



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



“EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
ALGUNAS TOXINAS PRESENTES EN LA ANÉMONA *Aiptasia*
pallida”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
(QUÍMICA ACUÁTICA)

P R E S E N T A

Quím. JESSICA NAYELI VILLEGAS MORENO

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Judith Sánchez Rodríguez

COMITÉ TUTORAL: Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Dr. Roberto Arreguín Espinosa

Dra. María Alejandra Rojas Molina

Dr. Abel Santamaría del Ángel

México, D.F., 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios UNAM por dejarme ser parte de ella, al Posgrado de Ciencias de Mar y Limnología especialmente a la Dra. Gloria Vilaclara, Diana Juárez, Chantal Ruiz, Guadalupe (Lupita) Godoy y Gabriela Armaráz por su inmensa ayuda en toda mi estancia en el posgrado y al Laboratorio de Toxinología del ICMYL, por todo el apoyo.

A CONACYT por la beca otorgada con número de becario: 211286.

A la Coordinación de Estudios de Posgrado por la beca otorgada de Fomento a la Graduación de igual manera al Comité de Becas del COMECYT.

Dra. Judith Sánchez, gracias por confiar en mí a pesar de no conocerme en un principio, por su ayuda, apoyo, comprensión y confianza.

A los miembros del Comité Tutoral: Dr. Abel Santamaría, Dr. Manuel Aguilar, Dr. Roberto Arreguín y Dra. Alejandra Rojas.

Al ecoparque Xcaret, especialmente a Roberto Raigoza Figueras y al Ing. Rafael Valdez Cruz, responsables del acuario, por permitirme muestrear y brindarme toda la ayuda posible.

Al M. Macario Morales y al M. Sergio Pavón, por aceptarme y dirigirme en las estancias en la Fac. de Química, UAEMex, para realizar experimentos microbianos.

Dr. Rogelio Arellano Ostoa, por aceptarme para realizar estancias en Juriquilla. Dra. Edith Garay, por sus enseñanzas y paciencia, al Dr. Paco, por sus consejos y a Horacio (por enseñarme a abrir ranas).

A los amigos que hice al iniciar la maestría Maricela Juárez (pitufina), Anaid Urban, Leo Vásques, Aaron Gayosso, que hicieron más amena mi estancia en el D.F.

A todos los administrativos y profesores de la Unidad Académica Puerto Morelos.

A mis compañeros que se convirtieron en amigos y después en mi familia, Lau, amiga te extraño! Manu, Luisfer, Fer, Rich, Manuel, Tania, Jey, Luis, Juan Pablo, Miguel, Román, gracias a todos por todos esos buenos momentos☺.

A Natalia Ayala, por su gran apoyo y por permitirme enseñar, otra de las cosas que son mi pasión: la danza, te extrañaré y obviamente a mis alumnitas: Eve, Jaz, Gen, Enif, Vale, Amaranta, Aida, Ámbar, Samantha, Emilia, Camila, Pao, Fanny, Alexia y Marla.

A los profesores, personal y amistades que participaron en el crucero 2008, fue una experiencia maravillosa, gracias Dra. Vianey, Cap. Barajas, Triana, chef y cocineros, TV UNAM, Lulú (pitufina mayor), Carlo, Angel, Sergio, Sarai, una singular experiencia sin duda.

A Bárbara, Erika, Lety, Ana, Vero y Ale por ayudarme en mi estancia en Juriquilla, y obviamente a los amigos que hicieron una estancia divertida en Querétaro: Alex, Esme, Anita, Chiqui y Clau.

A Enrique, por estar cerca de mí a pesar de la distancia en todo este tiempo, por escucharme, aconsejarme, leerme día a día y por ayudarme en trámites, cromatogramas y de más.

A mis amigas de toda la vida: Mariana, Fanny, Caro, Tania ¡las quiero!

DEDICATORIA

A mi mamá, por todo el amor, la paciencia, los cuidados y por el apoyo que siempre me has dado, gracias por tus enseñanzas.

A mi compañero excepcional, mi hermano: Bet, es bueno tenerte como hermano sino me sentiría muy sola, eres la persona que llegó para alegrarme la vida, gracias por todo, por preocuparte, escucharme, hacerme reír 😊.

A mi papá, Sergio Villegas Yáñez, por el apoyo y ayuda en todo momento.

A mis abuelos: Celia y Teófilo, Lucía y Raúl.

A mi segunda mamá Mary, a mis cuasihermanos Josue, Malú y Dina, a los nuevos miembros de la familia Fanny, Andrea y Disraeli.

*“APRENDAMOS A SOÑAR, SEÑORES,
ENTONCES QUIZÁS ENCONTRAREMOS LA
VERDAD”.*

August Kekulé (1829- 1896).

ÍNDICE GENERAL

	PÁG.
ÍNDICE DE DE FIGURAS Y TABLAS	III
ABREVIATURAS	VI
SIMBOLOGÍA.....	VII
RESUMEN.....	VIII
CAPÍTULO I GENERALIDADES	
1.1. CNIDARIOS	2
1.2. CLASE ANTHOZOA.....	4
1.2.1 Compuestos bioactivos presentes en anémonas	7
1.2.1.1 Citolisinas	7
1.2.1.2 Neurotoxinas	9
1.2.2 Anémona <i>Aiptasia pallida</i>	15
1.2.2.1 Investigaciones realizadas con <i>Aiptasia</i>	17
OBJETIVOS	19
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	20
CAPÍTULO II METODOLOGÍA	
2.1. SITIO DE MUESTREO.....	23
2.2. MUESTREO	24
2.3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO.....	24
2.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	25
2.5. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	25
2.6. ELECTROFORESIS (SDS-PAGE)	26
2.7. BIOENSAYOS	27
2.7.1. Actividad neurotóxica en cangrejos <i>Ocypode quadrata</i>	27
2.7.2. Hemólisis	27
2.7.3. Actividad citotóxica en <i>Artemia salina</i>	28
2.7.4. Actividad tóxica en la medusa <i>Cassiopeia xamachana</i>	28

2.1.1. Determinación del efecto inhibitorio en microorganismos.....	29
2.1.1.1. Siembra de bacterias y hongo	29
2.1.1.2. Preparación del extracto crudo	30
2.1.1.3. Preparación del inóculo.....	30
2.1.1.4. Pruebas de inhibición bacteriana	30
2.1.2. Análisis de la actividad sobre canales iónicos del extracto crudo y de las fracciones obtenidas	31
2.1.2.1.1. Extracción y purificación de ARNm	31
2.1.2.1.2. Obtención de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	32
2.1.2.1.3. Registro electrofisiológico	33

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RECOLECCIÓN	35
3.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO	36
3.3. TIPOS DE NEMATOCISTOS	37
3.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	39
3.5. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	40
3.6. ELECTROFORESIS.....	48
3.7. BIOENSAYOS	50
3.7.1. Actividad neurotóxica en cangrejos <i>Ocypode quadrata</i>	50
3.7.2. Actividad hemolítica en eritrocitos humanos.....	54
3.7.3. Actividad citotóxica en <i>Artemia salina</i>	58
3.7.4. Actividad tóxica en la medusa <i>Cassiopeia xamachana</i>	58
3.7.5. Determinación del efecto inhibitorio en microorganismos.....	59
3.7.6. Análisis de la actividad sobre canales iónicos del extracto crudo y de las fracciones obtenidas	65
CONCLUSIONES	72
RECOMENDACIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

PÁG.

CAPÍTULO I GENERALIDADES

Figura 1.1	Phylum Cnidaria	2
Figura 1.2	Esquema del cnidoblasto	4
Figura 1.3	Ejemplos de organismos de la clase Anthozoa	5
Figura 1.4	Anatomía de una anémona	6
Tabla 1.5	Clasificación de citolisinas (Anderluh, 2000).	8
Figura 1.6	Mecanismo de formación de poros, por actinoporinas (Macék, 2003).....	9
Figura 1.7	Localización de sitios receptores de neurotoxinas en canales de Na _v	12
Tabla 1.8	Algunos estudios realizados en anémonas	14
Figura 1.9	<i>Aiptasia pallida</i>	15
Tabla 1.10	Mapa de ubicación de la <i>Aiptasia. pallida</i>	16
Figura 1.11	Tipos de nematocistos y ubicación en la <i>A. pallida</i> (modificado de Carlgren, 1952).	17

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

Figura 2.1	Diagrama de bloques de la metodología	22
Figura 2.2	Ubicación del sitio de muestreo	23
Tabla 2.3	Microorganismos utilizados en la prueba inhibitoria	29
Figura 2.4	Tratamiento del ovocito para el registro electrofisiológico	33

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 3.1	Fechas y número de ejemplares de <i>A. pallida</i> recolectados en el Eco-parque Xcaret	35
Figura 3.2	Organismos recolectados y peso del extracto liofilizado	36
Figura 3.3	Basitríco cargado y descargado de <i>A. pallida</i> a 40X	38
Figura 3.4	Microbásico p-mastigóforo cargado y decargado <i>A. pallida</i> a 40X	38
Figura 3.5	Espirocisto descargado y cargado <i>A. pallida</i> a 40X.....	39
Tabla 3.6	Cuantificación de proteína del extracto crudo de <i>Aiptasia pallida</i>	39
Figura 3.7	Cuantificación de proteína de los extractos crudos (E1, E2, E3 y E4) obtenidos de <i>Aiptasia pallida</i>	40
Figura 3.8	Cromatograma de filtración en gel Sephadex G-50 M del extracto crudo con buffer de elución ácido acético 0.7 M, flujo de 2.5 mL/min. Las fracciones I, IV y V, mostraron actividad en los cangrejos <i>Ocypode quatrata</i>	41

Figura 3.9	Cromatograma de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25 de la muestra AP1G50, buffer de elución acetato de amonio pH 8.5, flujo de 1.0 mL/min	42
Figura 3.10	Cromatograma de filtración en gel de la muestra AP4G50 en intercambio aniónico Sephadex QAE A-25 buffer de elución acetato de amonio pH 8.5, flujo de 1.0 mL/min.....	43
Figura 3.11	Cromatograma de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25, buffer de elución acetato de amonio pH 8.5, flujo de 1.0 mL/min de la muestra AP5G50.	43
Figura 3.12	Cromatograma de intercambio catiónico Fractogel EDM SO ₃ ⁻ , muestra AP4G50QAEF1 buffer de elución acetato de amonio pH 5.4, flujo de 1.0 mL/min.	44
Figura 3.13	Cromatograma de filtración en gel Sephadex G-25 F, muestra AP4G50QAEF9 buffer de elución ácido acético, flujo de 1.5 mL/min.....	45
Figura 3.14	Cromatograma de filtración en gel de intercambio catiónico Hi Trap SP FF, muestra AP4G50QAEF9G25F1, buffer de elución acetato de amonio pH 5.4 , flujo de 1.0 mL/min.....	46
Figura 3.15	Espectro de HPLC de la muestra AP4G50QAEF1EMDF1G25F1, gradiente lineal de elución 90 a 10% agua (10mM ácido trifluoroacético), en acetonitrilo (10nM ácido trifluoroacético), flujo de 1.0 mL/min.....	47
Figura 3.16	Espectro de HPLC de la muestra AP4G50QAEF9G25F1EMDF2, gradiente lineal de elución 90 a 10% agua (10mM ácido trifluoroacético), en acetonitrilo (10nM ácido trifluoroacético), flujo de 1.0 mL/min.	47
Figura 3.17	Espectro de HPLC de la muestra AP4G50QAEF9G25F1EMDF1, gradiente lineal de elución 90 a 10% agua (10mM ácido trifluoroacético), en acetonitrilo (10nM ácido trifluoroacético), flujo de 1.0 mL/min	48
Figura 3.18	Gel de acrilamida del extracto crudo de <i>Aiptasia pallida</i> , en los extremos se muestran los estándares de alto peso molecular y en el centro se muestra el extracto crudo diluido 1:1 en el "sample buffer"	49
Figura 3.19	Gel de acrilamida del extracto crudo de <i>Aiptasia pallida</i> , en el extremo derecho se muestra el estándar de alto peso molecular y en las tres columnas el extracto crudo. La columna del centro muestra con ayuda de las líneas azules, las bandas observadas con los respectivos pesos moleculares 225 - 76, 52, 38- 31, 31-24, de 24 a 17 y una menor a 17 kDa.	49
Tabla 3.20	Bioensayo del extracto crudo de <i>A. pallida</i> en el cangrejo <i>O. quadrata</i>	51
Tabla 3.20	Continuación del bioensayo del extracto crudo de <i>A. pallida</i> en el cangrejo <i>O. quadrata</i> ...	52
Tabla 3.20	Continuación del bioensayo del extracto crudo de <i>A. pallida</i> en el cangrejo <i>O. quadrata</i>	53
Figura 3.21	Porcentaje de hemólisis del extracto crudo en eritrocitos humanos	55
Tabla 3.22	Reporte de características moleculares de actinoporinas presentes en toxinas purificadas de anémonas (Modificación Alegre- Cebollada, 2007).	57
Tabla 3.23	Bioensayo del extracto crudo de <i>A. pallida</i> en la medusa <i>C. xamachana</i>	59

Tabla 3.24	Observaciones en el microscopio de los microorganismos teñidos	60
Figura 3.25	Inhibición del extracto crudo en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , donde EC2 es extracto crudo 2 y EC3 extracto crudo 3, CONTROL- Agua destilada estéril, en los rectángulos se observa la concentración de extracto utilizada, los círculos rojos indican que existió inhibición y se muestra el tamaño de ésta; se observan las fechas del experimento	61
Figura 3.26	Inhibición del extracto crudo en <i>M. luteus</i> , donde EC2 es extracto crudo 2 y EC3 extracto crudo 3, CONTROL- Agua destilada estéril; en los rectángulos se observa la concentración de extracto utilizada, los círculos rojos indican que existió inhibición y se muestra el tamaño de ésta, se observan las fechas del experimento.	62
Figura 3.27	Inhibición del extracto crudo en <i>K. pneumoniae</i> , donde EC2 es extracto crudo 2 y EC3 extracto crudo 3, CONTROL- Agua destilada estéril; en los rectángulos se observa la concentración de extracto utilizada, los círculos rojos indican que existió inhibición y se muestra el tamaño de ésta; se observan las fechas del experimento, las líneas verdes señalan una contaminación.....	63
Figura 3.28	Inhibición del extracto crudo en <i>E. coli</i> , donde EC2 es extracto crudo 2 y EC3 extracto crudo 3, CONTROL- Agua destilada estéril; en los rectángulos se observa la concentración de extracto utilizada, los círculos rojos indican que existió inhibición y se muestra el tamaño de ésta; se observan las fechas del experimento.	64
Figura 3.29	Registro del extracto crudo en ovocito de <i>X. laevis</i> nativos a -60 mV	66
Figura 3.30	Registro del extracto crudo en ovocito de <i>X. laevis</i> inyectado con ARNm a -60 mV	66
Figura 3.31	Registro de la muestra AP4G50QAEF9G25F2 en ovocito de <i>X. laevis</i> inyectado con ARNm a -60 mV.	67
Figura 3.32	Registro de la muestra AP4G50QAEF9G25F2EMDF2HPLCF1, en ovocito de <i>X. laevis</i> nativos a -60 mV	68
Figura 3.33	Registro de la muestra AP4G50QAEF9G25F2, en ovocito de <i>X. laevis</i> inyectado con ARNm y probados con BaCl ₂	69

µm	micrómetros	rpm	revoluciones por minuto
cm	centímetros	min	minutos
m	metro	hrs	horas
kDa	Kilo Dalton	M	Mol
SM	Esfingomielina	pH	potencial de Hidrógeno
nm	nanometro	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Na ⁺	ión sodio	V	Volts
Vm	Potencial de membrana	g	gramo
mV	mili Volt	µL	micro Litro
K ⁺	ión Potasio	CL50	Concentración Letal Media
Ca ⁺²	ión Calcio	TSA	Agar Tristicaseipa
Kv1	Canal de Potasio	PDA	Agar Papa y Dextrosa
ShI	Toxina proveniente de <i>Stichodactyla helianthus</i>	UFC	Unidades Formadoras de Colonia
ShK	Toxina proveniente de <i>Stichodactyla helianthus</i>	ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
ShPI	Toxina proveniente de <i>Stichodactyla helianthus</i>	NaOH	Hidróxido de Amonio
StII	Toxina proveniente de <i>Stichodactyla helianthus</i>	mM	mili Mol
CgNa	Toxina proveniente de <i>Condylactis gigantea</i>	Tris HCl	Tris (hidroximetil) aminometano modificado con ácido clorhídrico
ATXI	Toxina proveniente de <i>Anemonia sulcata</i>	N	Normal
ATX II	Toxina proveniente de <i>Anemonia sulcata</i>	NaCl	Cloruro de Sodio
BDS-I	Toxina proveniente de <i>Anemonia sulcata</i>	ARN	Acido Ribonucleico
AEI	Toxina proveniente de <i>Anemonia sulcata</i>	KCl	Cloruro de Potasio
RMN	Resonancia Magnética Nuclear	NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
AP-A	Toxina proveniente de <i>Anthopleura xanthogrammica</i>	Ca(NO ₃) ₂	Nitrato de Calcio
AP-B	Toxina proveniente de <i>Anthopleura xanthogrammica</i>	CaCl ₂	Cloruro de Calcio
APETx1	Toxina proveniente de <i>Anthopleura elegantísima</i>	MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
APETx2	Toxina proveniente de <i>Anthopleura elegantísima</i>	Ω	Ohms
BgK	Toxina proveniente de <i>Bunodosoma granulifera</i>	E1	Extracto 1
EqII	Toxina proveniente de <i>Actinia equina</i>	E2	Extracto 2
DL ₅₀	Dosis Letal Media	E3	Extracto 3
ICMYL- UNAM	Instituto de Ciencias de Mar y Limnología- UNAM	E4	Extracto 4
° C	grado Centígrado	ng	nano gramo
mL	mili Litro	M	Macho
		H	Hembra
		UH ₅₀	Unidad de Hemólisis Media
		PLA ₂	Fosfolipasa A2
		EC2	Extracto Crudo 2
		EC3	Extracto Crudo 3
		VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
		Cl ⁻	ión Cloro
		nA	nano Amperes
		IP3	Inositol 1,4,5 - trifosfato
		BaCl ₂	Cloruro de Bario
		Ba ⁺²	ión Bario

"EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALGUNAS TOXINAS PRESENTES EN LA ANEMONIA Aiptasia pallida"

EXTRACTO CRUDO			
AP1G50	AP4G50	AP5G50	Exclusión molecular G50
AP1G50QAEF1	AP4G50QAEF1	AP4G50QAEF9	Intercambio aniónico QAE A-25
***	AP4G50QAEF1EMDF1	***	Intercambio catiónico EMD SO ₃
AP4G50QAEF1EMDF1G25F1	AP4G50QAEF9G25F1		Desalado G-25
	AP4G50QAEF9G25F1	AP4G50QAEF9G25F2	Intercambio catiónico EMD SO ₃
			Intercambio catiónico Hi Trap SP FF
	AP4G50QAEF9G25F2EMDF1	AP4G50QAEF9G25F2EMDF2	HPLC
AP4G50QAEF1EMDF1G25F1HPLCF1 AP4G50QAEF1EMDF1G25F1HPLCF2 AP4G50QAEF1EMDF1G25F1HPLCF3 AP4G50QAEF1EMDF1G25F1HPLCF4 AP4G50QAEF1EMDF1G25F1HPLCF5	AP4G50QAEF9G25F2EMDF1HPLCF1 AP4G50QAEF9G25F2EMDF1HPLCF2 AP4G50QAEF9G25F2EMDF1HPLCF3 AP4G50QAEF9G25F2EMDF1HPLCF4 AP4G50QAEF9G25F2EMDF1HPLCF5	AP4G50QAEF9G25F2EMDF2HPLCF1 AP4G50QAEF9G25F2EMDF2HPLCF2 AP4G50QAEF9G25F2EMDF2HPLCF3 AP4G50QAEF9G25F2EMDF2HPLCF4 AP4G50QAEF9G25F2EMDF2HPLCF5	

* No se obtuvo cromatograma, debido a que no hubo respuesta del equipo utilizado, se pasó toda la muestra, se concentró y se purificó por HPLC.
 *** Perdieron actividad

En el presente trabajo, se realizó la extracción y purificación parcial de algunas toxinas presentes en la anémona *Aiptasia pallida*, que a lo largo del proceso de fraccionamiento fueron probadas en diversos organismos para caracterizar su actividad neurotóxicas y/o citolíticas.

Se recolectaron un total de 680 anémonas *Aiptasia pallida* en el Acuario del ecoparque Xcaret, Quintana Roo, posteriormente los organismos fueron macerados y se observaron los tipos de nematocistos presentes, seguido de ello se fraccionó el extracto crudo mediante cromatografía de líquidos con matrices de diferentes tipos, cada una de las fracciones obtenidas se probaron en cangrejos con el fin de identificar a las fracciones activas para ser probadas en ovocitos de *Xenopus laevis*, como paso último del presente trabajo.

El extracto crudo de la *A. pallida*, mostró tener importantes efectos citolíticos, de acuerdo a los resultados obtenidos al realizar bioensayos con eritrocitos humanos y microorganismos. También se realizaron pruebas de toxicidad con la medusa *Cassiopeia xamachana* para observar si las proteasas digestivas presentes son específicas entre cada clase. Por otra parte se observó un efecto citotóxico sobre *Artemia salina*. La cantidad de proteína en el extracto crudo fue cuantificada por el método de Bradford y se realizaron geles de poliacrilamida para identificar el peso molecular de los componentes del extracto crudo.

Los resultados encontrados a lo largo de este trabajo de investigación son interesantes, se encontró actividad neurotóxica en ovocitos y se mostró la inhibición de algunos microorganismos como *Pseudomona aeruginosa* y *Micrococcus luteus* por efecto del extracto crudo, aunque se presentaron algunos problemas con respecto a la cantidad de extracto y obviamente en las fracciones obtenidas que impidieron llegar a un estudio mucho más específico, sin embargo, los resultados obtenidos podrían ser utilizados como base para estudios posteriores como caracterizar el efecto de las toxinas sobre diferentes en canales iónicos y elucidar el mecanismo de acción de las citolisinas.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

"Estar preparado es importante, saber esperar lo es aún más, pero aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida". *Arthur Schnitzler (1862-1931)*

1.1 CNIDARIOS

El phylum Cnidaria está constituido por medusas, anémonas, corales e hidroides, este phylum es uno de los más venenosos. Agrupa cuatro clases: Hydrozoa, Scyphozoa; Cubozoa y Anthozoa, esta última integra el 68% del total del phylum (Hurton, 1996). Lo integran más de 10, 000 especies, de las cuales se sabe que aproximadamente 70 de ellas causa daño al hombre por contacto directo o ingestión (Baslow, 1977; Norton, *et. al.*, 1978; Béress, 1982).

Los cnidarios constituyen uno de los principales troncos en el reino animal. Tienen un enterocelo, es decir, una cavidad interna del cuerpo que se abre al exterior mediante una abertura única y está dotada de paredes que segregan los jugos digestivos.



Fig.1.1 Phylum Cnidaria

<http://beim.us.es/eoantha/ECOANTHA/EXTRAS/SALVA/cnidarios.jpg>

Todos los Cnidarios comparten tres características fundamentales:

- 1) Estructura tisular con notable diferenciación histológica; existen células nerviosas y musculares, pero faltan centros nerviosos bien definidos.

- 2) Pared del cuerpo formada por dos capas de carácter epitelial: una externa o dermal (ectodermo) y una interna o gastral (endodermo). Entre una y otra se interpone la mesoglea, o proenquima, sustancia gelatinosa desprovista de células propias, aunque pueden contener células emigradas de las dos capas que la limitan.
- 3) Simetría radiada, es decir, disposición en partes del cuerpo en torno a un eje central que pasa por la boca: en dicho eje se cruzan los distintos planos de simetría. (Gran Enciclopedia, 1985).

Los cnidocistos son organelos microscópicos urticantes intracelulares característicos del phylum, cuya misión es la defensa y/o ataque contra presas y depredadores. Existen cerca de 28 tipos de cnidocistos, divididos en tres categorías, nematocistos, espirocistos y ptycocistos. Los nematocistos aparecen en todos los Anthozoarios. Los espirocistos se encuentran en la subclase Hexacorallia y los ptycocistos son exclusivos del orden Ceriantharia. Los cnidocistos son especialmente abundantes en los tentáculos y alrededor de la boca. (Francis, 2004; González, 2009).

