



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS
NEUROTOXINAS PRESENTES EN LA CUBOMEDUSA *Carybdea marsupialis*
(Lineé, 1758)**

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

Q. JOSÉ FERNANDO LAZCANO PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

**COMITÉ TUTORAL: DR. MANUEL AGUILAR RAMÍREZ.
DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA.
DRA. LAURA ESCOBAR PÉREZ.
DRA. PATRICIA THOMÉ ORTIZ.**

PUERTO MORELOS, Q. ROO, 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.

“ La ciencia es mucho más una determinada manera de pensar que un cuerpo de conocimientos. Su objetivo es descubrir cómo funciona el mundo, detectar las regularidades que puedan existir, captar las vinculaciones que se dan entre cosas... el mejor medio que tiene la humanidad para evitar todo tipo de abusos es adquirir una educación científica que le permita comprender las derivaciones que trae consigo todo programa de investigación.”

Carl Sagan
El cerebro de Broca

וַיֹּאמֶר אֱלֹהִים יֵשְׂרָצוּ הַמַּיִם שְׂרָץ נֶפֶשׁ חַיָּה
וַעֲוֹף יַעֲוֹפֵף עַל הָאָרֶץ עַל פְּנֵי רִקְיעַן הַשָּׁמַיִם
וַיִּבְרָא אֱלֹהִים אֶת הַתַּנִּינִם הַגְּדֹלִים וְאֵת כָּל נֶפֶשׁ
הַחַיָּה הַרְמֵשֶׁת אֲשֶׁר שְׂרָצוּ הַמַּיִם לְמִינֵהֶם וְאֵת
כָּל עוֹף כְּנָף לְמִינֵהוּ וַיִּרְא אֱלֹהִים כִּי טוֹב

Génesis 1:20-21

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios de Maestría y el apoyo que da a sus estudiantes y que la hace la mejor Universidad de Iberoamérica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgar la beca para la realización de este proyecto.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por darme la oportunidad de desarrollar mi trabajo de tesis, Dra. Gloria Vilaclara Fatjó, Diana, Chantal, Lupita y Gaby quienes dieron todo su apoyo y siempre con una sonrisa.

A la Dra. Judith Sánchez Rodríguez quien me proporcionó todos los medios para realizar este trabajo y me hizo sentir como en casa con sus cuidados y apoyo personal.

Al Dr. Rogelio Arellano Ostoia por su apoyo y permitirme realizar una estancia en su laboratorio.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Manuel Aguilar Ramírez, Dra. Patricia Thomé Ortiz y Dra. Laura Escobar Pérez por su brindarme su tiempo en las revisiones y consejos técnicos.

A la M. en C. Laura Celis Gutiérrez quien amablemente identificó las cubomedusas.

A la Dra. Edith Garay del Instituto de Neurobiología de la UNAM quien amablemente proporcionó las muestras de ARN y me proporcionó tiempo y dedicación durante mi estancia.

A Amauri Mendoza quien colectó la mayor parte del material de estudio y fue un gran apoyo durante los muestreos.

Al personal administrativo de la Unidad Académica de Puerto Morelos: Judith, Marci, Gabriel, Dolores, Carmen, por el apoyo y las facilidades brindadas durante mi estancia.

A toda mi familia, mis padres por su cariño y todo el apoyo incondicional durante la realización de mis proyectos de vida, mis hermanos, Ale, Beto y Adriana quienes me facilitaron las cosas más de lo que creen y quienes siempre han estado y seguirán estando para ayudarme.

A mis grandes amigos, mi familia adoptiva: Ricardo (mi hermano y compañero incondicional en las buenas y las malas), Geraldine (mi hermana gemela),

Manuela (mi hermana y enfermera), Miriam (la primera en abrirme los brazos y mi hermana igual), Manuel (mi gran amigo en momentos difíciles y fáciles), Thaydé (la prima mandona jaja) , Enrique (mi compañero de trabajo), Luisfer (el bendito) y Nadine . A todos ustedes muchas gracias de corazón por estar ahí, por soportarme, por cuidarme y por esas grandes aventuras que nunca acaban. Son los mejores y los quiero mucho.

A mis amigos de Toluca, Lidia, Fausto, Carlos, Saúl (gracias por tus correcciones) y Anuar por los años de amistad, experiencia y enseñanzas mutuas. Gracias!

A la banda de Querétaro, Ricardo, Letty, Ana, Bárbara, Miguel, Argel y Gina. Gracias por su ayuda y por hacerme sentir como en casa.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	2
Toxinas.....	3
<i>Citolisinas</i>	3
<i>Neurotoxinas</i>	3
El phylum Cnidaria como fuente de sustancias activas.....	7
Toxinas de Cnidarios.....	7
Toxinas de medusas y cubomedusas	8
Canales Iónicos	9
II. ANTECEDENTES	14
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVO	21
IV. ÁREA DE ESTUDIO	23
VI. METODOLOGÍA	25
<i>Muestreo</i>	25
<i>Obtención del extracto crudo</i>	25
Naturaleza química del veneno.	27
<i>Purificación de las neurotoxinas:</i>	27
<i>Bioensayos</i>	28
<i>Análisis electrofisiológico del veneno:</i>	29
VII. RESULTADOS	32
Recolección de <i>Carybdea marsupialis</i>	32
Obtención del extracto crudo:	32
Electroforesis	33
Bioensayos.....	33
Purificación.....	35
Registros electrofisiológicos	41
VIII. DISCUSIÓN	48
Ensayo de letalidad en cangrejos.....	48
Purificación de las neurotoxinas.....	50
Efecto de las fracciones sobre proteínas de membrana.	51
IX. CONCLUSIONES	55
IX. REFERENCIAS	57
X. ANEXOS	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Compuestos marinos en fase clínica (Kijjoa, 2004).	2
Tabla 2 Valores aproximados de letalidad de algunas.....	4
Tabla 3 Algunas neurotoxinas importantes, sus fuentes.....	5
Tabla 4 Algunas toxinas aisladas de cubomedusas.	19
Tabla 5 Bioensayos en cangrejos con el extracto de 2004.....	34
Tabla 6 Bioensayos en cangrejos con el extracto de 2007.....	34

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Neurotoxinas no peptídicas.	6
Figura 2 Neurotoxinas peptídicas	6
Figura 3 Sinapsis neuronal.	10
Figura 4 a: Origen del potencial eléctrico en una membrana.....	11
Figura 5 Esquema de un nematocisto (Ivy Livingstone, 1994).	14
Figura 6 Phylum Cnidaria..	16
Figura 7 <i>Carybdea marsupialis</i>	17
Figura 8 Ubicación de la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo.	23
Figura 9 Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	29
Figura 10 Nematocistos de <i>C. marsupialis</i>	32
Figura 11 Electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto crudo de la medusa <i>Carybdea marsupialis</i>	33
Figura 12 Sephadex G50 M del extracto crudo de <i>Carybdea marsupialis</i>	35
Figura 13 Cromatograma de intercambio iónico de la fracción activa en QAE Sephadex A25.	36
Figura 14 Cromatograma de intercambio iónico de las fracciones activas obtenidas de Fractogel EMD SO ₃ ⁻	36
Figura 15 Cromatograma de HPLC de la fracción neurotóxica.....	38
Figura 16 Ejemplo de un registro de la corriente transmembranal en un ovocito control inyectado con agua	39
Figura 17 Registro electrofisiológico del efecto del agonista. Acetilcolina (ACh) en un ovocito inyectado con RNAm de cerebro de rata.....	40
Figura 18 Registro electrofisiológico del efecto de los agonistas. Serotonina (5HT) y ácido glutámico + glicina (Glu+Gly) en un ovocito inyectado con RNAm de cerebro de rata	40
Figura 19 Efecto de la fracción F1 en una dilución 1/50	41
Figura 20 Efecto de la fracción F1 en dilución 1/20	42
Figura 21 Efecto de la fracción F1 en dilución 1/1000	42
Figura 22 Registro en ovocito con BAPTA-AM	43
Figura 23 Efecto de las fracciones 1 y 7 obtenidas al pasar F1 por HPLC	44
Figura 24 Efecto de HPLCf1 en ovocito a un potencial de -20 mV.	45
Figura 25 Efecto de HPLCf1 en ovocito a un potencial a 0 mV.	46

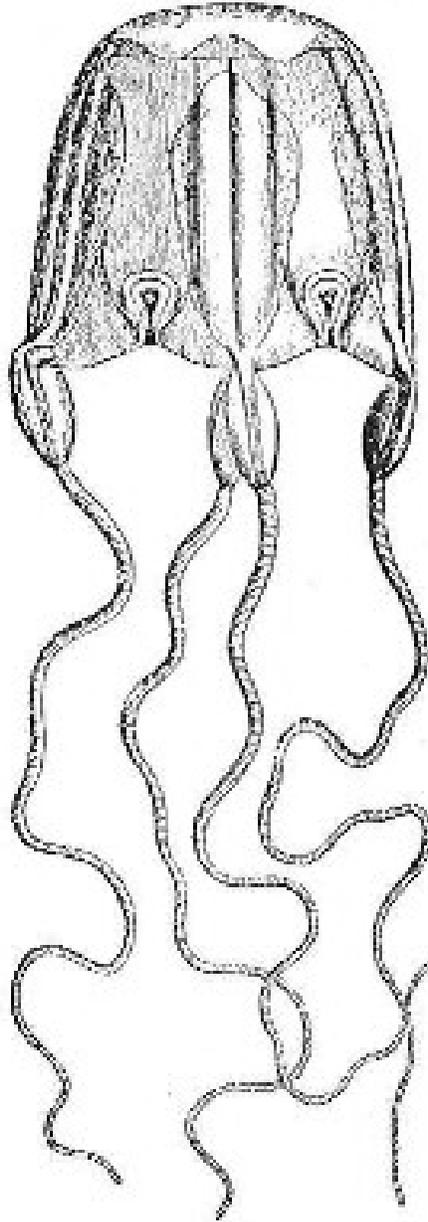
RESUMEN

Carybdea marsupialis es una cubomedusa muy abundante en aguas del Mediterráneo y mar Caribe. Su veneno es una mezcla compleja de compuestos con actividad biológica y que utiliza para capturar a sus presas y defenderse de sus depredadores. Este trabajo se enfocó en el aislamiento y purificación parcial de las neurotoxinas en dicho organismo mediante distintas técnicas cromatográficas, así como su caracterización con ensayos biológicos y electrofisiológicos. La dosis letal media (DL_{50}) calculada para el veneno crudo fue de 12mg/kg en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*. La filtración en gel (Sephadex G-50) se utilizó como primer paso cromatográfico y la fracción con actividad biológica se hizo pasar por una columna de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25. La fracción activa se separó en una columna de intercambio catiónico (Fractogel EMD SO_3^-) y aquella fracción con actividad neurotóxica se hizo pasar por una columna de HPLC fase reversa Microsorb C4 300 A 4.6x250mm. Las fracciones que presentaron actividad neurotóxica fueron analizadas electroforéticamente por SDS-PAGE, encontrándose un complejo de proteínas con bandas de entre 40 y 120 kDa. Se obtuvieron nueve fracciones las cuales se analizaron en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con ARN mensajero de cerebro de rata mediante la técnica de control de voltaje. Dos fracciones mostraron actividad en canales iónicos y las respuestas son reversibles y dependientes de la concentración.

ABSTRACT

Carybdea marsupialis is a widely distributed box jellyfish found in the tropical waters of the Mediterranean and Caribbean Sea. Its venom is a complex mixture of biologically active compounds that are used to catch prey. In order to evaluate the activity of the neurotoxins in the venom, bioassays were carried out using sea crabs *Ocypode quadrata* leading to a lethal dose (LD₅₀) of 12 mg/kg. The proteins with neurotoxic effect were partially purified using low-pressure liquid chromatography techniques. Gel filtration (Sephadex G-50) was used as the first step and the active fraction in crabs was passed through a QAE Sephadex A-25 column. The active fraction was run onto a Fractogel EMD SO³⁻ column and finally, the active fraction was run onto reverse phase HPLC Microsorb C4 300A, 4.6x250mm column. The fractions containing the neurotoxic activity were analyzed by SDS-PAGE showing a complex mixture of protein bands from 40 to 120 kDa. The final nine HPLC fractions were analyzed by Voltage-Clamp technique using *Xenopus* oocytes injected with mRNA from the brain of a rat. Two fractions were observed to affect crustacean ion channels and showed activity in different membrane proteins from rat the brain. The effect is dose-dependant and reversible.

INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

De entre la gran variedad de fuentes de las que el ser humano puede desarrollar nuevos compuestos con actividad farmacológica, los compuestos provenientes de organismos vivos, llamados productos naturales, son de particular interés. Aproximadamente una tercera parte de los fármacos utilizados provienen o son derivados de estructuras encontradas en la naturaleza (Proksch *et al.*, 2003). A pesar de que el 70% de la superficie de la Tierra está cubierta por océano, la mayoría de los productos naturales utilizados han sido obtenidos de organismos terrestres por su accesibilidad.

En la actualidad, se han identificado y estudiado más de 14,000 compuestos de origen marino y varios de ellos se encuentran en pruebas clínicas y preclínicas (Tabla 1).

Tabla 1. Compuestos marinos en fase clínica (Kijjoa, 2004).

Condición	Compuesto	Organismo
Cáncer	Aplidina	Tunicado
	Briostatina 1	Briozoario
	Didemnina B	Tunicado
	Dolastatina 10	Liebre marina
	Ecteinascidina-743	Tunicado
	Halicondrina B	Esponja
	Kahalaide F	Molusco
	Mycaperóxido B	Esponja
	Trisulfato de ciclodidemniserinol	Tunicado
	Sulfato de lamerallin	Tunicado
HIV	Ditiocianatos	Esponja
Infección por nemátodos		
Asma	Contignasterol	Esponja
Dolor	Conotoxinas	Molusco

La búsqueda de nuevos medicamentos y sustancias con fines terapéuticos va en ascenso en los últimos años. La existencia de enfermedades para las que no existen medicamentos, la resistencia de agentes patógenos y los avances en la biología molecular, han impulsado la identificación de moléculas “blanco” y han causado interés en la búsqueda de nuevos fármacos potentes y específicos (Garateix, 2005).

Toxinas

La biodiversidad da como resultado una gran variedad de sustancias químicas que les sirven a los organismos para incrementar sus posibilidades de supervivencia. Los venenos (compuestos principalmente por péptidos y proteínas) y ponzoñas (metabolitos secundarios producidos o adquiridos) contienen una mezcla compleja de sustancias llamadas toxinas, las cuales son moléculas que varían enormemente en sus estructuras químicas y tamaños (Mebs, 2002).

De acuerdo a su modo de acción, las toxinas pueden clasificarse en dos grupos principales:

Citolisinas

Destruyen las membranas celulares y forman canales o poros. Estos poros hacen que las membranas sean permeables y alteran el equilibrio osmótico; las células absorben agua hasta explotar. Son de dos tipos:

1. Citolisinas catalíticas: toxinas con la capacidad de hidrolizar fosfolípidos en las membranas celulares, conocidas como fosfolipasas.
2. Citolisinas que forman poros en la membrana: la toxina se une al colesterol de la membrana y promueve la formación de polímeros, los cuales se insertan en la membrana hasta atravesarla y formar un poro (Bernheimer y Rudy, 1986).

Neurotoxinas

Las neurotoxinas son las toxinas más potentes que se conocen (Tabla 2). Se producen por organismos que incluyen una gran variedad de niveles taxonómicos, desde microorganismos hasta animales superiores; se les llama así por su acción sobre el sistema nervioso, interfieren con la transmisión del impulso nervioso y actúan sobre sitios específicos (Tabla 3), lo que las hace muy útiles en la investigación fisiológica y farmacológica.

Tabla 2. Valores aproximados de letalidad de algunas de las neurotoxinas más potentes (Dixit *et al.*, 2005).

Toxina	LD 50 aprox. µg/kg	Naturaleza química	Fuente
Botulina	0.0001	peptídica	bacteria
Batracotoxina	0.06	alcaloide	anfibio
Palytoxina	0.150	polialcohol de estructura compleja	anémona
Dendrotoxina	0.20	peptídica	serpiente
Saxitoxina	5	alcaloide	dinoflagelado
Tetrodotoxina	8	alcaloide	dinoflagelado
Brevetoxina	10	éter policíclico	dinoflagelado
Conotoxinas	80	peptídica	molusco
Latrotoxina	100	peptídica	araña
Anatoxina	200	alcaloide	cianobacteria
Charybdotoxina	300	peptídica	escorpión
Apamina	800	peptídica	abeja
Capsaicina	800	alcaloide	planta

Las neurotoxinas pueden clasificarse de distintas formas:

A. Por su blanco molecular (Tabla 3), se pueden dividir en:

A.1. Neurotoxinas que afectan receptores:

A.1.1. Neurotoxinas que afectan los receptores nicotínicos: Las bungarotoxinas han sido herramientas fundamentales en la elucidación de la estructura y función de estos receptores (Chiappinelli, 1993).

A.1.2. Neurotoxinas que afectan los receptores glutamatérgicos: hasta ahora, se han encontrado pocas toxinas con efecto en este tipo de receptores. Un ejemplo es la toxina de la araña Joro (JSTX) que tiene un efecto antagonista sobre el receptor NMDA (Hawai y Nakijama, 1993).

A.1.3. Neurotoxinas que se unen a adrenoreceptores: El veneno de la serpiente *Vipera russeli russeli* tiene dos péptidos de este tipo (Freedman y Snyder, 1981).

A.2. Neurotoxinas que actúan sobre canales iónicos:

A.2.1. Canales de Potasio: Las toxinas de escorpión han sido las más estudiadas (Posanni *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1985). La apamina, una toxina aislada de la abeja y algunas toxinas de anémonas también tienen efectos antagónicos sobre estos canales.

A.2.2. Canales de Calcio: Las ω -conotoxinas han sido las más estudiadas al respecto (Craig, 2000). Estos péptidos tienen

acciones tan específicas, que son sustancias con aplicaciones terapéuticas muy prometedoras (Layer y McIntosh, 2006).

A.2.3. Canales de Sodio: La tetrodotoxina es tal vez la toxina bloqueadora del canal más estudiada (Miyazawa y Noguchi, 2001; Al-Sabi *et al.* 2006).

Tabla 3 Algunas neurotoxinas importantes, sus fuentes y modo de acción (Dixit *et al.*, 2005).

Toxina	Fuente	Modo de acción
Agatoxina	araña “tela de embudo”	Bloquea canales de calcio
α -bungarotoxina	serpiente	Bloquea receptor nicotínico de acetilcolina
Anatoxina	alga	Agonista de receptor de acetilcolina
Apamina	abeja <i>Apis mellifera</i>	Bloquea canales de potasio
Batracotoxina	rana venenosa centroamericana	Inhibe el cierre de canales de sodio
Botulina	bacteria <i>Chlostridium botulinum</i>	Bloquea la liberación de acetilcolina
Brevetoxina	dinoflagelado (marea roja)	Activa canales de sodio
Charybdotoxina	escorpión	Bloquea canales de potasio
Ciguatoxina	dinoflagelado	Activa canales de sodio
Cobrotoxina	cobra	Bloquea receptores nicotínicos
Conotoxinas	caracoles marinos del género <i>Conus</i>	Bloquean canales de calcio y sodio regulados por voltaje y receptores de acetilcolina, entre otros
Dendrotoxina	mamba verde	Bloquea canales de potasio
Latrotoxina	araña <i>Latrodectus mactans</i>	Estimula la liberación de acetilcolina
Palytoxina	coral del género <i>Palythoa</i>	Activa canales de sodio
Saxitoxina	dinoflagelados	Bloquea canales de sodio
Stichotoxina	anémona <i>Stichodactyla hellianthus</i>	Bloquea canales de potasio
Toxina tetánica	bacteria <i>Chlostridium tetani</i>	Bloquea la liberación de acetilcolina
Tetrodotoxina	bacterias, pez globo y pulpo de anillos azules, entre otros	Bloquea canales de sodio

- B.** Dada su naturaleza química, las neurotoxinas pueden ser de dos tipos:
- B.1.** No peptídicas: A este tipo pertenecen toxinas con estructuras químicas muy variadas (Fig. 1). Suelen ser metabolitos muy pequeños que se encuentran en redes tróficas que incluyen desde bacterias hasta vertebrados (Al-Sabi *et al.*, 2006).
- B.2.** Peptídicas: Compuestos con actividad neurotóxica que pueden variar de tamaño, desde pequeños péptidos hasta proteínas (Fig. 2).

