



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



AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS NEUROACTIVOS
BLOQUEADORES DE CANALES IÓNICOS E INHIBIDORES DE LA
ACETILCOLINESTERASA PRESENTES EN LAS TOXINAS DE LA ANÉMONA
Lebrunia danae (DUCHASSAING & MICHELOTTI, 1860).

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias
(Química Marina)

P r e s e n t a

OC. KARINA CRUZ VÁZQUEZ

Director de tesis: Dra. Judith Sánchez Rodríguez

Comité tutorial: Dr. Leovigildo Quijano
Dra. Patricia E. Thomé Ortiz
Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez
Dr. Rogelio Arellano Ostoa

Puerto Morelos, Q. Roo, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ofrecerme un camino lleno de bendiciones.

A mis padres porque gracias a ellos esto es posible, por todo su amor y las enseñanzas más importantes de la vida... los amo

A mis hermanos Gaby, Laura y Alejandro, por entenderme y cuidarme...están en mi corazón

A mis tutores, por su paciencia y comprensión, pero sobretodo por ser fuente de inspiración y motivación:

Dra. Lourdes Segura Puertas † por su cariño y ejemplo de dedicación y amor a la ciencia.

Dra. Judith Sánchez Rodríguez por su amistad y ayuda, doblemente gracias.

Dr. Leovigildo Quijano por su invaluable ayuda para expresar las ideas de forma escrita, mil gracias por este regalo.

Dr. Manuel Aguilar Ramírez por enseñarme a confiar en los logros personales, ser optimista y sonreír a pesar de las adversidades.

Dra. Patricia E. Thomé Ortiz por su apoyo y confianza

Dr. Rogelio Arellano Ostoa por aceptar guiarme al final de este camino.

CONACYT por la beca otorgada para estudios de Maestría clave 195651

PAPIIT con el proyecto " Evaluación de la actividad biológica de las toxinas de los Cnidarios *Linuche unguiculata* y *Lebrunia danae* del Caribe Mexicano" Clave IN213905

Dra. Gabriela Fuentes Rodríguez y Dr. Juan Luis Morales Landa, por la asesoría otorgada para la interpretación de datos y el aprendizaje de la técnica de búsqueda de inhibidores de la acetilcolinesterasa

Dr. Ed Heimer y Dr. Manuel Aguilar por el apoyo otorgado para trabajar en el laboratorio de Neurofarmacología del Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla; con el apoyo y asesoría invaluable del Biol. Andrés Falcón para la purificación de compuestos bioactivos en cromatografía líquida.

Dr. Rogelio Arellano Ostoa y Dr. Carlos Saldaña, por permitirme trabajar en el laboratorio de Fisiología del Instituto de neurobiología, campus Juriquilla, para realizar los análisis electrofisiológicos de este trabajo con su apoyo y asesoría.

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, unidad Puerto Morelos Quintana Roo, especialmente a Dra. Brigitta Van Tussenbroek y M. en C. Francisco Ruiz Rentería

M. en C. Cecilia Barradas, M. en C. Fernando Negrete y M. en C. Erika Magallón Gallón por su ayuda en la captura de anémonas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo.

A todas aquellas personas que contribuyeron de manera importante en la realización de este proyecto de vida. Gracias por sus conocimientos, amistad, solidaridad, comprensión, ayuda y cariño:

Querétaro: Estela, Gisela(+ retoño) y Miguel Ángel, Lety, Argel, Ricardo, Carlos Saldaña y Andrés.

Puerto Morelos: Biol. Carlos Avalos, M.en C. Eunice Ramírez Zaldivar, M.en C. Erika Magallón, M. en C. Guadalupe Barba, Dr. Xavier Pech, M.en C. Andrea Osorio, Dr. Kor, M. en C. Erika Díaz, M. en C. Vanía Cruz, Marcy Durán, Judith Vázquez, Sr. Rafael, Amaury y Don José

Mérida: Por creer en mí: Dr. Juan Luis Morales Landa , M. en C. Carmen Galindo, M. en C. Joel Loera, Dra. Gabriela Gaxiola, Dr. Xavier Chiappa, Dra. Maite Mascaró y M. en C. Juan José Dorantes.

Cuba: Dra. María A. Chávez, Dra. María Eliana Lanio, Dra. Fabiola Pasos, Dra Yamile González, Dra Maday Alonso del Rivero, Dra. Mayra Tejuca, Dra. Diana Martínez, Bioq. Uris Ros, M.C. Mireya Romero y Tec. Yeny Salas de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana y la Dra. Anoland Garateix del departamento de Bioactivos y Productos Naturales del Instituto de Oceanología.

Ensenada: Angélica, Lizet Avendaño, Liz Nuñez, Nicol, Mary Carmen Ruiz, Alonso, Diego y Karina Lugo.

RESUMEN

El Caribe mexicano constituye una fuente potencial de nuevas moléculas de origen natural. El phylum Cnidaria integrado por medusas, anémonas, hidroides y corales tiene como característica principal la presencia de nematocistos. La anémona *Lebrunia danae* es considerada como uno de los cnidarios más tóxicos. Esta especie se distribuye desde Bermudas hasta sur de Brasil, se ha demostrado que sus toxinas presentan actividad neurotóxica y hemolítica. En este estudio se determinó la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa y neurotóxica del extracto crudo y fracciones parcialmente purificadas. La actividad neurotóxica del extracto crudo se evaluó en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* ($7.5 \text{ mg ml}^{-1}\text{kg}^{-1}$) y mediante la técnica electrofisiológica de control de voltaje en ovocitos de *Xenopus laevis*. La purificación parcial se realizó en Sephadex G-50-M, QAE Sephadex A-25 y HPLC. Las fracciones parcialmente purificadas inhibieron 73 % de la actividad colinérgica ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$) y bloquearon 100% los canales iónicos de calcio ($16 \mu\text{g ml}^{-1}$). Las toxinas de *Lebrunia danae* presenta compuestos anticolinérgicos y neurotóxicos, los cuales pueden ser útiles en el estudio de los procesos fisiopatológicos y eventualmente en el tratamiento de padecimientos del sistema nervioso.

ÍNDICE

Agradecimientos	I
Resumen	III
Índice de figuras y tablas	V
Introducción	1
Antecedentes	2
Phyllum Cnidaria	2
Nematocistos	3
Anémona <i>Lebrunia danae</i>	5
El estudio de las toxinas de origen marino y sus blancos moleculares	8
Toxinas de anémonas	10
Importancia de las nerutoxinas de anémonas como herramientas para el estudio del sistema nervioso	15
Acción de las neurotoxinas de anémonas a nivel de receptores y/o canales iónicos	15
Acción de las neurotoxinas de anémonas como inhibidores de la acetilcolinesterasa	18
Objetivos	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
Justificación	23
Hipótesis	23
Metodología	24
Área de recolecta	24
Obtención de extracto	25
Separación y purificación	25
Cromatografía líquida de baja presión y HPLC	25
Caracterización biológica	26
Bioensayo neurotóxico	26
Determinación de la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa (AChE)	26
Análisis electrofisiológico en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	27
Microinyección de RNA mensajero	28
Desfoliculización	29
Registro electrofisiológico	29
Análisis de datos	30
Cuantificación de proteína por el método de Bradford	30
Determinación de peso molecular por medio de electroforesis en SDS-PAGE	30
Resultados	31
Aislamiento y purificación de inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE)	31
Análisis electrofisiológico en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	39
Determinación de peso molecular	49
Purificación de la fracción neurotóxica QAE IV mediante HPLC.	50
Discusión	53
Conclusiones	68
Bibliografía	71

Índice de figuras

Fig. 1 Tipos morfológicos de cnidarios, el medusoide (A) o de forma medusa de los cnidarios adaptado para nadar libremente, y la forma polipoide o hidroide (B) adaptada para la vida sésil.	3
Fig. 2 Estructuras internas y externas de un nematocisto. Fases del mecanismo de descarga de un nematocisto (Williamson <i>et al.</i> , 1996).	5
Fig. 3 <i>Lebrunia danae</i> (Duchassaing & Michelotti, 1860) (tomada de Deloach y Humnn, 2002).	6
Fig.4 <i>Lebrunia danae</i> “branching anemone” (Osmond, 2003).	7
Fig. 5 Tres tipos de cnidocistos (espirocistos (A, aumento 100 x) y nematocistos: mastigóforo macrobásico (B, aumento 100 x) y microbásico (C, aumento 100x) encontrados en las secreciones de los tentáculos de la anémona <i>Lebrunia danae</i> (Cruz-Vázquez, 2004).	7
Fig. 6 Flujo de iones a través de canales de membrana (A); interacción de la toxina en el canal (bloqueo del flujo de iones (B)) y alteración del flujo de iones a través de la membrana debido a la presencia de la toxina en el canal (C)) (OpusXpress, 2000)	9
Fig. 7 Esquema de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina por la enzima acetilcolinesterasa.	18
Fig. 8 Sinapsis colinérgica	20
Fig. 9 Área de recolecta de ejemplares de la anémona <i>Lebrunia danae</i>	24
Fig. 10 Ensayo de microcolumnas para la selección de las condiciones de la purificación en gel de intercambio iónico.	25
Fig. 11 Ejemplar maduro de la rana <i>Xenopus laevis</i>	27
Fig. 12 Ovocitos de la rana <i>Xenopus laevis</i> en estadios finales de desarrollo V y VI	28
Fig. 13 A) Microinyector utilizado para introducir el RNA mensajero de cerebro de rata en los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> . B) Microinyección de RNA en el ovocito de <i>Xenopus</i>	28
Fig. 14 Expresión de canales y receptores del RNA mensajero de cerebro de rata inyectado en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> (OpusXpress, 2000).	29
Fig. 15 Separación cromatográfica del extracto crudo de la anémona <i>Lebrunia danae</i> en Sephadex G-50-M.	31
Fig. 16 Curva de actividad enzimática de AChE (curva tipo) sin inhibidor y en presencia de la fracción F3G50 (4 µg de proteína/µl) de la cromatografía en Sephadex G-50-M.	33
Fig. 17 Curva de actividad enzimática de la AChE (curva tipo) extraída del tejido de cangrejos expuestos a la fracción F3G50 y extraída de tejido de cangrejos sin exposición a la fracción.	34
Fig. 18 Evaluación de la actividad inhibitoria de AChE de los sobrenadantes obtenidos de las microcolumnas empacadas con gel QAE Sephadex A-25 utilizando diferentes concentraciones de acetato de amonio (eluyente).	35
Fig. 19 Cromatografía de gel de intercambio iónico QAE Sephadex A-25 M de la fracción F3G50 de Sephadex G-50-M obtenida del extracto crudo de la anémona <i>L. danae</i> .	36
Fig. 20 Curva dosis respuesta de porcentaje de inhibición de la AChE contra concentración de proteína de la fracción QAE IV	37
Fig. 21 Actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa de la fracción QAE IV (12 µg proteína/µl)	38
Fig. 22 Ejemplo de la corriente transmembranal basal del ovocito control de <i>Xenopus laevis</i> .	40

Fig. 23 Ejemplo de la corriente transmembranal de ovocitos control de <i>Xenopus laevis</i> en perfundidos (señalizado por la barra superior) con extracto crudo (100 µg proteína/µl) de <i>Lebrunia danae</i> .	40
Fig. 24 Corrientes de membrana en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata, generadas por la perfusión (la barra superior indica el tiempo de aplicación) de los neurotransmisores acetilcolina, GABA, ácido glutámico-glicina y serotonina.	42
Fig. 25 Corrientes de sodio y potasio en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata, en condiciones control.	43
Fig. 26 Corrientes Tout en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> en condiciones control y en presencia de las fracciones parcialmente purificadas (F3G50 20 µg proteína/µl, B)	44
Fig. 27 Efecto de la fracción F3G50 sobre la corriente Tout en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata.	45
Fig. 28 Efecto de las fracciones de la separación por intercambio iónico QAE I, II y IV sobre la corriente Tout de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata.	46
Fig. 29 Efecto de las diferentes concentraciones de la fracción QAE IV sobre la corriente Tout de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata.	47
Fig. 30 Efecto de la ebullición del extracto crudo de <i>Lebrunia danae</i> sobre la potencia de inhibición de Tout en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata.	47
Fig. 31 Efecto de la ebullición de la fracción F3G50 (20 µg proteína/µl) sobre su capacidad inhibitoria de la corriente Tout en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata.	48
Fig. 32 Efecto de la fracción QAE IV (16 µg de proteína/µl) antes y después del tratamiento térmico sobre las corrientes de calcio en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata.	48
Fig. 33 Electroforesis SDS-PAGE 12 % de extracto crudo (EC), fracción F3G50 obtenida de Sephadex G-50-M y la fracción QAE IV obtenida de la cromatografía de intercambio iónico QAE Sephadex A-25 M.	50

Índice de tablas

Tabla I. Evaluación de actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa de las fracciones obtenidas en la cromatografía de Sephadex G-50-M	32
Tabla II. Evaluación de la actividad inhibitoria de la AChE de los sobrenadantes de las microcolumnas de intercambio iónico.	35
Tabla III. Resultados de actividad inhibitoria de la AChE de las fracciones obtenidas de la cromatografía en gel de intercambio iónico QAE Sephadex A-25.	36
Tabla IV. Datos de porcentaje de inhibición de la AChE con diferentes concentraciones de proteína de la fracción QAE IV	37
Tabla V. Datos obtenidos en los ovocitos probados en ausencia y presencia del extracto crudo y fracciones parcialmente purificadas de la anémona <i>Lebrunia danae</i> para el neurotransmisor GABA.	41
Tabla VI. Amplitud de la corriente Tout generada en el pico máximo (+20 mV) en ovocitos E30a (mensajero) en presencia de las fracciones F1G50 (100 µg de proteína/µl) y F3G50 (20 µg de proteína/µl).	45

I. Introducción

El medio marino constituye una enorme fuente potencial de nuevas moléculas de origen natural. Este potencial es más importante por el hecho de que los organismos marinos han evolucionado en un medio físico y químico distinto al del medio terrestre. Al igual que los bosques, el mar ofrece una excepcional fuente de biodiversidad. La naturaleza sésil de muchos organismos marinos los ha obligado a generar sustancias químicas únicas, usadas para defenderse, reproducirse y comunicarse (Habermehl, 1981).

Las sustancias de origen marino que los organismos utilizan para defenderse o alimentarse pueden dividirse en tres categorías: toxina, veneno y ponzoña que pueden definirse como sigue. Una toxina es una sustancia pura, química y estructuralmente definida, principalmente proteína; capaz de causar un efecto fisiológico adverso en otro organismo vivo. Un veneno es una mezcla de péptidos y proteínas secretado por glándulas con células altamente especializadas; que se libera por medio de estructuras (colmillos, aguijones) en otros organismos. La ponzoña es un metabolito secundario producida por microorganismos, plantas y animales que al ser ingeridos por otros organismos les causa intoxicación (Hashimoto, 1979). El veneno y la ponzoña son mezclas que contienen componentes tóxicos y otras sustancias con diferentes actividades biológicas (Mebis, 2002).

Las toxinas marinas más potentes se encuentran en los phylla Cnidaria, Equinodermata, Annelida y Mollusca, de los cuales cada uno con sus clases y órdenes tienen especies que son tóxicas para vertebrados e invertebrados (Hashimoto, 1979).

En el campo de la química de productos naturales, la separación, purificación, caracterización y determinación estructural son procesos que se aplican necesariamente al metabolito aislado, en este caso la toxina. Las estructuras químicas más comunes encontradas en las toxinas marinas corresponden a: proteínas, péptidos, lípidos, pigmentos, alcaloides y compuestos sulfurados (Hashimoto, 1979).

La mayoría de las toxinas son específicas en sus sitios de acción, por esta razón se convierten en importantes herramientas biológicas. Entre las toxinas marinas se ha encontrado una variedad de compuestos capaces de ejercer acciones específicas y potentes a nivel de canales iónicos activados por voltaje o neurotransmisores. Estos productos poseen una gran diversidad estructural. La especificidad de sus efectos permite que sean empleados como reactivos biológicos en investigaciones biomédicas, como agentes

Aislamiento y purificación de compuestos neuroactivos bloqueadores de canales iónicos e inhibidores de la acetilcolinesterasa presentes en las toxinas de la anémona Lebrunia danae (Duchassaing & Michelotti, 1860).

terapéuticos o como modelos o arquetipos estructurales para la generación de familias de fármacos con mayor potencia o especificidad (Garateix *et al.* 2003).

II. Antecedentes

Phyllum Cnidaria

El phylum Cnidaria comprende un amplio grupo de animales integrado por medusas, anémonas, hidroides y corales; cuyo rasgo principal es la presencia de organelos especiales de ataque y de defensa, llamados nematocistos donde se alojan las toxinas (Halstead, 1988).

Los cnidarios son organismos marinos cuya distribución abarca la mayoría de los hábitats desde las zonas tropicales hasta el ártico y desde la zona intermareal hasta la zona pelágica. El phylum contiene más de 10000 especies, son organismos primitivos, carentes de órganos especializados ya que solo evolucionaron hasta la formación de tejidos. Estos organismos se componen básicamente de un saco digestivo rodeado de una red nerviosa, una región gonadal, una región muscular delgada y una pared de protección (Meglitsch, 1978). Las características más notables de los cnidarios son la simetría radial primaria en torno al eje oral-aboral derivado de un eje primario de la gástrula o simetría birradial con el desarrollo de un plano sagital, manteniendo caracteres radiales externos; cuerpo formado por tres capas, la epidermis externa, la gastrodermis y una mesoglea; una cavidad del cuerpo, el celenterón, que deriva del intestino primitivo y una abertura, la boca, procedente del blastoporo; casi siempre existen una o más coronas de tentáculos alrededor de la boca; ausencia del aparato excretor y respiratorio; presencia de un aparato neurosensorial compuesto de una red nerviosa formada de protoneuronas y de varios tipos de células sensoriales, a veces reunidos en órganos sensoriales especiales; una marcada tendencia al polimorfismo. En los cnidarios se observan dos tipos morfológicos distintos, el medusoide o de forma medusa, que presenta el esquema del cuerpo típico de los cnidarios adaptado a nadar libremente, y la forma polipoide o hidroide adaptada a la vida sésil (Fig.1); órganos especiales de ataque y de defensa, llamados nematocistos (Fig. 2), formados por células intersticiales (Meglitsch, 1978).

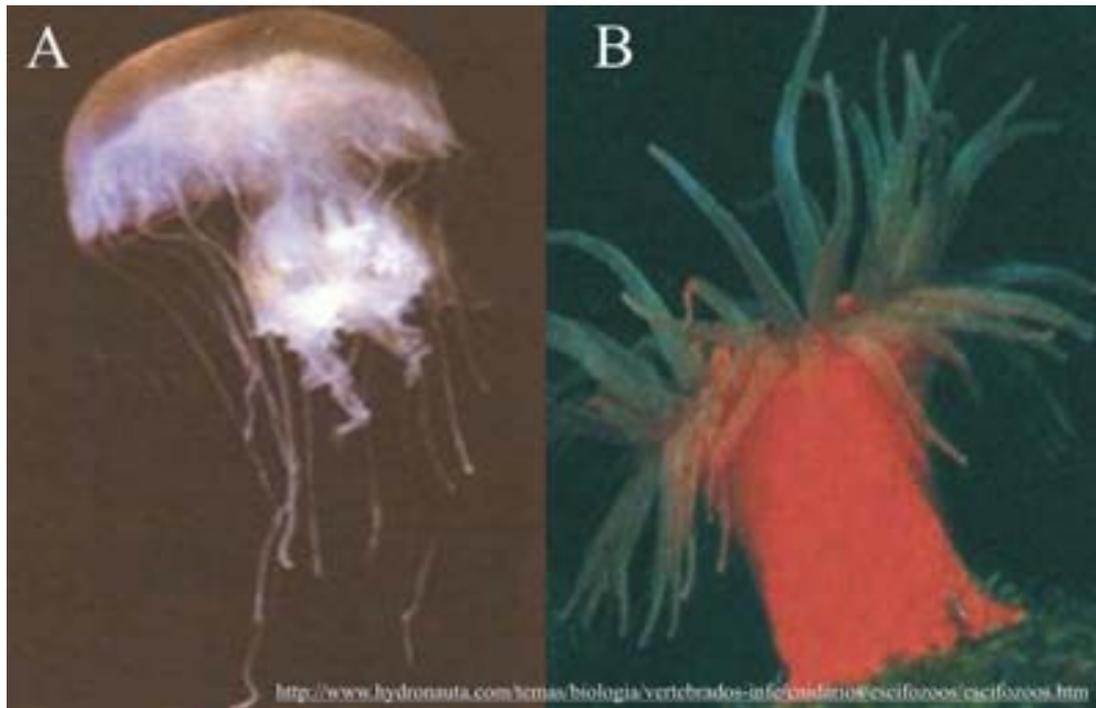


Fig. 1 Tipos morfológicos de cnidarios, el medusoide (A) o de forma medusa de los cnidarios adaptado para nadar libremente, y la forma polipoide o hidroide (B) adaptada para la vida sésil.

La mayoría de las toxinas producidas por cnidarios son mezclas complejas de polipéptidos y enzimas de diferente peso molecular, los cuales son tóxicos en humanos, de manera sistemática para el funcionamiento del organismo y/o local con la zona de contacto (epidermis). Estos compuestos tienen importancia médica y presentan una o más actividades biológicas como: efecto miotóxico sobre corazón, efecto sobre la vascularización pulmonaria o vascularización sistemática, efectos dermatonecroticos; efectos hemolítico y neurotóxico *in vitro*. Estas actividades están asociadas a problemas alérgicos y en algunos casos hasta la muerte (Torres y Aguilar, 2003).

Nematocistos

Los cnidarios al carecer de un sistema muscular y nervioso apropiado para atrapar presas con sus tentáculos, emplean un agente inmovilizador y la presencia de nematocistos que sujetan la presa a los tentáculos, esto los convierte en carnívoros a pesar de ser animales de movimientos lentos. La presencia de estructuras como los nematocistos, característica exclusiva de los cnidarios a la que se asocian su toxicidad, les permite atrapar a sus presas, ya que éstos aturden, paralizan o matan a la presa o enemigo,

envuelven el alimento y lo sujetan con los tentáculos. Las toxinas se alojan en los nematocistos, por lo tanto éstos juegan un papel importante en la defensa y captura de presas, dichas toxinas tienen un efecto paralizante en crustáceos y peces (Halstead, 1988).

La presencia de nematocistos, les permite a estos organismos garantizar su supervivencia en el medio y enfrentar sus necesidades vitales. A partir de tejidos ricos en nematocistos localizados en tentáculos y filamentos gástricos, así como del resto del cuerpo, se han obtenido diferentes toxinas peptídicas (Aneiros *et al.*, 1993; Goudet *et al.*, 2001; Loret *et al.*, 1994). Los cnidocitos son células especializadas exclusivas de los cnidarios; son células redondeadas con el núcleo en posición basal y un gran organelo característico llamado nematocisto (cápsulas filiformes). El cnidocisto tiene más de 100 μm , en posición apical; cuando esta célula intersticial comienza a segregar un nematocisto se le llama cnidoblasto; el cual se fija a la mesoglea y extiende su extremo distal hacia la superficie epidérmica. Al madurar el nematocisto, desarrolla un cnidocilo, un flagelo muy modificado a modo de pelo rígido que capta los estímulos que desencadenan la descarga.; En el citoplasma se forman unas fibras, algunas de las cuales servirán de soporte, pero otras se consideran contráctiles y al menos en algunos cnidarios, ayudan a la descarga de los nematocistos (Halstead, 1988).

Cada nematocisto está constituido por una cápsula, su contenido amorfo, un opérculo que la cierra y un filamento enrollado en su interior que con frecuencia está erizado de espinas (Fig. 2). En los cnidarios han sido descubiertos al menos 18 tipos de nematocistos de formas diferentes. Los nematocistos son especialmente abundantes en los tentáculos y alrededor de la boca (Williamson *et al.*, 1996).

Cuando el nematocisto se descarga, el filamento se evagina y el contenido de la cápsula se elimina. La descarga ocurre cuando el nematocisto experimenta un estímulo químico o mecánico que detecta el cnidocilo, se abre el opérculo, el agua atraviesa la pared de la cápsula aumentando la presión interna y se produce la evaginación del filamento. El filamento se clava en la piel de la víctima o depredador e inyecta el líquido venenoso contenido en la cápsula. Los filamentos tubulares de los nematocistos, pueden enlazar presas, arponearlas o paralizarlas. Los nematocistos son efectores independientes y no necesitan estímulos nerviosos para su acción (Williamson *et al.*, 1996).

