



POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Purificación y caracterización electrofisiológica de algunas  
toxinas extraídas del veneno de la medusa *Aurelia aurita*

# T E S I S

Que para obtener el grado académico de  
Maestría en Ciencias del Mar y Limnología  
(Biología Marina)

P r e s e n t a

Biól. Dalia Patricia Ponce García

Directora de Tesis:

Dra. Judith Sánchez Rodríguez

Comité Tutorial:

Dr. Edgar Philip Heimer De la Cotera

Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez

Dr. José Estuardo López Vera

Dr. Sergio Rodríguez Morales

México D. F., Junio 2011



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.

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	2
ÍNDICE DE TABLAS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	16
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	67
ANEXOS	68
REFERENCIAS	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina	mL	Mililitros
ACN	Acetonitrilo	mM	Milimolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico	mV	Milivolt
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	µg	Microgramo
APS	Ammonium peroxodisulfate (persulfato de amonio)	µL	Microlitro
°C	Grados centígrados	µM	Micromolar
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio dihidratado	µm	Micrómetro
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución	nAChR	Receptores nicotínicos de acetilcolina
cm	Centímetro	NaCl	Cloruro de sodio
DEAE FF	DEAE Sepharose Fast Flow	NaOH	Hidróxido de sodio
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography	nL	Nanolitro
g	Gramos	NSTX	Neosurugatoxina
HEPES	Acido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-Pireracilil-Etanosulfónico	PB	Sodium phosphate buffer (solución amortiguadora de fosfato de sodio)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	pH	Potencial hidrógeno
IC <sub>50</sub>	Concentración media inhibitoria	Q FF	Q Sepharose Fast Flow
KCl	Cloruro de potasio	s	Segundo
kDa	Kilodaltons	SDS	Sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico)
M	Molar	SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Ionization - time of flight mass spectrometer	SP FF	SP Sepharose Fast Flow
MALDI-MS	Matrix-Assisted Laser Ionization - Mass Spectrometer	TEMED	Tetramethylethylenediamina
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	Cloruro de magnesio	TFA	Trifluoroacetic acid (ácido trifluoroacético)
mg	Miligramos	TTX	Tetrodotoxina
min	Minutos	UV	Ultravioleta
		V	Volt
		VC	Volumen de columna

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema de un nematocisto descargado y sin descargar.	8
Fig. 2. Esquema de la unión neuromuscular y un nAChR del subtipo muscular fetal.	10
Fig. 3. Micrografías de los nematocistos identificados en el margen tentacular de <i>Aurelia aurita</i> .	27
Fig. 4. Curva patrón de albúmina sérica bovina y valor de la regresión lineal.	28
Fig. 5. Análisis SDS-PAGE del extracto crudo.	29
Fig. 6. Fotografía de las reacciones del efecto neurotóxico en cangrejos.	30
Fig. 7. Cromatograma del extracto crudo eluido en columna Superdex G-200 con una solución amortiguadora de fosfatos 10mM, pH 7.0.	31
Fig. 8. Análisis SDS-PAGE de las fracciones separadas manualmente de la elución con la columna Superdex G-200.	32
Fig. 9. Cromatograma del extracto crudo utilizando la columna HiTrap Q FF eluida con gradiente escalonado de acetato de amonio 0.01 M, pH 8.5.	33
Fig. 10. Cromatograma del extracto crudo utilizando la columna HiTrap DEAE FF eluida con gradiente escalonado de acetato de amonio 0.01 M, pH 8.5.	33
Fig. 11. Cromatograma del extracto crudo utilizando la columna HiTrap DEAE FF eluida con gradiente lineal de acetato de amonio 10 mM, pH 7.1.	34
Fig. 12. Cromatograma del extracto crudo utilizando la columna HiTrap SP FF eluida con gradiente escalonado de acetato de amonio 0.01 M pH 5.4.	35
Fig. 13. Cromatograma del extracto crudo utilizando la columna HiTrap SP FF eluida con gradiente escalonado de fosfato de sodio 0.05 M, pH 7.1.	35
Fig. 14. Cromatograma del extracto crudo utilizando la columna HiTrap SP FF eluida con gradiente lineal de fosfato de sodio 0.05 M, pH 6.9.	36
Fig. 15. Cromatograma de la purificación del extracto crudo por HPLC utilizando una columna analítica Vydac C <sub>18</sub> de fase reversa con un gradiente lineal de 5% a 95% de la solución B a un flujo 1 mL/min por 90 min.	38
Fig. 16. Curva patrón de albúmina y valor de la regresión lineal	40
Fig. 17. Gráfica de rendimientos de cada fracción obtenida por HPLC de fase reversa.	42

Fig. 18. Análisis SDS-PAGE de las fracciones parcialmente purificadas por HPLC de fase reversa con geles al 10% y 15% de acrilamida.	44
Fig. 19. Cromatograma de la purificación del extracto crudo por HPLC utilizando una columna Vydac C <sub>18</sub> de fase reversa indicando las fracciones con que presentaron actividad en los nAChR del subtipo muscular fetal.	47
Fig. 20. Bloqueo provocado por la fracción 4 sobre los nAChRs.	48
Fig. 21. Bloqueo provocado por la fracción 5 sobre los nAChRs.	50
Fig. 22. Bloqueo provocado por la fracción 9 sobre los nAChRs.	51
Fig. 23. Curvas dosis – respuesta del bloqueo provocado por las fracciones 4, 5 y 9 sobre los nAChR del subtipo muscular fetal.	52
Fig. 24. Bloqueo de las corrientes provocado por la toxina de coralillo 1.5 μM aplicada en baño estático por 5 min.	54
Fig. 25. Ensayo de competencia de las fracciones parcialmente purificadas por los sitios de unión de ACh en los nAChR.	55
Fig. 26. Estadios de desarrollo de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .	73

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad de algunas toxinas animales sobre nAChR del subtipo muscular.	10
Tabla 2. Características de la elución de cada columna utilizada en la purificación del extracto crudo por cromatografía de intercambio iónico:	20
Tabla 3. Relación del extracto crudo liofilizado y la concentración total de proteínas.	28
Tabla 4. Reacciones características y tiempos aproximados del efecto neurotóxico provocado por el extracto crudo.	30
Tabla 5. Características de la elución de cada fracción obtenida por HPLC de fase reversa.	39
Tabla 6. Proteínas totales del extracto crudo y de las fracciones parcialmente purificadas por HPLC de fase reversa.	41
Tabla 7. Concentración de proteínas utilizada de cada fracción para los geles de acrilamida al 10 y 15%.	43
Tabla 8. Identificación de las bandas notorias de las fracciones parcialmente purificadas por HPLC de fase reversa	44
Tabla 9. Reacciones provocadas por las fracciones 4, 5 y 9 en los bioensayos con cangrejos <i>C. maenas</i> .	46
Tabla 10. Inhibición de las corrientes provocada por las fracciones 4, 5 y 9 en las corrientes mediadas por los nAChR de subtipo muscular.	52
Tabla 13. Características de los estadios de ovocitos de <i>X. laevis</i> .	73

## RESUMEN

Las toxinas de cnidarios presentan una gran variedad de proteínas neurotóxicas las cuales se caracterizan por provocar una alteración en la transmisión de los impulsos nerviosos. La caracterización electrofisiológica de estas toxinas permite conocer su efecto en receptores membranales o canales iónicos específicos involucrados en la neurotransmisión. El objetivo de este trabajo fue la purificación de algunas proteínas neurotóxicas obtenidas del veneno de la medusa *Aurelia aurita* y su evaluación electrofisiológica en receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) del subtipo muscular fetal. El veneno se obtuvo mediante la descarga de los nematocistos ubicados en el margen tentacular de cada medusa. El veneno obtenido se centrifugó, liofilizó y almacenó a  $-60^{\circ}\text{C}$ . Su purificación se realizó por HPLC de fase reversa obteniendo 10 fracciones mayoritarias. La cuantificación de proteínas se realizó por los métodos de Bradford y Lowry y los perfiles proteicos se analizaron por el método SDS-PAGE de Laemmli utilizando geles al 10%, 12% y 15% de acrilamida. Los efectos neurotóxicos se caracterizaron por incoordinación motora, estiramiento de patas, espasmos, parálisis flácida y muerte de cangrejos utilizados en los bioensayos. La evaluación electrofisiológica se realizó en nAChR del subtipo muscular fetal expresados en ovocitos de ranas *Xenopus laevis*. Las fracciones 4, 5 y 9 provocaron un bloqueo reversible no-competitivo en estos receptores, siendo la fracción 9 la de mayor actividad ( $\text{IC}_{50}=15.53 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Este trabajo constituye el primer reporte del efecto de algunas proteínas neurotóxicas obtenidas del veneno de la medusa *Aurelia aurita* sobre nAChR musculares.

## ABSTRACT

Cnidarian toxins comprise a wide variety of neurotoxic proteins that inhibit neurotransmission pathways. The electrophysiological characterization of these toxins allows the identification of their neurotoxic effect on particular ion channels and receptors. The objective of this study was to partially purify some neurotoxic proteins from the crude venom of the scyphozoan jellyfish *Aurelia aurita* and to determine their electrophysiological properties on fetal muscle-subtype nicotinic acetylcholine receptors (nAChR). Crude venom was obtained by mechanical discharge of the nematocysts located in the tentacular margin of each jellyfish. The venom was centrifuged, dried freeze and stored at -60°C. The fractionation was performed by reverse-phase HPLC resulting in 10 major peaks. Protein quantification was determined by Bradford and Lowry assays. Protein profiles were obtained by SDS-PAGE technique using 10%, 12% and 15% acrylamide gels. The neurotoxic effects were characterized by motor alterations, spasms, appendix stretching, paralysis and death of crabs used in the bioassays. Electrophysiologic tests were performed on fetal muscle-subtype nAChR expressed in *Xenopus laevis* oocytes. Fractions 4, 5 y 9 showed a reversible non-competitive blocking effect on these receptors, revealing the major activity in fraction 9 ( $IC_{50}=15.53 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). This work reports for the first time the blocking effect on muscular nAChR of some neurotoxic proteins obtained from *Aurelia aurita* venom.

## INTRODUCCIÓN

Los organismos marinos constituyen una fuente de obtención de nuevos compuestos con actividad biológica [1]. Las mezclas de estos compuestos bioactivos, llamados venenos, tienen entre otras funciones, la de constituir mecanismos químicos de defensa–ataque [2]. Algunos de los compuestos que se han logrado identificar en estos venenos son aminas biogénicas, diterpenos, alcaloides, compuestos de amonio, ácidos carboxílicos, ésteres, esteroides, cadenas complejas de carbohidratos, péptidos y proteínas, entre otras moléculas [3]. Los compuestos bioactivos de naturaleza proteica han sido uno de los grupos más estudiados ya que son moléculas compactas, con una alta estabilidad conformacional y presentan una alta selectividad por sus blancos moleculares [1].

El Phylum Cnidaria es uno de los grupos del cual se han obtenido una gran cantidad de compuestos bioactivos que son capaces de ejercer acciones específicas y potentes en diversos sistemas biológicos [4]. Este Phylum incluye cinco clases: Hydrozoa (hidroides e hidromedusas), Anthozoa (anémonas, corales, plumas de mar), Cubozoa (avispa de mar, medusas con formas cúbicas), Scyphozoa (medusas en forma de campana) y Staurozoa (pequeñas medusas sésiles de aspecto polipoide) [5,6].

Todas las especies del Phylum Cnidaria presentan orgánulos especializados llamados nematocistos los cuales producen, almacenan y disparan el veneno contenido en ellos [5]. Esta liberación se desencadena por la estimulación química y por la activación mecánica del cnidocilo (estructura mecano-receptora del nematocisto), lo que provoca la liberación e inyección del veneno por medio de un sistema de fibras contráctiles enrolladas en su interior que conforman el túbulo (Fig.1) [5].

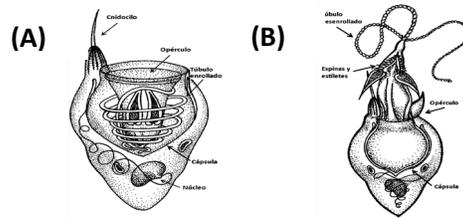


Fig. 1. Esquema de un nematocisto (A) sin descargar y (B) descargado donde se observa la liberación del túbulo por el cual se inyecta el veneno (modificado de Brusca & Brusca, 1990).

Para extraer el veneno de los nematocistos se han utilizado diferentes técnicas como descarga mecánica, descarga por choques osmóticos o inducción química [7]. Para su purificación se han utilizado diferentes métodos cromatográficos como los de exclusión molecular, intercambio iónico, afinidad e hidrofobicidad [8, 9, 10, 11].

Las toxinas aisladas del veneno de cnidarios se han clasificado en hemolíticas, cardiotoxinas, citotóxicas o neurotóxicas de acuerdo a los procesos fisiológicos o blancos moleculares que afectan [12]. En este trabajo nos centraremos en el estudio de las neurotoxinas, las cuales alteran la transmisión de los impulsos nerviosos modificando la conformación de canales iónicos, receptores membranales o mediante mecanismos enzimáticos como la actividad fosfolipasa A2 (PLA2) [4, 12, 13, 14].

El estudio de las neurotoxinas en cnidarios ha sido más extenso en el grupo de las anémonas (Clase Anthozoa) dado que la purificación, identificación y caracterización de estas toxinas en los otros grupos se ha dificultado debido a su alta termolabilidad e inestabilidad, gran tamaño, y tendencia a la formación de agregados insolubles [10, 15, 16, 17, 18, 19]. Sin embargo, los estudios existentes acerca de las neurotoxinas en organismos de la Clase Cubozoa [9, 20, 21], Hydrozoa [22, 23, 24] y Scyphozoa [25, 26, 27, 28, 29] han permitido caracterizar, en parte, sus efectos en diversos bioensayos y líneas celulares.

Para la identificación y caracterización del efecto de las neurotoxinas sobre receptores o canales iónicos se utilizan diferentes análisis electrofisiológicos como la fijación de

membrana (patch-clamp), fijación de voltaje (voltaje-clamp) y registros en macroparches (macropatch) [30]. La técnica de fijación de voltaje permite la medición de las corrientes eléctricas provocadas por el flujo de iones a través de la membrana, manteniendo el voltaje de la membrana en un valor fijo [31, 32].

Esta técnica de fijación de voltaje ha sido aplicada eficazmente en ovocitos de rana *Xenopus laevis* [33]. Este modelo biológico ha sido ampliamente utilizado en la caracterización electrofisiológica ya que es un sistema útil para la expresión heteróloga al permitir la microinyección de material genético externo como ARN o ADN complementario (ADNc) y la rápida expresión de diversos canales iónicos y receptores [33]. Las ventajas de su uso es su estabilidad eléctrica y mecánica, así como su fácil obtención y gran tamaño (diámetro ~ 1.0 mm) [33].

Dentro de los sistemas de neurotransmisión afectados por diversas neurotoxinas de origen animal es encuentra el de transmisión neuromuscular donde se une un axón y una fibra muscular. Este sistema regula la contracción muscular mediante la liberación del neurotransmisor acetilcolina (ACh) desde la terminal nerviosa hasta los receptores post - sinápticos nicotínicos y muscarínicos que se encuentran en la fibra muscular [34].

Los receptores nicotínicos de ACh (nAChR) del subtipo muscular son receptores ionotrópicos que permiten el paso de cationes como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$ , provocando la despolarización de la membrana a través de la propagación del potencial de acción desde la unión neuromuscular hasta la fibra muscular, dando como respuesta final la contracción de las miofibrillas [35]. Estos receptores están formados por la combinación de cuatro subunidades en una estequiometría que depende del estadio de desarrollo del músculo: fetal

( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) o adulto ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) (Fig. 2) [35, 36]. Cada subunidad está formada por cuatro segmentos transmembranales, siendo el segundo segmento (M2) el que forma el poro [37]. El dominio extracelular N-terminal de cada subunidad  $\alpha 1$  contiene un asa formada por dos residuos de cisteína unidos por un puente disulfuro, el cual forma el sitio de unión para el neurotransmisor ACh [37].

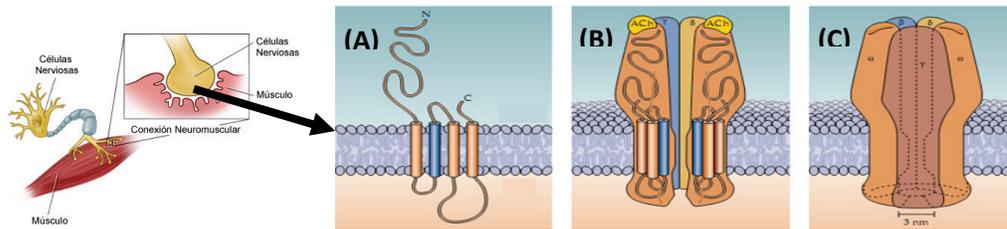


Fig. 2. Esquema de la unión neuromuscular y un nAChR del subtipo muscular fetal. (A) Vista de los cuatro segmentos transmembranales de cada subunidad (segmento M2 en color azul); (B) conformación de cada subunidad y los sitios de unión a la ACh y (C) disposición espacial de cada subunidad y tamaño del poro del receptor. Modificado de Purves, 2004 [34].

Las toxinas animales que actúan sobre los nAChR del subtipo muscular pueden tener un efecto agonista o antagonista en el receptor. Algunos ejemplos se mencionan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Actividad de algunas toxinas animales sobre nAChR del subtipo muscular.

