

00366



Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
CON ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y NEUROTÓXICA
DE LA CUBOMEDUSA *Carybdea marsupialis*
(LINEÉ 1758).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)**

**PRESENTA
BIOL. ERICA TORRENS ROJAS**

**CO-DIRECTOR DE TESIS: DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
CO-DIRECTOR DE TESIS: DRA. MA. DE LOURDES SEGURA PUERTAS**

**COMITÉ TUTORAL: DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOSA
DR. EDGAR HEIMER DE LA COTERA
DR. JOSÉ LUIS CARBALLO CENIZO**

PUERTO MORELOS, Q. ROO, 2004



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.

— Cualquiera que haya trabajado con seriedad en un trabajo científico sabe que a la entrada del templo de la ciencia está escrito sobre la puerta: *Necesitas tener fe*. Los científicos no podemos prescindir de ella. Aquel que maneja una serie de resultados obtenidos de un proceso experimental, debe representar imaginariamente la ley que está buscando. Después debe encarnarla en una hipótesis mental.

...La ciencia es incapaz de resolver por sí sola el misterio último de la naturaleza. Y ello se debe a que nosotros mismos formamos parte de esa naturaleza y por lo tanto del misterio que estamos tratando de resolver; también la música y el arte son, en cierta medida, intentos de comprender o al menos de expresar este misterio.

Bacon meditó unos segundos antes de replicar. Su mente se regodeaba con las posibles consecuencias de las explicaciones de Planck.

— La naturaleza siempre va a seguir asombrándonos — dijo—. La ciencia nos ayuda a comprenderla, pero a veces no es suficiente. Siempre hay algo que se nos escapa...

— Sí — afirmó Planck, implacable —. Una y otra vez nos enfrentamos a lo irracional. De otra manera no podríamos tener fe. Y si no tuviéramos fe la vida se convertiría en una carga insoportable. No tendríamos música, ni arte, ni capacidad de asombro. Y tampoco tendríamos ciencia: no solo porque perdería así su principal atractivo para quienes la cultivamos (es decir, la búsqueda de lo incognoscible), sino también porque habría perdido su pierda angular: la percepción de la vida como una realidad externa por medio de la conciencia.

Es un hecho que los misterios están ahí para que nosotros los resolvamos. Para darle sentido a nuestra existencia.

Jorge Volpi
En busca de Klingsor

Quiero dedicar esta tesis con mucho cariño a mis padres y a James, por apoyarme en todo, por compartir mis sueños y porque los amo con todo mi corazón.



También dedico este trabajo a todos, los que como yo, son amantes del mar y encuentran en sus aguas la inspiración y la tranquilidad necesarias para vivir...

AGRADECIMIENTOS

De manera especial, quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por toda la experiencia que me ha brindado en el ámbito científico y personal. Me siento muy orgullosa de pertenecer a esta institución que considero mi hogar y espero poder contribuir con estas páginas a la grandeza que ella representa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, ya que hizo posible mi estancia en el hermoso Caribe y la realización de esta tesis.

A la Unidad Académica Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y especialmente a las Doctoras Judith Sánchez y Lourdes Segura por todo su apoyo y paciencia en la realización de este trabajo.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, especialmente al Dr Martín Merino por los consejos y las palabras de ánimo que me ayudaron a terminar la Maestría y a Norma, Diana y Gaby por todo su apoyo.

También deseo expresar mi gratitud al Dr Roberto Arreguín, del Instituto de Química por todo lo que hizo por mí, sin lo cual es probable que este trabajo se hubiera quedado en una simple idea.

A la técnica María Eugenia Ramos por su amistad y por la valiosa ayuda en la recolección y procesamiento de las muestras, así como en diversos pasos de la purificación.

A Amauri por esos viajes en busca de peces, a Judith Vázquez por la ayuda con los documentos y por las sonrisas de siempre, a Loló, Mary Carmen y Marcy por ser las mejores! Y a todo el personal académico y administrativo de la estación por sus enseñanzas y su cariño.

A Rafa por siempre estar pendiente de mí, por las divertidas pláticas y porque se animó sin dudar a donar sangre para esta investigación.

De manera particular quiero agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Sistemas Arrecifales, con especial cariño al Dr Eric Jordán quien me enseñó más cosas de las que imagina, a la M en C Rosa Rodríguez, al Dr Paul Blanchon por los hermosos viajes a Xcaret y también a Miguel Angel y a Memo por su amistad.

Por supuesto al Amor de mi vida, James por todo su cariño y por el tiempo dedicado a algunos de los dibujos de esta tesis y a mi enseñanza de Corel Draw. También porque sin él no hubiera podido ver lo maravilloso de vivir en el Caribe y por todas las cosas que hemos pasado juntos...

A mis amigas Mayra y Sofía, por todas esas risas y complicidades que hicieron de la Maestría una experiencia maravillosa.

A mis amigas del Laboratorio Vania, Karina y Gaby por las divertidas pláticas, por la experiencia compartida y porque sin ellas, la estancia en Puerto Morelos hubiera sido más difícil.

A mis amigos, que siempre han estado conmigo compartiendo lo mejor de la vida... María José, Icelini, Silvina, María y Alejandro. Y también a mi familia por todo su

cariño... Mariana, Clara, Daniela, Roberto, Carmela, Emilia, Paula, Daniel, Pablo, María y Gaby.

A yinyololilo ✖ por existir...

A Carmen Giral por sus enseñanzas y su gran cariño.

Finalmente y con todo el corazón agradezco a mis papás por todo lo que soy.

Y por supuesto al mar por estar siempre ahí...!!!

Resumen

Carybdea marsupialis es una medusa que pertenece a la clase Cubozoa. Se encuentra ampliamente distribuida en los océanos Pacífico y Atlántico, así como en el mar Caribe y en el Mediterráneo. El veneno de esta especie es una compleja mezcla de sustancias biológicamente activas, denominado extracto crudo. Con dicho extracto se realizaron bioensayos para caracterizar parcialmente la actividad biológica del veneno de *C. marsupialis*. Para probar la actividad de las citolisinas se emplearon sardinas de la especie *Harengula humeralis*, obteniendo una Dosis Letal Media DL_{50} de $26\mu\text{g/g}$ de peso corporal. Para detectar las neurotoxinas, se emplearon cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, determinándose una DL_{50} de $1.05\mu\text{g/g}$ de peso corporal y para probar la actividad de las hemolisinas, se emplearon eritrocitos humanos de diferente tipo sanguíneo, siendo necesarios $119.4\mu\text{g}$ de proteína para hemolizar completamente los eritrocitos de cada tipo.

Asimismo, a partir del extracto crudo se aislaron parcialmente algunas proteínas con actividad hemolítica y neurotóxica por medio de cromatografía líquida de baja presión en un aparato de Pharmacia Biotech® y de HPLC fase reversa en un modelo Varian® 410. En el primer paso cromatográfico se empleó una columna de filtración en gel Sephadex G-50, del cual se obtuvieron 13 fracciones con actividad hemolítica y neurotóxica. De estas fracciones, se eligió la número 3 para continuar la separación de proteínas, debido a que resultó ser la más potente sobre cangrejos y eritrocitos humanos. Los siguientes pasos de la purificación consistieron en cromatografía de intercambio iónico, para la cual se emplearon los geles QAE Sephadex A-25 y Fractogel EMD SO_3^- 650M y filtración en gel con una columna empacada con Sephadex G-25. Las fracciones que al final presentaron actividad biológica fueron separadas por medio de HPLC fase reversa con una columna Microsorb (Varian®) C4 de 300\AA , de $4.6 \times 250\text{mm}$.

Se obtuvieron en total 19 hemolisinas cuya actividad fue probada en eritrocitos humanos y una neurotoxina, que mostró una potente actividad sobre cangrejos.

Por medio de electroforesis en gel de acrilamida 7.5%, se obtuvieron los pesos moleculares de cinco hemolisinas y de la neurotoxina, los cuales se encontraron entre 14 y 220kDa.

Índice

Página

ORIGEN DEL NOMBRE DE LA FAMILIA CARYBDEIAE.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Neurotoxinas y hemolisinas.....	6
<i>Neurotoxinas</i>	6
<i>Canales de Na⁺</i>	8
<i>Hemolisinas</i>	10
El Phylum Cnidaria como fuente de sustancias activas.....	12
La cubomedusa <i>Carybdea marsupialis</i> (Lineé 1758).....	16
<i>Diagnosis</i>	16
<i>Antecedentes en el estudio del género Carybdea</i>	16
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS.....	19
ÁREA DE ESTUDIO.....	19
METODOLOGÍA.....	22
Obtención de las toxinas.....	22
Descarga de los nematocistos.....	22
Concentración del extracto crudo.....	23
Electroforesis (SDS-PAGE).....	23
Determinación de proteínas.....	24
Bioensayos.....	24
<i>Prueba de actividad citolítica con extracto crudo</i>	
<i>Bioensayo con peces (Harengula humeralis)</i>	25
<i>Prueba de actividad neurotóxica con extracto crudo</i>	
<i>Bioensayo con cangrejos (Ocypode quadrata)</i>	26
<i>Prueba de actividad hemolítica con extracto crudo</i>	
<i>Bioensayo con eritrocitos humanos de diferentes tipos sanguíneos</i>	26
<i>Calibración de eritrocitos</i>	27
Purificación de proteínas.....	28
<i>Cromatografía líquida de baja presión</i>	28

<i>Cromatografía líquida de alta presión HPLC</i>	29
Diseño experimental.....	30
RESULTADOS	32
Recolección de <i>Carybdea marsupialis</i>	32
Obtención de extracto crudo.....	32
Electroforesis.....	32
Determinación de proteínas.....	34
Prueba de actividad citolítica con extracto crudo	
Bioensayo con peces (<i>Harengula humeralis</i>).....	35
Prueba de actividad neurotóxica con extracto crudo	
Bioensayo con cangrejos (<i>Ocypode quadrata</i>).....	36
Prueba de actividad hemolítica con extracto crudo	
Bioensayo con eritrocitos humanos de diferentes tipos sanguíneos.....	37
Calibración de eritrocitos.....	37
Purificación del extracto crudo de <i>Carybdea marsupialis</i>	39
Neurotoxinas.....	40
Hemolisinas.....	43
DISCUSIÓN	54
<i>Generalidades</i>	54
<i>Recolección de Carybdea marsupialis</i>	55
<i>Extracción del veneno</i>	55
<i>Actividad del veneno en sistemas vivos</i>	56
<i>Purificación de las proteínas del extracto crudo de Carybdea marsupialis</i>	63
<i>Caracterización de las proteínas</i>	66
CONCLUSIONES	69
ANEXO	72
REFERENCIAS	85

INDICE DE FIGURAS

	Página
Fig.1 Diagrama esquemático de cinco sitios de unión de diferentes neurotoxinas a la subunidad α del canal de Na^+	9
Fig. 2 Lisis por interrupción completa de la integridad celular.....	11
Fig. 3 Formación de poros selectivos.....	12
Fig. 4 Diferentes tipos de nematocistos.....	13
Fig. 5 Esquema de la estructura y de la descarga de un nematocisto.....	14
Fig. 6 Micrografías electrónicas de nematocistos descargados.....	15
Fig. 7 <i>Carybdea marsupialis</i>	16
Fig. 8 Ubicación de la laguna arrecifal de Puerto Morelos.....	20
Fig. 9 Electroforesis.....	33
Fig. 10 Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50 del extracto crudo de <i>Carybdea marsupialis</i>	39
Fig. 11 Cromatografía de intercambio aniónico de la fracción 3 en QAE Sephadex A-25	40
Fig. 12 Cromatografía de intercambio catiónico de la fracción 1 de QAE en Fractogel EMD SO_3^- 650M	41
Fig. 13 Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-25.....	41
Fig. 14 Purificación cromatográfica de la neurotoxina por HPLC.....	42
Fig. 15 Purificación cromatográfica de la hemolisina <i>CmHI 1</i> por HPLC.....	44

Índice de figuras

Fig. 16	Purificación cromatográfica de la hemolisina <i>CmHI 5</i>	45
Fig. 17	Purificación cromatográfica de la hemolisina <i>CmHI 7</i>	46
Fig. 18	Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50 de la fracción 2 de QAE	47
Fig. 19	Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650M (Merck), de la fracción 1 de G-50.....	48
Fig. 20	Purificación cromatográfica de la hemolisina <i>CmHI 11</i>	49
Fig. 21	Cromatografía por intercambio catiónico de la fracción 2 de G-50 en Fractogel EMD SO_3^- 650M	49
Fig. 22	Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50, de la fracción 3 de QAE.....	50
Fig. 23	Cromatografía por intercambio catiónico de la fracción 1(G-50)en Fractogel EMD SO_3^- 650M	51
Fig. 24	Cromatografía por intercambio catiónico de la fracción 2(G-50) en Fractogel EMD SO_3^- 650M.....	52
Fig. 25	Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción1 de QAE Sephadex A-25, fracción 1 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.....	78
Fig. 26	Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción1 de QAE Sephadex A-25, fracción 2 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.....	78
Fig. 27	Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción1 de QAE Sephadex A-25, fracción 3 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.....	79
Fig. 28	Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción1 de QAE Sephadex A-25, fracción 4 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.....	79
Fig. 29	Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción1 de	

Indice de figuras

	QAE Sephadex A-25, fracción 5 de Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 M.....	80
Fig. 30	Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción1 de QAE Sephadex A-25, fracción 6 de Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 M.....	80
Fig. 31	Purificación parcial en Sephadex G-25 de fracción 3 de G-50, fracción2 de QAE Sephadex A-25, fracción 1 de Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 M.....	81
Fig. 32	Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción2 de QAE Sephadex A-25, fracción 2 G-50, fracción 1 de Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 M.....	81
Fig. 33	Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción 2 de QAE Sephadex A-25, fracción 2 de G-50, fracción 1-2 de Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 M.....	82
Fig. 34	Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción 2 de QAE Sephadex A-25, fracción 2 de G-50, fracción 1-3 de Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 M.....	82
Fig. 35	Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción 4 de QAE Sephadex A-25, fracción 2 de G-50, fracción 1 de Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 M.....	83
Fig. 36	Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción 4 de QAE Sephadex A-25, fracción 2 de G-50, fracción 2 de Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 M.....	83

INDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

Tabla 1	Neurotoxinas naturales con acción sobre canales iónicos.....	8
Tabla 2	Determinación de proteínas.....	35
Tabla 3	Calibración de eritrocitos.....	37
Tabla 4	Resultados del ensayo hemolítico.....	38
Gráfica	Determinación de proteínas.....	34

ORIGEN DEL NOMBRE DE LA FAMILIA CARYBDEIAE

Muchos de los nombres científicos que se le han dado a los organismos marinos están basados en criaturas mitológicas, principalmente de las culturas griega y romana.



Es conocido que entre el sur de Italia y Sicilia, se encuentra el estrecho de Mesina donde el agua forma enormes y peligrosos remolinos. Según la mitología griega, en este estrecho rocoso moraba Escila, monstruo perverso con doce pies, seis cuellos larguísimos cada cual con una cabeza en cuya boca había tres filas de apretados dientes. Se creía que se encontraba sumido hasta la mitad del cuerpo en una honda gruta y cuando por ahí pasaba una embarcación, Escila le arrebatava con sus cabezas a todos sus hombres. A la sombra de este estrecho habitaba otro espeluznante monstruo llamado Caribdis. Vivía bajo unas rocas y tres veces al día tragaba enormes cantidades de agua llevándose con ella barcos, marinos, peces... Otras tantas veces la devolvía formando un horrible y veloz remolino en el que cualquiera perecía, pues no era posible advertir su presencia dado que se ocultaba tras una espesa niebla. Sólo el legendario héroe Odiseo consiguió sortear sus horribles fauces, en dos ocasiones.

Caribdis, no obstante, no siempre fue un monstruo. En sus orígenes fue una mujer, hija de Poseidon y de Gea a quien Zeus castigó convirtiéndola en esa horrible y malvada figura, porque trató de robar a Heracles una parte de los rebaños de Gerión.

Históricamente, Caribdis existe, aunque no como monstruo sino como un peligroso accidente geográfico de la costa del que se inventó esta leyenda.

De estos personajes provienen los nombres del nudibranquio del sargaso *Scyllacea pelagica* y de la familia de cubomedusas **Carybdeiae** que incluye a *Carybdea marsupialis*, objeto de estudio de este trabajo.

INTRODUCCIÓN



Introducción

Nuestro planeta ofrece una increíble diversidad de vida, con un extraordinario número de especies animales y vegetales que han evolucionado para adaptarse a los distintos ecosistemas. Esta adaptación ha tenido como una de sus múltiples consecuencias, la presencia de una gran diversidad de venenos y ponzoñas¹, que contienen toxinas altamente activas. Estas toxinas tienen una gran cantidad de compuestos químicos que van desde moléculas pequeñas hasta grandes complejos proteicos, los cuales varían en estructura y función entre los diferentes individuos, especies, géneros o familias de animales (Mebs, 2001).

De toda la diversidad biológica presente en nuestro planeta, la mayor cantidad de organismos se encuentra en el mar, que cubre el 70 % de su superficie. Algunos de estos organismos marinos han desarrollado complejos mecanismos biológicos de supervivencia, como la producción de potentes agentes químicos naturales. Actualmente, se sabe poco acerca del significado biológico de éstos, por qué surgieron, cuales son las sustancias precursoras involucradas y cual es el proceso exacto por el cual se forman (Halstead, 1988). Sin embargo, todos parecen servir tanto para la defensa del organismo que las posee como para la obtención de su alimento.

Para el ser humano representan una fuente de nuevos medicamentos de gran interés (Pharmamar.com), así como un gran espectro de estructuras moleculares nuevas o poco conocidas que pueden ser sintetizadas químicamente para manipularlas y convertirlas en productos útiles (Halstead, 1988).

El estudio de estos productos naturales que presentan actividad biológica, derivados de plantas y animales, ha sido por mucho tiempo de gran valor

¹ Russel (2002) define como veneno a "una sustancia tóxica producida por una planta o animal en un grupo de células altamente desarrolladas o en un órgano secretor, la cual puede ser liberada durante una mordedura o picadura" y ponzoña como "una sustancia tóxica presente dentro del cuerpo de la planta o animal, que no tiene un mecanismo de liberación, sino que se adquiere por ingestión".

biomédico y los productos crudos aislados de tales organismos han servido como una fuente de drogas, así como de materiales de los cuales pueden sintetizarse éstas (Baslow, 1977). Durante las últimas dos décadas, ha habido un incremento importante en la investigación de dichos compuestos naturales, y aunque tradicionalmente la búsqueda de sustancias bioactivas había sido canalizada en el campo botánico, la obtención de sustancias orgánicas con actividad biológica aisladas de organismos marinos, ha indicado el gran potencial de los mismos en el campo de la farmacología.

Entre los animales que producen toxinas, existen dos mecanismos para la síntesis de éstas: la expresión génica que da lugar directamente a un péptido o a una proteína; o a través de rutas metabólicas complejas que incluyen numerosas reacciones catalizadas por enzimas específicas. En este último, se producen metabolitos secundarios (Mebs, 2001).

Los metabolitos secundarios producidos por un organismo, son moléculas que no intervienen directamente en las reacciones esenciales de su metabolismo, pero que determinan las relaciones de los seres vivos con su medio aumentando su competitividad. Estos metabolitos presentan actividades farmacológicas, debido a que muchas de estas sustancias han sido seleccionadas en el curso de la evolución como mensajeros químicos, por lo que deben tener una acción selectiva sobre los receptores bioquímicos de los seres vivos. Dado que un medicamento debe tener esta misma propiedad, los metabolitos secundarios en general, y las toxinas en especial, constituyen una fuente importante de nuevos fármacos (Sobrino, 1996). Sin embargo, en ocasiones los metabolitos secundarios de origen marino, por su complejidad química son difíciles de caracterizar y sintetizar en las cantidades requeridas para su evaluación y desarrollo como fármacos. De forma que con el descubrimiento de compuestos peptídicos y proteicos derivados de invertebrados marinos venenosos, de caracterización y preparación menos complicada, pero con actividad fisiológica importante, se ha estimulado un nuevo enfoque en la búsqueda de "fármacos del mar". Estos compuestos peptídicos tienen diferentes actividades biológicas que incluyen propiedades

antitumorales, inmunosupresivas, y con gran actividad en los canales iónicos (Heimer de la Cotera *et al.*, 2002).

En cuanto a la importancia científica de las biotoxinas marinas -dejando de lado la importancia farmacéutica-, es conveniente señalar que aunque la creencia popularmente más difundida es que el principal esfuerzo científico debe dirigirse hacia la obtención de antitoxinas, hay otros aspectos que deben ser tomados en cuenta (Halstead, 1988). Entre estos es posible mencionar la exploración de nuevas sustancias químicas biológicamente activas, las cuales pueden ser empleadas para dilucidar la naturaleza de ciertas actividades celulares. Un ejemplo de esto puede ser el uso que se le da a las biotoxinas en pruebas neurológicas para conocer la naturaleza de la actividad de las células nerviosas y su efecto en diversas funciones musculares.