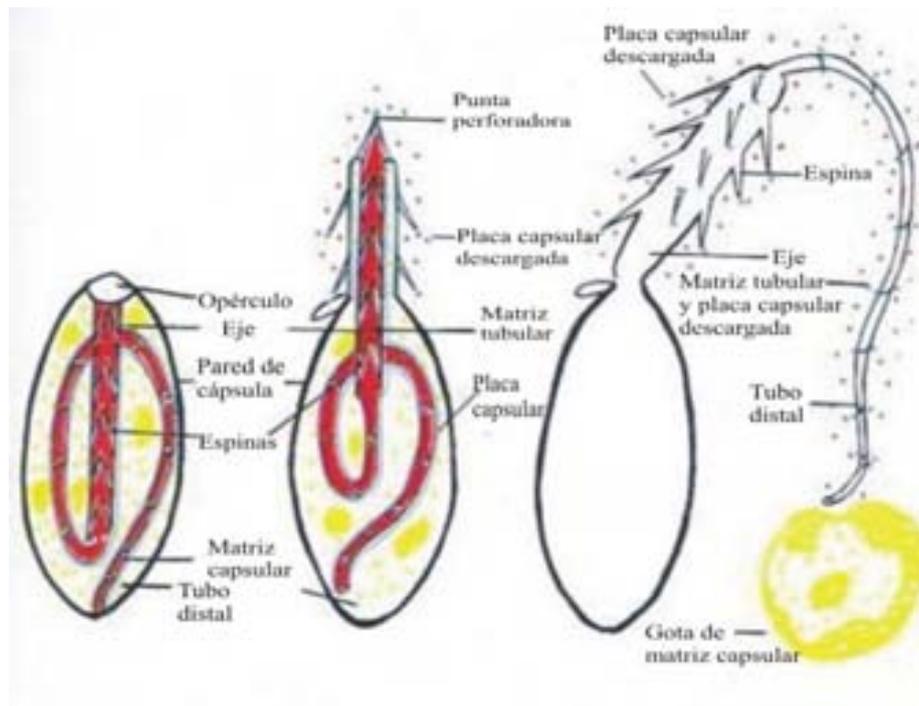


Fig. 2 Estructuras internas y externas de un nematocisto. Fases del mecanismo de descarga de un nematocisto (Williamson *et al.*, 1996).

Los nematocistos se extienden por toda la epidermis y básicamente tienen tres tipos funcionales: los que penetran en la presa e inyectan el veneno (penetrantes); los que envuelven y enredan a la presa (envolventes); y los que secretan una sustancia adhesiva utilizada en la locomoción y fijación (aglutinantes) (Kass-Simon y Scappaticci, 2002).

Anémona Lebrunia danae

La anémona *Lebrunia danae* pertenece a la subclase Zoantharia, familia Aliicidae del orden Actinaria. Las características principales de este orden son: permanencia de la fase pólipo a lo largo de toda su vida; presentan una simetría primaria radial, biradial o radio bilateral; esencialmente compuestas de dos capas epiteliales y una cavidad interna gastrovascular o celenterón; la mayoría tiene un cuerpo cilíndrico corto y la cavidad oral rodeada de un número variable de tentáculos (Halstead, 1988). Un esófago muscular cuelga de la boca hacia la cavidad gastrovascular donde se conecta con las paredes del cuerpo por una serie de divisiones verticales llamada mesenterios. Los tentáculos poseen nematocistos y glándulas adhesivas; los primeros están colocados en los tentáculos marginales; las

glándulas adhesivas al igual que los nematocistos, se encuentran en los tentáculos. La mayoría de las especies son sésiles y viven adheridas a objetos o diferentes tipos de sustrato, sin embargo, éstas pueden moverse si las condiciones del ambiente no son favorables, se deslizan con el disco basal (pedal) logrando moverse unos pocos milímetros por día (Hall y Strichartz, 1990).

La especie *Lebrunia danae*; se distribuye en el Atlántico desde Bermuda hasta el sur de Brasil, se le localiza cerca de arrecifes coralinos a una profundidad que varía de 2 a 40 metros. Esta especie tiene como característica principal dos tipos de tentáculos, primarios y secundarios (Fig. 3). Los primarios son típicos de la mayoría de las anémonas mientras que los secundarios son distintivos de esta especie, en los cuales poseen algas unicelulares (zooxantelas), las cuales fotosintetizan azúcares para uso y suplemento de nutrientes. Estos azúcares podrían ser la mayor fuente de energía (Cunnigham y Goetz, 1996).



Fig. 3 *Lebrunia danae* (Duchassaing & Michelotti, 1860) (tomada de Deloach y Humnn, 2002).

Típicamente, esta especie de anémona es de color café carmelita oscuro, con protuberancias café claro, se encuentra oculta en las grietas de las rocas o en sus bordes contra el sustrato arenoso (Herrera-Moreno y Betancourt Fernández, 2002). Los tentáculos primarios son café con luces azules; el secundario es corto y presenta vesículas pequeñas al final de éste (Fig. 4) (Guzmán y Guevara, 1998).



Fig.4 *Lebrunia danae* “branching anemone” (Osmond, 2003).

Presentan un disco basal amplio; columna lisa en la parte superior; justo debajo de los tentáculos, los especímenes jóvenes presentan de 4-8 divisiones grandes y pobremente ramificados; los adultos están fuertemente ramificados y en los tentáculos presentan vesículas que contienen nematocistos mastigoforos microbásicos y macrobásicos (Fig. 5). El tallo tiene bandas longitudinales de músculo endodermal alternando con músculos circulares. La parte superior de la columna presenta músculos longitudinales débiles y seis pares perfectos de mesenterios y varios imperfectos. Cnidocistos: espirocistos, basitrichous mastigoforo microbásico, mastigoforo ichobracios y macrobásicos (Calgren, 1949).



Fig. 5 Tres tipos de cnidocistos (espirocistos (A, aumento 100 x) y nematocistos: mastigóforo macrobásico (B, aumento 100 x) y microbásico (C, aumento 100x) encontrados en las secreciones de los tentáculos de la anémona *Lebrunia danae* (Cruz-Vázquez, 2004).

El estudio de las toxinas de origen marino y sus blancos moleculares

Los organismos marinos están sometidos a condiciones únicas, lo que ocasiona que sinteticen moléculas que no tienen equivalencia a las terrestres. Los grupos más estudiados son: esponjas, algas, moluscos, cnidarios, equinodermos, crustáceos, hongos y bacterias. Estas moléculas de origen marino poseen una gran diversidad estructural y además, son relativamente pequeñas y tienen propiedades similares a las de los fármacos, es decir pueden ser absorbidas y metabolizadas. La naturaleza química de las toxinas marinas es extremadamente variada y su especificidad es considerada que existe en varios niveles (Garateix, 2003).

El estudio de los mecanismos moleculares subyacentes al funcionamiento de los sistemas nervioso y cardiovascular, constituye una línea de investigación de gran interés dentro de la biología contemporánea. Los canales iónicos son esenciales para un amplio rango de funciones fisiológicas, incluyendo señalización neuronal, contracción muscular, ritmo cardíaco y la secreción hormonal entre otros (Castañeda, 2000).

Muchos de los compuestos peptídicos tienen como blancos moleculares, receptores importantes en los sistemas nervioso y cardiovascular. Ciertas características de los péptidos los convierte en constituyentes ideales de toxinas y venenos; pueden ser moléculas conformacionalmente estables; una vez que son inyectados en el cuerpo de la víctima, pueden difundir por el organismo hasta que se unen a sus receptores blanco donde muestran una alta especificidad debido a su complejidad estructural. Dependiendo de su tamaño, estabilidad e interacción con los blancos moleculares, los péptidos pueden actuar rápido, con potencia y especificidad, lo cual es altamente deseable para los compuestos de uso terapéutico (Garateix *et al*, 2003).

La interacción de las toxinas de origen marino con la membrana celular puede ser de dos tipos (Torres-Ramos, 2001):

- 1) Con receptores y/o canales iónicos. Bloquean o alteran la comunicación celular que se lleva a cabo a través de la sinapsis química (Fig. 6).
- 2) Con las citolisinas que interactúan con los lípidos que componen la membrana celular, alterando la permeabilidad.

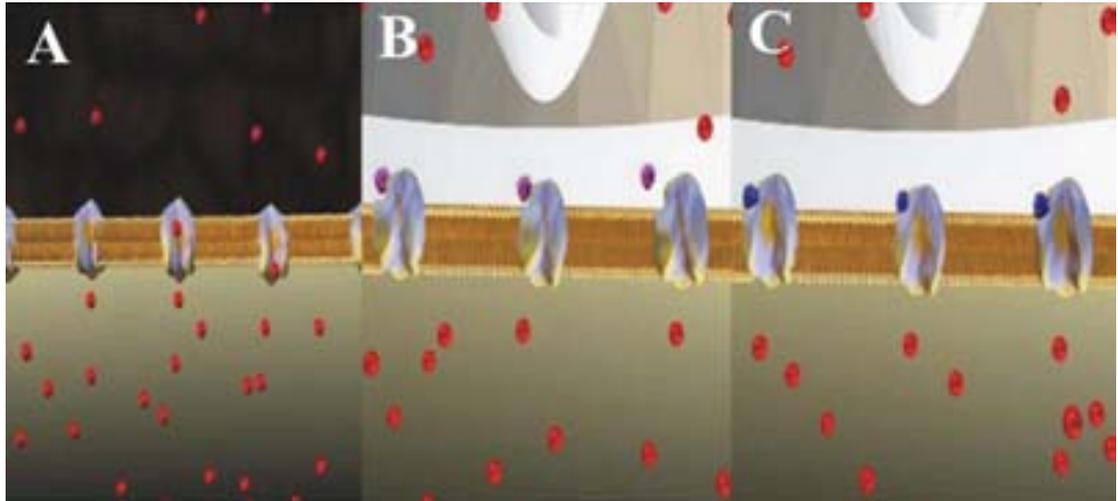


Fig. 6 Flujo de iones a través de canales de membrana (A); interacción de la toxina en el canal (bloqueo del flujo de iones (B)) y alteración del flujo de iones a través de la membrana debido a la presencia de la toxina en el canal (C)) (OpusXpress, 2000)

Ambas interacciones con la membrana celular, las convierte en herramientas de investigación y moléculas claves para elucidar diferentes procesos fisiológicos celulares gracias a su alta selectividad y potencia para identificar, purificar y caracterizar proteínas de membrana que ayudarán a entender detalles moleculares de su estructura y función (Torres-Ramos, 2001).

Cerca de 40 tipos de polipéptidos tóxicos se han encontrado en organismos marinos. Muchas de estas toxinas son extremadamente efectivas a bajas concentraciones en sus acciones, afectando un proceso o receptor. Las toxinas de anémonas y gasterópodos como *Conus*, han atraído la atención sobretodo en pruebas moleculares de canales iónicos. Las toxinas se involucran generalmente en el bloqueo de los sistemas responsables de locomoción, circulación o coordinación central en la presa. En esencia las toxinas atacan mecanismos que son críticos en la locomoción de las presas, estos mecanismos en vertebrados son fácilmente identificados. La activación de locomoción del músculo esquelético depende críticamente de la transmisión de axones, liberación de neurotransmisores, recepción de estos, transducción y finalmente contracción de la presa. Los mecanismos de contracción se encuentran debajo de la membrana celular y por lo mismo es un sitio adecuado para la acción de toxinas (Kem, 1988)

Lo anterior describe el potencial de una toxina de origen marino; ya sea por el hecho de que ésta puede aplicarse como un fármaco para diferentes patologías, o bien, ser útil como herramienta biológica para esclarecer parte de los procesos fisiológicos.

Toxinas de anémonas

La primera extracción de toxinas de anémonas la realizó el fisiólogo francés Charles Richet en 1903, de la especie *Anemonia sulcata*, obteniendo dos sustancias, la talasina y la congestina (Béress *et al.*, 2000). Shapiro (1968), reportó la primera purificación de una toxina, extraída de los tentáculos de la anémona *Condylactis gigantea*.

Un estudio sistemático consagrado al aislamiento y caracterización de las toxinas de anémonas, especialmente de *Anemonia sulcata* fue iniciado por L. Béress y R. Béress en 1966-1967 en la estación zoológica de Nápoles. Este trabajo reporta la purificación parcial de dos toxinas, toxina I (ATX I) y toxina II (ATX II). Ambas son polipéptidos de peso molecular medio (5000 MW) con efecto paralizante en cangrejos (*Carcinus maenas*) y mamíferos (ratones). Los métodos de purificación se perfeccionaron a partir de 1974, obteniendo una tercera toxina (ATX III). Usando las mismas técnicas de aislamiento, Béress y Zwick (1980) obtuvieron cuatro toxinas de *Condylactis aurantiaca* (CTX I, II, III y IV) y dos de *Bolocera tuediae* (BTTX I y II) (citados en Béress *et al.*, 2000).

Norton *et al.* (1976), purificaron la toxina APC de la anémona del Pacífico, *Anthopleura elegantissima* y otras cuatro de *Heractis magnifica* previamente llamada *Radianthus paumotensis*. Mebs y Gerbauer (1980), también aislaron polipéptidos biológicamente activos en la anémona *Stoichactis sp.*, los cuales presentaron actividad hemolítica e ictiotóxica.

De otras anémonas se han aislado toxinas de alto peso molecular como la equinotoxina, una toxina citolítica de *A. equina*. Las toxinas aisladas de muchas especies de anémonas (Actiniaria) son conocidas por ser citotóxicas y citolíticas (Kem, 1988; Maček, 1992; Maček *et al.*, 1994). Las equinatoxinas (EqTx) I, II y III, aisladas de la anémona *Actinia equina*, son proteínas de peso molecular aproximado de 20 kDa (Maček y Lebez, 1988). La Eq-Tx-II fue secuenciada (Belmonte *et al.*, 1994), clonada y expresada en bacterias (Anderluh *et al.*, 1996). Altas concentraciones de Eq-Tx-II causan lisis celular (Maček y Lebez, 1981, Batista *et al.*, 1990), mientras que a bajas concentraciones se reportan efectos en corrientes iónicas de membranas excitables. La Eq-Tx-II bloquea

corrientes de sodio e incrementa la conductancia en fibras de músculo esquelético, (Suput, 1986); también se reportan alta selectividad por bloqueo de corrientes de potasio dependientes de voltaje (Suput *et al.*, 1987); formadora de poros en membrana celular (Zorec *et al.*, 1990; Belmonte *et al.*, 1993; 1994; Pederzolli *et al.*, 1995) y causante de paro cardiorespiratorio (Bunc *et al.*, 1999). Todos estos resultados sugieren que esta toxina tiene una acción inhibitoria en el sistema nervioso central. Se ha encontrado que a concentraciones bajas estas toxinas, estimulan el corazón de mamíferos con un índice terapéutico más favorable que las drogas utilizadas actualmente para problemas cardíacos; estas toxinas tienen un peso molecular aproximado de 2 700 a 7 000 Da y existe una especial atención en el efecto inotrópico que producen en el músculo cardíaco y su uso potencial en el tratamiento de cardiopatías (Béress *et al.*, 2000).

A partir de diversas especies de anémonas se han aislado dos tipos fundamentales de toxinas con acción sobre canales iónicos: las que actúan sobre los canales de sodio y las que tienen como blanco los canales de potasio. La mayoría de las neurotoxinas de anémonas que han sido investigadas electrofisiológicamente, inhiben procesos en canales de sodio, prolongando el potencial de acción.

Las toxinas de anémonas afectan de forma diferencial a canales de sodio de distintas células de especies animales. La toxina de escorpión y algunas de las toxinas tipo II de otras anémonas no tienen este poder discriminante (Frelin *et al.*, 1984, citados en Béress *et al.*, 2000) y generalmente son polipéptidos con actividad hemolítica. Otra clasificación con base en su estructura primaria, las divide en cuatro categorías: tipo I incluye péptidos de las anémonas del género *Actinidae*; tipo II compuesto por toxinas de las especies de *Stichodactyla*; tipo III representado por *Calliactis parasitica*; tipo IV definida por toxina II de *Balocera tuediae*. Los péptidos que pertenecen al primer tipo se subdividen por el número de residuos aminoácidos en: largo (54); intermedio (46 a 49) y corto (27 a 31). Estructuralmente las toxinas tipo II carecen de un residuo N-terminal, poseen tres residuos ácidos consecutivos en las posiciones 6-8 y cuatro residuos básicos consecutivos en el C-terminal, generalmente presenta un residuo de tipo triptófano simple en la posición 30. Las secuencias homologas de aminoácidos en polipéptidos de anémonas han sido elucidadas y todos presentan uniones disulfuro. Las toxinas que actúan en canales de potasio, se dividen en tres tipos: tipo I incluye péptidos de la especie *Actinidae*; tipo II de *Stichodactyla* y tipo

III definido por la toxina de *Metridium senile* (Norton, 1991; Kem *et al.*, 1990; Kem, 1988; Norton, 1998).

La diferencia entre las toxinas de tipo I y II de la anémona *Condylactis aurantiaca*, se encuentra en la estructura que les da carácter hidrofóbico, las toxinas tipo II son más hidrofóbicas que las tipo I; ambas toxinas son de peso molecular medio (5 kDa) (Béress *et al.*, 2000). Las toxinas tipo III, son proteínas básicas y se encuentran en un intervalo de peso molecular que va de 2933 a 5630 Da.

La investigación sobre la estructura y función de péptidos de anémonas fue iniciado por Barhanin y colaboradores (1981, citados en Béress *et al.*, 2000) quienes mostraron que el sitio responsable de la fijación de ATX II al canal de sodio es distinto al sitio responsable para la toxicidad de estos péptidos. Las toxinas con acción sobre canales de Na⁺ son polipéptidos con 3 puentes disulfuro y con un peso molecular aproximado de 5 kDa. Debido a la especificidad y potencia de sus acciones en tejido muscular y nervioso constituyen instrumentos valiosos en la caracterización estructural y funcional de estos canales (Catterall, 2000; El-Sherif *et al.*, 1992; Rathmayer, 1976). Estas toxinas son cardiotoxicas y neurotóxicas, producen retraso en el proceso de inactivación de la corriente de Na⁺ y prolongan los potenciales de acción. Catterall y Béress (1988; citados en Béress *et al.*, 2000), demostraron que la toxina II de *Anemonia sulcata* (As II) se une, al igual que la α -toxina de escorpión, al mismo sitio del canal de sodio. Aunque estas observaciones han sido corroboradas por otros investigadores, no se asegura con certeza que exista una equivalencia con el sitio de unión de As II y α -toxina de escorpión. Salgado y Kem (1992), evaluaron el efecto de tres neurotoxinas, estructuralmente diferentes, de las anémonas *Stichodactyla helianthus*, *Condylactis gigantea* y *Calliactis parasitica*, en los canales de sodio de crustáceos e insectos. Los resultados indican que las tres toxinas son particularmente tóxicas para los crustáceos, moderadamente tóxicas para insectos mientras que en mamíferos no se observó un efecto de toxicidad. Estas toxinas prolongan e inhiben la fase de inactivación de las corrientes iónicas durante la despolarización, estabilizando el canal cuando está abierto sin afectar el proceso de activación (Catterall, 1984).

En relación con los canales de potasio, recientemente se encontró una nueva clase de toxinas bloqueadoras de estos canales a partir de diferentes especies de anémonas como *Bunodosoma granulifera* (Aneiros *et al.*, 1993, Loret *et al.*, 1994), *Stichodactyla helianthus* (Castañeda *et al.*, 1995), *Anemonia sulcata* (Schweitz *et al.*, 1995) y *Heteractis magnifica*

(Gendeh *et al.*, 1997) que no guardan homología, desde el punto de vista estructural, con otras toxinas que actúan en canales de potasio. Estas toxinas están constituidas por alrededor de 31 a 39 aminoácidos y presentan 3-4 puentes disulfuro. Actúan como bloqueadores de los canales de K^+ uniéndose a un sitio receptor localizado en la cara extracelular del canal e impidiendo el paso de iones. *Bunodosoma granulífera* ha sido fuente de algunos agentes bioactivos entre los que se encuentran los péptidos BgII y BgK. BgII actúa como neurotoxina (Loret *et al.*, 1994) y como cardiotoxina (Goudet *et al.*, 2001). BgK, es un péptido de 37 aminoácidos que contiene 3 puentes disulfuro y pertenece a un nuevo tipo de toxinas polipeptídicas bloqueadoras de canales de K^+ (Kem *et al.*, 1999). En ovocitos de *Xenopus* sp, BgK bloquea casi con igual potencia (6 a 15 nM) los canales tipo Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.3 mientras que los canales Kv3.1 son insensibles incluso a concentraciones de 0.125 μ M de toxina (Cotton *et al.*, 1997). Castañeda *et al.*, (1995) analizaron la toxina de *Stichodactyla helianthus*, encontrando actividad bloqueadora de canales de potasio. Después de analizar la toxina de esta especie, determinaron que no existía homología con otros péptidos bloqueadores de canales de potasio de anémonas como el caso de *Bunodosoma granulífera*.

En relación a las características químicas de las toxinas de anémonas, Béress *et al.* (2000), afirman que las secuencias de aminoácidos de la mayoría de las toxinas de anémonas han sido elucidadas, encontrándose que éstas son homólogas, todas interconectadas por tres puentes disulfuro que estabilizan la estructura de la molécula. Con base en su peso molecular y algunas propiedades farmacológicas, las toxinas bloqueadoras de canales de sodio, se clasifican en cuatro grupos (Alsen, 1983, citado en Béress *et al.*, 2000):

- 1) Polipéptidos de carácter básico con peso molecular aproximado de 3000 Da.
- 2) Polipéptidos con peso molecular aproximado de 4000 y 6000 Da. Estos dos grupos incluyen toxinas que actúan en canales de sodio activados por voltaje.
- 3) Polipéptidos con peso molecular aproximado entre 600 y 7000 Da; este grupo incluye inhibidores de proteasas y presentan homología con otros inhibidores de proteasas aislados de mamíferos.
- 4) Polipéptidos mayores a 10000 Da, estos compuestos son principalmente citolisinas.

Anderluh y Maček (2002) afirman que en más de 32 especies de anémonas se ha reportado la presencia de péptidos y proteínas que mostraron efecto citolítico letal. Basado en su estructura primaria y propiedades funcionales, las citolisinas han sido clasificadas en cuatro grupos:

- Grupo I, consiste en péptidos de 5-8 kDa, con actividad antihistamínica; representando por las toxinas de las anémonas *Tealia felina* y *Radianthus macrodactylus*.
- Grupo II, comprende proteínas básicas de 20 kDa, formadoras de poros inhibidas por esfingomielina. Ejemplos de estas son las: Equinotoxinas, sticolisinas y magnificalisinas de *Actinia equina*, *Stichodactyla helianthus*, y *Heteractis magnifica*, respectivamente, las cuales se caracterizan por presentar pesos moleculares entre 15 y 20 kDa. Entre ellas son muy similares pero exhiben diferencias individuales.
- Grupo III, comprende citolisinas de pesos moleculares de 30-40 kDa, con o sin actividad en fosfolipasas A₂; se encuentran en *Aiptasia pallida* (Familia Aiptasiidae)
- Grupo IV, representado por una sola citolisina de 80 kDa, nombrada metridiolisina, aislada de la especie *Metridium senile* (fam. Metridiidae). Es una proteína ácida que tiene un punto isoeléctrico cerca de 5; es termolábil e inactiva frente a enzimas proteolíticas. Presenta fuerte actividad hemolítica en eritrocitos de mamíferos a un pH óptimo entre 5 y 6. La toxicidad de metridiolisina es inhibida por colesterol a bajas concentraciones (Bernheimer, 1990).

Además de la identificación de las sustancias bioactivas, se han propuesto diferentes métodos para la extracción de las toxinas. Malpezzi *et al.* (1993), utilizaron un método de estimulación eléctrica para obtener el veneno puro de la anémona *Bunodosoma caissarum*, sin sacrificarla. Mediante esta técnica se aislaron las toxinas con bajos niveles de contaminación por otras sustancias del cuerpo de la anémona; el organismo sobrevivió para posteriores extracciones de toxina y finalmente fue regresada a su hábitat. Con este método se identificaron tres neurotoxinas con actividad hemolítica y neurotóxica.

Importancia de las neurotoxinas de anémonas como herramientas para el estudio del sistema nervioso central.

Acción de las neurotoxinas de anémonas a nivel de receptores y/o canales iónicos

Uno de los mecanismos de acción más importante, utilizados por las neurotoxinas marinas, es el bloqueo o modificación de las células de comunicación, principalmente a través de la sinapsis de células excitables. La interacción de las neurotoxinas con canales iónicos y receptores, puede modificar funciones neuronales y musculares. Bloqueando la sinapsis, ocurre una rápida parálisis de la presa o depredador, lo cual es muy importante para organismos sésiles o de poco movimiento como los cnidarios (Torres y Aguilar, 2003)

El sistema nervioso está involucrado en el control de todos los procesos fisiológicos, y la mayoría de las toxinas son neurotoxinas que actúan sobre los diferentes mecanismos de la actividad nerviosa. La mayoría de las toxinas, son proteínas y sustancias de bajo peso molecular, peptídicas o no, que tienen como sitio blanco de acción general las enzimas, los receptores, los canales iónicos y las membranas. Las toxinas de anémonas actúan sobre los canales de las membranas. Otro sitio específico para la acción de toxinas son los receptores para neurotransmisores vitales para locomoción. En vertebrados la mayor estrategia es el receptor de la acetilcolina (Martínez-Martos *et al.*, 1998).