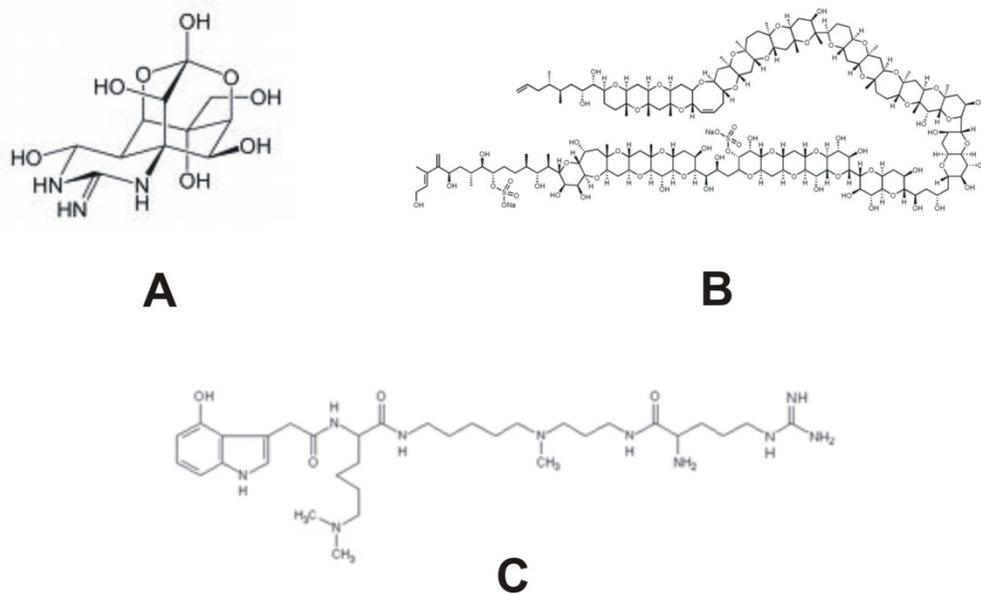


Figura 1. Neurotoxinas no peptídicas. A: Tetrodotoxina, un alcaloide; B: Maitotoxina, un éter policíclico; C: Argiotoxina, un alcaloide (Mebs, 2002).



Figura 2. Neurotoxinas peptídicas. AneTX Ia: Toxina aislada del veneno de *Anthopleura spp.* B-IV: Toxina aislada de secreciones tóxicas del gusano cinta *Cerebratulus lacteus* (Al-Sabi *et al.*, 2006).

El phylum Cnidaria como fuente de sustancias activas

Estudios sobre las sustancias químicas presentes en los cnidarios, muestran la presencia de compuestos de alto y bajo peso molecular y de naturaleza química muy variada. Entre las sustancias de bajo peso molecular se han encontrado carotenoides en anémonas y corales (Walker, 1988), terpenoides en corales blandos y gorgónidos (Neeman *et al.*, 1974; Wratten *et al.*, 1977), esteroides (Goad, 1978) y aminas principalmente en anémonas (Mathias *et al.*, 1960). Entre los compuestos de alto peso molecular podemos encontrar péptidos y proteínas.

Ya que las toxinas de cnidarios contienen toda esta diversidad de sustancias, el trabajo se enfoca al estudio de las toxinas con actividad neurotóxica de tipo peptídico en un organismo de este phylum.

Toxinas de Cnidarios

La transmisión neuromuscular es fundamental para el funcionamiento de un organismo vivo y una anomalía en ella puede causar estragos en él, por lo que es el blanco de las toxinas de muchos organismos incluyendo a los cnidarios.

El veneno de los cnidarios es termolábil, no dializable, y se degrada por agentes proteolíticos. La mayoría de las toxinas hasta ahora estudiadas actúan directamente sobre los canales de potasio y sodio, y provocan una cascada de liberación de mediadores inflamatorios. El veneno puede contener catecolaminas, aminas vasoactivas (histamina, serotonina) bradicininas, colagenasas, hialuronidasas, proteasas, fosfolipasas, fibrinolisinias, dermatoneurotoxinas, cardiotoxinas, miotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas y antígenos (Walker, 1988). La potencia total de los efectos fisiológicos del veneno de los nematocistos es el resultado de la acción combinada de todos estos componentes (Hessinger, 1988).

Muchos venenos de cnidarios son extremadamente lábiles a temperaturas mayores de 0°C y se descomponen en ciclos de congelación-descongelación (Burnett y Goldner, 1970).

La mayor parte de las toxinas de los cnidarios son de tipo proteico y esto por diversas razones (Hessinger, 1988):

a). Las toxinas proteicas son de dos a cinco órdenes de magnitud más letales que las no proteínicas.

- b). Están diseñadas para interactuar específicamente en sitios moleculares.
- c). Algunas toxinas proteicas tienen propiedades enzimáticas para amplificar sus efectos biológicos.
- d). Debido a su gran tamaño y estructura tridimensional, algunas toxinas pueden formar poros en la membrana de las células.
- e). Pueden pasar de estados inactivos a estado activos en respuesta a cambios extrínsecos, es decir, pueden ser inactivas dentro del nematocisto pero activarse al ser liberadas o entrar en contacto con el blanco.

Del total de las toxinas hasta ahora encontradas en cnidarios, las de anémonas son las que mejor han sido estudiadas. Muchas actúan sobre canales de sodio y potasio las cuales se conocen con detalle. Las toxinas de anémonas que actúan claramente en canales de calcio aún no han sido caracterizadas (Messerli y Greenberg, 2006); una posible candidata es la toxina Bainh aislada de la anémona *Bunodosoma granulifera* (Salinas *et al.*, 1997).

Se ha encontrado que la mayoría de las toxinas de anémonas que afectan los canales de sodio, retardan su inactivación (Kem, 2002). De entre las que afectan los canales de potasio, los bloquean, como las toxinas aisladas de *Bunodosoma granulifera*, *Stychodactyla helianthus* (Aneiros *et al.*, 1993; Castaneda *et al.*, 1995) y *Anthopleura elegantissima* (Diochot *et al.*, 2003). Una de ellas es un posible candidato al tratamiento de la esclerosis múltiple y otras enfermedades autoinmunes (Norton *et al.*, 2004).

Toxinas de medusas y cubomedusas

El encuentro con estos organismos no sólo puede producir dolores e inflamaciones agudas sino, dependiendo de la sensibilidad de la víctima, puede producir síntomas tales como dermatitis, neuropatías, parálisis, cardiopatías o incluso la muerte (Burnett *et al.*, 1998).

El veneno de la ortiga de mar (*Chrysaora quinquecirrha*) contrae los anillos aórticos en ratas por el incremento del flujo de calcio en canales dependientes de voltaje y es disminuido considerablemente con el uso de nifedipina y verapamil (Lin *et al.*, 1988). Extractos de los venenos de *C. fleckeri*, *P. physalis* y *C. quinquecirrha* producen bloqueos de funciones neurales dependientes de la concentración. El veneno de la cubomedusa *Carukia barnesi* produce un dolor severo acompañado de problemas cardio-respiratorios (Burnett *et al.*, 1998). Extractos del veneno de *Linuche unguiculata* y *Cassiopea xamachana* tienen importante toxicidad contra el protozoo *Giardia lamblia*, lo que

hace su estudio interesante desde el punto de vista farmacológico (Morales-Landa *et al.*, 2007).

De los cientos de especies que se conocen, solo 5 son reconocidas como potencialmente mortales. La más peligrosa de ellas, *Chironex fleckeri*, considerada por muchos uno de los animales más peligrosos del mundo, ha sido responsable de al menos 70 muertes en Australia (Tibbals, 2006). El veneno de esta medusa produce un dolor intenso acompañado de un comportamiento frenético agonizante (en los casos fatales) y la muerte es producida principalmente por paro respiratorio o cardíaco (Barnes, 1966).

Canales Iónicos

El sistema nervioso está formado por millones de células que se agrupan en dos tipos fundamentales: las llamadas neuronas y las células gliales; la comunicación eficiente entre estas células es de vital importancia para su funcionamiento.

La comunicación entre células neuronales se realiza en la región altamente especializada llamada sinapsis. Existen varios tipos de sinapsis (Darnell, *et al.*, 1998):

Sinapsis eléctrica: los iones se mueven directamente de una neurona a otra a través de uniones “gap” o nexus (conductos célula-célula). La despolarización de la membrana asociada a un potencial de acción en la célula presináptica pasa a través de la unión en hendidura y despolariza la célula postsináptica.

Sinapsis química: Esta estructura está constituida por tres componentes: presinapsis (terminal del axón), postsinapsis (dendrita) y un espacio sináptico. El mecanismo de comunicación sináptica es de tipo electroquímico. Comienza con un potencial de acción que ocasiona la apertura de canales de sodio localizados principalmente en los nódulos de Ranvier. La entrada de iones de sodio, despolariza la membrana presináptica lo que activa a los canales de calcio y potasio. El incremento de calcio intracelular dispara el mecanismo de fusión de vesículas en la membrana que finalmente liberan a los neurotransmisores hacia el espacio sináptico y activan receptores en la membrana postsináptica.

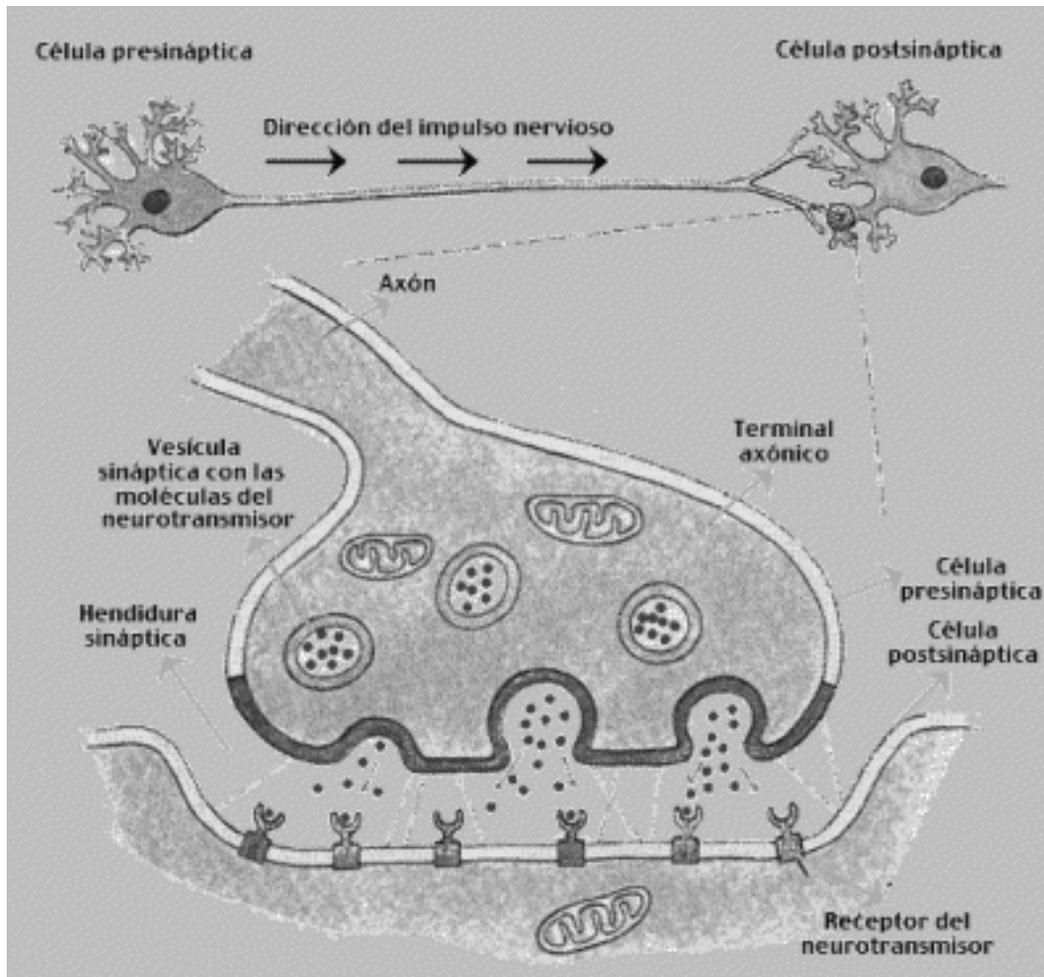


Figura 3. Sinapsis neuronal (tomada de: psi-angen.blogia.com).

Existe un potencial eléctrico a través de las membranas celulares debido a una diferencia en las concentraciones de iones en el medio intracelular con respecto al extracelular (Figura 4a). El ion potasio (K^+) se encuentra más concentrado en el citosol mientras que los iones sodio (Na^+), calcio (Ca^{2+}) y cloruro (Cl^-) se encuentran en mayor proporción en el medio extracelular. Los iones tienden a moverse en dirección de su gradiente de concentración a través de canales iónicos (McCormick, 2004).

Los canales iónicos (figura 4b) son proteínas integrales de la membrana que contienen una estructura especializada llamada poro y permiten que iones particulares crucen la membrana neuronal (Purves, 2007). Son los responsables de generar y regular las señales eléctricas del cuerpo ya que conducen iones a altas velocidades. Estas señales modulan funciones fisiológicas importantes (Arias, 2006).

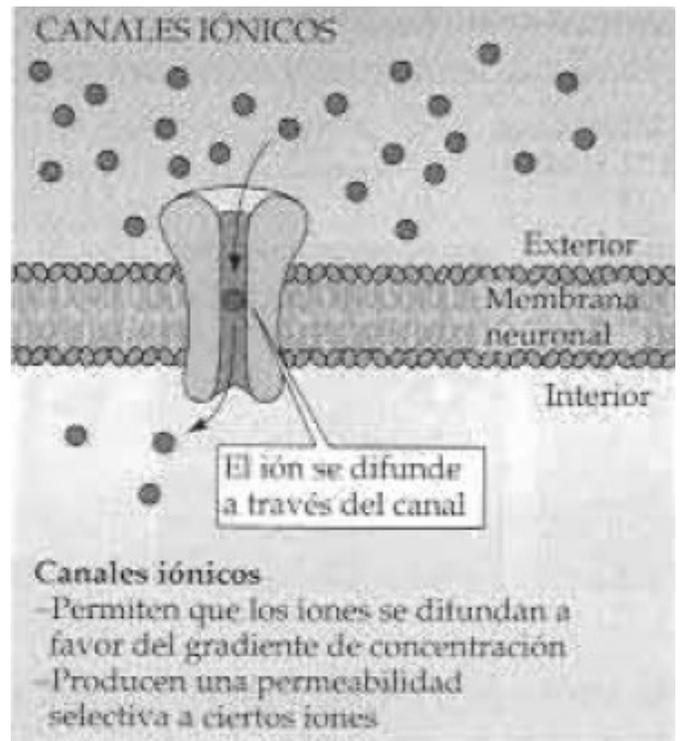
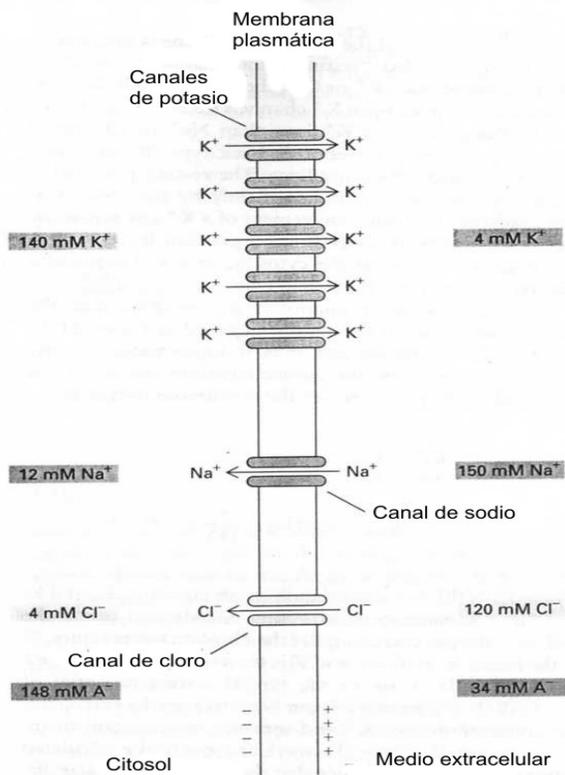


Figura 4. a: Origen del potencial eléctrico en una membrana. La composición iónica en el citosol y el medio extracelular son diferentes. Durante el reposo, existe un mayor número de canales de K^+ abiertos que de Na^+ y Cl^- ; un mayor número de iones K^+ salen de la célula y el exterior de la célula adquiere una carga neta positiva respecto del interior (tomado de Darnell, 1995). b: Los canales iónicos permiten el movimiento de iones seleccionados por difusión de forma que los gradientes químicos disminuyen (tomado de Purves, 2007).

Los canales iónicos pueden ser de varios tipos:

- 1.- Activados por el voltaje: son regulados por cambios en el potencial de membrana.
- 2.- Activados por ligando: son regulados por neurotransmisores.
- 3.- Mecanosensibles: responden a estímulos mecánicos.

Los canales iónicos regulados por voltaje más estudiados son los de sodio (Na_v), potasio (K_v) y calcio (Ca_v) y han sido descritas varias toxinas naturales que afectan su funcionamiento, por ejemplo:

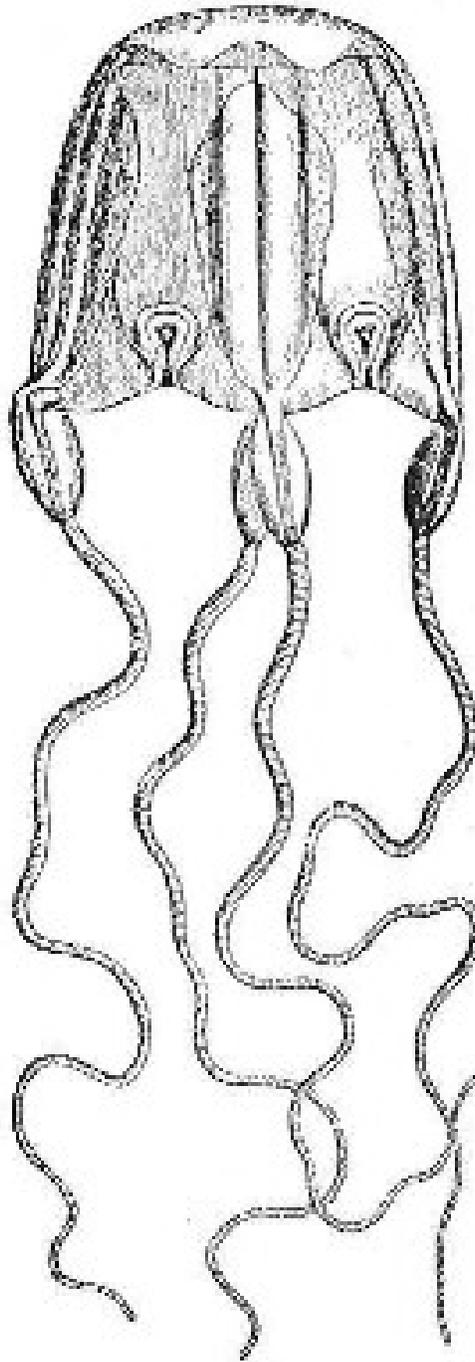
- 1.- **Na_v** Más de 50 toxinas de anémonas han sido aisladas y producidas por técnicas de ADN recombinante que afectan este canal (Messerli y Greenberg, 2006). Actúan principalmente retardando la inactivación del canal (Bergman *et al.*, 1976; Vincent *et al.*, 1980; Schweitz *et al.*, 1981; Warashina *et al.*, 1988).

2.- K_v Se han identificado 11 toxinas de anémonas que bloquean este canal (Messerli y Greenberg, 2006).

3.- Ca_v Las ω -conotoxinas de los moluscos del género *Conus* son las toxinas marinas más caracterizadas que afectan directamente este canal. Fracciones obtenidas del veneno del hidrozooario *Millepora complanata* afectan los canales de Ca²⁺ tipo L (Rojas *et al.*, 2001). El veneno de la ortiga de mar también es un posible candidato (Lin *et al.*, 1988).

Existen pocos estudios sobre toxinas de cnidarios que afecten receptores activados por ligando. Las lofotoxinas (obtenidas de corales gorgónidos del género *Lophogorgia* y *Pseudopterogorgia*) son antagonistas de los algunos receptores de acetilcolina (Arias, 2006). La toxina de alto peso de molecular (P₃) aislada de *Physalia physalis* bloquea reversiblemente los receptores glutamatérgicos en cangrejos (Mas, 1989). Efecto similar se ha encontrado en fracciones purificadas del veneno de la anémona *Phyllactis flosculifera* (Garateix *et al.*, 1996). El extracto crudo de la anémona *Bunodosoma caissarum* (Gondran *et al.*, 2002) tiene un efecto agonista del sistema glutamatérgico, posiblemente el receptor de tipo NMDA.