Para brindar un poco de luz sobre la importancia de la investigación de las toxinas marinas, se ha estimado que de los cientos de organismos marinos que contienen o podrían contener biotoxinas, hasta el momento menos del 1% ha sido estudiado (Halstead, 1988). Del número total de organismos estudiados, muy pocos han sido evaluados hasta determinar las características químicas y farmacológicas de sus toxinas.

Las sustancias marinas biotóxicas que se han estudiado revelan propiedades antimicóticas, inhibidoras de crecimiento, antivirales, antibióticas, antitumorales, hemolíticas, analgésicas, cardioinhibidoras, psicofarmacológicas, etcétera y por eso es importante cualquier esfuerzo en su caracterización (Halstead, 1988).

Además, es interesante el hecho de que las sustancias biotóxicas son extremadamente potentes; si se compara una de las sustancias más tóxicas sintetizadas por el hombre (p. ej. Di-isopropilfluorofosfato o Gas de Guerra) con cualquier biotoxina, resulta que la primera tiene una potencia similar a las toxinas menos poderosas de origen natural (Halstead, 1988).

Con base en lo anterior, se considera que en algunas de las biotoxinas marinas que faltan por examinar, se encontrarán las sustancias más tóxicas y de gran interés farmacológico presentes en nuestro planeta, pues una de las más poderosas que se conocen actualmente es el veneno producido por la cubomedusa *Chironex fleckeri*, de la cual se ha afirmado que puede producir la muerte en menos de un minuto tras el contacto de un ser humano con sus tentáculos (Halstead, 1988; Williamson *et al.*, 1996).

NEUROTOXINAS Y HEMOLISINAS

Como se mencionó anteriormente, las toxinas de medusas contienen una enorme diversidad de sustancias de interés científico y farmacológico. Como este trabajo se centra en el estudio de las hemolisinas y neurotoxinas es importante conocer algunas generalidades de sus mecanismos de acción y de su uso como herramientas farmacológicas.

Neurotoxinas

Las neurotoxinas son moléculas que actúan contra una función específica del sistema nervioso y por lo tanto contra una molécula clave. Esta especificidad constituye una herramienta sumamente útil para dilucidar el papel que juegan ciertas moléculas importantes, así como los mecanismos básicos del funcionamiento del sistema nervioso. Por ejemplo, cuando una cobra ataca a su presa, primero debe inmovilizarla. Para esto posee una pequeña proteína llamada α neurotoxina que bloquea la transferencia de impulsos nerviosos a los músculos. Gracias al estudio de las α -neurotoxinas se elucidó uno de los mecanismos moleculares más importantes de transmisión de impulsos nerviosos entre células (Hucho, 1995).

Actualmente, algunas neurotoxinas ya han sido utilizadas para el diagnóstico y tratamiento de distintas patologías gracias a las nuevas técnicas en Biología Molecular y a la gran selectividad que presentan por canales iónicos y receptores del Sistema Nervioso Central (SNC) (Gilman *et al.*, 1985).

Por lo anterior, la investigación del SNC con la ayuda de venenos de animales, ha permitido avances espectaculares en nuestra comprensión de su complejo funcionamiento. Esta complejidad se basa en que el SNC de vertebrados tiene una enorme diversidad de canales iónicos y receptores de distinto tipo, algunos de los cuales se evidencian solamente bajo circunstancias particulares.

Conocer las propiedades funcionales de esta gran diversidad de receptores y canales representa un reto para las neurociencias, por ello el empleo de estas sustancias tiene tres claros objetivos: el estudio de la estructura de las distintas isoformas de canales, sus características fisicoquímicas (con especial énfasis en su cinética de activación/inactivación) y el estudio de su fisiología (Martínez-Martos *et al.*, 1998).

En la tabla 1 se presentan algunas neurotoxinas naturales con acción sobre canales iónicos, las cuales han servido para indicar el elevado número de canales iónicos y receptores del SNC identificados en los últimos años (Martínez-Martos *et al.*, 1998)

Tabla 1. Neurotoxinas naturales con acción sobre canales iónicos (Martínez-Martos *et al.*, 1998)

Canales de Na ⁺	Canales de K ⁺	Canales de Ca ²⁺	Canales de Cl ⁻
PECES:	ABEJAS:	ESCARABAJOS:	BACTERIAS:
Tetrodotoxina	Apamina	β-Leptinotarsina-h	Avermectina B _{1a}
SALAMANDRA:	SERPIENTES:	SERPIENTES:	
Taricatosina	α-Dendrotoxina	Calciseptina	
PULPO:	β ₁ -Dendrotoxina	DINOFLAGELADOS:	
Maculotoxina	β ₂ -Dendrotoxina	Maitotoxina	
DINOFLAGELADOS:	γ-Dendrotoxina		
Saxitoxina	δ-Dendrotoxina		
Brevetoxina			
Ciguatoxina			
TOXINAS α DE ESCORPIÓN	TOXINAS DE ESCORPIÓN	CARACOLES MARINOS	TOXINAS DE ESCORPIÓN
Toxina I	Escilatoxina	ω-conotoxina GVIA	Clorotoxina
Toxina M7	Leiurotoxina I	ω-conotoxina MVIIA	
Toxina 2000	Caribdotoxina	ω-conotoxina MVIIIC	
Toxina V	Iberiotoxina	ω-conotoxina SVIA	
Neurotoxina IV y V	Margatoxina	ω-conotoxina SVIB	
	Kaliotoxina		
	Noxiustoxina		
TOXINAS DE ANÉMONAS			
Toxina I, II, III			
Antopleurina A y B			
CARACOLES MARINOS		ARAÑAS	
μ-conotoxina GIIIA, GIIIB y GIIIC		ω-Agatoxina IA	
		ω-Agatoxina IIA	
		ω-Agatoxina IIIA	
		ω-Agatoxina IVA	

Canales de Na⁺

Los canales de Na⁺ han sido los más estudiados desde el punto de vista toxinológico, y gracias al entendimiento de su estructura y de sus características se pueden comprender los efectos de las neurotoxinas sobre los canales iónicos en general.

El canal de Na⁺ es una proteína constituida por cuatro subunidades (α, β, γ y δ), cada una de las cuales está formada por seis segmentos transmembranales (S1

a S6). Estructuralmente se han podido identificar más de cinco lugares de unión de toxinas en la subunidad α de estos canales, utilizando varias neurotoxinas como sondas específicas (Figura 1) (Martínez-Martos *et al.*, 1998).

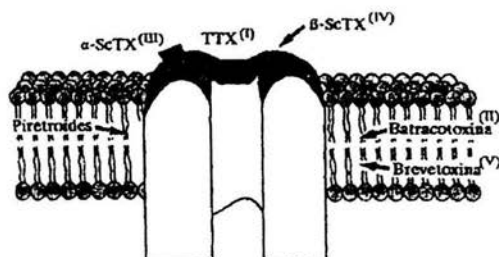


Figura 1. Diagrama esquemático de cinco sitios de unión de diferentes neurotoxinas a la subunidad α del canal de Na^+ . Los sitios de unión de la neurotoxina denominados I (definido por la unión de la tetrodotoxina y saxitoxina) y III (definido por la unión de la toxina α -escorpión) han sido determinados de forma precisa por entrecruzamiento covalente o mutagénesis dirigida. Los sitios IV (dominio extracelular, lugar de unión de la toxina β -escorpión), V (dominio hidrofóbico, lugar de unión de la brevetoxina) y II (dominio hidrofóbico, lugar de unión de la batracotoxina) y un sitio de unión del piretroide, todavía no han sido determinados de forma precisa (Martínez-Martos *et al.*, 1998).

De acuerdo con Hucho (1995), los canales de sodio dependientes de voltaje presentan 3 fases:

1. Apertura del canal después de la depolarización de la membrana.
2. Pico de permeabilidad y
3. Cierre del canal (inactivación) espontáneo.

Por lo que se ha sugerido que algunos de los lugares de unión de las toxinas son los responsables de las propiedades de activación, inactivación y permeabilidad del canal de Na^+ . Por ello, las toxinas se clasifican en activadoras, bloqueadoras y estabilizadoras, puesto que afectan alguna de las fases antes mencionadas (Strichartz *et al.*, 1990).

Las toxinas que promueven la apertura del canal (activadoras) son alcaloides lipofílicos, extraídos principalmente de plantas terrestres y anfibios como las Batracotoxinas, Grayanotoxinas, Aconitina y Veratridina, entre otras. Su acción consiste en la apertura espontánea del canal de Na^+ sin la necesidad de ningún estímulo, es decir, a potenciales de membrana que normalmente los mantienen cerrados. A la larga, el efecto de las sustancias activadoras es la muerte celular (Strichartz *et al.*, 1990).

Las toxinas que bloquean la apertura del canal (bloqueadoras) como la Tetrodotoxina (TTX) y la Saxitoxina (STX), actúan en la parte externa del canal impidiendo la entrada del Na^+ , lo cual produce parálisis (Hucho, 1995).

Las toxinas que afectan la inactivación (estabilizadoras) son compuestos peptídicos derivados principalmente de anémonas y de escorpiones venenosos, que prolongan o inhiben la fase de inactivación del Na^+ , la cual es necesaria para la repolarización de la neurona. Esto origina una gran relación de neurotransmisores que producen hiperexcitabilidad, convulsiones y parálisis en las presas (Hucho, 1995).

Cada una de estas toxinas actúan en sitios separados de los canales de Na^+ y su efecto combinado produce una rápida parálisis, acompañada de convulsiones y posiblemente la muerte (Halstead, 1988; Conn, 1993; Kem *et al.*, 1990; Shick, 1991; Norton, 1991; Fenner *et al.*, 1996).

Hemolisinas

Las hemolisinas son un grupo heterogéneo de proteínas que presentan la acción común de destruir células al eliminar la barrera permeable de su membrana. Se ha demostrado que las hemolisinas poseen actividad hemolítica potente y la lisis celular es facilitada por inserción de sus porciones hidrofóbicas dentro de la bicapa de la membrana (Bernheimer y Rudy, 1986).

Existen a la fecha dos modelos diferentes para explicar el mecanismo por el cual los eritrocitos y otro tipo de células son lisadas por este tipo de toxinas:

- a) **La interrupción completa de la integridad celular** (Figura 2). La citotoxicidad se presenta por un ataque sobre la membrana celular, en el que ocurre la destrucción de la función de la barrera mediante la interacción con colesterol en ciertas regiones de la membrana, causando una transición de fase lipídica. Cuando esto ocurre, la membrana se fragmenta y se rompe. Este modelo propone la formación de estructuras en forma de anillo que son productos poliméricos incidentales (Berheimer y Rudy, 1986).



Figura 2. Lisis por interrupción completa de la integridad celular. Los monómeros de la toxina se asocian al colesterol de la membrana embebiéndose en esta estructura, dando lugar al proceso conocido como oligomerización, que finaliza con la formación de un anillo (Rappouli y Montecucco, 1997)

- b) **La formación de poros selectivos producidos por toxinas ionofóricas.** (Figura 3) Muchas de las citolisinas son capaces de formar poros o canales en la membrana plasmática de células y su acción citolítica puede ser un resultado de su acción selectiva; esto es, las estructuras en forma de anillo generan poros grandes a través de los cuales el agua y las sales pueden pasar, produciéndose el clásico tipo de citólisis osmótica.



Figura 3. Formación de poros selectivos. 1) Monómero de la toxina con sus extremos C- y N- terminales. 2) Unión de la proteína a la membrana por afinidad. 3) Formación de un hexámero. 4) El hexámero penetra a la membrana en su parte lipídica creando un poro. 5) El poro formado permite la entrada de iones y otras moléculas pequeñas (Rappouli y Montecucco, 1997)

La función de algunas citolisinas puede ser secundariamente lítica; su efecto principal comienza en la producción de dolor, inflamación y parálisis neuromuscular (Shick, 1991).

EL PHYLUM CNIDARIA COMO FUENTE DE SUSTANCIAS ACTIVAS

Entre los invertebrados marinos productores de polipéptidos y proteínas con actividad farmacológica destacan los Cnidarios, que incluyen medusas, anémonas, hidras y corales, cuyos miembros se caracterizan por poseer nematocistos donde alojan sus toxinas (Figura 4).

Los nematocistos son organelos especializados localizados a lo largo de la epidermis y alojados entre las células epitelio-musculares o invaginados dentro de ellas, principalmente en los tentáculos (Milla *et al.*, 2000), los cuales están compuestos de queratina o una sustancia similar (Brown, 1950; Picken, 1953). Su principal función es la defensa y captura de las presas, de ahí su potente efecto citolítico, neurotóxico y hemolítico, entre otros.

Debido a la presencia de nematocistos, los cnidarios son responsables del mayor número de envenenamientos en el medio marino. Este grupo cuenta con 9,000 especies, de las cuales aproximadamente 70 son tóxicas para los humanos (Baslow, 1977; Hashimoto, 1979) aunque en teoría cualquier organismo equipado con nematocistos puede resultar urticante.



Figura 4. Diferentes tipos de nematocistos.
Tomado de www.ucmp.berkeley.edu/cnidaria

De acuerdo con Williamson *et al.* (1996) existen 24 tipos diferentes de nematocistos. El tipo y cantidad, así como la composición del veneno varía considerablemente en cada especie, por ello algunas resultan más peligrosas.

La estructura de los nematocistos es bastante compleja considerando que su tamaño oscila entre 5μ y 1.2mm de longitud (Figura 5). Cada nematocisto tiene una cápsula donde se aloja el veneno, dentro hay un túbulo hueco enrollado que hace las veces de arpón, el cual se mantiene enrollado gracias al opérculo que evita su eversión. Además, en un punto de la superficie externa del nematocisto surge una estructura llamada cnidocilo. Esta estructura dispara el mecanismo de descarga del nematocisto, actuando como una especie de gatillo al percibir estímulos químicos o mecánicos. La localización, estructura y ocurrencia de los cnidocilos varía en cada grupo de cnidarios y se encuentra aparentemente ausente en la clase anthozoa. Asimismo, el nematocisto tiene otros elementos efectores independientes que provocan su descarga, como son los quimiorreceptores (Halstead, 1988).

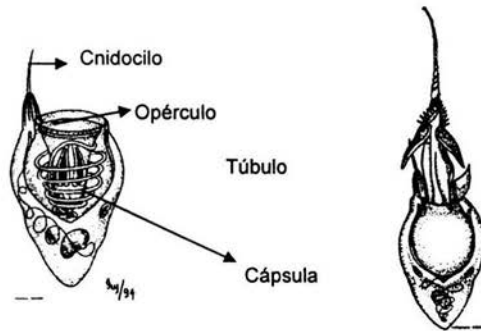


Figura 5. Esquema de la estructura y de la descarga de un nematocisto.
Tomado de Brusca y Brusca, 1990.

Los nematocistos se originan a partir de células especializadas llamadas cnidoblastos mediante un proceso conocido como cnidogénesis. Los cnidoblastos se forman a partir de células intersticiales, cuya principal característica es que son totipotenciales, es decir que pueden dar lugar a células especializadas somáticas o germinales. Una vez que se activa el proceso de diferenciación, por causas aún no documentadas, estas células se dividen simultáneamente de forma exponencial, permaneciendo unidas por puentes de microtúbulos que aparentemente tienen la función de asegurar el proceso de diferenciación.

Cuando se ha formado el cnidoblasto maduro, estas células se separan y comienza a aparecer el Retículo Endoplásmico Rugoso dentro del citoplasma de cada una de ellas y posteriormente el Aparato de Golgi. Cuando este último ha alcanzado su tamaño final, una de sus vesículas forma la cápsula del nematocisto que se mantiene rodeado por su membrana. La cápsula del nematocisto desarrolla dos texturas, una externa lisa y una interna rugosa (Westfall, 1966). El siguiente paso involucra la formación del túbulo que crece hacia fuera del extremo apical de la cápsula y en algunos tipos de nematocistos, se vuelve tan largo que puede enrollarse hasta dos veces en el citoplasma. En este punto, el aparato de Golgi recubre la punta del túbulo e inserta material de su matriz intracelular. Dentro de este material hay una gran

diversidad de proteínas que producen las estructuras accesorias de los nematocistos tales como espinas, barbas y estiletes (Skaer y Picken, 1966). Posteriormente, el ápice de la cápsula es cubierto por el opérculo y se forma el cnidocilo como resultado de la última secreción del aparato de Golgi en la formación del nematocisto, el cual en este punto se encuentra listo para ser descargado.

Cuando los nematocistos son disparados, el túbulo se inserta en el tejido de la víctima y transporta el veneno que se encuentra dentro de la cápsula (Figura 6). En general, los venenos de las cubomedusas están formados por una gran diversidad de péptidos neurotóxicos con actividad sobre canales iónicos o receptores del sistema nervioso y neuromuscular, péptidos citolíticos que actúan sobre las membranas celulares produciendo poros o canales (Rottini *et al.*, 1995) y péptidos hemolíticos que ocasionan la ruptura de vasos sanguíneos (Endean y Henderson, 1969, 1974), entre otros. Otras moléculas bioactivas que forman parte del veneno, son los compuestos vasoactivos como las catecolaminas, histamina, liberadores de histaminas, etcétera (Hessinger y Lenhoff, 1987).

Los efectos del veneno pueden ir desde una ligera dermatitis hasta la muerte instantánea; la severidad de las afecciones varía de acuerdo con la especie de cnidario y con el tipo de nematocistos que posee (Hastead, 1988).

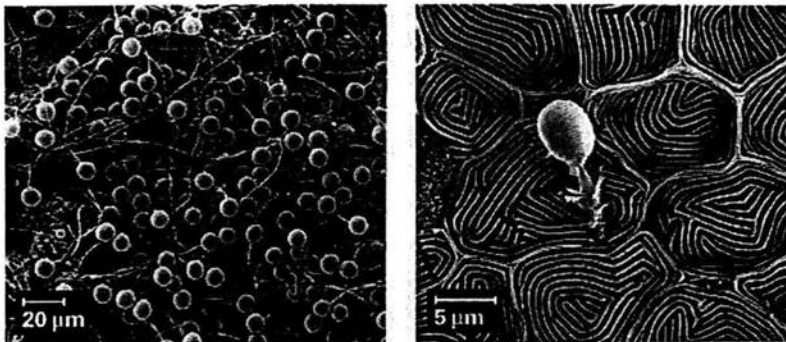


Figura 6. a) Micrografía electrónica de un grupo de nematocistos con el túbulo evertido.
b) Túbulo insertado en la epidermis de una víctima humana. Tomado de Mebs (2002).

LA CUBOMEDUSA *Carybdea marsupialis* (LINEÉ 1758)

Diagnosis

Carybdea marsupialis (Figura 7) es una medusa transparente, excepto por los cuatro órganos sensoriales (que contienen los ocelos) localizados en la campana. Esta presenta forma de cubo y su tamaño oscila entre 2 y 4 centímetros de alto y 3 de ancho. Posee cuatro tentáculos, ubicados en cada esquina de la campana, los cuales llegan a medir hasta 30 centímetros de largo. Los tentáculos poseen nematocistos agrupados en anillos. *Carybdea marsupialis* es una medusa muy abundante en aguas someras, principalmente donde hay arena y al igual que el resto de las cubomedusas es altamente inconspicua siendo prácticamente invisible en el agua.

Se encuentra distribuida en el Pacífico, en el Atlántico, en el Caribe y en el Mar Mediterráneo (Kramp, 1961).



Figura 7. *Carybdea marsupialis*

Antecedentes en el estudio del género Carybdea

En los estudios previos referentes al género *Carybdea* se encuentran los trabajos de Zajk *et al.* (1986) quienes estudiaron los efectos contráctiles de la toxina extraída de *C. rastonii* en aortas aisladas de conejos y de Nagase *et al.* (1986), quienes estudiaron los efectos contráctiles y relajantes de la toxina de la misma especie en tejidos vasculares e intestinales. Azila y Othman (1991) encontraron que los tentáculos de las medusas del género *Carybdea* contienen factores activos, hemolíticos y hemorrágicos. Rottini *et al.* (1995), purificaron y estudiaron las propiedades de una toxina citolítica presente en *Carybdea marsupialis*, mientras que Othman *et al.* (1996) mostraron que los componentes

hemolíticos y miotóxicos del veneno de las medusas pueden ser parcialmente purificados sin retención de actividad biológica. Asimismo, Chung *et al.* (2001) purificaron y caracterizaron la hemolisina CAH1 de *C. alata*.

El trabajo más reciente sobre esta clase de medusas fue realizado por Nagai (2003) donde se documentan las propiedades químicas de algunas toxinas de tres especies de cubomedusas: *Carybdea rastoni*, *Carybdea alata* y *Chrisopsalmus quadrigatus*. Las toxinas de estas especies mostraron toxicidad letal en crustáceos y actividad hemolítica en eritrocitos de oveja. Las siete toxinas aisladas presentaron pesos moleculares cercanos a los 45kDa y la secuencia de sus proteínas muestra que existe un 45% de homología entre las especies protéicas de *Carybdea rastoni* y *Carybdea alata* y un 21% entre *Chrisopsalmus quadrigatus* y las dos anteriores.

