



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS  
BIOACTIVOS PROVENIENTES DE LA CUBOMEDUSA *Carybdea*  
*marsupialis* (Lineé, 1758).

# TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
ULISES HERNÁNDEZ GUZMÁN

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros  
Instituto de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Luis Fernando Olguín Contreras  
Instituto de Química, UNAM  
Dr. Baltazar Becerril  
Instituto de Biotecnología, UNAM  
Dra. Victoria Nuria Sánchez Puig  
Instituto de Química, UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

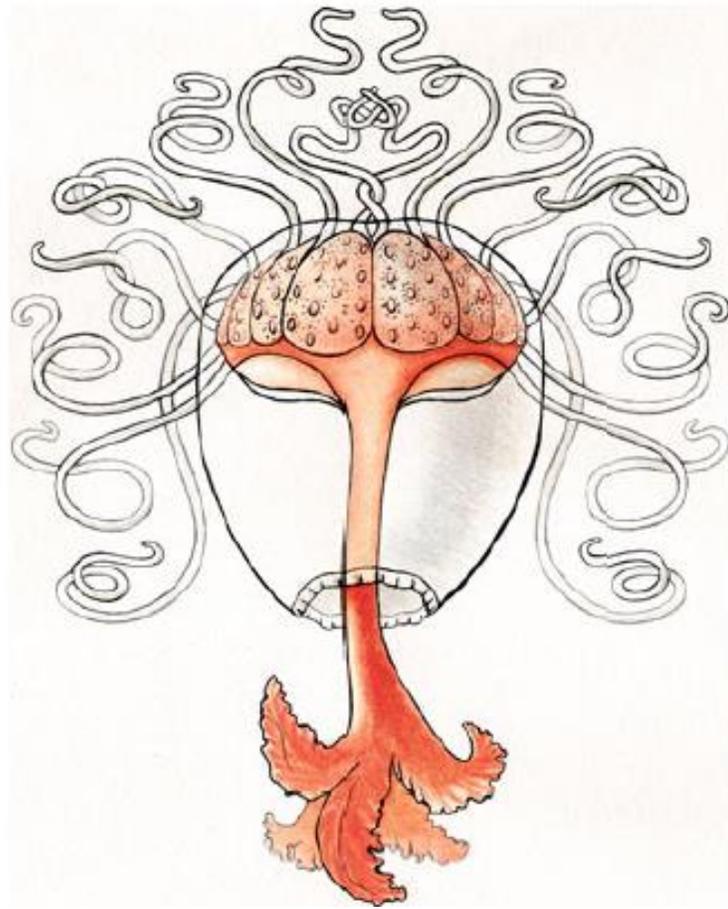


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Anya Lauri, Lauri Projects, Italy; 2016

*Medusa. Interfase entre la ciencia y el arte*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO



INSTITUTO DE QUÍMICA

## MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS

**EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS  
BIOACTIVOS PROVENIENTES DE LA CUBOMEDUSA *Carybdea marsupialis*  
(Lineé, 1758).**

ULISES HERNÁNDEZ GUZMÁN

**DIRECTOR:**

ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS

**ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS**, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor de Investigación en el Instituto de Química, UNAM.

**INFORMA:** que **ULISES HERNÁNDEZ GUZMÁN**, Licenciado en Química Farmacéutica Biológica por la Universidad Nacional Autónoma de México, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título: **“EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS PROVENIENTES DE LA CUBOMEDUSA *Carybdea marsupialis* (Lineé, 1758).”** presenta para optar al grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas por la Universidad Nacional Autónoma de México.

México, D.F. Abril 2017



Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros.

Este trabajo se ha realizado bajo el soporte económico de los proyectos de investigación que se enumeran a continuación:

UNAM-DGAPA

PAPIIT IN201511.

Ulises Hernández Guzmán ha disfrutado de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y apoyo económico para la realización de una estancia de investigación en la Unidad de Venómica Estructural y Funcional del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV) por parte del “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP).



PMDCB/545/2017

**Hernández Guzmán Ulises**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 13 de febrero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Extracción, purificación y caracterización de péptidos bioactivos provenientes de la cubomedusa *Carybdea marsupialis* (Linné, 1758)**", dirigida por el/la Dr(a) **Arreguín Espinosa de los Monteros Roberto Alejandro**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	García Hernández Enrique
VOCAL	González Segura Lilian
VOCAL	Sánchez Puig Nuria Victoria
VOCAL	Del Río Portilla José Federico
SECRETARIO	Corzo Burguete Gerardo

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"Por mi raza hablará el espíritu"**  
**Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de febrero de 2017.**  
**COORDINADOR**



**Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA**

*To anyone who, at least once,  
looking at the horizon wonders, what is there?  
Further away, where the sky joins to the sea.....*

# Agradecimientos

Quiero aprovechar este pequeño espacio para expresar mi más profundo agradecimiento a todos aquellos que con su apoyo han permitido llevar a término este trabajo, sin embargo, debo aceptar que es una tarea difícil, ya que he tenido la dicha de rodearme de gente muy valiosa que de alguna forma ha contribuido a mi desarrollo personal y profesional.

Para comenzar, expreso mi agradecimiento a mi director de tesis Dr. Roberto, por abrirme las puertas de su laboratorio, por sus consejos y por su apoyo para participar en congresos y realizar una estancia en el extranjero.

Del mismo modo agradezco a todos los “Arreguines”, que hicieron de mi estancia en el laboratorio muy agradable, así mismo a los “Nurios”, pero especialmente a los “Abeles” y particularmente al Dr. Abel Moreno por su apoyo y consejo.

A Q.I. Esteban López Sampedro, “Jarocho”, “Luis P” y “Betty” por estar siempre ahí, apoyándome científicamente y personalmente. Agradezco también a Miguel, Alan, Francisco e Ivette por ayudarme cuando lo necesité, por las discusiones científicas de camino a casa, en la biblioteca o en cualquier lugar.

A los “Post-docs”, Ariana y Lazcano, por sus consejos y ayuda en el laboratorio. A Jessica y Angélica por el apoyo y alegrarme el día tanto en clases como en los pasillos del IQ. A todos los estudiantes que han pasado por nuestro laboratorio. Dr. Judith Sánchez-Rodríguez y Biol. Amanda Pérez por proveer la muestra.

También quiero agradecer al Dr. Juan José Calvete Chornet, por darme la oportunidad de aprender por una temporada en su laboratorio, a la Dra. Libia

Sanz Sanz por sus consejos científicos y a todos los “Calvetes” que me hicieron sentir como en casa a pesar de estar tan lejos. Especialmente a Yania y Sara por todo el apoyo y aprender juntos. A Jorge por ser mi amigo tan lejos de casa. Al Dr. Durban y la Dra. Pla por todos los consejos y enseñanzas.

Finalmente, agradezco a mi familia por el apoyo incondicional en todos los aspectos, ya que ellos son los que me han dado el ímpetu necesario para seguir a delante a pesar de los obstáculos. A mi padre y mi madre, por enseñarme siempre con el ejemplo y mostrándome que los únicos límites que existen en el mundo son aquellos que nos inventamos y que la creatividad e imaginación son una buena cura para estos. A mi hermano, por intentar entenderme, por las pláticas de ciencia, experimentos, estancias, la vida y los ratos de ocio.



# Resumen

Los cnidarios son un grupo de animales acuáticos ampliamente distribuidos en los océanos del mundo que a pesar de su anatomía relativamente simple, se han reconocido como animales versátiles, capaces de someter a sus presas y repeler a sus depredadores evolutivamente más sofisticados mediante estructuras celulares especializadas denominadas nematocistos. El veneno de estos organismos contiene enzimas, toxinas formadoras de poro y neurotoxinas. La clase Cubozoa es el grupo de organismos más pequeño dentro de los Cnidarios comprendiendo alrededor de 50 especies y es conocido porque los miembros de esta clase son particularmente tóxicos. *Carybdea marsupialis* es una cubomedusa atlanto-mediterránea de estructura cubica típica capaz de infligir picaduras urticantes y perteneciente al orden *Carybdea*. Hasta la fecha se han reportado en Italia y España casos clínicos que relacionan a *C. marsupialis* con manifestaciones clínicas sistémicas similares a las reportadas en casos del Síndrome de Irukandji (dolor abdominal, náuseas, transpiración copiosa, hipertensión, taquicardia ansiedad y estrés). En el presente trabajo se determinó que el veneno procedente de los nematocistos de los tentáculos y las campanas de *C. marsupialis* posee actividades biológicas relacionadas con el Síndrome de Irukandji y que la toxina Cmt<sub>R</sub>1.1 aislada del veneno de los tentáculos estimula la liberación de catecolaminas en células cromafines mediante la modulación de  $[Ca^{2+}]_i$ , lo cual podría explicar los signos y síntomas reportados en víctimas de envenenamiento debido a la picadura de este organismo. Así mismo se demostró que el veneno procedente de los nematocistos ubicados en las campanas posee actividad citotóxica, proteolítica y neurotóxica.



# Índice

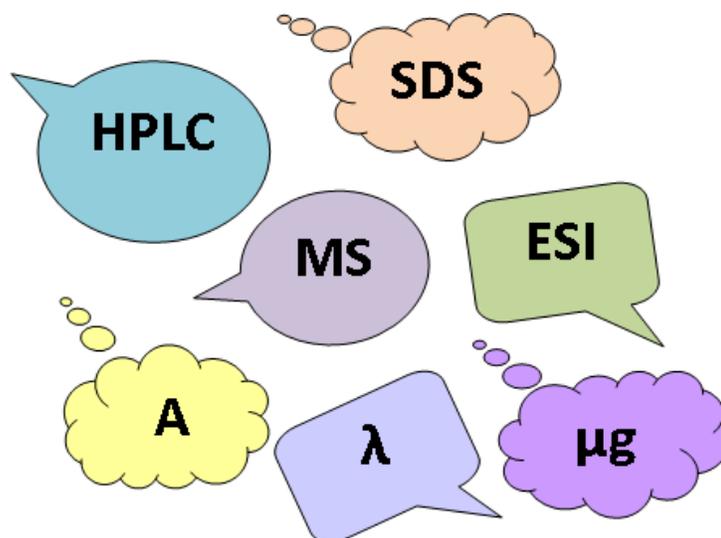


# Índice

Agradecimientos .....	I
Resumen.....	IV
Abreviaturas.....	IX
I.-Introducción .....	1
1.1.- <i>Phylum</i> Cnidaria.....	2
1.1.1-Filogenia de los cnidarios.....	4
1.1.2.-Sistema de suministro de veneno .....	6
1.1.3.-El veneno de los cnidarios.....	7
1.1.4.-Composición general del veneno de los Cnidarios .....	8
1.1.5.-El papel del veneno de los cnidarios en el descubrimiento de nuevos principios activos .	9
1.2.-Clase Cubozoa .....	13
1.2.1- Efectos de las picaduras de cubomedusas en humanos.....	14
1.2.2.-Síndrome de Irukandji.....	16
1.2.3.-Actividades biológicas en venenos de cubomedusas.....	20
1.2.4.-Toxinas de la clase Cubozoa .....	22
1.3.- <i>Carybdea marsupialis</i> .....	25
1.3.1 Distribución y descripción de los nematocistos de <i>C. marsupialis</i> .....	26
II.-Objetivos .....	29
2.2.-Objetivos.....	30
2.3.-Objetivos particulares .....	30
III.-Metodología.....	31
3.1.-Muestreo .....	32
3.2.-Área de estudio .....	32
3.3.-Obtención del extracto crudo .....	34
3.4.-Purificación parcial de toxinas .....	34
3.4.1.-Separación por Amicon.....	34
3.4.2.-Separación por HPLC en fase reversa .....	34
3.4.3.-Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación por espectrometría de masas en tandem.....	35

3.4.4.-BLAST.....	36
3.4.5.-Clustal W .....	36
3.4.6.-Phyre 2 y Knoter 1d .....	36
3.4.7.-Síntesis de péptidos .....	37
3.5.-Bioensayos .....	37
3.5.1.-Evaluación de actividad proteolítica .....	37
3.5.3.-Actividad neurotóxica en células granulares ganglionares (CCG) .....	38
3.5.3.1.-Cultivo de CCG a partir de cerebelo de rata (Winstar) .....	38
3.5.4.-FLiPR de Ca <sup>2+</sup> y K <sup>+</sup> (Fluorescent Imaging Plate Reader). .....	39
3.5.4.1.-Obtención de células cromafines.....	39
3.5.4.2.-Determinación del flujo de Ca <sup>2+</sup> .....	40
3.5.4.3.-Determinación del flujo de K <sup>+</sup> .....	40
3.5.4.4.-Ensayo de microfluoroscopia sobre células cromafines.....	41
IV.-Resultados y discusión.....	42
4.1.-Resultados.....	43
4.1.1-Caracterización de los péptidos activos procedentes de los tentáculos de <i>Carybdea marsupialis</i> .....	43
4.1.2-Caracterización de los péptidos activos procedentes de las campanas de <i>Carybdea marsupialis</i> .....	55
4.1.2- Otras actividades biológicas del extracto obtenido de los nematocistos localizados en las campanas de <i>Carybdea marsupialis</i> .....	66
4.1.2.1.-Actividad proteolítica.....	66
4.2 Discusión de resultados .....	67
V. Conclusiones .....	84
5.1.-Conclusiones.....	85
5.2.-Perspectivas .....	85
VI.-Corolario.....	86
VII.-Anexo.....	89
VIII.-Bibliografía .....	104

# Abreviaturas



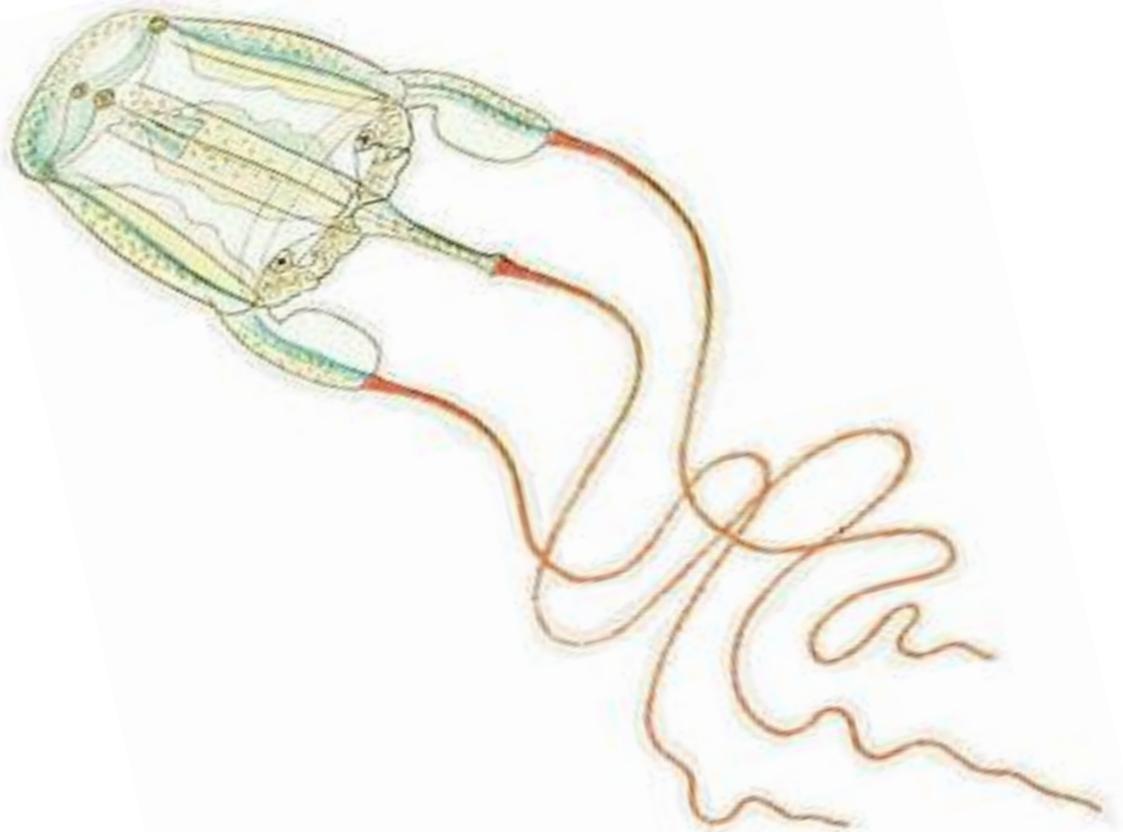
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>I</sub></b>	Concentración intracelular relativa de Ca <sup>2+</sup>
<b>[K<sup>+</sup>]<sub>I</sub></b>	Concentración intracelular relativa de K <sup>+</sup>
<b>ACH</b>	Ácido $\alpha$ -Ciano-4-hidroxicinámico
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>AchNR</b>	Receptor nicotínico de Ach
<b>ASIC</b>	Inhibidores de Canales de tipo ASIC (Acid-sensing ion channel).
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>CaTX</b>	Familia de toxinas básicas de 42-46 kDa aisladas de medusas
<b>CCH</b>	Células Cancerosas Humanas
<b>CGC</b>	Células Granulares Cerebelares
<b>CmEc</b>	Extracto crudo del veneno de <i>C. marsupialis</i> campanas
<b>CmEt</b>	Extracto crudo del veneno de <i>C. marsupialis</i> tentáculos
<b>CmNt</b>	Toxina de 36 kDa aislada de <i>Carybdea marsupialis</i>
<b>CYP2E1</b>	Citocromo 450 2E1
<b>DHB</b>	Ácido 2,5-Dihidroxibenzóico
<b>Dob</b>	Promedio de testigos
<b>Doc</b>	Promedio de tratamientos (DMSO)
<b>Dot</b>	Promedio de tratamientos
<b>EAA</b>	Aminoácidos excitatorios
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetracético
<b>EH</b>	Eritrocitos Humanos
<b>EqT II</b>	Equinotoxia II
<b>ESI-TOF</b>	<i>Electrospray Ionization Time-of-Flight</i>
<b>FGH</b>	Células fibroblásticas humanas
<b>Fmoc</b>	9-fluorenilmetoxycarbonilo
<b>HEK</b>	Human embryonic Kidney cells
<b>HELA</b>	Células cáncer cérvico uterino
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>HTC-15</b>	Células cáncer colon
<b>IS</b>	Irukandji Syndrome
<b>JFTs</b>	Toxinas de medusas
<b>K-562</b>	Células cáncer leucemia mioblástica
<b>KTxs</b>	Toxinas que afectan canales de Potasio dependientes de voltaje (Tipo Kunitz)
<b>MAC</b>	Proteínas de complejo de ataque a membrana (Porinas).
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i>
<b>MCF-7</b>	Células cáncer mama
<b>MMP</b>	Metaloproteasas
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>Na-TTX</b>	Canales de Sodio sensibles a TTX
<b>NaTxS</b>	Toxinas que afectan canales de Sodio dependientes de voltaje.

<b>Na<sub>v</sub></b>	<i>Voltage gated Sodium Channels</i>
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NCI</b>	Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU. A
<b>nm</b>	Nanometro
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>PC3</b>	Células cáncer próstata
<b>PLA2</b>	Fosfolipasa A2
<b>PME</b>	Peso molecular experimental
<b>PMt</b>	Peso molecular Teórico
<b>PSI-BLAST</b>	Position Specific Iterative-BLAST
<b>RPC</b>	Reverse Phase Chromatography
<b>SA</b>	Ácido sinapínico
<b>SCRIPs</b>	Pequeños péptidos ricos en Cisteína.
<b>SKLU-1</b>	Células cáncer pulmonar
<b>TRPV1</b>	Inhibidores de receptores tipo TRPV
<b>TTX</b>	Tetradotoxina
<b>U-251</b>	Células cáncer glial
<b>VGCC</b>	<i>Voltage gated Calcium Channels</i>
<b>VGCCL</b>	<i>Voltage gated Calcium Channels L-Type</i>



*Danza sobre las olas, vuelo flotante,  
ductilidad, perfección, acorde absoluto  
con el ritmo de las mareas,  
la insondable música  
que nace allá en el fondo y es retenida  
en el santuario de las caracolas.*

# I.-Introducción



## 1.1.- *Phylum Cnidaria*

Los cnidarios son un grupo de animales acuáticos ampliamente distribuidos en los océanos del mundo que a pesar de su anatomía relativamente simple se han reconocido como animales versátiles, capaces de someter a sus presas y repeler a sus depredadores evolutivamente más sofisticados (Jouiaei, Yanagihara, et al. 2014). Este grupo de animales venenosos es el más antiguo que existe y todos sus miembros son organismos predatorios (Turk y Kem 2009). El *phylum* Cnidaria, que incluye a las anemonas, corales, medusas e hidroides, se integra de organismos diblásticos, cuyo epidermo y gastrodermo se encuentran separados por tejido conectivo denominado mesoglea, el cual incluye células provenientes de las otras láminas germinales. El peculiar nombre del *phylum* se deriva de estructuras típicas especializadas que componen en su conjunto un aparato único de liberación del veneno denominado cnidocisto, el cual es empleado para inyectar un coctel de toxinas a otros organismos para defenderse o cazar. (Fig. 1) (Marottini y Pane 2013). Debido a la diversidad morfológica de los cnidocistos se han clasificado en tres categorías: nematocistos, spirocistos y ptichocistos. Actualmente se acepta la existencia de más de 24 tipos de cnidocistos y se propone que las diferencias morfológicas implican funciones específicas relacionadas con la captura de las presas o defensa, en otras palabras penetración o adherencia (Bridge, Cunningham, et al. 1996). Sin embargo, en los últimos años se han publicado reportes en los que se ha afirmado que es posible encontrar compuestos con actividad biológica en otros tejidos corporales (Sher, et al. 2005).

Las secreciones producidas por los nematocistos son mezclas complejas de polipéptidos así como de proteínas de mediano y alto peso molecular con función defensiva-ofensiva que permiten capturar a su presa y generar reacciones tóxicas e inmunológicas (David, et al. 2008).

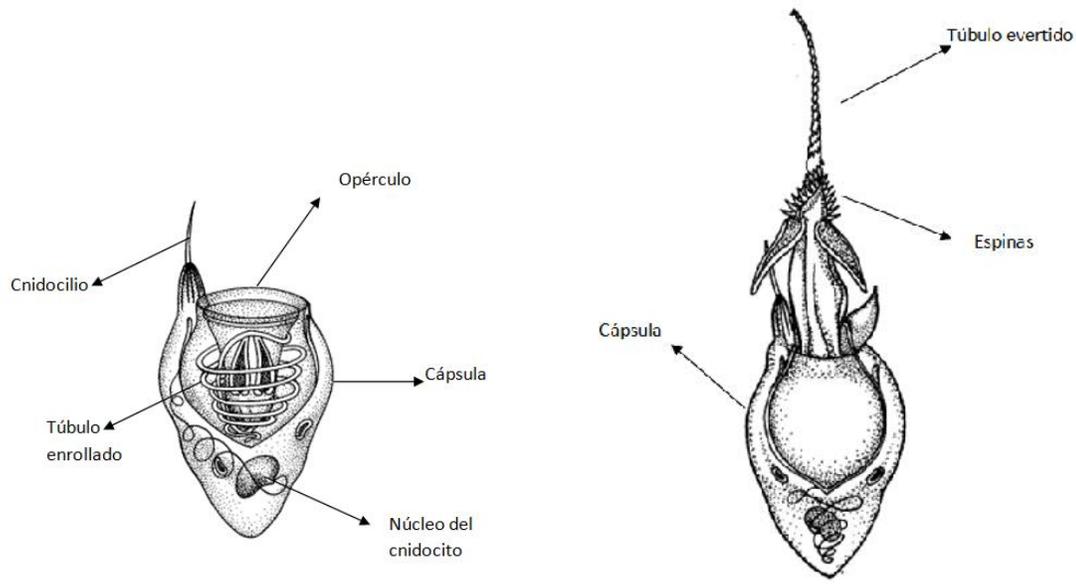


Fig. 1 Esquema de un nematocisto (Livingstone 2015).

El *phylum* Cnidaria ha sido considerado por los científicos como un grupo apasionante y único, ya que todos los miembros pertenecientes a este grupo son tóxicos. Dentro de este *phylum*, las medusas como las anémonas ocupan un lugar preponderante en la producción de venenos altamente tóxicos. Asimismo, datos moleculares y fósiles sitúan al *phylum* Cnidaria en el periodo Edicariano, haciendo de estos organismos representantes del linaje más antiguo de animales venenosos y como uno de los más prometedores para el descubrimiento de nuevas toxinas con actividad biológica, ya que la diversidad de este *phylum* se asocia a la variedad química de sus venenos, representando una fuente cuasi ilimitada de sustancias bioactivas útiles para el desarrollo de nuevos fármacos (Menon, McIlroy y Brasier 2013).

Sorprendentemente, a pesar de que se han descrito más de 10000 especies de cnidarios, solo algunas han sido estudiadas a detalle y la mayoría de los estudios toxicológicos del veneno de estos organismos se han centrado en la clase Anthozoa (principalmente en anémonas) aunque algunas otras clases han sido estudiadas como: Hydrozoa, Scyphozoa y en menor medida la clase Cubozoa (Torres-Ramos y Aguilar 2003).

### 1.1.1-Filogenia de los cnidarios

A través de los años ha existido una gran controversia acerca de la filogenia del *phylum* Cnidaria, no obstante, en función de los datos obtenidos del estudio del DNA mitocondrial y los diferentes ciclos de vida de los cnidarios, el *phylum* ha sido dividido en dos *subphyla*: Anthozoa y Medusozoa (Fig.2) (Kayal, et al. 2013). Por un lado los cnidarios pertenecientes al *subphylum* Anthozoa poseen DNA mitocondrial circular de manera similar a algunos metazoos, mientras que los cnidarios pertenecientes al *subphylum* Medusozoa poseen DNA mitocondrial lineal (Collins 2002). Así mismo, los miembros de las clases Hydrozoa, Scyphozoa, Staurozoa y Cubozoa que pertenecen al *subphylum* Medusozoa, comparten un ciclo de vida trifásico el cual incluye las siguientes etapas: larva de vida libre, estadio de pólipo sésil y el estado de medusa pelágica. En contraste los miembros del *subphylum* Anthozoa han perdido el último estadio del ciclo de vida (estado de medusa), siendo el estado adulto sésil el estado de madurez sexual.

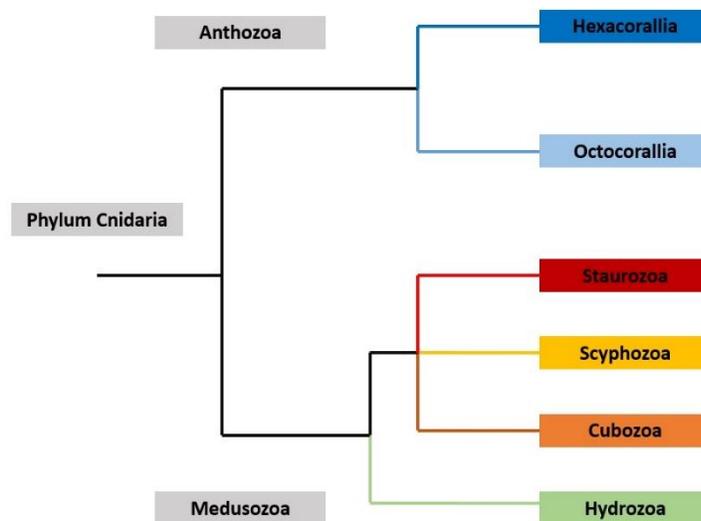


Fig.2 Clasificación tradicional y relaciones dentro del *phylum* Cnidaria. (Bridge, Clifford, et al. 1995; Kayal, et al. 2013).

A su vez, los cnidarios han sido clasificados tradicionalmente en cinco clases taxonómicas en función de sus características anatómicas y su ciclo de vida: la clase Scyphozoa (medusas), la clase Cubozoa (cubomedusas), la clase Hydrozoa (corales de fuego), la clase Staurozoa (Estauromedusas) y la clase Anthozoa (anémonas y corales blandos) (Fig. 3).



Fig. 3 Fotografías representativas de Cnidarios. El color de las cajas corresponde al color de los clados de la Fig. 2. **Amarillo:** Scyphozoa. A este grupo pertenecen las medusas “verdaderas”. Su tamaño varía desde unos centímetros hasta más de un metro. **(A)** *Chrysaora quinquecirrha*. **(B)** *Cephea cephea*. **(C)** *Pelagia noctiluca*. **Verde:** Hydrozoa. El grupo de los Hidropolipos e hidromedusas. **(D)** *Crossota millsae*. **(E)** *Physalia physalis*. **(F)** *Podocoryna carnea*. **(G)** *Hydractinia*. **Naranja:** Cubozoa. A este grupo pertenecen las medusas más tóxicas. Típicamente poseen campanas en forma de cubo y uno o más tentáculos en cada esquina. **(H)** *Copula sivickisi*. **Rojo:** Staurozoa. Este grupo de cnidarios incluye al orden stauromedusae de los cyphozoos. **(I)** *Haliclystus californiensis*. **Azul claro:** Octocorallia. Este grupo abarca los denominados corales blandos, las gorgonias, las plumas de mar, y el coral azul. **(J)** *Clavularia sp.* **(K)** *Pennatula sp.* **(L)** *Gorgonia ventalina*. **Azul fuerte:** Hexacorallia. Este grupo incluye a las anémonas y corales verdaderos. **(M)** *Porites sp.* **(N)** *Tubastrea faulkneri*. **(O)** *Heteractis magnifica* (Zapata, et al. 2015).

### 1.1.2.-Sistema de suministro de veneno

El *phylum* Cnidaria se caracteriza por haber desarrollado estructuras celulares denominadas cnidocistos, capaces de generar la descarga de su contenido después de su activación. Los cnidocistos son células redondeadas con el núcleo ubicado en posición basal, un flagelo modificado y un orgánulo apical característico denominado nematocisto contiguo al cnidocilio (sensor de estímulos mecánicos) (Fig. 1). Los nematocistos contienen mezclas complejas de compuestos bioactivos (Veneno) que sirven a los organismos de este *phylum* para atrapar, someter y digerir a sus presas, así como disuadir y repeler a sus competidores o depredadores (Orts, et al. 2013).

Los nematocistos son estructuras que se localizan abundantemente en los tentáculos y hasta el momento se han reconocido como estructuras especializadas en la síntesis de proteína y péptidos tóxicos, sin embargo se han reportado evidencias morfológicas que sugieren la presencia de células similares a los nematocistos en los canales gástricos (gastric cirri) y se ha demostrado que algunas células del ectodermo o células glandulares del endodermo pueden sintetizar componentes del veneno (Acevedo, et al. 2013.). Particularmente en los cubozoos, los cnidocistos se distribuyen en diferentes partes del organismo y se clasifican en tres tipos principales: nematocistos penetrantes, espirocistos envolventes y ptychocistos aglutinantes. Taxonómicamente, las características morfológicas de los cnidocistos son muy informativas, ya que se han utilizado para distinguir diferentes organismos pertenecientes a especies muy relacionadas y la predominancia o presencia de cierto tipo de cnidocisto es indicativo de una clase o especie. Estudios recientes han mostrado que la abundancia y variación de tamaño de los cnidocistos puede depender de factores específicos como el tipo de presa o ecosistema en que habita un organismo. (Ostman C 2000; Moran, Genikhovich, et al. 2012)

El mecanismo de descarga de los nematocistos inicia como respuesta a un estímulo externo (mecánico o químico) que ha sido arduamente estudiado, sin embargo permanece sin ser entendido completamente y es explicado de manera general por la teoría de tensión/ósmosis. Este mecanismo propone que a medida que la presión osmótica del fluido intracapsular de los nematocistos aumenta como consecuencia de la exposición de estos a un estímulo, se

promueve la exocitosis del contenido de la capsula del nematocisto. Por tanto, cuando la diferencia de presión existente entre la pared capsular y la presión intracapsular excede un punto crítico de equilibrio (140 atm) se inicia la descarga del contenido capsular durante el proceso de eversión-extensión del nematocisto. (Ozbek, Balasubramanian y Holstein 2009).

### 1.1.3.-El veneno de los cnidarios

Los cnidarios y especialmente la clase Cubozoa se reconocen como uno de los grupos de organismos venenosos más letales, cuyos venenos son capaces de generar efectos cardiotoxicos en mamíferos, crustáceos, larvas y pequeños peces utilizando una amplia mezcla de proteínas y péptidos tóxicos (Zhang, et al. 2003). Curiosamente en muchos organismos venenosos se han encontrado proteínas en el veneno que juegan un papel importante en la digestión y que además son sintetizadas en órganos diferentes (Casewell, et al. 2012).

El veneno de los cnidarios como el de otros organismos venenosos, cumple un papel dual de defensa y forrajeo, el cual se ha desarrollado evolutivamente para permitir la supervivencia de los individuos durante sus relaciones tróficas, por lo cual se ha sugerido que los componentes tóxicos de diferentes linajes han sido seleccionados a lo largo de la evolución como un subproducto que permite asegurar y digerir a las presas (Fry, et al. 2009; Mackessy, Williams y Ashton 2003). Debido al posible rol dual tóxico-digestivo de las proteínas en el veneno se han propuesto orígenes alternativos de su producción (Bottrall, Madaras, et al., 2010). Sin embargo, en el caso concreto de los cnidarios, no se han reportado glándulas venenosas especializadas ni glándulas digestivas, pero estos organismos contienen estructuras especializadas (nematocistos) ubicadas de manera anatómicamente específica según la especie (Badré S 2014). Por otro lado, se ha observado que muchas de las presas de estos organismos son inmovilizadas al contactar con los tentáculos inmediatamente o pueden mantener la capacidad de moverse hasta que son insertadas en el manubrio. A pesar de la polémica generada por la discrepancia entre los dos efectos del veneno, se ha propuesto que el papel de los nematocistos y la potencia del veneno que contienen deben jugar un rol central en el proceso de caza y digestión de la presa (Gershwin L 2006)

#### 1.1.4.-Composición general del veneno de los Cnidarios

El veneno de los Cnidarios es considerado muy diverso y su composición puede variar en función del organismo, su hábitat, así como de la porción anatómica de donde provengan los nematocistos descargados en el proceso de extracción. Este hecho se ha constatado a través de los años mediante múltiples experimentos analíticos y observaciones clínicas, tras los cuales se ha determinado que el veneno de estos organismos comprende un gran número de componentes que han evolucionado a través de millones de años confiriendo al veneno de los cnidarios una gran diversidad de toxinas (Tabla 1).

De manera general, se ha determinado que el veneno de estos organismos contiene una amplia gama de componentes que varían desde compuestos no proteicos hasta proteínas de alto peso molecular, sin embargo se ha establecido que el veneno de los Cnidarios es mayoritariamente proteico y que habitualmente las toxinas que contiene son lábiles (Tabla 1). Se ha reportado que el veneno de estos organismos puede contener toxinas con actividad enzimática como: fosfolipasas  $A_2$ , detectadas en homogenizados de tentáculos en los subfilos Anthozoa, Scyphozoa, Hydrozoa y Cubozoa (Talivinen y Nevalainen 2002), metaloproteasas detectadas en el veneno de las medusas *Stomolophus meleagris* y *Chironex fleckeri* (Li, et al. 2014; Jouiaei, Casewell, et al. 2015), actinoporinas presentes en Anthozoa e Hydrozoa (Glasser, et al. 2014), hidrolisinas encontradas en células de endodermo adrenal de la hidra verde (*Chlorohydra viridissima*) (Moran, Prahaer, et al. 2013), colagenasas, hialuronidasas, proteasas, fibrinolisinias, cardiotoxinas, miotoxinas y nefrotoxinas, así como diversas neurotoxinas encontradas principalmente en anémonas (Lazcano-Perez, et al. 2016). Incluso algunos tipos de familias de toxinas que se han encontrado en otros animales venenosos han sido identificados en organismos pertenecientes al *phylum* Cnidaria como es el caso de los péptidos de tipo Kunitz (Gilquin, et al. 2002) o toxinas bloqueadoras de canales de potasio dependientes de voltaje Kv1 (Fry, et al. 2009).

Por otro lado, aunque en menor medida, se ha reportado la presencia de compuestos no proteicos en el veneno de cnidarios como: catecolaminas, aminas vasoactivas (histamina), bradicinina, (Walter, Martinex y Godin 1977), prostaglandinas  $PGA_2$  en *Plaxaura*

*homomalla* (Weinheimer y Spraggins 1969) y la palitoxina en el zoantido *Palythoa toxica* (Moore y Scheuer 1972), entre otros. También algunos reportes indican que los cnidarios producen sustancias antitumorales, por ejemplo los prostanoïdes aislados de extractos de *Clavularia viridis*, los cuales inhiben el crecimiento de células tumorales de la leucemia entre otros (Honda, et al. 1985).

En el caso particular de los venenos de organismos pertenecientes a la clase Cubozoa, se dice que su veneno contiene citolisinas básicas (42-46 kDa) que no son frecuentes en otros cnidarios (H. Nagai, K. Takuwa, et al. 2000). Algunos estudios en modelos animales han demostrado que las toxinas de estos organismos causan dolor, inflamación, necrosis en la piel y son potencialmente letales.

#### 1.1.5.-El papel del veneno de los cnidarios en el descubrimiento de nuevos principios activos

La comunidad científica dedicada a la toxicología se ha encargado de la caracterización de las propiedades biofísicas y bioquímicas de los componentes tóxicos provenientes del veneno de diversas medusas, anemonas y corales, capaces de causar dolor severo, sensación de ardor así como colapso cardiovascular y muerte. Sin embargo, no hay que perder de vista que muchos de estos compuestos con implicaciones serias en la salud humana pueden ser utilizados como herramientas moleculares para el estudio de la fisiología celular o como una fuente de principios activos útiles en tratamientos paliativos o terapéuticos.

Un ejemplo claro de la aplicación de compuestos aislados de venenos de cnidarios utilizados en el estudio de la fisiología celular y la búsqueda de nuevos fármacos es el uso de un compuesto no proteico altamente tóxico denominado palitoxina. Este compuesto ha sido aislado de un coral suave del orden Zoantharia y su mecanismo de acción recae en la interacción de este con la bomba de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPasa, induciendo la conductancia pasiva de iones  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , provocando la despolarización de la membrana y la contracción de tejidos.

Tabla1. Composición general del veneno de los Cnidarios

Toxina	Clase fundadora	Función	PM(kDa)	Ref.
<b>Enzimas</b>				
<b>PLA2</b>	Anthozoa, Cubozoa, Schyphozoa, Hydrozoa	Citolítica, hemolítica Digestión de la presa	<b>13-45</b>	(Mariottini y Pane 2014)
<b>MMP</b>	Schyphozoa, Cubozoa, Anthozoa	Citotóxica, citolítica Daño del tejido local	<b>17-130</b>	(Lee, et al. 2014)
<b>Toxinas formadoras de poro (Citolisinas)</b>				
<b>Actinoporinas y Proteínas actinoporin-like JFTs</b>	Anthozoa, Hydrozoa  Cubozoa	Citolítica, hemolítica Arresto respiratorio y cardiovascular Hemolítico, cardiotoxico, citolítico Miotóxico, Inflamación cutánea	<b>20</b>  <b>42-46</b>	(Uechi, et al. 2005)  (Brinkman, et al. 2014)
<b>Proteínas relacionadas a Hidralisinas MAC-perforina</b>	Hidrozoa, Anthozoa  Anthozoa	Citolítica Digestión de la presa Citolítica, hemolítica	<b>27-31</b>  <b>60</b>	(Zhang, et al. 2003)  (Oshiro, et al. 2002)
<b>Neurotoxinas</b>				
<b>NaTxS (Tipo I-III) KTxs (Tipo I, III y IV, V)</b>	Anthozoa Anthozoa	Neurotóxica, cardiotoxica e insecticida Neurotóxica, hipotensiva, cardiotoxica Analgésica, antimicrobiana, inmunosupresora	<b>3.0-8.0</b> <b>3.0-4.0</b>	(Yan, et al. 2014) (Lazcano-Perez, et al. 2016) (Chi, et al. 2012)
<b>Péptidos tipo Kunitz (Tipo KTxsII) SCRiPs</b>	Anthozoa Anthozoa	Paralítica, Inhibidor de serín proteasas Paralítica	<b>6</b> <b>4.3-5.3</b>	(Gladkikh, et al. 2012) (Jouiaei, et al. 2015)
<b>SCRiPs homólogos Inhibidores ASIC Inhibidores TRPV1</b>	Anthozoa Anthozoa Anthozoa	 Analgésica Analgésica	 <b>3</b> <b>3</b>	 (Osmakov, et al. 2013) (Andreev, et al. 2008)
<b>Componentes bioactivos no proteicos</b>				
<b>Serotonina Histamina Bunodosine Caissarona</b>	Hydrozoa, Anthozoa Anthozoa Anthozoa Anthozoa	Vasodilatación, dolor agudo Vasodilatación, dolor agudo Analgésico Antagonista del receptor de Adenosina	- - - -	(Sher, et al. 2005) (Mathias, et al. 1960) (Zharenko, et al. 2011) (Cooper, et al. 1995)

En esta tabla se engloban los principales componentes aislados de diversos venenos de organismo correspondientes a diversas clases del *phylum* Cnidaria. **PLA2**; fosfolipasa tipo 2. **MMP**; metaloproteasas. **JFTs**; Toxinas de medusas. **MAC**; proteínas de complejo de ataque a membrana (Porinas). **NaTxS**; Toxinas que afectan canales de Sodio dependientes de voltaje. **KTxs**; Toxinas que afectan canales de Potasio dependientes de voltaje (Tipo Kunitz). **SCRiPs**; Pequeños péptidos ricos en Cisteína. **Inhibidores ASIC**; Inhibidores de Canales de tipo ASIC (Acid-sensing ion channel). **Inhibidores TRPV**; Inhibidores de receptores tipo TRPV (Transient Receptor Potencial Vanilloid). Modificado de (Jouiaei, Yanagihara, et al. 2014).

La palitoxina se ha aprovechado como herramienta molecular para el estudio electrofisiológico de tejidos excitables (Wu 2009). Así mismo, se ha descrito que la palitoxina posee actividad anti cancerígena contra células malignas procedentes de tumores de cabeza y cuello, proponiéndose como el mecanismo de acción la distorsión de filamentos de actina y la activación de la apoptosis (Gorogh, et al. 2013).

Investigaciones recientes en cuanto a la caracterización diversos componentes proteicos aislados de diversos cnidarios, han mostrado que la aplicación de estos como agentes terapéuticos para diversas enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer y el Alzheimer es posible. Por ejemplo la neurotoxina ShK aislada de la anemona *Stoichactis heliantus* ha mostrado poseer actividad inmunosupresora relevante (Chi, et al. 2012) y actualmente se encuentra en estudios de fase preclínica para su uso en humanos (Tabla 2). Otro ejemplo importante es el uso de citolisinas e inhibidores de proteasas como la Equinotoxina II (EqT II) y la Equistatina que han mostrado actividad anti tumoral significativa contra líneas celulares de leucemia L1210, células tumorales de Erlich y células cancerígenas procedentes de cáncer de mama (Yi-Lian, et al. 2004;Lenarcic, et al. 1997). Finalmente, un ejemplo notable de la aplicación de toxinas como agentes terapéuticos en enfermedades del sistema nervioso central, es el efecto de un inhibidor de butilcolinesterasa aún no caracterizado procedente del veneno de la medusa *Pelagia noctiluca*, cuyo uso potencial para el tratamiento de enfermedades como la demencia senil y el Alzheimer está siendo estudiados recientemente (Morabito, et al. 2013;Ayed, et al. 2016).

**Tabla 2. Ejemplos de péptidos obtenidos de venenos o sus derivados que se encuentra aprobados para su uso clínico o en diferentes fases de desarrollo.**

<b>Animal</b>	<b>Péptido/ proteína</b>	<b>Actividad farmacológica</b>	<b>Prescripción</b>	<b>Estado</b>	<b>Ref.</b>
Serpiente	Captopril (Teprotide)	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina	Hipertensión	FDA aprobado (1981)	(Todd 1981)
Serpiente	Eptifibatide (Integrilina™)	Inhibe la unión del fibrinógeno al receptor glicoprotéico de plaquetas IIb/IIIa	Angina de pecho	FDA aprobado (1998)	(Califf 1998)
<b>Caracol<sup>1</sup> Conus</b>	<b><math>\omega</math>-Conotoxina MVIIA (Ziconotide)</b>	<b>Bloquea el canal de calcio dependiente de voltaje Cav2.2</b>	<b>Dolor crónico</b>	<b>FDA aprobado (2004)</b>	(Liu 2012)
Lagarto	Exenatide (Byetta <sup>R</sup> )	Segregación de insulina	Diabetes mellitus tipo 2	FDA aprobado (2005)	(Davidson, Bate and Kirkpatrick 2005)
Serpiente	Ancrod	Anticoagulante	Accidente cerebrovascular isquémico	Fase III	(Nielsen 2016)
<b>Caracol Conus<sup>1</sup></b>	<b>X- ConotoxinaMrIA (Xen2174)</b>	<b>Inhibe el transportador de noradrenalina</b>	<b>Dolor crónico</b>	<b>Fase II</b>	(Souza, et al. 2013)
Escorpión	Chlorotoxina (TM-601)	Se une a la superficie del glioma MMP2 limitando su habilidad de invasión	Glioma	Fase II	(Ojeda, Wang y Craik 2016)
Araña	Psalmotoxina-1	Bloquea los canales iónicos (ASICa)	Dolor inflamatorio	Pre-clínica	(Smith y Gonzales 2014)
Araña	Tx2-6	Liberación de óxido nítrico	Disfunción eréctil	Pre-clínica	(Silva, et al. 2015)
<b>Anémoma<sup>1</sup></b>	<b>ShK</b>	<b>Bloquea los canales de potasio dependientes de voltaje Kv1.3</b>	<b>Enfermedades autoinmunes</b>	<b>Pre-clínica</b>	(King 2013)

<sup>1</sup>Ejemplos más representativos de péptidos obtenidos de venenos de organismos marinos que actualmente han sido usados como principios activos para diferentes medicamentos.

## 1.2.-Clase Cubozoa

A pesar que Cubozoa es la clase más pequeña del phylum Cnidaria, ya que solo se han descrito 50 especies, es muy conocida por sus características especiales, entre ellas su toxicidad (Bentlage, Cartwright, et al.,2010). Las medusas pertenecientes a esta clase, producen una mezcla de proteínas tóxicas las cuales, al igual que en otros cnidarios, son almacenadas en nematocistos y son usadas primordialmente para capturar a sus presas. El veneno producido por estos organismos consta de toxinas con un amplio rango de actividades biológicas como: neurotoxicidad, actividad citolítica y actividades enzimáticas (fosfolipasas A<sub>2</sub> y proteasas) (Frazo, Vasconcelos y Antunes 2012).