Los cnidocistos están redondeados con el núcleo en posición basal y un gran orgánulo característico; el cnidocisto o nematocisto mide más de 100 μ m y se encuentra en posición apical; cuando esta célula intersticial comienza a segregar un nematocisto se llama cnidoblasto; el cual se fija a la mesoglea y extiende su extremo distal hacia la superficie epidérmica (Fig.1.2), junto a él existe un flagelo muy modificado, el cnidocilio que capta los estímulos que desencadenan la descarga. Los nematocistos están localizados a lo largo de la epidermis y se encuentran entre las células del epitelio muscular, compuestos por una cápsula de colágeno que es secretada por el aparato de Golgi, consta de una cápsula invaginada de doble pared, un opérculo que la cierra y un filamento enrollado en su interior que con frecuencia está erizado de espinas, cuando el nematocisto es estimulado se produce la evaginación del filamento que se clava en la piel de la víctima o depredador e inyecta el líquido venenoso contenido en la cápsula (Brown, 1950; Mariscal, 1974; Picken, 1953).

Existen más de 24 diferentes morfologías de nematocistos, esta morfología diferencia las funciones específicas de cada uno, relacionadas con la captura de presas o defensa por penetración y adherencia principalmente (Mariscal, 1974).

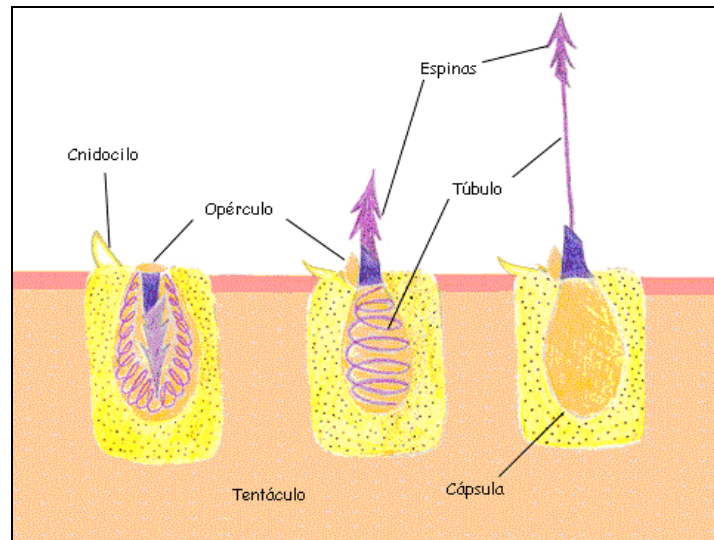


Fig 1.2 Esquema del cnidoblasto.

1.2 CLASE ANTHOZOA

En los Anthozoarios, los nematocistos son “el arma secreta”, estos organelos diminutos les han permitido alcanzar un enorme éxito como depredadores, a pesar de la poca inversión en la morfología y en la especificación sensorial (Rupert, 1996). Es por ello que los cnidarios han prevalecido aún con su simple fisiología corporal, citando a Kass-Simon, 2002 “son poco más simples que un intestino con tentáculos”.

La clase Anthozoa esta dividida en dos subclases: Alcyonaria y Zoantharia. Los antozoos son cnidarios polipoides solitarios o coloniales, en que la fase medusa esta totalmente ausente. Algunos animales son muy conocidos como la anémonas de mar, corales, abanicos de mar, los cuales son miembros de esta clase que contiene cerca de 6, 000 especies.



Fig. 1. 3 Ejemplos de la clase Anthozoa

<http://www.anthozoa.com/>

Las anémonas presentan simetría primaria radial, birradial o radio bilateral, esencialmente compuestas de dos capas epiteliales y una cavidad interna gastrovascular o celenteron, la cual se abre por la boca; tiene un cuerpo cilíndrico y una cavidad oral rodeada de tentáculos (Halstead, 1988). Además de ser organismos sésiles, viven en sustratos sólidos en el piso del océano y se deslizan con el disco pedal. Tienen unos largos tentáculos, que incorporan y eliminan sustancias del metabolismo que contienen venenos producidos por los nematocistos (Ständker, 2006).

Las anémonas son pólipos solitarios considerablemente mayores y más gruesos que los pólipos de hidrozoos. La mayoría de las anémonas miden entre 1.5 y 10 cm de longitud y de 1 a 5 cm de diámetro (Rupert, 1996).

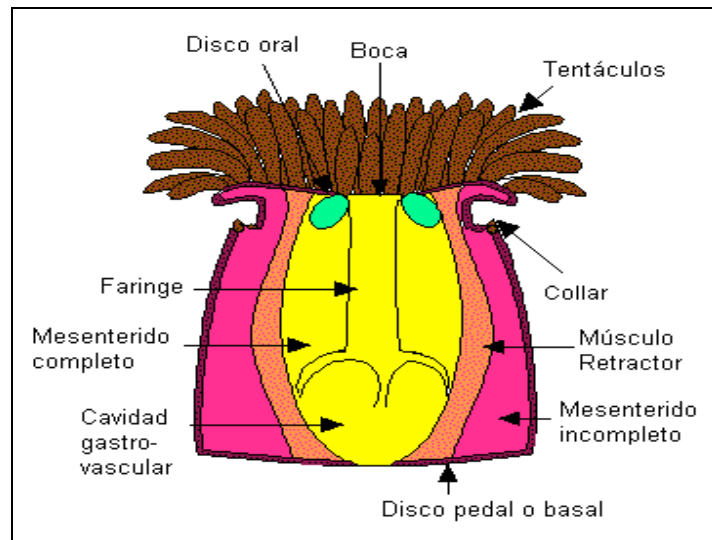


Fig. 1.4 Anatomía de una anémona

<http://www.enchantedlearning.com/subjects/invertebrates/seaanemone/Seaanemoneprintout.shtml>

Las anémonas tienen generalmente colores vivos, blancas, azules, rojas, naranjas. Viven en aguas profundas (algunas especies hasta a 5 000 m de profundidad) o costeras en todo el mundo pero aparecen en gran variedad en aguas tropicales, sin embargo existen especies que habitan en el Ártico.

Además de los nematocistos, que presentan una fuerte armadura de espinas para anclarse en los tejidos de las presas e inyectar las toxinas, las anémonas también poseen espirocistos, que tiene una cápsula con pared sencilla y largo filamento adhesivo; participan en la captura de las presas con superficies duras, como pequeños crustáceos y en la sujeción al sustrato por medio de un adhesivo. En los tentáculos los espirocistos son más frecuentes que los nematocistos (Rupert 1996).

La caracterización de diferentes toxinas de anémonas se ha llevado a cabo recientemente y el interés de los científicos por explotar esta área ha crecido en todas partes del mundo. Cerca de 1968, Shapiro purificó por primera vez la toxina de la anémona *Condylactis gigantea* y se observó que esta toxina era capaz de incrementar el potencial de acción del nervio ventral de langosta (Hessinger, 1988). Por otra parte Béress aisló tres toxinas de *Anemonia sulcata* que ha

sido estudiada en canales de sodio. La primera estructura tridimensional de una toxina activa en canales de sodio que fue determinada por espectroscopia de RMN de la *Anthopleura xanthogrammia* (AP-A) en 1988 y de la *Amenonia sulcata* en 1989 (Bosmans, 2007).

Los cnidarios, en especial las anémonas, contienen una o más proteínas o péptidos citolíticos difíciles de localizar concretamente, sin embargo, se han encontrado estos compuestos en los nematocistos y en tejidos. En algunas especies, como *Hydra vulgaris*, las toxinas se almacenan en el interior de los nematocistos (Klug *et al.*, 1989).

1.2.1 Compuestos bioactivos presentes en anémonas

Los compuestos bioactivos presentes en los nematocistos de anémonas, incluyen concentraciones altas de péptidos y proteínas (neurotoxinas, hemolisinas, formación de pretoxinas, fosfolipasa A2 e inhibidores de proteasas), y metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas y/o tóxicas (cardiotoxicidad, dermatitis, parálisis, necrosis, etc). Poco se conoce del mecanismo de acción de las toxinas de los nematocistos, sin embargo, se han reportado efectos en canales iónicos; en crustáceos se observa una actividad altamente paralítica, los efectos tóxicos debido a las toxinas de cnidarios debe al deterioro de la permeabilidad de la membrana. Estos compuestos activos son adsorbidos dentro de la proteína y no pueden ser extraídas con algunas sustancias químicas como el éter etílico, pero si con alcohol etílico o acetona (Patin, 1942; Faulkner 1998, 2000; Catterall, 2000; Haefner, 2003; Ständker, 2006; Zaharenko, 2008).

1.2.1.1 Citolisinas

Los miembros del phylum Cnidaria producen una variedad de péptidos y proteínas que actúan como neurotoxinas y citolisinas. Estudios realizados por Anderluh y Maek (2000) mencionan que en más de 32 especies de anémonas se ha reportado efecto citolítico letal de péptidos y proteínas. Las citolisinas son clasificadas en cuatro grupos, basados en la estructura primaria y en las propiedades funcionales.

Tabla 1.5 Clasificación de citolisinas (Anderluh, 2000).

	PESO MOLECULAR	CARACTERÍSTICA	ANÉMONA
Grupo I	5 a 8 KDa	Forman poros en membranas que contienen fosfatidilcolina	<i>Telia felina</i> y <i>Radianthus macrodactylus</i>
Grupo II	20 kDa	Forman poros catiónicos selectivos en las membranas	<i>Actinia equina</i> , <i>Sticodactyla helianthus</i> y <i>Heteractis magnifica</i>
Grupo III	30 - 40 kDa	Fosfolipasas A ₂ citolíticas, presenta actividad enzimática	<i>Aiptasia pallida</i>
Grupo IV	80 kDa	Su actividad es inhibida por el colesterol o fosfolipasas.	<i>Metridium snile</i>

Las primeras citolisinas purificadas de anémonas fueron llamadas actinoporinas (Kem, 1988). Las actinoporinas son extremadamente citotóxicas y citolíticas hacia una gran variedad de células y de sus organelos vesiculares, tienen efecto en la formación de poro en la membrana se caracterizan por tener una elevada homología secuencial de masa molecular de 18 a 20 kDa, punto isoeléctrico básico, estructura secundaria compuesta por hojas- y la capacidad de formar poros oligoméricos en membranas naturales y modelos. La caracterización de estructuras y funciones de las actinoporinas ha tenido un gran avance en la secuenciación de algunas de éstas citolisinas.

Estas moléculas son únicas, debido a su capacidad de insertarse espontáneamente en la membrana en la cual forman canales hidrofílicos, esto debido a la presencia de esfingomielina (SM). Los efectos citotóxicos y citolíticos de las actinoporinas afectan a un gran número de

células, incluyendo plaquetas, fibroblastos, células tumorales y células parasitas (Anderluh, 2003; Martínez, 2006; Tejuca, 2009).

Se ha encontrado la presencia de proteínas hemolíticas en las toxinas de Cnidarios que actúan en los fosfolípidos membranales (Bemheimer y Avigad, 1976), con estos ensayos se puede determinar si existen hemolisinas que actúan como algún tipo de lectinas, que son capaces de unirse o aglutinarse en ciertas células.

Estas actinoporinas forman canales selectivos para cationes en modelos membranales y en células, los poros formados están integrados por 3 o 4 monómeros que se insertan en la membrana lipídica con un diámetro cercano a 1 nm que permite que pasen las moléculas de 400 a 900 Da (Colla, 2006). La SM juega un papel en la actividad lítica de los actinoporinas (Norton, 2009).

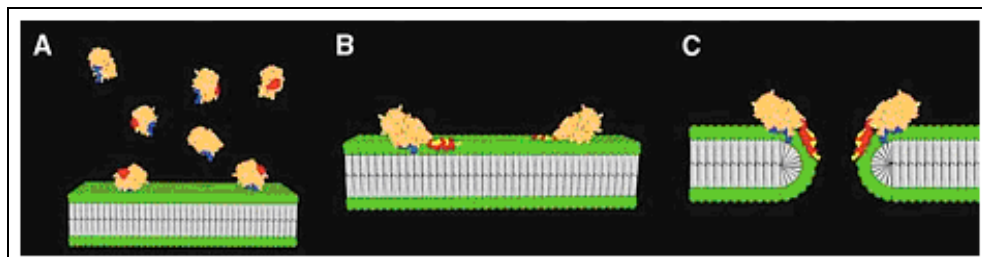


Fig. 1.6 Mecanismo de formación de poros, por actinoporinas (Macěk, 2003).

(A) Los monómeros de las toxinas, se unen a la superficie de la por medio de los grupos aromáticos (azul). (B) El segmento N-terminal con hélice antipático (rojo) deslocalizado y se ancla en la membrana en la interfase acuosa y los residuos polares son expuestos en la solución. (C) Después de la adición de cuatro monómeros, se forma un poro vía transmembranal y se exponen las cadenas de aminoácido (amarillo).

1.2.1.2 Neurotoxinas

Los canales iónicos son moléculas proteicas que contienen poros que permiten el flujo de iones a través de las membranas celulares. Se pueden clasificar en función del tipo de estímulo para su apertura o cierre en: canales activados por voltaje, canales activados por ligando y canales mecanosensibles. En los mamíferos determinan procesos esenciales como: excitación del nervio y músculo, secreción de hormonas y neurotransmisores, transducción sensorial, control del equilibrio hídrico y electrolítico, regulación de la presión sanguínea, proliferación celular y

procesos de aprendizaje y memoria. En los canales de compuerta dependientes de voltaje, un dominio de una proteína cargada se mueve en relación a la membrana en respuesta a un cambio del potencial eléctrico transmembranal, provocando que el canal iónico se abra o se cierre (Nelson, 2000).

La transmisión de señales químicas a través de canales iónicos es una forma importante de comunicación entre células. Estos son un tipo de poros en las proteínas transmembranales que se pueden abrir y cerrar como compuertas y se encuentran en todos los tipos celulares, incluidas las membranas plasmáticas de las neuronas y de las células musculares (Boyer, 1999).

La señalización en el sistema nervioso se consigue mediante redes de neuronas celulares especializadas que transportan un impulso eléctrico desde un extremo de la célula a través de una extensión citoplasmática alargada. La señal eléctrica desencadena la liberación de moléculas de neurotransmisor en la sinapsis transportando la señal a la siguiente célula del circuito. Tres tipos de canales iónicos de compuerta regulada por voltaje son esenciales para este mecanismo de señalización. Los canales de Na^+ que están cerrados cuando la membrana está en reposo ($V_m = -60 \text{ mV}$) y se abren cuando se despolariza la membrana localmente en respuesta a la acetilcolina. Esta despolarización provoca la apertura de los canales de K^+ de entrada regulada por voltaje y el flujo de K^+ repolariza localmente. La sensibilidad a voltaje de los canales iónicos es debida a la presencia en posiciones críticas de cadenas laterales de aminoácidos cargados que interactúan con el campo eléctrico a través de la membrana.

Cuando una onda de despolarización alcanza a los canales de Ca^{+2} de compuerta regulada por voltaje, se abren y entra Ca^{+2} desde el espacio extracelular. Actuando como segundo mensajero intracelular, el Ca^{+2} desencadena entonces la liberación de acetilcolina por exocitosis a la hendidura sináptica. La acetilcolina difunde hacia la célula postsináptica, donde se une a receptores de acetilcolina y desencadena la despolarización (Nelson, 2000).

Las neurotoxinas han demostrado ser herramientas muy valiosas para el estudio de diferentes aspectos mecánicos de la neurotransmisión, un diverso grupo de toxinas interactúan con los canales iónicos aumentando o inhibiendo la función del canal. Muchas neurotoxinas, interfieren con la acción de canales neuronales de Na^+ regulados por voltaje pero, curiosamente, se

conocen pocas que afecten a los canales de K^+ . La tetrodotoxina, un veneno paralizante de enorme potencia, que se encuentra principalmente en la piel, ovarios, hígado e intestinos del pez globo, actúa bloqueando específicamente el canal de Na^+ . Dicho canal es bloqueado de forma similar por la saxitoxina, un producto de dinoflagelados marinos que se concentra en los mariscos debido a su modo de alimentación por filtración. Ambas neurotoxinas tienen un grupo guanidino catiónico y ambas son efectivas solo cuando se aplican a la superficie externa de una neurona. Se cree por tanto que estas toxinas interactúan específicamente con un grupo carboxilato aniónico localizado en la entrada del canal de Na^+ en su lado extracelular (Martínez, 2001).

Por diversos trabajos, se ha determinado que algunas toxinas de anémonas actúan en el sitio 3 del canal de sodio, esto en vertebrados y en insectos, de la misma manera que las α -toxinas de escorpión (Fig. 1.7), el efecto que tiene el sitio tres es retrasar la inactivación del canal, manteniendo abierto el canal por un periodo de tiempo mayor y prolongando el potencial de acción (Wanke *et. al.*, 2009).

Las anémonas son conocidas por ser ricas en toxinas peptídicas de dos tipos, las que actúan en el sitio tres del canal de sodio y en K_v1 del canal de potasio. Recientemente se encontró una nueva clase de toxinas bloqueadoras de canales de potasio a partir de diferentes especies de anémonas tales como *Bunodosoma granulifera* (Aneiros, 1993; Garateix, 2000), *Stichodactyla helianthus* (Castañeda, 1995), *Anemonia sulcata* (Schweitz, 1995) y *Heteractis magnifica* (Gendeh, 1997). Estas toxinas tienen mayor efecto en crustáceos que en mamíferos, en el presente se han probado en insectos, con un efecto muy similar al de los crustáceos. Algunas de estas toxinas peptídicas han sido usadas en estudios farmacológicos por su gran afinidad con canales específicos, se han estudiado la estructura y la función (Ständker, 2006; Honma, 2008).

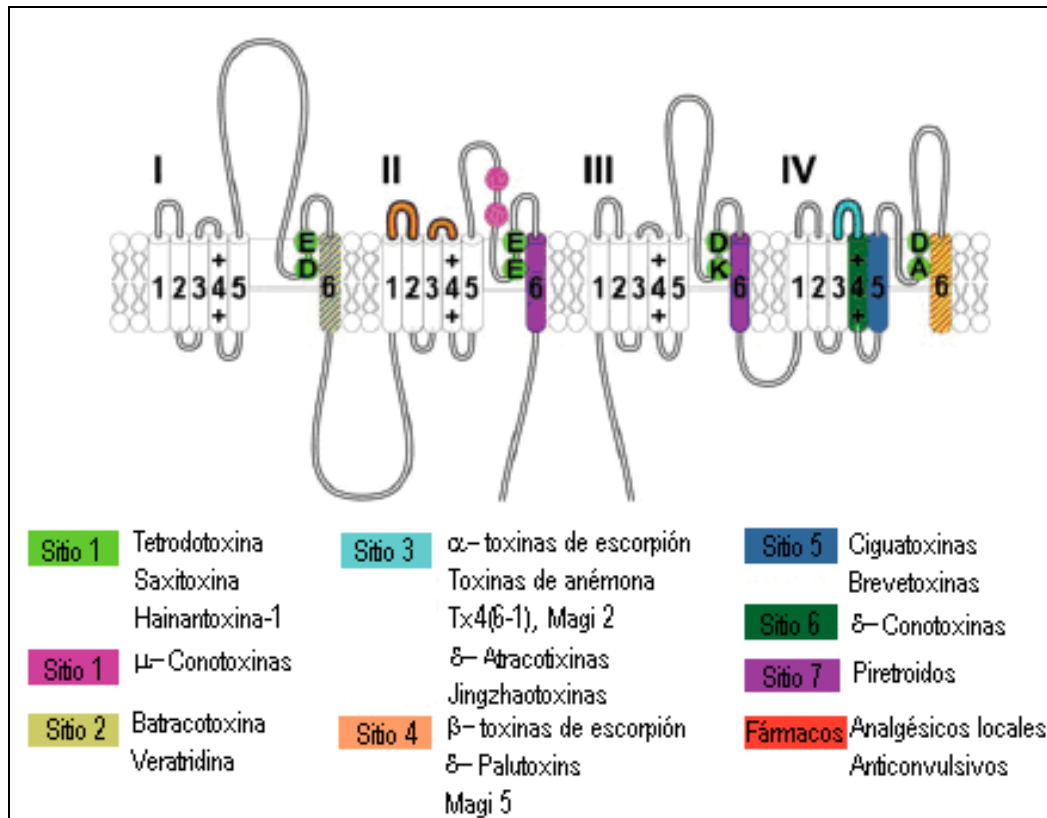


Fig. 1.7 Localización de sitios receptores de neurotoxinas en canales de Na_v.

Richet (1902; 1903) y Richet y Portier (1936) aislaron por primera vez tres extractos activos farmacológicos de los tejidos de cnidarios: Hipnotoxina, un extracto acuoso, el cual causa problemas cardiacos, un extracto alcohólico llamado Talassina causando expulsión de histamina y un extracto de glicerina llamado Congestina que induce a la anafilaxis. Posteriormente varias bases cuaternarias de amonio fueron identificadas en los extractos de anémoma tales como una tetramina que posee propiedades tóxicas en los *Hydra*. Welsh (1956) reportó el compuesto 5-hidroxi-triptamina (5-HT o serotonina) que tienen un poder para producir dolor y segrega histamina y es un neurotransmisor. Otros ejemplos de sustancias químicas que presentan actividad biológica en varios sistemas de prueba, son: *Anthopleura elegantissima* y *Metridium dianthus* de las cuales se obtuvo, el ácido 2- aminoetilfosfonico, de la *Anthopleura xanthogrammica* se extrajo el ácido 2- metilaminoetilfosfonico, entre otros (Baslow, 1977).

En los años 70's Lászlo Béress y colaboradores, así como Ted Norton, realizaron investigaciones con toxinas de anémonas y clasificaron la clase de los péptidos presentes. De acuerdo a la estructura primaria y a los puentes de disulfuro, las toxinas de anémonas, en canales de sodio se pueden clasificar de tres tipos: tipo I y II son las toxinas que contienen de 46 a 49 residuos de aminoácidos conectados por tres puentes de disulfuro, tal es el caso de la anémona encontrada en el Indopacífico *Heteractis* sp y el tipo III de 27 a 31 residuos, el tercer grupo contiene una cadena corta de residuos 27- 32 aminoácidos, como la *Stichodactyla* sp, la característica principal es la presencia de tres puentes de disulfuro. Por otra parte, investigadores como Narahashi, Moore, Catterall entre otros empezaron el estudio de la identificación y clasificación de los canales de Na_v. (Al- Sabi, 2006). Los primeros en realizar investigaciones de estructura y función de péptidos de anémona fueron Barhanin *et. al.* (1981), quienes mostraron que el sitio responsable de la fijación de ATX II al canal de sodio es distinto al sitio responsable para toxicidad de estos péptidos.

A continuación se presenta una tabla en la cual se resumen algunos trabajos publicados por diversos autores, concernientes al estudio de diversas especies de anémonas.

Tabla 1.8 Algunos estudios realizados en anémonas

ANÉMONA	ESTUDIO	AUTOR
<i>Stichodactyla helianthus</i>	Se probó en canales de sodio de crustáceos e insectos por efecto de la toxina ShI. Se encontró que la toxina ShK tiene actividad bloqueadora en canales de potasio. Además de inhibidores de proteasa (ShPI) y actinoporinas denominadas Sticholysin II (StII).	Salgado y Kem (1992); Castañeda <i>et. al.</i> (1995); Pennington <i>et al.</i> (1995); Castañeda y Harvey (2009)
<i>Condylactis gigantea</i>	Inactivación del canal de sodio, probada en crustáceos por la toxina CgNa.	Ständker <i>et. al.</i> (2006)
<i>Anemonia sulcata</i>	Se une al mismo sitio de canal de sodio, como la -toxina del escorpión. Canales de sodio en los axones de "Crayfish". Se determinaron las toxinas ATXI (AsI) y ATX (III) (AsIII) que actúan en canales de Na _v . También se encontraron toxinas que actúan en el canal de K ⁺ (BDS-I) e inhibidores de proteasa (AEI).	Catterall y Béress (1998) Karawhina y Fujita, (1983)
<i>Anthopleura xanthogrammica</i>	Se determinó por RMN las toxinas que actúan en el canal de sodio Anthopleurin A (AP-A) y Anthopleurin B (AP-B).	Pallaghy <i>et. al.</i> (1995).
<i>Anthopleura elegantísima</i>	La toxina denominada APETx1 actúan en el canal de potasio y la toxina APETx2, actúa en el canal de potasio	Diocot (2003), Bruhn <i>et. al.</i> (2001).
<i>Bunodosoma granulifera</i>	La toxina BgK actúa en canales de potasio, se han experimentado en moluscos	Garateix (2000).
<i>Actinia equina</i>	Se determinó que la toxina Equinatoxin II (EqII) actúa como actinoporinas.	Minagawa (1998),
<i>Aiptasia mutabilis</i>	Evaluación de efectos citotóxicos	Marino, <i>et. al.</i> (2004).