ANTECEDENTES



II. ANTECEDENTES

Phylum Cnidaria

El Phylum Cnidaria (*Cnida* = ortiga, en griego) incluye algunas de las especies más venenosas de los invertebrados marinos. Se conocen aproximadamente 10,000 especies. Poseen células llamadas cnidocitos situadas en la epidermis entre las células epitelio musculares. Dentro de los cnidocitos encontramos unos pequeños orgánulos eversibles llamados nematocistos (Fig. 5) que son utilizados para defensa y captura de presas. Las toxinas alojadas en los nematocistos de estas especies son mezclas complejas de polipéptidos y proteínas de mediano y elevado peso molecular, con capacidad para estimular reacciones tóxicas e inmunológicas. El conocimiento sobre el efecto producido por las toxinas en el hombre se ha incrementado en las últimas décadas, encontrándose que estas toxinas se encuentran entre los venenos más potentes hasta ahora conocidos. Este phylum se considera único ya que prácticamente todos sus miembros son tóxicos, lo que lo hace muy atractivo para investigaciones toxinológicas (Kem, 1989).

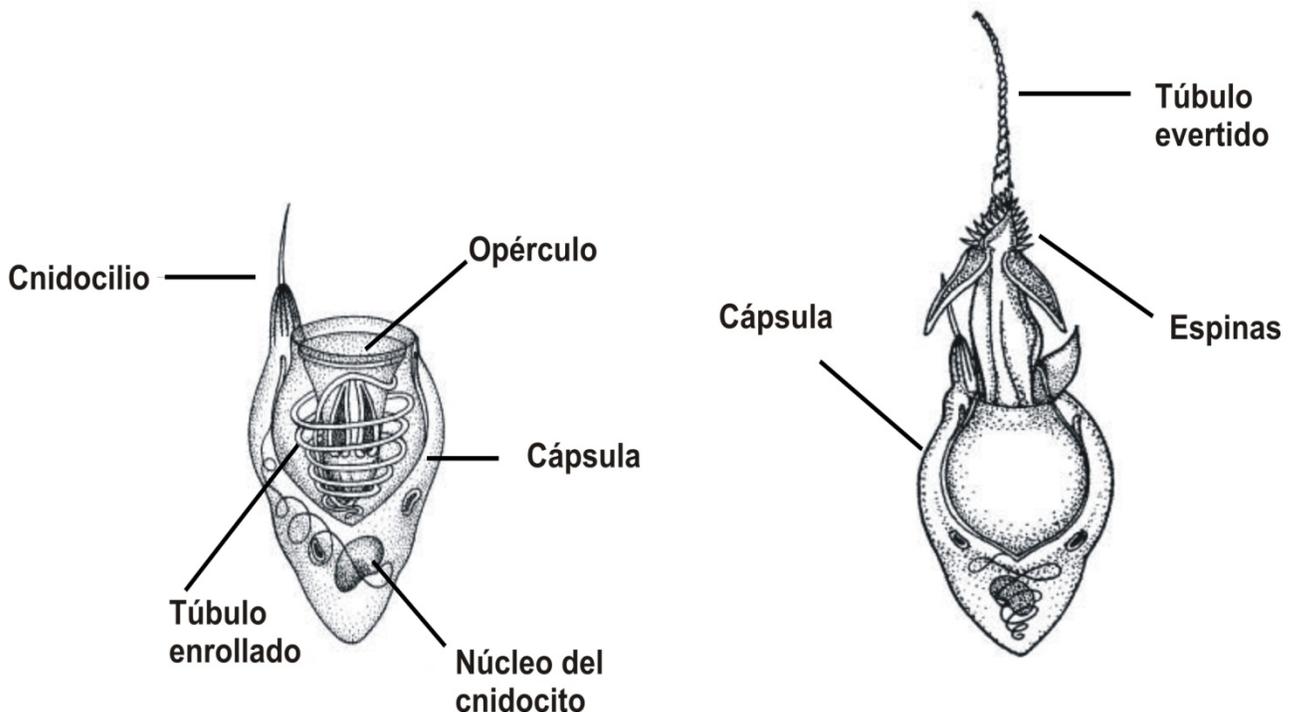


Figura 5. Esquema de un nematocisto (Ivy Livingstone, 1994).

Se ha calculado que el tiempo de descarga de un nematocisto es cuestión de milisegundos (Tardent, 1988) y que es en varias etapas.

Existen más de 24 tipos de nematocistos (Mariscal, 1974). Las diferencias morfológicas implican funciones específicas relacionadas con la captura de presas o defensa, es decir, penetración, adherencia, etc. (Purcell y Mills, 1988). Generalmente se asume que sólo los nematocistos penetrantes son venenosos. Por ejemplo, los túbulos evertidos de holotricos isorrizas de *Physalia physalis* se extienden más de 50 veces el diámetro de la cápsula del nematocisto y pueden penetrar hasta tejidos vascularizados en seres humanos (Cormier y Hessinger, 1980).

Aún no es claro el mecanismo de descarga de los nematocistos pero diversos estudios indican que podría ser una mezcla de estímulos químicos, mecánicos y osmóticos. La mayoría de los estudios realizados indican que la descarga en condiciones naturales depende principalmente de estímulos químicos y mecánicos (Rifkin *et al.*, 1996) lo que los hace independientes del sistema nervioso del animal. Sin embargo, experimentos diversos han mostrado que la descarga puede ser controlada por el animal dependiendo de su estado. Por ejemplo, algunas anémonas descargan sus nematocistos dependiendo del sustrato donde se encuentre su disco pedal (Davenport *et al.*, 1961; Ellis *et al.*, 1969). Burnett *et al.* (1960) y Bouchet (1961) observaron que la hidra reduce sus descargas de nematocistos después de haber sido bien alimentada.

El phylum Cnidaria está compuesto por las clases siguientes (Fig. 6):

-**Scyphozoa:** Al que pertenecen las llamadas medusas verdaderas, habitualmente de altamar y que son arrastradas hacia las costas. Su tamaño varía desde unos pocos centímetros hasta más de un metro.

-**Cubozoa:** A esta clase pertenecen las llamadas cubomedusas, las más tóxicas, con campanas o umbrelas en forma de cubo y uno (Carybdeidos) o varios (Chirodrópidos) tentáculos en cada esquina.

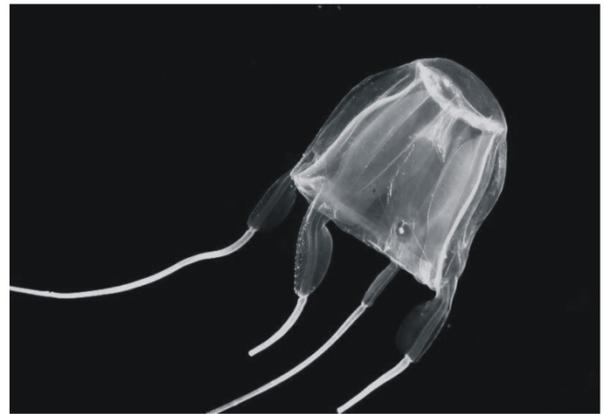
-**Anthozoa:** anémonas y corales.

-**Hydrozoa:** hidropólipos e hidromedusas.

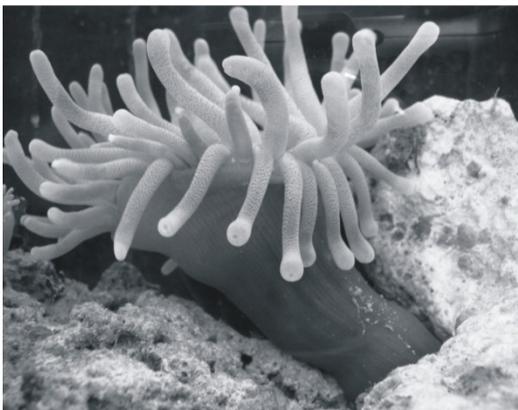
-**Staurozoa:** esta clase de cnidarios fue recientemente designada. Incluye al anterior orden stauromedusae de los scyphozoos (Daly *et al.*, 2007).



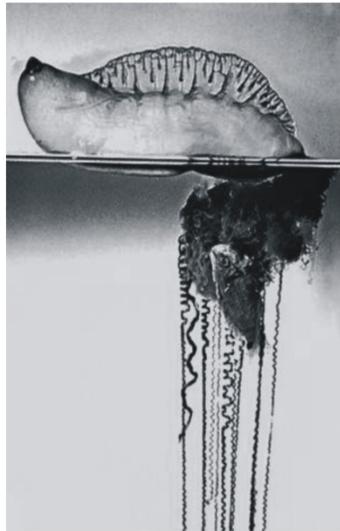
A



B



C



E



D

Figura 6. Phylum Cnidaria. A: Scyphozoa (*Pelagia noctiluca*, foto: www.focuspocus.org); B: Cubozoa (*Carybdea rastonii*, foto: www.paleobio.org); C: Anthozoa (*Condylactis gigantea*, foto: Ricardo González); D: Staurozoa (*Haliclystus octoradiatus*, foto: Richard Lord); E: Hydrozoa (*Physalia physalis*, foto: www.bioweb.uwlax.edu).

Las cubomedusas son un grupo de cnidarios conocido principalmente por los estudios realizados con *Chironex fleckeri*, la cubomedusa más peligrosa y considerada una de las especies más venenosas en el mundo. Brinkman y Burnell (2007) aislaron dos toxinas, CfTX-1 y CfTX-2, con pesos moleculares de

43 y 45 kDa respectivamente y que tienen capacidad hemolítica. Nagai (2003) documenta las propiedades químicas de algunas toxinas de tres especies de cubomedusas: *Carybdea rastoni*, *Carybdea alata* y *Chripsosalmus quadrigatus*. Las toxinas de estas especies mostraron toxicidad letal en crustáceos y actividad hemolítica en los eritrocitos de oveja.

Carybdea marsupialis

También conocida como “avispon marino” es una cubomedusa transparente, Tiene cuatro órganos sensoriales (ocelos) localizados en la campana. Presenta forma de cubo y el tamaño de campana oscila entre 2 y 4 cm de altura y 3 cm de ancho. Posee 4 tentáculos ubicados en cada esquina de la campana, los cuales llegan a medir hasta 30 cm de largo (Fig. 7). Los tentáculos tienen tres tipos de nematocistos agrupados en anillos (Avian, 1997):

- 1.- Heterotricos microbásicos euriteles
- 2.- Holotricos isorrizas haplonemes
- 3.- Atricos isorrizas haplonemes



Figura 7. *Carybdea marsupialis* (tomado de: doris.ffesm.fr/.../carybdea_marsupialis-gc1.JPG).

La posición taxonómica de la cubomedusa es la siguiente (Williamson *et al.*, 1996):

Reino: Animal

Phylum: Cnidaria Hatschek, 1888

Clase: Cubozoa Werner, 1975

Orden: Cubomedusae (=Carybdeida) Gegenbaur, 1856

Familia: Carybdeidae Haeckel, 1877

Género: *Carybdea* Péron & Lesueur, 1810

Especie: *Carybdea marsupialis* Linné, 1758

Es una cubomedusa muy abundante en aguas poco profundas (Torrens, 1994). Se encuentra distribuida en el Pacífico, Atlántico, Mar Caribe y Mediterráneo (Kramp, 1961).

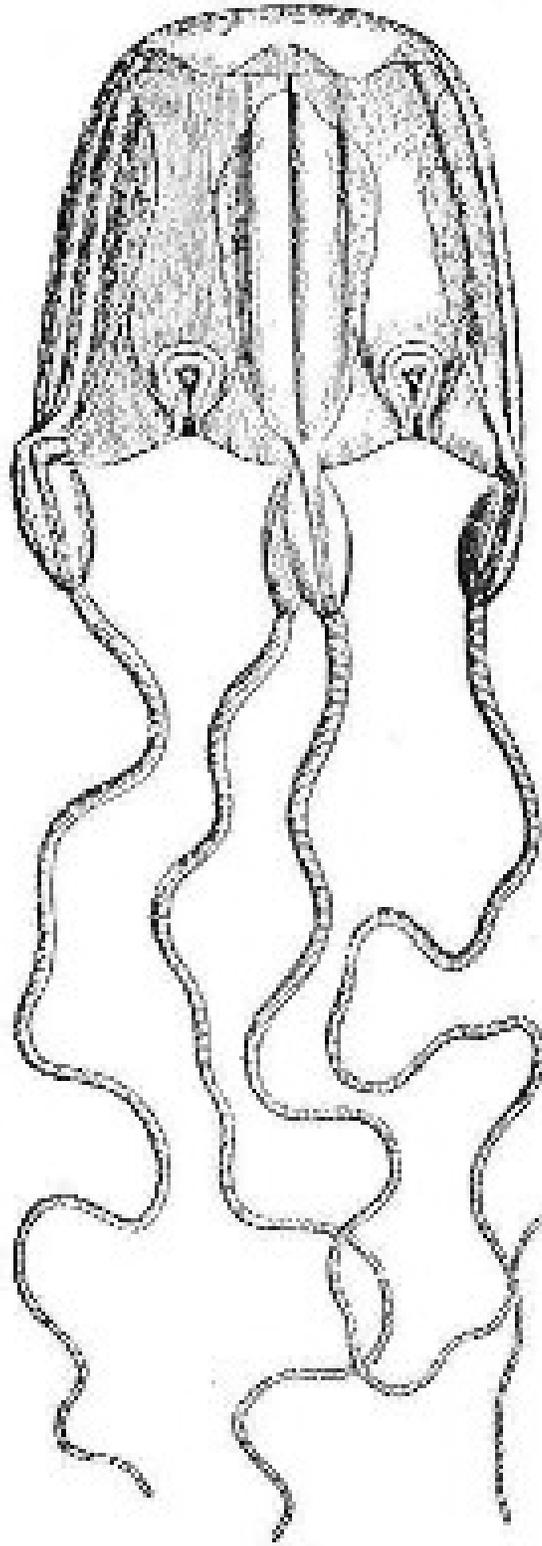
Azila y Othman (1991) encontraron que los tentáculos de las medusas del género *Carybdea* contienen factores activos, hemolíticos y hemorrágicos. Rottini *et al.* (1995) purificaron y estudiaron las propiedades de una toxina citolítica presente en *Carybdea marsupialis*. Torrens (2004) determinó la DL₅₀ (0.99mg/ml) en organismos de la especie *Ocypode quadrata*, con el extracto crudo de *Carybdea marsupialis* y purificó la neurotoxina **CmNt** con un peso molecular aproximado de 120 kDa. Morales-Landa *et al.* (2007), determinaron la DL₅₀ de extracto crudo de *C. marsupialis* (44 mg/kg) en tilapias de la especie *Oreochromis niloticus*, y encontraron que la toxina produce parálisis neural.

En general se han aislado en especies de cubomedusas (Tabla 4), sustancias de acción citotóxica, antifúngica, y antineoplásica (Sobrino, 1996).

Tabla 4. Algunas toxinas aisladas de cubomedusas.

NOMBRE	TOXINA	TIPO	PESO MOLECULAR (kDa)	REFERENCIA
1.- <i>Carybdea rastonii</i>	CrTX-A		43	Nagai <i>et al.</i> (2000a)
	CrTX-B		46	
2.- <i>Carybdea alata</i>	CrTX-A		43	Nagai <i>et al.</i> (2000b)
	CrTX-B		45	
	CAH1	hemolisina	42	Chung <i>et al.</i> (2000)
3.- <i>Carybdea marsupialis</i>	CARTOX	hemolisina	102-107	Rottini <i>et al.</i> (1995)
	CmNT	neurotoxina	120	Sánchez-Rodríguez (2006)
4.- <i>Chironex fleckeri</i>		hemolisina	70	Endean <i>et al.</i> (1993)
		miotoxina	150	Endean y Sizemore (1987)
		miotoxina	600	
		neurotoxina	150	
		hemolisina	150	
	CfTX-1	citolisina	43	Brinkman y Burnell (2007)
	CfTX-2	citolisina	45	
5.- <i>Chiropsalmus quadrigatus</i>	CqTX-A	hemolisina	44	Nagai (2002)
6.- <i>Carukia barnesi</i>		neurotoxina		Winkel <i>et al.</i> (2005)

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



III. HIPÓTESIS

Las neurotoxinas presentes en *Carybdea marsupialis* afectarán los canales iónicos y/o otras proteínas de membrana expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*.

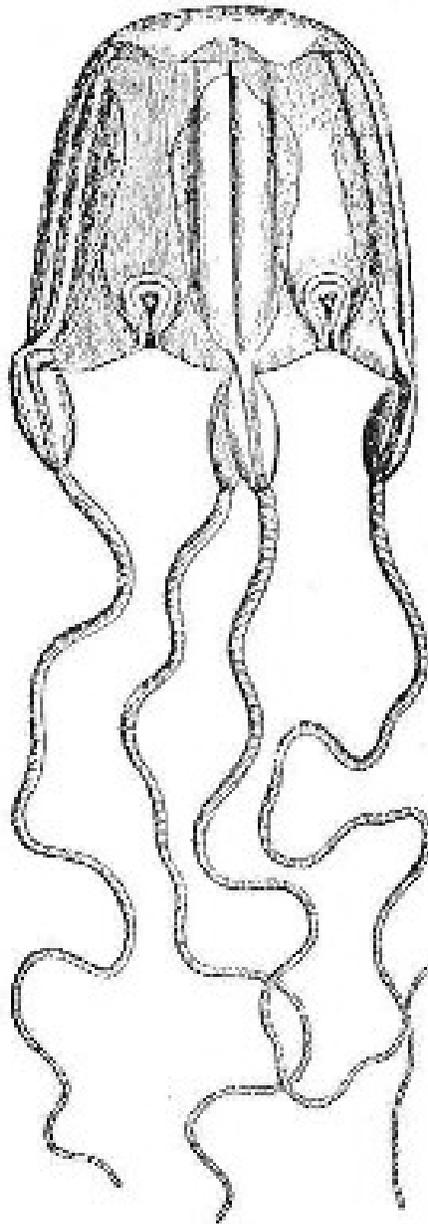
IV. OBJETIVO

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

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar las neurotoxinas presentes en la cubomedusa *Carybdea marsupialis*.
- Purificar parcialmente las neurotoxinas mediante cromatografía líquida de baja presión y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Caracterizar los posibles efectos de las neurotoxinas mediante análisis electrofisiológico en ovocitos de *Xenopus laevis*.

ÁREA DE ESTUDIO



V. ÁREA DE ESTUDIO

Las costas de Quintana Roo se caracterizan por presentar un relieve muy escaso y por la ausencia total de ríos. Esto se debe al carácter kárstico del terreno, el cual es de naturaleza calcárea. A lo largo de la costa se encuentran formaciones arrecifales sobre una plataforma continental muy estrecha. El clima es de carácter tropical, con vientos alisios en primavera y verano y “nortes” en otoño e invierno, y por la zona transitan huracanes y depresiones tropicales. El medio marino está dominado por la corriente de Yucatán que fluye paralela a la costa con dirección hacia el norte. Las aguas costeras presentan un carácter oceánico y oligotrófico, con gran estabilidad vertical, elevada transparencia y bajos niveles de nutrientes (Merino y Otero, 1991).

La laguna arrecifal de Puerto Morelos (Fig. 8) se encuentra ubicada en la porción nororiental de la Península de Yucatán, entre los 20° 52' N y los 86° 51' O (Ruiz-Rentería *et al.*, 1998). Tiene una extensión aproximada de 7 km y un amplitud entre 350 y 1600m; la profundidad varía entre 1 y 8 m. Presenta un promedio de 3 m (Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1991).