El proceso de señalización en una célula nerviosa implica la acción coordinada de canales iónicos selectivos en la membrana celular. Estos canales están constituidos por proteínas de membrana que funcionan como poros para iones particulares. En respuesta a un estímulo adecuado, por lo general un cambio en la diferencia de voltaje a través de la membrana, estas proteínas sufren un cambio conformacional que conduce a la apertura o cierre del poro. Existe, por tanto una alteración transitoria de la permeabilidad de la membrana para determinados iones. Los iones fluyen a través de estos canales en un gradiente electroquímico y la corriente resultante dispara una variedad de respuestas fisiológicas. En el proceso de señalización excitatoria en las neuronas, los iones implicados son Na^+ , K^+ y Ca^{+2} . Los canales específicos para estos iones generalmente se abren o se cierran, en respuesta a las variaciones del potencial de membrana y por tanto se refieren como canales dependientes de voltaje. Estos canales no están uniformemente distribuidos en las neuronas (Castañeda, 2000).

El primer hallazgo de neurotoxinas marinas con acción específica sobre canales iónicos fue el de la tetradotoxina (TTX), un alcaloide obtenido a partir del pez japonés de la

familia Tetradontidae, que fue capaz de bloquear la permeabilidad al Na^+ en axones gigantes de langosta (Narahashi, 1974).

De modo general, existen tres acciones básicas de las toxinas sobre los canales de Na^+ (Castañeda, 2000):

- A) Toxinas que bloquean canales,
- B) Toxinas que afectan la activación del canal
- C) Toxinas que afectan la inactivación del canal.

Existe un grupo de toxinas de naturaleza proteica cuyo efecto fundamental es retardar el proceso de inactivación de los canales de Na^+ , por lo cual el canal permanece abierto durante más tiempo. Esto provoca un incremento notable en la excitabilidad de nervios y músculos, como consecuencia del aumento en la liberación de acetilcolina desde las terminaciones nerviosas, en este grupo se incluyen las α toxinas de escorpiones presentes en los venenos de especies procedentes de África y América del Norte, así como las toxinas de anémonas. De la anémona *Anemonia sulcata*, se aisló una serie de polipéptidos análogos (ATX I, II, III y IV), de los cuales, el más abundante y activo en membrana de vertebrados es ATX II. Toxinas con propiedades similares han sido aisladas a partir de otras especies: *Anthopleura xantogrammica*, *Radianthus paumotensis*, *Condylactis gigantea*, *Heteractis macrodactylus*, *Phyllactis flosculifera*, *Stichodactyla giganteum* y *Stichodactyla helianthus*. Todas provocan actividad espontánea y repetitiva en axones y en músculo esquelético o cardíaco (Béress *et al.*, 2000).

El descubrimiento de algunas toxinas naturales como potentes agentes farmacológicos con acciones específicas sobre canales de K^+ a pesar de ser limitado, ha contribuido notablemente al conocimiento de las propiedades biofísicas y farmacológicas de estos canales, así como a la vinculación de estos a una gran diversidad de procesos fisiológicos (Castañeda, 2000). Hasta hace algunos años se pensaba que las anémonas eran fuente de toxinas exclusivamente con acción sobre canales de Na^+ (Norton, 1991), sin embargo recientemente las anémonas han atraído la atención como la primera fuente de toxinas de origen marino con acciones sobre los canales de K^+ . Estas toxinas han sido aisladas y caracterizadas a partir de varias especies de anémonas: *Bunodosoma granulifera* (Aneiros *et al.*, 1993; Cotton *et al.*, 1997), *Stichodactyla helianthus* (toxina denominada ShK, Castañeda *et al.*, 1995), *Heteractis magnifica* (Gendeh, 1997) y *Actina equina* (Minagawa *et al.*, 1998). Investigaciones preliminares sugieren que también se encuentran

presentes en los extractos totales de *Actinia bermedensis*, *Bunodosoma cangicum* y *Stichodactyla martensii* (Harvey *et al.*, 1995; Araque *et al.*, 1995). Todas las moléculas descritas hasta el presente con actividad de este tipo, en estas especies, son polipéptidos de carácter altamente básico que presentan seis residuos de cisteína con los cuales forman tres puentes disulfuro (Pohl *et al.*, 1995). Las más pequeñas: BgK, ShK, AsKS, HmK están formados por 35-37 residuos de aminoácido, mientras que las mayores: AsKcS, están formados por 58-59 residuos. Estas toxinas representan una nueva clase estructural de péptidos bloqueadores de canales de K⁺ que presentan poca similitud estructural con compuestos de actividad similar descritos a partir de otras especies e incluso entre las diferentes especies de anémonas entre sí. Por estas razones, la diversidad de peso molecular y estructura, que se supone que existe nos permite aseverar que el estudio de las toxinas de las anémonas contribuirá de forma muy efectiva a una mejor comprensión de la fisiología de los canales de K⁺ (Castañeda, 2000).

Actualmente, se utilizan neurotoxinas para el diagnóstico y tratamiento de distintas patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y el Parkinson (Garateix 2003); su uso es posible debido a: su naturaleza peptídico, su lugar de acción (canales iónicos y/o receptores específicos para diversos ligandos), la cinética de unión a sus sitios receptores, su mecanismo de neutralización pero principalmente debido a la gran selectividad que presentan por canales iónicos y receptores propios del sistema nervioso central (SNC). De esta manera, las neurotoxinas suponen una herramienta de gran importancia para diferenciar las características funcionales de cada subtipo de receptor y/o canal iónico, cumpliendo con tres claros objetivos: el estudio de la estructura de las distintas isoformas de canales iónicos, sus características fisicoquímicas (con especial énfasis en su cinética de activación/inactivación) y el estudio de su fisiología (Martínez-Martos *et al.*, 1998).

Acción de la neurotoxinas de anémonas como inhibidores de acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) está unida a las membranas celulares de los tejidos excitables (conjunciones sinápticas, retículo endoplásmico, etc.) y está asociada a la conducción del impulso nervioso; los impulsos nerviosos se transmiten de un nervio a otro o de una célula nerviosa a un órgano o glándula por un proceso de transmisión química.

Cuando un impulso alcanza la terminación de un axón, se libera un compuesto químico, la acetilcolina (ACh), que se almacena en las finas ramificaciones de éste. La ACh entra en el espacio entre el axón y la célula nerviosa, músculo o glándula. Una vez producido el impulso, la ACh es destruida por AChE, lo cual permite que la membrana del músculo o nervio regrese a su estado de reposo, lista para recibir otro impulso (Politoff *et al.*, 1975, citado en Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2004).

La función de la acetilcolinesterasa es la hidrólisis rápida del neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis colinérgicas (Fig. 7). La reacción de hidrólisis procede por medio de un ataque nucleofílico al carbonilo de la acetilcolina, acilando la enzima y liberando la colina. Esto es seguido de una rápida hidrólisis de la enzima acilada produciendo ácido acético y la restauración del sitio activo (Wilson y Nachmansohn, 1950, citado en Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2004).

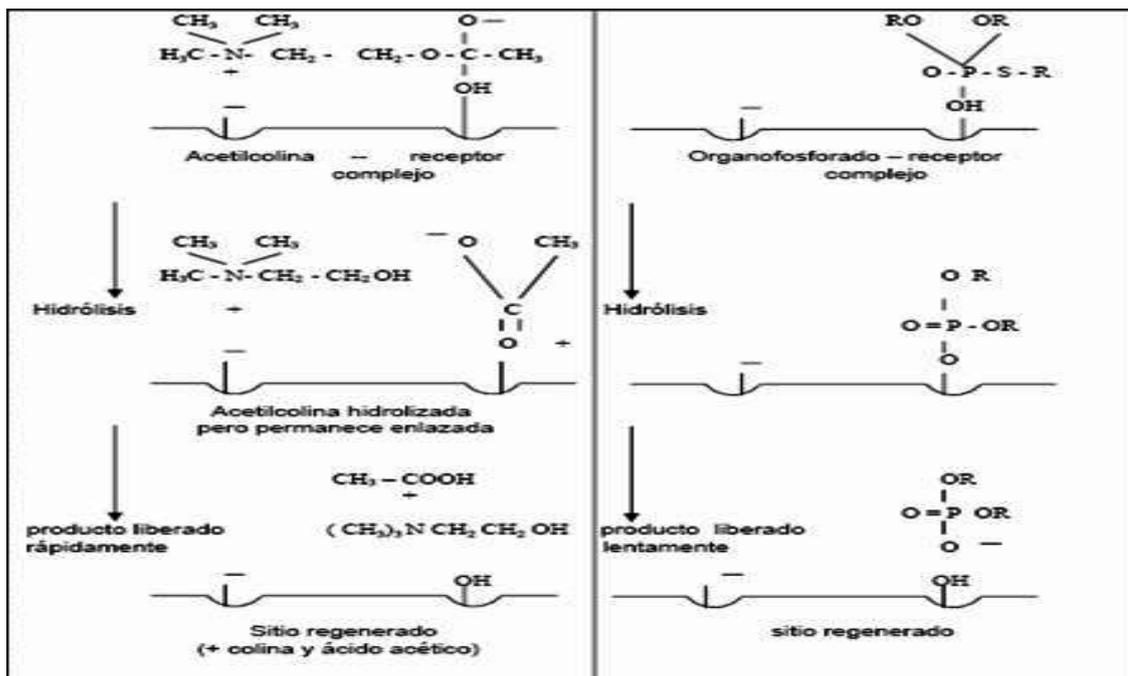


Fig. 7 Esquema de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina por la enzima acetilcolinesterasa.

La AChE se encuentra principalmente en el tejido nervioso y los eritrocitos de los mamíferos, aunque también se ha encontrado en bacterias, protozoarios, turbelarios, plantas primitivas y superiores (Roshina, 2001, citado en Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2004). La estructura tridimensional de la AChE ha mostrado que el centro activo de la

enzima se encuentra al fondo de un estrecho sitio catalítico. Los inhibidores de AChE que actúan sobre el centro activo impiden la unión de la molécula de sustrato o su hidrólisis ya sea bloqueando el sitio por su alta afinidad o reaccionando irreversiblemente con la serina próxima al centro catalítico. El sitio periférico es una zona más difusa, situada a la entrada del sitio activo, donde se unen preferentemente moléculas pequeñas o toxinas de tipo peptídico (Wessler *et al.*, 2001).

Las toxinas que actúan sobre el sistema de transmisión colinérgico pueden ser antagonistas o sinergistas de la acetilcolina. El mecanismo a través del cual se logran acciones facilitadoras en el sistema colinérgico consiste en inhibir la enzima que hidroliza la acetilcolina. Debido a esta acción, los agentes anticolinesterásicos producen una acumulación anormal de acetilcolina en la sinapsis que equivale a una estimulación colinérgica. Estas toxinas pueden incrementar la concentración de la acetilcolina en la sinapsis (Fig. 8), mediante tres mecanismos básicos (Castañeda, 2000):

- a) Acciones sobre canales iónicos, que prolongan la duración del potencial de acción y conducen a un incremento en la liberación de acetilcolina.
- b) Acciones que estimulan el mecanismo de producción de la acetilcolina.
- c) Inhibición de la hidrólisis de la acetilcolina.

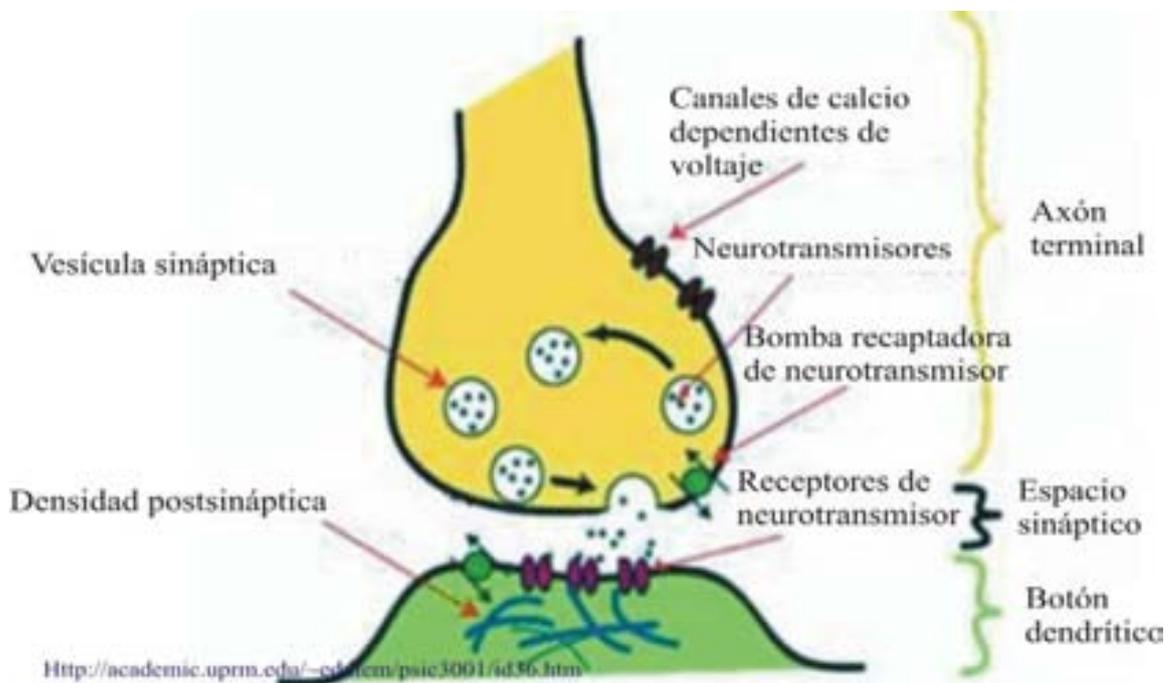


Fig. 8 Sinapsis colinérgica

Investigaciones sobre la base bioquímica de algunos venenos animales se han referido a algunas toxinas con actividad anticolinesterásica en especies poco relacionadas. La primera referencia de una toxina con actividad anticolinesterásica fue sobre la melitina, un polipéptido pequeño de 26 aminoácidos, aislado a partir del veneno de la abeja *Apis mellifera*, inicialmente por su actividad hemolítica (Habermann *et al.*, 1965), posteriormente se demostró que era capaz de inhibir la acetilcolinesterasa del tejido cerebral de larvas de *Drosophilla* (Herschel *et al.*, 1971, citado en Castañeda, 2000). Otras toxinas anticolinesterásicas de naturaleza peptídica han sido aisladas a partir de especies de serpientes, por ejemplo la atramina, a partir del veneno de las serpientes *Naja naja* y *Bungarus multicinctus* (Takechi y Tanaka, 1980). A partir de las secreciones del molusco *Onchidella binneyi* se aisló un compuesto que inhibe irreversiblemente la AChE. Los extractos de *Physalia physalis* y de las anémonas *Bunodosama granulifera* (Castañeda *et al.*, 1985) y *Condylactis gigantea* (Rivera *et al.*, 1987) inhibieron la acetilcolinesterasa sanguínea de ratones. Estos resultados indicaron que la toxicidad de estos extractos se debe, al menos en parte a la presencia de agentes anticolinesterásicos en estos celenterados. En la anémona *Stichodactyla helianthus* se aisló y purificó un principio anticolinesterásico a partir del extracto acuoso de esta especie; se trató de un compuesto no proteico de muy bajo peso molecular que ejerce una inhibición de tipo mixto frente a la acetilcolinesterasa eritrocítica humana (Karlsson *et al.*, 1991; Castañeda, 1996). La presencia de agentes anticolinesterásicos en extractos o secreciones procedentes de animales venenosos constituye hasta el presente, un hecho poco generalizado. Sin embargo, en las especies que los presentan, pueden considerarse que forman parte de la maquinaria defensiva de estos grupos (Castañeda, 2000).

Las toxinas con actividad colinérgica son poderosas herramientas que han permitido demostrar el papel clave de la acetilcolinesterasa estriatal en los mecanismos colinérgicos involucrados en el control de la conducta motora (Dajas *et al.*, 1991).

Otro ejemplo de la posible aplicación de nuevos inhibidores de la acetilcolinesterasa, es el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA), que es un proceso neurodegenerativo, lento y progresivo, clínicamente caracterizado por un paulatino deterioro de las funciones cognitivas e intelectuales, que se traduce en pérdida de memoria. La EA se explica con base en la hipótesis colinérgica que postula que los síntomas que presentan los pacientes son el resultado de la deficiente transmisión colinérgica y del

déficit en el nivel de neurotransmisores, principalmente acetilcolina. Esta hipótesis ha generado resultados con productos en clínica, efectivos en la mejora de la calidad de vida y capacidad intelectual en cortos espacios de tiempo. Entre los fármacos para restaurar la neurotransmisión colinérgica están los que actúan a nivel sináptico como los **inhibidores de la acetilcolinesterasa**, estos fármacos actúan sobre una consecuencia de la enfermedad (el déficit colinérgico) (Marco, 2002).

Finalmente el caso de la anatoxina-a, un alcaloide aislado de cianobacterias, bloquea la acetilcolinesterasa, lo que impide la degradación de la acetilcolina, dando como resultado la sobrestimulación de los músculos respiratorios. La anatoxina-a es un novedoso anticolinestarástico organofosforado que podría constituir la base de nuevos pesticidas, solubles en agua y biodegradables. Estos ejemplos constituyen una muestra de la contribución que pueden ofrecer las neurotoxinas como inhibidores de la acetilcolinesterasa en el estudio de procesos biológicos y diferentes patologías (Garateix, 2005).

Objetivo general

Aislar y caracterizar biológicamente y químicamente compuestos neuroactivos presentes en el extracto de crudo de la anémona *Lebrunia danae*

Objetivos particulares

- Determinar mediante el bioensayo en cangrejo, la presencia de neurotoxinas en el extracto crudo de *L. danae*.
- Separar y purificar neurotoxinas presentes en el extracto crudo de *L. danae*, mediante cromatografía de baja presión.
- Determinar mediante un bioensayo electrofisiológico y el empleo de técnicas de registro intracelular en ovocitos de *Xenopus laevis*, si las neurotoxinas aisladas actúan a nivel de receptores y/o canales iónicos
- Determinar la presencia de inhibidores de la acetilcolinesterasa en el extracto crudo de la anémona *L. danae*.
- Purificar los inhibidores de la acetilcolinesterasa presentes en extracto crudo de la anémona *L. danae* mediante cromatografía líquida de baja presión y HPLC.
- Realizar la caracterización biológica de las neurotoxinas aisladas del extracto crudo de *L. danae* de acuerdo a su efecto en el modelo pertinente.

Justificación

En estudios anteriores se demostró (Cruz-Vázquez, 2004) la presencia de potentes neurotoxinas y citolisinas en el extracto crudo de la anémona *Lebrunia danae*, las cuales no han sido investigadas con fines farmacológicos. Debido a la importancia que tienen las neurotoxinas como herramientas para el estudio del sistema nervioso y su aplicación en diversas patologías de este mismo. La presente investigación se pretende determinar los posibles mecanismos de acción que ejercen dichas neurotoxinas proponiendo dos vías; la primera de ellas consiste en evaluar si actúan a nivel de canales iónicos y/o receptores, y la segunda, en determinar si actúan como inhibidores de la acetilcolinesterasa. Los resultados obtenidos permitirán la caracterización biológica de las neurotoxinas aisladas en el extracto crudo de *L. danae* de acuerdo a su efecto en el modelo pertinente.

Hipótesis

La anémona *Lebrunia danae* produce neurotoxinas que actúan sobre el sistema nervioso central, con especificidad sobre canales de calcio y actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa. Esto representa el uso potencial de estas neurotoxinas para determinar mecanismos de acción en el sistema nervioso central.

Metodología

Área de recolecta

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, en el estado de Quintana Roo. Compreendida entre la barrera coralina y la línea de costa, tiene una extensión aproximada de 7 km. y una amplitud entre 350 y 1600 m; la profundidad varía entre 1 y 8 m. La laguna termina al sur donde se forman bancos arrecifales aislados. El arrecife está compuesto por corales escleractinios, gorgonáceos, y algas. La zona marina está dividida en laguna arrecifal, arrecife posterior, cresta arrecifal y arrecife frontal (Ruiz-Rentería *et al.*, 1998) (Fig. 9).

Los ejemplares de *Lebrunia danae* se recolectaron mediante buceo autónomo en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, en una zona llamada “*La Bocana*”, que es una entrada del arrecife frontal con una profundidad promedio de cuatro metros (Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1983). Los organismos se remueven del sustrato con cincel y martillo y se transportaron al laboratorio en bolsas de plástico.

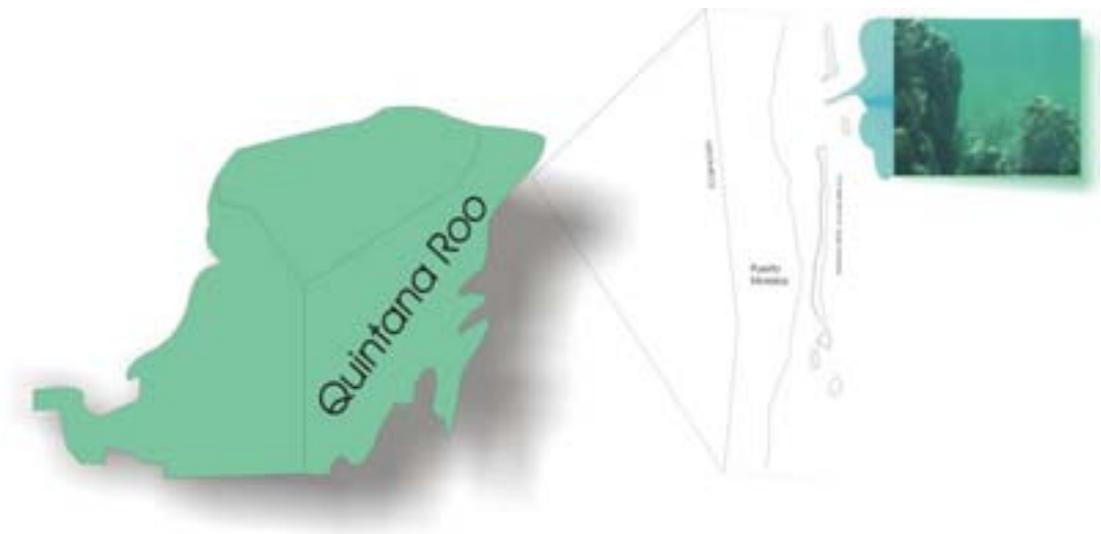


Fig. 9 Área de recolecta de ejemplares de la anémona *Lebrunia danae*

Obtención de extracto

La obtención del extracto crudo se realizó mediante el método modificado de Kem *et al.*, (1989) (ciclos de congelado y descongelado), que consistió en colocar el organismo en un recipiente con agua destilada a temperatura ambiente; posteriormente se extrajo para congelarlo a -60° C. Después de 30 minutos, se colocó nuevamente en el mismo recipiente con agua destilada para descongelarlo mediante agitación manual con una varilla de cristal. Este procedimiento se repitió en 3 ocasiones para obtener el extracto de la anémona.

Se realizó una preevaluación de la actividad del extracto crudo utilizando el bioensayo con cangrejos propuesta por Béress y Béress (1971) y enzimático para la búsqueda de inhibidores de acetilcolinesterasa (Ellman *et al.*, 1960, citado en Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2004), que se describen más adelante, con el fin de saber si el extracto presentaba actividad neurotóxica antes de iniciar la purificación.

Separación y Purificación

Cromatografía líquida de baja presión y HPLC.

Una vez evaluada la actividad del extracto, se procedió a la separación y purificación de las toxinas mediante el uso de cromatografía líquida de baja presión. Se utilizó gel Sephadex G-50 M y un gel de intercambio iónico. Para elegir el gel de intercambio iónico y la concentración del eluente que diera los mejores resultados, se realizó una prueba preliminar en tubos Eppendorf (a manera de microcolumnas) conteniendo un intercambiador catiónico (Fractogel EMD SO_2^- 650 M) y uno aniónico (QAE Sephadex A-25 M), y distintas concentraciones molares de acetato de amonio como eluente (Fig. 10).