En general se han aislado en especies de cubomedusas, sustancias de acción citotóxica y lactonas con acción antifúngica, citotóxica y antineoplásica (Sobrino, 1996). Para determinar y caracterizar su actividad se han realizado bioensayos con peces y animales de sangre caliente u órganos aislados (Hashimoto, 1979).

HIPOTESIS, OBJETIVOS Y AREA DE ESTUDIO



Hipótesis

Las toxinas de los cnidarios contienen metabolitos bioactivos, por lo que se espera obtener de *Carybdea marsupialis* compuestos con actividad hemolítica y neurotóxica.

Objetivo general

Purificar parcialmente y caracterizar los compuestos con actividad neurotóxica y hemolítica presentes en *Carybdea marsupialis*.

Objetivos particulares

- Estudiar la actividad tóxica de *Carybdea marsupialis* mediante bioensayos en diferentes sistemas biológicos (peces, cangrejos y eritrocitos humanos).
- Determinar la Dosis Letal Media con el extracto crudo en peces (*Harengula humeralis*) y en cangrejos (*Ocypode quadrata*).
- Evaluar la actividad hemolítica con el extracto crudo en diferentes tipos sanguíneos.
- Purificar parcialmente las sustancias con actividad hemolítica y neurotóxica.

Area de estudio

La zona marina de Puerto Morelos, se encuentra ubicada en la porción nororiental de la península de Yucatán, posee un sistema arrecifal de barrera con orientación Norte-Sur. El arrecife está compuesto por corales escleractinios, gorgonáceos, algas y otros organismos asociados; la zona marina está dividida en laguna arrecifal, arrecife posterior, cresta arrecifal y arrecife frontal (Jordán *et al.*, 1981; Merino y Otero, 1991).

La recolección de los ejemplares de *Carybdea marsupialis* se realizó en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, a 100 metros de la Unidad Académica

Puerto Morelos, UNAM a los $20^{\circ}52.39' N$ y $86^{\circ}51.91' W$ (Figura 8). Es una zona de aguas someras y transparentes.

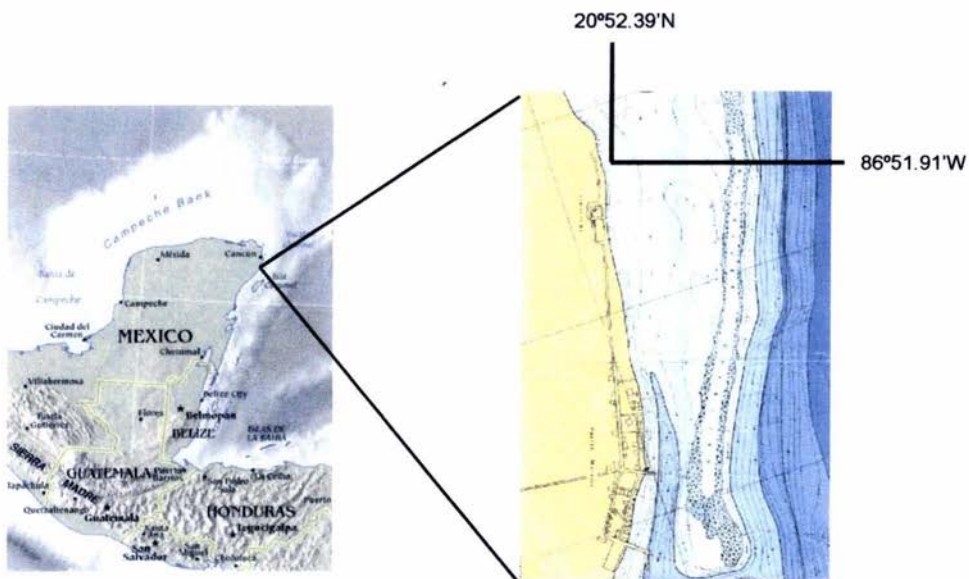


Figura 8. Ubicación de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo.

METODOLOGÍA



Metodología

Obtención de las toxinas

Para la obtención de las toxinas, se recolectaron ejemplares de la medusa *Carybdea marsupialis* en la laguna arrecifal de Puerto Morelos entre los meses de marzo y agosto de 2002. La recolección se llevó a cabo por medio de buceo libre en una zona somera y arenosa cerca de la playa. Las medusas fueron capturadas con la mano y depositadas en cubetas de plástico con capacidad de 20L con aireación, para su traslado al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se cortaron los tentáculos de cada medusa con tijeras y se depositaron en viales de vidrio.

Descarga de los nematocistos

1. Con el objeto de descargar la mayoría de los nematocistos presentes en los tentáculos de esta cubomedusa se empleó un homogeneizador de vidrio. Se eligió este método porque los estímulos mecánicos provocan la eversión del túbulo con la consiguiente liberación de las toxinas.
2. Los tentáculos se colocaron en el homogeneizador con agua desionizada y con el macerador se obtuvo un extracto crudo con la menor cantidad de tejido completo posible. Este proceso se repitió hasta obtener el extracto de todos los tentáculos.
3. El extracto se dejó en agitación por 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm, en una centrífuga Beckman TJ-6 colocando el sobrenadante en viales de vidrio previamente marcados. El proceso fue repetido 2 veces.
4. Se añadió un inhibidor de proteasas (Complete, Mini de Roche®).

5. Se tomó una muestra del sobrenadante para observarla al microscopio y comprobar que la mayor parte de los nematocistos habían sido descargados.

6. Los viales fueron congelados a -60°C para su posterior empleo.

Concentración del extracto crudo

El extracto crudo fue sometido a un proceso de liofilización en un aparato Freeze Drying Model 77500 (LABCONCO) a una temperatura de -45°C . Este proceso permite una deshidratación completa de la muestra.

Electroforesis (SDS-PAGE)

Para conocer el intervalo de peso molecular de las proteínas que componen las toxinas de *Carybdea marsupialis* se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 7.5% tanto con el extracto crudo como con las fracciones purificadas.

La electroforesis del extracto crudo se realizó con una concentración stock de 10mg de extracto crudo disueltos en 200 μl de agua desionizada. Las muestras se resuspendieron 1:4 en el Buffer de muestra (β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, glicerol, 10% SDS, Tris-HCL pH6.8) (ver Anexo). Se prepararon cuatro viales de esta solución, alcanzando en todas 50 μl de volumen final y se calentaron en seco a 95°C por cuatro minutos. Lo anterior con el objeto de desnaturalizar las proteínas y permitir su desplazamiento por el gel. Posteriormente, se colocaron 5 μl de cada solución desnaturalizada en los carriles centrales del gel. En los extremos se colocaron 2 μl de estándar de alto peso molecular con un intervalo entre 250 y 14 kDa (Rainbow coloured protein molecular weight markers; Amersham Pharmacia Biotech). Las muestras se dejaron correr durante cinco horas a un voltaje inicial de 35 Volts, en Buffer electrodo (electrode buffer URNG) (ver Anexo).

Para las fracciones purificadas, se tomó 1mg de cada muestra liofilizada y se disolvió en 1ml de agua desionizada. Estas soluciones fueron resuspendidas 1:4 en el buffer de muestra. Se calentaron en seco a 95°C por cuatro minutos, se colocaron en geles de acrilamida 7.5% y se dejaron correr a un voltaje de 60 Volts por gel durante aproximadamente dos horas.

Todos los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie al 1% (BioRad ®) para visualizar las bandas y desteñidos con una solución al 30% de metanol y 20% de ácido acético.

Determinación de proteínas

Con el propósito de conocer la cantidad de proteína presente en el extracto crudo liofilizado, se siguió el método de Bradford (1976) cuyo principio es que hay un cambio diferencial de color que ocurre en respuesta a las diferentes concentraciones de proteínas, empleando una tinción de azul de Coomassie. La absorbancia se midió a 595nm con un espectrofotómetro (ver anexo).

De acuerdo con la curva de calibración elaborada previamente con albúmina sérica bovina (BSA), se realizó el ensayo con concentraciones de 30, 40, 50, 60 y 70 µg del extracto crudo liofilizado de *C. marsupialis*. Además, a partir de esta curva se obtuvo la siguiente ecuación: $x=y-0.0094/0.058$ en donde "y" fue sustituida por la absorbancia que resultó de la lectura del extracto crudo, para obtener las respectivas concentraciones.

Bioensayos

Con el objeto de comprobar si la toxina de *Carybdea marsupialis* presenta actividades citolíticas, hemolíticas y neurotóxicas se realizaron bioensayos con peces (*Harengula humeralis*), eritrocitos humanos y cangrejos (*Ocypode quadrata*) respectivamente (ver Anexo).

PRUEBA DE ACTIVIDAD CITOLÍTICA CON EL EXTRACTO CRUDO

Bioensayo con peces (*Harengula humeralis*)

Se recolectaron ejemplares suficientes de sardinas de la especie *Harengula humeralis* en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, con un peso de entre 10 y 25g. Una vez recolectados, los peces se depositaron en un estanque de 6370 L de capacidad con aireación y flujo de agua continuo. En el estanque permanecieron al menos tres días para su aclimatación y sobre todo para evitar muertes por causas ajenas al experimento. Pasado este periodo, los peces se trasladaron a un estanque de 70 L para su posterior manipulación, el cual fue dividido con malla plastificada en cinco secciones para tener control de los peces tratados.

La prueba se realizó con cinco dosis diferentes de extracto crudo liofilizado diluido en agua desionizada, las cuales fueron aplicadas a diez individuos. Las concentraciones fueron las siguientes: 10, 8, 6, 4, 3.5 y 3 mg/ml. Por cada dosis se inyectaron diez peces más con suero para tener un control del experimento, por lo que en total se emplearon 120 peces.

A cada ejemplar, se le inyectó una alícuota de 0.1 ml de la dosis correspondiente por vía intravenosa en la arteria caudal con una jeringa de insulina, registrándose el tiempo de supervivencia en un intervalo de 12 hrs, así como el peso y las medidas de cada individuo.

La Dosis Letal media (DL₅₀), que indica la cantidad mínima de toxina que mata al 50% de los individuos experimentales se obtuvo con el método de Lehman (1980).

PRUEBA DE ACTIVIDAD NEUROTÓXICA CON EL EXTRACTO CRUDO

Bioensayo con cangrejos (*Ocypode quadrata*)

Para este ensayo se recolectaron cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* en la playa cerca de la Unidad Académica Puerto Morelos, con un peso de entre 10 y 20 gramos. Se emplearon siete dosis diferentes de extracto crudo liofilizado (0.5, 0.35, 0.28, 0.25, 0.18, 0.125, y 0.1mg/ml) y se inyectó 0.1ml de cada una a seis cangrejos en la tercera pata caminadora. Se registró el tiempo de supervivencia en un intervalo de cuatro horas. La DL₅₀ se obtuvo con el método de Lehman (1980).

PRUEBA DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA CON EL EXTRACTO CRUDO

Bioensayo con eritrocitos humanos de diferentes tipos sanguíneos

Debido a que las proteínas hemolíticas presentes en las toxinas de cnidarios actúan sobre fosfolípidos membranales (Bernheimer y Avigad, 1976), se decidió evaluar por medio de este bioensayo la actividad hemolítica del extracto crudo de *Carybdea marsupialis* en eritrocitos humanos de diferentes tipos sanguíneos, así como determinar si existe diferencia en su efecto.

Además, por medio de este ensayo se puede saber si las hemolisinas de *Carybdea marsupialis* actúan como tipo lectinas, pues estas proteínas son capaces de unirse o aglutinar ciertas células. Al tener esta actividad, son capaces de diferenciar los tipos sanguíneos por su efecto sobre los grupos oligosacáridos que los distinguen.

El método seguido es una modificación del descrito por Rottini *et al* (1990) para citólisis bacteriana. Se emplearon eritrocitos humanos de voluntarios sanos con los tipos sanguíneos: A-, A+, O-, O+, B- y B+.

Una vez lavada la sangre para remover grasa y plasma, se procedió a calibrarla. La calibración para cada tipo sanguíneo se efectuó para determinar la cantidad de eritrocitos necesaria para alcanzar un 100% de hemólisis.

Debido a que se emplearon celdas de 3ml para el espectrofotómetro, todas las soluciones se aforaron a este volumen.

Calibración de los eritrocitos

- Se tomaron 3ml de sangre de cada tipo y se agregaron 30ml de solución Alsever (ver Anexo).
- Se centrifugaron a 3000rpm por 5 min a temperatura ambiente.
- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron con Alsever frío.

Procedimiento: Volumen final 3ml

Tratamiento	Eritrocitos del paquete celular	Solución	% Hemólisis
A	60-180 μ l	Alsever 2940-2880 μ l	0%
B	20-180 μ l	Agua desionizada 2940-1880 μ l	100%

- Se colocaron por triplicado en tubos de ensaye, las distintas concentraciones de eritrocitos para los diferentes tratamientos.
- Se incubaron a 37°C por 30 min.
- Se centrifugaron a 2500rpm a 4°C por 4 min.
- Las muestras fueron leídas a una absorbancia de 415nm.

Una vez realizada la calibración, se procedió a emplear el extracto crudo para determinar la concentración necesaria para provocar el 100% de hemólisis.

Se preparó una solución Stock de extracto crudo a una concentración de 6mg/ml.

Procedimiento para la muestra: Volumen final 3ml.

- Se colocó por triplicado en tubos de ensaye, la cantidad de eritrocitos de cada tipo sanguíneo previamente calibrada.
- Se añadieron las diferentes concentraciones de extracto crudo disuelto en solución Alsever (1, 2, 3, 4 y 5mg/ml).
- Cada tubo se aforó a 3ml con Solución Alsever.
- Se incubaron a 37°C por 30 minutos.
- Se centrifugaron a 2500rpm a 4°C por 4 min.
- Las muestras fueron leídas a una absorbancia de 415nm.
- Se emplearon 150µl de eritrocitos en solución Alsever como blanco.

La hemólisis se evaluó midiendo la hemoglobina liberada en el sobrenadante por medio de un espectrofotómetro. Esta liberación de hemoglobina es resultado de la ruptura de los eritrocitos al contacto con las hemolisinas presentes en el extracto crudo.

Purificación de proteínas

Cromatografía Líquida de Baja Presión

Después de comprobar la actividad de las toxinas por medio de los bioensayos, se procedió a separar las neurotoxinas y las citolisinas por métodos cromatográficos. Los geles que se emplearon en este trabajo están formados por polímeros (dextrano) de unión cruzada que dan lugar a una red tridimensional y fueron Sephadex G-50 medio y Sephadex G-25 fino ya que se recomiendan para separación de péptidos y otras biomoléculas, así como para desalinizar las muestras (Gel filtration 2000). Se eligió como disolvente al ácido acético 0.7M y la cromatografía se realizó de forma isocrática.

En la cromatografía de intercambio iónico, se empleó un gradiente escalonado de acetato de amonio, 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M pH 8.5 y 5.4 para el intercambio aniónico y catiónico respectivamente, con el propósito de ir

aumentado la afinidad de las sales por las cargas fijas y de esta manera liberar todas las proteínas contenidas en la muestra. Los geles empleados en la cromatografía de intercambio iónico fueron: QAE Sephadex A-25 (Pharmacia Biotech) y Fractogel EMD SO_3^- 650 M (Merck).

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

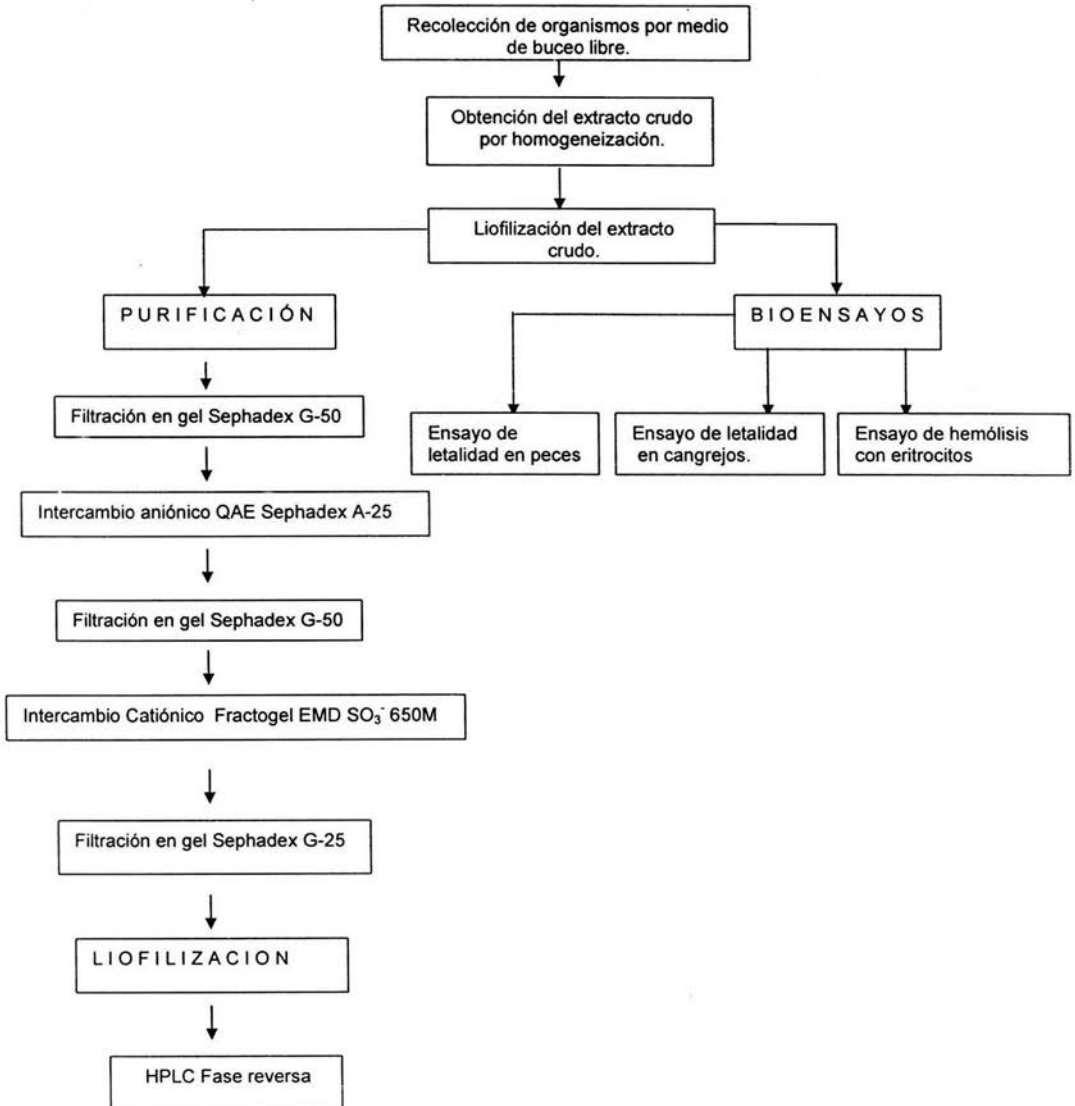
Como paso final, las fracciones resultantes se continuaron purificando por medio de Cromatografía líquida de Alta Presión de Fase Reversa en un aparato HPLC 410 de Varian®. Se empleó una columna empacada con Microsorb C4, de 300A, 4.6x250mm, de Varian®.

Como disolvente A se empleó ácido trifluoroacético (TFA) 10mM en agua y como disolvente B, se empleó acetonitrilo en TFA 10mM.

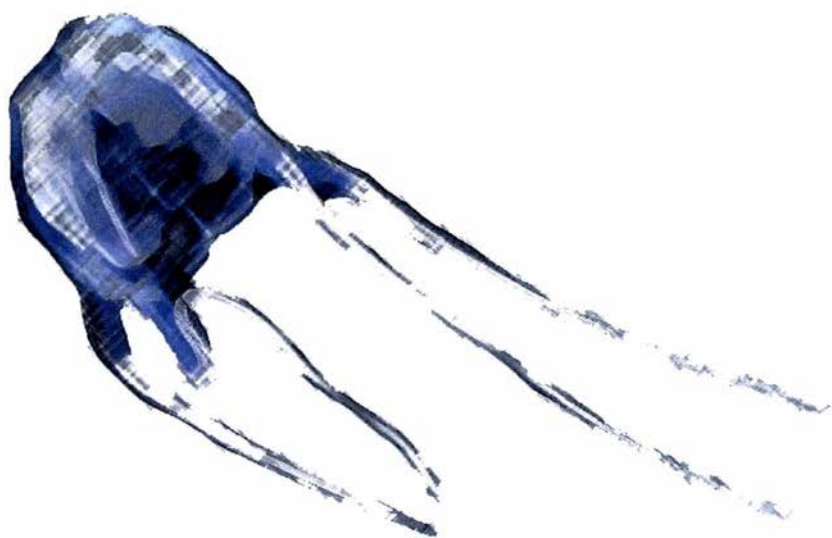
Se colocaron 50 μg de cada fracción previamente purificada. Las muestras fueron eluidas mediante un gradiente lineal de 10 a 80% del disolvente B en A en un lapso de 70 minutos. Para la detección de las diferentes fracciones se utilizó radiación con una longitud de onda de 280nm. La velocidad de flujo para todas las muestras fue de 1ml/min.

