+} -Sensibles a TEA^+ e insensibles a Ba^{2+} -Canales de K^+ (IsK, minK)	76, 30 131, 101 155
Ca^{2+}	-Dependientes de voltaje (T_{out}) - Activados por el vaciado de reservorios intracelulares (I_{crac})	45, 132, 112 175, 97, 63, 47
Catiónicos No selectivos	-Mecanosensibles (I_{MS}) -Hemicanales de uniones comunicantes (I_C) -Inducidos por palitoxina -Permeables a NH_4^+ -Inducidos por maitotoxina	66, 178, 173, 174 12, 50, 177 165 30, 31 20, 169
Cl^-	-Activado por Ca^{2+} . $I_{Cl(Ca)}$ (oscilatoria, T_{in} , y T_{out}). -Inducidos por hiperpolarización	13, 113 133, 91
Agua		1, 150

b) Activación de receptores acoplados a proteínas G, las cuales estimulan a la fosfolipasa C (PLC) aumentando la síntesis de IP_3 y provocando la liberación de calcio intracelular que a su vez activa canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} (Kusano et al., 1982; Miledi y Parker 1984; Oron et al., 1985). Esta cadena de eventos puede ser activada a través de la estimulación de receptores específicos a sustancias como acetilcolina (Kusano et al., 1982; Fig. 6A y B), un factor de

suero, angiotensina II y cationes divalentes (Miledi et al., 1989b; Tigyi et al., 1990; Woodward y Miledi, 1991).

2) Activación de diversos canales dependientes de voltaje; por ejemplo, de Ca^{2+} (Miledi 1982), de Na^+ (Baud et al., 1982) y de K^+ (Peres et al., 1985). También, aquellos canales activados por cambios de volumen celular (Arellano y Miledi, 1993, 1994, Perez-Samartin et al., 2000) y por la remoción de cationes divalentes del medio externo entre otros (Arellano et al., 1995; ver Fig.6C).

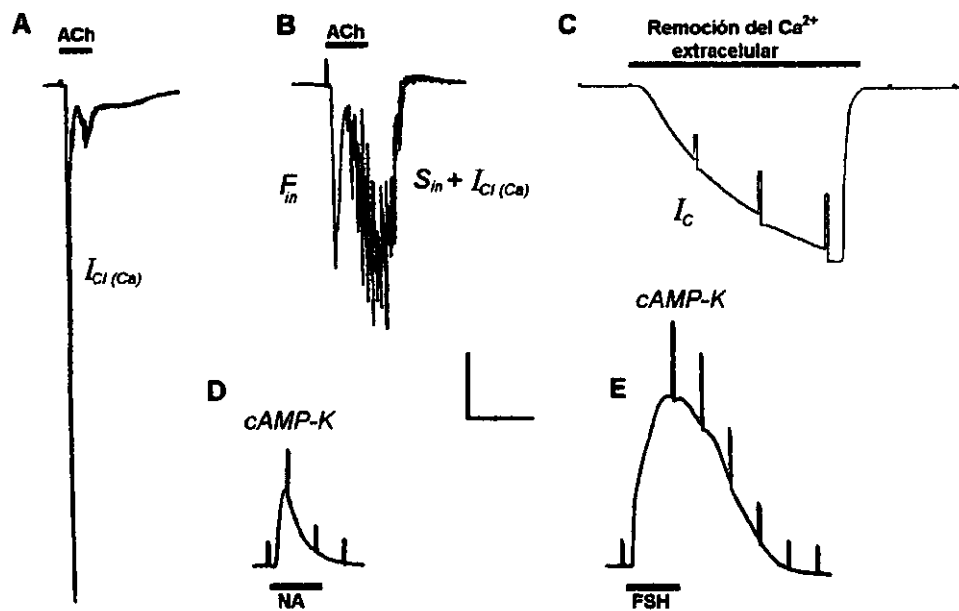


Figura 6. Registros electrofisiológicos característicos de respuestas a diferentes agonistas y condiciones experimentales en ovocito de *Xenopus laevis*

Utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (ver sección de métodos). A) y B) Corrientes complejas de Cl^- que incluyen componentes independientes de Ca^{2+} (F_{in} , S_{in}) y dependientes de Ca^{2+} ($I_{Cl(Ca)}$) producidas por ACh; C) Corriente catiónica inespecífica llamada I_C , producida por la remoción de Ca^{2+} extracelular. D) y E) Corrientes de K^+ activados por cAMP producido por la aplicación de noradrenalina (NA) y hormona foliculo estimulante (FSH). Se aplicaron pulsos periódicos de voltaje con el fin de evaluar la resistencia de la membrana, en los registros D y E de +10mV y en el C de +20 mV. Las barras de escala corresponden a: horizontal; 240 s (A, D,E), 120 s (B) y 50 s (C). Vertical; 100 nA (A,B,D,E) y 1 μA (C). (Modificado de Arellano et al., 1996).

Las respuestas electrofisiológicas que permiten ser evaluadas para determinar la actividad de diferentes toxinas son características del agonista aplicado o de las condiciones experimentales utilizadas, algunos ejemplos se muestran en la figura 6.

Actividad hemolítica

Dentro de los métodos más usados para el estudio de la interacción de toxinas con lípidos, y otras moléculas asociadas a éstos, se encuentra la evaluación de la presencia de actividad citolítica, utilizando principalmente el modelo de lisis de eritrocitos en diferentes especies de mamíferos. Las hemolisinas, nombre de las toxinas que tienen la capacidad de romper eritrocitos, se encuentran en una amplia diversidad de organismos.

Los eritrocitos de mamífero no tienen núcleo ni membranas intracelulares, básicamente son células que transportan hemoglobina. La membrana del eritrocito es homogénea, al parecer sus proteínas están mas o menos uniformemente distribuidas en el plano de la membrana sin grandes zonas especializadas; la proteína mayoritaria es la llamada banda 3 que forma un canal intercambiador de HCO_3^- y Cl^- ésta puede llegar a constituir hasta un 30 % del total de proteínas de la membrana del eritrocito. La composición de los lípidos membranales es variable dependiendo de la especie (Voet y Voet, 1995).

Independientemente del significado biológico de la hemólisis, ésta es una actividad biológica que representa un método sencillo y cuantitativo para detectar la presencia de citolisinas (Rowe y Welch, 1994). Brinda diferentes ventajas, cómo por ejemplo, la disponibilidad de los eritrocitos y el mantenimiento de éstos es relativamente fácil, la propia hemoglobina funciona como marcador, y se ha demostrado que sustancias liticas para otros tipos celulares, también afectan a los eritrocitos. Así, es razonable asumir que el mecanismo por el cual se lisan los eritrocitos es el mismo que en otros tipos de células eucariontes, esto puede estar reflejado en la actividad citotóxica que está asociada a las hemolisinas (Bernheimer, 1988).

La hemólisis o “porcentaje de hemólisis” puede ser estimado utilizando cualquiera de los siguientes métodos: a) midiendo la hemoglobina liberada en un periodo determinado de tiempo después de mezclar a la toxina con los eritrocitos, b) midiendo cambios en las propiedades ópticas de la reacción completa de la mezcla en función del tiempo, ya sea por absorbencia o dispersión de luz, y c) contando en un hemocitómetro el número de eritrocitos que permanecen después de un periodo de tiempo seguido a la aplicación del agente lítico (Bernheimer, 1988).

La importancia *in vivo* de la lisis de células sanguíneas por las hemolisinas no es clara, sin embargo, especialmente en cnidarios, la principal función de las citolisinas parece ser el rompimiento del integumento de la presa o depredador y podrían estar participando en la digestión (Kem, 1988a).

ANTECEDENTES

En el Mar Caribe mexicano podemos encontrar un gran número de invertebrados marinos, entre ellos los que pertenecen al phylum Cnidaria. En el inicio del presente estudio, la falta de información acerca de los compuestos bioactivos de estos organismos hizo necesaria la exploración de diferentes especies. De esta forma fueron exploradas inicialmente las posibles actividades electrofisiológicas y hemolíticas de extractos de las siguientes medusas : *Linuche unguiculata*, *Carybdea alata* y *Cassiopea xamachana*. La anemona *Condylactis gigantea*, los hidrocorales *Millepora complanata* y *Millepora alcicornis*. Partiendo de los resultados de esta exploración, abundancia y distribución de la especie, así como la accesibilidad para la captura, decidimos enfocar el estudio a las toxinas responsables de las actividades producidas por el veneno de la medusa *Cassiopea xamachana* .

La reproducibilidad de los resultados en una investigación de esta naturaleza depende en gran medida de la identificación taxonómica de la especie con la que se está trabajando. Por otro lado, el conocimiento de la biología y observación de los hábitos del organismo ayudan a dirigir el estudio de la bioactividad de las sustancias que produce. Con este propósito, a continuación se describen brevemente las características biológicas y antecedentes de estudios bioquímicos y de bioactividad de la medusa *Cassiopea xamachana*.

LA MEDUSA *Cassiopea xamachana* R.P. BIGELOW (1892)

Clasificación y hábitos

Phylum	Cnidaria
Clase	Scyphozoa
Orden	Rhizostomeae
Familia	Cassiopeidae
Género	<i>Cassiopea</i>

Los cnidarios presentan dos formas corporales características, el pólipo y la medusa (Fig. 7). Típicamente el pólipo es sésil, su cuerpo es cilíndrico con el extremo oral dirigido hacia arriba y el extremo opuesto fijo al sustrato (Barnes y Rupert, 1996), la medusa en cambio es libre nadadora.

A la clase Scyphozoa pertenecen los organismos que presentan como estado dominante en su ciclo de vida la forma de medusa, la polipoide está restringida a un pequeño estado sésil. Todas las medusas, se asemejan más o menos a una sombrilla invertida, plato, disco o campana que se le llama umbrela. Son muy conspicuas por su talla y coloración, normalmente miden de 2 a 40 cm de diámetro y a menudo se encuentran en la playa después de vientos fuertes o mal tiempo. A este grupo pertenecen las llamadas medusas verdaderas (Segura-Puertas, 1984 ; Rifkin et al., 1996). Existen alrededor de 200 spp descritas de scyphozoos que viven tanto en mares fríos como en tropicales, algunas a gran profundidad (Barnes y Rupert, 1996).

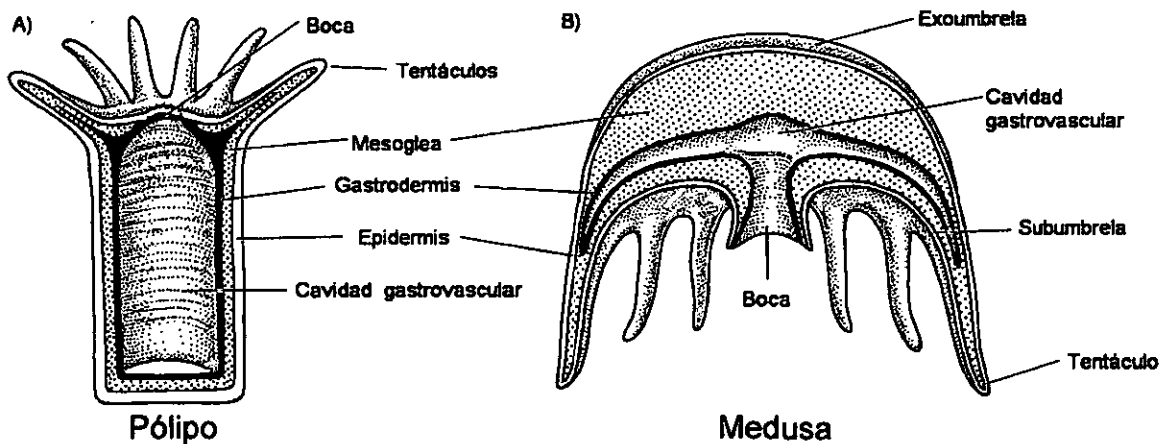


Figura 7. Anatomía general de un cnidario
Modificado de Barnes y Rupert (1996).

Las diferencias anatómicas que permiten reconocer a las medusas son su sistema central o vegetativo, y su sistema marginal o sensorial. El sistema central en los scyphozoos presenta un manubrio, boca, cavidad gastrovascular, apéndices orales y gónadas. El manubrio se extiende para formar los brazos orales. En los scyphozoos y cubozoos la capa interna de la cavidad gastrovascular puede extenderse, y formar filamentos o cirros gástricos. Los filamentos contienen enzimas digestivas y nematocistos. El sistema marginal o sensorial está formado por ondulaciones, tentáculos marginales, y órganos de los sentidos como el ropalio y la pedalia. El ropalio se encuentra entre cada par de ondulaciones y cada ropalio está compuesto por ocelos y estatocistos estos últimos son órganos del equilibrio (Segura-Puertas, 1984 ; Rifkin et al., 1996).

Lo que caracteriza a las medusas del orden Rhizostomae de otras medusas es la presencia de brazos orales, estos brazos orales a diferencia de los tentáculos crecen a partir del margen de la boca, se ramifican y presentan múltiples bocas (Barnes y Rupert, 1996). Tienen ocho brazos orales ramificados con pliegues muy profundos hacia los que dirige el alimento, estos pliegues son las llamadas "bocas secundarias" que se comunican con los canales del manubrio y éstos con el estómago; la boca primitiva desaparece como consecuencia de la fusión de los brazos orales, excepto en *Stomolophus*. Poseen de 8 a 16 ropalios, y pequeños apéndices filamentosos usados para capturar y paralizar a la presa. La mayoría son tropicales o subtropicales de aguas someras.

El género *Cassiopea* en inglés coloquial es llamado comúnmente "upside down jellyfish" (medusa invertida) debido a la posición que adoptan en su hábitat. Normalmente el animal puede permanecer en el fondo con la superficie exumbrelar sobre el sustrato y los brazos orales hacia arriba, esta posición le facilita conseguir su alimento (Barnes y Rupert, 1996). El nombre de este organismo se puede encontrar indistintamente de dos diferentes formas *Cassiopeia* y *Cassiopea*. Han sido descritas cerca de 17 spp de este género (Rifkin et al., 1996).

Las especies del género *Cassiopea* habitan en lagunas costeras y remansos de manglares, se han visto particularmente en el océano Pacífico, en los

alrededores de Hawai, en el oeste de la India, Caribe y las Antillas, norte, este y sur de Australia, así como en Malasia, Fiji y Nueva Caledonia (Rifkin et al., 1996).

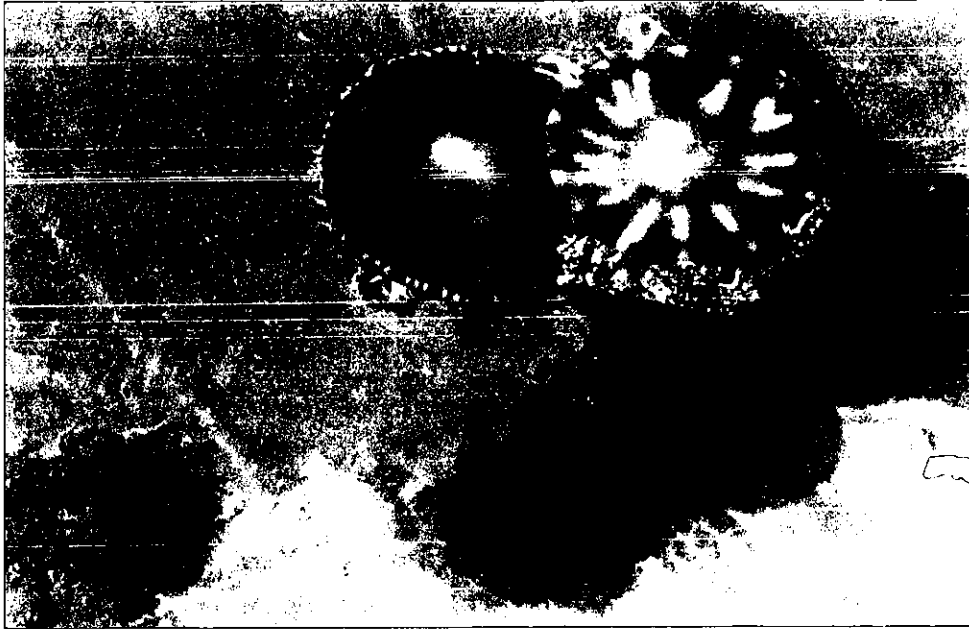


Figura 8. Organismos adultos de *Cassiopea xamachana*

Diagnosis

***Cassiopea xamachana* R.P. Bigelow**

La umbrela tiene forma de disco con el margen adelgazado, un diámetro que puede alcanzar hasta 40 cm y tiene una concavidad distintiva en el centro (Fig. 8). En el margen se observan cinco ondulaciones cortas entre las cuales se encuentran de 11 a 22 lóbulos ropalares. Del centro de la superficie subumbrelar se proyecta el disco de los brazos orales, de dicho disco surgen los 8 brazos orales característicos con un tamaño aproximado de 1.25 veces el radio de la umbrela. Los brazos orales en corte transversal tienen forma triangular, y cada brazo presenta de 10 a 15 ramificaciones primarias, las que a su vez dan origen a

ramificaciones secundarias. Presenta una región oral central que se prolonga a lo largo de las ramificaciones primarias y secundarias, con bocas múltiples en las ramificaciones secundarias. Se observan apéndices en forma de filamentos que están asociados a las ramificaciones primarias y a la superficie de la región oral del disco de los brazos orales, estos últimos son más largos y presentan agrupaciones de nematocistos. La coloración es variable, de grisáceo a grisazulado, así como de café a amarillo. La apariencia de la exumbrela es de un círculo y rayas radiales (Bigelow, 1892).

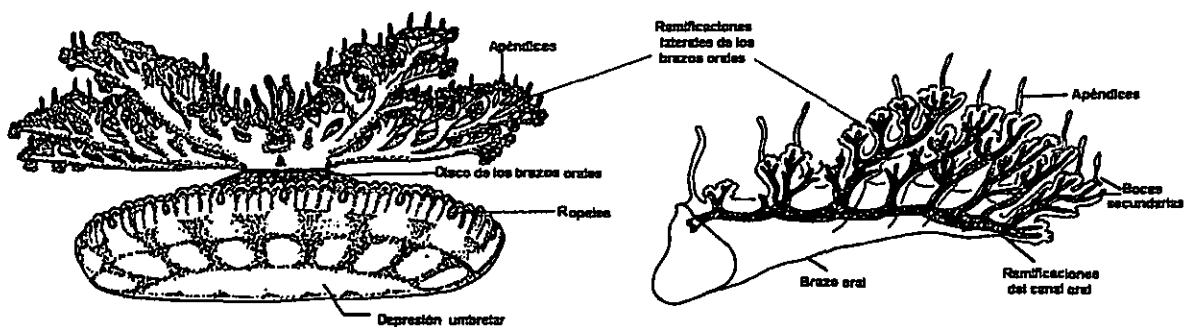


Figura 9. Esquema anatómico de *Cassiopea xamachana*
Individuo adulto y acercamiento del brazo oral. Modificado de Rifkin (1996).

Cassiopea xamachana posee un pigmento azul difundido dentro de la porción acelular de su mesoglea. Los pigmentos de una amplia variedad de cnidarios son carotenoproteínas, existen varias especulaciones con respecto a su función, por ejemplo, parecen actuar como filtros a la luz ultravioleta (Blanquet y Phelan, 1986).

De más de 30 tipos de cnida que han sido descritos en diferentes especies, esta medusa presenta nematocistos de dos diferentes tipos, unos son ovoides de 12-15 μm , clasificados como euriteles, y otros son redondos y mas pequeños 6-9 μm identificados como holotricos isorrizas (Golber y Taylor, 1997).

La reacción que presentan las personas que han tenido contacto con *Cassiopea xamachana* es considerada de moderada a severa. Los síntomas locales en el área afectada son eritema, urticaria, generación de ámpilas,

hinchazón y dolor intenso. Estos pueden ir acompañados de padecimientos sistémicos como son calambres musculares, expectoración mucosa, dolor en las articulaciones, vómito y tos intensa (Halstead, 1978; Rifkin et al., 1996).

Hábitos alimenticios

Casi todos los cnidarios son carnívoros, las medusas preferentemente tienden a agregarse en capas oceánicas de temperatura y salinidad discontinuas que son zonas donde se concentra el zooplancton.

Algunas medusas pueden adoptar comportamiento solitario, mientras que otras forman grupos numerosos rodeando a las pequeñas presas. Generalmente se alimentan moviendo sus tentáculos continuamente hasta atrapar a su presa. Algunas especies como *Cassiopea sp* crean turbulencias para atraer el alimento al alcance de sus brazos orales, los organismos que entran en contacto con la medusa son inmovilizadas por el veneno de los nematocistos, dirigidas hacia la boca y tragados, dentro del organismo enzimas gástricas digieren el alimento (Rifkin et al., 1996).

Cassiopea xamachana en acuario puede ser alimentada con *Artemia salina*, usa movimientos del margen umbrelar y secreción de cordones mucosos para atrapar al alimento, al parecer, de la misma forma que ha sido descrita para *Cassiopea frondosa*. En *C. frondosa*, la proximidad del alimento actúa como un estímulo para las vesículas orales en donde se encuentran pequeños sacos de nematocistos y células mucosas que son disparadas a través de la boca a cualquier posible alimento cercano, una vez capturadas las presas son paralizadas y conducidas por cordones mucosos a las múltiples bocas (Smith, 1936; Hickman et al., 1993).

Cassiopea xamachana, como otras especies de cnidarios, posee dinoflagelados simbioses, en este caso de la especie *Symbiodinium microadriaticum*, los cuales también le suministran algunos nutrientes por un mecanismo de translocación (Fitt y Trench, 1983).

Estudios bioquímicos y de actividad biológica

De las cuatro clases que pertenecen al phylum Cnidaria, las toxinas aisladas de la clase Anthozoa han sido las más estudiadas, especialmente las de anémonas. De las otras tres clases que comprenden más de 4000 spp se han estudiado alrededor de 15 spp.

La investigación con el veneno de scyphozoos, así como de hidrozoos y cubozoos (que data de hace aproximadamente 30 años), se ha desarrollado lentamente debido principalmente a las siguientes razones: a) algunos animales no son muy abundantes, otros se encuentran en zonas muy aisladas y otros solo se pueden encontrar en épocas restringidas del año; b) se requiere una gran cantidad de material crudo (Burnett, 1990) y c) se conoce la dificultad en la purificación de las toxinas activas ya que son lábiles y tienden a agregarse, disociarse y enlazarse con otros componentes no tóxicos del veneno o a las resinas utilizadas para su purificación (Othman y Burnett, 1990). A esto se puede agregar que poblaciones separadas geográficamente de la misma especie pueden presentar variantes en los componentes tóxicos del veneno (Kem, 1990).

En el intento por purificar compuestos de estos cnidarios se han utilizado diversos métodos bioquímicos como son cromatografía en columnas de filtración en gel, intercambio iónico e inmunofinidad y enfoque isoeléctrico, entre otros. Sin embargo cada uno de ellos ha presentado problemas específicos para llegar a la purificación de una toxina bioactiva. Sólo se puede encontrar un antecedente en la literatura, de una toxina citolítica purificada y parcialmente secuenciada proveniente de un scyphozoo (Lotan et al., 1996).

Dentro de la bioactividad producida por el extracto crudo proveniente de nematocistos de diferentes especies, podemos mencionar los siguientes ejemplos: de *Physalia physalis* ha sido estudiado el bloqueo reversible de las respuestas provocadas por glutamato en neuronas del gasterópodo *Zachrysis guanensis* y del acocil *Cambarus clarkii* (Mas et al., 1989), la entrada de Ca^{2+} en varias líneas celulares (L-929, GH4C1, FRL) y células embrionarias de corazón de pollo (Edwards y Hessinger, 2000), y la actividad hemolítica debida a una proteína lábil con un tamaño molecular de aproximadamente 240 000 Da (Bernheimer y

Rudy, 1986). En los cubozoos, ha sido estudiada la vasoconstricción producida en músculo liso arterial por el veneno de *Carybdea rastonni* (Azuma et al., 1986); se han encontrado toxinas hemolíticas para células de diferentes mamíferos en *Carybdea marsupialis* (Rottini et al., 1995) y *Chironex fleckeri* (Bernheimer y Rudy, 1986 ; Calton y Burnett, 1988). De las medusas que pertenecen al grupo de scyphozoos se han estudiado también diversas actividades biológicas, por ejemplo, la despolarización irreversible del músculo de rana debida a un aumento de permeabilidad a iones de Na^+ por el veneno de *Aurelia sp* (Kihara et al., 1988), citotoxicidad y hemólisis en *Rhizostoma pulmo* (Carli, et. al., 1996, Cariello et al., 1988). El veneno de *Chrysaora sp* abre canales catiónicos permeables a Na^+ , K^+ , Cs^+ y Li^+ , en tejido neuronal de rana (Dubois et al., 1983).

De la composición y bioactividad del veneno producido por el scyphozoo *Cassiopea xamachana*, se ha descrito actividad enzimática anticolinérgica debida a sustancias no peptídicas de bajo peso molecular (Karlsson et al., 1991). Recientemente reportamos la actividad hemolítica en eritrocitos humanos inhibida por colesterol, gangliósidos y fosfatidilcolina, actividad de fosfolipasa A_2 , actividad dermonecrótica y vasopermeabilidad de diferentes fracciones de una cromatografía de filtración molecular. La letalidad reportada en ratones es de 1.6 mg Kg^{-1} determinada con proteína del extracto crudo de los brazos orales (Radwan et al., 2001).

HIPOTESIS

El veneno de los Cnidarios como la medusa *Cassiopea xamachana* posee toxinas con actividad biológica. La base molecular de los efectos de las toxinas reside en su interacción con componentes de la membrana celular.

OBJETIVOS

- 1) Determinar la actividad biológica del extracto de la medusa *Cassiopea xamachana* utilizando métodos electrofisiológicos y análisis de su capacidad hemolítica.
- 2) Caracterizar la actividad eléctrica provocada por las toxinas en ovocitos de *Xenopus laevis*
- 3) Extracción, caracterización química, y purificación parcial de la(s) toxina(s) bioactivas.

MÉTODOS

RECOLECTA

La recolecta, identificación y extracción de las sustancias biológicamente activas producidas por animales marinos son pasos extremadamente críticos para su investigación. Inicialmente no se conoce la concentración de una toxina presente en un organismo, por lo tanto, siempre existe la incertidumbre de cuantos individuos deben ser capturados, ésto puede ser crucial especialmente si el área de recolecta no es accesible; además, en esta situación es importante considerar evitar la sobrecolecta que podría resultar nociva para la población de los organismos. Por otro lado, especímenes de poblaciones separadas geográficamente y de diferente temporada del año, pueden poseer otras variantes de sustancias activas (Kem, 1988a, Radwan et al., 2001). Esto implica dos procedimientos a considerar: a) el primero representa la necesidad de capturar a los animales en número suficiente para todo el estudio en una sola recolecta, o b) analizar la actividad biológica de organismos de la misma especie por separado dependiendo de las diferentes zonas o época de recolecta, para poder definir posibles variaciones.

El Mar Caribe mexicano alberga una gran diversidad de nichos ecológicos en los que habitan diferentes especies de invertebrados marinos del phylum Cnidaria. La búsqueda y recolecta de los organismos estudiados en este trabajo se realizó en lagunas arrecifales y lagunas costeras del Estado de Quintana Roo utilizando técnicas sencillas con redes de mano desde la embarcación, y buceo libre o autónomo dependiendo del espécimen.

Los ejemplares de *Cassiopea xamachana* (que será llamada Cx) fueron colectados en las lagunas de Bojórquez (latitud 21°31' / longitud 86°44'), Xel-ha (20°24' / 87°18'), X'Caret (20°34' / 87°07') y Chankanaab (20°26' / 86° 59'; Fig. 10), en los meses de febrero, mayo, agosto y noviembre.

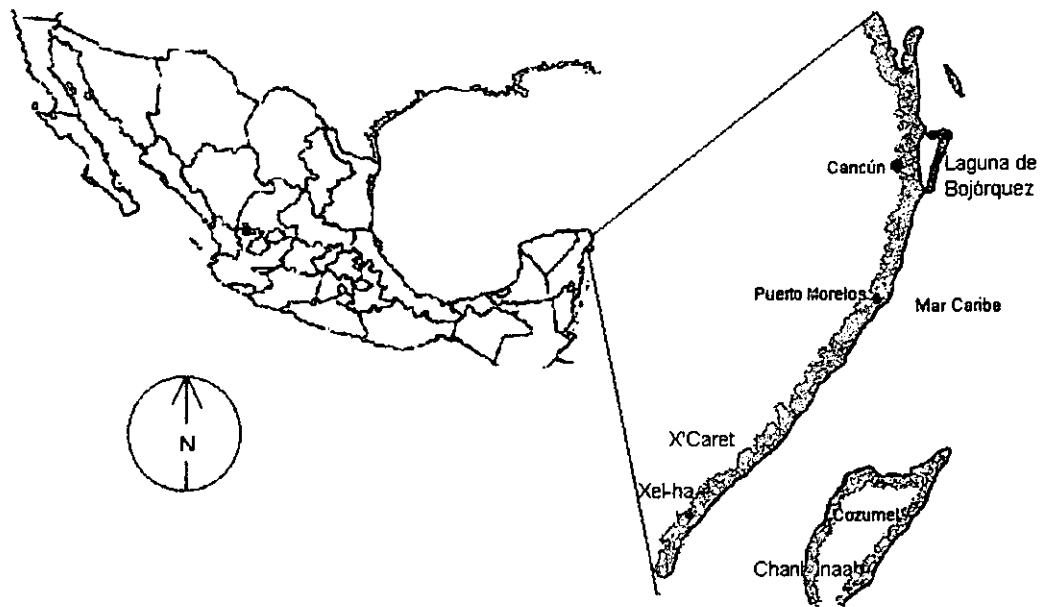


Figura 10. Area de colecta de la medusa *Cassiopea xamachana*
Los organismos fueron colectados en las lagunas de Bojórquez, X'Caret, Xel-ha y Chankanaab en el Estado de Quintana Roo, México.

La captura de los organismos fue realizada en diferentes zonas y temporadas del año, con la finalidad de identificar alguna posible variación en la composición de sustancias bioactivas producidas por diferencias en el hábitat y estacionalidad. Las medusas fueron mantenidas durante un máximo de 15 días en estanques con agua de mar, alimentándolos con *Artemia salina*; durante este periodo se identificaron taxonómicamente y se hicieron observaciones de sus hábitos alimenticios.

EXTRACCIÓN DEL VENENO

Los puntos esenciales a considerar para la obtención de un extracto de cnidarios son : 1) preservar la potencia de la actividad biológica; 2) minimizar el contenido de sales, y 3) separar a los nematocistos de otros componentes celulares (Burnett, 1992).

En esta investigación, fueron utilizadas 3 estrategias diferentes para la preparación de los extractos de *Cx*. Las estrategias fueron modificadas de métodos previamente publicados considerando algunas necesidades especiales al trabajar con esta medusa.

Los extractos fueron obtenidos por: a) la trituración del tejido completo de los brazos orales, b) la recuperación de la secreción mucosa que produce *Cx*, y c) la estimulación eléctrica facilitando así la descarga de los nematocistos en individuos vivos. En la estandarización de estos métodos de extracción fue importante analizar el número de nematocistos presentes en las diferentes muestras y el porcentaje de descarga. Este análisis fue realizado haciendo observaciones con ayuda de un microscopio compuesto para identificar el tipo de nematocistos y determinar el estado cargado o descargado de los mismos durante los tres procedimientos que son descritos de forma breve a continuación:

a) Trituración del tejido completo de los brazos orales

Los brazos orales de *Cx* fueron triturados manualmente y se mantuvieron 24 h con agua destilada a 4°C, después, fueron centrifugados a 1620 g durante 10 min, el precipitado se recolectó y liofilizó. Este precipitado fue observado al microscopio y se cuantificaron los nematocistos. Estos procedimientos no produjeron descarga importante de los nematocistos, lo cual permitió transportar las muestras con los nematocistos sin descargar y así preservar la potencia de la actividad del veneno aún contenido en las cápsulas.

Con el fin de inducir la descarga de estos nematocistos, el liofilizado fue resuspendido en agua desionizada durante 2 minutos $100 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ y centrifugado a 1932 g durante 30 min. Los parámetros seleccionados de resuspensión y centrifugación fueron los óptimos para producir un mayor porcentaje de descarga (cuantificado por inspección microscópica) en los nematocistos sin que los dinoflagelados sufrieran alteraciones físicas. El sobrenadante se recolectó y centrifugó nuevamente a 11,130 g durante 15 min con el fin de disminuir las partículas en suspensión, finalmente la muestra fue filtrada ($0.45 \mu\text{m}$). Todo el procedimiento fue realizado a 4°C.

La eficiencia del método de descarga de los nematocistos por resuspensión y centrifugación dependió del tiempo de almacenamiento del extracto liofilizado; se observó que conforme pasa el tiempo, el rompimiento de las cápsulas es más difícil. Alternativamente, en muestras no frescas, previamente a la centrifugación, la descarga fue realizada por sonicación (utilizando un Ultrasonic cell disrupter) aplicando 6 pulsos, con una intensidad del aparato de 6, en periodos de 20 segundos, y esperando 10 segundos entre cada periodo.

Utilizando una estrategia similar han sido realizados diversos estudios de extractos crudos provenientes de animales completos, tentáculos o brazos orales, preparados por homogenización y centrifugación de la muestra, utilizando diferentes parámetros de velocidad y tiempo. Entre las especies estudiadas de esta forma se encuentran: *Chironex fleckeri* (Burnett, 1992; Endean et al., 1993), *Physalia physalis* (Mas et al., 1989), *Carybdea rastonni* (Azuma et al., 1986), *Stichodactyla helianthus* (Lanio et al., 2001).

b) Secreción mucosa que produce la medusa.

Las Cx producen una secreción mucosa cuando son sometidas a estrés o cuando el organismo se prepara para alimentarse. La secreción se indujo aplicando un estímulo mecánico que consistió en manipulación extrema de diferentes ejemplares de Cx, esta secreción se recolectó y liofilizó directamente. El liofilizado fue resuspendido durante 2 minutos en agua desionizada a $50 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$. El procesamiento de este liofilizado para la descarga de los nematocistos se efectuó de forma similar al del procedimiento descrito en a).

El estudio de secreciones mucosas ha sido realizado principalmente en anémonas, este tipo de extractos han demostrado contener un gran número de nematocistos y toxinas con significativa actividad biológica (Garateix et al., 1995; Mígués et al., 1999; Garateix et al., 2000).

c) Estimulación eléctrica

El tercer extracto fue obtenido con la aplicación de estímulos eléctricos a Cx utilizando dos electrodos de carbón, el electrodo positivo se colocó en el agua y el

negativo en el disco de los brazos orales, y fueron aplicados estímulos eléctricos de 40-50 mA durante 1 minuto a una medusa colocada en un recipiente con 200 ml de agua desionizada (método modificando de Malpezzi et al., 1993). Este procedimiento se realizó en 6 u 8 individuos en los mismos 200 ml de agua y posteriormente el agua fue liofilizada. El liofilizado fue resuspendido durante 2 minutos en agua desionizada $10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$, se cuantificaron nematocistos y se centrifugó a 11,130 g durante 15 min, finalmente el extracto fue filtrado ($0.45\mu\text{m}$). Todo el procedimiento fue realizado a 4°C . En este método tanto el choque eléctrico como el osmótico contribuyeron a la descarga de los nematocistos. La intensidad y el tiempo óptimos en la aplicación de los estímulos eléctricos para obtener el mayor número de nematocistos descargados, fueron establecidos considerando principalmente la fragilidad de la medusa. El número de estímulos eléctricos aplicados a un individuo dependió del tiempo que requiere la medusa para comenzar a producir la secreción mucosa como respuesta al estrés producido por las descargas eléctricas.

La recuperación del veneno después de aplicar estímulos eléctricos o mecánicos a organismos vivos, produciendo la descarga de los nematocistos al medio ha sido utilizado para la cubomedusa *Chironex fleckeri* (Hessinger, 1988; Burnett, 1992) y en la anémona *Bunodosoma caissarum* (Malpezzi et al., 1993).