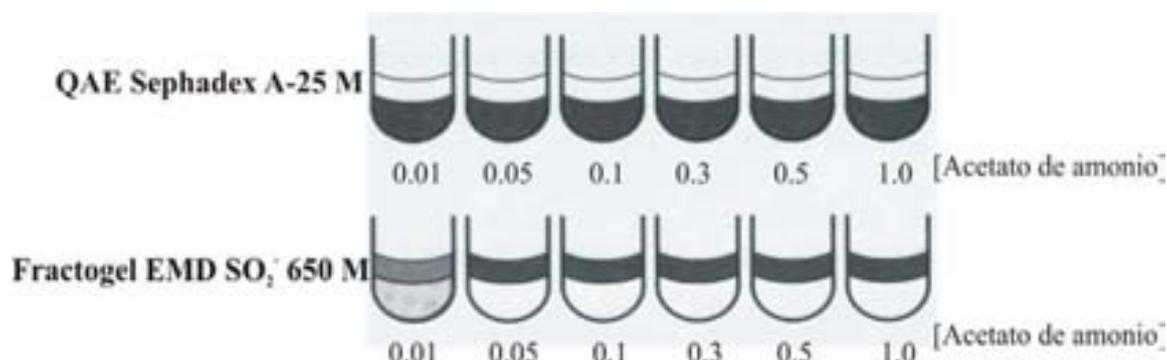


Fig. 10 Ensayo de microcolumnas para la selección de las condiciones de la purificación en gel de intercambio iónico.

Se agregó una muestra (4 µg proteína/µl) en cada uno de los tubos, se centrifugó y se tomó el sobrenadante para evaluarlo biológicamente mediante los bioensayos en cangrejo y la determinación de actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa. Con base en este ensayo preliminar, se eligió el gel QAE Sephadex A-25 como segundo paso para la purificación, utilizando un gradiente escalonado de 0.01 a 0.3 M de acetato de amonio como eluente.

La eliminación de sales y concentración de las fracciones con actividad biológica, se realizó mediante un dispositivo de ultrafiltración (Amicon) con una membrana de 1 kDa.

La fracción con actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa, acción neurotóxica en cangrejo y actividad sobre canales iónicos, se sometió al último proceso de purificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las soluciones amortiguadoras de elusión fueron acetonitrilo con 10 µM de ácido trifluoroacético (TFA) y agua con 10 µM TFA grado HPLC. Se utilizó un gradiente lineal de 10 a 90 % acetonitrilo/agua en corridas de 70 minutos, con una columna Nucleosil RP-100-5 C18, de 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5µm (Varian); módulo de distribución de disolventes ProStar (Varian), detector UV-VIS (Varian, longitud de onda 280 nm) y automuestreador ProStar (Varian).

Caracterización biológica

Bioensayo neurotóxico

La actividad neurotóxica del extracto crudo se evaluó mediante el bioensayo en cangrejo (Béress y Béress 1971). Para este bioensayo se recolectaron cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* (10-15 gramos) a los cuales se les inyectó en el tercer apéndice locomotor, 0.1 ml de soluciones de diferentes concentraciones de las fracciones primarias de la separación del extracto crudo en Sephadex G-50. Se registró el tiempo de respuesta observando reacciones de parálisis, estimulación continua de los músculos y muerte durante los primeros 60 minutos después de aplicar el extracto.

Determinación de la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa (AChE)

La actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa del extracto crudo y algunas fracciones parcialmente purificadas se determinó espectrofotométricamente de acuerdo al método de Ellman y colaboradores (1961). Se utilizaron 3 ml de solución amortiguadora

Tris 0.5 M /DTNB (ditio bis 2 ácido nitrobenzoico) a un pH de 7.4, 20 μ l de yoduro de acetilcolina 0.1 M (Sigma, USA) y 60 μ l de cada muestra. La reacción se inició al añadir 20 μ l de AChE (Sigma, USA). La actividad enzimática se monitoreó por dos minutos. Se determinó la actividad inhibitoria media (CI₅₀) expresada en unidades de inhibición, la cual se define como la cantidad de inhibidor a la cual se reduce la velocidad de hidrólisis de la acetilcolinesterasa al 50 %.

Análisis electrofisiológico en ovocitos de *Xenopus laevis*

Se utilizó la técnica electrofisiológica de control de voltaje con dos microelectrodos con el objetivo de medir la corriente transmembranal producida en el ovocito de *Xenopus laevis*, como respuesta a la actividad del extracto crudo y fracciones parcialmente purificadas de la anémona *Lebrunia danae*.

Los ovocitos se extrajeron de ejemplares maduros de la rana *Xenopus laevis* (Fig. 11). Para llevar a cabo la extracción de ovocitos se realizó una cirugía, los organismos se colocaron previamente en hielo durante 20 minutos para anestesiarlos. Por medio de pinzas se realizó la disección de 2 a 4 lóbulos ováricos los cuales se colocaron en cajas Petri con solución de Barth Normal que contiene las siguientes sales: NaCl 88 mM, KCl 1mM, NaHCO₃ 2.4mM, Ca(NO₃)₂ 0.33 mM, CaCl₂ 0.41 mM y MgSO₄ 0.82 mM, Hepes 5, ajustado a pH 7.4 con NaOH y suplementado con 70 μ g/ml de gentamicina.



Fig. 11 Ejemplar maduro de la rana *Xenopus laevis*

Posteriormente, los ovocitos se separaron uno a uno de los sacos ováricos y se colocaron nuevamente en solución de Barth normal. Se seleccionaron los ovocitos que se encontraban en los estadios finales de desarrollo V y VI (Dumont, 1972) (Fig. 12). Los ovocitos se mantuvieron a una temperatura de 18°C.

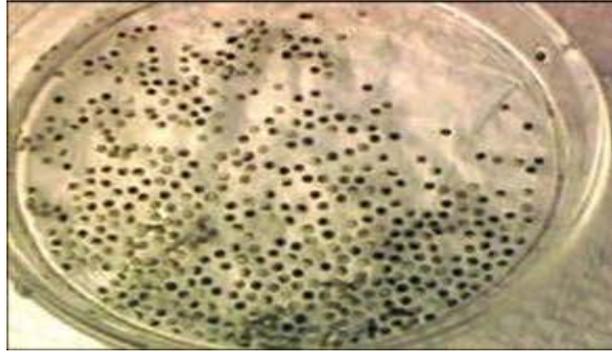


Fig. 12 Ovocitos de la rana *Xenopus laevis* en estadios finales de desarrollo V y VI

Microinyección de RNA mensajero

El siguiente paso fue microinyectar a los ovocitos con RNA mensajero extraído de cerebro de rata, para llevar a cabo la expresión de receptores y canales iónicos. Los ovocitos separados se colocaron y acomodaron sobre una malla puesta en el fondo de una caja de Petri. En cada ovocito se inyectaron 50 nl del RNAm por medio de un microinyector (Fig. 13).



Fig. 13 A) Microinyector utilizado para introducir el RNA mensajero de cerebro de rata en los ovocitos de *Xenopus laevis*. B) Microinyección de RNA en el ovocito de *Xenopus*

Las células se mantuvieron en solución de Barth normal a 18 ° C durante cuatro días, que es un tiempo necesario para permitir la expresión de los receptores y canales iónicos codificados por el RNAm (Fig. 14)



Fig. 14 Expresión de canales y receptores del RNA mensajero de cerebro de rata inyectado en ovocitos de *Xenopus laevis* (OpusXpress, 2000).

Desfoliculación

Para desfolicular los ovocitos se sometieron a un tratamiento enzimático con colagenasa (Tipo I sigma, 0.5 mg/ml) a temperatura ambiente durante 30 minutos en una solución de Ringer Normal (RN, que contiene NaCl 115 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1.8 mM, N[2-hidroxietil] piperazina-N ácido etanosulfónico (Hepes) 5, ajustada a pH 7.0 con NaOH). Posteriormente se lavaron con RN, y usando pinzas finas los ovocitos fueron desfoliculados removiendo las capas externas que los cubren con excepción de la capa vitelina. Las células se mantuvieron a 18° C en la solución fisiológica de Barth. Los registros control se realizaron en 3 ovocitos (ovocitos sin microinyección de RNA mensajero de cerebro de rata) para estandarizar los valores de potencial de membrana. Para el extracto crudo y las fracciones parcialmente purificadas se utilizó un ovocito (microinyectado con RNA mensajero de cerebro de rata) diferente en cada caso después de la exposición a las diferentes concentraciones.

Registro electrofisiológico

El registro de las corrientes iónicas se realizó a temperatura ambiente (22-25° C) empleando la técnica de control de voltaje en la configuración de célula completa. (Hamill *et al.*, 1981). Las pipetas de registro se fabricaron empleando capilares de borosilicato, utilizando para ello un estirador de pipetas (P80/Pc, Sutter); una vez llenas, tuvieron resistencias entre 0.9 y 2.5 MΩ.

En esta técnica electrofisiológica, uno de los microelectrodos intracelulares midió continuamente el potencial de membrana, mientras que el segundo inyectó la corriente necesaria para controlar el potencial en un valor preseleccionado a través de un circuito de

retroalimentación. La corriente que cruzó la membrana fue medida en forma continua por un electrodo colocado en el medio extracelular. Se evaluaron 5 ovocitos con cada fracción a diferentes concentraciones.

Los ovocitos de *Xenopus laevis* fueron continuamente perfundidos con una solución de Ringer Normal (RN). Se evaluaron las fracciones F1 y F3 de G50, así como las cuatro fracciones de QAE Sephadex A-25. De igual manera se realizó con el extracto crudo y las fracciones parcialmente purificadas de *L. danae*. El potencial transmembranal al que fueron controlados era regularmente de -60 mV. Este es el potencial de reposo que se encuentra alejado de los potenciales de equilibrio para K^+ , Na^+ , Ca^+ y Cl^- en estas células (Kusano *et al.*, 1982 citado en Torres-Ramos, 2001) y permite discernir las diferentes corrientes de iónicas producidas por diferentes estímulos. La connotación de corriente entrante está referida a este potencial.

Análisis de datos

Las fracciones F3G50 y QAE IV tuvieron efecto sobre corrientes de calcio. Este efecto consistió en un bloqueo de corrientes dependientes del influjo de este catión. Los registros se obtuvieron mediante el protocolo TOUT -100, que consistió en pulsos periódicos de voltaje en +20 mV con el fin de evaluar la resistencia de la membrana. Los registros se analizaron usando los programas PCLAMPFIT 9.0 (Axon Instruments) y OriginPro 7.0 (Microcal Software).

Cuantificación de proteína por el método de Bradford (1976)

El contenido de proteína presente en el extracto crudo y las fracciones parcialmente purificadas de *L. danae* se cuantificó con el método de Bradford (1976) mediante el kit *Bio-Rad quick start protein assay*.

Determinación de peso molecular por medio de electroforesis en SDS-PAGE.

Para conocer el intervalo de peso molecular del extracto y las fracciones parcialmente purificadas de *L. danae* se realizaron electroforesis en SDS-PAGE 12 % por el método de Laemmli (1970) (citado en Smith, 1994). Para la tinción de los geles se utilizó la técnica de Coomassie (Kruger, 1994)

Resultados

Aislamiento y purificación de inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE)

Para evitar la degradación por acción de proteasas presentes en el extracto crudo, éste se trató con 50 mg de una mezcla de inhibidores de proteasas (complete TM, mini Boehringer Mannheim Co. Germany) por 500 ml del extracto (100 µg/ml). Una muestra de 20 ml de este extracto crudo tratado (80.2 mg de proteína/ml) se fraccionó en una columna (80 x 2 cm) de gel Sephadex G-50-M usando ácido acético 0.3 M como eluente, y un flujo de 1.3 ml/min; se colectaron 160 eluatos de 20 ml cada uno, los cuales se agruparon en 4 fracciones (F1-F4). En un ensayo preliminar se demostró que el ácido acético (utilizado como eluente en la cromatografía) causaba inhibición de la enzima AChE, debido a que modifica el pH del medio, por lo cual se tomó la decisión de eliminarlo mediante liofilización. Las fracciones liofilizadas se resuspendieron en agua destilada y posteriormente evaluadas mediante el bioensayo en cangrejo. Se inyectaron 3 cangrejos por fracción. Los organismos presentaron respuestas inmediatas consistentes en estimulación continua de los músculos, parálisis de las extremidades y la muerte antes de cinco minutos. Las fracciones F1, F3 y F4 resultaron activas en este modelo (Fig. 15).

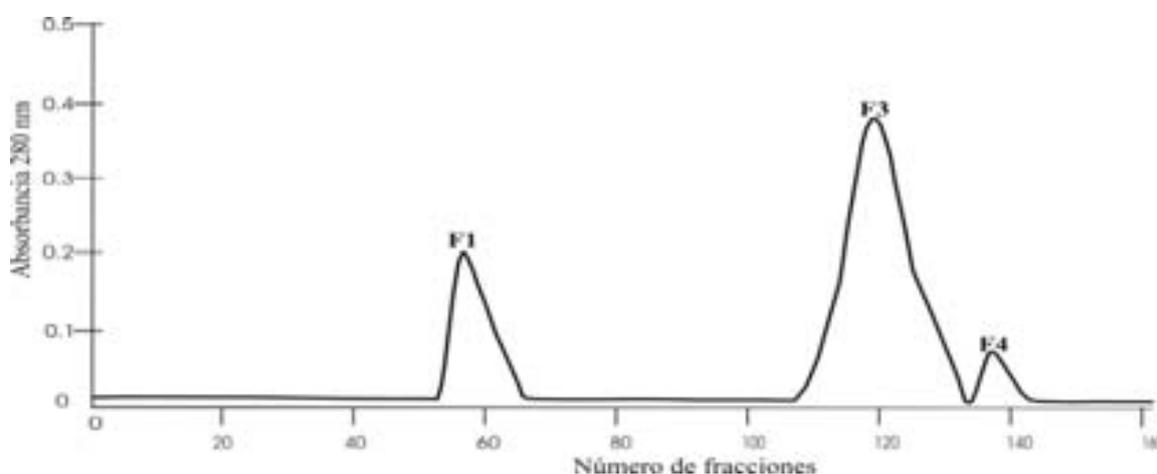


Fig. 15 Separación cromatográfica del extracto crudo de la anémona *Lebrunia danae* en Sephadex G-50-M.

Debido a su función esencial, los productos químicos que interfieren o inhiben la acción de la AChE se conocen como **anticolinesterásicos**, los cuales son generalmente potentes neurotoxinas. La inhibición de esta enzima provoca efectos devastadores en los

agentes nerviosos, con el resultado de una estimulación continua de los músculos, glándulas y el sistema nervioso central (Eckert, 1997).

Las cuatro fracciones obtenidas (F1-F4), se evaluaron mediante el ensayo de actividad inhibitoria de la AChE.

Tabla I. Evaluación de actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa de las fracciones obtenidas en la cromatografía de Sephadex G-50-M

Fracciones	% de inhibición de la acetilcolinesterasa	Proteína
F1G50*	Sin actividad	16 µg/µl
F3G50 *	73 %	4 µg/µl
F4G50*	16 %	6 µg/µl

* Presentan actividad neurotóxica en el bioensayo con cangrejo

La fracción F3G50 (0.2 µg de proteína/µl) mostró la actividad más alta con un 73 % de inhibición (Fig. 16, Tabla I). Esta también fue evaluada en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* causando una respuesta inmediata (estimulación continua de los músculos) parálisis y muerte durante el primer minuto después de ser aplicada. Se ha reportado que los compuestos que causan inhibición del la AChE mayor del 50 % ocasionan la muerte del organismo. Para corroborar lo anterior, se midió la actividad de la enzima extraída del tejido muscular de los cangrejos tratados comparada con la actividad de la enzima extraída del cangrejo sin tratar.

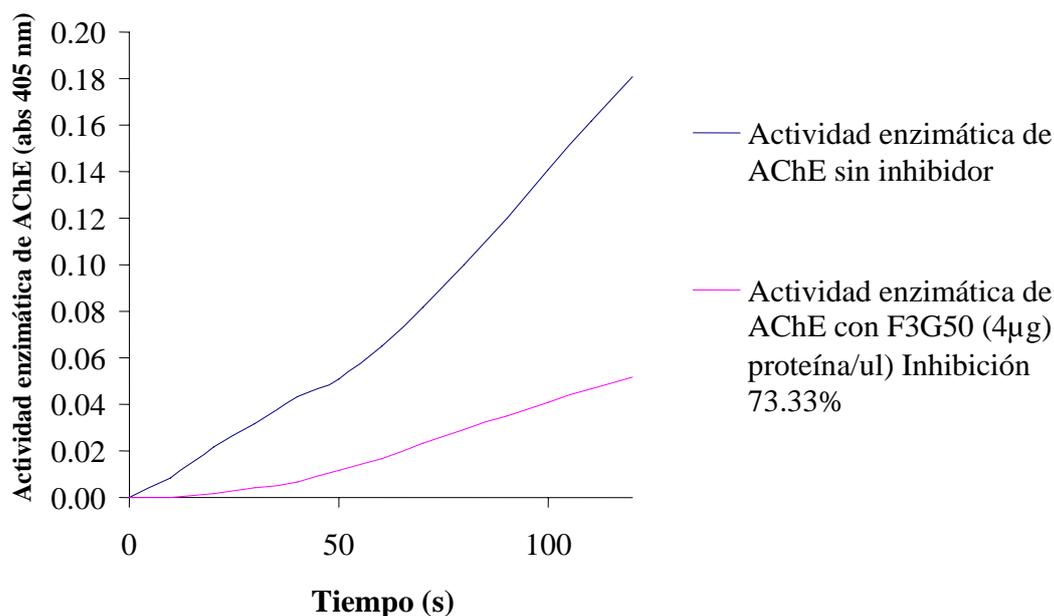


Fig. 16 Curva de actividad enzimática de AChE (curva tipo) sin inhibidor y en presencia de la fracción F3G50 (4 µg de proteína/µl) de la cromatografía en Sephadex G-50-M.

El uso de AChE como biomarcador en invertebrados marinos no está bien establecido, debido a la falta de un órgano claramente definido (cerebro); sin embargo se ha utilizado hemolinfa, nervios ganglionares, tejido muscular y cuerpo completo (Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2004). La enzima AChE se extrajo mediante el método de Ellman (1960) (citado en Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2004) del tejido muscular de cangrejos expuestos a la fracción F3G50 y de cangrejos sin exposición. Posteriormente se determinó la actividad enzimática de ambas para determinar el grado de inhibición de la AChE causado por la exposición a la fracción F3G50 (Fig. 17).

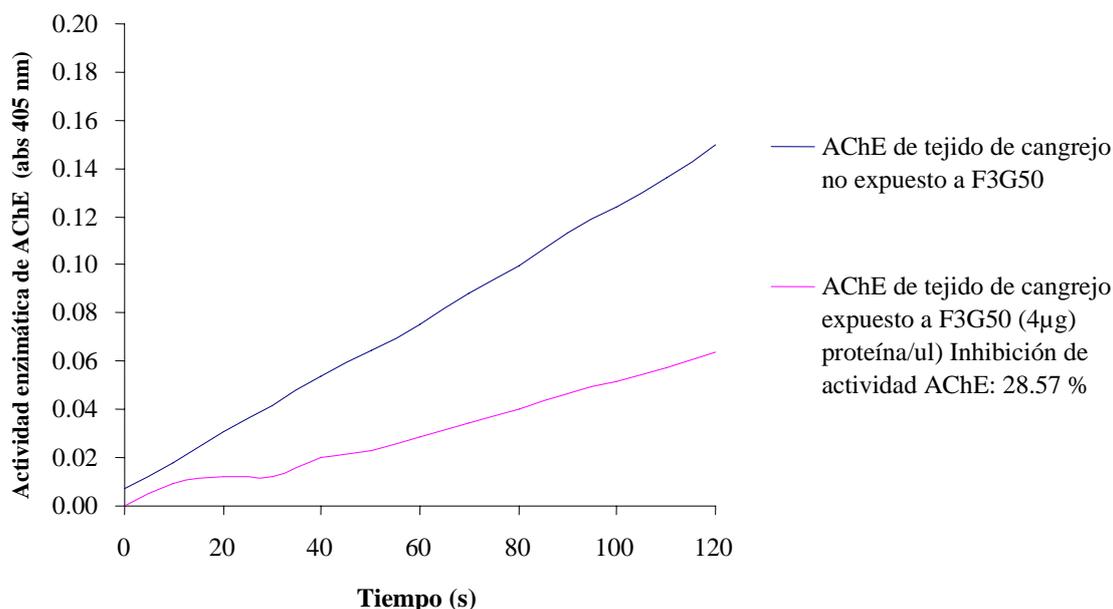


Fig. 17 Curva de actividad enzimática de la AChE (curva tipo) extraída del tejido de cangrejos expuestos a la fracción F3G50 y extraída de tejido de cangrejos sin exposición a la fracción.

La fracción F3G50 (4 µg/µl) causó una inhibición de 28.57 % en la enzima extraída del tejido de cangrejo inyectado con la toxina. Esto indica que la inhibición causada por dicha fracción es significativamente importante en el organismo, pues al presentar una inhibición mayor del 20 %, muestra signos patológicos (estimulación continua de los músculos y parálisis de extremidades) como parte de un proceso de intoxicación y finalmente la muerte.

Mientras que el extracto crudo presentó una actividad inhibitoria de la AChE del 27 %, las fracciones F3G50 y F4G50 de la cromatografía del extracto crudo de *Lebrunia danae* en gel Sephadex G-50 M mostraron el 73 y el 16 % de actividad inhibitoria de la AChE, respectivamente (Tabla I). Además ambas fracciones presentaron actividad neurotóxica potente en cangrejos. El hecho de que la actividad inhibitoria de la fracción F3G50 sea mayor que la del extracto crudo, nos indica que en el primer proceso de purificación que se aplicó, se aislaron los compuestos inhibidores de la AChE eficientemente, pues esta actividad se incrementó de un 27 % (extracto crudo) a un 73 % (fracción F3G50).

Con base en los resultados obtenidos, la fracción F3G50 se fraccionó nuevamente utilizando un gel de intercambio aniónico (QAE Sephadex A-25) y como eluente acetato de amonio 0.01- 0.3 M, de acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas preliminares (Tabla II, Fig. 18).

Tabla II. Evaluación de la actividad inhibitoria de la AChE de los sobrenadantes de las microcolumnas de intercambio iónico.

QAE Sephadex A-25		Fractogel EMD SO_2^- 650 M	
$[\text{NH}_4\text{OAc}]$	% Inhibición de AChE	$[\text{NH}_4\text{OAc}]$	% Inhibición de AChE
1.0 M	0.0	1.0 M	0.0
0.5 M	20	0.5 M	30
0.3 M	40	0.3 M	30
0.1 M	40	0.1 M	30
0.05 M	13.33	0.05 M	30
0.01 M	46.67	0.01 M	30

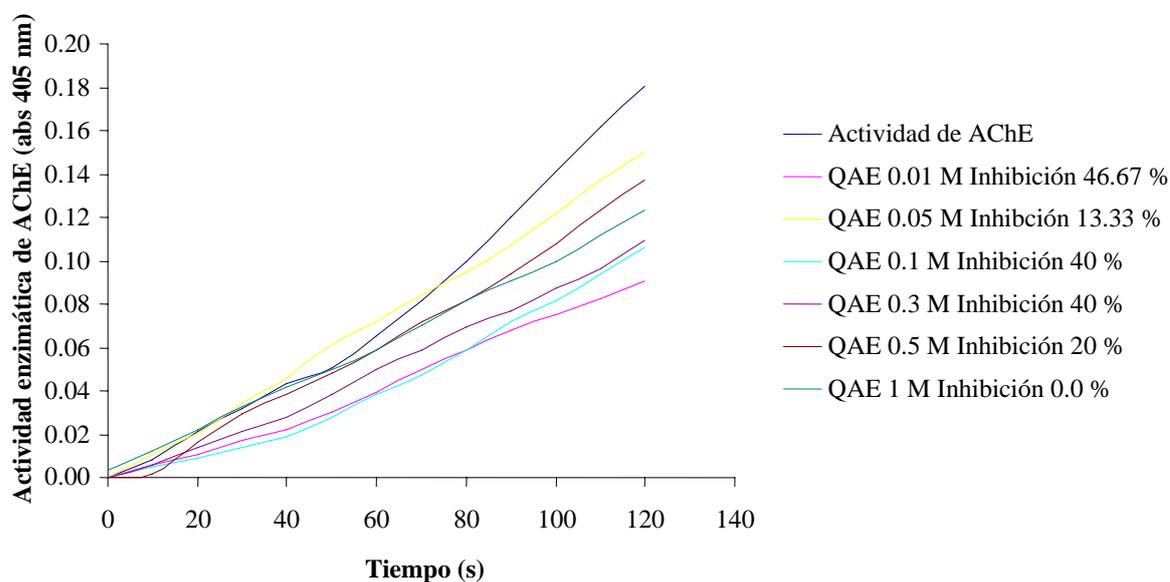


Fig. 18 Evaluación de la actividad inhibitoria de AChE de los sobrenadantes obtenidos de las microcolumnas empacadas con gel QAE Sephadex A-25 utilizando diferentes concentraciones de acetato de amonio (eluente).