Agonistas	Antagonistas
Epibatidina (alcaloide de la rana <i>Epipedobates tricolor</i> )	$\alpha$ -bungarotoxina (polipéptidos obtenidos de serpientes cobra <i>Bungarus multicinctus</i> )
Anabaseina (alcaloide de gusanos marinos del Phylum Nemertina y en glándulas venenosas de hormigas)	Lophotoxinas (diterpenoides obtenidos de corales gorgonáceos como <i>Lophogorgia</i> y <i>Pseudopterogorgia</i> )
$\alpha$ -conotoxina (péptido EI obtenido de <i>Conus ermineus</i> )	Neosurugatoxina (obtenida del molusco <i>Babylonia japonicus</i> )
	$\alpha$ -, $\alpha A$ - y $\psi$ - conotoxinas (péptidos obtenidos de caracoles del género <i>Conus</i> )

[Tomado de 35, 36, 38, 39]

Como se observa, existe un gran número de toxinas animales que actúan de manera antagonista en este tipo de receptores, la cual corresponde a un bloqueo del canal, ya sea por la interacción de las toxinas en los sitios de unión a la ACh o en otros sitios del receptor provocando cambios conformacionales que resultan en el cierre del receptor [35].

## ANTECEDENTES

Las medusas son un grupo de animales marinos venenosos pertenecientes a la Clase Scyphozoa dentro del Phylum Cnidaria. Se ha reportado que la picadura accidental de estos organismos puede provocar envenenamiento en humanos caracterizado por dolor, lesiones dérmicas como edemas (hinchazón), eritemas (inflamación caracterizada por manchas rojas), erupciones vesiculares, comezón, así como problemas en la coordinación motora, dificultades en la respiración, síntomas cardiovasculares como hipotensión e incluso la muerte en algunos casos [12, 40]. A pesar de constituir un problema de salud pública, no existe un registro nacional de las picaduras por estos organismos y la información existente sobre las precauciones y primeros auxilios es escasa. Además, hasta el momento sólo existe un antiveneno disponible para las picaduras de medusas en todo el mundo, el cual es específico sólo para el veneno de la cubomedusa *Chironex fleckeri* [41]. Por esta razón, resulta fundamental la identificación y caracterización de los componentes tóxicos del veneno, así como un mayor conocimiento en sus mecanismos de acción celular.

*Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758), es una medusa con toxicidad variable. Tiene una distribución cosmopolita ya



que se encuentra en la mayoría de los mares y bahías de aguas someras templadas y

tropicales [6, 42]. Esta medusa se alimenta del zooplancton marino constituido principalmente por huevos y larvas de peces, crustáceos, moluscos, entre otros organismos [6]. Durante el ciclo de vida de *A. aurita* se presentan tres tipos de nematocistos: polispiras, heterótricos microbásicos euriteles y átricos isorrizas, siendo los dos últimos los que se conservan hasta su etapa adulta [43, 44, 45, 46]. Los nematocistos se encuentran distribuidos en el margen tentacular que rodea la umbrela en forma de campana y en la zona oral [5].

El perfil proteico del veneno de esta medusa comprende un intervalo muy amplio, ya que abarca desde péptidos pequeños menores a 10 kDa hasta proteínas muy grandes mayores a los 250 kDa [47, 42, 46]. En cuanto a su caracterización biológica, se ha demostrado su actividad hemolítica en eritrocitos de oveja, bovino, roedor y humano [47, 42, 46], así como actividad citotóxica en células de agalla (RTgill-W1), siendo más potente el veneno obtenido de los brazos orales que el del margen tentacular [46]. Además, se ha reportado que el extracto de *A. aurita* afecta la integridad de células cancerígenas e inhibe el crecimiento de células de adenocarcinoma de mama y pulmón, así como de células leucémicas [48, 49]. Radwan *et al.* (2001) reportaron que el veneno de esta medusa presenta actividad dermonecrótica, factores inductores de vasopermeabilidad, actividad hemolítica y actividad fosfolipasa A2, y que existen diferencias toxinológicas del veneno de esta medusa de acuerdo a su distribución geográfica [42]. El extracto crudo ha resultado ser letal en ratones y en nauplios de *Artemia salina* provocando la mayor mortandad durante las primeras cinco horas de exposición [47, 42]. Kihara *et al.* (1988) reportaron la actividad electrofisiológica del veneno en fibras musculares de *Rana catesbeiana*, donde

provocó un efecto irreversible en la contracción del músculo y tuvo una acción despolarizante en las membranas musculares al incrementar la permeabilidad de iones  $\text{Na}^+$  [50]. Además, el efecto neurotóxico de dos fracciones purificadas del veneno de esta medusa se caracterizó en bioensayos donde provocaron reacciones tetánicas, parálisis total y muerte en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* [47].

Dado que son pocos los compuestos proteicos purificados del veneno de esta medusa [47] y su efecto neurotóxico sólo se ha caracterizado en preparaciones musculares y bioensayos con cangrejos, resulta de gran importancia la identificación y caracterización específica del efecto de sus toxinas sobre receptores o canales iónicos. Por esta razón, el objetivo principal de este trabajo se centró en la purificación de algunas proteínas neurotóxicas, así como su caracterización en receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) del subtipo muscular fetal.

La elección de estos receptores para la caracterización electrofisiológica se basa en las reacciones provocadas en cangrejos, las cuales se encuentran estrechamente relacionadas con alteraciones en la contracción muscular [6]. Asimismo, se ha reportado la presencia de receptores nicotínicos homólogos en algunos organismos que constituyen su alimento, como en cangrejos y peces [51, 52, 53].

Con este trabajo, se espera contribuir al conocimiento de algunos componentes proteicos del veneno, así como la explicación de un posible mecanismo celular involucrado en los efectos neurotóxicos provocados por el veneno de esta medusa.

## **HIPÓTESIS**

El veneno de la medusa *Aurelia aurita* contiene algunas proteínas neurotóxicas que actúan sobre receptores nicotínicos de acetilcolina del subtipo muscular.

## **OBJETIVOS**

General:

Purificar y evaluar la actividad electrofisiológica de algunas proteínas neurotóxicas obtenidas del veneno de la medusa *Aurelia aurita*.

Particulares:

- Identificar los nematocistos del margen tentacular.
- Extraer el veneno de los nematocistos.
- Purificar el veneno utilizando los métodos cromatográficos FPLC de exclusión molecular e intercambio iónico y CLAR (HPLC en inglés) de fase reversa.
- Cuantificar y caracterizar el contenido proteico del extracto crudo y de las fracciones obtenidas.

- Identificar los efectos neurotóxicos del extracto crudo y de las fracciones obtenidas mediante bioensayos con cangrejos.
- Evaluar la actividad electrofisiológica de las fracciones parcialmente purificadas en receptores nicotínicos de acetilcolina del subtipo muscular fetal expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La composición de las soluciones, geles, y soluciones amortiguadoras utilizadas en este trabajo se encuentran en el Anexo I.

### **1. Adquisición de ejemplares**

Se obtuvo una donación de 150 medusas del parque acuático Xcaret. Los organismos recibidos fueron ejemplares adultos con el margen tentacular completamente desarrollado y con un diámetro corporal de 10 cm en promedio.

### **2. Identificación de nematocistos y extracción del veneno**

El margen tentacular de cada medusa se recortó y colocó en agua de mar (1:2) a 4°C por 24 horas. El agua de mar se decantó y se agregó agua desionizada (1:2) adicionada con un coctel inhibidor de proteasas (Complete Mini - Protease inhibitor cocktail, Roche). Esta mezcla se agitó ligeramente, se congeló a -60°C y posteriormente se descongeló a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se homogeneizó por 25 min (Homogeneizador Pyrex 40 mL Ten Broeck) hasta lograr la descarga de la mayoría de los nematocistos. Finalmente la mezcla se centrifugó a 18,787g a 4°C por 10 min (Eppendorf centrifuge 5810R, rotor F-45-30-11) y el sobrenadante se congeló a -60°C y se liofilizó

para su uso posterior (Freeze Drying Model 77500 Labconco). La descarga e identificación de los nematocistos se realizó con la ayuda de un microscopio compuesto.

### 3. Análisis del extracto crudo

#### 3.1. Cuantificación de proteínas

Se realizó por el método de Bradford [54]. Se realizaron tres diluciones a partir de una solución inicial de 100 mg del extracto crudo liofilizado resuspendido en 1 mL de agua desionizada. Se colocaron 20  $\mu$ L de cada dilución y 1 mL del reactivo de Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay, Bio-Rad) en cada celda de cuarzo (Spectrophotometer cuvetts, Sigma-Aldrich). Se realizaron dos réplicas de cada dilución para su lectura. Se midió la absorbancia de cada muestra a 595 nm y los valores obtenidos se extrapolaron en una curva patrón construida con 125, 250, 500, 750 y 1000  $\mu$ g/mL de albúmina sérica bovina (Quick Start, Bovine Serum Albumin (BSA) Standard Set, Bio-Rad).

#### 3.2. Electroforesis SDS-PAGE

El análisis de proteínas se realizó por el método de Laemmli [55]. Se resuspendió 1 mg del extracto crudo liofilizado en 1 mL de agua desionizada. Se mezclaron 10  $\mu$ L de la muestra y 10  $\mu$ L del tampón de carga y este volumen se aplicó en cada pozo. Se utilizaron geles de acrilamida al 12%. Cada gel se corrió a 60 V durante 4 horas en una solución

amortiguadora de corrimiento Tris-glicina (Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System, Bio-Rad). Se utilizaron 3  $\mu$ L de marcadores coloridos de alto y bajo peso molecular (Kaleidoscope, Bio-Rad y Amersham High-Range, GE Healthcare). Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie R-250 [56].

### 3.3. Identificación de los efectos neurotóxicos mediante bioensayos con cangrejos

Se utilizaron cangrejos machos de la especie *O. quadrata* con un peso promedio de 10 g. Se inyectó una alícuota de 0.1 mL del extracto crudo sin liofilizar ( $\sim 127 \mu\text{g/mL}$ ) en la base de la tercera pata caminadora y se anotaron las reacciones y el tiempo en el que ocurrieron en cada cangrejo.

## 4. Purificación del extracto crudo

### 4.1. Purificación por exclusión molecular

Se resuspendieron 150 mg del extracto crudo liofilizado (equivalente a  $\sim 2$  mg de proteínas total) en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 10 mM, pH 7.0. La muestra se aplicó a una columna HiLoad 26/60 Superdex G-200 prep grade (Amersham Bioscience) conectada a un equipo Äktaprime plus FPLC (GE Healthcare). La columna se equilibró y eluyó con una solución amortiguadora de fosfatos de sodio 10 mM, pH 7.0 a un

flujo de 1mL/min. La columna se calibró previamente con un set estándar de proteínas (LMW Gel Filtration Calibration Kit, Amersham Bioscience) compuesto por albúmina (67 kDa), ovalbúmina (43 kDa), quimotripsinógeno (25 kDa), ribonucleasa A (13.7 kDa) y azul dextran (2000 kDa). La elución de las proteínas se monitoreó por detección UV a 280 nm.

#### 4.2. Purificación por intercambio iónico

Se resuspendieron 100 - 200 mg del extracto crudo liofilizado (equivalente a ~1.5 – 2 mg de proteínas total) en 500 µL de la solución amortiguadora de elución. La muestra se aplicó a diferentes columnas de intercambio iónico marca Hi Trap 1 mL, GE Healthcare, las cuales se enlistan a continuación:

- Hi Trap Q Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Q FF) → Intercambiador aniónico fuerte
- Hi Trap DEAE Sepharose Fast Flow (DEAE FF) → Intercambiador aniónico débil
- Hi Trap SP Sepharose Fast Flow (SP FF) → Intercambiador catiónico fuerte

Cada una de ellas se equilibró con 5 volúmenes de columna (VC) de la solución amortiguadora de elución y posteriormente con 10 VC de la la solución amortiguadora de inicio hasta que la línea basal se estabilizara. Posteriormente se aplicó la muestra y la elución se realizó a un flujo de 1mL/min utilizando un gradiente escalonado o lineal de la la solución amortiguadora de elución. La elución de las proteínas se monitoreó por detección UV a 280 nm.

Las columnas y las características de elución se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla 2. Características de la elución de cada columna utilizada en la purificación del extracto crudo por cromatografía de intercambio iónico:

Intercambiadores aniónicos

Gradiente	Columna	Solución amortiguadora inicial	Solución amortiguadora de elución
Escalonado	HiTrap Q FF	Acetato de amonio 0.01 M, pH 8.5	Acetato de amonio 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M
	HiTrap DEAE FF	Acetato de amonio 0.01 M, pH 8.5	Acetato de amonio 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M
Lineal	HiTrap DEAE FF	Acetato de amonio 10 mM, pH 7.1	Solución amortiguadora inicial + 1 M NaCl

Intercambiadores catiónicos

Gradiente	Columna	Solución amortiguadora inicial	Solución amortiguadora de elución
Escalonado	HiTrap SP FF	Acetato de amonio 0.01 M, pH 5.4	Acetato de amonio 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M
	HiTrap SP FF	Fosfato de sodio 0.05 M, pH 7.1	Solución amortiguadora inicial + gradiente escalonado de acetato de amonio 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M
Lineal	HiTrap SP FF	Fosfato de sodio 0.05 M, pH 6.9	Solución amortiguadora inicial + 1 M NaCl

### 4.3. Purificación por HPLC de fase reversa

Se resuspendieron 50 mg del extracto crudo liofilizado (800 µg de proteínas totales) en 1 mL de una solución de acetonitrilo (ACN) al 5% (Marca Burdick & Jackson) y ácido trifluoroacético (TFA) al 0.004% (Fluka). Este volumen se inyectó a través de un asa de un volumen de 1 mL a una columna analítica Vydac C<sub>18</sub> de fase reversa (218TP54, 5 µm, 4.6

× 250 mm, 300 Å) acoplada a una pre-columna Vydac C<sub>18</sub> (218GK54, 5 μm, 4.6 × 10 mm). La elución se realizó con un cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC (Pro Star, Varian) a un flujo de 1 mL/min utilizando un gradiente lineal de 5% a 95% de solución B (1%/min) por 90 min, donde la solución A: 0.1% v/v TFA en agua, y la solución B: 0.09% v/v TFA en 90% v/v en ACN acuoso. La elución de las proteínas se monitoreó por detección UV a 220 nm. Todas las fracciones recolectadas se concentraron a sequedad (Savant SpeedVac Concentrator, Thermo) por 12 horas y se conservaron a -60°C.

## 5. Análisis de las fracciones obtenidas por HPLC de fase reversa

### 5.1. Cuantificación de proteínas

Se realizó por el método de Lowry [57]. Tanto el extracto crudo como las fracciones parcialmente purificadas que se encontraban liofilizadas se resuspendieron en 20 μL de agua desionizada. Se colocaron 1, 2 y 3 μL de cada muestra en cada pozo y se llevaron a 20 μL con agua desionizada. Finalmente se agregaron 25 μL del Reactivo A (solución alcalina de tartrato de cobre) y 200 μL del Reactivo B (reactivo de Folin) a cada muestra (Bio-Rad DC Protein Assay, Bio-Rad). Se midió la absorbancia de cada muestra a 690 nm y los valores se extrapolaron en una curva patrón construida con 1,2, 3, 6 y 12 μg/μL de albúmina.

Aunque este método es menos sensible que el de Bradford [54], se utilizó con la finalidad de tener una estimación de la concentración de proteínas de cada fracción, así como una aproximación en el cálculo del rendimiento de la purificación del extracto crudo.

## 5.2. Electroforesis SDS-PAGE

Se realizó por el método de Laemmli [55] Cada fracción parcialmente purificada se resuspendió en 40  $\mu$ L de agua desionizada y se le agregó 17  $\mu$ L del tampón de carga. Se colocaron 30  $\mu$ L de cada muestra en cada pozo del gel. Se utilizaron geles de acrilamida al 10% y 15%. Cada gel se corrió a 60 V durante 4 horas en una solución amortiguadora de corrimiento Tris-glicina (Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System, Bio-Rad). Se utilizaron marcadores coloridos de alto y bajo peso molecular (Kaleidoscope, Bio-Rad y Amersham High-Range, GE Healthcare). Cada gel se tiñó con Azul de Coomassie R-250 [56].

## 5.3. Identificación de los efectos neurotóxicos mediante bioensayos con cangrejos

Se utilizaron cangrejos machos de la especie *C. maenas* con un peso promedio de 10 g. En esta identificación sólo se probaron las fracciones que presentaron efecto sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina. Cada fracción parcialmente purificada se resuspendió

en 200  $\mu$ L de agua desionizada y esta alícuota se inyectó en la base de la tercera pata caminadora. Se anotaron las reacciones y tiempos para cada cangrejo.

En este bioensayo se utilizaron cangrejos de la especie *C. maenas* ya que no fue posible conseguir los cangrejos utilizados en la identificación del extracto crudo (*O. quadrata*). Sin embargo, esta especie ha resultado ser útil en la identificación de los efectos neurotóxicos del veneno de otros cnidarios [8, 57].