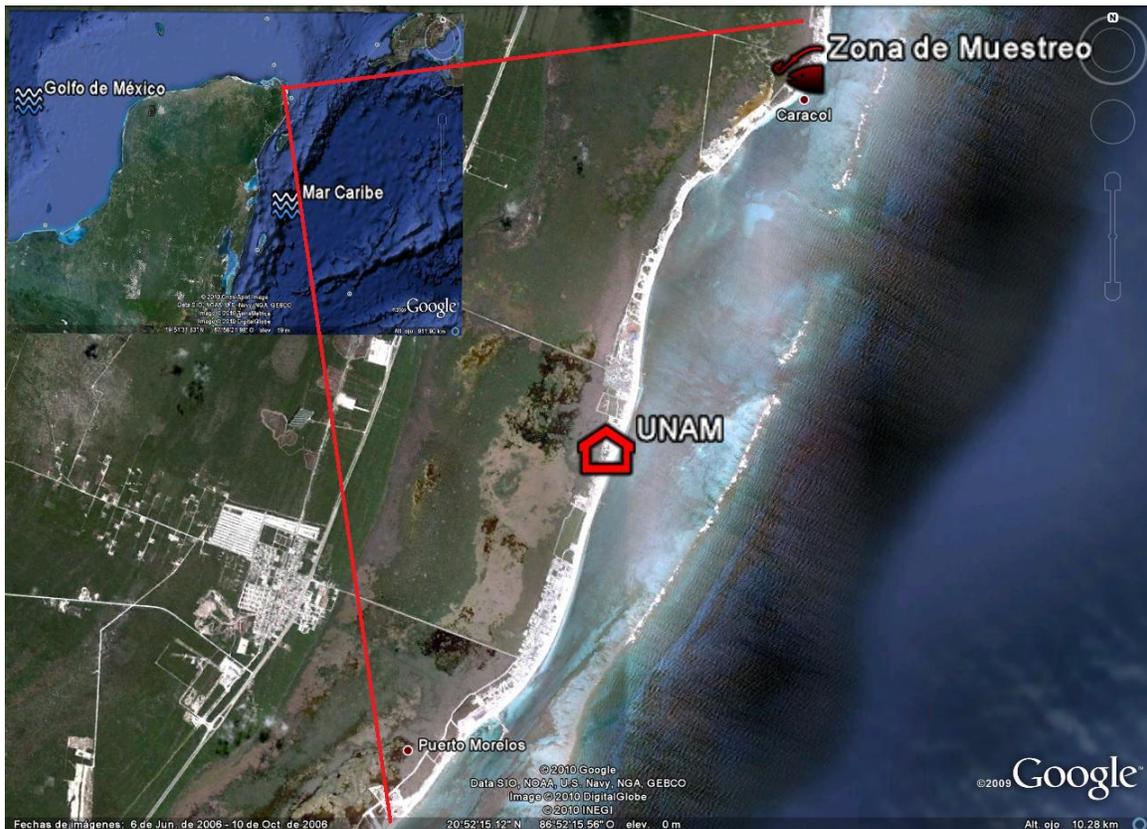
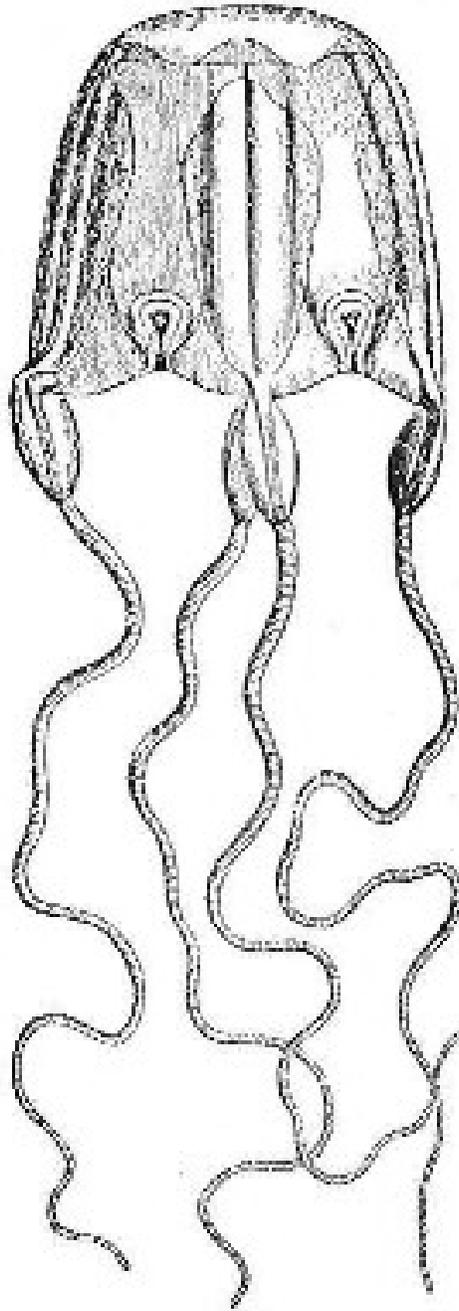


Figura 8 Ubicación de la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo.

METODOLOGÍA



VI. METODOLOGÍA

Muestreo

Los ejemplares de la cubomedusa *Carybdea marsupialis* se recolectaron en la laguna arrecifal de Puerto Morelos entre los meses de julio y septiembre de 2007. La recolección se llevó a cabo por medio de buceo libre en la zona somera y arenosa cercana a la playa. Las cubomedusas se capturaron manualmente y se colocaron en recipientes de plástico con capacidad de 20 l aproximadamente llenos de agua de mar. Los organismos se transportaron a la Unidad Académica Puerto Morelos donde se procesaron.

Obtención del extracto crudo

- 1.- En el laboratorio se cortaron los tentáculos de las medusas con tijeras y se colocaron en viales de vidrio.
- 2.- Con el objeto de descargar los nematocistos en los tentáculos, se utilizó un homogeneizador de vidrio. Los tentáculos se colocaron en agua desionizada y se maceraron hasta obtener la descarga total de los nematocistos, de este modo el estímulo mecánico provocado por la fricción, provocó la eversión del túbulo y la liberación de la toxina al medio.
- 3.- El extracto se agitó y se centrifugó durante 30 minutos a 4000 rpm a 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5810 R.
- 4.- Se tomó una muestra del precipitado para observarla al microscopio y comprobar que la mayoría de los nematocistos fueron descargados.
- 5.- Se tomó el sobrenadante y se colocó en viales de vidrio. Posteriormente se agregó un inhibidor de proteasas (Complete Mini de Roche®).
- 6.- El material se congeló a -60°C y se liofilizó a - 48°C en un aparato Freeze Dryng Model 77500 (LABCONCO) y se guardó nuevamente hasta su uso.

Electroforesis (SDS-PAGE)

Para conocer el intervalo de peso molecular de las proteínas que componen la toxina, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% del extracto crudo y de las fracciones purificadas.

La electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) es un método rápido y sensible para separar y caracterizar proteínas. Se basa en la velocidad de migración de las moléculas hacia el polo positivo de una celda. La velocidad de migración, depende del tamaño y la forma de la molécula.

Se utilizaron 10 mg de extracto crudo disueltos en 200µl de agua desionizada. Las muestras se resuspendieron 1:4 en "buffer" de muestra (β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, glicerol, 10% SDS, TRIS-HCL pH 6.8) (ver Anexo). Se prepararon en viales de plástico y se calentaron a 95°C por 4 minutos en baño seco. Se colocaron 14 µl de cada muestra en el gel y 2 µl de estándar. Se usó como estándar el Rainbow coloured protein molecular weight markers (Amersham Pharmacia Biotech) con un intervalo de pesos entre 250 y 14 kDa. Las muestras se corrieron a 100 volts por 45 min. aproximadamente en un buffer de corrimiento (ver Anexo).

Para las fracciones purificadas se pesaron 7mg de la muestra liofilizada y se disolvieron en 300µl de agua desionizada y se aplicó la misma técnica del extracto crudo.

Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie al 1% (BioRad®) y destañados con una solución de metanol (30%), ácido acético (20%) y agua (50%).

Determinación de proteínas

Para conocer la cantidad de proteínas presente en el extracto crudo liofilizado, se siguió el método de Bradford (1976). Este método se basa en la unión del colorante Azul de Coomassie a las proteínas.

Se hizo una curva de calibración con Globulina bovina con concentraciones de 0.125, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5 y 2.0 mg/ml y se leyó en un espectrofotómetro UV-Visible (AMINCO DW-2) a 595 nm en celdas de cuarzo. Se leyeron las muestras de extracto crudo y fracciones de la misma forma y se determinó la cantidad de proteína mediante la sustitución en la curva patrón obtenida.

Naturaleza química del veneno.

Las toxinas estudiadas de cnidarios con actividad neurotóxica y hemolítica son de naturaleza peptídica con pesos moleculares que pueden tener hasta 260, 000 Da.

La estructura tridimensional resulta crítica para la función de una proteína (Torres, 2001) y su exposición al calor, detergentes y pH extremos la pueden desestabilizar, ya sea que destruyan interacciones químicas débiles como fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, puentes disulfuro o interacciones iónicas.

Para saber la naturaleza de las toxinas en *Carybdea marsupialis*, el veneno se incubó a diferentes temperaturas durante 5 minutos: 35, 60 y 100 °C y se inyectó en cangrejos para observar la reacción.

Purificación de las neurotoxinas:

Los métodos para separar y purificar proteínas son muy variados y dependen de las propiedades físicas y químicas de las moléculas como su tamaño, carga, grupos ionizables, solubilidad, termoestabilidad, etc. Algunas de las técnicas utilizadas son la ultracentrifugación, electroforesis, cambio de pH, aglutinación por anticuerpos, inmunoelectroforesis y la cromatografía.

La separación por cromatografía se basa en la partición diferencial de las moléculas de muestra entre una fase estacionaria o matriz y una fase móvil o eluyente. Las proteínas se pueden separar por tamaños mediante una filtración en gel; en función de su carga eléctrica por cromatografía de intercambio iónico; por su alta afinidad a grupos químicos específicos por una cromatografía de afinidad; o por su hidrofobicidad con una cromatografía en fase reversa.

1. Cromatografía Líquida de Baja Presión.

El extracto crudo liofilizado se disolvió en agua desionizada para iniciar la purificación mediante cromatografía en columna de líquidos y se utilizaron los medios siguientes:

- a) Cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-50 M): Con esta técnica, las moléculas se separan de acuerdo a su tamaño. Este método se utilizó como primer paso para la purificación de toxinas y se usó ácido acético como eluyente. La fracción activa en cangrejos, la fracción 2, se pasó a la siguiente matriz para su purificación.

b) Columna de intercambio aniónico (QAE Sephadex A -25): Esta separación se basa en la adsorción reversible de moléculas cargadas negativamente en una matriz con un grupo positivo. La fracción activa, la fracción 1, se hizo pasar por la columna con una solución amortiguadora de acetato de amonio pH 8.5 y un gradiente escalonado de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 M.

c) Columna de intercambio catiónico (Fractogel EMD SO_3^-): La separación por esta columna funciona del mismo modo que la anterior con la diferencia de que ahora la matriz tiene un grupo negativo (SO_3^-) y las proteínas adsorbidas son aquellas con carga positiva. La fracción 1 de QAE se hizo pasar por la columna y se utilizó una solución amortiguadora de acetato de amonio pH 5.5 y un gradiente escalonado de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 M.

2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Fase Reversa).

La cromatografía en fase reversa (RPC) permite separar moléculas con base en su polaridad. Las fracciones resultantes de los pasos cromatográficos anteriores, se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución fase reversa en un aparato HPLC 410 Varian®. La columna empleada fue una Microsorb C4, de 300^a, 4.6x250mm Varian®.

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

Bioensayos

Prueba de Actividad Neurotóxica:

Cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* se recolectaron en la playa. Se les inyectaron dosis del extracto crudo en diferentes concentraciones y de las fracciones pre-purificadas en el tercer apéndice caminador, con el fin de realizar el monitoreo biológico y continuar la purificación. Se observaron las reacciones que tuvieron los organismos al ser inyectados.

Se determinó la dosis letal media (LD_{50}) en cangrejos del extracto crudo y de una fracción purificada. Se emplearon dosis de 1, 5, 10, 15, 17.5, 20 y 25 mg/kg y se inyectó 0.1 ml de cada una en el tercer apéndice caminador. Cada prueba se hizo en 5 individuos y se determinó la LD_{50} del extracto crudo y de la fracción 1 de Sephadex G50 M con el programa PROBIT.

Análisis electrofisiológico del veneno:

Ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos se obtuvieron por cirugía de la rana *Xenopus laevis*. Las ranas fueron anestesiadas por hipotermia en hielo y posteriormente sometidas a una intervención quirúrgica en la parte baja del abdomen donde fueron disecados de dos a tres lóbulos del ovario. (Fig. 9 A). Ovocitos en los estadios V o VI de desarrollo (Fig. 9 B) fueron disecados y mantenidos a 19 ° C por 24 h en una solución de Barth Normal (BN) con la composición siguiente (mM): NaCl 88, KCl 1, NaHCO₃ 2.4, Ca(NO₃)₂ 0.33, CaCl₂ 0.41, MgSO₄ 0.82, ácido (4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetasulfónico (Hepes) 5, gentamicina 70 µg/ml y se ajustó el pH a 7.4.

Los ovocitos fueron microinyectados 24 horas después con el ARNm purificado de cerebro de rata (50nl equivalentes a 50ng). Se utilizó una micropipeta de vidrio estéril en un microinyector Drummond®. Los ovocitos se incubaron a 19 ° C en solución de Barth Normal.

El uso de los ovocitos en los registros electrofisiológicos requiere la remoción de la capa de células foliculares. 48 horas después de la microinyección, los ovocitos fueron sometidos a un tratamiento enzimático con colagenasa (de *Clostridium histolyticum* Tipo I, Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.3 mg/ml durante 30 minutos en una solución Ringer Normal (RN) con la composición siguiente (mM): NaCl 115, KCl 2, CaCl₂ 1.8, Hepes 5 y pH 7.0. Posteriormente se lavaron varias veces con RN y se colocaron en BN para defolicularlos (remoción de las capas externas que lo cubren a excepción de la capa vitelina) con ayuda de una pinzas finas (Dummont No. 5, Fine Science Tools). Los registros electrofisiológicos se realizaron 3 días después del tratamiento.

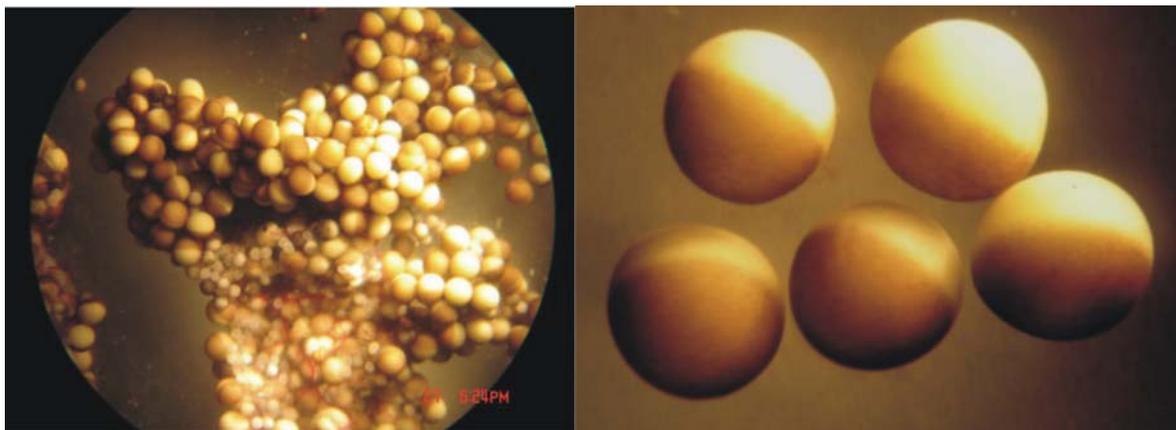


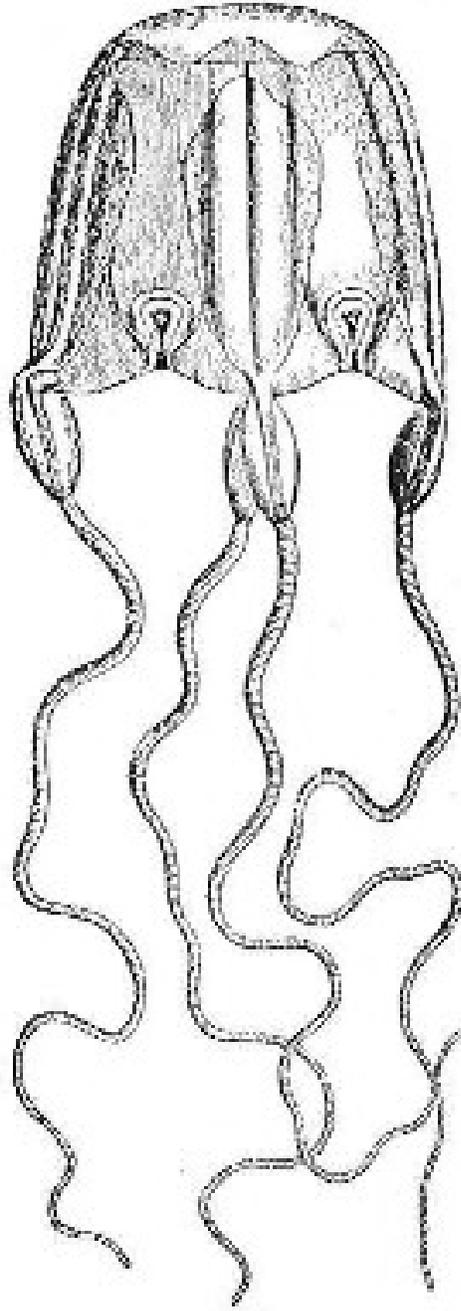
Figura 9. A: Lóbulo de ovocitos de *Xenopus laevis*. B: Ovocitos en estadio VI de desarrollo (fotos: Leticia Robles).

Análisis Electrofisiológico

Para evaluar la actividad de las fracciones purificadas del veneno de *Carybdea marsupialis* (*Cm*), se utilizó la técnica de control de voltaje con dos electrodos. Los microelectrodos se llenaron con una solución 3M de KCl y tuvieron una resistencia de 1 a 2 M Ω . Los ovocitos fueron continuamente perfundidos con Ringer Normal (10 ml/min) y las fracciones del veneno de *Cm* fueron aplicadas por perfusión rápida en diferentes concentraciones.

Para realizar las pruebas se aplicó el protocolo siguiente: se inyectó ARNm de cerebro de rata en los ovocitos, se obtiene la expresión de proteínas de membrana diversas las cuales se midieron con la aplicación de soluciones que contienen algunos de los agonistas más importantes, por ejemplo: acetilcolina (ACh), serotonina (5HT), ácido γ -aminobutírico (GABA) y ácido glutámico-glicina (Glu-Gly). Una vez corroborada la expresión funcional de proteínas membranales, los agonistas se co-aplicaron con la fracción tóxica y se observó el efecto.

RESULTADOS



VI. RESULTADOS

Durante los primeros meses, debido a la escasez de ejemplares, se trabajó con muestras liofilizadas y almacenadas en el laboratorio de toxicología de cnidarios, de tentáculos de *C. marsupialis*, recolectadas en el 2004. Posteriormente, se recolectaron más organismos. Se hicieron pruebas de toxicidad en cangrejos y se compararon los extractos obtenidos (Tablas 5 y 6).

Recolección de Carybdea marsupialis

La recolección de los organismos se realizó manualmente mediante buceo libre, obteniendo un total de 1340 ejemplares.

Obtención del extracto crudo:

La homogeneización de los tentáculos, dio un porcentaje de descarga de aprox. 90% (Fig. 10). Después de la liofilización, se obtuvieron 12 g de extracto.

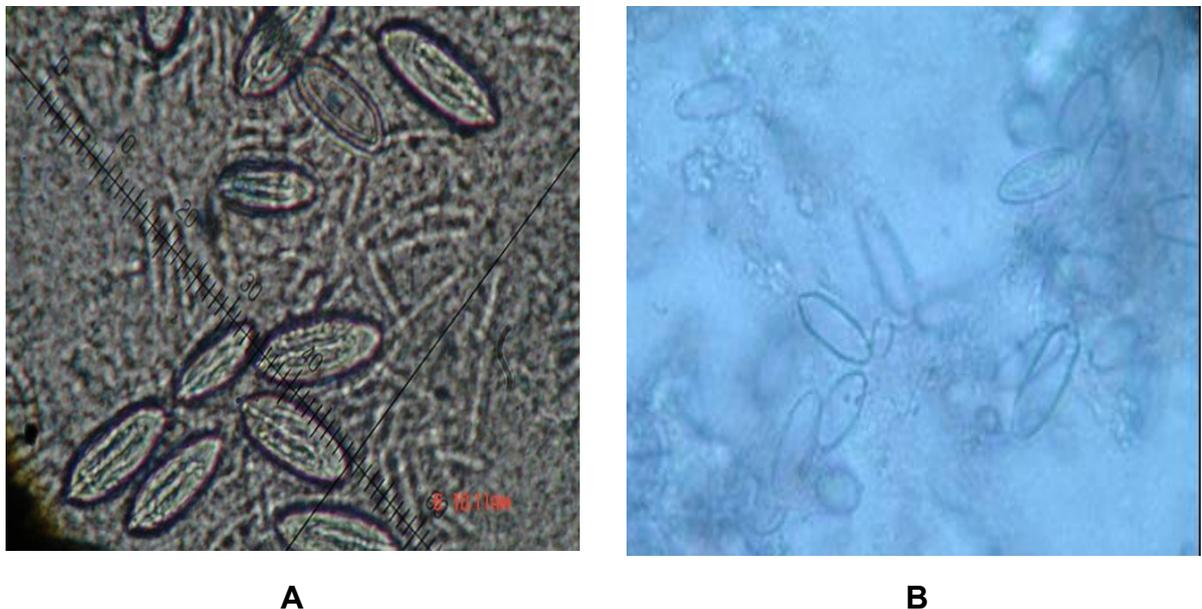


Figura 10. A: Nematocistos cargados en los que se puede apreciar el estilete dentro de la cápsula. B: Nematocistos descargados después de la homogeneización.