Se tomaron 40 ml de fracción F3G50 de la columna de Sephadex G-50-M, los cuales se cromatografiaron en una columna (46 x 1 cm) de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25 con un gradiente escalonado de 0.01 a 0.3 M de acetato de amonio a pH 8.5, flujo de 2 ml/ min. Se obtuvieron 70 eluatos de 15 ml cada una (Fig. 19).

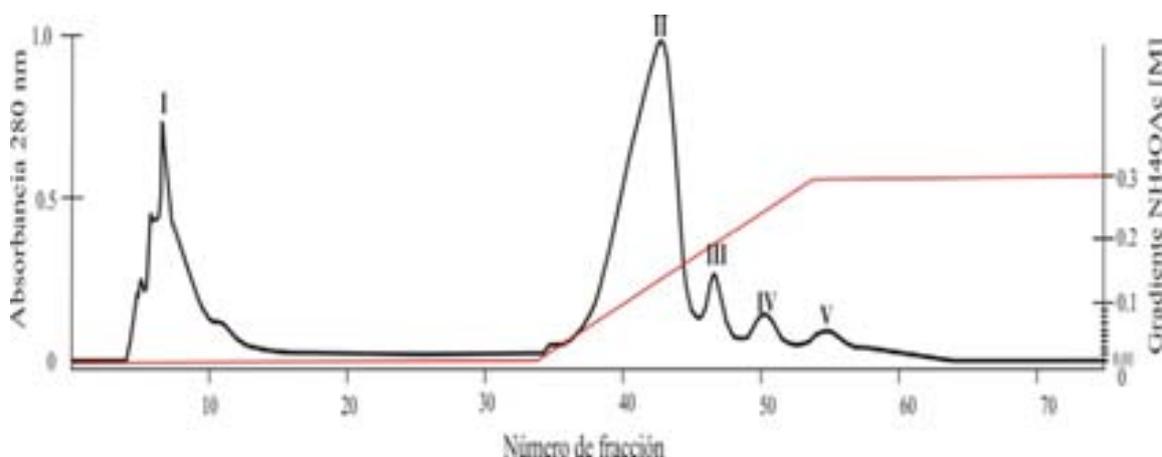


Fig. 19 Cromatografía de gel de intercambio iónico QAE Sephadex A-25 M de la fracción F3G50 de Sephadex G-50-M obtenida del extracto crudo de la anémona *L. danae*.

Se obtuvieron las fracciones correspondientes a cinco picos de la cromatografía de intercambio iónico QAE Sephadex A-25. Las cinco fracciones se concentraron por liofilización para eliminar el acetato de amonio y evaluarlas en el ensayo de actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa (Tabla III). El pico IV presentó la mayor actividad con un 30 % de inhibición.

Tabla III. Resultados de actividad inhibitoria de la AChE de las fracciones obtenidas de la cromatografía en gel de intercambio iónico QAE Sephadex A-25.

Fracciones de QAE	% Inhibición de la AChE	Proteína
I	20	12 µg/µl
II	20	10 µg/µl
III	20	10 µg/µl
IV	30	8 µg/µl
V	13	

Con base en los resultados anteriores, se procedió a la evaluación de la actividad de inhibición de acetilcolinesterasa utilizando diferentes concentraciones de la fracción QAE

IV. Los resultados obtenidos mostraron un incremento en el porcentaje de inhibición dependiente de la concentración de proteína (Tabla IV). En el caso de la fracción V no fue posible medir la concentración de proteína porque estaba por debajo del límite de detección del método.

Tabla IV. Datos de porcentaje de inhibición de la AChE con diferentes concentraciones de proteína de la fracción QAE IV

Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	% Inhibición de la AChE
0	0
4	17
8	30
10	30
12	36

Para obtener un CI_{50} , fue necesario continuar incrementar la concentración de proteína hasta obtener el 100 % de inhibición de la acetilcolinesterasa.

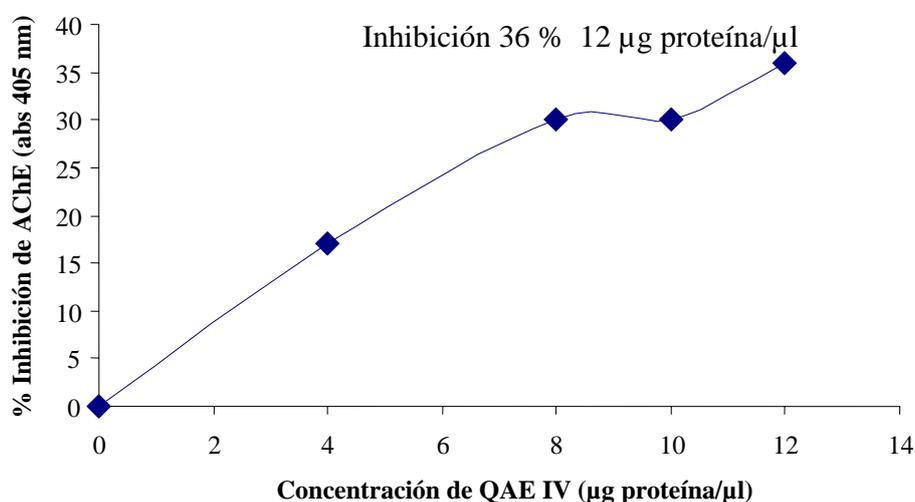


Fig. 20 Curva dosis respuesta de porcentaje de inhibición de la AChE contra concentración de proteína de la fracción QAE IV. En el caso de la fracción F3G50, 4 μg proteína/ μl fueron suficientes para lograr una inhibición de 73 %, sin embargo, las fracciones obtenidas del QAE Sephadex A-25, no alcanzaron ni rebasaron dicho porcentaje, alcanzando como máximo valor

un 36 % de inhibición (Fig. 21) con tres veces la concentración de proteína (12 μg proteína/ μl) que se utilizó con F3G50 (4 μg proteína/ μl).

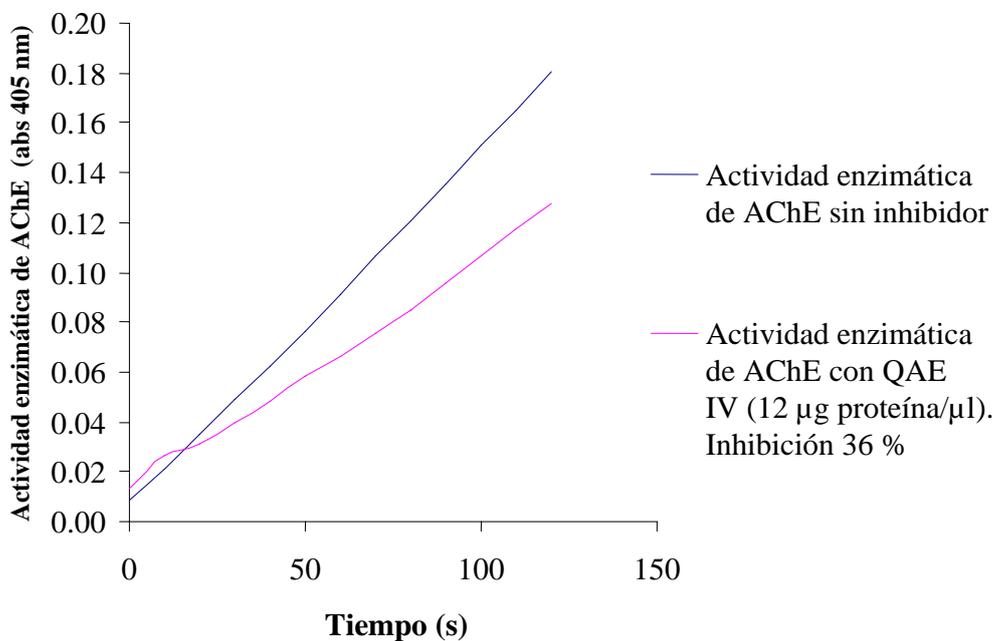


Fig. 21 Actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa de la fracción QAE IV (12 μg proteína/ μl)

Los inhibidores de la AChE que se encontraron en la fracción F3G50, se separaron por interacción aniónica en el segundo paso cromatográfico, la separación trajo como consecuencia una disminución de la actividad inhibitoria de la enzima de 73% a 36 %, esto a pesar de incrementar la concentración de proteína máxima que fue posible recuperar en esta cromatografía (12 μg proteína/ μl). El ensayo con microcolumnas indicó que en la concentración 0.3 M del eluente, se encontraba el compuesto con mayor actividad inhibitoria de la AChE, alcanzando un 46 % de inhibición. La fracción con mayor actividad inhibitoria fue QAE IV (36 %) que corresponde a la concentración de 0.3 M en el gradiente escalonado (Fig. 19).

Análisis electrofisiológico en ovocitos de *Xenopus laevis*

Se evaluaron las fracciones F1G50, F3G50, QAE I, II, III y IV mediante la técnica electrofisiológica en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, con la finalidad de determinar su actividad a nivel de canales y receptores iónicos. La fracción QAE V no se evaluó con esta

técnica porque el método (Bradford) que se utilizó para determinar la cantidad de proteína no lo detectó debido a que la concentración se encuentra por debajo del límite de detección. El análisis electrofisiológico consistió en evaluar el efecto de las fracciones y extracto crudo específicamente sobre los canales de sodio, potasio y calcio así como sobre los receptores membranales a los neurotransmisores GABA (ácido gamma-aminobutírico), acetilcolina, glutámico-glicina y serotonina.

La polaridad y la amplitud de las corrientes iónicas dependieron del potencial transmembranal y las especies iónicas que acarrearón la corriente. La primera evaluación se realizó en ovocitos controles, es decir, aquellos que no fueron inyectados con el RNA mensajero del cerebro de rata, esto, con el objetivo de evaluar si el extracto crudo causaba efecto sobre las características nativas de la membrana del ovocito. Se registró la corriente transmembranal del ovocito control y posteriormente el ovocito se perfundió en 100 µg /µl de proteína del extracto crudo (Fig. 22).

Al exponer el ovocito al extracto crudo de *Lebrunia danae*, fue registrada una corriente entrante que tuvo una amplitud variable en el rango de cero a - 6000 nA, lo cual indica que el extracto modificó el flujo de iones a través de los canales iónicos endógenos del ovocito. Después de unos segundos de la aplicación del extracto, éste fue lavado perfundiendo con la solución RN para eliminar restos del extracto crudo. Después de lavar, la corriente transmembranal basal se recuperó en un 100 % en la mayoría de los casos estudiados (ovocitos inyectados con mensajero E30a). De esta forma podemos evidenciar que el extracto crudo causa un aumento de la conductancia membranal al exponerlo a dicha concentración de extracto crudo produciendo la generación de una corriente entrante. La cinética de esta corriente y sus características eléctricas correspondieron con las descritas para la corriente oscilatoria activada por la apertura de canales de Cl⁻ dependiente de Ca²⁺, que se activan en los ovocitos nativos a través de un mecanismo que implica la síntesis de IP3 y liberación del Ca²⁺ desde reservorios intracelulares (Arellano *et al.*, 1995) .

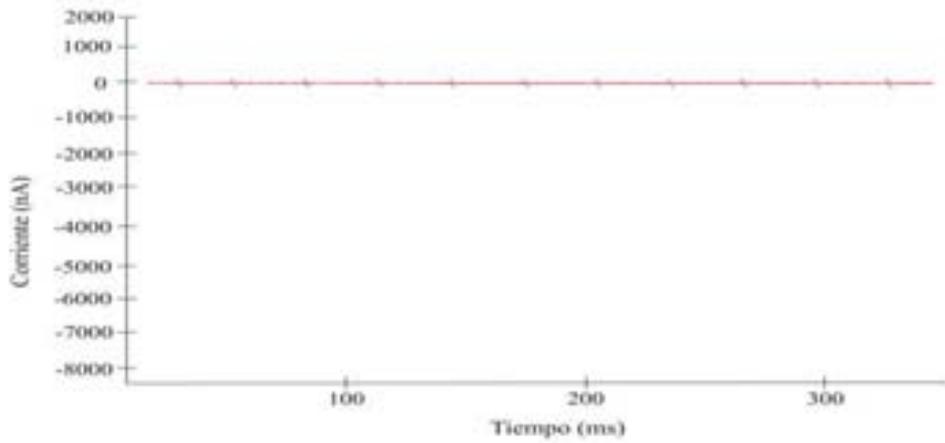


Fig. 22 Ejemplo de la corriente transmembranal basal del ovocito control de *Xenopus laevis*.

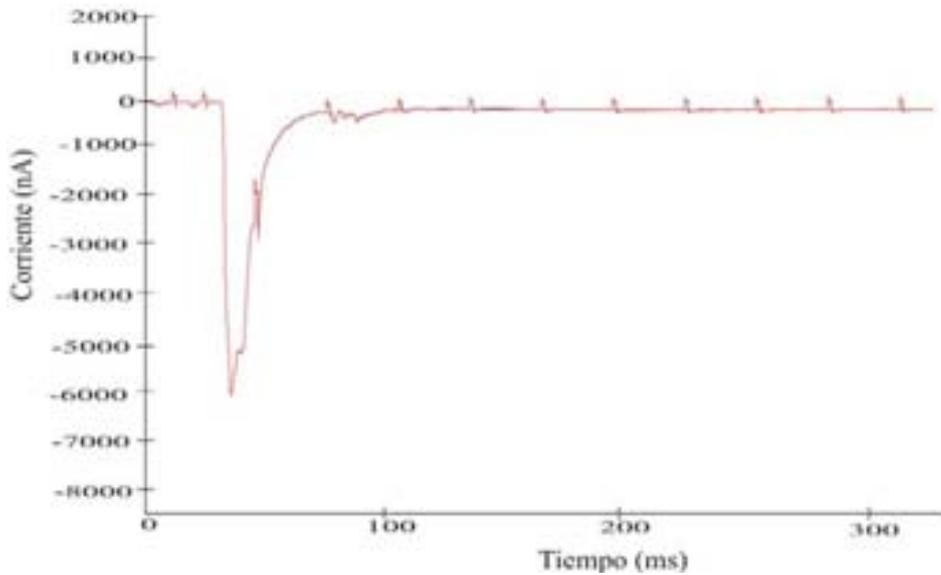


Fig. 23 Ejemplo de la corriente transmembranal de ovocitos control de *Xenopus laevis* en perfundidos (señalizado por la barra superior) con extracto crudo (100 μg proteína/ μl) de *Lebrunia danae*.

Se procedió a la evaluación de diferentes concentraciones de extracto crudo y fracciones parcialmente purificadas en ovocitos inyectados con mRNA de cerebro de rata, para identificar las fracciones que ocasionan el cambio en el potencial de membrana y detectar si existe especificidad de las toxinas sobre canales de sodio, potasio y calcio. Además de dichas evaluaciones, se realizaron experimentos de desnaturalización con el extracto crudo y fracciones parcialmente purificadas; posteriormente se realizó el análisis electrofisiológico de estas sustancias.

Las fracciones previamente liofilizadas y conservadas a -60°C , se disolvieron en agua desionizada estéril para utilizarlas en este ensayo.

Se evaluó el efecto del extracto crudo y fracciones parcialmente purificadas, sobre las corrientes eléctricas generadas por los neurotransmisores acetilcolina, GABA, ácido Glutámico-glicina y serotonina. Estos neurotransmisores producen en ovocitos expresando el RNAm de cerebro corrientes características de los mecanismos utilizados por cada uno de los receptores estimulados (Figura 24). Durante el monitoreo de la corriente generada por cada neurotransmisor, el ovocito fue perfundido con diferentes concentraciones de extracto crudo en conjunto con las fracciones parcialmente purificadas, sin embargo no se observaron cambios de las corrientes activadas en 8 ovocitos E30a para cada uno de los neurotransmisores estudiados. En la tabla V se presenta un resumen de los datos obtenidos en los ovocitos probados en ausencia y presencia del extracto crudo y fracciones parcialmente purificadas para el neurotransmisor GABA.

Tabla V. Datos obtenidos en los ovocitos probados en ausencia y presencia del extracto crudo y fracciones parcialmente purificadas de la anémona *Lebrunia danae* para el neurotransmisor GABA.

Tiempo (ms)	Control	Extracto crudo 500 μl	F1 500 μl	F3 500 μl
30000	-180	-195	-100	-190
40000	-220	-200	-175	-275
50000	-555	-510	-220	-340
60000	-345	-385	-315	-225
70000	-615	-630	-410	-340
80000	-420	-440	-330	-290

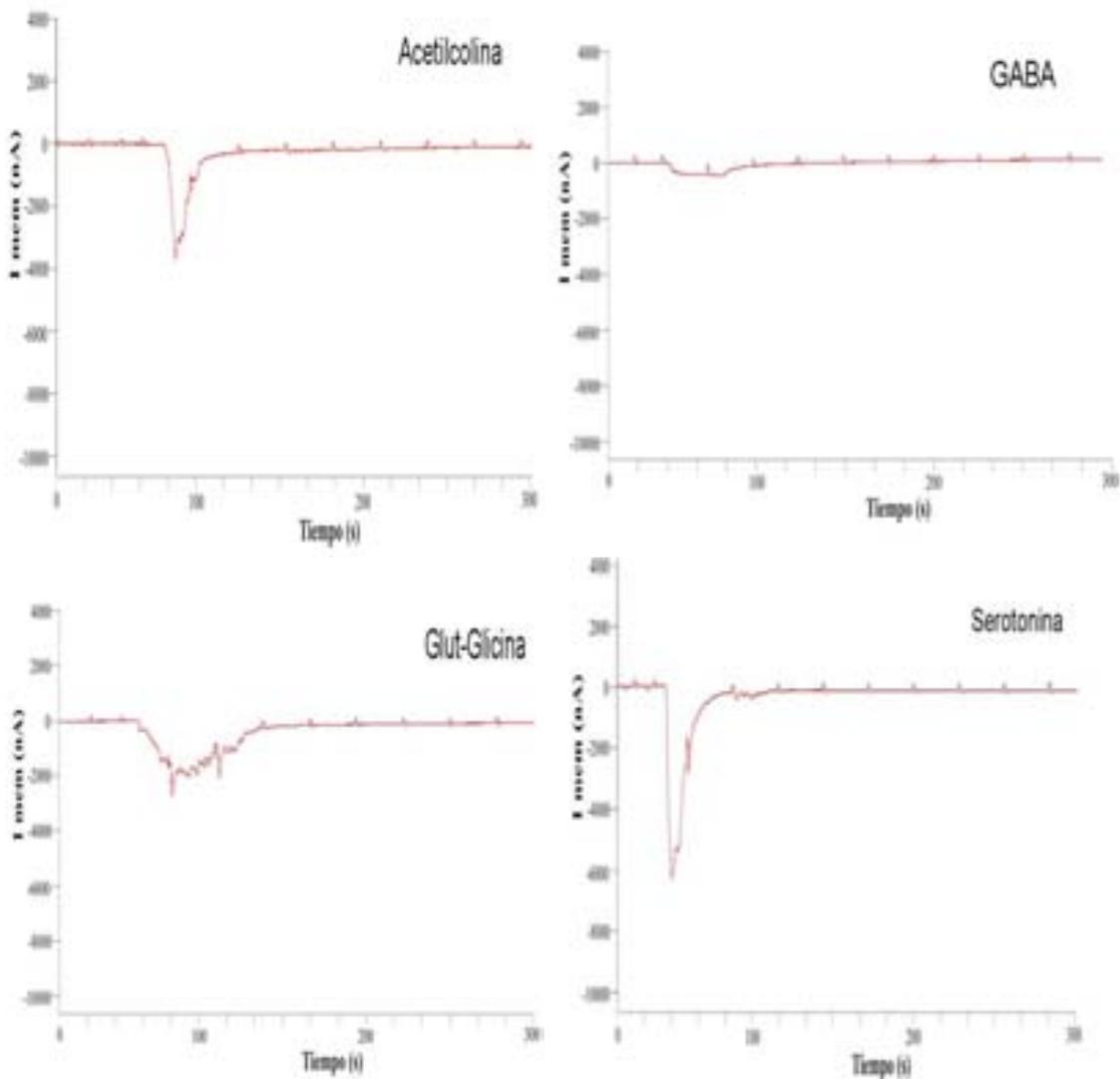


Fig. 24 Corrientes de membrana en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata E30a, generadas por la perfusión (la barra superior indica el tiempo de aplicación) de los neurotransmisores acetilcolina, GABA, ácido glutámico-glicina y serotonina.

De forma similar para el caso de corrientes de sodio y potasio, no se observaron cambios en la corriente (Fig. 25). Estas corrientes fueron generadas a través de la aplicación de protocolos de pulsos despolarizantes.

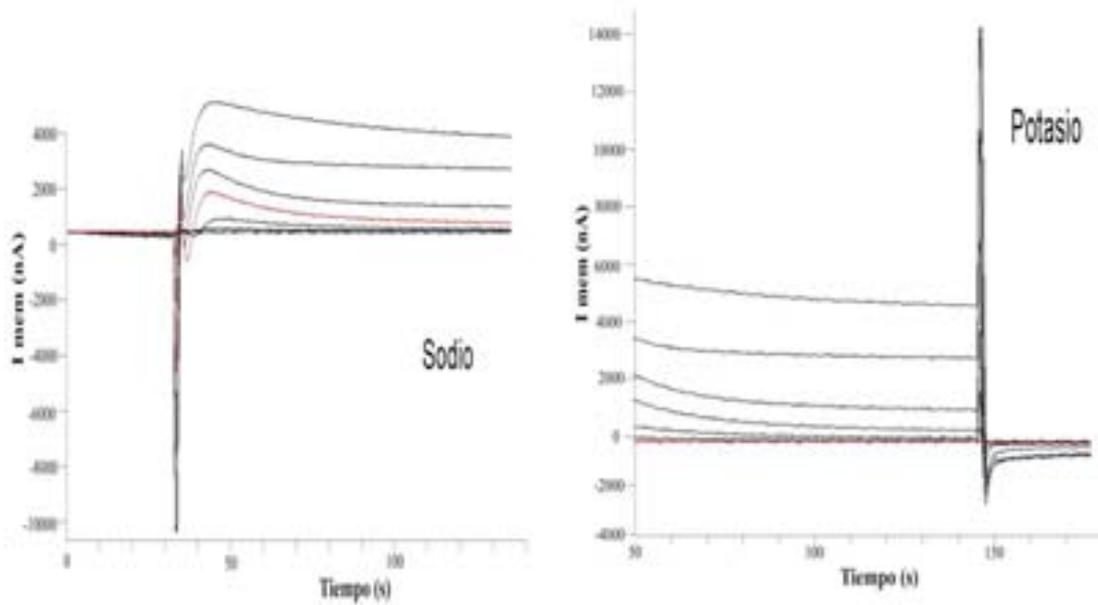


Fig. 25 Corrientes de sodio y potasio en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata, en condiciones control.

Sin embargo, en el caso de las corrientes Tout, se detectó una inhibición de magnitud importante (Fig. 26). La corriente Tout se genera a través de la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje cuyo influjo promueve la apertura de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} (Miledi, 1982). Al expresar las proteínas de cerebro los ovocitos inyectados con el RNAm E30a generan corrientes Tout robustas de varios μA por la expresión de una alta densidad de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, mientras que los canales de Cl^- son en su mayor parte los endógenos de la membrana del ovocito.