## 6. Caracterización electrofisiológica de las fracciones parcialmente purificadas

### 6.1. Obtención de ovocitos

Los ovocitos se obtuvieron de ranas de la especie *X. laevis* previamente adormecidas a  $-4^{\circ}\text{C}$  por 90 min. Los ovocitos se extrajeron por una incisión en la cavidad abdominal con la ayuda de tijeras y pinzas. Una vez aislados, los ovocitos se lavaron con solución fisiológica OR-2. Posteriormente se colocaron en solución OR-2 adicionada con colagenasa (Collagenase from *Clostridium histolyticum*, Sigma) y se dejaron en agitación constante por 45 min. Los ovocitos separados se cambiaron a una solución OR-2 y se seleccionaron aquellos ovocitos maduros en los estadios V y VI (Ver anexo II). Éstos se colocaron en solución electrofisiológica ND96 adicionada con gentamicina (marca RAYERE) y se mantuvieron a  $17^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

## 6.2. Inyección de ovocitos

Los ovocitos se utilizaron 1 ó 2 días después de su obtención. Se inyectaron 2.3 nL del ADNc que codifica las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  que conforman los nAChR del subtipo muscular fetal. La inyección se realizó en el núcleo de cada ovocito con la ayuda de un micro-inyector (Nanoliter 2000, World Precision Instruments). Las clonas (ADNc) para la expresión de cada subunidad fueron donadas por el Dr. McIntosh de la Universidad de Utah. La propagación de este material se realizó en colaboración con el Dr. Aguilar en el laboratorio de Neurofarmacología Marina del del Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla.

## 6.3. Evaluación electrofisiológica

Los ovocitos se utilizaron de 1 a 3 días después de la inyección. Cada ovocito se colocó en una cámara de registro y se fijó a un voltaje constante de -70 mV (Oocyte Clamp OC-725C, Warner Instruments Corp; software Labview 8.5, National Instruments) mediante la técnica de fijación de voltaje con un sistema de dos electrodos. Cada ovocito se perfundió con un flujo constante de solución ND96 y los receptores se activaron con una solución de ACh (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich) 1  $\mu$ M aplicando un pulso de 1 segundo una vez por minuto.

Para cada registro, primero se realizó un control del promedio de las corrientes generadas por 5 pulsos de ACh 1  $\mu$ M y posteriormente se aplicaron 3  $\mu$ L de solución ND96 en baño estático por 5 min. Una vez transcurrido este tiempo, se volvieron a aplicar los

pulsos de ACh y se restituyó el flujo constante de solución ND96 para corroborar que las corrientes se mantuvieran estables.

Se probaron 3 concentraciones diferentes de cada fracción parcialmente purificada, las cuales se aplicaron en un baño estático de 5 min en cada ovocito. Posteriormente se volvieron a aplicar los pulsos de ACh y el flujo de solución ND96 para permitir la disociación de las toxinas y su lavado de las membranas. Se dejaron pasar tantos pulsos fueran necesarios para observar las variaciones provocadas en las corrientes, así como la recuperación de cada ovocito.

Se utilizó una serie de válvulas solenoides de tres vías para cambiar entre el medio de perfusión ND96 con o sin toxina y la solución de ACh. Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente (20-23°C). El volumen de la cámara de registro fue de 30  $\mu$ L.

Finalmente, se obtuvo una curva dosis – respuesta y los valores de concentración media inhibitoria ( $IC_{50}$ ) para cada fracción que presentó actividad sobre los nAChR (Software Prisma GraphPad, versión 5).

#### 6.4. Ensayos de competencia por los sitios de unión de ACh

Se utilizó una toxina de coralillo como control, la cual se une de manera específica en los dos sitios de unión para la ACh en estos receptores (artículo en prensa).

En este ensayo, sólo se utilizaron las fracciones 4, 5 y 9 que fueron las que presentaron actividad sobre los nAChR.

Para cada registro, se realizó un control del promedio de las corrientes generadas por 5 pulsos de ACh 1  $\mu\text{M}$  y posteriormente se aplicaron 6  $\mu\text{L}$  de la solución electrofisiológica ND96 en baño estático durante 10 min (3  $\mu\text{L}$  al inicio y 3  $\mu\text{L}$  a los 5 min). Una vez transcurrido este tiempo, se volvieron a aplicar los pulsos de ACh y se restituyó el flujo constante de solución ND96 para corroborar que las corrientes se mantuvieran estables.

Para caracterizar de manera individual el efecto de la toxina de coralillo y de las fracciones parcialmente purificadas, primero se colocaron 3  $\mu\text{L}$  de ND96 y a los 5 min se colocó la toxina de coralillo o cada una de las 3 fracciones parcialmente purificadas. Se utilizaron 1.5  $\mu\text{M}$  de la toxina de coralillo en un volumen de 3  $\mu\text{L}$  y 45, 76.5 y 18  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de la fracción 4, 5 y 9 respectivamente en un volumen de 9  $\mu\text{L}$ . Tanto la toxina de coralillo como las fracciones parcialmente purificadas se dejaron actuar por 5 min.

El ensayo de competencia se realizó preincubando los nAChR con 9  $\mu\text{L}$  de cada fracción durante 5 min y posteriormente, se aplicaron 3  $\mu\text{L}$  de la toxina de coralillo la cual se dejó actuar por otros 5 min en baño estático.

En todos los casos, una vez transcurridos los 10 min del baño estático, se volvieron a aplicar los pulsos de ACh y el flujo constante de solución ND96 para permitir la disociación de las toxinas y su lavado de las membranas. Se dejaron pasar tantos pulsos fueran necesarios para observar las variaciones provocadas en las corrientes, así como la recuperación de cada ovocito.

## RESUMEN

### 2. Identificación de nematocistos

La identificación se realizó microscópicamente encontrando dos tipos de nematocistos en el margen tentacular de *A. aurita*:

1) Heterótrico microbásico euritele. La cápsula es pequeña y de forma ovoide. El túbulo está abierto y su porción basal es delgada y corta presentando una dilatación ornamentada con espinas diminutas de diferente tamaño [58].

2) Átrico isorriza. La cápsula es oval y pequeña. El túbulo es de grosor uniforme abierto en la punta y no presenta espinas [58].

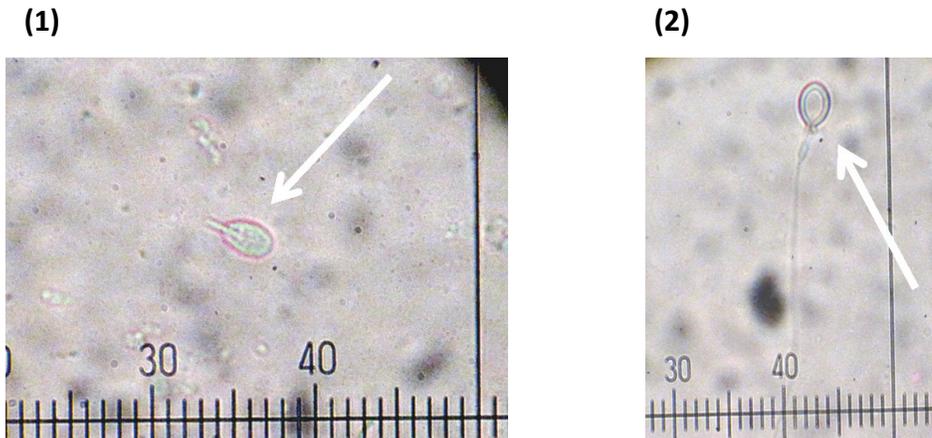


Fig. 3. Micrográficas de los nematocistos descargados (1) heterótrico microbásico euritele, (2) átrico isorriza (40X).

### 3. Análisis del extracto crudo

#### 3.1. Cuantificación de proteínas

Se realizó por el método de Bradford. La curva patrón obtenida con el set estándar de albúmina sérica bovina fue la siguiente:

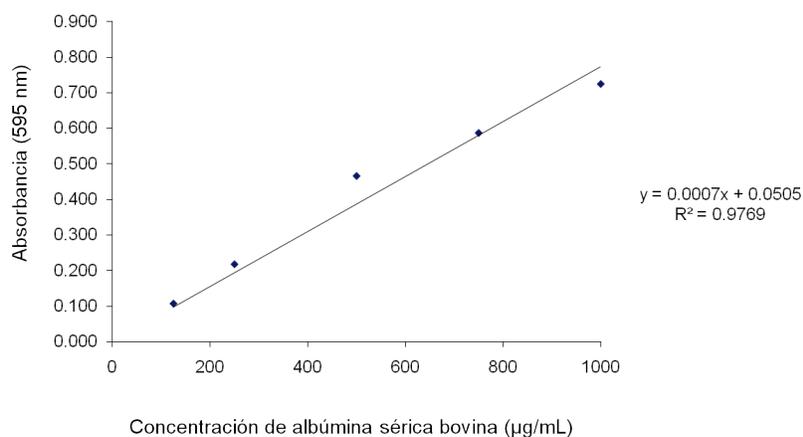


Fig. 4. Curva patrón de albúmina sérica bovina y valor de la regresión lineal.

Los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones del extracto crudo se extrapolaron en la curva patrón para obtener las concentraciones de proteína total correspondientes:

Tabla 3. Relación del extracto crudo liofilizado y la concentración total de proteínas.

Liofilizado (mg/mL)	Proteínas totales (µg/mL)
10	63.5
20	285.9
50	802.6
100	1269.2

### 3.2. Electroforesis SDS-PAGE

El perfil proteico del extracto crudo se obtuvo con un gel de acrilamida al 12% el cual se muestra a continuación:

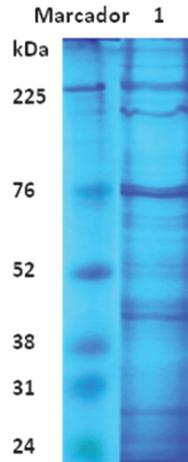


Fig. 5. Análisis SDS-PAGE del extracto crudo. Marcadores moleculares GE Healthcare; el carril 1 corresponde a 10  $\mu$ L con una concentración de 800  $\mu$ g/mL de proteína total del extracto crudo.

El análisis SDS-PAGE muestra que el extracto crudo está compuesto por un amplio rango de proteínas que va desde los 24 hasta los 225 kDa.

Las bandas proteicas más notorias son de 26, 28, 45, 50, 76, 200 y 225 kDa.

### 3.3. Identificación de los efectos neurotóxicos mediante bioensayos con cangrejos

Se utilizaron cangrejos de la especie *O. quadrata*. Al inyectar una alícuota de 0.1 mL del extracto crudo sin liofilizar (~127 µg/mL), el cangrejo presentó las reacciones típicas del efecto neurotóxico en este bioensayo las cuales se resumen en la Tabla 4 y en la Fig. 6 que se muestran a continuación:

Tabla 4. Reacciones características y tiempos aproximados del efecto neurotóxico provocado por el extracto crudo.

Reacción	Tiempo
Incoordinación motora	Inmediata
Estiramiento de patas	7 s
Espasmos	1 min
Pérdida de equilibrio	1 min
Parálisis flácida	5 min
Muerte	7 min

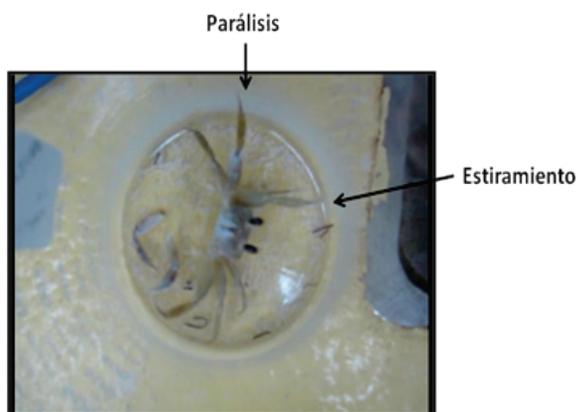


Fig. 6. Fotografía de las reacciones de parálisis y estiramiento de patas de los cangrejos utilizados en el bioensayo.

## 4. Purificación del extracto crudo

### 4.1. Purificación por exclusión molecular

Al pasar el extracto crudo por la columna Superdex G-200 no se logró obtener una separación adecuada, ya que toda la muestra eluyó en un solo pico (Fig. 7). Los hombros laterales del pico se separaron manualmente, pero el análisis SDS-PAGE confirmó que éstos presentaban las mismas bandas proteicas que el extracto crudo completo (Fig. 8).

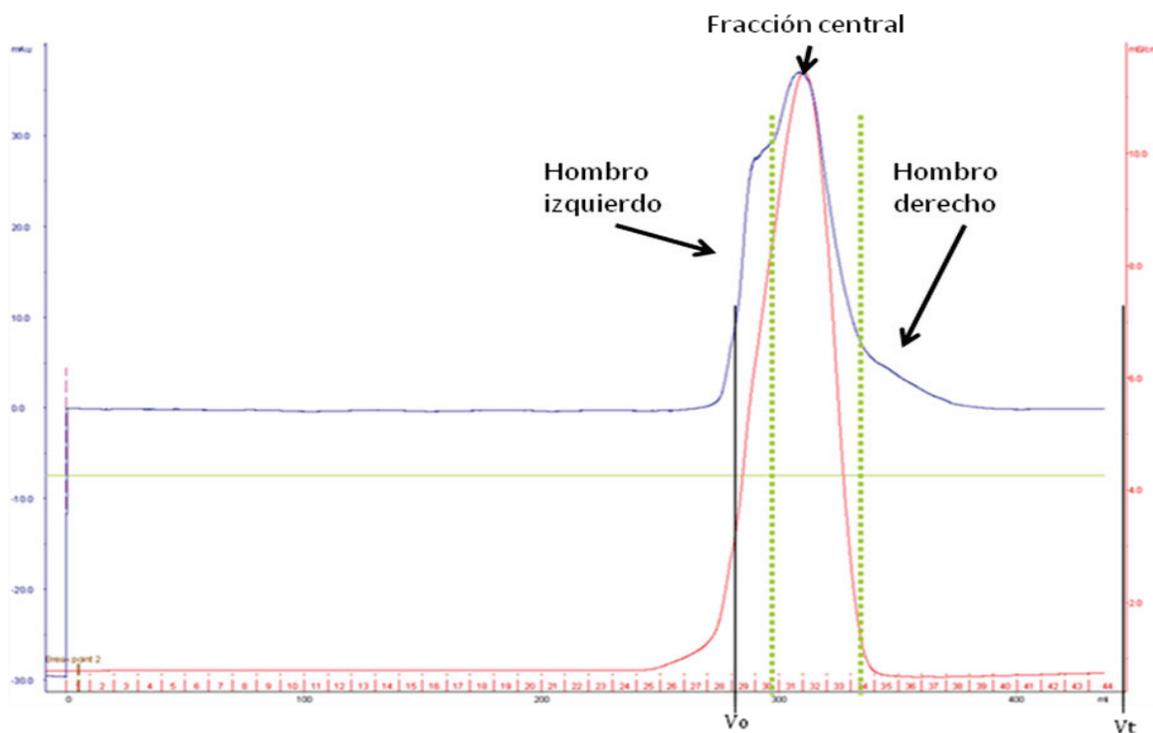


Fig. 7. Cromatograma del extracto crudo eluido en columna Superdex G-200 con una solución amortiguadora de fosfatos 10mM, pH 7.0. La línea azul corresponde a la detección UV de las proteínas, la línea roja corresponde a la conductividad de la solución amortiguadora utilizada y las líneas verdes punteadas corresponden a la corte manual de los hombros del pico principal.

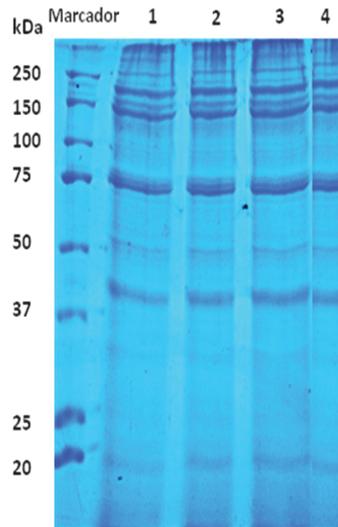


Fig. 8. Análisis SDS-PAGE de las fracciones separadas manualmente de la elución con la columna Superdex G-200. Marcadores moleculares Bio-Rad; carril 1 corresponde al extracto crudo completo; carril 2 al hombro izquierdo; carril 3 al pico central y carril 4 al hombro derecho.

## 4.2. Purificación por intercambio iónico

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos del extracto crudo con las diferentes columnas utilizadas. La línea azul indica la detección UV de las proteínas, mientras que la línea roja indica la conductividad de las soluciones amortiguadoras utilizadas.

- Intercambiadores aniónicos:

### Gradiente escalonado

#### ❶ Columna HiTrap Q FF

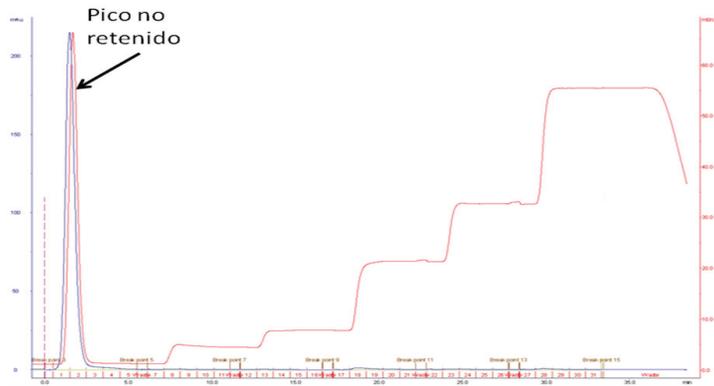


Fig. 9. Cromatograma del extracto crudo utilizando la columna HiTrap Q FF (intercambiador aniónico fuerte) eluida con acetato de amonio 0.01 M, pH 8.5 con gradiente escalonado de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M de acetato de amonio.