Electroforesis

En la electroforesis realizada con el extracto crudo (Fig. 11), con varias cantidades (8, 12, 14 y 16 μ l a una concentración de 12.5 mg/ml) se ven varias bandas que indican que está compuesto por una variedad de proteínas de peso molecular entre los 220 y 14 kDa. Los pesos aproximados de las proteínas son:

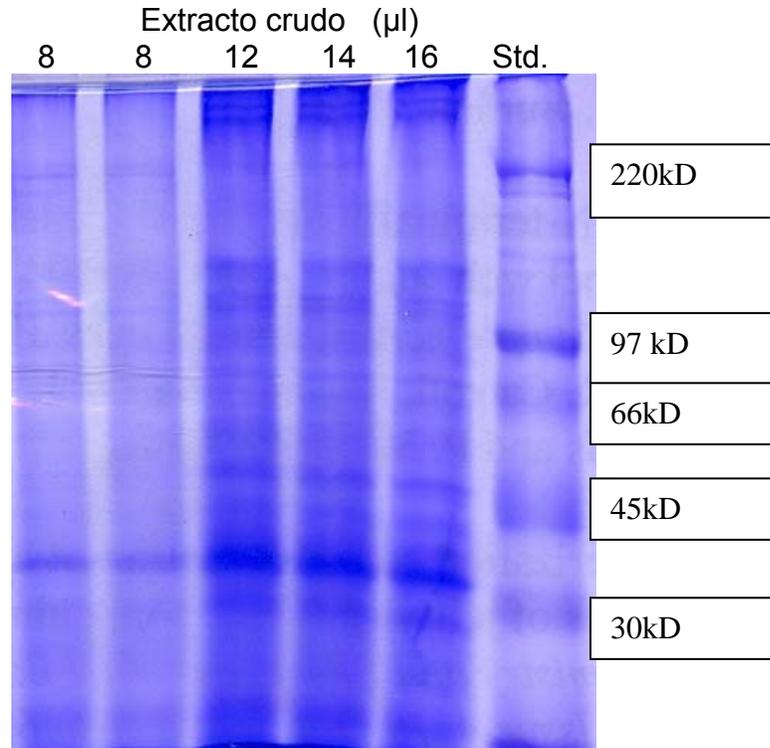


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto crudo de la medusa *Carybdea marsupialis*.

Bioensayos

El extracto crudo al ser probado en crustáceos de la especie *Ocypode quadrata*, mostró actividad biológica. Se disolvió 1mg de extracto en 1 ml de agua desionizada y se inyectó 0.1ml en el tercer apéndice caminador con una jeringa de insulina.

La Tabla 5 muestra los resultados de pruebas realizadas con extracto crudo de muestras del año 2004 mientras que la Tabla 6 presenta los resultados con muestras del año 2007.

Al minuto se observaron movimientos involuntarios (temblores, primero en apéndices caminadores y luego en las quelas). A los 2 minutos pararon y el espécimen entró en parálisis. Fue difícil saber el tiempo de muerte por no poder diferenciarla de la parálisis, sin embargo, se definió cuando el animal quedó completamente flácido y su caparazón necrosado. La muerte se estimó que ocurrió en aproximadamente 7 minutos.

Tabla 5. Bioensayos en cangrejos con el extracto de 2004.

	Cangrejo 1	Cangrejo 2	Cangrejo 3
Sexo	hembra	hembra	hembra
Peso	15 g	11.75 g	12.34 g
Long. Cuerpo	3.2 cm	3 cm	3 cm
Tiempo de movimientos	3min	1 min 53 seg	2 min 34 seg
Parálisis	5min	3 min	3 min 30 seg
Muerte	20 min	20 min	18 min

Tabla 6. Bioensayos en cangrejos con el extracto de 2007.

	Cangrejo 1	Cangrejo 2	Cangrejo 3
Sexo	hembra	hembra	macho
Peso	14 g	20 g	18 g
Long. Cuerpo	3. cm	3.3cm	3.1 cm
Tiempo de movimientos	1min	1 min	1 min 10 seg
Parálisis	2min	2 min	2 min
Muerte	7 min	7 min	7 min

Para la determinación de la DL_{50} se comenzó con una dosis de 25 mg/kg. El porcentaje de mortalidad fue del 100% y en pocos minutos por lo que se probaron dosis más pequeñas. Con dosis de 1mg/kg la supervivencia fue de 100%. Todos los organismos sobrevivientes fueron liberados. El procedimiento se realizó con el extracto crudo y la fracción 1 de Sephadex G50 M y las DL_{50} calculadas fueron de 14 y 12 mg/kg respectivamente.

Las pruebas de temperatura para mostrar la naturaleza proteica de la toxina mostraron que a una temperatura de incubación de 35°C la toxina aún producía efectos de convulsiones y parálisis pero muy retardados y de menor duración. Los organismos inyectados sobrevivieron. El extracto crudo y fracciones calentadas a 60 y 100°C perdieron completamente su actividad.

Purificación

El primer paso en la purificación fue la cromatografía de filtración en gel Sephadex G50 M (Pharmacia Biotech) en una columna de 5 X 90cm. Se disolvieron 8.72 g de extracto crudo en 150 ml de agua desionizada y se hicieron pasar en la columna a un flujo de 2.5 ml/min, se utilizó como eluyente una solución de ácido acético 0.7 M. Para la detección de las fracciones proteicas, se utilizó una longitud de onda de 280 nm. De este primer paso, se obtuvieron 3 fracciones (Fig. 12), las cuales se concentraron al vacío con un rotavapor Buchi hasta un volumen aproximado de 5 ml, posteriormente se congelaron a -60 °C.

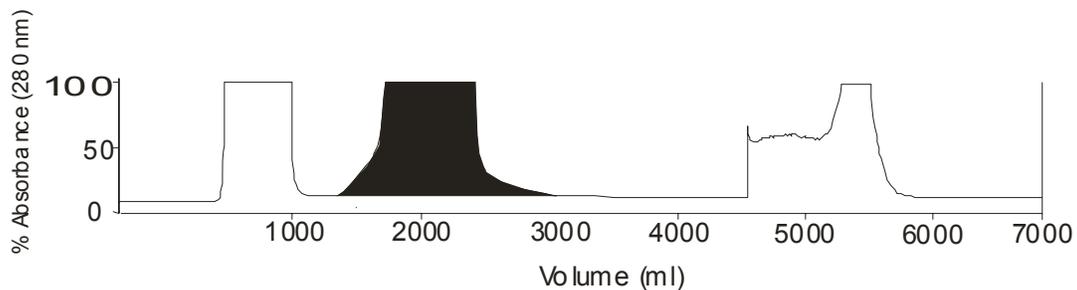


Figura 12. Sephadex G50 M del extracto crudo de *Carybdea marsupialis*.

La fracción 2 (coloreada en negro) mostró toxicidad en cangrejos con síntomas de neurotoxicidad y se continuó la purificación.

Como paso siguiente, se utilizó una columna con matriz de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25 (Pharmacia Biotech) en una columna de 0.5 por 48 cm de longitud y se utilizó como solución amortiguadora acetato de amonio pH 8.5 en un gradiente escalonado 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M. El flujo fue de 2 ml/min y las fracciones se detectaron a 280 nm. Se obtuvieron 6 fracciones, cada una correspondiente a una molaridad diferente de la solución de acetato de amonio (Fig. 13).

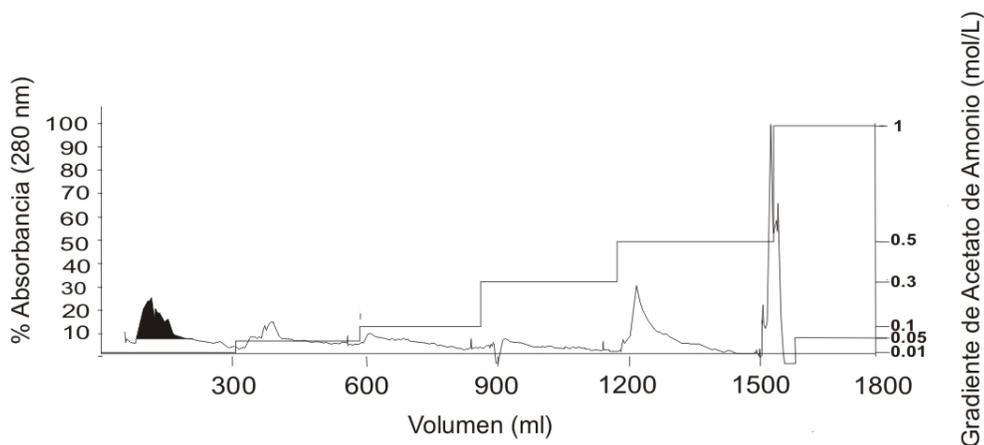


Figura 13. Cromatograma de intercambio iónico de la fracción activa en QAE Sephadex A25.

La fracción activa en crustáceos fue la fracción 1. Se pasó por una columna de intercambio catiónico (1.5 X 25 cm) Fractogel EMD SO_3^- (Merck). Se utilizó un gradiente escalonado de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M de acetato de amonio pH 5.5. El flujo fue de 2.5 ml/min y se detectaron las fracciones a 280nm (Fig. 14).

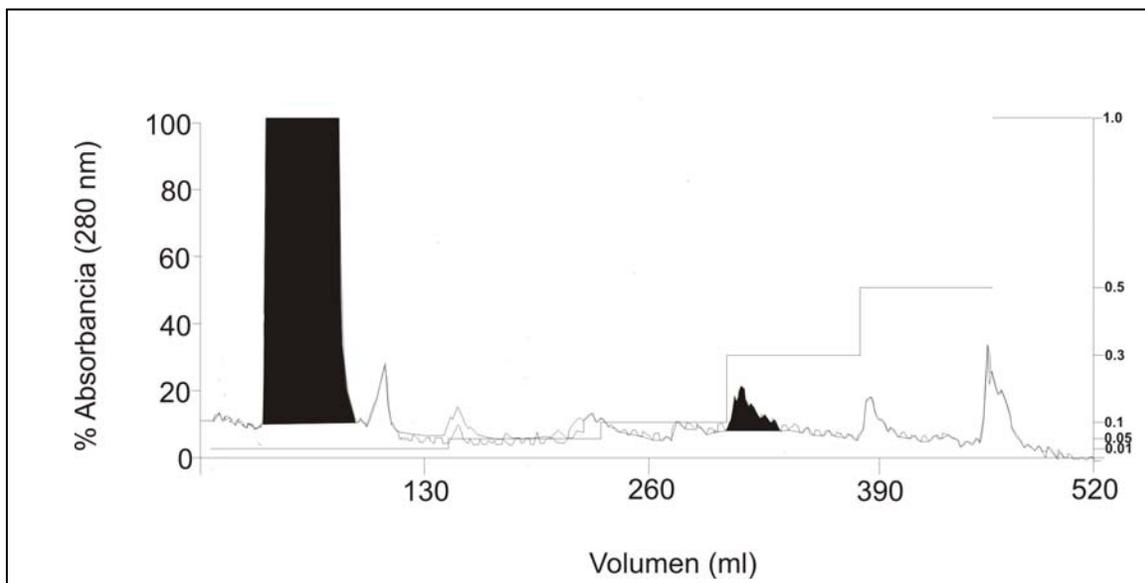


Figura 14. Cromatograma de intercambio iónico de las fracciones activas obtenidas de Fractogel EMD SO_3^- .

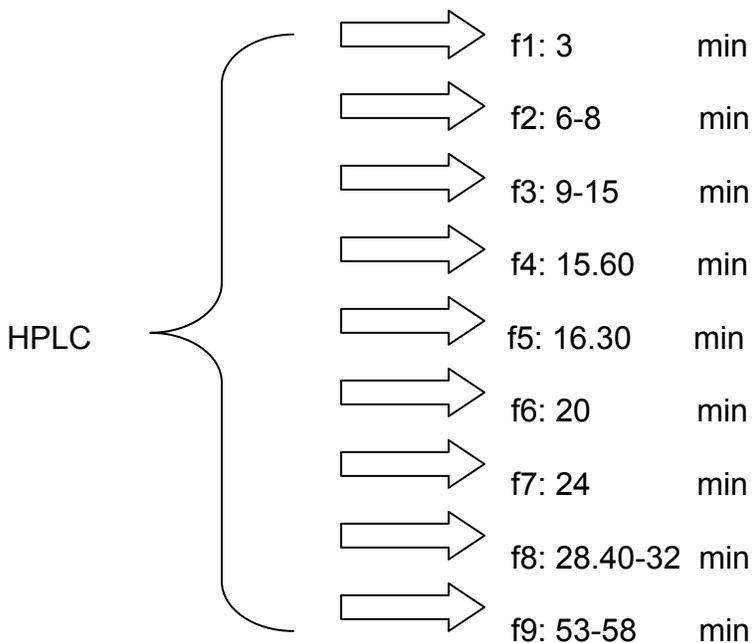
De las fracciones obtenidas (Fig. 14), dos presentaron actividad neurotóxica: las fracciones 1 y 4 (color negro).

La fracción 1, llamada F1, mostró una alta conductividad por lo que se desaló mediante una membrana de diálisis con un poro de 3.5 kDa.

Para eliminar el acetato de amonio de la fracción 4 (F4), se desaló en una columna (2 X 90cm) de filtración en gel con Sephadex G-25, a una velocidad de 2 ml/min, utilizando ácido acético 0.7 M como eluyente.

El último paso en la purificación parcial de las fracciones con actividad neurotóxica fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en columna de fase reversa con un gradiente lineal de agua-acetonitrilo (10-90% a 90-10%) en 70 minutos (Fig.15).

Se obtuvieron nueve fracciones en los tiempos de elución que a continuación se enlistan:



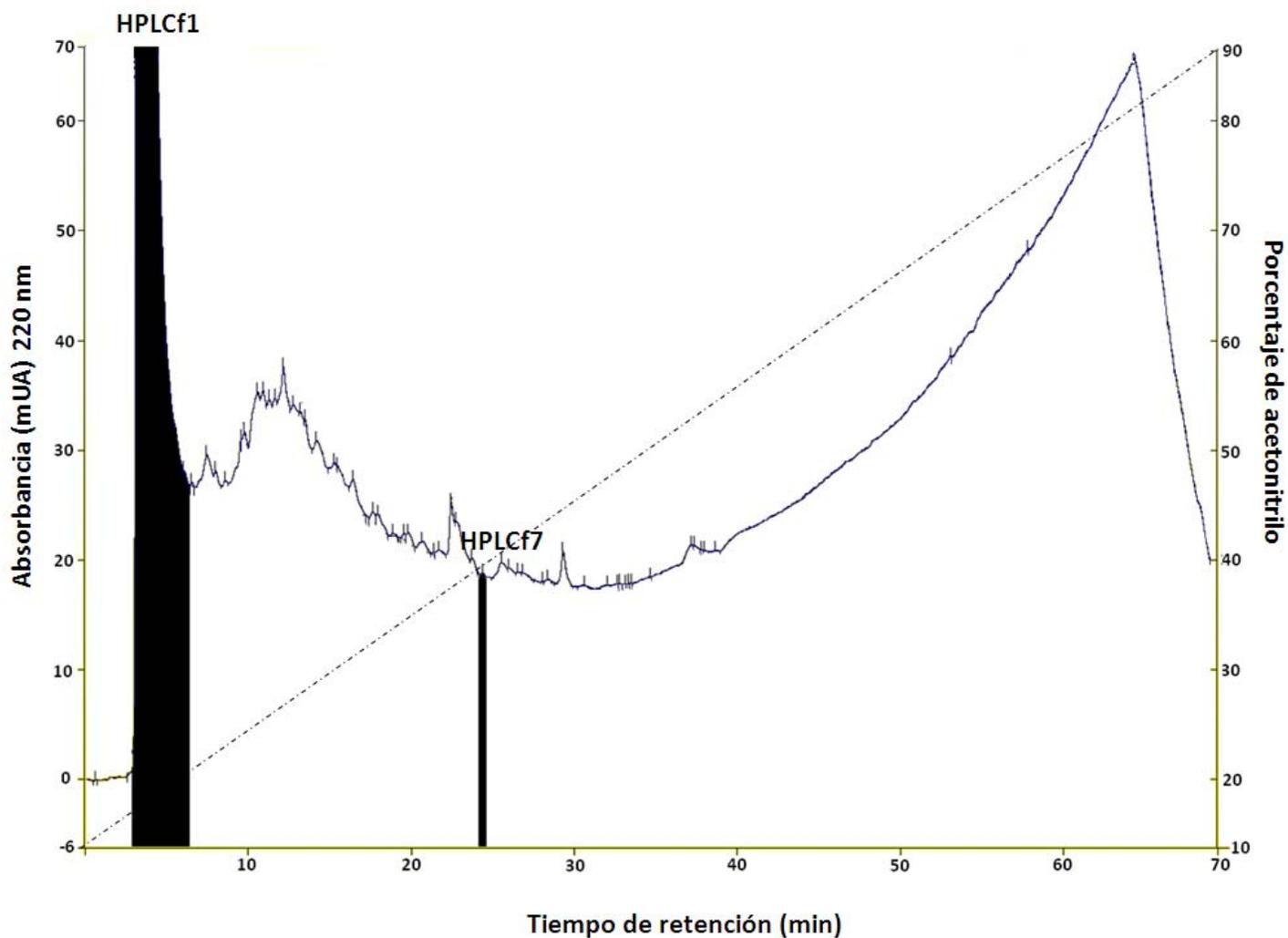


Figura 15. Cromatograma de HPLC de la fracción neurotóxica. Se muestran en negro las fracciones con actividad en ovocitos.

Con la finalidad de determinar la actividad a nivel de canales iónicos de las toxinas de *Cm*, se evaluaron las fracciones F1 (fracción 1 de Fractogel EMD SO_3^-) y las fracciones obtenidas al pasar ésta por HPLC (fracciones 1 a 9).

Primero, se evaluaron las fracciones en ovocitos control, es decir, aquellos ovocitos inyectados con agua estéril y no con RNAm, con la finalidad de saber si las fracciones causaban efectos sobre las características nativas de la membrana del ovocito. Al perfundir la fracción F1, no se observó cambio en la corriente basal lo que indicó que la toxina no tiene efecto sobre los receptores y canales iónicos nativos del ovocito (Fig. 16).



Figura 16. Ejemplo de un registro de la corriente transmembranal en un ovocito control, inyectado con agua. Los ovocitos tanto controles como inyectados con el ARNm de cerebro fueron mantenidos a un potencial de -60 mV y perfundidos con Ringer Normal al que fueron agregadas diversas sustancias de prueba en el tiempo señalado con la barras. Se observa que tanto la fracción F1 como los agonistas glutamato-glicina y GABA no producen respuestas en ovocitos control.

Una vez que se probaron los ovocitos inyectados con agua estéril, se observó entonces el nivel de expresión de los ovocitos inyectados con ARNm de cerebro de rata. Soluciones de agonistas como acetilcolina, serotonina y ácido glutámico-glicina fueron probadas a una concentración de 10^{-4} M. Ejemplos de las respuestas de corriente obtenidas se pueden ver en las figuras 17 y 18.