La importancia biológica de realizar estos estudios radica en la posibilidad de encontrar valor terapéutico en las toxinas y poderlas aplicar en la farmacología, pueden también utilizarse como modelos moleculares para procesos de síntesis o semisíntesis química de compuestos bioactivos, como herramientas en biología experimental o para el desarrollo de nuevos fármacos.

Las sustancias biotóxicas que han sido estudiadas y han revelado propiedades farmacéuticas importantes como antimicóticos, inhibidores de crecimiento, antivirales, antitumorales, hemolíticas, antibióticas, cardioinhibidoras entre otras; es por lo anterior que el estudio y caracterización de las toxinas, de la anémona *A. pallida* es muy importante ya que se pueden generar conocimientos nuevos a cerca de su toxicidad y conocer como es el mecanismo de reacción de la toxina.

1.2.2 Anémona *Aiptasia pallida*

Reino Animalia

Phylum Cnidaria

Clase Anthozoa

Subclase Hexacorallia

Orden Actiniaria

Suborden Nynantheae Carlgren, 1899

Infraorden Thenaria Carlgren, 1899

Familia *Aiptasiidae* Carlgren, 1924

Género *Aiptasia* Gosse, 1858

Especie *Aiptasia pallida* (Agassiz in Verrill, 1864).



Fig. 1.9 *Aiptasia pallida*

Descripción: Disco pedal bien desarrollado de contorno irregular, con diámetro entre 0.3 y 0.8 cm de color café claro y semitransparente. Tentáculos lisos, delgados y largos de color café con manchas blancas y amarillas. Disco oral amplio, color café oscuro, con manchas en forma de puntos blancos, azulados o amarillentos. Boca pequeña y en forma de ranura, pueden presentar manchas blanquecinas en sus extremos. Con acontias.

Hábitat: se fijan a rocas pequeñas y maderos sumergidos, entre los parches de arena y pastos marinos, en la zona lagunar cerca de la zona intermareal, a una profundidad de entre 1-3 m.

Alimentación: *A. pallida* contiene zooxanthelas especialmente en los tentáculos, o algas dinoflageladas simbióticas, que producen oxígeno y fijan carbón por fotosíntesis, además se alimenta de crustáceos y pequeños peces.

Tipo de Reproducción: Se reproducen asexualmente por laceración pedal de forma rápida y eficiente, ya que reptan lentamente sobre el sustrato dejando a su paso pequeños trozos de tejido, de los cuales se desarrollan nuevos y pequeños individuos en un periodo de entre dos y tres días.

La distribución geográfica de la *A. pallida*, se puede observar en la Fig. 1.10, es importante indicar que no se encuentra marcado Quintana Roo, sin embargo estas anémonas son encontradas en multitud, en los acuarios con flujo abierto en la zona dentro del Caribe Mexicano.

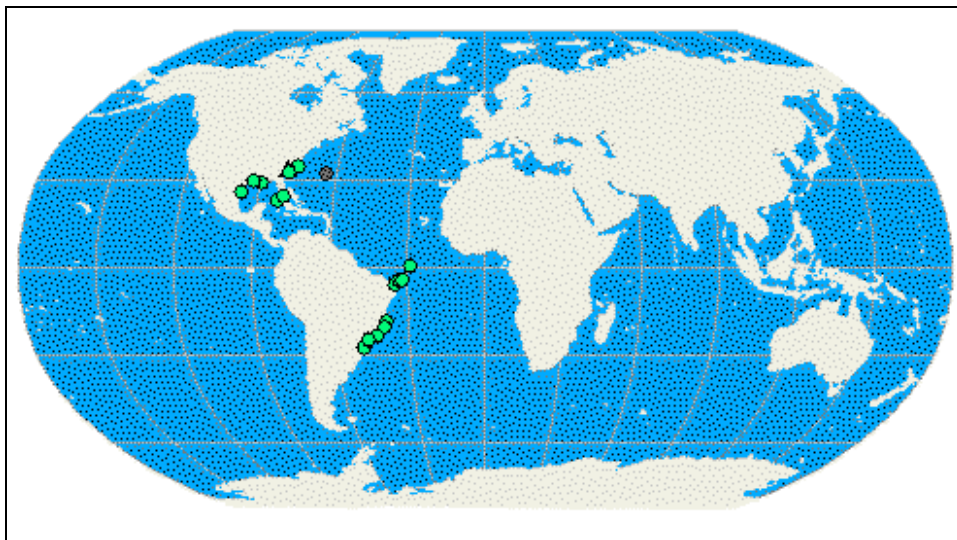


Fig. 1.10 Mapa de ubicación de la *Aiptasia pallida*

<http://hercules.kgs.ku.edu/Hexacoral/Anemone2/distribution.cfm?xmlsource=http%3A%2F%2Fhercules%2Ekgs%2Eku%2Eedu%2Fhexacoral%2Fanemone%2Fxml%2Fhexmlscript%2Ecfm%3Fseniorid%3D5271%26type%3D&callingpage=species&speciessearched=Aiptasia%20pallida>

Observaciones: Esta especie es considerada como una plaga para la acuariofilia. *A. pallida* nada por una acción ciliar en espiral. Esta anémona puede arrastrarse por si misma, progresando alrededor de 4 cm por hora.

1.2.2.1 Investigaciones realizadas con *Aiptasia*

Blanquet en 1968, fue uno de los pioneros en trabajar con la anémona *A. pallida*, fue osmóticamente descargado en un medio ácido y se observaron precipitados de túbulo invertido.

Según las observaciones realizadas en la anémona *A. pallida*, se han identificado dos tipos de nematocistos, los microbásicos p-mastigóforos y los basitricos, y espirocistos (Blanquet, 1968) y también se reporta la presencia de microbásicos amastigóforos (González, 2009).

A continuación se muestra en la tabla 1.11 la localización de los diferentes cnidoblastos encontrados en la *A. pallida*.

Tabla 1.11 Tipos de nematocistos y ubicación en la *A. pallida* modificado de Carlgren, 1952.

Localización	Tipo de cnidoblasto
Acontia	Basitricos
	Microbásico p-mastigóforo
Actinofaringe	Microbásico amastigóforos
Columna	Basitricos
	Microbásico p-mastigóforo
Filamentos	Microbásico p-mastigóforo
	Microbásico p-mastigóforo
Tentáculos	Basitricos
	Microbásico p-mastigóforo

Específicamente los estudios de caracterización en *A. pallida*, se enfocan en los compuestos citolíticos (Anderluh, 2000) de acuerdo al peso molecular de las toxinas presentes se hace una clasificación de citolisinas, así como, en las características esenciales de cada grupo, otro de los artículos encontrados habla de la extracción de los mastigóforos microbásicos presentes en la anémona *A. pallida* y se realizaron estudios de fosfolipasa A₂ (Grotendorst, 1999), estudios biológicos de los nematocistos presentes en esta anémona (Westfall, 1998; 2004 y González, 2009) y estudios relativos a los organismos simbiotes que posee (Cook, 1988 y Lesser, 1989).

El veneno de la anémona es el único veneno que puede causar decaimiento en la actividad motora, se presentan movimientos involuntarios y la inactivación de los canales de sodio (Kem, 1988). El alto peso molecular de las proteínas citolíticas en el veneno de la *Aiptasia*, produce movimientos o temblores en las patas y un estado de parálisis antes de la muerte en los cangrejos (Hessinger *et al.*, 1973), pero son más letales en los ratones (Hessinger, 1979).

La Dosis Letal media (DL₅₀), indica la cantidad mínima de la toxina que mata al 50% de los individuos a los que se les inyecta la toxina (Torrens, 2004). La dosis letal del veneno de la *A. pallida* es similar a varias especies de cobras, mambas y víboras (Fisher, 1967; Schwick, 1963). También existen venenos de *Physalia* y *Chironex* que poseen nematocistos con venenos potentes, algunos son de los venenos más tóxicos que conocen.

OBJETIVO GENERAL:

Realizar la extracción y fraccionamiento de algunas de las sustancias activas presentes en la anémona *Aiptasia pallida*, así como caracterizar su actividad biológica usando diferentes bioensayos.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Identificar los nematocistos de la anémona *Aiptasia pallida*.
- Purificar los polipéptidos activos mediante el uso de la cromatografía de líquidos.
- Evaluar la actividad biológica del extracto crudo y de las fracciones obtenidas mediante el uso de bioensayos en cangrejos, *Artemia salina* y en eritrocitos humanos.
- Evaluar la actividad tóxica del extracto crudo en la medusa *Cassiopeia xamachana*.
- Determinar de la inhibición del crecimiento de microorganismos, causada por el extracto crudo.
- Evaluar la posible actividad de las fracciones cromatográficas obtenidas a partir del extracto crudo sobre canales iónicos, empleando el modelo de ovocitos de *Xenopus laevis*.

JUSTIFICACIÓN:

La anémona *Aiptasia pallida*, genera plagas en algunos acuarios y es difícil de combatir, es un organismo muy competitivo y urticante, lo cual nos da una idea de que las toxinas que poseen son compuestos altamente tóxicos. La información acerca de la purificación y caracterización de las toxinas presentes en *A. pallida* es muy escasa y a la fecha no se han realizado estudios de caracterización de neurotoxinas, sin embargo, se sabe que posee citolisinas y que presentan actividad enzimática. Por todo lo anterior, se trabajó con *A. pallida* para poder incrementar la información existente y para poder caracterizar algunas de las toxinas presentes en esta especie.

HIPÓTESIS:

La anémona *Aiptasia pallida* contiene una gran cantidad de toxinas, entre estas podemos encontrar a las neurotoxinas con efecto sobre canales iónicos, así como citolisinas que causan hemólisis en eritrocitos humanos.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

"Cuanto más numerosas son las cosas que quedan para aprender, menos tiempo queda para hacerlas". *Marcel Prévost (1862-1941)*

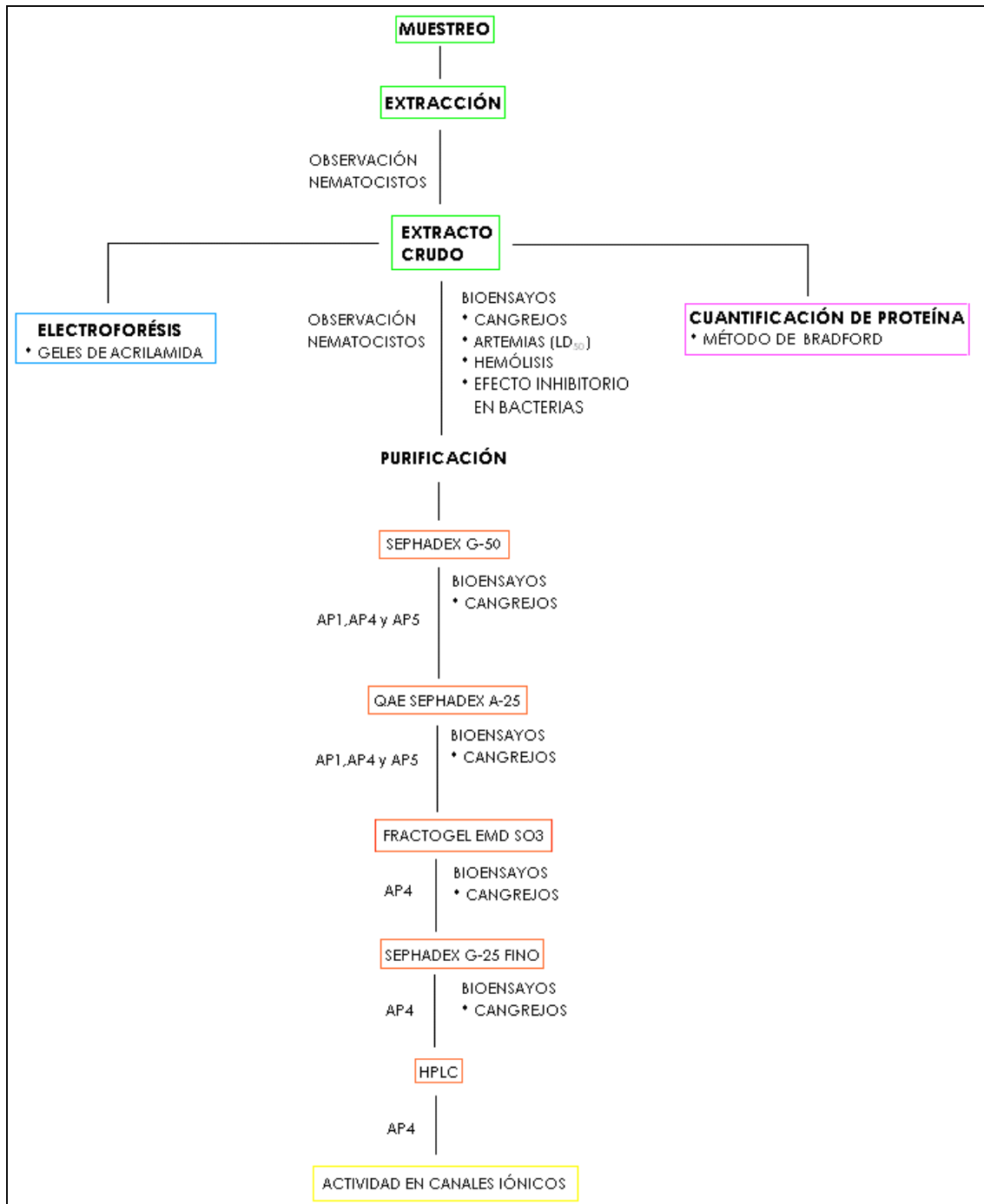


Fig. 2.1 Diagrama de bloques de la metodología.

2.1 UBICACIÓN DEL SITIO DE MUESTREO



Fig. 2.2 Ubicación del sitio de muestreo.

2.2 MUESTREO

Los organismos fueron recolectados de las peceras del acuario del ecoparque Xcaret, Quintana Roo, México. Los organismos estaban pegados al sustrato y solo se sacaron las rocas pequeñas en las que se encontraban, debido a la dificultad que representa despegar al organismo de las cavidades rocosas.

Posteriormente los organismos con sus sustratos, se transportaron a la Unidad Académica Puerto Morelos del ICMYL-UNAM, en una hielera con agua marina. Al llegar a laboratorio se separaron los organismos que se habían desprendido del sustrato y se guardaron en un envase de plástico y en el congelador a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agua desionizada.

Por otra parte los organismos que quedaron pegados en las cavidades, se dejaron en una pecera, posteriormente se inyectó 1 mL de agua desionizada fría ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$) en el disco pedal, con esto se observó que el organismo se desprendía con mayor facilidad.

2.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

- Una vez sueltos los organismos se sometieron a una agitación moderada para obtener los nematocistos sin descargarse y observarse en el microscopio Olympus CH-30.
- Posteriormente fueron macerados con el homogenizador Pyrex 21 X 150 mm. Las muestras se observaron al microscopio, con el fin de identificar los tipos de nematocistos.
- Una vez observados la mayoría de los nematocistos descargados se centrifugaron (Centrifuga 5810 R Eppendorf) a 4000 rpm por 10 min, se guardó en el congelador a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 12 hrs aproximadamente, en viales de vidrio de 5.5 X 2.5 cm.
- El extracto crudo fue liofilizado (LABCONCO Mod. 117 por 48 hrs).

2.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se determinó la proteína presente en el extracto crudo de *A. pallida* por el método de Bradford (1976) con un kit de Bio- Rad Protein Assay.

- La solución estándar fue Globulina gamma de bovino Bio Rad.
- Las lecturas se llevaron a cabo en el espectrofotómetro Turner SP-830 a 595 nm.
- Se pesó el extracto crudo en balanza analítica Sartorius BP 2215.

2.5 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La purificación de las proteínas presentes en el extracto crudo de la *Aiptasia pallida*, se llevó a cabo con columnas cromatográficas, utilizando diferentes tipos de matrices y diferentes tamaños de la columna, a continuación se especifican las características de las matrices utilizadas y de las columnas, así como de los eluyentes.

Gel Sephadex G-50 M

Datos generales:

Tamaño de columna: 90 cm x 5.5 cm de diámetro

Eluyente: Acido acético 0.7 M

Tipo de Gel: Sephadex® G-50 Medio

Gel QAE Sephadex A-25

Datos generales:

Tamaño de columna: 38 cm x 1.2 cm

Eluyente: Acetato de amonio 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M a pH 8.5

Tipo de Gel: Sephadex®

Gel Fractogel EMD SO₃⁻

Datos generales:

Tamaño de columna: 36 cm x 1.2 cm

Eluyente: Acetato de amonio 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M a pH 5.4

Tipo de Gel: Fractogel® EMD SO₃

Gel Sephadex G-25

Datos generales:

Tamaño de columna: 77 cm x 5.5 cm

Eluyente: Acido acético 0.3 M

Tipo de Gel: Sephadex® G-25 Medio

Equipo AKTA prime plus GE de cromatografía en gel

Columna de HiTrap Sepharose Fast Flow (SP FF) para intercambio catiónico 1 mL

Eluyente: Acetato de amonio 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M a pH 5.4

Equipo HPLC Varian Pro Star Mod. 410

Columna: Varian Microsorb 300- S C-4 de 250 x 4.6 mm

Eluyente: Ácido Tricloroacético 1% en Acetonitrilo, Agua grado HPLC y Acetonitrilo

2.6 ELECTROFORESIS (SDS-PAGE)

La electroforesis se basó en el método de Laemmli (1970), sin embargo para su óptimo desempeño se efectuaron algunas modificaciones.

- Se realizó la electroforesis del extracto crudo de la *A. pallida* en gel de acrilamida al 12%.
- Las muestras se dejaron correr por un espacio de seis horas con un voltaje en cada placa 50 V.
- Los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie al 1% (Bio Rad®) para poder observar las bandas y se destiñeron con una solución de 40% de metanol, 10% ácido acético y 50% de agua desionizada.

2.7 BIOENSAYOS

2.7.1 Actividad neurotóxica en cangrejos *Ocypode quadrata*.

Se recolectaron en la playa cerca de la Unidad Académica Puerto Morelos, cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, con el fin de realizar ensayos de actividad neurotóxica. El peso de los organismos fue de 6 a 12 g, dependiendo del tamaño se le inyectaron cantidades tanto del extracto crudo como el liofilizado, este último disuelto en agua desionizada.

- Se inyectó en el pereopodo, entre la coxa y exoesqueleto a cangrejos *O. quadrata* y agua desionizada fue utilizada como blanco; se observó la reacción, en el caso de los organismos recolectados en el primer muestreo.

2.7.2 Hemólisis.

- Se utilizaron eritrocitos de humano tipo de sangre O (+) con extracto de *Aiptasia pallida*, las pruebas se hicieron por triplicado.
- Una vez lavada la sangre libre de grasa y plasma se calibró. El tratamiento fue, por cada 1.5 mL de sangre se agregó 3.5 mL de Alsever, se centrifugó a 3500 rpm a 4 °C por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el paquete de eritrocitos fue lavado con 1 mL de solución Alserver y se repitió tres veces la operación.
- Se tomaron 100 µL de esta suspensión y se diluyeron a diferentes concentraciones para realizar la curva estándar de hemoglobina bovina (Sigma), (de 4 a 16 µL), leyeron en el espectrofotómetro de absorción a 415 nm encontrándose como absorción cercana a 1 el volumen de 12 µL.
- En seguida se peso 0.0011 g del extracto crudo, se agitó por 5 min, se agregó el volumen del estándar calculado anteriormente (12 µL) y se prosigió a leer la concentración de hemoglobina liberada en el sobrenadante a 415 nm y fue correlacionada con la curva estándar expresada como mg/mL.

2.7.3 Actividad citotóxica en *Artemia salina*.

Basado en el método de Meyer *et. al.* (1982) se hicieron eclosionar 0.5 g de *Artemia salina* después de tres días de mantener a los organismos en aireación se contaron 10 organismos en 1 mL de agua de mar y se agregaron a viales de 25 mL y se agregaron distintas concentraciones de extracto crudo y se hizo por duplicado.

Se observó la tasa de mortandad a las 24 hrs, se realizó el contenido y se determinó la Concentración Letal Media (CL₅₀) (Lehmann, 1980).

2.7.4 Actividad tóxica en la medusas *Cassiopeia xamachana*.

Se recolectaron 38 ejemplares en la laguna Caracol en Cancún, Quintana Roo, mediante el uso de redes, se colocaron en un estanque de 2m x 60 cm x 60 cm y se dejaron aclimatar por 1 semana, todas sobrevivieron.

Posteriormente, en laboratorio; usando diferentes concentraciones de extracto crudo se inyectaron a las medusas con jeringas de insulina en el canal de manubrio, dependiendo del peso del organismo, como blanco se inyectó suero Electrolit, posteriormente se observó su comportamiento regresándolas en el estanque en donde se encontraban, por un lapso de 2 horas.

2.7.5 Determinación del efecto inhibitorio en microorganismos.

Se utilizaron los siguientes microorganismos:

Tabla 2.3 Microorganismos utilizados en la prueba inhibitoria.

Gram (+)	Gram (-)	Hongo
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10534	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
	<i>Pseudomonas</i> 079 290604	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	

Se reactivaron los microorganismos en cajas de petri de 40 mL. Después de 24 horas se realizaron tinciones de cada microorganismo para constatar la presencia de sólo los organismos requeridos. Posteriormente se sembraron en tubos de ensayo de 10 mL y se dejaron incubar por 22 hrs. Cada experimento fue realizado con organismos sembrados con 22 hrs de antelación.

2.7.5.1 Siembra de bacterias y hongo.

En cajas de Petri de cristal de 40 mL se sembraron por estrías los microorganismos Gram (mostrados en el cuadro 2.4), en un medio de cultivo de Agar de Soya Trypticaseína (TSA) de Bioxon, se dejaron incubar por 20 hrs a una temperatura de 35 ° C.

Posteriormente en tubos de ensayo, se resembraron las bacterias extraídas de las cajas de petri en el mismo medio de cultivo (TSA).

Por otra parte la levadura *Candida albicans*, fue sembrada en un medio de cultivo de Agar de Dextrosa y Papa (PDA) de Bioxon, y resembrado en tubos de ensayo en el mismo medio.

2.7.5.2 Preparación del extracto crudo.

Se pesó aproximadamente 70 mg del extracto crudo 3 y 2, se diluyó en 1.5 mL de agua destilada previamente esterilizada, se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL, se centrifugaron Mini spin Eppendorf, a 8000 rpm en un lapso de 4 min y posteriormente se filtró con ayuda de una jeringa nueva de 3 mL y un filtro de 12 m Supor Membrane Acrodisc Syringe Filter.

2.7.5.3 Preparación del inóculo.

Se tomaron 10 mL de agua destilada estéril y se colocaron 2 mL en tubos de ensayo, posteriormente con un asa se tomaron microorganismos y se diluyeron en el agua hasta alcanzar la turbidez de la solución McFarland 5 (15×10^8 UFC/mL), en cada uno de las bacterias y levaduras probadas, posteriormente dado que éste método no fue el más eficaz, se estandarizó la turbidez a 25% T, en un espectrofotómetro Genesys 20, que fue leído a 680 nm, esto fue una solución McFarland 3 (9×10^8 UFC/ mL).

2.7.5.4 Pruebas de inhibición bacteriana.

Se midieron 21 mL, con pipeta serológica estéril de agar líquido (TSA o ADP, según el microorganismo) y se colocaron en cajas de petri previamente rotuladas, se dejó solidificar.

Por otra parte se agregó a un tubo de ensayo 4 mL de agar (TSA o ADP) y 0.15 mL del inóculo previamente preparado, y se añadió a la caja de petri que contenía en agar sólido, se extendió y una vez solidificada la capa que contenía el inóculo se colocaron de tres a cinco penicilindros en cada caja, posteriormente se colocó 0.2 mL de extracto crudo en cada penicilindro, uno de los cinco sólo contenía agua destilada estéril como control.

Esta metodología se repitió para cada microorganismo probado.

Una vez colocado el extracto crudo se incubaron de 20 a 22 hrs a temperatura de 32 °C. Pasado este tiempo se observaron los resultados.

2.5.6 Análisis de la actividad sobre canales iónicos del extracto crudo y de las fracciones obtenidas.

2.5.6.1 Extracción y purificación de ARNm.

La extracción de RNA total de cerebro de rata fue realizada utilizando el método de Chomczynski & Sacchi (1987). Se utilizaron rata macho adultas, con un peso entre 250 a 300 g, proporcionados por el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla, Querétaro. La extracción de cerebros fue efectuada mediante decapitación y rompimiento de cráneo con material quirúrgico; el cerebro extraído (cerebro, cerebelo y tallo cerebral) fue colocado en un tubo estéril de propilpropileno de 50 mL de capacidad, adicionando 10 mL de solución desnaturante y homogeneizados (homogeneizador Utraturrax T25) durante 1-2 min o hasta incorporación total, a temperatura ambiente.