#### ❷ Columna HiTrap DEAE FF

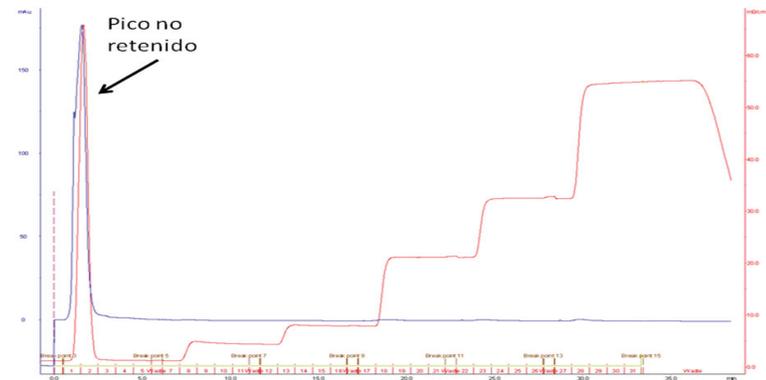


Fig. 10. Cromatograma del extracto crudo utilizando la columna HiTrap DEAE FF (intercambiador aniónico débil) eluida con acetato de amonio 0.01 M, pH 8.5 con gradiente escalonado de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M de acetato de amonio.

## Gradiente lineal

### ③ Columna HiTrap DEAE FF 1 mL

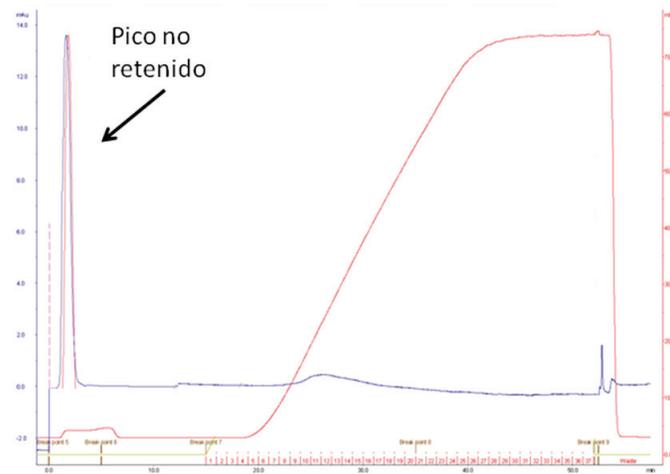


Fig. 11. Cromatograma del extracto crudo utilizando la columna HiTrap DEAE FF (intercambiador aniónico débil) eluida con una solución amortiguadora de acetato de amonio 10 mM, pH 7.1 con gradiente lineal de la solución amortiguadora inicial + 1M NaCl.

- Intercambiadores catiónicos:

Gradiente escalonado

- ❶ Columna HiTrap SP FF 1 mL

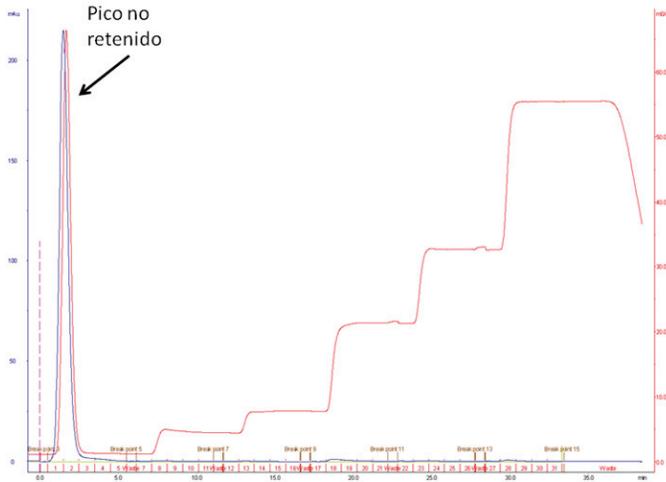


Fig. 12. Cromatograma del extracto crudo utilizando la columna HiTrap SP FF (intercambiador catiónico fuerte) eluida con acetato de amonio 0.01 M pH 5.4 con gradiente escalonado de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M de acetato de amonio.

- ❷ Columna HiTrap SP FF 1 mL

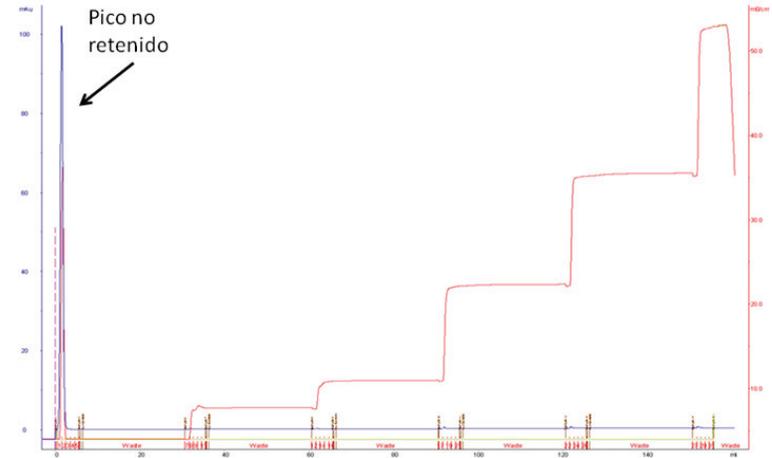


Fig. 13. Cromatograma del extracto crudo utilizando la columna HiTrap SP FF (intercambiador catiónico fuerte) eluida con fosfato de sodio 0.05 M, pH 7.1 y gradiente escalonado de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M de acetato de amonio.

## Gradiente lineal

### ③ Columna HiTrap SP FF 1 mL

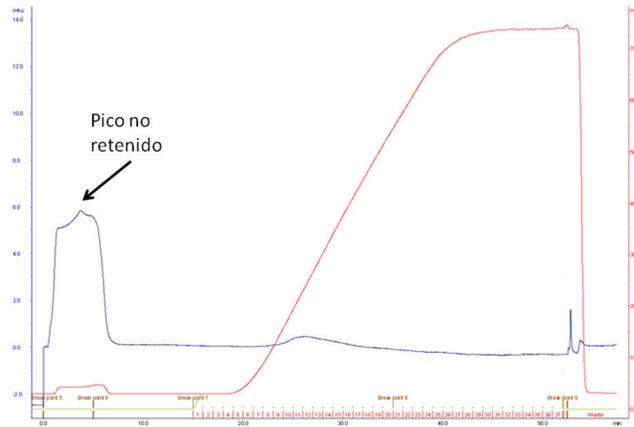


Fig. 14. Cromatograma del extracto crudo utilizando la columna HiTrap SP FF (intercambiador catiónico fuerte) eluida con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.05 M, pH 6.9 y gradiente lineal de la solución amortiguadora inicial + 1M NaCl.

Con la cromatografía de intercambio iónico tampoco se logró la purificación del extracto crudo, ya que todas las proteínas eluyeron antes de que comenzara el gradiente lineal o escalonado de la solución amortiguadora de elución.

### 4.3. Purificación por HPLC de fase reversa

Con este método cromatográfico se obtuvieron 10 fracciones durante los primeros 60 minutos de elución.

Las fracciones mayoritarias fueron la 1, 3 y 5, seguidas de la fracción 4 y finalmente las fracciones 6, 7, 8, 9, 10 y 2.

De cada fracción se colectaron ~1.5 mL, con excepción de las tres fracciones mayoritarias de las cuales se colectaron hasta 3 mL.

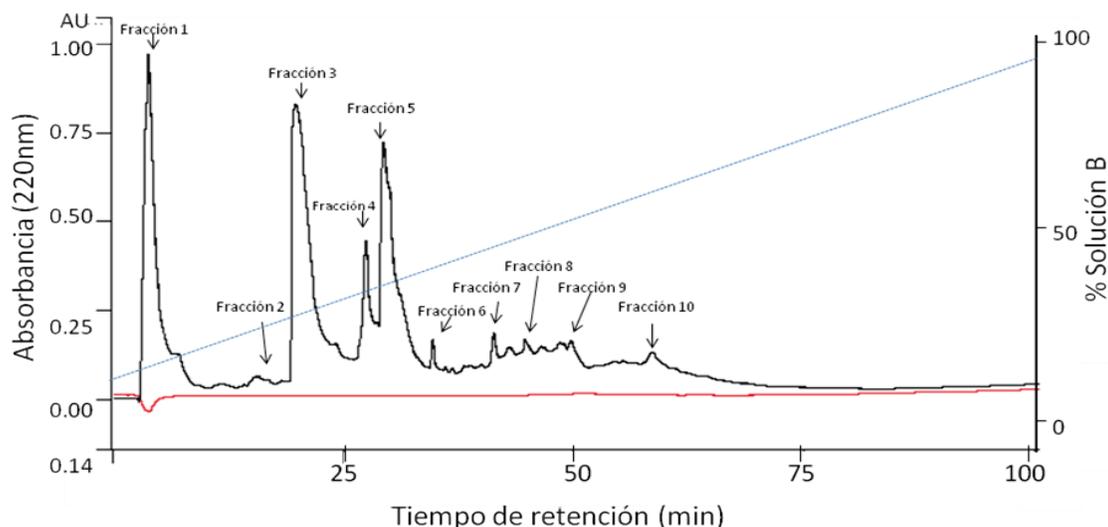


Fig. 15. Cromatograma de la purificación del extracto crudo por HPLC utilizando una columna analítica Vydac C<sub>18</sub> de fase reversa con un gradiente lineal de 5% a 95% de la solución B a un flujo 1 mL/min por 90 min, donde la solución A: 0.1% v/v TFA en agua, y la solución B: 0.09% v/v TFA en 90% v/v en ACN acuoso. La línea negra indica la detección UV de las proteínas a 220 nm. La línea roja indica la línea basal utilizando 1 mL de ACN 5% + TFA 0.004% como blanco. La línea azul punteada representa el porcentaje de la solución B en relación al tiempo de elución.

Los tiempos de retención y la concentración de ACN a la que eluyó cada fracción se resumen en la Tabla 5:

Tabla 5. Características de la elución de cada fracción obtenida por HPLC de fase reversa.

Fracción	Tiempo de retención (min)	Concentración de ACN (%)
1	3.10	7.91
2	13.77	17.94
3	18.20	22.11
4	26.35	29.77
5	28.28	31.58
6	34.05	37.01
7	41.16	43.69
8	43.24	46.64
9	48.13	50.24
10	58.34	59.84

De acuerdo a las características de su elución, las fracciones 1 a 8 corresponden a compuestos hidrofílicos ya que se obtuvieron con una concentración mayor de agua y menor de ACN (menos del 50%).

Las fracciones 9 y 10 presentan propiedades más hidrofóbicas ya que eluyeron a una concentración un poco mayor de ACN.

## 5. Análisis de las fracciones obtenidas por HPLC de fase reversa

### 5.1. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las fracciones se realizó por el método de Lowry. La curva patrón de albúmina se presenta a continuación:

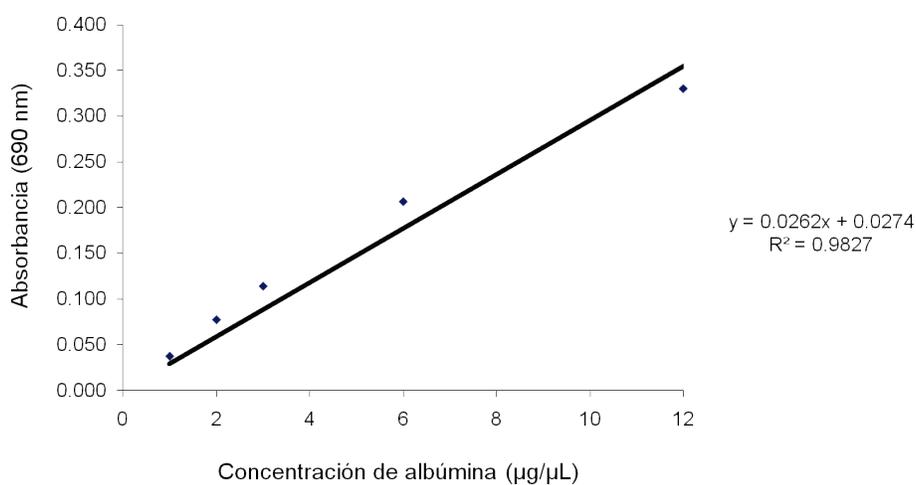


Fig. 16. Curva patrón de albúmina y valor de la regresión lineal

A partir de la curva patrón se obtuvo la concentración de proteínas del extracto crudo y de cada fracción parcialmente purificada, cuyos valores se muestran en la Tabla 6:

Tabla 6. Proteínas totales del extracto crudo y de las fracciones parcialmente purificadas por HPLC de fase reversa.

Muestra	Proteínas totales ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Extracto crudo	51.19
Fracción 1	8.57
Fracción 2	0.26
Fracción 3	0.65
Fracción 4	4.91
Fracción 5	8.59
Fracción 6	2.13
Fracción 7	1.47
Fracción 8	1.45
Fracción 9	2.24
Fracción 10	0.05
Total fracciones	30.32

La concentración de proteínas del extracto crudo fue de  $51.19 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Las fracciones 1 y 5 presentaron la mayor concentración de proteínas con  $\sim 8.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de manera individual. Las fracciones 4, 9 y 6 presentaron 4.9, 2.24 y  $2.13 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  respectivamente. El resto de las fracciones presentaron una concentración menor al  $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de proteínas totales de manera individual.

Con estos resultados se calcularon los rendimientos de cada fracción, los cuales se muestran en la siguiente gráfica:

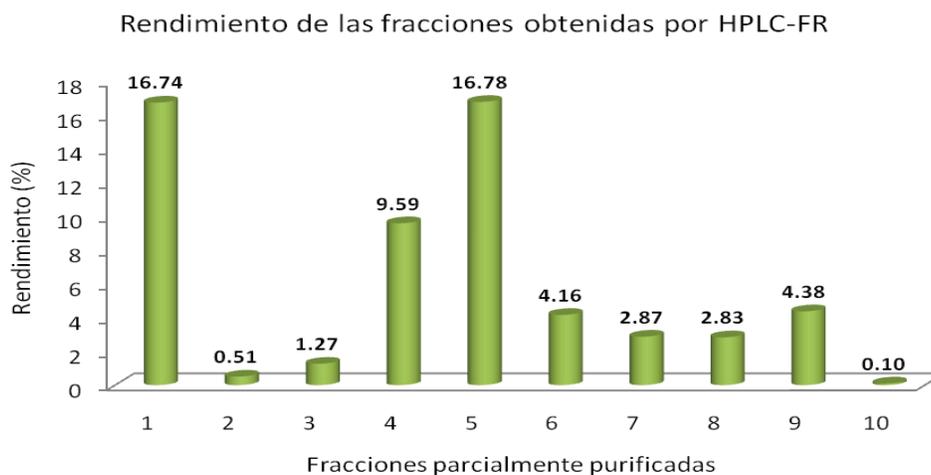


Fig. 17. Gráfica de rendimientos de cada fracción obtenida por HPLC de fase reversa.

Los porcentajes de rendimiento para cada fracción se calcularon respecto a los 51.19  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  del extracto crudo inyectado inicialmente (100%).

Los resultados muestran que la fracción 1 tuvo un rendimiento del 16.74%, la fracción 5 del 16.78% y la fracción 9 del 9.59%, siendo las fracciones con los porcentajes de rendimiento más altos.

El resto de las fracciones presentaron porcentajes individuales menores al 5% y en conjunto correspondieron al 16.12%.

## 5.2. Electroforesis SDS-PAGE

El perfil proteico de las 10 fracciones obtenidas se realizó en geles de acrilamida al 10% y 15 % con la finalidad de mejorar la resolución de las bandas proteicas de cada fracción de acuerdo a su masa molecular. La concentración de proteínas utilizadas de cada fracción se muestra a continuación:

Tabla 7. Concentración de proteínas utilizada de cada fracción para los geles de acrilamida al 10 y 15%.

Fracción	Concentración de proteínas ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
1	2.85
2	0.26
3	0.21
4	1.63
5	2.86
6	2.13
7	1.47
8	1.45
9	2.24
10	0.05

El perfil electroforético y el análisis de las bandas proteicas notorias de cada fracción obtenida se muestra a continuación en la Fig. 18 y Tabla 8 respectivamente:

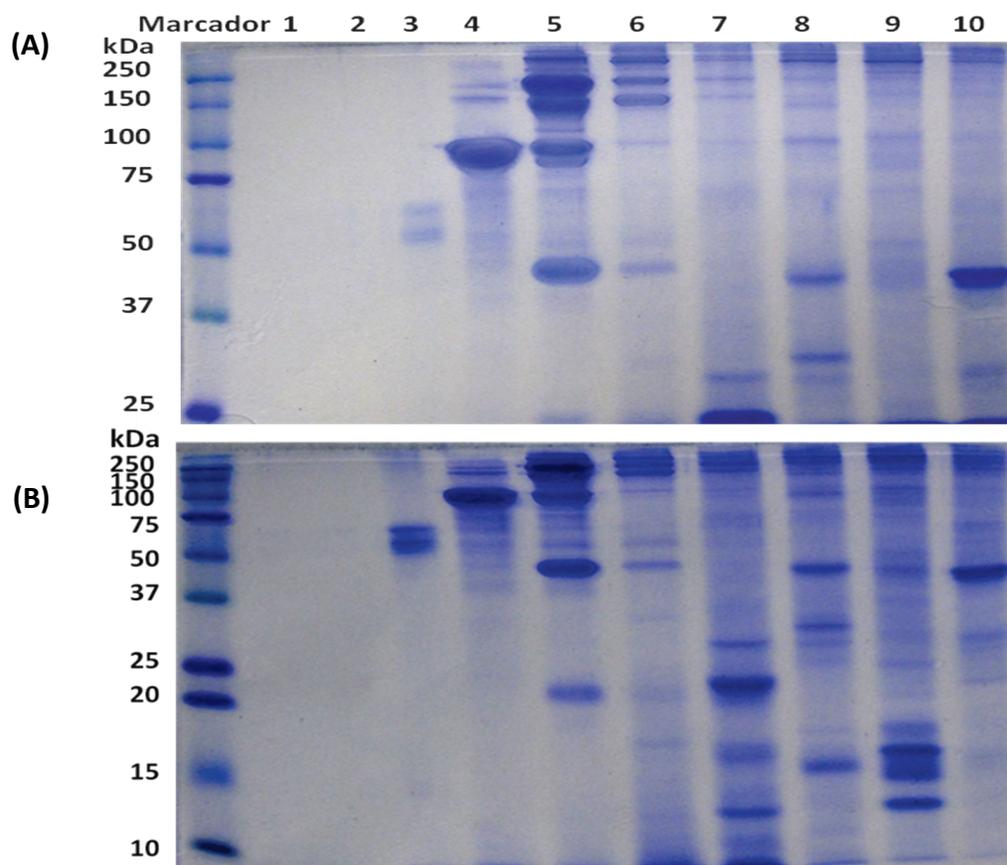


Fig. 18. Análisis SDS-PAGE de las fracciones parcialmente purificadas por HPLC de fase reversa con geles al (A) 10% y (B) 15% de acrilamida. Marcadores moleculares GE Healthcare; los carriles 1 al 10 corresponden a las fracciones parcialmente purificada.