El entendimiento y tratamiento de los síntomas del envenenamiento causado por los organismos pertenecientes a la clase Cubozoa se debe principalmente a los esfuerzos por caracterizar las toxinas presentes en el veneno de estos organismos. El integrante más estudiado de esta clase es *Chironex fleckeri*, que es conocida como la medusa más letal y es una de las especies más venenosas del mundo, mientras que las especies menos estudiadas son *Chiropsalmus quadrigatus* y *Carybdea marsupialis* (Pereira y Seymour 2013).

A pesar de las décadas de investigación bioquímica, toxicológica y farmacológica del veneno de estos organismos solamente muy pocas toxinas han sido caracterizadas y sus mecanismos de acción permanecen sin ser aclarados.

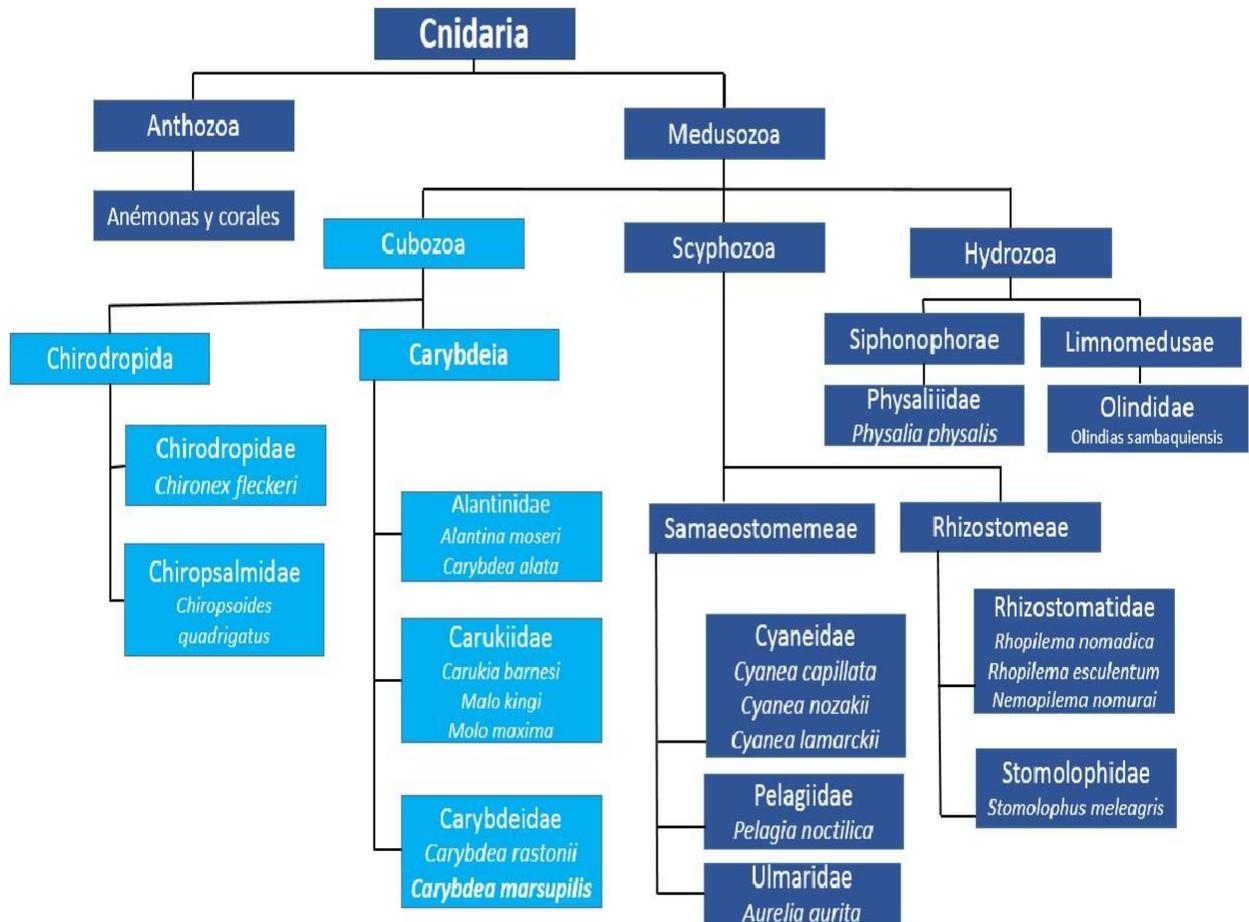


Fig. 4 Clasificación del *subphylum* Medusozoa. Fuente: World register of marine species (Worms), <http://www.marinespecies.org/index.php> 17.03.2017. La clase Cubozoa y algunos ejemplos de especies de cada familia se encuentran resaltados en azul claro.

### 1.2.1- Efectos de las picaduras de cubomedusas en humanos

La importancia clínica y farmacológica de las toxinas marinas, venenos y ponzoñas ha sido un tópico de interés para los toxicólogos que se ha incrementado a lo largo de los años. Sin embargo, debido a las complicaciones técnicas en cuanto a los métodos de extracción, purificación de los componentes y la variación de los resultados obtenidos de los venenos de origen marino; los Cnidarios, especialmente los de la clase Cubozoa no han sido ampliamente estudiados. Actualmente se ha establecido que solo 50 especies de medusas son venenosas y cinco de estas se consideran potencialmente mortales para el hombre (*Carukia barnesi*, *Malo maxima*, *Malo kingii*, *Gerongia rifkinae* y *Carybdea spp.*) (Little,

Pereira, et al., 2006). Las medusas antes mencionadas pertenecen a los órdenes *Carybdeidae* y *Chirodropidae*, relativamente dañinas para los seres humanos y potencialmente letales (Fig. 4). El espectro de síntomas que manifiestan las víctimas de envenenamiento varía significativamente en función de la especie con que se tenga contacto (Tabla 3). En el caso de los carybdeos como *Carybdea rastonii*, *Carybdea alata* y *Carybdea marsupialis*, el contacto con sus tentáculos genera un amplio rango de síntomas entre los que destacan; dolor cutáneo, inflamación, erupciones vesiculares e hipersensibilidad (Nagai H 2003). En contraste, los efectos que tienen los venenos de los carybdeos australianos como *Carukia barnesi*, se asocian con efectos de carácter generalizado como el síndrome de Irukandji (Barnes 1964), en el cual es posible observar efectos sistémicos que se desarrollan en un rango de 5 a 120 minutos, incluyendo dolor abdominal, náuseas, transpiración copiosa, hipertensión, taquicardia ansiedad y estrés (Gershwin, 2007). Por otro lado, *Chironex fleckeri* pertenece al orden Chirodropidae y es considerada la medusa más peligrosa del mundo. El contacto con sus tentáculos produce reacciones inflamatorias cutáneas muy dolorosas y síntomas sistémicos como: dolor, hipertensión, pérdida de la conciencia y fallas cardiorrespiratorias (Brinkman y Burnell 2009). La muerte que puede ocurrir dentro de algunos minutos después del envenenamiento se atribuye a los efectos cardíacos y respiratorios del veneno. Otras especies pertenecientes a este orden como *Chiropsalmus quadrigatus* inducen dolor local, inflamación cutánea y efectos cardiorrespiratorios potencialmente letales (Cegalon, et al. 2013).

Dada la diversidad y severidad de los síntomas generados por diferentes especies de medusas, es probable que los venenos de las cubomedusas varíen en composición, potencia y actividad biológica. Asimismo las distinciones morfológicas entre los órdenes *Chirodropidae* y *Carybdeidae* pueden jugar un papel importante, ya que los primeros poseen tentáculos múltiples, mientras que los segundos solo poseen cuatro tentáculos, por lo que las dosis inyectadas por los Chirodropideos pueden ser considerablemente mayores que las inyectadas por los Carybdeos. Sin embargo existen excepciones, ya que algunos Carybdeos que pueden producir el síndrome de Irukandji son potencialmente más letales para los seres humanos, que algunos Chirodropideos como *C. barnesi* (Brinkman y Burnell 2009).

**Tabla 3. Síntomas locales y sistémicos observados después del contacto con una cubomedusa.**

<b>Clase</b>	<b>Especie</b>	<b>Síntomas locales</b>	<b>Síntomas sistémicos.</b>
<b>Cubozoa</b>	<i>Chironex fleckeri</i>	Reacción cutánea Dolor Cicatrización	Dolor Pérdida del conocimiento Falla cardiaca y respiratoria Muerte
	<i>Chiropsalmus</i>	Reacción cutánea	Falla cardiaca y respiratoria
	<i>Quadrigatus</i>	Cicatrización	
	<i>Carybdea rastoni</i>	Reacción cutánea Dolor	-
	<i>Carybdea marsupialis</i>	Reacción cutánea Dolor	-
	<i>Alatinamordens</i>	Eritema	Síndrome irukandji <sup>1</sup>
	<i>Carybdea alata</i>	Eritema	Síndrome irukandji <sup>1</sup>
	<i>Carakia barnesi</i>	Eritema	Síndrome irukandji <sup>1</sup>
	<i>Malo kingi</i>	Eritema	Síndrome irukandji <sup>1</sup>
	<i>Malo máxima</i>	Eritema	Síndrome irukandji <sup>1</sup>

<sup>1</sup>El síndrome de Irukandji es un conjunto de síntomas causados por el envenenamiento causado por medusas. Comprende dolor abdominal, náuseas, vómito, ansiedad, hipertensión, taquicardia y edema pulmonar (Badré S 2014; Fenner y Lippmann 2009)

### 1.2.2.-Síndrome de Irukandji

Los signos y síntomas generados en humanos debido al encuentro con medusas de la clase cubozoa es muy amplio y su patogénesis ha sido inferida a través de múltiples estudios experimentales, así como de correlaciones clínicas. Hasta el momento, la etiología de estos

no ha sido elucidada y de manera general, las manifestaciones clínicas generadas por la picadura de estos organismos se han englobado en la definición del Síndrome de Irukandji (IS). Este síndrome fue definido por primera vez en los años cincuenta y recibe su nombre debido a una tribu aborígen que habitaba en la región de Irukandji en Australia, cuyos integrantes sufrían recurrentemente manifestaciones clínicas correspondientes a este síndrome, aunque los reportes más antiguos de IS se ubican en las Filipinas (Carrette, Underwood y Seymour 2012).

El IS es descrito como una serie de signos y síntomas sistémicos retardados que hacen su aparición en un promedio de 45 minutos tras el contacto con alguna medusa y cuyos efectos pueden llegar a durar desde algunas horas hasta siete días. Los signos y síntomas que comprenden este síndrome son: eritema, náuseas, vómito, dolor muscular intenso, contracciones involuntarias, dolor lumbar, dolor de cabeza, sudoración copiosa, hipertensión y en muchos casos clínicos se han reportado fallas cardiorrespiratorias (Carrette, Underwood y Seymour 2012; Tibballs, et al. 2006). El amplio rango de síntomas y la severidad variable de los mismos no han permitido definir correctamente al síndrome, ya que para algunos pacientes los signos y síntomas del envenenamiento por el encuentro con alguna cubomedusa pueden ser mínimos o inocuos, mientras que otros pueden experimentar complicaciones y síntomas severos que incluso pueden amenazar la vida del paciente. Cada año se reportan entre 100 y 200 casos de IS y solo se han reportado dos decesos directamente relacionados a este síndrome hasta el año 2008 (Baguley 2008). A pesar de que IS puede amenazar la vida de las víctimas de picaduras de medusas, no es una enfermedad prioritaria para los sistemas de salud de los países donde suelen ocurrir estos casos, debido a que la incidencia de envenenamientos es baja, sin embargo a nivel local, representa un alto costo para las comunidades donde estos casos ocurren con mayor incidencia (Fig. 5). Por otro lado, además de los costos directos asociados al tratamiento de las víctimas de IS, existen efectos indirectos en la economía de estas comunidades, como las afectaciones al turismo, ya que los casos de IS son ampliamente publicitados y generan la sensación de inseguridad en el público causando pérdidas a la industria turística.

Actualmente muchas teorías se han propuesto para explicar la patogénesis del síndrome, sin embargo ninguna ha sido concluyente, ya que se han inferido tanto de investigaciones

experimentales y ensayos *in vitro*, como de los casos clínicos documentados especialmente del área del Indo-Pacífico, Texas, Florida, Queensland y China. Una de las teorías más aceptada hasta el momento es que el síndrome de Irukandji debe ser ocasionado por una toxina o grupo de toxinas que permitan la liberación excesiva de catecolaminas endógenas, debido a la similitud clínica entre el síndrome de Irukandji y las crisis catecolaminérgicas provocadas por feocromocitomas<sup>1</sup> (Tabla 4).

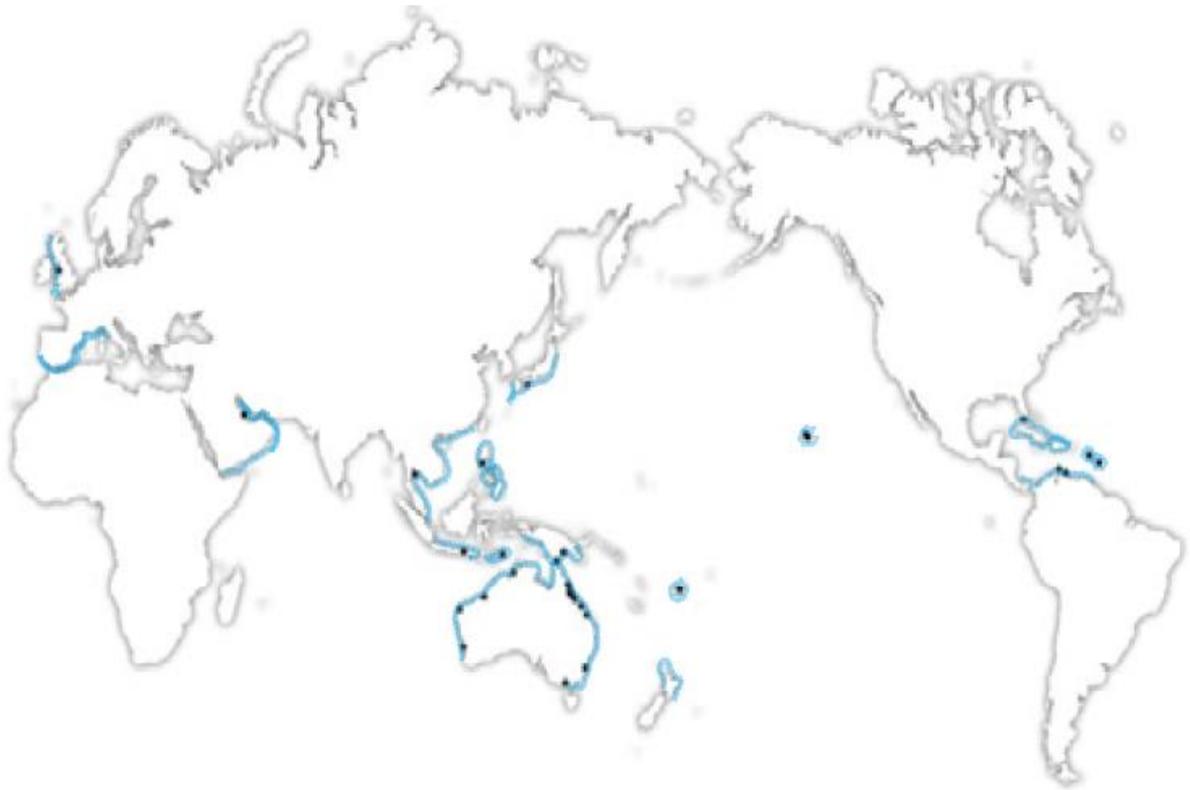


Fig. 5 Mapa de la distribución global de los casos documentados de Síndrome de Irukandji asociados a la picadura de una cubomedusa (Gershwin, et al. 2013).

---

<sup>1</sup>**Feocromocitomas:** Se definen como células cromafines tumorales típicamente desarrolladas en las glándulas suprarrenales y caracterizadas por una excesiva producción de catecolaminas, lo cual conduce normalmente al aumento de la presión arterial, temblor, sudoración etc. Si no es atendido o no diagnosticado, este tipo de tumores pueden conducir a la falla respiratoria o cardíaca. (Jacques, et al. 2002)

Como se ha mencionado en párrafos anteriores, el agente causal de IS es el envenenamiento correspondiente a la picadura de diferentes tipos de medusas, las cuales se distribuyen en ambos hemisferios (Fig.5). Sin embargo la dificultad de identificar al tipo de medusa que infringe la herida en el momento en que ocurre el envenenamiento imposibilita determinar con certeza las especies de cubomedusas que generan este síndrome (De los 17 cnidarios que se sabe pueden generar IS en sus víctimas, 14 son del género *Carybdea*). Las cubomedusas *M. kingii* y *Carukia barnesi* son consideradas las principales causantes del IS (Gershwin, 2007), sin embargo, existen reportes de medusas que son capaces de generar IS aunque con síntomas menos severos que el IS clásico<sup>2</sup> como: cubomedusas de la clase *Tamoyidae* y *Carybdeidae* (Bentlage, Cartwright, et al., 2010).

En el caso de *Carybdea marsupialis* se han reportado algunos casos clínicos en Europa, principalmente en Italia y España, que relacionan a esta cubomedusa con manifestaciones sistémicas similares al IS (Bordehore, et al. 2015; Peca, et al. 1997). Actualmente existen dos reportes de toxinas aisladas de *C. marsupialis*, sin embargo hasta ahora como en ningún otra cubomedusa se ha descrito algún componente del veneno que afecte algún receptor o canal iónico de células neuroendocrinas (Células cromafines) responsable de la liberación desregulada de catecolaminas propuesto como etiología del IS. De ser identificado este componente, no solo sería importante para entender y tratar el IS, sino que también podría ser utilizado como una herramienta molecular o terapéutica para el estudio y tratamiento de diferentes enfermedades que afecten el sistema nervioso central.

---

<sup>2</sup> El término síndrome de Irukandji (clásico), se utilizó por primera vez para englobar los signos y síntomas causados por el envenenamiento producido por la cubomedusa *Carukia barnesi*, mientras que para las demás medusas se dice que pueden producir “Síndrome Irukanji-like” (no clásico), el cual comparte los síntomas básicos con el síndrome producido por *Carukia*, sólo que en algunas especies pueden ser más severos que en otras. Actualmente se considera que la habilidad de generar el síndrome de Irukandji pudo haberse perdido en el linaje que derivó en los Carybdeos y los Tripedaliideos, aunque se ha asociado a algunas especies de *Carybdea* con la habilidad de provocar este síndrome, sin embargo esta atribución no ha sido confirmada del todo. (Fig. 6) (Little, Pereira, et al., 2006)

**Tabla 4. Comparación entre los signos y síntomas causados por el Síndrome de Irukandji y Feocromocitomas.**

Síndrome de Irukandji	Feocromocitomas
-	Dolor abdominal
-	Dolor Torácico
Dolor muscular intenso	-
Nauseas	-
Dolor de cabeza	Dolor de cabeza
Nerviosismo	Nerviosismo
↑ Frecuencia cardiaca	↑ Frecuencia cardiaca
↑ Frecuencia respiratoria	↑ Frecuencia respiratoria
Hipertensión	Hipertensión
Sudoración/ Agitación	Agitación

### 1.2.3.-Actividades biológicas en venenos de cubomedusas

Como se ha mencionado anteriormente, muchos de los organismos pertenecientes a la clase Cubozoa son considerados altamente tóxicos y en los últimos años se han realizado estudios exhaustivos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que han confirmado que los venenos derivados de nematocistos aislados de una gran variedad de cubomedusas comparten actividades biológicas similares (Tabla 3). Por ejemplo: actividad dermonecrotica, miotóxica, cardiotoxica, hemolítica y hemodinámica (Mustafa, et al. 1995). Así mismo, se ha descrito que los venenos de las cubomedusas tienen actividad hemolítica potente y citotóxica en otros tipos celulares como: células renales, hepatocitos y líneas celulares tumorales (Sun, et al. 2002). Recientemente, se han publicado reportes en los que se han comprobado las actividades miotóxica y neurotóxica mediante ensayos con preparaciones nervio-musculares de rata y se ha relacionado la sensación de ardor y dolor cutáneo debida al envenenamiento por algunos Cubozoos con la activación de TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid-1) (Cuypers, et al. 2006). Sin embargo, la toxicidad del veneno varía de especie a especie, de tal manera que algunos organismos pueden ser considerados relativamente inofensivos para los seres humanos, mientras que otros pueden causar la muerte en cuestión de minutos. Por ejemplo, el envenenamiento causado por *Chironex yamaguchii* es considerado grave y ha causado decesos en Japón, mientras que otras especies como *Chiropsalmus* y *Chiropsella* son consideradas menos peligrosas. De manera contrastante la actividad hemolítica de los

Carybdeos es mayor que la de los Chirodropideos y la secuenciación de las proteínas hemolíticas muestra una divergencia moderada (Brinkman y Burnell,2008; Bentlage, Cartwright, et al., 2010).

Las citolisinas descritas en organismos del orden *Carybdeida* han sido aisladas principalmente en el veneno de *Carybdea marsupialis*. Una toxina hemolítica denominada CARTOX con un peso molecular de 102-107 kDa identificada de especímenes procedentes del mar Adriático (Rottini, Gusmani, et al., 1995) y tres citolisinas con pesos moleculares aparentes de 220 kDa, 139 kDa y 36 kDa de especímenes procedentes de la costa norte del Caribe mexicano (Sánchez-Rodríguez, Torrens y Segura-Puertas,2006; Nagai,Takuwa, et al., 2000 b).

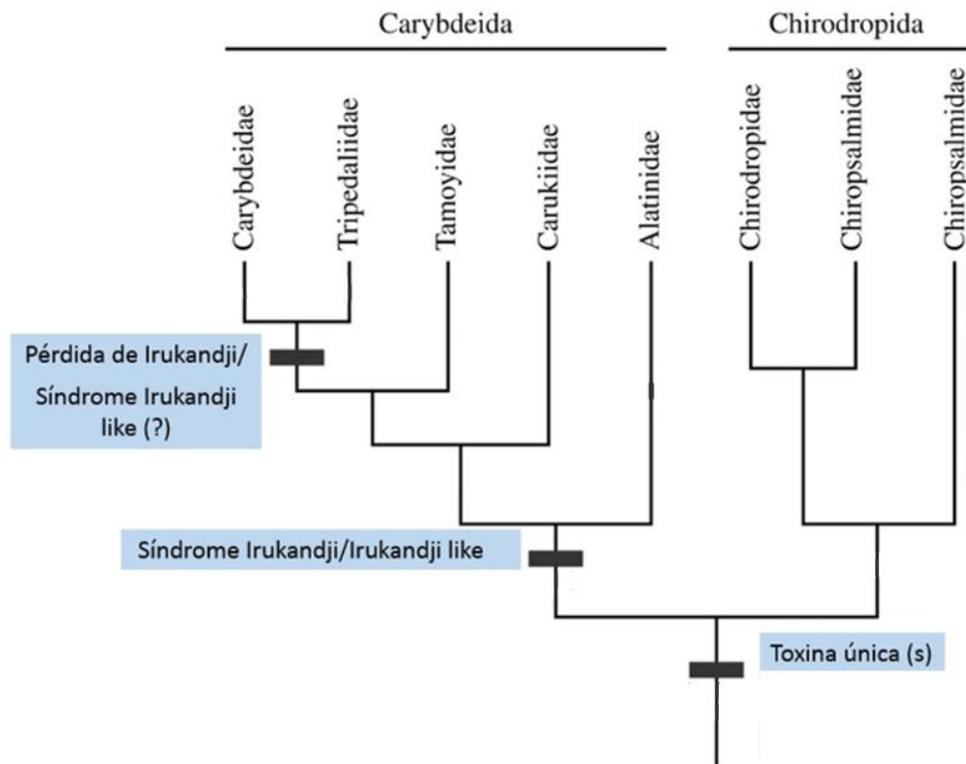


Fig. 6 Tendencia en la toxicidad y evolución de la clase Cubozoa modificado de Bentlage, Cartwright, et al., 2010.

#### 1.2.4.-Toxinas de la clase Cubozoa

Un grupo bien caracterizado de toxinas de la clase Cubozoa son las proteínas citolíticas (Tabla 5). En el caso de los Carybdeos se han reportado múltiples citolisinas en *Carybdea marsupialis*, *C. rastoni* y *C. alata* (Torrens y Segura-Puertas 2006; J. Chung, et al. 2001) (Nagai y Takuwa, 2000), mientras que en el caso de los Chirodropideos, solo una citolisina ha sido aislada de *C. quadrigatus* (Nagai y Takuwa, 2002). En el caso de *C. fleckeri*, muchas citolisinas de peso molecular variable han sido aisladas de extractos de tentáculo completo y extractos derivados de nematocistos. Algunas de las hemolisinas de los Cubozoos exhiben afinidades variables por las células sanguíneas de diferentes especies. Por ejemplo: las citolisinas obtenidas de *C. marsupialis* y *C. fleckeri* presentan afinidades variables hacia eritrocitos de humano, conejo, rata y ratón, mientras que las citolisinas aisladas de *C. xamacana*, *C. brozie* y *C. rastoni* no presentan variación significativa por eritrocitos humanos o de oveja (Rottini, Gusmani, et al., 1995; Beiley, et al. 2005).

Algunos estudios realizados en *C. fleckeri* han demostrado que los extractos obtenidos de tentáculos y nematocistos no tienen actividad de fosfolipasa A o C, en el caso de extractos de tentáculos de *C. marsupialis* y *C. rastoni*, se ha determinado niveles relativamente altos de actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), así como de extractos de cuerpo completo de *C. barnesi*. Algunos investigadores han sugerido que la actividad de PLA<sub>2</sub> juega un papel local o sistémico en seres humanos, sin embargo no se han obtenido evidencias directas que relacionen específicamente las actividades PLA<sub>2</sub> con toxinas derivadas de nematocistos. (Nevalainen, Peuravuori, et al., 2004)

Muchos de los reportes clínicos de cuadros de envenenamiento por contacto con medusas describen síntomas neurológicos como neuropatías sensoriales o parálisis. Análisis de transcriptómica realizados en *Carukia barnesi* y *Malo kingi* (Ávila-Soria, 2009) han permitido la identificación de toxinas putativas con actividad proteolítica o neurotóxica. Los genes identificados tienen motivos de la toxina ShK, una toxina de la anémona *Stichodactyla helianthus*, que bloquea canales de potasio dependientes de voltaje (Castañeda, et al. 1995).

**Tabla 5. Algunas toxinas aisladas de cubomedusas.**

<b>Especie</b>	<b>Nombre</b>	<b>Mw (kDa)<sup>a</sup></b>	<b>Mw (kDa)<sup>b</sup></b>	<b>Actividad biológica</b>
<i>Chironex fleckeri</i>	CfTX-1	43		Cardiotóxica Citotóxica Hemolítica
	CfTX-2	45		Cardiotóxica Citotóxica Hemolítica
	CfTX-A	40		Citotóxica Hemolítica
	CfTX-B	42		Citotóxica Hemolítica
<i>Carukia barnesi</i>	CbTX-1	21	21.7	Neurotóxica
<i>Carybdea rastoni</i>	CrTX-A	43		Hemolítica
	CrTX-B	46		letal
<i>Carybdea alata</i>	CaTX-A	43		Hemolítica
	CaTX-B	45		letal
<i>Chiropsalmus quadrigatus</i>	CqTX-A	44		Hemolítica letal
<i>Carybdea marsupialis</i>			<b>200</b>	<b>Citolítica</b>
	<b>CARTOX</b>		<b>102-107</b>	<b>Hemolítica</b>
			<b>139</b>	<b>Citolítica</b>
			<b>36</b>	<b>Neurotóxica</b>
	<b>CmNt</b>		<b>120</b>	<b>Neurotóxica</b>
<i>Cyanea capillata</i>	CcTX-1		31.2	Citotóxica
	CcNT		8.2	Neurotóxica
<i>Cyanea lamarckii</i>	CIGP-1	27	25.7	Citotóxica
<i>Rhopilema nomadica</i>				Fosfolipasa A <sub>2</sub>
<i>Stomolophus melagris</i>	SmP90		90	Captación de radicales
<i>Physalia physalis</i>	Physalitoxina	220		Hemolítica
	P1	220		Neurotóxica
	P3	85		Neurotóxica
	PpV9.4		0.6	
<i>Olindiassam baquiensis</i>	Oshem1		3.0	Hemolítica
	Oshem2		3.4	Hemolítica

<sup>a</sup> Peso molecular estimado por SDS-Page en kDa. <sup>b</sup> Peso molecular determinado por espectroscopia de masas en kDa.

En el caso de *Carukia barnesi*, se ha expresado una neurotoxina recombinante que ha mostrado actividad en cucarachas (Gershwin, Richardson, et al. 2013). En *Carybdea marsupialis* se ha reportado una neurotoxina de aproximadamente 120 kDa aislada mediante métodos cromatográficos y que mostró actividad en un modelo de cangrejo, sin embargo su estructura primaria no ha sido reportada (Sánchez-Rodríguez, Torrens y Segura-Puertas, 2006).

**Tabla 6. Nueva familia de toxinas de cubomedusas.**

ESPECIE	TOXINA	EXP. M <sup>a</sup> <sub>r</sub>		Reference
		kDa	GenBank	
<i>C. rastoni</i>	CrTX-A	43	AB015878	(H. Nagai, K. Takuwa, et al. 2000)
	CrTX-B	46	-	
<i>C. alata</i>	CaTX-A	43	AB036714	(H. Nagai, K. Takuwa, et al. 2000)
	CaTX-B	45	-	
	CAH1	42	-	
<i>C. quadrigatus</i>	CqTX-A	44	AB045319	(Nagai, H, A 2002)
<i>C. fleckeri</i>	CfTX-1	43	EF636902	(Brinkman y Durnell, 2007)
	CfTX-2	45	EF636903	(Chung, et al. 2001)

EXP. M<sup>a</sup><sub>r</sub>, kDa Masa molecular experimental determinada por SDS-PAGE.

Finalmente, la caracterización de toxinas de cubomedusas se ha llevado a cabo lentamente en comparación a otros cnidarios. Las primeras toxinas en ser identificadas fueron CrTX-A y CrTX-B de *Carybdea rastoni* (Nagai y Takuwa, 2000) y posteriormente se describieron otras toxinas provenientes de otras tres especies de cubomedusas (Tabla 6). Cabe destacar que no hay una secuencia de aminoácidos homóloga existente entre las toxinas de cubomedusas y otras proteínas conocidas, lo que sugiere que las toxinas de cubomedusas pertenecen a una nueva familia de toxinas. Las toxinas de cubomedusas se caracterizan por ser lábiles, básicas y poseer una actividad hemolítica muy potente (Nagai y Takuwa, 2002; Brinkman y Durnell, 2007)

### **1.3.-*Carybdea marsupialis***

*Carybdea marsupialis* (Lineé. 1758) también conocida como “avispon marino del mediterraneo”, es una cubomedusa atlanto-mediterránea que tiene la capacidad de infligir picaduras urticantes. Esta cubomedusa presenta una estructura cúbica típica (Camillo, et al. 2006). Tiene cuatro órganos sensoriales localizados en la campana y su tamaño oscila entre 20 a 40 mm de altura por 36 mm de ancho. Tiene cuatro largos tentáculos que pueden llegar a tener una longitud de hasta diez veces el tamaño de la umbrela (300 mm), los cuales decrecen en diámetro conforme incrementan su longitud y se ubican en cada esquina de la campana (Fig.7). Los tentáculos se encuentran rodeados a lo largo de su longitud con abundantes baterías de nematocistos. El manubrio es corto, y dividido en cuatro lóbulos. La cavidad sub-umbrellar presenta cuatro bolsillos gástricos, los cuales contienen numerosos canales gástricos, transparentes, huecos, similares a los tentáculos (Fig.8A).



La clasificación taxonómica de la cubomedusa es la siguiente (Williamson y Fenner 1996):

- **Reino:** Animalia
  - **Phylum:** Cnidaria (Hatschek, 1888)
    - **Clase:** *Cubozoa* (Werner, 1975)
      - **Orden:** *Cubomedusae* [Carybdea] (Gegenbaur, 1856)
        - **Familia:** *Carybdeidae* (Haeckel, 1877)
          - **Género:** *Carybdea* (Péron & Lesueur, 1810)
            - **Especie:** *Carybdea marsupialis* (Linné, 1758)

Fig. 7 *Carybdea marsupialis* y su clasificación taxonómica (Dallavalle 2015).

### 1.3.1 Distribución y descripción de los nematocistos de *C. marsupialis*

De manera general, el “*cnidoma*” de *C. marsupialis* se compone de al menos cinco tipos de nematocistos reportados (dos de tipo heterotrico, dos de tipo eritele y un grupo de nematocistos encapsulados). La descarga de los nematocistos de este organismo es diferencial, por ejemplo: los nematocistos eriteles y heterotricos que se encuentran en la umbrela y los tentáculos descargan su contenido espontáneamente, mientras que los nematocistos encapsulados no lo hacen, por lo que se ha sugerido que los diferentes tipos de nematocistos deben tener diferentes funciones y reaccionar por tanto a diferentes estímulos (Fig. 8B).

Los nematocistos de *C. marsupialis* se ubican principalmente en la exumbrela y en los tentáculos. Los nematocistos ubicados en la umbrela miden entre  $6.5 \mu\text{m} \times 3.5 \mu\text{m} - 4.5 \mu\text{m}$  y normalmente se ubican de manera radial. Estos nematocistos no descargados presentan un túbulo grueso, ligeramente enrollado y rodeado de espinas. Las espinas tienen forma triangular pequeñas arregladas helicoidalmente alrededor del túbulo. Por otro lado, los nematocistos ubicados en los tentáculos, se encuentran densamente empaquetados en segmentos anillados. Tres tipos de nematocistos han sido encontrados en los tentáculos: heterotricos, holotricos ovoides y holotricos subsféricos. La disposición de estos nematocistos genera una lámina superficial que consiste de diversos nematocistos rodeados de una placa más profunda que contiene elementos contráctiles (Yanagihara, et al. 2002). En menor medida se ha reportado la presencia de pequeños nematocistos contenidos en los racimos de filamentos gástricos distribuidos homogéneamente (Camillo, et al. 2006).

De manera general, se ha descrito que muchas especies de cubo medusas poseen nematocistos en los tentáculos, así como en los labios y los canales gástricos (Camillo, et al. 2006; Southcott 1967), los cuales se propone permiten asegurar presas grandes dentro del manubrio, razón por la cual se dice que las cubo medusas con capacidad de matar o incapacitar a sus presas antes de ingerirlas no presentan nematocistos en el sistema digestivo, mientras que aquellas cubo medusas cuya picadura sea comparativamente menos efectiva posiblemente poseen nematocistos en los canales gástricos que les permitan incapacitar a sus presas (Larson 1976), por lo cual se ha propuesto que el coctel de proteínas bioactivas secretadas en los canales gástricos sean los responsables de matar y digerir a las presas. Actualmente se ha propuesto que los gránulos presentes en el sistema digestivo de la cubo medusa *C. marsupialis* descritos morfológicamente en los canales gástricos localizados en su campana (Fig. 8B) probablemente poseen una función similar a células glandulares recientemente identificadas en anemonas que son capaces de secretar toxinas de manera independiente a los nematocistos y que han sido descritas en otras cubo medusas como *C. xaymacana* y *Nematostella vectensis* (Moran, Praher, et al. 2013). Por tanto, el papel dual de proteínas bioactivas descritas en el veneno pero procedentes de otros tejidos como la exumbrela, tejido epitelial o canales gástricos de la campana posiblemente desempeñan un rol central en la digestión y aseguramiento de la presa.

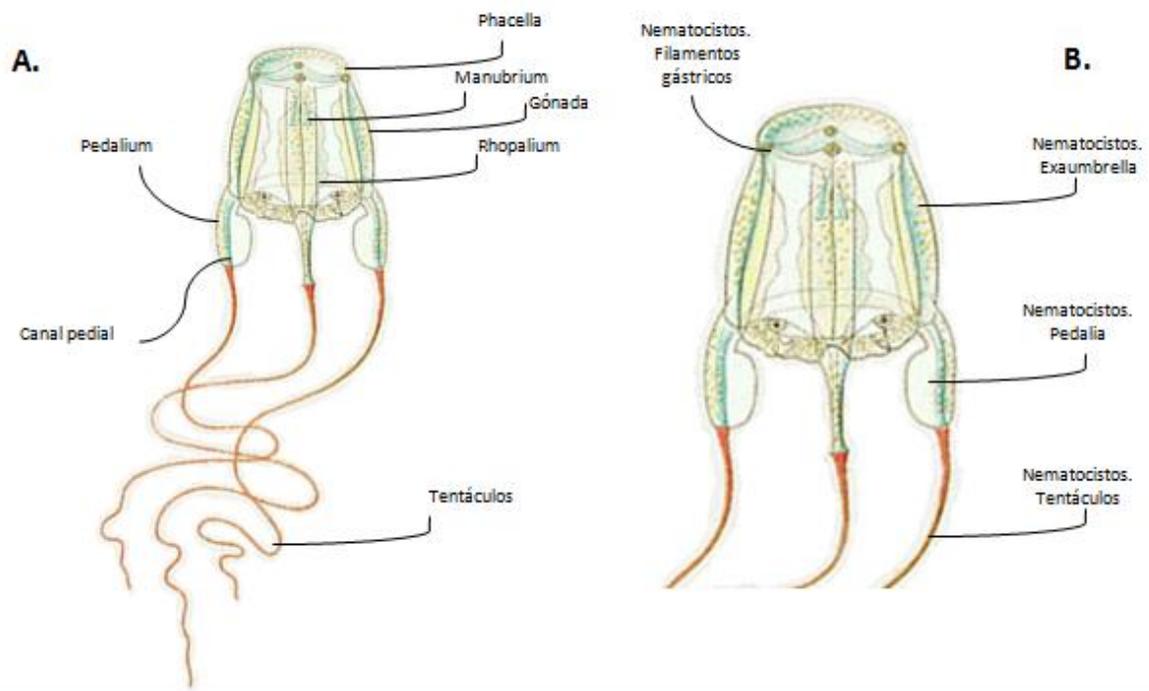
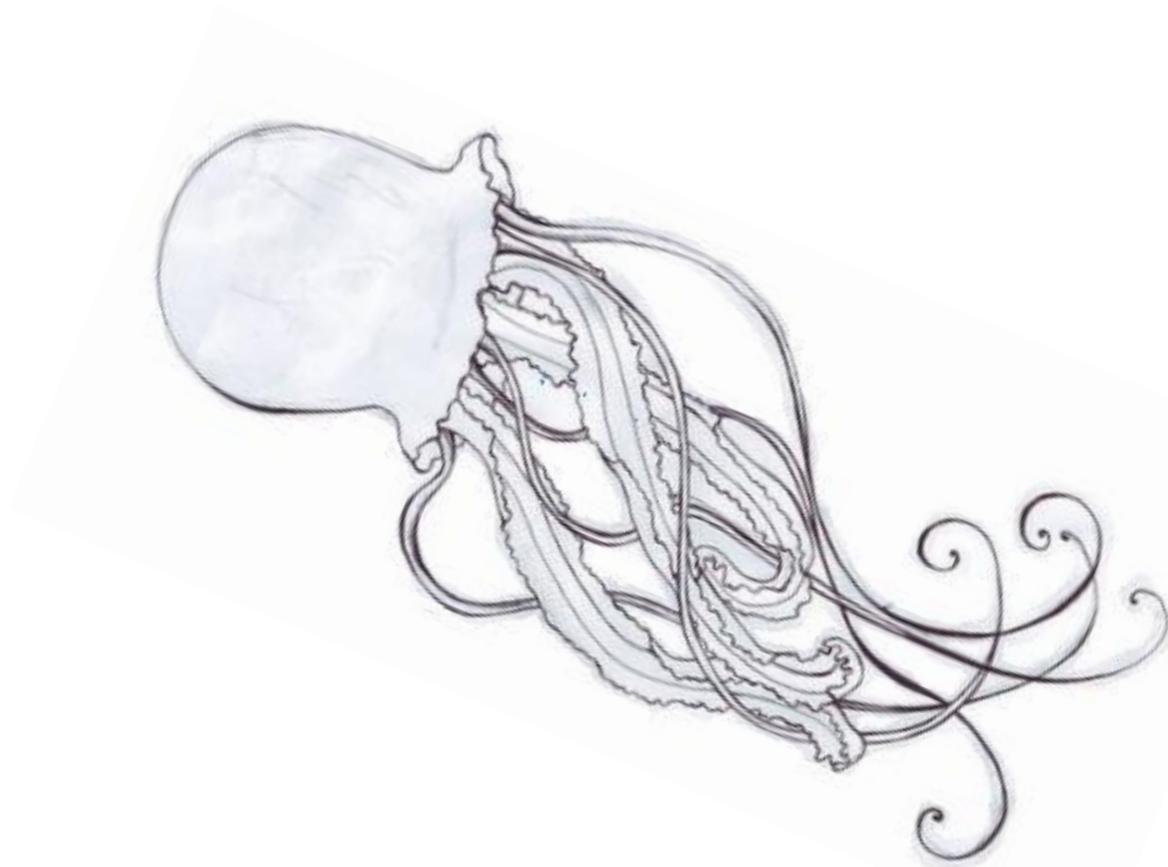


Fig. 8. **A.** Estructura anatómica general de la cubomedusa *Carybdea marsupialis*. **B.** Distribución de los nematocistos en *C. marsupialis* (Camillo, et al. 2006).

*La medusa no oculta nada,  
más bien despliega  
su dicha de estar viva por un instante.  
Parece la disponible, la accedora  
que sólo busca la fecundación,  
no el placer ni el famoso amor,  
para sentir: Ya cumplí,  
ya ha pasado todo.  
Puedo morir tranquila en la arena  
donde me arrojaron las olas que no perdonan.*

## II.-Objetivos



## 2.1.-Hipótesis

La picadura de las cubomedusas como *Carybdea marsupialis* se ha relacionado con un conjunto de signos y síntomas englobados dentro del Síndrome de Irukandji (IS). A pesar que la base farmacológica de IS hasta ahora ha sido sujeto de especulación, los signos y síntomas del síndrome son similares a aquellos causados por la liberación excesiva de catecolaminas por parte de las células cromafines. Por lo tanto, el estudio del veneno de la especie *Carybdea marsupialis* resultará en toxinas que modulen la liberación de catecolaminas endógenas a través de la modulación de  $[Ca^{2+}]_i$ .

## 2.2.-Objetivos

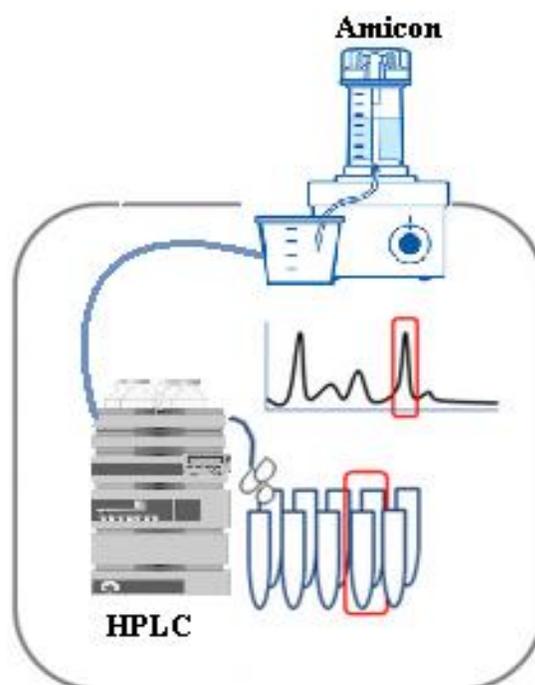
Purificar y caracterizar péptidos bioactivos presentes en la cubomedusa *Carybdea marsupialis*.

## 2.3.-Objetivos particulares

- Identificar las toxinas presentes en la cubomedusa *Carybdea marsupialis*.
- Purificar toxinas mediante técnicas cromatográficas.
- Determinar la secuencia de las toxinas purificadas.
- Caracterizar los posibles efectos biológicos de las toxinas purificadas (actividad proteolítica, citotóxica y neurotóxica).

*Medusa, flor del mar. La comparan  
con la que petrifica a quien se atreve a mirarla.  
Medusa blanca como la U Tabay de los mayas  
y la Desconocida que sale al paso y aeecha  
desde el Eclesiastés al pobre deseo.*

## III.-Metodología



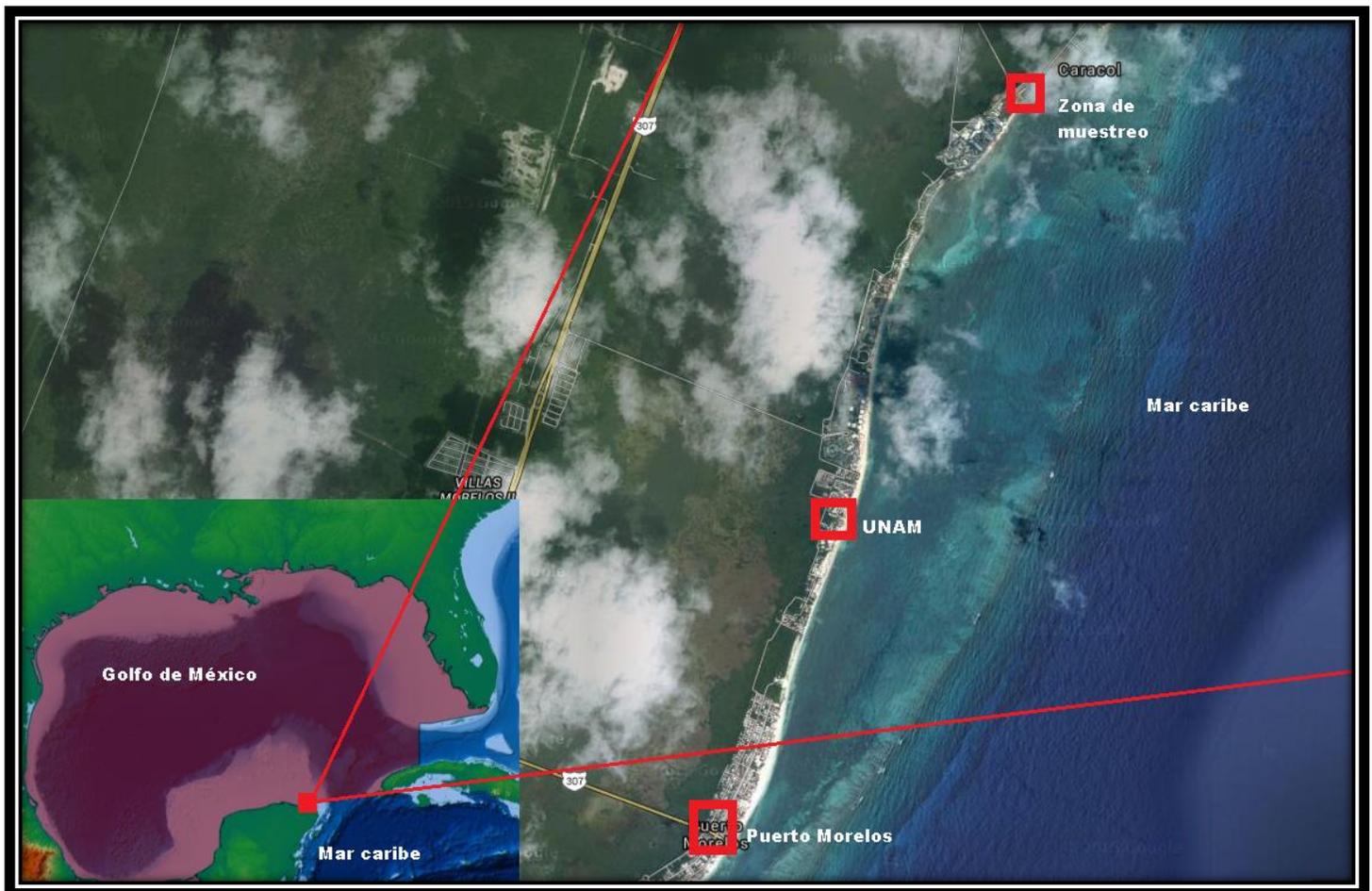
### **3.1.-Muestreo**

Los especímenes de la cubomedusa *Carybdea marsupialis* fueron recolectados en la laguna arrecifal de Puerto Morelos entre los meses de julio y septiembre de 2014. La recolección se realizó en la zona somera y arenosa cercana a la playa, mediante buceo libre. Los especímenes se capturaron de forma manual en recipientes de plástico de 20 L de capacidad llenos de agua de mar. Las cubomedusas se transportaron a la unidad académica de Puerto Morelos para su posterior procesamiento.