La purificación de ARNm fue realizada por medio de una columna de oligo (dT)-celulosa. La columna fue tratada sucesivamente con 4 mL de NaOH 0.1 M, 6 mL (10 mM Tris HCl pH 7.6) o hasta alcanzar un pH de 6 – 7 en el líquido eluyente y posteriormente, con 3 mL de solución 1X (10 mM Tris HCl pH 7.6 y 0.5 M NaCl). Posteriormente, se aplicó el ARN total previamente ajustado a 10 mM Tris HCl pH 7.6 y 0.5M NaCl con el buffer 2X y desnaturizado a 65°C. El ARN se aplicó 3 veces y después la columna fue lavada con 4 mL de solución 1X recuperando alícuotas de 1 mL cada una; y finalmente se eluyó con 2.5 mL de solución E recuperado en alícuotas de 500 µL cada una.

La columna de oligo (dT) celulosa fue lavada con 4 mL de NaOH 0.1 M y 6 mL de solución E hasta obtener un pH 7; posteriormente, se lavó con 3 mL de solución 1X.

El ARNm fue precipitado con 1 volumen de etanol al 100% y 0.1 volumen de acetato de sodio a – 20°C por toda la noche. Después, el ARNm fue empastillado por centrifugación durante 30 min a 14,000 rpm a 4°C (Beckman Coulter Microfuge 22R). La pastilla fue obtenida mediante decantación de la solución, lavada con etanol al 80% y centrifugada bajo las mismas condiciones

(30 min / 14,000 rpm / 4°C). La pastilla de ARNm fue resuspendida en 50 µL de agua estéril y la cantidad de ARN fue cuantificada bajo las condiciones establecidas para el ARN total.

2.5.6.2 Obtención de ovocitos de *Xenopus laevis*.

Los ovocitos fueron obtenidos de ranas *Xenopus laevis*. La rana fue anestesiada por hipotermia, se colocó en hielo por 30 min o hasta observar ausencia de reflejos. Una vez anestesiada, se colocó en una cama de hielo, se realizó una incisión tanto en piel como en músculo, en el área abdominal para obtener dos a tres lóbulos ováricos, éstos se colocaron en una caja de Petri con solución de Barth's normal (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.33 mM Ca(NO₃), 0.41 CaCl₂, 0.82 MgSO₄, 5 mM Hepes, 70 µg/mL de Gentamicina y un pH de 7.4); la rana fue suturada y colocada en agua a temperatura ambiente para su recuperación.

Los ovocitos en estadio V - VI fueron separados del lóbulo ovárico e incubados a 21°C en solución Barth's por 12 horas. Se separaron ovocitos en buen estado la ayuda del microscopio Zeiss Stemi 1000 y se microinyectaron con 50 nL de ARNm y otros con 50 nL de agua estéril, como control. La microinyección se realizó con una micropipeta de vidrio estéril (Dummond Scientific #3-000-210-G8). Los ovocitos microinyectados fueron incubados a 19°C por mínimo 1 día en solución de Barth; posteriormente fueron tratados con colagenasa (tipo I de Sigma) a una concentración de 0.3 mg/mL por 30 min en solución Ringer (115 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 CaCl₂, 5 Hepes ajustada a pH 7 con NaOH 5N). Después del tratamiento enzimático los ovocitos fueron lavados 3 veces con solución Ringer e incubados en solución Barth normal; la capa folicular remanente fue removida con la ayuda de pinzas finas de disección Sigma tipo #5; los ovocitos fueron incubados nuevamente en solución Barth y en viales de vidrio de 20 mL, durante 2 a 3 días, cambiando a diario la solución Barth's y separando los ovocitos en mal estado, hasta llevar a cabo los registros electrofisiológicos (Fig. 2.4).

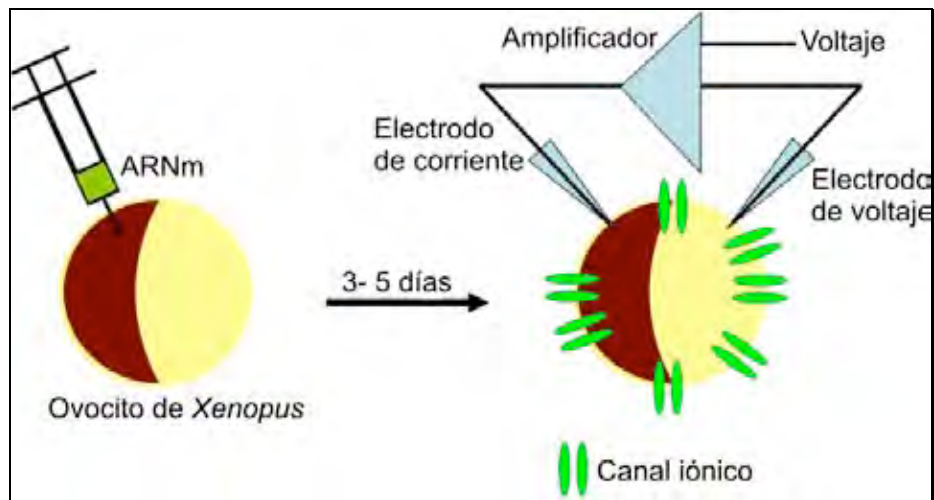


Fig. 2.4 Tratamiento del ovocito para el registro electrofisiológico (modificado de www.sumanasinc.com).

2.5.6.3 Registro Electrofisiológico.

Se utilizó la técnica de control de voltaje, en esta técnica uno de los microelectrodos mide el potencial de la membrana continuamente (electrodo de voltaje), por otra parte el otro microelectrodo equilibra la corriente necesaria para mantener fijo el potencial requerido. Los microelectrodos que se utilizaron fueron tubos capilares de borosilicato (P80/Pc de Sutter) y fueron alargadas con un equipo especializado y posteriormente se dejaban en una solución salina hasta su uso posterior.

Los microelectrodos se colocaron en las micropipetas y se observaban que las resistencias oscilaran entre 0.9 a 2.5 M Ω , en ambos casos, tanto en el electrodo de corriente y en el electrodo de voltaje.

Como primer paso se colocó un ovocito de *X. laevis* previamente tratado entre los dos electrodos y una vez estabilizados se fijó el potencial a -60 mV, en la mayoría de los registros, (en algunos casos se aumentó o se disminuyó para observar cambios específicos), y en todo el proceso de registro se perfusiónó Ringer normal, a excepción de cuando se colocaba la muestra, que estaba diluida en Ringer normal. A continuación se probó el extracto crudo y algunas fracciones obtenidas sobre los ovocitos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo”.
Albert Einstein (1879-1955)

3.1 RECOLECCIÓN

La especie *Aiptasia pallida* actualmente es considerada una plaga en los acuarios, esto debido a la capacidad para reproducirse (laceración pedal) y por ser un competidor altamente efectivo, esto aunado a las condiciones óptimas como luz y flujo de agua, que les brinda el acuario. Además de ser pequeña (5 cm máximo, incluyendo tentáculos), prefiere las cavidades rocosas y se adhiere fácilmente a estos lugares, por lo que es difícil identificarlas y sacarlas.

Se recolectaron aproximadamente 677 anémonas *A. pallida* de diferentes tamaños desde 0.2 cm a 5 cm, se sacaron, específicamente en la pecera donde se exhibían *Hippocampus sp.*, que fue donde se encontraba mayor número de anémonas, pero estaban adheridas a las rocas que servían como exposición y por ello no se podía modificar la estructura rocosa y solo se podían sacar las rocas que estaban sueltas, algunas veces al transportar las rocas en la hielera, las anémonas se desprendían pero la mayoría permanecía en el sustrato.

Por muchos métodos se trató de desprender a las anémonas y el más eficiente fue inyectar agua desionizada a -4 °C en el disco pedal, se desprendían algunas horas después, sin embargo, debido a su tamaño y a la poca cantidad de organismos, la cantidad de extracto crudo obtenida fue menor a un gramo, a excepción del último muestreo; ya que los organismos recolectados eran de mayor tamaño, por lo que se pudo obtener mayor cantidad de extracto crudo.

Las fechas de muestreo, así como el número aproximado de organismos (Tabla 3.1), fueron los siguientes:

Tabla 3.1 Fechas y número de *A. pallida* recolectados en el Eco-parque Xcaret.

Fecha	Núm. de organismos
30/01/2008	30
03/04/2008	90
08/04/2008	150
07/08/2008	200
19/06/09	207

3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

El extracto crudo que se obtuvo de la maceración y centrifugación, fue un líquido viscoso de color café oscuro y al liofilizarse el color se mantuvo, para el liofilizado del primer muestreo era café oscuro y para el segundo liofilizado el color se torno café- naranja, el cambio de color se pueda atribuir a que el color del organismo depende de la especie de simbiote. La tabla 3.2 posterior muestra el peso del extracto liofilizado así como el color aproximado de los extractos, para dar una idea al lector.

Tabla 3.2 Organismos recolectados y peso del extracto liofilizado.

Número de organismos recolectados	Peso de extracto
60 ■	0.1135 g
208 ■	0.5114 g
175 ■	0.8367 g
207 ■	3.5591 g
Total: 650	5.4186 g

Existen diferentes métodos de ruptura celular entre los cuales están:

- Lisis celular: utilizado en células sin pared celular como las células de tejidos animales. Consiste en suspender las células en una solución hipotónica (más diluida que el interior de las células). Debido a la diferencia osmótica el agua difunde al interior de la célula, causando su hinchamiento y rotura.
- Descargas eléctricas (Malpezzi *et. al.*, 1993).
- Destrucción mecánica: por homogenización pasar las células entre un tubo y pistón de vidrio, mortero con arena o albúmina; molino de perlas de vidrio (Estrada, 2001), prensa French hacer pasar las células a gran velocidad a través de un pequeño orificio, sonicación someter las células a vibraciones ultrasónicas. Schulze en 1922 (citado en Patin, 1942) sugiere que la estimulación mecánica es esencial para que los

nematocistos sean descargados y mostró que según la estructura de los cnidoblastos es la respuesta.

- Congelado y descongelado: se someten las células a cambios bruscos de temperatura (Kem 1989).

Sin embargo, Zugasti (2001), observó que las descargas eléctricas disminuían la toxicidad en los organismos utilizados para los bioensayos, por otra parte las perlas de vidrio tienden a desnaturalizar las proteínas, las anémonas son de tamaño variable y la mayoría no miden más de 5 cm, por lo que no se utilizó este método y se realizó la extracción por maceración ya que en trabajos anteriores (Torrens, 2004) se observó que los estímulos mecánicos provocan la eversión del túbulo con la liberación de toxinas además de la gran recuperación del extracto crudo sin pérdida de actividad biológica. El único inconveniente es que la descarga no es rápida ni al 100 % y se tiene que incitar a la expulsión de la toxina por agitación magnética, por poco tiempo para no desnaturalizar la proteína.

3.3 TIPOS DE NEMATOCISTOS

Al observar las muestras en el microscopio, se observaron gran cantidad de microbásico p-mastigóforos e isorhizas basitricos, son los que se han reportado en la bibliografía consultada (Blanquet y Lenhoff, 1966) y espirocistos, estos sólo se encontraron cuando se hizo la maceración del organismo completo, ya que se observó que en la acotia, sólo había nematocistos microbásicos p- mastigóforos y basitricos. Debido a que se procesó la anémona completa y también se observó tejidos musculares y simbioses.

Los basitricos se caracterizan por tener una cápsula alargada; en ésta se puede distinguir el túbulo y el filamento al estar cargado, al ser descargado se observa un filamento delgado largo (Östman, 2000).

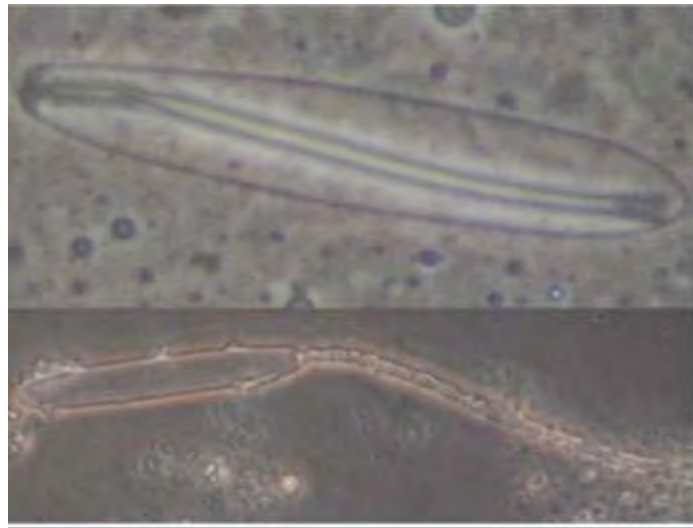


Fig. 3.3 Basitrico cargado y descargado *A. pallida* a 40X.

Los nematocistos microbasicos p- mastigoforos tienen una forma de bastón y el túbulo presenta una forma de "V" al estar cargado. La longitud del túbulo es tres veces menor a la longitud de la capsula y en el extremo se observan unas espinas, presentan un filamento después del túbulo (Östman, 2000).

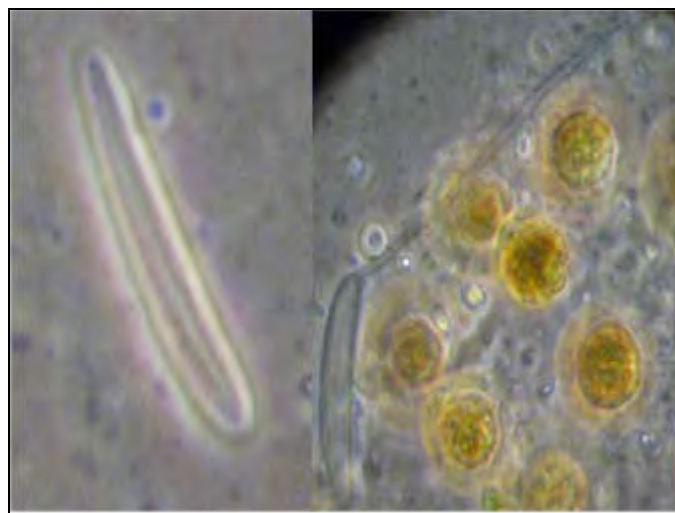


Fig. 3.4 Microbásico p-mastigóforo cargado y descargado *A. pallida* a 40X.

En los espirocistos, se observa el túbulo en espiral cuando esta cargado y al ser descargado el filamento es delgado de forma uniforme. La pared de la cápsula del espirocisto es delgada y al ser evaginada secreta adherente y sustancias higroscópicas (Östman, 2000).

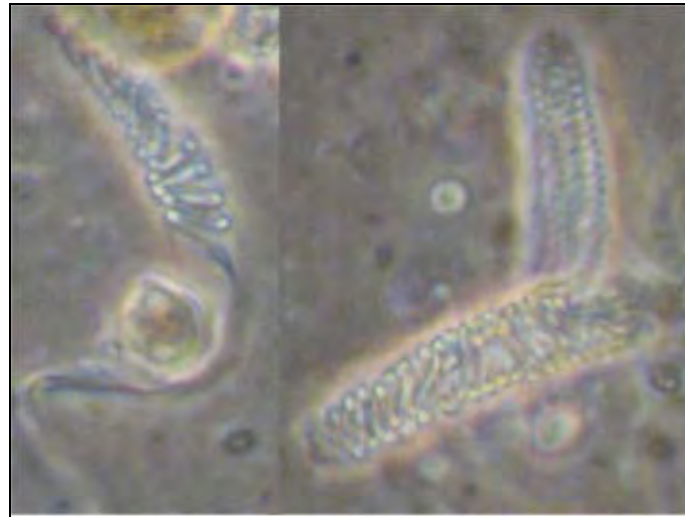


Fig.3.5 Espirocisto descargado y cargados *A. pallida* a 40X.

3.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

A partir de la curva estándar con globulina de bovino, se obtuvo la ecuación $y = 0.265x + 0.4301$ y se sustituyó "y" por la absorbancia leída para los extractos 1,2 y 3, y para el extracto 4 se utilizó la ecuación $y=0.213x+ 0.3882$, se observa que las cantidades de proteínas son muy similares.

Tabla 3.6 Cuantificación de proteína del extracto crudo de *Aiptasia pallida*.

EXTRACTO (100 µl)	ABSORBANCIA (595 nm)			PROMEDIO	CANTIDAD DE PROTEÍNA (µg/µL)
10,000	1,200	1,188	1,176	1,188	2,860
10,000	1,536	1,558	1,525	1,540	4,187
10,000	1,404	1,465	1,445	1,438	3,803
16,000	1,398	1,412	1,354	1,388	4,694

Los extractos 1 y 2 se aplicaron en las columnas cromatográficas y se probaron en los organismos como crustáceos, medusa y pruebas hemolíticas; con el extracto 3 se realizaron las pruebas de inhibición en microorganismos y con el extracto 4 se los geles de poliacrilamida.

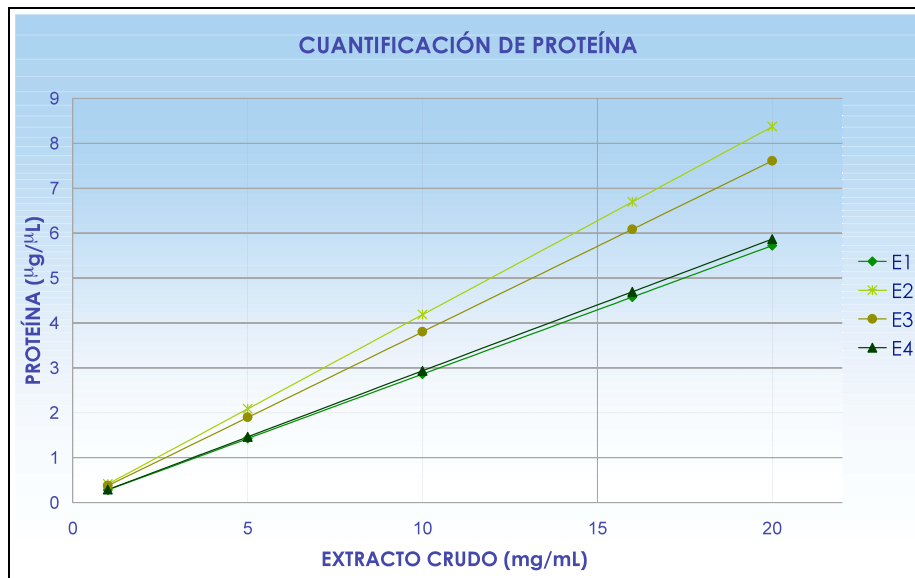


Fig. 3.7 Cuantificación de proteína de los extractos crudos (E1, E2, E3 y E4) obtenidos de *Aiptasia pallida*.

3.5 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El primer tipo de matriz utilizado para la purificación fue Sephadex G-50 M (exclusión molecular), el peso del extracto crudo disuelto fue de 2.9417 g, la longitud de onda de detección a la que se llevó a cabo la separación cromatográfica fue de 280 nm que ha este longitud de onda es al cual absorben aminoácidos aromáticos como el triptofano y tirosina. Se obtuvieron 11 fracciones, las cuales fueron concentradas a presión reducida en el rotavapor Buchi, hasta obtener un volumen aproximado de 10 mL a una temperatura aproximada de 30 °C y después se probó la actividad neurotóxica en cangrejos, y sólo las partes coloreadas en la figura posterior mostraron actividad, provocando movimientos involuntarios de tenaza, patas y ojos, parálisis y posteriormente muerte, estas fracciones fueron nombradas AP1G50, AP4G50 y AP5G50.

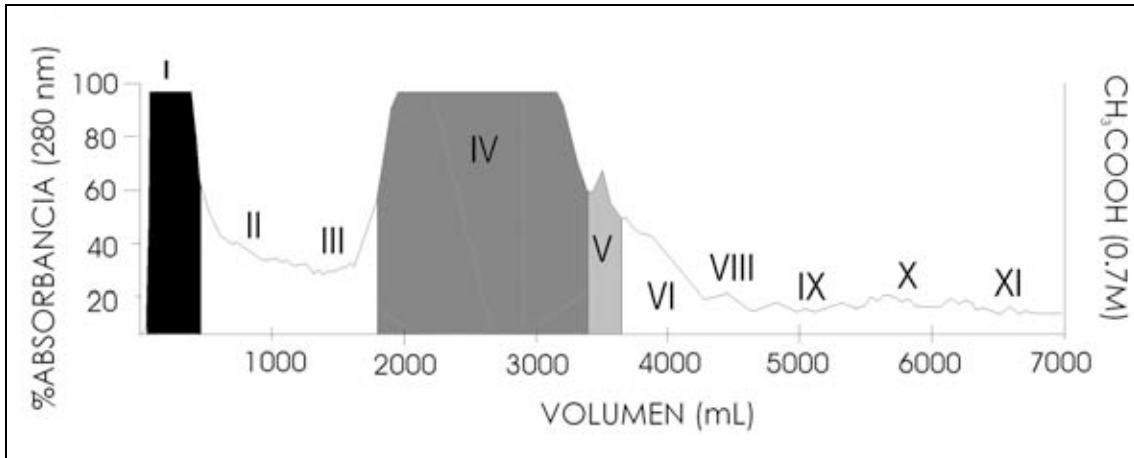


Fig. 3.8 Cromatograma de filtración en gel Sephadex G-50 M del extracto crudo con buffer de elución ácido acético 0.7 M, flujo de 2.5 mL/min. Las fracciones I, IV y V, mostraron actividad en los cangrejos *Ocypode quatrata*.

Posteriormente las tres fracciones activas, se pasaron por separado por una matriz de intercambio aniónico, QAE Sephadex A-25, eluido con acetato de amonio pH 8.5 en gradiente escalonado. En el caso de AP1G50 se observó un pequeño pico que fue inactivo en el bioensayo con cangrejos, algo similar se observó con la muestra AP5G50 (Fig. 3.11).

En el caso de la muestra AP1G50 se corrieron 8 mL, encontrándose un solo pico en la concentración de 0.01 M de acetato de amonio, en los demás gradientes escalonados (0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M), no se observó la presencia de ningún pico (Fig. 3.9).

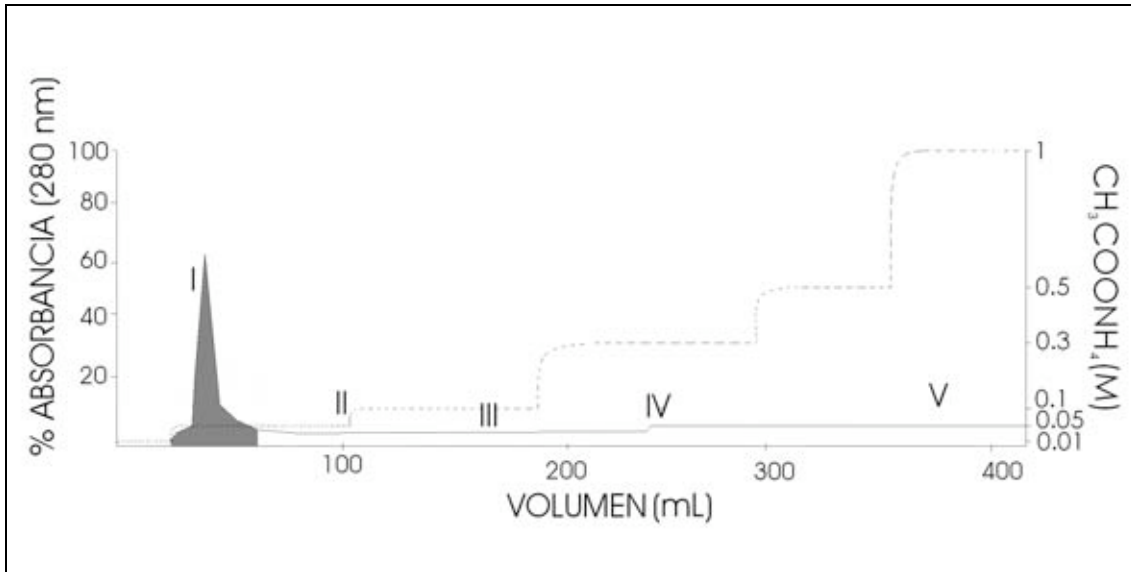


Fig. 3.9 Cromatograma de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25 de la muestra AP1G50, buffer de elución acetato de amonio pH 8.5, flujo de 1.0 mL/min

Por otro lado, la muestra AP4G50, fue pasada por la columna de gel QAE Sephadex A -25 y se encontraron los picos que se observan en la figura posterior (Fig. 3.10), también se hicieron gradientes escalonados de acetato de amonio pH 8.5, de igual manera las partes sombreadas se inyectaron en cangrejos, siendo la primera AP4G50QAEF1 y tercera AP4G50QAEF9 activas. Siendo que la tercera tiene mayor concentración de sales, se desaló antes de pasar a la columna de intercambio catiónico.