Tabla 8. Identificación de las bandas notorias de las fracciones parcialmente purificadas por HPLC de fase reversa.

Fracción	No. total de bandas	Bandas notorias (masa molecular en kDa)
1	0	-
2	0	-
3	2	50, 60
4	1	95
5	6	45, 100, 120, 150, 250, >250
6	6	45, 50, 100, 150, 250, >250
7	8	12, 17, 20, 30, 100, 150, 250, >250
8	8	15, 30, 32, 50, 100, 140, 250, >250
9	8	12, 14, 17, 18, 25, 50, 100, >250
10	3	27, 45, >250

Las fracciones 1 y 2 no presentaron bandas proteicas visibles en ambos geles.

Las fracciones 7, 8 y 9 presentaron el mayor número de bandas, con un total de 8, seguidas de la fracción 5 y 6 con 6 bandas, la fracción 10 con 3 bandas, la fracción 3 con 2 bandas y finalmente la fracción 4 con una sola banda.

Las fracciones 7, 8 y 9 son las que presentaron mayor número de bandas de menor masa molecular, mientras que las demás fracciones presentan un perfil más amplio de bandas proteicas.

Todas las fracciones, con excepción de las fracciones 1, 2 3 y 4, presentan bandas mayores a 250 kDa por lo que al parecer este método cromatográfico no es el más adecuado para el fraccionamiento correcto de las proteínas más grandes de este veneno.

### 5.3. Identificación de los efectos neurotóxicos mediante bioensayos con cangrejos

Se utilizaron cangrejos de la especie *C. maenas*. En este bioensayo sólo se probaron las fracciones que tuvieron actividad sobre los nAChR del subtipo muscular, es decir, las fracciones 4, 5 y 9.

Las reacciones y tiempos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 9. Reacciones provocadas por las fracciones 4, 5 y 9 en los bioensayos con cangrejos *C. maenas*.

Reacción	Tiempo		
	Fracción 4	Fracción 5	Fracción 9
Incoordinación motora	Inmediata	Inmediata	Inmediata
Estiramiento de patas	5s	-	-

Como se observa en la Tabla 9, las fracciones sólo provocaron incoordinación motora y estiramiento de patas en este bioensayo, a diferencia del extracto crudo que provocó un mayor número de reacciones (Tabla 4).

## 6. Caracterización electrofisiológica de las fracciones parcialmente purificadas

### 6.3. Evaluación electrofisiológica

Las fracciones 4, 5 y 9 presentaron actividad sobre los nAChR del subtipo muscular en la evaluación.

Su identificación en el fraccionamiento por HPLC de fase reversa se muestra en la Fig. 20:

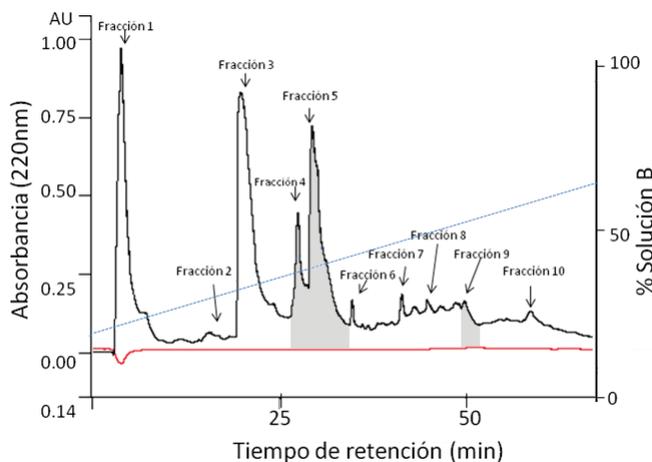


Fig. 19. Cromatograma de la purificación del extracto crudo por HPLC utilizando una columna Vydac C<sub>18</sub> de fase reversa indicando las fracciones con que presentaron actividad en los nAChR del subtipo muscular fetal (color gris). La columna se eluyó utilizando un gradiente lineal de 5% a 95% de la solución B a un flujo 1 mL/min por 90 min, donde la solución A: 0.1% v/v TFA en agua, y la solución B: 0.09% v/v TFA en 90% v/v en ACN acuoso.

Las fracciones 4 y 5 son picos mayoritarios con tiempos de retención entre los 26 y 28 min. Por su parte, la fracción 9 es parte de otro grupo de fracciones siendo la única que presentó actividad sobre los nAChR. Su tiempo de retención fue de 48 min. Las tres fracciones con actividad provocaron un bloqueo de las corrientes generadas por ACh. Las características y porcentajes de bloqueo se presentan a continuación para cada fracción.

La fracción 4 provocó un bloqueo de las corrientes mediadas por los nAChR musculares. El bloqueo fue reversible de manera inmediata al restaurar el flujo de solución ND96 y fue visible al aplicar el pulso de ACh después del baño estático de ND96 y fue visible al aplicar el pulso de ACh después del baño estático.

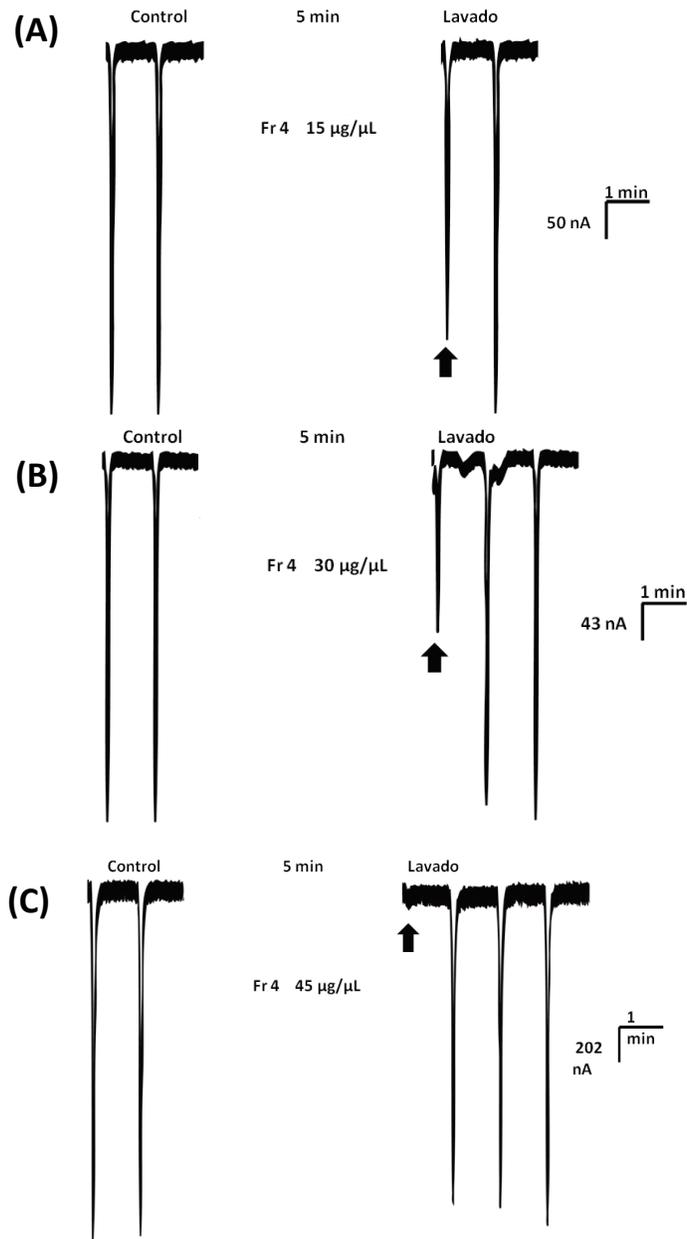


Fig. 20. Bloqueo provocado por la fracción 4 sobre los nAChRs. (A) 15 µg/µL provocó un bloqueo del 27%, (B) 30 µg/µL provocó un bloqueo del 50% y (C) 45 µg/µL provocó un bloqueo del 96%. Las flechas indican el bloqueo de las corrientes al aplicar el primer pulso de ACh 1 µM después del baño estático de 5 min.

La fracción 5 provocó un bloqueo reversible inmediato de las corrientes generadas por ACh. Sin embargo, esta fracción también afectó la integridad de la membrana de los ovocitos probados, ya que como se aprecia en los tres paneles de la Fig. 21, ninguno de los trazos control se mantuvo en los valores óptimos del control después del baño estático de 5 min (flechas punteadas). El efecto reversible inmediato sólo se puede apreciar en los paneles A y B, ya que en el panel C el daño a la membrana del ovocito fue tan severo que su recuperación fue muy lenta como si se tratara de un efecto reversible paulatino o como si no hubiera recuperación del todo. Incluso, en algunas ocasiones, la mayor concentración probada, 76.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , provocó la muerte del ovocito.

Los porcentajes de bloqueo con cada concentración utilizada de esta fracción se presentan a continuación:

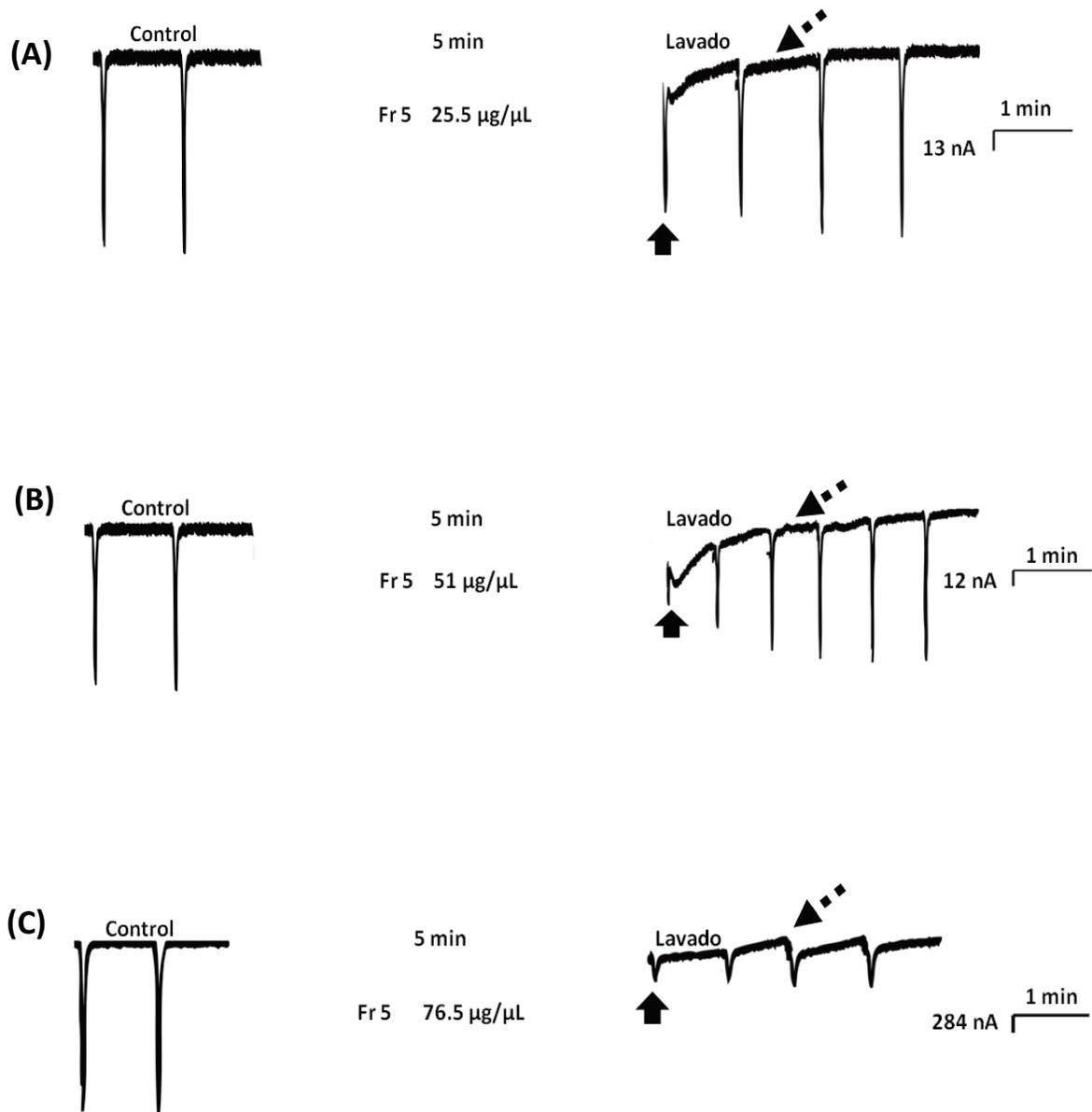


Fig. 21. Bloqueo provocado por la fracción 5 sobre los nAChRs. (A) 25.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  provocó un bloqueo del 22%, (B) 51  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  provocó un bloqueo del 38% y (C) 76.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  provocó un bloqueo del 87%. Las flechas continuas indican la aplicación del primer pulso de ACh 1  $\mu\text{M}$  después del baño estático de 5 min. Las flechas punteadas indican las variaciones en los trazos control reflejando el daño de la membrana provocado por esta fracción.

La fracción 9 provocó un bloqueo, el cual fue reversible de manera inmediata al restaurar el flujo de solución ND96 y aplicar el pulso de ACh.

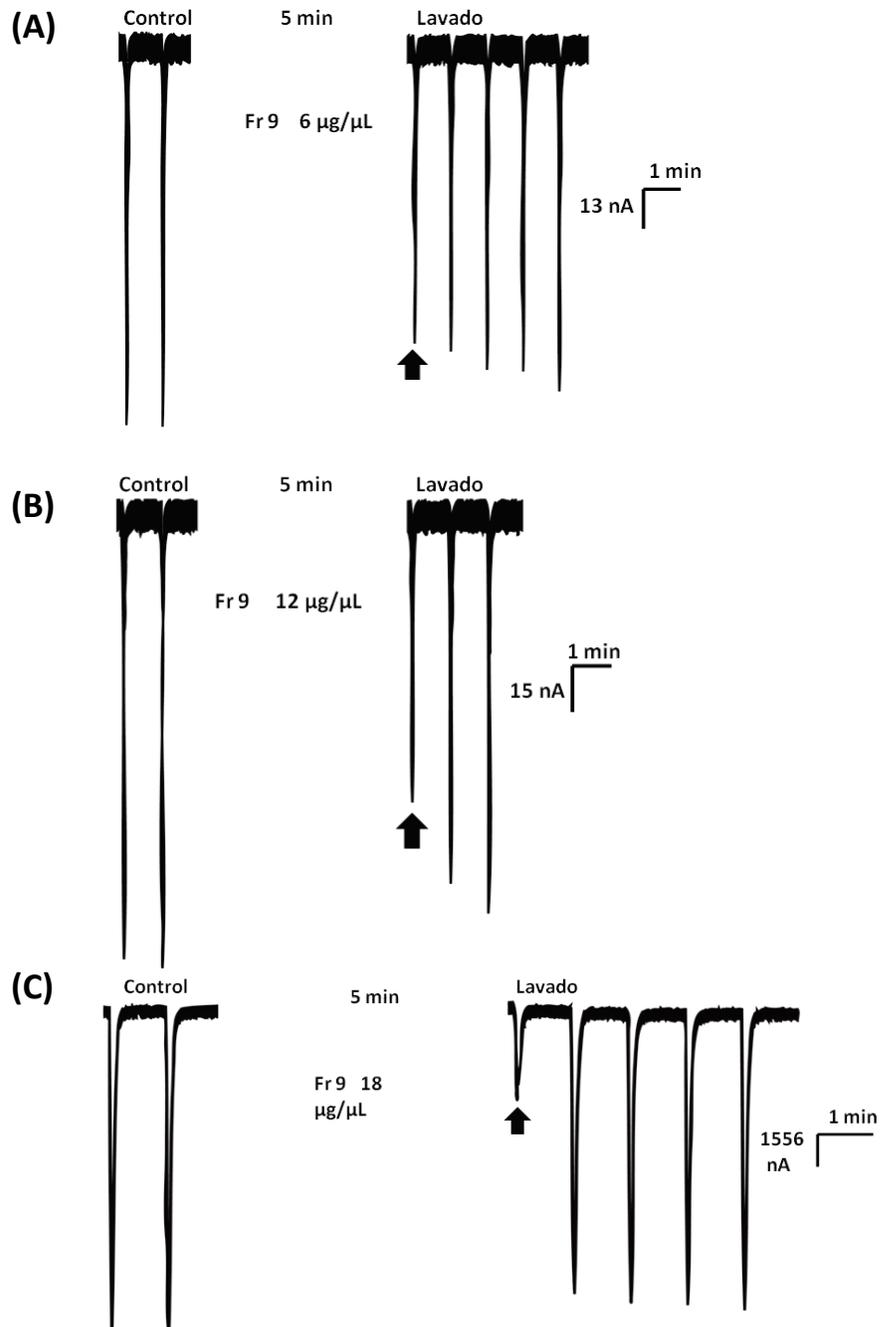


Fig. 22. Bloqueo provocado por la fracción 9 sobre los nAChRs. (A) 6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  provocó un bloqueo del 22%, (B) 12  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  provocó un bloqueo del 36% y (C) 18  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  provocó un bloqueo del 72%. Las flechas indican el bloqueo de las corrientes al aplicar el primer pulso de ACh 1  $\mu\text{M}$  después del baño estático de 5 min.