A continuación se presenta un diagrama del diseño experimental.

DISEÑO EXPERIMENTAL



RESULTADOS



Resultados

Recolección de *Carybdea marsupialis*

Debido a la ocurrencia estacional de *Carybdea marsupialis*, la recolección se llevó a cabo entre los meses de abril y agosto, cuando las formas adultas son más abundantes. En total se recolectaron 1219 ejemplares de esta cubomedusa.

Obtención del extracto crudo

Se obtuvo un total de 14.17 gramos de extracto crudo, después de la homogeneización y liofilización de los tentáculos.

Electroforesis

En la figura 9-a,i se aprecian en el primero y último carril del gel, los estándares de alto peso molecular (Rainbow coloured protein molecular weight markers, de Amersham Pharmacia Biotech®), con un intervalo de entre 220 y 14kDa.

En el extracto crudo se observan claramente varias bandas que indican que está compuesto por una gran variedad de proteínas de alto peso molecular (Figura 9-b).

La electroforesis realizada con la neurotoxina *CmNt* dio como resultado una única banda que corresponde a una sola especie protéica, con un aparente peso molecular de 97kDa (Figura 9-c).

En la electroforesis de la hemolisina 10 *CmHI 10* se aprecian dos bandas con un aparente peso molecular de entre 20 y 30kDa la primera y de entre 14 y 20kDa la segunda (Figura 9-d).

Resultados

En la electroforesis realizada con la hemolisina 5 *CmHI 5* se observan dos bandas con un aparente peso molecular de 220 y 45kDa (Figura 9-e).

La electroforesis realizada con la hemolisina 1 *CmHI 1* dio como resultado dos bandas de aparente peso molecular de 220 y 97kDa (Figura 9-f).

En la electroforesis realizada con la hemolisina 6 *CmHI 6* se observan dos especies proteicas con un aparente peso molecular de 97 y 16 kDa (Figura 9-g).

La electroforesis realizada con la hemolisina 7 *CmHI 7* dio como resultado una única banda con un aparente peso molecular de entre 31 y 45kDa (Figura 9-h).

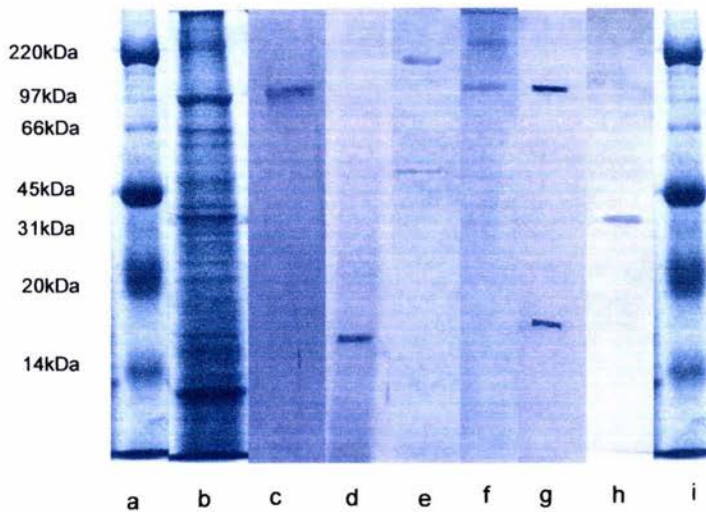


Figura 9. Electroforesis de acrilamida 7.5% del extracto crudo de *Carybdea marsupialis*. a, i) estándar de alto peso molecular, b) extracto crudo, c) neurotoxina CmNt, d) hemolisina CmHI 10, e) hemolisina CmHI 5, f) hemolisina CmHI 1, g) hemolisina CmHI 6, h) hemolisina CmHI 7

A pesar de que en total se obtuvieron 19 fracciones con actividad hemolítica, no fue posible realizar una caracterización por electroforesis de todas ellas

Resultados

a la poca recuperación de material obtenido después del método de purificación.

Determinación de proteínas

Los resultados del ensayo con concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 µg de extracto crudo liofilizado, se presentan en la gráfica 1.

Determinación de proteínas



Gráfica 1. Ecuación y línea de tendencia de la determinación de proteínas por el método de Bradford

El cálculo de la concentración de proteínas se realizó empleando la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración de BSA (albúmina sérica bovina) $x = y - 0,0094/0,058$. Se sustituyeron los valores de absorbancia en "y" y se despejó la variable "x" que corresponde a la cantidad de proteína, obteniendo los valores siguientes:

CONCENTRACIÓN	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml
ABSORBANCIA	0.118	0.209	0.316	0.378	0.471

A partir de la ecuación obtenida de la curva de calibración se obtuvieron las diferentes concentraciones de proteínas (Tabla 2):

$$X = \frac{y - 0.0094}{0.058}$$

Tabla 2. Determinación de proteínas de *Carybdea marsupialis*.

Extracto crudo (μg)	Concentración proteína (μg)
20	1.87
40	3.44
60	5.28
80	6.35
100	7.96

PRUEBA DE ACTIVIDAD CITOLÍTICA CON EL EXTRACTO CRUDO

Bioensayo con peces (*Harengula humeralis*)

Al inyectar las diferentes concentraciones del extracto crudo en la arteria caudal de los peces, se observaron distintas reacciones, las cuales hacen evidente la presencia de citolisinas en el veneno de *Carybdea marsupialis*.

Con la concentración más baja (3mg/ml) no se observó efecto alguno, con 3.5mg/ml, tres de los diez peces inyectados sufrieron movimientos incontrolados, dos de ellos alcanzaron parálisis y muerte en un tiempo aproximado de 7 horas. Con 4mg/ml seis individuos comenzaron a presentar oscurecimiento en la zona dorsal, seguido de movimientos incontrolados, pasados 17 minutos dos organismos murieron. Con 6mg/ml, se observó la muerte de seis individuos, en un tiempo de 20 minutos con 51 segundos, todos presentando oscurecimiento en la parte dorsal y parálisis.

Con 8mg/ml se observó la muerte de ocho individuos en un tiempo de 4 minutos con 22 segundos. Finalmente, con la concentración más alta (10mg/ml), murieron todos los individuos en un tiempo de 5 minutos, en todos,

se observó oscurecimiento de la piel en la zona dorsal, parálisis y movimientos laterales incontrolados.

La Dosis Letal media (DL_{50}), fue de 5.72 mg/ml, la cual equivale a 455.31 μ g de proteína, que a su vez corresponde a 26 μ g/g de peso corporal.

PRUEBA DE ACTIVIDAD NEUROTÓXICA CON EL EXTRACTO CRUDO Bioensayo con cangrejos (*Ocypode quadrata*)

El extracto crudo mostró una evidente actividad biológica en crustáceos.

A los pocos segundos de ser inyectada la dosis (0.1ml de una concentración de 1mg/ml), se observaron fuertes contracciones en los músculos de los apéndices caminadores, acompañados de intensos movimientos espasmódicos. Las patas se tornaron temblorosas con movimientos laterales involuntarios, habiendo pérdida de control total y parálisis. La muerte ocurrió en aproximadamente 30 segundos.

En cuanto a las diferentes concentraciones de extracto crudo inyectadas para obtener la DL_{50} , con 0.5mg/ml se observó a los pocos segundos reacción tetánica, parálisis y muerte de todos los individuos en un tiempo aproximado de 5 minutos. Con la dosis más baja (0.1mg/ml) no se observó ningún tipo de reacción, por lo que todos los individuos sobrevivieron durante el tiempo estipulado para el experimento y fueron liberados.

Con las cinco dosis restantes (0.35, 0.28, 0.25, 0.18 y 0.125mg/ml) se observó reacción tetánica en todos los individuos. Con la primera dosis, cinco individuos murieron en un tiempo aproximado de 10 minutos. Con la segunda dosis, cuatro individuos murieron en un tiempo aproximado de 17 minutos. Con la tercera dosis, tres individuos murieron en 20 minutos. Con la cuarta dosis, tres individuos murieron en un intervalo de una hora y finalmente con la última dosis no se observó mortalidad.

Resultados

En los cangrejos utilizados como control, inyectados con solución salina (0.1ml) no se observó ninguna reacción, ni mortalidad de los individuos.

La DL₅₀ fue de 0.199 mg/ml para cangrejos, lo cual equivale a 15.8µg de proteína, que a su vez corresponde a 1.05µg/g de peso corporal.

PRUEBA DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA CON EL EXTRACTO CRUDO

Bioensayo con eritrocitos humanos de diferentes tipos sanguíneos

El extracto crudo de la medusa *Carybdea marsupialis* provocó hemólisis en eritrocitos humanos de diferentes tipos sanguíneos.

Calibración de los eritrocitos

La calibración para cada tipo sanguíneo se efectuó para determinar la cantidad de eritrocitos necesaria para alcanzar un 100% de hemólisis. La sangre empleada para la calibración fue tomada de una solución stock de 250µl del paquete celular de eritrocitos en 2750µl de solución Alsever.

Los resultados se presentan en la tabla 3:

Tabla 3. Calibración de los eritrocitos.

TIPO SANGUÍNEO	CANTIDAD DE ERITROCITOS PARA OBTENER EL 100% DE HEMÓLISIS
A -	150µl
A +	84µl
O -	66µl
O +	99µl
B -	72µl
B +	90µl

Una vez calibrada la sangre, se probaron diferentes concentraciones del extracto crudo en los eritrocitos de diferente tipo sanguíneo, obteniendo el

Resultados

100% de hemólisis con 1.5mg/ml en todos, lo cual equivale a 119.4 μ g de proteína, resultando en una hemólisis dependiente de la concentración (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del ensayo hemolítico. Se muestra la absorbancia a 415nm obtenida con 1.5mg/ml de extracto crudo, donde 1 es el máximo de hemólisis.

CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO CRUDO	TIPO SANGUÍNEO	ABSORBANCIA 415nm
1.5 mg/ml	A -	0.995
	A +	1.035
	O -	1.008
	O +	1.002
	B -	0.949
	B +	1.022

Purificación del extracto crudo de *Carybdea marsupialis*

El primer paso en la purificación de los compuestos con actividad biológica de *Carybdea marsupialis* fue la cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50 de 80ml de una solución preparada a partir de 9 gramos de extracto crudo disueltos en 200ml de agua desionizada.

La columna de 5x100cm, se mantuvo con un flujo de 2.5ml/min, obteniendo fracciones de 15ml. Para la detección de las diferentes fracciones se utilizó radiación con una longitud de onda de 280nm. De este primer paso cromatográfico se obtuvieron 13 fracciones (Figura 10), las cuales fueron concentradas a presión reducida en un rotoevaporador Buchi, hasta obtener un volumen de aproximadamente 20ml. Posteriormente, fueron congeladas a -60°C.

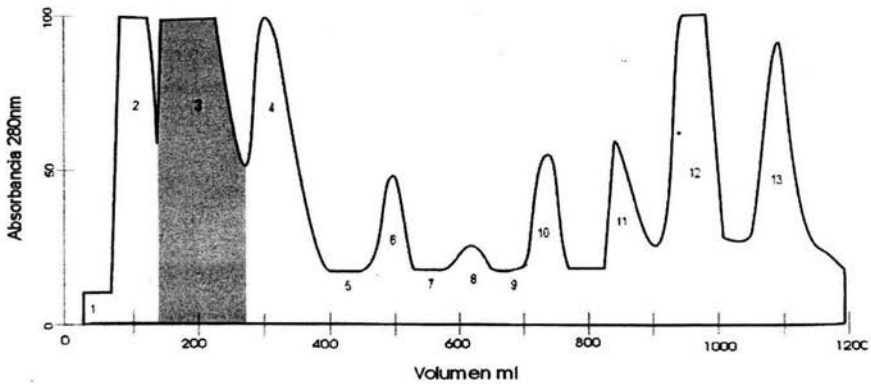


Figura 10. Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50 del extracto crudo de *Carybdea marsupialis*. El área sombreada corresponde a la fracción activa en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*.

Debido a que la fracción 3 mostró toxicidad considerable en cangrejos y dado que las hemolisinas son proteínas de alto peso molecular, se continuó purificando esta fracción. Para ello se pasó por una columna de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25 (Pharmacia Biotech) de 1.5x50cm, con acetato de amonio pH 8.5 en un gradiente escalonado 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M. La

velocidad de flujo fue de 2.5ml/min, recolectando fracciones de 15ml y leyendo la muestra a 280nm. Se obtuvieron seis fracciones correspondientes a cada molaridad de acetato de amonio empleada (Figura 11).

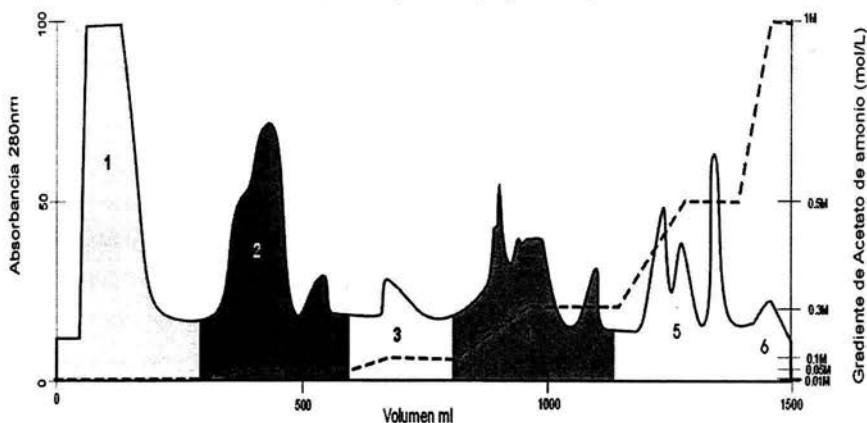


Figura 11. Cromatografía de intercambio aniónico de la fracción 3 en QAE Sephadex A-25 (Pharmacia Biotech). La fracción 1 corresponde a la fracción activa en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*. Las fracciones 2 y 4 corresponden a las fracciones con actividad hemolítica.

NEUROTOXINAS

De las seis fracciones obtenidas en QAE Sephadex A-25, la más potente en crustáceos fue la 1. Esta fracción se pasó por una columna de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650 M (Merck), de 1.5x25cm, con un gradiente escalonado 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M de acetato de amonio pH 5.4. La velocidad de flujo fue de 2.5ml/min, recolectando fracciones de 15ml (Figura 12).

Resultados

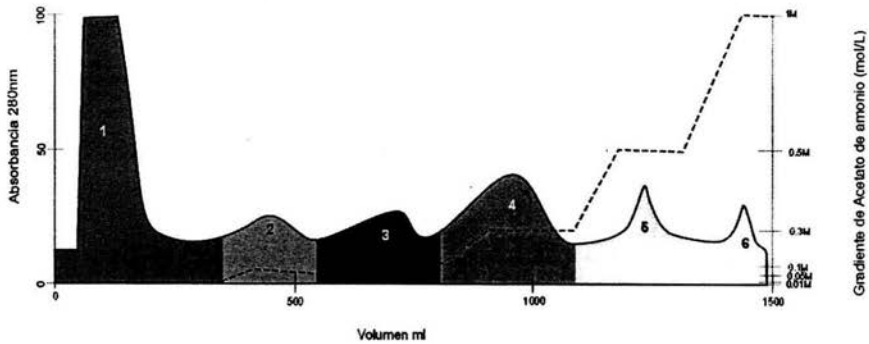


Figura 12. Cromatografía de intercambio catiónico de la fracción 1 de QAE en Fractogel EMD SO_3^- 650M (Merck). La fracción 2 corresponde a la fracción activa en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*. Las fracciones 1, 3, 4 y 5 presentaron actividad hemolítica.

De estas fracciones en Fractogel EMD SO_3^- 650M, la 2 resultó activa en crustáceos y se procedió a desalarla por medio de filtración en gel, con una columna Sephadex G-25 de 2x90cm, con una velocidad de 2ml/min en fracciones de 15ml, a una atenuación de 0.1 y a una longitud de onda de 280nm. Como eluyente se empleó una solución 0.7M de ácido acético (Figura 13).

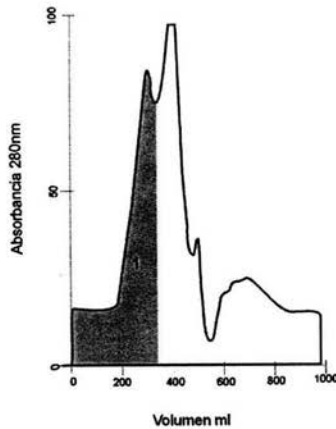


Figura 13. Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-25. El área sombreada corresponde a la fracción activa en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*.

El último paso en la separación cromatográfica de la neurotoxina, consistió en la purificación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (figura 14). La fracción activa en cangrejos eluyó a los 41.176 minutos a un porcentaje de 49% de acetonitrilo.

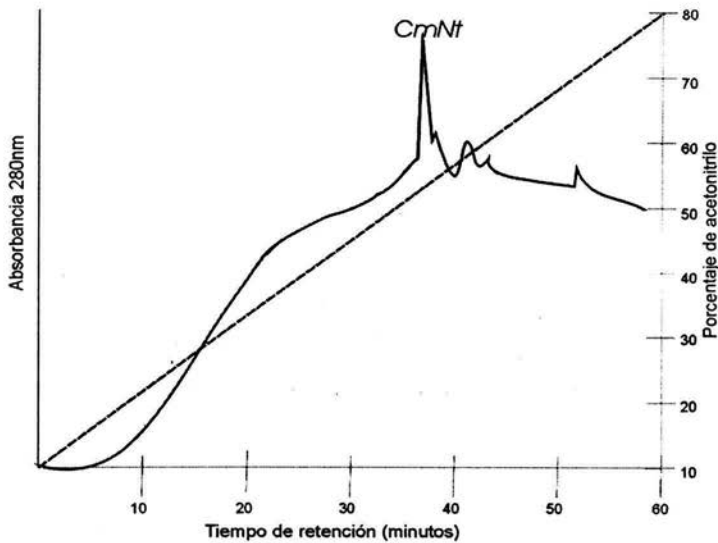


Figura 14. Purificación cromatográfica de la neurotoxina en HPLC. Disolvente A: TFA 0.1% en agua; B: TFA 0.1% en Acetonitrilo. 50 µg de toxina fue eluida mediante un gradiente lineal de 10 a 80% del disolvente B en A en 60 minutos.

La fracción que presentó efecto neurotóxico (Figura 13) fue denominada *CmNt* (*Carybdea marsupialis* neurotoxina).

Esta fracción fue probada en dos cangrejos con una concentración de 1mg/ml, inyectando 0.15ml en la tercera pata caminadora de cada uno. Al poco tiempo de haber inyectado la dosis, se observaron fuertes contracciones en los músculos de los apéndices caminadores, acompañados de intensos movimientos espasmódicos. Las patas se tomaron temblorosas con movimientos laterales involuntarios, habiendo parálisis y posteriormente la muerte. El tiempo promedio de supervivencia fue de 30 minutos.

HEMOLISINAS

En el caso de las hemolisinas se decidió continuar purificando las fracciones 1, 2 y 4 correspondientes a 0.01, 0.05 y 0.3M de Buffer de acetato de amonio, previamente obtenidas en QAE Sephadex A-25 (Figura 11).

Fracción 1

La fracción 1 de QAE Sephadex A-25, se pasó por una columna Fractogel EMD SO_3^- 650M (Figura 12). De ésta se obtuvieron 5 fracciones con actividad hemolítica, correspondientes a las concentraciones 0.01, 0.05, 0.1, 0.3 y 0.5M de acetato de amonio, las cuales a su vez se pasaron por una columna Sephadex G-25 para remover las sales, con una velocidad de 2ml/min, en fracciones de 15ml.

De la fracción 1 de Fractogel EMD SO_3^- 650M resultaron con actividad hemolítica 3 fracciones, las cuales fueron denominadas *CmHI 1, 2 y 3* (ver Anexo, figura 25).

Posteriormente, se trataron 50 μg de *CmHI 1* por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), donde la fracción activa en eritrocitos eluyó a los 37.96 minutos, a un porcentaje de 51% de acetonitrilo (Figura 15).