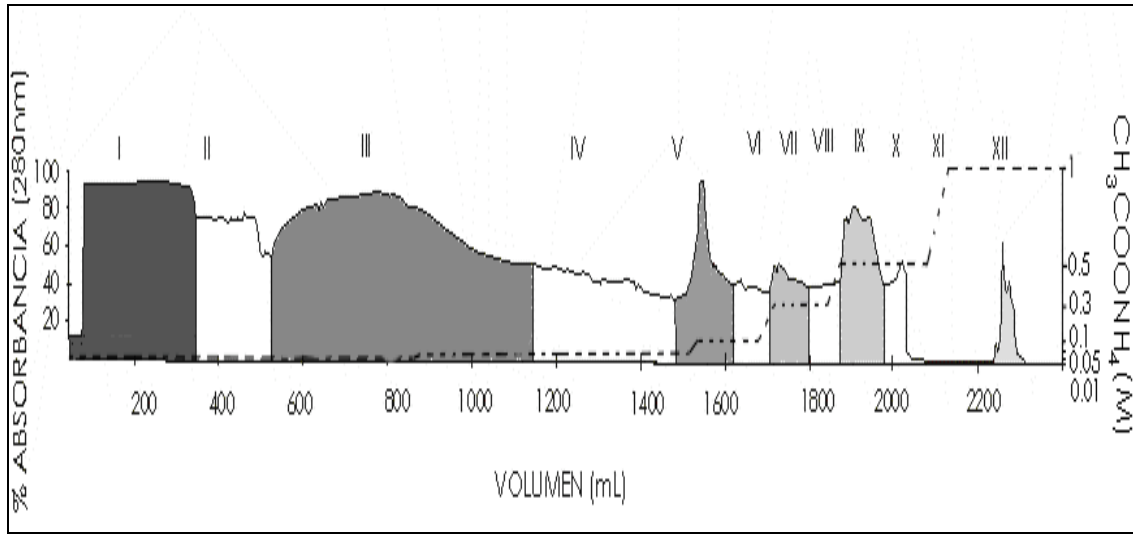


Fig. 3.10 Cromatograma de filtración en gel de la muestra AP4G50 en intercambio aniónico Sephadex QAE A-25 buffer de elución acetato de amonio pH 8.5, flujo de 1.0 mL/min.

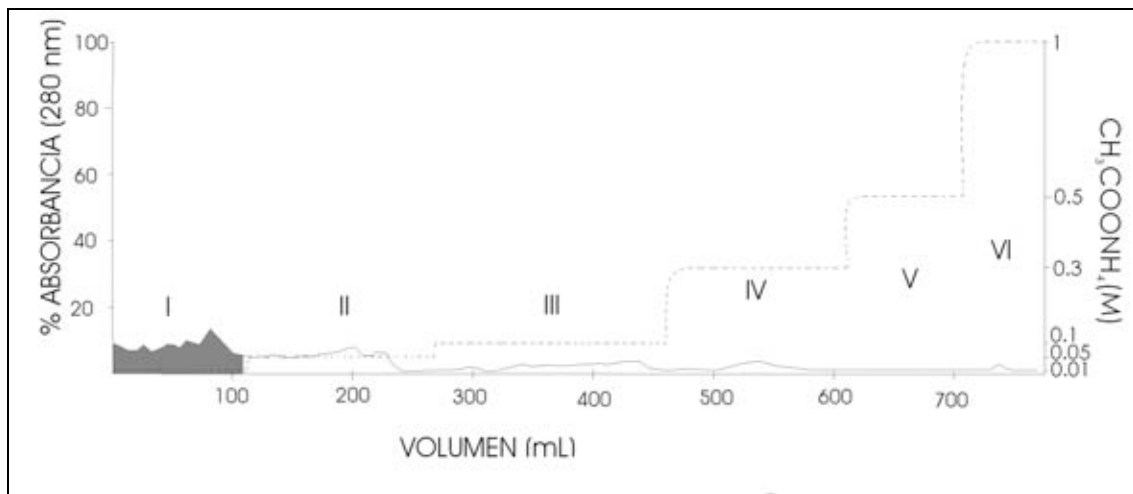


Fig. 3.11 Cromatograma de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25, buffer de elución acetato de amonio pH 8.5, flujo de 1.0 mL/min de la muestra AP5G50.

La fracción AP4G50QAEF1, fue aplicada a una columna de gel de intercambio catiónico, Fractogel EDM SO_3^- , eluída con gradientes escalonados de acetato de Amonio a pH de 5.4, de en donde se obtuvo una fracción activa. Posteriormente, esta fracción fue desalada en la columna de Sephadex G-25 F y no se observó ningún pico activo.

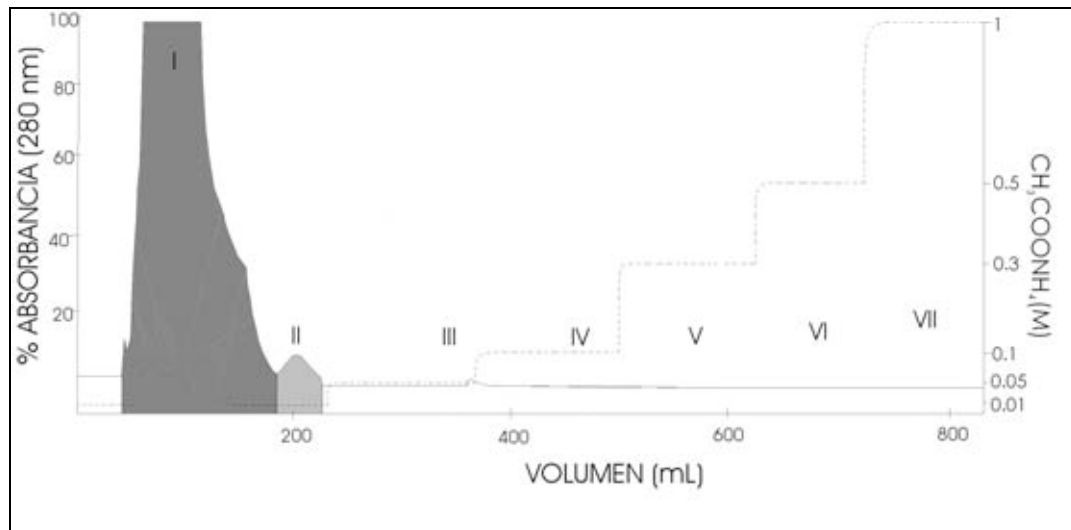


Fig. 3.12 Cromatograma de intercambio catiónico Fractogel EDM SO_3^- , muestra AP4G50QAEF1 buffer de elución acetato de amonio pH 5.4, flujo de 1.0 mL/min.

A continuación se muestra en la Fig. 3.13 el espectro de la desalación de la muestra AP4G50QAEF9; posteriormente se aplicó la muestra en el gel de intercambio catiónico EMD SO_3^- , sin obtener ninguna respuesta, por lo que se utilizó otro equipo AKTA prime plus GE de cromatografía en gel y la columna de HiTrap Sepharose Fast Flow (SP FF) para intercambio catiónico, en este equipo se pasó la muestra 17 ocasiones para poder obtener mayor cantidad de muestra purificada, ya que la columna es de 1 mL de volumen, en la figura 3.17 se observa el espectro obtenido de este equipo.

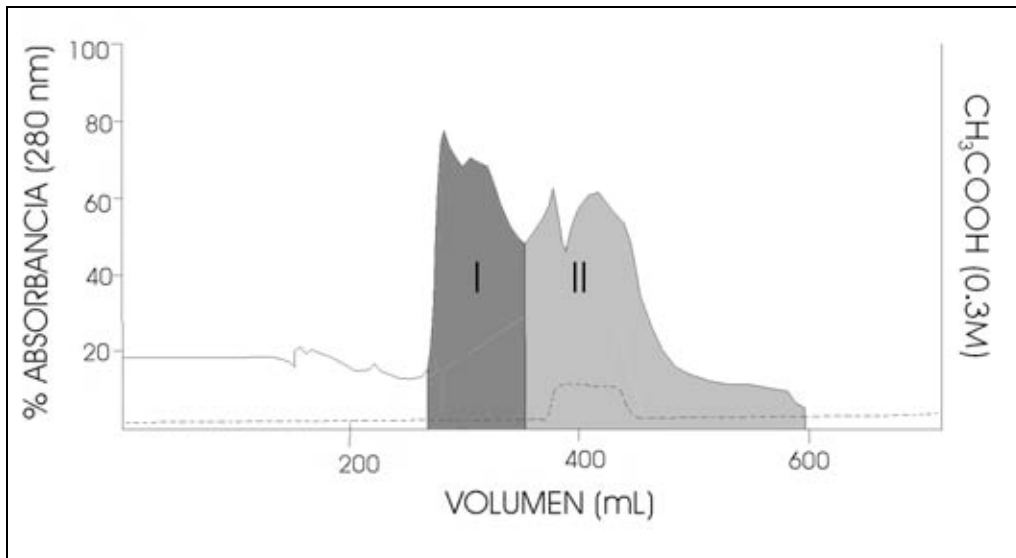


Fig. 3.13 Cromatograma de filtración en gel Sephadex G-25 F, muestra AP4G50QAEF9 buffer de elución ácido acético, flujo de 1.5 mL/min.

Por otro lado la fracción AP4G50QAEF9 fue desalada en una columna de Sephadex G-25, donde dos fracciones resultaron activas, AP4G50QAEF9G25F1 y AP4G50QAEF9G25F2 posteriormente estas fracciones, se adicionaron a una columna de intercambio catiónico Hi Trap SP FF, y posteriormente se adicionó en una columna Microsorb C4 (250 x 4.6 mm, con flujo de 1.0mL/min, eluído con ácido tricloroacético al 1%) del equipo de HPLC.

En estos últimos pasos de la purificación del intercambio catiónico, fue donde las fracciones activas perdieron actividad al realizar el registro con los ovocito de *Xenopus laevis*, debido a que las fracciones anteriores a este paso, mostraron actividad importante, tal es el caso de la fracción AP4G50QAEF9G25F2.

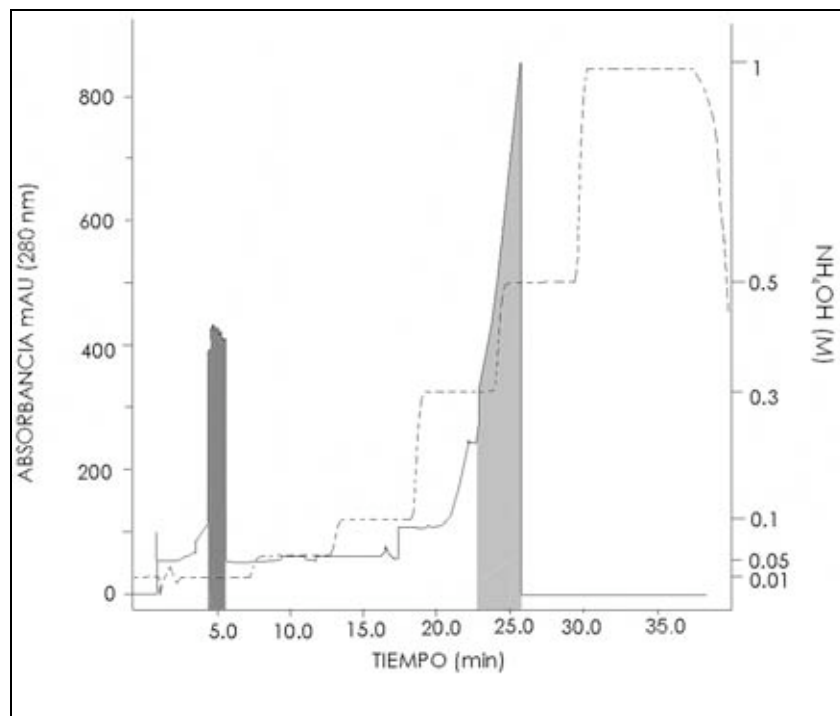


Fig. 3.14 Cromatograma de filtración en gel de intercambio catiónico Hi Trap SP FF, muestra AP4G50QAEF9G25F1, buffer de elución acetato de amonio pH 5.4, flujo de 1.0 mL/min.

Como paso final en la purificación se utilizó en equipo de HPLC, a continuación se presentan las fracciones que mostraron actividad en cangrejos en el paso anterior, a la purificación por HPLC, debido a la poca cantidad de muestra obtenida (ng), no se probó la actividad en los cangrejos, es por ello que en las figuras no se observa (a diferencia de las anteriores) ninguna parte sombreada que indica las fracciones probadas en cangrejos, el equipo de HPLC se encontraba descalibrado, esto por la dificultad de establecer la línea base y por lo observado en los espectros obtenidos.

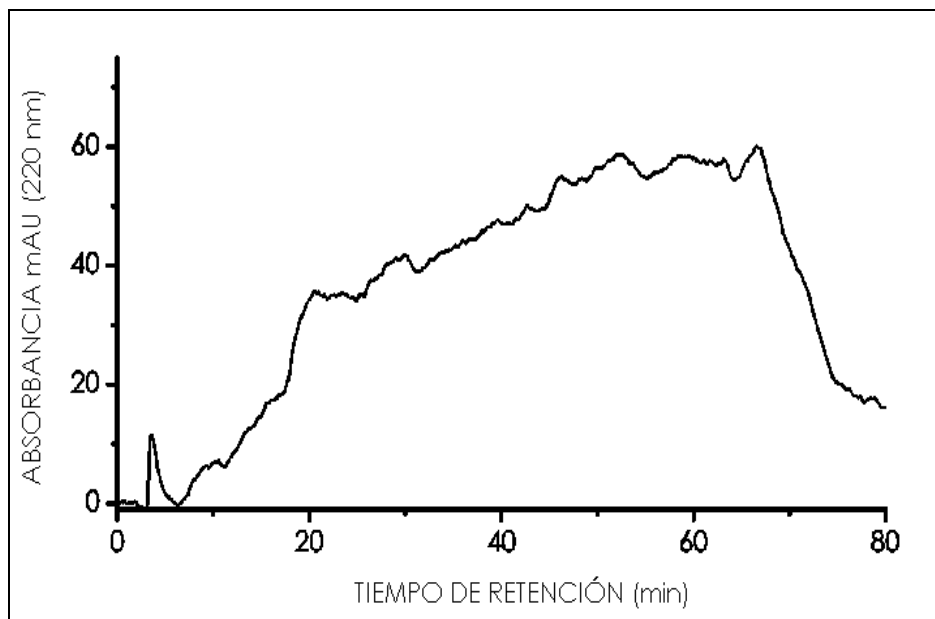
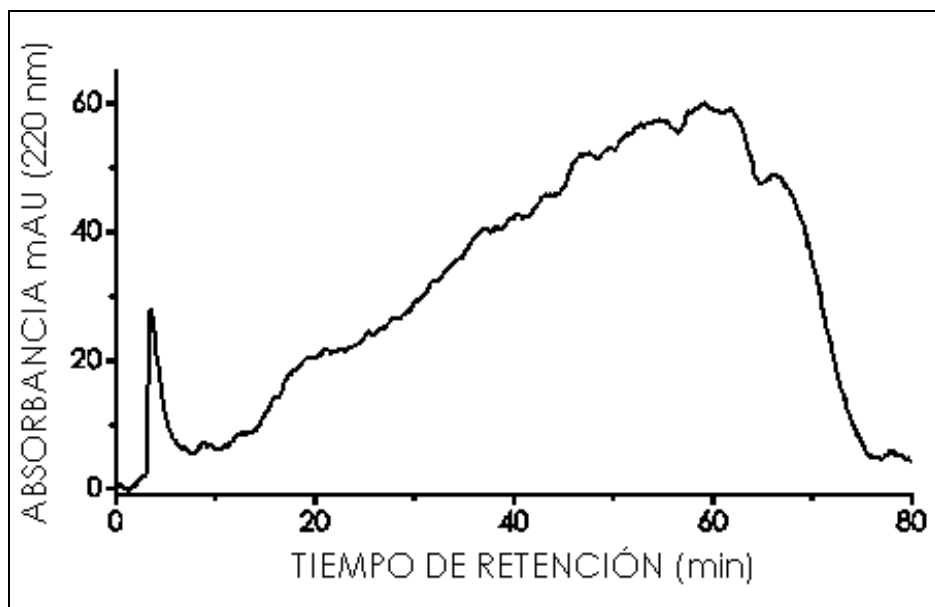
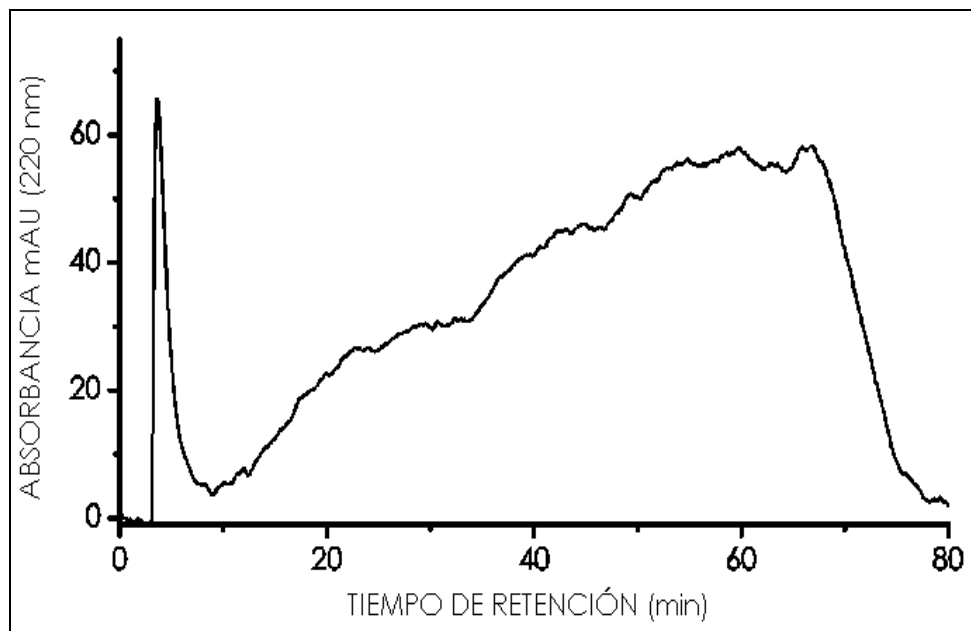


Fig. 3.15 Espectro de HPLC de la muestra AP4G50QAEF1EMDF1G25F1, gradiente lineal de elución 90 a 10% agua (10mM ácido trifluoroacético), en acetonitrilo (10nM ácido trifluoroacético), flujo de 1.0 mL/min.



3.16 Espectro de HPLC de la muestra AP4G50QAEF9G25F1EMDF2, gradiente lineal de elución 90 a 10% agua (10mM ácido trifluoroacético), en acetonitrilo (10nM ácido trifluoroacético), flujo de 1.0 mL/min.



3.17 Espectro de HPLC de la muestra AP4G50QAEF9G25F1EMDF1, gradiente lineal de elución 90 a 10% agua (10mM ácido trifluoroacético), en acetonitrilo (10nM ácido trifluoroacético), flujo de 1.0 mL/min.

3.6 ELECTROFORÉISIS

La técnica de electroforéisis puede ser un instrumento excelente para la determinación aproximada de la masa molecular de las proteínas (Shapiro, 1967).

Se realizaron geles de acrilamida al 12%, y se agregó el extracto crudo en concentración 10 mg/mL, se pudieron observar bandas entre los siguientes intervalos 225 - 76, 52, 38- 31, 31-24, de 24 a 17 y una menor a 17 kDa, en las figuras posteriores 3.18 y 3.19 se muestran fotografías de estas bandas.

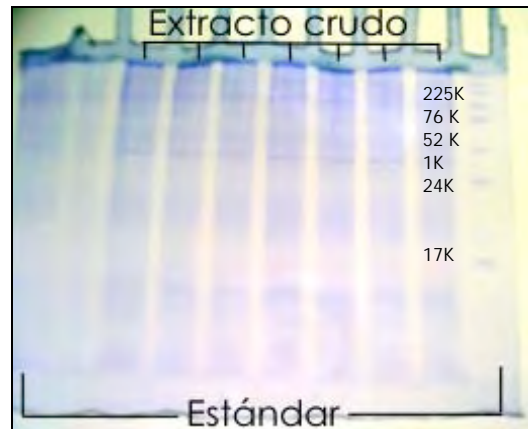


Fig. 3.18 Gel de acrilamida del extracto crudo de *Aiptasia pallida*, en los extremos se muestran los estándares de alto peso molecular y en el centro se muestra el extracto crudo diluido 1:1 en el "sample buffer".

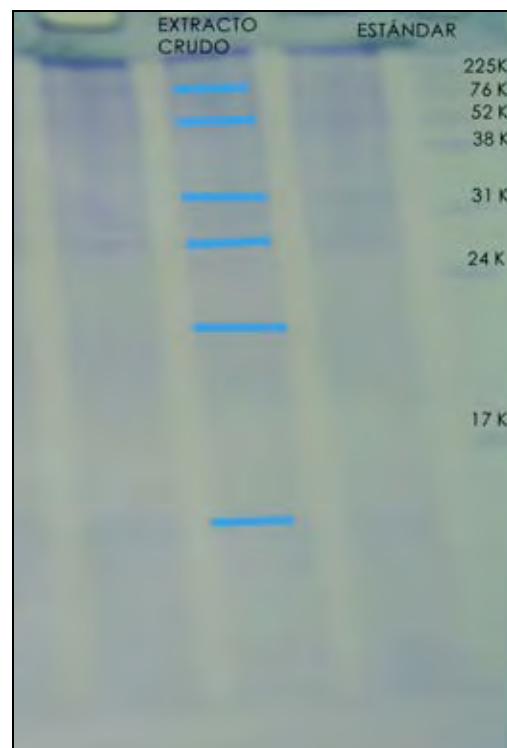


Fig.3.19 Gel de acrilamida del extracto crudo de *Aiptasia pallida*, en el extremo derecho se muestra el estándar de alto peso molecular y en las tres columnas el extracto crudo. La columna del centro muestra con ayuda de las líneas azules, las bandas observadas con los respectivos pesos moleculares 225 - 76, 52, 38- 31, 31-24, de 24 a 17 y una menor a 17 kDa.

3.7 BIOENSAYOS

Para poder conocer y caracterizar los efectos neutóxicos, hemolíticos y la presencia de citolisinas se utilizaron bioensayos o pruebas con organismos vivos; con estas pruebas se puede detectar y cuantificar toxinas que afectan específicamente a las membranas excitables (neurotoxinas) y membranas celulares (citolisinas y hemolisinas).

3.7.1 Actividad neurotóxica con cangrejos *Ocypode quadrata*

El extracto crudo obtenido, fue fuente para distintos bioensayos, entre ellos, las pruebas neurotóxicas con cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, que se siguieron a lo largo de la purificación. Entre los efectos ocasionados en este organismo se observaron movimientos involuntarios de tenaza, patas y ojos, parálisis, y se murieron en un tiempo aproximado de minutos en el caso del extracto crudo y para algunas de las fracciones purificadas en horas. Estas observaciones también son descritas por Hessinger, (1973 y 1979) y Kem (1988).

Se inyectó a los cangrejos diferentes muestras, la cantidad varió de acuerdo al peso de los organismos, en la Tabla 3.20, se presenta información detallada del bioensayo.

Tabla 3.20 Bioensayo del extracto crudo de *A. pallida* en el cangrejo *O. quadrata*
Cangrejo *Ocypode quadrata*

Fecha	Género	Peso	Muestra	Cantidad	Tiempo	Observaciones
01/02/2008	Macho	1.1096 g	Extracto crudo	0.05 mL	3 min	Movimientos involuntarios de tenaza, patas y ojos, parálisis y posteriormente muerte.
	M	1.0567 g	Agua desionizada	0.05 mL	20 s	Inmovilidad seguida de movimientos rápidos y volvió a la normalidad.
18/04/2008	H	116.792	Extracto crudo	0.1 mL	6 horas	Movimientos involuntarios instantáneos. Después de 6 hrs no había movimientos en las patas y ojos se observó movimientos involuntarios en la tenaza y patas, al cabo de 20 min más murió.
	H	1.683 g	Agua desionizada	0.05 mL	30 s	Permaneció inmóvil con movimientos rápidos y volvió a la normalidad.
01/05/2008	M	3.9763 g	0.1 mL Extracto en 1 mL agua	0.1 mL	1:02 hrs	Segregación de espuma café, parálisis, movimientos rápidos, lentos, tensión en la pata inyectada, se volteos hacia atrás, cambio de color en el caparazón tenue, movimiento de ojos de adentro hacia fuera. Espuma y con movimientos lentos, muerte.
	H	13.9048 g	0.1 mL extracto en 1 mL de agua	0.2 mL	4:25 hrs	Segregación de espuma café, parálisis, movimientos rápidos, lentos, tensión en la pata inyectada, se volteos hacia atrás, cambio de color en el caparazón tenue, movimiento de ojos de adentro hacia fuera. Espuma y movimientos lentos, muerte.