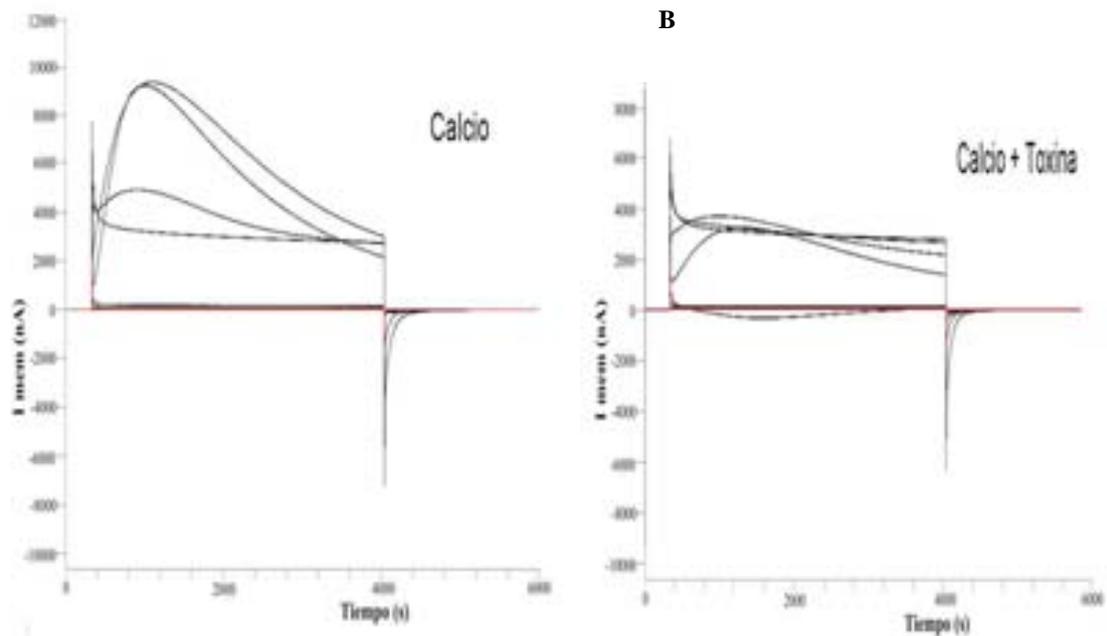


Fig. 26 Corrientes Tout en ovocitos de *Xenopus laevis* en condiciones control y en presencia de las fracciones parcialmente purificadas (F3G50 20 μ g proteína/ μ l, B)

Para evaluar el efecto de las fracciones y el extracto crudo sobre la corriente Tout (más probablemente sobre los canales de Ca^{2+}), se midieron los datos de la corriente máxima en cada potencial de membrana en el rango de -100 a +60 mV; posteriormente se construyeron gráficas en la que se incluyen las corrientes en la ausencia y la presencia de diferentes concentraciones del extracto crudo y fracciones parcialmente purificadas (Fig. 27, 28, 29, 30, 31 y 32).

Tabla VI. Amplitud de la corriente Tout generada en el pico máximo (+20 mV) en ovocitos E30a (mensajero) en presencia de las fracciones F1G50 (100 µg de proteína/µl) y F3G50 (20 µg de proteína/µl).

Potencial de membrana	Tout control	Tout F1G50	Tout F3G50
-80	20	25	35
-60	10	-15	10
-40	-35	5	-5
-20	10	-100	-60
0	1680	1270	620
+20	6260	4675	3065
+40	5210	1975	1025
+60	4105	340	-75

El pico de la corriente Tout se genera regularmente en un potencial de membrana de +20 mV; durante este potencial, el flujo de iones Cl^- hacia el interior de la célula es alto y por lo tanto ocurre una despolarización. Cuando se perfundió la toxina de *Lebrunia danae* (extracto crudo y fracciones) ésta provocó una disminución de la corriente Tout a través de la membrana. Esta disminución de corriente indicó un posible bloqueo de los canales de Ca^{2+} responsables de la generación de Tout.

La fracción F3G50 causó efecto a partir de una concentración de 20 µg de proteína/µl (Fig. 27), mientras que la fracción F1G50 no presentó actividad aun en concentraciones de 100 µg de proteína/µl.

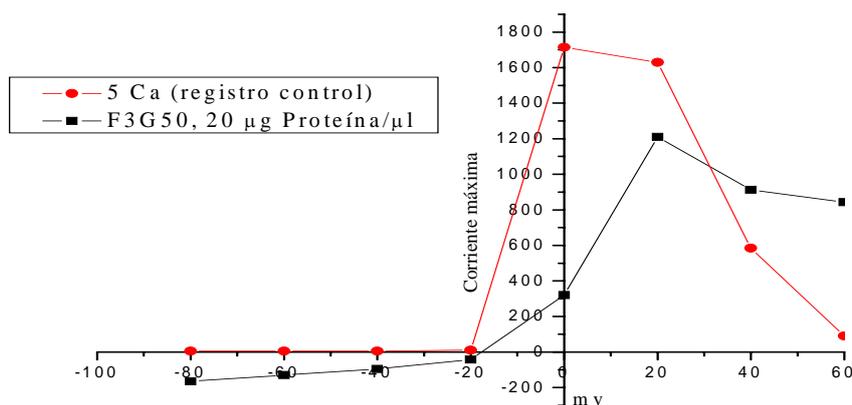


Fig. 27 Efecto de la fracción F3G50 sobre la corriente Tout en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata.

En el caso de las fracciones QAE, se evaluaron diferentes concentraciones, encontrando que QAE I y QAE II, a pesar de probarlas en concentraciones altas de proteína (100 y 88 μg proteína/ μl respectivamente) no modificaron las corrientes de calcio; en contraste, la fracción QAE IV causó efecto a una concentración baja de 16 μg de proteína, bloqueando la corriente de calcio en su totalidad (Fig. 28).

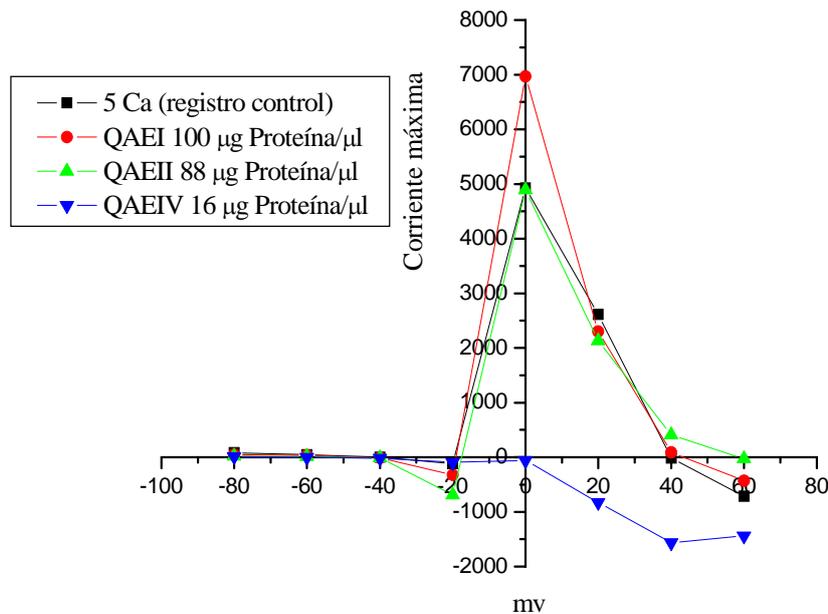


Fig. 28 Efecto de las fracciones de la separación por intercambio iónico QAE I, II y IV sobre la corriente I_{Ca} de ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata.

Debido a que la fracción QAE IV contiene compuestos que bloquean la corriente I_{Ca} , se realizó el análisis electrofisiológico con diferentes concentraciones de esta fracción. Fue posible determinar que aun en una concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se observa un potente efecto inhibitorio de 80 % de la corriente (ovocitos E30a) (Fig. 29).

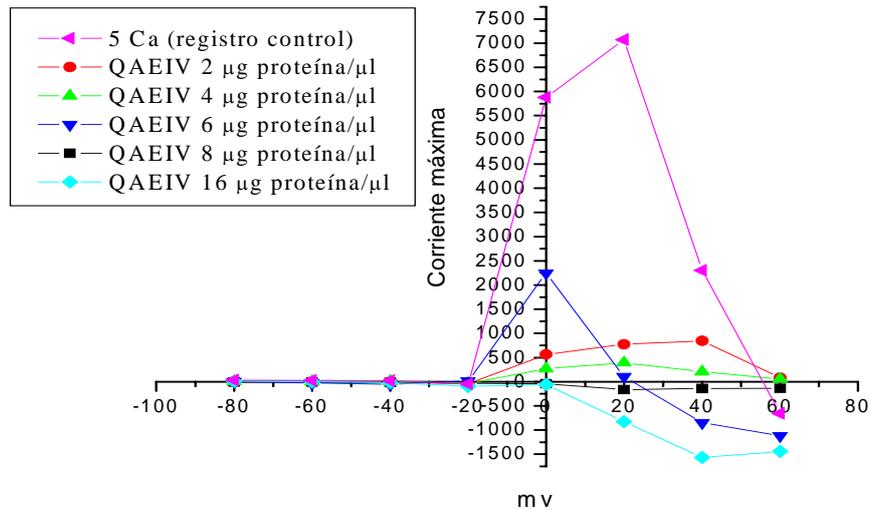


Fig. 29 Efecto de las diferentes concentraciones de la fracción QAE IV sobre la corriente Tout de ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata.

La estructura tridimensional específica de una proteína resulta crítica para su función; cuando una proteína pierde su conformación nativa pierde su actividad. Con el objetivo de desnaturalizar el compuesto bloqueador de la corriente Tout en las fracciones, el extracto crudo y las fracciones que resultaron activas (F3G50 y QAE IV), se sometieron a un tratamiento térmico de 100°C durante 20 minutos. Una vez hecho el tratamiento, se evaluaron nuevamente mediante el bioensayo electrofisiológico. Se encontró que el efecto inhibitorio sobre Tout fue aun mayor o no fue afectado (Fig. 30 y 31).

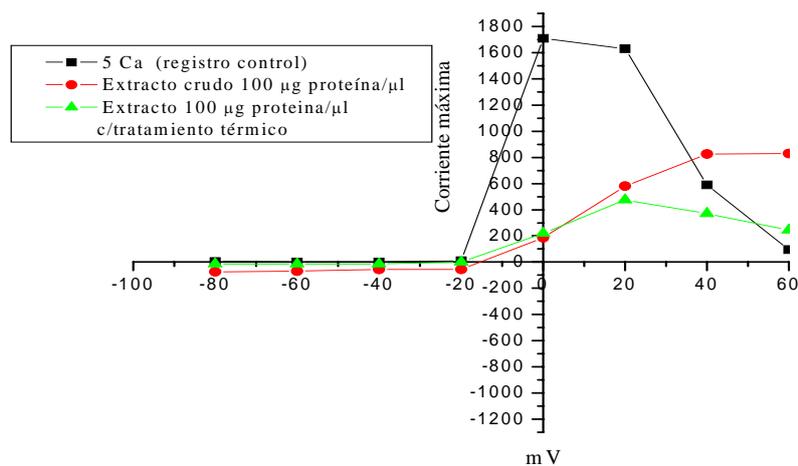


Fig. 30 Efecto de la ebullición del extracto crudo de *Lebrunia danae* sobre la potencia de inhibición de Tout en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata.

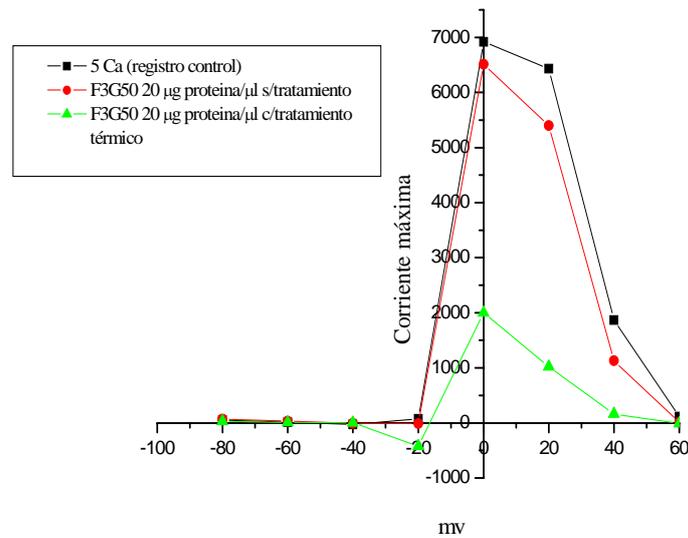


Fig. 31 Efecto de la ebullición de la fracción F3G50 (20 µg proteína/µl) sobre su capacidad inhibitoria de la corriente I_{out} en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata.

En el caso de la fracción QAE IV (Fig. 32), el tratamiento de ebullición no aumentó la inhibición de I_{out} . Los valores de corriente máxima se mantuvieron por encima de los valores que se registraron para la misma fracción sin el tratamiento. Sin embargo, al igual que en los casos de extracto crudo y fracción F3G50, la actividad inhibitoria se mantuvo a pesar del tratamiento térmico.

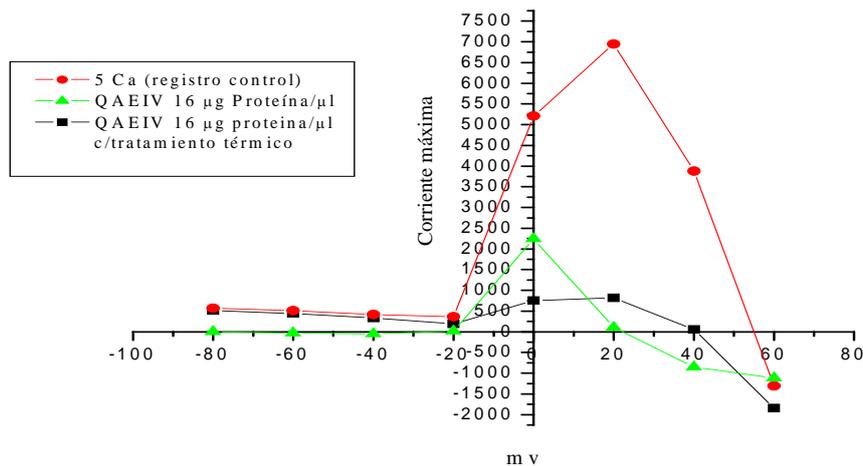


Fig. 32 Efecto de la fracción QAE IV (16 µg de proteína/µl) antes y después del tratamiento térmico sobre las corrientes de calcio en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNA mensajero de cerebro de rata.

El tratamiento térmico concentra las fracciones y el extracto crudo, por lo tanto el efecto fue más potente para el caso del extracto crudo y la fracción F3G50, ya que la concentración con la que se realizó el análisis electrofisiológico, fue más alta que la original (fracción sin tratamiento). No fue posible medir la concentración de proteína debido a los volúmenes obtenidos después del tratamiento térmico. Sin embargo fue claro que la sustancia o sustancias responsables de la inhibición en estos extractos no fue termolábil.

Ningún ovocito recuperó su corriente basal después de la aplicación de las fracciones, por lo que no fue posible realizar otro experimento en este mismo ovocito, una vez que ocurría el bloqueo de la corriente de calcio, no se recuperó y fue imposible tomar otro registro con otra fracción o diferente concentración de ésta. Debido a esto, se utilizó un ovocito nuevo para cada experimento.

Determinación de peso molecular

Para determinar el peso molecular aproximado de los componentes del extracto crudo y las fracciones parcialmente purificadas se utilizó la técnica de electroforesis SDS-PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 12 %. El extracto crudo presentó proteínas con peso molecular aproximado de 100 a 10 kDa (Fig. 33). La fracción F3G50 de Sephadex G-50-M, contiene proteínas con peso molecular aproximado de 75 a 10 kDa (Fig. 33) y la fracción QAE IV presentó bandas de 50 a 20 kDa.

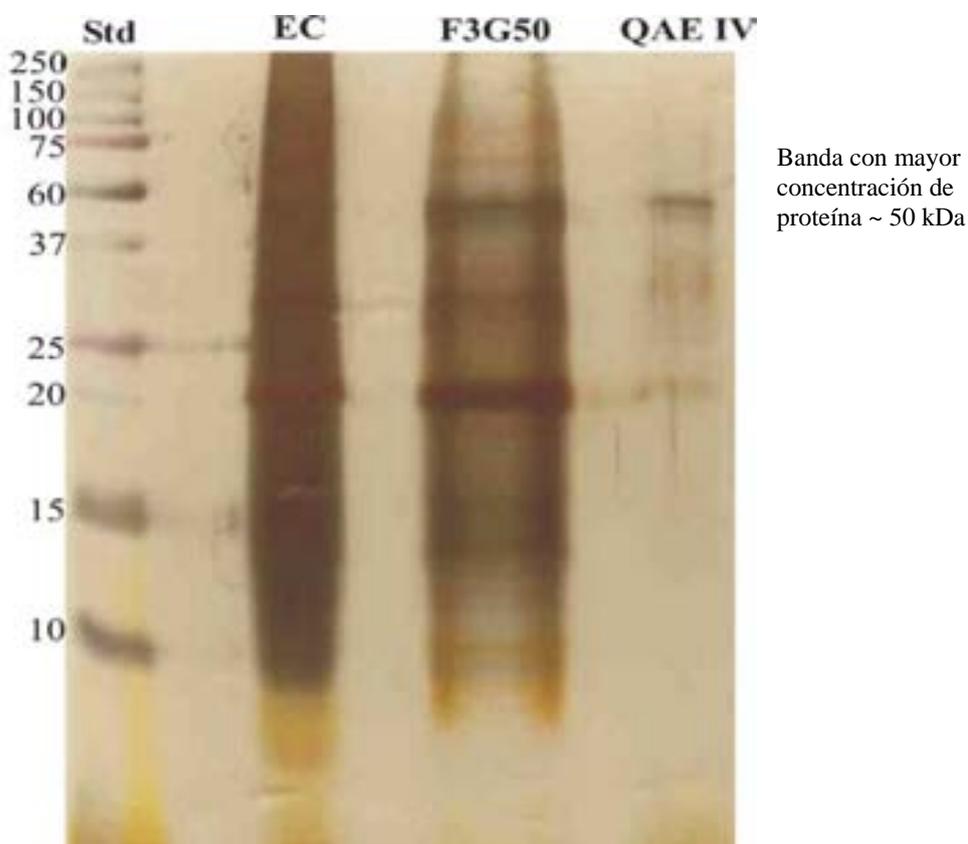


Fig. 33 Electroforesis SDS-PAGE 12 % de extracto crudo (EC), fracción F3G50 obtenida de Sephadex G-50-M y la fracción QAE IV obtenida de la cromatografía de intercambio iónico QAE Sephadex A-25 M.

La banda con mayor concentración de proteína tiene un peso molecular aproximado de 50 kDa, dicha banda se observó claramente en las tres columnas: extracto crudo, fracción F3G50 y QAE IV. La banda 20 kDa también se encontró en los tres casos, sin embargo la concentración de proteína es más baja que la de 50 kDa.

Purificación de la fracción neurotóxica QAE IV mediante HPLC.

La fracción QAE IV presentó actividad neurotóxica en el bioensayo con cangrejo, en el enzimático de inhibición de la acetilcolinesterasa y en el análisis electrofisiológico de ovocitos de *Xenopus laevis*. Dicha fracción se separó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó una columna analítica en la que se introdujeron 10 μ l de muestra con una concentración total de 0.2 μ g proteína/ μ l de agua desionizada.

El cromatograma (Fig. 34) indicó la presencia de cinco compuestos (picos). La electroforesis SDS-PAGE 12 % de la fracción QAE IV (Fig. 33) presentó cinco bandas con pesos moleculares aproximados entre 50 y 20 kDa. La banda con mayor concentración de proteína correspondió a la de 50 kDa; la cual podría tratarse del primer pico que presenta un tiempo de retención menor a 10 minutos (Fig. 34). Al existir una relación directamente proporcional entre la altura del pico y la concentración de proteína, es posible sugerir que el primer pico corresponde a la banda de 50 kDa (proteínas separadas en geles SDS-PAGE). El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluído de la columna se denomina **tiempo de retención** y se considera una propiedad característica de un compuesto.

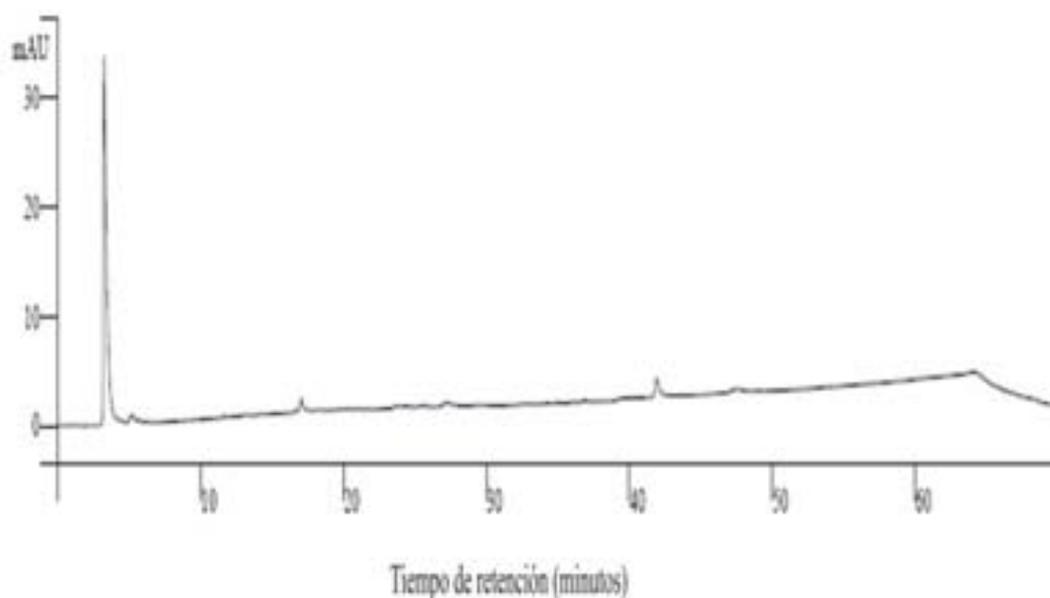


Fig. 34 Cromatograma de HPLC de la fracción QAE IV Sephadex A-25 obtenido de la fracción F3G50 de Sephadex G-50-M del extracto crudo de la anémona *L. danae*. Se utilizó un gradiente lineal de 10 a 90 % acetonitrilo/agua en corridas de 70 minutos, con una columna Nucleosil RP-100-5 C18, de 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 μ m (Varian).

Este último análisis cromatográfico, sugirió que la fracción QAE IV, con actividad neurotóxica en los tres modelos biológicos, está conformada por una mezcla de compuestos, los cuales son separados mediante cromatografía líquida de alta resolución.

El gradiente utilizado en este experimento fue lineal de 10 a 90 % acetonitrilo/agua. El gradiente separó los componentes de la muestra en función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el gradiente acetonitrilo/agua, que se utilizó para la purificación de QAE IV, los compuestos más hidrofílicos eluyeron a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluyeron a concentraciones elevadas de acetonitrilo. El tiempo de retención fue mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyeron rápidamente. Por lo tanto, el pico más grande que se presentó en el cromatograma de HPLC (Fig. 34) es de carácter polar, hidrofílico, porque eluye a mayor concentración de agua. Los compuestos obtenidos de esta cromatografía no fueron evaluados por ningún bioensayo. Para continuar el estudio de los compuestos activos identificados será necesario purificar una mayor cantidad de las fracciones activas a partir del extracto crudo, lo cual podría requerir el uso de una columna semipreparativa en el último paso (HPLC), en vez de la usada en este trabajo, la cual suele denominarse columna de rango analítico (Skoog *et al.*, 1992).

Discusión

En este estudio se aislaron y caracterizaron biológica y químicamente los compuestos neuroactivos presentes en el extracto de crudo de la anémona *Lebrunia danae*, identificando dos tipos de actividades biológicas; la actividad inhibitoria de la AChE y la inhibidora de las corrientes Tout.

Durante el proceso de aislamiento y purificación se puede obtener información valiosa acerca de las propiedades físicas y químicas de la molécula que se investiga, por ejemplo, su masa molecular, sus características ácido-básicas, aspectos estructurales, entre otras. Sin embargo, la mayoría de las veces, la purificación es un medio de obtención de una cantidad suficiente de un compuesto (una proteína en nuestro caso), para realizar estudios posteriores. En todos los casos es imprescindible un sistema de planificación de las diferentes etapas de separación, es decir, el establecimiento de una estrategia general para todo el proceso de purificación (Chávez, 1990). Para lograr dicho objetivo, el método de purificación que se utilizó para aislar los compuestos del extracto de *Lebrunia danae*, estuvo basado en métodos cromatográficos y la detección de la actividad biológica en cada uno de los pasos, para el aislamiento y purificación de los compuestos neuroactivos; en cada paso se realizaron bioensayos en cangrejo, enzimático para detectar inhibidores de la AChE y electrofisiológico; tanto del extracto crudo como de las fracciones parcialmente purificadas.

Se utilizaron dos criterios para la selección de los geles de las columnas cromatográficas con las que se realizó la separación y purificación de compuestos neuroactivos del extracto crudo de *L. danae*; el primero consistió en separar los compuestos del extracto crudo por tamaño molecular, para esto se utilizó el gel Sephadex G-50-M (80 x 2 cm), del cual se obtuvieron cuatro fracciones, F1G50, F2G50, F3G50 y F4G50. Las cuatro fracciones fueron evaluadas biológicamente mediante los tres bioensayos.