### **3.2.-Área de estudio**

La península de Yucatán presenta en el lado del Caribe mexicano, estructuras arrecifales que se extienden de manera casi continua que se extiende desde el extremo norte de la península hasta la bahía de Chetumal, cubriendo una distancia aproximada de 350 km. Sobre la costa existe una formación de barrera con algunas interrupciones. Las costas del estado de Quintana Roo se caracterizan por presentar un relieve muy escaso y por la ausencia total de ríos; sin embargo, la presencia de dolinas es común, lo cual se debe al carácter kárstico del terreno, el cual es de naturaleza calcárea (Folk 1967). La temperatura media mensual del agua varía entre los 25.6 °C en enero (20.3 °C en época de nortes) hasta 29.1 °C en agosto, con un promedio anual de 27.5 °C. La marea es semidiurna de poca amplitud y la dirección de la corriente superficial marina es de sur a norte (Jordan 1978). A lo largo de la costa se encuentran formaciones arrecifales sobre una plataforma continental muy estrecha. El clima es de carácter tropical con vientos alisios en primavera y verano. El medio marino está dominado por la corriente de Yucatán que fluye paralela a la costa con dirección hacia el norte. Las aguas costeras presentan un carácter oceánico y oligotrófico, con gran estabilidad vertical, y elevada transparencia. La laguna arrecifal de Puerto Morelos, se encuentra ubicada en la porción nororiental de la península de Yucatán, entre los 20° 52' N y los 86° 51' O (Ruiz-Retería, Van Tussenbroek y Jordán- Dahlgren 1998). Tiene una extensión aproximada de 7 km y una amplitud de 350 y 1600 m: la profundidad varía entre 1 y 8 m. Presenta un promedio de 3 m. El aporte de agua del subsuelo está directamente relacionado con las lluvias que se presentan usualmente en verano,

presentando un clima cálido y húmedo, entre  $Aw_1$  y  $Aw_2^3$ , según la clasificación modificada de Koeppen. Con un cociente de precipitación-temperatura mayor de 55.3, más la temperatura en la orilla es suavizada considerablemente por los vientos provenientes del este y sureste predominantemente, con presencia de nortes en la parte inicial y final del año (Jordan 1978).



Zona de colecta. (Rojo) La distribución biogeográfica de *Carybdea marsupialis*. Ubicación de la **Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo**. Google. INEGI Imagery 2016. Terra metrics. Puerto Morelos 20°51'13"N 86°52'31"O, elevation 10km, visto 31 de Agosto de 2016. <https://www.google.com.mx/maps>

<sup>3</sup>  $Aw_1$ ; Clima cálido semi-húmedo (Humedad intermedia) y  $Aw_2$ ; Clima cálido semi-húmedo (Humedad alta).

### 3.3.-Obtención del extracto crudo

Los tentáculos de las medusas fueron recortados con tijeras y se colocaron en viales de vidrio. Posteriormente, mediante un homogeneizador de vidrio se descargaron los nematocistos. Para tal efecto, los tentáculos se colocaron en agua desionizada y se homogeneizaron hasta obtener la descarga total de los nematocistos, de tal manera que el estímulo mecánico provocado por la fricción, promoviera la eversión de los túbulos de los nematocistos y por ende la liberación de las toxinas al medio. El método se utilizó también para obtener el extracto de veneno de los nematocistos presentes en las campanas. El extracto obtenido se agitó y se centrifugó durante 30 minutos a 4000 rpm a 4 ° C en una centrífuga Eppendorf 5810 R. El sobrenadante fue colocado en viales de vidrio y se liofilizó en una liofilizadora Freeze Dryng Model 77500 (LABCONCO). El material se congeló a -60 °C hasta su uso (Morales-Landa 2007).

### 3.4.-Purificación parcial de toxinas

#### 3.4.1.-Separación por Amicon

El fraccionamiento del extracto crudo se realizó mediante el sistema de Amicon utilizando los filtros 1, 3, 10 y 30 kDa. Se disolvió 1g de extracto crudo en 25 mL de agua destilada a una temperatura de 4 °C con una presión de 55 psi.

#### 3.4.2.-Separación por HPLC en fase reversa

- 1) Se disolvió 1 mg de extracto crudo procedente de los tentáculos en 500  $\mu$ L de agua desionizada. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4 °C y el sobrenadante se inyectó en un sistema RP-HPLC (Shimadzu SCL-10AVP) con una columna analítica purospher STAR C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m) de 250 x 4,6 mm. La columna fue equilibrada con Solución A: agua 0.1 % TFA (v/v). Las fracciones de los componentes del veneno fueron eluidos mediante el siguiente programa: 5 min de Solución A 100%, un gradiente lineal de 0 a 100 % (v/v) de la Solución B: acetonitrilo 0,1% TFA, con un flujo de 1 mL·min<sup>-1</sup> por 30 min y 15 min de solución B al 100 %. Las fracciones cromatográficas colectadas se concentraron por medio del sistema Speed-Vac

ISS110. La fracción C<sub>mtr</sub> 1.1 se disolvió en 200  $\mu$ L de agua desionizada y fue repurificada mediante el mismo sistema RP-HPLC utilizando el siguiente programa: 5 min de Solución A al 100%, un gradiente lineal de 0-60 % de la Solución B por 30 min y 15 min de solución B al 100% a un flujo de 0.5 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. La absorbencia fue medida a  $\lambda$  220 nm. (Frazão y Antunes, Marine drugs 2016) Las fracciones obtenidas se concentraron por medio del sistema Speed-Vac ISS110.

- 2) Se disolvió 1 mg de extracto crudo procedente de las campanas en 500  $\mu$ L de agua desionizada. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4 °C y el sobrenadante se inyectó en un sistema RP-HPLC (Shimadzu SCL-10AVP) con una columna analítica puospher STAR C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m) de 250 x 4,6 mm. La columna fue equilibrada con Solución A: agua 0.1 % TFA (v/v). Las fracciones de los componentes del veneno fueron eluidos mediante el siguiente programa: 5 min de Solución A 100 %, un gradiente lineal de 0 a 100 % de la Solución B: acetonitrilo 0,1% TFA, con un flujo de 0.5 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup> por 40 min y 5 min de solución B al 100 % por 15min. Las fracciones cromatográficas colectadas se concentraron por medio del sistema Speed-Vac ISS110. La absorbencia fue medida a  $\lambda$  220 nm. (Frazão y Antunes, Marine drugs 2016) Las fracciones obtenidas se concentraron por medio del sistema Speed-Vac ISS110.

### 3.4.3.-Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación por espectrometría de masas en tandem.

La masa molecular de los péptidos activos se determinó por espectrometría de masa MALDI-TOF. A 5  $\mu$ g de cada péptido se le agregaron 5  $\mu$ L de una solución saturada de ácido ( $\alpha$ )-ciano-4-hidroxi-cinámico ultra puro. 1  $\mu$ L de esta mezcla se depositó en una placa de MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente. El espectro se registró en modo lineal positivo en un espectrómetro Brucker Microflex con un láser de nitrógeno a  $\lambda$  337 nm a un intervalo de masas de 1000 a 30,000 Da. La secuencia de aminoácidos se determinó en un espectrómetro de masas Esquire con trampa de iones (Brucker-Frazer Analytical, GmbH, Germany) en modo positivo mediante el método de Top-down. Las fracciones obtenidas se disolvieron en un volumen *ad hoc* de una solución A: agua: ácido fórmico 0.1%. Se eluyeron las fracciones en un sistema cromatográfico RSLC nano utilizando una columna capilar de fase reversa ProSwiftRP-4H (200 $\mu$ m x 25 cm). Se utilizó una solución B: Acetonitrilo: 0.1%

ácido fórmico. El gradiente consistió en 5-30% de solución B por 10 min, 30-65% de solución B por 45 min y 65-90% solución B por 5 min. Se utilizó una fuente de ionización ESI (*electrospray*) acoplado al espectrofotómetro. Los espectros MS/MS se generaron mediante la técnica ETD (Disociación por transferencia de electrones). Los espectros intactos fueron deconvolucionados utilizando el algoritmo del software Xtract Thermo Scientific™ Protein Deconvolution 4.0. Los datos fueron analizados mediante el software ProSightPD™ y Proteome Discover™ 2.0.

#### 3.4.4.-BLAST

Se utilizó el programa informático de alineamiento de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en el servidor del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el fin de realizar alineamientos de secuencias proteicas entre las secuencias de los péptidos purificados y las bases de datos Swiss-Prot y NCBI.

#### 3.4.5.-Clustal W

Después de realizar una búsqueda de secuencias homólogas con los programas BLAST y PSI-BLAST, se realizaron alineamientos múltiples entre secuencias de toxinas de cnidarios reportadas en la base de datos de NCBI, así como en artículos publicados, utilizando el programa Clustal W. Las secuencias fueron cargadas al programa en formato FASTA y utilizando el valor estándar (-1) de máximas interacciones tipo HMM.

#### 3.4.6.-Phyre 2 y Knoter 1d

Posteriormente a la búsqueda de secuencias homólogas, se generaron modelos a partir de las secuencias obtenidas, se utilizó el programa Phyre 2 (Protein homology & Recognition Engine). Así mismo se utilizó el programa Knoter1d para predecir si la secuencia obtenida era similar a alguna toxina (Gracy, et al. 2004)

### 3.4.7.-Síntesis de péptidos

Los péptidos Cmt<sub>R</sub>1.1 y Cmt<sub>R</sub>1.3 fueron sintetizados en fase sólida utilizando la metodología Fluoren-9-ylmethoxycarbonil (Fmoc) en un sintetizador de péptidos 433A de Applied Biosystems por la empresa Chemical Riufu Lt. Los péptidos sintéticos fueron purificados mediante RP-HPLC (Shimadzu con un detector dual) en una columna analítica puospher STAR C18 (5um) de 250 x 4,6 mm con un gradiente lineal de 0 a 60 % de Solución B: acetonitrilo 0,1% TFA, con un flujo de 1 mL·min<sup>-1</sup> por 45 min La columna fue equilibrada con Solución A: agua 0.1 % TFA (v/v) por 5 min

### 3.5.-Bioensayos

Las pruebas biológicas que se realizaron en el transcurso del proyecto con las fracciones obtenidas por RP-HPLC:

- Evaluación de actividad hemolítica en eritrocitos humanos.
- Evaluación de la actividad proteolítica (método de Kunitz).
- Evaluación de actividad anticancerígena.
- Actividad neurotóxica.
- Ensayos de fluorescencia (Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>) en el sistema FLiPR (Fluorescent Imaging Plate Reader).

#### 3.5.1.-Evaluación de actividad proteolítica

La determinación de la actividad proteolítica se realizó mediante el método de Kunitz. En el cual se monitoreo la hidrólisis del sustrato caseína mediante la capacidad de los péptidos resultantes de la hidrólisis de absorber a 280 nm. Para comenzar el ensayo se preparó una solución de caseína 1% en una solución buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.5 y se preincubó a 35 °C por 5 minutos. Así mismo se prepararon soluciones de las fracciones FC<sub>mc</sub><10, FC<sub>mc</sub>10-30 y FC<sub>mc</sub>>30, así como del control positivo bromelina, a una concentración de 1mg/mL en una solución buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.5 adicionado con CaCl<sub>2</sub> 0.025 M, las cuales también se pre incubaron a 35 °C por 5 minutos. Posteriormente se agregaron a

200  $\mu\text{L}$  de solución de caseína 100  $\mu\text{L}$  del control positivo, así como cada una de las fracciones a probar. Al control negativo se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  solución buffer. Se agitó cada tubo y se incubó a 35 °C en un baño María por 20 minutos. Al término de la incubación se agregaron a todos los tubos 600  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % a cada tubo y se agitó vigorosamente. Posteriormente se incubó cada tubo por 30 minutos en un baño María a 35 °C. Después de la incubación se centrifugaron los tubos a 2500 RPM por 20 min. Se tomó el sobrenadante de los tubos y se determinó la absorbencia de cada uno de los tubos a 280 nm, ajustando con un blanco de reactivos (600  $\mu\text{L}$  TCA 10 %: 400  $\mu\text{L}$  de agua destilada). Se corrigió el valor de la absorbencia de cada tubo restando el valor de la absorbencia del control positivo. (Ebeling, et al. 1974)

### 3.5.3.-Actividad neurotóxica en células granulares ganglionares (CCG)

#### 3.5.3.1.-Cultivo de CCG a partir de cerebelo de rata (Winstar)

En este experimento se utilizaron 6 ratas Winstar de 7 a 8 días de nacidas. Se empapó el cuello de cada rata con alcohol y se seccionó de un tajo la cabeza, la cual fue recibida en la tapa de una caja Petri. Con tijeras tipo Mayo se realizó una incisión sagital de la piel de la base del cuello a la nariz. Con tijeras Metzembraum, se cortó el cráneo de manera coronal sobre la porción petrosa del hueso temporal. Posteriormente, se cortaron los nervios ópticos y los cerebros completos con las pinzas Kelly curvas. Los cerebros fueron recibidos en una caja Petri con solución de Krebs. Con la ayuda del microscopio se disecaron las meninges y los vasos del cerebelo dejando al descubierto los hemisferios cerebelares, los cuales fueron disecados a su vez y colocados en una caja Petri de 35 mm. El tejido cerebelar se disgregó con ayuda del bisturí y se colocó en un tubo con solución de Krebs. Se centrifugó el tejido obtenido a 1000 rpm por 10 segundos y se retiró el sobrenadante mediante aspersion. Se agregaron 6 mL de solución de tripsina (0.3 mg/mL) previamente filtrada al tejido obtenido y se incubó a 37 °C a baño María durante 8 minutos. Se volvió a centrifugar a 1000 rpm por diez segundos y se retiró el sobrenadante por aspersion. Se agregaron 2 ml de solución de DNAsa (0.1 mg/mL) e inhibidor de proteasas (1 mg/mL) al tejido y fue disociado con una

pipeta Pasteur hasta obtener una suspensión homogénea. La suspensión fue recuperada y depositada en un tubo con 5 mL de solución de Krebs adicionada con  $MgSO_4$  (3.8 %). Se centrifugó la suspensión obtenida a 1000 rpm por 6 minutos. Se retiró el sobrenadante y se disolvió el pellet obtenido en medio de cultivo. Se determinó el número de células (1.25-1.5 millones de neuronas/mL y 0.6-1 millones de astrocitos/mL). Posteriormente, se agregó Ara C (12.5  $\mu$ L/mL) para evitar el crecimiento de células gliales a las 24 h. Se mantuvieron las células por 8 días y se analizaron al décimo día con KCl 5 mM, KCl 25 mM, Glutamato 500  $\mu$ M, NMDA 150  $\mu$ M y MK 801 140  $\mu$ M. Se probaron dos concentraciones del extracto crudo proveniente de los tentáculos (16 y 32  $\mu$ g/mL) y las campanas (3.2 y 0.3  $\mu$ g/mL) (Thangnipon, et al. 1983).

### 3.5.4.-FLiPR de $Ca^{2+}$ y $K^+$ (Fluorescent Imaging Plate Reader).

#### 3.5.4.1.-*Obtención de células cromafines*

Las células cromafines (CF) se disecaron de las glándulas suprarrenales de vacas adultas *Bos taurus*. Las glándulas suprarrenales bovinas fueron obtenidas de vacas criadas y manejadas de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano (CEIEPAA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las glándulas suprarrenales fueron disecadas para obtener la médula adrenal, la cual fue disgregada en pequeñas porciones. El tejido obtenido fue incubado a 37 °C por 20 min en solución de Hank modificada y suplementada con 20 U/ml de papaína. Posteriormente, el tejido fue transferido a una solución de colagenasa tipo 1 /dispasa (1:10, v/v) y se incubó a 37 °C por 20 min. La disgregación del tejido después de la incubación se realizó mecánicamente mediante un homogeneizador tipo Stomacher (ECOSHEL, USA). Las células en suspensión fueron centrifugadas a 1270 rpm por tres minutos y lavadas con medio Leibovitz (L-15) dos veces y una vez en medio modificado de Eagle (DMEM), ambos suplementados con suero fetal bovino 10 % (v/v) y una solución de estreptomomicina/penicilina 1% (v/v). Las células fueron depositadas en placas de 96 pozos recubiertas de con poli-L-

lisina e incubadas a 37° C en una atmósfera con aire/CO<sub>2</sub> (19:1, v/v). Las células fueron usadas 24 h después de ser depositadas en las placas (Waymire, et al. 1983).

#### 3.5.4.2.-Determinación del flujo de Ca<sup>2+</sup>

a) Los cambios en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular en tiempo real se determinaron en células cromafines crecidas en placas de 96 pozos precargadas con el colorante fluorescente Fluo-4 AM (Sigma, USA). Se utilizó un lector de microplacas multimodal Flex Station 3 (Molecular Devices, USA) a 525 nm con un tiempo de adquisición de 2 s. En cada pozo de la placa se colocaron un total de 10,000 células CF. Las CF fueron incubadas por 300 s con medio de registro (Amortiguador Krebs-Ringer/Glucosa). En el segundo 315 se agregaron las fracciones a probar a las células y K<sup>+</sup> [10 mM] (Control). Finalmente en el segundo 430 se agregó ionomicina [1 mM] (Guo, et al. 2013).

b) Los cambios en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular en tiempo real se determinaron en células cromafines crecidas en placas de 96 pozos precargadas con el colorante fluorescente Fluo-4 AM (Sigma, USA). Se utilizó un lector de microplacas multimodal Flex Station 3 (Molecular Devices, USA) a 525 nm con un tiempo de adquisición de 2 s. En cada pozo de la placa se colocaron un total de 10,000 células CF. Las CF fueron incubadas por 300 s con las fracciones a probar disueltas en el amortiguador Krebs-Ringer/Glucosa. En el segundo 315 se agregó K<sup>+</sup> [10 mM]. Finalmente en el segundo 430 se agregó ionomicina [1 mM] (Guo, et al. 2013).

#### 3.5.4.3.-Determinación del flujo de K<sup>+</sup>

Los cambios en la concentración de K<sup>+</sup> intracelular fueron determinados en células HEK (*human embryonic kidney*) transfectadas con el vector de expresión de mamíferos HEK-pTracer-Kv10.1 para expresar el canal Kv 10.1 crecidas en placas de 96 pozos precargadas con el colorante fluorescente indicador de Tl<sup>+</sup> AM (acetoximetil éster). Se utilizó un lector de microplacas multimodal Flex Station 3 (Molecular Devices, USA) a 515 nm con un tiempo de adquisición de 2 s. En cada pozo de la placa se colocaron un total de 10,000 células que fueron incubadas por 300 s con cada fracción. Antes de comenzar con la adquisición de

datos, las células adheridas a la microplaca fueron incubadas por la noche a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. El buffer de carga se preparó al siguiente día. Se removieron las placas de células y se les agregó buffer de carga. (100 µL de Buffer de carga por 100 µL de solución de células con 20000-80000 células). Las placas fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente en obscuridad. Se introdujo a la placa Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a partir de una solución 5x y 1x para obtener una concentración final de 0.5 mM de Tl<sup>+</sup> y 5 mM de K<sup>+</sup> (Titus SA 2009).

#### 3.5.4.4.-Ensayo de microfluoroscopia sobre células cromafines

Para realizar este ensayo se utilizó un microscopio de epifluorescencia Leica DM 5000. Se utilizaron células cromafines de vaca en suspensión, en solución de Krebs-Ringer, utilizando como indicador el fluoróforo Fluo-4 Am. Se suministraron pulsos de 500 ms a la preparación de células mediante el sistema micro Spitzer. Se probaron tres condiciones: **A)** Células cromafines sin tratamiento. **B)** Células cromafines después de un pulso de K<sup>+</sup> 100 mM. **C)** Células cromafines después de un pulso de toxina (1µg/µl). Las imágenes se analizaron mediante el programa J Image (Hernandez y Francisco 1989).

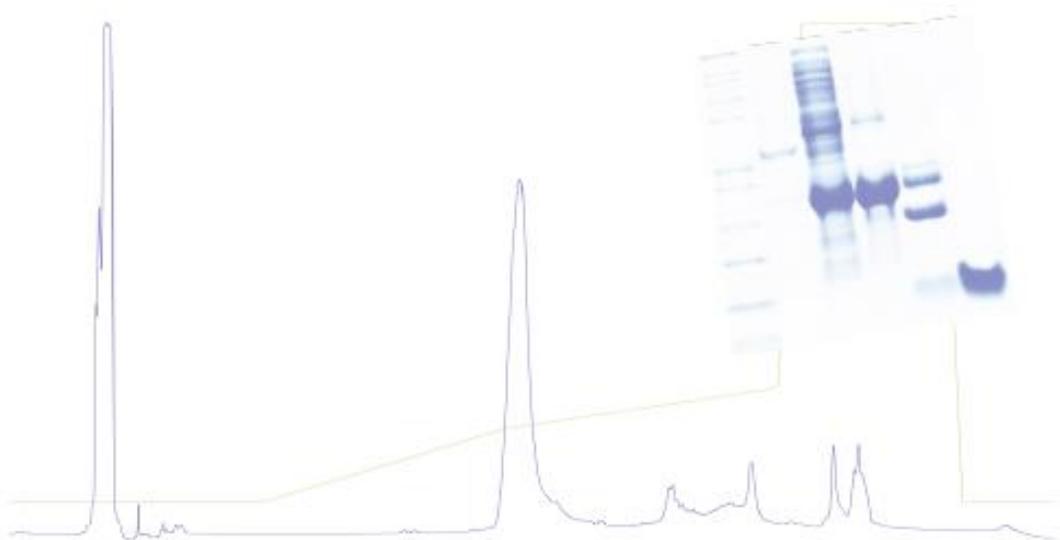
*Flores del mar y el mal las medusas.*

*Cuando eres niño te advierten:*

*Limitate a contemplarlas.*

*Si las tocas, las espectrales  
te dejarán su quemadura,  
la marca a fuego, el estigma  
de quien codicia lo prohibido.*

## IV.-Resultados y discusión



## 4.1.-Resultados

### 4.1.1-Caracterización de los péptidos activos procedentes de los tentáculos de *Carybdea marsupialis*

Para realizar la extracción del veneno se tomó en cuenta que una de las características principales de los organismos pertenecientes a la clase Cubozoa es la presencia de nematocistos. Dichas estructuras especializadas en la dispensación del veneno contra depredadores y presas se localizan comúnmente en los tentáculos. En el caso concreto de *C. marsupialis*, se sabe que esta posee cuatro tentáculos con nematocistos organizados en baterías helicoidales a lo largo de estos (Camillo, et al. 2006). Por lo cual se procedió a disecar los tentáculos de las campanas de los organismos recolectados y posteriormente se realizó el proceso de extracción. El extracto crudo (CmEt) obtenido fue liofilizado y guardado en congelación hasta su uso.

Los componentes de CmEt fueron determinados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*), realizando un *Mass fingerprint* utilizando diferentes matrices (Ácido sinapínico SA, ácido  $\alpha$ -Ciano-4-hidroxicinámico ACH y ácido 2,5-Dihidroxibenzóico DHB). Las proteínas de alto peso molecular no fueron detectadas a pesar del uso de diferentes matrices. Se detectaron 43 componentes con pesos moleculares entre 2724-17911 Da. El perfil del espectro de masas mostrado en la Fig. 9 corresponde a lo que se ha reportado en la literatura en lo que respecta a la compleja mezcla de péptidos y proteínas que componen el veneno de los cnidarios. Se detectaron dos grupos de componentes de acuerdo a su peso: señales de alta intensidad, correspondientes a péptidos entre los 3 y 10 kDa, así como de dos señales de baja intensidad de 17.72 a 17.78 KDa que podrían ser indicativos de la presencia de fosfolipasas de tipo  $A_2(PLA_2)$ . Las  $PLA_2$  son enzimas ampliamente difundidas en los venenos de diversos organismos tanto terrestres, como de origen marino y que usualmente poseen una masa molecular comprendida entre los 13 kDa y 18 kDa (Timo J, et al. 2004; Bahareh, et al. 2016).

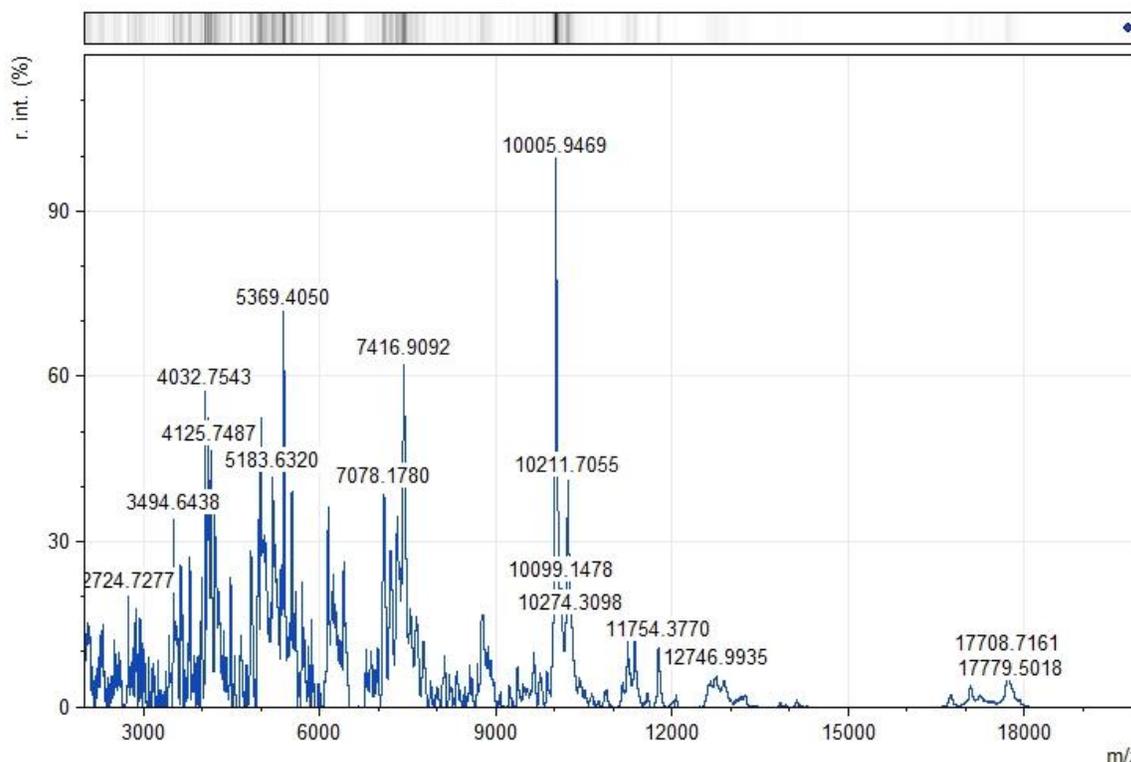


Fig.9 *Mass fingerprint* del extracto crudo del veneno obtenido de los tentáculos (CmEt) obtenido del veneno proveniente de los tentáculos de la cubomedusa *Carybdea marsupialis*. (r.int.: intensidad relativa; %: normalizada). Se muestra el peso molecular de los péptidos y proteínas cargados  $[M+H]^+$  con una relación señal/ruido  $>2$ .

La caracterización de las proteínas y péptidos bioactivos provenientes del veneno de las cubomedusas se ha visto obstaculizada por la inestabilidad de sus componentes, así como la dificultad de colecta de los organismos debido a su pequeño tamaño y falta de coloración (camuflaje). Por tanto, hasta la fecha existen muy pocos estudios acerca de los componentes del veneno procedentes de las cubomedusas del género *Caribdeidae* al cual pertenecen las principales especies causales del síndrome de Irukandji. En el caso particular de *Carybdea marsupialis*, sólo se han reportado alrededor de cuatro toxinas de alto peso molecular (30-100 kDa) aisladas del veneno de este organismo. Tomando en cuenta que la mayoría las neurotoxinas aisladas de cnidarios se encuentran en un intervalo de pesos moleculares entre 3 y 10 kDa (Moran, Genikhovich, et al. 2012) y que el *Mass fingerprint* obtenido mostraba señales que corresponden a estos pesos, se decidió probar la citotoxicidad de CmEt sobre Células Granulares Cerebelares (CGC) como modelo de neurotoxicidad. Las CGC son

células ubicadas en el cerebelo y estudios previos han demostrado que la influencia de condiciones que propician el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula promueve la maduración y supervivencia de las CGC. Estas condiciones incluyen la despolarización de las células influenciada por concentraciones “elevadas” de  $\text{K}^+$  extracelular ( $[\text{K}^+]_e$ ) en cultivos primarios de CGC (Resink, et al. 1994), así como la estimulación excitatoria mediada por receptores de aminoácidos excitatorios (EAA<sub>R</sub>) (Gallo, et al. 1987). El EAA<sub>R</sub> de tipo NMDA (N-metil-D-Aspartato) es particularmente efectivo para generar esta respuesta debido a que es un receptor glutamatérgico de tipo inotrópico (iGluR) permeable a  $\text{Ca}^{2+}$  (Balázs, Jørgensen y Hack 1988). Así mismo se ha descrito que los EAA ejercen efectos tóxicos en CGC y que la sensibilidad a EAA depende del estado de madurez de las células (Garthwaite y Garthwaite 1991).

El modelo *in vitro* de excitotoxicidad sobre CGC fue diseñado de la siguiente manera. Se utilizaron dos grupos de cultivos primarios de CGC con dos tiempos de incubación (5 y 10 días). Se utilizaron dos concentraciones de  $[\text{K}^+]_e$  (5 mM y 25 mM, “bajo” y “alto”  $[\text{K}^+]_e$  respectivamente), los AAE (Glutamato (Glu), NMDA, y el inhibidor MK 801) como controles y se probaron dos concentraciones de CmEt: B1 y B2. La viabilidad celular fue determinada con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium). Este modelo permitió determinar los efectos indirectos de CmEt en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en CGC (Fig. 10). El efecto observado en este modelo al agregar CmEt a dos diferentes concentraciones (B1:16 y B2:32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) al medio de cultivo celular es que CmEt mimetiza el efecto trófico excitatorio de NMDA y Glu, así como el efecto de altas concentraciones de  $[\text{K}^+]_e$ , ya que al ser agregados a CGC “jóvenes” (5 días), estas aumentan su supervivencia y cuando se agregan a células “viejas” (10 días) se induce la muerte celular respecto al efecto obtenido con bajas concentraciones de  $[\text{K}^+]_e$ . Por otro lado, a pesar de que los efectos obtenidos por la adición de CmEt con dos concentraciones son similares al efecto de EAA, Glu y NMDA generan un efecto mayor que B1 y B2, pero menor que el aumento de la viabilidad celular en células jóvenes y la disminución de la viabilidad celular en células viejas a altas concentraciones de  $[\text{K}^+]_e$ . Así mismo es posible observar un efecto sinérgico al combinar los EAA con B1 y B2. Por tanto, el tratamiento de los cultivos primarios de CGC parece mimetizar los efectos tróficos y tóxicos de los EAA en CGC, sin embargo, no a través de un receptor glutamatérgico, ya que al tratarse las CGC con el inhibidor Mk-801 en

conjunto con CmEt el porcentaje de supervivencia es moderadamente mayor respecto a Mk801, lo que es indicativo de que el ambiente trófico excitatorio de CmEt es generado a través de un proceso alternativo a la apertura de canales inotrópicos de glutamato.

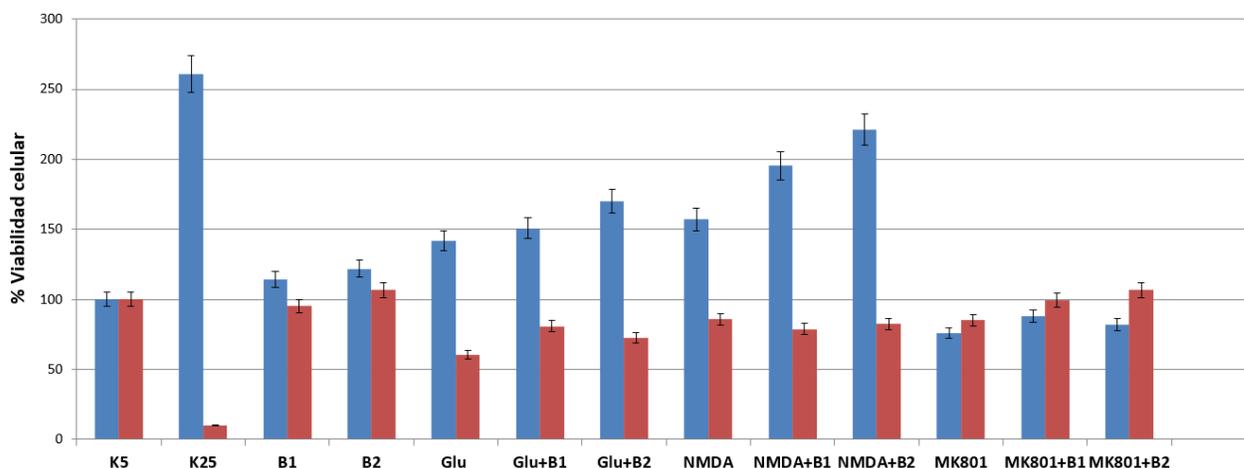


Fig.10 Actividad neurotóxica en Células Granulares Cerebelares (CGC) del extracto crudo obtenido del veneno proveniente de los tentáculos de la cubomedusa *Carybdea marsupialis*. Se realizaron pruebas de viabilidad en neuronas granulares tratadas a los 5 días (Azul) y a los 10 días (Rojo). La determinación de la viabilidad celular se realizó a las 30 h. (K5) KCl 5mM. (K25) KCl 25mM. (B1) Veneno de tentáculos (16 $\mu$ g/mL). (B2) Veneno de tentáculos (32 $\mu$ g/mL). (Glu) Glutamato 140  $\mu$ M. (NMDA) N-metil-D-aspartato 140  $\mu$ M. (MK 801) Dizocilpina 140  $\mu$ M.

Dado que CmEt de *Carybdea marsupialis* mostró tener efecto neurotóxico sobre CGC y considerando la experiencia experimental de diversos autores que se han enfocado en la caracterización bioquímica y estructural de toxinas de cnidarios (especialmente de la clase Anthozoa e Hydrozoa), se decidió concentrar y fraccionar CmEt mediante el sistema de ultrafiltración Amicon. Se utilizaron las membranas Millipore de 10 y 30 kDa, ya que muchas de las dificultades encontradas en el aislamiento de toxinas en cnidarios radican en la agregación de proteínas de alto peso molecular y la proteólisis de los componentes del veneno (Lazcano-Perez, et al. 2016; Ponce, et al. 2013; Lassen, Helmholz and Ruhnau, et al. 2012; Helmholtz, et al. 2010). Se obtuvieron tres fracciones FCmt<10, FCmt10-30 y FCmt > 30, las cuales fueron alicuotadas, liofilizadas y guardadas en refrigeración hasta ser usadas.

Para definir que fracción poseía actividad biológica sobre células excitables, se decidió determinar el efecto en curso temporal de la concentración relativa de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en células cromafines bovinas *in vitro* de las fracciones obtenidas (Fig. 11), ya que estas células son usadas como modelo de células excitables como neuronas noradrenérgicas o células neuroendocrinas (Domínguez, et al. 2012). Además que la hipótesis más aceptada hasta el momento para explicar los signos y síntomas de IS propone que alguna toxina presente en el veneno de las cubomedusas es capaz de intervenir en el proceso de liberación de catecolaminas por parte de las células cromafines (Rathbone, et al. 2016). El ensayo consistió en precargar con el indicador fluorescente Fluo-4 AM a las células cromafines y a los 315 ms agregar las fracciones FCmt<10, FCmt > 30 y FCmc<10. Se utilizó  $\text{K}^+$  [10 mM] como control. Finalmente se agregó ionomicina [1 mM] a los 430 s. Se probaron las fracciones FCmt<10 y FCmt > 30, debido a que solamente se ha reportado una neurotoxina de aproximadamente 120 kDa aislada de *Carybdea marsupialis* y que generalmente las toxinas neurotóxicas presentes en el veneno de los cnidarios tienen un peso molecular de 3-10 kDa (Sánchez-Rodríguez, Torrens y Segura-Puertas, 2006; Zhang, et al. 2003).

En la Fig. 11, se puede observar que tanto la fracción FCmt<10 y FCmt > 30 aumentan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células cromafines, mostrando un efecto similar al de  $\text{K}^+$  [10 mM], el cual induce la despolarización de la membrana y promueve la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula aumentando  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La fracción FCmt<10 mostró mayor efecto. Así mismo, al agregar ionomicina al medio de cultivo se puede observar que hay aumento en la fluorescencia por lo cual podemos inferir que los efectos de las fracciones en las células cromafines no se deben a la interrupción de la membrana celular, ya que la ionomicina es un ionóforo divalente.

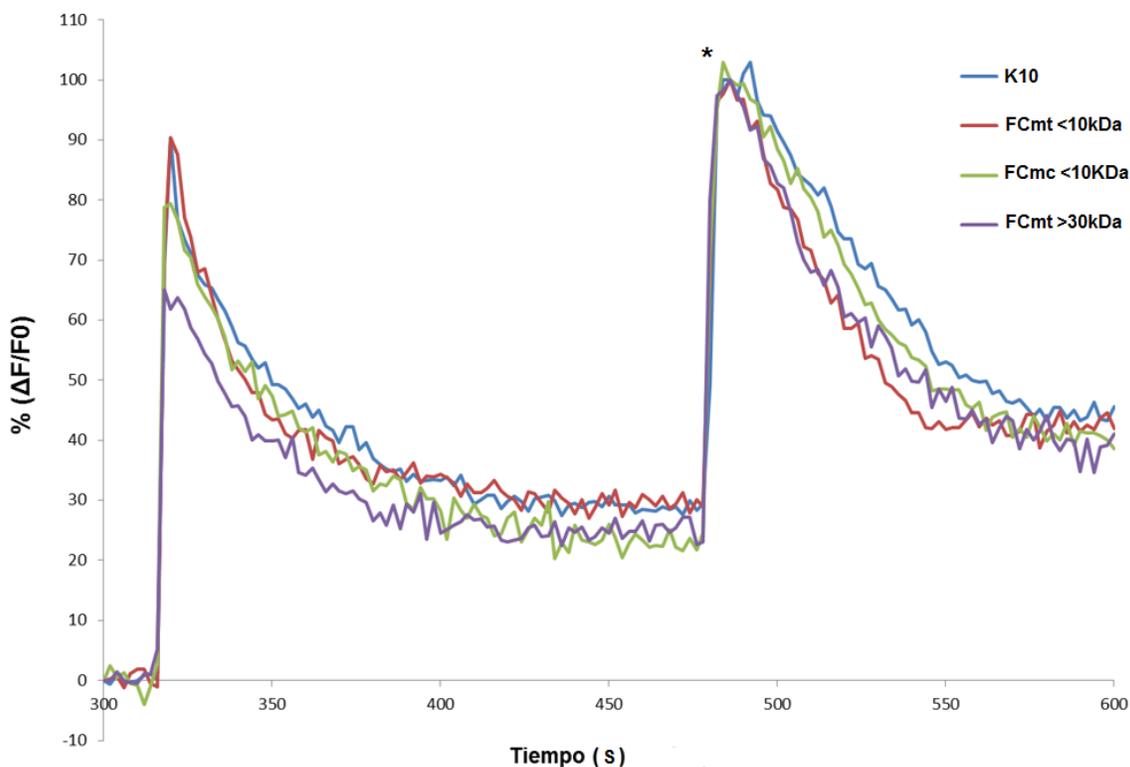


Fig. 11 Determinación del cambio de la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) en células cromafines bovinas inducido por las las fracciones FCmt<10, FCmt>30 y FCmc<10. Las células cromafines fueron precargadas con el indicador Fluo-4 y se monitorearon los cambios de  $[Ca^{2+}]_i$  a 525 nm. Las células se incubaron por 300 s. Las fracciones fueron agregadas a los 315 s. Se utilizó como control K 10 (KCl 10 mM). (\*) Inducción de la entrada de  $Ca^{2+}$  agregando ionomicina [1 mM] a los 430 s.

Los péptidos cuyo peso molecular se encuentra en un rango de 3 a 10 kDa son aquellos que presentan actividad neurotóxica y que alteran la función normal de diferentes canales iónicos para capturar a sus presas (Fautin 2009). Por lo cual, la fracción FCmt<10 que promovió el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  en células cromafines fue fraccionada mediante cromatografía de fase reversa (Fig.12). Siete sub-fracciones fueron obtenidas. Se decidió refraccionar la fracción FCmt<sub>R1</sub>, ya que fue la subfracción más hidrosoluble y una de las características de las toxinas es que son solubles en altas concentraciones en el veneno y en el ambiente donde ejercen su acción.

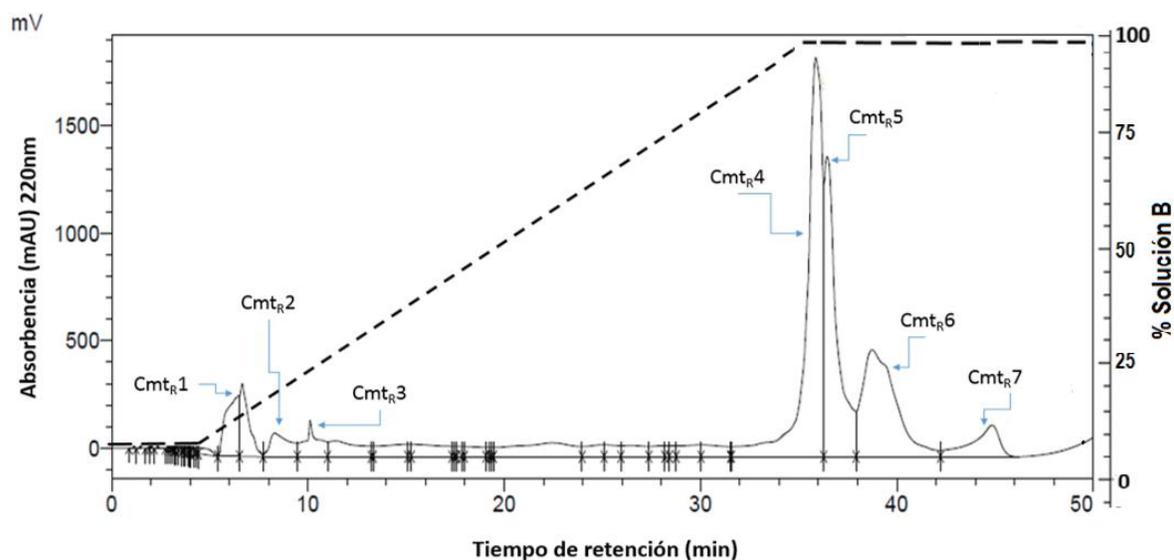


Fig.12 Cromatograma (Cromatografía de fase reversa-220 nm) de la fracción FCmt<10 kDa proveniente del veneno del tentáculo de la cubomedusa *Carybdea marsupialis*. Las sub-fracciones obtenidas Cmt<sub>R</sub>1-7 fueron colectadas manualmente. Flujo 1mL/min. Agua: acetonitrilo. Columna Purospher C-18 HPLC 250 x 4.6 mm (5µm).

De las sub-fracciones restantes se tomó la fracción Cmt<sub>R</sub>1 y posteriormente se procedió a su re purificación (Fig. 13). Bajo las mismas condiciones cromatográficas pero cambiando el gradiente lineal agua: acetonitrilo de 0-40% en un tiempo de 30 minutos a un flujo de 500µL/min. De esta re purificación, se obtuvieron siete fracciones (Cmt<sub>R</sub>1.1-1.6), de las cuales solamente las más hidrosolubles fueron secuenciadas (Cmt<sub>R</sub>1.1-1.4).

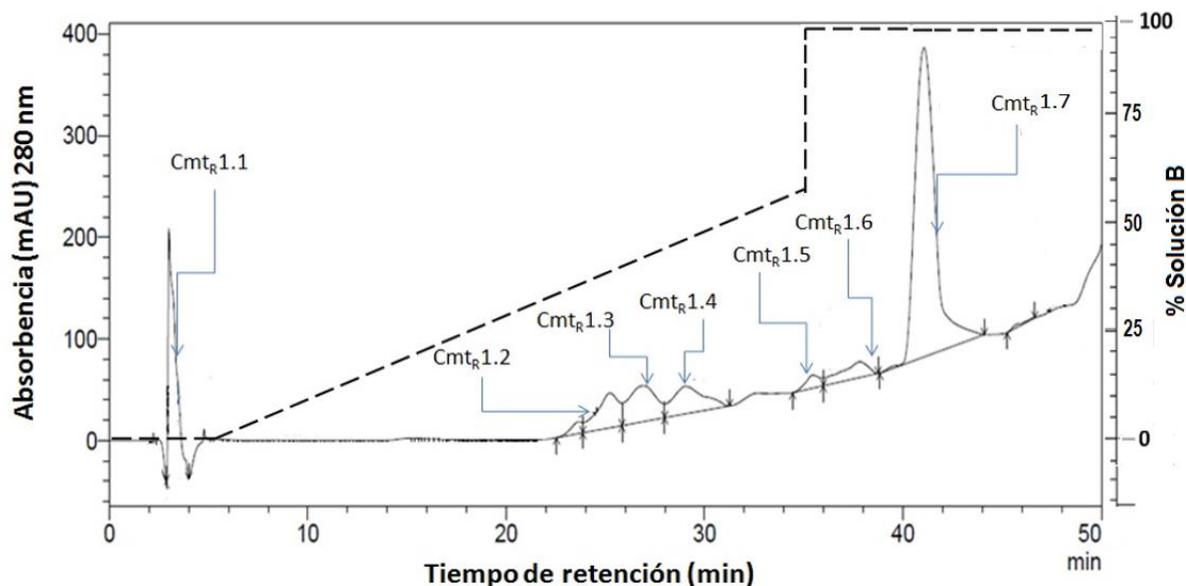


Fig.13 Cromatograma (Cromatografía de fase reversa-220 nm) de la sub-fracción Cmt<sub>R</sub>1 proveniente del fraccionamiento de la fracción Cmt<10 kDa del veneno del tentáculo de la cubomedusa *Carybdea marsupialis*. Las sub-fracciones obtenidas Cmt<sub>R</sub>1.1-1.6 fueron colectadas y las sub-fracción Cmt<sub>R</sub>1.1-1.4 fueron secuenciadas. Flujo 500µL/min. Agua: Acetonitrilo. Columna Purospher C-18 HPLC 250 x 4.6 mm (5µm).