Tabla 3.20 Continuación del bioensayo del extracto crudo de *A. pallida* en el cangrejo *O. quadrata*

Cangrejo *Ocypode quadrata*

Fecha	Género	Peso	Muestra	Cantidad	Tiempo	Observaciones
19/08/2008	H	64.365	AP4G50Q.AEF1	0.1	1: 48HRS	Parálisis, mov. tetánicos, inmovilidad, ojos descontrolados, coloración, parálisis y mov. lentos, muerte.
	M	71.184	AP4G50Q.AEF1	0.1	2:21 HR	Mov. tetánicos, parálisis, inmovilidad, ojos descontrolados, soltó un pereipodo, coloración, parálisis y mov. lentos.
	M	26.912	AP4G50Q.AEF8	0.1	1 HR	Inmovilidad, estrés, volvió a la normalidad.
	M	22.621	AP4G50Q.AEF8	0.1	1 HR	Inmovilidad, volvió a la normalidad.
	M	41.813	AP4G50Q.AEF9	0.1	2:16 min	Parálisis, mov. tetánicos, muerte.
	H	42.945	AP4G50Q.AEF9	0.1	3:49 min	Parálisis, mov. involuntarios, burbujas, muerte.
	M	32.992	AP4G50Q.AEF2	0.1	1 HR	Inmovilidad, estrés, volvió a la normalidad.
	H	47.877	AP4G50Q.AEF2	0.1	1 HR	Inmovilidad, estrés, volvió a la normalidad.
	H	81.987	AP4G50Q.AEF10	0.1	1 HR	Inmovilidad, estrés, volvió a la normalidad.
	M	69.552	AP4G50Q.AEF10	0.1	1 HR	Inmovilidad, estrés, volvió a la normalidad.

Tabla 3.20 Continuación del bioensayo del extracto crudo de *A. pallida* en el cangrejo *O. quadrata*

Fecha	Género	Peso	Muestra	Cantidad	Tiempo	Observaciones
19/08/2008	M	49.626	AP4G50Q.AEF5	0.1	1 HR	Inmovilidad, estrés, mov. en la boca, volvió a la normalidad.
	M	59.840	AP4G50Q.AEF5	0.1	1 HR	Inmovilidad, estrés, mov. en boca, volvió a la normalidad.
01/10/2008	H	104.479	AP4G50Q.AEF1E MDF1	0.1	34:45 min	Parálisis, mov. tetánicos, salivamiento, mov. lentos, cambio de color, muerte
	M	66.750	AP4G50Q.AEF1E MDF2	0.1	1 HR	Inmovilidad, estrés, mov. en boca, volvió a la normalidad.
	M	76.935	AP4G50Q.AEF1E MDF1	0.1	1 HR	Inmovilidad, estrés, mov. en boca, volvió a la normalidad, tiro la pata
	M	88.937	AP4G50Q.AEF9G 25F1	0.1	35:18 min	Mov. rápidos, cambio de color, muerte
	H	116.825	AP4G50Q.AEF9G 25F2	0.1	35:26 min	Salivó, parálisis, mov. tetánicos, cambio de color a oscuro, muerte.

El tiempo requerido para producir la muerte por la inyección intravenosa de la dosis letal es muy corto. Inyectándose LD₅₀ del veneno de la *Aiptasia pallida* principalmente se han hecho pruebas con crustáceos, muere en minutos y mientras mayor concentración la muerte es en segundos (Hessinger, 1979).

Los síntomas que se observan al inyectar la dosis letal son diferentes para cada toxina. Cuando es inyectado LD₅₀ o menos del veneno de *A. pallida* en cangrejos, hay letargia y respiraciones irregulares, seguida de parálisis parcial en las tenazas, músculos maxilares, inmediatamente antes de la muerte, convulsiones violentas y espasmos musculares (Hessinger, 1979).

En pruebas con cangrejos (*Uca*), los venenos de la *Aiptasia pallida* inducen movimientos en las patas, actividad violenta seguida de parálisis y movimientos involuntarios y en algunos casos la muerte (Hessinger *et al.*, 1973).

3.7.2 Actividad hemolítica en eritrocitos humanos

Las proteínas citolíticas son una parte muy importante del veneno de las anémonas. Estas proteínas penetran las membranas celulares por la formación de poros transmembranales lo que causa la lisis celular (Rnigoj, 2009). El bioensayo de hemólisis es considerado como una prueba sensible y funcional para la caracterización de citolisinas.

En distintas especies de anémonas se ha realizado pruebas hemolíticas, tal es el caso de la anémona *Bartholomea annulata*, (que pertenece a la misma familia que la *Aiptasia pallida*) en la que se hicieron pruebas con eritrocitos de ratón a distintas concentraciones de extracto crudo y se observó que la respuesta hemolítica depende de la concentración del extracto crudo, esto puede indicar que la cantidad de toxinas específicas en el extracto crudo es directamente proporcional al contenido de las proteínas presentes en la muestra (Santamaría, *et. al.* 2002).

Se realizaron pruebas hemolíticas con el extracto crudo de la *Aiptasia pallida* a diferentes concentraciones, en sangre humana tipo O positiva. A continuación se observa en la grafica 3.21 los valores de absorbancia, leídos a 415 nm, obtenidos a las diferentes concentraciones del extracto crudo.

La hemólisis, representa la cantidad de hemoglobina liberada, causada al agregar diferentes concentraciones del extracto crudo a eritrocitos humanos del tipo O⁺, se empleó el método de Rottini *et. al.* (1990) se obtuvo el valor de la 0.98 mg/mL de extracto crudo como unidad de hemólisis media (UH₅₀) y como hemólisis al 100 % un valor de 1.6 mg/mL de extracto crudo. Sólo se realizó con un tipo de sangre ya que en trabajos anteriores se ha visto que no hay cambios significativos probando con diferentes tipos de sangre (Cruz, 2004).

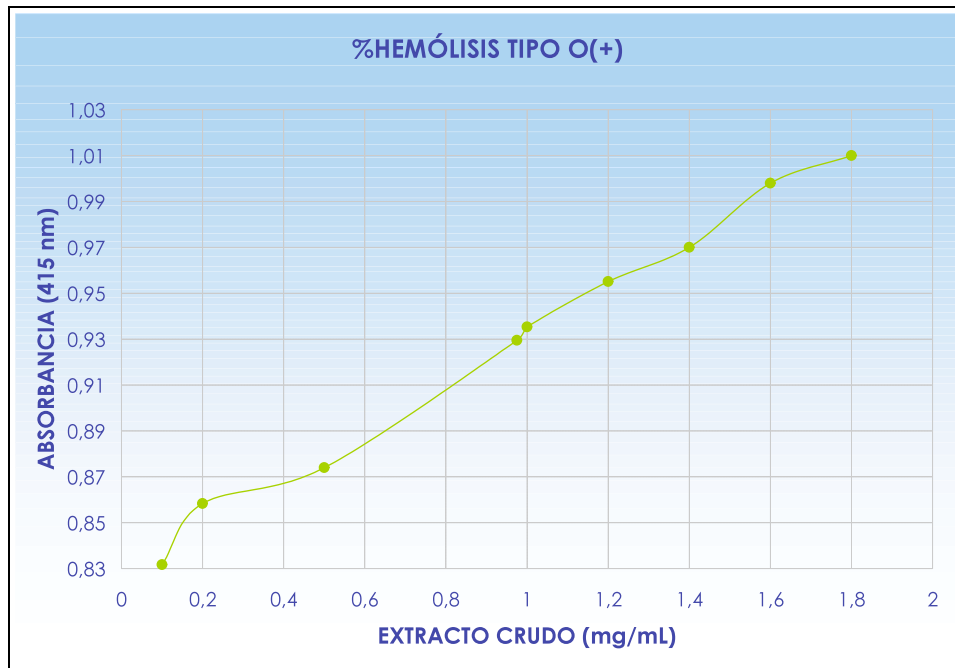


Fig. 3.21 Porcentaje de hemólisis del extracto crudo en eritrocitos humanos.

Senĩ (1990), nos presenta un cuadro con estudios realizados de diferentes especies de anémonas: la toxina activa con su respectivo peso molecular, etc. entre estos estudios se encuentra la *Aiptasia pallida*, llevado a cabo por Hessinger y Lenhoff en 1976, en el cual ellos sugieren la presencia de citolisinas, que son las responsables de la muerte de cangrejos y se observó que la letalidad es de 40 μ g/kg para la fracción determinada III y para la fracción IV fue de 60 μ g/kg. Los pesos moleculares obtenidos en ambas fracciones son de 30 kDa, que comparadas con las enlistadas mucho mayores a todas las descritas (a excepción de *Metridium senile* con 80 kDa).

De acuerdo a los geles de poliacrilamida realizados, se muestra que en el extracto crudo puede existir la presencia de citolisinas, esto por la presencia de la banda aproximada entre 20 y 17 kDa, además de que se observa actividad hemolítica, por lo anterior, es que se supone que existen actinoporinas. En estudios realizados se observan que en distintas toxinas de anémonas existen las actinoporinas con pesos moleculares que oscilan entre los 18 y 20 kDa, puntos

isoelectrónicos básicos alrededor de 9 además de la presencia de esfingomielina. En la tabla 3.22 se observa que la anémona *Bunodosoma caissarum*, inhibe esfingomielina, el punto isoelectrónico alrededor de 9 y posee una toxina formadora de poros y por otro lado Malpezzi (1995) señala la existencia de fosfolipasa A2 como el responsable de acciones citolíticas, es decir, existe una mezcla de compuestos enzimáticos y toxinas formadoras de poro, con distintos pesos moleculares, este mismo comportamiento se podría presentar en la *A. pallida*, la presencia de compuestos enzimáticos como la PLA2 aunado a toxinas formadoras de poro.

Trabajos anteriores indican que las toxinas hemolíticas y citolíticas encontradas en diversas especies de anémonas, tienen un mecanismo de acción directa y no enzimática, a excepción de *Aiptasia pallida* (Grotendorst, 2000), *Bunodosoma caissarum* (Malpezzi, 1995), entre otras, donde la fosfolipasa A2 (PLA2) ha sido encontrada.

De la acontia de la *A. pallida*, se aislaron nematocistos microbásicos mastigoforos, se observó que el veneno contiene multicomponentes con actividad neurotóxica, hemolítica y citolítica. La hemólisis es el resultado de tres tipos de proteínas sinérgicas, incluyendo la fosfolipasa A2 en dos formas y . La fosfolipasa A2 es un componente esencial en el sistema citolítico de serpientes, abejas y anémonas. Esta fosfolipasa comúnmente participa en las acciones citolíticas de los venenos, una clase de neurotoxina presináptica, esto ha sido identificado en venenos de serpientes, se ha identificado un peso molecular de 8 a 13 kDa y de 5-6 disulfuros, lo que la hace altamente resistente a la desnaturalización. Por otra parte en la *A. pallida* encontró que la forma de la fosfolipasa A2, es la más abundante con el 70% del total, el peso molecular es de 43 kDa y el punto isoelectrónico de 8.8 (Grotendorst, 2000).

Tabla 3.22 Reporte de características moleculares de actinoporinas presentes en toxinas purificadas de anémonas (Modificación Alegre- Cebollada, 2007).

ESPECIE	TOXINA	PM(kDa)	PUNTO ISOELÉCTRICO	INHIBICIÓN
<i>Actinera villosa</i>	Avt- I	19	9.2	SM
<i>Actinia cari</i>	Caritoxina I	19.8	9.4	SM
	Caritoxina II	19.8	10	SM
<i>Actinia equina</i>	Equinatoxina I	19	9.8	SM
	Equinatoxina II	19	10.5	SM
	Equinatoxina III	19	10.5	SM
<i>Actinia tenebrosa</i>	Tenebrosina A	19.8	>9.4	nd
	Tenebrosina B	19.5	>9.4	nd
	Tenebrosina C	19.8	>9.4	SM
<i>Anthopleura japonica</i>	"Hemolisina I"	19.5	>9	SM
	"Hemolisina II"	19	8	nd
<i>Bunodosoma cassarum</i>	Cassarolisina I	19.8	>9	SM
<i>Condylactis gigantea</i>	C.g. toxina	18.3	8.9	SM
<i>Entacmea quadricolor</i> (<i>Parascyonis actinostoloides</i>)	Parasitoxina	18	7.9	nd
<i>Epiactis prolifera</i>	Epiactin A	19.5	6.4	nd
	Epiactin B	19.5	8.3	SM
	Epiactin C	19.5	7.6	nd
<i>Heteractis magnifica</i>	Magnificalisina I	19	9.4	nd
	Magnificalisina II	19	10	nd
	Magnificalisina III	19	9.1	nd
<i>Phyllodiscus semoni</i>	PsTX-20A	20	9.4	nd
<i>Phymactis clematis</i>	Coelenterolisina	nd	nd	SM
<i>Pseudactinia varia</i>	Variolisina	19.5	9.8	SM
<i>Radianthus macrodactylus</i>	RTX- A	20	9.8	SM
	RTX- S	20	9.8	SM
	RTX- SII	19.3	10	SM
	RTX- G	20	10.5	SM
<i>Sagartia rosea</i>	Src- I	19.6	4.8	SM
<i>Stichodactyla helianthus</i>	Sticholisina I	19.4	9.2	SM
	Sticholisina II	19.3	9.8	SM
<i>Stichodactyla kenti</i>	Kentin	18	9.2	SM
<i>Stichodactyla mertensii</i>	SmT-I	nd	nd	SM
	SmT-II	nd	nd	SM

nd - No determinado

SM - Esfingomiolina

3.7.3 Actividad citotóxica en *Artemia salina*

Para la determinación de la CL₅₀, se utilizaron *A. salina*, las concentraciones a las que se hizo el bioensayo fueron las siguientes 20, 40, 60, 80 y 100 L, el valor de la CL₅₀ fue de 10.15 U, este bioensayo se hizo por duplicado.

En esta prueba nos dimos cuenta que el extracto crudo tiene efectos citotóxicos en estos organismos, al provocar la muerte de estos organismos. Sánchez-Rodríguez (2006), reporta que la CL₅₀ del extracto crudo de la anémona *Lebrunia danae* fue de 2.82 mg/mL, en experimentos realizados con *A. salina* y por otra parte se reporta que la CL₅₀ de *Anthopleura elegantissima* es de 5.78 mg/mL, esto significa que los compuestos citotóxicos de *L. danae* son mayores que *A. elegantissima* y al ser comparado con los resultados obtenidos, también es mayor que *A. pallida* (CL₅₀= 10.15 mg/mL).

3.7.4 Actividad tóxica en la medusa *Cassiopeia xamachana*

Se inyectó extracto crudo de *Aiptasia pallida* a las medusas *Cassiopeia xamachana* y se observaron los comportamientos.

Los bioensayos realizados con la *C. xamachana*, mostraron sólo cambios fisiológicos (Tabla 3.23), como la aparición de manchas blancas en la campana y la lentitud en el movimiento de los tentáculos en el momento de ser inyectado el extracto crudo de la *A. pallida*, pero en ningún caso se observó la muerte de algún organismo, este experimento se hizo con el fin de observar, si las proteasas digestivas que se encuentra en la medusa, son específicas para el tipo de nematocistos que el organismos posee y que otros tipos de nematocistos de diferente familia pueden ser tóxicos, sin embargo, no fue clara la respuesta obtenida, ya que se esperaba, que de ser cierta esta hipótesis el organismo inyectado muriera, aunque cabe la posibilidad de que se necesita mayor concentración de toxina para poder obtener resultados claros, pero ya no se inyectaron mayores dosis por la poca cantidad de extracto crudo obtenida.

Tabla 3.23 Bioensayo del extracto crudo *A. pallida* en la medusa *C. xamachana*.

Fecha	Peso	Muestra	Cantidad	Tiempo	Observaciones
21/08/2008	12.6955 g	Extracto crudo 1	0.5 mL	24 hrs	Aparecieron manchas blancas en su campana, mov. Lentos, parálisis de 30 seg, contracción de tentáculos.
22/08/2008	38.5787 g	Extracto crudo 2	1.0 mL		Parecía normal, contracción de tentáculos.
	32.6857 g	Extracto crudo 1	0.7 mL		Normal, al cabo de 1 hr contracción de tentáculos.
	60.5904 g	Extracto crudo 1	0.8 mL		Mov. Lentos, contracción de tentáculos al nadar.
01/09/2008	23 g	Extracto crudo 3	0.25 mL		Mov. Lentos, manchas blancas, volvió a la normalidad
	35 g	Extracto crudo 3	0.25 mL		Mov. Lentos, volvió a la normalidad
	30 g	Extracto crudo 2	0.25 mL		Mov. Lentos, en la campana se observó que la toxina que entraba y se volvía blanca, volvió a la normalidad
	39 g	Extracto crudo 2	0.25 mL		Mov. Lentos, volvió a la normalidad
	27 g	Extracto crudo 1	0.25 mL		Mov. Lentos, manchas blancas, volvió a la normalidad
	40 g	Extracto crudo 1	0.25 mL		Mov. Lentos, manchas blancas, volvió a la normalidad

3.7.5 Determinación del efecto inhibitorio en microorganismos.

3.7.5.1 Tinción

Se sembraron microorganismos en caja de Petri y posteriormente se resembraron en tubos de ensayo, se realizaron tinciones para constatar que los organismos no estaban contaminados o con algunos otros microorganismos y se tiñeron con safranina.

A continuación se muestra un cuadro con las características principales observadas:

Tabla 3.24 Observaciones en el microscopio de los microorganismos teñidos

MICROORGANISMO	OBSERVACIONES	TIPO DE GRAM
<i>P. aeruginosa</i> 079 290604	Bacilos rojos largos	Negativo
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Pinos morados, con esferas pequeñas	Hongo
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	Bacilos rojos pequeños	Negativo
<i>E. coli</i> ATCC 10534	Bacilos rojos pequeños	Negativo
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	Sacos morados pegados en pares	Positivo

Se probaron diferentes concentraciones del extracto crudo 2 (0.5, 10, 25 y 50 mg/mL) y del extracto 3 (1,13, 20 y 50 mg/mL). La cantidad de organismos fue estandarizado con la lectura de 25% de transmitancia ($\pm 3\%$), aproximadamente en turbulencia fue 3 en McFarland, es decir, 2.25×10^8 UFC.

En tres de los experimentos se observaron halos de inhibición principalmente en *Micrococcus luteus* y en *Pseudomona aeruginosa*, la medida del halo inhibitorio oscilaba entre 0.5 a 0.9 cm y de 0.3 a 1.1 cm respectivamente.

La *Pseudomona* es una bacteria Gram negativa, considerada también un patógeno oportunista, produce infección en pacientes con problemas en los mecanismos normales de defensa inmune. Múltiples son los reportes cada año sobre sus infecciones en pacientes inmunodeprimidos y pacientes con fibrosis quística. En la etapa de invasión a los tejidos *P. aeruginosa* produce y excreta toxinas que les permiten implantarse; entre ellas las mas estudiadas son: la elastasa, la proteasa alcalina y la exotoxina A. La exotoxina A tiene actividad necrótica en el sitio de colonización bacteriana y cuando se purifica tiene alto poder letal en animales de experimentación, incluyendo primates y daña severamente los tejidos infectados y produce hemorragias de órganos internos especialmente en pulmones y la córnea.

Se conocen pocas sustancias inhibitorias, ya que este microorganismo es muy resistente a los antibióticos, debido a su facilidad para mutar, algunos de los antibióticos que han mostrado

actividad contra esta bacteria están: aminoglicosidos, quinolonas, cefalosporinas y uredopenilicinas (Moya, 2007).

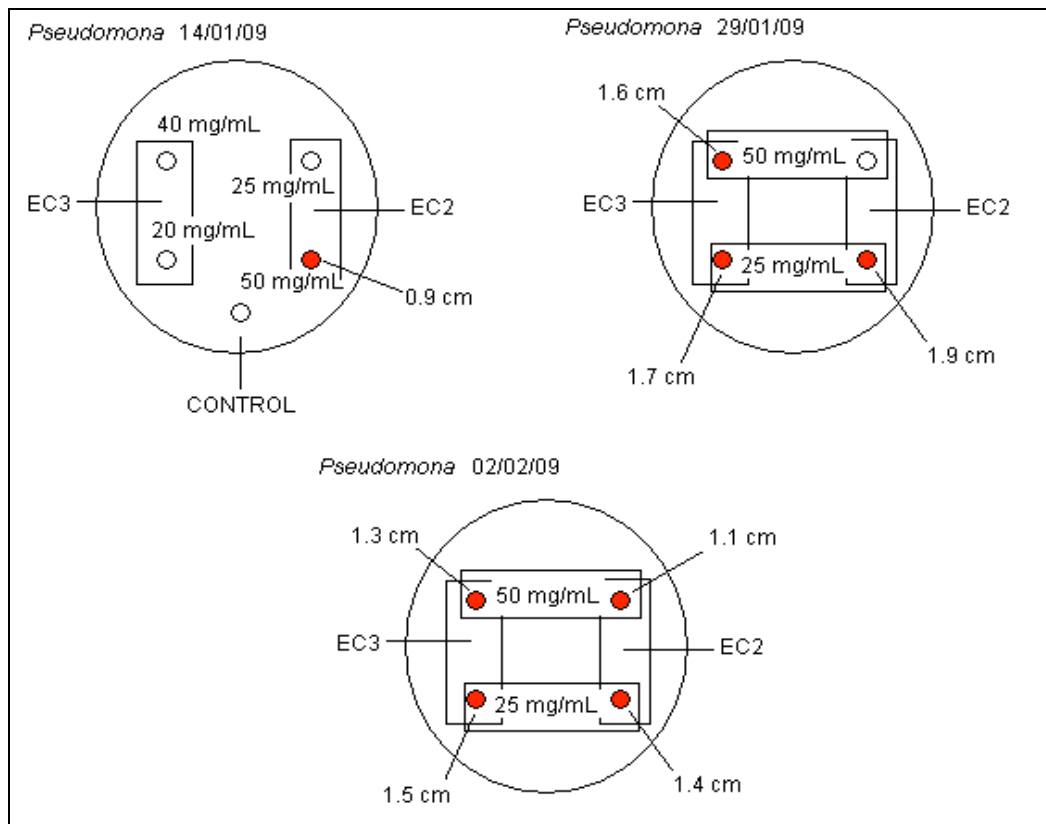


Fig. 3.25 Inhibición del extracto crudo en *Pseudomonas aeruginosa*, donde EC2 es extracto crudo 2 y EC3 extracto crudo 3, CONTROL- Agua destilada estéril, en los rectángulos se observa la concentración de extracto utilizada, los círculos rojos indican que existió inhibición y se muestra el tamaño de ésta; se observan las fechas del experimento.

En la Fig. 3.25 se hace referencia al diámetro de inhibición que el extracto crudo produjo en *P. aeruginosa*, podemos observar que en el último experimento, tanto la concentración de 25 y de 50 mg/mL, son capaces de inhibir a la bacteria, el penicilíndro contaba con 0.8 cm de diámetro, por lo que en los dos últimos ensayos se muestra un diámetro de inhibición importante (1.9 y 1.5 cm).

La bacteria *M. luteus* es una bacteria Gram positiva, considerada como un patógeno oportunista en pacientes que poseen el VIH, se encuentra presente en la microflora cutánea, en algunas

infecciones como bacteremia recurrente, meningitis y neumonía. Shapo (2007), experimentó con gorgoneos, *Leptogorgoa virgulata*, y observa que hay una inhibición en *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi* y *Micrococcus luteus*. Explica que la inhibición de las bacterias puede deberse a que los metabolitos secundarios tienen propiedades antimicrobianas..