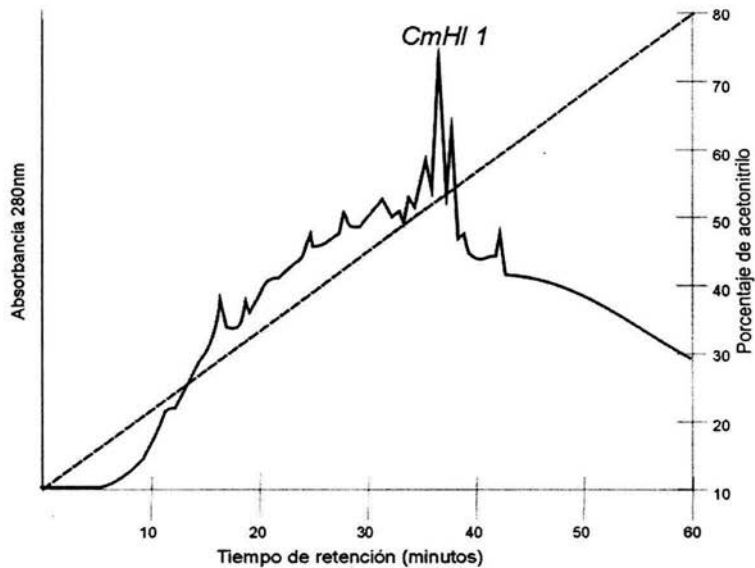


Figura 15. Purificación cromatográfica de la hemolisina *CmHI 1* en HPLC. Disolvente A: TFA 0.1% en agua; B: TFA 0.1% en Acetonitrilo. 50 μ g de toxina fue eluida mediante un gradiente lineal de 10 a 80% del disolvente B en A en 60 minutos.

De la fracción 2 de Fractogel EMD SO_3^- 650M se obtuvo un pico con actividad y fue denominado *CmHI 4* (ver Anexo, figura 26). De la fracción 3 de Fractogel EMD SO_3^- 650M, se obtuvieron dos fracciones con actividad hemolítica denominadas *CmHI 5* y 6 (ver Anexo, figura 27).

La fracción 5 se continuó separando por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), obteniendo dos picos que eluyeron a los 40.54 minutos, a un porcentaje de 42% de acetonitrilo y a los 41.76 minutos a un porcentaje de 43% de acetonitrilo (Figura 16).

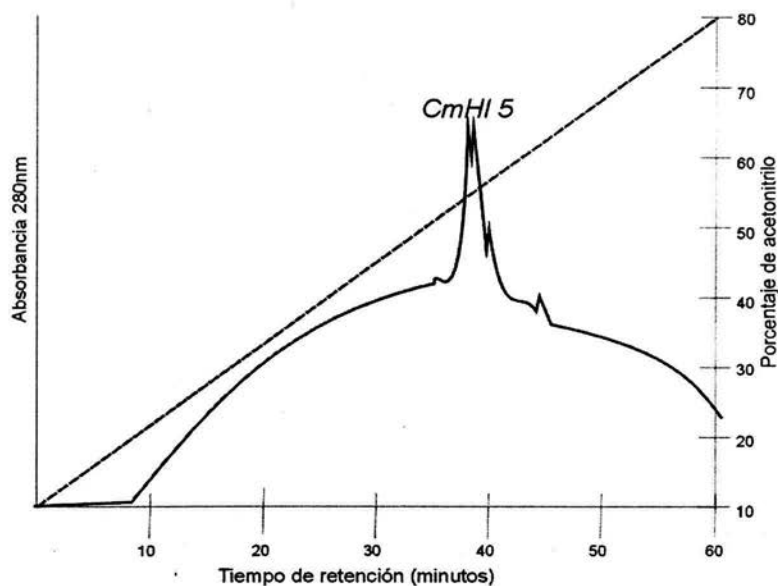


Figura 16. Purificación cromatográfica de la hemolisina *CmHI 5* en HPLC. Disolvente A: TFA 0.1% en agua; B: TFA 0.1% en Acetonitrilo. 50 μ g de toxina fue eluida mediante un gradiente lineal de 10 a 80% del disolvente B en A en 60 minutos.

De la fracción 4 de Fractogel EMD SO_3^- 650M, se obtuvo una fracción con actividad, denominada *CmHI 7* (ver Anexo, figura 28). Esta se continuó purificando por HPLC (Figura 17), dando como resultado tres picos que eluyeron a los 38.77 minutos, que corresponden a 44% de acetonitrilo, 39.23 minutos que corresponden a 51% de acetonitrilo y 39.98 minutos, que corresponde a 52% de acetonitrilo.

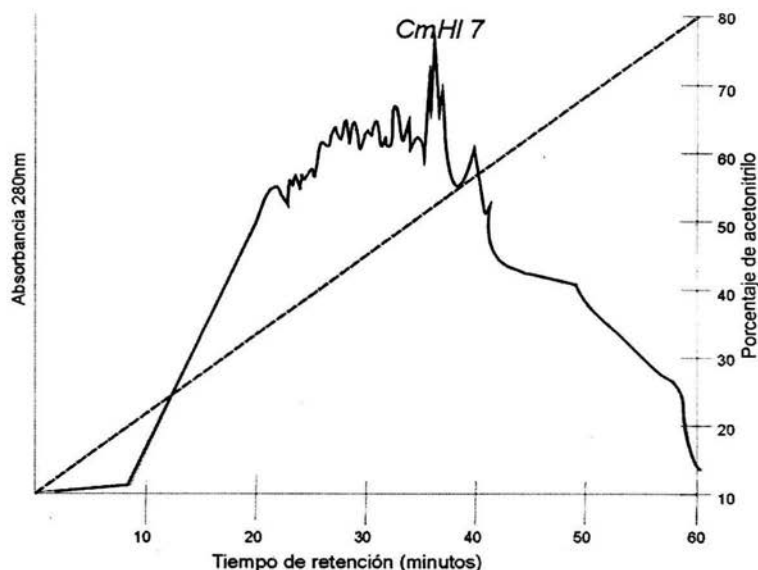


Figura 17. Purificación cromatográfica de la hemolisina *CmHI 7* en HPLC. Disolvente A: TFA 0.1% en agua; B: TFA 0.1% en Acetonitrilo. 50 µg de toxina fue eluida mediante un gradiente lineal de 10 a 80% del disolvente B en A en 60 minutos.

Finalmente, de la fracción 5 de Fractogel EMD SO_3^- 650M resultó una fracción activa y fue denominada *CmHI 8* (ver Anexo, figura 29).

Las fracciones 2 y 4 de QAE Sephadex A-25, correspondientes a 0.05 y 0.3M de acetato de amonio pH 8.4 (Figura 11) se pasaron por una columna Sephadex G-50 de 2x90cm para remover las sales. La velocidad de flujo fue de 2ml/min, en fracciones de 15ml y a una longitud de onda de 280nm.

Fracción 2

La fracción 2 de QAE Sephadex A-25 se pasó por una columna Sephadex G-50, obteniéndose dos picos, ambos con actividad hemolítica (Figura 18).

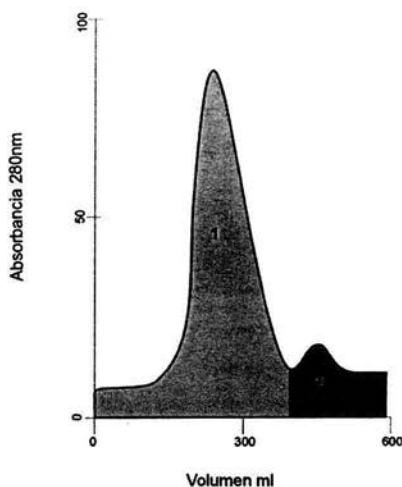


Figura 18. Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50 de la fracción 2 de QAE Sephadex A 25, donde se observan las fracciones con actividad hemolítica.

Fracción 1(G-50)

La fracción 1 de Sephadex G-50 se pasó por una columna de 1.5x25cm de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650M (Merck), obteniendo seis fracciones correspondientes a las diferentes concentraciones de acetato de amonio (0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M). La velocidad de flujo fue de 2.5ml/ml y las fracciones recolectadas fueron de 15ml

De dicha cromatografía se obtuvieron dos fracciones (1 y 2) con actividad, eluidas en 0.01M de acetato de amonio pH 5.4 (Figura 19). Posteriormente, se pasaron por una columna Sephadex G-25, obteniendo 2 fracciones con actividad hemolítica denominadas *CmHI 9* y *CmHI 10* (ver Anexo, figura 31).

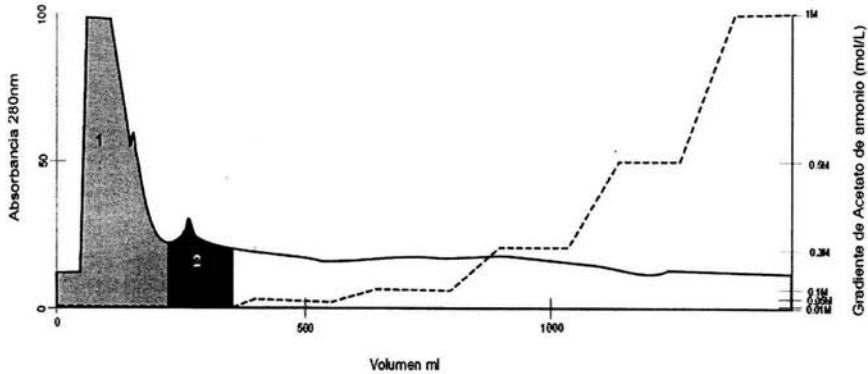


Figura 19. Cromatografía de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650M (Merck), de la fracción 1 de G-50.

Fracción 2(G-50)

La segunda fracción obtenida en Sephadex G-50 (Figura 18), fue pasada por una columna de 1.5x25cm de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650M (Merck), con un gradiente escalonado de acetato de amonio pH5.4. La velocidad a la cual se corrió la muestra fue de 2ml/min, recolectando fracciones de 15ml.

De esta columna se obtuvieron cuatro fracciones con acetato de amonio 0.01M, de las cuales 1, 2 y 3 presentaron actividad hemolítica, al igual que la fracción correspondiente a 0.05 de acetato de amonio (Figura 20). Estas fracciones fueron pasadas por una columna Sephadex G-25 para remover las sales de amonio, obteniendo al final 6 fracciones con actividad hemolítica, que fueron denominadas *CmHI 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17* (ver Anexo, figuras 32 y 33).

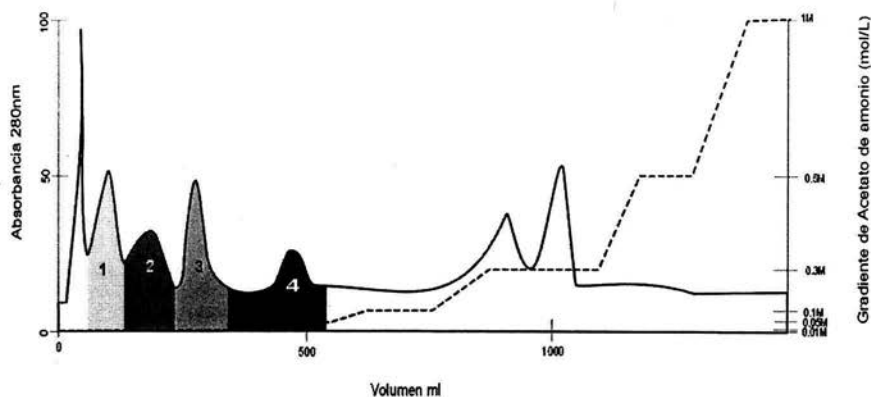


Figura 20. Cromatografía por intercambio catiónico de la fracción 2 de G-50 en Fractogel EMD SO_3^- 650M (Merck). Las áreas sombreadas muestran las fracciones con actividad hemolítica.

De la fracción 11 se pasaron $50\mu\text{g}$ por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), donde la fracción con actividad hemolítica eluyó a los 41.096 minutos que corresponde a 56% de acetonitrilo (Figura 21).

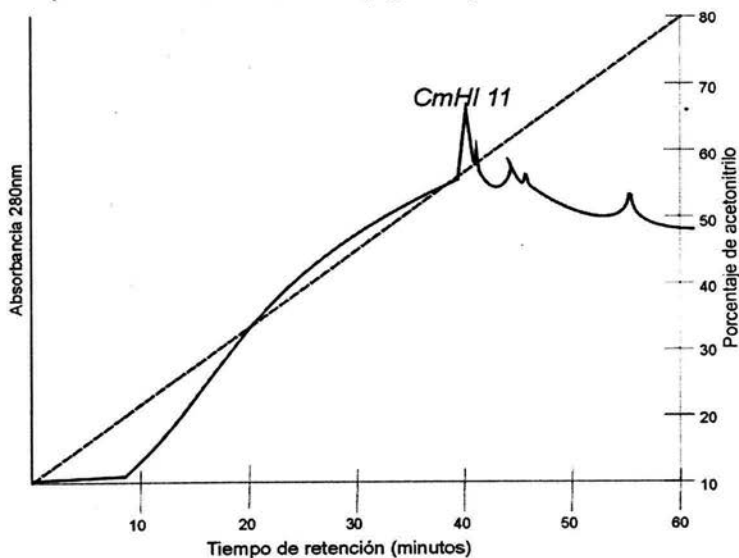


Figura 21. Purificación cromatográfica de la hemolisina *CmHI 11* en HPLC. Disolvente A: TFA 0.1% en agua; B: TFA 0.1% en Acetonitrilo. $50\mu\text{g}$ de toxina fue eluida mediante un gradiente lineal de 10 a 80% del disolvente B en A en 60 minutos.

Fracción 4

La fracción 4 de QAE Sephadex A-25 se pasó por una columna Sephadex G-50, con lo cual se obtuvieron 4 fracciones, de las cuales sólo dos presentaron actividad hemolítica (Figura 22).

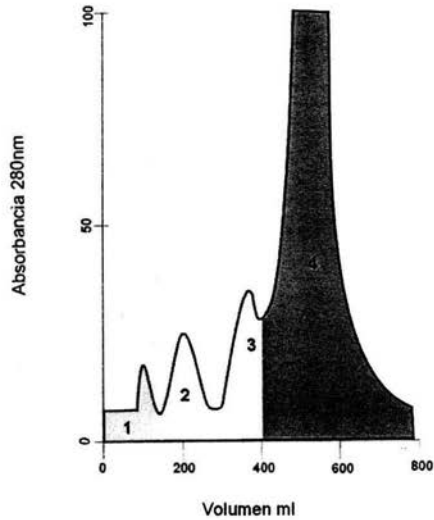


Figura 22. Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50, de la fracción 3 de QAE Sephadex A-25. Las áreas sombreadas representan las fracciones con actividad hemolítica.

Fracción 1(G-50)

La fracción 1 de Sephadex G-50 (Figura 22) se pasó por una columna de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650M (Merck), (Figura 23).

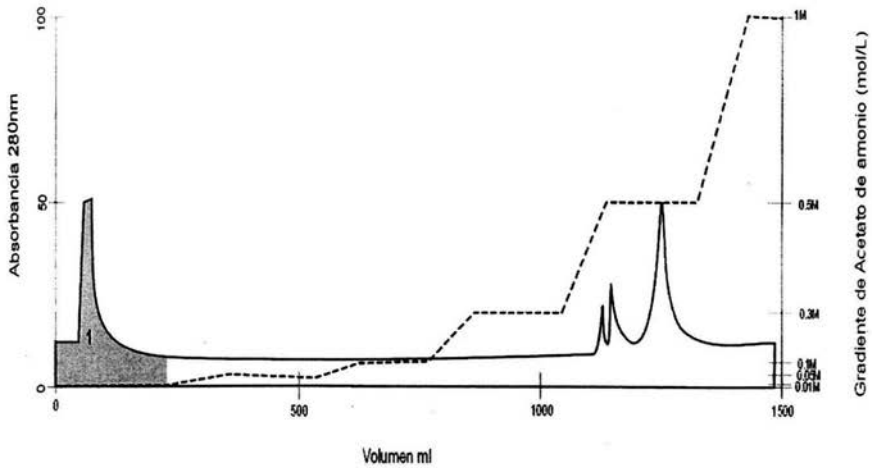


Figura 23. Cromatografía por intercambio catiónico de la fracción 1(G-50) en Fractogel EMD SO_3^- 650M (Merck). Se encontró actividad hemolítica en la zona coloreada.

Posteriormente, la fracción 1 de Fractogel EMD SO_3^- 650M (Figura 23) se pasó por una columna Sephadex G-25 y la fracción activa fue llamada *CmHI 18* (ver Anexo, figura 35).

Fracción 4(G-50)

La fracción 4 de Sephadex G-50 (Figura 22) se pasó por una columna de intercambio catiónico Fractogel EMD SO_3^- 650M (Merck), (Figura 20).

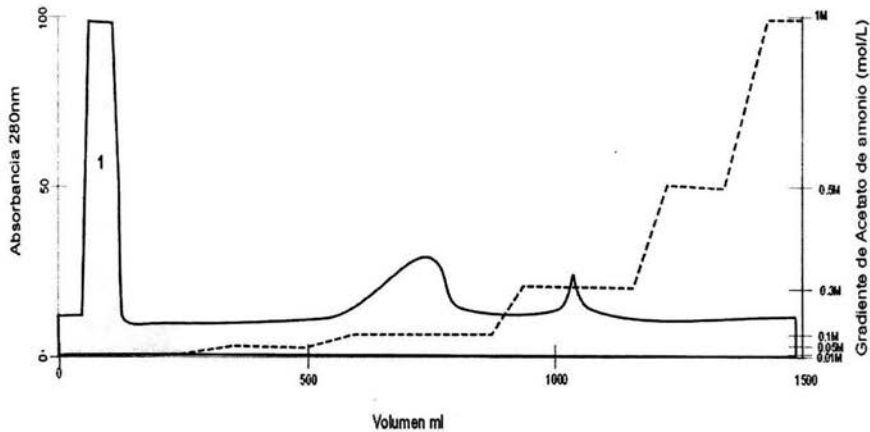


Figura 24. Cromatografía por intercambio catiónico de la fracción 2(G-50) en Fractogel EMD SO_3^- 650M (Merck). La fracción sombreada presentó actividad hemolítica.

De las fracciones resultantes, la 1 correspondiente a 0.01M de acetato de amonio resultó con actividad hemolítica y se pasó por una columna Sephadex G-25. De este paso cromatográfico se obtuvo una fracción activa, denominada *CmHI 19* (ver Anexo, figura 36).

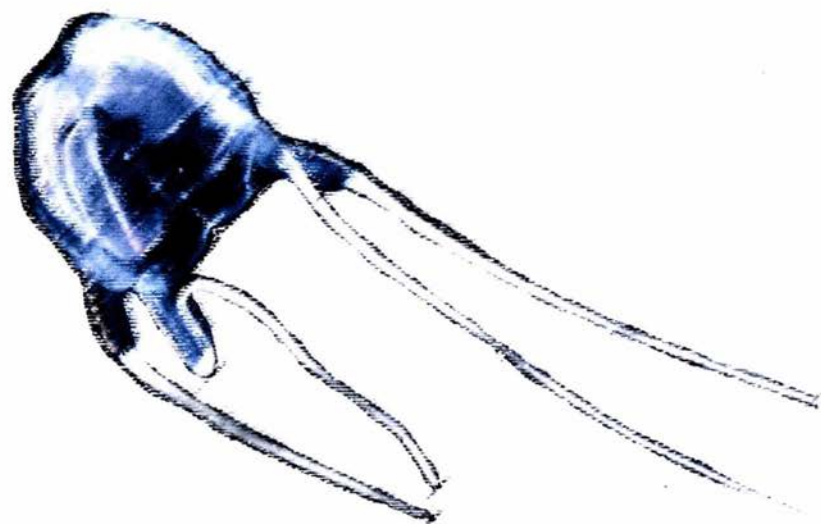
Las fracciones que resultaron con actividad positiva fueron probadas en eritrocitos humanos de tipo sanguíneo A-, observando la acción hemolítica con un microscopio óptico. Este método brinda una manera eficiente de comprobar la actividad hemolítica pues se emplea como control una muestra de eritrocitos completamente lisados por agua desionizada.

Las fracciones con actividad hemolítica fueron 19, denominadas *CmHI 1-19*. De estas fracciones, se eligieron las cinco más abundantes (*CmHI 1*, *CmHI 2*, *CmHI 5*, *CmHI 6* y *CmHI 7*) para realizar un ensayo hemolítico por medio de espectrofotometría, como el descrito anteriormente.

Con las fracciones *CmHI 1*, *CmHI 2*, *CmHI 5* y *CmHI 6* se realizó el ensayo con $125\mu\text{g/ml}$, obteniendo en todos los casos entre 1.4 y 2.4% de hemólisis.

Con la fracción *CmHI 7* se pudo realizar el ensayo con 1mg/ml , observándose sólo el 10% de hemólisis.

DISCUSIÓN



Discusión

Generalidades

En vista de que en los últimos años se ha descubierto que el veneno presente en varios organismos marinos contiene sustancias biológicamente activas que han permitido ampliar los horizontes del mundo de la farmacéutica, de las neurociencias y de la biología celular, se ha vuelto importante conocer las especies que presentan este tipo de compuestos, para después caracterizarlos y probarlos como drogas novedosas o como herramientas para dilucidar las funciones de diferentes células.