Una vez colectadas las fracciones Cmt<sub>R</sub>1.1-1.4, se concentraron mediante el sistema *Speed-Vac* y posteriormente se re-suspendieron en un volumen *ad hoc* para determinar la masa molecular de cada una de las fracciones mediante espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando ACH ultra puro como matriz. Posteriormente la secuencia de aminoácidos fue determinada en un espectrómetro de masas Esquire con trampa de iones.

Consecutivamente a la determinación de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura primaria de los péptidos purificados, se procedió a analizar dichas secuencias con los programas BLAST y ProtParam (Tabla 7). Sin embargo, no fue posible determinar proteínas con dominios homólogos a las secuencias obtenidas. Para determinar la presencia de modificaciones post traduccionales en dichas secuencias, se compararon el peso molecular experimental obtenido por espectrometría de masas y el peso molecular teórico (PM<sub>t</sub>) calculado mediante el programa ProtParam. Al comprobar que no había diferencia entre la masa teórica y la masa experimental (PM<sub>E</sub>), se asumió que los péptidos secuenciados no poseen modificaciones post traduccionales.

**Tabla 7. Secuencias obtenidas de las sub-fracciones Cmt<sub>R</sub>1.1-1.4**

<b>Cmt<sub>R</sub>1.1</b>	<b>pI: 9,1</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 5741.51</b>	<b>PM<sub>E</sub>:5741.4953</b>	<b>49 aa</b>
SFNQEGCLTYHHCRNYLGHCKMFSYIHHDV GRASCTIDNK RHSMVARKS				
<b>Cmt<sub>R</sub>1.2</b>	<b>pI: 4,7</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 4546.11</b>	<b>PM<sub>E</sub>:4546.1744</b>	<b>42 aa</b>
MLRSDACVQI CSTAVEFQRC GADCVEKDFA TVQSGVYVSG RD				
<b>Cmt<sub>R</sub>1.3</b>	<b>pI: 5,0</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 4199.82</b>	<b>PM<sub>E</sub>:4199.8927</b>	<b>38 aa</b>
MLRSDACHQR STCVEKMLTV DCMIGCEDSG VCYVSGRD				
<b>Cmt<sub>R</sub>1.4</b>	<b>pI: 6,5</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 4063.64</b>	<b>PM<sub>E</sub>:4063.7056</b>	<b>37 aa</b>
MLQSRASCNE RSLCVAQFNC GHCERAVESC TVAFQIA				

Secuencias obtenidas de las sub-fracciones Cmt<sub>R</sub>1.1-1.4. (PM<sub>t</sub>) Peso Molecular teórico. (PM<sub>E</sub>) Peso Molecular experimental (Anexo 3).

Ya que el logaritmo de la herramienta Blast se basa en que las proteínas poseen una naturaleza modular, es decir, que poseen al menos un dominio funcional dentro de su secuencia y que los mismos dominios también se encuentran en proteínas de especies diferentes (Altschul, et al. 1997). La falta de dominios homólogos a las secuencias obtenidas posiblemente se deba a que su tamaño es muy pequeño y por tanto al generar el primer alineamiento global el sistema encuentra muy poca similitud entre las secuencias comparadas. Así mismo, la falta de secuencias de péptidos reportadas pertenecientes a la clase cubozoa y al *phylum* Cnidaria, disminuye la probabilidad de que se encuentren secuencias similares en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Por tanto, se decidió realizar búsquedas en otras bases de datos, eligiéndose la base de datos Knottin database<sup>4</sup>. Por medio de alineamientos de tipo PSI-BLAST (Position Specific Iterative-BLAST) se buscaron secuencias homólogas en la base de datos Knottin

<sup>4</sup> Knottin database es una base de datos que permite comparar secuencias mediante dos métodos Knottin3D y Knottin1D (estructura 3D y 1D, respectivamente). En cuanto al método Knottin 1D, compara las secuencias problema con proteínas ricas en cisteínas, que después basándose en el Score, el Blast-P value y el número de cisteínas conservadas genera un alineamiento con una segunda secuencia en función de los espacios inter cisteína.

database, mediante un algoritmo iterativo que nos permitió determinar patrones conservados entre diferentes secuencias (Tabla 8).

**Tabla 8. Secuencias obtenidas de las sub-fracciones Cmt<sub>R</sub>1.1-1.4**

ID	Score	E-value	Categoría	Función
*Cmt <sub>R</sub> 1.1	40	0.021	toxin-like	Neurotoxina
*Cmt <sub>R</sub> 1.1 Hainantoxin	SFNQEGCLTYHH <b>CRNYLGHCKMFSYIHHDVGR</b> - - -AS <b>CTID</b> NRHSMVARKS -----E <b>CRY YLGGCK</b> K <b>DE</b> SECCTHLQCHSYWEW <b>CIWD</b> GTGFGK----- .** *** ** * .: * * .. .			
Cmt <sub>R</sub> 1.2	38	1.9	toxin-like	Neurotoxina
Cmt <sub>R</sub> 1.2 Latroinsectotoxin	<b>MLRSDACVQICSTAV</b> EFQRC <b>GAD</b> CV <b>EKDF</b> ATVQSGV <b>V</b> SGRD <b>MSRADQCKLLAYTAV</b> GYET <b>VGN</b> - - <b>VAADIASIEGANLVA</b> --- * * : * * : : *** : : * * * : * : : : * :			
*Cmt <sub>R</sub> 1.3	40	0.42	toxin-like	Neurotoxina
*Cmt <sub>R</sub> 1.3 gamma-KTx 3.2	MLR <b>SDACHQRSTC</b> VEKMLTV <b>DCMIGCEDSGV</b> - - - - <b>CYV</b> SGRD--- - -DR <b>DS</b> CV <b>DKSR</b> CAKYGY <b>QQCEICCKKAG</b> HRGGT <b>CEFFKCKCKV</b> * : * : : * * : : : * * * : : * * : . .			
Cmt <sub>R</sub> 1.4	47	1.5	toxin-like	Neurotoxina
Cmt <sub>R</sub> 1.4 Pisautoxin	-ML <b>QSRASCNERSLC</b> V <b>AQF</b> N <b>CGHC</b> ERAV <b>ESCTVAFQIA</b> ----- K <b>FCSSAECGEGSC</b> TGG <b>SFNR HC</b> QSL <b>AEN</b> TP <b>CQ</b> Q <b>PNKYD</b> HYSTG <b>CPCKEGLVCSAINY</b> C <b>QKA</b> : * * : * * * * : : ** : . * : * . *			

Análisis de las secuencias obtenidas mediante el servidor de reconocimiento de plegamiento de proteínas (Phyre 2) y el programa de alineamiento local múltiple de secuencias (Psi-BLAST) utilizando la base de datos Knottins de Uniprot (Kelly 2015). (\*) Péptidos sintetizados.

Los péptidos analizados mostraron similitud con neurotoxinas aisladas de venenos de otros organismos como arañas (*Haplopelma hainanum*, *Latrodectus tredecimguttatus*, *Dolomedes mizhoanus*) y escorpiones (*Mesobuthus martensii*), aunque los valores de E-value (E) son altos. El (E) es un parámetro que describe si el alineamiento encontrado a partir del alineamiento múltiple es producto del azar (Ruido de fondo aleatorio) mientras tenga un valor más cercano a cero, permite considerar al alineamiento como más significativo, sin embargo, tomando en cuenta que el cálculo de E value se basa en la longitud de la cadena analizada y que se ha reportado que alineamientos de secuencias cortas idénticas presentan altos valores de E (Bethesda 2005), solamente se tomaron en cuenta a los péptidos con los valores de E más bajos para ser sintetizados (Cmt<sub>R</sub>1.1 y Cmt<sub>R</sub> 1.3).

Una vez analizadas las secuencias obtenidas, se sintetizaron los péptidos Cmt<sub>R</sub>1.1 y Cmt<sub>R</sub>1.3 mediante síntesis química de péptidos basados en el uso del agente protector del grupo alfa amino Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) en fase sólida. (La síntesis de Cmt<sub>R</sub>1.3 fue complicada y no se incluyó en el presente trabajo).

Para probar el péptido sintetizado, se decidió utilizar técnicas de microscopía de epifluorescencia acopladas a un sistema de micro inyección y un indicador de la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> (Fluo-4 AM). Se decidió utilizar como modelo a las células cromafines debido a que como se ha mencionado anteriormente, IS presenta signos y síntomas relacionados a liberación excesiva de catecolaminas y los feocromocitomas (Beiley, et al. 2005; Tiong 2008). Por otro lado, aunque no se conoce aún el proceso fisiológico secuencial completo de la liberación de catecolaminas por parte de la medula suprarrenal, se sabe que la liberación de estos neurotransmisores esta mediada por fibras pre-ganglionares que mediante acetilcolina promueven la despolarización de la membrana celular de las células cromafines a través de su interacción con receptores nicotínicos. Los receptores nicotínicos inducen consecuentemente el aumento de la permeabilidad membranal a los iones Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, promoviendo finalmente la liberación de catecolaminas por exocitosis (Brunton, et al., 2006).

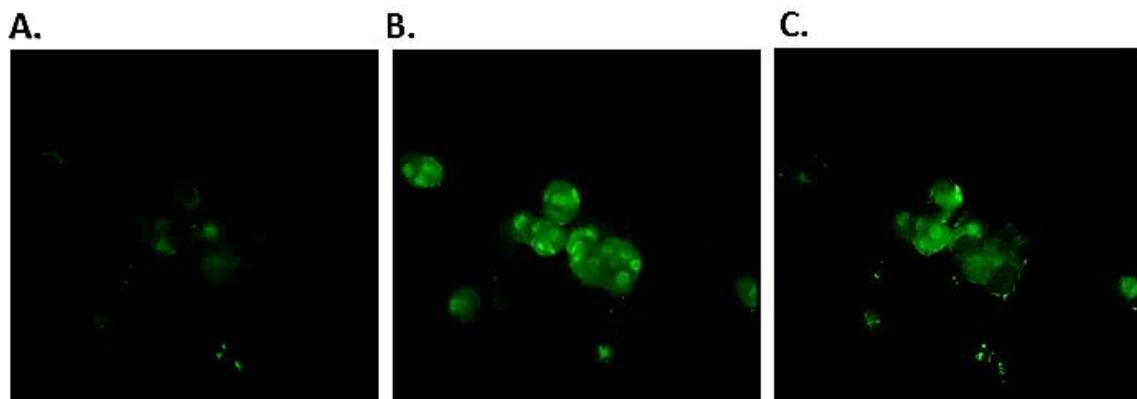


Fig.14 Micrografía de células cromafines (40x). Se utilizó como indicador de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular al fluoróforo Fluo-4 Am. Se suministraron pulsos de 500 ms. **A)** Células cromafines sin tratamiento. **B)** Células cromafines después de un pulso de K<sup>+</sup> 100 mM **C)** Células cromafines después de un pulso de Cmt<sub>R</sub>1.1 (174.1μM).

En la Fig. 14 se muestran micrografías de células cromafines sin tratamiento y tratadas con un pulso de 500 ms de  $K^+$  100 mM y 147.1  $\mu M$  de  $Cm_{TR}1.1$ . En ambos casos la concentración de  $[Ca^{2+}]_I$  aumentó tanto en presencia de  $Cm_{TR}1.1$  como de  $K^+$ , sin embargo el aumento de la  $[Ca^{2+}]_I$  es mayor con el pulso de  $K^+$  que con de  $Cm_{TR}1.1$ . En ambos casos el aumento de  $[Ca^{2+}]_I$  se correlaciona con la liberación de catecolaminas por parte de las células cromafines. Se utilizó el indicador Fluo-4 AM debido a que permitió determinar si la concentración de  $[Ca^{2+}]_I$  en las células cromafines aumentó o no al ser expuesta a la despolarización inducida por  $K^+$  (100 mM) o  $Cm_{TR}1.1$  (174.1  $\mu M$ ).

Con el fin de ponderar la intensidad de fluorescencia del indicador Fluo-4-AM se recurrió al programa de análisis de imagen ImageJ. Este programa permitió calcular la fluorescencia y el área de cada una de las células permitiendo generar la Fig.15. En esta figura se observa que las células responden aumentando la  $[Ca^{2+}]_I$  a dos pulsos de 500 ms de  $K^+$ , así como a los pulsos de 500 ms de  $Cm_{TR}1.1$ , sin embargo, la respuesta a la despolarización inducida por  $K^+$  es considerablemente mayor que la inducida por la exposición a la toxina. Para sustraer la intensidad de fondo se tomó una imagen de fondo al inicio del experimento y se sustrajo de las imágenes obtenidas subsecuentemente durante el experimento.

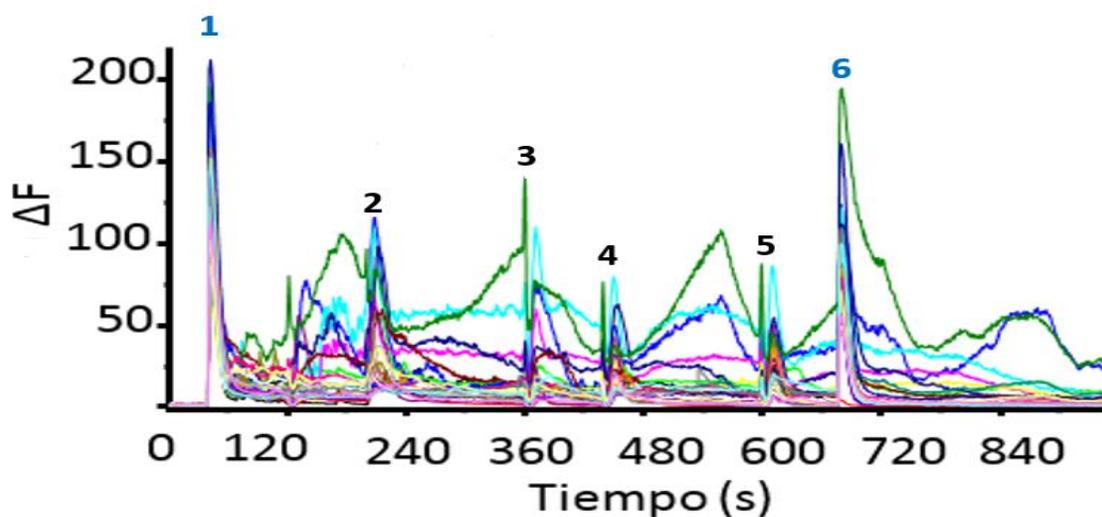


Fig.15 Efecto de  $Cm_{TR}1.1$  sobre la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular en células cromafines. Se proporcionaron pulsos de 500 ms en cada tratamiento. **1) y 6)**  $K^+$  100 mM. **2-5)**  $Cm_{TR}1.1$  174.1  $\mu M$

#### 4.1.2- Caracterización de los péptidos activos procedentes de las campanas de *Carybdea marsupialis*

Como se ha mencionado anteriormente, la secreción de toxinas por parte de otras regiones anatómicas diferentes a los tentáculos se ha propuesto como un mecanismo que permite a los cnidarios asegurar y digerir a sus presas. En el caso de *C. marsupialis* solamente se han descrito toxinas procedentes de extractos obtenidos de la descarga de los nematocistos presentes en sus tentáculos (Sánchez-Rodríguez, Torrens and Segura-Puertas, 2007; Rottini, Gusmani, et al., 1995). Sin embargo, se ha descrito la presencia de nematocistos que pueden contener toxinas en porciones definidas de la ex umbrela, así como en los canales gástricos (Fig.8B) (Camillo, et al. 2006). Por lo cual se procedió a disecar los tentáculos de las campanas de los organismos recolectados y posteriormente se realizó el proceso de extracción a las campanas. Una vez obtenido el extracto crudo (CmEc) fue liofilizado y guardado en congelación hasta su uso. Para realizar la extracción del veneno se tomaron en cuenta las mismas precauciones que en los tentáculos con el fin de obtener el extracto de las estructuras que presentan nematocistos (ex umbrela y canales gástricos) primordialmente sobre aquellos otros tejidos como el tejido epitelial. Posteriormente se determinó el *Mass fingerprint* de los componentes de CmEc mediante espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando diferentes matrices (SA, ACH y DHB). El perfil obtenido en el espectro de masas (Fig. 16) corresponde a lo reportado en la literatura, ya que se ha establecido que el veneno de los cnidarios puede ser dividido en tres categorías principales: péptidos neurotóxicos, proteínas con actividad enzimática (proteasas y fosfolipasas) y citolisinas (Moran, Genikhovich, et al. 2012) (Lassen, Helmholz, et al., 2010). Se detectaron 39 componentes con pesos moleculares entre 2091-14397 Da. Las señales detectadas se pueden dividir en dos grupos. Péptidos entre los 3 y 10 kDa, lo que normalmente se asocia a la presencia de neurotoxinas (Lazcano-Perez, et al. 2016) y una señal de baja intensidad de 14.3 kDa. Esta última señal podría ser indicativo de la presencia de fosfolipasas  $A_2$ , ya que usualmente estas enzimas poseen una masa molecular comprendida entre los 13 kDa y 18 kDa (Timo J, et al. 2004; Bahareh, et al. 2016). Finalmente no se observaron señales más allá de los 15 kDa

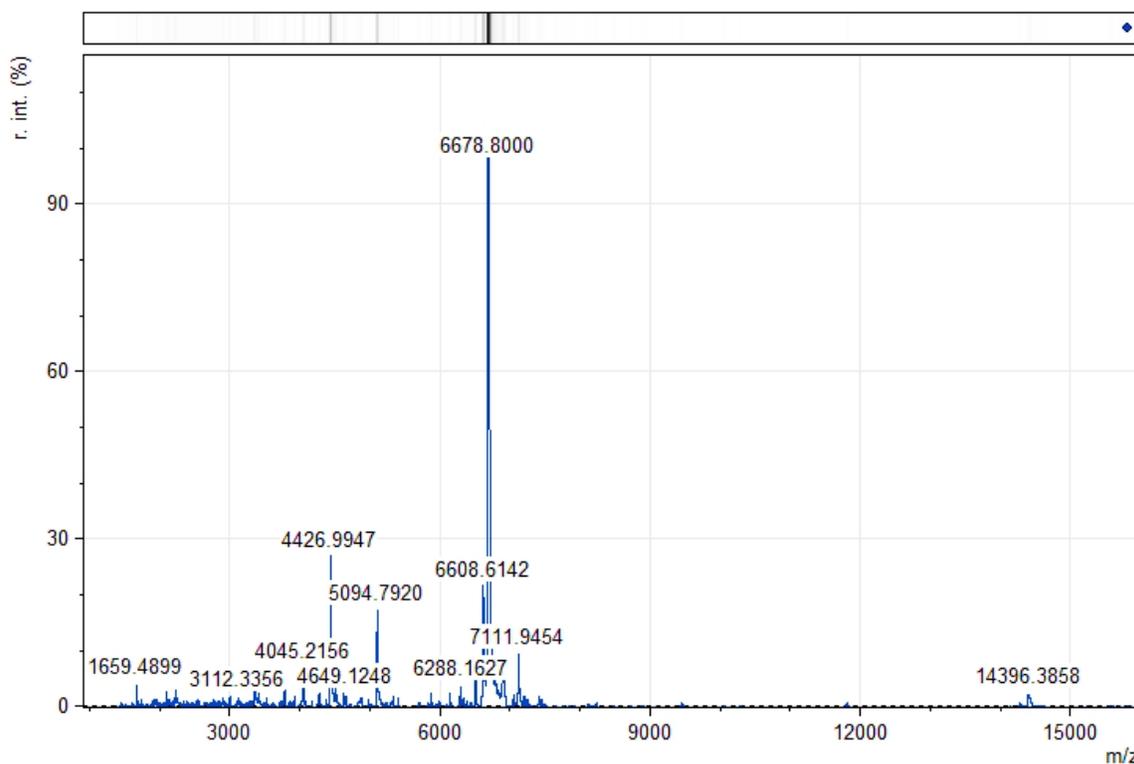


Fig.16 “*Mass fingerprint*” del extracto crudo obtenido del veneno proveniente de las campanas (CmEc) de la cubomedusa *Carybdea marsupialis*. (r.int.: intensidad relativa; %: normalizada). Se muestra el peso molecular de los péptidos y proteínas cargados  $[M+H]^+$  con una relación señal/ruido  $>2$ .

De manera general se acepta que el veneno de Cnidarios contiene neurotoxinas con un peso molecular aproximado de 3-10 kDa (Zhang, et al. 2003) las cuales alteran el potencial de acción en células con membranas excitables del sistema nervioso, cardiovascular y musculoesquelético a través de la modificación de la apertura de canales dependientes de voltaje de sodio, potasio y calcio (Jouiaei, Yanagihara, et al. 2014; Smith y Blumenthal 2007). En el caso particular de *C. marsupialis* sólo se han reportado cuatro toxinas aisladas de extractos de nematocistos ubicados en los tentáculos de *C. marsupialis* y no se ha estudiado hasta el momento la posibilidad de que las toxinas provenientes de extractos de nematocistos ubicados en las campanas de este organismo pudiesen poseer actividad neurotóxica. Tomando en cuenta la detección de señales en el rango de peso molecular 3-7 kDa en el *Mass fingerprint* correspondiente a CmEc (Fig. 16), se determinó la actividad neurotóxica de CmEc en el modelo de CCG *in vitro*, de manera similar al ensayo realizado para

determinar esta actividad con CmEt (Fig. 17). Este modelo permitió determinar los efectos indirectos de CmEc en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en CGC. En este ensayo se probaron dos concentraciones de CmEc (A3:3 y A4:0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El comportamiento de CmEc observado en el ensayo es de tipo mixto, ya que al ser agregado a CGC “jóvenes” (5 días) tanto con la concentración A3 como A4, estas aumentaron su supervivencia de manera similar a cuando se agregó NMDA, mientras que al agregarse a células “viejas” (10 días), no disminuyó la viabilidad celular. Así mismo cuando se agregó NMDA en conjunto con A3, la viabilidad celular de CGC jóvenes disminuyó. Por otro lado cuando se agregó MK801 en conjunto con A3 se observó que la supervivencia de CGC maduras aumentó moderadamente respecto a cuando se agregó solo MK801, mientras que cuando se agregó A4 en conjunto a MK 801 parece no haber diferencia entre el porcentaje de viabilidad celular de CGC, por lo que se infiere que los efectos generados por CmEc sobre CGC deben ser producto de un proceso alterno a la apertura de canales inotrópicos de glutamato. Asimismo, el comportamiento mixto de CmEc puede deberse a que el extracto pueda contener diferentes toxinas con mecanismos de acción diferentes, así como otro tipo de toxinas que afecten la viabilidad celular como es el caso de las citolisinas y  $\text{PLA}_2$  (Riss, Morave y Niles 2013) (Caro y Cederbaum 2003).

Dado que CmEc de *Carybdea marsupialis* mostró tener efecto neurotóxico sobre CGC, se decidió concentrar y fraccionar CmEc mediante el sistema de ultrafiltración Amicon. Se utilizaron las membranas Millipore de 10 y 30 kDa. Se obtuvieron tres fracciones FCmc<10, FCmc10-30 y FCmc > 30, las cuales fueron alicuotadas, liofilizadas y guardadas en refrigeración hasta ser utilizadas.

Para definir que fracción posea actividad biológica sobre células excitables, se decidió determinar el efecto de FCmc<10 en el curso temporal de la concentración relativa de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en células cromafines bovinas *in vitro* (Fig. 11), ya que estas células son usadas como modelo de células excitables como neuronas noradrenérgicas (Domínguez, et al. 2012). Se utilizó la fracción FCmc<10 ya que en la literatura se ha establecido que generalmente las toxinas de los cnidarios que afectan canales iónicos tienen un peso molecular aproximado de 3-10kDa (Rathbone, et al. 2016). En la Fig. 11, se puede observar que la fracción FCmc<10 aumentó la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células cromafines, mostrando un efecto similar pero de menor

intensidad que la fracción FCmt<10 y  $K^+$  [10 mM]. Así mismo, al agregar ionomicina al medio de cultivo, se puede observar que hay aumento en la fluorescencia, por lo cual podemos inferir que los efectos de las fracciones en las células cromafines no se deben a la disrupción de la membrana celular, ya que la ionomicina es un ionóforo divalente.

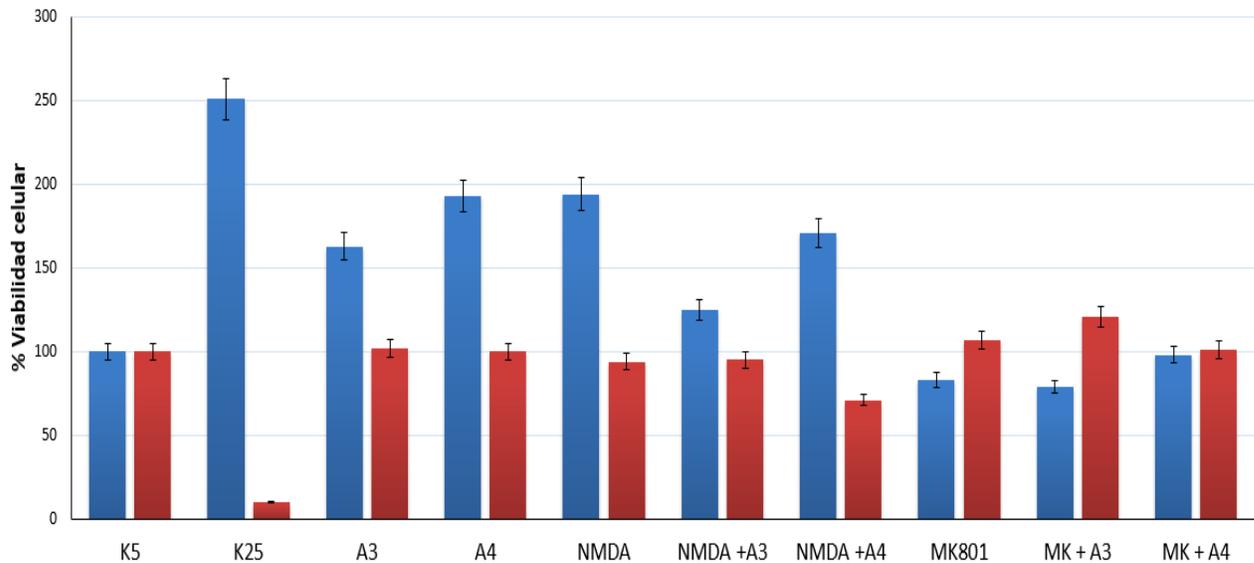


Fig.17 Actividad neurotóxica en Células Granulares Cerebelares (CGC) del extracto crudo obtenido del veneno proveniente de las campanas de la cubomedusa *Carybdea marsupialis*. Se realizaron pruebas de viabilidad en neuronas granulares tratadas a los 5 días (Azul) y a los 10 días (Rojo). La determinación de la viabilidad celular se realizó a las 30 h. (K5) KCl 5mM. (K25) KCl 25mM. (A3) Veneno de campanas (3  $\mu$ g/mL). (A4) Veneno de campanas (0.3 $\mu$ g/mL). (NMDA) N-metil-D-aspartato 140  $\mu$ M. (MK 801) Dizocilpina 140  $\mu$ M.

Dado que CmEc mostró un efecto mixto en el modelo de células CGC y que la fracción FCmc<10 mostró aumentar la  $[Ca^{2+}]_i$  en células cromafines, se determinó el efecto de FCmc<10 en la concentración intracelular relativa de  $K^+$  ( $[K^+]_i$ ) mediada por el canal Kv 10.1 expresado en células HEK (células embrionarias de riñón humano). Para llevar a cabo este ensayo, se aprovechó que los iones de talio ( $Tl^+$ ) pueden utilizarse como un sustituto de  $K^+$ , por lo cual, al añadir  $Tl^+$  al medio extracelular y al abrirse los canales Kv, los iones  $Tl^+$  pueden fluir en función de su gradiente de concentración hacia el interior de las células y la actividad del canal se detecta con un colorante indicador fluorescente  $Tl^+$ -AM (acetoximetil

éster) que puede ser determinado mediante un lector de placas a 515 nm (Weaver, et al. 2004). Así mismo, se decidió utilizar el canal Kv 10.1 en células HEK, ya que este canal juega un papel importante en muchos procesos celulares como la proliferación celular y la progresión del ciclo celular. (Oquadid-Ahidouch, Ahidouch y Pardo 2016).

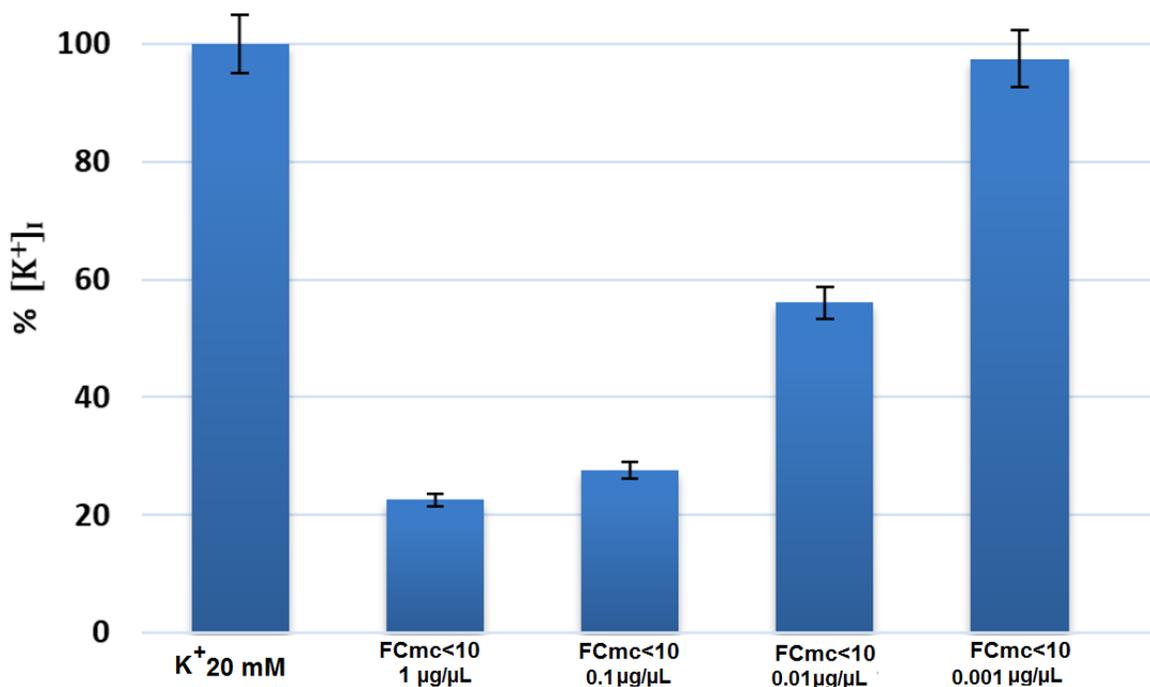


Fig. 18 Efecto de FCmc<10 en la concentración intracelular relativa de  $K^+$  ( $[K^+]_i$ ) mediada por el canal Kv 10.1 en células HEK. Los cambios en la concentración de  $K^+$  intracelular se determinaron en células HEK precargadas con un indicador sensible a  $Tl^+$  (Acetoximetil) a 515 nm. Las células se incubaron con la toxina por 300 s. La actividad de las concentraciones probadas se manifiesta a los 315 s cuando se induce la despolarización de la membrana celular por la adición de  $K^+$  [20 mM].

Se puede observar en la Fig. 18 que  $[K^+]_i$  disminuye de manera dosis dependiente al agregar FCmc<10, ya que al incubarse las células con la concentración más alta de esta fracción (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) se observa una disminución de alrededor del 80 % de la concentración de potasio intracelular inducida tras la despolarización de la membrana celular causada por la adición de  $K^+$  [20 mM]. Así mismo  $[K^+]_i$  no varía respecto al control al incubarse las células HEK con la concentración más diluida de FCmc<10 (0.001  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).

La FCmc<10 fue fraccionada mediante cromatografía de fase reversa (Fig.19) ya que presentó actividad biológica en células cromafines promoviendo el aumento de  $[Ca^{2+}]_I$  e inhibiendo la  $[K^+]_I$  en células HEK transfectadas con el canal Kv 10.1. Ocho sub-fracciones fueron obtenidas (FCmc<sub>R</sub><10.10-10.17).

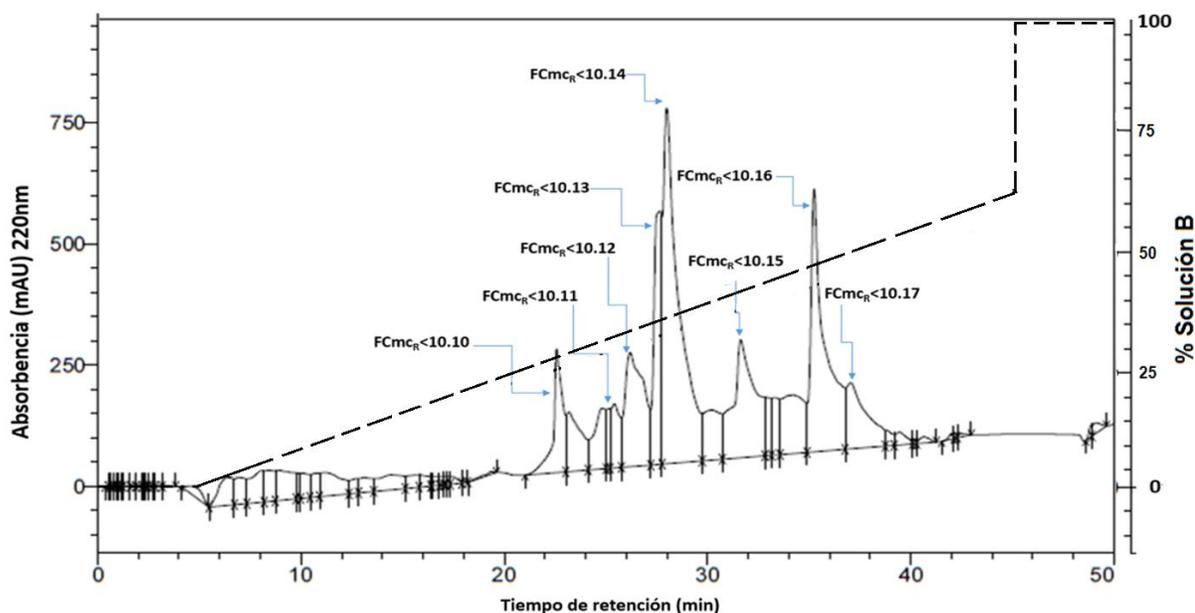


Fig. 19 Cromatograma (Cromatografía de fase inversa-220 nm) de la fracción FCmc<10 kDa proveniente del veneno de la campana de la cubomedusa *Carybdea marsupialis*. Se obtuvieron las sub-fracciones FCmc<sub>R</sub>10.10-10.17. Flujo 500μL/min. Agua: acetonitrilo. Columna Purospher C-18 HPLC 250 x 4.6 mm (5μm). \*La fracción FCmc<sub>R</sub>10.16-17 fue colectada entre el minuto 35-38 para los ensayos biológicos pero fue separada en dos tubos para fines de secuenciación.

Posteriormente, en concordancia con el enfoque de la purificación biodirigida, se decidió determinar el efecto de las fracciones FCmc<sub>R</sub><10.10-10.17 obtenidas del fraccionamiento de FCmc<10 kDa determinando el curso temporal de la  $[Ca^{2+}]_I$  en células cromafines bovinas *in vitro*. Se decidió utilizar este modelo, ya que FCmc<10 kDa mostró la capacidad de ejercer efecto neurotóxico sobre CGC y principalmente debido a que la hipótesis más aceptada hasta el momento para explicar los signos y síntomas de IS, propone que alguna toxina presente

en el veneno de las cubomedusas es capaz de intervenir en el proceso de liberación de catecolaminas por parte de las células cromafines (Rathbone, et al. 2016).

El ensayo consistió en incubar células cromafines por 300ms con las fracciones FCmc10.10-10.16 (Fig.20). Las células fueron previamente cargadas con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescente permeable Fluo-4 AM y se determinó el curso temporal de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediante un lector de placas a 525 nm. Se agregó  $\text{K}^+$  [10 mM] a los 315 y a los 430s ionomicina [1 mM]. En este ensayo la fluorescencia se utilizó como monitor de los efectos de FCmc10.10-10.16 en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  después de la inducción de la despolarización de la membrana celular de las células cromafines. Las células cromafines se utilizaron como modelo ya que para ejercer su función, estas células poseen un amplio arreglo de canales iónicos que les permiten generar y mantener un potencial de acción que culmina en el incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  permitiendo la exocitosis de catecolaminas contenidas en vesículas (Garcia, et al. 2006)

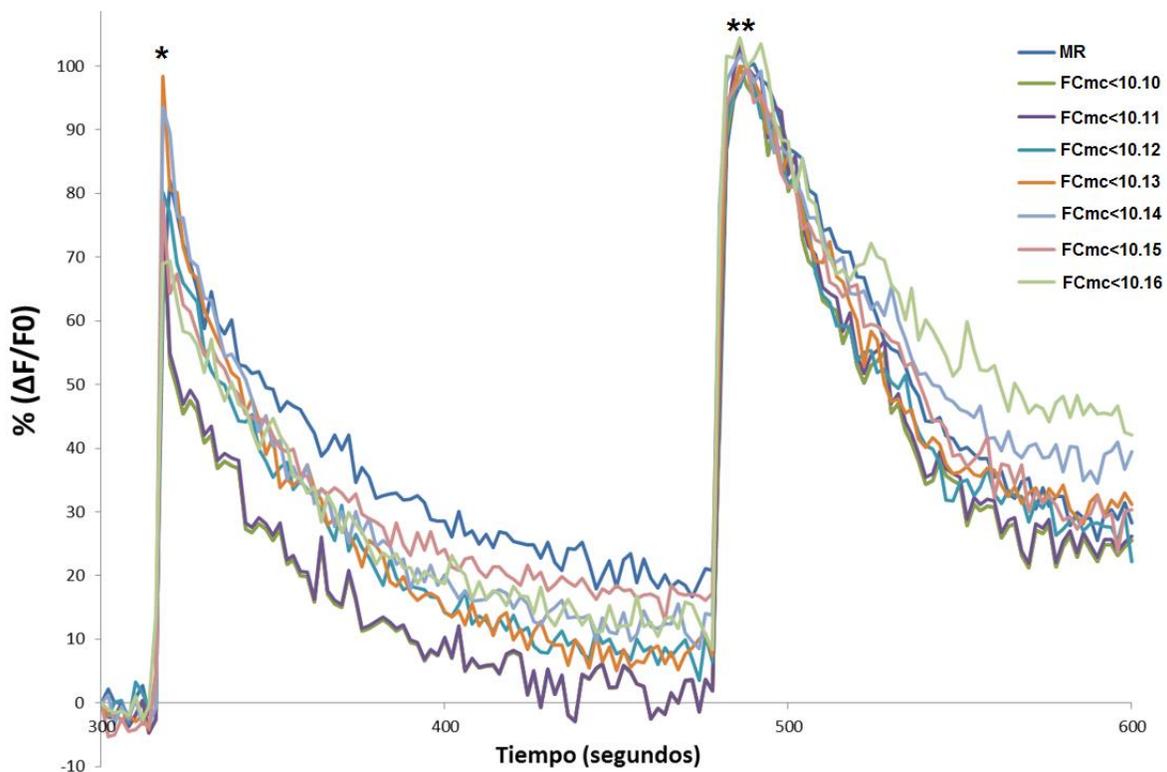


Fig.20 Efecto de las fracciones FCmc<sub>R</sub><10.10-10.16 en la concentración intracelular relativa de  $\text{Ca}^{2+}$  en células cromafines bovinas. Los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se determinaron en células cromafines precargadas con Fluo-4 a 525 nm. Las células se incubaron con la toxina por 300 s. Las fracciones fueron agregadas a los 15 s y se incubaron por 300s. (MR) medio de registro como control. (\*) Inducción de la despolarización de la membrana agregando  $\text{K}^+$  [10 mM] a los 315 s. (\*\*) Inducción de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  agregando ionomicina [1 mM] a los 430 s.

En la Fig. 20 se puede observar que al agregar  $K^+$  [10 mM] se induce la despolarización de membrana que resulta en el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$ , lo cual indica indirectamente la posterior liberación de catecolaminas al medio intracelular. Sin embargo, no se observaron cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  durante el tiempo de incubación (300s). Por otro lado al inducir la despolarización en células encubadas con las fracciones  $FCmc_R < 10.10-10.16$  a los 315 s con  $K^+$  [10 mM], se obtuvieron efectos diferentes en  $[Ca^{2+}]_i$  para cada una de las fracciones, ya que algunas fracciones aumentan la  $[Ca^{2+}]_i$  ( $FCmc < 10.13-14$ ) mientras que otras la disminuyen. Así mismo se puede inferir que los efectos de las fracciones en la permeabilidad de la membrana celular a  $Ca^{2+}$  no se debe a la disrupción de la membrana celular, ya que la ionomicina es un ionóforo divalente que produce el aumento máximo  $[Ca^{2+}]_i$ , lo cual se observa a los 430 s.

Para visualizar de mejor manera los efectos de las subfracciones  $FCmc_R < 10.10-10.16$ , se realizó un ensayo con las mismas condiciones que el anterior pero determinando la  $[Ca^{2+}]_i$  cuando se induce la despolarización de las células cromafines a los 315 s (Fig. 21).

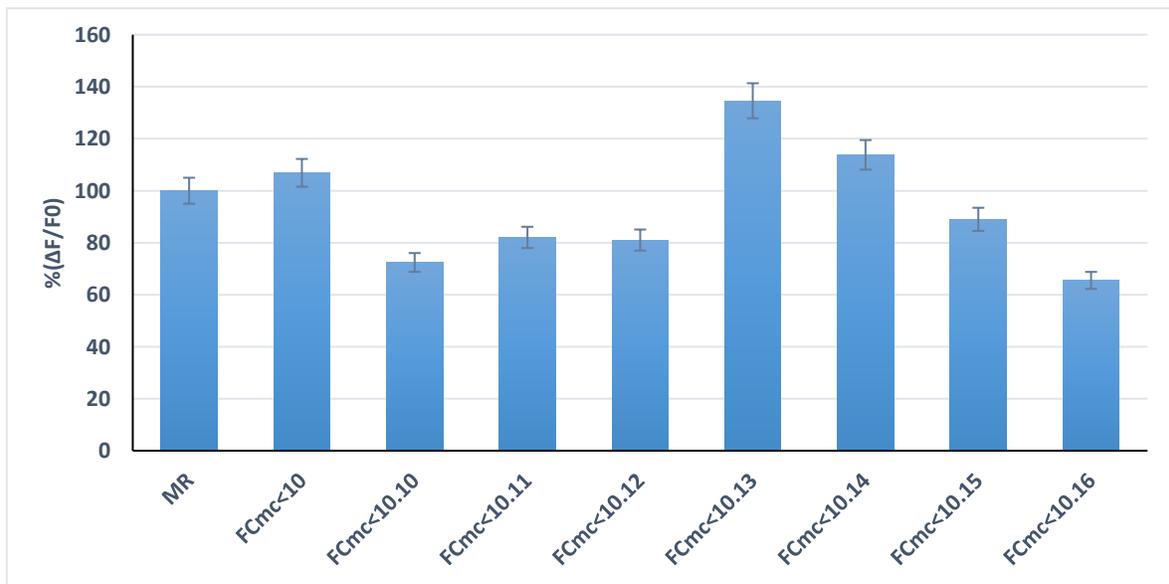


Fig.21 Efecto de las fracciones  $FCmc_R < 10.10-10.16$  en la concentración intracelular relativa de  $Ca^{2+}$  en células cromafines bovinas al inducir la despolarización de las células a los 315 s con  $K^+$  [10 mM]. El cambio en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular se determinó en células cromafines precargadas con Fluo-4 a 525 nm. Las células se incubaron con la toxina por 300 s. Las fracciones fueron agregadas a los 15 s y se encubaron por 300s. (MR) medio de registro como control.

En la fig. 21 las subfracciones FCmc<10.13-14 aumentan  $[Ca^{2+}]_i$  mientras que las demás subfracciones lo disminuyen, lo cual concuerda con los experimentos de la Fig. 20. Así mismo, la razón por la que La fracción FCmc<10 aumente  $[Ca^{2+}]_i$  puede deberse al efecto sumatorio de sus componentes.

Una vez determinado el efecto de las sub-fracciones FCmc<10.10-10.16 sobre  $[Ca^{2+}]_i$  en las células cromafines se procedió a determinar la identidad estructural de los péptidos mediante espectrometría de masas en un espectrómetro de masas Esquire con trampa de iones. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con los programas BLAST y ProtParam (Tabla 9). Se determinó la ausencia de modificaciones post traduccionales en dichas secuencias, ya que al comparar el peso molecular experimental obtenido por espectrometría de masas y el peso molecular teórico calculado mediante el programa ProtParam, no hubo diferencia entre la masa teórica y la masa experimental.

Las secuencias se analizaron con la herramienta bioinformática Blast para determinar mediante alineamientos globales dominios homólogos con proteínas de otras especies, sin embargo no se encontraron dominios homólogos mediante esta aproximación. Este resultado puede deberse a la poca cantidad de proteínas reportadas de cnidarios, así como la falta de genomas de estos organismos en la base de datos del NCBI. Por tanto se decidió analizar las secuencias mediante la base de datos Knottin database y alineamientos iterativos usando el algoritmo PSI-BLAST (Tabla 10).