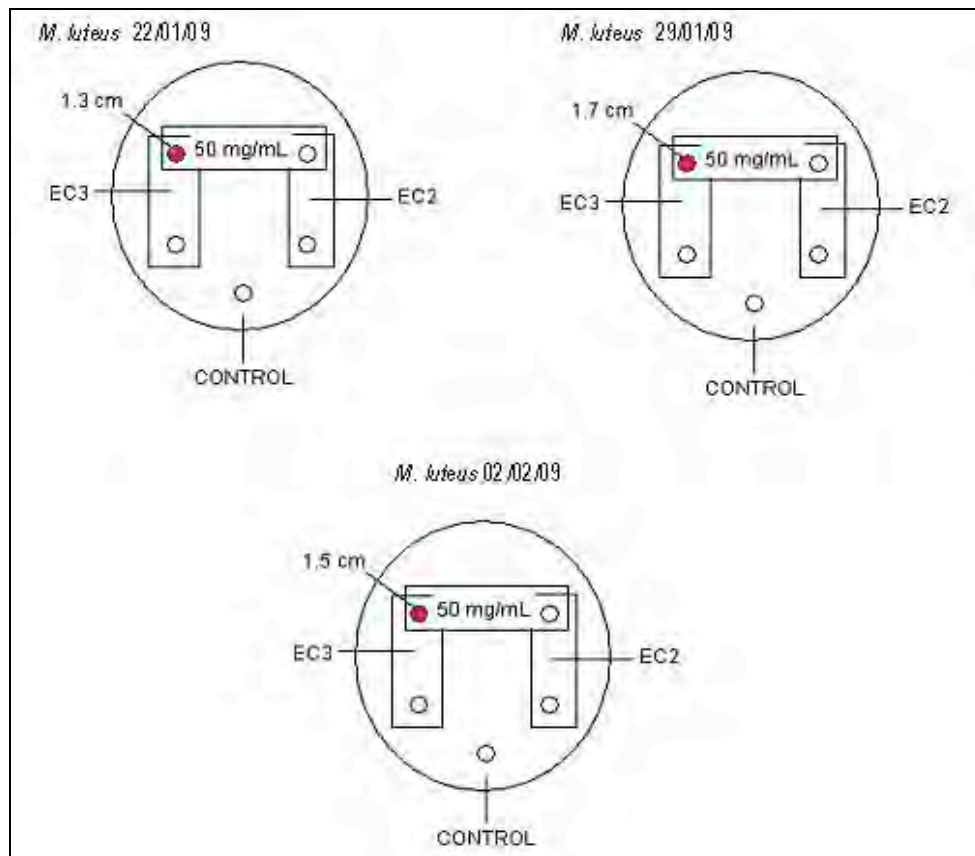


Fig. 3.26 Inhibición del extracto crudo en *M. luteus*, donde EC2 es extracto crudo 2 y EC3 extracto crudo 3, CONTROL- Agua destilada estéril; en los rectángulos se observa la concentración de extracto utilizada, los círculos rojos indican que existió inhibición y se muestra el tamaño de ésta; se observan las fechas del experimento.

Los metabolitos secundarios son productos sintetizados naturalmente por organismos vivos y juegan un papel importante en su fisiología, su supervivencia y en mecanismos de defensa. Tal es el caso de las esponjas marinas, se sabe que poseen una diversidad importante de metabolitos secundarios, que sirven para la defensa contra las bacterias marinas potencialmente patógenas y han mostrado propiedades importantes como antitumorales, antivirales y antibacteriales (Faulkner, 2000 y Kelman, 2001).

En cuanto a las Figs. 3.27 y 3.28 donde *K. pneumoniae* y *E. coli* presentan inhibiciones, no siempre estuvieron presentes estas observaciones, estas dos bacterias junto con la levadura *C. albicans*, fueron de los que más experimentos se realizaron, debido a que *Pseudomonas* y *M. luteus* en la primera siembra resultaron contaminados y se volvió a resembrar, teñir y observar en el microscopio, por ello los experimentos con estas dos últimas fueron retrasados, pero a su vez, fueron los que en mayor número de experimentos presentaron inhibición.

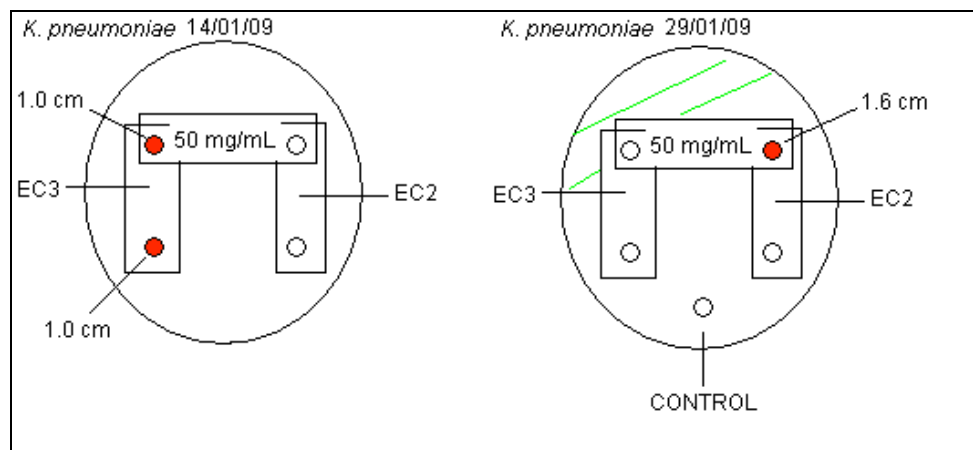


Fig. 3.27 Inhibición del extracto crudo en *K. pneumoniae*, donde EC2 es extracto crudo 2 y EC3 extracto crudo 3, CONTROL- Agua destilada estéril; en los rectángulos se observa la concentración de extracto utilizada, los círculos rojos indican que existió inhibición y se muestra el tamaño de ésta; se observan las fechas del experimento, las líneas verdes señalan una contaminación.

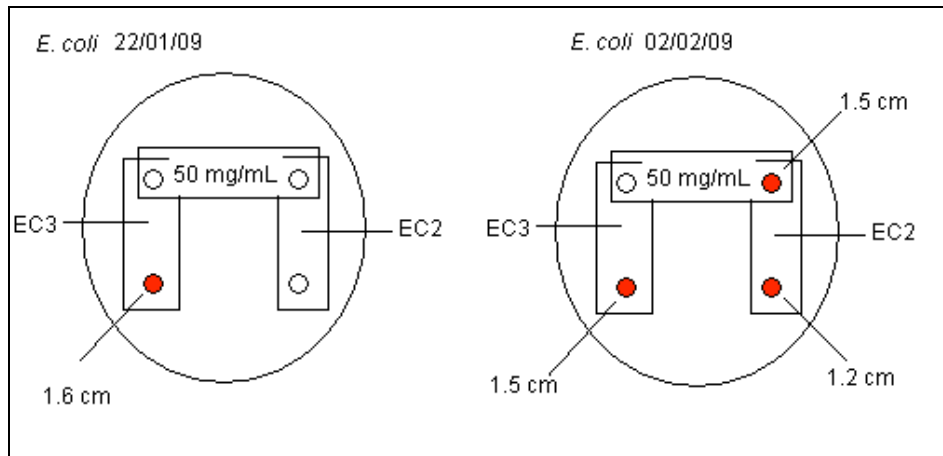


Fig. 3.28 Inhibición del extracto crudo en *E. coli*, donde EC2 es extracto crudo 2 y EC3 extracto crudo 3, CONTROL- Agua destilada estéril; en los rectángulos se observa la concentración de extracto utilizada, los círculos rojos indican que existió inhibición y se muestra el tamaño de ésta; se observan las fechas del experimento.

Se han realizado estudios evaluando los productos naturales marinos en bacterias de organismos como esponjas, moluscos, algas, pastos marinos y cnidarios. Tal es el caso de Bhosale (2002), que probó el extracto de 37 organismos entre ellos flora y fauna marina, y entre las inhibiciones se observó que el alga café *Padina tetrastromatica* inhibió a *Bacillus pumilis* y *Pseudomonas vesicularis* y entre los cnidarios probados *Cassiopeia sp.* inhibió a *Bacillus circulans* y *Pseudomonas putida*. Aquí se muestra la especificidad de cada organismo, para diferentes especies de microorganismos, por lo que sería muy bueno realizar más experimentos de inhibición de *A. pallida* con diferentes especies de *Pseudomonas* o *Micrococcus*, para observar si hay una mejor reacción con alguna especie en particular.

No hay muchos trabajos reportados en los que toxinas, específicamente de anémonas, sean probadas en bacterias, sin embargo Morales-Landa (2007) reporta experimentos de inhibición con diferentes cnidarios entre ellos *Bartholomea annulata*, que pertenece a la misma familia que la *Aiptasia pallida*, pero no se encontró algún efecto relevante en las bacterias probadas (*C. albicans*, *G. lambia* y *O. nolotis*), sin embargo, organismos como *Linuche unguiculata* y *Cassiopeia xamachana*, mostraron inhibición en *Giardia lamblia*, que es un protozoo intestinal

que causa diarrea en humanos y otros mamíferos. Es uno de los patógenos más prevalentes transmitidos por el agua. Estos resultados son importantes ya que se pueden desarrollar nuevos productos farmacéuticos para el tratamiento de la giardiasis que es una de las enfermedades generadas por *G. lamblia*. En este mismo artículo *L. unguiculata*, muestra un efecto importante en *Cándida albicans*, este hongo causa serias infecciones que incluyen a los portadores del VIH, este mismo organismo ha sido inhibida por dos péptidos bioactivos Discobahamin A y B, provenientes de esponjas marinas (Aneiros, 2004).

Es por ello que estos resultados, son de gran importancia, ya que podrían servir para estudios posteriores para el desarrollo de fármacos, obviamente, se requiere de una investigación enfocada específicamente al desarrollo de antibióticos y experimentos con las fracciones obtenidas, para poder llegar a la fracción pura que produce la inhibición, ya que el extracto crudo, contiene muchas proteínas con distintas características, el volumen de la fracción purificada también es muy importante, para poder cambiar las concentraciones, como en el experimento realizado y observar que concentración es la adecuada y produce una inhibición de las bacterias.

3.7.6 Análisis de la actividad sobre canales iónicos del extracto crudo y de las fracciones obtenidas.

Durante la estancia en el laboratorio de Electrofisiología Celular (Instituto de Neurobiología, en Juriquilla, Querétaro), en el periodo de febrero a marzo, los ovocitos de *Xenopus laevis* no pudieron ser registrados, debido a que morían después de ser inyectados y no resistían al tratamiento con colagenasa, esto para romper los enlaces peptídicos presentes en los folículos. En el mes de abril los ovocitos se recuperaron y se probaron diferentes fracciones, a continuación se presentan algunos de los registros realizados.

La concentración del extracto crudo fue de 4×10^{-1} g/L. La cuantificación se realizó con el equipo Nanodrop del Instituto de Neurobiología en Juriquilla, Qro. y el estándar que se utilizó fue de albúmina, debido a que con el método de Bradford, no dio buenos resultados debido a que el

reactivo Bradford estaba contaminado y al realizar la curva estándar el coeficiente de correlación era mucho menor a 0.95.

La primera evaluación fue realizada con ovocitos control, es decir, ovocitos nativos que no fueron inyectados con ARNm y observó ninguna respuesta (Fig. 3.29). Por otro lado al realizar los registros electrofisiológicos se pudo observar que el extracto crudo de la *Aiptasia pallida* generó una respuesta en los ovocitos inyectados con ARNm (Fig. 3.30), esta respuesta se observa como una serie de oscilaciones, además de un aumento de conductancia membranal al exponer el ovocito a cierta concentración del extracto crudo produciendo la generación de una corriente entrante (Furuichi, 1995 y Suresh, 1996)

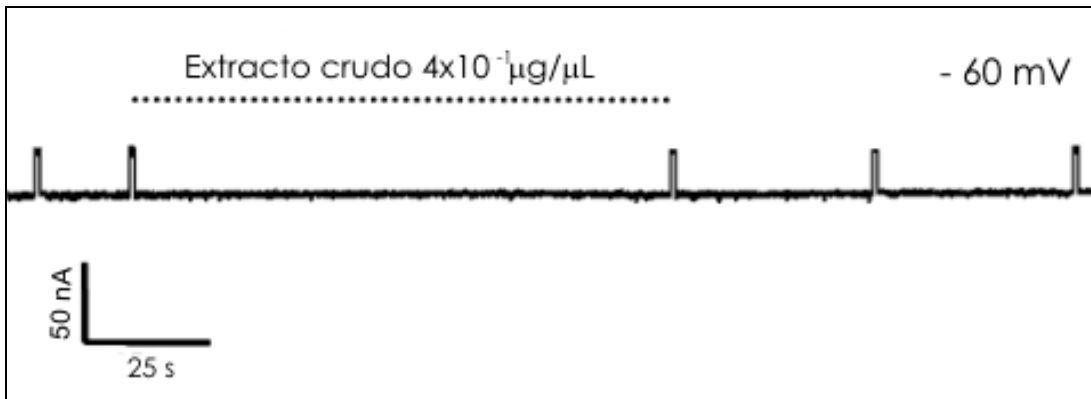


Fig. 3.29 Registro del extracto crudo en ovocito de *X. laevis* nativos a -60 mV.

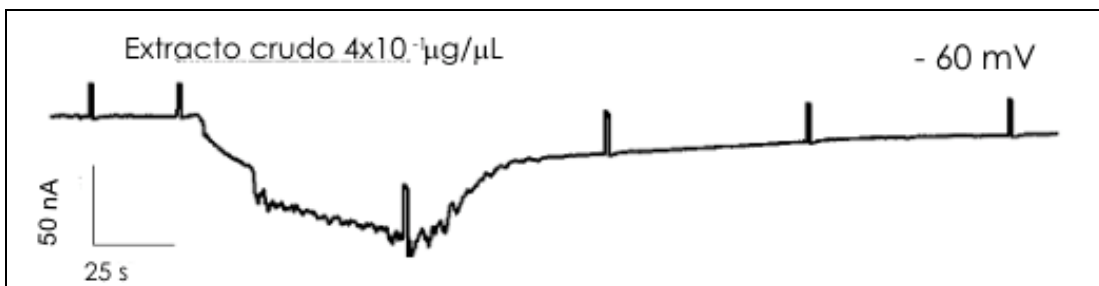


Fig. 3.30 Registro del extracto crudo en ovocito de *X. laevis* inyectado con ARNm a -60 mV.

En la figura 3.30 se muestra que la cinética de esta corriente así como las características eléctricas son muy parecidas a las descritas en las corrientes oscilatorias activadas por la apertura de canales de Cl^- , dependientes a Ca^{+2} , que se activan en ovocitos nativos a través del mecanismo de la liberación de Ca^{+2} inducido por la síntesis de IP_3 .

Posteriormente se evaluaron diferentes fracciones parcialmente purificadas, en ovocitos inyectados con ARNm de cerebro de rata, para identificar un posible cambio en el potencial de membrana.

En la fracción AP4G50QAEF9G25F2, que se muestra en la Fig. 3.31, se observa que hay una corriente entrante que tuvo una amplitud de aproximadamente -2000 nA, lo cual nos indica que hubo una modificación en el flujo de iones a través de los canales iónicos y que aumento la conductancia membranal, a diferencia de la respuesta con el extracto crudo, no hay oscilaciones, se muestra una corriente entrante más limpia, las características de esta respuesta nos dan una posible idea de que esta muestra interacciona en el canal de potasio. Se muestra una respuesta inicial que puede ser no dependiente al voltaje, debido a que a diferentes potenciales sometidos, la respuesta inicial, es muy similar en todos los casos.

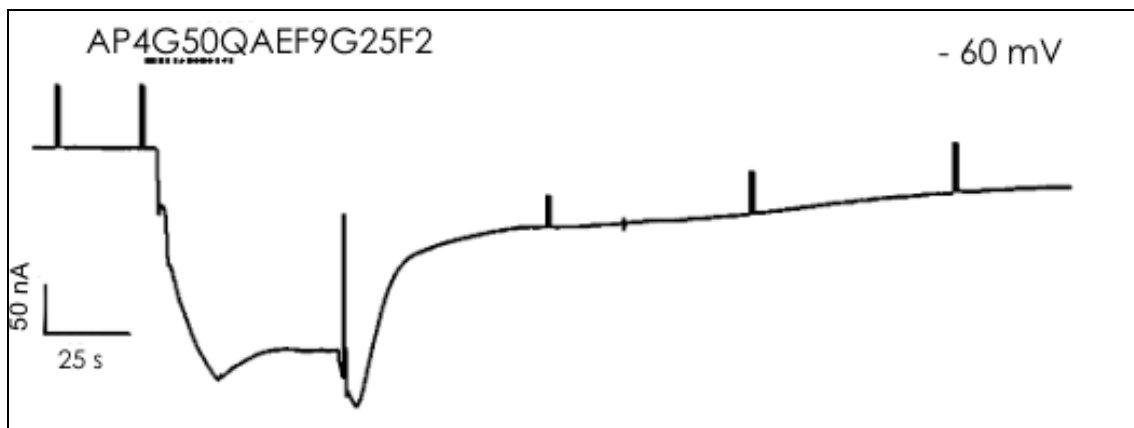


Fig. 3.31 Registro de la muestra AP4G50QAEF9G25F2 en ovocito de *X. laevis* inyectado con ARNm a -60 mV.

En la Fig. 3.32, se muestra el registro de AP4G50QAEF9G25F2EMDF2HPLCF1, donde se observa que no hay ninguna respuesta, al contrario con lo esperado, no mostró tener efecto en los ovocitos inyectados, esto puede deberse a una pérdida de actividad al realizarse la purificación por el HPLC, estas muestras no fueron aplicados a los cangrejos debido a su poca disponibilidad. Sin embargo, las muestras parcialmente purificadas anteriores a la purificación por HPLC mostraron actividad. Tal como se mencionó en la metodología, se hizo un cambio de equipo al desalar la muestra (paso anterior a la purificación por HPLC), y es aquí donde muy probablemente la actividad neurotóxica se perdió y esto nos podría dar la explicación de porque no se observa ninguna señal en el registro realizado.

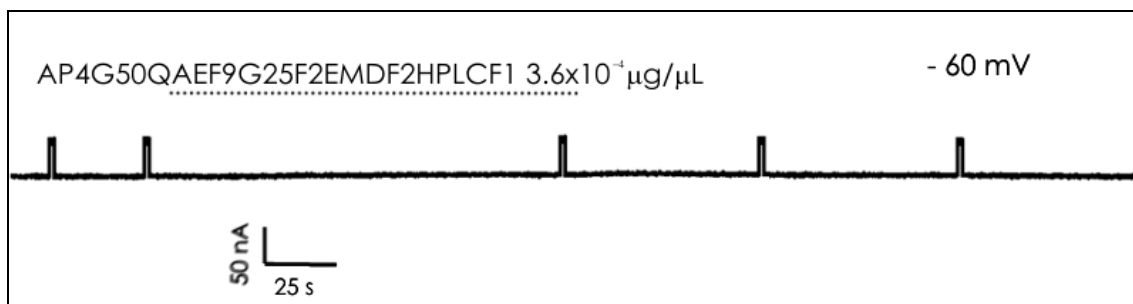


Fig. 3.32 Registro de la muestra AP4G50QAEF9G25F2EMDF2HPLCF1, en ovocito de *X. laevis* nativos a -60 mV.

Debido a la poca disponibilidad de muestra, se realizó sólo un ensayo con BaCl₂, este compuesto bloquea a canales de K⁺, y en el registro se ve que hay una activación y posteriormente un bloqueo en el canal de potasio. Al ser aplicada la muestra se observa que hay una activación de un sitio diferente al sitio del canal de potasio que bloquea el Ba⁺², se muestran pequeñas oscilaciones, la conductancia del Ba⁺² y de la muestra son menores comparadas con los primeros pulsos, posteriormente hay un cierre lento que permanece en una intensidad de corriente similar al que se observa al aplicar Ba⁺² (Armstrong 1980 y Tokimasa, 1996).



Fig. 3.33 Registro de la muestra AP4G50QAEF9G25F2, en ovocito de *X. laevis* inyectado con ARNm y probados con BaCl₂

El estudio de las toxinas peptídicas con efectos de retardo en la inactivación en canales de sodio, específicamente en el sitio 3, ha crecido en todo el mundo. Desde la primera purificación de la toxina producida por la *Anemonia sucata* (Béress *et al.*, 1975), más de 50 toxinas peptídicas con efectos en el sitio 3 de canales de sodio han sido identificadas y han sido clasificadas de acuerdo al número de residuos y a los puentes de disulfuro que poseen (Shiomi, 2009).

Los péptidos que activan los canales de K⁺ dependientes del voltaje, han sido aislados del veneno de diferentes especies de animales, tal es el caso de escorpiones (Gasparini, 2004) y serpientes (Castañeda, 2000), estas toxinas presentan las características de contener de 22 a 60 residuos de aminoácidos y se observa la presencia de 2 a 4 puentes de disulfuro (Posanni *et al.*, 1999, Kem *et al.*, 1999).

En la década pasada, fueron descubiertas toxinas peptídicas de anémonas con efectos en canales de potasio. Más de 10 toxinas aisladas fueron divididas en tres grupos de acuerdo a la estructura y función (Honma, 2006). Las toxinas de tipo 1 (con 34-37 residuos aminoácidos) bloquean al canal de potasio, Kv1 un intermediario que conduce la activación de calcio en canales de potasio. Las toxinas tipo 2 (58-59 residuos de aminoácidos) tienen homologías secuencias con inhibidores de proteasas, menos potentes que las del tipo 1. En el tipo tres se incluyen algunas como BDS-I y BDS -II de la anémona *Anemonia sulcata* (Diochot *et al.*, 1998) y

APETx1 de la *Anthopleura elegantissima* (Diochot *et al.*, 2003), que hasta ahora son las únicas que bloquean el canal de potasio.

Retuerto y colaboradores (2007), reportan sobre las características bioquímicas, hemolíticas, citotóxicas y citolíticas en el veneno de la anémona *Anthothoe chilensis*, en ella detectan la actividad hemolítica y fosfolipásica, mencionan que probablemente la propiedad hemolítica es medida por un mecanismo sinérgico semejante al de la *Aiptasia pallida* o por la presencia de proteínas formadoras de poro.

Las toxinas que actúan sobre el sistema de transmisión colinérgico pueden ser antagonistas o sinergistas de la acetilcolina. Las toxinas antagonistas bloquean los receptores postsinápticos nicotínicos, así como toxinas que inhiben la liberación de acetilcolina. Las toxinas sinergistas tienen acciones facilitadoras por diferentes mecanismos que tienden a incrementar la concentración de acetilcolina en la sinapsis y tienen tres mecanismos básicos: acciones sobre canales iónicos, estimulación del mecanismo de exocitosis del neurotransmisor e inhibición de la hidrólisis de la acetilcolina (Castañeda, 2000).

La activación e inactivación de los canales de Na⁺ y K⁺ son la base del potencial de acción, que representa la señal integrativa que permite a las células excitables conducir la información para el control de una gran variedad de eventos fisiológicos entre los que se encuentran la propagación del impulso nervioso y la determinación del ritmo cardíaco (Vega, 2001).

Los canales de K⁺ se ensamblan a partir de las proteínas integrales en la membrana plasmática capaces de conducir los iones de K⁺ conocidas como subunidades , así como por proteínas auxiliares intracelulares conocidas como subunidades que favorecen la expresión membranar de los canales recombinantes y le confieren a las subunidades conductoras de iones () propiedades cinéticas similares a las observadas en los canales nativos. Algunas de las canalopatías asociadas al canal de K⁺ son: Ataxia episódica tipo 1 (EA1), que es una enfermedad humana poco frecuente causada por la alteración de un canal de K⁺ neuronal que se hereda de manera autosómica dominante y se caracteriza por movimientos no coordinados de cabeza y extremidades (Vega, 2001).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

“Sólo comprendemos aquellas preguntas que podemos responder”.
Friedrich Nietzsche (1844-1900)

De acuerdo a los resultados obtenidos de este trabajo, las conclusiones a las que se llegaron son las siguientes:

- La anémona *Aiptasia pallida*, posee nematocistos basitricos, microbásicos p- mastigofos y espirocitos. La mejor forma de llevar a cabo la descarga de estos cnidocistos es por homogenización seguida de una leve agitación magnética.
- Se observó en cangrejos *Ocypode quadrata* las siguientes reacciones: parálisis, seguida de movimientos involuntarios en tenazas, patas y ojos, en algunos casos salivación y muerte, en un lapso menor a 2 min al inyectar el extracto crudo en el crustáceo.
- En los ovocitos de *Xenopus laevis*, inyectados con ARNm total de cerebro de rata, se observó un efecto del extracto crudo así como de algunas fracciones obtenidas. Entre las fracciones probadas AP4G50QAEF9G25F2, mostró actividad en ovocitos y en esta muestra los registros mostraron un posible bloqueo del canal de K⁺.
- Con los bioensayos realizados en cangrejos y en ovocitos de *Xenopus laevis*, nos podemos dar cuenta que existen neurotoxinas que probablemente actúan en el canal de K⁺, esto concuerda con algunas investigaciones realizadas con otras especies de anémonas, en donde se ha visto que hay una inactivación del canal de K⁺, sin embargo, los resultados no son tan claros, debido a que se contaba con poca cantidad de extracto crudo (ng) y de muestras, para realizar experimentos más específicos.
- Mediante los bioensayos realizados para evaluar la inhibición del crecimiento bacteriano y las pruebas de hemólisis en sangre de humano (tipo O+), debidas al extracto crudo, se encontró la presencia de citolisinas, esto fue comprobado con los geles de acrilamida, en los cuales se observaron que en el extracto crudo, existe un compuesto con peso molecular aproximado a 17 kDa, este peso es característico de las citolisinas, específicamente de las actinoporinas, que están presentes en las toxinas de anémonas.