En un intento por contribuir a tal propósito, en este trabajo se caracterizó la actividad biológica de las toxinas de *Carybdea marsupialis*, y se purificaron algunas de las proteínas que presentaron dicha actividad. Esta caracterización es una tarea difícil, dado que generalmente el veneno es una mezcla compleja de moléculas biológicamente activas.

Carybdea marsupialis presenta varias ventajas para su estudio: en el Caribe mexicano es muy abundante entre los meses de marzo a agosto, se conoce buena parte de su biología, y es poco lo que se conoce sobre sus toxinas, por lo que es un organismo sumamente interesante desde el punto de vista fármaco y toxinológico.

En este trabajo enfocamos nuestro esfuerzo en la obtención de neurotoxinas y hemolisinas para las cuales existen ensayos estandarizados que permiten su reconocimiento, entre los que se encuentran los bioensayos con cangrejos y los resultados que se esperan de éstos como la reacción tetánica que ocurre al inyectarles las toxinas de casi cualquier cnidario (Béress y Wunderer, 1975, 1976; Schweitz *et al.*, 1981), así como los ensayos hemolíticos, donde es evidente la ruptura de los eritrocitos (Chung *et al.*, 2001).

Recolección de *Carybdea marsupialis*

La estacionalidad y abundancia de *Carybdea marsupialis* en la laguna arrecifal de Puerto Morelos permitió una captura de aproximadamente 200 medusas por día de recolecta, las cuales fueron identificadas con la asesoría de la Dra. Lourdes Segura del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. En trabajos previos se describe la ruptura de los tentáculos al capturar las medusas con redes para plancton, de forma que se utilizó el método de recolección manual sugerido por Estrada (2001), el cual resultó efectivo pues no se perdió material durante la recolección.

Extracción del veneno

Se sabe que el veneno de los cnidarios se encuentra almacenado en los nematocistos (Lotan *et al.*, 1995), de forma que para realizar con éxito la purificación y caracterización de los compuestos presentes en este veneno se debe contar con un método efectivo para descargarlos y obtener las toxinas.

Carybdea marsupialis presenta tres tipos de nematocistos: *Heterotricos microbásicos euriteles*, *Atricos isoriza haplonemes* y *Holotricos isoriza haplonemes* (Avian *et al.*, 1997), de los cuales los atricos son los más abundantes. Estos tres tipos de nematocistos no representan una característica distintiva de esta especie pues se encuentran en la mayoría de las especies de la clase Cubozoa. Sin embargo, al existir diferencias en el tipo y cantidad de toxinas que poseen, se hace evidente la importancia de caracterizar los componentes tóxicos presentes en los nematocistos de las especies venenosas.

Existen varios métodos para obtener la descarga de los nematocistos de medusas. En la literatura se sugiere la extracción del veneno principalmente por sonicación (Rottini *et al.*, 1995; Othman *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2001), con perlas de vidrio (Estrada, 2001) y también mediante estímulos eléctricos (Edean *et al.*, 1993).

En la literatura se comenta que el empleo de estímulos eléctricos para lograr la descarga de los nematocistos provoca una disminución en la toxicidad, y la recuperación de material es baja (Zugasti, 2001). Por otro lado, las perlas de vidrio pueden desnaturalizar las proteínas que conforman el veneno y finalmente el método por sonicación requiere de un aparato especializado. Por ello, en este trabajo el método utilizado para la descarga de los nematocistos fue por homogeneización de los tentáculos, ya que se sabe que la liberación de las toxinas puede ser provocada mediante acción mecánica sobre las cápsulas. Este método resultó en una gran recuperación de material, sin pérdida en la actividad biológica. Se estimó que por cada 100 medusas se obtuvo 1 gramo de extracto crudo liofilizado.

Actividad del veneno en sistemas vivos

El extracto crudo provocó diversos síntomas en sistemas vivos y células *in vitro*, asociados con la presencia de neurotoxinas y citolisinas.

*Ensayo de letalidad en peces (*Harengula humeralis*) con el extracto crudo*

Los peces expuestos al veneno de *Carybdea marsupialis* presentaron oscurecimiento de la piel en la zona dorsal, parálisis y movimientos laterales incontrolados indicando la presencia de citolisinas en el extracto crudo.

En la literatura no se encontraron referencias de bioensayos realizados con peces, por lo que los resultados obtenidos no se pudieron comparar. Sin embargo, se han efectuado bioensayos con el extracto crudo de otras especies de cubomedusas, empleando ratones como animales experimentales. En *Chrysaora quinquecirrha* la DL_{50} fue de 0.00096-0.00158 mg/g de peso corporal (Burnett y Goldner, 1970; Burnett *et al.*, 1973; Kelman *et al.*, 1984), en *Chrysaora achylos* la DL_{50} fue de 0.0065-0.008 mg/g de peso corporal (Radwan *et al.*, 2001) y en *Chironex fleckeri*, la medusa más venenosa que se conoce hasta la fecha, la DL_{50} fue de 0.000028-0.00012 mg/g de peso corporal

(Keen, 1971; Burnett *et al.*, 1986, Othman y Burnett, 1990, Endean *et al.*, 1993).

A pesar de que los peces no han sido empleados como animales de experimentación en ensayos con extracto crudo, éstos resultaron eficaces para detectar citolisinas. Y como apunta Kem *et al.* (1988), los organismos vivos pueden representar la ventaja de que responden a una variedad de toxinas que afectan diferentes sistemas fisiológicos, lo cual permite la detección de sustancias activas que podrían pasar desapercibidas con ensayos más selectivos.

Ensayo de letalidad en cangrejos (Ocypode quadrata) con el extracto crudo.

Las neurotoxinas son proteínas que se unen a sitios específicos de los canales iónicos sensibles a voltaje y provocan parálisis, convulsiones, hiperactividad y en algunos casos la muerte, por ello es fácil distinguir su efecto a simple vista en organismos sensibles como los crustáceos, como lo indican las investigaciones en *Aurelia aurita* (Avila, 2001), *Chrysaora quinquecirrha* (Blanquet, 1972) y en diferentes especies de anémonas (Blanquet, 1968; Béress *et al.*, 1982; Zugasti, 2001). Es común encontrar neurotoxinas en el veneno de los cnidarios pues gracias a su efecto permiten la captura de las presas.

El extracto crudo de *Carybdea marsupialis*, tuvo gran actividad sobre cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, ocasionando una intensa reacción tetánica, seguida por parálisis y muerte de los organismos experimentales. La DL₅₀ fue de 0.99mg/ml, lo cual equivale a 1.05µg/g de peso corporal.

Aunque diferentes investigadores han realizado bioensayos preliminares en cangrejos con extracto crudo de medusas, no existe documentación acerca de la DL₅₀, por lo que es difícil comparar los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, debido a que los crustáceos constituyen el recurso mayormente empleado para detectar neurotoxinas por su gran sensibilidad (Béress y

Wunderer, 1975, 1976; Aneiros *et al.*, 1998; Schweitz *et al.*, 1981), se ha obtenido la DL₅₀ con diferentes toxinas de anémonas. Bruhn *et al.* (2001) obtuvieron a partir de las toxinas APE 1, APE 2 y APE 5 de la anémona *Anthopleura elegantissima* los siguientes resultados en cangrejos de la especie *Carcinus maenas*: Con la toxina APE 1, la DL₅₀ fue de 1:10 μg/kg de peso corporal, con APE 2, la DL₅₀ fue de 1:1 μg/kg de peso corporal y con APE 5 fue de 3:50 μg/kg de peso corporal.

Estos resultados indican que las neurotoxinas de *Carybdea marsupialis* y de la anémona *Anthopleura elegantissima* actúan sobre los canales de sodio de los crustáceos, ocasionando reacciones tetánicas y muerte.

Ensayo de letalidad en cangrejos con la neurotoxina CmNt.

La primera toxina polipeptídica con acción neurotóxica fue aislada de los tentáculos de la anémona *Condylactis gigantea* (Shapiro 1968) y aunque existe un gran número de neurotoxinas caracterizadas en especies de la clase Anthozoa, no existen muchas en la clase Cubozoa, a la que pertenece *Carybdea marsupialis*.

Endean *et al.* (1991) obtuvieron la purificación de la neurotoxina T₄ de *Chironex fleckeri* con un peso molecular de 150KDa, la cual provocó la contractura en los músculos de crustáceos, además del bloqueo en la conducción de impulsos nerviosos en roedores.

De forma similar, la neurotoxina purificada en este trabajo, tiene un peso molecular alto, de 97kDa aproximadamente y provocó bloqueo en canales iónicos ocasionando reacción tetánica inmediata, parálisis a los 6 minutos y finalmente la muerte en un lapso de 30 minutos.

Ensayo hemolítico con el extracto crudo

El ensayo hemolítico realizado con eritrocitos humanos de diferente tipo sanguíneo, permitió detectar la presencia de hemolisinas, obteniéndose el 100% de hemólisis con 119.4µg/ml de proteína.

Comparando los resultados de ensayos hemolíticos con eritrocitos humanos en otras especies de medusas (tomando en cuenta que en este trabajo con la dosis indicada se obtiene un 100% de hemólisis y en los otros trabajos un 50%), se encontró que la dosis para hemolisar la mitad de los eritrocitos de la muestra con *Chrysaora quinquecirrha* fue de 70 µg/ml de proteína (Kelman *et al.*, 1984) y con *Chironex fleckeri* 0.1 µg/ml (Endean *et al.*, 1993).

De acuerdo con el resultado obtenido en este trabajo, se puede notar que la potencia de las hemolisinas varía en cada especie de medusa, siendo las de *Chironex fleckeri* las más potentes de todas. Según Tibbáls (2003) la diferencia en la potencia del veneno debe a varios factores, entre ellos destacan el número de tentáculos de la medusa y la cantidad y el tipo de nematocistos que posee, lo cual está en función de los depredadores y las presas de cada medusa en particular. Por ejemplo, *Chiropsalmus quadrigatus*, que es una medusa similar a *Chironex fleckeri*, pero más pequeña y con nueve tentáculos, contiene en su veneno propiedades dermatonecróticas y hemolíticas, en aproximadamente la misma proporción que *C. fleckeri*, sin embargo, la cantidad de veneno que puede inyectar es 90% menos que *C. fleckeri* (Barnes, 1966). Y la toxicidad de su veneno en ratones, indica que es una sexta parte de la toxicidad que *C. fleckeri* puede provocar en los mismos (Tibbáls, 2003).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que los valores para la DL₅₀ de cada especie, también pueden variar debido a las técnicas utilizadas y a la inestabilidad de las hemolisinas presentes en las muestras, las cuales dependiendo de su composición, son lábiles frente a ciertas condiciones, como

lo han afirmado varios investigadores (Long y Burnett, 1989; Rottini *et al.*, 1995 y Chung *et al.*, 2001).

En este sentido es importante señalar que el resultado de cada investigación puede variar, incluso para la misma especie, debido a diversos factores como la pureza inicial de la muestra, su estabilización, así como el método de purificación empleado. Por otro lado, como las toxinas se encuentran dentro de organelos especializados, es difícil aislarlas de impurezas tales como otras proteínas, ácidos nucleicos, endotoxinas o restos celulares. Como apunta Estrada (2001) esto se podría resolver si existieran métodos estandarizados para la obtención de proteínas puras que fueran confiables y seguros para el estudio de las toxinas.

Es importante mencionar que en el extracto crudo de *Carybdea marsupialis* existe más de una hemolisina y por ello, esta especie puede ser importante como fuente de toxinas con actividad sobre las células, especialmente sobre los componentes no protéicos de sus membranas.

Ensayo hemolítico con las fracciones purificadas

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo exacto de acción de las hemolisinas, se ha propuesto que la sensibilidad de los eritrocitos a estas toxinas está relacionada con la composición de lípidos presentes en su membrana, principalmente la esfingomielina (Máček *et al.*, 1994) y el colesterol, presentando actividad de fosfolipasa o formando poros transmembranales.

Varios investigadores han demostrado que hay una diferencia significativa en la acción de las hemolisinas sobre eritrocitos de diferentes especies. La explicación para estas diferencias se basa en la distinta proporción de los componentes lipídicos de la membrana de cada una de ellas. Por ejemplo, la membrana de los eritrocitos de oveja y de rumiantes en general, contiene alrededor de tres veces más esfingomielina que los eritrocitos humanos (Rottini *et al.*, 1995). En el estudio de Rottini *et al.* (1995) con *Carybdea marsupialis* se

demuestra la diferencia en la sensibilidad entre eritrocitos de oveja, humano y conejo, siendo los primeros los más susceptibles a la lisis.

Debido a que las investigaciones anteriores describen la acción de las hemolisinas sobre eritrocitos de diferentes especies, en el presente trabajo se investigó si la acción de estas toxinas puede también afectar a los eritrocitos de una misma especie, considerando que los grupos sanguíneos humanos se diferencian por la presencia o ausencia de ciertas proteínas. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el grado de sensibilidad de los eritrocitos humanos, lo cual puede deberse a la constitución similar de los componentes membranales.

Por otro lado, las hemolisinas pueden tener actividad de tipo lectina, lo cual se evidencia en la especificidad que presentan ante diferentes tipos sanguíneos. Las lectinas son proteínas específicas que pueden unirse a ciertas células o provocar su aglutinación. Esta especificidad se hace evidente en su capacidad para distinguir entre los eritrocitos de los tipos sanguíneos A, B y O, debido a su diferencia en la estructura de los grupos oligosacáridos (Zenteno *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 2001).

En este trabajo, al no encontrar diferencias en el efecto hemolítico de las toxinas de *Carybdea marsupialis*, se podría descartar que tengan actividad de tipo lectina, aunque se sugiere realizar un ensayo de aglutinación.

Pérdida de la actividad biológica de las hemolisinas

En este trabajo se aislaron varias hemolisinas constitutivas del veneno de *Carybdea marsupialis*, las cuales perdieron considerablemente su actividad tras el proceso de purificación al que fueron sometidas. Esto ha sido observado en estudios previos con toxinas de medusas, como lo demuestran Burnett *et al.* (1973), Edean *et al.* (1993), Nagai (2003) y con otros cnidarios Bernheimer y Avigad (1976).

Rottini *et al.*, (1995) y Chung *et al.*, (2001) establecen que la inestabilidad de las citolisinas es dependiente de la temperatura y de cambios en la estructura molecular provocados por proteasas. Los primeros autores afirman que incluso en temperaturas bajas de -36°C se pierden sus propiedades entre 7 y 10 días.

En varios estudios realizados en este sentido se ha registrado una pérdida de la potencia de las toxinas tras los primeros procedimientos de extracción y purificación (Comis y Howden, 1988; Nagai *et al.*, 2000; Rottini *et al.*, 1995), así como la pérdida de material tras su concentración. De manera que es difícil obtener una alta recuperación con poca pérdida de la actividad biológica.

En su trabajo más reciente, Nagai (2003) observa que la toxicidad de las proteínas de *Carybdea rastoni* disminuyeron considerablemente su actividad durante el proceso de purificación, almacenamiento y concentración de las muestras. Encontró que éstas deben almacenarse inmersas en grandes concentraciones de sales y sugiere el empleo de 0.8M NaCl y $5\mu\text{m}$ de Buffer de fosfatos pH6 y una temperatura de 4°C . Bajo estas condiciones logró mantener el 90% de la actividad hemolítica por más de seis meses, debido a que las proteínas se logran estabilizar por puentes salinos y otras interacciones. Además, calculó el punto isoeléctrico de las proteínas, el cual mostró su naturaleza básica, por lo que presentan tendencia a adherirse en vidrios, por lo que sugiere emplear otros materiales para su manejo y almacenamiento.

En este trabajo se mantuvieron tanto el extracto crudo, como las fracciones prepurificadas a -60°C , las primeras en agua desionizada con inhibidores de proteasas y las segundas en ácido acético 0.7M, lo cual pudo haber influido en la disminución de la actividad hemolítica, como se observó en los ensayos con las fracciones purificadas. Por otro lado, probablemente las proteínas con actividad biológica de *Carybdea marsupialis* actúan de manera cooperativa y sinérgica, como lo ha propuesto Hessinger y Lenhoff (1987). Esto indica que las proteínas que conforman el veneno, más que actuar de forma independiente lo hacen interactuando unas con otras.

Con base en estos resultados, se sugiere que para aislar las hemolisinas del veneno de las medusas, se limite el número de pasos durante la purificación, se almacenen las muestras el menor tiempo posible en el medio y la temperatura adecuados y se eviten los cambios de temperaturas.

Finalmente, es importante mencionar que en la literatura se sugiere que el mejor método para la purificación de hemolisinas es la cromatografía de intercambio iónico, la cual ha sido empleada exitosamente para varias especies de cubomedusas como *Carybdea marsupialis* (Rottini *et al.*, 1995), *Chrisopsalmus quadrigatus*, *Carybdea alata* (Nagai *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2001), cuyos resultados indican la eficacia de este método para el aislamiento de proteínas lábiles, además de una alta recuperación de proteínas.

Purificación de las proteínas del extracto crudo de *Carybdea marsupialis*

Las toxinas de los cnidarios han sido extensamente estudiadas y su caracterización parcial ha indicado que en su mayoría son de origen proteico. Sin embargo, y a diferencia de otros cnidarios, las proteínas de las medusas son extremadamente grandes y por consiguiente lábiles ante pequeños cambios de temperatura, pH, etcétera, por lo que sus propiedades químicas exactas no han podido ser elucidadas (Rottini *et al.*, 1995, Chung *et al.*, 2001).

Cuando se conocen las propiedades físicas y químicas de las proteínas de interés resulta más sencillo elegir un método de purificación, así como las operaciones de remoción de solutos y concentración de fracciones, ya que el peso molecular determina el límite de exclusión de las membranas empleadas en las diálisis, así como el tamaño de los poros del medio cromatográfico, puesto que éstos deben excluir completamente la proteína en estudio para obtener una recuperación rápida sin pérdida de material.

En el caso de *Carybdea marsupialis* es poco lo que se conoce acerca de las proteínas constitutivas de su veneno, de forma que el método de purificación que se desarrolló en este trabajo se basó en las diferentes propiedades de

separación de los geles cromatográficos empleados. Primero, filtración en gel para separar los componentes del extracto crudo por tamaño, posteriormente fue necesario emplear cromatografía de intercambio aniónico y catiónico y finalmente cromatografía de fase reversa. En total, la purificación de las proteínas se realizó en seis pasos.

En la filtración en gel, las proteínas se separan por tamaño conforme migran por la matriz de la columna. Las proteínas más pequeñas son las primeras que salen debido a que son excluidas de la matriz, mientras que las más grandes son retenidas por ésta.

En la cromatografía por intercambio iónico, las proteínas se separan de acuerdo a su carga resultando en una buena resolución. Para esta cromatografía se empleó acetato de amonio como eluyente, debido a que no interactúa con las proteínas, manteniendo su actividad biológica. Este se mantuvo con un pH constante (5.4 para intercambio catiónico y 8.5 para intercambio aniónico) para mantener estables las cargas de las proteínas, ya que los cambios en el pH pueden ocasionar un cambio en la composición de las cargas. Dicho eluyente se introdujo en la columna de manera continua con un gradiente escalonado para desplazar las proteínas en la columna. En este caso se eligió un gradiente de seis molaridades distintas para conseguir una separación completa y recuperación de las mismas. Durante todos los pasos de la purificación, se monitoreó la elusión de las proteínas con un detector UV a 280nm. Esto es porque la mayoría de las proteínas contienen residuos aromáticos que tienen un máximo valor en este punto.

Una vez separadas las proteínas, se procedió a utilizar HPLC fase reversa para determinar su pureza. En este tipo de cromatografía, las proteínas se separan de acuerdo a su carácter hidrofóbico, mediante un gradiente lineal de un solvente orgánico, que en este caso fue el acetonitrilo. El gradiente que se empleó en este trabajo TFA/Acetonitrilo 10/80 significa que el gradiente comienza con un 10% de acetonitrilo y pasa a un 80% en 60 minutos. Los péptidos y proteínas eluyen dependiendo de su interacción con la matriz,

aunque generalmente lo hacen cuando el solvente orgánico alcanza un 30%. En este caso se dejó que el gradiente llegara a 80% para asegurar la salida de todo el material.

En cuanto a las características de la columna empleada, la elección de Microsorb C4 de 300Å (Varian) se debió a que permite una buena separación de proteínas de alto peso molecular, como las presentes en *Carybdea marsupialis*. Las columnas de 100Å generalmente se emplean para la separación de moléculas pequeñas. La fase estacionaria de las columnas está formada por una cadena de elementos hidrofóbicos ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) que interactúan con la muestra. C4 significa que la longitud de la cadena es pequeña, lo cual se emplea para la separación de proteínas, ya que éstas tienen más regiones hidrofóbicas que pueden interactuar con la fase estacionaria. C18 es generalmente usada para péptidos u otras moléculas pequeñas.