**Tabla 9 Secuencias obtenidas de las sub-fracciones Cmt<sub>R</sub>10.10-17**

<b>Cm<sub>CR</sub>10.1</b>	<b>pl: 9,2</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 4083.88</b>	<b>PM<sub>E</sub>:4083.9381</b>	<b>36 aa</b>
VAFRNVCTPQ GCILPHGARN VTSFIGKMCF WQELKM				
<b>Cm<sub>CR</sub>10.2</b>	<b>pl: 4,4</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 4187.76</b>	<b>PM<sub>E</sub>:4187.8179</b>	<b>40 aa</b>
MLRDACVQIC STAVEFQRCG ADCVEKDFAT VQSGVYVSG				
<b>Cm<sub>CR</sub>10.3</b>	<b>pl: 6,7</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 3960.65</b>	<b>PM<sub>E</sub>:3960.7116</b>	<b>35 aa</b>
MELYPFMKAC RDAVCEANSL IHCSTVHICF NRASV				
<b>Cm<sub>CR</sub>11.1</b>	<b>pl: 5,8</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 5065.88</b>	<b>PM<sub>E</sub>:5065.9543</b>	<b>45 aa</b>
SERILEVCAS DAECNMKLIC RHANCYKLI HMPSPGQEHM AESVA				
<b>Cm<sub>CR</sub>11.2</b>	<b>pl: 4,5</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 6663.70</b>	<b>PM<sub>E</sub>:6663.7896</b>	<b>61 aa</b>
MEASDARCIL SVAQCRDACE VAWTIMVSPG HILSTPYAVQ ECTDCARNVE GEQMSTVILK M				
<b>Cm<sub>CR</sub>12.1</b>	<b>pl: 5,0</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 8395.85</b>	<b>PM<sub>E</sub>:8395.9517</b>	<b>76 aa</b>
MQDKLSPLAQE LRDMKAVVLT LAVLCMIAEL CAERCQAERC IEQLISVANV ARARVASERV ALERSDFIAE LYASMA				
<b>Cm<sub>CR</sub>12.2</b>	<b>pl: 5,0</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 4199.82</b>	<b>PM<sub>E</sub>: 4199.8927</b>	<b>38 aa</b>
MLRSDACHQR STCVEKMLTV DCMIGCEDSG VCVYVSGRD				
<b>Cm<sub>CR</sub>12.3</b>	<b>pl: 6,1</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 8369.55</b>	<b>PM<sub>E</sub>:8369.6467</b>	<b>42 aa</b>
MHKDLEECVK QKVQPYLDEF QKKWHECEVE IYRQKVAPLG EEFREGARQK VQCESAQTLR ACQSMARIEQ				
<b>Cm<sub>CR</sub>12.4</b>	<b>pl: 7,8</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 13566.58</b>	<b>PM<sub>E</sub>:13566.5759</b>	<b>80 aa</b>
AVFASDQIVL RKCAREYAV LSACERDFPR STVCGHIKMF ARNECDVYTS WKMLHGQESR QLMIVAEDCQ GRTASLRQEMHKDLEEVKQK VQPYLDEFQK KVSILAIDE ASKLNLAQ				
<b>Cm<sub>CR</sub>13.1</b>	<b>pl:5,9</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 7293.39</b>	<b>PM<sub>E</sub>:7293.4811</b>	<b>59 aa</b>
MAREVCESAH ILIRQLCAER QCRQEMHKDL EEVKQKCVQP YLDEFQKKCW HEEVEIYRQ				
<b>Cm<sub>CR</sub>14.1</b>	<b>pl: 6,5</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 4063.64</b>	<b>PM<sub>E</sub>:4063.7056</b>	<b>37 aa</b>
MLQSRASCNE RSLCVAQFNC GHCERAVESC TVAFQIA				
<b>Cm<sub>CR</sub>14.2</b>	<b>pl: 5,6</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 15497.71</b>	<b>PM<sub>E</sub>:15497.8716</b>	<b>80 aa</b>
MLRKEVCQEF WDNLEKETAC SLRQEMHKDC CDFATVYVEA KDAERSDDLRL QRLTARLEAL KEGLPVLESL KVSILAAGEK AKPVEDLRLQ AERVAYMRGH KLIHVVDCER NALIHFSMSV NDEQHREQMS TMQ				
<b>Cm<sub>CR</sub>15.1</b>	<b>pl: 4,7</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 6865.87</b>	<b>PM<sub>E</sub>:6865.9594</b>	<b>59 aa</b>
MLQSVALGCS TQMLCGPVTQ EFWDNCLEKE TASLRQEMHC KDLEEVKQKV QPYLDEFQK				
<b>Cm<sub>CR</sub>15.2</b>	<b>pl: 5,0</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 5948.71</b>	<b>PM<sub>E</sub>:5948.7794</b>	<b>55 aa</b>
MLMNSYTRES CSQASANDSV AIGDFCKISE VALVQRPAE QQEVACWSAC VGLGH				
<b>Cm<sub>CR</sub>16.1</b>	<b>pl: 5,6</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 6832.73</b>	<b>PM<sub>E</sub>:6832.8166</b>	<b>58 aa</b>
MHKLMNVCEA AQEQCRFDSN LMIESRCDQA ERVTVEADSF KERSHVGFM QARAVDER				
<b>Cm<sub>CR</sub>16.2</b>	<b>pl: 4,6</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 4950.43</b>	<b>PM<sub>E</sub>:4950.4413</b>	<b>46 aa</b>
MEQESADCVE RTIKGCLERD VNAQSVARTS ATIDFNEMRT AGTSAG				
<b>Cm<sub>CR</sub>17.1</b>	<b>pl: 4,7</b>	<b>PM<sub>t</sub>:7227.87</b>	<b>PM<sub>E</sub>:7227.9475</b>	<b>65 aa</b>
MEKHSERAQV CYTRESAVAR AAESDGDSIS AIAEDNAMGL NDFRECSQY VARPYSDDLRL QRLTA				
<b>Cm<sub>CR</sub>17.2</b>	<b>pl: 9,5</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 2271.65</b>	<b>PM<sub>E</sub>: 2271.6393</b>	<b>21 aa</b>
RLEALKEGGG SLAVKQKVP Y				
<b>Cm<sub>CR</sub>17.3</b>	<b>pl:6,5</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 7073.13</b>	<b>PM<sub>E</sub>:7073.2010</b>	<b>64 aa</b>
MANVSILAAI DEHAKASEQL KAASKKLKDF ATVYVEAIKD SGRDYVAQFN AQMAWERTVA IMLN				
<b>Cm<sub>CR</sub>17.4</b>	<b>pl: 5,2</b>	<b>PM<sub>t</sub>: 6120.75</b>	<b>PM<sub>E</sub>:6120.8177</b>	<b>55 aa</b>
SERVALISTR QAERCAVCSA DNDASIKHFN VDCQVESANE RMLYRESDCA RSVNA				

Secuencias obtenidas de las sub-fracciones Cmt<sub>R</sub>10.10-17. Las secuencias fueron analizadas con el programa ProtParam y se compararon con los datos experimentales. (PM<sub>t</sub>) Peso Molecular teórico. (PM<sub>E</sub>) Peso Molecular experimental. La fracción FCm<sub>CR</sub>10.16-17 fue colectada entre el minuto 35-38 para los ensayos biológicos, pero fue separada en dos tubos para fines de secuenciación dando lugar a la sub-fracción Cmt<sub>R</sub>17.1-4(Anexo 4).

Tabla 10. Secuencias obtenidas de las sub-fracciones obtenidas de FCmc&lt;10

ID	Score	E-value	Categoría	Función
<b>Cmc<sub>R</sub>10.1</b> CmcR10.1 U13-ctenitoxin	38	0.72	toxin-like	Neurotoxin
			VAFRNVCTPQGCILPHGARNVTSFIGMKCFWQELKM -----CTSDgcCYG---KCMIAFMGKIC----- ** : ** : : : : : : : *	
<b>Cmc<sub>R</sub>10.2</b> CmcR10.2 U13-lycotoxin	38	0.72	toxin-like	Neurotoxin
			MLRDACVQICSTAVEFQRCGADCVEKDFATVQSGVYVSG ---DCCLNIATCNCRFGRYFCSTFGDYQI----- * . : : : : : : * * . . . . * : *	
<b>Cmc<sub>R</sub>10.3</b> CmcR10.3 Ctenitoxin	42	0.42	toxin-like	Neurotoxin
			MELYPFMKACRDVCEANSLIHCSTVHICFNRAV----- ECADVYKECWYFEKPKCKDRACQCSLGMNCKC-----KATLGDIF ** * : * * . : : . . : : * . : : *	
<b>Cmc<sub>R</sub>11.1</b> CmcR11.1 Q3YED2_CONLT/1-72	54	0.040	toxin-like	Neurotoxin
			SERILEVCASDAECNMKLCRHANCVYKL -----ICNNDAECCFPYSCENSNC----- : * . : : : : : : * : : : *	
<b>Cmc<sub>R</sub>11.2</b> CmcR11.2 Kappa-conotoxin-like	53	0.049	toxin-like	Neurotoxin
			MEASDARCILSVAQCRDACEVAWTIMVSPGHILSTPYAVQECTDCARNVVEGEMSTVILKM -----CFLLVIAACLNLFFQVVLTSRCFFPGIYCTPYLpgICCDICRNV----- * : * * * : : : * * * * * * * * * * * * * * *	
<b>Cmc<sub>R</sub>12.1</b> CmcR12.1 Omega-theraphotoxin	51	0.20	toxin-like	Neurotoxin
			MQDKLSPLAQELRDMKAVVLTAVLGMIAELCAERCQAERCIEQLISVANVARARVASERVALERSDFIAELYASMA -----CMSDTEcEAcgAekCVPQLTKVHTTTKTRGGRRRSMEMSD----- * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
<b>Cmc<sub>R</sub>12.2</b> CmcR12.2 gamma-KTx	42	0.42	toxin-like	Neurotoxin
			MLRSDACHQRSTCEVKMLTVDCMIGCEDSGVCYVSGRD ---DSCVDKSRCAKYGYQQCEICCKKAG----- * : * * * * : : * * * * : : *	
<b>Cmc<sub>R</sub>12.4</b> CmcR12.4 Four-loop	43	0.35	toxin-like	Neurotoxin
			FARNECDVYTSWKMLHGQESRQIMIVAEDCQGRITASLRQEMHKDL -----CQLITADDSRGTQKHRALLISMSTRCQGRGASCRKTM----- * : : * : . * : * * : : * * * * * * * * * *	
<b>Cmc<sub>R</sub>13.1</b> CmcR13.1 Conotoxin	39	0.72	toxin-like	Neurotoxin
			MAREVCESAHLIRQLCAERQCRQEMHKDLEEVKQKCVQPYLDEFQKKCWHEVEIYRQ -----LLVVALCMLTTCHTENYRDSQKV----- : * : * * * * : * * * * : * *	
<b>Cmc<sub>R</sub>14.1</b> CmcR14.1 Conotoxin	47	0.17	toxin-like	Neurotoxin
			MLQSRASCNERSLCVAQFNCGHCERAVESCTVAFQIA ---TNAScNEGAMCSFGFQCCCKECCMSHCT----- : : * * * * : * * * * : * * * * * * *	
<b>Cmc<sub>R</sub>14.2</b> CmcR14. Conotoxin	49		toxin-like	Neurotoxin
			MLRKEVCQEFDNLEKETACSLR---QEMHKDCCD LLAAHAQEELSDNIESERGCSGAYKRCSSSQRCCE : * . . . : * * * * * * * * . : * * :	
<b>Cmc<sub>R</sub>15.1</b> CmcR15.1 U2-ctenitoxin	49	0.11	toxin-like	Neurotoxin
			MLQSVALGCSTQMLCGPVTIQEFWDCNLEKETASLRQEMHKDLEEVKQKVPYLDQK -----CCRSKMFKDVTCTCFYPSQAKKELCTCQPKHLKYIEKGLQKADY----- * . . : : * * : : * * : : * * : : * * : : *	
<b>Cmc<sub>R</sub>15.2</b> CmcR15.2 ASIP_MACAS	38	0.72	signaling-protein	Melanogenesis
			MLMNSYTRSCSQASANDSVAIGDFCKISEVALVQRPAEQEVACWSACVGLGH -----SNSSVNLDFPVSIVALNKKSKQTSRKEA----- * : * * * : * * . : * * * * : : : : *	
<b>Cmc<sub>R</sub>16.1</b> CmcR16.1 ITR5_LUFCY	47	0.17	Kunitz-like	Inhibidor tripsina
			MHKLMNVCEAQEQCRFDNSLMIESRCDQAEVTVVEADSFKERSHVGFIMQARAVDER -----ICPRIIMPCKTDDDCMLDCRC----- : * * * * : * : * : : * * *	
<b>Cmc<sub>R</sub>17.1</b> CmcR17.1 theraphotoxin	41	0.49	toxin-like	Neurotoxin
			MEKHSERAQVCYTRRESAVARAAESDGDSSISAIAEDNAMGLNDFRECAQSQYVARPYSDDLRLTA -----CRKSKSAGKICKSEGSSISA----- * . : * * : : : * * * * * *	
<b>Cmc<sub>R</sub>17.2</b> CmcR17.2 Conotoxin	37	0.80	toxin-like	Neurotoxin
			RLKALKEGGGSLAVKQKVPY ---QALIKGGGKRPKEKIK--- : * * * * * * * * * * * * * * :	
<b>Cmc<sub>R</sub>17.3</b> CmcR17.3 F2SHJ8_TRIRC	39	0.99	Enzima	Enzima
			MANVSILAAIDEHAKASEQLKAAASKLKDFAIVVEAIKDSGRDYVAQFNAQMAWERIVPIMLN -----KAEKAEAAKKKKED----- * * * : * * * * * * * * *	

Análisis de las secuencias obtenidas mediante el servidor de reconocimiento de plegamiento de proteínas (Phyre 2) y el programa de alineamiento local múltiple de secuencias (Psi-BLAST) utilizando la base de datos Knottins de Uniprot (Kelly 2015).

#### 4.1.2- Otras actividades biológicas del extracto obtenido de los nematocistos localizados en las campanas de *Carybdea marsupialis*

##### 4.1.2.1.-Actividad proteolítica

Algunos de los componentes más importantes del veneno de animales marinos y terrestres son las proteasas: serín-proteasas (SP) y especialmente las metaloproteasas (MMP), debido a que los pesos moleculares de las proteasas son muy variados, se decidió realizar ensayos de actividad proteolítica con las fracciones FCmc 10-30 y FCmc >30. La determinación de la actividad proteolítica se realizó mediante el método de Kunitz. En la Fig. 22 se observa que las fracciones FCmc 10-30 y FCmc >30 presentaron actividad proteolítica, aunque FCmc 10-30 mostró mayor actividad que FCmc>30. Con el fin de determinar en qué fracción se encontraban las metaloproteasas, se tomó en cuenta que estas requieren de iones divalentes como  $Zn^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  para ser activas, por lo cual son inhibidas por la presencia de agentes quelantes como EDTA (Ácido Etilendiaminotetracético) mientras que las serín proteasas no son afectadas. El experimento se realizó bajo las mismas condiciones que el experimento anterior, pero agregando EDTA (0.5 mM). En la Fig. 22 se puede observar que la actividad proteolítica de FCmc>30 disminuyó en relación a la actividad que mostró sin EDTA, mientras que FCmc10-30 no mostró cambios en su actividad. Por tanto, MPP se encuentran en FCmc>30 mientras que SP, se encuentran en FCmc10-30.

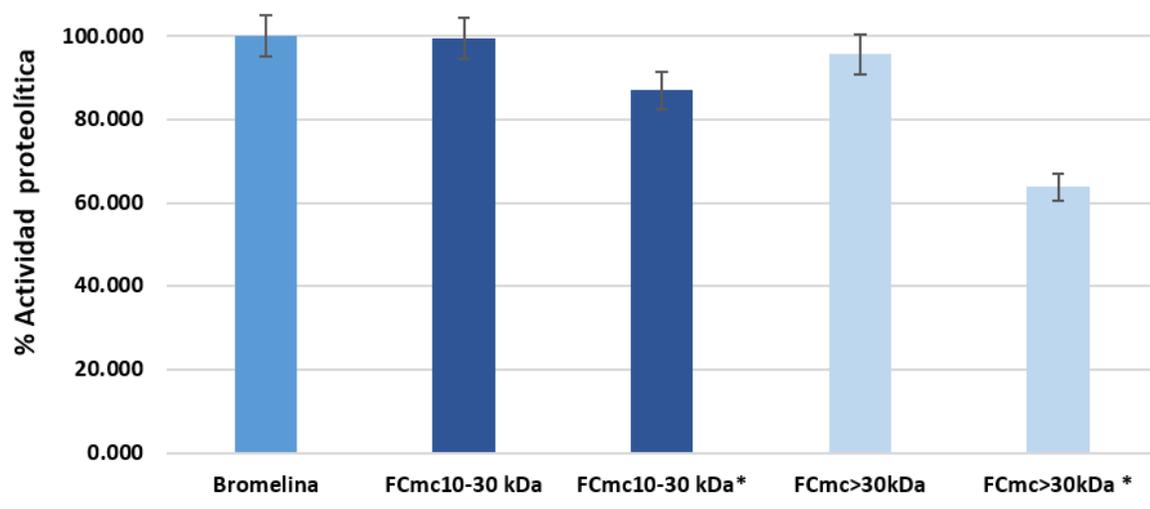


Fig.22 Actividad proteolítica de las fracciones FCmc>30 y FCmc10-30 obtenidas del extracto crudo del veneno proveniente de las campanas de la cubomedusa *Carybdea marsupialis*. (\*)Fracciones a las que se agregó EDTA 0.5 mM, Se utilizó como control a la Bromelina.

## 4.2 Discusión de resultados

Como se ha mencionado anteriormente en este trabajo, los cnidarios secretan una gran diversidad de toxinas en sus venenos que le permiten defenderse o cazar, sin embargo la caracterización de proteínas y péptidos bioactivos de las medusas de la clase cubozoa se ha visto obstaculizada debido a la dificultad en la colecta de organismos y su identificación, así como la tendencia de las toxinas de estos venenos a agregarse y adherirse a las superficies de los sistemas de separación. (Brinkman y Burnell, 2008; Badré S 2014). Asimismo, se ha sugerido que la variabilidad en los resultados obtenidos por diferentes grupos se debe al método y la variabilidad de las fuentes de extracción.

*Carybdea marsupialis*, al igual que otros miembros de la clase *Cubozoa*, se compone de aproximadamente 95 % de agua y de 4-5 % de proteína (Peggy Hsieh, Leong y Rudloe 2001) por lo cual en método de extracción es crítico para obtener un rendimiento aceptable y evitar contaminaciones producto de la manipulación de los organismos (Anexo 1). Aunque la diferentes técnicas de extracción de venenos de Cnidarios están sujetas a debate, una de las más utilizadas hasta el momento es la técnica “disrupción mecánica”, la cual fue utilizada en el presente trabajo, ya que permite evitar contaminaciones provenientes de otros tejidos y el exterior (Frazão y Antunes, 2016).

Los perfiles obtenidos en los espectros de masas de la Fig. 9 y 16 correspondientes a los extractos de los tentáculos y las campanas respectivamente, muestran señales similares a lo reportado en la literatura, ya que se ha establecido que el veneno de los cnidarios puede ser dividido en tres categorías principales: péptidos neurotóxicos (3-10 kDa), proteínas con actividad enzimática (10-30 kDa) y citolisinas (>30 kDa) (Moran, Genikhovich, et al. 2012; Lassen, Helmholz, et al.,2010). Sin embargo existen diferencias entre los dos espectros, principalmente en cuanto al número de componentes detectados, ya que en el espectro de masas de CmEt se detectaron 43 componentes con pesos moleculares entre 2724-17911 Da, mientras que para el espectro de CmEc se detectaron 39 componentes con pesos moleculares entre 2091-14397 Da. Las señales detectadas en ambos espectros se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a su peso: señales de alta intensidad entre 3 y 10 kDa que se asocian

usualmente con la presencia de neurotoxinas (Lazcano-Perez, et al. 2016) y un grupo de menor intensidad entre 13 y 18 kDa que se asocia a la presencia de fosfolipasas de tipo A<sub>2</sub> (Timo J, et al. 2004; Bahareh, et al. 2016). En ambos espectros no se observan señales más allá de los 18 kDa, sin embargo se ha reportado la presencia de citolisinas en el veneno de *C. marsupialis* con pesos moleculares mayores a los 100 kDa (107, 220 y 139 kDa) (Sánchez-Rodríguez, Torrens y Segura-Puertas, 2007; Rottini, Gusmani, et al., 1995). Una de las posibles razones por la cual no se hayan detectado señales de alto peso molecular es que este tipo de toxinas tienden a aglomerarse formando agregados como resultado de interacciones no covalentes durante diferentes pasos de purificación o extracción. Este efecto de agregación es el más común en la purificación de hemolisinas, las cuales tienden a agregarse al cambiar el amortiguador de extracción o concentrarse (Long y Burnett 1989). Las discrepancias en la composición del veneno al comparar los *mass fingerprints* obtenidos de CmEt y CmEc se deben fundamentalmente al tejido de origen, ya que se ha reportado que diferentes tipos de nematocistos pueden poseer diferentes actividades o potenciales tóxicos (Jouiaei, Casewell, et al. 2015; MacClounan 2012; Winter, et al. 2010).

Las picaduras de las medusas, principalmente de la clase cubozoa, se han asociado a diferentes actividades biológicas como: dolor, inflamación, cardiotoxicidad, miotoxicidad, así como efectos hemodinámicos y hemolíticos, sin embargo también se ha relacionado a la picadura de organismos del género *Carybdeidae* con un conjunto de síntomas sistémicos denominado Síndrome de Irukandji (IS). A pesar que la etiología de IS permanece sin ser elucidada, algunas evidencias experimentales y datos obtenidos de reportes clínicos sugieren que los signos síntomas de IS se relacionan con el aumento exacerbado y desregulado de catecolaminas (Noradrenalina y adrenalina). Actualmente, sólo se han publicado dos trabajos que relacionan el veneno de las cubomedusas y el IS, en los cuales se ha reportado efectos cardiovasculares en seres humanos, ratas y cobayos *in vitro* utilizando extractos de veneno completo de *C. barnesi* (Winkel, et al. 2005) y el aumento de la concentración de catecolaminas en el torrente sanguíneo de víctimas de IS (Ramasamy S 2005 b).

Por otro lado, mucho se ha debatido acerca de la capacidad de *Carybdea marsupialis* para generar síntomas similares a IS, ya que muy pocas toxinas han sido aisladas de su veneno y su picadura ha sido asociada usualmente con dolor severo, sensación de quemazón,

erupciones eritematosas y edema (Sánchez-Rodríguez, Torrens and Segura-Puertas, 2007; Milla, et al. 2000), sin embargo, algunos otros reportes relacionan a la picadura de *C. marsupialis*, con manifestaciones clínicas sistémicas similares a IS (Bordehore, et al. 2015; Giampero, et al. 1997).

A partir del conocimiento de la composición general del veneno de los Cnidarios y de *C. marsupialis*, así como de las actividades biológicas reportadas en otras especies de cubo medusas como: neurotoxicidad y citotoxicidad, se ha propuesto que algún o algunos componentes del veneno de las cubomedusas son capaces de intervenir en el proceso de liberación de catecolaminas por parte de las células cromafines (Rathbone, et al. 2016), por lo cual se decidió probar la actividad excitotóxica de CmEt y CmEc en un modelo de células cerebelares granulares (CGC) ya que desde hace algunos años se sabe que cierto tipo de neuronas como las CGC sobreviven o mueren *in vitro* bajo condiciones que promueven el incremento del flujo de  $Ca^{2+}$  en función de su estado de madurez (Garthwaite y Garthwaite 1991). Estas condiciones incluyen la despolarización de las células influenciada por concentraciones “elevadas” de  $K^+$  extracelular ( $[K^+]_e$ ) en cultivos primarios de CGC (Resink, et al. 1994), así como la estimulación excitatoria mediada por receptores de aminoácidos excitatorios (EAA<sub>R</sub>) (Gallo, et al. 1987), por lo cual, este modelo permite determinar los efectos indirectos de CmEc y CmEt en el flujo de  $Ca^{2+}$  (Fig. 10 y 17).

En este ensayo se probaron dos concentraciones de CmEt (A3:3 y A4:0.3 $\mu$ g/mL) y CmEc (B1:16 y B2:32 $\mu$ g/mL). Se obtuvieron diferentes resultados entre ambos extractos. En el caso de CmEt, parece que este extracto en ambas concentraciones mimetiza los efectos tróficos excitatorios de manera similar a NMDA, Glu y altas concentraciones de  $[K^+]_e$  aunque con menor intensidad. Asimismo es posible observar un efecto sinérgico al combinar Glu o NMDA con B1 y B2. Sin embargo al tratarse las CGC con el inhibidor Mk-801 en conjunto con B1 y B2 produce cambios similares en la viabilidad celular respecto a K5 (control) y moderadamente mayores a MK801. Particularmente si se comparan los efectos de B1 y B2, tanto solos como en conjunto con EAA, parece que generan el mismo efecto en la viabilidad celular de CGC, lo cual puede deberse a que existen diferentes toxinas contenidas en CmEt que en conjunto generan este efecto.

Por otro lado, CmEc parece generar a primera vista un efecto mixto ya que mimetiza los efectos tróficos excitatorios de NMDA en células jóvenes pero no reduce la viabilidad celular de CGC maduras. De igual modo al agregarse A3 y A4 en conjunto con NMDA, los efectos tróficos en las CGC son diferentes, ya que al agregar NMDA en conjunto con A3, la viabilidad celular de CGC jóvenes disminuye, por lo que pareciese que A3 disminuye los efectos tróficos de NMDA. Sin embargo, CmEc con la concentración A4 en conjunto con MK801 parece no generar algún cambio en la viabilidad celular de CGC, pero si con A3 de manera moderada en células maduras aunque no en células jóvenes.

Finalmente, debido al efecto obtenido de la adición de Mk801 en conjunto con CmEt y CmEc en la Fig. 10 y 17 respectivamente, se puede inferir que los efectos en la viabilidad celular de CGC deben ser producto de un proceso alterno a la apertura de canales inotrópicos de glutamato, pero que afectan los flujos de  $\text{Ca}^+$  intracelular.

Dado que tanto CmEc como CmEt afectaron la viabilidad celular de CGC, se decidió concentrar y fraccionar ambos extractos mediante el sistema de ultrafiltración Amicon, utilizando las membranas Millipore de 10 y 30 kDa. Se obtuvieron las fracciones FCmc<10, FCmc10-30, FCmc > 30 y FCmt<10, FCmt10-30 y FCmt >30, las cuales fueron alicuotadas, liofilizadas y guardadas en refrigeración hasta ser utilizadas. Para determinar que fracción poseía actividad sobre células excitables, se determinó el efecto de las fracciones obtenidas en el curso temporal de la concentración relativa de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en células cromafines bovinas *in vitro* (Fig.11). Se probaron las fracciones FCmc<10, FCmt<10 y FCmt>30, ya que en general toxinas con actividad en células excitables poseen un peso entre los 3-10 kDa (Zhang, et al. 2003). La fracción FCmt>30 se probó ya que hay reportes de una toxina no secuenciada pero aislada por medios cromatográficos de 120 KDa que tuvo efecto neurotóxico en cangrejos kDa (Sánchez-Rodríguez, Torrens y Segura-Puertas, 2006). Todas las fracciones aumentaron  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  al ser agregadas al medio de registro. FCmt<10 tuvo un efecto similar al producido por la inducción de la despolarización por K [10 mM], mientras que FCmc<10 aumento  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en menor medida que FCmt<10 y la que tuvo menor efecto fue FCmt>30. Debido a que la ionomicina es un ionoforo divalente que facilita el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular, se concluyó que los efectos de las fracciones no son producto de la disrupción de la membrana celular de las células cromafines.

Las fracciones FC<sub>mc</sub><10 y FC<sub>mt</sub><10 fueron las elegidas para ser procesadas mediante cromatografía de fase reversa con una columna C18 en un sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Las fracciones obtenidas fueron secuenciadas mediante un espectrómetro de masas Esquire con trampa de iones y analizadas con los programas BLAST y ProtParam (Tabla 7 y 9). Al comprobar que no había diferencia entre la masa teórica (PM<sub>t</sub>) y la masa experimental (PM<sub>E</sub>), se asumió que los péptidos secuenciados no poseen modificaciones post traduccionales. Por otro lado no fue posible determinar proteínas con dominios homólogos a las secuencias obtenidas, por lo cual se utilizó la base de datos Knottin database y el algoritmo iterativo PSI-BLAST (Tabla 8 y 10). Mediante esta aproximación los péptidos analizados mostraron similitud con neurotoxinas aisladas de venenos de otros organismos. Cabe mencionar que hasta el momento no se ha reportado alguna toxina aislada de cubo medusas que posea una secuencia de aminoácidos homóloga con otras proteínas conocidas (Brinkman, Konstantakopulos, et al. 2014; Brinkman y Burnell 2009; Nagai. H 2002), por lo cual los valores de E-value (E) para las secuencias analizadas son relativamente altos.

Ya que la base farmacológica de IS hasta ahora ha sido sujeto de especulación y que las características del síndrome recuerdan a aquellos signos y síntomas causados por la liberación excesiva de catecolaminas provocada por diversos padecimientos que afectan directamente las glándulas suprarrenales como los feocromocitomas (Winkel, et al. 2005;. Beiley, et al. 2005; Tiong 2008). Se realizó un ensayo de microfluoroscopia sobre células cromafines, utilizando el fluoróforo Fluo-4 Am, para probar el efecto del péptido Cmt<sub>R</sub>1.1.

En la Fig. 14 se muestran micrografías que muestran que las células cromafines aumentan [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> al ser expuestas a K<sup>+</sup> y de igual modo en presencia de Cmt<sub>R</sub>1.1, aunque no con la misma intensidad. Aunque no se conoce aún el proceso fisiológico secuencial completo de la liberación de catecolaminas por parte de la medula suprarrenal, se sabe que la liberación de estos neurotransmisores esta mediada por fibras pre-ganglionares que mediante acetilcolina promueven la despolarización de la membrana celular de las células cromafines a través de receptores nicotínicos que consecuentemente inducen el aumento de la permeabilidad membranal a los iones Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> promoviendo finalmente la liberación de

catecolaminas por exocitosis (Brunton, Lazo y Parker, Goodman & Gilman: Bases farmacológicas de la terapéutica 2006). Para generar un gráfico que nos permitiera comparar el efecto de  $Cm_{tR}1.1$  en las células cromafines, se trataron diferentes células y se ponderó la intensidad de fluorescencia del indicador Fluo-4-AM mediante el programa de análisis de imagen ImageJ (Fig.15). En esta figura se observa que las células responden aumentando la  $[Ca^{2+}]_i$  a dos pulsos de 500 ms de  $K^+$ , así como a los pulsos de 500 ms de  $Cm_{tR}1.1$ , sin embargo, la respuesta a la despolarización inducida por  $K^+$  es considerablemente mayor que la inducida por la exposición  $Cm_{tR}1.1$ .

Como se ha mencionado anteriormente, la liberación de catecolaminas por parte de la medula suprarrenal requiere del neurotransmisor acetilcolina (ACh) que promueve la despolarización de la membrana de las células cromafines a través de receptores nicotínicos de acetilcolina (AChNR). Los AChNR son una familia de receptores catiónicos de nueve subunidades involucrados en la regulación de la liberación de diferentes neurotransmisores (Wonnacott, Presynaptic nicotinic ACh receptors. 1997). Los neurotransmisores agonistas como ACh promueven cambios conformacionales en AChNR incrementando su permeabilidad a cationes como  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ . El flujo de cationes al interior de las células cromafines causa la despolarización local de la célula promoviendo la activación de canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), lo cual desencadena la liberación de vesículas con neurotransmisores mediante un proceso de liberación mediado por  $Ca^{2+}$  promovido por el aumento de la permeabilidad a los iones  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  (Fig. 24 A). (Brunton, Lazo y Parker, Goodman & Gilman: Bases farmacológicas de la terapéutica 2006) (Wonnacott, Kaiser, et al. 2000).

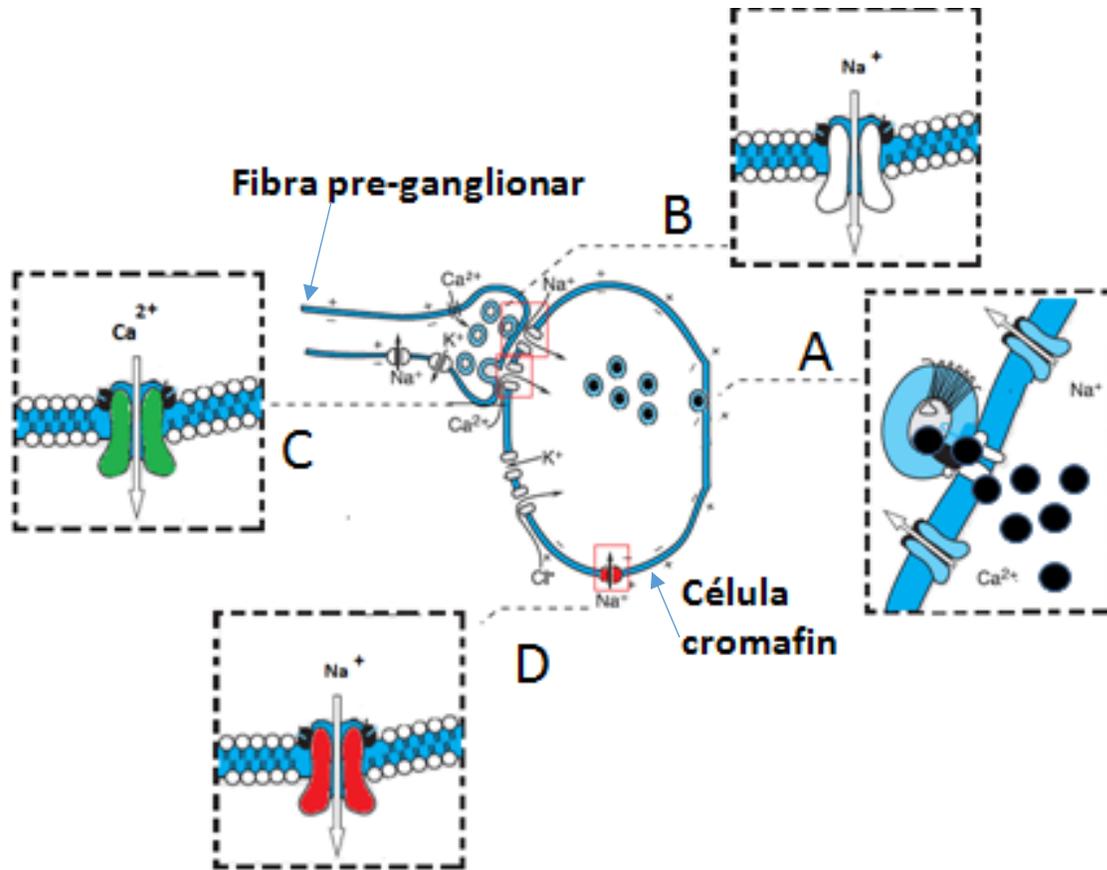


Fig. 24 Posibles dianas moleculares de la toxina Cmt<sub>R</sub>1.3. A. Esquema del proceso de liberación normal de catecolaminas. B. Receptor nicotínico de acetilcolina. C. Canales de Calcio regulados por voltaje (VGCC). D. Canales de Sodio sensibles a tetrodotoxina (Na<sub>v</sub>-TTX).

Por lo cual, es posible reconocer tres posibles blancos moleculares con los cuales la toxina Cmt<sub>R</sub>1.1 puede interactuar para generar el efecto observado en Fig. 15 (Craviso, 2010). El primero de los eventos necesarios para que ocurra la liberación de catecolaminas es la liberación de Ach por parte de las inervaciones pre ganglionares de las células cromafines, Ach se une a los AchNR, un receptor asociado a un canal iónico, el cual permite la entrada local de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> generando la despolarización local de las células cromafines (Fig. 24B). Tras la despolarización, los VGCC son activados permitiendo la entrada de Ca<sup>2+</sup> y por ende la liberación de catecolaminas (Fig.24 C). A diferencia de los dos primeros eventos que permiten la liberación de catecolaminas, lo cuales ocurren a nivel local en zonas restringidas de las células cromafines o en ciertas regiones de las glándulas suprarrenales, el tercer evento

ha sido descrito en situaciones de estrés, donde la liberación vigorosa de catecolaminas es necesaria. En este proceso interviene la activación de canales de  $\text{Na}_v\text{-TTX}$  posterior a la despolarización generada por Ach (Fig. 24D). Estos canales permiten la entrada adicional de  $\text{Na}^+$ , acoplado el proceso de despolarización local de la célula con una mayor liberación de catecolaminas mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la activación adicional de VGCC, ya que la apertura de estos canales promueve la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  permitiendo la liberación exacerbada de catecolaminas (Cera, et al. 1983). Por lo tanto los AchNR, VGCC y  $\text{Na}_v\text{-TTX}$  constituyen posibles dianas moleculares de  $\text{Cmtr}_1.1$  debido a que la activación independiente de uno de estos canales conlleva a la liberación de catecolaminas mediante la despolarización de las células cromafines generando un potencial de acción (AP) que se sincroniza con la activación transitoria de la maquinaria de exocitosis (Lefkowitz, et al. 2014).

Como se ha mencionado anteriormente, la base farmacológica de IS ha estado sujeta a especulación y algunos datos clínicos han provisto la evidencia necesaria para que se asocien los signos y síntomas de este síndrome con la hipercatecolanemia producida en casos de Feocromocitoma pero también con algunos casos de envenenamiento producido por arañas y escorpiones, por lo cual se ha propuesto la posibilidad de que algunos miembros de la clase cubozoa como *C. barnesi* posean en su veneno toxinas que afecten canales de sodio sensibles a tetrodotoxina con base en estudios en el atrio derecho e izquierdo de ratas y conejillos de indias. (K. Winkel, et al. 2005) (Freire-Maia y Campos 1987) (Nicholson y Graudins 2002). Particularmente el péptido  $\text{Cmtr}_1.1$  tiene cierta similitud con toxinas pertenecientes a la familia de toxinas 12 (Fig. 25) que se caracteriza por agrupar toxinas que inhiben canales iónicos de diferentes tipos entre ellos canales de sodio sensibles a tetrodotoxina (Marchler-Bauer, et al. 2017). En el alineamiento se observa que las toxinas de esta familia tienen un dominio estructural con tres cisteínas más que  $\text{Cmtr}_1.1$  y forman puentes disulfuro. Esta diferencia podría explicar que las toxinas del veneno de *C. marsupialis* sean lábiles, sin embargo se requieren más datos para entender la relación estructura función de las toxinas procedentes de organismos de la clase cubozoa y determinar la historia molecular evolutiva de su diversificación (Brinkman, Konstantakopulos, et al. 2014; Brinkman y Burnell 2009; Nagai y Takuwa, 2002)

```

CmtR 1.1      SFNQEGL TYH HCRNY LGHCK MFSY IHH DVG ---R A S C T I DNKRHSMVARKS
H12A4         SADYQLNPQER GCRY F LGE CK K TSE CCE H LACHDKHKW CA WDWT I ---- -GK-
H7A01_HAPHA   SADNQLNPQER ECRYWLG T CS K TGDCCS H L SCS PK HGWC V W DWTF ---- -RK-
               * : :           : ** : ** * . .           . : .           : * . * .           *
Superfamilia Toxin_12      .CR.....C.....CC.....C.....C

```

Fig.25 Alineamiento múltiple de Cmt<sub>R</sub>1.1 con toxinas pertenecientes a la Súper familia de toxinas 12 aisladas del veneno de *Selenocosmia hainana*

Se ha propuesto que las toxinas que promueven la liberación de catecolaminas utilizando como diana molecular a los canales de sodio dependientes de voltaje (Na<sub>v</sub>-TTX) “modulan” la entrada de Na<sup>+</sup> al interior de la célula, (Dary, et al. 2016). Lo cual resulta interesante, ya que hasta hace algunos años se había establecido que la contribución de Na<sub>v</sub> a la excitabilidad de las células cromafines era parcial, sin embargo, recientemente se ha descrito la presencia de flujos de Na<sup>+</sup> en células cromafines de gerbos y ratas que son críticos en la configuración de la forma de la onda AP y por tanto capaces de producir cambios drásticos en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>I</sub> (Vandael, et al. 2015). Por tanto, el posible bloqueo de Na<sub>v</sub>-TTX, por parte de Cmt<sub>R</sub>1.1, puede generar la liberación de catecolaminas como se ha descrito en ensayos en los que se ha demostrado que la disminución de la disponibilidad de Na<sub>v</sub>-TTX puede inducir el aumento de la secreción de catecolaminas debido a la generación de ráfagas triples o dobles de AP, los cuales se han relacionado con el aumento [Ca<sup>2+</sup>]<sub>I</sub> y la liberación de catecolaminas en células cromafines de ratón (Lingle 2015). Por tanto, a pesar de la especulación que ha rondado desde hace mucho tiempo el papel de las toxinas provenientes del veneno de las cubomedusas y su capacidad de promover la liberación de catecolaminas por parte de las células cromafines, los Na<sub>v</sub>-TTX pueden ser la posible diana molecular de Cmt<sub>R</sub>1.1 y su mecanismo de acción sea la reducción de la disponibilidad de Na<sub>v</sub>-TTX generando la despolarización de la membrana celular y la activación persistente VGCC, lo cual eleva la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>I</sub> promoviendo la liberación de catecolaminas de manera similar a los reportes del aumento de liberación de catecolaminas en células cromafines de ratón tratadas con TTX (Marder y Taylor 2011; Vandael, et al. 2015).

Por otro lado, las secuencias obtenidas de la fracción FCmc<10 fueron analizadas de la misma manera que las secuencias obtenidas de FCmt<10 y agrupadas según su similitud con otras toxinas (Fig. 26).

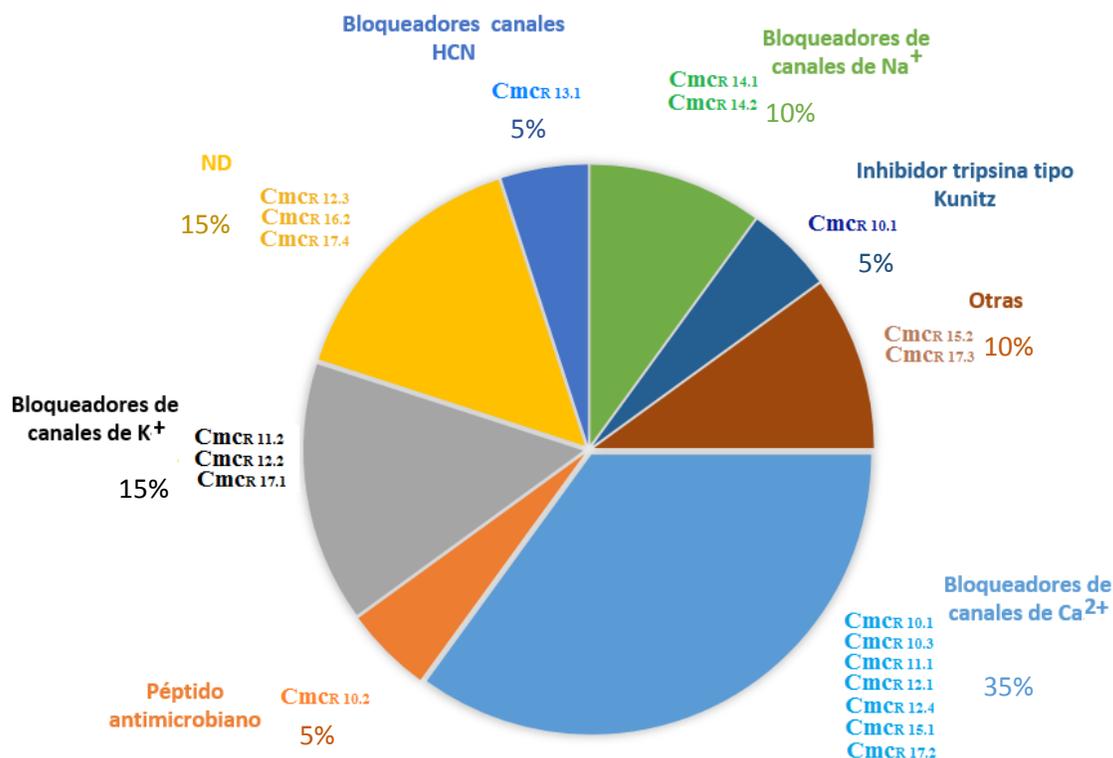


Fig. 26 Gráfico circular de las secuencias obtenidas de FCmc<10 y analizadas mediante el servidor de reconocimiento de plegamiento de proteínas (Phyre 2) y el programa de alineamiento local múltiple de secuencias (Psi-BLAST) utilizando la base de datos Knottins de Uniprot (Kelly 2015).

La presencia de neurotoxinas en nematocistos ubicados en las campanas parece relacionarse con la necesidad de las cubomedusas de incapacitar rápidamente a su presa, permitiendo su digestión (Brinkman y Durnell, 2007). Así mismo se ha propuesto adicionalmente que las cubomedusas con picaduras menos potentes (*Carybdea spp.*) son capaces de cazar presas más grandes debido a la presencia de nematocistos en su sistema gástrico que pueden secretar proteínas y péptidos bioactivos (Camillo, et al. 2006; Larson 1976). Lo cual es bastante interesante ya que a pesar de que la producción del veneno de las cubomedusas proviene de los nematocistos (Gershwin, et al. 2010), estudios de transcriptómica de tejidos específicos realizados recientemente han revelado que muchos de los genes relacionados con la

producción de veneno de las cubomedusa son expresados en altas concentraciones en los canales gástricos localizados en las campanas de estas (Ávila-Soria, 2009). En la Fig. 26 se puede observar que el 35 % de las secuencias analizadas tiene similitud con toxinas bloqueadoras de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , 15 % con toxinas bloqueadoras de canales de  $\text{K}^+$ , 10 % toxinas bloqueadoras de  $\text{Na}^+$  y 5 % de toxinas bloqueadoras de HCN (canales marcapasos), que representan el 65 % de las toxinas analizadas.