PURIFICACIÓN DE LOS NEMATOCISTOS

En este estudio, con el objetivo de purificar a los nematocistos principalmente aislándolos de tejidos y dinoflagelados simbiotes de *Cx*, fueron ensayados dos procedimientos de separación por densidad con los extractos provenientes de los brazos orales y de la secreción mucosa, de la forma siguiente:

a) Resuspendiendo el liofilizado de la muestra total de *Cx* en agua de mar artificial sin Ca^{2+} - Mg^{2+} (mM) : NaCl 462, Na_2SO_4 7.0, KCl 10.7 y NaHCO_3 2.1 pH 7.4 en agua desionizada y por centrifugación en gradientes discontinuos de Percoll 20,

40, y 60 % a 600 g durante 10 min, modificando el método de Garson y cols. (1998) descrito para aislar nematocistos que se adhieren a esponjas de mar.

b) Resuspendiendo el liofilizado de la muestra total de Cx en agua de mar artificial sin Ca^{2+} - Mg^{2+} y por centrifugación de gradientes discontinuos de sacarosa 2, 4, 6, y 8 % a 600 g durante 10 min.

El éxito en el aislamiento de nematocistos de los tejidos de un cnidario depende de la fragilidad de éstos para descargar su veneno la cual es específica del tipo de nematocisto, de la especie y de los estímulos aplicados durante el proceso de separación. Debido a esto, durante los procedimientos de purificación de los nematocistos fueron considerados los siguientes parámetros: a) cambios osmóticos, b) centrifugación, c) pH, y d) la concentración de cationes divalentes extracelulares. Experimentos realizados con diferentes tipos de nematocistos, sugieren que el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular está involucrado en su descarga (Burnett y Calton, 1986; Thorington y Hessinger, 1986; Salleo et al., 1994; Mire-Thibodeaux y Watson, 1993).

La obtención de los nematocistos separándolos de tejidos ha sido posible también utilizando otros métodos, por ejemplo: a) por métodos mecánicos como filtración, en la medusa *Chrysaora quinquecirrha* y en la cubomedusa *Carybdea marsupialis* (Burnett, 1992; Rottini et al., 1995), y b) por citometría de flujo en *Physalia physalis* (Burnett et al., 1986).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VENENO DE *Cassiopea xamachana*

Análisis electrofisiológico en ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos de *Xenopus laevis* en los estadios finales de desarrollo V y VI (Dumont, 1972) fueron disecados de los ovarios. Para facilitar la remoción de las cubiertas externas fueron sometidos a un tratamiento enzimático con colagenasa (Tipo I Sigma, 0.5 mg ml^{-1}) a temperatura ambiente durante 30 min en una solución de Ringer Normal (RN) que contenía (en mM) : NaCl 115, KCl 2, CaCl_2 1.8, N-[2-hidroxietil]piperazina-N ácido etanosulfónico (Hepes) 5, ajustada a pH 7.0 con NaOH. Después, fueron lavados con RN, y usando pinzas finas los

ovocitos fueron desfoliados removiendo las capas externas que los cubren con excepción de la capa vitelina. Las células fueron mantenidas a 18°C en una solución fisiológica estéril de Barth la cual contenía (en mM): NaCl 88, KCl 1, NaHCO₃ 2.4, Ca(NO₃)₂ 0.33, CaCl₂ 0.41, MgSO₄ 0.82, Hepes 5, pH 7.4, agregando a la solución 70 µgml⁻¹ de gentamicina. Los registros electrofisiológicos se realizaron en un periodo de 1-5 días después de la desfoliación.

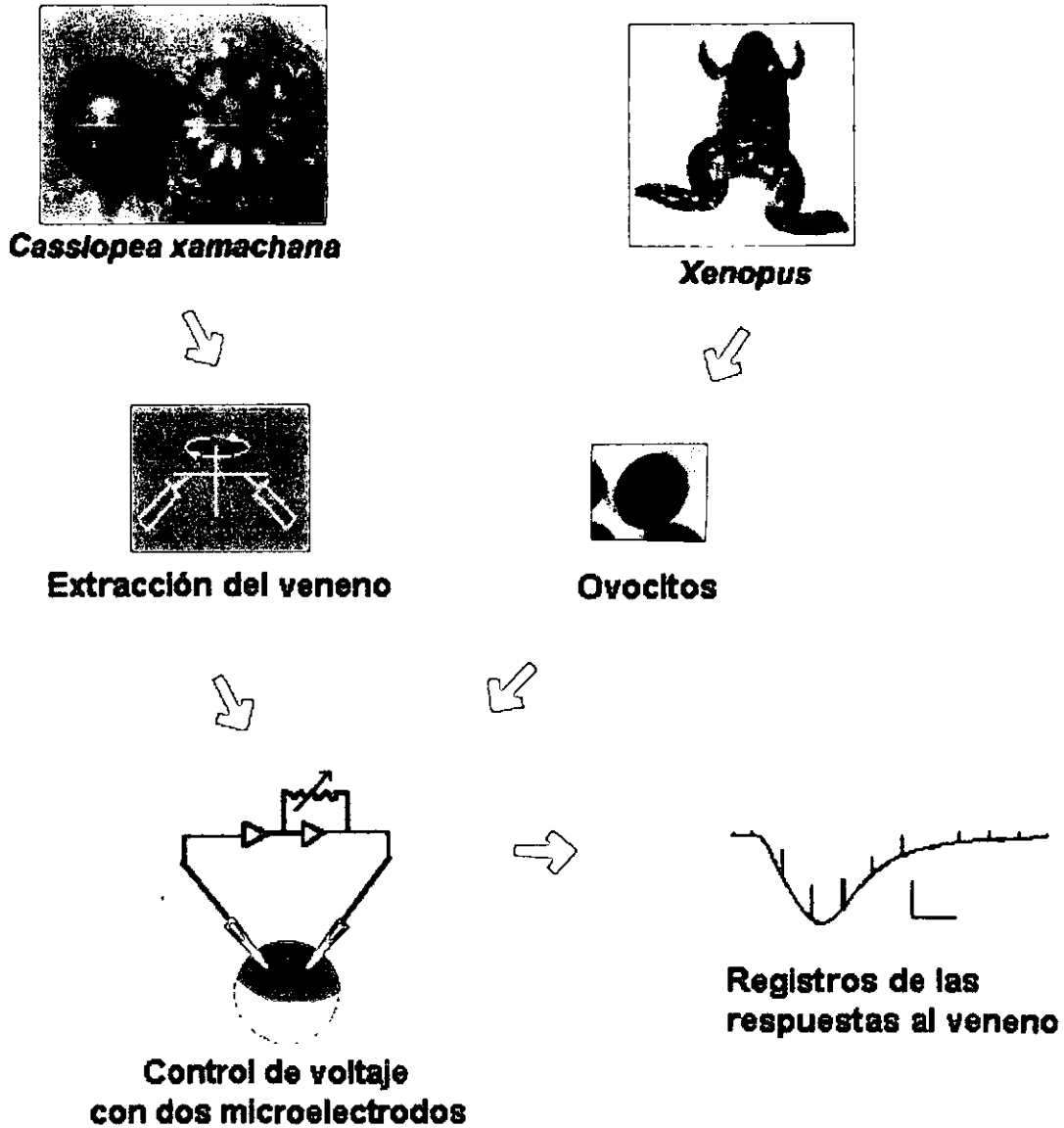


Figura 11. Esquema general de la estrategia usada para determinar la actividad electrofisiológica del veneno de la medusa *Cassiopea xamachana*.

Fue utilizada la técnica electrofisiológica de control de voltaje con dos microelectrodos con el objetivo de medir la corriente transmembranal producida en el ovocito de *Xenopus*, como respuesta a la actividad del veneno de organismos marinos, u otras sustancias y manipulaciones experimentales. En esta técnica electrofisiológica, uno de los microelectrodos intracelulares mide continuamente el potencial de membrana, mientras que el segundo inyecta la corriente necesaria para controlar el potencial en un valor preseleccionado a través de un circuito de retroalimentación. La corriente que cruza la membrana es medida en forma continua por un electrodo colocado en el medio extracelular (Anexo 1).

Los ovocitos de *Xenopus* fueron continuamente perfundidos con RN y el veneno de *Cx* y otras sustancias fueron aplicadas por perfusión en diferentes concentraciones (Fig 11). El potencial transmembranal al que fueron controlados fue regularmente de -60 mV, este potencial se encuentra alejado de los potenciales de equilibrio para K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- en estas células (Kusano et al., 1982) y permite discernir mejor las corrientes de cualquier naturaleza iónica producidas por diferentes estímulos. La connotación de corriente entrante está definida con respecto a este potencial.

Bases iónicas de las respuestas eléctricas

La polaridad y la amplitud de las corrientes iónicas dependen del potencial transmembranal y de las especies iónicas que transportan la corriente. Para definir la naturaleza de los iones que cruzan la membrana en las respuestas eléctricas encontradas, fueron realizados estudios de sustitución iónica, conjuntamente con el análisis del comportamiento del potencial de inversión (E_{inv}) para cada respuesta. La estimación del E_{inv} de una corriente determinada fue realizada de la siguiente forma:

Bajo control de voltaje, fueron aplicados al ovocito series de pulsos de 2.6 s de duración con varias amplitudes que llevaron al potencial de membrana desde -140 hasta +60 mV en incrementos de 20 mV. Esta serie de pulsos fue aplicada durante la perfusión con RN (corriente control) y nuevamente en el pico máximo

de la corriente producida por el veneno u otra maniobra experimental. En el ejemplo de la Fig. 12 A el estímulo fue la eliminación de Ca^{2+} extracelular. Para cada pulso de voltaje, la corriente de membrana control fue restada a la generada durante el pico de la corriente experimental y los valores obtenidos fueron graficados en una curva corriente-voltaje (I/V) como la mostrada en la Fig. 12 B. En el ejemplo, la corriente inicial (\bullet) fue diferente a la alcanzada en el estado estacionario (\circ) y proporciona curvas I/V relativamente distintas, sin embargo, ambas medidas de corriente proporcionan un valor de E_{inv} idéntico.

El E_{inv} de una corriente es un parámetro importante porque depende del tipo y la concentración (extracelular e intracelular) de los iones que acarrearán dicha corriente. Analizar su comportamiento en diferentes condiciones iónicas nos permite discernir las especies iónicas que intervienen en la respuesta. Por ejemplo, en un canal selectivo a un solo tipo de ión, el E_{inv} es igual al potencial de equilibrio (E_{eq}) para ese ión descrito por la ecuación de Nernst:

$$E_{eq} = \frac{RT}{zF} \log \frac{[X]_e}{[X]_i} \quad (1)$$

Donde R es la constante de los gases ($8.314 \text{ V CK}^{-1}\text{mol}^{-1}$), T es la temperatura absoluta ($T=273^\circ + ^\circ\text{C}$), z es la carga del ión, F es la constante de Faraday ($9.648 \times 10^4 \text{ Cmol}^{-1}$). $[X]_e$ y $[X]_i$ es la concentración del ión X extracelular e intracelular respectivamente.

Los E_{inv} para corrientes que fluyen a través de canales que son permeables a más de un tipo de ión, por ejemplo el canal nicotínico, pueden ser predichos por ecuaciones, como la de "campo constante" de Goldman-Hodgkin-Katz, que toma en cuenta además de las concentraciones de los iones las permeabilidades para cada uno de ellos a través del canal (Hille, 1984). Así, el E_{inv} para un canal permeable a Na^+ y K^+ esta dada por la ecuación:

$$E_{inv} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i} \quad (2)$$

Donde P_K y P_{Na} corresponden a las permeabilidades de cada ión a través del canal. En varias condiciones experimentales la ecuación (2) es de mayor utilidad al expresarla en términos de la tasa de permeabilidades, la cual nos dice que tan permeable es un ión con respecto a otro, ecuación (3).

$$\Delta E_{inv} = E_{invA} - E_{invB} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_A [A]_e}{P_B [B]_e} \quad (3)$$

En donde ΔE_{inv} es el cambio de potencial de inversión producido por la sustitución del ión A por el ión B en el medio externo.

En el presente trabajo, los E_{inv} obtenidos de la construcción de las curvas I/V bajo varias condiciones iónicas fueron analizados con base en lo establecido por las ecuaciones (1) y (3), dependiendo si se trataba de corrientes iónicas acarreadas por un ión o por varios. Las sustituciones iónicas en el medio extracelular utilizadas incluyeron:

- a) Baja concentración de Na^+ , sustituyendo el NaCl de la solución RN equimolarmente por NMDG⁺ en varias proporciones 100, 75, 50, y 25%. Además, otras dos soluciones sin Na^+ fueron preparadas sustituyendo el NaCl en el RN por TEA⁺ o Tris⁺.
- b) Alta concentración de K^+ , sustituyendo el NaCl de la solución de RN por KCl.
- c) Baja concentración de Cl^- , sustituyendo el NaCl por Na_2SO_4 (57.5 mM) en el RN, la osmolaridad de esta solución fue ajustada agregando sacarosa.

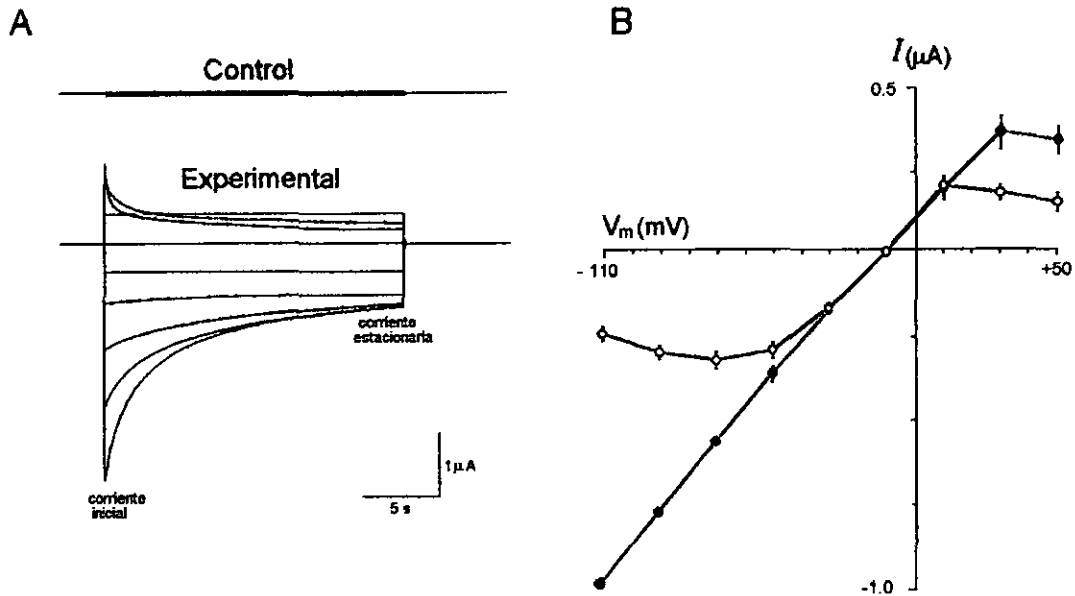


Figura 12. Relación corriente-voltaje (I/V)

Ejemplos de registros de pulsos de voltaje aplicados desde -100 a +50 mV incrementándose cada 20 mV en ovocitos controlados en un potencial de membrana de -10 mV durante la perfusión de RN. A) trazos control (arriba) y durante el pico de corriente producido aplicación de Ringer sin Ca^{2+} . B) relación corriente-voltaje correspondiente a la datos experimentales de A, los círculos rellenos muestran la relación I/V de la corriente inicial y los vacíos la corriente en estado estacionario. El voltaje al cual la corriente cambia de dirección (el cruce del eje X) es definido como potencial de inversión (E_{rev}), que en este caso es cercano a -10 mV. (Modificado de Arellano et al., 1995).

Estudio hemolítico

El porcentaje de hemólisis producida por el veneno de *Cx* fue estimado midiendo la absorbencia a 415 nm de la hemoglobina liberada en un periodo de tiempo determinado después de mezclar a la toxina con los eritrocitos que fueron mantenidos en una solución fisiológica.

Se tomaron 3 ml de sangre de ovejas y de humanos adultos, ambas muestras fueron resuspendidas en 40 ml de solución fisiológica de Alsever (conteniendo en mM: dextrosa a 120, citrato de sodio 30, NaCl 70 y ácido cítrico 2 (este último componente actúa como anticoagulante). Las muestras se mantuvieron en hielo para su traslado y posterior calibración.

La calibración de eritrocitos se llevó a cabo de la siguiente forma: fue estandarizada la solución en dos valores controles de absorbencia, el primer es obtenido cuando la suspensión eritrocitos + Alsever tiene un valor de 0 al cual se le asigna el 0% de hemólisis, y el segundo, es obtenido cuando la solución eritrocitos + Alsever + agua desionizada tiene un valor de 1, al cual se le asigna el 100% de hemólisis. Para obtener estos valores, los eritrocitos fueron concentrados por centrifugación a 1130 g, durante 5 minutos a 4°C, el paquete celular se resuspendió en la solución fisiológica de Alsever, después de 3 repeticiones, fueron recuperados y se resuspendieron al 1%. Se aforaron 50 µl de la suspensión a 1 ml con agua desionizada, y otros 50 µl de la suspensión se aforaron a 1ml en solución fisiológica de Alsever. Los tubos se agitaron ligeramente y fueron incubados a 37°C durante 30 minutos, posteriormente, se centrifugó a 1130 g durante 5 minutos a 4°C, midiendo la absorbencia al sobrenadante.

El bioensayo se elaboró de acuerdo al método descrito por Rottini y cols. (1990) de la forma siguiente: se agregó la muestra a evaluar a 50 µl de la suspensión de eritrocitos calibrados (1%) y se llevó a un volumen final de 1 ml con la solución fisiológica de Alsever. Las muestras se agitaron ligeramente y se incubaron a 37° C, durante 30 minutos, después se centrifugó 5 minutos a 1130 g y 4° C. Finalmente fue medida la absorbencia del sobrenadante a 415 nm, para cada condición experimental.

Con los datos de absorbencia del 100% y 0% como referencia al valor mínimo y máximo, fueron calculadas las curvas de porcentaje de hemólisis producida por las toxinas a diferentes concentraciones aplicando regresión lineal.

NATURALEZA QUÍMICA DE LAS TOXINAS BIOACTIVAS

El conocimiento de la naturaleza química de las sustancias bioactivas permiten diseñar los protocolos experimentales para su purificación. La mayoría de las toxinas con actividad sobre membrana celular estudiadas en Cnidarios presentan naturaleza peptídica con diferentes pesos moleculares, desde pequeños péptidos hasta proteínas de mas de 200,000 Da.

Es conocido que la estructura tridimensional específica de una proteína resulta crítica para su función, entonces, cuando una proteína pierde su conformación nativa por exposición a un agente desestabilizante como el calor o un detergente, éstas pierden su actividad. Por ejemplo, la ebullición de una disolución de proteína destruye una serie de interacciones químicas débiles, como las fuerzas de Van der Waals. Los disolventes orgánicos, la urea y los detergentes actúan en principio rompiendo las interacciones hidrofóbicas que forman el núcleo estable de las proteínas. Los tratamientos en soluciones con pH extremos alteran la carga neta de la proteína, dando lugar a la aparición de repulsiones electrostáticas y la destrucción de algunos enlaces de hidrógeno.

El efecto del calor es observado prácticamente en todas la proteínas globulares independientemente de su tamaño o función biológica. La temperatura necesaria para la pérdida de actividad varía de proteína a proteína, y el efecto del calor puede ocasionalmente ser reversible.

Como estudio preliminar que permitiera mostrar evidencias de la naturaleza química de las sustancias bioactivas fue estudiado el efecto del calor sobre la toxina que presentó actividad electrofisiológica. Para esto, fue realizado el siguiente protocolo experimental: el veneno obtenido del extracto de los brazos orales fue incubado durante 5 minutos a diferentes temperaturas 20, 40, 50, 80, 100 °C y fueron realizados registros electrofisiológicos con muestras sometidas a cada uno de los tiempos de incubación.

Por otro lado, se observó que el veneno de *Cx* incubado a 37°C perdía actividad hemolítica y electrofisiológica gradualmente. Ha sido analizada la presencia de proteasas en los extractos totales de Cnidarios (Hessinger, 1988;

Pong-prayoon et al., 1991) y la temperatura de 37°C es óptima para la actividad enzimática de diversas proteínas. Con el fin de discernir si la pérdida de la actividad fue provocada por la presencia de enzimas en el veneno crudo, se realizó el siguiente experimento:

A 2 ml del extracto de los brazos orales se les agregó 12.5 mg de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete TM, mini Boehringer Mannheim Co. Germany) y fueron incubados a 37°C durante 0, 1.5, 3, 6, 12 y 24 h. Fueron realizados 6 experimentos hemolíticos y cuatro registros electrofisiológicos con cada uno de los tiempos de incubación aplicando diferentes concentraciones de proteína para cada ensayo.

Cuantificación de proteínas

Se usó el método descrito por Lowry *et al.* (1951) con el kit de BIO-RAD D₀ Protein Assay para determinar la cantidad de proteína en el veneno crudo proveniente de los tres métodos de extracción.

La curva de calibración se preparó con Albúmina de suero bovino, en concentraciones de 1, 2, 4, 8, 10, 12 y 24 µg ml⁻¹. La absorbencia se leyó a una longitud de onda de 750 nm.

En ocasiones se usó el método A_{280}/A_{260} (Bollag et al., 1996). Las muestras fueron leídas con UV a longitudes de onda de 280 y 260 nm; la concentración de proteína fue estimada usando la fórmula:

$$\text{Concentración de proteína} = (1.5)A_{280} - (0.75)A_{260}$$

PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS TOXINAS BIOACTIVAS

Los métodos bioquímicos para la purificación de proteínas son diversos y dependen principalmente de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, tales como: tamaño, carga, grupos ionizables, solubilidad, capacidad de adsorción y estabilidad de la proteína a purificar. Las proteínas pueden ser purificadas por técnicas como centrifugación, electroforesis, punto isoeléctrico y cromatografía, entre otras.

En la purificación por métodos cromatográficos, las proteínas se separan mediante procedimientos de fraccionamiento en una serie de etapas independientes. El objetivo es eliminar selectivamente a los demás componentes de la mezcla de modo que permanezca la sustancia activa de interés. La purificación de una proteína "nueva" está sujeta a los precedentes bibliográficos y al sentido común (Lehninger et al., 1995).

La separación por cromatografía depende de la partición diferencial de las proteínas entre una fase estacionaria (medio adsorbente) y una fase móvil (solución amortiguadora). Este método permite separar a las proteínas por diferentes propiedades fisicoquímicas: a) las proteínas se pueden purificar por tamaño molecular y forma, utilizando cromatografías de exclusión molecular; b) en las cromatografías de intercambio iónico se separan por carga neta y distribución de carga; c) en un cromatoenfoco es utilizado el punto isoeléctrico; d) con las cromatografías de interacción hidrofóbica y fase reversa se pueden purificar péptidos y proteínas por hidrofobicidad; e) las llamadas cromatografías covalentes separan a las proteínas por el contenido de grupos tioles, y f) en las cromatografías de afinidad las moléculas son purificadas por afinidad bioespecífica a ligandos como inhibidores, receptores, anticuerpos, etc.

Generalmente son utilizadas dos o más cromatografías en diferentes condiciones para la purificación de una proteína. Estas condiciones pueden ser optimizadas en las soluciones amortiguadoras con la aplicación de diferente fuerza iónica, pH, y aditivos como detergentes, agentes reductores y otros; así como con la elección de la composición química de la fase estacionaria. Existe una amplia diversidad de adsorbentes que permiten explorar varias propiedades de la proteína durante su purificación.

En el caso de la purificación parcial de las proteínas con actividad tanto hemolítica como electrofisiológica del veneno de *Cx* fueron utilizadas diversas estrategias principalmente cromatográficas, con los tres extractos estandarizados en este trabajo.

Purificación parcial de las toxinas bioactivas a partir del extracto de los brazos orales

Durante la purificación parcial de las toxinas de Cx fueron realizados diversos estudios preliminares utilizando diferentes tipos de amortiguadores, columnas y resinas hasta la obtención de parámetros que permitieran la reproducibilidad de los perfiles cromatográficos, mejor separación y bioactividad consistente.

De acuerdo a los parámetros obtenidos de los estudios preliminares, se prosiguió con el siguiente método de purificación: en la primera etapa, usando un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) el veneno se pasó a través de la columna de exclusión molecular Bio-Sil SEC –125 (BSS) de Bio-Rad, 600 X 7.5 mm que tiene una exclusión molecular de 5000 a 100,000 Da. Fue equilibrada y eluída con acetato de amonio 10 mM pH 7 (calibrada con albúmina de suero bovino P.M. 66 200, Bio-Rad). Se colectaron fracciones de 1 ml a un flujo de 1 ml min^{-1} , leyéndose a 206 y 280 nm, en esta etapa se determinaron ambas actividades a cada fracción obtenida y se continuó purificando sólo la fracción con actividad electrofisiológica ya que en los estudios preliminares sobre purificación de la(s) toxina hemolítica(s) de este extracto, fueron obtenidos mejores resultados utilizando una estrategia diferente (ver Sánchez-Calderón 2001). Segunda etapa: la fracción que presentó la actividad electrofisiológica fue inyectada nuevamente a la misma columna en las mismas condiciones. Tercera etapa: finalmente, la última fracción se inyectó a la misma columna pero esta vez equilibrada y eluída con amortiguador de fosfato (contiene en mM: Na_2HPO_4 , y NaH_2PO_4 50 y NaCl 150) pH 6.8.

Fueron utilizadas columnas de DEAE-celulosa (dietilaminoetil celulosa) y CM-sepharosa (carboximetil sepharosa) para realizar cromatografías de intercambio aniónico y catiónico respectivamente, en un cromatógrafo de líquidos de separación rápida de proteínas (FPLC), equilibradas y eluidas con acetato de amonio 10 mM pH 7 con gradientes escalonados de 0.25, 0.5 y 1M de NaCl.

Purificación parcial de las toxinas bioactivas a partir del extracto de la secreción mucosa

Como primer paso, fue confirmada la actividad electrofisiológica y la hemolítica de este extracto, dada la consistente actividad electrofisiológica, se decidió por la purificación de la proteína con esta actividad utilizando una cromatografía de exclusión molecular por HPLC con la columna BSS equilibrada y eluida con acetato de amonio 10 mM pH 7. Se colectaron fracciones de 1 ml a un flujo de 1 ml min^{-1} , leyéndose a 206 nm y 280 nm. Después de determinar la actividad electrofisiológica de cada una de las fracciones y realizar una electroforesis en gel de gradiente en el cual se observó un exceso de sales en la fracción con actividad, con el objetivo de dializar la muestra fue realizada una cromatografía en FPLC utilizando la columna HiTrap Desalting (HTD) que tiene una exclusión molecular de 1000 a 5000 Da. La fracción activa eluyó con las sales nuevamente, debido a este resultado, el siguiente paso fue el uso de columnas de poliacrilamida Bio-spin P6 (BioRad) con el fin de eliminar las sales por centrifugación, en este último paso fueron realizados tres lavados con agua desionizada a 1530 g durante 3 min cada uno.

Purificación parcial de las toxinas bioactivas a partir del extracto obtenido por estimulación eléctrica

Con este extracto fueron realizados dos procedimientos para purificar parcialmente toxinas con actividad hemolítica.

a) Debido al exceso de sales que presentó esta muestra en particular, en la primera etapa se realizaron cromatografías en FPLC con la columna HTD equilibrada y eluida con amortiguador de bicarbonato de amonio 100 mM pH 7 con un flujo de 1 ml min^{-1} , y se colectaron fracciones de 0.5 ml que fueron agrupadas de acuerdo a la absorbencia de 280 nm que presentó el perfil cromatográfico. A cada una de estas fracciones se les determinó tanto actividad hemolítica como electrofisiológica. En la segunda etapa se decidió seguir la purificación con la fracción 1 la cual presentó consistentemente actividad hemolítica, esta fracción se corrió en la columna BSS en HPLC equilibrada y

eluida con amortiguador de acetato de amonio 10mM pH7 con un flujo de 1ml min⁻¹ fueron colectadas fracciones de 1ml y se agruparon de acuerdo a la absorbencia de 206 nm, finalmente, se determinó actividad hemolítica a cada una de las fracciones. La fracción 1 obtenida en este último paso se corrió nuevamente con las mismas condiciones en columna BSS.

b) Por otro lado, proteína de la misma fracción 1 de la columna de HTD se corrió por la misma columna de BSS en HPLC pero equilibrada y eluida con amortiguador de fosfatos pH 6.8 y se midió la actividad hemolítica a cada una de las fracciones.

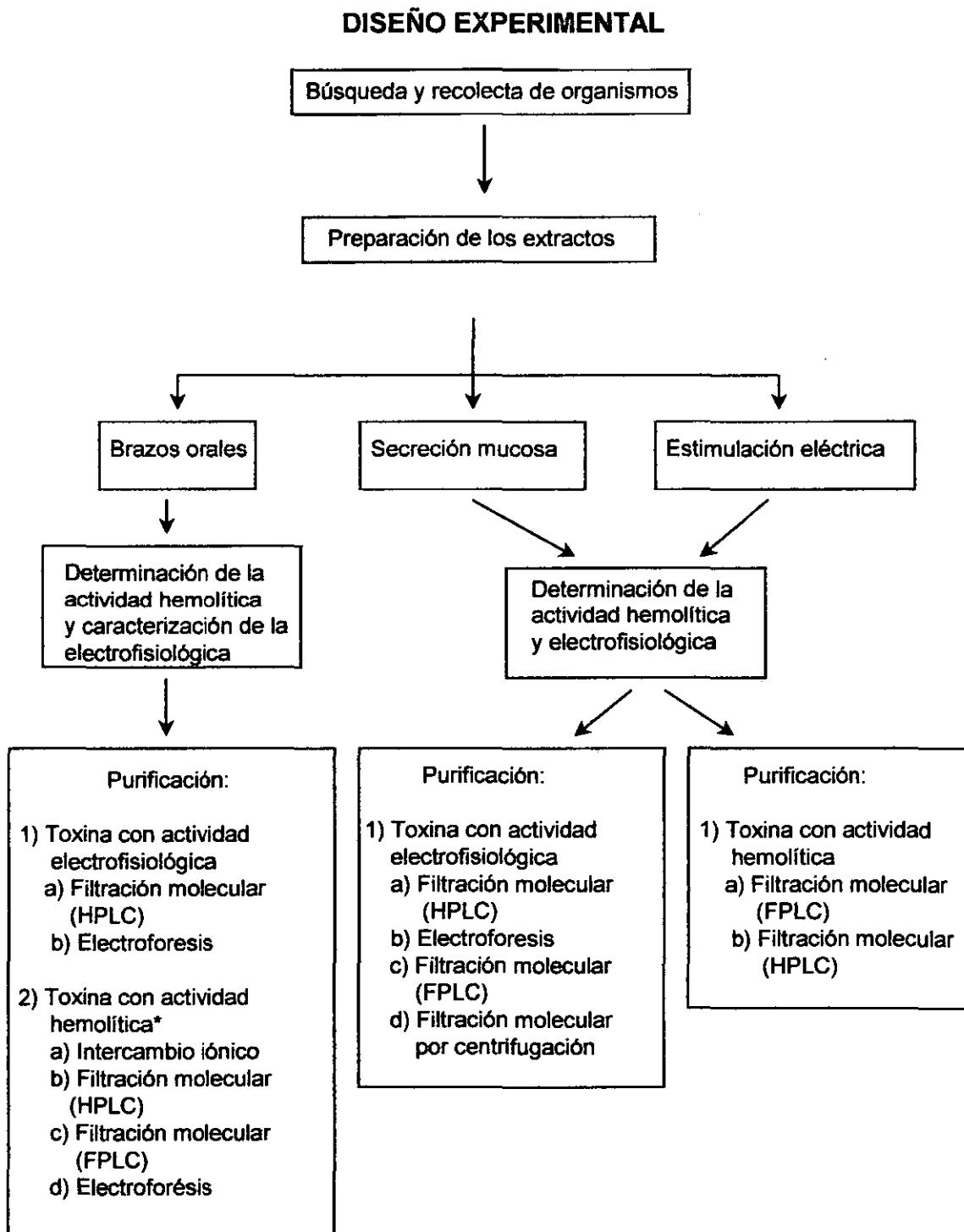
Electroforesis

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) es un método cuantitativo, rápido y reproducible para caracterizar y separar proteínas. El SDS enlaza las regiones hidrofóbicas de una proteína, rompe su estructura tridimensional y permite mantener a la proteína en solución, en su conformación extendida. Como resultado, el complejo SDS-proteína es proporcional al peso molecular de la proteína a la que se enlazó. Esta técnica nos permite entre otras cosas: analizar la pureza, determinar el peso molecular y verificar la concentración de una proteína (Laemmli, 1970).

Durante la purificación de las toxinas bioactivas, a las fracciones con actividad eléctrica y/o hemolítica les fue realizada electroforesis SDS-PAGE al 12, 10 o 7 % y/o de gradiente de 5 a 20% en condiciones reductoras y/o no reductoras e incluso en algunos casos con 8 M de urea. Fueron utilizados diferentes porcentajes de poliacrilamida y condiciones reductoras, dependiendo del número de proteínas y el tamaño esperado de éstas.

Se usó tinción con plata o Coomassie para revelar los geles, fue aplicado al gel 1 µg de proteína en los casos de tinción con plata y 10 µg para el caso de Coomassie, utilizando los siguientes marcadores moleculares (Bio-rad) (PM): Miosina 200,000; β-galactosidasa 116,200; Fosforilasa b 97,400; Albúmina 66,200 y Ovoalbúmina 45,000; Anhidrasa carbónica 31,000; Inhibidor de tripsina 21,500; lisozima 14,400 y Aprotinina 6,500. En las ocasiones que se corrieron

marcadores de alto rango están incluidos los cinco primeros marcadores y en los de bajo rango los seis últimos.



Cuadro 1. Diseño general de la estrategia seguida durante este trabajo de investigación

*Sánchez Calderón (2001).

RESULTADOS

Nematocistos y extracción del veneno

Los dos tipos de nematocistos presentes en los ejemplares de *Cassiopea xamachana* fueron identificados, con base en parámetros morfológicos, como euriteles y holotricos isorriza descritos con anterioridad por Goldberg y Taylor, 1997 (Fig. 13).

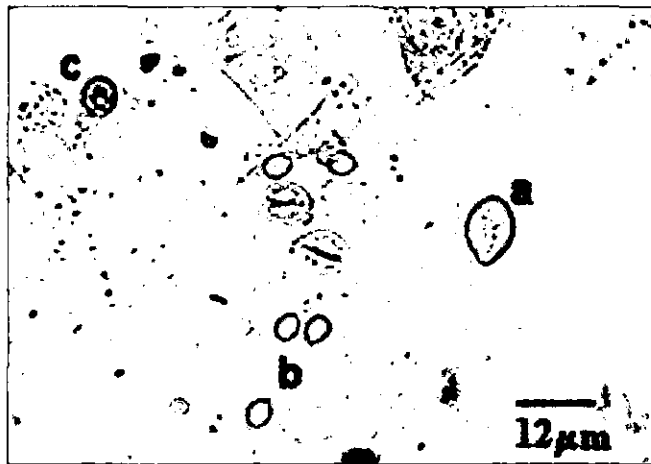


Figura 13. Nematocistos de *Cassiopea xamachana*
Nematocistos del tipo euriteles (a) y holotricos isorrizas (b). La estructura en c corresponde a un dinoflagelado.

Los 25 extractos provenientes de cada recolecta exhibieron actividad hemolítica y electrofisiológica similares en los modelos biológicos utilizados en este trabajo, sugiriendo que las sustancias responsables son constantes en la especie e independientes de cambios ambientales.

Las diferencias entre los tres métodos de la extracción del veneno fueron: a) la proporción de nematocistos vs. dinoflagelados, b) la concentración total de proteína cuantificada en cada extracto, c) la potencia en la actividad hemolítica. Todas presentaron actividad electrofisiológica (Tabla 1 y Fig. 14 A, B y C).