El gradiente empleado en este trabajo sirvió para separar adecuadamente las toxinas. Por convención, el solvente A es agua con 0.1% de ácido y el B debe ser un solvente orgánico ya sea acetonitrilo, metanol o propanol con 0.1% de ácido. El ácido se utiliza para mejorar la resolución de los picos, mientras que el solvente orgánico se emplea porque se disuelve en las muestras y después se evapora con facilidad. Para este trabajo se eligió el empleo de Acido trifluoroacético y de acetonitrilo.

Analizando los resultados obtenidos en este trabajo, a pesar de que resultó difícil estabilizar la línea base de los cromatogramas y de que se aprecia un poco de ruido, todos mostraron que se obtuvo un alto grado de pureza en las proteínas separadas.

En el caso de la neurotoxina, el pico con actividad se detectó a los 41.176 minutos a una concentración de 39% de acetonitrilo. Este pico resultó casi

homogéneo y se comprobó por medio de electroforesis que se trata de una sola proteína.

En cuanto a las hemolisinas, los cromatogramas presentaron varios picos que muestran la posible presencia de isómeros, conformaciones diferentes de la misma proteína, o proteínas diferentes. Para evaluar la pureza de dichas fracciones se propone resolverlas en un trabajo posterior, por medio de un espectrofotómetro de masas.

Es importante mencionar que la cromatografía por fase reversa es una parte importante de la caracterización de las proteínas ya que se determina el tiempo de retención para cada una.

Finalmente, es conveniente señalar que otro problema que surge al trabajar con proteínas es la baja recuperación del material, por lo que son necesarios numerosos organismos para su estudio (Othman y Burnett, 1990; Nagai *et al.*, 2000; Radwan *et al.*, 2001). Por ello, fue favorable trabajar con *Carybdea marsupialis* ya que es una medusa sumamente abundante en las aguas del Caribe mexicano, por lo que debería ser considerada como un candidato útil para continuar investigando sus compuestos y las posibilidades farmacológicas de éstos.

Caracterización de las proteínas

Los pesos moleculares de las citolisinas de cnidarios oscilan entre 15 y 250 KDa, siendo las de las cubomedusas de las más grandes registradas hasta ahora. Por ejemplo la hemolisina de *Carybdea marsupialis* CARTOX, purificada por Rottini *et al.* (1995) tiene un peso molecular de 102-107KDa. La hemolisina T₃ de *Chironex fleckeri* (Endean *et al.*, 1991) tiene un peso molecular de 70KDa. Las toxinas A y B de *Carybdea alata* (CaTx-A y CaTx-B) purificada por Nagai *et al.* (2000) tienen un peso molecular de 43 y 45KDa respectivamente, ambas con potente actividad hemolítica. En cuanto a las hemolisinas purificadas de

Carybdea rastoni CrTx-A y CrTx-B se ha calculado un peso molecular de 43 y 46kDa respectivamente (Othman , *et al.* 1996).

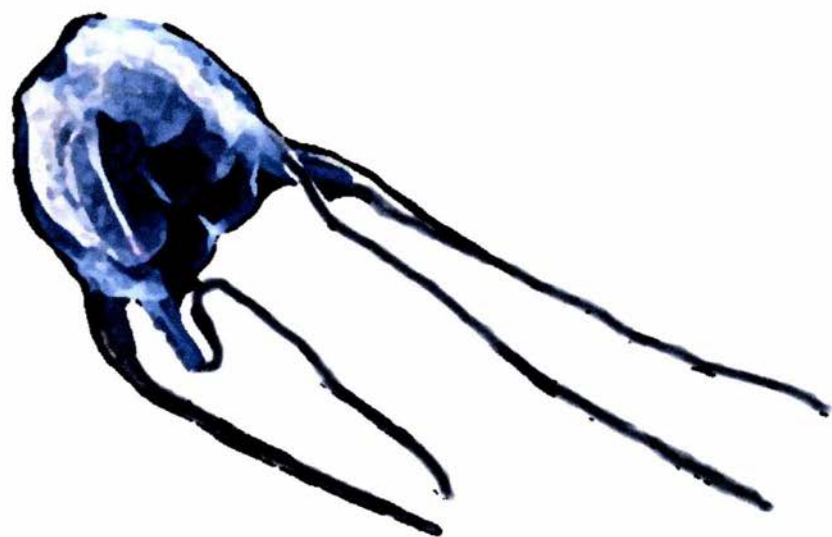
En el caso de las proteínas de *Carybdea marsupialis*, los aparentes pesos moleculares obtenidos fueron los siguientes:

- Neurotoxina 97kDa
- Hemolisina 1 dio dos bandas de 220 y 97kDa
- Hemolisina 5 dio dos bandas de 220 y 45kDa
- Hemolisina 6 dio dos bandas de 97 y 16 kDa
- Hemolisina 7 entre 31 y 45kDa
- Hemolisina 10 dio dos bandas de entre 20 y 30kDa la primera y entre 14 y 20kDa la segunda

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores para diferentes especies de medusas. Se observan pesos moleculares muy altos debido a la gran complejidad de las proteínas de estos organismos.

Finalmente, a partir de este trabajo se puede observar que el área de la toxicología de cnidarios es muy vasta y existen muchos campos posibles de investigación. En este proyecto, se obtuvieron 13 fracciones con actividad biológica, después del primer proceso de separación cromatográfica del extracto crudo. Posteriormente, se trabajó con sólo una de esas fracciones, por lo que se hace evidente que queda aún mucho que investigar acerca de las toxinas de *Carybdea marsupialis*. Se sugiere realizar un ensayo de aglutinación para evaluar lectinas, realizar una tabla de rendimiento donde se indique el rendimiento del método y la actividad específica de cada una de las proteínas separadas, así como un electroenfoque para determinar el punto isoeléctrico de las proteínas.

CONCLUSIONES



Conclusiones

- El método de descarga utilizado en los nematocistos por homogeneización resultó rápido y efectivo para la obtención del extracto crudo.
- El empleo de inhibidores de proteasas, así como la congelación del extracto crudo a -60°C constituyen un buen recurso para mantener la actividad biológica de las toxinas hasta su empleo.
- La determinación de proteínas, así como la realización de una electroforesis con el extracto crudo, brindaron un resultado importante acerca de la composición protéica del veneno de *Carybdea marsupialis*, lo cual es fundamental al trabajar con sustancias novedosas, de las que no se conocen sus propiedades físico-químicas.
- El veneno de *Carybdea marsupialis* contiene sustancias que forman poros y lisan las membranas celulares, por lo que se puede concluir que las toxinas de esta especie tienen actividad hemolítica sobre los eritrocitos.
- Asimismo, el veneno contiene sustancias neurotóxicas que afectan canales iónicos, causando parálisis y muerte en los cangrejos.
- La Dosis Letal media (DL_{50}), en sardinas fue de $455.31 \mu\text{g}$ de proteína, que corresponde a $26 \mu\text{g/g}$ de peso corporal. Las toxinas provocaron movimientos laterales incontrolados, parálisis y muerte en estos organismos.

- La DL_{50} en cangrejos fue de $15.8\mu\text{g}$ de proteína, que corresponde a $1.05\mu\text{g/g}$ de peso corporal. Las toxinas provocaron reacciones de tipo tetánico, parálisis y muerte en estos organismos.
- El 100% de hemólisis en eritrocitos humanos de diferente tipo sanguíneo se alcanzó con 1.5mg/ml en todos, lo cual equivale a $119.4\mu\text{g}$ de proteína. Las toxinas provocaron la ruptura completa de los eritrocitos humanos.
- El método de purificación utilizado en este trabajo, dio buenos resultados en la purificación de las neurotoxinas, debido a la estabilidad de las mismas y a la recuperación de material. La proteína aislada presentó fuerte actividad sobre cangrejos, ocasionando su muerte.
- En el caso de las hemolisinas, durante el proceso de purificación se observó una pérdida de su actividad biológica. Para evitar lo anterior se sugiere realizar la purificación en el menor tiempo posible, y como indica Nagai (2003) almacenar las muestras en grandes concentraciones de sal sin congelarlas.
- Se debe elegir un orden en los pasos de la separación que lleven a la dilución de la muestra de proteínas. La combinación de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y HPLC resultó provechosa en este respecto.
- Las proteínas de *Carybdea marsupialis* tienen pesos moleculares elevados, con un intervalo entre 250 y 14kDa , aunque cabe señalar que no se realizó una electroforesis para proteínas de bajo peso molecular, por lo que podrían haber más pequeñas.

ANEXO



ANEXO

Sobre los métodos y procesos empleados

Liofilización

Este proceso permite una deshidratación completa de la muestra, sin aumentar la temperatura mediante un proceso de sublimación, de manera que la actividad biológica de las proteínas de interés no se ve afectada.

Electroforesis

La electroforesis en gel se halla entre los métodos más resolutivos y convenientes en la separación molecular. En esta técnica, los geles retrasan las moléculas grandes con respecto a las menores al migrar a través del gel por efecto de un campo eléctrico. El aislamiento molecular se basa en la filtración en gel, así como en las moviidades electroforéticas de las moléculas que se están separando. Los geles de uso común son la poliacrilamida y la agarosa, que poseen poros de dimensiones moleculares cuyos tamaños pueden especificarse (Walker, 1996; Hawcroft, 1997).

Preparación y reactivos

Soluciones "Stock"

A. Acrilamida/Bis-acrilamida

87.6g acrilamida (29.2g/100ml)

2.4g N'N'-bis-metil-acrilamida (0.8g/100ml)

Aforar a 300ml con agua desionizada. Guardar a 4°C en oscuridad (30 días máximo)

B. 1.5M Tris-HCL pH 8.8

27.23g Tris base (18.15g/100ml)

80ml agua desionizada

Ajustar pH 8.8 con 6N HCl. Aforar a 150ml con agua desionizada.

Guardar a 4°C

C. 0.5M Tris-HCL pH 6.8

6g Tris base

60ml agua desionizada

Ajustar pH 6.8 con 6N HCl. Aforar a 100ml con agua desionizada.

Guardar a 4°C

D. SDS 10%

Disolver 10g SDS (dodecil sulfato de sodio) en 90ml de agua desionizada. Aforar a 100ml. Guardar a temperatura ambiente.

E. Buffer reductor de muestra

3.3ml Agua desionizada

1.0ml 0.5M Tris-HCl pH 6.8

0.8ml Glicerol

1.6ml SDS 10%

0.4ml 2-mercaptoetanol

0.4ml Azul de Bromofenol 1%

8ml

Diluir la muestra al menos 1:4 y calentar a 95°C por 4 minutos

F- Buffer electrodo 5X (URNG buffer)

9g (15g/l) Tris base

43.2g (42g/l) Glicina

3g (5g/l) SDS

Aforar a 600ml con agua desionizada. Guardar a 4°C. Calentar a temperatura ambiente antes de usar. Diluir 60ml 5X en 240ml de agua desionizada para una electroforesis

Gel de separación

	Bajo peso molecular	Alto peso molecular
	12%	7.5%
Agua desionizada	3.35ml	4.85ml
Tris pH 8.8	2.5ml	2.5ml
SDS 10%	100 μ l	100 μ l
Acrilamida	4.0ml	2.5ml
Persulfato de amonio 10%	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l
Cantidad total	10ml	10ml

Gel "stacking"

	4%
Agua desionizada	6.1 ml
Tris pH 6.8	2.5ml
SDS 10%	100 μ l
Acrilamida	1.33ml
Persulfato de amonio 10%	50 μ l
TEMED	10 μ l
Cantidad total	10ml

Determinación de proteínas

En este método se añade un colorante ácido (azul de Coomassie G-250) a la solución de proteínas y después se mide con un espectrofotómetro la absorbancia a 595nm dado que la mayor forma de azul aniónica del reactivo de Bradford que se une a proteínas, tiene una absorbancia máxima de 595nm. Por lo tanto la cuantificación de proteína puede ser estimada al determinar la cantidad de

colorante en la forma azul iónica (Bradford, 1976; Harris y Angal. 1989; Walker, 1996).

Las ventajas de este método son rapidez y sensibilidad; es relativamente libre de interferencia por reactivos bioquímicos comúnmente usados, así como por componentes no proteicos. Las desventajas que presenta son que se tiene alguna variabilidad de respuesta entre las diferentes proteínas purificadas; las proteínas usadas en este ensayo son irreversiblemente desnaturalizadas (Bradford, 1976; Harris y Angal. 1989; Walker, 1996).

Bioensayos

Los bioensayos son pruebas con organismos vivos o células que permiten conocer las actividades de las toxinas de interés. En algunos bioensayos se emplean animales para detectar y cuantificar toxinas que afectan específicamente membranas excitables (neurotoxinas) y otro tipo de membranas celulares (citolisinas y hemolisinas). Una ventaja de los ensayos con animales es que éstos responden a una variedad de toxinas que afectan diferentes sistemas fisiológicos, lo cual permite la detección de sustancias activas que podrían pasar desapercibidas con ensayos más selectivos (Keddy *et al.*, 1995).

Purificación de proteínas

Los medios más poderosos y útiles para la separación de proteínas, basándose en el tamaño y en la carga de las mismas, son la cromatografía de filtración sobre gel y la cromatografía de intercambio iónico respectivamente (Lehninger, 1985).

En la filtración en gel, las moléculas en solución son separadas por tamaño conforme atraviesan una columna que contiene gel como medio cromatográfico. Las moléculas más pequeñas al difundirse en el gel avanzan más lentamente que

las grandes, las cuales se mueven continuamente hasta abandonar primero la columna, seguidas por las moléculas siguientes en tamaño (Gel filtration 2000).

El gel es un sistema de fase heterogéneo conformado generalmente por una fase sólida (matriz) en cuyos poros contiene una líquida. Estos poros son de diferentes tamaños dependiendo del gel y por ello es importante elegir cuidadosamente el que se requiere para cada uno de los diferentes pasos de la purificación.

El Sephadex está compuesto por una matriz de dextrano con epíclorohidrina, la cual se expande en una solución acuosa. Existen diferentes tipos de Sephadex que difieren en el grado de uniones cruzadas, en el grado de expansión y en el intervalo de fraccionamiento para lograr una purificación completa.

La cromatografía de intercambio iónico (IEC) está diseñada específicamente para separar compuestos iónicos o ionizables. De manera similar a la filtración en gel, la IEC tiene una fase estacionaria y una móvil, sin embargo, en la fase estacionaria existen grupos funcionales ionizables unidos por enlaces químicos, junto con cargas de signo opuesto o counteriones que no están fijas y pueden ser desplazadas. La IEC recibe su nombre con base en estas últimas, es decir que una columna de intercambio aniónico contiene cargas fijas positivas y una catiónica contiene cargas fijas negativas (Rossomando, 1990). La cromatografía de intercambio iónico involucra dos eventos separados: 1) la unión de la proteína a las cargas fijas y 2) la elución o desplazamiento de las mismas. Cuando se coloca la muestra en una columna de intercambio iónico, primero las proteínas son retenidas por las cargas fijas como resultado de una interacción electrostática entre ellas. Esta unión involucra el desplazamiento de los counteriones que se encontraban ahí por las proteínas.

Cuando se comienza a eluir la muestra, los nuevos counteriones contenidos en el eluyente empiezan a desplazar a las proteínas debido a su mayor afinidad por las cargas.

La cromatografía de Fase Reversa (RPC) permite separar moléculas con base en su polaridad, ya que se emplean interacciones hidrofóbicas para retener las proteínas. En este tipo de cromatografía hay una fase estacionaria, compuesta de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos, lo cual convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Una fase móvil débil que generalmente consiste de una solución acuosa ácida (ácido trifluoroacético 0.1%, ácido fosfático 1%, fosfato de trietil-amonio, etcétera) y otra fase móvil eluyente compuesta por un solvente orgánico polar como agua, metanol, 2-propanol o acetonitrilo (www.depa.pquim.unam.mx).

Una vez que la muestra es inyectada en la fase móvil de la columna, las proteínas son retenidas por las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Aunque estas interacciones son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas por lo que la muestra es retenida hasta que una adecuada concentración del solvente orgánico comienza a desplazar a las proteínas. Como es casi siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente; se puede substituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente (Roman y Fred, 1990).

Purificación de proteínas

El último paso de la purificación fue la filtración en G-25 de las fracciones más abundantes obtenidas por intercambio catiónico en Fractogel EMD SO_3^- 650M (Merck). A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos en la columna empacada con Sephadex G-25.

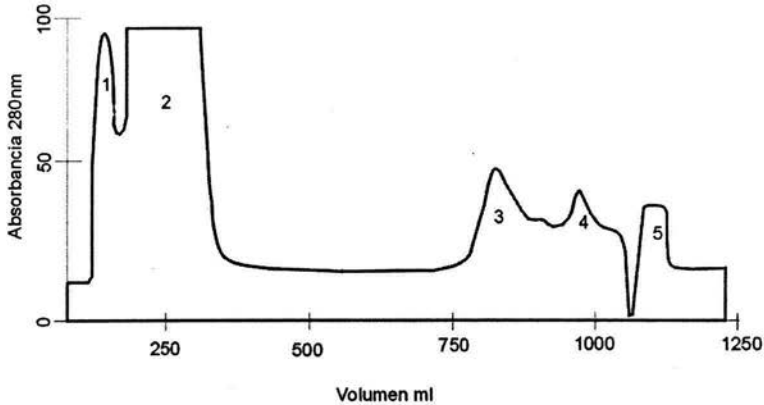


Figura 25. Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción 1 de QAE Sephadex A-25, fracción 1 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.

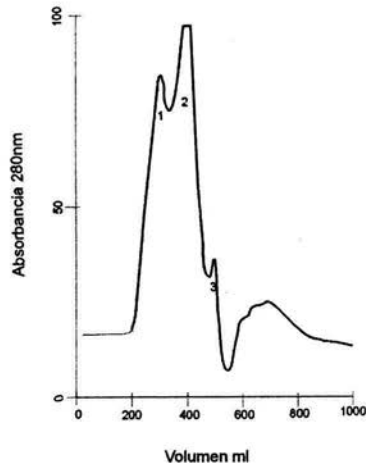


Figura 26. Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción 1 de QAE Sephadex A-25, fracción 2 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.

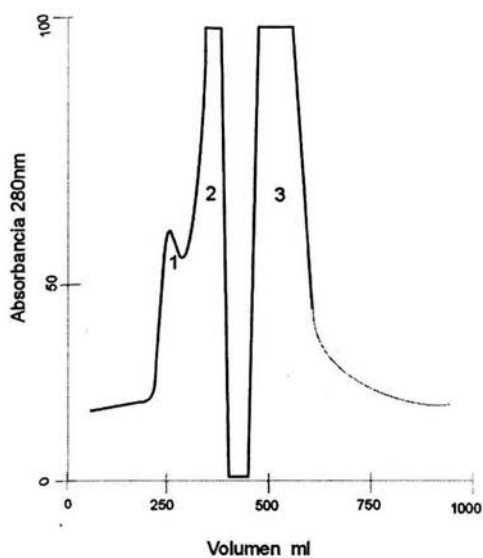


Figura 27. Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción1 de QAE Sephadex A-25, fracción 3 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.

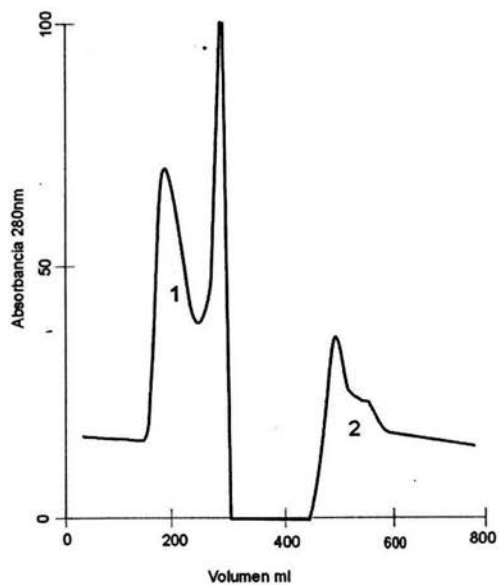


Figura 28. Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción1 de QAE Sephadex A-25, fracción 4 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.

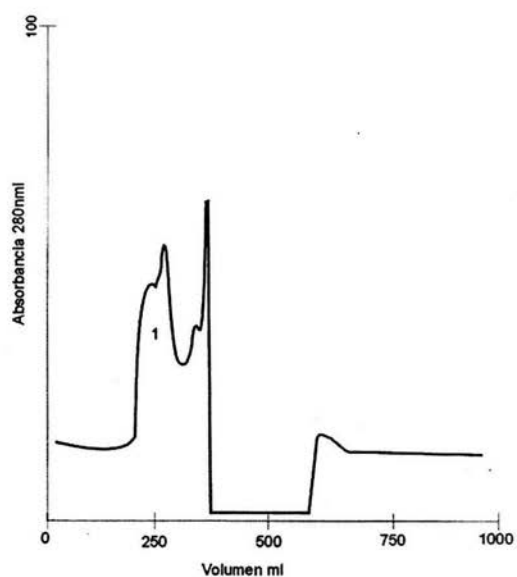


Figura 29. Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción1 de QAE Sephadex A-25, fracción 5 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.