Debido a que algunas toxinas de Fc<sub>mc</sub><10 mostraron similitud con toxinas bloqueadoras de  $\text{K}^+$  y efecto mixto sobre células CGC, se determinó el efecto de esta fracción Fc<sub>mc</sub><10 sobre  $[\text{K}^+]_i$  a través del canal Kv 10.1 en células HEK (Fig.18). En este ensayo es posible observar que  $[\text{K}^+]_i$  disminuye de manera dosis dependiente con respecto a la concentración de Fc<sub>mc</sub><10. Los resultados obtenidos en este ensayo son de gran relevancia ya que se ha relacionado el aumento de los niveles de expresión de Kv10.1 en un gran número de tumores sólidos (Borowiec, et al. 2011), así mismo, se han reportado que el Kv10.1 se relaciona con el flujo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es la señal responsable de regular procesos celulares como la supervivencia celular e incluso de la inhibición del canal Kv10.1 (Chantome, et al. 2013). Asimismo, se determinó el efecto de las fracciones obtenidas de Fc<sub>mc</sub><10 (Fc<sub>mc</sub>10.10-10.16) en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células cromafines (Fig. 20). En esta figura se puede observar que el efecto de las sub-fracciones Fc<sub>mc</sub>10.10-10.16 sobre  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células cromafines ocurre solamente después de la inducción de la despolarización de la membrana celular de estas células mediada por la adición  $\text{K}^+$  [10 mM] al medio y que el efecto en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de Fc<sub>mc</sub>10.10-10.16 en células cromafines es diferente, lo cual se relaciona con los resultados obtenidos en la Fig. 17 en la que se determinó que el efecto excitotóxico de Fc<sub>mc</sub><10 sobre CGC es de tipo mixto. Así mismo si se observa el intervalo comprendido entre los 315s y 430 s es posible observar que  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tiende a restablecerse y a los a los 430 s cuando se agrega el ionóforo ionomicina al medio la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumenta, lo cual es una evidencia de que el efecto observado en las células cromafines es producto de la interacción de las toxinas de las sub-fracciones obtenidas con alguno de los canales iónicos presentes en la membrana celular.

Retomando el proceso de liberación de catecolaminas por las células cromafines, existen al menos tres dianas de las toxinas de FCmc<10 (AchNR, VGCC y Na<sub>v</sub>-TTX), ya que la activación independiente de uno de estos canales conlleva a la liberación de catecolaminas (García, García-De-Diego, et al., 2006). En las Fig. 20 y 21, se muestra que las subfracciones de FCmc<10 tienen diferentes efectos en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el modelo de células cromafines, por lo cual al clasificarlas en función de su efecto se correlacionan con su similitud con otras neurotoxinas (Fig.25). Las subfracciones FCmc 10.10-16 pueden ser clasificadas en dos grupos; aquellas que disminuyen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mediada por la adición K<sup>+</sup> [10 mM] y las aumentan [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mediada por la adición K<sup>+</sup> [10 mM]. Para clasificar a las fracciones FCmc 10.10, 10.11, 10.12, 10.15 y 10.16 se tomaron en cuenta los resultados de la Fig.21, ya que estas fracciones disminuyeron [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> después de la inducción de la despolarización de las células cromafines. Así mismo, las secuencias obtenidas de estas fracciones tienen similitud con toxinas bloqueadoras de los VGCC de tipo L y N. Las células cromafines contienen un gran número de VGCC (L, N, P/Q y T) que permiten la liberación de catecolaminas dependiente de Ca<sup>2+</sup> a la circulación sanguínea en condiciones de estrés (Fernández-Morales 2014). Los canales de calcio más estudiados en las últimas décadas son los VGCC de tipo L y T, los cuales se ha demostrado juegan un papel central en el control de la excitabilidad y procesos de exocitosis en las células cromafines (Malmberg y Yaksh 1994; Mahapatra, et al. 2012). Así mismo, la similitud de las secuencias de las subfracciones FCmc 10.10, 10.11, 10.14 y 10.16 capaces de bloquear VGCC de tipo L sugiere que la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por la despolarización de la célula, solamente se reduce y no desaparece debido a que los VGCC de tipo L son responsables del 40-50 % del total de la corriente de Ca<sup>2+</sup> (García, García-De-Diego, et al., 2006) además que se ha descrito que las células cromafines presentan una gran diversidad y densidad de canales de Ca<sup>+</sup> en su membrana (Lingle 2015), por lo cual la concentración utilizada en el ensayo no sea suficiente para bloquear la totalidad de los VGCC en las células cromafines, sin embargo, se requieren ensayos posteriores para constatar la diana molecular y mecanismo de acción de las toxinas aisladas. En cuanto a las secuencias analizadas de las subfracciones FCmc 10.11, 10. 12 y 10.16, muestran similitud con toxinas bloqueadoras de canales de K<sup>+</sup>, lo cual evita que la inducción de la despolarización mediada por K<sup>+</sup> [10 mM] sea lo suficientemente intensa para abrir los completamente los “clústeres”

de VGCC ubicados en la membrana plasmática y por tanto disminuyendo la entrada  $[Ca^{2+}]_i$  en la célula.

En cuanto a las secuencias obtenidas de las fracciones FCmc 10.13 y FCmc 10.14 mostraron similitud con toxinas capaces de bloquear canales de sodio y HCN (marcapasos). Así mismo, estas fracciones mostraron la capacidad de aumentar la  $[Ca^{2+}]_i$  en el modelo de células cromafines posterior a la inducción de la despolarización de la membrana mediada por  $K^+$  [10 mM] (Fig. 21). Es muy probable que la subfracción (Cmc<sub>R</sub>14.1 y 14.2) posean un mecanismo similar al propuesto para la toxina Cmt<sub>R</sub>1.1, ya que como se ha descrito anteriormente el bloqueo de Na<sub>v</sub>-TTX puede generar la liberación de catecolaminas a través de la generación de ráfagas triples o dobles de AP (Lingle 2015). Por otro lado, la secuencia analizada de la fracción FCmc 10.13, muestra similitud con toxinas bloqueadoras de HCN. Los canales HCN se encargan de regular los ritmos de secreción de neurotransmisores en neuronas y células cromafines (Yu, et al. 2004), por lo que la disminución de la disponibilidad de los canales HCN disminuye el potencial de membrana permitiendo la generación AP prolongado que promueve la liberación de catecolaminas.

Uno de los componentes más importantes del veneno de animales marinos y terrestres, son las proteasas: serín-proteasas (SP) y especialmente las metaloproteasas (MMP), ya que las primeras se han vinculado con procesos de evasión inmunológica, mientras que las segundas se asocian con la degradación de la matriz extracelular y necrosis. Estudios de transcriptómica llevados a cabo en cnidarios han demostrado la presencia de este tipo de enzimas en anemonas y medusas como: *Nematostella vectensis*, *Chironex fleckeri*, *Stomolophus meleagris* entre otros (Li, et al. 2014; Jouiaei, Casewell, et al. 2015; Moran, Prahaer, et al. 2013). Por tanto se determinó la actividad proteolítica FCmc 10-30 y FCmc >30 mediante el método de Kunitz. En la Fig. 22 se observa que ambas fracciones presentaron actividad proteolítica, sin embargo FCmc 10-30 mostró mayor actividad que FCmc >30, mientras que al agregar EDTA la actividad proteolítica de FCmc >30 disminuyó en relación a la actividad que mostró sin EDTA y FCmc10-30 no mostró cambios. Por lo tanto, MMP se encuentran en FCmc >30 mientras que SP se encuentran en FCmc10-30. Estos resultados se correlacionan con estudios realizados en el sistema gástrico de *C. xaymacana*

(filogenéticamente relacionado con *C. marsupialis*), en los cuales se ha demostrado que la actividad de serín-proteasa se eleva cuando una presa es capturada y se coloca cerca del manubrio o canales gástricos. Actualmente se ha propuesto que la actividad de serín-proteasa detectada es secretada por nematocistos o células glandulares de los canales gástricos o la phacela gástrica. Así mismo, se piensa que las proteasas son secretadas con el fin de facilitar la digestión extracelular de las presas. Por otro lado, estudios de transcriptómica han demostrado la expresión de altos niveles de metaloproteasas y serín proteasas, las cuales se relacionan con las toxinas expresadas en los tentáculos (Lewis, et al. 2016). Se sabe que en el veneno de los cnidarios, usualmente se expresan SP similares a quimotripsina así como MMP del tipo BMP (Bone morphogenic Protein 1). (Li, et al. 2014) (Jouiaei, Casewell, et al. 2015) (Moran, Prahaer, et al. 2013). Cabe resaltar que en los cnidarios las metaloproteasas normalmente utilizan  $Zn^{2+}$  y son el componente mayoritario de muchos venenos de diferentes linajes. Así mismo sea propuesto que las MP cumplen un rol dual inmovilizando a las presas y digiriéndolas (Calvete, et al. 2009). En el caso de los cnidarios se ha determinado mediante estudios de transcriptómica, que la expresión de las Zinc-metaloproteasas es mayor en las campanas que en los tentáculos de la cubo medusa modelo *C. Alata* (Bottrall, Madaras, et al.,2010). La determinación de la actividad de proteasas de las fracciones FCmc>30 y FCmc10-30 obtenidas de las campanas de *C. marsupialis* es indicativa de que los nematocistos ubicados en los canales gástricos generan toxinas y enzimas relacionadas, que permiten la incapacitación y estabilización de las presas (Larson 1976).

Finalmente se determinó la actividad citolítica del veneno de *C. marsupialis* proveniente de las campanas en células cancerosas humanas, ya que se han reportado que compuestos aislados de algunos cnidarios han presentado actividad anti-cancerígena como las pseudopterosinas (G, P, Q, S, T, U) aisladas del coral *Pseudopterogorgia acerosa* capaces de inducir la muerte celular de CCH como Hela, PC-3, HCT, MCF7 y FGH (Fenical 1987) o más recientemente a los reportes que indican que el veneno de la anemona *Heteractis magnifica* posee la capacidad de inducir la muerte celular de células cancerosas de pulmón y mama de manera dosis dependiente mediante la modulación de la progresión del ciclo

celular (Sanderson, Da Silva y Ramezanpour 2016). Así mismo las toxinas aisladas y estudiadas debido a su potencial uso como agentes anti-cancerígenos provienen de un gran número de organismos pertenecientes a diversos *phyla* y pueden ejercer su actividad antineoplásica mediante diferentes mecanismos en diferentes procesos celulares como: proliferación celular, migración, invasión, apoptosis y angiogénesis (Gomez-Lagunas, et al. 2016). En el caso de los cnidarios, la molécula ShK, es el principal referente en este tipo de actividad (Kuyucak, et al. 2012). Para determinar si algunas de las fracciones obtenidas del CmEc (FCmc>30, FCmc 10-30 y FCmc<10), poseen actividad citotóxica sobre células cancerosas humanas, se realizó un el escrutinio primario sobre diferentes líneas celulares *in vitro* y se compararon con la Mitoxantrona (agente intercalante irreversible del DNA). Cabe destacar que la única fracción que obtuvo un efecto sobre las células cancerígenas MCF-7 y HCT-15 fue FCmc<10, mientras que, tanto las fracciones FCmc 10-30 y FCmc<10 tuvieron efecto en las células control FGH. La fracción FCmc >30 no presentó actividad citotóxica en ninguna de las pruebas (Datos no mostrados).

En el caso de FCmc10-30, la actividad citotóxica se asocia con la actividad de PLA<sub>2</sub>, ya que se ha reportado que este tipo de toxinas son capaces de generar citotoxicidad a través de metabolitos secundarios generados por el metabolismo de ácidos grasos como el ácido araquidónico (leucotrienos, tromboxanos o prostaglandinas (Tonello y Rigoni 2015). La citotoxicidad mediada por PLA<sub>2</sub>, se ha relacionado con la expresión de CYP2E1 (enzima relacionada con la activación y destoxificación de xenobióticos), que es capaz de regular la proliferación y supervivencia de FGH y cuya expresión se encuentra alterada en las células cancerosas (Halownia, et al. 2014; Sánchez y Moreno 2006).

Por otro lado FCmc>30, no presentó actividad citotóxica en ninguno de los casos. Es probable que una de las principales razones por la cual no fue posible observar el efecto citotóxico sea que las hemolisinas de *C. marsupialis* reportadas en ejemplares del mediterráneo mostraron ser susceptibles a la concentración de Ca<sup>2+</sup>, por tanto la actividad citotóxica de esta fracción pudo verse enmascarada (Rottini, Gusmani, et al., 1995).

En cuanto a FCmc<10, esta fracción mostró actividad sobre HCT-15, MCF-7 y FGH, así mismo es necesario destacar que FCmc<10, es la fracción que contiene neurotoxinas, cuya

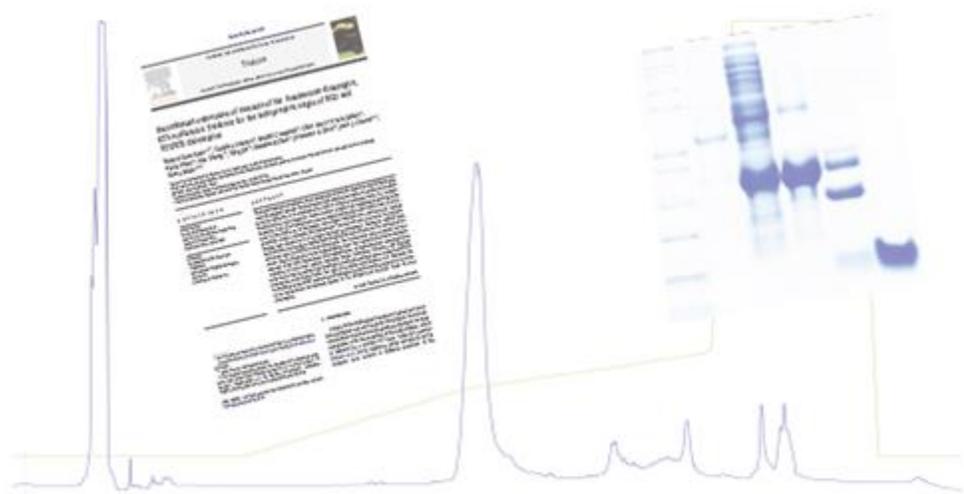
función principal es la de inmovilizar a la presa (Smith y Blumenthal 2007). Normalmente las neurotoxinas de los Cnidarios actúan modificando la abertura de los canales de sodio o bloqueando los canales de potasio durante el estadio de repolarización (Jouiaei, Casewell, et al. 2015), provocando que las células se hiperactiven, liberando grandes cantidades de neurotransmisores en las sinapsis y en las placas neuromusculares generando parálisis (Urrego, et al. 2014), por lo que podría parecer curioso que FCmc<10 presente actividad citotóxica en células cancerosas, ya que usualmente se ha relacionado a los canales iónicos y las bombas con la regulación del potencial de membrana, la homeostasis de iones y la señalización eléctrica de células excitables. Sin embargo, los canales iónicos también se encuentran relacionados con procesos celulares diversos como: la proliferación celular, migración, apoptosis, diferenciación celular, etc. (Zhang, et al. 2003; Pastor-Anglada, Felipe y Casado 1969). Por lo cual se ha sugerido que los canales iónicos están implicados en diversos procesos fisiopatológicos que contribuyen al desarrollo tumoral (Sintheimer 2008). Así mismo, el Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU. A (*NCI*) ha demostrado que diversos extractos obtenidos del veneno de diferentes cnidarios poseen actividad anti cancerígena, por lo que los venenos de organismos marinos en general y el veneno de los cnidarios en particular, representan una fuente de posibles agentes terapéuticos (Hill y Fenical 2010; Jain, Sonawane y Mandrekar 2008).

Así mismo, se han reportado evidencias experimentales que asocian la expresión y función aberrante de canales iónicos con los procesos oncológicos, por lo cual se ha propuesto que moléculas capaces de alterar el funcionamiento de estos como las neurotoxinas presentes en diferentes venenos pueden inhibir la proliferación celular, metástasis o supervivencia de células cancerosas (Fraser 2003). Por tanto el efecto citotóxico de FCmc<10 posiblemente se deba a la presencia de toxinas bloqueadoras de canales de potasio, ya que se ha relacionado el aumento de los niveles de expresión de Kv10.1 en un gran número de tumores sólidos (Borowiec, et al. 2011) y se ha relacionado a Kv10.1 con el flujo intracelular de  $Ca^{2+}$ , siendo la  $[Ca^{2+}]_i$  la señal responsable de regular procesos celulares como la supervivencia celular (Chantome, et al. 2013). Así mismo, se ha reportado que el uso de inhibidores de estos canales como: imipramina, astemizol o quinidina, reduce la proliferación y supervivencia de CCH (García-Quiroz, et al. 2014; Gavrilova-Ruch, et al. 2002), mientras que el uso de anticuerpos

monoclonales específicos a Kv10.1 reducen el crecimiento tumoral en ensayos *in vivo* (Urrego, et al. 2014).

*Quizá dijiste en silencio:  
Pretendo asir la marea,  
acariciar lo imposible.*

# V. Conclusiones



## 5.1.-Conclusiones

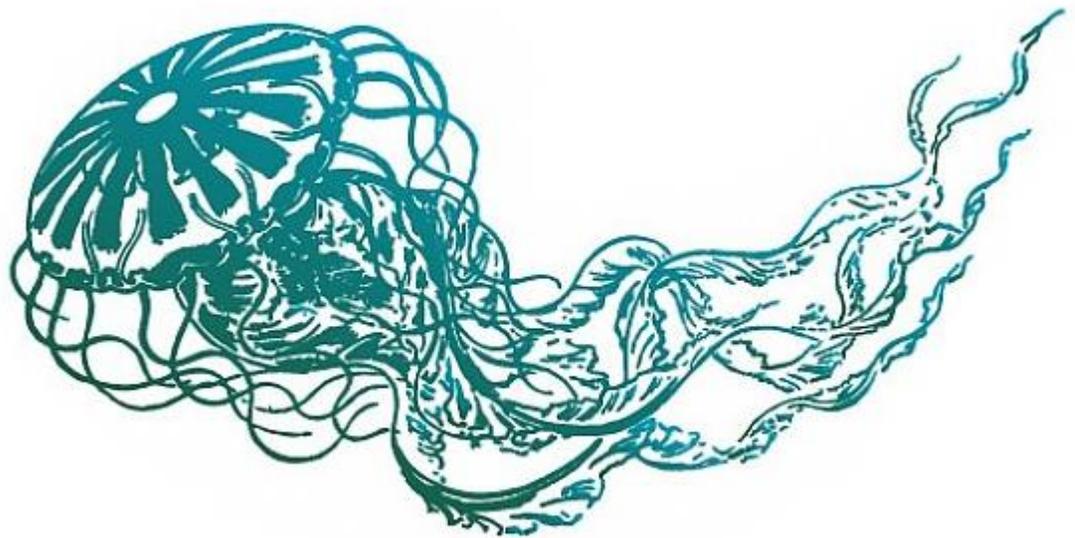
- Se determinó que la toxina Cmt<sub>R</sub>1.1 procedente del veneno de los tentáculos de *C. marsupialis* modula la  $[Ca^{2+}]_i$  en células cromafines, lo cual se ha asociado con la liberación de catecolaminas y se relaciona con algunos de los signos y síntomas reportados en víctimas que desarrollan el Síndrome de Irukandji debido a la picadura de este organismo.
- El veneno procedente de los nematocistos de las campanas de *C. marsupialis* posee actividad citotóxica y proteolítica. Lo cual es un indicativo de que los nematocistos presentes en las campanas juegan un papel importante en la digestión e inmovilización de la presa.
- La FCmc<10 posee actividad citotóxica sobre CCH y la capacidad de inhibir la  $[K^+]_i$  mediada por el canal Kv 10.1, por lo que las toxinas contenidas en esta fracción e identificadas como bloqueadores de potasio son posibles candidatos para desarrollar antineoplásicos.
- Las sub-fracciones obtenidas de FCmc<10 son capaces de modular  $[Ca^{2+}]_i$  en células cromafines y por tanto la liberación de catecolaminas. Este efecto podría relacionarse con signos y síntomas reportados en víctimas de envenenamiento debido a la picadura de este organismo y el desarrollo del Síndrome de Irukandji.

## 5.2.-Perspectivas

- Expresión heteróloga de las toxinas secuenciadas e identificadas como neurotoxinas
- Realizar ensayos electrofisiológicos sobre canales específicos (Patch-clamp), con el fin de determinar la afinidad de las toxinas a diferentes canales, así como la obtención de curvas dosis-respuesta (Cmt<sub>R</sub>1.1 y Cmc<sub>R</sub> 14.1 en canales Na-TTx; Cmc<sub>R</sub> 11.2, Cmc<sub>R</sub> 12.2, Cmc<sub>R</sub> 17.1 en canales K<sup>+</sup> y Cmc<sub>R</sub> 10.1, Cmc<sub>R</sub> 11.1 y Cmc<sub>R</sub> 12.1 en canales VGCC)
- Obtener el transcriptoma de los cnidocistos presentes en los tentáculos y campanas.
- Realizar estudios de venómica para comparar la expresión diferencial de toxinas entre ambos tejidos.
- Aislar y caracterizar las toxinas con actividad enzimática presentes en el veneno de las campanas (Proteasas y Fosfolipasas A<sub>2</sub>).
- Realizar estudios bioinformáticos de acoplamiento molecular para predecir el mecanismo de acción de las toxinas aisladas y corroborar de ser posible con datos cristalográficos.

*Nunca lo harás: las medusas  
no son de nadie celestial o terrestre.  
Son de la mar que no es ni mujer ni prójimo*

## VI.-Corolario



Como se ha mencionado a lo largo del texto, el Síndrome de Irukandji es un síndrome potencialmente letal que se ha atribuido a la picadura de diversas cubo medusas (K. Winkel, et al. 2005). El cual se compone de tres signos consistentes: (i) dolor agudo; (ii) efectos similares a la hiper-catecolanemia; (iii) complicaciones tardías relacionadas con la descompensación cardio-muscular (Fenner y Lippmann 2009)). Cabe destacar que de las manifestaciones clínicas recabadas, los efectos simpáticos dominan los síntomas causados por el envenenamiento por picaduras de cubomedusas y son consistentes con los efectos generados por la liberación de noradrenalina debidos a afecciones que afectan las glándulas suprarrenales como los Feocromocitomas (Nicholson y Graudins 2002; Brunnet, et al. 1998)

En el presente trabajo se determinó que el veneno procedente de los nematocistos de los tentáculos de *C. marsupialis* posee actividad neurotóxica y que la toxina Cm<sub>TR</sub>1.1 estimula la liberación de catecolaminas en células cromafines. Así mismo se identificaron a las toxinas Cm<sub>CR</sub> 13.1 y Cm<sub>CR</sub> 14.1 provenientes del veneno de los nematocistos de las campanas de *C. marsupialis*, como toxinas capaces de generar el mismo efecto que Cm<sub>TR</sub>1.1, lo cual podría explicar los signos y síntomas reportados en víctimas de envenenamiento debido a la picadura de este organismo.

Por otro lado, los resultados obtenidos sugieren que la liberación de noradrenalina inducida por las toxinas identificadas se debe a la interacción de estas con los canales de Sodio dependientes de voltaje sensibles a tetradotoxina, ya que se ha relacionado el bloqueo de estos canales con la liberación exacerbada de catecolaminas por parte de las células cromafines en modelo murino (Craviso, et al. 2010)

Un hecho remarcable, es que los signos y síntomas de Síndrome de Irukandji presentan cierta similitud con los efectos clínicos del envenenamiento producido por toxinas de escorpiones y arañas, lo cual sugiere la existencia de sitios comunes de interacción entre las toxinas identificadas y las toxinas aisladas de otros organismos con los canales de sodio dependientes de voltaje. Por lo cual el mapeo comparativo entre la estructura de las toxinas aisladas y otras con acciones similares resultarían invaluable para el entendimiento del mecanismo de acción de las toxinas identificadas en los tentáculos y campana de *Carybdea marsupialis*.

Bajo este argumento, se esperaría que existiera cierta similitud en la secuencia de las toxinas identificadas respecto a toxinas bloqueadoras de canales de sodio como la Hexatoxia, la Hainantoxina o la Theraphotoxina, sin embargo la estructura primaria de las toxinas identificadas no muestran similitud con las toxinas antes mencionadas, lo cual pareciese sorprendente, sin embargo si se toma en cuenta el patrón de las cisteínas presentes en las toxinas identificadas mediante el análisis Psi-BLAST se puede encontrar cierta similitud. Este hecho se ha reportado en gran medida en las toxinas de diversos organismos en diferentes niveles taxonómicos y ha representado un desafío para su identificación, ya que de manera general, las toxinas peptídicas por definición tienen muy pocos aminoácidos para poder inferir un ancestro común y a diferencia de las proteínas globulares que dependen de su núcleo hidrofóbico para mantener su integridad estructural y funcional, las toxinas peptídicas presentan un número variable de mutaciones que debido a su tamaño y solubilidad no interfieren con su estructura y función (Li, et al. 2013). Por tanto a pesar de la acumulación de mutaciones durante la evolución de las toxinas peptídicas, aminoácidos especialmente importantes como las cisteínas tienen a ser altamente conservados y su delección o inserción representa un patrón estructural nuevo, que dificulta la identificación de estas toxinas ya que el alineamiento equivoco de las cisteínas en un análisis de alineamiento de secuencias produce resultados erróneos.

Las toxinas identificadas (Cmt<sub>R</sub>1.1, y Cmc<sub>R</sub> 14.1), presentan un patrón de cisteínas similar a las toxinas Hexatonia, la Hainantoxina o la Theraphotoxina, sin embargo la similitud del patrón no es total, lo cual se ha visto en otro tipo de toxinas (Holm y Rosentrom 2010), ya que incluso este tipo de aminoácidos pueden encontrarse mutados en una secuencia, por lo cual la determinación de la estructura terciaria de las toxinas identificadas es indispensable, ya que a pesar de la hipermutabilidad de los residuos de las toxinas peptídicas, la estructura terciaria de estas parece mantenerse intacta, de tal manera que la comparación de estructuras tridimensionales entre las toxinas identificadas y toxinas similares tanto estructuralmente o funcionalmente permitiría reconocer casos de evolución convergente entre toxinas y sus posibles sitios comunes de interacción con sus blancos moleculares respectivos.

*Son peces de la nada, plantas del viento,  
quizá espejismos,*

## VII.-Anexo

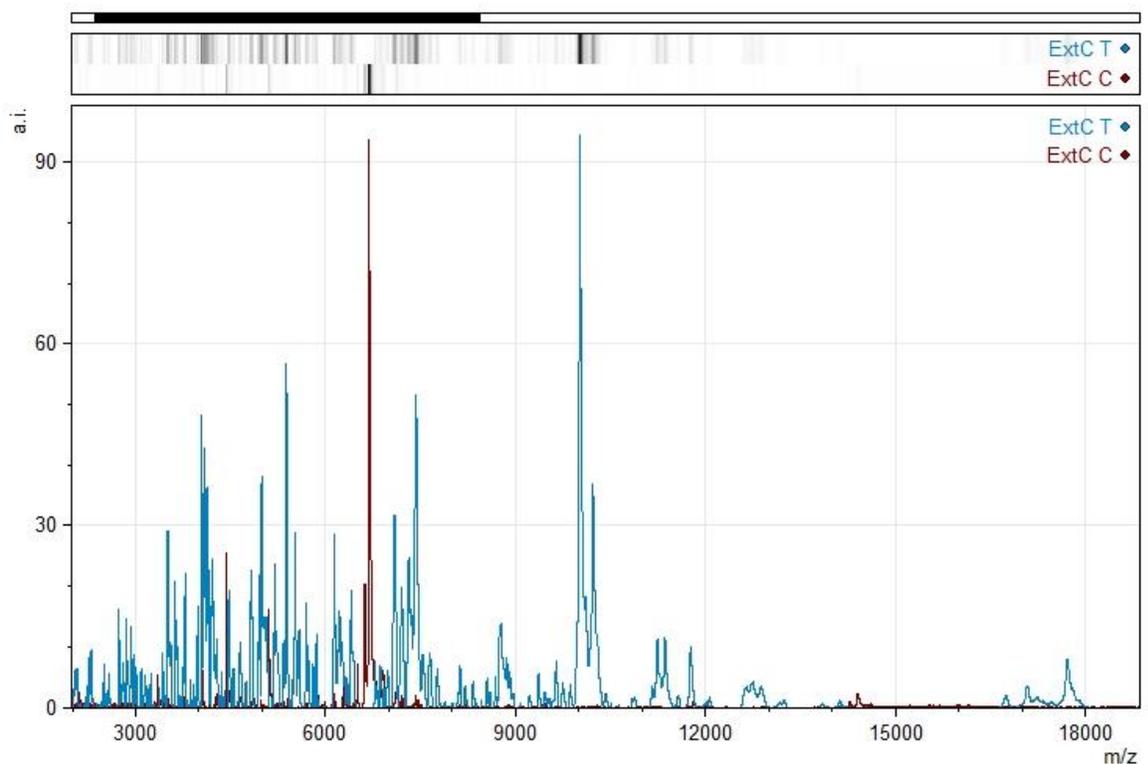


Concentración de proteínas y rendimiento						
	Tentáculos			Campanas		
	Peso (g)	Rendimiento	[mg/mL]*	Peso (g)	Rendimiento	[mg/mL]*
<b>Peso Húmedo</b>	2.612	100,00		8.942	100,00	
<b>Liofilizado</b>	0.110	3,88	0,15	0.114	1,27	0,18
<b>Fracciones total*</b>	0.034	1,29		0.093	1,04	

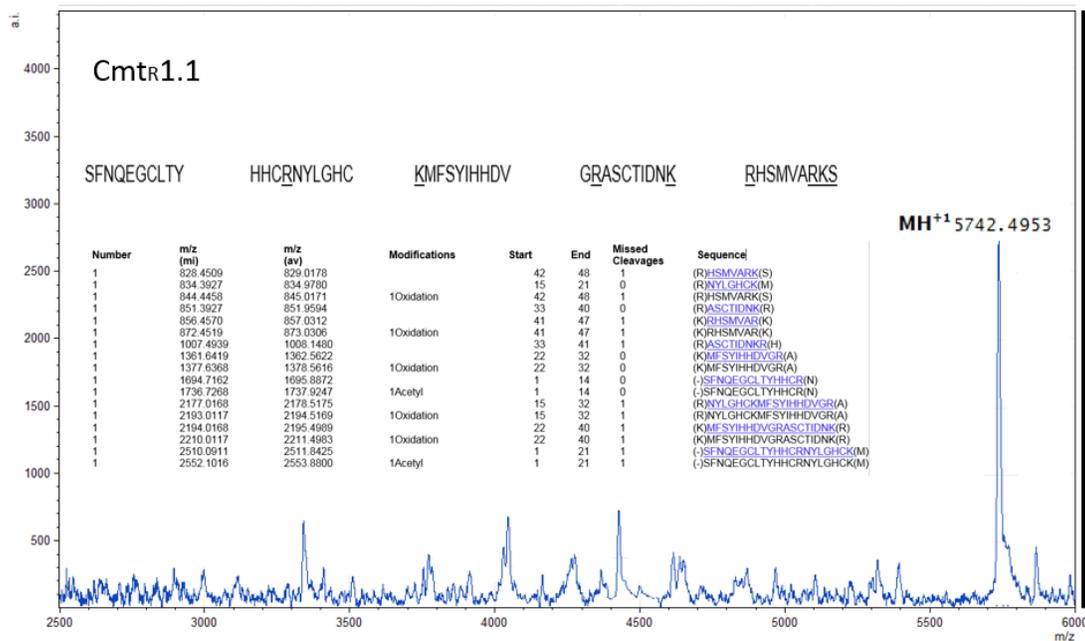
  

Fracción	Liofilizado (mg)	Rendimiento	[mg/mL]*	Liofilizado (mg)	Rendimiento	[mg/mL]*
<b>&gt;30 kDa</b>	15.90	46,76	2,94	37.80	40.64	7,48
<b>10-30 kDa</b>	1.31	4.74	0.24	2,94	3.16	0,10
<b>&lt;10 kDa</b>	16.49	48,50	3.05	51.02	54.86	10,08

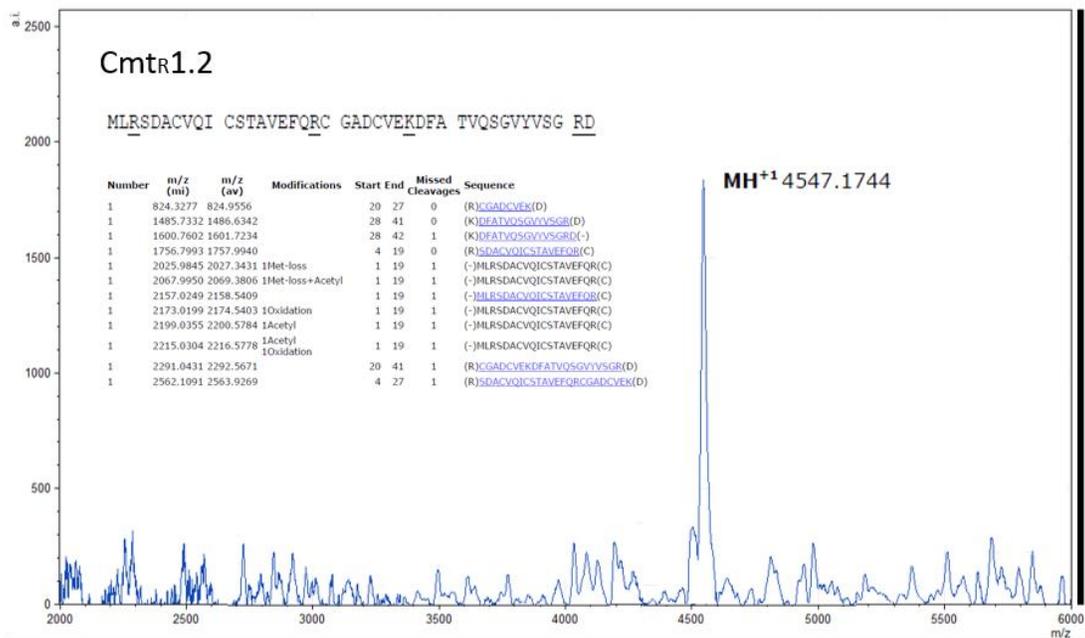
Anexo 1 Concentración y rendimiento de las fracciones obtenidas mediante el sistema Amicon para el veneno obtenido de los tentáculos y las campanas. (\*) Concentración de proteína obtenida antes y después del proceso de pre-purificación.



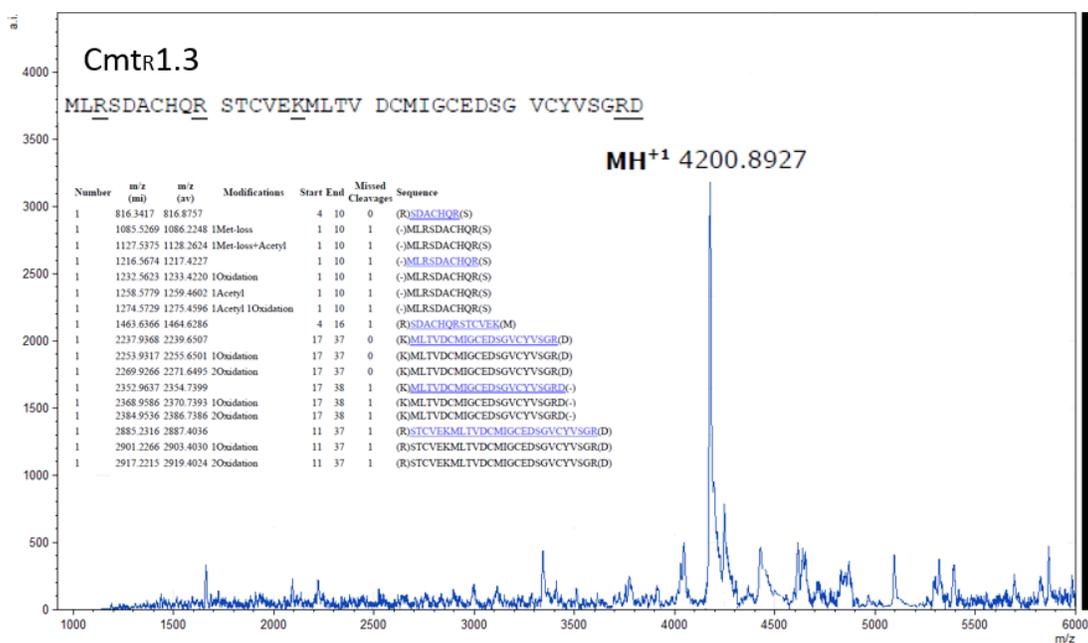
Anexo 2 Comparación de los “Mass fingerprint” del extracto crudo obtenido del veneno proveniente de los tentáculos (**CmEt: azul**) y de las campanas (**CmEc: rojo**) de la cubomedusa *Carybdea marsupialis*. (r.int.: intensidad relativa; %: normalizada). Se muestra el peso molecular de los péptidos y proteínas cargados  $[M+H]^+$  con una relación señal/ruido  $>2$ .



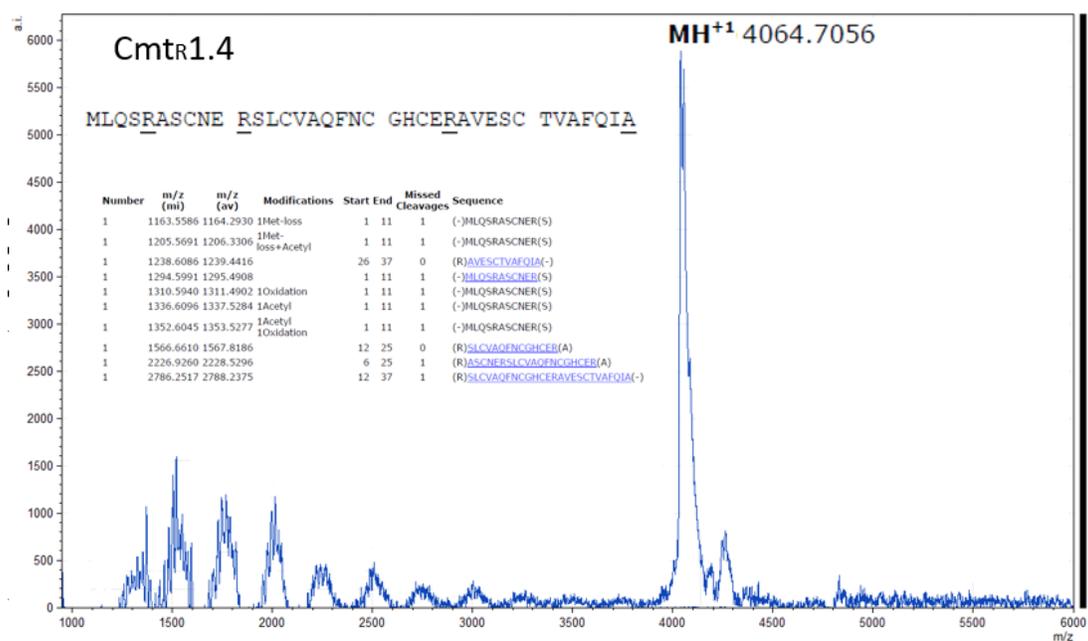
Anexo 3.1 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción Cmtr1.1 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmtr1.1 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmtr1.1 PME: 5741.4953 Da



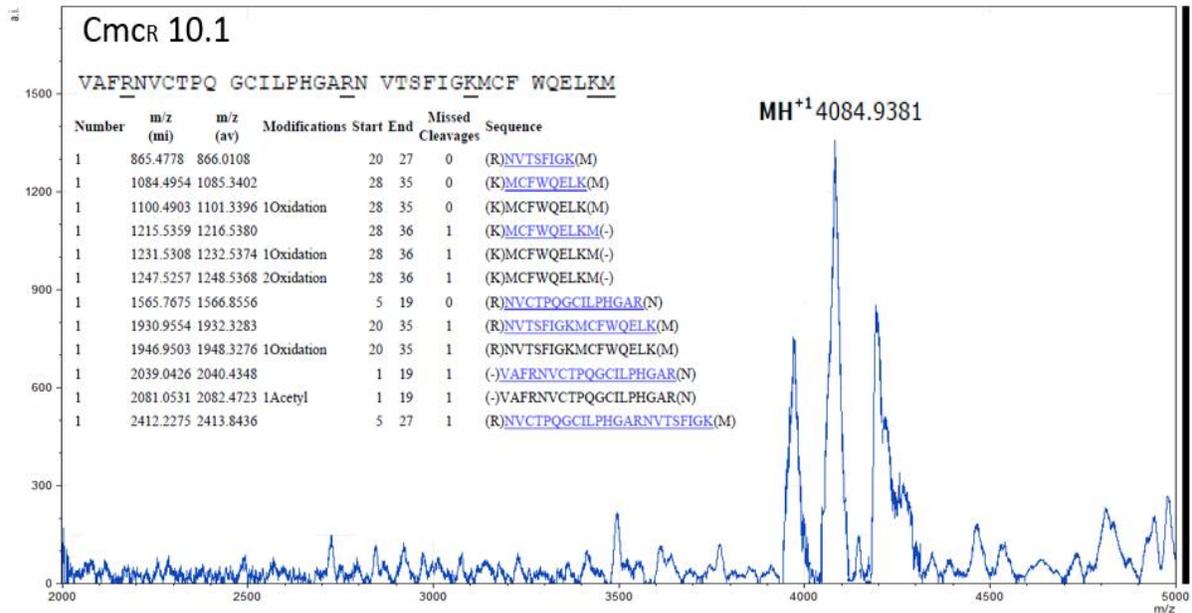
Anexo 3.2 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción Cmtr1.2 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmtr1.2 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmtr1.2 PME: 4546.1744 Da.



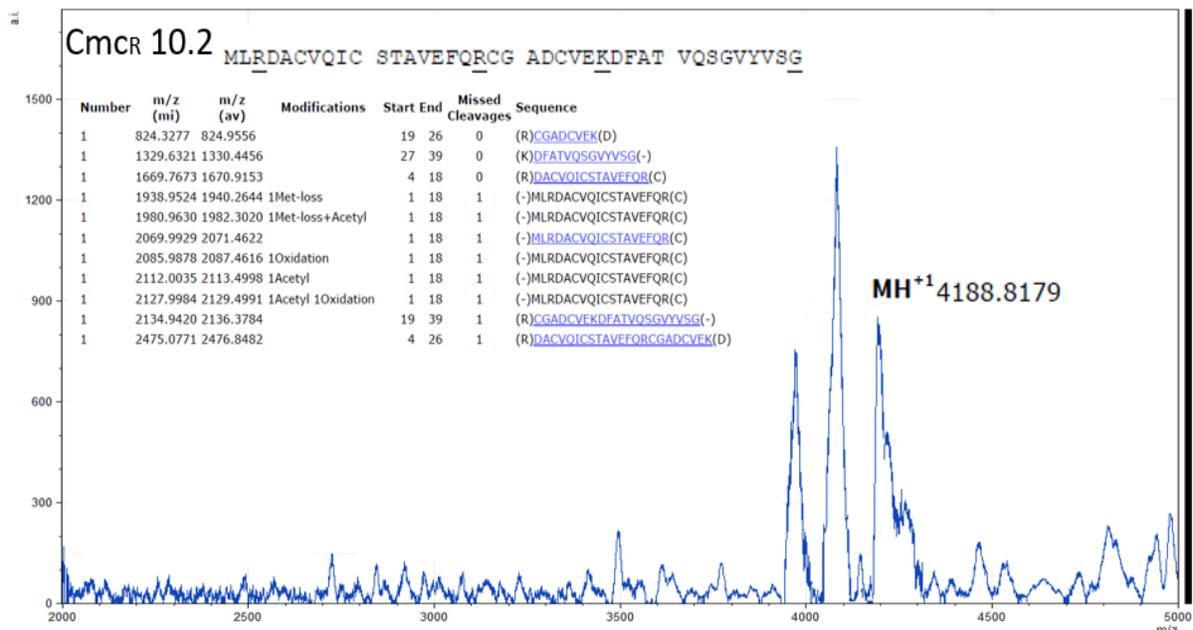
Anexo 3.3 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción Cmtr1.3 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmtr1.3 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmtr1.3 PM<sub>E</sub>: 4199.8927 Da



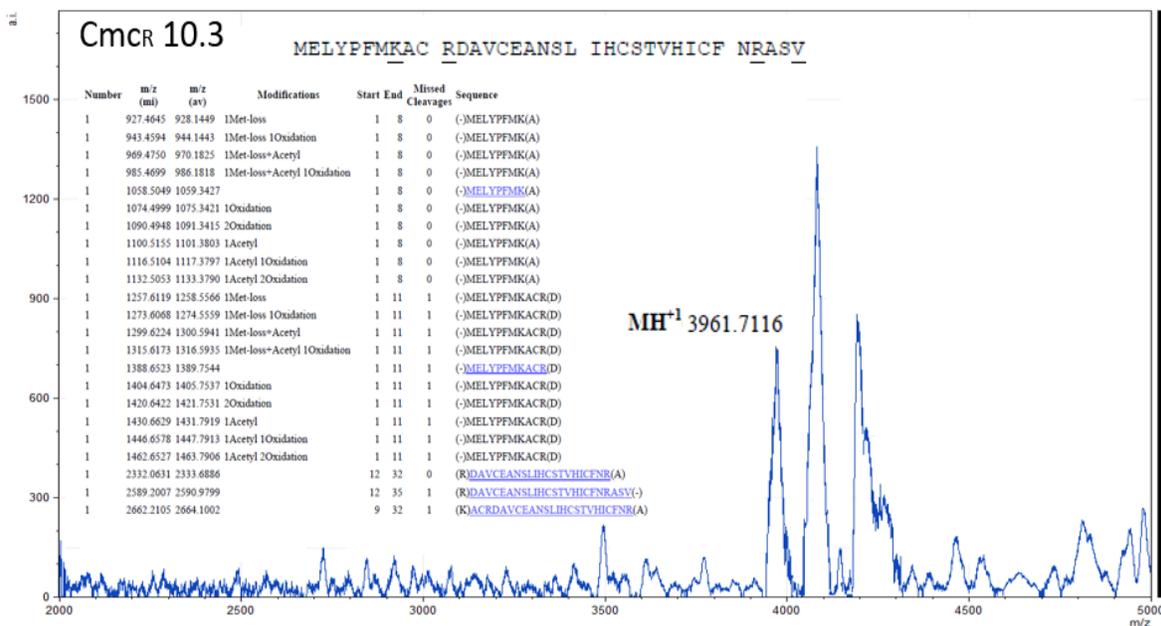
Anexo 3.4 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción Cmtr1.3 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmtr1.3 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmtr1.3 PM<sub>E</sub>: 4063.7056 Da.