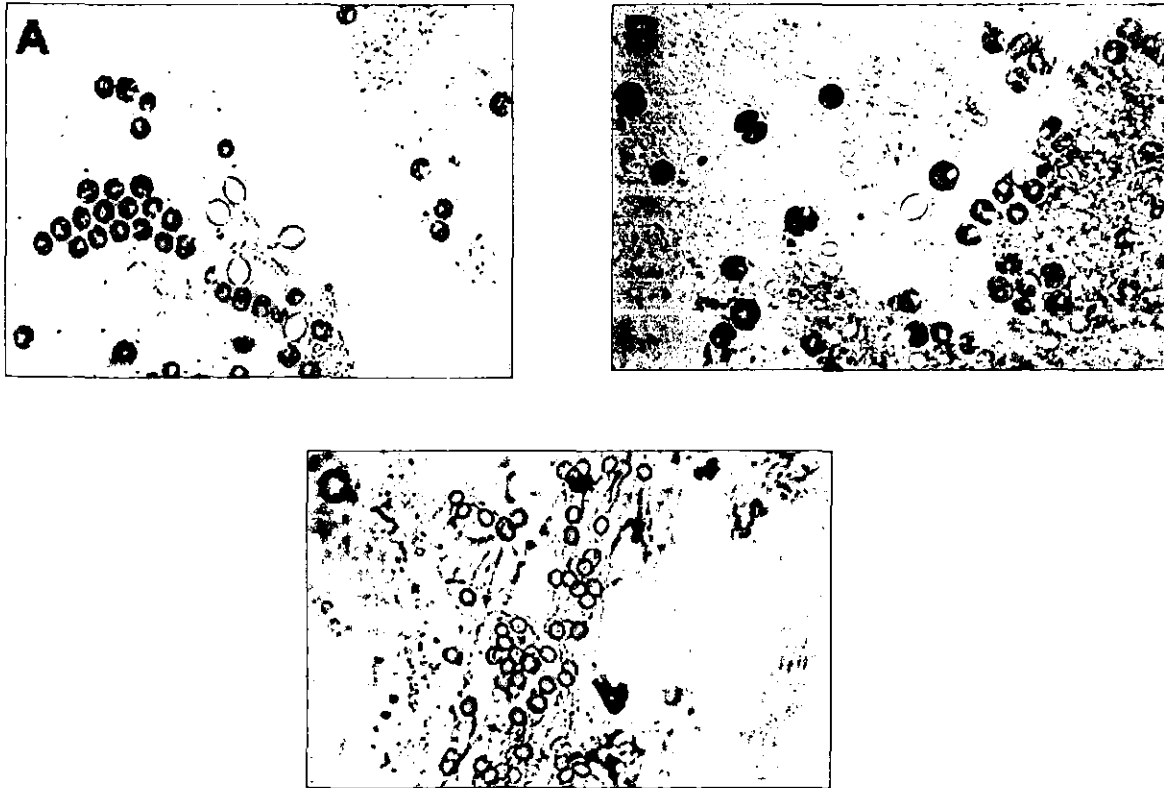


Figura 14. Ejemplo de las preparaciones de nematocistos de Cx obtenidos con cada uno de los diferentes métodos de extracción
A) brazos orales, B) Secreción mucosa y C) estimulación eléctrica.

El extracto proveniente de medusas estimuladas eléctricamente no presentó contaminación por dinoflagelados u otros tejidos del espécimen, (Tabla 1; Fig. 14C) estos resultados sugieren fuertemente que el veneno obtenido de esta preparación es producido por la descarga de los nematocistos. También, el veneno proveniente de la estimulación eléctrica presentó constantemente actividad en el ensayo hemolítico y generó la respuesta electrofisiológica caracterizada en el ovocito de *Xenopus*, sugiriendo que la principal fuente de las sustancias bioactivas son los nematocistos.

Considerando el estudio comparativo de los tres métodos de extracción, (Tabla 1) y principalmente por el rendimiento de proteína y el número de organismos necesarios para su preparación, además del contenido de sales en

cada muestra, fue seleccionado principalmente el extracto obtenido de la trituración de los brazos orales para realizar la caracterización y purificación parcial de las sustancias con ambas respuestas, electrofisiológica y hemolítica. Sin embargo, también fue realizado un seguimiento de bioactividad con las preparaciones provenientes de los otros dos métodos de extracción.

Tabla II. Concentración de proteína y actividad biológica obtenida de los tres diferentes métodos de extracción

Método de extracción	Núm. de organismos	Peso total del extracto (g)	Proporción *(n:d)	Proteína total [μgml^{-1}]	Hemólisis ** (100%) [μgml^{-1}]	Actividad electrofisiológica [$5 \mu\text{gml}^{-1}$]
1	5	10.6	1:14	2454	128	presente
2	14	16.5	1:0.5	116	22.6	presente
3	27	10.2	1:0	2.6	17.7	presente

*n:d = nematocistos:dinoflagelados ** Eritrocitos de oveja

Métodos de extracción: 1) brazos orales, 2) secreción mucosa y 3) estimulación eléctrica.

La mejor técnica para la descarga del veneno contenido en los nematocistos, tanto en la preparación de los brazos orales como en la de la secreción mucosa, fue la aplicación de un choque osmótico resuspendiendo el material en agua desionizada y centrifugando posteriormente. En el caso de los brazos orales, la eficiencia de este método fue dependiente del tiempo de almacenamiento del extracto, preparaciones con más de un año almacenadas fue necesario sonicarlas para obtener mejor porcentaje de descarga (Tabla 2).

La actividad hemolítica y electrofisiológica de los extractos fue consistente en muestras liofilizadas mantenidas por más de un año a temperatura de -20°C , ya resuspendidas en agua desionizada la actividad persistió durante aproximadamente un mes en promedio congeladas a -70°C .

Tabla III. Relación entre nematocistos cargados y descargados en muestras nuevas y con un año de almacenamiento

Muestras	Nematocistos cargados (ml ⁻¹)	Nematocistos descargados (ml ⁻¹)	Concentración de proteína (mg ml ⁻¹)
Nuevas	22000	270000	2.4
Recolectadas un año antes	264000	49000	1.84
Recolectadas un año antes y sonicadas	40000	293000	4.38

Los extractos de los brazos orales y secreción mucosa tienden a formar agregados en solución; esta característica dificultó la separación de los nematocistos de dinoflagelados y tejidos de la medusa utilizando cualquiera de los dos procedimientos descritos en los métodos, la centrifugación con Percoll y sacarosa. En algunos casos, para evitar la formación de los agregados, fue adicionado Tritón X-100 (un detergente) o hidróxido de sodio diluidos en diferentes concentraciones. Sin embargo, ambos reactivos provocaron la descarga y/o ruptura de los nematocistos.

EXTRACTO DE BRAZOS ORALES

Determinación de la actividad hemolítica

La actividad hemolítica producida por el veneno de *Cx* fue dependiente de la concentración. Este comportamiento se presentó tanto en los eritrocitos humanos como en los de oveja (Fig. 15) teniendo una UH_{50} de 6.89 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y 55.93 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente. Así, el veneno de *Cx* fue 8.1 veces más potente sobre los eritrocitos de humano.

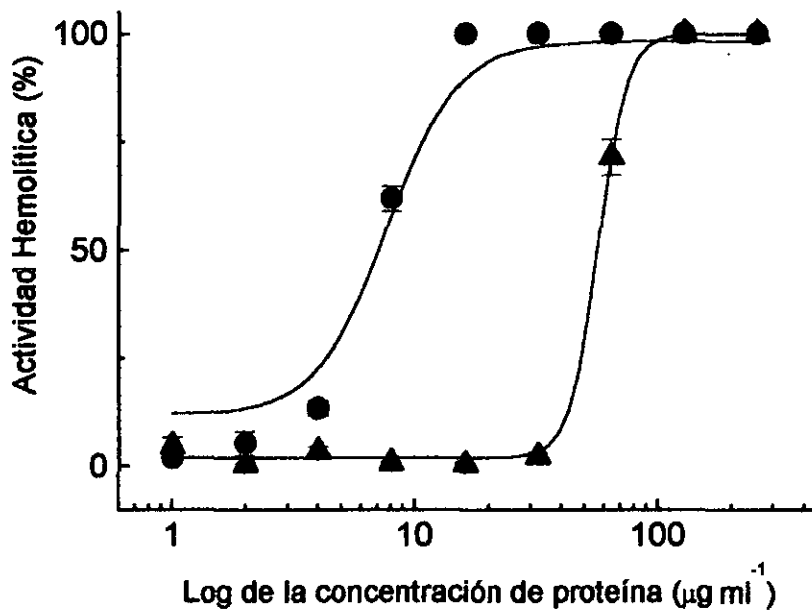


Figura 15. Evaluación de la actividad hemolítica

Hemólisis en eritrocitos de humano (●) y oveja (▲); en 6 ensayos hemolíticos de cada una de las siguientes concentraciones de veneno crudo: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (media \pm s.e.).

Determinación y caracterización de la actividad electrofisiológica inducida por el veneno de *Cx* en ovocitos de *Xenopus laevis*.

El potencial de reposo y la resistencia de membrana de los ovocitos ($n=150$, 25 ranas) usados en este estudio fue de -34 ± 6 mV (media \pm S.E.) y 0.79 ± 0.2 M Ω respectivamente.

El veneno total de *Cx* generó en la membrana del ovocito una mezcla compleja de respuestas entrantes, todas asociadas con un incremento de la conductancia en la membrana (Fig. 16 A, B y C).

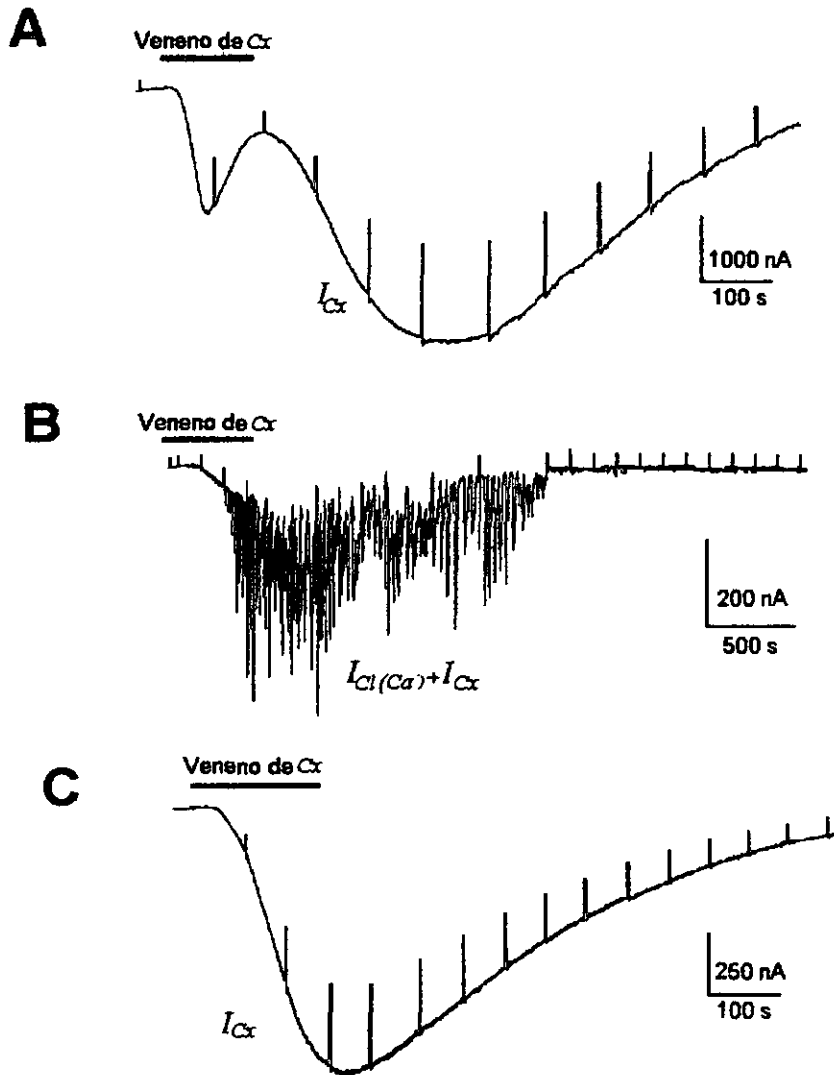


Figura 16. Ejemplos típicos de corrientes iónicas membranales generadas por el veneno de *Cx* en ovocitos de *Xenopus laevis*

Ovocitos bajo control de voltaje a -60 mV. En éstos, así como en los subsecuentes registros presentados en este trabajo, el veneno ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) y otras drogas fueron aplicadas durante el tiempo indicado por la barra superior, además fueron aplicados pulsos cortos (2 s) a -40 mV con el fin de evaluar la conductancia de la membrana durante la respuesta. A) la respuesta entrante rápida producida sólo en algunos ovocito junto con I_{Cx} , B) corriente oscilatoria ($I_{Cl(Ca)}$) con I_{Cx} , y C) I_{Cx} .

Dos de los componentes de la respuesta no se presentaron en todas las células; uno de estos componentes fue una corriente rápida (2.2 ± 0.8 s) y lisa que se inactivó aún en presencia del veneno (63 ± 5.7 s, Fig. 16 A); fue observada en 15 ovocitos de 4 ranas del total de 25 ranas. El E_{inv} de esta corriente fue de -8.86 ± 0.65 mV (Fig. 17 A) valor que difiere de los potenciales de equilibrio dados para Cl^- (-20 mV), K^+ (-100mV) o Na^+ (+60 mV) en ovocitos de *Xenopus* (Kusano et al., 1982). Esto último sugirió que esta corriente es acarreada por más de un tipo de ión. Cuando se sustituyó el Na^+ de la solución de RN por K^+ (Fig. 17 B) el E_{inv} fue de 6.61 ± 1.14 mV. Utilizando la ecuación (3), la tasa P_K/P_{Na} indicó que el K^+ es 3 veces mas permeable que el Na^+ a través del canal involucrado.

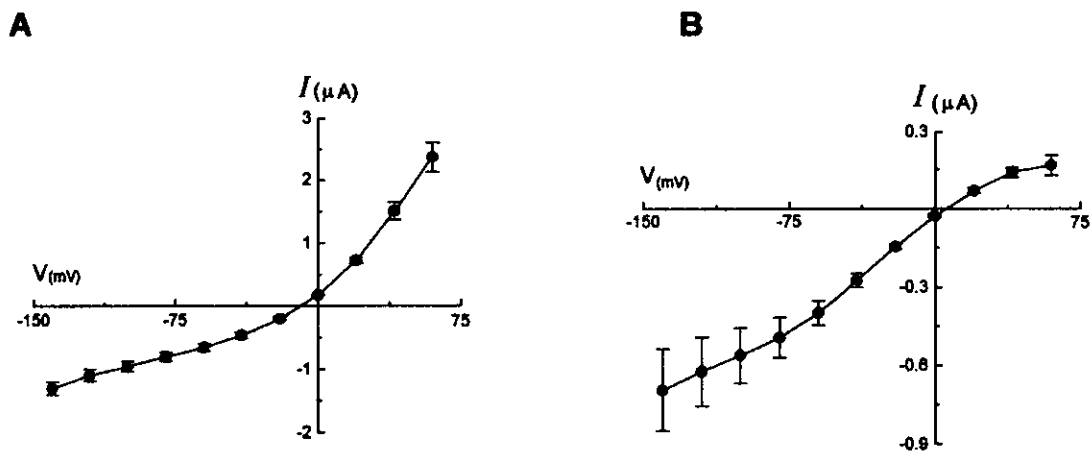


Figura 17. Relaciones corriente-voltaje de la respuesta rápida

Relaciones I/V en ovocitos perfundidos en RN (A) y en ovocitos perfundidos en una solución donde el Na^+ fue sustituido por K^+ en el RN (B). Cada punto representa el promedio de la corriente obtenida en 5 ovocitos de una rana.

El segundo componente fue una corriente entrante y oscilatoria (Fig. 16 B) que se generó en 34 ovocitos de 13 ranas. Esta corriente oscilatoria presentó características similares a la corriente de cloro dependiente de calcio intracelular denotada $I_{Cl(Ca)}$ y que es inducida en ovocitos de *Xenopus* por varios agonistas tales como acetilcolina, angiotensina II, cationes divalentes y un factor de suero (Miledi et al., 1989).

Las conductancias que son dependientes del aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular pueden ser inhibidas por incubación o inyección intracelular de algún compuesto secuestrador de Ca^{2+} , como lo son el EGTA y el BAPTA. Con el objetivo de establecer el papel del Ca^{2+} intracelular durante la corriente oscilatoria producida por el veneno de *Cx*, los ovocitos de *Xenopus* fueron incubados durante 24 h en solución de Barth con 10 μ M de BAPTA-AM [1,2-bis(o-aminophenoxy)etano-N,N,N',N'-tetraacetic acid]. El AM es un radical éster de acetometil que confiere al complejo BAPTA-AM carga neutra y mejor permeabilidad, de esta forma puede difundir al citoplasma eficientemente. Una característica importante de los ésteres AM es la facilidad con la que son hidrolizados por esterasas intracelulares, cuando esto sucede, el BAPTA queda atrapado en el interior de la célula (Tsien, 1980; Kao, 1994; Jiang et al., 1998).

Los resultados mostraron que la respuesta oscilatoria producida por el veneno de *Cx* fue inhibida en los ovocitos incubados con BAPTA-AM, sugiriendo que la activación de la corriente era dependiente de la liberación de calcio intracelular (Fig. 18 A y C). Esto sucede también con las respuestas producidas por agonistas como los antes mencionados, por ejemplo, un factor de suero bovino fetal (SBF), el cual fue usado en este experimento como control positivo (Fig. 18 B y D).

El tercer componente de la respuesta al veneno fue una corriente entrante y lisa con un curso temporal lento, a la cual le hemos llamado I_{Cx} (Fig. 16 C). I_{Cx} fue generada en todos los ovocitos utilizados en este estudio.

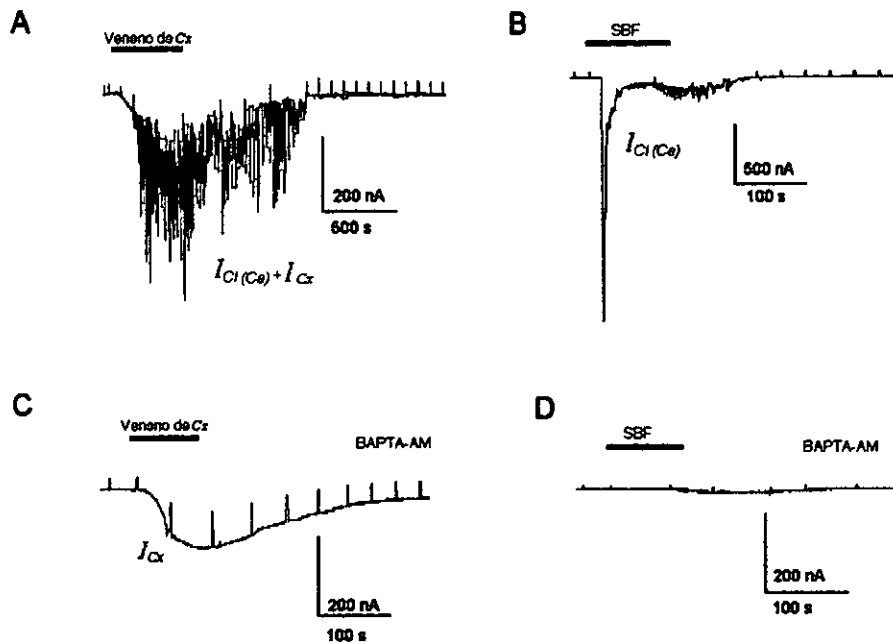


Figura 18. Independencia de Ca^{2+} intracelular de la activación de I_{Cx}

A) y B) son ejemplos de corrientes iónicas generadas por el veneno de Cx ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) y SBF (0.1%) respectivamente en ovocitos control. En C) se muestra un ejemplo de la I_{Cx} generada en ovocitos del mismo donador incubados con BAPTA-AM.

La activación de I_{Cx} fue relativamente lenta, alcanzando el pico de amplitud en aproximadamente 25.74 ± 0.90 s. Dependiendo de la amplitud de la corriente producida, el lavado de la respuesta con RN fue normalmente de varios minutos (10-18 min). En general todos los ovocitos recuperaron su corriente basal después de la aplicación del veneno, y la respuesta pudo ser activada varias veces en el mismo ovocito.

La amplitud de I_{Cx} fue dependiente de la concentración del veneno (Fig. 19 A y B, 10 ovocitos, 2 ranas). Sin embargo, fueron observadas variaciones en el pico máximo de corriente producida entre ovocitos provenientes de diferentes ranas. Por ejemplo, el veneno ($1.25 \mu\text{g ml}^{-1}$) en ovocitos de una rana generó I_{Cx} con una amplitud promedio de 1327 ± 133 nA ($n=5$), mientras que en ovocitos de otra rana se generaron corrientes de 302 ± 87 nA ($n=5$).

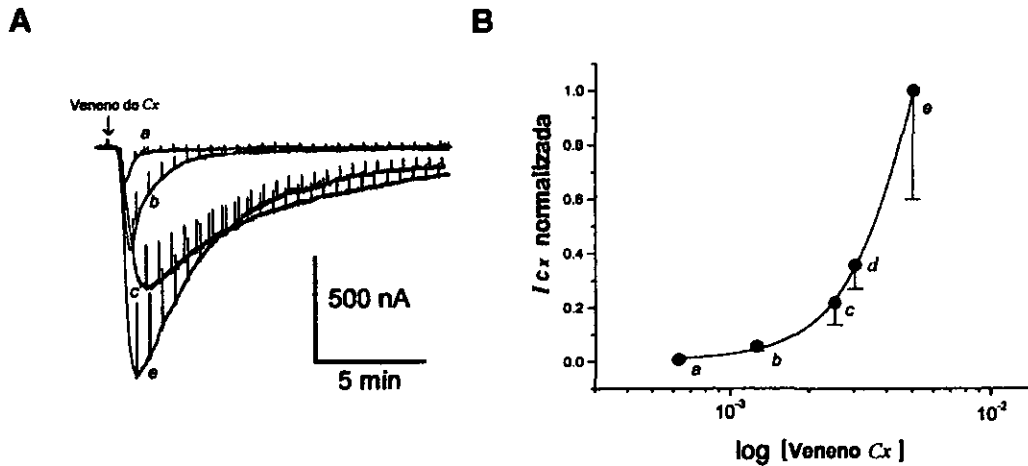


Figura 19. Relación concentración-respuesta en la generación de I_{Cx}

A) trazos superpuestos de la corriente producida por subsiguientes aplicaciones del veneno de *Cx* (15 ml) a diferentes concentraciones (en $\mu\text{g ml}^{-1}$: a=0.62, b=1.25, c=2.5, e=5) en un ovocito controlado a -60 mV. Los periodos de lavado entre cada aplicación fueron de 10 minutos. B) La I_{Cx} producida por las concentraciones: a=0.62, b=1.25, c=2.5, d= 3 e=5, fue normalizada con respecto a la corriente máxima generada por $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ del veneno.

Aplicaciones subsiguientes de la misma concentración del veneno produjeron desensibilización de la respuesta (Fig. 20). No se observó diferencia en la amplitud y el curso temporal de la I_{Cx} en ovocitos (n=26, 6 ranas) cargados con BAPTA-AM, mientras que en los mismos ovocitos la corriente oscilatoria $I_{Cl(Ca)}$ ya sea producida por el veneno de *Cx* o suero bovino fetal fueron completamente eliminadas, por lo que I_{Cx} pareció no depender del incremento de calcio intracelular (regresar a Fig. 18 A y C).

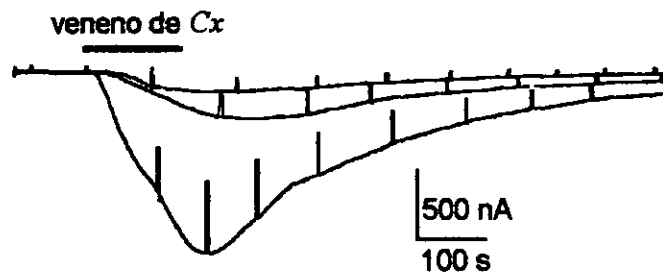


Figura 20. Desensibilización de I_{Cx}

Registros superpuestos de tres aplicaciones subsiguientes del veneno de *Cx* ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) en un mismo ovocito.

Bases iónicas de I_{Cx}

Dado que I_{Cx} fue la respuesta eléctrica más consistente producida por el veneno de la medusa en el ovocito de *Xenopus* sus características electrofisiológicas fueron estudiadas con más detalle.

La figura 21 A muestra un ejemplo de los registros control y experimental del protocolo de pulsos utilizado para determinar el potencial de inversión (E_{inv}) de I_{Cx} y así analizar la selectividad iónica de los canales. El curso temporal de la corriente durante los pulsos no presentó inactivación, y ninguna otra dependencia en el tiempo, por lo que todas las curvas I/V fueron construidas con el valor de corriente generada a la mitad del pulso.

El E_{inv} para I_{Cx} fue de -10.3 ± 0.4 mV ($n=10$, Fig. 21 B) valor que difiere, como mencionamos anteriormente, de los potenciales de equilibrio dados para Cl^- , K^+ o Na^+ en ovocitos de *Xenopus*, sugiriendo que I_{Cx} fue acarreada por más de un tipo de ión. Con la finalidad de definir la participación de los principales iones durante I_{Cx} fueron realizados los siguientes estudios de sustitución iónica.

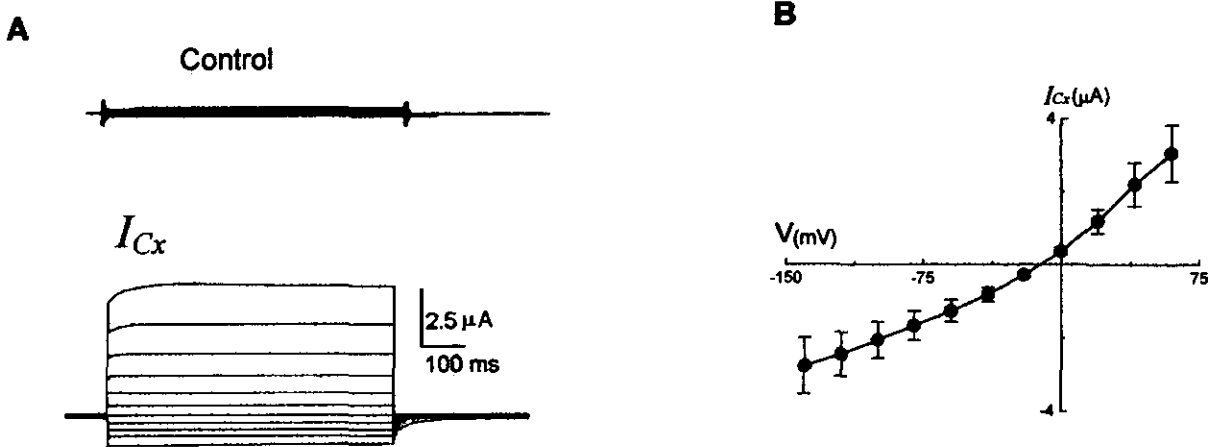


Figura 21. Relación corriente-voltaje (I/V) de I_{Cx}

A) Ejemplos de registros utilizando el protocolo de pulsos de voltaje de -140 a $+60$ mV (en incrementos de 20 mV) en ovocitos controlados a -60 mV. El protocolo fue aplicado durante la perfusión de RN (trazos control) y durante el pico de corriente producido por $5 \mu g ml^{-1}$ del veneno. B) la gráfica muestra la amplitud de I_{Cx} en el estado estacionario en los diferentes potenciales. Cada punto representa el promedio de la corriente obtenida en 10 ovocitos de dos ranas.

El NaCl de la solución de RN fue sustituido en un 100, 75, 50 y 25 % por NMDG-Cl. La aplicación del veneno en estas soluciones provocó la disminución progresiva en la amplitud de I_{Cx} , así, con sustituciones crecientes de Na^+ por NMDG⁺ la corriente disminuyó y el E_{inv} fue desplazado a valores más negativos (Fig. 22, Tabla 3). Estos resultados sugirieron que uno de los principales iones fluyendo durante la corriente producida por el veneno de Cx fue Na^+ . El NMDG⁺ parece ser impermeable a los canales de I_{Cx} , sin embargo, con la sustitución del Na^+ en un 100% se observó una pequeña corriente entrante con un E_{inv} de -40 mV; si la permeabilidad sólo correspondiera a K^+ , el valor esperado del E_{inv} , sería cercano a -100 mV, así que el valor obtenido experimentalmente debido a la sustitución sugiere la permeabilidad de algún otro ión.

Con la sustitución de todo el Na^+ de la solución de RN por K^+ el E_{inv} que se obtuvo fue de -12.8 ± 1.4 mV ($n=6$; Fig. 23 A) y las corrientes generadas presentaron amplitudes similares sugiriendo que los canales de I_{Cx} son también permeables a este ión.

Con la finalidad de explorar la posible permeabilidad de Cl^- durante I_{Cx} , la corriente fue inducida en un medio sin Cl^- . En soluciones donde el Cl^- fue sustituido completamente por SO_4^- provocaría un desplazamiento del E_{inv} a valores positivos. Canales de Cl^- caracterizados en folículos de *Xenopus* muestra desplazamientos del E_{inv} hasta +50 mV en sustituciones de 95% de Cl^- por SO_4^- (Arellano et al., 1998). En nuestros resultados fue observado un ligero desplazamiento del potencial de inversión hacia valores negativos (E_{inv} -14.03 ± 0.39 ; Fig. 23 B), esto sugiere que el Cl^- no es uno de los principales iones acarreados por I_{Cx} . Sin embargo, en este caso la amplitud de la corriente se redujo pareciendo indicar que el SO_4^- o la ausencia de Cl^- interfirieron de alguna forma para que se produjera una activación óptima de la respuesta generada por el veneno de Cx .

Todos estos resultados están de acuerdo con el comportamiento esperado para un canal que es permeable principalmente a cationes y discrimina pobremente entre Na^+ y K^+ . La tasa de permeabilidad calculada de K^+/Na^+ fue 0.96.

De confirmarse la tasa de permeabilidad a K^+ de la respuesta rápida descrita anteriormente y la de I_{Cx} , podría indicar que están involucrados canales diferentes en las respuestas.

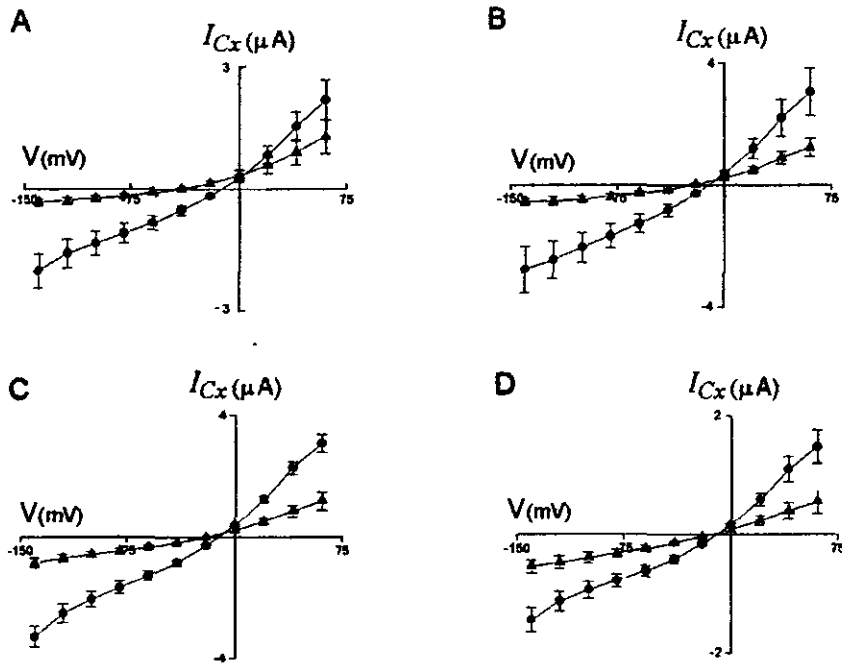


Figura 22. Relación I/V de la respuesta de I_{Cx} sustituyendo en diferentes proporciones el Na^+ en la solución RN por $NMDG^+$
 A) sustitución del 100%, B) 75%, C) 50% y D) 25%, (\blacktriangle). Los círculos negros representan las corrientes generadas en RN.

Finalmente, en la sustitución de Na^+ por TEA^+ no fue observado un cambio importante en el E_{inv} , pero la amplitud de la corriente parece disminuir (Fig. 23 C). Este resultado sugieren que el TEA^+ permea a través del canal aunque en menor grado que el Na^+ . La tasa de permeabilidad TEA^+/Na^+ calculada utilizando la ecuación 3 fue de 0.89

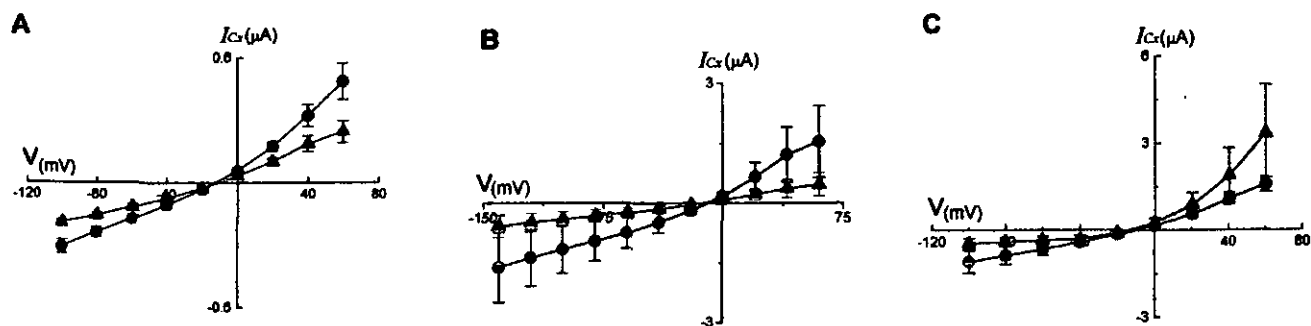


Figura 23. Relación corriente-voltaje de I_{Cx} con diferentes sustituciones iónicas
 Fueron realizadas sustituciones totales (\blacktriangle) en la solución de RN de: A) Na^+ por K^+ , B) Cl^- por SO_4^{2-} y C) Na^+ por TEA^+ . Los círculos negros representan las corrientes generadas en RN.

Tabla IV. Potenciales de inversión de las diferentes sustituciones iónicas durante la activación de I_{Cx}

X/ Na^+	%	E_{inv}	E_{inv} en RN (control)
NMDG^+	100	-39.83 ± 2.23	-11.20 ± 1.26
	75	-24.32 ± 1.03	-11.48 ± 0.66
	50	-19.66 ± 0.16	-11.95 ± 1.01
	25	-14.99 ± 1.31	-10.59 ± 0.96
K^+	100	-12.8 ± 1.40	-11.80 ± 2.25
TEA^+	100	-13.03 ± 3.00	-9.89 ± 0.30
X/ Cl^-			
SO_4^{2-}	100	-14.03 ± 0.39	-9.76 ± 0.50

Mecanismo de acción involucrado en la generación de I_{Cx}

La desensibilización de la respuesta provocada por aplicaciones subsecuentes de la misma concentración del veneno fue una evidencia indirecta de que I_{Cx} quizá fuera generada por la presencia de un canal en la membrana del ovocito. Otra evidencia indirecta la proporcionó la desaparición de la corriente en ovocitos maduros con progesterona. Con respecto a este último punto, se sabe que varias respuestas nativas de la membrana del ovocito son reguladas o eliminadas en ovocitos maduros; por ejemplo, las respuestas colinérgicas (Kusano et al., 1982), la corriente I_C (Arellano et al., 1995) y varias otras (R. Miledi y R.O. Arellano, observaciones no publicadas). Si la respuesta provocada por el veneno de Cx dependiera solamente de la interacción de la sustancia activa con los lípidos de la membrana del ovocito, podría esperarse que la respuesta no fuera modificada por la maduración, en cambio si el veneno de Cx requiere de algún otro componente en la membrana del ovocito para la generación de I_{Cx} sería de esperarse que pudiera ser afectada por la maduración como lo son las otras respuestas. Para explorar esta posibilidad fueron realizadas aplicaciones del veneno de Cx en ovocitos control y ovocitos que fueron inducidos a madurar aplicando 10 μ M de progesterona (en RN), durante aproximadamente 5 h. Los resultados mostraron que los ovocitos ($n=4$) control respondieron al veneno con una I_{Cx} de 1858 ± 85 nA, mientras que la mayoría de los ovocitos maduros no respondieron al veneno; sólo un ovocito maduro de un total de cuatro (misma rana) respondió con una I_{Cx} de 20 nA (Fig. 24). Así, es claro que la respuesta producida por el veneno de Cx en la membrana del ovocito fue regulada por la maduración como otras respuestas nativas, lo cual sugiere que la actividad de I_{Cx} requiere de elementos normalmente presentes en el ovocito inmaduro.