La fracción F3G50 presentó actividad en los tres bioensayos. Con base en esto, el siguiente paso cromatográfico fue la separación por intercambio iónico de dicha fracción; para esto se realizó la selección entre un gel de intercambio catiónico y otro de tipo aniónico mediante un ensayo preliminar con microcolumnas. Se prepararon seis microcolumnas con gel de intercambio catiónico Fractogel EMD SO₃ y otras seis microcolumnas con gel de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25; a cada microcolumna se le agregó una solución de diferente concentración de acetato de amonio

(eluyente) y de la fracción F3G50 (1 μ l) posteriormente se agitaron y se centrifugaron para asentar el gel; los sobrenadantes se evaluaron mediante el bioensayo enzimático para la búsqueda de inhibidores de la AChE. Durante toda la purificación fue necesario detectar la presencia de la toxina en forma activa; además, se hizo imprescindible la evaluación de la cantidad de proteína en cada una de las etapas, ya que la toxina está acompañada de una gran variedad de otras proteínas (Chávez, 1990). Mediante este bioensayo fue posible evaluar los sobrenadantes simultáneamente, utilizando poca muestra, de una manera sencilla y económica, por lo tanto, este bioensayo reunió los requisitos de una evaluación eficiente y rápida para descartar aquellos compuestos que pierden o no presentan la actividad biológica y continuar con la purificación de los compuestos neuroactivos. Los resultados (Tabla II) indicaron que los compuestos con mayor actividad inhibitoria de la AChE, se encuentran en los sobrenadantes obtenidos cuando se uso gel QAE Sephadex A-25 y concentraciones de 0.01 a 0.03 M de acetato de amonio como eluyente (46.67 y 40 % respectivamente) (Tabla II, Fig. 18). De esta manera se eligió el gel QAE Sephadex A-25 con un gradiente escalonado de 0.01 a 0.3 M de acetato de amonio en columnas cromatográficas (46 x 1 cm) para el segundo paso de purificación de la fracción F3G50.

Una vez que se eligió el gel que separó los compuestos biológicamente activos, se inició la purificación en las columnas cromatográficas (46 x 1 cm). Se sugiere el método de microcolumnas como una herramienta útil para hacer eficiente el proceso de purificación.

La purificación de la fracción F3G50 en QAE Sephadex A-25 con un gradiente escalonado de 0.01 a 0.3 M de acetato de amonio, dio como resultado cinco fracciones (QAE I, II, III, IV y V) (Fig. 19), las cuales fueron evaluadas mediante los bioensayos antes mencionados. El bioensayo enzimático de inhibición de la acetilcolinesterasa mostró una actividad menor en cada una de las cinco fracciones obtenidas con respecto a la fracción original F3G50; aún aumentando tres veces la concentración de proteína de las fracciones QAE. Es evidente que la actividad biológica original de la fracción F3G50 se repartió en las cinco fracciones que se obtuvieron de la separación en QAE Sephadex A-25, siendo la fracción QAE IV la que conservó mayor actividad con un 36 % a una concentración de 12 μ g de proteína/ μ l. Esto sugirió que adición o sinergismo entre los componentes de la fracción F3G50, ya que al separarlos disminuyó la actividad inhibitoria de la AChE.

Haciendo una comparación de actividad contra concentración de proteína, aun triplicando la concentración de proteína de la fracción QAE IV (12µg de proteína/µl), esta solo alcanzó el 36 % de inhibición de la AChE con respecto a la fracción F3G50 (4 µg de proteína/µl) la cual inhibió 73 % de la actividad de la acetilcolinesterasa con 4 µg de proteína/µl, mientras que la fracción QAE IV inhibió 17 % de la actividad con la misma concentración de proteína. No fue posible calcular una CI_{50} debido a que la cantidad de proteína obtenida en la fracción QAE IV resultó insuficiente (12 µg de proteína/µl) con la cual solo se pudo construir una curva dosis-respuesta con 36 % de inhibición máxima (Fig. 20).

Se esperaba que al tratarse de un compuesto más puro, este sería más potente a una concentración menor de proteína, pero esto no fue así; sin embargo, las fracciones obtenidas de la columna QAE Sephadex A-25, conservaron una actividad inhibitoria significativa (mayor al 20 %).

La inhibición de la enzima AChE causada por xenobióticos, resulta en la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en las terminales nerviosas, los cambios en los niveles de actividad de las colinesterasas pueden indicar los niveles de daño neuronal, dependiendo del grado de inactivación de la AChE, puede producir la muerte del organismo. Una inhibición del 20% es significativamente importante, ya que esta, es el resultado de mecanismos de desintoxicación en el organismo y puede ser detectado como un signo patológico. Por lo general se considera que una inhibición mayor al 50 % de la actividad de la AChE puede significar que el organismo se encuentre fisiológicamente comprometido, lo cual, potencialmente lo puede conducir a la muerte (Payne *et al.*, 1996).

El extracto crudo presentó 27% de actividad inhibitoria de la AChE. El uso de cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50-M y de intercambio iónico en QAE Sephadex A-25, resultó ser un procedimiento efectivo para el aislamiento y purificación de inhibidores de la AChE presentes en el extracto crudo de *Lebrunia danae*.

Es un hecho común que las secreciones neurotóxicas de anémonas producen varios tipos de toxinas que actúan en sinergismo (Karlsson *et al.*, 1995). En este caso, la situación indicó sinergismo entre los componentes de la fracción F3G50, ya que al separarlos disminuyó la inhibición; la actividad se repartió en las cinco fracciones obtenidas; es decir que, si estos compuestos permanecen juntos, el porcentaje de inhibición es mayor, por tal

razón, es posible indicar que la naturaleza de las toxinas del extracto crudo de *Lebrunia danae* actúan en sinergismo.

El último paso de purificación consistió en separar los componentes de la fracción QUE IV (fracción activa en todos los bioensayos); para conocer su composición y algunas de las características químicas de sus componentes, esta fracción se separó mediante HPLC.

La fracción QAE IV, se recromatografió mediante HPLC utilizando una columna Nucleosil RP-100-5 C18n (250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5µm) y como fase móvil acetonitrilo/agua (10 a 90%) con un gradiente lineal. Los componentes de la mezcla se separaron en función de la afinidad de los compuestos por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. Los compuestos más hidrofílicos eluyeron a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluyeron a mayores concentraciones de acetonitrilo. El tiempo de retención fue mayor para las moléculas de naturaleza poco polar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyeron rápidamente. Por lo tanto, el pico más grande que se observa en el cromatograma de HPLC (Fig. 34) corresponde a un compuesto de carácter polar, hidrofílico, ya que eluyó a mayor concentración de agua.

Es necesario continuar la investigación de los cinco picos que se obtuvieron en la separación de la fracción QAE IV, para verificar su actividad neurotóxica, ya que no se realizaron los ensayos neurotóxicos debido a que no se recuperaron concentraciones de proteína suficientes para realizar nuevamente los bioensayos con cangrejos, electrofisiológicos en ovocitos de *Xenopus* y de inhibición de la AChE. Para recuperar una mayor cantidad de los compuestos separados mediante HPLC es necesario que la columna tenga un diámetro interno igual o mayor a 10 mm, ya que estas columnas se utilizan para la purificación de compuestos a mayor escala y su utilización posterior; en cambio las columnas con diámetro entre 4-5 mm se utilizan para el análisis cualitativo de compuestos y la cantidad de material recuperado en cada inyección es menor. Estas columnas suelen denominarse columnas de rango analítico (Skoog *et al.*, 1992).

Es importante detectar cual de los cinco compuestos separados mediante HPLC de la fracción QAE IV, es el responsable de la actividad neurotóxica, y comprobar si existe adición o sinergismo entre estos compuestos, o bien, si son capaces de actuar por si solos y conservan la actividad neurotóxica. Además, es necesario identificar cual de los cinco

compuestos es el responsable de bloquear canales de calcio y cual el inhibidor de la acetilcolinesterasa o si se trata del mismo compuesto.

Una vez establecido que la fracción F3G50 presenta compuestos que inhiben 73 % de la actividad de la AChE *in vitro*, se procedió a evaluar la inhibición de la enzima causada por esta fracción *in vivo*, utilizando como modelo biológico, cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*. De esta manera, fue posible evaluar la inhibición de la AChE *in vivo*. Los resultados indicaron que la fracción F3G50 inhibió 28.57 % de la actividad de la AChE *in vivo*.

La enzima fue extraída del músculo del cangrejo al que se le inyectó previamente 0.1 ml de la fracción F3G50 (4 µg proteína/µl) (Fig. 17). El cangrejo mostró una estimulación continua de los músculos y parálisis de extremidades, estas reacciones son parte de un proceso de intoxicación que concluye con la muerte.

Menéndez *et al.* (1990) y Garateix *et al.* (1992) indican que las anémonas, carentes de mecanismos de inmovilización, contactaban inicialmente a sus presas con un solo tentáculo, consecuentemente desarrollaron la capacidad producir toxinas que por diversos mecanismos incrementa el nivel de acetilcolina en la sinapsis, actuando como anticolinesterásicos, retardando la inactivación de los canales de sodio, y bloqueando los canales de K⁺ dependientes de voltaje; de esta forma provocan una estimulación continua de los músculos en sus presas que los conduce a una parálisis rígida inmediata.

La fracción F3G50 causó parálisis y muerte en el organismo, este mismo organismo mostró una inhibición del 28.57 % de la AChE que se extrajo del tejido muscular del cangrejo. Turk *et al.* (1995), evaluaron la inhibición *in vitro* de la AChE causada por las toxinas del coral *Parazoanthus axinellae* con el método de Ellman (1961) e inyectaron la toxina en cangrejos y ratas. El resultado de esto fue parálisis y muerte de los organismos. Los autores asociaron este efecto con la inhibición de la acetilcolinesterasa. El ensayo enzimático de inhibición de la acetilcolinesterasa en cangrejos vivos, hace evidente el hecho de que ocurre inhibición de la enzima debido a las toxinas de la anémona *Lebrunia danae* en el organismo; causándole parálisis y muerte. Con base en estos resultados, podemos establecer que uno de los mecanismos de acción que utiliza la anémona *Lebrunia danae* para matar presas o defenderse de depredadores, es la exposición a toxinas que causan inhibición de la acetilcolinesterasa.

La enzima acetilcolinesterasa para el bioensayo *in vivo*, se extrajo del tejido muscular del cangrejo. La acetilcolinesterasa se extrajo de músculo de los cangrejos (tratados con las fracciones y sin exposición), debido a que la enzima es abundante en este tejido. Sin embargo, en el futuro deberá verificarse la presencia de pseudocolinesterasas (enzima de la familia de las colinesterasas con estructura similar a la AChE) mediante caracterización bioquímica de las colinesterasas, con el fin de contar con una correcta interpretación de los resultados.

Las toxinas que actúan sobre el sistema de transmisión colinérgico pueden ser antagonistas o agonistas de la acetilcolina. El mecanismo a través del cual se logran acciones en el sistema colinérgico, consiste en inhibir la enzima que hidroliza la acetilcolina. Debido a esta acción, los agentes anticolinesterásicos producen una acumulación anormal de acetilcolina en la sinapsis que equivale a una estimulación colinérgica (Castañeda, 2000). Toxinas con actividad anticolinesterásicas, de naturaleza peptídica aisladas a partir de los extractos de *Physalia physalis* y del cuerpo total de la anémona *Bunodosoma granulifera* (Castañeda *et al.*, 1985) así como de la columna corporal de la anémona *Condylactis gigantea* (Rivera *et al.*, 1987) inhibieron la acetilcolinesterasa sanguínea de ratones. Estos resultados indicaron que la toxicidad de estos extractos se debe, al menos en parte a la presencia de agentes anticolinesterásicos en estos celenterados. Otros agentes anticolinesterásicos de naturaleza similar, se han obtenido a partir de la anémona *Bunodosoma granulifera*, con un peso molecular inferior a 2 000 Da (Aneiros *et al.*, 1992). De la anémona *Stichodactyla helianthus* se aisló y purificó un principio anticolinesterásico a partir del extracto acuoso de esta especie; se trató de un compuesto no proteico de muy bajo peso molecular que ejerce una inhibición de tipo mixto frente a la acetilcolinesterasa eritrocítica humana (Karlsson *et al.*, 1991; Castañeda, 1996). La presencia de agentes anticolinesterásicos en extractos o secreciones procedentes de animales venenosos constituye hasta el presente, un hecho poco generalizado. Sin embargo, en las especies que los presentan, pueden considerarse que forman parte de la maquinaria defensiva de estos grupos (Castañeda, 2000). Ahora es posible agregar a esta lista, la anémona *Lebrunia danae*, la cual presentó agentes anticolinesterásicos en el extracto crudo que se aislaron eficientemente mediante cromatografía en Sephadex G-50-M y QAE Sephadex A-25. Los compuestos anticolinérgicos aislados en otras especies de anémonas, son compuestos de bajo peso molecular (Aneiros *et al.*, 1992); sin embargo, el extracto

crudo de *Lebrunia danae* con 27 % de inhibición de la AChE *in vitro*, presentó pesos moleculares entre 100 a 10 kDa mientras que los compuestos anticolinérgicos que se aislaron en la fracción F3G50, presentaron pesos moleculares aproximados de 75 a 10 kDa y la fracción QAE IV de 50 a 20 kDa. (Fig. 33). La banda con mayor concentración de proteína en extracto crudo, fracción F3G50 y fracción QAE IV, correspondió a la de 50 kDa, por lo que es posible pensar que, al tratarse de la banda con mayor presencia en los tres casos, sea la responsable de la actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa. En la especie *Lebrunia danae*, los compuestos anticolinérgicos no son de bajo peso molecular como en otras especies de anémonas; sin embargo, en todos los estudios realizados con anémonas se han encontrados compuestos con actividad biológica que van de los 2 hasta 80 kDa (Anderluh y Maček, 2002; Bernheimer, 1990), por lo que los compuestos bioactivos de *Lebrunia danae* permanecieron en este intervalo al igual que el resto de las anémonas estudiadas.

El proceso de señalización de la célula nerviosa implica la acción coordinada de canales iónicos selectivos en la membrana celular. Estos canales están constituidos por proteínas que funcionan como poros de membrana para iones particulares. En respuesta a un estímulo adecuado, por lo general un cambio en la diferencia de voltaje a través de la membrana, estas proteínas sufren cambios conformacionales que conduce a la apertura o cierre del canal (poro). Existe, por tanto, una alteración transitoria de la permeabilidad de la membrana para iones particulares. Los iones fluyen a través de estos canales debido a su gradiente electroquímico y la corriente resultante “dispara” una variedad de respuestas fisiológicas. En el proceso de señalización excitatoria en las neuronas, los iones implicados son Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Canales específicos para estos iones generalmente se abren o se cierran, en respuesta a las variaciones del potencial eléctrico en la membrana, y por tanto estos se refieren como canales dependientes del voltaje (Castañeda, 2000). La capacidad celular de distribuir iones selectivamente a través de la membrana citoplasmática origina en ella diferencias en la distribución de cargas eléctricas, esto permite a las células generar actividad eléctrica espontánea en respuesta a la estimulación. La corriente eléctrica producida por el flujo de iones a través de la membrana ocasiona cambios de voltaje. Si los cambios de voltaje son pequeños su propagación es pasiva y sufren una atenuación a lo largo de la distancia, si el cambio sobrepasa el umbral, se producen impulsos conocidos como potencial de acción, que es la diferencia eléctrica entre el interior y el exterior de la

célula, el cual se mide en el interior celular tomando como referencia el medio extracelular (Funjul *et al.*, 1998).

La toxinas marinas han proporcionado una variedad de compuestos capaces de ejercer acciones específicas y potentes a nivel de canales iónicos activados por voltaje o por neurotransmisores (Garateix *et al.*, 2003).

A partir de diversas especies de anémonas se han aislado dos tipos fundamentales de toxinas con acción sobre canales iónicos: las que actúan sobre los canales de sodio y las que tienen como blanco los canales de potasio. La mayoría de las neurotoxinas de anémonas que han sido investigadas electrofisiológicamente, inhiben procesos en canales de sodio, prolongando el potencial de acción (Béress *et al.*, 2000).

Las anémonas contienen toxinas de naturaleza proteica, algunas de las cuales son neurotoxinas muy activas: estas son importantes herramientas para elucidar mecanismos de la conexión nerviosa, o bien de canales iónicos (Mebs, 2002).

La fracción F3G50 obtenida del extracto crudo de *Lebrunia danae*, se separó mediante el uso de un intercambiador iónico (aniónico) QAE Sephadex A-25, obteniendo cinco fracciones, de las cuales, la fracción IV presentó actividad en cangrejo y en el ensayo enzimático de inhibición de la acetilcolinesterasa. Con base en estos resultados, dichas fracciones se evaluaron en el bioensayo electrofisiológico de ovocitos de *Xenopus laevis* para determinar su actividad a nivel de canales y/o receptores iónicos. Se utilizó este bioensayo ya que los ovocitos son un sistema en el cual se pueden expresar receptores y proteínas de membrana de diferentes tejidos a partir de la inyección del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de cerebro de rata; además, contienen una gran diversidad de canales iónicos y receptores nativos que responden a diferentes neurotransmisores, hormonas y péptidos.

El extracto crudo de *Lebrunia danae*, generó respuestas de corrientes entrantes en la membrana del ovocito, todas asociadas con un incremento de la conductancia en la membrana. Para varias fracciones de la toxina su aplicación no tuvo efectos sobre corrientes provocadas por una variedad de neurotransmisores o sobre canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de voltaje. Sin embargo, para el caso de la corriente denominada Tout (Miledi, 1982) fue posible observar una disminución de la corriente generada a través de pulsos despolarizantes. Esta corriente depende de la apertura de canales de Cl⁻ que dependen del influjo de Ca²⁺, a través de canales dependientes de voltaje que fueron

expresados a través de la inyección del ARNm de cerebro (Fig. 26). Se construyeron gráficas que incluyeron las corrientes Tout en la ausencia y la presencia de diferentes concentraciones de extracto crudo y fracciones parcialmente purificadas (Fig. 30, 31 y 32). En un potencial de membrana de +20 mV, donde la corriente Tout alcanzó un pico, la toxina de *Lebrunia danae* (extracto crudo y fracciones) provocó inhibiciones hasta del 100%. La disminución de la corriente Tout podría ser debida al bloqueo de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje involucrados en el influjo de este ión, o posiblemente sobre los canales de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺, sin embargo dado que la misma toxina promueve la apertura de los canales de Cl⁻ es más probable que el efecto principal esté dado sobre los canales de Ca²⁺. La fracción F3G50 causó efecto a partir de una concentración de 20 µg proteína (Fig. 27), la fracción F1G50 no presentó actividad. La fracción QAE IV causó efecto total a una concentración de 16 µg de proteína/µl (Fig. 28). Debido a que la fracción QAE IV contiene compuestos que bloquean la Tout, se realizó el análisis electrofisiológico con diferentes concentraciones de esta fracción. Fue posible determinar que aun en una concentración de 2 µg /µl la fracción tuvo un efecto de 80 % de inhibición, esta (Fig. 29). Con el bioensayo electrofisiológico se logró establecer que las fracciones F3G50 y QAE IV actúan a nivel de canales iónicos, más probablemente sobre canales de calcio dependientes de voltaje.

El tratamiento con inhibidores de proteasas en el extracto crudo de *L. danae* fue indispensable ya que se tiene registro de que las toxinas de otros cnidarios incubadas a 37° C, pierden actividad electrofisiológica gradualmente, debido a la acción de proteasas. La actividad de proteasas en extractos totales de cnidarios fue reportada por Hessinger, (1988) y Pong-Prayoon *et al.* (1991). La temperatura es un factor que se debe tener bajo control para evitar la **actividad enzimática** que destruye las proteínas y no tanto por el hecho de la desnaturalización de las mismas, ya que en el caso de las anémonas, los puentes disulfuro entrecruzados inducen conformaciones rígidas y estables en la estructura de estas proteínas. Las toxinas de anémonas tienen en común la presencia de tres puentes disulfuro que estabilizan la estructura de la molécula (Béress *et al.*, 2000). Las secuencias homologas de aminoácidos en polipéptidos de anémonas han sido elucidadas y todos presentan uniones disulfuro (Norton, 1991; Kem *et al.*, 1990; Kem, 1988; Kem *et al.*, 1996 y Norton, 1998).

Durante el bioensayo electrofisiológico, tanto el extracto crudo como las fracciones evaluadas, se sometieron a un tratamiento de ebullición para desnaturalizarlas; ya que la estructura tridimensional específica de una proteína resulta crítica para su función; cuando una proteína pierde su conformación nativa pierde su actividad; sin embargo, esto no sucedió, lo que indica que el tratamiento térmico no fue suficiente para desnaturalizar los compuestos neuroactivos de *Lebrunia danae*. Se esperaba que desaparecería la actividad de las fracciones y extracto crudo sobre las corrientes de calcio; por el contrario, este efecto se potenció, es decir que el registro de corriente eléctrica a través de la membrana disminuyó en presencia del extracto crudo (Fig. 30), y la fracción F3G50 (Fig. 31). Es posible que el tratamiento térmico al que fueron expuestas fracciones y extracto crudo induzca otra conformación de las proteínas resultando más activas o bien una concentración de las toxinas en menor volumen, sin que estas se hayan desnaturalizado. Anteriormente se mencionó que las proteínas de anémonas son sumamente estables debido a sus características estructurales, esto nos permite proponer que la proteína responsable de los efectos observados es termoestable y conservó la actividad sobre los canales de calcio.

A pesar de que todas las toxinas de anémonas estudiadas tienen en común la presencia de puentes disulfuro que estabilizan la estructura de la molécula, existen casos en los que la desnaturalización inducida por calor ocurre a temperaturas bajas, como es el caso de las toxinas de la anémona *Epiactis prolifera*, las epiactolisinas A y B. La epiactolisina B se desnaturaliza por exposición a 50 °C por 30 minutos, mientras que la epiactolisina A es estable a estos tratamientos (Bernheimer, 1990). En el caso de *Lebrunia danae*, la actividad bloqueadora de canales de calcio del extracto crudo y de las fracciones F3G50 y QAE IV, fue estable a los 100 °C; este hecho puede estar relacionado con la presencia de puentes disulfuro en la estructura, permitiendo que la toxina sea estable a dicho tratamiento.

Al purificar compuestos bioactivos, estos se pueden diferenciar por características químicas estructurales o bien por actividades biológicas diferentes como es el caso de *Lebrunia danae*, que presentó compuestos neurotóxicos que inhiben la acetilcolinesterasa y bloquean corrientes de la corriente Tout. Puede tratarse de un mismo compuesto con las dos actividades biológicas o ser un compuesto para cada actividad. En la separación de la fracción QAE IV mediante HPLC, no fue posible identificar el compuesto responsable para cada actividad.

Cuando sucede la despolarización en la terminación nerviosa, los canales de calcio permanecen abiertos por más tiempo, penetra Ca^2 y como consecuencia, aumenta la liberación de acetilcolina (Castañeda, 2000). Al bloquear la corriente de calcio es posible interrumpir la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina, al no haber acetilcolina no hay transmisión del impulso nervioso. Las toxinas de *Lebrunia danae* bloquearon las corrientes de calcio en el ovocito, por lo tanto, es posible que interrumpan la liberación de acetilcolina y no haya transmisión de impulso nervioso. Por otro lado, estas toxinas también inhiben la acetilcolinesterasa, la función de esta enzima es hidrolizar la acetilcolina, al no llevar a cabo su función, no se interrumpe el impulso nervioso por la presencia de acetilcolina, ocasionando una sobrestimulación de músculo hasta causar la muerte del organismo. Ambos mecanismos de acción de las toxinas de *Lebrunia danae* tienen relación con el neurotransmisor acetilcolina. Un organismo que es expuesto a las toxinas de esta especie quedará paralizado por bloqueo de canales iónicos, específicamente de calcio, ocasionando la interrupción de la liberación de acetilcolina; o bien será paralizado por una sobrestimulación causada por la inhibición del proceso de hidrólisis de la acetilcolina. Ambos mecanismos, serán las armas necesarias para que esta especie pueda defenderse y alimentarse. Podría hacer uso de uno o los dos mecanismos según lo requiera, de acuerdo a las características de la presa o el depredador.

Existen toxinas que tienen acciones facilitadoras mediadas por diferentes mecanismos que tienden a incrementar la concentración de acetilcolina en la sinapsis; estas pueden tener acciones sobre canales iónicos que prolongan la duración del potencial de acción y conducen a un incremento en la liberación de acetilcolina o la inhibición de la hidrólisis de la acetilcolina (Castañeda, 2000). La fracción F3G50, presentó compuestos tóxicos que inhibieron la acetilcolinesterasa y bloquearon los canales de calcio. Ambos mecanismos tienen relación con la concentración de acetilcolina; una parte, los canales de calcio, aseguran la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina, al ser bloqueados, estos pueden detener la liberación del neurotransmisor. Por otro lado, la inhibición de la acetilcolinesterasa evitará la hidrólisis de acetilcolina, incrementando la concentración de este neurotransmisor. Ambos mecanismos pueden actuar de manera opuesta, ya que si bloquea corrientes de calcio no habrá acetilcolina y si inhibe la hidrólisis de la acetilcolina que queda, ocasionará la parálisis inmediata de la presa o depredador debido a una sobrestimulación muscular.