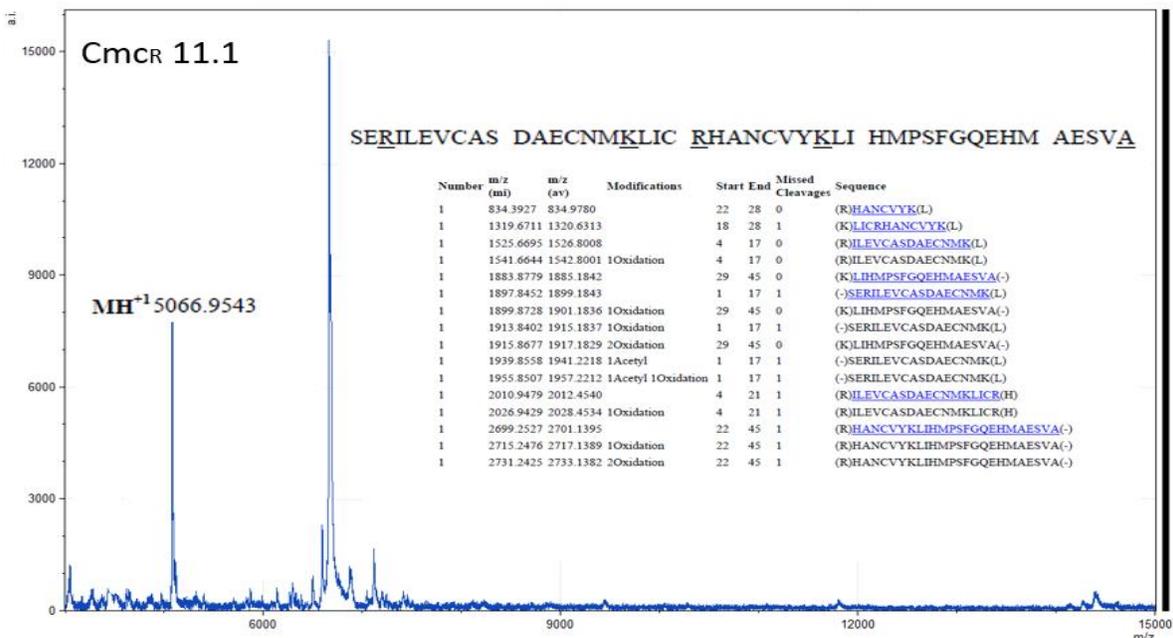
Anexo 4.1 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.10 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmcr10.1 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmcr10.1 PM: 4083.9381 Da.



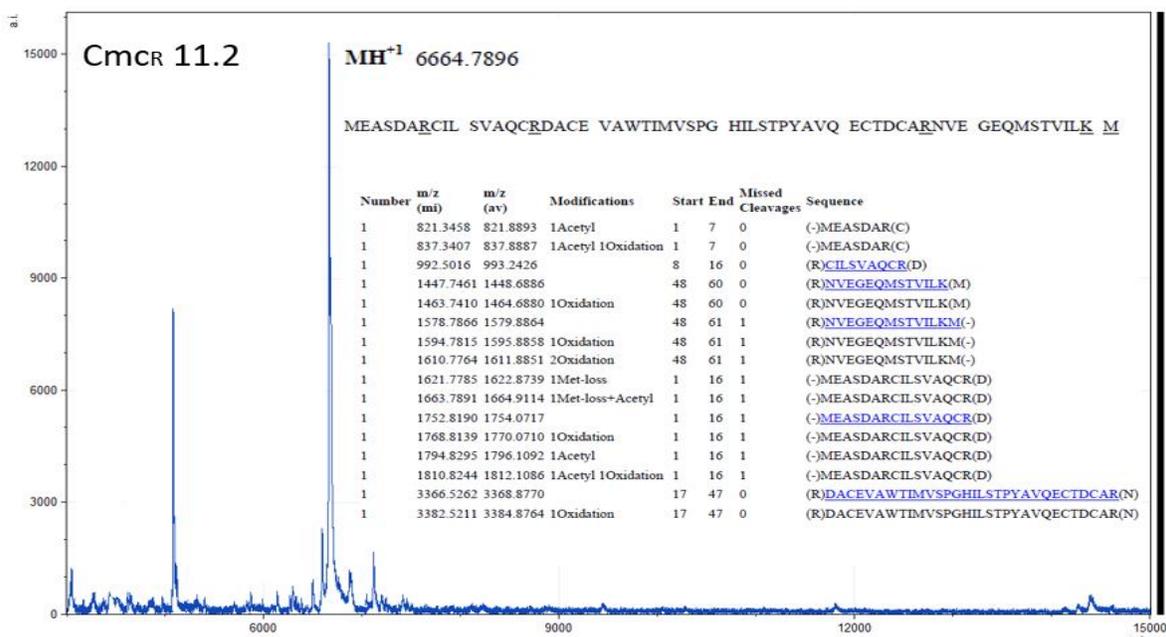
Anexo 4.2 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.10 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmcr10.2 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmcr10.2 PM: 4188.8179 Da.



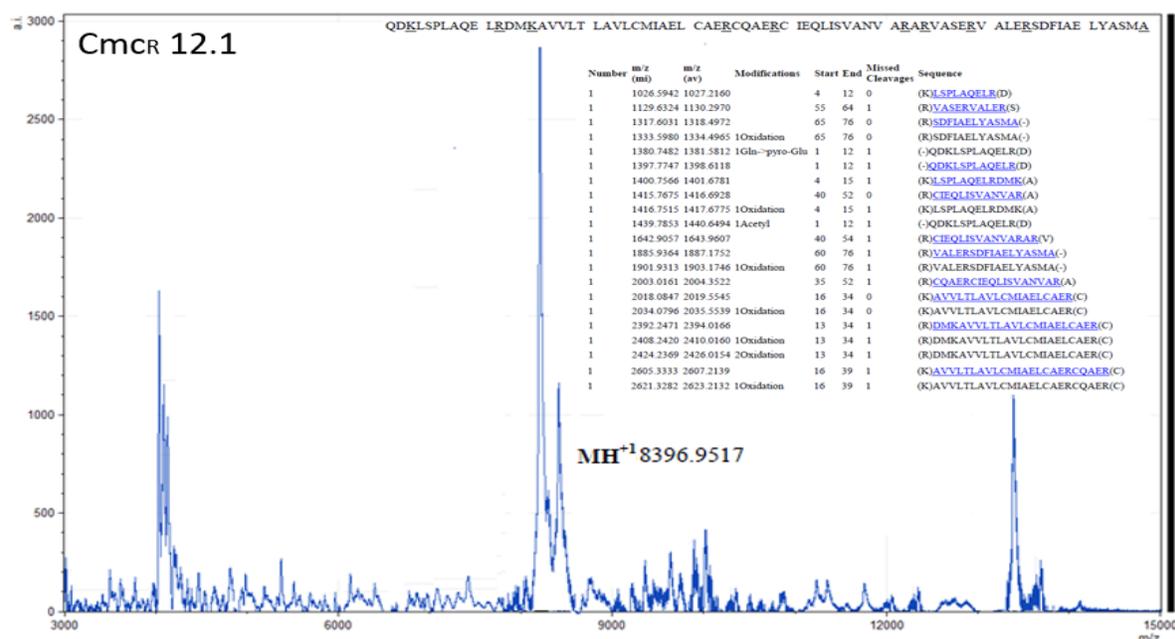
Anexo 4.3 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.10 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmc<sub>R</sub>10.3 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmc<sub>R</sub>10.3 PM: 3961.7116 Da.



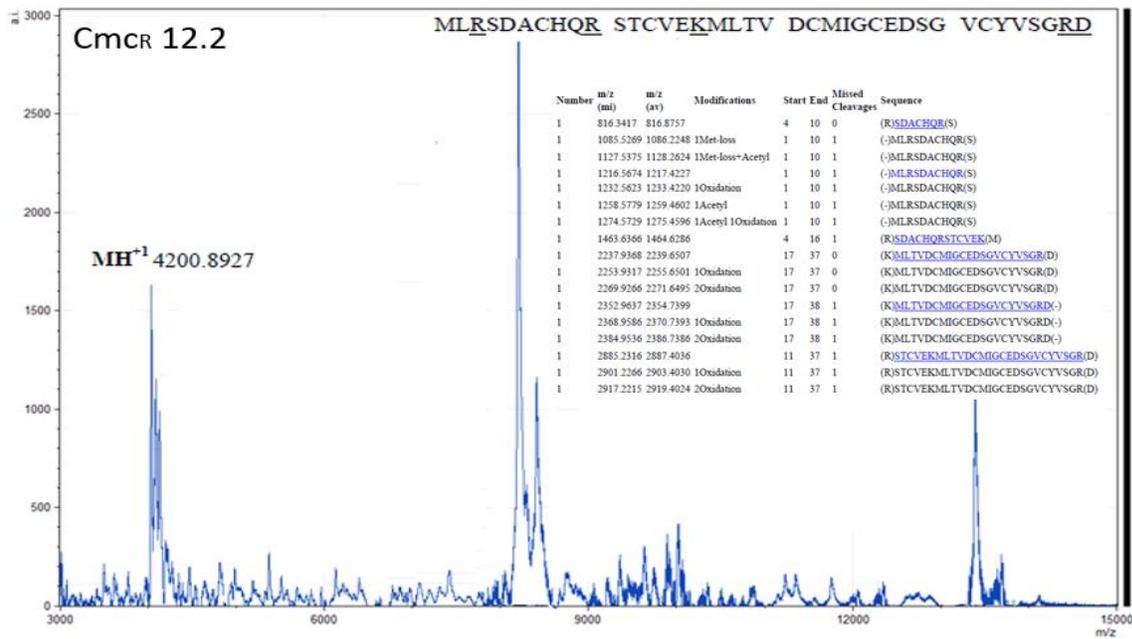
Anexo 4.4 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.11 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmc<sub>R</sub>11.1 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmc<sub>R</sub>11.1 PM: 5065.9543 Da.



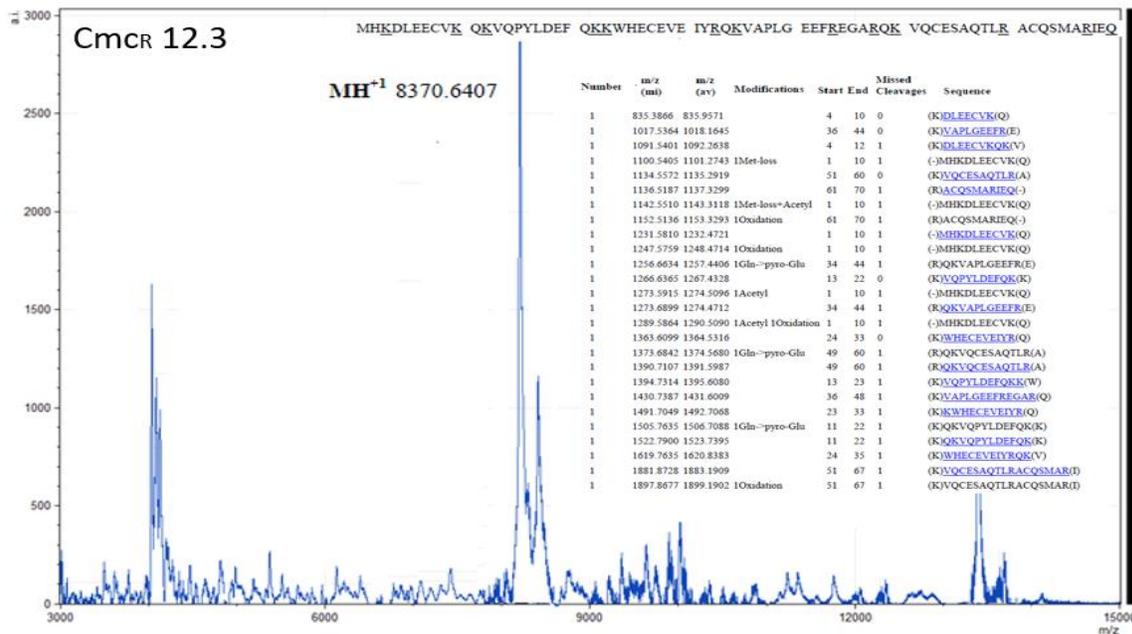
Anexo 4.5 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.11 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmc<sub>R</sub>11.2 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmc<sub>R</sub>11.2 PM: 6663.7896 Da.



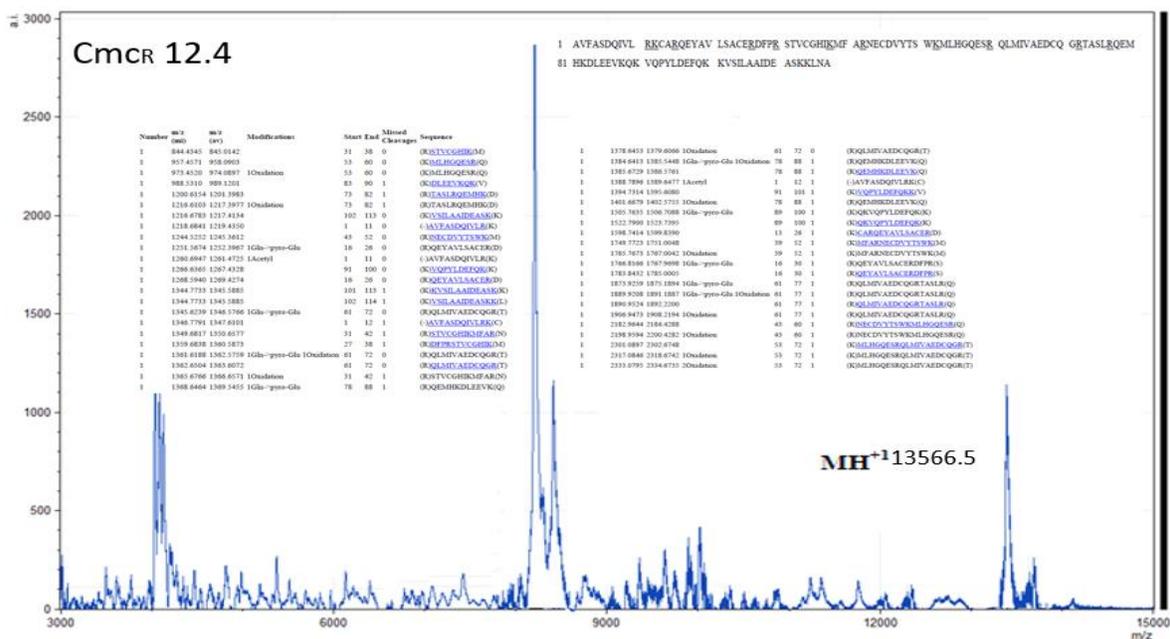
Anexo 4.6 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.12 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmc<sub>R</sub>12.1 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmc<sub>R</sub>12.1 PM: 8395.9517 Da.



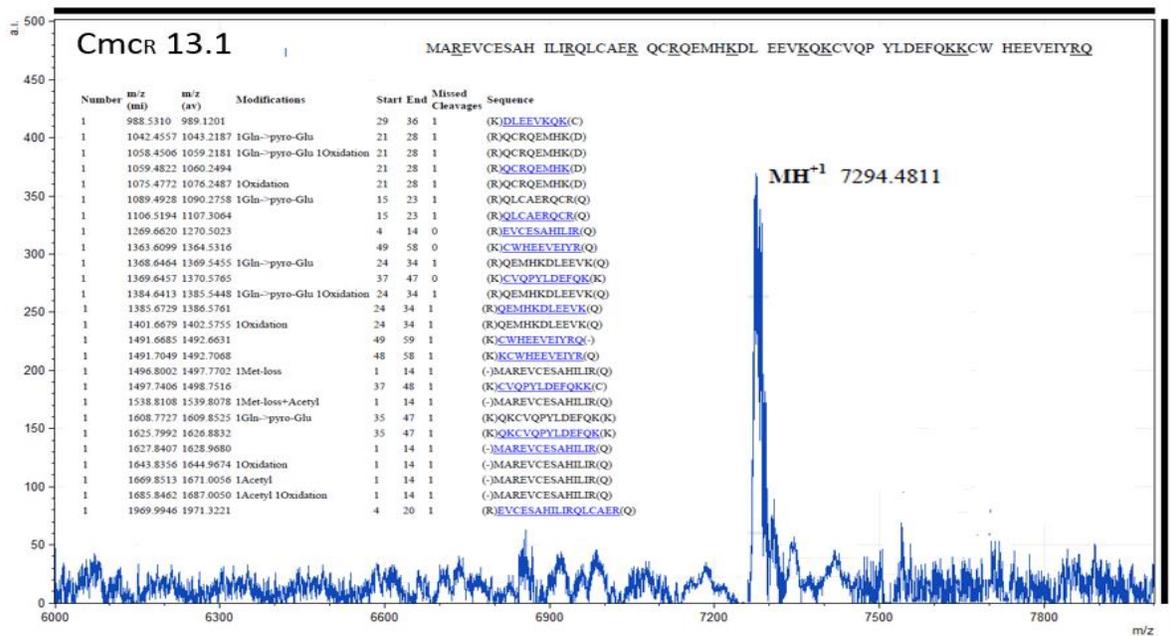
Anexo 4.7 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.12 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de CmcR12.2  $[M+H]^+$  con una relación señal/ruido  $>2$ . Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de CmcR12.2 PM: 4199.8927 Da.



Anexo 4.8 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.12 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de CmcR12.3  $[M+H]^+$  con una relación señal/ruido  $>2$ . Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de CmcR12.3 PM: 8369.6407 Da.

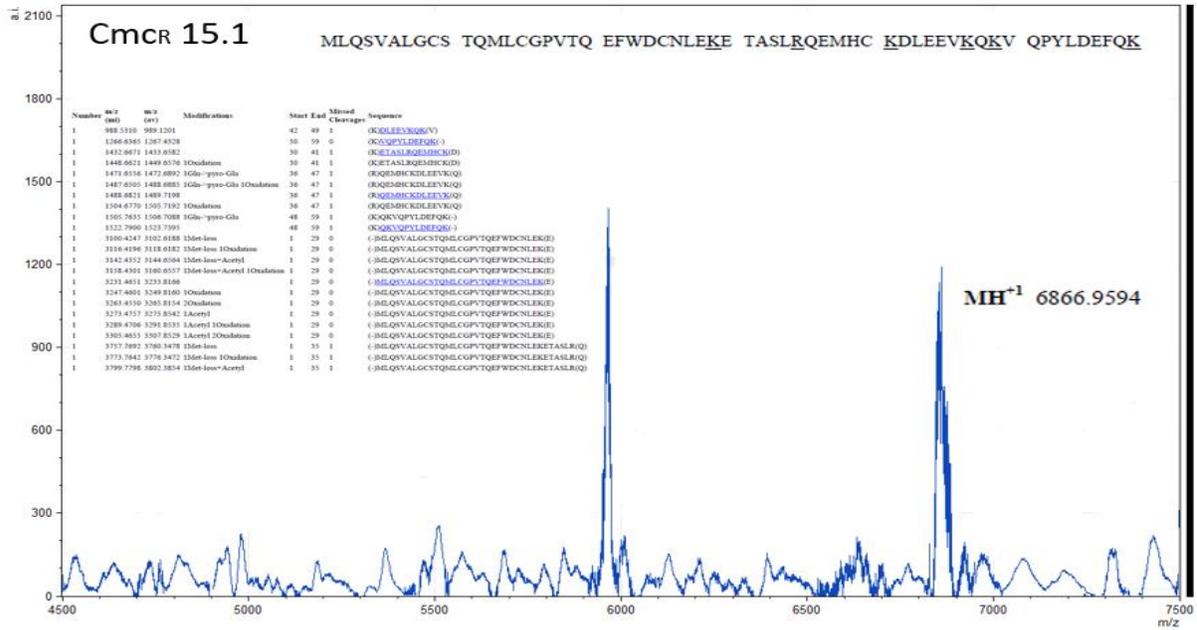


Anexo 4.9 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.12 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmc<sub>R</sub>12.3 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmc<sub>R</sub>12.3 PM: 13265.5754Da.

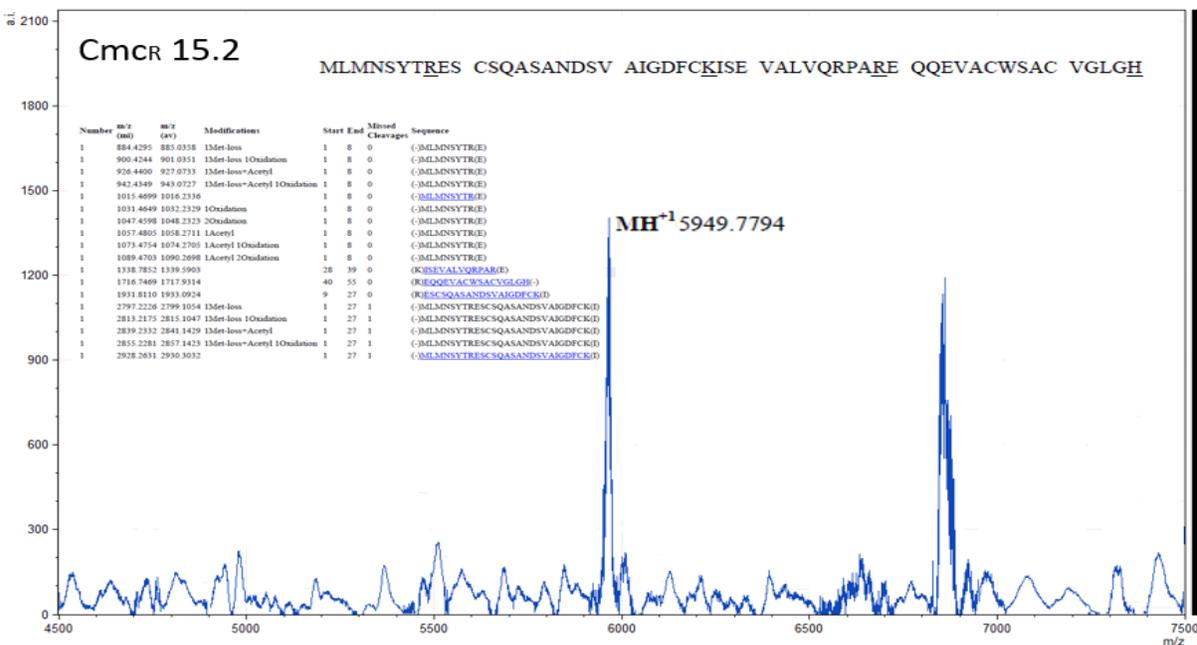


Anexo 4.10 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.13 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmc<sub>R</sub> 13.1 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmc<sub>R</sub> 13.1 PM: 7293.4811Da.

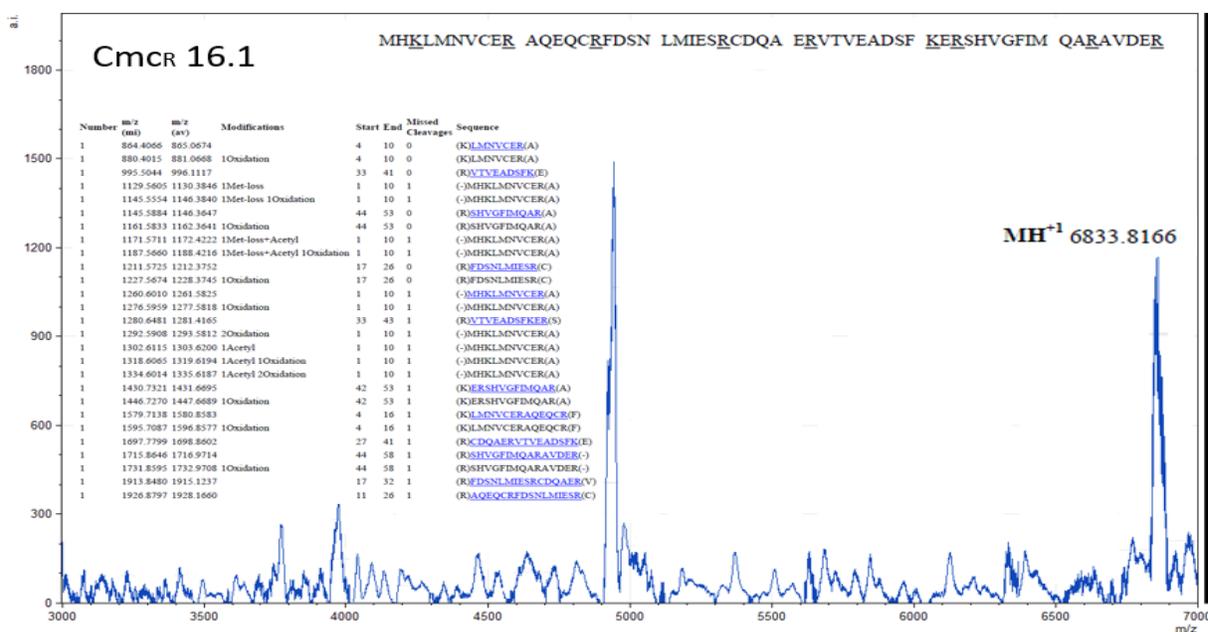




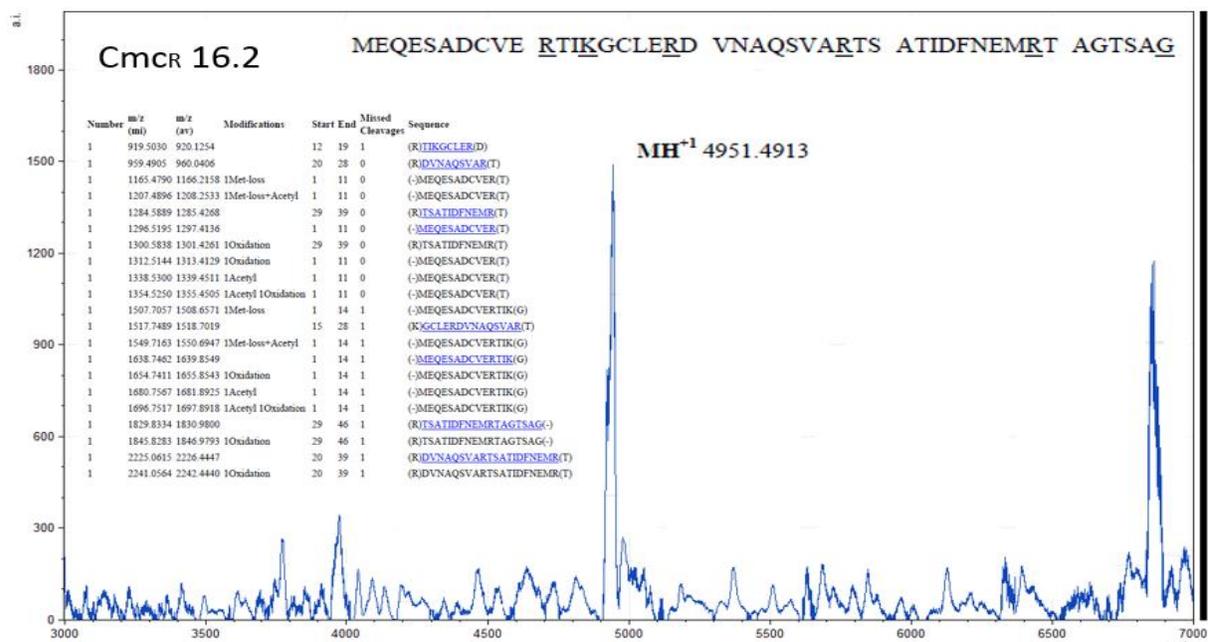
Anexo 4.13 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.15 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmcr 15.1  $[M+H]^+$  con una relación señal/ruido  $>2$ . Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmcr 15.1 PM: 6865.9594 Da.



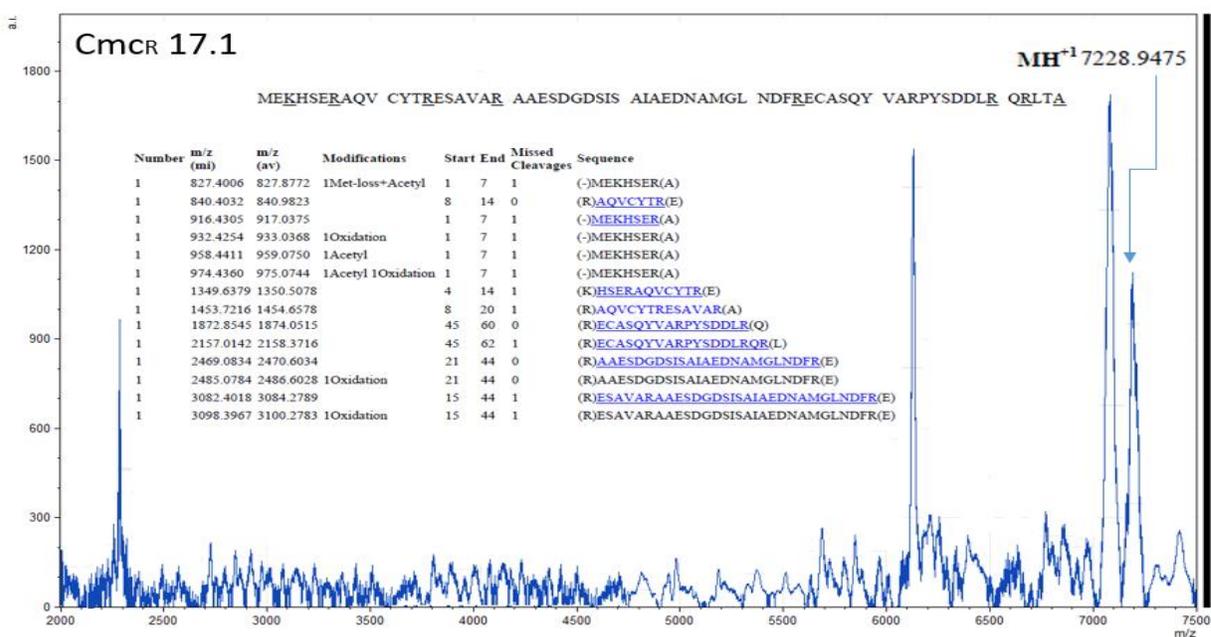
Anexo 4.14 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.15 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmcr 15.2  $[M+H]^+$  con una relación señal/ruido  $>2$ . Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmcr 15.2 PM: 5948.7794 Da.



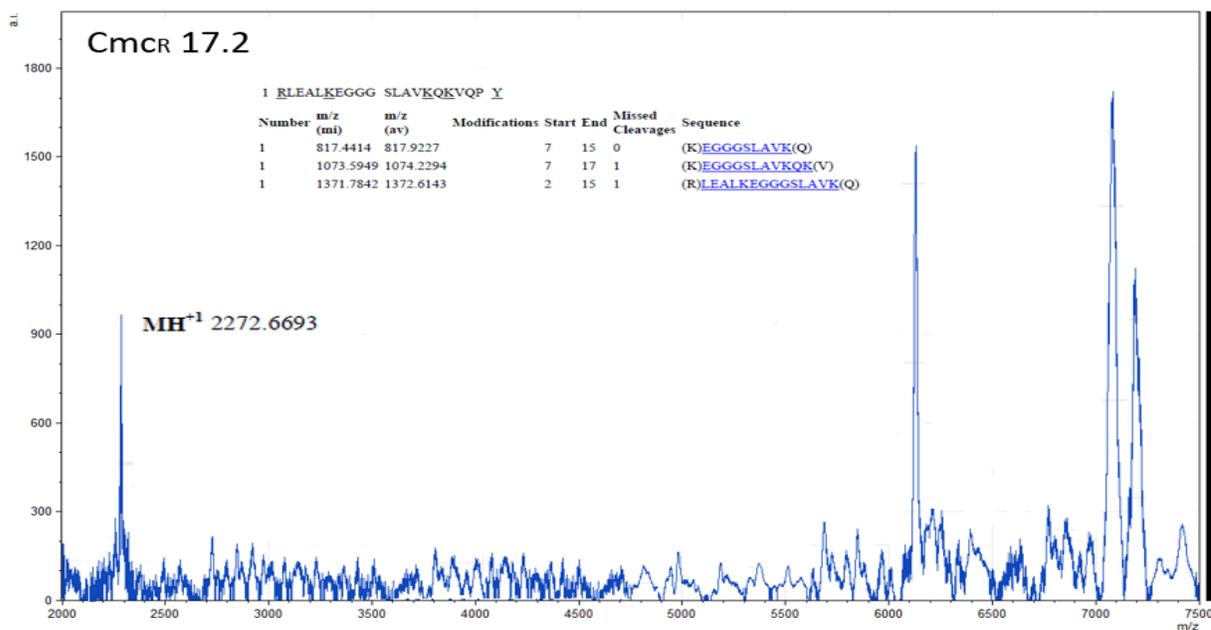
Anexo 4.15 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.16 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmc<sub>R</sub> 16.1 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmc<sub>R</sub> 16.1 PM: 6832.8166 Da.



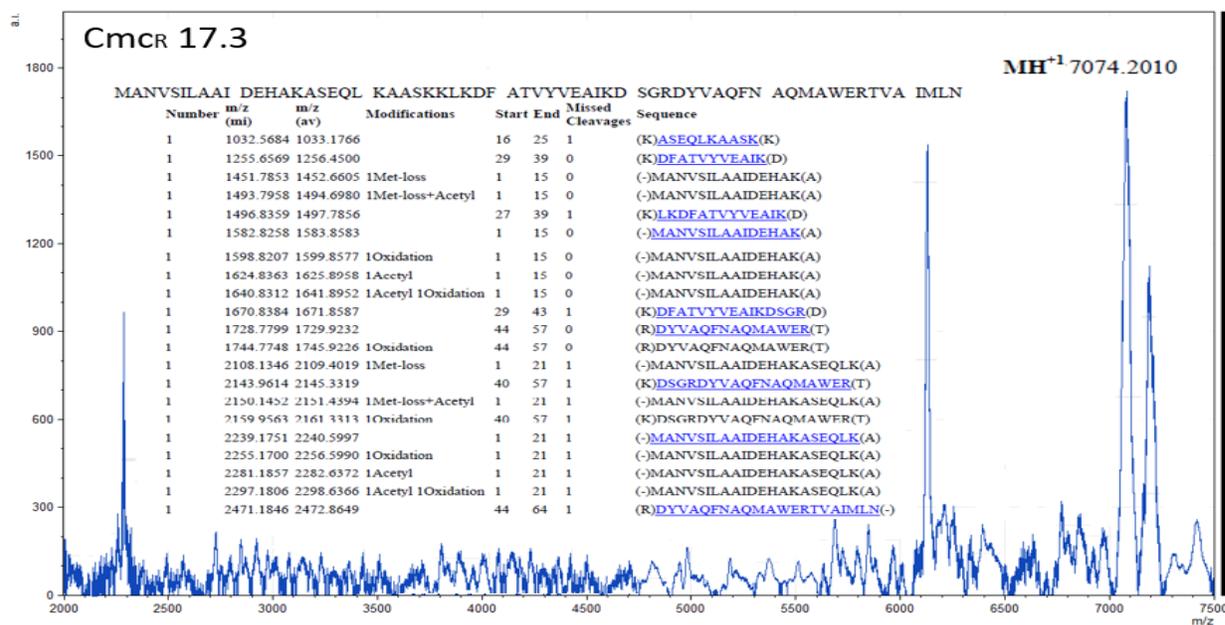
Anexo 4.16 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.16 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmc<sub>R</sub> 16.2 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmc<sub>R</sub> 16.2 PM: 4950.4913 Da.



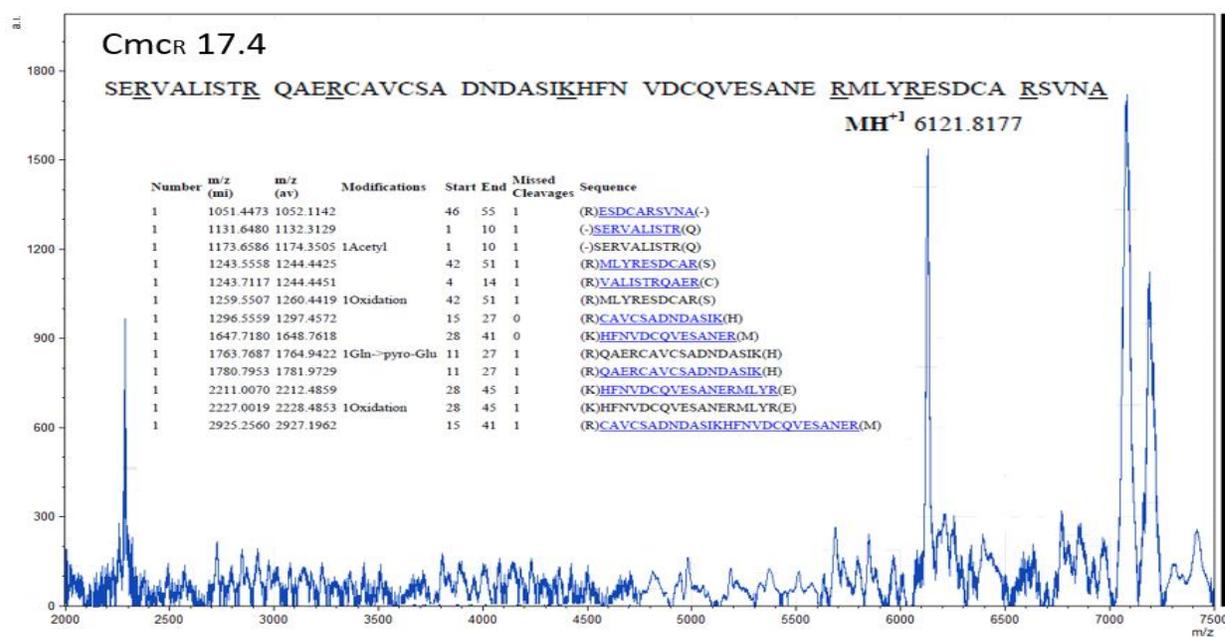
Anexo 4.17 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.17 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmcr 17.1 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmcr 17.1 PM: 7227.9475 Da.



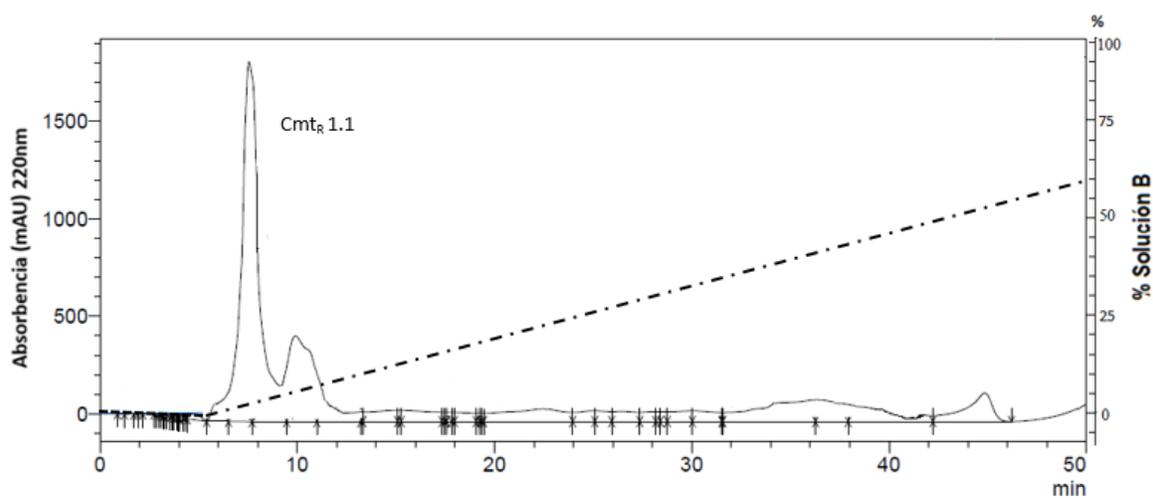
Anexo 4.18 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.17 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmcr 17.2 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmcr 17.2 PM: 2271.6693Da.



Anexo 4.19 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.17 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmcr 17.3 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmcr 17.3 PM: 7073.2010Da.



Anexo 4.20 Espectro de masas MALDI-TOF de la sub-fracción FCmc 10.17 (r.int.: intensidad relativa). Se muestra el peso molecular de Cmcr 17.4 [M+H]<sup>+</sup> con una relación señal/ruido >2. Se muestran los fragmentos secuenciados y la secuencia ensamblada de Cmcr 17.4 PM: 6120.8177 Da.

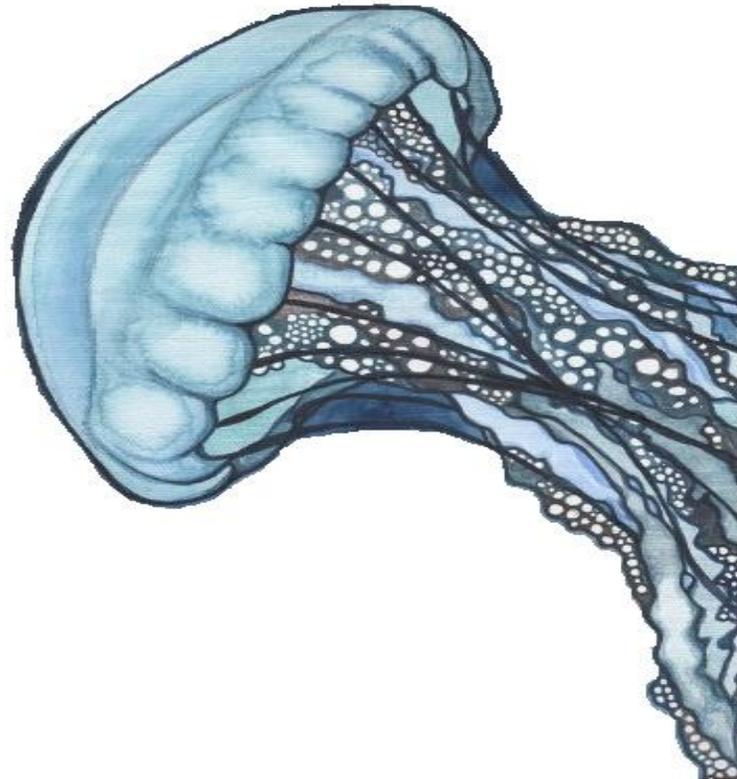


Anexo 7 Cromatograma (Cromatografía de fase reversa-220 nm) de la fracción Cmt<sub>R</sub>1.1 sintetizado. Flujo 1mL/min. Agua: acetonitrilo. Columna Purospher C-18 HPLC 250 x 4.6 mm (5 $\mu$ m).

*gasas de espuma ponzoñosa*  
*En Veraacruz las llaman aguas malas.*

*Las flores del mar, José Emilio Pacheco*

## VIII.-Bibliografía



- Acevedo, MJ, et al. "Maintenance, feeding and growth of *Carybdea marsupialis* (Cnidaria: Cubozoa) in growth of *Carybdea marsupialis* (Cnidaria: Cubozoa) in the laboratory." *J Exp Mar Bio Ecol*, 2013.: 439:84–91.
- Al-Sabi, A, McArthur, J et. al. «Marine Toxins that target voltage-gated sodium channels.» *Marine Drugs*, 2006: 4:157-192.
- Altschul, S. Madden, T. Schäffer, A. Zhang, J. Zhang, Z. Miller, W. Lipman, D. «Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.» *Nucleic Acids Research*, 1997: 25 (17), 3389–3402.
- Altschul, SF, TL Madden, AA Schaffer, J Zhang, Z Zhang, and W Miller. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.*, 1997: 25(17):3389–402.
- Andreev, Y, et al. "Analgesic compound from sea anemone *heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of a vallinoid receptor 1 (TRPV1)." *J. Biol. Chem.*, 2008: 283, 23914-23921.
- Ávila-Soria G. «Molecular Characterisation of *Carukia barnesi* and *Malo Kingi*, cnidaria: Cubozoa, Carybdeidae.» *PhD Thesis James Cook University*, 2009.
- Ávila-Soria, G. «Molecular Characterisation of *Carukia barnesi* and *Malo Kingi*, cnidaria: Cubozoa, Carybdeidae.» *PhD Thesis James Cook University*, 2009.
- Ayed, Y, R Sghaier, D Laouini, and H Bacha. "Evaluation of anti-proliferative and anti-inflammatory activities of *Pelagia noctiluca* venom in Lipopolysaccharide/Interferon- $\gamma$  stimulated RAW264.7 macrophages." *Biomed Pharmacother.*, 2016: 753-3322(16)30916-7.
- Badré S. «Bioactive toxins from stinging jellyfish.» *Toxicon*, 2014: 91, 114-125.
- Baguley, J. «The excitatory:inhibitory ratio model: An integrative explanation of acute autonomic overactivity syndromes.» *Medical Hypotheses*, 2008: 70:26-35.
- Bahareh, M, J Shahla, D Shahbazzadehc, and K Pooshang. "The first report on coagulation and phospholipase A2 activities of Persian Gulf lionfish, *Pterois russelli*, an Iranian venomous fish." *Toxicon*, 2016: 113, 25-31.
- Balázs, R, OS Jørgensen, y N Hack. «N-methyl-d-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture.» *Neuroscience*, 1988: 27(2). 437–451.
- Baley, P. Little, M. Jelinek, G. Wilce, J. «Jellyfish envenoming syndromes: unknown toxic mechanisms and unproved therapies.» *Bites and stings*, 2003: 178:34-37.
- Barnes, J.H. «Cause and effects of Irukandji stings.» *Medical Journal of Australia*, 1964: 897–904.
- Beiley, PM, AJ Bakker, JE Seymour, and JA Wilce. "A functional comparison of the venom of three Australian jellyfish-*Chironex fleckeri*, *Chiropsalmus* sp y *Carybdea xamacana*-on cytosolic Ca<sup>2+</sup>, hemolysis and *Artemia* sp. lethally." *Toxicon*, 2005: 45, 233-242.
- Bentlage, B, P Cartwright, A Yanagihara, C Lewis, G Richards, and A Collins. "Evolution of box jellyfish cnidaria:Cubozoa), a group of highly toxic invertebrates." *proc. R. soc. B*, 2010: 277:493-501.
- Bernheimer, AW, Rudy. B. «Interactions between membranes and cytolytic peptides.» *Biochem Biophys*, 1986: 846.123-141.
- Bethesda, MD. «Entrez Help [Internet].» *National Center for Biotechnology Information (US)*. 2005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3836/> (último acceso: 2016).
- Bordehore, C, S Nogué, J Gili, M Acevedo, and V Fuentes. "Carybdea marsupialis (Cubozoa) in Mediterranean sea: The First Case of a Sting Causing Cutaneous and Systematic Manifestations." *Journal of Travel Medicine*, 2015: 22: 61-63.