Entonces, dadas las características de I_{Cx} , resultaba interesante saber si los canales involucrados en su generación correspondían con algunas de las conductancias catiónicas nativas ya descritas en el ovocito de *Xenopus*.

Sabemos de estudios previos que existen al menos tres distintas corrientes acarreadas principalmente por cationes en el ovocito, las cuales son generadas

por: 1) la apertura de hemicanales de uniones comunicantes constituidos por proteínas llamadas conexinas, del subtipo Cx38, que generan la corriente llamada I_C (Arellano et al., 1995; Zhang et al., 1998); 2) La aplicación de palitoxina que activa una corriente catiónica sensible a ouabaina; se ha propuesto que la bomba Na^+/K^+ es activada por la toxina a través de un mecanismo que provoca que funcione como un canal catiónico (Wang y Horisberger, 1997), y 3) la activación de canales mecanosensibles (I_{MS}) (Yang y Sachs 1989). Para determinar si uno de estos canales pudiera estar involucrado en la generación de I_{Cx} , fueron realizados los siguientes protocolos experimentales.

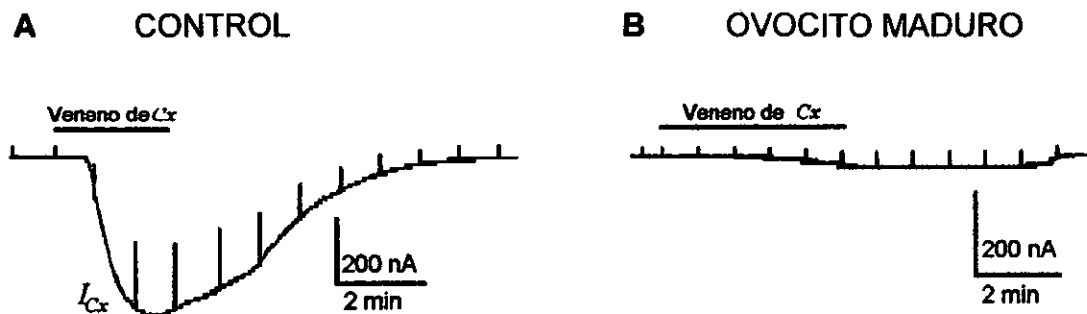


Figura 24. I_{Cx} y maduración

Los trazos son ejemplo de la I_{Cx} provocada por el veneno en dos grupos de ovocitos. El registro en condiciones control y ovocitos de la misma rana que fueron inducidos a madurar por aplicación de progesterona ($10 \mu\text{M}$), en donde puede apreciarse una fuerte inhibición de la respuesta. Los registros son ejemplos del resultado obtenido con 4 ovocitos (2 ranas) en cada condición.

Relación de I_{Cx} con la corriente nativa I_C .

La corriente I_C es generada cuando el ovocito es expuesto a un medio extracelular desprovisto de cationes divalentes (Arellano et al., 1995) y es debida a la apertura de hemicanales de uniones comunicantes del subtipo Cx38 que se encuentran presentes en la membrana del ovocito. La inyección de ovocitos con oligonucleótidos antisentido contra Cx38 elimina I_C en aproximadamente 48 h (Ebihara, 1996; Zhang et al., 1998). En este estudio, para eliminar I_C fueron

inyectados ovocitos con 15 ng (2 o 3 días antes del registro) de un oligonucleótido antisentido contra Cx38 (antiCx38) con la secuencia 5'-GCT TTA GTA ATT CCC ATC CTG CCA TGT TTC-3' (Ebihara, 1996); también fue inyectado otro grupo de ovocitos control con un oligonucleótido antisentido (misma concentración) no específico con la secuencia 5'-CTT TTG ACC GCT CAT CCC TAT AGT ATT TGC-3'. Ambos grupos de ovocitos fueron incubados durante 48 h o más, hasta que los ovocitos inyectados con el antiCx38 no generaran I_C al ser bañados con una solución de Ringer desprovista de Ca^{2+} . Los resultados obtenidos mostraron que los ovocitos sin I_C sí respondieron al veneno de Cx ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) produciendo I_{Cx} de gran amplitud. Por ejemplo, en ovocitos ($n=4$) control de una rana, I_{Cx} fue de 285 ± 35 nA y en ovocitos inyectados con antiCx38 y que no generaron I_C , respondieron al veneno con una I_{Cx} de 440 ± 25 nA ($n=4$, Fig. 25). Estos resultados indicaron que los canales de I_{Cx} no correspondieron con la apertura de hemicanales de uniones comunicantes Cx38.

Relación de I_{Cx} con la corriente generada por palitoxina.

La palitoxina es una toxina que ha sido aislada principalmente de corales blandos del género *Palythoa*, y también se ha encontrado en diversos organismos marinos como esponjas, algunos peces, poliquetos, crustáceos y otros corales (Mebs, 1998).

La respuesta eléctrica producida por palitoxina en la membrana del ovocito de *Xenopus*, presenta algunas similitudes con I_{Cx} . Por ejemplo, la palitoxina induce una despolarización con un incremento en la permeabilidad de la membrana a Na^+ y K^+ , actividad atribuida a canales catiónicos no selectivos (Habermann, 1989; Wang y Horisberger, 1997). Basados en la observación de que la ouabaina, un inhibidor específico de la Na,K-ATPasa, antagoniza el efecto de palitoxina, se postuló a la bomba de Na^+/K^+ como su blanco biológico. De esta forma el mecanismo propuesto para la corriente evocada por esta toxina es la activación de la Na^+/K^+ ATPasa como canal catiónico (Scheiner-Bobis y Schneider, 1997; Wang y Horisberger, 1997). Con la finalidad de conocer si la ouabaina también era un antagonista del veneno de Cx como lo es con la palitoxina, y así evidenciar

alguna relación entre ambas respuestas, a un grupo de 5 ovocitos le fue aplicada ouabaina (100 μM) en RN durante 2 minutos previamente a la coaplicación del veneno de *Cx* (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A otro grupo de ovocitos ($n=5$) control sólo le fue aplicado el veneno (misma concentración).

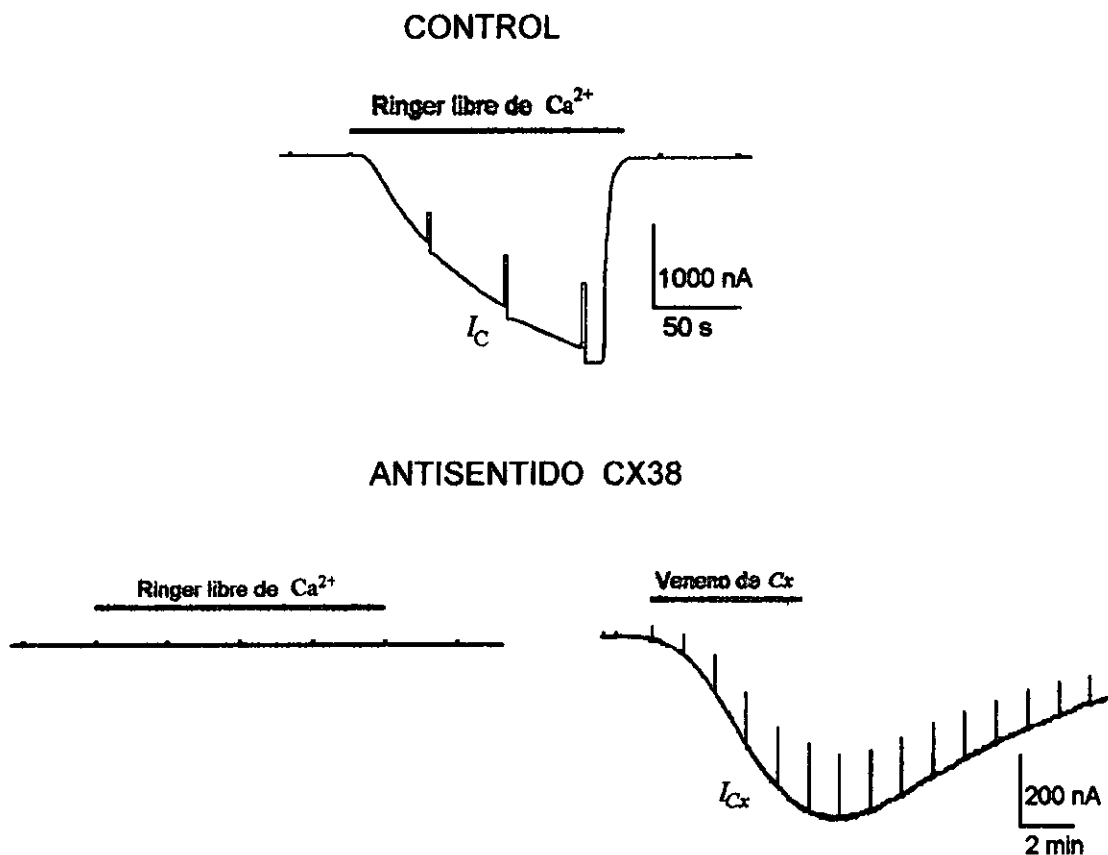


Figura 25. Relación de I_{Cx} e I_C

El registro control muestra un ejemplo típico de la corriente catiónica I_C activada por la perfusión de Ringer libre de Ca^{2+} . La generación de I_C fue inhibida en los ovocitos inyectados con el oligonucleótido antisentido de *Cx38*, sin embargo, los mismos ovocitos respondieron a la aplicación del veneno (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) generando I_{Cx} similares a las producidas en ovocitos control.

Los resultados mostraron que la amplitud y el curso temporal de I_{Cx} producida por la aplicación del veneno fue similar en presencia de ouabaina (473 ± 16 nA) comparado con el grupo control (ausencia de ouabaina, 342 ± 41 nA, $n=5$, Fig. 26). Esto indica que I_{Cx} no es inhibida por ouabaina sugiriendo que su mecanismo de acción es diferente al postulado para la palitoxina.

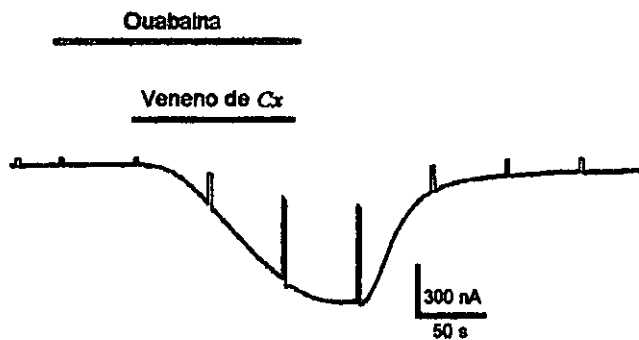


Figura 26. Coaplicación de ouabaina y el veneno de Cx

Aplicando $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de veneno, I_{Cx} fue generada sin diferencias con respecto a los controles en presencia de ouabaina ($100 \mu\text{M}$). El registro es ejemplo de 6 ovocitos (2 ranas) en cada condición.

I_{Cx} y su relación con la apertura de canales mecanosensibles (MS)

Finalmente, la tercera posibilidad analizada en este trabajo fue la relación de I_{Cx} con la corriente catiónica inespecífica (I_{Ms}) que es generada debido a la apertura de canales MS caracterizados en membrana de ovocito de *Xenopus*. Estos canales sólo han podido ser activados en ovocito por medio de presión o succión aplicados a la membrana en registros de canal unitario (Yang y Sachs, 1989; Yang y Sachs, 1990; Zhang y Hamill, 2000). El Gd^{3+} y otros cationes trivalentes como La^{3+} se han usado como moduladores farmacológicos de canales catiónicos no selectivos, y son la herramienta más utilizada para identificar la

presencia de canales MS (Yang y Sachs, 1989, Hamill y McBride, 1996; Caldwell et al., 1998). Además, ha sido demostrado el bloqueo por Gd^{3+} de otras conductancias catiónicas en varios tipos celulares, incluyendo ovocito de *Xenopus* (Hesheler y Schultz, 1993), por ejemplo sobre la I_C (Arellano et al., 1995).

Entonces, dado que ambas conductancias catiónicas I_{MS} e I_C son bloqueadas por cationes trivalentes, fueron realizados dos protocolos experimentales para demostrar el posible bloqueo de I_{Cx} por estos cationes. Primero, se generó I_{Cx} con el veneno y en el pico máximo de la corriente se aplicó Gd^{3+} o La^{3+} (10, 5 y 2.5 μM). Los resultados en este experimento mostraron que ambos, Gd^{3+} y La^{3+} bloquearon 100% de la I_{Cx} en una concentración de 10 μM (n=6, Fig. 27 A).

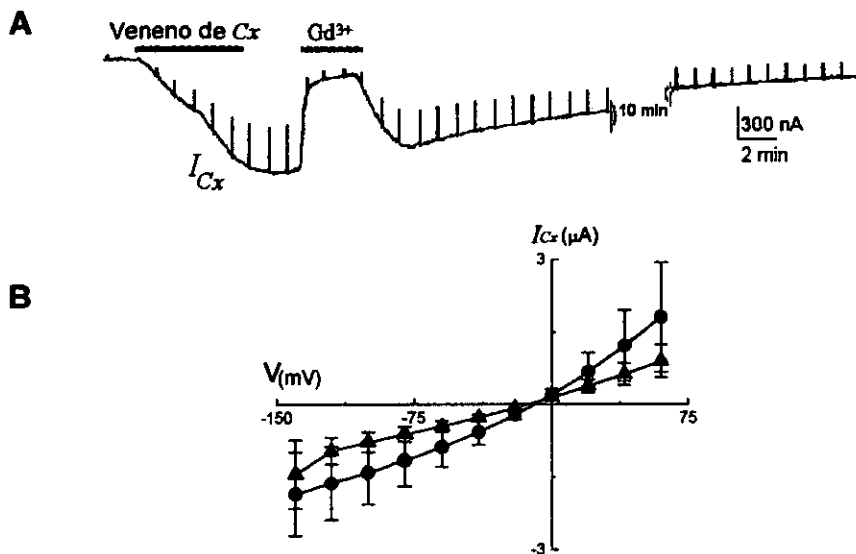


Figura 27. Efecto de Gd^{3+} sobre I_{Cx}

A) I_{Cx} (5 $\mu g\ ml^{-1}$ de veneno) fue bloqueada por Gd^{3+} (10 μM), el efecto fue completamente reversible en RN. B) Relación corriente-voltaje del bloqueo de I_{Cx} por Gd^{3+} (5 μM , \blacktriangle), comparado con I_{Cx} en condiciones control (\bullet). Los puntos son el promedio de 5 ovocitos distintos (2 ranas) en cada condición.

Determinado el bloqueo de I_{Cx} por Gd^{3+} el segundo protocolo fue realizado con la finalidad de conocer lo siguiente: 1) la dependencia al voltaje del bloqueo por Gd^{3+} sobre I_{Cx} lo cual podría aportar datos de la posible relación con los canales MS, y 2) información acerca del posible sitio de unión de Gd^{3+} en el canal de I_{Cx} . Para esto, la I_{Cx} fue generada con $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de veneno y en el pico de la corriente se aplicó Gd^{3+} o La^{3+} (5 y 10 μM), en el bloqueo máximo fue empleado el protocolo de pulsos de voltaje de -140 a +60 mV y fue construida la curva I/V correspondiente (Fig. 27 B). Los resultados mostraron que el efecto de bloqueo con Gd^{3+} o La^{3+} fue independiente del voltaje ($n=4$) sugiriendo que el sitio de acción de los cationes trivalentes fue superficial al poro del canal de I_{Cx} ; este comportamiento fue similar al observado por Yang y Sachs (1989) para los canales MS.

PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS TOXINAS BIOACTIVAS

Los resultados en el estudio realizado para determinar la naturaleza química de las sustancias con bioactividad, mostraron que la sustancia involucrada en la respuesta electrofisiológica fue termolábil, su actividad se perdió incubándola durante 5 min a una temperatura de 50 °C (Fig. 28 A; $n=4$; 2 ranas).

Además, la pérdida de la actividad con la incubación del veneno a 37°C fue gradual desde las 2 horas, y tanto la actividad electrofisiológica como la hemolítica fueron perdidas completamente a las 24 h. La mezcla de inhibidores de proteasas tuvo un efecto protector de ambas actividades, aún durante incubaciones a 37°C por 24 h. Los inhibidores de proteasas *per se* no generaron ningún tipo de actividad eléctrica o hemolítica (Fig. 28 B y C). Estos resultados sugirieron que las sustancias bioactivas son de naturaleza proteínica.

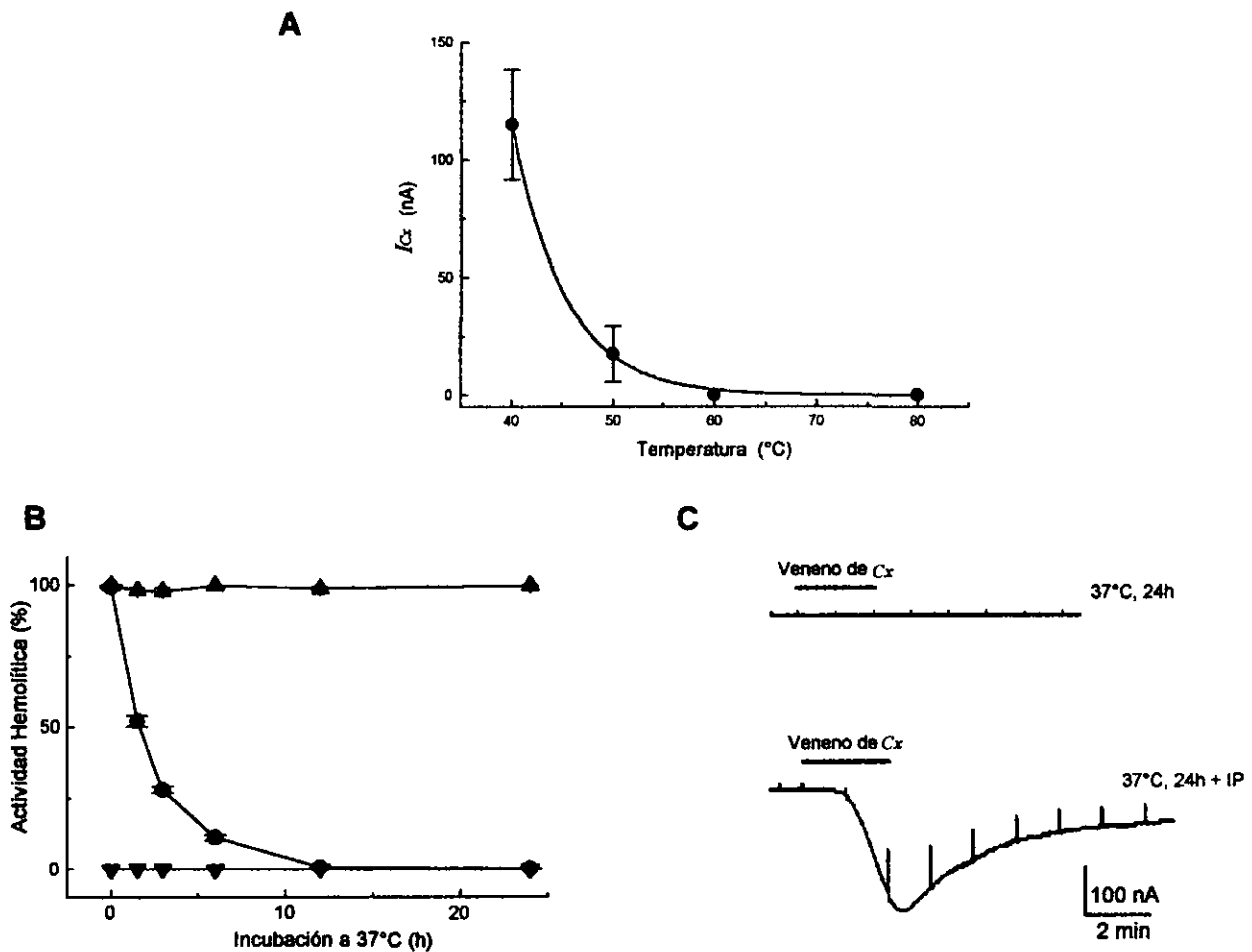


Figura 28. Naturaleza química de las toxinas bioactivas

A) Pérdida de la capacidad para generar I_{Cx} incubando el veneno de *Cx* durante 5 min a diferente temperatura. B) respuesta hemolítica de eritrocitos de oveja en presencia del veneno de *Cx* incubado a 37°C (●), el veneno de *Cx* incubado a 37°C junto con una mezcla de inhibidores de proteasas (▲) y solo la mezcla de inhibidores de proteasas (▼). C) El trazo superior es un ejemplo de la pérdida total de la actividad del veneno al ser incubado a 37 °C por 24 h. El trazo inferior muestra el efecto protector que tuvo la mezcla de inhibidores de proteasas (IP) sobre la pérdida total de actividad del veneno (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) a 37°C por 24 h.

Extracto de los brazos orales

Purificación parcial de la toxina que evoca a la I_{Cx} .

Durante la primera etapa de purificación, fueron colectadas 35 fracciones (Fig. 29 A). Las 35 fracciones fueron evaluadas para determinar su capacidad de generar I_{Cx} , sólo la fracción obtenida en el minuto 25 (F25), presentó consistentemente la actividad eléctrica.

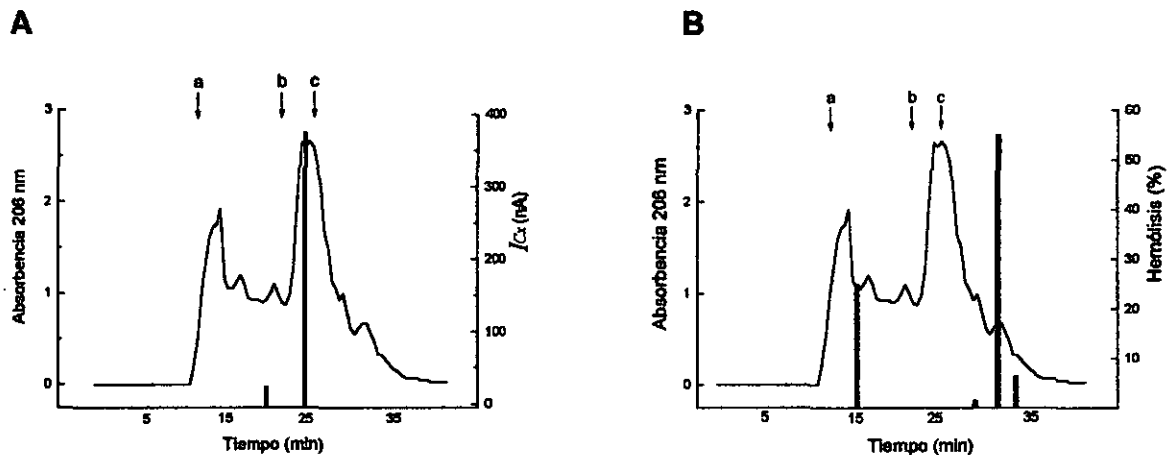


Figura 29. Perfil de elución de HPLC con la actividad electrofisiológica y hemolítica del extracto de brazos orales de Cx

En este y los demás perfiles de elución por HPLC que se presentan fue usada la columna Bio-Sil SEC-125 (600 x 7.5 mm), fueron colectadas fracciones de un mililitro y la absorbancia fue leída a 206 nm. En A) Las barras indican las fracciones que activaron a la I_{Cx} . En B) las barras indican las fracciones que presentaron actividad hemolítica. Se usaron los siguientes marcadores en ambos casos: a, tiroglobulina, (PM 670 000); b, mioglobina de caballo (PM 17 000), y c, vitamina B-12 (PM 1,350).

La F25 generó una corriente entrante con un E_{inv} of -12.47 ± 0.97 mV (Fig. 30 A y B). El comportamiento de esta corriente fue similar al observado en los mismos ovocitos al generarse la I_{Cx} por el veneno total (Fig. 30 A). Con el objetivo de determinar si la corriente inducida por F25 era también independiente de Ca^{2+} intracelular como lo era I_{Cx} , un grupo de ovocitos fue cargado con BAPTA-AM (10 μ M), estos ovocitos cargados con el quelante de Ca^{2+} respondieron a F25 de forma similar a lo observado con ovocitos control. La corriente generada presentó un E_{inv} of -10.77 ± 0.81 mV, un valor también muy semejante al de I_{Cx} que fue inducida por el veneno crudo (Fig. 30 B). Estos resultados indicaron que F25

contiene una sustancia capaz de evocar una respuesta muy similar a la I_{Cx} , generada por la sustancia proteínica presente en el extracto crudo.

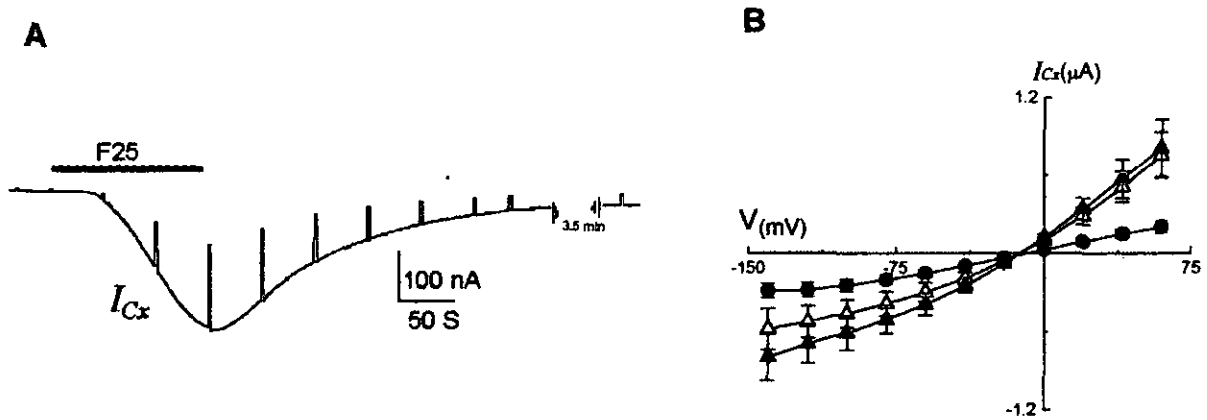


Figura 30. Corriente iónica generada por F25

A) Corriente típica generada por la fracción 25 ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) esta corriente entrante tuvo características similares a las de I_{Cx} . B) Relación corriente-voltaje de la corriente evocada por F25 ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$, Δ) y la de I_{Cx} evocada por el veneno total de Cx venom ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$, \bullet). La respuesta generada por F25 no se afectó en ovocitos cargados con BAPTA-AM (\blacktriangle). Cada punto representa la media de la corriente producida en 5 ovocitos (2 ranas).

Con la finalidad de conocer el número de proteínas presentes en F25 y tratar de evidenciar a la proteína responsable de la actividad, fue realizado un gel de electroforesis al 10% de acrilamida. El gel mostró un gran número de bandas correspondientes a proteínas de diferentes pesos moleculares (Fig. 31), por lo que no se pudo distinguir a la proteína bioactiva, como consecuencia de este resultado, fue realizada una segunda etapa de purificación.

En una segunda etapa de la purificación la F25 fue procesada a través de la columna de exclusión molecular en las mismas condiciones (Fig. 32 A); nuevamente la fracción 25 de esta segunda purificación presentó en forma consistente actividad electrofisiológica. Con la finalidad de obtener datos del posible peso molecular de la toxina que genera I_{Cx} , la fracción 25 obtenida de F25 (F25B) se corrió por la misma columna utilizando un amortiguador de fosfatos pH

6.8, solución utilizada para la calibración de la columna con diferentes patrones moleculares.

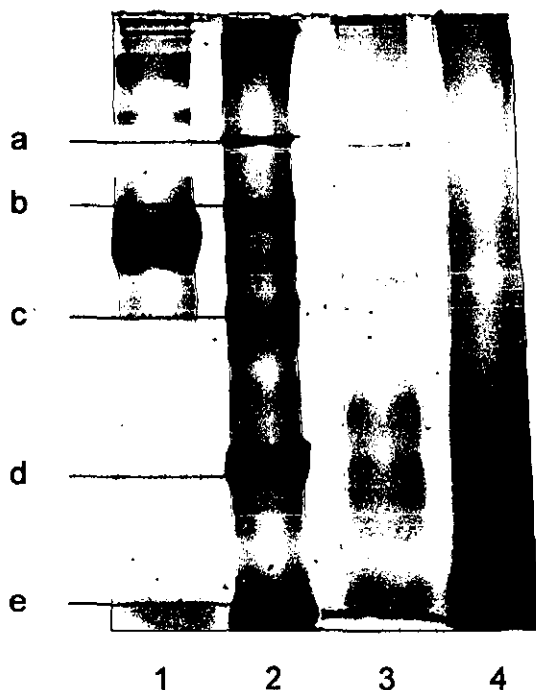


Figura 31. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% de extracto crudo y F25
Líneas: 1) albúmina , 2) Marcadores de peso molecular. a, Miosina 200 000; b, b-galactosidasa 116 200; c, Fosforilasa b 97 400 ; d, Albúmina 66 200; e, Ovoalbúmina 45 000. 3) F25, 4) Extracto crudo. Tinción con plata (kit Bio-Rad).

En la cromatografía con el amortiguador de fosfatos, la F25B fue dividida en dos picos (F1 y F3) y un valle (F2; Fig. 32 B). De acuerdo a la calibración de la columna, uno de los picos (F1) se presentó en el área no retenida del cromatograma que corresponde a tamaños moleculares mayores a 100 000 Da y el otro pico (F3) se presentó en la zona en la cual eluyen moléculas de tamaño de un poco mayor a 1300 Da. En este caso, ninguno de ambos picos generó I_{Cx} aplicando a los ovocitos de *Xenopus* concentraciones de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de F1 o F3, y $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de F2. Este resultado sugiere que quizá sean requeridas al menos dos entidades moleculares de diferente tamaño para generar I_{Cx} . Sin embargo, tampoco presentaron actividad cuando las fracciones fueron mezcladas

nuevamente. Esto sugiere, entre otras posibilidades, que se produjo un cambio conformacional en la toxina que provocó la pérdida de actividad.

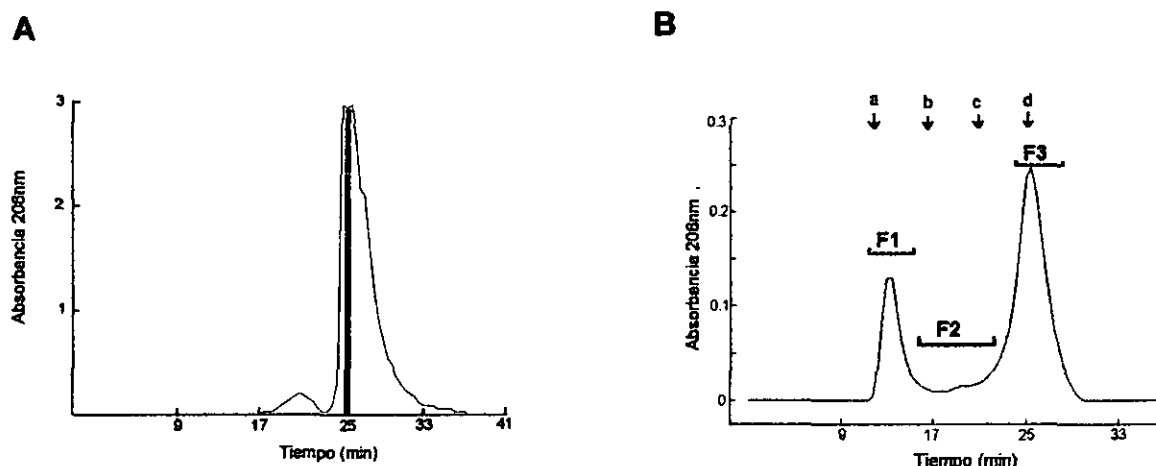


Figura 32. Perfiles de elución de F25 y F25B por HPLC

En A) se muestra el cromatograma de F25, donde la columna fue equilibrada y eluida con amortiguador de acetato de amonio 10 mM pH 7, la barra indica la fracción F25B con actividad electrofisiológica que se tomó para el siguiente cromatograma. B) es el perfil de elución de F25B en la misma columna anterior equilibrada y eluida con un amortiguador de fosfatos pH 6.8, las barras horizontales muestran las tres fracciones obtenidas de esta purificación. Fueron usados los siguientes marcadores para la calibración de la columna: a, tiroglobulina, (PM 670 000); b, ovoalbúmina de pollo (PM 45 000); c, mioglobina de caballo (PM 17 000), y d, vitamina B-12 (PM 1,350).

Por otro lado, I_{Cx} no fue generada consistentemente en ninguna fracción de las cromatografías de intercambio iónico probadas (datos no mostrados).

Purificación parcial de la toxina con actividad hemolítica

Fue determinada también la actividad hemolítica de las 35 fracciones obtenidas de la primera etapa de purificación mencionada anteriormente. La actividad hemolítica se presentó en las fracciones correspondientes a los minutos de elución 15 y 31 (Fig. 29 B), estos datos sugieren la presencia de más de una hemolisina. La fracción que evoca I_{Cx} no presentó actividad hemolítica.

La estrategia que ha sido exitosa para la purificación de las toxinas hemolíticas es diferente a la utilizada para la toxina que presentó la actividad electrofisiológica, debido principalmente a que las proteínas hemolíticas fueron muy estables al ser procesadas en resinas de intercambio iónico (ver Sánchez-Calderón 2001).

Extracto de la secreción mucosa

Purificación parcial de la toxina con actividad electrofisiológica

Se obtuvieron 35 fracciones de la primera cromatografía de exclusión molecular. La actividad máxima se presentó en la fracción 24, presentando también actividad las fracciones, 25, 26 y 27 (Fig. 33).

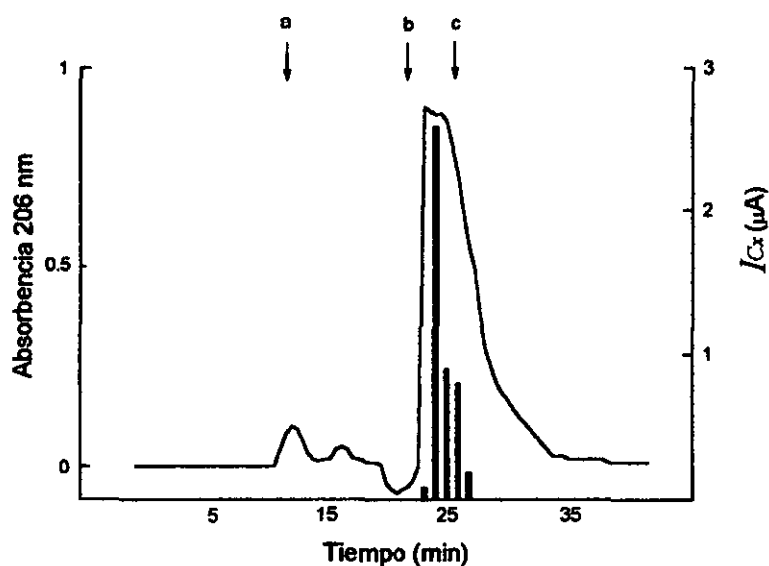


Figura 33. Perfil de elución por HPLC del veneno de *Cx* de la secreción mucosa
La columna fue equilibrada y eluida con acetato de amonio 10 mM PH 7. Las barras indican las fracciones que activaron a I_{Cx} . Se usaron los siguientes marcadores: a, tiroglobulina, (PM 670 000); b, mioglobina de caballo (PM 17 000) y c, vitamina B-12 (PM 1,350).

En el gel de electroforésis realizado con la fracción 24 se observó gran cantidad de sales (datos no mostrados), por este motivo se trató de desalar en la columna HTD. De tres fracciones obtenidas en la última purificación la actividad se presentó en la fracción tres, que correspondió también con la fracción de elución de las sales como puede observarse en el gráfico de conductividad (Fig. 34).