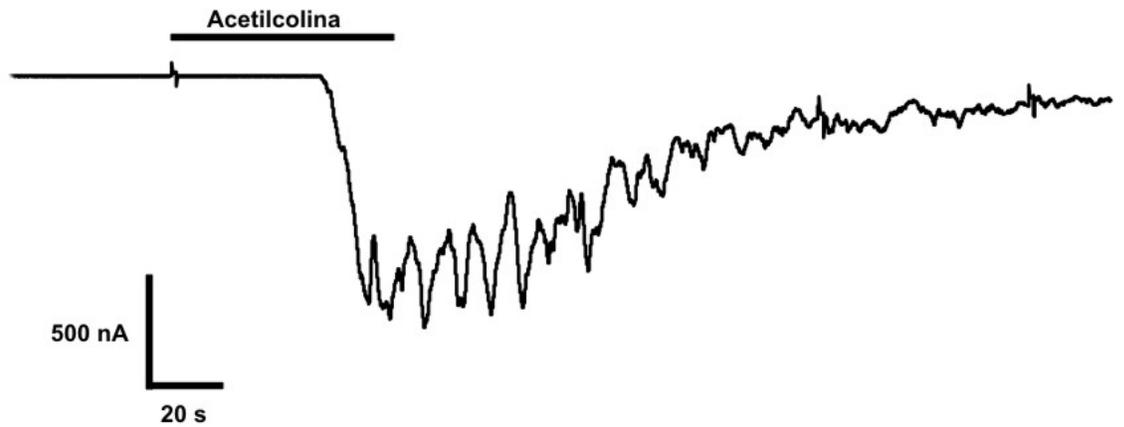


Figura 17. Registro electrofisiológico del efecto del agonista Acetilcolina (ACh) en un ovocito inyectado con RNAm de cerebro de rata. Las condiciones de registro fueron iguales a las de la figura 17.

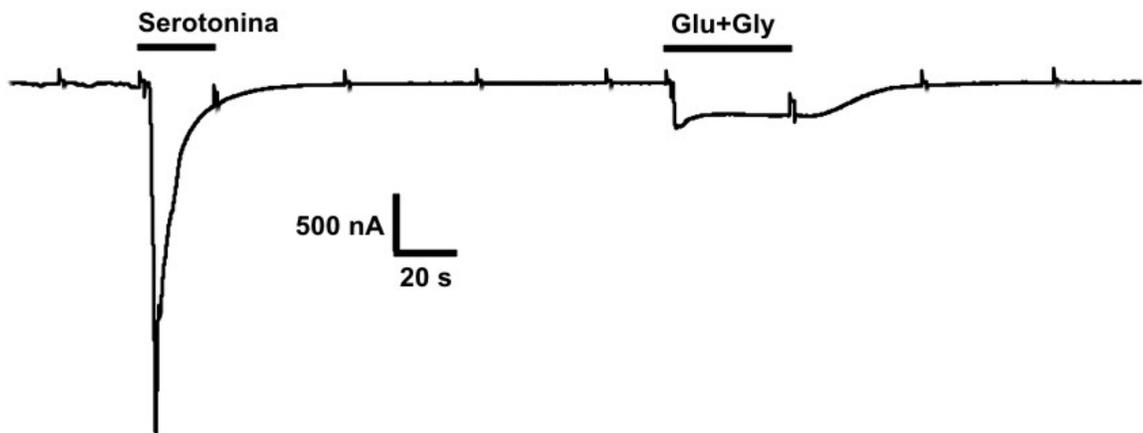


Figura 18. Registro electrofisiológico del efecto de los agonistas Serotonina (5HT) y ácido glutámico + glicina (Glu+Gly) en un ovocito inyectado con RNAm de cerebro de rata. Las condiciones de registro fueron iguales a las de la figura 17.

En ambas figuras se puede observar una corriente entrante que indica la apertura de receptores a los agonistas aplicados a diferencia del registro con ovocitos inyectados con agua, que se observa plano (Fig. 17). Una vez comprobado que los ovocitos expresan receptores mediante la aplicación de los diferentes agonistas, se procedió a evaluar las fracciones del veneno de *Cm*.

Registros electrofisiológicos

Respuesta electrofisiológica de la fracción F1 en ovocitos con receptores

A diferencia de la falta de efecto observado de F1 sobre los ovocitos control, esta fracción y algunas otras obtenidas del veneno de *Carybdea marsupialis* generaron en la membrana del ovocito inyectado con RNAm, una mezcla de respuestas (Fig. 19).



Figura 19. Efecto de la fracción F1 en una dilución 1/50, equivalenten a 2.8 $\mu\text{g/ml}$ de proteína.

Por ejemplo, en el registro de la figura 20, se observa una corriente entrante lisa (R.L.) de aproximadamente 7 nA seguida de una corriente oscilatoria (OSC) de aproximadamente 145 nA.

Posteriormente, se realizaron experimentos con diferentes concentraciones que muestran una respuesta dependiente de la dosis (Figuras 20 y 21).



Figura 20. Efecto de la fracción F1 en dilución 1/20, equivalente a 7 μ g/ml de proteína.



Figura 21. Efecto de la fracción F1 en dilución 1/1000, equivalente a 0.14 μ g/ml de proteína.

La fracción F1 en dilución 1/20 produjo una corriente entrante lisa (R.L.) de 14 nA y una corriente oscilatoria (OSC) de 485 nA aproximadamente, mientras que la misma fracción en una dilución mucho menor (1/1000) produjo

una OSC= 20 nA. A esta dilución la R.L. no es perceptible. Los resultados anteriores muestran que la concentración de proteína perfundida en el ovocito influye en la intensidad de las corrientes producidas.

Se ha demostrado que las corrientes tipo OSC son debidas a un aumento de Ca^{2+} intracelular (Kusano et al., 1982). Para poder observar la corriente entrante lisa por separado, algunos ovocitos fueron incubados con BAPTA-AM (ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético), un quelante de Ca^{2+} intracelular, para inhibir la corriente OSC. De esta forma se pudo observar que la respuesta R.L. se asocia a una disminución de conductancia (Fig. 22).



Figura 22. Registro en ovocito con BAPTA-AM

Registro electrofisiológico de la fracción HPLCf1.

Debido a que la fracción F1 mostró la actividad más consistente y reproducible en varios ovocitos de diferentes donadores, a continuación, se probaron las fracciones obtenidas de fraccionar F1 en HPLC, con el fin de saber cual de ellas tiene actividad electrofisiológica. Las fracciones llamadas HPLCf1 y HPLCf7 tuvieron actividad en ovocitos (Fig. 23).

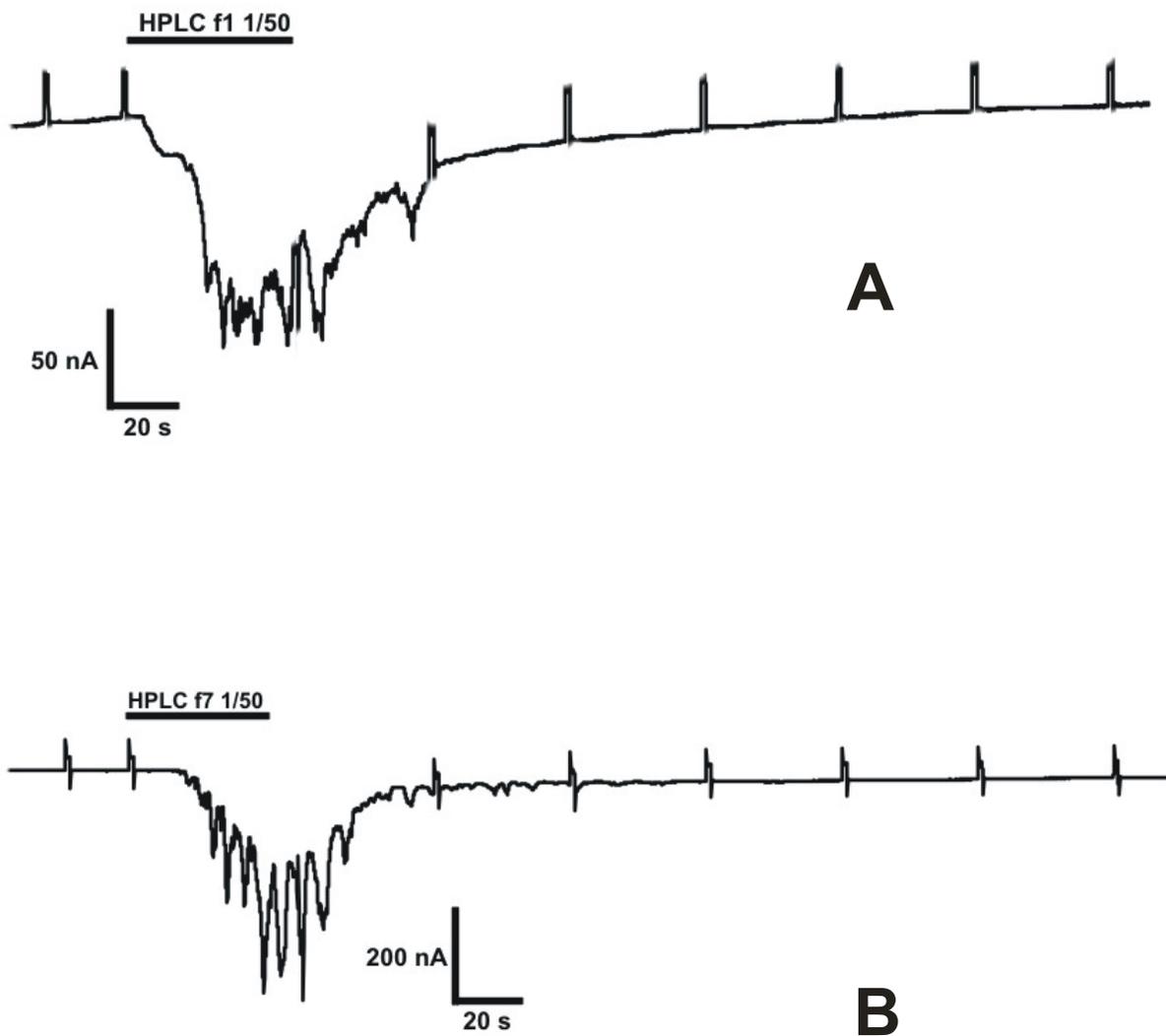


Figura 23 Efecto de las fracciones 1 y 7 obtenidas al pasar F1 por HPLC. A: R.L.=21 nA; OSC= 115 nA. B: OSC=480 nA.

Las demás fracciones, HPLCf2-f6, HPLCf8 y HPLCf9, no mostraron actividad electrofisiológica en los ovocitos inyectados (ver Anexo II).

La fracción HPLCf1 tuvo una respuesta muy similar a la obtenida en registros por F1. Para confirmar que la corriente OSC se debía a una corriente de cloro e indagar sobre la posible naturaleza de la corriente R.L., fueron realizados registros en un potencial de mantenimiento de -20 mV y se aplicó la toxina por 20 s. Se observó entonces que la corriente lisa (R.L.) permaneció con su naturaleza entrante, sin embargo, de acuerdo a lo esperado la corriente oscilatoria (OSC) invirtió su dirección (Fig. 24).

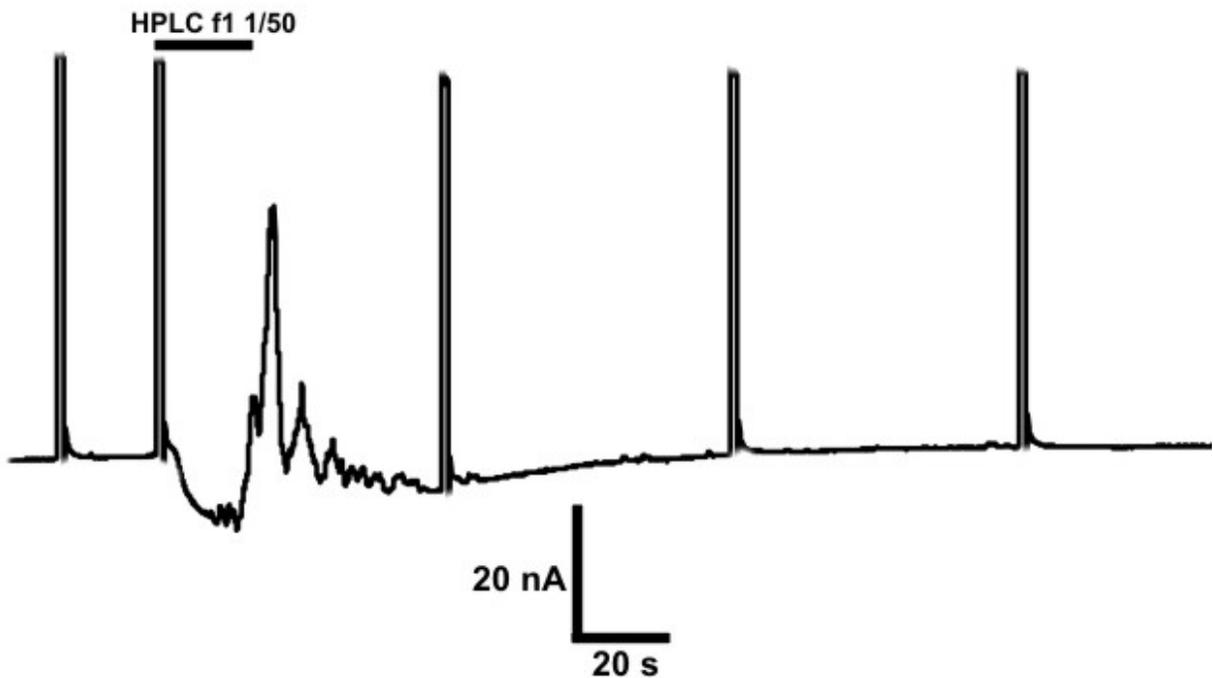


Figura 24 Efecto de HPLCf1 en ovocito. R.L.= -10 nA; OSC= 45 nA.Potencial a -20 mV.

Aún y cuando no es tan claro, un efecto similar se observó cuando se hizo el registro en un potencial de 0mV (Fig. 25).

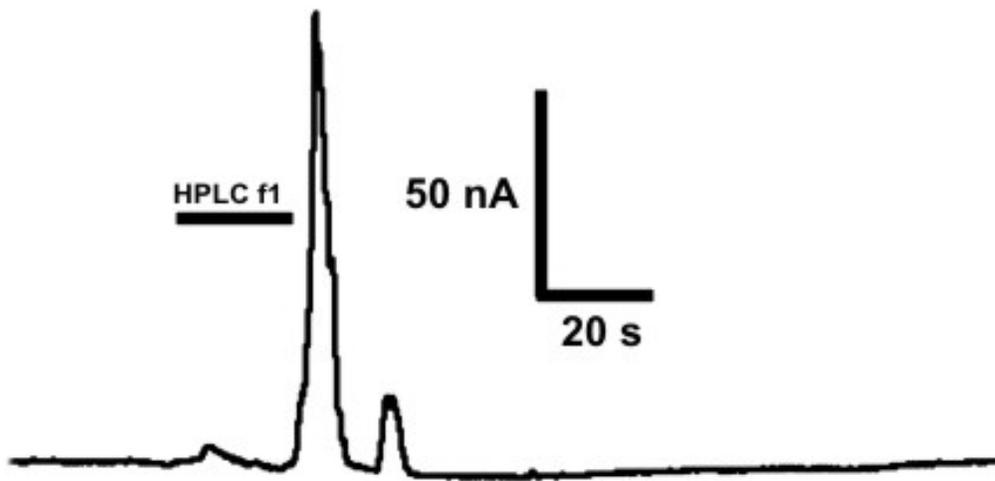
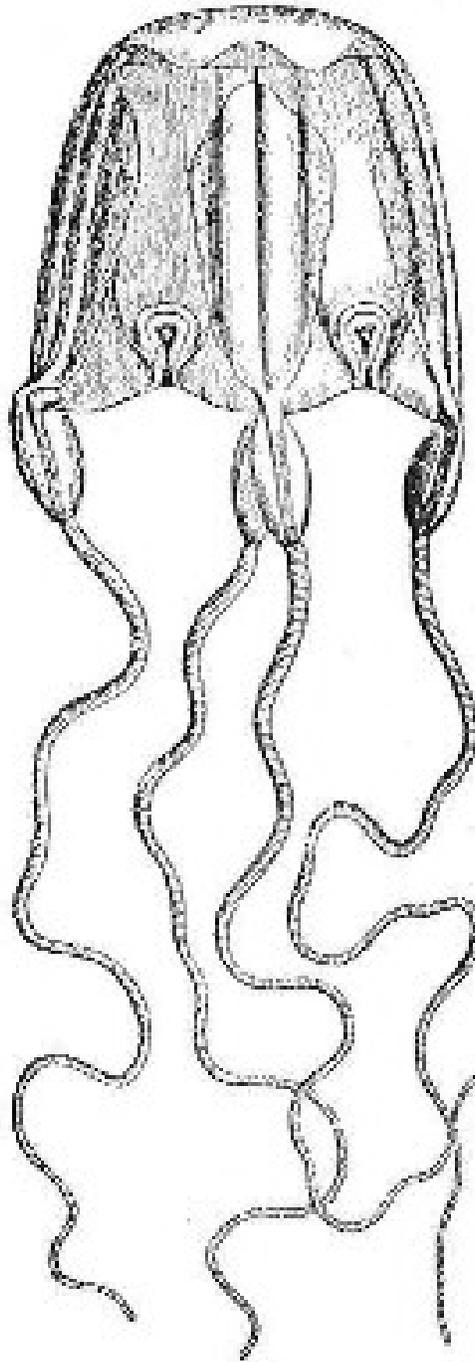


Figura 25 Efecto de HPLCf1 en ovocito. R.L.= -3.5 nA; OSC= 112 nA.Potencial a 0 mV.

DISCUSIÓN



VII. DISCUSIÓN

Ya que la caracterización de nuevas sustancias con actividad biológica se ha vuelto una actividad importante en las últimas décadas, este trabajo se enfoca a la identificación de compuestos con actividad neurotóxica de un organismo marino y la observación de su mecanismo de acción.

C. marsupialis es una cubomedusa abundante durante el periodo de mayo a agosto, lo que facilitó la recolecta de muchos ejemplares que fueron debidamente identificados en el laboratorio y, el método de recolecta, aunque lento, fue el óptimo para no dañar a los organismos y evitar la pérdida de tentáculos como sucede con otros métodos, como redes que se utilizan para la captura de otras especies de medusas.

Ya que el veneno que los cnidarios utilizan para la defensa y captura de presas se encuentra contenido en los nematocistos, es necesario tener un método efectivo de descarga. Varios métodos de descarga se han sugerido, entre ellos, la sonificación (Rottini *et al.*, 1995; Othman *et al.*, 1990), perlas de vidrio (Kem *et al.*, 1989) y mediante estímulos eléctricos (Endean *et al.*, 1993; Torres, 2001). Algunos autores sugieren que el empleo de estímulos eléctricos provoca la disminución de la toxicidad del extracto crudo y baja recuperación de material (Zugasti, 2001; Torres Ramos, 2001). Las perlas de vidrio, como se ha visto en este trabajo, no produjeron una alta descarga y menos aún cuando se trata de material con mucho tiempo de almacenaje. La liberación de la toxina depende principalmente de estímulos mecánicos y osmóticos (Rifkin *et al.*, 1996) por lo que el homogeneizado de los tentáculos en agua desionizada fue el método empleado y resultó en un alto porcentaje de descarga con alta recuperación de toxina. Se utilizó el método descrito por Torrens (2004) para descargar los nematocistos de los tentáculos de *C. marsupialis* y se logró una descarga de más del 90%. Este método se comparó con el de Morales-Landa *et al.* (2007), quien utilizó el método modificado de Kem *et al.* (1989), en donde agregaron perlas de vidrio y se obtuvo una descarga del 75% aproximadamente.

El método de descarga de nematocistos visto con muestras liofilizadas con tiempo de almacenaje (2004) mostró que conforme pasa el tiempo, la descarga se torna más difícil.

Ensayo de letalidad en cangrejos

En las investigaciones toxinológicas, se requiere de un método sencillo y rápido de identificación de mezclas con actividad biológica o de las fracciones obtenidas de estas mezclas en un proceso de purificación. Pequeñas cantidades de toxinas obtenidas de anémonas tienen potentes efectos paralizantes en

crustáceos como los cangrejos. El ensayo de detección de neurotoxinas en cangrejos es ampliamente utilizado, ya que no requiere de equipo costoso y reactivos, además de que los ensayos en animales vivos muestran respuestas diversas a una amplia gama de toxinas que actúan en diversos receptores (Kem, 2002).