En la Tabla 10 se resumen los porcentajes de inhibición provocados por las diferentes concentraciones probadas de la fracción 4, 5 y 9:

Tabla 10. Inhibición de las corrientes provocada por las fracciones 4, 5 y 9 en las corrientes mediadas por los nAChR de subtipo muscular.

Fracción	Concentración (µg/µL)	Inhibición de corriente (%)
4	15	27
	30	50
	45	96
5	25.5	22
	51	38
	76.5	87
9	6	22
	12	36
	18	72

Con estos datos se realizó la curva dosis – respuesta de las fracciones, la cual se muestra a continuación:

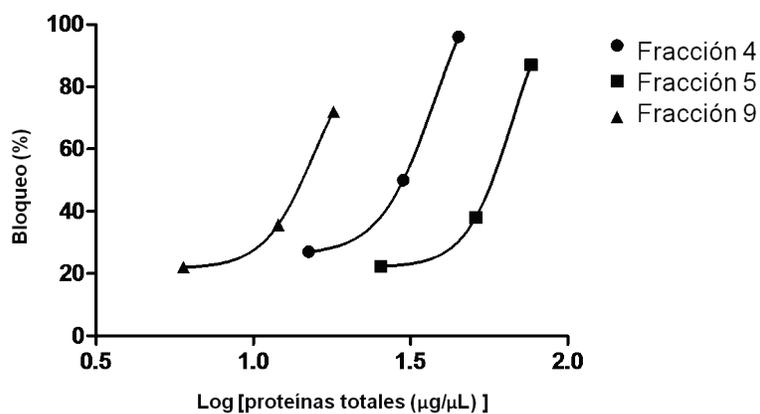


Fig. 23. Curvas dosis – respuesta del bloqueo provocado por las fracciones 4, 5 y 9 sobre los nAChR del subtipo muscular fetal. Cada punto corresponde a ensayos realizados en tres ovocitos de manera independiente.

Con la curva dosis-respuesta se calcularon los valores de concentración media inhibitoria ( $IC_{50}$ ) para cada fracción. Sin embargo, estos valores son sólo aproximaciones ya que las fracciones no son puras.

La fracción 4 tuvo un valor  $IC_{50}$  estimado de 37.80  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Esta fracción provocó el mayor porcentaje de bloqueo de las corrientes el cual fue del 96% al aplicar 45  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de esta fracción.

Por su parte, la fracción 9 fue la que presentó mayor actividad sobre los nAChR ya que su  $IC_{50}$  fue la menor de las tres fracciones, cuyo valor se estimó en 15.53  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . El máximo bloqueo obtenido con esta fracción fue del 72% aplicando 18  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de esta fracción.

Finalmente la fracción 5 fue la que presentó menor actividad sobre los nAChR, ya que su  $IC_{50}$  fue el más alto calculado en 66.77  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

#### 6.4. Ensayos de competencia por los sitios de unión de ACh

La toxina de coralillo utilizada como control es un antagonista competitivo en los nAChR del subtipo muscular fetal, ya que actúa específicamente en los sitios de unión para la ACh.

En este ensayo, 1.5  $\mu\text{M}$  de la toxina de coralillo provocó un bloqueo del 98% de las corrientes generadas por ACh 1  $\mu\text{M}$  después de un baño estático de 5 min. Dicho bloqueo fue reversible pero de forma paulatina como se muestra en la Fig. 24:

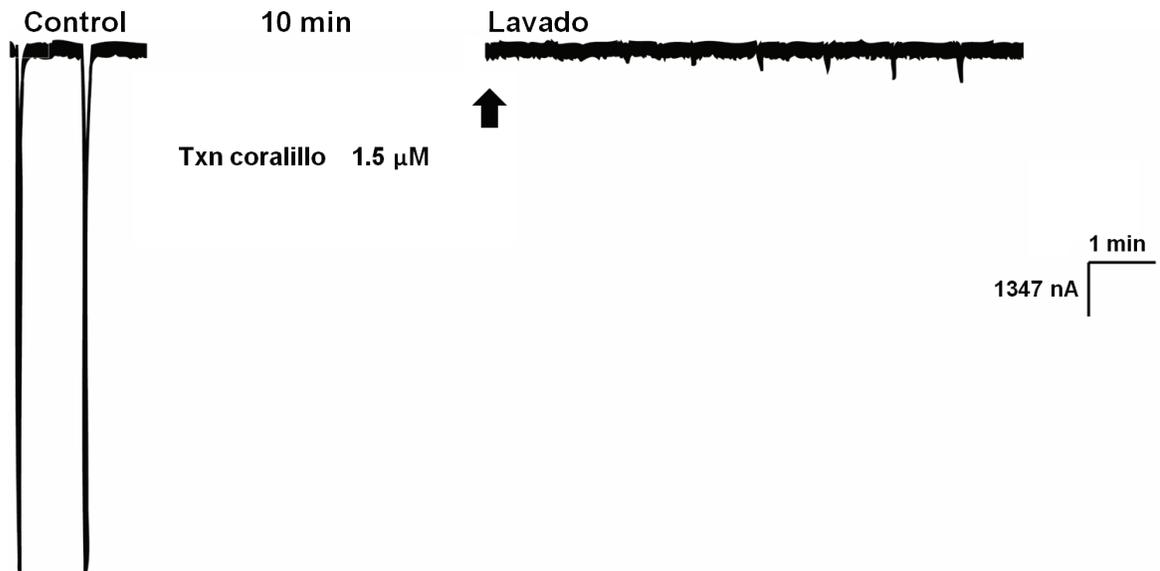


Fig. 24. Bloqueo de las corrientes provocado por la toxina de coralillo 1.5  $\mu\text{M}$  aplicada en baño estático por 5 min. La flecha indica el bloqueo de la corriente al aplicar el primer pulso de ACh después del baño estático.

Los resultados de la preincubación de las fracciones en los receptores y la aplicación posterior de la toxina de coralillo se muestran a continuación:

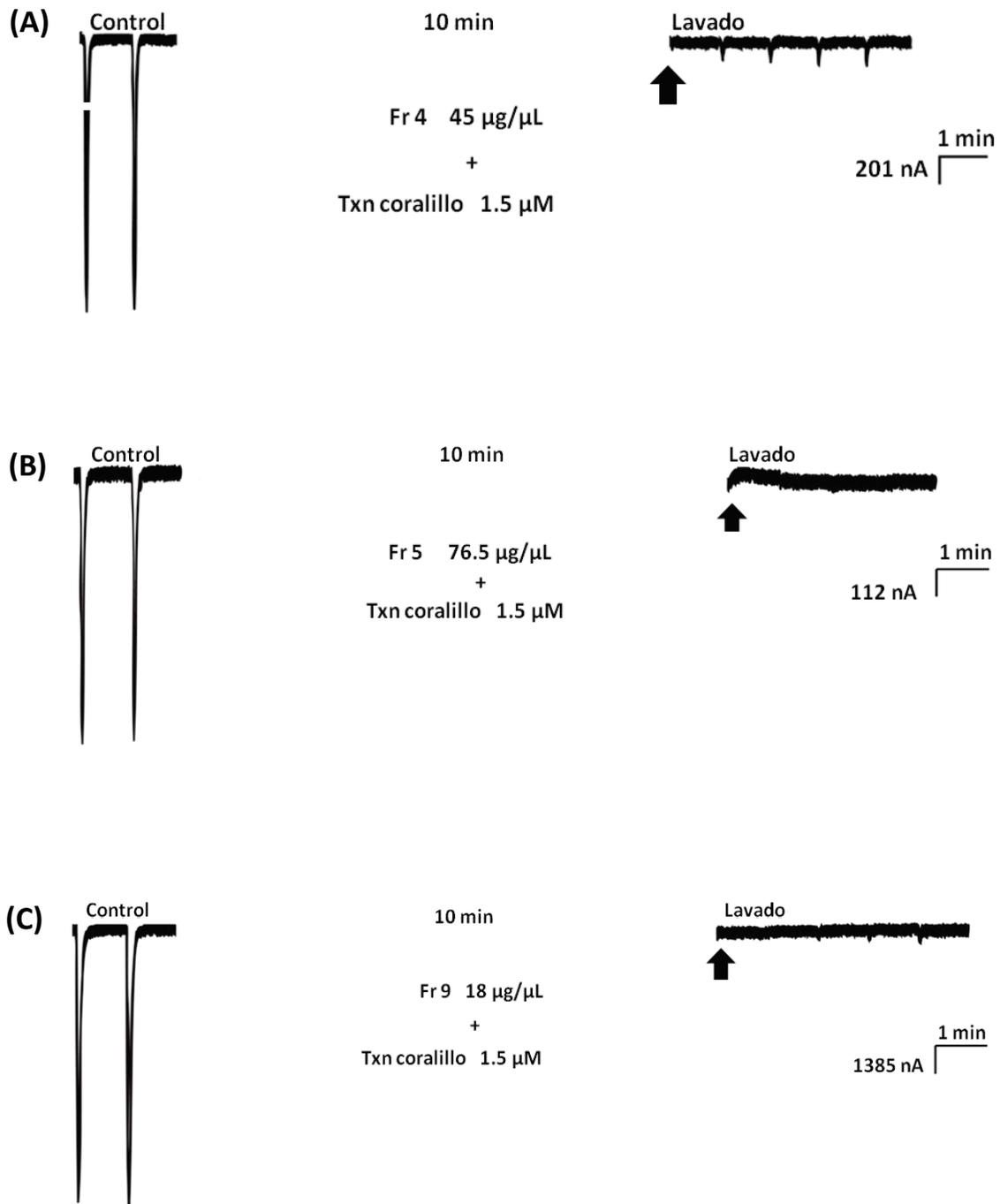


Fig. 25. Ensayo de competencia por los sitios de unión de ACh en los nAChR. (A) Al colocar 45  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de la fracción 4 y 1.5  $\mu\text{M}$  de la toxina de coralillo se provocó un bloqueo del 98%, (B) con 76.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de la fracción 5 y 1.5  $\mu\text{M}$  de la toxina de coralillo se obtuvo un bloqueo del 97% y (C) 18  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de la fracción 9 y 1.5  $\mu\text{M}$  de la toxina de coralillo provocó un bloqueo del 99% de las corrientes generadas por ACh 1  $\mu\text{M}$ . Las

flechas indican la primera corriente generada al aplicar por el pulso de ACh 1  $\mu$ M después de los 10 min de baño estático.

Como se observa en la Fig. 25, en los tres casos el bloqueo fue reversible de manera paulatina y tuvo un promedio de inhibición del 98%. Sin embargo, este bloqueo corresponde al efecto caracterizado para la toxina de coralillo (Fig. 24). Por lo tanto, las fracciones 4, 5 y 9 no fueron capaces de bloquear la unión de la toxina de coralillo a pesar de su preincubación en los receptores por 5 min.

## DISCUSIÓN

### Métodos de extracción y almacenaje del veneno

La extracción del veneno de *Aurelia aurita* se realizó a partir del margen tentacular completo, ya que es una zona corporal con una alta concentración de nematocistos [5].

Algunas proteínas del tejido tentacular pudieron ser liberadas en la homogeneización del margen completo. Sin embargo, los perfiles proteicos del veneno obtenidos por este método [47] coinciden con los obtenidos de nematocistos aislados [42, 46].

Además, con este método se han obtenido un gran número de neurotoxinas del margen tentacular de otros cnidarios como de anémonas de las especies *Anthopleura* sp. [59, 60], *Parasicyonis actinostoloides* [61] y *Bunodosoma granulifera* [62], así como de la cubomedusa *Carybdea marsupialis* [9] y de la medusa *Chrysaora quinquecirrha* [27].

Para la preservación de las propiedades tóxicas del veneno fue de suma importancia el uso de inhibidores de proteasas durante su extracción dada la naturaleza proteica del extracto crudo [9, 47 63]. De esta manera, se evitó la degradación de los compuestos peptídicos y ayudó a mantener las propiedades tóxicas del veneno por más tiempo [63].

Además, la liofilización y congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  resultaron ser los mejores métodos para el almacenamiento y preservación del extracto crudo y las fracciones parcialmente purificadas [16, 18, 64].

## Purificación del extracto crudo y perfiles electroforéticos

El veneno de *A. aurita* presentó un rango proteico entre los 10 y 250 kDa (Figs. 18 y 19). Este mismo perfil ha sido reportado por Radwan *et al.* (2001) [42], Segura-Puertas *et al.* (2002) [47] y Helmholtz *et al.* (2010) [46] para esta especie, y se encuentra dentro del rango de los perfiles proteicos del veneno de otros organismos de la clase Scyphozoa [17, 18, 65, 66].

En este trabajo, no fue posible la purificación del veneno de *A. aurita* por exclusión molecular utilizando el medio Sephadex G-200, ya que no hubo una correcta separación de los componentes del veneno (Figs. 7 y 8). Sin embargo, en otro trabajo se obtuvieron fracciones menores a 65 kDa utilizando medios de exclusión molecular similares [42].

De igual manera, en este trabajo tampoco fue posible el fraccionamiento del veneno por cromatografía de intercambio iónico (Fig. 9 a 14 y Tabla 2). En contraste, Segura-Puertas *et al.* (2002) [47] logró la obtención de dos bandas proteicas de 45 y 66 kDa del veneno de esta medusa utilizando los medios de exclusión molecular Sephadex G-200 y G-100, así como el intercambiador aniónico DEAE Sephadex A-25.

Las condiciones cromatográficas pudieron ser un factor importante para la purificación del veneno de *A. aurita*, ya que la preparación de las soluciones amortiguadoras, los parámetros de equilibrio y elución de las columnas pudieron afectar la estabilidad de las proteínas del veneno o anular su interacción con la fase estacionaria de las columnas [10, 63, 67]. Además, la composición idónea de las soluciones

amortiguadoras de equilibrio y elución de las columnas depende del punto isoelectrico de las proteínas de la muestra, dato que aún se desconoce para el veneno de *A. aurita*.

Asimismo, los compuestos proteicos de la muestra pudieron interaccionar entre ellos formando agregados insolubles, los cuales no pudieron ser fraccionados correctamente [10, 67].

Finalmente, el veneno de *A. aurita* pudo fraccionarse por el método cromatográfico HPLC de fase reversa con base en las propiedades hidrofóbicas de sus compuestos proteicos [68].

Los perfiles electroforéticos de los 10 picos obtenidos permitieron la identificación de las bandas proteicas de cada fracción (Fig. 18). La comparación de estas bandas se analizó en geles con diferentes concentraciones de acrilamida ya que esta variación permite una mejor resolución de las bandas proteicas de acuerdo a su masa molecular [69]. De esta manera, el gel de acrilamida al 10% presentó una mejor resolución de las proteínas de mayor masa molecular, mientras que el gel al 15% permitió una mejor resolución de las proteínas de menor masa molecular (Fig. 18 y 19; Tabla 8).

Las fracciones 1 y 2 no presentaron bandas proteicas en ambos geles, como se observa en las Figs. 18 y 19. La fracción 1 muy probablemente no presentó bandas proteicas visibles debido a una alta concentración de proteínas de masa molecular muy baja las cuales no fueron retenidas en los geles (Tabla 8) [69] o a una alta concentración de sales y otros componentes no proteicos que provocaron una alta lectura en el sistema de detección UV del cromatógrafo.

Por su parte, la fracción 2 corresponde a un pico muy pequeño del fraccionamiento del veneno (Fig. 19) con una concentración de proteínas muy baja ( $0.26 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), por lo que éstas probablemente no fueron visibles en los geles de acrilamida al teñir con azul de Coomassie. Por esta razón, se sugiere utilizar la tinción con plata ya que es un método con mayor sensibilidad para la detección de péptidos y proteínas en geles de poliacrilamida [70].

Todas las demás fracciones presentaron perfiles proteicos diferentes, pero al parecer las bandas de mayor masa molecular (superiores a los 250 kDa) se presentan en todos los carriles, lo que indica que el fraccionamiento con HPLC de fase reversa no fue adecuado para la separación de los componentes proteicos más grandes del veneno de esta medusa (Figs. 18 y 19), en gran medida por el tamaño de partícula empleada en la columna.

En contraste, este fraccionamiento fue efectivo para la separación de los componentes proteicos de menor masa molecular, dado que las fracciones presentaron diferentes bandas proteicas entre los 10 y 250 kDa.