- Los microorganismos que mostraron una inhibición causada por el extracto crudo fueron *Micrococcus luteus* (gram positivo) con 50 mg/mL del extracto crudo y *Pseudonoma aeuroginosa* (gram negativo) con 25 y 50 mg/mL del extracto crudo, ambas bacterias son considerados como organismos patógenos oportunistas, que atacan a los pacientes con un sistema inmunológico deficiente, tal es el caso de los enfermos con VIH.
- Los pesos moleculares aproximados que se pudieron observar en la electroforesis fueron de 76, 35 y 17 kDa.
- El extracto crudo presentó actividad citotóxica en *Artemia salina* ($CL_{50} = 10.15$ U) y en medusa *Cassiopeia xamachana* se observó la contracción de tentáculos al ser inyectadas, en algunos casos la aparición de manchas blancas en la campana, en ningún caso se presentó la muerte.
- La cantidad total del extracto crudo obtenido, así como de las muestras purificadas fue un factor que limitó la realización de experimentos más específicos. El principal problema al que nos enfrentamos fue el tamaño de las anémonas que en su mayoría fue menor a 2 cm de longitud, que las anémonas prefieren los sustratos de las cavidades rocosas y es muy difícil de separarlas además de que en el acuario del Eco-parque Xcaret no se permitía modificar la estructura rocosa, por ello el número de anémonas recolectadas fue relativamente poco.

- Para realizar trabajos con neurotoxinas o citolisinas presentes en la anémona *A. pallida*, es muy conveniente la recolección de mayor número de especies para obtener mayor cantidad de extracto crudo. Se observó que en el periodo de verano, hay mayor cantidad de organismos.
- La mejor forma de separar a estos organismos enteros de las cavidades rocosas, es con la inyección en el disco pedal de agua fría (-4 ° C).
- Para que el disparo de nematocistos sea más efectivo, se recomienda que posterior a la homogenización, se agite magnéticamente el extracto crudo, con el cuidado adecuado de no desnaturalizar la proteína.
- Al realizar la purificación, se observó que la actividad se perdió al cambiar de equipo, por lo que se sugiere realizar las purificaciones solo en un tipo de columna, con un solo equipo.
- Sería muy interesante realizar nuevamente la purificación (debido a la poca cantidad obtenida de las fracciones) y que cada fracción sea probada en microorganismos, la ventaja de estos bioensayos es que los resultados se observan al siguiente día, una vez realizado el experimento.
- Otra observación importante es que los bioensayos en cangrejos se realicen de enero a septiembre, debido a que en época de lluvias es muy difícil encontrar cangrejos en la playa, lo cual puede postergar la identificación de posibles neurotoxinas.

BIBLIOGRAFÍA

"La única verdad es la realidad"
Aristóteles

1. Alegre- Cebollada, J.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J. G.; Martínez del Pozo, A. (2007). "Sea anemone actinoporins: the transition from a folded soluble state to a functionally active membrane – bound oligomeric pore". *Current protein and peptide Science* 8, 558- 572.
2. Al- Sabi, A.; McArthur, J.; Ostroumov, V.; French, R. (2006). "Marine toxins that target voltage- gated Sodium channels". *Mar. Drugs*. 4, 157-192.
3. Anderluh, G.; Ma ek, P. (2003). "Dissecting the actinoporin pore-forming mechanism". *Structure* 9, 341-346.
4. Aneiros, A.; García, I.; Martínez, J.R.; Harvey, A.L.; Anderson, A.J.; Marshall, D.L.; Engström, Å.; Hellman, U.; Karlsson, E. (1993). "A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*". *Biochimica et Biophysica Acta* 1157, 86-92.
5. Aneiros, A.; Garateix, A. (2004). "Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procederes". *Journal of Chromatography B* 803, 41-53.
6. Armstrong, C. (1980). "Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons". *Biophys. J.* 30, 473-488.
7. Ávila, G. (2001). "Purificación parcial y caracterización de la actividad biológica de la escifomedusa *Aurelia aurita* del Caribe Mexicano". Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. pp. 18.
8. Barhanin, J.; Hugues, M.; Schweitz, H.; Vincent, J.P.; Lazdunski M. (1981) "Structure-Function Relationships of Sea Anemone Toxin II from *Anemonia sulcata*". *The Journal Biological Chemistry* 256 (11), 5764 - 5769.
9. Baslow, M. H. (1977). "Marine pharmacology; Marine animals; Marine plants; Pharmacognosy; Toxins". Ed. R. E. Krieger Pub. Co. 2ª Ed. 327-330.
10. Bemheimer, 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.

11. Béress, L.; Béress, R.; Wunderer, G.(1975). "Isolation and characterisation of three pilyptides with neurotoxic activity from *Anemonia sulcata*". FEBS Lett. 50, 311-314.
12. Béress, L. (1982). "Biologically active compounds from coelenterates". Pure & Appl.Chem. 4 (10), 1981—1994.
13. Bemheimer, 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.
14. Bhosale, S. H.; Nagle, V.L.; Japtap, T.G. (2002). "Antifouling potencial of some marine organims from India agains species of *Bacillus* and *Pseudomonas*". Marine Biotechnology 4, 111- 118.
15. Blanquet R.; Lenhoff, H. M. (1966) "A disulfide-linked collagenous protein of nematocyst capsules". Science 154, 152-153.
16. Blanquet, R. (1968). "Properties composition of the namatocyst toxin of the sea anemone *Aiptasia pallida*". Comp. Biochem. Physiol. 25, 893-902.
17. Blanquet, R. (1970). "Ionic effects on discharge of the isolated an *in situ* nematocyst of the sea anemone *Aiptasia pallida*". Comp. Biochem. Physiol. 35, 451-461.
18. Bosmans, F.; Tytgat, J. (2007). "Sea anemone venom a source of insectidal peptides acting on voltage-gated Na⁺ channels". Toxicon 49, 550-560.
19. Boyer, R. (1999). "Conceptos de bioquímica". Ed. Thomson Editores. 3ª ed. pp.269-271.
20. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Analytical Biochemistry 72, 248-254.
21. Brianchi, L; Driscoll M. (2008).Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus oocytes*". WormBook. 2-14.
22. Brown, H. (1950). "Keratins in invertebrates". Nature 166, 439.

23. Bruhn, T.; Schaller, C.; Schulze, C.; Sánchez-Rodríguez, J.; Dannmeier, C.; Ravens, U.; Heubachd, J.F.; Eckhardt, K.; Schmidtmayer, J; Schmidt, H.; Aneiros, A.; Wachter, E.; Béress, L. (2001). "Isolation and characterisation of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*". *Toxicon* 39, 693–702.
24. Carlgren, O. (1952). "Actiniaria from North America". En *Arkiv für Zoologi*. 3, 373-390.
25. Castañeda, O.; Sotolongo, V.; Amor, A. M.; Stocklin, R.; Anderson, A.; Harvey, A.; Engstrom, W.; Karlsson, E. (1995). "Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean sea anemone *Stygodactyla helianthus*". *Toxicon* 33, 603-613.
26. Castañeda, O. (2000). "Toxinas animales: acciones facilitadoras de la transmisión colinérgica". *Revista Biología*. 14(1), 1-15.
27. Castañeda, O.; Harvey, A. (2009). "Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels". *Toxicon*. En impresión.
28. Catterall, W. A. (2000). "From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels". *Neuron* 26, 13-25.
29. Cruz, K. (2004). "Aislamiento y caracterización biológica de las sustancias activas presentes en la anémona *Lebrunia danae* (Duchassaing & Michelotti, 1860)". Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Marinas.pp. 20-21.
30. Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987). "Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction". *Analytic Biochemistry* 162, 156- 159.
31. Clement, H. ; Odell, G.; Zamudio, F.; Redaelli, E.; Wanke, E.; Alagona, A.; Possani, L. D. (2009). "Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the spider *Grammostola rosea* that blocks sodium channels". *Toxicon*. En impresión
32. Črnigoj, K.; Viero, G.; Dalla, M.; Maček, P.; Anderluh, G. (2009). "Molecular mechanism of pore by actinoporins". *Toxicon*. En impresión.

33. Colla, R. (2006). "Vias de sinalização celular envolvidas na liberação de glutamato induzida por citolisinas de anêmonas do mar". Tesis de doctorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. pp. 8-83.
34. Cook, C.B.; D'Elia, C. F.; MuUer-Parker, G. (1988). "Host feeding and nutrient sufficiency for zooxanthellae in the sea anemone *Aiptasia pallida*". *Marine Biology* 98, 253-262.
35. Diochot, S.; Schweitz, H.; Béress, L.; Lazdunski, M. (1998). "Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4". *J. Biol. Chem* 273, 6744–6749.
36. Diochot, S.; Loret, E.; Bruhn, T.; Béress, L.; Lazdunski, M. (2003). "APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human Ether-a-go-go related gene potassium channels". *Molecular pharmacology* 64 (1), 59- 69.
37. Estrada, N. (2001). "Caracterización de la actividad biológica de las toxinas de *Carybdea marsupialis* Linné 1758 (Cnidaria: Cubozoa)". Tesis. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. pp.47.
38. Faulkner, D.J. (1998). "Marine natural products". *Nat Prod Rep.* 15, meet113–158.
39. Faulkner, D. J. (2000). "Marine pharmacology". *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 135–145.
40. Faulkner, D.J. (2000). "Marine natural products". *Nat Prod Rep.* 17, 7–55.
41. Fenical, W. (1997). "New pharmaceuticals from marine organisms". *Marine biotechnology* 15, 339-341.
42. Fisher F.; Kabara J. (1967). "Animal Toxins". En F. E. Russell and P. R. Saunders (eds.) Pergamon Press. New York. pp. 283-292.
43. Francis, L. "Microscaling: Why larger anemones have longer Cnidae". *Biol. Bull* 207, 116-129.

44. Garateix, A.; Vega, R.; Salceda, E.; Cebada, J.; Aneiros, A.; Soto, E. (2000). "BgK anemone toxin inhibits outward K currents in snail neurons". *Brain Research* 864, 312-314.
45. Garateix, A.; García, T. (2003). "Compuestos de origen marino como instrumentos para el estudio del sistema nervioso". *Avicennia*.13. En la red. <http://www.fisio.buap.mx/online/2003%20Garateix%20-%20Avicennia%206-12%20Compuestos%20marinos.htm>.
46. Gasparini, S.; Gilquin, B.; Ménez, A. (2004). "Comparison of sea anemone and scorpion toxins binding to Kv1 channels: an example of convergent evolution". *Toxicon* 43, 901-908.
47. Gendeh, G. S.; Young, L. C.; de Medeiros C. L. C.; Jeyaseelan, K.; Harvey, A. L.; Chung, M.C.M. (1997). "A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: Isolation, cDNA cloning and functional expression". *Biochemistry*, 36, 11461-11471.
48. González, R. (2009). "Anémonas (Anthozoa: Actiniaria, Corallimorpharia, y Zoanthidea) del Arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo." Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 54-56, 72-73.
49. Grotendorst, G.; Hessinger, D. (1999). "Purification and partial characterization of the phospholipase A₂ and co-lytic factor from sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom". *Toxicon* 37 (12), 1779-1796.
50. Grotendorst, G.; Hessinger, D. (2000). "Enzymatic characterization of the major phospholipase A₂ component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom". *Toxicon* 38, 931-943.
51. Gran Enciclopedia de la Ciencia y de la Técnica. 1985. Tomo 2. Ed. Océano. España. pp. 699-701.
52. Halstead, BW (1988). "Poisonous and venomous marine animals of the world". Darwin Press, Princeton, NJ (EUA).

53. Haefner, B. (2003) "Drugs from the deep: Marine natural products as drug candidates". *Drug Discov Today* 8, 12, 536–544.
54. Hessinger, D. A.; Lenhoff, H. M. (1973). "Assay and properties of hemolysis activity of pure venom from the nematocysts of the acontia of the sea anemone *Aiptasia pallida*". *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 629-638.
55. Hessinger, D.A.; Grove, R.I. (1979). "Antibodies to sea anemone nematocyst venom. II. Neutralization of the hemolytic, phospholipase A₂ and lethal activities by purified antibodies produced in response to attenuated venom". *Toxicon* 17, 109-120.
56. Hessinger, D.A. (1988). "Nematocyst venoms and toxins. En The biology of nematocysts". Hessinger, A. Lenhoff, H. M. (Ed) Academic Press Inc. pp. 33.368.
57. Honma, T.; Shiomi, K. (2006). "Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects". *Mar. Biotechnol* 8, 1–10.
58. Honma, T.; Kawahata, S.; Ishida, M. (2008). "Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*". *Peptides* 29, 536-544.
59. Hutton, D.; Smith, V. (1996). "Antibacterial propieties of isolated Amoebocytes from the sea anemone *Actinia equina*". *Biol. Bull.* 191, 441-451.
60. Kelman, D.; Rosenberg, E.; Ilan, M.; Ifrach, I.; Loya, Y. (2001). "Antimicrobial activity of the reef sponge *Amphimedon viridis* from the Red Sea: evidence for selective toxicity". *Aquatic Microbial Ecology* 24, 9- 16.
61. Kelso, G. J.; Blumenthal, K. M. (2008). "Identification and characterization of novel sodium channel toxins from the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*". *Toxicon* 36, 41-51.
62. Kass-Simon, G.; Scappaticci, A. (2002). "The behavioral and developmental physiology of nematocysts". *Can. J. Zool.* 80(10), 1772–1794
63. Kem W. (1988). "Sea anemone toxins: structure and action". En Hessinger, D. Lenhoff, H. (Eds). *The biology of the nematocysts*. Academic Press, Inc., New York. pp. 375-405.

64. Kem, W. R.; Parten, B.; Pennington, M.W.; Dunn, B. M.; Preece, D. (1989). "Isolation and characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*". *Biochem. J.* 28, 3483-3489.
65. King, G.; Escoubas, P.; Nicholson, G. (2008). "Peptide toxins that selectively target insect Na_v and Ca_v channels". *Channels* 2:2, 100-116.
66. Klug, M.; Weber, J; Tardent, P. (1989). "Hemolytic and toxic properties of *Hydra attenuata* nematocyst". *Toxin* 27, 325-339.
67. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227, 680-685.
68. Lesser, M. P.; Shick, J. M. (1989). "Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity". *Marine Biology* 102, 243-255.
69. Malpezzi, E. L.; de Freitas, J. C.; Muramoto, K.; Kamiya, H. (1993). "Characterization of peptides in the sea anemone venoms collected by novel procedure". *Toxicon* 31 (7), 853-864.
70. Marino, A.; Valveri, V.; Muià, C.; Crupi, R.; Rizzo, G.; Musci, G.; La Spada, G. (2004). "Cytotoxicity of the nematocyst venom from the sea anemone *Aiptasia mutabilis*". *Comparative Biochemistry and Physiology* 139, 295-301.
71. Mariscal, R. (1974). "Coelenterate Biology". L. Muscatine and H.M. Lenhoff. Academic Press. New York. pp. 129-178.
72. Martínez, D.; Álvarez, C.; Tejuca, M.; Pazos, F.; Valle, A.; Calderón, L.; Ros, U. Díaz, I.; Pentón, D.; Laino, M. (2006). "Los lípidos de la membrana actúan como moduladores de la actividad permeabilizante de Sticholisina II, una toxina formadora de poros con aplicaciones biomédicas". *Biotechnología aplicada* 23 (3), 251-254.
73. Martínez Rosas, M. (2004). "Los canales iónicos: la biología y patología". *Archivos de Cardiología de México*, 74, Supl. 2, 205- 210.

74. Massaro, E. (2000). "Handbook of Neurology". Vol.2. Ed. Human Press. EUA. pp. 529- 564.
75. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nicols, D. E.; McLaughlin, J. L. (1982). "Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents". J Medicinal Plan Res. 45, 31-34
76. Minagawa, S.; Ishida, M.; Nagashima, Y.; Shiomi, K. (1998). "Primary structure of a potassium channel toxin from the sea anemone *Actinia equina*". FEBS Letters 427, 149-151.
77. Morales, J. L.; Zapata- Pérez, O.; Cedillo- Rivera, R.; Segura- Puertas L.; Simá- Alvarez, R.; Sánchez- Rodríguez, J. (2007). "Antimicrobial, Antiprotozoal, and Toxic Activities of Cnidarian Extracts from the Mexican Caribbean Sea". Pharmaceutical Biology 45 (1), 37-43.
78. Moya, A.; Callico, A.; Camacho, F.; Cedré, B.; Simón, A. Almenares, J.; Valmaseda, T.; Ocanto, A.; Cádiz, A.; Esnard, S. (2007). "Evaluación de la respuesta de anticuerpos hacia antígenos de *Pseudomonas aeruginosa*". VaccinMonitor, 16 (1), 5- 11.
79. Nelson, D.; Cox, M.; Cuchillo, C. (2000). "Principios de Bioquímica". 3ª ed. Ed. Omega. pp. 423,428-430, 441-444.
80. Norton, R. T.; Kashiwagi, M.; Shibata, S. (1978). "Anthopleurin A, B and C cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Athopleura xanthogrammica* (Brandt)". In: Kaul PN, Sidermann CJ (eds). Drugs and food from the sea myth or reality? University of Oklahoma Press, Oklahoma, pp. 37-50.
81. Norton, R. S (1991). "Structure and structure-function relationship of sea anemone proteins that interact with the sodium channel". Toxicon 29, 1051-1084
82. Norton, R. S. (2009). "Structures of sea anemone toxins". Toxicon. En impresión.
83. Östman, C. (2000). "A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts". Scientia marina. 64 (1), 31-46.

84. Pallaghy, P.; Scanlon, M.; Monks, S.; Norton, R. (1995). "Three-Dimensional Structure in Solution of the Polypeptide Cardiac Stimulant Anthopleurin-A". *Biochemistry* 34, 3782-3794.
85. Patin, C. (1942). "The excitation of nematocysts". Zoological Laboratory, Cambridge. pp. 294-310.
86. Pennington, M.W.; Byrnes, M.E.; Zaydenberg, I.; Khaytin, I.; de Chastonay, J.; Krafft, D.S.; Hill, R.; Mahnir, V.M.; Volberg, W.A.; Gorczyca, W.; Kem, W. R. (1995). "Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent potassium channel inhibitor from a sea anemone". *Int. J. Pept. Protein Res.* 46, 354–358.
87. Picken, L. E. (1953). "A note on the nematocysts of *Corynactis viridis*". *Ovar. J. Microscop. Sci.* 94 (3), 203-227.
88. Retuerto, F.; Arbaiza, E.; Quiroz-Garrido, Y.; Estrada, R.; Zavala, J. (2007). "Actividad biológica del veneno de *Anthothoe chilensis* (Lesson, 1830) (Actiniaria: Sagartiidae)". *Rev. Peru. Biol.* 14 (2), 277-282.
89. Richet, C. (1902). "On poison pruritogene et urticant contenu dans les tentacules d' Actinies". *C. R. Soc. Biol., Paris.* 54, 1438-1440.
90. Richet, C. (1903). "Des poisons contenus dans les tentacules des Actinies, congestine et thallasine". *C. R. Soc. Biol., Paris.* 55, 246-248.
91. Richet, C.; Portier D. (1936). "Reserches sur la toxina des coelenteres et le phenome d'anaphylaxie". *Re. Comp. Sci., Monaco.* 95, 2-24.
92. Rottini, G.; Dobrina, A.; Forgiarini, O.; Nardon, E.; Amirante, G.; Patriarca, P. (1990). "Identification and Partial Characterization of a Cytolytic Toxin produced by *Gardnerella vaginalis*". *Infection and Immunity* 58 (11), 3751-3758.
93. Rupert, E. (1996). "Zoología de los invertebrados". 6ª. Ed. Ed. Mc Graw – Hill Interamericana. México. pp. 138-145.

94. Sánchez-Rodríguez, J.; Cruz-Vázquez, K. (2006). "Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860)". Arch. Toxicol. 80, 436–441.
95. Santamaría, A.; Sánchez-Rodríguez, J.; Zugasti, A.; Martínez, A.; Galvan-Arzate, S.; Segura-Puertas, L. (2002). "A venoms extract from the sea anemone *Bartholomea annulata* produces haemolysis and lipid peroxidation in mouse erythrocytes". Toxicology 173, 221–228.
96. Shapiro, B. I. (1968). "Purification of a toxin from tentacles of the anemone *Condylactis gigantea*". Toxicon 5, 253-259.
97. Shapo, J.; Moeller, P.; Galloway, S. (2007). "Antimicrobial activity in the common seawhip, *Leptorgorgia virgulata* (Cnidaria: Gorgonaceae)". Comparative Biochemistry and Physiology. B 148, 65- 73.
98. Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J-M, Béress, L.; Lazdunski, M. (1995). "Kalicludines and kaliseptine". Journal of Biological Chemistry, 270, 25121-25126.
99. Shiomi, K. (2009). "Novel peptide recently isolated from sea anemone". Toxicon. En impresión.
100. Sen i, L.; Ma ek, P. (1990). "New method for isolation of venom from the sea anemone *Actinia cari*. Purification and characterization of cytolytic toxins". Comp. Biochem. Physiol. 97B (4), 687- 693.
101. Smith, J. J.; Blumenthal, K.M. (2007). "Site-3 sea anemone toxins: Molecular probes of gating mechanisms in voltage-dependent sodium channels". Toxicon 49, 159-170.
102. Ständker, L.; Béress, L.; Garateix, A. Christ, T.; Ravens, U., Salceda, E.; Soto, E.; John, H.; Forssman, W. G.; Aneiros A. (2006)."A new toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation". Toxicon 48, 211-220.

103. Suresh, J. (1996). "The inositol triphosphate receptor family". Elsevier Science. 8, 1, 1-7.
104. Tejuca, M.; Anderluh, G.; Serra, D. (2009). "Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins". *Toxicon*. En impresión.
105. Tokimassa, T.; North, R. A. (1996). "Effects of barium, lanthanum and gadolinium on endogenous chloride and potassium currents in *Xenopus* oocytes". 496 (3), 677-686.
106. Torrens, E. (2004). "Aislamiento y purificación de proteínas con actividad hemolítica y neurotóxica de la cubomedusa *Carybdea marsupiales* (Linné 1758)". Tesis de Maestría. Posgrado de Ciencias de Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 55-60.
107. Vega Hernández, A.; Félix, R. (2001). "Fisiopatología de los canales iónicos sensibles al voltaje". *Avance y Perspectiva* 20, 83-96.
108. Warashina, A.; Fujita, S. (1983) "Effect of sea anemone toxins on the sodium inactivation process in crayfish axons". *The Journal of General Physiology* 81, 305-323.
109. Wanke, E.; Zaharenko, A.J.; Redaelli, E.; Schiavon, E. (2009). "Actions of sea anemone type1 neurotoxins on voltage-gated sodium channel isoforms". *Toxicon*. En impresión.
110. Westfall, J. A.; Landers, D. D.; Mccallum, J. D. (1998). "Different Nematocytes Have Different Synapses in the Sea Anemone *Aiptasia pallida* (Cnidaria, Anthozoa)". *Journal of Morphology* 238, 53-62.
111. Westfall, J. A. (2004). "Neural pathways and innervation of cnidocytes in tentacles of sea anemones". *Hydrobiologia* 530/531, 117-121.
112. Zaharenko, A.J.; Ferreira, W. A.; Oliveira, J. S.; Richardson, M.; Pimenta, D. C.; Konno, K.; Portaro, F. C. V.; de Freitas, J.C. (2008). "Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins". *Comparative Biochemistry and Physiology*. D3, 219-255.

113. Zick, K. (1932). "Die Entladung der Nesselkapseln durch Protozoen". *Zool. Anz.* 98, 191.
114. Zugasti, A. (2001). "Caracterización toxicológica de pépticos bioactivos de la anémona *Bartholomea annulata* (Le Sueur, 1817)". Tesis de maestría. UNAM. Posgrado en Ciencias de Mar y Limnología.