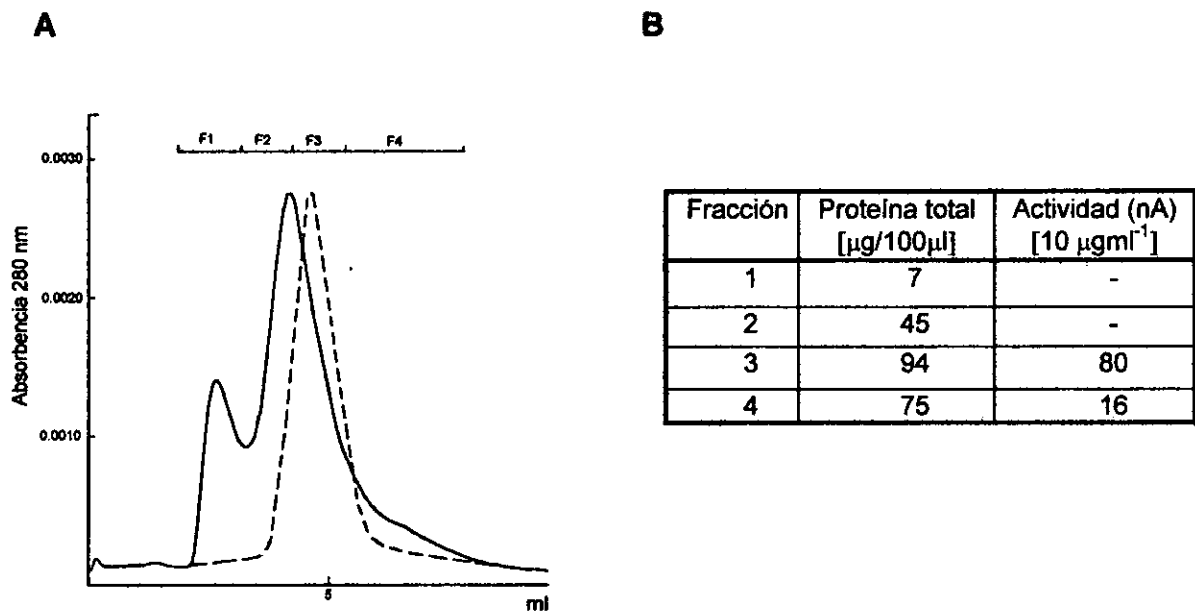


Figura 34. Perfil de elución y actividad electrofisiológica del fraccionamiento de F24 del extracto de la secreción mucosa

A) En un sistema de FPLC fue usada la columna HiTrap desalting, equilibrada y eluída con amortiguador de bicarbonato de amonio 100 mM a pH 7; en este caso se agruparon las fracciones con respecto a la absorbencia de 280 nm y al contenido de sales. El perfil de línea punteada representa la conductividad de las sales en la muestra. B) la tabla muestra la relación de proteína obtenida y actividad electrofisiológica de la cuatro fracciones.

Debido a la coelución de sales con la proteína activa se procedió a utilizar columnas de poliacrilamida para desalar por centrifugación. Este procedimiento no permitió obtener resultados satisfactorios; la concentración de proteína medida por el método de absorbencia (ver sección de métodos) presente en el

sobrenadante de los tres lavados (L) consecutivos fue la siguiente: L1= 184, L2= 853 y L3= 349 $\mu\text{g ml}^{-1}$. La mayor concentración de proteína se presentó en el segundo lavado, eluyendo nuevamente con las sales. La I_{Cx} máxima que generó la proteína ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) del segundo lavado fue de 20 nA, actividad muy reducida con respecto a ovocitos control, los cuales respondieron al veneno crudo (misma concentración) con I_{Cx} hasta de 476 nA.

Extracto de la estimulación eléctrica

Purificación parcial de las toxinas con actividad hemolítica.

En la primera etapa de purificación, utilizando la columna HTD, fueron obtenidas cuatro fracciones (Fig. 35 A). Para cada una de las fracciones fue evaluada la actividad hemolítica con 27 μg (0.5 de UH_{50}) de proteína en eritrocitos de oveja (Fig. 35 B). La sustancia con actividad hemolítica fue encontrada principalmente en la fracción 1 (F1), esta fracción fue seleccionada para seguir purificándola con diferentes estrategias.

En las siguientes purificaciones la actividad hemolítica fue evaluada en eritrocitos de humano debido principalmente a la mayor sensibilidad que presentaron estos eritrocitos a las toxinas, como fue observado en la curva concentración-respuesta del extracto crudo de los brazos orales.

En la figura 36 A se observa el perfil cromatográfico obtenido en la segunda etapa de purificación, a través de la columna BSS con amortiguador de acetato de amonio. Fueron recuperadas 5 fracciones y a cada una de ellas se les determinó actividad hemolítica con $3.4 \mu\text{g ml}^{-1}$ que representa $0.5 UH_{50}$ de humano (Fig. 36 B). La fracción 1 fue la que presentó mayor actividad; la sustancia activa eluyó en la zona que corresponde a un PM mayor de 100 000.

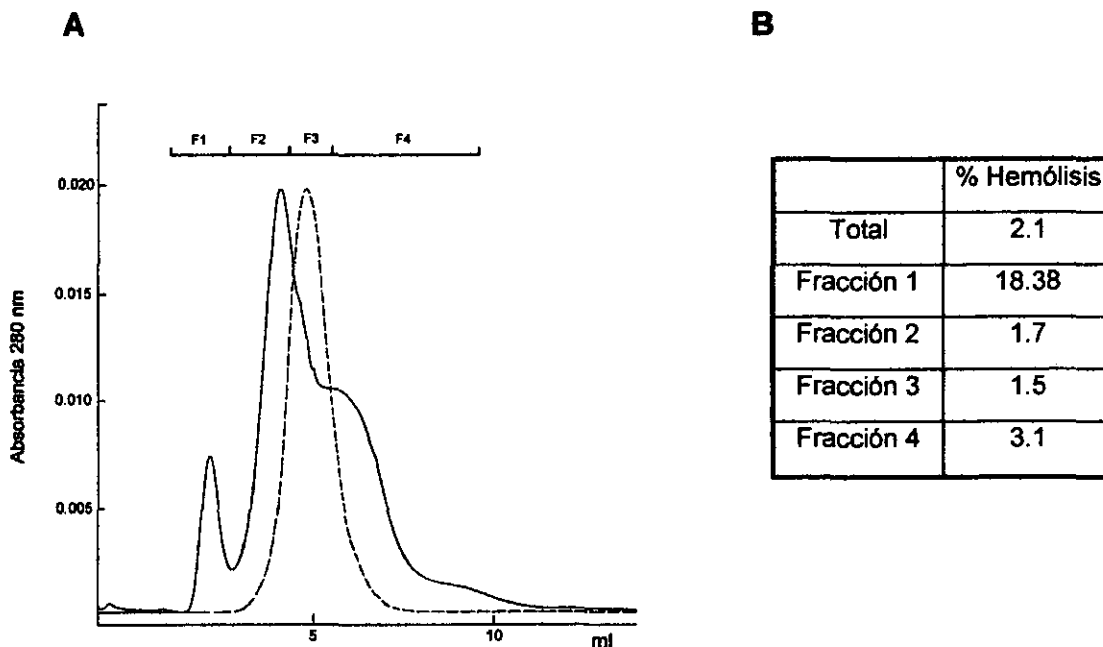


Figura 35. Primera etapa de purificación del extracto de la estimulación eléctrica

A) Perfil de elución del extracto obtenido por estimulación eléctrica usando la columna HiTrap desalting equilibrada y eluida con amortiguador de bicarbonato de amonio 100 mM pH 7, en un sistema de FPLC. La línea punteada muestra el perfil de conductividad de las sales y las barras la agrupación de las fracciones usadas para determinar la actividad hemolítica. B) la tabla muestra la actividad hemolítica en eritrocitos de oveja de las diferentes fracciones. Se utilizaron 27 μg (1/2 UH) de proteína.

Además, la proteína de la misma fracción 1 obtenida con la columna HTD, fue procesada por la misma columna de BSS en HPLC pero en este caso equilibrada y eluida con amortiguador de fosfatos a pH 6.8, obteniéndose el perfil cromatográfico presentado en la Fig. 37 A. La actividad hemolítica de las diferentes fracciones se puede observar en la tabla de la Fig. 37 B. En esta purificación fueron 2 fracciones las que exhibieron alta actividad hemolítica con 3.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.5 de UH_{50}) de proteína, la fracción 1 presentó un 100% de hemólisis y la fracción 3 un 94.02%; estos datos indican al menos tres cosas: 1) refuerza la idea de la presencia de más de una hemolisina, 2) la fuerza iónica de este amortiguador permite separarlas y 3) ya que ha sido reportada la estabilidad y el aumento en la potencia de la actividad debido a altas concentraciones de sales en

las hemolisinas de la anémona *Stichodactyla helianthus* (Alvarez et al., 1998), en el caso de la hemolisinas de *Cx* posiblemente las sales de fosfatos de alguna forma confieren a las toxinas mayor actividad. En este sentido es importante hacer notar que las sales del amortiguador de fosfatos en la misma concentración que se encuentran en las fracciones no presentaron actividad hemolítica.

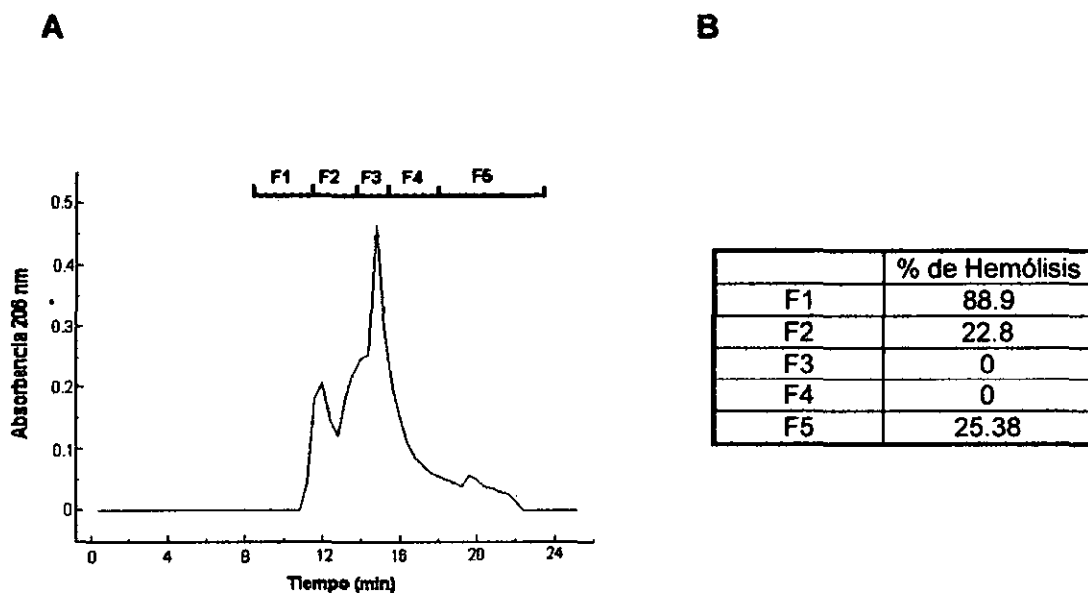


Figura 36. Segunda etapa de purificación del extracto de la estimulación eléctrica

A) Perfil de elución de F1(HiTrap desalting) obtenida del procedimiento descrito en la Fig. 35, y eluida en la columna Bio-Sil SEC 125 con amortiguador de acetato de amonio 10 mM pH7. B) la tabla muestra la actividad hemolítica de las diferentes fracciones en eritrocitos humanos.

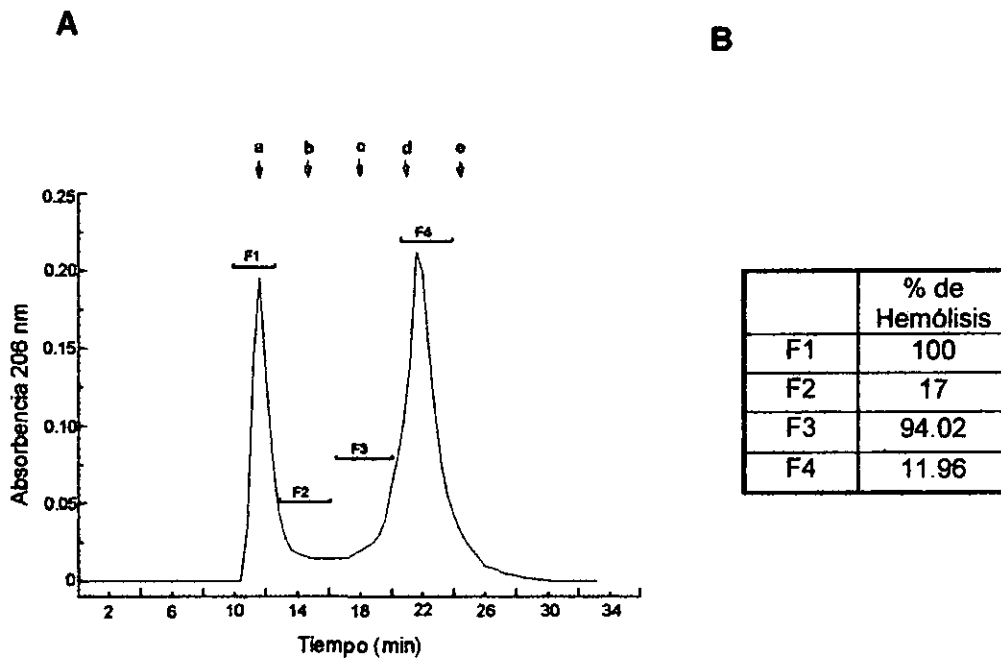


Figura 37. Segunda etapa de purificación del extracto de la estimulación eléctrica utilizando alta concentración de sales

A) Perfil de elución de F1 (HiTrap desalting) obtenida del procedimiento descrito en la Fig. 35, y eluida en la columna Bio-Sil SEC 125 con amortiguador de fosfatos pH 6.8. B) la tabla muestra la actividad hemolítica de las diferentes fracciones en eritrocitos humanos. Fueron usados los siguientes marcadores para la calibración de la columna: a, tiroglobulina, (PM 670 000); b, gamaglobulina (158 000) c, ovoalbúmina de pollo (PM 45 000); d, mioglobina de caballo (PM 17 000), y e, vitamina B-12 (PM 1,350).

DISCUSIÓN

La discusión de este trabajo de tesis está enfocada en cinco puntos principalmente: 1) el origen de las toxinas bioactivas, 2) el mecanismo de acción implicado en la actividad hemolítica generada por el veneno de *Cx*, 3) características generales de I_{Cx} y su posible relación con la apertura de canales endógenos de el ovocito de *Xenopus*, 4) la $I_{Cl(Ca)}$ producida por el veneno de la medusa y su mecanismo de activación, y 5) características químicas de las toxinas bioactivas.

ORIGEN DE LAS SUSTANCIAS BIOACTIVAS

La medusa *Cx* requiere de estrategias para la obtención de alimento y para defenderse, el mecanismo utilizado principalmente por cnidarios, como se ha estudiado en anémonas y otras medusas, es el uso de toxinas contenidas en los nematocistos. También, *Cx* contiene dinoflagelados simbioses que pudieran estar participando en la síntesis de sustancias bioactivas, y además se han encontrado toxinas en extractos de otros tejidos en medusas. Entonces las sustancias con actividad biológica encontradas en *Cx* podría tener al menos tres fuentes: nematocistos, dinoflagelados u otros tejidos del cuerpo.

En este trabajo fueron estandarizadas tres técnicas de extracción para la obtención del veneno de la medusa *Cx*. El estudio bioquímico y de bioactividad en cada uno de los extractos permitieron mostrar la presencia de diferentes sustancias biológicamente activas en ellos, y discernir en forma parcial su origen.

La actividad tanto hemolítica como la generación de I_{Cx} que presentó la preparación obtenida estimulando eléctricamente a organismos vivos de la medusa, apoya la posibilidad de que los nematocistos contengan a las sustancias bioactivas. El hecho de que estas toxinas se encuentren en los nematocistos indica que quizá estén participando en el mecanismo de caza y/o defensa de la medusa, como se conjetura para péptidos y proteínas encontrados en venenos de otros organismos marinos. Esta función es más clara para las toxinas hemolíticas. Por ejemplo, Kem (1988a) sugirió que las toxinas líticas tienen un papel

secundario por el cual producen sus efectos sobre la presa o el depredador, considerando como efectos primarios a la parálisis neuromuscular, el dolor y la inflamación producidas por el piquete, y como efectos secundarios al rompimiento del integumento (lisis) para la mejor penetración del resto de las toxinas implicadas en el mecanismo de toxicidad, y que además las citolisinas quizá participen en la digestión del alimento.

Por otra parte, para las toxinas de *Cx* que mostraron actividad electrofisiológica como activadores de canales es más difícil enmarcarlas en el contexto de toxinas utilizadas como medios de caza o defensa, son escasos los estudios de toxinas que provocan despolarización celular descritas para cnidarios, como es el caso del veneno de *Physalis physalis* (Edward y Hessinger, 2000), *Aurelia aurita* (Kihara et al., 1988) y el de *Chrysaora sp.* (Dubouis et al., 1983). Si bien no pueden ser descartadas como toxinas con la función de caza/defensa, también es importante considerar que las sustancias del veneno de *Cx* que generaron respuestas electrofisiológicas en el ovocito de *Xenopus* pudieran tener un papel fisiológico en el propio nematocisto. Es decir, es probable que los nematocistos además de contener proteínas y péptidos necesarios para capturar a su presa o para defenderse, requieran de otras moléculas para cumplir con procesos fisiológicos como lo es el propio mecanismo de descarga. Ha sido sugerida la participación de algunos polipéptidos y proteínas aisladas de nematocistos de cnidarios, principalmente en hydrozoos y anémonas (Weber et al., 1988; Hessinger, 1988) en diferentes procesos fisiológicos de estos cnida.

La generación de I_{Cx} en el extracto obtenido por la estimulación eléctrica sugiere que los dinoflagelados simbiosntes no están involucrados en la síntesis de la toxina que evoca a la corriente. Sin embargo, al comparar los perfiles cromatográficos se observa al menos una fracción hemolítica en un área del cromatograma que disminuye considerablemente en el extracto de la secreción mucosa con respecto al extracto obtenido a partir de los brazos orales (ver resultados) lo cual puede indicar dos cosas: a) que los dinoflagelados si participan en la producción de alguna de las hemolisinas, ó b) que al menos una de las

hemolisinas esté siendo producida en el cuerpo del organismo, en forma similar a lo que ocurre en las cubomedusas *Chironex fleckeri* (Endean et al., 1993), *Carybdea rastoni* (Nagai et al., 2000a) y *Carybdea alata* (Nagai et al., 2000b).

Esto último lleva a considerar un estudio toxicológico de sustancias provenientes de diferentes tejidos de la medusa y además un análisis de las sustancias bioactivas de un extracto de dinoflagelados. Los simbiontes de *Cx*, que son de la especie *Symbiodinium microadriaticum*, pudieran ser separados y cultivados como se ha hecho con otros dinoflagelados del mismo género (Kobayashi et al., 1988). Algunos estudios sobre *Symbiodinium sp* han mostrado que contienen elementos fotosintéticos y fosfatasas ácidas (Fitt y Trench, 1983). Sin embargo, no hay evidencias de toxinas con actividad biológica de la especie *S. microadriaticum*. No debe descartarse la necesidad de un estudio sistemático de este organismo como poseedor de sustancias bioactivas ya que toxinas aisladas de otras especies del mismo género han presentado efectos como activadoras de la ATPasa de Ca^{2+} (Kobayashi et al., 1988) y vasoconstrictoras (Nakamura, 1993).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VENENO DE *Cx*

En este trabajo fue evaluada la actividad biológica del veneno de *Cx* en dos distintos modelos celulares: 1) hemólisis en eritrocitos humanos y de oveja, y 2) actividad electrofisiológica en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los resultados de la actividad del veneno sobre ambos modelos permitieron mostrar algunos aspectos de la interacción de las toxinas producidas por la medusa con componentes de la membrana celular.

Actividad hemolítica producida por el veneno de *Cx*

No obstante que el veneno de la medusa *Cx* presentó la misma eficacia hemolítica tanto en eritrocitos de humano como en los de oveja, los eritrocitos humanos fueron más sensibles. En estudios previos concernientes al mecanismo

de acción de proteínas citolíticas, ha sido mostrado que este tipo de toxinas parecen interactuar directamente con los fosfolípidos o con otras moléculas asociadas a éstos en la membrana celular (Bernheimer y Rudy, 1986) presentando actividad de fosfolipasa o formando poros transmembranales. Algunas toxinas citolíticas se unen con el colesterol como blanco celular (Bernheimer y Avigad, 1978; Rossjohn et al., 1997) y otras tienen como aceptor a la esfingomielina (Bernheimer, 1990).

La proporción de los diferentes componentes lipídicos de membrana difiere entre los eritrocitos de las diversas especies animales, por ejemplo, la membrana de los eritrocitos de oveja, y de rumiantes en general, contienen alrededor de tres veces más esfingomielina que los eritrocitos humanos (Rottini et al., 1995, Ikezawa et al., 2000). Esta diferencia en la composición de los lípidos explicaría, al menos en parte, la mayor selectividad del veneno de *Cx* sobre los eritrocitos humanos con respecto a los de oveja. Esto indirectamente sugiere que al menos la esfingomielina no es el blanco de estas toxinas (o de la toxina más abundante en el extracto) involucrado en el mecanismo de acción responsable de la hemólisis. Esta hipótesis también fue directamente apoyada por los resultados del estudio de Radwan y cols. (2001), en donde nuestro grupo encontró la actividad de fosfolipasa A_2 y hemólisis del veneno crudo inhibida por varios lípidos (colesterol, fosfatidilcolina y gangliósidos). El estudio fue extendido a diferentes fracciones de la medusa *Cx*. Los estudios mostraron que ninguna fracción hemolítica fue inhibida por esfingomielina.

Los resultados experimentales de este estudio, permiten postular la presencia de más de una hemolisina en el extracto total, esto también es sustentado por el trabajo realizado por Sánchez-Calderón (2001) en el cual se purificó una de las hemolisinas con un PM de aproximadamente 57 500. Este tamaño difiere con respecto al de las fracciones hemolíticas observadas en los perfiles cromatográficos en este trabajo, además el estudio de Radwan y cols. (2001), mencionado anteriormente, demuestra al menos dos mecanismos de acción en diferentes fracciones del extracto de *Cx*, estos datos también apoyan la idea de la presencia de más de una hemolisina.

Puede considerarse entonces a la actividad hemolítica producida por el extracto total de *Cx*, como la resultante de la suma de la bioactividad de diversas citolisinas con diferentes mecanismos de acción, como sucede en otros cnidarios (Lanio et al., 2001; Edean, et al., 1993). Por lo tanto, esta medusa puede ser importante como fuente de toxinas con actividad sobre lípidos y otros componentes no proteínicos de la membrana celular.

Actividad eletrofisiológica evocada por el veneno de *Cx*

Características de I_{Cx}

En el estudio electrofisiológico fueron observadas tres respuestas al veneno de *Cx* sobre la membrana del ovocito de *Xenopus laevis*. La respuesta más consistente fue la activación de una corriente que fue llamada I_{Cx} . La I_{Cx} fue generada en todos los ovocitos utilizados y fue caracterizada como una corriente catiónica acarreada principalmente por iones de Na^+ y K^+ .

Los canales de I_{Cx} parecen poco permeables a Cl^- como se puede observar en el ligero desplazamiento hacia potenciales negativos resultado de la sustitución de este anión por SO_4^{2-} en RN. Sin embargo, la disminución de la amplitud de la corriente en esta sustitución sugiere una interferencia del SO_4^{2-} o la necesidad de Cl^- en el mecanismo involucrado en la generación de la respuesta por la aplicación del veneno de *Cx*. El sulfato pudiera provocar un impedimento estérico para el flujo de iones que participan en la corriente; también puede considerarse para explicar este comportamiento, que la toxina quizá presenta una mejor actividad en presencia de iones Cl^- comparado con la presencia de iones de SO_4^- , esto pudiera ser debido a la electronegatividad de cada anión, el tamaño, o el número de cargas que los rodean. También la ausencia de Cl^- puede estar afectando de alguna forma la unión de la toxina con los componentes de membrana involucrados en la generación de la respuesta, o incluso la conformación misma de la toxina que pudiera estar siendo alterada de diferente forma por cada uno de los aniones. Todas estas especulaciones requieren de un estudio detallado para elucidar el papel que pudiera estar ejerciendo el Cl^- en la activación de I_{Cx} .

El rango de permeabilidad de los diferentes cationes permite discutir el tamaño aproximado del poro por donde fluye I_{Cx} . Los resultados mostraron que el TEA^+ parece ser permeable por los canales de I_{Cx} , en contraste al $NMDG^+$ que fue impermeable. El tamaño de una molécula es definida por el radio de Van der Waals de los átomos individuales y su estructura molecular (Villarreal 1997) así, el TEA^+ en forma cristalina tiene un diámetro molecular de 7.1 – 8.8 Å (Zhang et al., 1998); esto sugiere que el tamaño del poro de los canales de I_{Cx} tienen al menos un diámetro mayor al del TEA^+ .

Mecanismo de acción de I_{Cx}

Nuestras evidencias experimentales apoyan indirectamente que el mecanismo activado por el veneno de Cx corresponde con la apertura de un canal y no con un rompimiento no específico de la membrana, por ejemplo: a) la completa recuperación de la conductancia de la membrana después de la generación de I_{Cx} ; b) la desensibilización producida sobre I_{Cx} en subsecuentes aplicaciones del veneno en el mismo ovocito; c) la ligera rectificación de las corrientes entrantes observada en la relación I/V de I_{Cx} , d) la eliminación de I_{Cx} en ovocitos maduros, y e) las diferencias en las amplitudes de I_{Cx} en ovocitos provenientes de distintos donadores con la misma concentración de veneno, esto último podría estar indicando que algún componente membranal necesario para la activación de I_{Cx} se expresa diferencialmente de donador a donador, en forma similar a lo que sucede con las respuestas de acetilcolina de tipo muscarínico y varias otras (Arellano y Miledi, 1993; Arellano et al., 1996).

Con estos antecedentes, fueron considerados al menos dos posibles mecanismos de acción involucrados durante la activación de I_{Cx} : a) la toxina del veneno de Cx se inserta en la membrana formando un poro, mecanismo similar al usado por algunas citolisinas (Bernheimer y Avigad, 1978; Bernheimer y Rudy 1986; Rossjohn et al., 1997), y b) el veneno de Cx requiere de componentes proteínicos normalmente presentes en la membrana del ovocito para la activación de I_{Cx} .

La pérdida de I_{Cx} en ovocitos maduros *in vitro*, por tratamiento con progesterona, ofreció una evidencia importante de que el veneno de *Cx* requiere de otros componentes proteínicos presentes en la membrana del ovocito para poder generar la respuesta. Es sabido que los ovocitos de los anfibios pueden permanecer por años en el estado diploteno de la profase meiótica, y la reanudación de la meiosis en el ovocito primario del anfibio requiere de progesterona. *In vivo*, esta hormona es secretada por las células foliculares en respuesta a las hormonas gonadotrópicas secretadas por la hipófisis. Dentro de las primeras 6 horas después de estimulación con progesterona, se rompe la vesícula germinal, el microvilli se retrae, el nucleolo se desintegra y los cromosomas se contraen y migran hacia el polo animal para iniciar su división. Este proceso es llamado maduración del ovocito (Gilbert, 1997). Además de todos los cambios mencionados, ha sido observado electrofisiológicamente que en ovocitos de *Xenopus leavis* maduros *in vitro* con progesterona, las respuestas a diferentes neurotransmisores son fuertemente inhibidas, por ejemplo las respuestas a acetilcolina, a catecolaminas (Kusano et al., 1982), a un factor de suero y la respuesta debida a la remoción de Ca^{2+} extracelular llamada I_C (Arellano et al., 1995), además de otras respuestas (Miledi R. y Arellano R.O., comunicación personal). Para explicar este fenómeno, se postula que durante la maduración sucede una reorganización y regulación importante de proteínas membranales tales como canales iónicos y receptores, con la finalidad de permitir la inserción de nuevas proteínas involucradas en la diferenciación (Kusano et al., 1982). Todas las respuestas al veneno de *Cx* fueron también inhibidas en ovocitos maduros, esto parece implicar la participación de algunos componente de la membrana que son modificados por la maduración, y que son necesarios para la activación I_{Cx} y de las otras dos respuestas. Estos componentes pudieran ser proteínas de membrana, por ejemplo, aquellas que están involucradas en la generación de alguna de las respuestas catiónicas nativas caracterizadas previamente en ovocito.

De acuerdo a las características electrofisiológicas de I_{Cx} existen al menos tres diferentes tipos de canales nativos que pudieran corresponder con los que son activados durante esta corriente.

Los resultados experimentales mostraron que I_{Cx} no es activada por la apertura de hemicanales Cx38 involucrados en la generación de I_C . Tampoco el veneno de Cx parece utilizar el mismo mecanismo que la palitoxina, a través de la activación de la Na^+/K^+ ATPasa en una conformación que parece comportarse como un canal iónico (Scheiner-Bobis y Schneider, 1997; Wang y Horisberger, 1997).

Sin embargo, la activación de los canales mecanosensibles (MS) todavía permanece como una posibilidad. Tres evidencias apoyan la similitud entre I_{Cx} e I_{MS} : a) Los canales MS descritos por Yang y Sachs (1989), para ovocitos de *Xenopus* son catiónicos inespecíficos; b) durante su caracterización farmacológica el bloqueo más eficiente fue dado por Gd^{3+} en concentraciones 10 μM , al igual que el efecto producido por este catión trivalente sobre I_{Cx} , y c) el bloqueo por Gd^{3+} en ambas corrientes fue a través de un mecanismo independiente del voltaje. A pesar de que es sabido que otros canales son bloqueados por este ión trivalente (Hescheler y Schultz 1993), por ahora el Gd^{3+} es la herramienta más utilizada para identificar la presencia de canales MS (Caldwell et al., 1998). Con el fin de explorar la real participación de los canales MS en la generación de la respuesta producida por el veneno de Cx, se hace necesario el diseño de futuros experimentos enfocados a la caracterización farmacológica detallada de I_{Cx} . También, considerando que los canales MS han sido caracterizados utilizando la técnica de canal unitario, la aplicación de esta técnica para resolver las corrientes unitarias de I_{Cx} ayudaría a establecer una mejor comparación en el comportamiento y cinética de los canales involucrados en la respuesta al veneno y la de los canales MS.

Por otra parte, es importante mencionar que la maitotoxina una toxina de origen marino aislada de dinoflagelados de la especie *Gambierdiscus toxicus*, también genera una corriente entrante catiónica (I_{Mtx}) (Bielfeld-Ackermann, et al., 1998), similar a I_{Cx} , en ovocitos de *Xenopus laevis*. La I_{Mtx} en ovocitos, es

bloqueada por Gd^{3+} y los canales que son activados por maitotoxina no son permeables a $NMDG^+$. También se ha observado que la maitotoxina produce un incremento en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular (Bielfeld-Ackermann, et al., 1998; Weber, 1999; Weber et al., 2000), y puede llegar a generar $I_{Cl(Ca)}$ (Bielfeld-Ackermann, et al., 1998; Martínez et al., 1999). Dadas estas características, Bielfeld-Ackermann y cols. (1998) proponen también que los canales activados por maitotoxina están relacionados con los canales MS. Todo lo anterior parece apoyar la idea de que existen similitudes entre las respuestas I_{Cx} e I_{Mtx} , provocadas por toxinas, con la corriente nativa esperada para la apertura de canales MS del ovocito.

La posibilidad de contar con una sustancia que module la activación de los canales MS es importante ya que este tipo de canales sólo han sido activados y caracterizados por presión o succión después de formar un sello con la pipeta de "patch clamp" (Zhang and Hamill, 1999). No hay evidencias directas de corrientes macroscópicas fluyendo a través de los MS activadas en ovocitos completos con cualquier estímulo. En otros tipos celulares, los canales MS están involucrados en un amplio rango de respuestas, por ejemplo, a perturbaciones mecánicas incluyendo regulación del volumen celular, incremento de Ca^{2+} intracelular, proliferación celular, expresión de genes, síntesis de DNA, activación de baroreceptores, actividad eléctrica cardíaca alterada (ver revisión de Hamill y McBride, Jr. 1996). Es interesante que en un estudio realizado en la medusa *Pelagia nocticula* fue observado que la descarga de los nematocistos fue inhibida por el Gd^{3+} , los autores de este estudio sugieren la presencia y la activación de canales MS en los nematocistos, lo cual permite la entrada del Ca^{2+} necesario para que se lleve a cabo el mecanismo de descarga de los cnida (Salleo et al., 1994).

Considerando todo lo anterior, las toxinas que activen canales MS podrían representar una nueva y poderosa herramienta para el estudio del significado fisiológico de éstos, en la membrana del ovocito y otras células.

Si el veneno de *Cx* no estuviera activando a los canales MS del ovocito, aún existe la posibilidad de que el blanco de la toxina que permite la activación de I_{Cl} sea alguna otra molécula en la membrana.

Este parece ser el caso para algunas de las respuestas provocadas por el veneno, por ejemplo, la que involucra la generación de $I_{Cl(Ca)}$. La activación de esta respuesta evidencia la presencia de más sustancias bioactivas de interés en el veneno de *Cx*.

$I_{Cl(Ca)}$ evocada por el veneno de la medusa

La corriente oscilatoria característica de la apertura de canales permeables a Cl^- dependientes del aumento de Ca^{2+} intracelular fue generada por el veneno de *Cx* en 34 ovocitos de los 150 estudiados; la inconsistencia de la $I_{Cl(Ca)}$ puede deberse a la variabilidad biológica en cada donador, tal y como sucede con otras respuestas nativas. El sistema completo de transducción de señales involucrado en este tipo de respuesta está compuesto de varios pasos que incluye: la estimulación del receptor, activación de fosfolipasa C vía una proteína G, la subsecuente producción de IP_3 -diacilglicerol y finalmente la liberación de Ca^{2+} de reservorios celulares, este aumento de Ca^{2+} intracelular provoca la apertura final de los canales permeables a Cl^- . Algún componente del veneno de *Cx* quizá esté actuando sobre uno de los pasos en la cascada de señalización que genera $I_{Cl(Ca)}$. Cabe mencionar que la apertura de canales de Cl^- por este mecanismo ha sido observada como consecuencia de la aplicación de diversas toxinas naturales en el ovocito de *Xenopus laevis*, como son: la maitotoxina (Bielfeld-Akermann, et al., 1998; Martínez et al., 1999), una fracción del veneno del ciempiés *Scolopendra* sp. (Stankiewicz et al., 1999), extractos orgánicos de las plantas *Baccharis heterophylla*, *Chenopodium murale*, *Desmodium grahami* y *Solanum rostratum*, (Rojas et al., 2001), el veneno de la medusa *Cassiopea andromeda* y el extracto del hidrocoral *Millepora complanata* (Torres M., Rojas A., Heimer E., y Arellano R.O., observaciones no publicadas). Farmacológicamente, también ha sido observada como respuesta a cationes divalentes como Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} y otros (Miledi et al., 1989b, Frings et al., 2000). El sustrato de una posible relación de los

mecanismos entre todas las sustancias que generan $I_{Cl(Ca)}$ es aún especulativo, sin embargo, de existir pudiera ayudar a entender el papel fisiológico de los canales de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺ intracelular en el ovocito inmaduro.

También, ya que los ovocitos de *Xenopus* actualmente son usados frecuentemente como un sistema de expresión en el estudio de canales, transportadores y receptores, inyectando ya sea mRNA o cDNA, el conocimiento de las conductancias endógenas ayudan a su mejor uso como modelo, además nos permiten realizar estudios sistemáticos de la actividad de diferentes toxinas sobre la membrana celular.

Finalmente, el número de toxinas que presentan actividad como agonistas de receptores o activadoras de canales, estudiadas y caracterizadas, en proporción con las bloqueadoras o antagonistas es considerablemente menor, el veneno de *Cx* resulta interesante ya que posee al menos dos toxinas activadoras. Sin embargo, aún no podemos descartar la presencia de toxinas antagonistas en el veneno producido por esta medusa, así como de sustancias con alguna otra actividad biológica de interés.

PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS TOXINAS BIOACTIVAS

El efecto protector de la mezcla de inhibidores de proteasas incubando el veneno a 37°C durante 24 h sugiere fuertemente que las sustancias activas son de naturaleza peptídica, además indica la presencia de proteasas en el extracto de *Cassiopea*.