Esta técnica cromatográfica ha resultado sumamente útil en el fraccionamiento de otros compuestos proteicos pequeños como toxinas vasoconstrictoras (15 y 20 kDa), y hemolisinas (30 kDa) del coral de fuego *Millepora complanata* [24] y neurotoxinas de caracoles del género *Conus* (de13a =  $\sim 3\text{kDa}$  y di16a =  $\sim 5\text{kDa}$ ) [71, 72] y de la anémona *Bundusoma granulifera* (GRX=4.9 kDa) [62], por citar algunos ejemplos.

Aunque algunas fracciones del veneno de *A. aurita* parecen compartir ciertas bandas proteicas intermedias ( $\sim 15$ ,  $\sim 20$  y  $\sim 50$  kDa), no es posible realizar esta comparación con

certeza ya que puede resultar subjetiva al no poder apreciar a simple vista con este método las pequeñas variaciones en las masas moleculares de los componentes.

Asimismo estas bandas pueden corresponder a un mismo compuesto proteico con alguna modificación post – traduccional lo que le confiere ligeras variaciones en su masa molecular y en sus tiempos de elución, como lo reportado por López-Vera (2007) [73] al aislar dos  $\alpha$ -conotoxinas, SrIA y SrIB, del veneno del caracol *Conus spurius*. El péptido SrIA, presentó una carboxilación en los dos residuos de glutamato en su secuencia de aminoácidos, por lo que este péptido tuvo una mayor masa molecular y un menor tiempo de retención en su fraccionamiento por HPLC de fase reversa [73].

En cualquier caso, es necesaria la repurificación de las fracciones para obtener los compuestos proteicos lo más puros posibles, ya que sólo de esta manera se pueden determinar sus masas moleculares con exactitud [69].

Son pocos los compuestos proteicos puros obtenidos del veneno de organismos de la Clase Scyphozoa debido a las dificultades en su purificación y análisis [15, 16, 17, 18].

Uno de los compuestos puros que se han logrado obtener corresponde a una glicoproteína citotóxica obtenida del veneno de la medusa *Cyanea lamarckii*, la cual fue purificada por cromatografía de afinidad en lectina. Este compuesto presentó una masa molecular de 6.85 kDa determinada por la técnica de MALDI-TOF [11].

Otro compuesto peptídico puro fue obtenido del cuerpo de la medusa *A. aurita*, el cual se purificó por HPLC con una columna Macrosphere-300 C<sub>18</sub> de fase reversa y presentó una masa molecular de 4.29 kDa determinada con la técnica MALDI-MS [68].

Aunque este compuesto no se obtuvo del veneno de los nematocistos, sus características estructurales son de gran importancia para el estudio de las toxinas de los cnidarios, ya que presenta una estructura muy similar a una toxina bloqueadora de canales de potasio (HmK) purificada del veneno de la anémona *Heteractis magnifica* [68].

El fraccionamiento del veneno de *A. aurita* por HPLC de fase reversa permitió conocer el rendimiento de este método cromatográfico, el cual se determinó por la concentración de proteínas de las fracciones obtenidas. Los resultados muestran que los rendimientos más altos fueron del 16.74% y 16.78% para las fracciones 1 y 5 respectivamente, mientras que el más bajo fue de 0.10% para la fracción 10 (Fig. 17). Esto indica que después del fraccionamiento y de los procesos de concentración, los rendimientos de las fracciones obtenidas fueron bajos, ya que se situaron en el rango de 0.10% a 16.7% como máximo. Además, el porcentaje de recuperación final fue del 60%, por lo que el resto del material inyectado inicialmente se perdió en el proceso de fraccionamiento (Fig. 17). Este bajo porcentaje de recuperación complica la caracterización y repurificación de las fracciones obtenidas, ya que la cantidad de material será menor conforme aumente el número de pasos en la purificación.

Este bajo rendimiento puede estar relacionado con una baja concentración de proteínas en las fracciones obtenidas o a la absorción de ciertas proteínas en el medio utilizado en las columnas, como lo reporta Brinkman y Burnell (2008) al purificar dos hemolisinas del veneno de la cubomedusa *Chironex fleckeri* con porcentajes de recuperación menores al 14% [10].

## Evaluación electrofisiológica de las fracciones parcialmente purificadas

Se utilizaron nAChR del subtipo muscular fetal dado que estos receptores son los que se esperaría encontrar en el sistema muscular de larvas de peces, crustáceos y moluscos los cuales constituyen el alimento de *A. aurita* [47].

La presencia de nAChR del subtipo muscular en peces y moluscos se ha inferido de la actividad que otras toxinas de origen animal han tenido sobre estos receptores [39]. Uno de los mejores ejemplos son las  $\alpha 3/5$ -,  $\alpha 4/7$ -,  $\alpha A$ - y  $\psi$ -conotoxinas, las cuales tienen una actividad antagonista bien caracterizada sobre este tipo de receptores en peces y moluscos los cuales también constituyen las presas de algunos caracoles marinos [39]. Además, se ha reportado que el sistema locomotor de algunos cangrejos decápodos es sensible a ACh y está activado por motoneuronas del subtipo nicotínico y muscarínico [51, 52].

Las fracciones 4, 5 y 9 provocaron un bloqueo reversible de las corrientes mediadas por los nAChR del subtipo muscular fetal. Estas fracciones presentaron características muy diferentes entre ellas, ya que las fracciones 4 y 5 correspondieron a compuestos hidrofílicos y de gran masa molecular, mientras que los compuestos de la fracción 9 resultaron ser más hidrofóbicos y de menor masa molecular (Tabla 5 y Fig. 19).

La identificación del compuesto proteico que provocó el bloqueo de estos receptores no es posible dada la falta de pureza de las fracciones obtenidas, así como la posibilidad de que el efecto neurotóxico sea provocado por uno o varios compuestos proteicos del veneno [73].

La cinética de disociación observada en la evaluación electrofisiológica indicó que el efecto inhibitorio de las fracciones es reversible de manera inmediata al restaurar el lavado de las membranas de los ovocitos (Figs. 21, 22 y 23). Este fenómeno puede deberse a una baja concentración de las proteínas contenidas en las fracciones probadas así como a una baja afinidad por el receptor [74, 75].

La baja afinidad de las fracciones por los sitios de unión a la ACh en estos receptores se corroboró en el ensayo de competencia, ya a pesar de su preincubación en los receptores por 5 min, no fueron capaces de competir por estos sitios ante una toxina antagonista competitiva como la toxina de coralillo (Fig. 25).

Por lo tanto, la rápida reversibilidad del efecto de bloqueo y la baja afinidad de las fracciones por los sitios de unión a ACh, ponen en evidencia que sus mecanismos de acción son muy similares a un efecto antagonista no-competitivo en este tipo de receptores [74, 76, 77].

Aunque no es posible asegurar el mecanismo de acción de estas fracciones, su efecto puede estar relacionado con un bloqueo del poro del receptor o con una modificación alostérica que provoca cambios conformacionales que resultan finalmente en el cierre del receptor [76].

Algunos ejemplos de otras toxinas bloqueadoras con efecto antagonista no-competitivo y reversible sobre los nAChRs son la neurotoxina neosurugatoxina (NSTX), obtenida del molusco *Babylonia japonica*, la cual presentó un bloqueo de nAChR en la motoneurona D<sub>f</sub> de insectos [74], así como la  $\alpha$ -conotoxina ImII obtenida del caracol *Conus*

*imperialis*, la cual bloqueó el poro del receptor  $\alpha$ -7 nAChR de rata y su disociación completa ocurrió en menos de 5 min [75].

En cuanto a los posibles sitios de unión de las toxinas bloqueadoras con efecto antagonista no-competitivo y reversible sobre los nAChRs se encuentra el sitio propuesto para las  $\psi$ -conotoxinas, PIII E y PIII F, purificadas del veneno del caracol *Conus purpurascens*. Estas conotoxinas presentaron una actividad antagonista no-competitiva en nAChR del subtipo muscular de rayas *Torpedo* y de ratón expresados en ovocitos de *X. laevis*, con un periodo de disociación de 5 a 7 min [77, 78]. Se ha propuesto que debido a la gran similitud entre las  $\psi$ -conotoxinas y las  $\mu$ -conotoxinas (bloqueadoras de canales de Na<sup>+</sup> voltaje-dependientes), uno de los posibles mecanismos de acción de las  $\psi$ -conotoxinas puede ser su unión en el extremo extracelular del poro del receptor [77].

Los valores de IC<sub>50</sub> calculados para las fracciones parcialmente purificadas del veneno de *A. aurita* fueron aproximaciones debido a la falta de pureza. Sin embargo, con estos valores (Fig. 23) y los porcentajes de bloqueo (Tabla 10) fue posible determinar que la fracción 9 fue la que presentó mayor actividad sobre estos receptores (IC<sub>50</sub>=15.53  $\mu$ g/ $\mu$ L), cuyo efecto fue aproximadamente el doble que el de la fracción 4 (37.80  $\mu$ g/ $\mu$ L) y cuatro veces mayor que el de la fracción 5 (66.77  $\mu$ g/ $\mu$ L).

Además de provocar un bloqueo en los nAChR, la fracción 5 provocó una alteración en la integridad de la membrana de los ovocitos (Fig. 21), la cual puede estar asociada con la actividad fosfolipasa A2 que se ha reportado para el veneno de *A. aurita* [13, 42]. Sin embargo, aunque esta actividad sólo se identificó claramente en esta fracción, no es posible

descartar que el resto de las fracciones también presenten esta actividad enzimática a pesar de no ser detectada con la caracterización en ovocitos.

En la identificación de efectos neurotóxicos, el extracto crudo provocó un mayor número de reacciones que las fracciones parcialmente purificadas en los bioensayos con cangrejos (Tablas 4 y 9).

La ausencia de todas las reacciones del efecto neurotóxico se puede explicar por la baja concentración de proteínas de las fracciones obtenidas (Tabla 8), por la pérdida de actividad tóxica debido al tiempo de almacenaje [17], por la influencia de los métodos de concentración y condiciones cromatográficas a las que se sometió la muestra [9, 67] ó debido al fraccionamiento de las toxinas que pudieron estar actuando de manera cooperativa (sinergismo) para provocar el efecto neurotóxico [12].

Al realizar la primera evaluación de las fracciones, se presentó un problema metodológico con los tubos de plástico utilizados en su recolección ya que todas las fracciones presentaron actividad sobre los receptores. Esta actividad se presentó nuevamente al realizar un control de los tubos con diferentes concentraciones de ACN liofilizadas a sequedad, por lo que al parecer los tubos desprendieron algún material que provocó un bloqueo en los receptores o el ACN no fue eliminado totalmente durante la liofilización.

Debido a esto, se utilizaron otros tubos eppendorf de plástico (MTC-150, 1.5 mL) y tubos de vidrio para la recolección y liofilización de las fracciones obtenidas. Por esta razón, es importante realizar un control previo de los tubos para evitar un problema similar.

## CONCLUSIONES

- Los dos nematocistos identificados en el margen tentacular de ejemplares adultos de *Aurelia aurita* fueron heterótricos microbásicos euriteles y átricos isorrizas.
- El veneno de los nematocistos se extrajo por los métodos de adición de agua desionizada, ciclos de congelación-descongelación y homogenización del margen tentacular completo.
- El extracto crudo se fraccionó parcialmente por cromatografía HPLC utilizando una columna analítica Vydac C<sub>18</sub> de fase reversa con un gradiente lineal de 5% a 95% de la solución B a un flujo 1 mL/min por 90 min. Se obtuvieron 10 picos mayoritarios.
- La cuantificación del extracto crudo y de las fracciones parcialmente purificadas se realizó por los métodos de Bradford y Lowry.
- El extracto crudo y las fracciones parcialmente purificadas mostraron un rango de proteínas entre los 10 y 250 kDa utilizando geles de acrilamida al 10%, 12% y 15% por el método SDS-PAGE de Laemmli.
- El efecto neurotóxico del extracto crudo provocó incoordinación motora, estiramiento de patas, espasmos, parálisis flácida y muerte; mientras que las fracciones con actividad en los nAChR musculares provocaron incoordinación motora y estiramiento de patas en los cangrejos utilizados en los bioensayos.
- Las fracciones parcialmente purificadas provocaron un bloqueo de las corrientes mediadas por nAChR del subtipo muscular fetal. Este efecto antagonista fue no-competitivo ya que las fracciones no impidieron la unión de una toxina antagonista competitiva. La mayor actividad sobre estos receptores la presentó la fracción 9, seguida de la fracción 4 y finalmente la fracción 5.

## ANEXOS

### ANEXO I. Preparación de soluciones, geles y soluciones amortiguadoras

#### Obtención del extracto crudo

➡ Inhibidor de proteasas:

1 tableta por cada 10 mL de muestra

#### Electroforesis

➡ Geles:

Geles de resolución

Compuesto	10%	12%	15%
Agua desionizada	4.1 mL	3.35 mL	2.33 mL
1.5 M Tris pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
10% (w/v) SDS stock	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Acrilamida/Bis (30% stock)	3.3 mL	4.0 mL	5 mL
APS (persulfato de amonio)	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
TEMED ((N,N,N',N'tetrametilenetilendamina)	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

Gel de empacamiento

Compuesto	4%
Agua desionizada	6.1 mL
0.5 M Tris pH 8.8	2.5 mL
10% (w/v) SDS stock	100 $\mu$ L
Acrilamida/Bis (30% stock)	1.3 mL
APS (persulfato de amonio)	50 $\mu$ L
TEMED ((N,N,N',N'tetrametilenetilendamina)	10 $\mu$ L

➤ Tampón de carga:

- ◆ Agua desionizada 3.55 mL
- ◆ 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 1.25 mL
- ◆ Glicerol 2.5 mL
- ◆ 10% (w/v) SDS 2.0 mL
- ◆ 0.5% (w/v) azulbromofenol 0.2 mL
- ◆ 2- Mercaptoetanol 500  $\mu$ L

➤ Solución amortiguadora de corrimiento (10X), pH 8.3:

- ◆ Tris base 30.3 g
- ◆ Glicina 144 g
- ◆ SDS 10 g

Disuelto en 1 L

➤ Solución para tinción:

- ◆ Coomassie Blue R-250 0.25 g
- ◆ Metanol 225 mL
- ◆ Ácido acético 46 mL
- ◆ Agua desionizada 230 mL

Mezclar por 15 min, filtrar y guardar a temperatura ambiente

➤ Solución para desteñir:

- ◆ Metanol 400 mL

- ◆ Ácido acético                      100 mL
- ◆ Agua desionizada                  500 mL

### Cromatografía por exclusión molecular

- ➔ Solución amortiguadora de fosfatos de sodio 10 mM, pH 7.0:

A partir de una solución stock 1M de fosfato monobásico y una solución 1M de fosfato dibásico, tomar los siguientes volúmenes de cada una de ellas para llevarlos a pH 7.0:

- ◆ 1 M Fosfato monobásico      42.3 mL
- ◆ 1 M Fosfato dibásico          57.7 mL

Tomar 10 mL de esta solución y llevar a 1 litro.

### Cromatografía de intercambio iónico

- ➔ Solución amortiguadora de acetato de amonio:

Stock 1M:

- ◆ Acetato de amonio                77.08 g

Ajustar pH con ácido acético o hidróxido de sodio y llevar a 1 litro.

- ➔ Solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.1:

A partir de una solución stock 1M de fosfato monobásico y una solución 1M de fosfato dibásico, tomar los siguientes volúmenes de cada una de ellas para llevarlos a pH 7.1:

- ◆ 1 M Fosfato monobásico      31.6 mL
- ◆ 1 M Fosfato dibásico          68.4 mL

Tomar 50 mL de esta solución y llevar a 1 litro.

Para 1 M NaCl, se agregó 58.48 gr de NaCl en 1 L de la solución amortiguadora utilizada.

### HPLC de fase reversa

#### ➤ Solución A:

1 mL de TFA en 1 L de agua grado HPLC

#### ➤ Solución B:

850  $\mu$ L de TFA + 900 mL de ACN + 99.15 mL de agua grado HPLC

### Obtención de ovocitos

#### ➤ Solución OR-2 (20X), pH 7.1 – 7.7:

♦ NaCl	192.8 g
♦ KCl	6.0 g
♦ MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	8.0 g
♦ HEPES	48.0 g

Ajustar pH con 10 N NaOH y llevar a 2 litros. Esterilizar en autoclave.

Se separaran 50 mL de esta solución y se le adicionan 35 mg de colagenasa.

#### ➤ Solución ND96 (20x):

♦ NaCl	224.4 g
♦ KCl	5.96 g
♦ MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	8.2 g
♦ CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	10.6 g

Disolver en 2 L de agua nanopura. Esterilizar en autoclave.

Se separan 500 mL de esta solución y se le adicionan 625  $\mu$ L de gentamicina.

➔ Solución HEPES (20X), pH 7.1 – 7.5:

- ◆ HEPES 47.6 g
- ◆ Ajustar pH con 10N NaOH y llevar a 2 litros. Esterilizar en autoclave.

## ANEXO II. Estadios de desarrollo de ovocitos de *Xenopus laevis*

Tabla 11. Características de los estadios de ovocitos de *X. laevis*. Modificado de Dumont, 1972 [79].