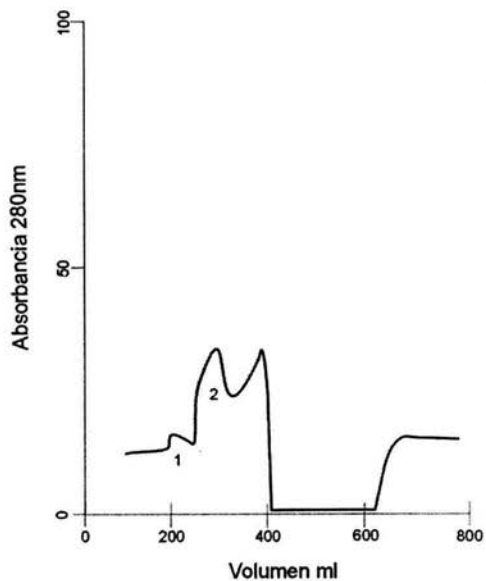


Figura 30. Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción1 de QAE Sephadex A-25, fracción 6 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.

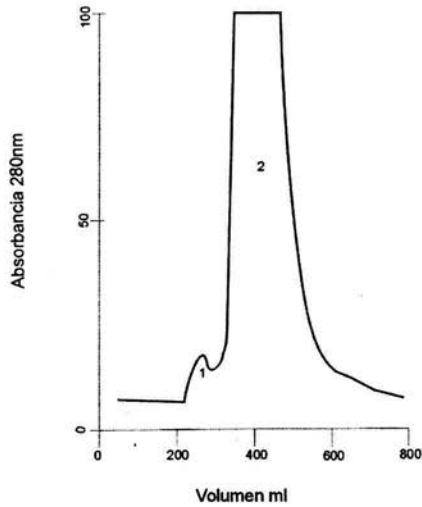


Figura 31. Purificación parcial en Sephadex G-25 de fracción 3 de G-50, fracción2 de QAE Sephadex A-25, fracción 1 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.

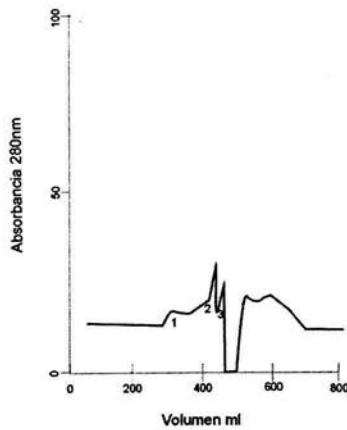


Figura 32. Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción2 de QAE Sephadex A-25, fracción 2 G-50, fracción 1 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.

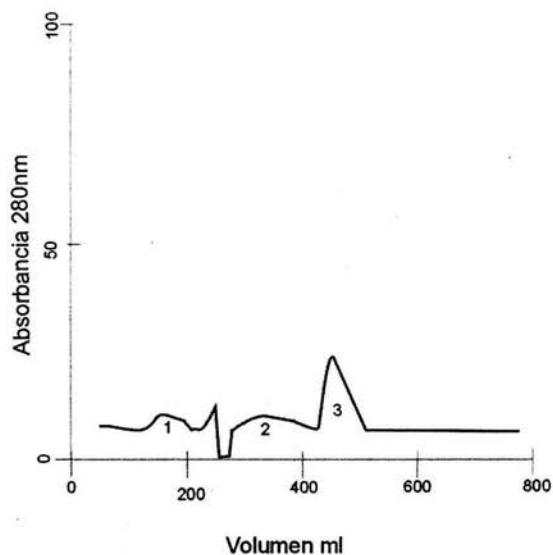


Figura 33. Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción 2 de QAE Sephadex A-25, fracción 2 de G-50, fracción 1-2 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.

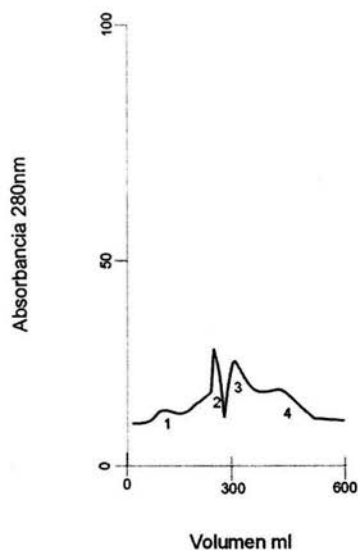


Figura 34. Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción 2 de QAE Sephadex A-25,, fracción 2 de G-50, fracción 1-3 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.

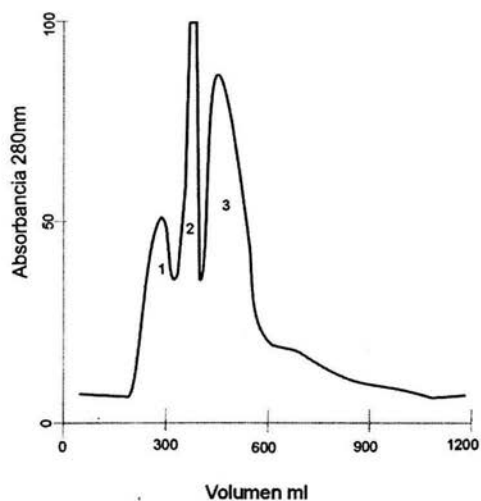


Figura 35. Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción 4 de QAE Sephadex A-25, fracción 2 de G-50, fracción 1 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.

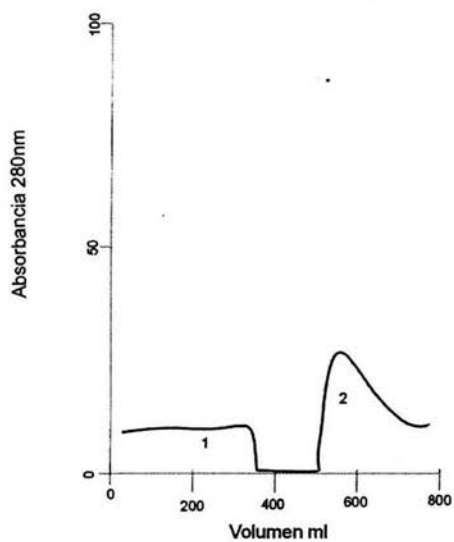


Figura 36. Purificación parcial en Sephadex G-25 de la fracción 3 de G-50, fracción 4 de QAE Sephadex A-25, fracción 2 de G-50, fracción 2 de Fractogel EMD SO_3^- 650 M.

REFERENCIAS



Referencias*

- Aneiros, A., Karlsson, E., Béress, L., Garateix, A., Alvarez, J., Soto, E., Salinas, E., 1998. Isolation of toxins from the Caribbean sea anemones *Bunodosoma granulifera* and *Phyllactis floscuifera*. *Toxicon* 36, 1276.
- Avian, M., Budri, N., Rottini, L., 1997. The nematocysts of *Carybdea marsupialis* Linnaeus, 1758 (Cubozoa). *Proc. 6th Int. Conf. Coel. Biol.* 1995, 29-26.
- Avila, S.G., 2001. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Azila, N., Othman, I., 1991. Pharmacological effects of various jellyfishes found in Malaysian waters. *International Society of Toxinology Meeting*, Singapore.
- Barnes, J.H., 1966. Observations on jellyfish stings in North Queensland. *Med. J. Aust.* 2, 993.
- Baslow, M.H., 1977. *Marine pharmacology*. Robert E. Kroeger Publishing Co. USA.
- Béress, L., Wunderer, G., 1975. Purification of three polypeptides with neurotoxic and cardiotoxic activity from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Toxicon* 13, 359-367.
- Béress, L., Wunderer, G., 1976. Purification and characterization of four polypeptides with neurotoxic activity from the *Condylactis aurantiaca*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 409-414.

* Basadas en las normas de la revista *Toxicon*.

- Béress, L., Ritter, R., Ravens, U., 1982. The influence of the rate of electrical stimulation on the effects of the *Anemonia sulcata* toxin II in guinea-pig papillary muscle. Eur. J. Pharmacol. 79, 265-272
- Bernheimer, A.W., Avigad, L.S., 1976. Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*, including specific bonding to sphingomyelin. Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 467-471.
- Bernheimer, A.W., Rudy, B., 1986. Interactions between membranes and cytolytic peptides. Biochem. Et Bioph. Act 864, 123-141.
- Blanquet, R.S., 1968. Properties composition of the nematocyst toxin of the sea anemone *Aiptasia pallida*. Comp. Biochem. Physiol. 25, 893-902.
- Blanquet, R.S., 1972. A toxic protein from the nematocyst of the scyphozoan medusae *Chrysaora quinquecirrha*. Toxicon 10, 103-109.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brown, H.C., 1950. Keratins in invertebrates. Nature 166 (4219), 439.
- Bruhn, T., Schaller, C., Schulze, C., Sanchez-Rodriguez, J., Dannmeier, C., Ravens, U., Heubach, J.F., Eckhardt, K., Schmidtmayer, J., Schmidt, H., Aneiros, A., Wachter, E., Beress, L., 2001. Isolation and characterisation of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. Toxicon 39, 693-702.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 1990. Invertebrates. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA.
- Burnett, J.W., Goldner, R., 1970. Effect of *Chrysaora quinquecirrha* (sea nettle) toxin on rat nerve and muscle. Toxicon 8, 179-181.

- Burnett, J.W., Calton, C.J., Garbus, J., Max, S.R., 1973. The effects of *Chrysaora* and *Physalia* venoms on mitochondrial structure and function. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143, 971-977.
- Burnett, J.W., Calton, C.J., Larsen, J.B., 1986. Significant envenomation by *Aurelia aurita*, the moon jellyfish. Toxicon 26, 215-217.
- Chung, J., Ratnapala, L., Cooke, I., Yanagihara, A., 2001. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. Toxicon 39, 981-990.
- Comis, R.F., Howden, E.M., 1988. Stabilization of lethal and hemolytic activities of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) venom. Toxicon 27, 439-447.
- Conn, P.M., 1993. Neuropeptide analogs, conjugates and fragments. Ac Press. Inc. New York. USA.
- Endean, R., Henderson, L., 1969. Further studies of toxic material from nematocysts of the cubomedusan *Chironex fleckeri*. Toxicon 7, 303-314.
- Endean, R., Henderson, L., 1974. Some aspects of the biological activity of crude nematocyst toxin from *Chironex fleckeri*. Bioactive compounds of the sea, 1.
- Endean, R., Rifkin, J.F., Daddow, L., 1991. Envenomation by the box jellyfish *Chironex fleckeri*: how nematocyst discharge. Hydrobiology 216/217, 641-648.
- Endean, R., Monks S.A., Cameron, A.M., 1993. Toxins from the box-jellyfish *Chironex fleckeri*. Toxicon 38, 931-943.
- Estrada, N., 2001. Tesis. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México.

- Fenner, P., Mulcahy, M., Williamson, J., 1996. Historical background to marine envenomation. In: Williamson J, A., Fenner P, J., Burnett, J, W., Rifkin, J. (Eds), *Venomous and poisonous marine animals: a medical and biological handbook*. Univ. New South Wales Press, Sidney. pp. 40-54.
- Gel filtration, principles and methods. 2000. 8th edition. Amersham Pharmacia. Biotech.
- Gilman, A.G., Goodman L.S., Rall T.W., Murad F., 1985. *The pharmacological basis for therapeutics*. McMillan, London.
- Halstead, B., 1988. *Poisonous and venomous Marine Animals of the world* The Darwin Press, London.
- Harris, E.L., Angal, S., 1989. *Protein purification methods. A practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Hashimoto., 1979. *Marine toxins and other Bioactive Marine Metabolites*. Japan, Scientific Societies Press, Tokyo.
- Hawcroft, D.M., 1997. *Electrophoresis: The basics*. IRL Press, Oxford.
- Heimer de la Cotera, E., Aguilar Ramírez, M., López Vera, E., Maillo., Peñalver, M., 2002. Purificación, caracterización y evaluación de péptidos y proteínas neuroactivas provenientes de invertebrados marinos, trabajos de la comunidad, www.venenonemia.org
- Hessinger, D., Lenhoff, H., 1987. *The Biology of Nematocysts*. Academic Press, Inc., USA.
- Hucho, F., 1995. Toxins as tools in Neurochemistry. *Angew. Chem. Im. Ed. Engl.* 34, 39-50.

- Jordán, E., Merino, M., Moreno, O., Martin, E., 1981. Community structure of coral reefs in the mexican caribbean. Proc. 4th. Int. Coral Reef Symp. Manila 2, 303-308.
- Keddy, C.J., J.C. Greene., M.A. Bonnell., 1995. Review of whole-organism bioassays: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. Ecotox. Env. Saf. 30, 221-251.
- Keen, T, E., 1971. Comparison of tentacle extracts from *Chiropsalmus quadrigatus* and *Chironex fleckeri*. Toxicon 9: 249-254.
- Kelman, S. N., Calton, G. J., Burnett, J. W., 1984. Isolation and partial characterization of a lethal sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) mesenteric toxin. Toxicon 22, 139-44.
- Kem, W. R., 1988. Sea anemone toxins: structure and action. In: Hessinger, D.A., Lenhoff, H. M. (Eds). The Biology of the Nematocysts. Academic Press, Inc., New York.
- Kem, W.R., Pennington, M., Dunn, B.M., 1990. Sea anemone polypeptide toxins affecting sodium channels. In: Hall & Strcihartz (eds), Marine Toxins. Origin, structure and molecular pharmacology (ACS) Symposium series. 377pp.
- Kramp, P. L., 1961. Sinopsis of the medusae of the world. J. Mar. Biol. Ass. 254-258.
- Lehman, A.L., 1980. Dosis Letal o Efectiva Media: un cálculo manual fácil y rápido. Arch. Far. Toxicol. 6, 161-178.
- Lehninger, A.L., 1985. Bioquímica. Omega, Barcelona.
- Long, K.O., Burnett, J.W., 1989. Isolation, characterization and comparison of hemolytic peptides in nematocyst venoms of two species of jellyfish:

Chrysaora quinquecirrha and *Cyanea capillata*. Comp. Biochem. Physiol. 94B (4), 641-646.

- Lotan, A., Fishman, L., Zlotkin, E., 1995. Delivery of a nematocyst. Nature 375, 456.
- Mäcek, P., Belmonte, G., Pederzoli, C., Menestrina, G., 1994. Mechanism of action of equinatoxin II, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia equina*. Toxicology 87, 205-227.
- Martínez-Martos, J.M., Ramirez, M.J., Iribar, C., Peinado, J.M., 1998. Las neurotoxinas naturales como herramientas farmacológicas para el estudio del Sistema Nervioso Central. Rev. Neurol. 26 152, 584-591.
- Matsui, T., Hamako, J., Ozeki, Y., Titani, K., 2001. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. Biochem. Biophys. acta 1525, 50-57.
- Mebs, D., 2001. Toxicity in animals. Trends in evolution? Toxicon 39, 87-96.
- Mebs, D., 2002. Venomous and poisonous animals: A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists. CRC Press, Germany.
- Merino, M., Otero, L., 1991. Atlas ambiental costero, Puerto Morelos, Quintana Roo. ICMYL, UNAM y Cen. Inves. Quintana Roo, México.
- Milla, L., Segura, L., Celis, L., Heimer de la Cotera, E., 2000. Dermatitis por contacto con *Carybdea marsupialis* (Cnidaria cubozoa). Dermatología Rev. Mex. 44(4), 167-70.

- Nagai, H., Takuwa K., Nakao M., Sakamoto B., Crow G., Nakajima T., 2000. Isolation and characterization of a novel protein toxin from the Hawaiian box jellyfish (Sea Wasp) *Carybdea alata*. Biomed. Biophys. Res. Com. 275, 589-594.
- Nagai, H., 2003. Recent progress in jellyfish toxin study. J. Health Sci. 49, 337-340.
- Nagase, H., Karaki, H., Ozaki, H., Urakawa, N., Azuma, H., Nakajima, T., 1987. Contractile and relaxant effects of jellyfish toxin on the vascular and intestinal tissue. Comp. Biochem. Physiol. 86(2), 411-414.
- Norton, R.S., 1991. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with sodium channel. Toxicon 29 (9), 29-41.
- Othman, I., Burnett, J.W., 1990. Techniques applicable for purifying *Chironex fleckeri* venom. Toxicon 28, 821-835.
- Othman, I., Eldila, M., Mustafa, M., Musa, M., Musa, N., 1996. Studies on jellyfish *Carybdea rastonii*. Toxicon 34, 167.
- Othman, I., Fathilah, M.R., Mustafa, J., Mohd, S., Azila, N., 1997. Isolation and characterization of active compounds from the jellyfish *Rhopilema hispidum* (Vanhoffen, 1888). Proc. 6th. Int. Con. Coel. Biol. 1995.
- Picken, L.E., 1953. A note on the nematocysts of *Corynactis viridis*. Ovar. J. Microscop. Sci. 94(3), 203-227.
- Picken, L.E., Skaer, R. J., 1966. A review of researches on nematocysts. Symp. Zool. Soc. London. 16, 19-50.
- Radwan, F.F., Burnett, J.W., Bloom, D.A., Coliano, M.E., Eldefrawi, H., Erderly, L., Aurelian Torres, M., Heimer de la Cotera, E., 2001. A

- comparison of the toxinological characteristics of two *Casiopea* and *Aurelia* species. *Toxicon* 39, 245-257.
- Rappouli, R., Montecuccio, C., 1997. Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. Oxford University Press, Oxford.
 - Roman, M. C., Fred, E. R., 1990. High Performance liquid Chromatography: Effective Protein Purification by various Chromatographic Mode. In: Deucher, M. (Ed), *Methods in enzymology*. Academic Press, USA. 182, p 309.
 - Rossomando, E.F., 1990. Ion-exchange Chromatography. In: In: Deucher, M. (Ed). *Methods in enzymology*. Academic Press, USA. 182, p 309.
 - Rottini, G.A., Dobrina, O., Forgiarini, E., Nardon, G., Almirante., Patriarca, P., 1990. Purification and properties of a cytolytic toxin in the venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Toxicon* 33, 315-326.
 - Rottini, G., Gusmani, L., Parovel, E., Patriarca, P., 1995. Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Toxicon* 33, 315-126.
 - Russell, F.E., 2002. International Society on toxinology. P8. Versión modificada de *Toxicon* 25, 3-21 (1987).
 - Shapiro, B.I., 1968. Purification of a toxin from tentacles of the anemone *Condylactis gigantea*. *Toxicon* 5, 253-259.
 - Shick, M. A., 1991. *Functional Biology of sea anemones*. Chapman & Hall, New York, USA.
 - Schweitz, H., Vincent, J., Barhanin, C., Frelin, G., Linden, M., Lazdunsky, M., 1981. Purification and pharmacological properties of eight sea anemone toxins from *Anemonia sulcata*, *Anthopleura xanthogrammica*, *Stoichactis giganteus* and *Actinodendron plumosum*. *Biochemistry* 20, 5245-5252.

- Skaer, R.J., Picken, L.R., 1966. The pleated surface of the undischarged thread of a nematocyst and its stimulation by models. *J. Exp. Biol.* 45,173-176.

- Sobrino, A.S., 1996. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Strichartz, E., Hall, S., Moczydlowski, A., Ravindran., Reichardt, P.B., 1990. The saxitoxins: sources, chemistry, and pharmacology. In: Hall, S and Strichartz, G. (Eds.), *Marine Toxins: Origin, Structure, and Molecular Pharmacology*. American Chemical Society Symposium Series No. 418. Washington, D.C. pp. 29-65.

- Tibbals, J., 2003. Australian Venom Research Unit. <http://www.avru.unimelb.edu.au/avruweb/jellyfi.htm#Box> Jellyfish

- Walker, M, J., 1996. *The protein protocols Handbook*. Humana Press, New Jersey, USA.

- Westfall, J.A., 1966. The differentiation of nematocysts and associated structures in the Cnidaria. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 75, 381-403.

- Williamson, J., Fenner, P.J., Burnett, J.W., Rifkin, J.F., 1996. *Venomous and poisonous marine animals: a medical and biological handbook* Univ. New South Wales, Sydney.

- Zakj, H., Karaki, H., Nagase, H., Urakwa, N., Azuma, H., Nakagima, T., 1986. Contractile effects of jellyfish toxin extracted of *Carybdea rastonii* on isolated rabbit aorta. *Japan J. Pharmac.* 42, 425-430.

- Zenteno, R., Chavez, R., Portugal, D., Paez, A., Lascurain, R., Zenteno, E., 1995. Purification of a N-Acetyl-D-Galactosamine specific lectin from the orchid *Laelia autumnalis*. *Photochemistry* 40 (3), 651-655.
- Zugasti, A., 2001. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.