Las características observadas en diversos estudios bioquímicos que hacen referencia a la dificultad para el aislamiento de toxinas peptídicas biológicamente activas, en extractos de medusas de la clase schyphozoa son: 1) la propiedad que presentan las sustancias bioactivas de adherirse a las resinas utilizadas para su purificación, 2) la capacidad de agregarse con otros componentes no tóxicos del veneno, 3) son extremadamente lábiles, pueden perder su actividad durante el método de purificación, por ejemplo, durante procesos de concentración y congelamiento, 4) es bajo el rendimiento de las toxinas activas, lo cual implica la

captura de un gran número de individuos para su estudio, y 5) la presencia de dinoflagelados simbioses en muchas especies (Olson et al., 1984 ; Othman y Burnett, 1990; Bloom et al., 1998; Nagai et al., 2000a; Radwan et al., 2001). Estas características han provocado que la investigación en cnidarios de esta clase sea escasa y que hasta la fecha solo exista el reporte de una proteína, con actividad de fosfolipasa tipo A₂, purificada y parcialmente secuenciada de schyphozoos (Lotan et al., 1996). Cabe mencionar que recientemente fueron descritas las primeras secuencias completas de toxinas aisladas de medusas de la clase cubozoa. Estas corresponden con una toxina hemolítica y otra que produce inflamación de *Carybdea rastoni* (Nagai et al., 2000a), y dos toxinas hemolíticas más de *Carybdea alata* (Nagai et al., 2000b).

Los resultados de las purificaciones parciales realizadas durante este proyecto de investigación sugieren que las toxinas hemolíticas producidas por *Cx* también son susceptibles de ser purificadas.

Toxinas con actividad hemolítica

Las hemolisinas encontradas tanto en el extracto crudo como en las diferentes fracciones obtenidas de las cromatografías realizadas mostraron no ser extremadamente lábiles, a diferencia de otras citolisinas. Éstas pueden liofilizarse y mantenerse deshidratadas durante tiempo prolongado, son estables en resinas de intercambio iónico, e incluso pueden ser dializadas con agua desionizada sin perder actividad (datos no mostrados). Debido a que es necesario un gran número de organismos para obtener rendimientos suficientes de toxinas puras, puede considerarse mantener vivos a diferentes ejemplares de *Cx* en un acuario y estimularlos eléctricamente durante varias ocasiones, dándoles el tiempo necesario de recuperación de los nematocistos, esto significa un proceso largo, pero también tiene la ventaja de poder minimizar el número de simbioses en las preparaciones, así como no tener que sacrificar al organismo.

La comparación de la actividad hemolítica de toxinas aisladas de diferentes cnidarios se dificulta principalmente por tres motivos : 1) las condiciones de los ensayos suelen ser diferentes; 2) los eritrocitos utilizados son de diversas

especies animales, y 3) la determinación de proteína también es reportada por diferentes métodos que en muchos casos no son comparables directamente. Sin embargo, como ejemplos de las concentraciones de toxinas con actividad hemolítica en eritrocitos de humano aisladas de anémonas y reportadas en ng ml^{-1} para la UH_{50} son : 0.75 aislada de *Entacnea quadricolor*, 64 de *Heteractis magnifica*; 98 de *Condylactis gigantea* (Giese et al., 1996); 63.6 de *Actinia equina* (Macek, 1994) entre otras; también, la toxina de 57.5 KDa aislada del extracto de los brazos orales de *Cx* presentó 100% de hemólisis con 90 ng ml^{-1} en eritrocitos de oveja. Nuestros resultados muestran que la proteína necesaria para obtener el 100 % y el 94 % de hemólisis por las fracciones finales del extracto obtenido de las medusas estimuladas eléctricamente (Fig. 37) fue de $3.4 \mu\text{g ml}^{-1}$, la potencia hemolítica de estas fracciones sugiere considerarlas como fuente de al menos dos hemolisinas importantes para la continuación de un estudio bioquímico y de actividad citolítica y citotóxica.

Los pesos moleculares de las citolisinas reportadas para cnidarios en general oscilan entre los 15 y 240 KDa. En el extracto de *Cx*, tanto de los brazos orales como del obtenido por la estimulación eléctrica fueron encontradas, de acuerdo al tiempo de elución observado en los perfiles cromatográficos, dos fracciones con actividad hemolítica, una de menos de 1.3 y la otra de aproximadamente 150 KDa. Sin embargo, aún no se puede descartar la posibilidad de que las proteínas bioactivas se adhieran a la columna y por lo tanto eluyan en un tiempo que no corresponde a su tamaño real, esta última característica es considerada para la hemolisina de 57.5 KDa aislada de *Cx* (Sánchez-Calderón, 2001). Probablemente esta toxina de 57.5 Da, esté presente en una de las fracciones hemolíticas mencionadas anteriormente, y que se trate de una de las bandas que se pueden observar en el gel de la Fig. 31 muy cerca del marcador de la albúmina que tiene un PM de 66 200.

Toxina (s) con actividad electrofisiológica

Con respecto a la purificación parcial de la toxina responsable de la activación de I_{Cx} , en la primera separación cromatográfica se obtuvieron tres diferentes fracciones con actividad biológica, una de ellas generó a I_{Cx} y dos más produjeron hemólisis, indicando que los polipéptidos hemolíticos no son los mismos que generan la actividad electrofisiológica caracterizada en este trabajo.

El péptido responsable de la actividad electrofisiológica parece ser de un tamaño más pequeño que el de la mioglobina (17,000 Da), sin embargo, aparentemente la toxina se adhirió a la columna o se agregó con otros componentes no tóxicos del extracto, esto último parece ser característico de toxinas de los venenos de medusas sometidos a purificación (Olson et al., 1984 ; Othman y Burnett, 1990; Bloom et al., 1998). La separación del pico único de la primera cromatografía de filtración molecular, a través de la misma columna, pero con un amortiguador de mayor fuerza iónica (Fig. 24B) sugirió que la toxina responsable de la actividad eléctrica en realidad sea un oligómero. Por ahora no podemos saber el verdadero tamaño de las entidades moleculares o la cantidad de ellas que forman la toxina activa, una parece ser de más de 100 KDa y la otra probablemente sea pequeña, de menos de 17 KDa, sin embargo en esta última no podemos descartar la posibilidad aún de que continúe adhiriéndose a la columna.

La pérdida de la actividad electrofisiológica en las diferentes fracciones de la columna Bio-Sil SEC 125 equilibrada y eluida con amortiguador de fosfatos pH 6.8, Fig. 32 B), sugirió que se requiere de la unión original de dos o más moléculas para formar la toxina activa, quizá también pudiera estar implicado un cambio conformacional provocado por las sales. Un ejemplo de toxinas que tienen actividad como oligómero es la taicatoxina aislada del veneno de la serpiente *Oxiuranus scutelatus scutelatus*, en este caso cada subunidad que forma la toxina tiene actividad biológica diferente aunque la forma más activa es con la unión no covalente de las tres subunidades que conforman a la toxina (Possani, 1997), y se propone que la toxina de 240 KDa aislada del hidrozooario *Physalia physalis* también es un oligómero en su forma activa (Bernheimer y Rudy, 1986).

Probablemente la participación de dos o más entidades moleculares en la toxina activa explicaría en parte una aparente inconsistencia en la actividad electrofisiológica de las fracciones en las diferentes columnas de intercambio iónico probadas. En este caso habría que suponer, por ejemplo, que uno de los componentes del heterómero con carga diferente se quedara pegado al intercambiador. Futuros experimentos utilizando diferentes amortiguadores y soportes cromatográficos podrían ayudar a confirmar o negar esta hipótesis.

Por otro lado, durante la búsqueda de la mejor estrategia para la purificación de esta proteína en el extracto de la secreción mucosa, la cual contenía menos sustancias provenientes de los tejidos corporales de la *Cassiopea*, se pudo hacer una observación más, y es que la toxina activa coeluye con las sales sugiriendo la presencia de una proteína con carga que probablemente sea positiva ya que el material del que están hechas las partículas de la columna (sílice) contiene grupos silanol cargados negativamente, los cuales pueden interaccionar con residuos básicos en un amortiguador con baja fuerza iónica y retener así a una proteína con carga positiva.

También, parece ser que la presencia de sales interfieren con la generación de I_{Cx} , ya que la actividad disminuyó considerablemente en las fracciones con mayor concentración de éstas, contrariamente al estudio de Alvarez y cols. (1998) en donde reportan una potencia de la hemólisis, de toxinas aisladas de anémonas, en amortiguadores con altas concentraciones de sales. Otro tratamiento que provocó la pérdida de la actividad electrofisiológica del veneno fue el uso de solventes orgánicos como el acetonitrilo y el ácido trifluoroacético que fueron usados en un intento de utilizar columnas de fase reversa en su purificación.

Con respecto a la purificación parcial de la toxina responsable de la activación de $I_{Cl(Ca)}$, fue observado que sólo el extracto de los brazos orales y el obtenido de la secreción mucosa presentaron esta respuesta, y ninguna fracción de todas las cromatografías realizadas a estos extractos fue capaz de generar a la $I_{Cl(Ca)}$. Esto parece indicar que las sustancias o sustancias responsables de la activación de esta corriente son particularmente lábiles.

La continuación del estudio bioquímico dirigido hacia la purificación y secuenciación de las toxinas con actividad hemolítica y electrofisiológica de la medusa *Casiopea xamachana* permitirá realizar un trabajo sistemático para confirmar y detallar los mecanismos de acción involucrados.

Las toxinas producidas por diferentes organismos y sus blancos biológicos pueden ayudar a entender la propia fisiología, ecología y biología de las especies en estudio. El abordaje interdisciplinario de trabajos como el expuesto aquí, presenta ventajas que permitirán avances importantes en diferentes áreas como lo son las ciencias biomédicas y la biotecnología.

CONCLUSIONES

1. El estudio de actividad biológica mostró que algunas toxinas producidas por la medusa *Cassiopea xamachana* tienen como blancos moleculares a lípidos y proteínas de la membrana celular.
2. Las toxinas de *Cx* parecen activar al menos dos proteínas transmembranales formadoras de canales iónicos en la membrana del ovocito de *Xenopus laevis*
3. La respuesta mas consistente que fue la generación de una corriente catiónica inespecífica llamada I_{Cx} parece ser provocada por la activación de canales mecanosensibles o por la activación de canales catiónicos aún no descritos en la membrana del ovocito.
4. La toxina que generó a I_{Cx} probablemente se trate de un oligómero en su forma activa.
5. La hemólisis del veneno crudo de *Cx* es debida a la actividad por lo menos dos hemolisinas. Y el blanco principal de estas toxinas, o de la hemolisina mas abundante, parece ser un componente lipídico que se encuentra en mayor proporción en la membrana de los eritrocitos de humano comparado con los de oveja.
6. El estudio bioquímico sugirió la naturaleza proteínica de las toxinas bioactivas presentes en *Cx*.

REFERENCIAS

1. Ackerman, M.J., Krapivinsky, G.B., Gordon, E., Krapivinsky, L., Clampham, D. C., 1994. Characterization of a native swelling-induced chloride current, $I_{Cl,swell}$, and its regulatory protein, pICln, in *Xenopus* oocytes. *Jpn. J. Physiol.* 44, suppl. 2 S17-24.
2. Adams, M.E., Olivera, B.M., 1994. Neurotoxins: overview of an emerging research technology. *TINS.* 17, 151-155.
3. Adley, D.J., Standfield, P.R., 1996. Ion channel molecules in action. Cambridge, University Press. pp. 1-165.
4. Allavena, A., Mariottini, G. L., Carli, A. M., Contini, S., Martelli, A., 1998. *In vitro* evaluation of the cytotoxic, hemolytic and clastogenic activities of *Rhizostoma pulmo* toxin(s). *Toxicon* 36, 933-936.
5. Alouf, J., 1997. Cholesterol binding toxins (*Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*). En: Rappuoli R., Montecucco, C. (Ed.) Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. A Sambrook & Tooze Publications at Oxford University Press. pp. 7-10.
6. Alvarez, C., Lanio, M.E., Tejuca, M., Martínez, D., Pazos, F., Campos, A.M., Encinas, M.V., Perthihez, T., Schreier, S., Lissi, E.A., 1998. The role of ionic strength on the enhancement of the hemolytic activity of sticholysin I. A cytolysin from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon.* 36, 165-178.
7. Anderluh, G., Krizaj, I., Strukelji, B., Gubensek, F., Maeek, P., Pungerear, J., 1999. Equinatoxins, pore-forming proteins from the sea anemone *Actinia equina*, belong to a multigene family. *Toxicon.* 37, 1391-1401.
8. Arellano, R.O., Miledi, R., 1993. Novel Cl^- currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle eclosed *Xenopus* oocytes. *J. Gen Physiol.* 102, 833-857.
9. Arellano, R.O. Miledi, R., 1994 Osmo-dependent Cl^- current activated by cyclic AMP in follicle-eclosed *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. London Ser B.* 258,229-235.
10. Arellano, R.O. Miledi, R., 1995. Functional role of follicular cells in the generation of osmolarity-dependent Cl^- currents in *Xenopus* follicles. *J. Physiol. (London)* 488, 351-357.
11. Arellano, R. O., Garay, E., Miledi, R., 1998. Cl^- currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicle. *Am. J. Physiol. (cell physiol 43)*, C333-C340.
12. Arellano, R.O., Woodward, R.M., Miledi, R., 1995. A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes *J. Physiol., Lond.* 484,593-604.

13. Arellano, R.O., Woodward, R.M., Miledi, R., 1996. Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* Oocytes. In: T. Narahashi (Ed.), Ion Channels, Plenum Press, New York, pp. 203-256.
14. Azuma, H., Ishikawa, M., Nakajima, T., Satoh A., Sekizaki, S., 1986. Calcium-dependent contractile response of arterial smooth muscle to a jellyfish toxin (pCrTX :*Carybdea rastonii*). Eur. J. Pharmac. 88,549-559.
15. Barnes, R., Rupert, E. E., 1996. Los cnidarios (phylum Cnidaria). En : McGraw Hill, Interamericana (Ed), Zoología de invertebrados. México. pp. 106-173.
16. Baud, C., Kado, R.T., Marcher, K., 1982. Sodium channels induced by hyperpolarization of the *Xenopus laevis* oocyte. Proc. Nat. Acad. Sc. USA 79,3188-3192.
17. Bernheimer, A.W., 1988. Assay of hemolytic toxins. Methods in Enzymology. 165,213-219.
18. Bernheimer, A.W., Avigad, L.S., Kwang-Shin K., 1979. Comparison of metridiolysin from the sea anemone with thiol-activated cytolytins from bacteria. Toxicon. 17, 69-75.
19. Bernheimer, A.W., Rudy, B., 1986. Interactions between membranes and cytolytic peptides. Biochim. Biophys. Acta 864(1), 123-41.
20. Bielfeld-Ackermann, A., Ranger, C., Korbmacher, C., 1998. Maitotoxin (MTX) activates a non selective cation channel in *Xenopus laevis* oocytes. Pflügers Arch-Eur. Physiol. 436,329-337.
21. Bigelow, R.P., 1892. On a new species of *Cassiopea* from Jamaica. Zoolg. Anzeiger, Bd. 15,212-214.
22. Blanquet, R.S., Phelan, M.A., 1986. An unusual blue mesoglea protein from the magrove jellyfish *Cassiopea xamachana*. 423-430.
23. Bloom, D.A., Burnett, J., Alderslade, P., 1998. Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beach side. Toxicon 36,1075-1085.
24. Blumenthal, K., 1995. Ion channels as targets for toxins. En: Nicholas Sperelakis (Ed.) Cell physiology source book. Academic Press. pp 389-412.
25. Bollag, M. D., Rozycky, M.D., Edelstein, S. J., 1996. Protein concentration determination. En: Wiley-lyss (Ed.) Protein Methods. New York. pp.57-81.
26. Bossi, E., Centinaio, E., Moriondo, A., Peres, A., 1998. Ca²⁺ - dependence of the depolarization-inducible Na⁺ current of *Xenopus* oocytes. J. Cell Physiol. 174, 154-159.
27. Bourinet, E., Fournier, F., Nargeot, J., Charnet, P., 1992. Endogenous *Xenopus*-oocyte Ca-channels are regulated by protein kinase A and C. FEBS Lett. 299, 5-9.

28. Bowersox, S.S., Luther, R., 1998. Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-III), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of *Conus magus*. *Toxicon*. 36, 1651-1658.
29. Burckhardt, B.C., Burckhardt, G., 1997. NH_4^+ conductance in *Xenopus laevis* oocytes. I. Basic observations. *Pflugers Arch*. 434, 306-312.
30. Burckhardt, B.C., Frömter, E., 1992. Pathways of $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflugers Arch*. 420,83-86.
31. Burckhardt, B.C., Thelan, P., 1995. Effect of primary, secondary and tertiary amines on membrane potential and intracellular pH in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflugers Arch*. 429, 306-312.
32. Burnett, J.W., 1990. Some natural jellyfish toxins. In: Hall, S.y G. Strichartz (Ed.) *Marine toxins: origin, structure and molecular pharmacology*. American Chemical Society. pp. 333-335.
33. Burnett, J.W., 1992. Beachside preparation of jellyfish nematocyst tentacles. *Toxicon*. 30, 794-796.
34. Burnett, J.W., Calton, G.J., 1986. Venomous pelagic coelenterates:chemistry, toxicology, immunology and treatment of their stings. *Toxicon*. 25, 581-602.
35. Burnett, J.W., Ordonez V.J., Calton, J., 1986. Differential toxicity of *Physalia physalis* (Portuguese man-o'-war) nematocysts separated by flow cytometry. *Toxicon*. 24, 514-518.
36. Burnett, J.W., Kumar, S., Malecki, J.M., Szmant, A.M., 1995. The antibody response in seabather's eruption *Toxicon*. 33, 99-10.
37. Caldwell, R.A., Clemo, H. F., Baumgarten, C. M., 1998. Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations. *Am. J. Physiol*. 275,C619-C621.
38. Calton G.J. Burnett J.W., 1988. Characterization of nematocyst venom. En: Hessinger, A. y M. Lenhoff (Ed.) *The biology of nematocysts*. Academic Press Inc. pp.369-373.
39. Cariello, L., Romano, G., Spagnuolo, A., Zanetti, L., 1988. Isolation and partial characterization of Rhizolysin, a high molecular weight protein with hemolytic activity, from the jellyfish *Rhizostoma pulmo*. *Toxicon*. 26, 1057-1065.
40. Carli, A., Bussotti, S., Mariottini, G. L., Robbiano, L., 1996. Toxicity of Jellyfish and sea-anemone venoms on cultured V79 cells. *Toxicon*. 34, 496-500.
41. Catterall, W.A., Trainer, V., Baden, D.G., 1992. Molecular properties of the sodium channel: a receptor for multiple neurotoxins. *Bull. Soc. Pathol. Exot*. 85,481-485.
42. Charpentier, G., Béhue, N., Fournier, F., 1995. Phospholipase C activates protein kinase C during induction of slow Na^+ current in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch*. 429, 825-831.

43. Cole, K.S., 1947. Four lectures on biophysics. Inst. Biofis. Univ-Brasil.
44. Cotton, J., Crest M., Bouet, F., Alessandri, N., Gola, M., Forest, E., Karlsson, E., Castaneda, O., Harvey, A.L., Vita, C. Menez, A., 1997. A potassium-channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*, an inhibitor for Kv1 channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity. Eur. J. Biochem. 244, 192-202.
45. Dascal, N., Snutch, T. P., Lübbert, H., Davidson, N., Lester, H. A., 1986. Expression and modulation of voltage-gated calcium channels after RNA injection in *Xenopus* oocytes. Science. 231, 1147-50.
46. Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilqui, B., Roumestand, C., Vita, C., de Madeiros C.L.C., Rowan, E.G., Harvey, A.L., Menez, A., 1997. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. J. Eur. Chem. 272, 4302-4309.
47. DeLisle, S., Krause, K.H., Denning, G., Potter, B.V., Welsh, M.J., 1990. Effect of inositol trisphosphate and calcium on oscillating elevations of intracellular calcium in *Xenopus* oocytes. J. Biol. Chem. 265, 11726-11730.
48. Dubois, J.M., Tanguy, J., Burnett, J.W., 1983. Ionic channels induced by sea nettle toxin in the nodal membrane. Biophys. J. 42, 199-202.
49. Dumont, J.N., 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. J. Morphol. 136, 153-180.
50. Ebihara, L., 1996. *Xenopus* connexin 38 forms hemi-gap-junctions channels in the nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. Biophys. J. 71, 742-748.
51. Edwards, L., Hessinger, A., 2000. Portuguese man-of-war (*Physalia physalis*) venom induces calcium influx into cells by permeabilizing plasma membranes. Toxicon. 38, 1015-1028.
52. Endean, R., Monks, S.A., Cameron, A.M., 1993. Toxins From the Box-Jellyfish *Chironex fleckeri*. Toxicon 31, 397-410.
53. Fitt, W.F., Trench, R.K., 1983. Endocytosis of the symbiotic dinoflagellates *Microadriaticum freudenthal* by endoderm cells of the scyphistomae of *Cassiopea xamachana* and resistance of the algae to host digestion. J. Cell Sci. 64, 195-212.
54. Frings, S., Reuter, D., Kleene, S.J., 2000. Neuronal Ca²⁺- activated Cl⁻ - homing in on an elusive channel species. Progress in Neurobiology. 60, 247-289.
55. Galettis, P., Norton, R.S., 1990. Biochemical and pharmacological studies of the mechanism of action of tenebrosin-C, a cardiac stimulatory and hemolytic protein from the sea anemone, *Actinia tenebrosa*. Toxicon. 28, 695-706.

56. Garateix, A., Vega, R., Salceda, E., Cebada J., Aneiros, A., Soto E., 2000. BgK anemone toxin inhibits outward K⁺ currents in snail neurons. *Brain Res.* 864, 312-314.
57. Garateix, A., Flores, A., García-Andrade J.M., Palmero A., Aneiros A., Vaga R., Soto, E., 1995. Antagonism of glutamate receptor by a chromatographic fraction from the exudate of the anemone *Phyllactis flosculifera*. *Toxicon.* 34,443-450.
58. Garson, M.J., Flowers, A.E., Webb, R.I., Charan, R.D., McCaffrey, E.J., 1998. A sponge/dinoflagellate association in the haplosclerid sponge *Haliclona* sp.: cellular origin of cytotoxic alkaloids by percoll density gradient fractionation. *Cell Tissue Res.* 293,365-373.
59. Giese, C., Mebs, D., Werdning, B., 1996. Resistance and vulnerability of crustaceans to cytolytic sea anemone toxins. *Toxicon.* 34,955-959.
60. Gilbert, S. F., 1997. *Developmental Biology*. Sinauer Associates, INC. Publishers. pp. 864-865.
61. Goldberg, W. M., Taylor, G. T., 1997. Coelenterate cnidae capsules: disulfide linkages revealed by silver cytochemistry and their differential responses to thiol reagents. *Biol. Bull.* 192, 1-16.
62. Goldin A.L., Sumikawa K. 1992. Preparation of RNA for injection into *Xenopus* oocytes. *Methods in Enzymology.* 207,279-295.
63. Gregory, R.B., Barritt, G.J., 1996. Store-activated Ca²⁺ inflow in *Xenopus laevis* oocytes: inhibition by primaquine and evaluation of the role of membrane fusion. *Biochem. J.* 319, 755-360.
64. Grotendorst, G.R., Hessinger, D.A., 1999. Purification and partial characterization of the phospholipase A2 and co-lytic factor from sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon.* 37,1779-1796.
65. Habermann, E., 1989. Palitoxin acts through Na⁺, K⁺ ATPase. *Toxicon.* 27,1171-1187.
66. Hamill, O.P., McBride, D.W. Jr., 1996. The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol. Rev.* 48,2231-2252.
67. Hammerland, L.J., Olivera, B.M., Yoshikami D., 1992. Conantokin-G selectively inhibits N-methyl-D-aspartate-induced currents in *Xenopus* oocytes injected with mouse brain mRNA. *Eur. J. Pharm.* 226, 239-244.
68. Hasteald, E., 1978. *Poisonous and venomous marine animals of the world*. The Darwin Press Inc, U.S.A.
69. Hescheler, J., Schultz, G., 1993. Nonselective cation channel: physiological and pharmacological modulations of channel activity. En D. Siemen & J. Hescheler (Ed.) *Nonselective cation channels: Pharmacology, Physiology and Biophysics*. Birkhäuser Verlag Basel. Switzerland. Pp. 27-43.

70. Hessinger, D., 1988. Nematocyst venoms and toxins. En: Hessinger, A. y M. Lenhoff (Ed.) The biology of nematocysts. Academic Press Inc. pp. 333-368.
71. Hickman, C.P., Roberta, S. L., Larson, A., 1993. Integrated principles of zoology. Mosby. U.S.A.
72. Hille, B., 1992. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates INC. Sunderland. Massachusetts. 426p.
73. Ho, C. L., Ko, J. L., Lue., H. M., Lee C. Y., Ferland, I., 1987. Effect of Equinatoxin on the guinea pig atrium. *Toxicon*. 25,659-664.
74. Hodgking, A.L., Huxley, A.F., Katz, B., 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol*. 116, 424-448.
75. Houck, H. E., Lipsky, M. M., Marzella, L., Burnett, J. V., 1996. Toxicity of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) fishing tentacle nematocyst venom in cultured rat hepatocytes. *Toxicon*. 34,771-778.
76. Huang, H., St-Jean, H., Coady, M.J., Lapointe, J. Y., 1995. Evidence for coupling between Na⁺ pump activity and TEA⁺-sensitive K⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membr. Biol*. 143, 29-35.
77. Ikesawa, H., Obama, T., Tsukamoto, K., 2000. The structure-function relationship in *Bacillus cereus* sphingomyelinase, a bacterial hemolysin. XIIth world congress of the international society on toxinology. Toxins from animals, plants and microbes. IST, Paris. L31.
78. Jiang, T., Sweeney, G., Rudolf, M.T., Klip, A., Traynor-Kaplan, A., Tsien R.Y., 1998. Membrane-permeant esters of phosphatidil inositol 3,4,5-triphosphate. *J. Biochem. Chem*. 273, 11017-11024.
79. Kado, R.T., Baud, C., 1981. The rise and fall of electrical excitability in the oocyte of *Xenopus laevis*. *J. Physiol*. 77, 1113-7.
80. Karlsson, E., Adem, A., Aneiros A., Castaneda, O., Harve A., Jolkkon, M., Sotolongo, V. 1991. New toxins from marine organisms. *Toxicon*. 29,1168.
81. Kao, J. P.Y., 1994. Practical aspects of measuring [Ca²⁺] with fluorescent indicators. En: Richard Nuccitelli (Ed) A practical guide to the study of calcium in living cells. Academic Press, pp. 155-181.
82. Kem, W. R., 2000. Nemertine toxins as a models for desing of $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist: drug candidates for treatment of Alzheimer's disease and schizophrenia. XIIth world congress of the international society on toxinology. Toxins from animals, plants and microbes. IST, Paris. L105.
83. Kem, W.R., 1988a. Peptide chain toxins of marine animals. En: Fautin, D. G. (Ed.) Biomedical importance of marine organism. California Academy of Sciences, San Francisco. pp. 69-83.

84. Kem, W. R., 1988b. Sea anemone toxins :structure and action. En: Hessinger, A. y M. Lenhoff (Ed.) The biology of nematocysts. Academic Press Inc. pp. 375,405.
85. Kem W.R., Pennington M.W. Dunn B.M.,1990. Sea anemone polypeptide toxins affecting sodium channels. En: Hall, S.y G. Strichartz. (Ed.) Marine toxins origin structure and molecular pharmacology. American Chemical Society Washintong, D.C. 279.
86. Khoo, H. E., Lim, J.P., Tan, C. H., 1995. Effects of sea anemone (*Heteractis magnifica* and *Actinia equina*) cytolytins on synaptosomal uptake of GABA and choline. *Toxicon* 33, 1365-71.
87. Kihara, H., Anraku M., Ohno, M., Hashimura S., 1988. Tetrodotoxin-unaffected depolarization of frog muscles induced by venom of jellyfish (Genus *Aurelia*). *Jpn. J. Physiol.* 38,839-849.
88. Klung, M., Weber, J., Tardent, P., 1988. Direct observation of hemolytic activity associated with single nematocyst. En: Hessinger, A. y M. Len hoff (Ed.). The Biology of Nematocysts. Academic Press Inc. pp. 543-550.
89. Kobayashi, J., Ishibashi, M., Nakamura, H., Hirata, Y., Yamasu, T., Sasaki T., Ohizumi, Y.,1988. Symbioramide, a novel Ca^{2+} -ATPase activator from the cultured dinoflagellate *Symbiodinium* sp. *Experimentia*. 44, 800-802.
90. Kowdley, G.C., Ackerman, S.J., Jhon, J.E. 3rd, Jones, L.R., Moorman, J.R., 1994. Hyperpolarization-activated chloride currents in *Xenopus* oocytes. *J. Gen Physiol.* 103, 217-230.
91. Krapivinsky, G.B., Ackerman, M.J., Gordon, E.A., Krapivinsky, L.D., Clapham, D.E., 1994. Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell.* 76, 439-448.
92. Kumura, A., Hartzell, H.C., 1999. Dyanemics of calcium regulation of chloride currents in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol.* 276, C161-75.
93. Kusano, K., Miledi, R., Stinnakre, J. 1982. Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J. Physiol., Lond.* 328,143-170.
94. Laemelli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the of the head of bacteriophage T⁴. *Nature* 227,680-685.
95. Lanio, M.E., Morera, V., Alvarez, C., Tejuca, M., Gómez, T., Pazos, F., Besada, V., Martínez, D., Huerta, V., Padrón G., Chávez, M. A., 2000. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyila helianthus*. *Toxicon.* 39,187-194.
96. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 1995. Principios de bioquímica Ed. Omega. Barcelona España.

97. Lomaxx, R. B., Herrero, C.J., García-Palomero, E., García, A.G., Montiel, C., 1998. Capacitative Ca^{2+} entry into *Xenopus* oocytes is sensitive to omega-conotoxins GVIA, MVIIA and MVIIIC. *Cell calcium*. 23, 229-239.
98. Loredó, J. S., González, R. R., Hessinger D. A., 1986. Effects of portuguese Man-of-War venom on isolated vascular segments. *J. Farmacol. Exp. Ther.* 233,140-143.
99. Lotan, A., Fishman, L., Zlotkin, E., 1996. Toxin compartmentation and delivery in the cnidaria :the nematocyst's tubule as a multiheaded poisonous arrow. *J. Exp. Zoo.* 275,444-451.
100. Lowry, O. H., RoseBrogh, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193,265-275.
101. Lu, L., Montrose-Rafizadeh, C., Hwang, T.C., Guggino, W.B. 1990. A delay rectifier potassium current in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 57, 1117-1123.
102. Macek, P., Belmonte, G., Pederzoli, C., Menestrina, G., 1994. Mechanism of action of equinatoxin II, a cytolysin from the sea anemone *Actinia equina* L. belonging to the family of actinoporins.
103. Malpezzi, E. L., De Freitas, J. C., Muramoto, K., Kamiya, H., 1993. Caracterizacion of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* 31,853-864.
104. Manestrina, G., Ferreras, M., 1997. α -Toxin (*Staphylococcus aureus*). En: : Rappuoli R., Montecucco, C. (Ed.) Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. A Sambrook & Tooze Publications at Oxford University Press. pp. 10-13.
105. Mantegazza, M., Franceschetti S., Avanzini, G., 1998. Anemone toxin (ATXII)-induced in persistent sodium current: effects on the firing properties of rat neocortical pyramidal. *J. Physiol.* 507.1, 105-116.
106. Marmont, G., 1949. Studies on the axon membrane: I. A new method. *J. Cell Comp. Physiol.* 34, 351-382.
107. Martin, J.W., Gershwin, L-A., Burnett, J.W., Cargo, D.G., Bloom, D., 1997 *Chrysaora achlyos*, a remarkable new species of Scyphozoon from the eastern Pacific. *Biol. Bull.* 193,8-13.
108. Martínez, M., Salvador, C., Fariás, J.M., Vaca, L., Escobar, L., 1999. Modulation of a calcium-activated chloride current by maitotoxin. *Toxicon.* 37, 359-370.
109. Mas, R., Menendez ,R.M., Garateix A., Garcia M., Chavez M., 1989. Effects of a high molecular weight toxin from *Physalia physalis* on glutamate responses. *Neuroscience.* 33,269-273.
110. Mebs, D., 1998. Occurrence and sequestration of toxins in food chains. *Toxicon.* 36,1519-1532.

111. Migués, P.V., Leal, R.B., Mantovan, M., Nicolau, M., Gavilán, H.N., 1999. Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Budonosoma caissarum*. *Neuroreport*. 10, 67-70.
112. Miledi, R., 1982. A calcium-dependent transient outward current evoked in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. B* 215, 491-497.
113. Miledi, R., Parker, I., 1984. Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J. Physiol (London)*. 357, 173-183.
114. Miledi, R., Woodward, R.M., 1989. Membrane currents elicited by prostaglandins, oxytocin and atrial natriuretic factor in follicle enclosed *Xenopus* oocyte. *J. Physiol. (London)*. 416, 623-643.
115. Miledi, R., Parker, I., Sumikawa, K., 1989a. Transplanting receptors from brains into oocytes. En: *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures*, Raven Press, LTD., New York, pp. 57-90.
116. Miledi, R., Parker, I., Woodward, R. M., 1989b. Membrane currents elicited by divalent cations in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 417, 173-195.
117. Mire-Thibodeaux, P., Watson G. M., 1993. Direct monitoring of intracellular calcium ions in sea anemone tentacles suggest regulation of nematocyst discharge by remote, rare epidermal cells. *Biol. Bull.* 185, 335-345.
118. Monje, V.D., Haack, J.A., Naissbitt, S.R., Miljanich, G., Ramachandran, J., Nadasdi, L., Olivera, B.M., Hillyard, D.R., Gray, W.R., 1993. A new *Conus* peptide ligands for Ca²⁺ channel subtypes. *Neuropharm.* 32, 1141-1149.
119. Nagai, H., Takuwa, K., Nakao, M., Sakamoto, B., Crow, G.L., Nakajima, T. 2000b. Isolation and characterization of a novel protein toxin from the Hawaiian box jellyfish (sea wasp) *Carybdea alata*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 275, 589-594.
120. Nagai, H., Takuwa, K., Nakao, M., Ito, E., Miyake, M., Noda, M., Nakajima, T. 2000a. Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish (sea wasp) *Carybdea rastoni*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 275, 582-588.
121. Nagase, H., Karaki, H., Ozaki, H., Urakaw, N., Azuma, H., Nakajima, T., 1987. Contractile and relaxant effects of jellyfish toxin on the vascular and intestinal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C, 411-414.
122. Nakamura, H., Asari, T., Ohisumi, Y., Kobayashi, J., Yamasu, T., Murai, A., 1993. Isolation of zooxanthellatoxins, novel vasoconstrictive substances from the zooxanthella *Symbiodinium* sp. *Toxicon.* 31, 371-376.
123. Nielsen, C., 1995. *Animal evolution interrelationships of the living phyla*. Oxford University Press. Oxford Inglaterra. 467 pp.
124. Norton, R., 1991. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon.* 29, 1051-1054.