El ensayo se llevó a cabo en cangrejos de la especie *O. quadrata*, los cuales son muy abundantes en la playa de la zona de estudio. Aunque existen muchos experimentos de toxinas con cangrejos, no existe mucha información sobre la determinación de la DL₅₀ con toxinas de medusas o cubomedusas, lo que dificulta la comparación de resultados de la potencia del veneno de esta medusa con otras. Experimentos con anémonas nos dan una idea de la potencia de toxinas de cnidarios: Bruhn y colaboradores (2001), encontraron que las DL₅₀ para las toxinas APE1, APE2 y APE5 de la anémona *Anthopleura elegantissima* en cangrejos de la especie *Carcinus maenas* fueron de 1.1 µg/kg, 1.1µg/kg y 3.5µg/kg respectivamente. Torrens (2004), encontró que la DL₅₀ de extracto crudo de *C. marsupialis* en *O. quadrata* fue de 1.05µg/g.

Es importante tener en cuenta que los valores de DL₅₀ pueden variar por las técnicas utilizadas, la inestabilidad de las toxinas, las condiciones en las que se realizan, etcétera, como ha sido señalado por diversos autores (Long y Burnett, 1989; Rottini, *et. al.*, 1995). Mientras que Torrens reporta una DL₅₀ de 10.5 mg/kg, este estudio reporta una de 14 mg/kg para el extracto crudo. La diferencia podría deberse a varios factores como la cantidad de toxina extraída durante el proceso o el tamaño de los cangrejos utilizados. Es importante señalar que las pruebas de letalidad con extracto crudo, debido a condiciones como las anteriores, tal vez no son lo más conveniente a diferencia de utilizar toxinas puras. Experimentos de este tipo con fracciones más avanzadas en la purificación no fueron posibles ya que llegó la época de invierno donde los cangrejos son muy poco abundantes y posteriormente las fracciones perdieron su actividad por el tiempo de almacenaje o los ciclos de congelado-descongelado al que fueron sometidas durante pruebas posteriores.

Las pruebas de toxicidad en cangrejos con el extracto de nematocistos del año 2004 mostraron muerte a los 20, mientras que con el extracto nuevo, la muerte sucede a los 7 minutos. Esto puede significar la pérdida de la actividad del veneno conforme aumenta el tiempo de almacenaje.

Purificación de las neurotoxinas.

Ya que la naturaleza química de los compuestos con actividad biológica en una mezcla compleja es desconocida, no siempre es posible seguir una técnica específica para la separación de sus constituyentes.

El método más usual en la purificación de proteínas es la cromatografía líquida. El diseño de una metodología de purificación para una mezcla compleja de sustancias es un proceso complicado y generalmente seleccionado por ensayo y error (Guerrier, *et.al.*, 2007). Además varios factores deben tomarse en cuenta como el origen de la muestra, su contenido de sales, pH, labilidad, termoestabilidad. En varios estudios se han encontrado ciertas características que dificultan el aislamiento de las toxinas puras de medusas (Torres Ramos, 2001), como son:

- a) Algunas toxinas se adhieren (adsorción inespecífica) durante el proceso de purificación a la matriz.
- b) Se agregan a componentes no tóxicos del veneno
- c) Pierden actividad durante el proceso de purificación, concentración y almacenaje en congelamiento.
- d) Se requiere de una gran cantidad de individuos ya que el rendimiento de la obtención de la toxina es muy bajo.
- e) Muchas especies tienen dinoflagelados simbiotes que son los responsables de la producción de las toxinas activas.

En nuestro caso, la adsorción inespecífica de algunas toxinas a los geles utilizados no se sabe con certeza, sin embargo, las fracciones finales en todos los pasos, no mostraron actividad neurotóxica, ya sea debido a la adsorción a la matriz, porque la cantidad no adherida de toxina es muy poca o que como se ha mencionado antes, las toxinas de medusas son muy inestables. La agregación a componentes no tóxicos y sin carga neta o muy hidrofílicos podría ser la responsable de que las toxinas de *C. marsupialis* no pudieran ser separadas en ninguna de las columnas disponibles. Se requirieron 1340 cubomedusas, lo que representa una cantidad apreciable de organismos.

La mayoría de las toxinas de anémonas estudiadas a la fecha, han sido purificadas mediante técnicas cromatográficas de filtración en gel, intercambio iónico y HPLC en fase reversa.

La electroforesis del extracto crudo mostró una banda cercana a los 100 kDa que coincide con el peso molecular aproximado reportado por Torrens (2004) y que corresponde con la neurotoxina caracterizada en su trabajo. Sin embargo, a pesar de haberse utilizado el mismo método de purificación, no fue posible obtener la toxina o toxinas de forma pura por lo que es necesario cambiar el método en futuros trabajos con el mismo organismo. Las fracciones

que mostraron la actividad neurotóxica fueron fracciones que no se retenían en las columnas de intercambio iónico ni en la columna de fase reversa por lo que es posible que estas toxinas o no tuvieran una carga neta o fueran demasiado hidrofílicas lo que explica que no se retuvieran en el HPLC en fase reversa.

Una proteína puede perder su conformación nativa cuando es expuesta a agentes como el calor, detergentes, disolventes, pH extremo y enzimas. El calentamiento de una proteína en solución puede destruir interacciones de Van der Waals. Los experimentos realizados al calentar el extracto y las fracciones activas a diferentes temperaturas mostraron la pérdida de actividad lo que puede al menos descartar la posibilidad de que sean sales las que provoquen los efectos tanto en organismos vivos como en las pruebas electrofisiológicas. Además, como se observó tras las pruebas electrofisiológicas, luego de dos ciclos de congelado-descongelado, las toxinas perdieron sus efectos, lo que indica que igualmente cambios muy grandes de temperatura (-20°C a 20°C) afectan la actividad de las toxinas.

Efecto de las fracciones sobre proteínas de membrana.

Como se ha visto, la aplicación de las fracciones en ovocitos de *Xenopus laevis* produjo una serie de respuestas distintas. Al menos dos respuestas, generadas por las fracciones F1 y HPLCf1, fueron visibles aunque no en todos los ovocitos:

- a) Una respuesta entrante lisa (R.L.)
- b) Una respuesta oscilatoria (OSC)

F1

La primera fracción utilizada para el análisis electrofisiológico fue F1, es decir la fracción activa en cangrejos obtenida al pasar la fracción QAE1 por la columna de intercambio catiónico. La fracción probada en un mismo ovocito a diferentes concentraciones (0.14, 1.4 y 7 µg/ml), muestra un aumento en las amplitudes obtenidas en la corriente oscilatoria, lo que nos puede indicar que las respuestas son directamente proporcionales a la concentración de la toxina aplicada. Cuando se agregó una concentración de 2.8 µg/ml a otro ovocito inyectado con el mismo mensajero se observaron valores menores que los vistos a concentración menor. Esto podría deberse a variaciones en la expresión de proteínas de membrana en el segundo ovocito.

Como era de esperarse, los ovocitos tratados con BAPTA-AM no mostraron la corriente oscilatoria sino solamente la corriente entrante lisa asociada a una disminución de conductancia. Esta característica hace suponer que el canal responsable de la corriente RL es uno que es bloqueado por la toxina, y por lo tanto podría tratarse de un canal que se encuentra abierto de forma basal y que acarrea corriente de salida, una posibilidad es que se trate de canales de K⁺ del sistema nervioso central.

HPLCf1

Dos de las fracciones obtenidas de la cromatografía de alta presión tuvieron actividad evidente en ovocitos: HPLCf1 y HPLCf7. Durante el duplicado de las pruebas, se observó actividad de la fracción HPLCf6, lo que podría explicarse por la mayor expresión del ovocito del duplicado (Glu-Gly: 260 nA, GABA: 283 nA) comparada con el primer ovocito (Glu-Gly: 77 nA, GABA: 280 nA). El ovocito duplicado expresó algún canal que se vio afectado por la toxina y que no fue bien expresado en el primero.

La fracción 1 de HPLC se escogió para continuar con las pruebas ya que es la que mantiene el comportamiento muy similar al de F1. Al igual que F1, la corriente entrante lenta se genera y posteriormente la OSC, aunque en algunos casos la corriente R.L. parece estar “enmascarada” por la OSC. Cuando se cambió el potencial de -60 mV a -20 mV, la existencia de la corriente RL se hace mas visible por que en este potencial la corriente OSC invierte su sentido, tal y como se espera para una corriente acarreada por Cl⁻, lo mismo ocurre en un potencial de 0 mV. Estos resultados refuerzan la idea de que la corriente RL es debida al bloqueo de una corriente de salida en potenciales de -60 a 0 mV, que podría ser debida al flujo de K⁺.

La corriente OSC producida por la salida de iones Cl⁻ dependiente del aumento de Ca²⁺ intracelular fue generada en la mayoría de los ovocitos estudiados. Esta respuesta está dada por una cascada de procesos que implica la estimulación del receptor, la activación de una fosfolipasa C por una proteína G, la producción de IP3-diacilglicerol y finalmente la liberación de Ca²⁺ intracelular el cual provoca la apertura de canales permeables a Cl⁻ (Arellano *et al.*, 1996). Cuando se cambió el potencial a -20 mV, la corriente oscilatoria se invirtió. Esto refuerza la idea de que la corriente es debida a Cl⁻ dependiente de la concentración de Ca²⁺ intracelular, ya que -20 mV es un potencial mayor al potencial de inversión del Cl⁻ y fue abolida por la incubación en BAPTA-AM.

La apertura de canales de Cl⁻ por este mecanismo ha sido observado en diversas toxinas de cnidarios como *Cassiopea xamachana* (Torres *et al.*, 2001).

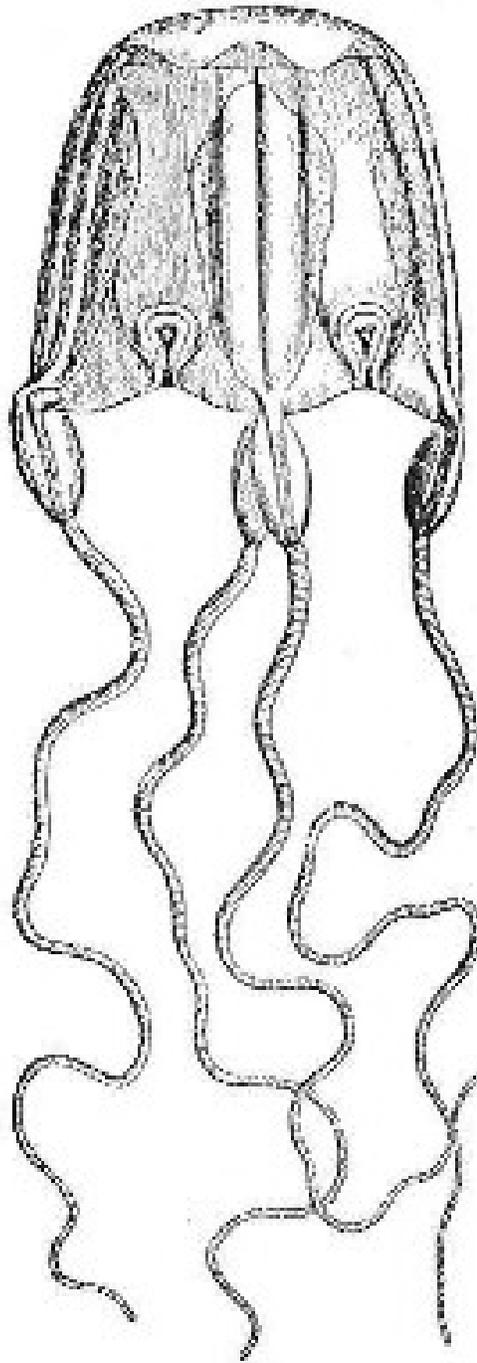
Se requiere de más estudios para poder identificar el tipo de canal iónico al que estas toxinas afectan, sin embargo, durante el tiempo de realización de los mismos no fue posible, ya que las toxinas no resistieron el tiempo de almacenaje ni los ciclos de congelado-descongelado a los que fueron sometidas durante la realización de las pruebas.

Se espera que en los próximos años los péptidos y proteínas sea utilizados como agentes anticancerígenos, hormonas, factores de crecimiento, analgésicos, antihipertensivos, trombolíticos, etc. (Banga, 2006). Algunos de los compuestos activos más importantes de muchos venenos son péptidos y estos compuestos tienen como blanco receptores importantes en el sistema nervioso y el cardiovascular. Los péptidos, además, poseen ciertas características importantes que los convierten en constituyentes ideales del veneno, como ser moléculas relativamente compactas y conformacionalmente estables, que una vez inyectados se difunden en el cuerpo del organismo hasta su sitio de unión con una alta especificidad. Pueden actuar rápidamente y con potencia dependiendo de su tamaño y estabilidad lo que los hace interesantes desde el punto de vista terapéutico. Los péptidos en general, administrados de forma oral son degradados por enzimas digestivas y aplicados por otras vías producen reacciones inmunológicas. Es necesario formularlos en condiciones estables y de absorción y distribución adecuadas (Banga, 2006).

El phylum Cnidaria, ha sido fuente de compuestos con acciones fisiológicas específicas sobre canales iónicos y han sido instrumentos valiosos para la caracterización de sus mecanismos. Se han encontrado nuevos tipos de toxinas bloqueadoras de canales de potasio a partir de diferentes especies de anémonas como *Bunodosoma granulifera* (Garateix, A., et. al. 2000), *Stichodactyla helianthus* (Castañeda, O., et. al., 1995), *Anemonia sulcata* (Schweitz, et. al., 1995) y *Heteractis magnifica* (Gendeh, et. al., 1997) que no guardan homología con otras toxinas de canales de potasio.

Existen decenas de ejemplos que constituyen una muestra de la contribución de los compuestos de origen marino en el estudio de muchos procesos biológicos. Los avances de la química y la biología molecular ayudarán a diseñar nuevos compuestos que abran perspectivas de estudio y aplicación en la terapéutica.

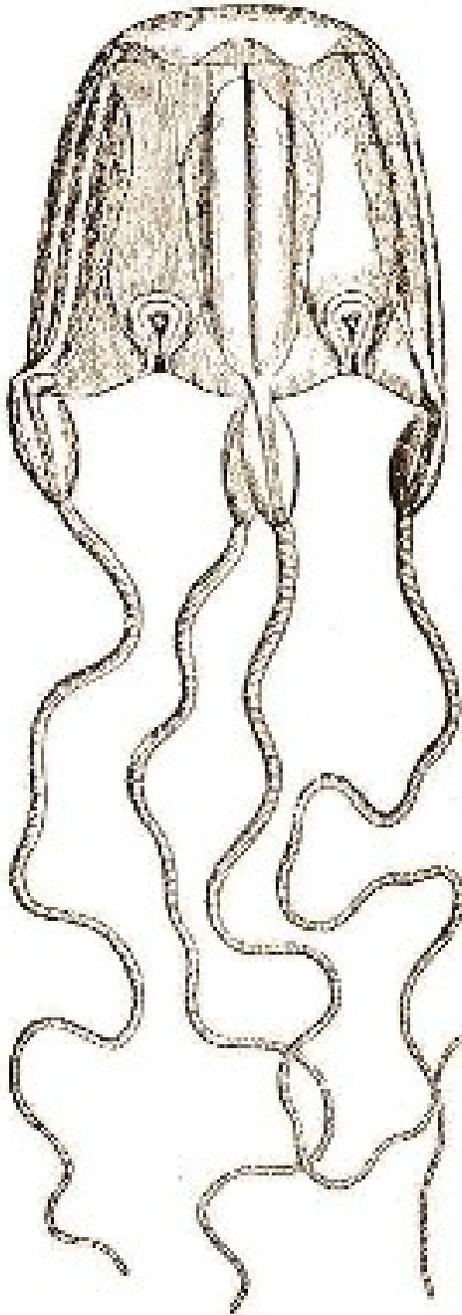
CONCLUSIONES



VIII. CONCLUSIONES

- Las toxinas en el veneno de *Carybdea marsupialis* son de naturaleza peptídica y se degradan fácilmente.
- El veneno de *C. marsupialis* contiene neurotoxinas que afectan canales iónicos en crustáceos.
- El estudio electrofisiológico del veneno extraído de *C. marsupialis* mostró que tiene efecto sobre diversas proteínas de membrana del sistema nervioso de mamíferos.
- La respuesta más consistente es una corriente oscilatoria probablemente producida por la activación de un receptor, que actúa vía la producción de IP_3 , y estimula el aumento de la concentración de calcio intracelular.
- La corriente entrante lenta, al estar asociada a una disminución de conductancia, probablemente se deba al bloqueo de un canal iónico por la toxina.

REFERENCIAS



IX. REFERENCIAS

1. Al-Sabi, A., McArthur, J., Ostroumov, V., French, R.J. 2006. Marine toxins that target voltage-gated sodium channels. *Marine Drugs* 4: 157-192.
2. Amersham Biosciences 18-1022-18. 2002. *Gel Filtration Principles and Methods*. Edition A1.
3. Aneiros, A.; García, I.; Martínez, J.R.; Harvey, A.L.; Anderson, A.J.; Marshall, D.L., et.al. 1993. A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. *Biochim. Biophys. Acta* 1157: 86-92.
4. Arellano, R.O., Woodward, R.M., Miledi, R. 1996. Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes en *Ion Channels*. Vol. 4, editado por Toshio Narahashi, Plenum Press, New York. p. 203-259.
5. Arias, H.R. 2006. Marine Toxins Targeting Ion Channels. *Marine Drugs* 4:37-69.
6. Avian, M., Budri, N., Rottini, L. 1997. The nematocysts of *Carybdea marsupialis* Linnaeus, 1758 (Cubozoa). *Proc. 6th Int. Conf. Coel. Biol.* 1995: 26-29.
7. Azila, N., Othman, I. 1991. Pharmacological effects of various jellyfishes found in Malaysian waters. *Toxicon* 30:489.
8. Banga, A.K. 2006. Therapeutic peptides and proteins. Formulation, processing and delivery systems. 2nd ed. Ed. CRC Press. New York. 354 pp.
9. Barnes, J.H. 1966. Studies on tree venomous cubomedusae. En *The Cnidaria and their Evolution*. Ed. W.J. Rees, Academic Press. Symp. Zool. Soc. Lond. 16:307-332.
10. Bergman, C., Dubois, J.M., Rojas, E., Rathmayer, W., 1976. Decreased rate of sodium conductance inactivation in the node of Ranvier induced by a polypeptide toxin from sea anemone. *Biochem. Biophys. Acta* 455:173-184.
11. Bernheimer, A.W., Rudy, B. 1986. Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochem. Biophys. Acta* 864: 123-141.
12. Bouchet, C. 1961. Le controle de la decharge nematocystique chez l'Hydre. *C.R. Acad. Sci.* 252 : 327-328.

13. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem* 72:248-254.
14. Brinkman, D., Burnell, J. 2007. Identification, cloning and sequencing of two major venom proteins from the box jellyfish *Chironex fleckeri*. *Toxicon* 50:850-860.
15. Bruhn, T., Schaller, C., Schulze, C., Sánchez-Rodríguez, J., Dannmeier, C., Ravens, U., Heubach, J.F., Eckhardt, K., Schimdtmayer, J., Schimdt, H., Aneiros, A., Wachter, E., Beress, L., 2001. Isolation and Characterization of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Toxicon* 39:693-702.
16. Burnett, A.L., Lentz, T., Warren, M. 1960. The nematocyst of Hydra (Part I). The question of control of the nematocyst discharge reaction by fully fed hydra. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.* 90: 247-267.
17. Burnett, J.W., Goldner, R. 1970. Effect of *Chrysaora quinquecirrha* (sea nettle) toxin on rat nerve and muscle. *Toxicon* 8:179–181.
18. Burnett, J.W., Weinrich, D., Williamson, J.A., Fenner, P.J., Lutz, L.L., Bloom, D.A. 1998. Autonomic neurotoxicity of jellyfish and marine animal venoms. *Clinical Autonomic Research* 8:125-130.
19. Castañeda, O., Sotolongo, V., Amor, A.M., Stocklin, R., Anderson, A.J., Harvey, A.L., et al. 1995. Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean sea anemone *Styrodactyla helianthus*. *Toxicon* 33: 603-613.
20. Chiapinnelli, V.A. 1993. Neurotoxins acting on acetylcholine receptors in Natural and Synthetic Neurotoxins, ed. Alan Harvey, Academic Press, London, pp.65-128.
21. Cormier, S.M., Hessinger, D.A. 1980. Cellular basis for tentacle adherence in the Portuguese Man-of-War (*Physalis physalis*). *Tissue Cell* 12:713-721.
22. Craig, A.G. 2000. The Characterization of Conotoxins. *J. Toxicol.-Toxin Rev.* 19:53-93.
23. Chung, J.J., Ratnapala, L.A., Cooke, I.A., Yanagihara, A.A. 2000. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. *Toxicon* 39:981-990.