- Borowiec, AS, F Hague, V Gouilleux-Gruart, K Lassued, and H Quadid-Ahidouch. "Regulation of IGF-1-dependent cyclin D1 and E expression by hEag1 channels in MCF-7 cells: the critical role of hEag 1 channels in G1 phase progression." *Biochem. biophys Acta*, 2011: 1831, 723-30.
- Bottrall, JL, F Madaras, CD Biven, MG Venning, and PJ Mirtschin. "Proteolytic activity of Elapid and Viperid snake venoms and its implication to digestion." *J Venom Res*, 2010: 1:18–28.
- Bridge, D, C. W Cunningham, B Schierwater, R DeSalle, and L Buss. "Anthozoans Hydrozoans and scyphozoans." *University of New South Wales Press*, 1996.
- Bridge, D, W Clifford, R Cunningham, and L Buss. "Class-Level relationships in phylum Cnidaria: Molecular and morfological evidence." *Mol. Biol. Evol.* (Mol. Biol. Evol. ), 1995: 12, 679-689.
- Brinkman, D, et al. "chironex felckeri (Box jelly fish) venom proteins: expansion of a cnidarian toxin family that elicits variable cytolytic and cardiovascular effects." *J. Biol. Chem.*, 2014: 289, 4798-4812.
- Brinkman, D, y J Burnell. «Partial purification of cytolytic venom proteins from the box jellyfish Chironex fleckeri.» *Toxicon*, 2008: 51(5) 853-863.
- Brinkman, D, y J Durnell. «Identification, cloning and sequencing of two major venom proteins from the box jellyfish Chironex fleckeri.» *Toxicon*, 2007: 51:853-863.
- Brinkman, DL, y J Burnell. «Biochemical and molecular characterisation of cubozoan protein toxins.» *Toxicon*, 2009: 54, 1162-1173.
- Brunnet, J, D Weinreich, J Williamson, P Fenner, L Lutz, and D Bloom. "Autonomic neurotoxicity of jellyfish and marine animal venoms." *Clinical Autonomic Research*, 1998: 8: 125-130.
- «Goodman & Gilman: Bases farmacológicas de la terapéutica.» De L Brunton, J Lazo y K Parker, 2015. Colombia: Mac Graw Hill, 2006.
- Bruton, Lawrence L., *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. La Jolla, Cal, USA: McGraw Hill, 2012.
- Burnett JW, Currie B, Fenner P, Rifkin J, Williamson J. «Cubozoans ('Box jellyfish').» En *Venomous and Poisonous Marine Animals.*, de Fenner P, Burnett JW, Rifkin J In: Williamson J, 1996; 236–83. Sydney: University of New South Wales Press, 1996.
- Califf, R. M. «A perspective on the regulation of the evaluation of new antithrombotic drugs.» *The American journal of cardiology*,, 1998: 82(8), 25P-35P.
- Calvete, J, L Sanz, Y Angulo, B Lomonte, and JM Gutierrez. "Venoms, venomics, antivenomics." *FEBS Lett* (583:1736–43.), 2009: 583:1736–43.
- Camillo, CD, S Puce, S Tazioli, and G Bavestello. "The cnidome of *Carybdea marsupialis* (Cnidaria: Cubomedusae) from Adriatic Sea." *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 2006: 86, 705-709.
- Caro, A, y A Cederbaum. «Role of Phospholipase A2 Activation and Calcium in CYP2E1-dependent Toxicity in HepG2 Cells.» *The Journal of Biological Chemistr*, 2003: 278: 33866 –33877.
- Carrette, T. J, A. H Underwood, y J. E Seymour. «Irukandji Syndrome a widely misunderstood and poorly researched tropical marine envenoming.» *Diving Hyperb. Med. J. South Pac. Underw. Med. Soc.*, 2012: 42, 214-223.
- Casewell, NR, Wuster W, FJ Vonk, RA Harrison, and BG Fry. "Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms." *Trends Ecol Evol*, 2012: 28:219–29.
- Castaneda O, Harvey AL. «Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins ythat affect neuronal potassium ion channels.» *Toxicon*, 2009: 54, 1119-1124.
- Catterall WA, Celeste S, Yarov-Yarfovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T,. «Votaged-gated ion channels and gating modifier toxins.» *Toxicon* , 2007: 49, 124-141.
- Cegalon, L, WC Heymann, JH JLange, and G Mastrangelo. "Jellyfish stings and their managment." *Mar. Drugs*, 2013: 11, 523-550.

- Cera, V, P Nicolas, M Sánchez Garcisa, Kirpekar, and A Garcia. "PHARMACOLOGICAL DISSECTION OF RECEPTOR ASSOCIATED AND VOLTAGE SENSITIVE IONIC CHANNELS INVOLVED IN CHATECOLAMINE RELEASE." *neuroscience*, 1983: vol. 10, No. 4, pp. 1455 to 1462.
- Chantome, A. Potier-Carterau, M. Clarysse, L. Fromont, G. Oullier, T. Girault, A. Arbion, F. Haelters, J Jaffres, P. Pinault, M. Besson, P. Joulin, V. «Pivotal role of the lipid raft SK-Orail complex in human cancer cell migration and bone metastases.» *Cancer Research*, 2013: 73, 4852-4861.
- Cheryl, L. Macrander, J. «Evidence for an Alternative Mechanism of Toxin Production in the box jellyfish *Alata*.» *Integrative and Comparative Biology*, 2016: 56: 5, 973–988.
- Chi, V, M Pennington, R Norton, E Tarcha, L Londono, and B Sims-Fahey. "Development of a sea abemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases." *Toxicon*, 2012: 59, 529-546.
- Chiapinelli, V A. «Neurotoxins acting in acetylcoline receptors en Natural and Synthetic Neurotoxins.» (Alan Harvey , Academic Press) 1993: 65-128.
- Chung, J, LA Ratnapala, IM Cooke, and AA Yanagihara. "Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) From hawaian jellyfish (*Carybdea alata*) venom." *Toxicon*, 2001: 39:981-990.
- Collins A. «Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles.» *J. Evol. Biol.* , 2002: 15, 418-432.
- Cooper, R, J de Freitas, F Porreca, C Eisenhour, R Lukas, and R Huxtable. "The sea anemone purine, caissarone: Adenosine receptor antagonism." *Toxicon*, 1995: 33, 1025-1031.
- Craviso, G, S Choe, P Chatterjee, I Chatterje, and T Vernier. "Nanosecond electric Pulses: a novel Stimulus for Triggering Ca<sup>2+</sup> Influx into Chromaffin cells Via Voltaged.gated ca<sup>2+</sup> channels." *Cell Mol neurobiol*, 2010: 30, 1259-1265.
- Cuypers, E, A Yanagihara, E Karlsson, and J Tytgat. "Jellyfish and other cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels." *FEBS letters*, 2006: 580(24), 5728-5732.
- D, Brinkman., y J Burnell. «Biochemical and molecular characterisation of cubozoan protein toxins.» *Toxicon*, 2009: 54:1162-1173.
- Dallavalle, G. «cotebleue.» 2015.
- Dary, I, R Yang, Deuis, D Dashevsky, and J Dobson. "The Snake with the Scorpion's Sting: Novel Three-Finger Toxin Sodium Channel Activators from the Venom of the Long-Glanded Blue Coral Snake (*Calliophis bivirgatus*)." *Toxins*, 2016: 8, 303.
- David, C, et al. "Evolution of complex structures: minicollagens shape the cnidarian nematocyst." *Trends Genet*, 2008: 24, 431-438.
- Davidson, MB, G Bate, and P Kirkpatrick. "Exenatide." *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005: 4(9), 713-714.
- Díaz-García, C. M, Sanchez-Soto, C., Fuentes-Silva, D. Leon-Pinzon, C. Díaz-García, C. M. Sanchez-Soto, C. Fuentes-Silva, D. Leon-Dominguez-Perez, D. Varela, C. Rodríguez-Romero, A. Castaneda, O. Hiriart, M. «Low molecular weight compounds from *Zoanthus sociatus* impair insulin secretion via Ca<sup>2+</sup> influx.» *Toxicon*, 2012: 59(2), 306-14.
- Ditix, A, Dhaked. R.K. et. al. «Military potential of biological neurotoxins.» *Toxin Rev*, 2005: 24:175-207.
- Domínguez, N1, M Rodríguez, JD Machado, and R Borges. "Preparation and culture of adrenal chromaffin cells." *Methods Mol. Biol.*, 2012: 846:223-34.
- Dutertre. S, Lewis. R. «Use of venom Peptides to Probe Ion Channel Structure and Function.» *J. Biol. Chem* , 2010: 285:13315-13320.
- Ebeling, W, N Hennrich, M Klockow, H Metz, H. D Orth, and H Lang. "Proteinase K from *Tritirachium album limber*." *European Journal of Biochemistry*,, 1974: 47(1), 91-97.
- Fautin, DG. «Structural diversity, sistematics, and evolution of cnidae.» *Toxicon*, 2009: 54, 1054-1064.

- Felipe, A. Vicente, R. Villagona, N. Roura-Ferrer M, Martinez-Marmol, R. Solé, L. Ferreres, J. Condom, E. «Potassium channels: New targets in cancer therapy.» *Cancer Detection and Prevention*, 2006: 30: 375-385.
- Fenical, W. «Marine soft corals of the genus *Pseudopterogorgia* : a resource for novel anti-inflammatory diterpenoids.» *J Nat Prod*, 1987: 50:1001–1008.
- Fenner, P J, y J Lippmann. «Severe Irukandji-like jellyfish stings in Thai waters.» *Diving and hyperbaric medicine : the journal of the South Pacific Underwater Medicine Society*, 2009: 39: 3, 175-7.
- Fernández-Morales, J. Padín, J. Arranz-Tagarro, J. Vestring, S. García, A. «Hypoxia-elicited catecholamine release is controlled by L-type as well as N/PQ types of calcium channels in rat embryo chromaffin cells.» *American Journal of Physiology - Cell Physiology* , 2014: 307:5, C455-C465 .
- Flecker, H. «Irukandji sting to North Queensland bathers without production of weals but with severe general symptoms.» *Med. J. Aust.*, 1952: 2: 89–91.
- Folk, R. L. «Carbonate sediments of Isla mujeres.» (Geol. Soc.) 100-123 (1967).
- Fraser, S. Salvador, V. Manning, E. Mizal, J. Altun, S. «Contribution of functional voltage-gated Na<sup>+</sup> channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer.» *J. Cell. Physiol.*, 2003: 195, 479-487.
- Frazão, B. Antunes A. «Jellyfish Bioactive Compounds: Methods for Wet-Lab Work.» *Mar Drugs.*, 2016: 12;14(4).
- Frazo, B, V Vasconcelos, y A Antunes. «Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actinaria) toxins: an over view.» *Mar. Drugs*, 2012: 10, 1812-1851.
- Freedman, J, Zinder. S. «Vipotoxin, a protein from Russell's viper venom with high affinity for biogenic amine receptors .» *J. Biol Chem*, 1981: 172-179.
- Freire-Maia, L, y JA Campos. «Response to the letter to the editor by Gueron and Ovsyshcher on the treatment of the cardiovascular manifestation of scorpion envenomation.» *Toxicon*, 1987: 25; 125-130.
- Fry, BG, et al. "The toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins into animals venoms." *Annu. Rev. genomics Hum. Genet.*, 2009: 10, 483-511.
- Gallo, V, A Kingsbury, R Balasz, and O Jorgensen. "The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture." *J. Neurosci.*, 1987: 17: 755-767.
- García, A, A García-De-Diego, L Gandía, R Borges, and J García-Sancho. "Calcium Signaling and Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells." *American Physiological Society*, 2006: 86 (4), 1093-1131.
- García-Arredondo, A, L Murillo-Esquivel, A Rojas, and J Sanchez-Rodriguez. "Characteristics of hemolytic activity induced by the aqueous extract of the Mexican fire coral *Millepora complanata*." *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 2014: 20(1), 49.
- García-Quiroz, J, et al. "Astemizole synergizes calcitrol antiproliferative activity by inhibiting CYP24A1 an upregulating VDR: a novel approach for breast cancer therapy." *Plos One*, 2014: 7:14.
- Garthwaite, G, y J Garthwaite. «AMPA neurotoxicity in rat cerebellar and hippocampal slices: histological evidence for three mechanisms.» *Eur. J. Neurosci.*, 1991: (3) 715-728.
- Gavrilova-Ruch, O, et al. "Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGRI melanoma cells." *J Membr Biol*, 2002: 188, 137-149.
- Gershwin L. «Nematocysts of the Cubozoa.» *Zootaxa*, 2006: 1232, 1-57.
- Gershwin, L. De Nardi, M. Winkel, K. Fenner, P. «Marine stingers: review of an under-recognized global coastal management issue. » *Coast Manag*, 2010: 38:22–41.
- Gershwin, LG. «Malo kingi: a new species of Irukanji jellyfish ( Cnidaria: Cubozoa: Carybdea), possibly lethal to humans, from Queensland, Australia.» *Zootaxa*, 2007: 1231, 1-42.

- Geshwin L, Richardson A, Winkel K, Fenner P, Lippman J, Hore R, Avila-Soria G, Brewer D, Kloser R, Steven A, Condie S. «Biology and ecology of Irukandji jellyfish (Cnidaria; Cubozoa).» *Adv. Mar. Biol.*, 2013: 66, 1-85.
- Giampero, P. Rafanelli, S. Galassi, G. Di Batolo, P. Bertini, S. Alberani, M. Beccari, G. «Contact reactions to the jellyfish *Carybdea marsupialis*: observation of 40 cases.» *Contact Dermatitis*, 1997: 36, 124-126.
- Gilquin, B, et al. "Structure of BGK-Kv1.1 complex based on distance restraints identified by double mutant cycles. Molecular basis for convergent evolution of Kv1 channel blockers." *J. Biol. Chem.*, 2002: 277,37406-37413.
- Gladkikh, I, et al. "Atypical reactive center kunitz-type inhibitor from the sea anemone *Heteractis crispa*." *Mar. Drugs*, 2012: 10, 1545-1565.
- Glasser, E, T Rachamim, D Aharanovich, and D Sher. "Hydra actinoporin-like toxin-1, an unusual hemolysin from nematocyst venom of *Hydra magnipapillata* which belongs to an extended gene family." *Toxicon*, 2014: 91, 103-113.
- Gomez-Lagunas F, Carillo E, Prado A, Stuhmer W. «Gating modulation of the tumor -Related Kv10.1 Channel by Mibefradil.» *Journal of Cellular Physiology*, 2016: Accepted manuscript.
- Gorogh, T, L Beress, E Quabius, P Ambrosch, and M Hoffmann. "Head and Neck cancer cells and xenografts are very sensitive to palytoxin; Decrease of C-jun N-terminale kinase-3 expression enhances palytoxin toxicity." *Mol. Cancer*, 2013: 12,12.
- Gracy, J, D Le-Nguyen, J Gelly, Q Kaas, A Heitz, and L Chiche. "KNOTTIN: the knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007." *Nucleic Acids Res.*, 2004: 9.32:D156-.
- Guo, X, SL Stice, NL Boyd, and SY Chen. "A novel in vitro model system for smooth muscle differentiation from human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells." *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013: 304:C289-C298.
- Halownia, A, et al. "Histone acetylation and arachidonic acid cytotoxicity in HepG2 cells overexpressing CYP2E1." *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2014: 384:271-280.
- Helmholtz, H, B Jhonston, C Ruhnau, and A Prangue. "Isolation of a cytotoxic glycoprotein from the Scyphozoa *Cyanea lamarckii* by lectin affinity chromatography and characterization of a molecule interactions by surface plasmon resonance." *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. sci.*, 2010: 871, 60-66.
- Helmhoz, H. Ruhnau, C. Schutt, C. Prange, A. «comparative study on the cell toxicity and enzymatic activity of two northern scyphozoan species *Cyanea capillata* (L) and *Cyanea lamarckii* (Peron & Lesieur).» *Toxicon*, 2007: 50, 53-64.
- Hernandez, A, y S Francisco. «Subcellular calcium transients visualized by confocal microscopy in a voltage-clamped vertebrate neuron.» *J. Gen. Physiol.*, 1989: 93, 43.
- Hessinger, d. Lenhoff, H. «Mechanism of hemolysis induced by nematocyst venom: roles of phospholipase A and direct lytic factor.» *Arch. Biochem. Biophys*, 1976: 173, 603-613.
- Hill, R.Fenical, W. «Pharmaceuticals from marine natural products: Surge or edd?» *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2010: 777-779.
- Holm, L, y P Rosentrom. «Dail server: conservation mapping in #D.» *Nucleic acids Res*, 2010: 38: W545-9.
- Honda, A, Y Yamamoto, Y Mori, Y Yamada, and H Kikuchi. "Antileukemic effect of coral -prostanoids clavulones from the stolonifer *Clavularia viridis* on human myeloid leukemia cells." *Biochem Biophys Res Commun*, 1985: 130:515-23.
- J, Sánchez-Rodríguez, E Torrens, y L Segura-Puertas. «Partial purification and characterisation of a novel neurotoxin and three cytolytic factors from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom.» *Arch. Toxicol.*, 2006: 80, 163-168.
- Jacques, W. M, et al. "Biochemical Diagnosis of Pheochromocytoma." *JAMA*, 2002: Vol. 287 No.11.

- Jain, R, S Sonawane, y N Mandrekar. «Marine organisms: Potential source for drug discovery.» *Curr. Sci*, 2008: 94, 292.
- Jensen JE, Cristofori-Armstrong B, Anangi R, Rosengren KJ, Lau CH, Mobili M, Brst A, Alewood PF, King GF, Rash LD,. «Understanding the molecular basis of toxin promiscuity : The analgesic sea anemone peptide APETx2 interacts with acid-sensing ion channel 3 and hERG channels via overlapping pharmacophores.» *J. Med. chem.*, 2014: 57, 9195-9203.
- Jordan, D. *Estructura y composicion de arrecifes; en la religion noreste*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Ciencias del Mar y Limnología., 1978.
- Jouiaei M, Casewell NR, Yanagihara AA, Nouwens A, Cribb BW, Whitehead D, JACKSON TN, Ali SA, Wagstaff SC, Koludarov I. «Firing the sting: chemically induced discharge of cnidae reveals novel proteins and peptides from Box Jellyfish (*Chironex fleckeri*) venom.» *Toxins*, 2015: 7, 936-950.
- Jouiaei M, Sunagar K, Federman A, Scheib H, Alewood P, Moran Y, Fry B,. «Evolution of Ancient Venom: Recognition of a Novel Family of Cnidarian Toxins and the Common Evolutionary Origin Of Sodium and Potassium Neurotoxins in Sea Anemone.» *Mol. Biol. Evol.* , 2015: 32(6):1598-1610.
- Jouiaei, M, A Yanagihara, B Madio, and T Nevalainen. "Ancient venom Systems: A review on Cnidarian Toxins." *Toxins*, 2014: 7, 2251-2271.
- Jouiaei, M, et al. "Evolution of an ancient venom: Recognition of a novel family of cnidarian toxins ND THE COMMON EVOLUTIONARY ORIGIN OF SODIUM AND POTASSIUM NEUROTOXINS IN SEA ANEMONE." *mOL. bIOL. eVOL.*, 2015: 32, 1598-1610.
- Jouiaei, M, et al. "Firing the Sting: Chemically Induced Discharge of Cnidae Reveals Novel Proteins and Peptides from Box Jellyfish (*Chironex fleckeri*) Venom." *Toxins*, 2015: 7, 936-950.
- Junqueira-de-Azevedo, ILM, CMV Bastos, PL Ho, MS Luna, N Yamanouye, and NR Casewell. "Venom-related transcripts from *Bothrops jararaca* tissues provide novel molecular insights into the production and evolution of snake venom.l." *Mol Biol Evo*, 2015: 32:754–66.
- Kawai, N, y T. Nakijama. «Neurotoxins from spider venoms.» En *Natural and synthetic Neurotoxins*, editado por A Harvey, 65-128. London: Academic Press, 1993.
- Kayal, E, B Roure, H Philippe, AG Collins, and DV Lavrov. "Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics." *BMC Evol. Biol.*, 2013: 13:5.
- Kelly, LA. «The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.» *Nature Protocols*, 2015: 10, 845-858.
- Kem, W. *Anthozoan neurotoxins*. Vol. 1, de *Handbook of Neurotoxicology*, editado por E Massaro, 529-572. London: Human Press, 1989.
- King, G. F. «Venoms to drugs: translating venom peptides into therapeutics. .» *Aust Biochem.*, 2013: 44(3), 13-5.
- Kioja, A., y P. Sawangwong. «Drugs and cosmetics from the sea.» *Marine Drugs*, nº 2 (2004): 73-82.
- Koehn. FE, Carter. GT. «The envolving role of natural products in drug discovery.» *Nat Rev Drug Discov*, 2005: 4:206-220.
- Kuyucak, M, F Harunur, Rashid, and Serdar. "Affinity and Selectivity of ShK Toxin for the Kv1 Potassium Channels from Free Energy Simulations." *The Journal of Physical Chemistry B 2012*, 2012: 116 (16), 4812-4822.
- Larson, RJ. «Coelenterate ecology and behavior.» En *Cubomedusae: feeding functional morphology, behavior and phylogenetic position*, de Mackie GO, 237–45. Boston: Spingfield, 1976.
- Lassen, S, H Helmholtz, C Rahnau, and A Prange. "Caharacterisation of neurotoxic polypeptides from *Cyanea capillata medusae* (Shyphozoa)." *Hydrobiologia*, 2010: 645, 213-221.
- Lassen, S, H Helmholtz, C Rahnau, and A Prangue. "Isolation of a Nav channel blocking polypeptide from *Cyanea capillata meduse*-a neurotoxin contained in fishing tentacle isorhizas." *Toxicon*, 2012: 58,277-284.

- Layer, R, McIntosh, J. «Conotoxins: Therapeutic potential and application .» *Marine Drugs*, 2006: 4: 119-142.
- Lazcano-Perez, F, U Hernández-Guzman, J Sanchez-Rodriguez, and R Arreguin-Espinosa. "Cnidarian Neurotoxic Peptides Affecting Central Nervous system." *Central Nervous system agents in Medicinal Chemistry*, 2016.
- Lee, H, E Jung, C Kang, W Yoon, J Kim, and E Kim. "Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity." *Toxins*, 2014: 58, 277-284.
- Lefkowitz, J, et al. "Catecholamine exocytosis during low frequency stimulation in mouse adrenal chromaffin cells is primarily asynchronous and controlled by the novel mechanism of Ca<sup>2+</sup> syntilla suppression." *J Physiol*, 2014: 592 (21), 4639–4655.
- Lenarcic, B, A Ritonja, B Strukelj, B Turk, and V Turk. "Equistatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from *Actinia equina*, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain." *J Biol Chem.*, 1997: 272(21):13899-903.
- Lewis AC, Ryan JF, Bely AE, Cartwright P, Collins AG. «A new transcriptome and transcriptome profiling of adult and larval tissue in the box jellyfish *Alatina alata*: an emerging model for studying venom, vision and sex.» *Genomics.*, 2016: 17:650.
- Lewis C, Macrander, J. «Evidence for an Alternative Mechanism of Toxin Production in the Box Jellyfish *Alatina alata*.» *Integr Comp Biol*, 2016: 56 (5): 973-988.
- Lewis, C. Bentlage, B. Yanagihara, AA. Gillan, W. Blerk, JV. Keil, DP. Bely, A. Collins, AG. «Redescription of *Alatina alata* (Reynaud, 1830) (Cnidaria: Cubozoa) from Bonaire, Dutch Caribbean.» *Zootaxa*, 2013.: 3737:473–87.
- Li, H, JJ Bowling, FR Fronczek, and J Hong. "Asteropsin A; an unusual cysteine-crosslinked peptide from Porifera enhances neuronal Ca<sup>2+</sup> influx." *Biochim Biophys Acta*, 2013: 1830: 2591-9.
- Li, R, et al. "Venomics and venom gland Transcriptomics Analysis of *Stomolophus meleagris* to reveal the Toxins Associated with Sting." *J. Proteomics*, 2014: 106, 17-29.
- Lingle, C. «NAVigating a transition from single action potential firing to bursting in chromaffin cells.» *J Physiol*, 2015: 593.4 761–762 761.
- Litan, A. Langhans, S. «Cancer as channelopathy: ion channels and pumps tumor development and progression.» *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2015: 9:1-11.
- Little M. Pereira P. Carrette, T, Seymour J. «Jelly fish responsible of Irukandji Syndrome.» *QJM*, 2006: 99: 425-247.
- Little, M, P Pereira, T Carrette, and J Seymour. "Jellyfish responsible for Irukandji Syndrome." *Q. F. Med.*, 2006: 99, 425-427.
- Liu, Y. «Renaissance of marine natural product drug discovery and development.» *J. Mar. Sci. Res. Dev*, 2012: 2 (2).
- Livingstone, I. *Biodac*. Ottawa, 15 de mayo de 2015.
- Long, k, y W Burnett. «isolation, characterisation, and comparison of hemolytic peptides in nematocyst venoms of 2 species of jellyfish (*Chrysoara quinquecirrha* and *Cyanea capillata*).» *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1989: 94: 641-646.
- Macarron.R. «Critical review of the rol of HTS in drug discovery.» *Drug Discov Today*, 2006: 11:277-279.
- MacClounan, S. Seymour, J. «Cytotoxic and cytolytic Cnidarian venoms. A review on health implications and possible therapeutic applications .» *Toxins* , 2012: 6, 108-151.
- Mackessy, S, K Williams, y KG Ashton. «Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venom paedomorphsis?» *Copeia*, 2003: 769–82.
- Mahapatra, S, C Calorio, D Vandael, and A Marcantoni. "Calcium channel types contributing to chromaffin cell excitability, exocytosis and endocytosis." *Cell calcium*, 2012: 51, 321–330.

- Malmberg, A, y T Yaksh. «Voltage-Sensitive Calcium Channels in Spinal Nociceptive Processing: Blockade of N- and P-Type Channels Inhibits Formalin-induced Nociception.» *Journal of neuroscience*, 1994: 14 (8) 4882-4890.
- Marcano, D., y M. Hasegawa. *Fitoquímica orgánica*. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela, CDCH, 1991.
- Marcantoni, A. Vandael, D. Mahapatra, S. Carabelli, V. Sinnegger-Brauns, M. Striessnig, J. Carbone, E. « Loss of Cav1.3 channels reveals the critical role of L-type and BK channel coupling in pacemaking mouse adrenal chromaffin cells.» *J Neurosci*, 2010: 30, 491–504.
- Marchler-Bauer, A, et al. "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. ." *Nucleic Acids Res.*, 2017: 45(D1):D200-D203.
- Marder, E, y A Taylor. «Multiple models to capture the variability in biological neurons and networks.» *Nat Neurosci*, 2011: 14, 133–138.
- Mariottini G, Pane L. «Cytotoxic and cytolytic Cnidarian venoms. A review on helath applications anfd possible therapeutic applications.» *Toxins*, 2013: 6, 108-151.
- Marottini, GL, y L Pane. «the Role of Cnidaria in Drug Discovery. A review on CNS implications as New perspectives.» *recent Patents on CNS Drug Discovery*, nº 2 (2013): 8:110-122.
- Mathias, A, D Ross, y M Schachter. «The distribution of 5-hydroxytryptamine, tetramethylammonium, homarine, and other substances in sea anemones.» *J. Physiol.*, 1960: 151, 296-311.
- McCleskey, E. Fox, A. Feldman, D. Cruz, L. Olivera, B. Tsien, R. Yoshikami, D. «Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle.» *PNAS*, 1987: 84 (12), 4327–4331.
- McClouan, S. Seymour, J. «Venom and cnidome ontogeny of teh cudomedusae: Chironex fleckeri.» *Toxicon*, 2012: 60, 1335-1341.
- Mebs, D. *Venomous and Poisonous Animals, A Handbook for biologists, toxicologist and toxinologist, physicans and pharmacists*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 2009.
- Menon, LR, D Mcllroy, y MD Brasier. «Evidence of cnidaria like behavoir in ca 560 Ma edicaran. Aspidella.» *Geology*, 2013: 41, 895-898.
- Milla L, Segura-Puertas L, Celis L, Heimer de la Cotera E,. «Dermatitis por contacto con Carybdea marsupialis (cnidaria Cubozoa).» *Dermatología Rev Mex*, 2000: 44: 167-170.
- Moore, RE, y PJ Scheuer. «Palytoxina new marine toxin from a Coelenterates.» *Science*, 1972: 172:495-98.
- Morabito, R, A Marino, P Romano, C Rigano, and G La Spada. "Sulphate and chloride-dependent potassium transport in human erythrocytes are affected by crude venom from nematocysts of the jellyfish Pelagia noctiluca." *Cell Physiol Biochem.*, 2013: 32(7):86-95.
- Morales-Landa, J. L., Zapata-Pérez, O., Cedillo-Rivera, R., Segura-Puertas, L., Simá-Alvarez, R., & Sánchez-Rodríguez, J. «Antimicrobial, antiprotozoal, and toxic activities of cnidarian extracts from the Mexican Caribbean Sea.» *Pharmaceutical biology*, 2007: 45(1), 37-43.
- Moran Y, Kahn R, Cohen L, Gur M, Karbat I, Gordon D, Gurevitz M. «Molecular analysis of sea anemone toxin Av3 reveals selectivity to insects and demonstrates the heterogeneity of receptopr site 3 on voltage gated Na channels.» *Biochem. J.*, 2007: 406,41-48.
- Moran, Y, D Prahaer, A Schlesinger, A Ayalon, Y Tal, and U Technau. "Analysis of soluble protein contents from nematocysts of a model of sea anemone sheds lighth on venom evolution." *Mar. biotechnol.*, 2013: 15, 329-339.
- Moran, Y, et al. "Neurotoxin localization to ectodermal gland cells uncovers an alternative mechanism of venom delivery in sea anemones." *Proceedings of the royal society*, 2012: 279, 1351-1358.

- Moran, Y. Ganikhovich, G. Gordon, d. Wienkoop, S. Zenkert, C. Ozbek, S. Technau, U. Gurevitz, M. «Neurotoxin localization to ectodermal gland cells uncovers an alternative mechanism of venom delivery in sea anemones.» *Proc. Biol. Sci.*, 2012: 279. 1351-1358.
- Muller. WEG, Brummer. F, Batel. R, et. al. «molecular biodiversity. case study: pofifera (sponges).» *Naturwissenschaften*, 2003: 90:103-120.
- Mustafa, M. R, E White, K Hongo, I Othman, and C. H Orchard. "The mechanism underlying the cardiotoxic effect of toxin from the jellyfish *C. fleckeri*." *Toxicology and applied pharmacology*, 1995: 133:196-206.
- Nagai H. «Recent progress in jellyfish toxin study.» *Journal of Health science*, 2003: 49, 337-340.
- Nagai, H, et al. "Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish *Carybdea rastoni*." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000 b: 275:582-588.
- Nagai, H, K Takuwa, M Nakao, N OSHIRO, S IWANAGA, and T NAKAJIMA. "A novel protein toxin from the deadly jellyfish *Chiropsalmus quadrigatus*." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2002: 66:97-102.
- Nagai, H, K. Takuwa, M Nakao, B Sakamoto, G. L Crow, and T. Nakajima. "Isolation and characterization of a novel from the hawaiian box jelly fish *Carybdea alata*." *Biochemical and biophysical research communications*, 2000: 275: 589-594.
- Nagai, H, y K Takuwa. «A novel protein toxin from the deadly jellyfish *Chiropsalmus quadrigatus*.» *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2002: 66:97-102.
- Nagai, H, y K Takuwa. «Isolation and characterization of a novel from the hawaiian box jelly fish *Carybdea alata*.» *Biochemical and biophysical research communications*, 2000: 275: 589-594.
- Nagai, H, y otros. «Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish *Carybdea rastoni* .» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000 b: 275:582-588 .
- Nelson, L. Cox, M. *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Madrid: Mac Graw Hill, 2014.
- Nevalainen T. «Phospholipases A2 in the genome of the sea anemone *Nematostella vectensis*.» *Comp. Biochem. Physiol. D Genomics Proteomics*, 2008: 3, 226-233.
- Nevalainen, AMF, et al. "Phospholipase A2 in Cnidaria." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2004: 139, 731-735.
- Nicholson, GM, y A Graudins. «Spider of medical importance in Asia-Pacific: Atracotoxin, latrotoxin and related spider neurotoxins.» *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2002: 29:785-94.
- Nielsen, V. G. «Ancrod revisited: viscoelastic analyses of the effects of *Calloselasma rhodostoma*.» *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 2016: 42(2), 288-293.
- Nir N, Eli s, Daniel S, Yehu M, Liora T, Binyamin H. «A new ionotropic Na + Channel toxin from *Aiptasia diaphana*, is similar to, yet distinct from, known anemone Na+ channel toxins.» *Biochem. J.* , 2013: 451, 81-90.
- «Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish *Carybdea rastoni*.» 2000.
- Ojeda, P.G, CK Wang, y DJ Craik. «Chlorotoxin: structure, activity, and potential uses in cancer therapy.» *Peptide Science*, 2016: 106(1), 25-36.
- Orts, D, et al. "Biochemical and electrophysiological characterisation of two SeaAnemone Type I Potassium Toxins from Geographically distant Population of *Budosoma caissarum*." *Mar. Drugs*, 2013: 11, 577-582.
- Orts, DJ, et al. "BcsTx3 is a founder of a novel sea anemone toxin family of potassium channel blocker." *FEBS J.*, 2013: 280, 4839-4852.
- Oshiro, N, C Kobayashi, S Iwanaga, M Nozaki, and T. Namikoshi. "Novel proteinaceous toxins from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *Phyllodiscus semonin* Kwietniewski." *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2002: 294, 760-763.

- Osmakov, D, et al. "Sea anemone peptide with uncommon B-harpin structure inhibits acid sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity." *J. Biol. Chem*, 2013: 288,23116-23127.
- Ostman C. «A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts.» *Sci. Mar.*, 2000: 64, 31-46.
- Quadid-Ahidouch, H, A Ahidouch, y L Pardo. «Kv10-1 K<sup>+</sup> channel: from physiology to cancer.» *Eur J Physiol*, 2016: 468: 751-762.
- Ozbek, S, P Balasubramanian, y T. Holstein. «Cnidocyst structure and biomechanics of discharge.» *Toxicon*, 2009: 54, 1038-1045.
- Parker M, Feil S. «Pore-Forming protein toxins: From structure to function .» *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2005: 88, 91-142.
- Pastor-Anglada, M, A Felipe, y FJ Casado. «Kaplan, WD. Trout, WE.» *Genetics*, 1969: 61:399-409.
- Pastor-Anglada, M. Felipe A. Casado, FJ. «Kaplan, WD. Trout, WE.» *Genetics*, 1969: 61:399-409.
- Peca, G, et al. "Contac reactions to the jellyfish *Carybdea marsupialis*: observation of 40 cases." *Contact Dermatitis*, 1997: 36, 124-126.
- Peggy Hsieh, YH, FM Leong, y J Rudloe. «Jellyfish as food.» *Hydrobiologia* , 2001: 451: 11.
- Pereira, P, y JE Seymour. «In vitro effects on human heart and skeletal cells of the venom from two cubozoans, *Chironex flekeri* and *Carukia barnesei*.» *Toxicon*, 2013: 76, 310-315.
- Pigneur S, Billen B, Deura R, Waelkens E, Debaveye S, Beress L, Tytgat J. «A bifunctional sea anemone peptide with kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties.» *Biochem. Pharmacol.* , 2011: 82, 81-90.
- Ponce, D, Lopez-vera E, MB Aguilar, and J Sanchez-Rodriguez. "Preliminary results of the in vivo and in Vitro characterisation of the tentacle venom fraction from jellyfish *aurelia aurita*." *Toxins*, 2013: 5, 2420-2433.
- Proksch, P., Edrada-Ebel, R.A., Ebel, Rainer. «Drugs from the sea- Opportunities and Obstacles.» *Marine Drugs*, nº 1 (2003): 5-17.
- Ramasamy S, Isbister G, Seymour j, Hodgson W. «The invivo cardiovascular effects of box jellyfish (*Chiropsalmus* sp.) venom in rats .» *Toxicon* , 2005: 45, 321-327.
- Ramasamy S, Isbistera, K. Seymourb, J. Hodgsona, C. «The in vivo cardiovascular effects of the Irukandji jellyfish (*Carukia barnesi*) nematocyst venom and a tentacle extract in rats.» *Toxicology letter*, 2005 b: 155, 135-141.
- Rathbone, J, R Franklin, C Gibbs, and D. Williams. "Review article: Role of magnesium sulphate in the management of Irukandji syndrome: A systematic review." *Emergency Medicine Australasia*, 2016.
- Resink, A, N Hack, J Geral, and R Balazs. "Growth conditions differentially modulate the vulnerability of developing cerebellar granule cells to excitatory amino acids." *Brain Research*, 1994: 655: 222-232.
- Riss, E, V Morave, y A Niles. *Cell Viability Assays*. NCBI Bookshelf, 2013.
- RM, Kostrzewa. «Neurotoxins.» *East Tennessee State University*, 2009: 1035-1041.
- Rottini, G, L Gusmani, E Parovel, M Avian, and P Patriarca. "Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*." *Toxicon*, 1995: 33, 315-326.
- Ruiz-Retería, F, B Van Tussenbroek, y E Jordán- Dahlgren. «Characterization of the puerto Morelos CARICOMP.» En *Caribbean Coastal Marine Productivity (CARICOMP)*, de F., van Tussenbroek, B & E., Jordán- Dahlgren. Ruiz-Retería, 57-66. pARIS: UNESCO, 1998.
- Sánchez, T, y J Moreno. «Gr63779x, an EP3 receptor agonist, induced S phase arrest and 3T& fibroblast growth inhibition.» *Eur J Pharmacol*, 2006: 529: 16-23.
- Sánchez-Rodríguez, J, E Torrens, and L Segura-Puertas. "Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolytic toxins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom." *Pharmaceutical Biology*, 2007: 45, 34-43.

- Sánchez-Rodríguez, J, E Torrens, y L Segura-Puertas. «Partial purification and characterisation of a novel neurotoxin and three cytoliysins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom.» *Arch. Toxicol.*, 2006: 80, 163-168.
- Sanderson, B, K Da Silva, y M Ramezanzpour. «How Venom from the Magnificent Sea Anemone, *Heteractis magnifica*, Kills breast and lung cancer cells.» *Springer Nature*, 2016: 669-681.
- Sher, D, et al. "Toxic polypeptides of the hydra-a bioinformatic approach to cnidarian allomones." *Toxicon*, 2005: 45:865-79.
- Shinzato, C. Shoguchi, E. Kawashima, T. Hamada, M. Hisata, K. Tanaka, M. Fujie, M. Fujiwara, M. Konayagi, R. Ikuta, T. et al. «Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change.» *Nature*, 2011: 476, 320-323.
- Silva, C. N, et al. "PnPP-19, a synthetic and nontoxic PnPP-19, a synthetic and nontoxic peptide designed from a *Phoneutria nigriventer* toxin, potentiates erectile function via NO/cGMP." *The Journal of urology*, 2015: 194(5), 1481-1490.
- Simms A, Zamponi G. «Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels Structure, Function and Dysfunction.» *Cell. Press Neuron Rev.*, 2014: 24-45.
- Sintheimer, H. «an unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis.» *Exp. Biol. Med. (maywood)*, 2008: 233:779-791.
- Sitprija, V. Sitprija, S. «Renal Injury Induced by Marine Toxins : Role of Ion Channels.» *SRL Nephrology and therapeutics*, 2016: 2(1): 001-006.
- Skehan, P, et al. "New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening." *JNCI J Natl Cancer Inst*, 1990: 82 (13): 1107-1112.
- Smith, J, y K Blumenthal. «Site-3 sea anemone toxins: molecular probes of gating mechanisms in voltage-dependent sodium channels.» *Toxicon*, 2007: 49, 159-170.
- Smith, R. N., & Gonzales, E. B. « Protons and Psalmotoxin-1 reveal nonproton ligand stimulatory sites in chicken acid-sensing ion channel: Implication for simultaneous modulation in ASICs.» *Channels*, 2014: 8(1), 49-61.
- Southcott, RV. «Revision of some carybdeidae (Scyphozoa: Cubomedusae), including a description of the jellyfish responsible for the "Irukandji syndrome."» *Aust J Zool*, 1967: 15:651–71.
- Souza, A, et al. "An Evaluation of the Antinociceptive Effects of Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , a Neurotoxin from the Spider *Phoneutria nigriventer*, and  $\omega$ -Conotoxin MVIIA, a Cone Snail *Conus magus* Toxin, in Rat Model of Inflammatory and Neuropathic Pain." *Cellular & Molecular Neurobiology*, 2013: 33(1).
- Sun, L. K, et al. "Apoptosis induced by box jellyfish toxin in glioma and vascular endothelial cell lines." *toxicon*, 2002: 40:401-406.
- Talivinen, KA, y TJ Nevalainen. «Cloning of a novel phospholipase A2 from the cnidarian *Adamisia cariniopados*.» *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 2002: 132, 571-578.
- Thangnipon, W, A Kingsbury, M Webb, and R. Balazs. "Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes." *Developmental brain research*, 1983: 11(2), 177-189.
- Tibballs, J, R Li, H. A Tibballs, L. A Gershwin, and K. D Winkel. "Australia carybdeid jellyfish causing "Irukandji Syndrome " ." *Toxicon*, 2006: 59, 617-625.
- Timo J, Nevalainena, Heikki J, R Peuravuoria, LE Quinnb, and E Llewellync. "Phospholipase A2 in Cnidaria." *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2004: 139, 731-735.
- Tiong, K. «Irukandji syndrome, catecholamines, and mid-ventricular stress cardiomyopathy.» *European Journal of Echocardiography* (European <journal of Ecocardiography), 2008.

- Titus SA, Beacham D, Shahane SA, Southall N, Xia M, Huang R, Hooten E, Zhao Y, Shou L, Austin CP, Zheng W. «A new homogeneous high-throughput screening assay for profiling compound activity on the human ether-a-go-go-related gene channel.» *Anal Biochem*, 2009: 394:30-38.
- Todd, B. «New drugs.» *Geriatric Nursing*, 1981: 2(6), 432-435.
- Tonello, F, y M Rigoni. «Cellular mechanisms of Action of Snake Phospholipase A2 tóxins.» *Toxinology*, 2015: 1-14.
- Tonello, F. Rigoni, M. «Cellular mechanisms of Action of Snake Phospholipase A2 tóxins.» *Toxinology*, 2015: 1-14.
- Torres-Ramos, M, y M Aguilar. «Recent Advances in Cnidarian Neurotoxin research.» *Comments on Toxicology*, 2003: 9,161-174.
- Trease, G. E., y W. C. Evans. *Pharmacognosy*. London, UK: Cassell & Collier MacMillan Publishers Ltd., 1978.
- Turk, T, y R Kem. «The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms.» *Toxicon*, 2009: 54:1031-1037.
- Uechi, G, H Toma, T Arakawa, and Y Sato. "Biochemical and physiological analyses of a hemolytic toxin isolated from a sea anemone actinaria villosa." *toxicon*, 2005: 45, 761-766.
- Urrego, D, A Tomczak, F Zahed, W Stuhmer, and L Pardo. "Potassium channels in cell cycle and cell proliferation." *Philosophical Transactions of the Royal society B: Biological Sciences*, 2014: 369 (1638) : 23 10094.
- Vandael, D, et al. "Reduced availability of voltage-gated sodium channels by depolarization or blockade by tetrodotoxin boosts burst firing and catecholamine release in mouse chromaffin cells." *J Physiol*, 2015: 593.4: 905–927.
- Vatter, I, Davos, J, et. al. «Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery.» *Amino Acids*, 2011: 40:15-28.
- Walter, M, T Martinex, y D Godin. «Investigations into the cardiotoxicity of a toxin from the nematocysts of the jellyfish, *Cyanea capillata*.» *Toxicon*, 1977: 15:339-359.
- Waymire, J. C, W. F Bennett, R Boehme, L Hankins, K Gilmer-Waymire, and J. W Haycock. "Bovine adrenal chromaffin cells: high-yield purification and viability in suspension culture." *Journal of neuroscience methods*, 1983: 7(4), 329-351.
- Weaver, D, D Harden, S Dworetzky, B Robertson, and R Knox. "A Thallium-Sensitive, Fluorescence-Based Assay for Detecting and Characterizing Potassium Channel Modulators in Mammalian Cells." *Journal of Biomolecular Screening*, 2004: 8: 671-676.
- Weinheimer, AJ, y RL Spraggins. «The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the Gorgonian *Plexaura Homomalla* Chemistry of Coelenterates.» *Chemistry of Coelenterates*, 1969: 10:5185-88.
- Williamson, J, y P et. al. Fenner. «Venomous and Poisonous Marine Animals: a medical and biological handbook.» 504. Australia: University of New South Wales Press, 1996.
- Winkel, K, et al. "CARDIOVASCULAR ACTIONS OF THE VENOM FROM THE IRUKANDJI (RAT AND GUINEA-PIG TISSUES)." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2005: 32: 777-788.
- Winkel, K. D, et al. "CARDIOVASCULAR ACTIONS OF THE VENOM FROM THE IRUKANDJI (RAT AND GUINEA-PIG TISSUES)." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2005: 32: 777-788.
- Winter, K, Isbister, G, McGowan, S, Konstantakopoulos, N, Seymour, J, Hodson, W. «A pharmaceutical and biochemical examination of the geographical variation of *Chironex fleckeri*.» *Toxicon. Lett.*, 2010: 192, 419-424.
- Wonnacott, S. «Presynaptic nicotinic ACh receptors.» *Trends Neurosci.*, 1997: 20:92-98.
- Wonnacott, S, S Kaiser, A Mogg, L Soliakov, and I Jones. "Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum." *Eur. J. Pharmacol.*, 2000: 393: 51-58.

- Wu, C. «Palytoxin: Membrane mechanisms of action.» *Toxicon*, 2009: 54, 1183-1189.
- Yan, F, et al. "Improved insecticidal toxicity by fusing Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* with Av3 of *Anemonia viridis*." *Curr. Microbiol.*, 2014: 68, 604-609.
- Yanagihara, A, J Kuroiwa, L Oliver, J Chung, and D Kunkel. "Ultrastructure of a novel eurytele nematocyst of *Carybdea alata* Reynaud (Cubozoa: Cnidaria)." *Cell and Tissue Research*, 2002: 308, 307-3018.
- Yanagihara A, shohet R,. «Cubozoan venom induced cardiovascular collapse is caused by hyperkalemia and prevented by gluconate in mice.» *Plos One*, 2012: 7, 351-358.
- Yanagihara, A. Shoet,R. «Cubozoan venom-induced cardiovascular collapse is caused by hypercalemia and prevented by zinc gluconate in mice.» *plos one*, 2012: 106, 57-67.
- Yi-Lian, Li, D, Li-Qin, Wu Xue-Mei, W Hu, Y Xin-Yan, and Li Gong-Chu. "Cytotoxicity and Subcellular Distribution of Sea Anemone Equinatoxin II S105-P142 Fragment in Cancer Cells." *Journal of tumor*, 2004: Vol. 2 No. 8.
- Yu, X, K Duan, C Shang, H Yu, and Z Zhou. "Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (Ih channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004: 101(4), 1051-1056.
- Zapata, F, E Freya, S Goetz, Smith, M Howison, and S Siebert. "Phylogenomic Analyses Support Traditional." *PLoS ONE*, 2015: 10(10).
- Zhang M, Fishman Y, Sher D, Zlotkin E. «Hydralysin a novel group selective paralytic and cytolytic protein from a noncnidocystic origin in hydra.» *Biochemistry*, 2003: 42: 8939-8944.
- Zharenko, A, et al. "Bunomodosine 391: An analgesic acylamino acid from the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*." *J. Nat. Prod.*, 2011: 74, 378-382.