	ESTADIO	TAMAÑO ( $\mu$ )	APARIENCIA GENERAL
<b>Pre-vitelogénico</b>	I	50 a 300	Citoplasma transparente; núcleo y masa mitocondrial claramente visible
<b>Vitelogénico</b>	<b>Temprano</b>	300 a 450	Citoplasma translúcido al inicio, blanco y opaco después ; núcleo y masa mitocondrial visible al inicio del Estadio II
	<b>Medio</b>	450 a 600	Se distingue la pigmentación - café claro al inicio, negrozco uniforme después; área de unión al ovario ligeramente pigmentada
		600 a 1000	Hemisferios vegetal y animal se comienzan a diferenciar
	<b>Tardío</b>	1000 a 1200	Hemisferios claramente delineados en la zona ecuatorial; hemisferio animal de color café claro
<b>Post-vitelogénico</b>	VI	1200 a 1300	Banda ecuatorial sin pigmento

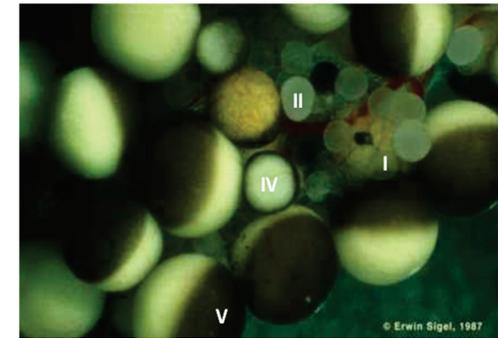


Fig. 26. Estadios de desarrollo de ovocitos de *Xenopus laevis*.

## REFERENCIAS

- [1] Garateix, A., 2005. El mar: fuente de nuevos fármacos. En: *Elementos: Ciencia y cultura*, 58: 39-47.
- [2] Berembaum, M. R., 1995. The chemistry of defense: Theory and practice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 2-8.
- [3] Béress, L., 1982. Biologically active compounds from coelenterates. *Pure & Appl. Chem.*, 54: 1981-1994.
- [4] Garateix, A., García, T., Salceda, E. y Soto, E., 2003. Compuestos de origen marino como instrumentos para el estudio del sistema nervioso. *Avicennia*, 16: 6-12.
- [5] Brusca, R. C. y Brusca, G. J., 1990. Invertebrates. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, 921 pp.
- [6] Segura-Puertas, L. y Rodríguez-Martínez, R., 2007. Phylum Cnidaria. En: Álamo, F. y Rivas, G., (eds.). Niveles de organización en animales. Las Prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 432 pp.
- [7] Carrette, T. y Seymour, J. 2004. A rapid and repeatable method for venom extraction from Cubozoan nematocysts. *Toxicon*, 44: 135-139.
- [8] Bruhn, T., Schaller, C., Schulze, C., Sánchez-Rodríguez, J., Dannmeier, C., Ravens, U., Heubach, J. F., Eckhardt, K., Schmidt Mayer, J., Schmidt, H., Aneiros, A., Wachter, E. y Béress, L., 2001. Isolation and characterization of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Toxicon*, 39: 693-702.
- [9] Sánchez-Rodríguez, J., Torrens, E. y Segura-Puertas, L., 2006. Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolytic proteins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom. *Arch. Toxicol.*, 80: 163-168.
- [10] Brinkman, D., y Burnell, J., 2008. Partial purification of cytolytic venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, 52:853-863.

- [11] Helmholz, H., Naatz, S., Lassen, S. y Prange, A., 2008. Isolation of a cytotoxic glycoprotein from the Scyphozoa *Cyanea lamarckii* by lectin-affinity chromatography and characterization of molecule interactions by surface plasmon resonance. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 871: 60-66.
- [12] Šuput, D., 2009. In vivo effects of cnidarians toxins venoms. *Toxicon*, 54: 1190-1200.
- [13] Nevalainen, T. J, Peuravuori, H. j., Quinn, R. J., Llewellyn, L. E., Benzie, J. A. H., Fenner, P y Winkel, K. D., 2004. Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., Part B*, 139: 731-735.
- [14] Turk, T. y Kem, W. R., 2009, The Phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*, 54: 1031 – 1037.
- [15] Burnett, J. W., 1990. Some natural jellyfish toxins. En: Marine Toxins: Origin, structure and molecular pharmacology. Hall, S. & G. Strichartz (ed.) American Chemical Society, Washington D.C. 968 pp.
- [16] Cuiping, L., Huahua, Y., Jinhua, F., Xiaolin, C. y Pengcheng, L., 2009. Comparative analysis of methods for concentrating venom from jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye. *Chin. J. Oceanol. Llimn*, 27: 172-176.
- [17] Feng, J., Yu, H., Li, C., Xing, R., Liu, S., Wang, L., Cai, S., Pegcheng, L., 2009. Isolation and characterization of lethal proteins in nematocyst venom of the jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye. *Toxicon*, 1-8.
- [18] Kang, C., Munawir, A., Cha, M., Sohn, E., Lee, H., Kim, J., Yoon, W., Lim, D., Kim, E., 2009. Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol Pharmacol* 150: 85-90.
- [19] Sher., D. y Zlotkin, E., 2009. A hydra with many heads: Protein and polypeptide toxins from hydra and their biological roles. *Toxicon*, 54: 1148-1161.

- [20] Ramasamy, S., Isbister, G.K., Seymour, J.E., Hodgson, W.C., 2004. The *in vivo* cardiovascular effects of box jellyfish *Chironex fleckeri* venom in rats: efficacy of pre-treatment with antivenom, verapamil and magnesium sulphate. *Toxicon* 43, 685–690.
- [21] Endean, R., 1987. Separation of two myotoxins from nematocysts of the box jellyfish (*Chironex fleckeri*). *Toxicon* 25, 483–492.
- [22] Klug, M., Weber, J., Tardent, P., 1989. Hemolytic and toxic properties of *Hydra attenuata* nematocysts. *Toxicon*, 27: 325–339.
- [23] Lesh-Laurie, G.E., DiBlasi, S.L., Suchy, P.E., Senturia, J.B., 1989. Inotropic response elicited by nematocyst contents of *Hydra oligactis* (Coelenterata: Hydrozoa). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 94: 249–254.
- [24] Ibarra-Alvarado, C., García, J. A., Aguilar, M. B., Rojas, A., Falcón, A. y Heimer de la Cotera, E. P., 2007. Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol Pharmacol.*, 146: 511-518.
- [25] Dubois, J. M., Tanguy, J. y Burnett, J. W., 1983. Ionic channels induced by sea nettle toxin in the nodal membrane. *Biophysical Journal*, 42: 199-201.
- [26] Carneiro, R. F., Nascimento, N. R., Costa, P. P., Gomes, V. M., Souza, A. J., Oliveira, S. C., Santos Diz Filho, E. B., Zara, F. J., Fonteles, M. C., Oliveira Tomaya, D., Tomaya, M. H. y Santos, C. F., 2011. The extract of the jellyfish *Phyllorhiza punctata* promotes neurotoxic effects. *J. Appl. Toxicol.* Doi 10.1002/jat.1620.
- [27] Warnick, J. E., Weinreich, D. y Burnett, J. W., 1981. Sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) toxin on electrogenic and chemosensitive properties on nerve and muscle. *Toxicon*, 19: 361-371.
- [28] Lassen, S., Helmholz, H., Ruhnau, C. y Prange, A., 2010. Characterisation of neurotoxic polypeptides from *Cyanea capillata* medusa (Scyphozoa). *Hydrobiologia*, 645: 213-221.

- [29] Radwan, F. F. Y., Román, L. G., Baksi, K. y Burnett, J. W., 2005. Toxicity and mAChRs binding activity of *Cassiopea xamachana* venom from Puerto Rico coasts. *Toxicon*, 45: 107-112.
- [30] Cens, T. y Charnet. P., 2007. Cap. 18 Use of *Xenopus* Oocytes to measure ionic selectivity of pore-forming peptides and ion channels. En: Patch-Clamp Methods and Protocols: P. Molnar y J. Hickman (eds.), Vol. 403:18. Ed. Human Press Inc., Totowa, 303 pp.
- [31] Cole, K. S., 1949. Dynamic electrical characteristics of squid axon membrane. *Arch. Sci. Physiol.* 3: 253-8.
- [32] Hodgkin, A. L. y Huxley, A. F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.*, 117: 500-544.
- [33] Dascal, N., 1987. The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22: 317-387.
- [34] Purves, D. Neuroscience, 4 ed., 2008, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 857 pp.
- [35] Arias, H. R., 2006. Marine toxins targeting ion channels. *Mar. Drugs*, 4:37-69.
- [36] Dutertre, S. y Lewis, R., 2006. Toxin insights into nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.*, 72: 661-670.
- [37] Wonnacott, S., Barik, J., 2007. Nicotinic ACh receptors. *Tocris Reviews*, 28: 1-19.
- [38] Castañeda, O., 2000. Toxinas animales: Acciones facilitadoras de la transmisión colinérgica. *Revista Biología*, 14: 1-15.
- [39] McIntosh, J. M., Santos, A. D. y Olivera, B. M., 1999. *Conus* peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annu. Rev. Biochem.*, 68: 59-88.
- [40] Mariottini, G. L. y Pane, L., 2010. Mediterranean jellyfish venoms: a review on scyphomedusae. *Mar. Drugs*, 8: 1122-1152.

- [41] Winkel, K. D., Hawdon, P. J. F., Gershwin, L., Collins, A. G. y Tibballs J., 2003. Jellyfish antivenoms: past, present, and future. *J. Toxicol.*, 22: 115-127.
- [42] Radwan, F. F. Y., Burnett, J. W., Bloom, D. A., Coliano, T., Eldefrawi M. E., Erderly, H., Aurelian, L., Torres, M. y Heimer - de la Cotera, E. P., 2001. A comparison of the toxinological characteristics of two *Cassiopea* and *Aurelia* species. *Toxicon*, 39: 245-257.
- [43] Gröndahl, F., 1988. Interactions between polyps of *Aurelia aurita* and planktonic larvae of scyphozoans: an experimental study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 45: 87-93.
- [44] Di Camillo, C. G., Betti, F., Bo, M., Martinelli, M., Puce, S. y Bavestrello, G., 2009, Contribution to the understanding of seasonal cycle of *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa) scyphopolyps in the northern Adriatic Sea. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 90: 1105-1110.
- [45] Wiebring, A., Helmholz, H., Sötje, I., Lassen, S., Prange, A. y Tiemann, H., 2010. A new method for the separation of different types of nematocysts from Scyphozoa and investigation of proteinaceous toxins utilizing laser catapulting and subsequent mass spectrometry. *Mar. Biotechnol.*, 12: 308-317.
- [46] Helmholz, H., Johnston, B. D., Ruhnau, C. y Prange, A., 2010. Gill cell toxicity of northern boreal scyphomedusae *Cyanea capillata* and *Aurelia aurita* measured by an in vitro cell assay. *Hydrobiologia*, 645: 223-234.
- [47] Segura - Puertas, L., Ávila-Soria, G., Sánchez-Rodríguez, J., Ramos-Aguilar, M. E. y J. W. Burnett, 2002. Some toxinological aspects of *Aurelia aurita* (Linné) from the Mexican Caribbean. *J. Venom. Anim. Toxins*, 8: 269-282.
- [48] Bayazit, V., 2004. Cytotoxic effects of some animal and vegetable extracts and some chemicals on adenohipophyse carcinoma, kidney adenocarcinoma and skin carcinoma cells. *J. Med. Sci.*, 4: 1-10.

- [49] Bayazit, V. y Khan, K. M., 2005. Anticancerogen activities of biological and chemical agents on lung carcinoma, breast adenocarcinoma and leukemia in rabbits. *J. Chem. Soc. Pakistan*, 27: 413-422.
- [50] Kihara, H., Anraku, M., Ohno, M. y Hashimura, S., 1988. Tetrodotoxin - unaffected depolarization of frog induced by the venom of jellyfish (Genus *Aurelia*). *Jpn. J. Physiol*, 38: 839-849.
- [51] Marder, E. y Paupardin - Tritsch, D., 1980. The pharmacological profile of the acetylcholine response of a crustacean muscle. *J. Exp. Biol.* 88: 147-159.
- [52] Cattaert, D., Araque, A., Buño, W. y Clarac, F., 1994. Nicotinic and muscarinic activation of motoneurons in the crayfish locomotor network. *J. Neurophysiol.*, 72: 1622-1633.
- [53] Jones, A. K., Elgar, G. y Sattelle, D. B., 2003. The nicotinic acetylcholine receptors gene family of the pufferfish, *Fugu rubripes*, *Genomics*, 82: 441-451.
- [54] 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.
- [55] Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 – 685.
- [56] Kawasaki, H., Emori, Y. y Suzuki, K., 1990. Production and separation of peptides from proteins stained with Coomassie brilliant blue R-250 after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 191: 332-336.
- [57] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- [58] Östman, C., 2000. A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocyst. *Scientia Marina*, 64 (Supl.1): 31-46.

- [59] Liu, W., Wang, L., Wang, Y., Peng, L., Wu, W., Peng, W., Jiang, X., Tu, H., Chen, H., Yang, P. y Xu, A., 2003. Cloning and characterization of a novel neurotoxin from the sea anemone *Anthopleura* sp. *Toxicon*, 41: 793-801.
- [60] Wang, L., Ou, J., Peng, L., Zhong, X., Du, J., Liu, Y., Huang, Y., Liu, W., Zhang, Y., Dong, M. y Xu, A., 2004. Functional expression and characterization of four novel neurotoxins from sea anemone *Anthopleura* sp. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 313: 163-170.
- [61] Ishikawa, Y., Onodera, K y Takeuchi, A., 1979. Purification and effect of the neurotoxin from the sea anemone *Parasicyonis actinostoloides*. *J. Neurochem.* 33: 69-73.
- [62] Santana, A. N. C., Leite, A. B., França, M. S. F., França, L., Vale, O. C., Cunha, R. B., Ricart, C. A. O., Sousa, M. V. y Carvalho, K. M., 1998. Partial sequence and toxic effects of granulotoxin, a neurotoxic peptide from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. *Braz. J. Med.*, 31: 1335-1338.
- [63] Torres, M., Aguilar, M. B., Falcón, A., Sánchez, L., Radwan F. F. Y., Burnett, J. W., Heimer - de la Cotera, E. P. y Arellano, R. O., 2001. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon*, 39: 1297-1307.
- [64] Radwan, F. F. Y. y Burnett, J., W., 2001. Toxinological studies of the venom from *Cassiopea xamachana* nematocysts isolated by flow cytometry. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*, 128: 65-73.
- [65] Bloom, D. A., Radwan, F. F. y Burnett, J. W., 2001. Toxinological and immunological studies of capillary electrophoresis fractionated *Chrysaora quinquecirrha* (Desor) fishing tentacle and *Chironex fleckeri* Southcott nematocyst venoms. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*, 128: 75-90.
- [66] Marino, A., Morabito, R., Pizzata, T. y La Spada, G., 2008. Effect of various factors on *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphozoa) crude venom-induced haemolysis. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 151: 144-149.

- [67] Othman, Y. y Burnett, J. W., 1990. Techniques applicable for purifying *Chironex fleckeri* (box-jellyfish) venom. *Toxicon*, 28: 821-835.
- [68] Ovchinnikova, T. V., Balandin S. V., Aleshina, G. M., Tagaev A. A., Leonova, Y. F., Krasnodembsky, E. D., Men'shenin A. V. y Kokryakov, V. N., 2006. Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 348: 514-523.
- [69] Nelson, D. L. y Cox M. M., Lehninger, Principles of Biochemistry. 2004. 4<sup>a</sup> Edición, Ed. Freeman, Worth. 1120 pp.
- [70] Switzer, R. C., Merrill, C. R. y Shifrin, S., A highly sensitive stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 98: 231-237.
- [71] Aguilar, M. B., López-Vera, E., Ortiz, E., Becerril, B., Possani, L. D., Olivera, B. M. y Heimer de la Cotera, E. P., 2005. Novel conotoxin from *Conus delessertii* with posttranslationally modified lysine residues. *Biochemistry*, 44: 11130-11136.
- [72] Chen, P., Garrett, J. E., Watkins, M. y Olivera, B. M., 2008. Purification and characterization of a novel excitatory peptide from *Conus distans* venom that defines a novel gene superfamily of conotoxins. *Toxicon*, 52: 139-145.
- [73] López-Vera, E., Aguilar, M., Schiavon, E., Marini, C., Ortiz, E., Cassulini, R. R., Batista, C. V. F., Possani, L. D., Heimer de la Cotera, E. P., Peri, F., Becerril, B. y Wanke, E., 2007. Novel  $\alpha$ -conotoxin from *Conus spurius* and the  $\alpha$ -conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS J.*, 274: 3972-3985.
- [74] Bai, D. y Sattelle, 1993. Neosurugatoxin blocks and  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 23: 161-167.
- [75] Ellison, M., McIntosh, J. M. y Olivera, B. M.,  $\alpha$ -Conotoxins ImI and ImII, similar  $\alpha 7$  nicotinic receptor antagonist act at different sites. *J. Biol. Chem.*, 278: 757-764.

- [76] Choi, S., Kalivretenos, A., Usherwood, P. N. R. y Nakanishi, K., 1995. Labeling of photolabile philanthotoxins with nicotinic acetylcholine receptors: mode of interaction between toxin and receptor. *Chem. Biol.*, 2: 23-32.
- [77] Shon, K., Grilley, M., Jacobsen, R., Cartier, G. E., Hopkins, C., Gray, W. R., Watkins, M., Hillyard, D. R., Rivier, J., Torres, J., Yoshikami, D. y Olivera, B. M., 1997. A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry.*, 36: 9581-9587.
- [78] Van Wagoner, R. M., Jacobsen, R. B., Olivera, B. M., Ireland, C. M., 2003. Characterization and three-dimensional structure determination of  $\psi$ -conotoxin PIIIF, a novel noncompetitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry.*, 42: 6353-6362.
- [79] Dumont, J. N., 1972. *Oogenesis in Xenopus laevis* (Daudin) I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.* 136: 153-180.