24. Daly, M., Brugler, M., Cartwright, P., Collins, A., Dawson, M., Fautin, D., France, S., McFadden, C., Opresko, D., Rodríguez, E., Ronamos, S., Stake, J. 2007. The Phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* 1668:127-182.
25. Darnell, J., Baltimore, D., Berk, A., Ziporsky, S.L., Matsudaira, P. 1998. *Molecular Cell Biology*. 3rd ed. Scientific American Books, USA. p. 925-990.
26. Davenport, D., Ross, D.M., Sutton, L. 1961. The remote control of nematocyst-discharge in the attachment of *Calliactis parasitica* to shells of hermit crabs. *Vie Milieu* 12:197-209.
27. 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. *Mol. Pharmacol.* 64:59-69.
28. Dixit, A., Dhaked, R.K., Alam, S.I., Singh, L. 2005. Military potential of biological neurotoxins. *Toxin Rev.* 24:175-207.
29. Ellis, V.L., Ross, D.M., Sutton, L. 1969. The pedal disc of the swimming sea anemone *Stomphia coccinea* during detachment, swimming and resettlement. *Can. J. Zool.* 47:333-342.
30. Endean, R., Sizemore, D.J. 1987. The use of verapamil to counter the effects of myotoxins from nematocysts of the box jellyfish *Chironex fleckeri*. In: *Progress in venom and toxin research*. Pergamon Press, Oxford, p. 499-507.
31. Endean, R., Monks, S.A., Cameron, A.M. 1993. Toxins from the box jellyfish *Chironex fleckeri*. *Toxicon* 31:397-410.
32. Freedman, J.E., Zinder, S.H. 1981. Vipotoxin, a protein from Russell's viper venom with high affinity for biogenic amine receptors. *Journal of Biological Chemistry* 256: 172-179.
33. Garateix, A. 2005. El Mar: Fuente de nuevos fármacos. *Ciencia y Cultura* 58:39-47.
34. Garateix, A., Flores, A., García-Andrade, J.M., Palmero, A., Aneiros, A., Vega, R., Soto, E. 1996. Antagonism of glutamate receptors by a chromatographic fraction from the exudate of the sea anemone *Phyllactis flosculifera*. *Toxicon* 34: 443-450.

35. Garateix, A., Vega, R., Salceda, E., Cebada, J., Aneiros, A., Soto, E. 2000. BgK anemone toxin inhibits outward potassium currents in snail neurons. *Brain Res.* 864: 312-314.
36. 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.
37. Goad, L.J. 1978. The sterols of marine invertebrates: Composition, biosynthesis and metabolites. En *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives*. Vol. II, P.JP Scheuer (Ed.) Academic Press, New York, p. 75-172.
38. Gómez López, P., Green, G. 1983. Sistemática de las esponjas marinas de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología en biblioweb.dgsca.unam.mx/.../1984-1/img/ag066.gif* (05/12/08).
39. Gondran, M., Eckeli, A.L., Miguez, P.V., Gabilan, N.H., Rodrigues, A.L. 2002. The crude extract from the sea anemone, *Bunodosoma caissarum* elicits convulsions in mice: possible involvement of the glutamatergic system. *Toxicon* 40:1667-1674.
40. Guerrier, L., Lomas, L., Boschetti, E. 2007. A new general approach to purify proteins from complex mixtures. *J. Chromatogr. A* 1156: 188-195.
41. Hessinger, D.A. 1988. Nematocyst Venoms and Toxins en *The Biology of Nematocysts*. Academic Press, San Diego. p. 333-367.
42. Hille, Bertil. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Ma. U.S.A. 814 pp.
43. Kawai, N.; Nakijama, T. 1993. Neurotoxins from spider venoms en *Natural and Synthetic Neurotoxins*, Harvey, A. Ed. Academic Press, London, p.65-128.
44. Kem, W.R. 1989. Anthozoan neurotoxins. En *Handbook of Neurotoxicology*. Vol. 1. Edited by E.J.Massaró, Humana Press Inc. p. 529-572.
45. Kem, W.R., Parten, B., Pennington, M.W., Price, D.A., Dunn, B.M. 1989. Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 28 (8): 3483-3489.

46. Kijjoa, A., Sawangwong, P. 2004. Drugs and Cosmetics from the Sea. *Marine Drugs* 2:73-82.
47. Kramp, P.L. 1961. Synopsis of the Medusae of the World. *J. Mar. Biolog. Assoc U.K.* p. 254-258.
48. Kusano, K; Miledi, R.; Stinnakre, J. 1982. Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *The Journal of Physiology*, 328, 143-170.
49. Layer, R.T.; McIntosh, J.M. 2006. Conotoxins: Therapeutic Potential and Application. *Marine Drugs* 4:119-142.
50. Lin, W.W.; Lee, C.Y.; Burnett, J.W. 1988. Effect of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) venom on isolated rat aorta. *Toxicon* 26:1209–1212.
51. Livingstone, I. 1994. (06 de noviembre de 2008) www.biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails/catquery.htm?Kingdom=Animalia&phylum=Cnidaria.
52. Long, K.O.; Burnett, J.W. 1989. Isolation, characterization and comparison of hemolytic peptides in nematocyst venom of two species of jellyfish: *Chrysaora quinquecirrha* and *Cyanea capillata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B: 641-646.
53. Mariscal, R.N. 1974. *Coelenterate Biology*. Academic Press, New York. p. 129-178.
54. Mas, R.; Menéndez, R.; Garateix, A.; García, M.; Chávez, M. 1989. Effects of a high molecular weight toxin from *Physalis physalis* on glutamate responses. *Neuroscience* 33:269-273.
55. Mathias, A.P., Ross, D.M., Schachter, M. 1960. The distribution of 5-hydroxytryptamine, tetramethylammonium, homarine and other substances in sea anemone. *J. Physiol.* 151: 296-311.
56. McCormick, D.A. 2004. Membrane Potential and Action Potential en From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular an Molecular Neuroscience. Elsevier Academic Press. USA. p. 115-140.
57. Mebs, D. 2002. *Venomous and Poisonous Animals, A Handbook for biologists, toxicologists and toxinologists, physicians and pharmacists.* Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart. 339 pp.

58. Merino I.M.; Otero, D.L. 1991. Atlas Ambiental Costero: Puerto Morelos - Quintana Roo. Editado por el Centro de Investigaciones de Quintana Roo, México, 89 pp.
59. Messerli, S.M., Greenberg, R.M. 2006. Cnidarian Toxins acting on voltage-gated ion channels. *Marine Drugs* 4:70-81.
60. Miller, C.; Moczydlowski, E.; Latorre, R.; Philips, M. 1985. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Calcium-activated potassium channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313:316-318.
61. Miyazawa, K. and Noguchi, T. 2001. Distribution and Origin of Tetrodotoxin. *Toxin Rev.* 20(1):11-33.
62. Morales-Landa, J.L.; Zapata-Pérez, O., Cedillo-Rivera, R., Segura-Puertas, L., Simá-Álvarez, R., Sánchez-Rodríguez, J. 2007. Antimicrobial, antiprotozoal and toxic activities of cnidarian extracts from the Mexican Caribbean Sea. *Pharmaceutical Biology* 45:37-43.
63. Nagai, H. 2003 Recent Progress in jellyfish toxin study. *J. Health Sci.* 49:337-340.
64. Nagai, H.; Takuwa, K.; Nakao, M.; Ito, E.; Miyake, M.; Noda, M.; Nakajima, T. 2000a. Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish *Carybdea rastoni*. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 275:582-588.
65. Nagai, H.; Takuwa, K.; Nakao, M.; Sakamoto, B.; Crow, G.; Nakajima, T. 2000b. Isolation and Characterization of a Novel Protein Toxin from the Hawaiian box jellyfish *Carybdea alata*. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 275:589-594.
66. Nagai, H., Takuwa-Kuroda, K., Nakao, M., Oshiro, N., Iwanaga, S., Nakajima, T. 2002. A novel protein toxin from the deadly box jellyfish (sea wasp, Habu-kurage) *Chiropsalmus quadrigatus*. *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 66:97-102.
67. Neeman, I., Fishelson, L., Kashman, Y. 1974. Sarcophine: A new toxin from the soft coral *Sarcophyton glaucum* (Alcyonaria). *Toxicon* 12: 593-598.
68. Norton, R.S., Pennington, M.W., Wulff, H. 2004. Potassium channel blockade by the sea anemone toxin ShK for the treatment of multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *Curr. Med. Chem.* 11:3041-3052.
69. Othman.Y., Burnett, J.W. 1990. Techniques applicable for purifying *Chironex fleckeri* (box-jellyfish venom). *Toxicon* 28:821-835.

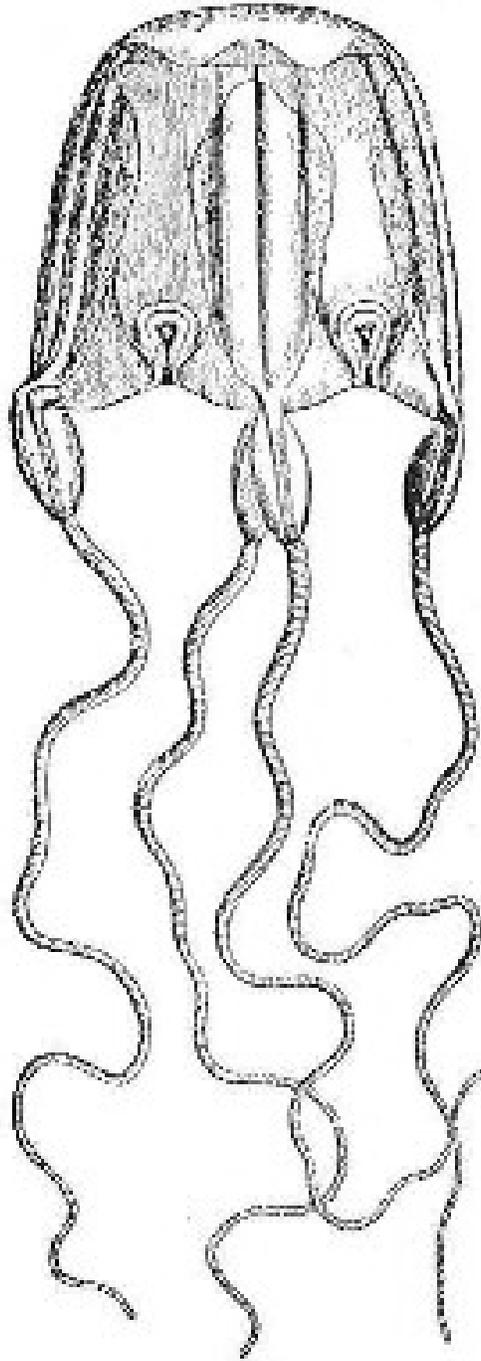
70. Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, I.B. 1982. The primary structure of noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Carlsberg Res. Commun.* 47:285-289.
71. Proksch, P., Edrada-Ebel, R.A., Ebel, Rainer. 2003. Drugs from the Sea- Opportunities and Obstacles. *Marine Drugs* 1:5-17.
72. Purcell, J.E.; Mills, C. 1988. The Correlation between nematocyst types and diets in pelagic hydrozoa. En *The biology of nematocysts*. Academic press, San Diego, pp. 463-485
73. Purves, D., Augustine, G. Fitzpatrick, D., Hall, W.C., Lamantia, A-S., McNamara, J.O., Williams, S.M. 2007. *Neurociencia*. 3a. ed. Ed. Panamericana. 856 pp.
74. Rifkin, J.; Williamson, J.; Fenner, P.; 1996. Anthozoans, hydrozoans and scyphozoans. En: Williamson, J.; Fenner, P.; Burnett, J.; Rifkin, J. *Venomous and Poisonous Marine Animals: a Medical and Biological Handbook*. University of South Wales Press, Sydney, p. 180-235.
75. Rojas, A.; Torres, M.; Rojas, J.I.; Feregrino, A.; Heimer de la Cotera, E.P. 2001. Calcium-dependant smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon* 40: 777-785.
76. Rottini, G., Gusmani, L., Parovel, E., Avian, M., Patriarca, P. 1995. Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Toxicon* 33:315-326.
77. Ruiz-Rentería, F., Van Tussenbroek, B, & E. Jordán-Dahlgren.1998. Characterization of the Puerto Morelos (Mexico) CARICOMP site. p. 57-66. In: *Caribbean Coastal Marine Productivity (CARICOMP)*. UNESCO, Paris.
78. Salinas, E.M., Cebada, J.; Valdés, A., Garateix, A., Aneiros, A., Alvarez, J.L. 1997. Effects of a toxin from the mucus of the Caribbean sea anemone (*Bunodosoma granulifera*) on the ionic currents of singular ventricular mammalian cardiocytes. *Toxicon*, 35:1699-1709.
79. Sánchez-Rodríguez, J., Torrens, E., Segura-Puertas, L. 2006. Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolytins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom. *Arch. Toxicol.* 80:163-168.

80. Schweitz, H.; Bruhn, T.; Guillemare, E.; Moinier, D.; Lancelin, J.M.; Beress, L.; Lazdunski, M. 1995. Kaliclutidines and kalispetine. *J. Biol. Chem.* 270: 25121-25126.
81. Schweitz, H., Vincent, J.P., Barhanin, J. Frelin, C., Linden, G., Hugues, M., Lazdunski, M. 1981. Purification and pharmacological properties of eight sea anemone toxins from *Anemonia sulcata*, *Anthopleura xanthogrammica*, *Stoichactis giganteus* and *Actinodendrum plumosum*. *Biochemistry*, 20: 5245-5252.
82. Sobrino, A. S. 1996. Detección de substancias bioactivas en organismos bentónicos del Golfo de Tehuantepec. Tesis. UNAM.
83. Takeuchi, A and Takeuchi, N. 1964. The effect on crayfish muscle of iontophoretically applied glutamate. *J. of Physiol.* 170: 296-317.
84. Tamkun, M.M., Hessinger, D.A. 1981. Isolation and partial characterization of a haemolytic and toxic protein from the nematocyst venom of the Portuguese Man-of-War, *Physalia physalis*. *Biochem. Biophys. Acta* 667:87-98.
85. Tardent, P. 1988. History and current state of knowledge concerning discharge of cnidae en *The Biology of Nematocysts*. Academic Press, San Diego. p. 333-367.
86. Tibballs, J. 2006. Australian venomous jellyfish, envenomation síndromes, toxins and therapy. *Toxicon* 48:830-859.
87. Torrens, E. 2004. Aislamiento y purificación de proteínas con actividad hemolítica y neurotóxica de la cubomedusa *Carybdea marsupialis*, (Linné, 1758). Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM, 94 pp.
88. Torres Ramos, M. 2001. Actividad biológica del veneno de la medusa *Cassiopea xamachana*: estudios electrofisiológicos y bioquímicos. Tesis de Doctorado. Centro de Neurobiología. UNAM, 116 pp.
89. Torres, M., Aguilar, M.B., Falcón, A., Sánchez, L., Radwan, Y., Burnett, J.W., Heimer de la Cotera, E.P., Arellano, R.O. 2001. Elctrophysiological and hemolytic activity elicited by the venos of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon* 39:1297-1307.
90. Vincent, J.P., Balerna, M., Barhanin, J. Fosste, M., Lazdunski, M. 1980. Binding of sea anemone toxin to receptor sites associated with gating system of sodium channel in synaptic nerve endings *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:1646-1650.

91. Walker, M.J.A. 1988. *Coelenterate and Echinoderm Toxins: Mechanisms and Actions* en *Handbook of Natural Toxins* Vol. 3, Ed. por Tu, A.marcel Dekker Inc. p. 279-324
92. Walter, M.J.A., Martinex, T.T., Godin, D.V. 1977. Investigations into the cardiotoxicity of a toxin from the nematocysts of the jellyfish, *Cyanea capillata*. *Toxicon* 15:339-346.
93. Warashina, A., Ogura, T., Fujita, S. 1988. Binding properties of sea anemone toxins to sodium channels in the crayfish giant axon. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 90: 351-359.
94. Williamson, J.A., Fenner, P.J., Burnett, J.W., Rifkin, J.F. 1996. *Venemous and Poisonous Marine Animals: a medical and biological handbook*. University of New South Wales Press. Australia, 504 pp.

95. Winkel, K.D., Tibballs, J., Molenaar, P., Lambert, G., Coles, P., Ross-Smith, M., Wiltshire, C., Fenner, P., Gershwin, L.A., Hawdon, G.M., Wright, C.E., Angus, J.A. 2005. The cardiovascular actions of the venom from the Irukandji (*Carukia barnesi*) jellyfish: effects on human, rat and guinea pig tissues in vitro, and in pigs in vivo. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32:777-788.
96. Wratten, S.J., Faulkner, D.J., Hirotsu, K., Clardy, J. 1977. Stylatulide, a sea pen toxin. *J. Am. Chem. Soc.* 99: 2824-2825.
97. Zugasti, A. 2001. Caracterización toxinológica de péptidos bioactivos en la anémona *Bartholomea annulata* (Le Sueur, 1817). Tesis. UNAM.

ANEXOS



X. ANEXOS

ANEXO 1

SOLUCIONES Y REACTIVOS

A. Acrilamida/Bis-acrilamida

8.76 g acrilamida (29.2g/100ml)

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

Aforar a 300ml com água desionizada. Guardar a 4°C em obscuridad (30 días máximo).

B. 1.5M Tris-HCl pH 8.8

27.23g Tris base (18.15/100ml)

80ml agua desionizada

Ajustar a pH 8.8 con HCl 6N. Aforar a 150ml con agua desionizada. Guardar a 4°C.

C. 0.5M Tris-HCl pH6.8

6g Tris base

60ml de agua desionizada

Ajustar a pH 6.8 con HCl 6N. Aforar a 100ml con agua desionizada. Guardar a 4°C.

D. SDS 10%

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

E. Buffer reductor de muestra

3.3ml	Agua desionizada
1.0ml	0.5M Tris-HCl ph 6.8
0.8ml	Glicerol
1.6ml	SDS 10%
0.4ml	2-mercaptoetanol
0.4ml	Azul de bromofenol 1%

Diluir la muestra 1:4 y calentar a 95°C por 4 min.

F. Buffer electrodo 5X (Running buffer)

9g (15g/l)	Tris base
43.2g (42g/l)	Glicina
3g (5g/l)	SDS

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

Gel separador

	12%	7.5%
Agua desionizada	3.35ml	4.85ml
Tris pH 8.8	2.5ml	2.5ml
SDS 10%	100µl	100µl
Acilamida	4.0ml	2.5ml

Persulfato de amonio 10%	50µl	50µl
TEMED	5µl	5µl
Cantidad total	10ml	10ml

Gel concentrador (superior)

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

Determinación de proteínas (Bradford, 1976)

Diluir el reactivo para la determinación de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Dye reagent concentrate) 1:4 con agua desionizada. Esta misma solución se mezcla 1:5 con cada estándar para la curva de calibración y cada muestra. Se leyó en celdas de vidrio con capacidad para 3ml en un espectrofotómetro Turner SP-830 a 595nm.

Solución Barth's Normal

Cloruro de sodio (NaCl)	5.14g
Cloruro de potasio (KCl)	0.075g
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	0.20g
Nitrato de calcio (CaNO ₃)	0.075g
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	0.06g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.202g
Hepes	1.19g

Agregar 7ml de gentamicina (70µg/ml). Ajustar pH a 7.4 con hidróxido de sodio NaOH 5N y aforar a 1l. Filtrar para esterilizar con membrana de 0.22 micras.

Solución Ringer Normal

Cloruro de sodio (NaCl)	67.20g
Cloruro de potasio (KCl)	1.49g
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	2.64g
Hepes	11.91g

Ajustar pH a 7.0 con NaOH 5N y aforar a 10l.

ANEXO II

Fracciones HPLC 2-6, 8 y 9 que no mostraron actividad electrofisiológica

HPLC f2 1/50



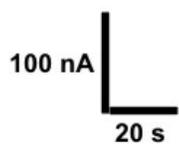
100 nA
20 s

HPLC f3 1/50

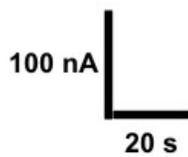


100 nA
20 s

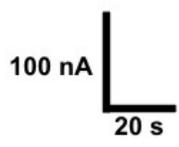
HPLC f4 1/50



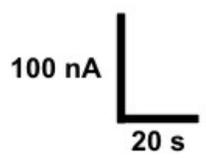
HPLC f5 1/50



HPLC f6 1/50



HPLC F8 1/50



HPLC f9 1/50