125. Norton, R. S., Bobek, G., Ivanov, J.O., Thomson, M., Fiala-Beer, E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., 1990. Purification and characterization of proteins with cardiac stimulatory and hemolytic activity from the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Toxicon*. 29,29-41.
126. Olivera, B.M., Steel, D.J., 1997. Conantokins (*Conus* sp). En: : Rappuoli R., Montecucco, C. (Ed.) Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. A Sambrook & Tooze Publications at Oxford University Press. pp. 249-250.
127. Olivera, B.M., Milijanich, G.P., Ramachandran, J., Adams, M.E. 1994. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Ann Rev. Biochem.* 63, 823-867.
128. Olson, C.,E., Pockl, E. E., Calton, G.J., Burnett, J. W.,1984.Immunochromatographic purification of a nematocyst toxin from the cnidarian *Chironex fleckeri* (sea wasp). *Toxicon* 22. 733-742.
129. Oron, Y., Dascal, N., Nadler, E., Lupu, M., 1985. Inositol 1,4,5-triphosphate mimics muscarinic response in *Xenopus* oocytes. *Nature*. 313, 141-143.
130. Othman, Y., Burnett J.W., 1990. Techniques applicable for purifying *Chironex fleckeri* (box-jellyfish) venom. *Toxicon* 28,821-835.
131. Parker, I., Ivorra, I., 1990. A slowly inactivating potassium current in native oocytes of *Xenopus laevis*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 238, 369-381.
132. Parker, I., Miledi, R., 1987. Inositol threephosphate activates a voltage-dependent calcium influx in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*231, 27-36.
133. Parker, I., Miledi, O., 1988. A calcium-independent chloride current activated by hyperpolarization in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 233, 191-199.
134. Pennington, M.W., Kem, W., Karlsson, E., 1997. Sea anemone potassium channel toxins. En: Rappuoli R., Montecucco, C. (Ed.) Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. A Sambrook & Tooze Publications at Oxford University Press. pp.161-163.
135. Peres. A., Bernardini, G., Mancinelli, E., Ferroni, A. 1985. A voltage-dependent K⁺ channel controlling the membrane potential in frog oocytes. *Pflugers Arch. J.* 403, 41-46.
136. Perez-Samartin, A. L. Miledi, R., Arellano, R.O., 2000. Activation of volume-regulated Cl⁻ channels by Ach and ATP in *Xenopus* follicles. *J. Physiol.* 523.3, 721-734.
137. Pong-Prayoon, U., Bohloin, L., Wasuwat, S.,1991. Neutralization of toxic effects of different crude jellyfish venoms by an extract of *Ipomea pes-caprae* (L.). *R. Br. J. Ethnopharmac.* 35,65-9.

138. Possani, L. D., 1997. Taicatoxin (*Oxyuranus scutelatusscutelatus*). En: Rappuoli R., Montecucco, C. (Ed.) Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. A Sambrook & Tooze Publications at Oxford University Press. pp-10-13.
139. Radwan, F.F.Y., Burnett, J.W., Bloom, D. A., Coliano, T., Eldefrawi, M.E., Erdely, H., Aurelian, L., Torres, M., Heimer, E., 2001. A comparison of the toxinological characteristics of two *Cassiopea* and *Aurelia* species. *Toxicon* 39,245-257.
140. Rappuoli R., Montecucco, C., 1997. En: Rappuoli R., Montecucco, C. (Ed.) Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. A Sambrook & Tooze Publications at Oxford University Press.
141. Rifkin, J., Williamson, J., Fenner, P., 1996. Anthozoans, Hydrozoans and Scyphozoans. En: Williamson, J., P. Fenner, J. Burnett., Rifkin, J. (Eds.), *Venomous and Poisonous Marine Animals: a Medical and Biological Handbook*, University of New South Wales Press, Sydney, pp. 180 -235.
142. Rojas, A., Mendoza, S., Moreno, J., Arellano, R.O., 2001. Extracts from plants used in Mexican traditional medicine activate Ca^{2+} -dependent chloride channel in *Xenopus laevis* oocytes. *Plant Medicine* (en prensa).
143. Rossjohn, J. Feil, S. C., McKinstry, W. J., Twenten, R., Parker, M. W., 1997. Structure of cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* 89,685-692.
144. Rottini, G., Gusmani, L., Parovel, E., Avian, M., Patriarca, P., 1995. Purification and properties of the jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Toxicon* 33,315-326.
145. Rottini, G., Dobrina, A., Forgiarini, O., Nardon, E., Amirante G., Patriarca, P., 1990. Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. *Infec. Inmun.* 58,3751-3758.
146. Rowe, G.E., Welch, R.A., 1994. Assays of hemolytic toxins. *Methods in enzymology.* 235, 657-679.
147. Salleo, A., La Spada, G., Barbera, R., 1994. Gadolinium is a powerful blocker of the activation of nematocyst of *Pelagia nocticula*. *J. Exp. Biol.* 187, 202-206.
148. Sánchez-Calderón, L., 2001. Extracción y purificación parcial de una toxina con actividad hemolítica, proveniente de la medusa *Cassiopea xamachana*. Tesis presentada para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de Querétaro, México.
149. Scheiner-Bobis, G., Schneider, H., 1997. Palytoxin-induced channel formation within the Na^+/K^+ -ATPase does not require a catalytically active enzyme. *Eur. J. Biochem.* 248,3717-23.
150. Schreiber, R., Greger, R., Nitschke, R., Kunzelmann, K., 1997. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates water conductance in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch.* 434, 841-847.

151. Segura-Puertas, L., 1984. Morfología, sistemática y zoogeografía de las medusas (Cnidaria: Hidrozoa y Scyphozoa) del Pacífico tropical oriental. An. Inst. Cienc. Del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. Publ. Esp. , 1-320.
152. Shyrock, J., Bianchi C., 1983. Sea nettle (*Chrysora quinquecirrha*) nematocyst venom: Mechanism of action on muscle. *Toxicon*. 21,81-95.
153. Smith, H.G., 1936. Contribution to the anatomy and physiology of *Cassiopea frondosa*. En: *Papers from Tortugas Laboratory*, (Ed.) Departments of Zoology, Universities of Bristol and Aberdeen, Bristol. pp 31,19-52.
154. Stankiewicz, M., Hamon A., Benkhalifa, R., Kadziela, W., Hue, B., Lucas, S., Mebs, D., Pelhate., 1999. Effects of a centipede venom fraction on insect nervous system, a native *Xenopus* oocyte receptor and on an expressed *Drosophila* muscarinic receptor. *Toxicon*. 37, 1431-1445.
155. Takumi, T., Ohkubo, H., Nakanishi, S., 1988. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science*. 242, 1042-1045.
156. Tardent, P., 1988. History and Current State of Knowledge Concerning Discharge of Cnidae En: Hessinger, A. y M. Lenhoff (Ed.). *The Biology of Nematocysts*. Academic Press Inc. pp 309 - 332.
157. Tigyi, G., Dyer, D., Matute, C., Miledi, R., 1990. A serum factor that activates the phosphatidylinositol phosphate signaling system in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Academic Sci. USA* 87,1521-1525.
158. Thorington, G.U., Hessinger, D.A., 1986. Control of discharge: factors affecting discharge of cnida. En: Hessinger, A. y M. Lenhoff (Ed.) *The biology of nematocysts*. Academic Press Inc. pp. 223-253.
159. Tokimasa, T., North, R.A., 1996. Effects of barium, lanthanum and gadolinium on endogenous chloride and potassium currents in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol*. 496, 677-686.
160. Tsien, R.Y., 1980. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons; design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochem*. 19,2396-23404.
161. Turk, T., 1992. Cytolytic toxins from sea anemones. *J. Toxicol. Toxin reviews*. 10, 223-262.
162. Verkman, A.S., van Hoek, A. A., Ma, T., Frigeri, A., Skach, W. R., Mitra, A., Tamarappoo, B .K., Farinas, J., 1996. Water transport across mammalian cell membranes. *Am. J. Physiol*. 270, C12-30.
163. Villarroel, A., 1997. Ion conduction through the acetylcholine receptor channel. En: F. J. Barrantes (Ed.). *The nicotinic acetylcholine receptor*. Springer, New York. pp.109-130.

164. Voet, D., Voet, J., 1995. Biochemistry. John Wiley & Sons (Eds), INC. New York. pp. 300-303.
165. Wang, X., Horisberger, J-D., 1997. Palytoxin effects through interaction with the Na,K-ATPase in *Xenopus* oocyte. FEBS letters 409,391-395.
166. Watson, M.G., Wood L.R., 1988. Colloquium on terminology. En: Hessinger A.D., Lenhoff, M.H (Ed.).The biology of nematocysts. Academic Press, Inc. New York. pp. 23-23.
167. Weber, W.M., 1999. Endogenous ion channels in oocytes of *Xenopus laevis* : recent developments. J. Mem. Biol. 170, 1-12.
168. Weber, W.M., Liebold, K.M., Clauss, W., 1995. Amiloride-sensitive Na⁺ conductance in native *Xenopus* oocytes. Biochim. Biophys. Acta. 1239,201-206.
169. Weber, W.M., Popp, C., Claus, W., Van Driessche, W., 2000. Maitotoxin induces insertion of different ion channels into the *Xenopus* oocyte plasma membrane via Ca²⁺-stimulated exocytosis. Pflügers Arch. Eur. Physiol. 439,363-369.
170. Weber, J., Klug, M., Tardent, P., 1988. Chemistry of hydra nematocysts. En: Hessinger, A. y M. Lenhoff (Ed.) The biology of nematocysts. Academic Press Inc. pp. 427-444.
171. Whittle, K., Gallacher, S., 2000. Marine toxins. British. Med. Bull. 56, 236-253.
172. Woodward, R.M., Miledi, R., 1991. Angiotensin II receptors in *Xenopus* oocytes. Proc. R. London Ser. B. 244,11-19.
173. Yang, X.C., Sachs, F., 1989. Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. Science 243,1068-1071.
174. Yang, X.C., Sachs, F., 1990. Characterization of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes. J. Physiol. 431,103-122.
175. Yao, Y., Tsien, R.Y., 1997. Calcium current activated by depletion of calcium stores in *Xenopus* oocytes. J. Gen. Physiol. 109, 703-715.
176. Yasumoto, T., Murata, M., 1993. Marine toxins. Chem. Rev. 93, 1897-1909.
177. Zhang, Y., McBride, Jr. D., Hamill, O., 1998. The ion selectivity of a membrane conductance inactivated by extracellular calcium in *Xenopus* Oocyte. J. Physiol. 508.3, 763-776.
178. Zhang, Y., Hamill, O.P. , 2000. Calcium-, voltage- and osmotic stress-sensitive currents in *Xenopus* oocytes and their relationship to single mechanically gated channels. J. Physiol. 523,83-99.

ANEXO 1

Control de voltaje

Los diferentes métodos electrofisiológicos desarrollados hasta la fecha, son utilizados para analizar y registrar la actividad eléctrica de las células y los canales iónicos que están involucrados. El desarrollo de estos métodos ha sido consecuencia del avance en la investigación en varias ciencias, principalmente la biofísica y las neurociencias. Los primeros registros realizados en el siglo XIX fueron obtenidos con grandes limitaciones tecnológicas, sin embargo, el trabajo de muchos grupos derivó en adelantos metodológicos que provocaron la generación de técnicas electrofisiológicas eficientes. Una de estas técnicas la cual conocemos como control de voltaje fue desarrollada por varios grupos de investigadores, principalmente Cole y Marmont (E.U.A., 1947-1949) y Hodgkin, Huxley y Katz (Inglaterra, 1952). Esta metodología es el antecedente directo de otra de las técnicas más exitosas del siglo pasado, la de control de voltaje en microáreas desarrollada por el grupo de Neher y Sackman (Alemania, 1982) y que permite medir la actividad eléctrica de canales unitarios.

La técnica de control de voltaje fue utilizada en este estudio para detectar las corrientes iónicas provocadas por el veneno de *Cx*. Antes de explicar el fundamento de la técnica debemos recordar algunos de los conceptos básicos de las propiedades eléctricas celulares.

Las propiedades eléctricas de las células son consecuencia principalmente de su geometría y las características de los componentes de su membrana, tales como canales iónicos y transportadores. En general, en toda célula existe una

diferencia de potencial eléctrico entre su interior y exterior, esto es establecido principalmente por las características electroquímicas de ambos medios. El potencial transmembranal usualmente se denota V_m y es medido en voltios. El flujo de iones a través de la membrana por unidad de tiempo es llamado corriente membranal, y es medida en amperios (A) y denotada como I_m .

Los canales iónicos confieren características a la membrana celular muy importantes para la definición de sus propiedades eléctricas ya que a través de ellos los iones atraviesan la membrana, y proporcionan a ésta una conductancia eléctrica. La conductancia G , medida en siemens (S), es el inverso de la resistencia R , medida en ohms (Ω). Así, a resistencia infinita, la conductancia tiende a cero. Cuando varios canales iónicos en una membrana se abren simultáneamente, el total de conductancia de membrana es la suma de la conductancia de los canales individuales en su estado abierto. La conductancia de la membrana se determina midiendo la corriente que la atraviesa en respuesta a una fuerza electroquímica impulsora establecida por dos factores: 1) la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana, y 2) el gradiente de concentración iónica que se establece a ambos lados de la membrana.

Otra propiedad importante, en las características eléctricas celulares es la bicapa lipídica, que es impermeable a los iones y actúa como un aislante confiriendo a la membrana de capacitancia eléctrica. El grosor y el área de la membrana hace de ésta un excelente capacitor. La capacitancia (C), medida en faradios (F) corresponde a la habilidad de almacenar cargas (Q) a uno y otro lado de la membrana.

Técnica de control de voltaje con dos microelectrodos

Los mayores progresos en el entendimiento del comportamiento de las diferentes corrientes iónicas a través de canales en membranas celulares, ha sido posible, en buena medida, por el desarrollo de técnicas de control de voltaje (ver Hille, 1994 y Adley y Stanfield, 1996). Este método permite analizar la corriente iónica debido a que: 1) mantiene el control espacial y temporal del potencial de membrana, 2) elimina por lo tanto la corriente capacitiva, y 3) permite separar la corriente iónica de interés, al poder aplicar diversas manipulaciones experimentales incluyendo diferentes soluciones intra y extra celulares y el uso de fármacos específicos.

A finales de los años 40's, Cole (1947) y Marmont (1949) desarrollaron un método cuya finalidad era controlar el potencial de membrana. Esto era necesario por la siguiente razón: en los experimentos de control de voltaje se puede controlar el potencial de la membrana y medir por lo tanto la corriente transmembranal requerida para mantener ese voltaje. Esto se logra con un sistema de retroalimentación negativa, así por medio de un electrodo intracelular se mide continuamente el potencial de membrana, este valor se compara con una señal de referencia y mediante un amplificador diferencial, se inyecta a través de un segundo electrodo intracelular, la corriente necesaria para mantener el potencial de membrana en el valor de referencia.

La corriente total de membrana, I_m es la suma de dos componentes:

$$I_m = I_{ion} + I_{Cm}$$

Donde I_{Cm} es la corriente capacitiva e I_{ion} es la corriente que fluye a través de los canales.

La corriente capacitiva es proporcional al cambio de potencial de membrana con respecto al tiempo. Esto es, $I_{Cm} = C_m dV/dt$. La forma de medir directamente la corriente iónica en todo momento es hacer que no haya cambios en el potencial de membrana de tal forma que $dV/dt=0$

La corriente en ausencia de fluctuaciones del potencial de membrana corresponde únicamente a la que fluye por los canales iónicos, y es posible medir a través de otro electrodo externo conectado a un convertidor corriente-voltaje. La detección de la corriente transmembranal en forma continua permite analizar sus características funcionales desde el punto de vista, de varias disciplinas, por ejemplo, biofísico, fisiológico o farmacológico.

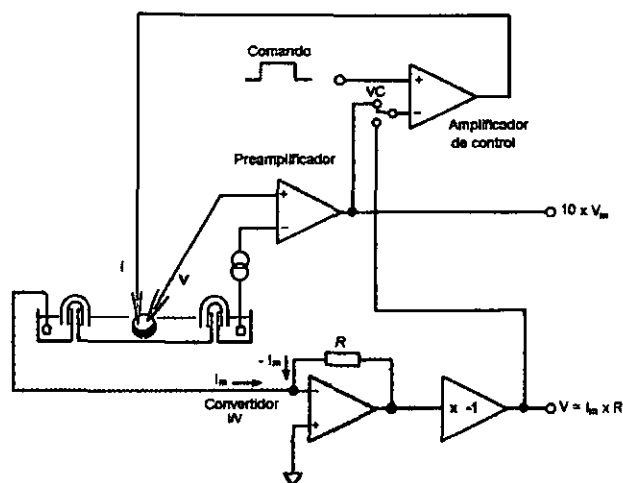


Figura. 1. Diagrama que muestra el mecanismo de retroalimentación usado durante la técnica de control de voltaje con dos microelectrodos

I , representa al electrodo de corriente; V , al electrodo de voltaje. V_m es el potencial de membrana; I_m la corriente transmembranal; R , resistencia. Modificado de Adley y Standfield, 1996.



Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*

Monica Torres^a, Manuel B. Aguilar^a, Andres Falcon^a, Lenin Sánchez^a, Faisal F. Y. Radwan^b, Joseph W. Burnett^b, Edgar P. Heimer-de la Cotera^a, Rogelio O. Arellano^{a,*}

^aCentro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Querétaro 76001, Mexico

^bDepartment of Dermatology, School of Medicine, University of Maryland 6th Floor, 405 W. Redwood Street, Baltimore, MD 21201, USA

Received 7 September 2000; accepted 9 December 2000

Abstract

In this study, we determined hemolysis activity in human and sheep erythrocytes, and characterized the electrical responses in *Xenopus* oocyte membrane elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana* (Cx). The Cx venom produced hemolysis in both species, being more potent on human red cells. The electrophysiological study showed that the Cx venom elicited three different responses in the oocytes. One current was generated in all the oocytes tested and corresponded with a slow inward current (I_{C_x}) associated with an increase in membrane conductance. I_{C_x} was concentration-dependent and had a reversal potential of -10.3 ± 0.4 mV. Ionic substitution studies indicated that the conductive pathway was mainly permeable to cations and non-selective. The oocyte membrane resistance was completely recovered after washout of the venom, this suggested that the effect was due to generation of a specific membrane conductance as opposed to a possible non-specific membrane breakdown. A comparative study with three distinct native cationic channels present in the oocyte membrane (i.e. (1) hemi-gap-junction channels, (2) mechanosensitive channels, and (3) the ouabain-sensitive channel activated by palytoxin), showed that I_{C_x} might correspond to opening of mechanosensitive channels or to activation of an unknown cationic channel located in the oocyte membrane. The bioactive fraction eliciting I_{C_x} were peptides and was separated from two other peptidic hemolytic fractions by chromatography. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Cassiopea*; *Xenopus* oocyte; Ionic channels; Electrophysiology; Hemolysis

1. Introduction

The marine invertebrates included in the phylum Cnidaria—jellyfishes, sea anemones and corals—express a wide variety of neurotoxic and cytolytic substances (Pong-Prayoon et al., 1991; Lotan and Zlotkin, 1996). These toxic substances are principally confined to a cytoplasmic capsules, the nematocysts (Watson and Wood, 1988).

Cassiopea xamachana (Cx) is a jellyfish that, like all other members of this genus, is called “the up side-down jellyfish”. The presence of Cx has been reported in all the oceans, and particularly at the Indo-Pacific, also around Hawaii, and the Caribbean Sea. Its venom can cause moderately painful stings in humans that commonly results in a

rash, and occasionally within an hour, produces vomiting, painful joints swelling, facial edema and generalized urticaria (Rifkin et al., 1996).

Isolation of Cx nematocysts has proven difficult (Fitt and Trench, 1983; Radwan et al., 2001), and has hampered research on Cx venom. Nevertheless, studies on its hemolytic, proteolytic and phospholipase actions exist (Pong-Prayoon et al., 1991; Radwan et al., 2001). Also, the crude venom has been reported to contain small nonpeptide anticholinesterases and muscarinic toxins (Karlsson et al., 1991).

Among the bioactivities of different jellyfishes toxins, cytotoxicity is probably one of the most documented (Edean et al., 1993; Bernheimer and Rudy, 1986; Rottini et al., 1995; Lotan, 1995; Malpezzi et al., 1993). In addition, it has been reported that some jellyfish venoms generate electrical activity in different cell models, for example: (1) *Aurelia* sp venom causes depolarization in frog muscle (Kihara et al., 1988); (2) *Carybdea rastonii* produces a calcium-dependent

* Corresponding author. Tel.: +52-4-2381062; fax: +52-4-2381062.

E-mail address: arellano@calli.cnb.unam.mx (R.O. Arellano).

contractile response in arterial smooth muscle (Azuma et al., 1986); and (3) *Chrysaora* sp. toxins open cationic channels in myelinated frog nerve fibers (Dubois et al., 1983).

The *Xenopus* oocytes and follicles (i.e. the oocytes coupled to its surrounding follicular cells) are useful cellular systems for studying ion channels and membrane receptors in a controlled *in vivo* environment. These cellular models are excellent tools in the venom research with neurotoxic activity since they exhibit several advantages: (1) oocytes and follicles express a variety of native ionic conductances and membrane receptors to diverse neurotransmitters and hormones (Kusano et al., 1982; Miledi et al., 1989; Arellano et al., 1996); (2) several exogenous receptors and channels can be expressed in the membrane of the oocyte by micro-injection of messenger RNA purified from different sources (Miledi et al., 1989), including the nervous system; and (3) the size of the oocytes (1–1.3 mm) permits the application of several research methodologies on a single cell.

In the present study, we describe the biological activity of the Cx venom in two systems by measuring: human and sheep erythrocytes lysis and the electrical activity evoked in *Xenopus* oocytes.

2. Material and methods

2.1. Venom extraction

Live adult *Cassiopea xamachana* were collected in Bojórquez Lagoon, Cancún, Quintana Roo México (20° 20' north latitude and 21° 10' east longitude) and were prepared as follows: The oral arms of five organisms were clipped manually, combined and centrifuged at 1620 g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in distilled water, lyophilized and stored at –20°C.

The nematocysts rupture was monitored optically in order to obtain their maximal discharge. The best technique for nematocysts discharge was obtained applying an osmotic shock by resuspending freshly lyophilized samples in deionized water (1 mg 10 μl^{-1}), this preparation was stirred for 2 min and centrifuged at 1932 g for 30 min at 4°C. The supernatant was then centrifuged at 11130 g for 20 min at 4°C, and filtered (millipore 0.45 μm). Protein content was measured using both the Bradford and Lowry methods (Bradford, 1976; Lowry et al., 1951). This pool was used to determine both, the electrical and the hemolytic venom activities. The venom isolated and resuspended in this form, maintained full activity when stored at –70°C for 1 month. Samples of venom kept at –70°C gradually lost as much as 70% of their electrical activity within 1 year. Thus, the best way to maintain full activity for several months was keeping the lyophilized sample at –20°C.

2.2. Hemolytic assay

Hemolytic assay was performed according to the method described previously for a bacterial cytolysin (Rottini et al.,

1990), with some modifications. Briefly, the assay contained a mixture (1 ml) of Alseven solution (containing in mM: 120 dextrose, 30 sodium citrate, 7 NaCl and 2 citric acid, adjusted to pH 7.4) with 50 μl of 1% suspension of human or sheep erythrocytes, and the required volume of venom sample. Samples were incubated at 37°C for 30 min. After centrifugation (1130 g for 5 min at 4°C), the A_{415} of the supernatant fluid containing the hemoglobin released from lysed erythrocytes was measured in a spectrophotometer (Lambda Bio, Perkin Elmer Co.). Each experiment was normalized with respect to complete hemolysis, this was accomplished by diluting the erythrocytes sample in deionized water instead of Alseven buffer and adjusting the A_{415} to 0.9. One hemolytic unit (HU_{50}) was defined as the amount protein sample required to cause 50% hemolysis.

2.3. Electrophysiological techniques

Xenopus laevis oocytes at stages V and VI (Dumont, 1972) were dissected from the ovaries and treated with collagenase (0.5 mg ml^{-1}) at room temperature for 30 min in normal frog Ringer (NR) solution (containing in mM: 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl_2 , 5 Hepes, pH 7.0). After washing with NR, the oocytes were defolliculated (all their external envelopes except for the vitelline layer were removed) using fine forceps. The defolliculated oocytes were stored at 18°C in sterile Barth's solution (containing in mM: 88 NaCl, 1 KCl, 2.4 NaHCO_3 , 0.33 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.41 CaCl_2 , 0.82 MgSO_4 , 5 Hepes, pH 7.4, supplemented with 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gentamicin) until their use in electrophysiological studies (Arellano et al., 1996). Electrical recordings were made over a period of 1–5 days following dissection, and responses were monitored with a two-electrode voltage-clamp (Miledi, 1982). The oocytes were continuously superfused (5 ml min^{-1}) with NR and voltage clamped at –60 mV so as to be away from the equilibrium potentials for K^+ , Na^+ , Ca^{2+} and Cl^- (Kusano et al., 1982). The connotation of inward ionic current is given with respect to this potential. Cx venom and other drugs were applied in the superfusing bath. To study ion selectivity, the NaCl in the NR was substituted with equal amounts (115 mM) of NMDG-Cl or KCl. The low Cl^- Ringer solution contained 57.5 mM Na_2SO_4 in place of NaCl and the osmolarity of this solution was adjusted by addition of sucrose.

Lanthanum or gadolinium were added to NR from 10 mM stock solutions. Stock solution of progesterone (10 mM) was made in ethanol. In order to eliminate the native I_c current (Arellano et al., 1995), an antisense oligonucleotide for the sequence that codified for the connexin 38 (Cx38) was prepared with the sequence 5'-GCT TTA GTA ATT CCC ATC CTG CCA TGT TTC-3', and was injected (15 ng) into oocytes 2 or 3 days before recording (Ebihara, 1996; Zhang et al., 1998). The oocytes of this group were compared with oocytes injected with equal amount of a control scramble antisense oligonucleotide that had the

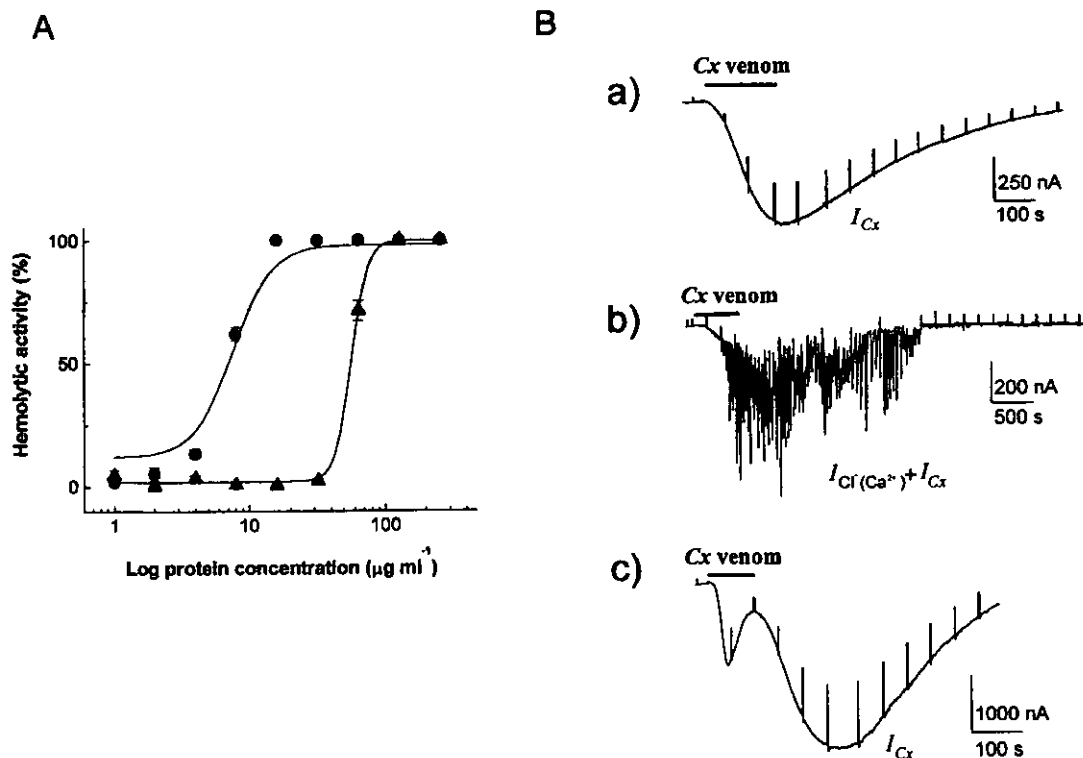


Fig. 1. Hemolysis and electrical responses produced by Cx venom. (A) The hemolytic activity of Cx venom on sheep (▲) and human erythrocytes (●) was concentration-dependent. Each point is the mean \pm SE from six assays. The HU_{50} in sheep and human erythrocytes were of 55.9 and 6.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. (B) Examples of membrane ionic currents elicited by Cx venom in oocytes voltage clamped at -60 mV. In this and subsequent records the venom (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and other drugs were applied during times indicated by bars at top, and steps to -40 mV (2 s) were applied periodically to monitor membrane conductance. (a) I_{Cx} elicited by Cx venom, (b) oscillatory current ($I_{Cl(Ca^{2+})} + I_{Cx}$) and I_{Cx} , and (c) the fast inward current elicited in some oocytes together with the typical I_{Cx} .

sequence 5'-CTT TTG ACC GCT CAT CCC TAT AGT ATT TGC-3'.

2.4. HPLC size exclusion chromatography

The Cx venom was processed for HPLC using a Bio-Rad Bio-Sil SEC-125 column (600 \times 7.5 mm) equilibrated and eluted with 10 mM ammonium acetate buffer (pH 7); flow rate of 1 ml min^{-1} ; 1 ml fractions collected; detection, 206 nm. The fractions were lyophilized and resuspended in deionized water and protein concentration was determined by the Lowry method.

The column was calibrated with the following molecular weight standards: thyroglobulin (670,000); bovine gamma globulin (158,000); albumin (66,200); chicken ovoalbumin (44,000); horse myoglobin (17,000); and vitamin B-12 (1350), equilibrated and eluted with phosphate buffer pH 6.8 (sodium phosphate 0.10 M and NaCl 0.15 M).

The 1,2-bis(2-aminophenoxy)-ethane-*N,N,N',N'*-tetraa-

cetic acid tetrakis acetoxymethyl ester (BAPTA-AM) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Fetal bovine serum, progesterone, collagenase (type I), gentamicin, and ouabain were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and all salts and other reagents were obtained from J. T. Baker (Phillipsburg, PA, USA) or Sigma.

3. Results

3.1. Cytolytic assay

The crude Cx venom had concentration-dependent hemolytic activity. This was detected in both, human and sheep erythrocytes (Fig. 1(A)), and had an HU_{50} of 6.89 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 56 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. Thus, the Cx venom was approximately 10 times more lytic to human red cells.

Xenopus oocytes treated with similar Cx venom concentrations were not lysed (not shown).

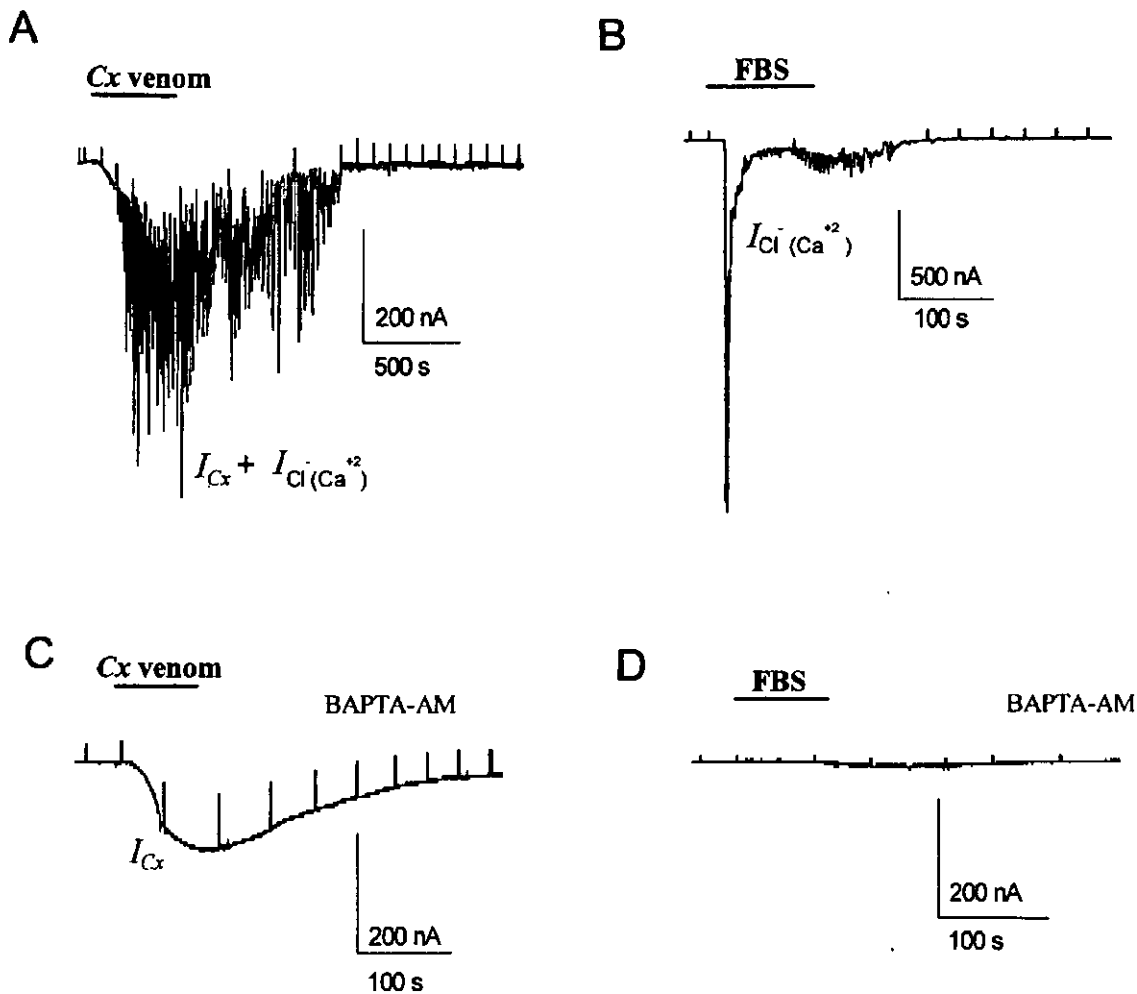


Fig. 2. I_{Cl} activation was independent on intracellular Ca^{2+} increase. Example of ionic currents elicited by venom ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) or FBS (0.1%) in control oocytes (A–B) and in oocytes loaded with BAPTA-AM ($10 \mu\text{M}$, 24 h, C–D). I_{Cl} was not affected in the BAPTA-loaded oocytes, while the oscillatory currents were completely eliminated (C and D).

3.2. Electrical activity elicited by *Cx venom* in *Xenopus* oocytes

The resting membrane potential of the oocytes ($n = 150$, 25 frogs) used in this study was $-34 \pm 6 \text{ mV}$ (all data given as means \pm SE) and had an average input resistance of $0.79 \pm 0.2 \text{ M}\Omega$.

In oocytes, the *Cx venom* evoked complex inward membrane currents associated with an increase in membrane conductance (Fig. 1(B)). Two components of the current response were not elicited in all cells, one of these was a smooth inward current that inactivated rapidly even in the presence of the venom ($63 \pm 5.7 \text{ s}$, Fig. 1(Bc)). This response was observed in 15 oocytes of four frogs from a total of 25 frogs.

The second response component was an oscillatory inward current (Fig. 1(Bb)) elicited in 34 oocytes from 13 frogs from the same total of 25 frogs. This oscillatory current presented characteristics which were very similar to the common $I_{Cl}(Ca^{2+})$ elicited in oocytes by several agonist such as, acetylcholine, angiotensin II, divalent cations and a serum factor (Miledi et al., 1989). For example, the *Cx venom*-induced oscillatory current was abolished in oocytes incubated 24 h in medium containing BAPTA-AM ($10 \mu\text{M}$), suggesting that the current activation was dependent on intracellular calcium release (Fig. 2).

The third component of the venom response was elicited in all the oocytes tested and was commonly the largest current activated. This corresponded to a slow and

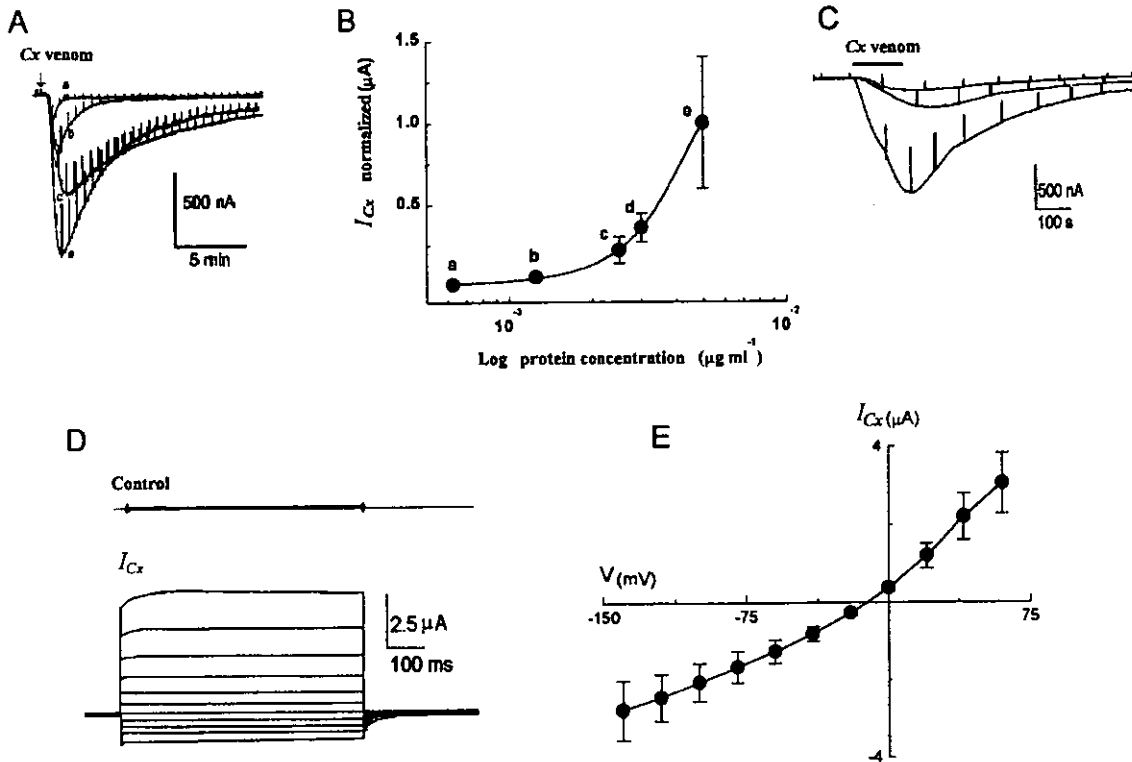


Fig. 3. Concentration-response and current-voltage relationships. (A) Examples of membrane ionic currents elicited in an oocyte held at -60 mV. Superimposed traces are the membrane current elicited by subsequent applications of Cx venom (15 nl) at different concentrations (in $\mu\text{g ml}^{-1}$: $a = 0.62$, $b = 1.25$, $c = 2.5$, $d = 3$, $e = 5$) in a single oocyte with washing periods of 10 min. (B) Concentration-response relationship for I_{Cx} obtained in six oocytes (two frogs). I_{Cx} obtained in each concentration were normalized with respect to the maximal current generated by $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of the Cx venom. (C) Traces are examples of subsequent Cx venom ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) applications in a single oocyte producing desensitization of the response. (D) Superimposed traces are examples of voltage steps, from -140 to $+60$ in increases of 20 mV applied to an oocyte held at -60 mV during superfusion with NR (control traces) and during the peak elicited by $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of Cx venom. (E) Current-voltage relationship of I_{Cx} . Each point represents the average of the current obtained in 10 oocytes from two frogs.

smooth inward current, denoted here as I_{Cx} . The activation of I_{Cx} was concentration-dependent (Fig. 3(A) and (B), six oocyte from two frogs), but the average current amplitudes were variable between oocytes from different frogs. For example, the venom ($1.25 \mu\text{g ml}^{-1}$) in oocytes ($n = 5$) from one frog generated I_{Cx} of 1327 ± 133 nA, while venom from the same extraction elicited in oocytes ($n = 5$) from another frog currents of 302 ± 87 nA. The I_{Cx} recovered slowly, normally several minutes after the venom was washed-out. Also, subsequent venom applications in the same oocyte produced desensitization of the response (Fig. 3(C)).

In oocytes (28 from six frogs) incubated 24 h with BAPTA-AM ($10 \mu\text{M}$) the I_{Cx} amplitude and its time-course were not affected, while the oscillatory current in the same oocytes evoked by the Cx venom or serum were completely eliminated, this result strongly suggested that I_{Cx} was not dependent on intracellular Ca^{2+} increase.

3.3. Ionic basis of I_{Cx}

Given that I_{Cx} was the more consistent response elicited by the venom we studied in detail the electrophysiological characteristics of this current.

Further experiments were performed in order to evaluate the ionic basis of I_{Cx} and to establish a possible relationship with previously described ionic channels in the native oocyte (see below). For this, oocytes were clamped at -60 mV, and a series of voltage steps (2.6 s) from -140 to $+60$ mV were applied during superfusion with NR (control current) or at the I_{Cx} peak. For each voltage step, the control membrane currents were subtracted from those obtained during I_{Cx} peak, and these values were plotted as in Fig. 3(E).

The I_{Cx} had a reversal potential (E_{rev}) of -10.3 ± 0.4 mV ($n = 10$, Fig. 3(E)). This value differs from the equilibrium potentials for Cl^- (-20 mV), K^+ (-100 mV) or Na^+

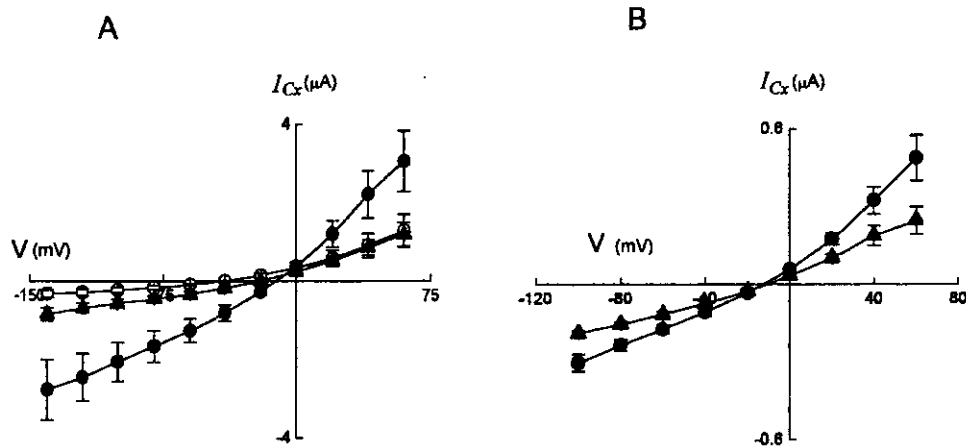


Fig. 4. Ionic basis of I_{C_x} . Oocytes were superfused with solutions containing different concentrations of the principal ions in Ringer solution and the current-voltage relations were constructed applying a series of voltage steps before and during the I_{C_x} peak. I_{C_x} was generated in NR (●) or in one of following solutions, (A) substitution of 100% Na^+ by NMDG^+ (○) or 50% (▲), and (B) substitution of all Na^+ by K^+ (▲).

(+60 mV) in *Xenopus* oocytes (Kusano et al., 1982), suggesting that the I_{C_x} channels were permeable to more than a single type of ion.

Ion substitution studies were performed in order to know the participation of the principal ions during I_{C_x} . Replacement of 100, 50, 75 and 25% NaCl in the NR by *N*-methyl-D-glucamine gave E_{rev} 's of -39.83 ± 2.23 mV ($n=6$), -24.32 ± 1.03 mV ($n=6$), -19.66 ± 0.16 mV ($n=6$), and -14.99 ± 1.31 mV ($n=6$), respectively (Fig. 4(A)). As I_{C_x} was reduced throughout the voltage range studied, this effect was stronger on the inward currents suggesting that Na^+ is a main current carrier in the response. Substituting all Na^+ by K^+ slightly shifted the E_{rev} to -12.8 ± 1.4 mV, six oocytes (Fig. 4(B)) suggesting that I_{C_x} channels were also permeable to K^+ . Finally, I_{C_x} elicited in Cl^- free medium had an $E_{rev} -14.03 \pm 0.39$ (not shown).

All these results are in agreement with the behavior expected of a channel that is permeable mainly to cations and discriminates poorly between Na^+ and K^+ .

3.4. Action mechanism involved in I_{C_x} generation.

Given that I_{C_x} was driven through a cationic permeable pathway, we were interested in determining whether or not the channels involved corresponded with any native cationic conductance previously characterized in *Xenopus* oocytes. Indirect evidence indicated that I_{C_x} might be generated by opening of an oocyte native channel. For example, one fact supporting this idea was obtained in experiments in which a group of oocytes were induced to mature by incubation with progesterone (10 μM , approximately 5 h). It is known that several native responses of the oocyte are down regulated or eliminated in matured oocytes. The cholinergic responses (Kusano et al., 1982), the I_c current (Arellano et al., 1995,

see below), and several other native electrical responses are completely eliminated in mature oocytes (Miledi, R. and Arellano, R.O., unpublished observations). The I_{C_x} was almost completely eliminated in matured oocytes (Fig. 5(B)). Experiments made in cells from a particular donor showed that control oocytes ($n=4$) responded to venom with robust I_{C_x} of 1858 ± 85 nA while in matured oocytes from the same frog only one from four oocytes responded with an I_{C_x} of 20 nA. Thus, the electrical response produced by the Cx venom in the oocyte membrane is regulated by maturation as likewise several other native responses.

Previous studies have shown that oocyte membrane is endowed with at least three distinct native cationic currents which are generated by: (1) the opening of hemi-gap-junction channels (Cx38) that generates the current named I_c (Arellano et al., 1995; Zhang et al., 1998); (2) palytoxin application that activates an inward ouabain-sensitive current (Wang and Horisberger, 1997); and (3) the activation of mechanosensitive channels (I_{MS}) (Yang and Sachs, 1989). To determine if one of these channels is involved in the I_{C_x} generation, the following experiments were performed.

(1) The I_c native current is generated when the oocytes are exposed to medium deprived of divalent cations (Arellano et al., 1995), and is due to the opening of Cx38 hemi-gap-junction channels commonly present in the membrane of the oocyte. The injection of Cx38 antisense oligonucleotide into the oocytes eliminates I_c in approximately 48 h (Ebihara, 1996; Zhang et al., 1998). Therefore, we injected oocytes with an oligonucleotide antisense to Cx38 and incubated for >48 h until I_c vanished, as evidenced by perfusing the oocytes with Ca^{2+} -free Ringer solution. These injected-oocytes not generating I_c , still

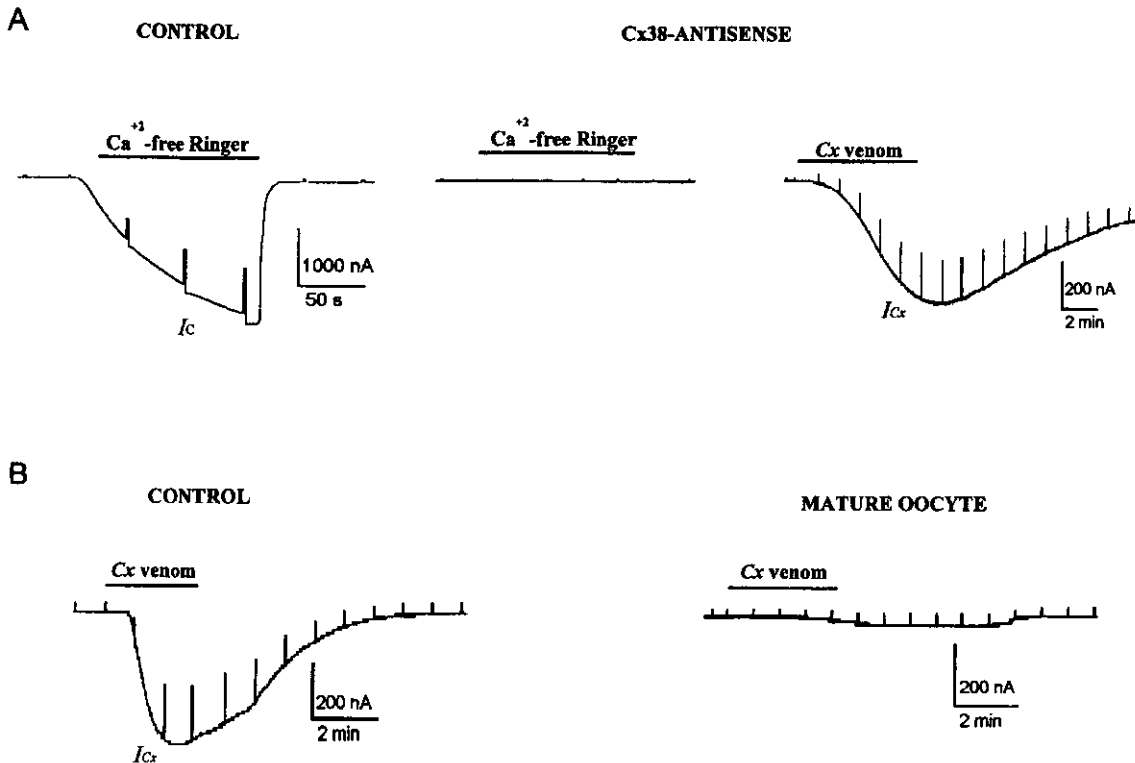


Fig. 5. I_{C_r} , relation with I_C , and its regulation during oocyte maturation. (A) Native cationic current I_C activated by superfusion of Ca^{2+} -free Ringer solution in control oocytes. I_C was abolished in oocytes injected with a Cx38 antisense oligonucleotide. The oocytes deprived of I_C in this way still responded generating robust I_{C_r} ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$). (B) I_{C_r} ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) in a control oocyte and in an oocyte which was induced to mature by progesterone ($10 \mu\text{M}$) treatment. Traces are examples of results obtained in four oocytes for each group.

responded to the venom ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) evoking robust I_{C_r} . For example, in control oocytes ($n=4$) from one frog (either non-injected or injected with a scramble oligo) I_{C_r} was of $285 \pm 35 \text{ nA}$ and oocytes without I_C (antisense Cx38-injected) generated I_{C_r} of $440 \pm 25 \text{ nA}$ ($n=4$, Fig. 5(A)). This result indicated that a I_{C_r} channel did not correspond to opening of Cx38 hemi-gap-junction channels. (2) Palytoxin (a toxin from a soft coral of the genus *Palythoa*) evoked an unspecific cationic conductance in the oocyte membrane which is blocked by ouabain (Wang and Horisberger, 1997). Again, I_{C_r} elicited by $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ venom did not produce differences in the presence of ouabain $100 \mu\text{M}$ ($473 \pm 16 \text{ nA}$, $n=5$) compared with a control group in the absence of ouabain ($342 \pm 41 \text{ nA}$, $n=5$). Finally, (3) because both I_{M_S} and I_C are blocked by lanthanides, the possibility that these polycations might block I_{C_r} was tested. For these studies, the I_{C_r} was elicited by Cx venom ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) and then Gd^{3+} or La^{3+} ($10 \mu\text{M}$) were applied at its maximum peak. Both, Gd^{3+} and La^{3+} , blocked 100% I_{C_r} ($n=6$, Fig. 6(A)). The inhibition effect with Gd^{3+} ($5 \mu\text{M}$) was voltage-independent ($n=4$, Fig. 6(B)). The later result suggested that the site for Gd^{3+} actions did not

strongly sense the transmembranal potential, and that the blockage binding site was not within the pore of the I_{C_r} channel. However, it is still not possible to completely rule out that the Gd^{3+} binding site was at a superficial location of the pore and not sense the transmembranal potential.

3.5. Partial purification

The Cx venom lost its hemolytic activity when it was incubated at 37°C for 2 to 12 h, but the activity was preserved when the venom was incubated up to 24 h together with a cocktail of protease inhibitors (complete TM, mini Boehringer Mannheim Co. Germany) in six hemolytic experiments (Fig. 7(A)). Likewise, the electrical activity was lost gradually with the incubation at 37°C in the absence of protease inhibitors, but preserved when the inhibitors were present (10 oocytes from four frogs). The protease inhibitors used did not generated hemolytic or electrical activity by themselves. These observations suggested that the active substances were proteinaceous (Fig. 7(B)).

Thirty five fractions were collected from the HPLC chromatography (Fig. 8(A)), and the peak obtained at 25 min

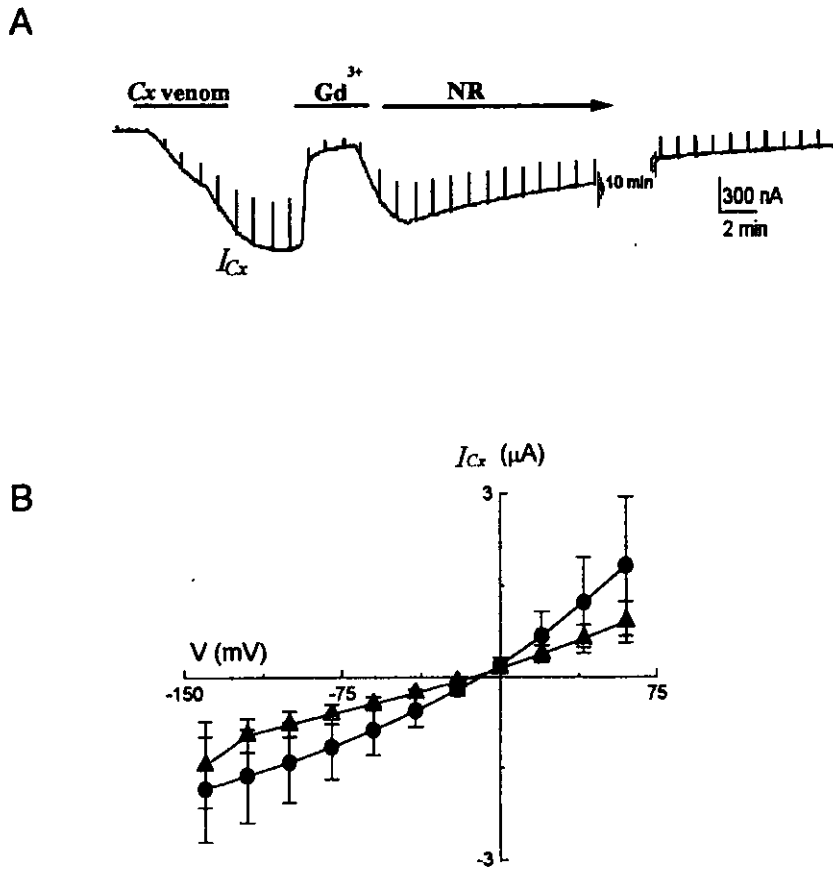


Fig. 6. Blocking effect of I_{Cx} by Gd^{3+} . (A) I_{Cx} ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of venom) was blocked by Gd^{3+} ($10 \mu\text{M}$), the effect was completely reversible. (B) Current-voltage relation of I_{Cx} , blocking effect by Gd^{3+} ($5 \mu\text{M}$, \blacktriangle), compared with I_{Cx} in control conditions (\bullet). Points are the average (\pm SE) of four oocytes in each condition.

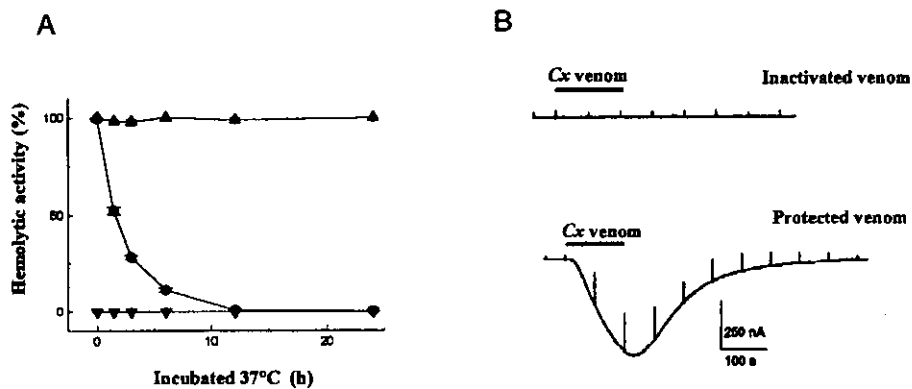


Fig. 7. Evidence of the protein nature of the active substances. (A) Hemolysis assays were made on sheep erythrocytes in the presence of Cx venom incubated at 37°C (\bullet), Cx venom incubated at 37°C together with a protease inhibitors cocktail (\blacktriangle) and the protease inhibitors cocktail alone (\blacktriangledown). (B) Activation of I_{Cx} failed when Cx venom ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) was incubated at 37°C for 24 h (top trace), however, Cx venom activity was protected during the incubation at 37°C (24 h) by the presence of a protease inhibitors cocktail.

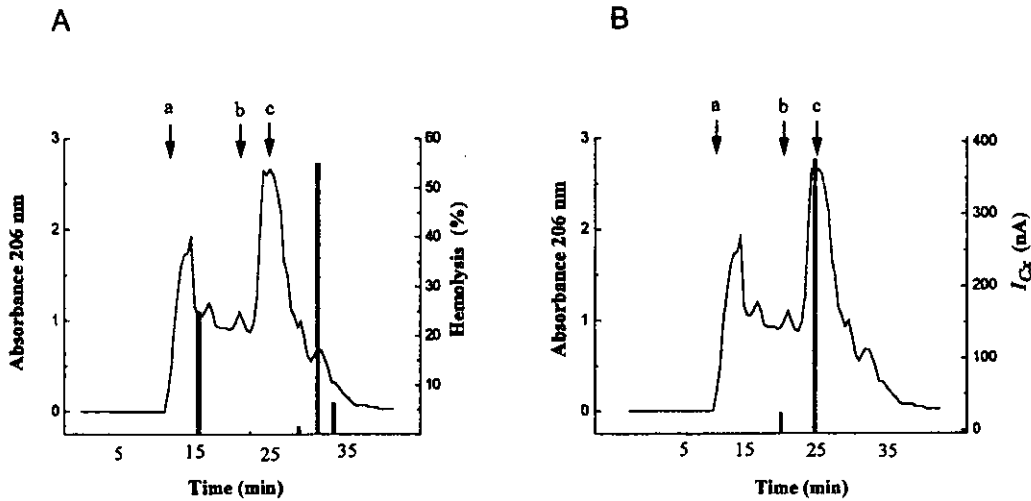


Fig. 8. Cx venom HPLC elution profile using a Bio-Sil SEC-125 column (600×7.5 mm). One ml fractions were collected and the eluate absorbance was determined in each case at 206 nm. In (A) the bars indicate the fractions with hemolytic activity. In (B) the bars indicate the fractions which activated I_{Cx} . The following markers were used in both cases: a, thyroglobulin (MW 670,000); b, horse myoglobin (MW 17,000) and c, vitamin B-12 (MW 1350).

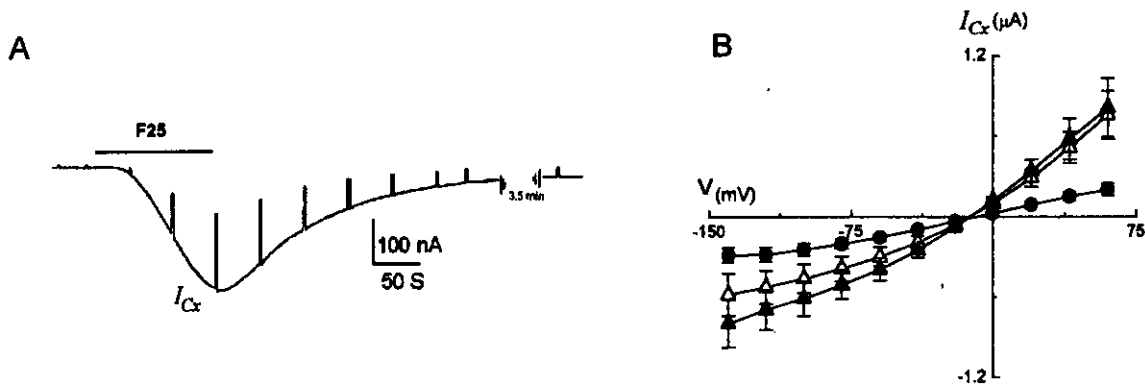


Fig. 9. Ionic membrane current generated by F25. (A) The fraction 25 ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) elicited an inward membrane current with similar characteristics to I_{Cx} . (B) Current-voltage relationship of I_{Cx} elicited by F25 ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$, Δ) and total Cx venom ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$, \bullet). The current response elicited by F25 was not affected in BAPTA-loaded oocytes (\blacktriangle). Each point represents the mean current in five oocytes.

(F25) consistently presented the electrical activity, while the hemolytic activity was obtained in peaks 15 and 31 (Fig. 8(B)).

F25 elicited an inward current with a similar time-course to that of I_{Cx} (Fig. 9(A)) and had an E_{rev} of -12.47 ± 0.97 mV. This value was similar to that obtained in the same oocytes for the I_{Cx} generated by total venom superfusion. In order to know if the current elicited by F25 was Ca^{2+} -independent like I_{Cx} , we performed venom applications in oocytes loaded with BAPTA-AM. Loaded-oocytes still responded to F25 and the current generated had an E_{rev} of -10.77 ± 0.81 , a value that was also similar to that for the I_{Cx} elicited by the crude venom (Fig. 9(B)). Thus,

these results seemed to indicate that F25 contains the protein responsible for I_{Cx} generation.

4. Discussion

In this study, we show that Cx venom displays biological activity in two different cell models: erythrocytes and oocytes. With respect to hemolysis, human erythrocytes were more sensitive to Cx venom than sheep red blood cells. Previous studies concerning the action mechanisms of cytolytic proteins have shown that these substances interact directly with the membrane lipids (Bernheimer

and Rudy, 1986), either by presenting intrinsic phospholipase activity or by generating transmembranal hydrophilic pores. Some cytolytic toxins interact with target cell via cholesterol (Rossjohn et al., 1997) and, in other cases, sphingomyelin (Bernheimer and Rudy, 1986). The proportion of these membrane lipids in erythrocytes differs between animal species; for example, sheep erythrocyte membrane contains about three times more sphingomyelin than the human erythrocytes (Rottini et al., 1995). Thus, differences in membrane lipids composition might explain the higher selectivity of Cx venom on human erythrocytes.

The electrophysiological study shows that the Cx venom elicits three different responses in *Xenopus* oocytes. One of them, denoted I_{Cx} , was generated in all oocytes tested. I_{Cx} was produced by the opening of cationic channels in the oocyte membrane; these channels discriminate poorly between Na^+ and K^+ .

We consider at least two possible mechanisms involved in the activation of I_{Cx} by the venom: (1) The Cx venom peptide was incorporated to the membrane to form an ion-conducting pore, a similar mechanism to that used by cytolysins (Bernheimer and Rudy, 1986; Rossjohn et al., 1997); and (2) Cx venom activated native cationic channels present in the oocyte membrane. Three observations suggest that the Cx venom exerts its action by opening a specific membrane conductance rather than inducing a non-specific membrane breakdown: (1) the complete recovery of the oocyte membrane conductance after continuous exposure to Cx venom; (2) the desensitization of I_{Cx} resulting from subsequent venom applications in the same oocyte; and (3) the elimination of I_{Cx} in mature oocytes.

The electrical characteristics of I_{Cx} indicated that there are at least three different types of native channels that might correspond with those activated by Cx venom.

Our results show that I_{Cx} was not generated via the $Na^+ - K^+$ pump which has been proposed to be activated by palytoxin, neither by opening of I_C channels, since oocytes deprived of I_C by injection with an antisense against Cx38 channel nucleotide sequence still responded potently to the venom. The third option, a venom action on the gating of mechanosensitive channels still remains as a strong possibility. Indirect evidence that support a similarity between I_{Cx} and I_{MS} include: (1) both are cationic currents; (2) also, both are blocked completely by a concentration close to $10 \mu M$ Gd^{3+} ; and (3) importantly, this blocking effect was provoked through a voltage-independent mechanism, that suggested strongly which the channels involved are blocked by Gd^{3+} at a binding site outside the membranal electric field (cf. Yang and Sachs, 1989).

It is interesting to mention that maitotoxin, a marine neurotoxin from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*, can also elicit an inward cationic current (I_{Mn}) in *Xenopus* oocytes (Bielfeld-Akermann et al., 1998). Additionally, I_{Mn} is blocked by Gd^{3+} and is non-permeable to $NMDG^+$. Finally, maitotoxin can produce an increase of intracellular Ca^{2+} in addition to I_{Mn} (Bielfeld-Akermann et al., 1998; Weber et al.,

2000). Because of these observations, it has been proposed that the mechanosensitive channels are related with those channels activated by maitotoxin (Bielfeld-Akermann et al., 1998). Thus, some similarity exist between I_{Cx} , I_{Mn} and I_{MS} , which is of interest since I_{MS} channels in oocytes are regularly activated by mechanical pressure applied via the patch-clamp pipette after the formation of a tight seal (e.g. Yang and Sachs, 1989). There is no clear evidence of any other stimuli activating macroscopic I_{MS} currents in the whole oocyte. Thus, drug-activated MS-conductance might represent a novel tool for the study of the physiological significance of these channels in the oocyte cell membrane. Alternatively, Cx venom might be activating a different and unknown channel. The results presented here may help the understanding of characteristics of native conductances and channels which are important in regulating the oocyte development and maturation.

The protective effect produced by the protease inhibitor cocktail on Cx venom incubated at $37^\circ C$ (24 h) strongly suggested that the venom's active substances were peptides. Other biochemical studies about the compounds found in the venom of some jellyfishes have separated different polypeptides and enzymes such as collagenases, proteases, elastases, phospholipases and nucleases (Pong-Prayoon et al., 1991; Smith, 1936).

The chromatographic separation of Cx venom rendered three different bioactive fractions, one of them elicited I_{Cx} and two produced hemolysis. The fact that more than one hemolytic protein is present in the Cx venom is a feature common to other jellyfish that can possess two or more cytolysins in the same species (Endean, 1993).

The peptide responsible for the electrical activity might probably be smaller than horse myoglobin (17,000 Da). This conclusion is not definitive since adsorption could occurred to the column support, or aggregation of various proteins in the eluate, these events have been reported to occur in several other jellyfish venom proteins (Olson et al., 1984; Othman and Burnett, 1990; Bloom et al., 1998).

4. Uncited References

Scheiner-Bobis and Schneider, 1997. Yang and Sachs, 1990.

Acknowledgements

We are grateful for the help during this study of Ma. Eugenia Ramos, Bs, Pilar Galarza, Bs and Edith Garay, PhD, from the CNB-UNAM, and Fernando Negrete, MS and Lourdes Segura-Puertas, PhD, from the ICML-UNAM. This work was supported by the grants: CONCyTEQ (B-11) to M.T. and E.H., and by DGAPA-UNAM (IN 200198, IN-209596) and CONAcYT (32364-N) to

R.O.A. Also, M.T. acknowledges PhD fellowships from DGEF-UNAM and PAEP-UNAM (205312).

References

- Arellano, R.O., Woodward, R.M., Miledi, R., 1995. A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus oocytes*. *J. Physiol., Lond.* 484, 593–604.
- Arellano, R.O., Woodward, R.M., Miledi, R., 1996. Ion channels and membrane receptors in follicle-eclosed *Xenopus Oocytes*. In: Narahashi, T. (Ed.), *Ion Channels*. Plenum Press, New York, pp. 203–256.
- Azuma, H., Ishikawa, M., Nakajima, T., Satoh, A., Sekizaki, S., 1986. Calcium-dependent contractile response of arterial smooth muscle to a jellyfish toxin (pCrTX: *Carybdea rastonii*). *Eur. J. Pharmac.* 88, 549–559.
- Bernheimer, A.W., Rudy, B., 1986. Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 864 (1), 123–141.
- Bieffed-Akermann, A., Ranger, C., Korbmayer, C., 1998. Maitotoxin (MTX) activates a non selective cation channel in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Arch-Eur. Physiol.* 436, 329–337.
- Bloom, D.A., Burnett, J., Alderslade, P., 1998. Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beach side. *Toxicon* 36, 1075–1085.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248–254.
- Dubois, J.M., Tanguy, J., Burnett, J.W., 1983. Ionic channels induced by sea nettle toxin in the nodal membrane. *Biophys. J.* 42, 199–202.
- Dumont, J.N., 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136, 153–180.
- Ebihara, L., 1996. *Xenopus* connexin 38 forms hemi-gap-junctions channels in the nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 71, 742–748.
- Edean, R., Monks, S.A., Cameron, A.M., 1993. Toxins from the box-jellyfish *Chironex fleckeri*. *Toxicon* 31, 397–410.
- Fitt, W.F., Trench, R.K., 1983. Endocytosis of the symbiotic dinoflagelates *Micrrodriaticum freudenthal* by endoderm cells of the scyphistomae of *Cassiopea xamachana* and resistance of the algae to host digestion. *J. Cell Sci.* 64, 195–212.
- Karlsson, E., Adem, A., Aneiros, A., Castaneda, O., Harve, A., Jolkkon, M., Sotolongo, V., 1991. New toxins from marine organism. *Toxicon* 29, 1168.
- Kihara, H., Anraku, M., Ohno, M., Hashimura, S., 1988. Tetrodotoxin-unaaffected depolarization of frog muscles induced by venom of jellyfish (*Genus Aurelia*). *Jpn. J. Physiol.* 38, 839–849.
- Kusano, K., Miledi, R., Stinnakre, J., 1982. Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J. Physiol., Lond.* 328, 143–170.
- Lotan, F.L., Zlotkin, E., 1996. Toxin compartmentation and delivery in the cnidaria: the nematocyst's tubule as a multiheaded poisonous arrow. *J. Exp. Zoo.* 275, 444–451.
- Lowry, O.H., RoseBrogh, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Malpezzi, E.L., De Freitas, J.C., Muramoto, K., Kamiya, H., 1993. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* 31, 853–864.
- Miledi, R., Parker, I., Sumikawa, K., 1989. Transplanting receptors from brains into oocytes. Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures. Raven Press, New York, pp. 57–90.
- Miledi, R., 1982. A calcium-dependent transient outward current evoked in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. B* 215, 491–497.
- Othman, Y., Burnett, J.W., 1990. Techniques applicable for purifying *Chironex fleckeri* (box-jellyfish) venom. *Toxicon* 28, 821–835.
- Pong-Prayoon, U., Bohloin, L., Wasuwat, S., 1991. Neutralization of toxic effects of different crude jellyfish venoms by an extract of *Ipomea pes-caprae* (L.). *R. Br. J. Ethnopharmac.* 35, 65–69.
- Radwan, F.F.Y., Burnett, J.W., Bloom, D.A., Coliano, T., Eldefrawi, M.E., Erdely, H., Aurelian, L., Torres, M., Heimer, E., 2001. A comparison of the toxicological characteristics of two *Cassiopea* and *Aurelia* species. *Toxicon* 39, 245–257.
- Rifkin, J., Williamson, J., Fenner, P., 1996. Anthozoans, hydrozoans and scyphozoans. In: Williamson, J., Fenner, P., Bumett, J., Rifkin, J. (Eds.), *Venomous and Poisonous Marine Animals: a Medical and Biological Handbook*. University of New South Wales Press, Sydney, pp. 180–235.
- Rossjohn, J., Feil, S.C., McKinsty, W.J., Twenten, R., Parker, M.W., 1997. Structure of cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* 89, 685–692.
- Rottini, G., Dobrina, A., Forgiarini, O., Nardon, E., Amirante, G., Patriarca, P., 1990. Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. *Infect. Immun.* 58, 3751–3758.
- Rottini, G., Gusmani, L., Parovel, E., Avian, M., Patriarca, P., 1995. Purification and properties of the jellyfish *Caribdea marsupialis*. *Toxicon* 33, 315–326.
- Scheiner-Bobis, G., Schneider, H., 1997. Palytoxin-induced channel formation within the Na⁺/K⁺-ATPase does not require a catalytically active enzyme. *Eur. J. Biochem.* 248, 3717–3723.
- Smith, H.G., 1936. Contribution to the anatomy and physiology of *Cassiopea frondosa*. In: *Papers from Tortugas Laboratory* (Ed.), Departments of Zoology, 31, 19–52. Universities of Bristol and Aberdeen, Bristol.
- Wang, X., Horisberger, J.-D., 1997. Palytoxin effects through interaction with the Na,K-ATPase in *Xenopus* oocyte. *FEBS Letters* 409, 391–395.
- Watson, M.G., Wood, L.R., 1988. Colloquium on terminology. In: Hessinger, Lenhoff (Eds.), *The Biology of Nematocysts*. Academic Press, New York.
- Weber, W.M., Popp, C., Claus, W., Van Driessche, W., 2000. Maitotoxin induces insertion of different ion channels into the *Xenopus* oocyte plasma membrane via Ca²⁺-stimulated exocytosis. *Pflügers Arch. Eur. Physiol.* 439, 363–369.
- Yang, X.C., Sachs, F., 1989. Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science* 243, 1068–1071.
- Yang, X.C., Sachs, F., 1990. Characterization of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 431, 103–122.
- Zhang, Y., McBride Jr, D., Hamill, O., 1998. The ion selectivity of a membrane conductance inactivated by extracellular calcium in *Xenopus* oocyte. *J. Physiol.* 508 (3), 763–776.