El resultado de inhibición de la AChE *in vivo*, mostró que la toxina inhibe menos del 30 % la actividad enzimática. Si se tratara de un depredador o presa, las toxinas de esta anémona, inhibirían la acetilcolinesterasa y bloquearían los canales de calcio impidiendo que se libere acetilcolina. Los mecanismos pueden trabajar unidos para alcanzar un fin (toxinas sinergistas), en este caso, la muerte de la presa; al inhibir la acetilcolinesterasa habrá más acetilcolina, pero por otro lado dejará de liberarse acetilcolina al bloquear el canal de calcio, impidiendo que se libere acetilcolina. Al no hidrolizarse la acetilcolina y evitar la liberación de acetilcolina se interrumpe el impulso nervioso, ocurre la parálisis y finalmente la muerte de la presa.

Cuando una toxina no tiene un sitio específico de acción, generalmente presenta una estrategia atotóxica, la atotoxicidad puede tener dos consideraciones: La primera involucra un ataque sobre la membrana celular destruyendo su función como barrera mientras que la segunda es atacar fundamentalmente la química de la célula, en muchos casos, el ataque químico es el que involucra ácido nucleico. Las toxinas pueden alterar la membrana parcialmente o totalmente en sus funciones. Una variedad de toxinas son capaces de formar sus propios canales en la membrana celular. La acción de las proteínas aisladas de anémonas involucra diferentes mecanismos. Las hemolisinas de la anémona *R. macrodactylus*, son capaces de formar canales iónicos en las membranas. Las proteínas básicas de *Sticodactyla helianthus* también forma canales en membrana; estos canales son permeables a cationes, esta habilidad de la toxina III de *S. helianthus*, depende de la naturaleza de los lípidos de la membrana; citolisinas de *S. helianthus* se unen a esfingomiélin y esta sustancia podría utilizarse muy bien como sitio de unión en las membranas celulares. En cada sitio existe un número fundamental de sitios moleculares en los cuales las toxinas pueden actuar. Para axones estos están en los canales de sodio y potasio dependientes de voltaje.

La actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa y el análisis electrofisiológico en ovocitos de *Xenopus laevis* nos permitió establecer que el mecanismo de acción de las toxinas de *Lebrunia danae* es la inhibición de la acetilcolinesterasa y el bloqueo de canales de calcio, mecanismos necesarios para paralizar y ocasionar la muerte de presas y depredadores de esta anémona. Cada mecanismo es específico para una función diferente del organismo.

Un bloqueador específico nos permite comprender el funcionamiento o mecanismo de una canal y con qué función fisiológica está relacionado. Es posible comprender los mecanismos que utiliza esta especie y al mismo tiempo, nos permite utilizarla como una herramienta biológica para comprender la fisiología de los canales de calcio. Desde el punto de vista farmacológico, la supresión de determinadas corrientes de calcio dependientes de voltaje y la inhibición de las respuestas inhibitorias medidas por los receptores GABA B son dos blancos importantes para nuevas drogas antiepilépticas (Garateix *et al*, 2003). Los bloqueadores de los canales de calcio no son la primera opción de tratamiento para las personas con presión arterial alta que no tienen ningún otro problema cardíaco. En lugar de esto, los bloqueadores de los canales de calcio se usan con frecuencia como segundo o tercer medicamento para ayudar a bajar la presión arterial cuando otros medicamentos no han logrado bajarla lo suficiente. Sin embargo, los bloqueadores de los canales de calcio deben considerarse como primera opción de medicamento en las personas con presión arterial alta que también tienen angina de pecho o un serio riesgo de derrame cerebral o de enfermedad coronaria. En este caso, los bloqueadores de los canales de calcio por lo general se usan conjuntamente con otros medicamentos tales como diuréticos o betabloqueadores. Millones de estadounidenses usan bloqueadores de los canales de calcio (Calcium Channel Blockers, CCB 2005) para tratar la presión arterial alta, la angina de pecho y ciertas anomalías del ritmo cardíaco. La fracción QAE IV obtenida de la purificación del extracto crudo de *Lebrunia danae*, es capaz de bloquear en su totalidad las corrientes de calcio, esto es indicativo del potencial que puede llegar a tener esta toxina en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso y anomalías del ritmo cardíaco.

La Enfermedad de Alzheimer llega a afectar al 10 % de la población mayor de 65 años y a cerca del 50 % de la mayor de 85. La sintomatología de la enfermedad comienza con una pérdida progresiva de memoria, deterioro intelectual, trastornos del lenguaje, apraxia, agnosia y cambios de personalidad. Hasta el momento los fármacos utilizados sólo han logrado reponer o subsanar, en la medida de lo posible, la pérdida de actividad colinérgica característica de la enfermedad. Se dispone de estrategias que permiten incrementar la función colinérgica, entre ellas está la de inhibir la degradación de acetilcolina, inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa (fisostigmina, tacrina); aumentar la

producción de acetilcolina incrementando la disponibilidad de precursores de la misma y estimular directamente los receptores colinérgicos muscarínicos (Faus Soler, 1997).

El primer inhibidor de la acetilcolinesterasa obtenido a partir de neurotoxinas naturales fue la fasciculina (FAS) del veneno de serpientes; la FAS se caracterizó por su actividad a nivel de SNC y demostró inhibir potentemente la acetilcolinesterasa (AChE) en cada núcleo colinérgico del SNC. Además, demostró ser un ligando altamente específico para el sitio periférico de la AChE e influenciar el papel de la AChE en el desarrollo de vertebrados (Blasiona *et al.*, 2000).

La anémona *Lebrunia danae*, presentó compuestos capaces de inhibir más del 70 % la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa. En este sentido, cobra importancia médica el seguir realizando estudios con respecto a la relación entre esta neurotoxina y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Las cianobacterias producen toxinas como la anatoxina-a, un alcaloide que mimetiza la acción de la acetilcolina y se combina con los receptores de las células musculares induciendo la contracción, pero no puede ser degradado por la acetilcolinesterasa y, consecuentemente continúa actuando sobre las células musculares hasta que éstas quedan exhaustas y dejan de operar. Esta toxina bloquea a la acetilcolinesterasa lo que impide la degradación de la acetilcolina, dando como resultado la sobrestimulación de los músculos. Su capacidad de mimetizar la acción de la acetilcolina le confiere un gran interés como herramienta farmacológica. Se encuentra en estudio la posibilidad de obtener una versión modificada de este compuesto con la toxicidad reducida que pueda retardar la degeneración mental observada en la enfermedad de Alzheimer. En muchos pacientes este deterioro proviene, en parte de la destrucción de neuronas que producen la acetilcolina. La acetilcolina por si misma no se puede administrar a pacientes con Alzheimer puesto que se degrada rápidamente, por lo que la aplicación de la anatoxina-a podría ser de utilidad en la terapia de esta patología y de otras asociadas a un déficit colinérgico como la miastenia gravis (Matsunaga *et al.*, 1989). La miastenia gravis es una enfermedad autoinmune, caracterizada por debilidad muscular y fatiga; ocurre cuando el cuerpo produce de forma inapropiada anticuerpos contra los receptores de acetilcolina, y de este modo inhibe las transmisiones de señales de la acetilcolina. Los fármacos que inhiben la acetilcolinesterasa (ejemplos: neostigmina o fisostigmina) son efectivas para el tratamiento de esta afección (Brenner y Stevens, 2006).

En la actualidad existe la tendencia de la búsqueda de principios con actividad biológica a partir de fuentes naturales: bioprospección, esto con el fin de analizar su utilización potencial en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades en beneficio de la humanidad. Los ejemplos aquí mencionados indican la importante contribución que pueden ofrecer los compuestos de origen marino al estudio de procesos biológicos y fisiopatológicos y, eventualmente, también al tratamiento médico de diversos padecimientos.

Son necesarias estrategias y procedimientos para identificar y analizar mecanismos de acción de las toxinas. Previo a esto es necesario identificar especies tóxicas, técnicas de “screening” (monitoreo biológico) para detectar toxicidad, técnicas para purificar toxinas, identificación de la naturaleza química y técnicas para una identificación tentativa de los mecanismos de acción.

Los organismos venenosos usan su maquinaria metabólica, genética o la ayuda de otros organismos (simbiosis) para producir estos compuestos. Existen dos vías para la síntesis de toxinas; uno es la expresión genética que da lugar a una proteína o péptido; el otro es a través de un complejo mecanismo metabólico el cual comprende un gran número de reacciones químicas catalizadas por enzimas específicas que dan como resultado metabolitos secundarios con propiedades tóxicas (Mebs, 2001). La mayoría de las toxinas producidas por cnidarios son mezclas complejas de polipéptidos y enzimas de diferente peso molecular (Torres y Aguilar, 2003).

Desde el punto de vista biológico, puede decirse que las toxinas son herramientas que los organismos usan para incrementar sus probabilidades de supervivencia y proliferación, atacando los procesos fisiológicos esenciales de sus presas al unirse a las moléculas claves que regulan dichos procesos. Esto sólo se logra mediante una interacción específica y de alta afinidad (Garateix, 2005). Debido al hecho de que son moléculas seleccionadas de forma evolutiva para afectar procesos muy específicos en el organismo, se consideran como una herramienta de estudio muy importante para definir los mecanismos moleculares que participan en diversos procesos celulares entre los que destacan los responsables de algunas enfermedades neurodegenerativas.

Conclusiones

Las toxinas de la anémona *Lebrunia danae* presentan compuestos neuroactivos bloqueadores de canales iónicos e inhibidores de la acetilcolinesterasa con pesos moleculares aproximados de 75 a 10 kDa, los cuales actúan en sinergismo o adición y son de carácter polar hidrofílico.

Los criterios para la selección de la fase estacionaria (geles) para las columnas cromatográficas con las que se realizó el aislamiento y purificación de compuestos con actividad del extracto crudo de *L. danae*; fueron los siguientes:

- 1) Fraccionamiento del extracto crudo por tamaño molecular, por medio del gel Sephadex G-50-M.
- 2) Separación de moléculas por interacción iónica.

La fracción F3G50 presentó actividad neurotóxica en cangrejo, actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa y actividad electrofisiológica específica en canales de calcio.

El método enzimático para la búsqueda de inhibidores de la AChE resultó ser un método de evaluación eficiente y rápido (pruebas simultáneas de varias muestras, se utiliza poca muestra, es sencillo y económico), lo que permitió descartar fracciones que no presentaron la actividad biológica.

Se sugiere este método como una herramienta útil para hacer eficiente el proceso de purificación.

La purificación de la fracción F3G50 en el gel QAE Sephadex A-25 permitió la separación de cinco componentes (QAE I, QAE II, QAE III, QAE IV y QAE V), entre los cuales se repartió la actividad biológica inicial, lo que sugirió adición o sinergismo entre los componentes de la fracción F3G50.

El extracto crudo de *Lebrunia danae* presentó 27% de actividad inhibitoria de la AChE; los compuestos aislados con mayor actividad inhibitoria presentaron diferentes

porcentajes de actividad en el transcurso de la purificación; F3G50 73 % con 4 µg de proteína/µl y QAE IV 36 % con de 12 µg de proteína/µl.

El procedimiento de purificación en geles de Sephadex G-50 y QAE Sephadex A-25 del extracto crudo de *Lebrunia danae*, permitió el aislamiento de manera efectiva compuestos inhibidores de la AChE y bloqueadores de canales de calcio. No se observó efecto sobre canales de sodio ni potasio.

La purificación de la fracción QAE IV mediante HPLC se llevo a cabo por un método analítico/cualitativo y no cuantitativo. Se obtuvieron cinco componentes de la separación de la fracción QAE IV.

Es necesario continuar la investigación de los componentes obtenidos de la separación de la fracción QAE IV y detectar cual es el responsable de la actividad neurotóxica, de la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa y electrofisiológica específica en canales de calcio. Es importante comprobar si existe sinergismo entre estos componentes, o bien, si son capaces de actuar por si solos y conservan la actividad neurotóxica.

La fracción F3G50 inhibió 28.57 % de la actividad de la AChE *in vivo* en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*.

El extracto de la anémona *Lebrunia danae* contiene agentes anticolinesterásicos, por lo tanto, se puede sugerir que uno de los mecanismos de acción que utiliza la anémona *Lebrunia danae* para matar a sus presas o defenderse de depredadores, es el contacto con toxinas que inhiben la acetilcolinesterasa.

Los compuestos anticolinérgicos del extracto de *L. danae* presentaron pesos moleculares aproximados de 100 a 10 kDa (extracto crudo); de 75 a 10 kDa en la fracción F3G50; y de 50 a 20 kDa en la fracción QAE IV. La banda de mayor concentración de proteína en el extracto crudo y las fracciones F3G50 y QAE IV, correspondió a la de 50 kDa.

La fracción F3G50 obtenida del extracto crudo de *Lebrunia danae*, se separó mediante el uso de un intercambiador iónico (aniónico) QAE Sephadex A-25, obteniéndose cinco fracciones, de las cuales, la fracción IV presentó actividad en cangrejo, en el ensayo enzimático de inhibición de la acetilcolinesterasa y en el análisis electrofisiológico en ovocitos de *Xenopus laevis*.

La fracción F3G50 mostró actividad en canales de calcio a partir de una concentración de 20 µg proteína/µl; la fracción F1G50 no presentó actividad. La fracción QAE IV actuó a una concentración de 16 µg de proteína/µl, bloqueando la corriente de calcio en su totalidad.

Se determinó que la dosis mínima QAE IV en la que ocurrió el bloqueo de canales de calcio fue de 2 µg proteína/µl, mientras que la concentración a la que ocurre un bloqueo total de la corriente de calcio fue de 16 µg proteína/ µl.

La actividad bloqueadora de canales de calcio del extracto crudo y las fracciones F3G50 y QAE IV, se mantiene a pesar de exponerlas a un tratamiento térmico de 100 °C.

La exposición a las toxinas de *Lebrunia danae*, causa parálisis por bloqueo de canales iónicos, específicamente de calcio, ocasionando la interrupción de la liberación de acetilcolina en la sinapsis; o por sobrestimulación causada por la inhibición del proceso de hidrólisis de la acetilcolina.

La anémona *Lebrunia danae* produce compuestos capaces de inhibir más del 70 % la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa. En este sentido, cobra importancia la continuación de estudios con respecto a esta neurotoxina y algunas enfermedades neurodegenerativas, así como su utilización potencial en el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades

Bibliografía

- Anderluh, G., Pungercar, J., Strukelj, B., Macek, P., Gubensek, F. (1996). **Cloning, sequencing, and expression of equinatoxin II**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 437-442.
- Anderluh, G., Macek, P. (2002). **Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria)**. *Toxicon* 40, 111-124.
- Aneiros, A., García-Alonso, I., Martínez, J., Engstrom, A., Karlsson, E. (1992). **Isolation and purification of an anticholinesterase from *Bunodosoma granulifera* mucus**. *Physiopathology of nervous system Proceedings of the Second Conference* 29-32 pp.
- Aneiros, A., García, I., Martínez, J.R., Harvey, A.L., Anderson, A.J., Marshall, D.L., Engstrom, Å., Hellman, U. y Karlsson, E. (1993). **A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera***. *Biochim. Biophys. Acta*, 1157, 86-92.
- Araque, A., Urbano, F., Cerveñasky, C. García, L., Buño, W. (1995). **Selective block of Ca⁺² dependent K⁺ current in crayfish neuromuscular system and chromaffin cells by a sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom**. *Journal of neurosciencie* 42, 539-546.
- Arellano, R.O., Woodward, R.M., Miledi, R. 1995. *J. Physiol.* 484, 593-604
- Batista, U., Macek, P., Sedmak, B. (1990). **The cytotoxic and cytolytic activity of equinatoxin-II from the sea anemone *Actinia equina***. *Cell Biol. Int. Rep.* 14, 1013-1024.
- Belmonte, G., Menestrina, G., Pederzoli, C., Krizaj, I., Gubensek, F., Turk, T., Macek, P. (1994). **Primary and secondary structure of a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina* L. and its association with lipid vesicles**. *Biochim. Biophys. Acta* 1192, 197-204.
- Belmonte, G., Pederzoli, C., Macek, P., Menestrina, G. (1993). **Pore formation by sea anemone cytolsin equinatoxin-II in red blood cells and model lipid membranes**. *J. Membrane Biol.* 131, 11-22.
- Béress, L. y Béress R. (1971). **Reinigung zweier krabbenlahmender toxine aus der Seenemone *Anemonia sulcata***. *Kieler Meeresforschungen* 27, 117-127.

- Béress, L., Bruhn, T., Sánchez-Rodríguez, J., Wachter, E., Schweitz, H. (2000). **Sea anemone toxins acting on Na⁺ channels and K⁺ channels : isolation and characterization.** *Animal Toxins. Facts and protocols.* Rochat H. Y M Martin-Eauclaire (ed). Birkhauser Verlag. Berlin. pp. 31-56.
- Béress, L., Zwick, J. 1980. **Purification two crab-paralyzing polypeptides from the sea anemone *Bolocera tuediae*.** *Mar. Chem.* 8,333-338.
- Béress, L., Béress, R., Wunderer, G. (1975). **Isolation and characterization of three polypeptides with neurotoxic activity from *Anemonia sulcata*.** *FEBS Lett.* 50, 311-314.
- Bernheimer, A. W. (1990) **Cytolytic peptides of sea anemones.** *En: Marine toxins origin, structure and molecular pharmacology.* Gary Strichartz (ed). Sherwood Hall Ed. American Chemical Society Washington, D.C. pp. 305-309.
- Blasona, M. F., Faria, A. C., Gardino, P. F., Hokoc, J. N., Almeida, O. M. M. S., Mello, F. G., Arrut, C., Dajas, F. (2000). **Evidences for a non-cholinergic function of acetylcholinesterase during development of chicken retina as shown by fasciculín.** *Cell and Tissue Res* 299:173-184.
- Bradford, M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.** *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brenner, G. M, Stevens, C. W. (2006). **Pharmacology.** 2a edición. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Compañy (Elsevier).
- Bunc, M., Drevensek, G., Budihna, M., Suput, D. (1999). **Effects of equinatoxin II from *Actinia equina* (L.) on isolated rat heart: the role of direct cardiotoxic effects in equinatoxin II lethality.** *Toxicon* 37, 109-123.
- Calcium Channel Blockers (2005). Consumer reports. www.crbestbuydrugs.org
- Carlgren, O. (1949). **A Survey of the Ptychodactiaria, Corallimorpharia and Actiniaria.** *Kungl. Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, series 4, volume 1, number 1.
- Castañeda, O., Sotolongo, V., Amor, A., Stocklin, R., Anderson, Harvey, A., Engstrom, C., Wernstedt, C., Karlson, E. (1995) **Characterization of potassium channel toxin from the caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*.** *Toxicon* 33, 603-613.

- Castañeda, O., Rivera, F., Nuñez, L., Silva, R., López, T., Mas, R. (1985). **Evaluación de la capacidad anticolinestarástica de los extractos obtenidos a partir de *Bunodosoma granulifera* y *Physalia physalis***. Contribuciones, simposio de Ciencias del Mar y VII Jornada Científica del Instituto de Oceanología XX Aniversario. Editorial academia. La Habana 284-287.
- Castañeda, P.O. (2000). **Toxinas colinérgicas facilitadoras de la transmisión colinérgica**. Revista de Biología. 14, 1-11.
- Castañeda, O. (1996). **Caracterización de dos toxinas facilitadoras de la transmisión colinérgica**. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Catterall, W.A. (1984). **The molecular basis of neuronal excitability**. Science 223, 653-661.
- Catterall, W. A. (2000). **From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channel**. Neuron. 26, 13-25.
- Chávez, M.A. (1990). **Purificación de enzimas, Tomo I**. Universidad de la Habana, Facultad de Biología. 293 pp.
- Cotton, J., Crest, M., Bouet, F., Alessandri, N., Gola, M., Forest, E. Karlsson, E., Castañeda, O., Harvey, A., Vita, C., Méndez, A. (1997). **A potassium channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera* an inhibitor for K_v channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment chemical synthesis and biological activity**. Eur. J. of Biochem. 244, 192-202.
- Cruz-Vázquez, K. (2004). **Aislamiento y caracterización biológica de las sustancias activas presentes en la anémona *Lebrunia danae* (Duchassaing & Michelotti, 1860)**. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias marinas. UABC. 74 pp.
- Cunningham, P., Goetz, P. (1996). **Pisces guide to venomous and toxic marine life of the world**. Loney Planet, Oakland, CA. 160 pp.
- Dajas, F., R. Silveira, Cerveñasky, C. (1991). **Neuropharmacology of fasciculín, a potent anticholinesterase polypeptide**. Methods in Neurosciences, Conn, A.P. (Ed.) pp. 258-270.
- Deloach, P., Humnn, N. (2002). **Reef creature identification. Florida Caribbean Bahamas**. 2a ed. New World Publication. 448 pp.
- Eckert, R. (1997). **Animal Physiology: Mechanisms and adaptations**. 4 ed. W. H. Freeman and Company. 125-405 pp.

- El-Sherif, N., Fozzard, H., Hanck, D. (1992). **Dose-dependent modulation of the cardiac sodium channel by sea anemone toxin ATX II.** *Circulation research* 70, 285-301.
- Ellman, G., Courtney, D., Andres, V., Featherstone, R. (1961). **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochem Pharm* 7, 88-95.
- Faus Soler, M. T. (1997). **Tratamiento actual y nuevas perspectivas terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer.** *Farm. Hosp.* 21,195-207.
- Funjul M., Hiriart, M., Fernández de Miguel, F. (1998). **Biología funcional de los animales.** Siglo XXI. 113-168 pp.
- Garateix A. (2005). **El mar fuente de nuevos fármacos.** *Elementos* 58, 39-47.
- Garateix, A., García, T., Salceda, E., Soto, E. (2003). **Compuestos de origen marino como instrumento para el estudio del sistema nervioso.** *Avicennia* 16, 6-12.
- Gendeh G., Young, L., de Medeiros, C., Jeyaseelan, K., Harvey, A., Chung, M. (1997). **A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: isolation cDNA cloning and functional expression.** *Biochem.* 36, 11461-11471.
- Goudet, C., Ferrer, T., Galan, L., Artiles, A., Batista, C.F.V., Possani, L.D., Alvarez, J., Aneiros, A. & Tytgat, J. (2001). **Characterization of two *Bunodosoma granulifera* toxins active on cardiac sodium channels.** *Br. J. Pharmacol.* 134,1195-1206.
- Guzmán, H. M., Guevara, C. A. (1998). **Arrecifes coralinos de Bocas del Toro, Panamá: I. Distribución, estructura y estado de conservación de los arrecifes continentales de la Laguna de Chiriquí y la Bahía Almirante.** *Rev. Biol. Trop.*, 46,601-623.
- Habermann, E., Reiz, K.G. (1965). **Ein neues Verfahren zur Gewinnung der Komponenten von Bienengift, insbesondere des zentral wirksamen Peptids Apamin.** *Biochem Z.* 341, 451.
- Habermehl, G. G. (1981). **Venomous animals and their toxins.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 195 pp.
- Halstead, B. W. (1988). **Poisonous and venomous marine animals of the world.** 2a ed. The Darwin Press, Inc Princeton New Jersey. 288 pp. M.

- Hall, S., Strichartz, G. (1990). **Marine Toxins. Origin, structure and molecular pharmacology.** ACS Symposium Series 418. American Chemical Society, Washington, D. C. 377 pp.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakman, B., Sigworth, F.J. (1981). **Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell free membrane patches.** Pflügers Archiv 391, 85-100
- Harvey, A., Rowan, E., Vatanpour, H., Young, L., Castañeda, O., Mebs, D., Cerveñansky, C., Karlsson, E. (1995). **Potassium Channel Neurotoxins from Sea Anemones.** Biochemical Aspects of Marine Pharmacology 121-131 pp. Lazarovici, P. Spira, M. and E. Zlotkin (Ed.) Alaken, Inc. Fort Collins, Colorado.
- Hashimoto, Y. (1979). **Marine toxins and other bioactive marine metabolites.** Japan Scientific Societies Press. 369 pp.
- Herrera-Moreno, A., Betancourt Fernández, L., (2002). **Especies de anémonas (Coelenterata: Actiniaria: Corallimorpharia, Zoanthidea y Ceriantharia) conocidas para la Hispaniola.** Revista Ciencia y Sociedad, Universidad INTEC, Santo Domingo, 27, 439-453.
- Hessinger, D. A. (1988). **Nematocysts venoms and toxins. En: The biology of nematocysts.** Hessinger, A., Lenhoff, H. M. (Ed.). Academic Press Inc. pp. 333-368.
- Horvat-Znidars, I., Suput, D. (1996). **The effect of equinatoxin-II on nerve and muscle.** Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 431 (Suppl. 2), 279-280.
- Karlsson, E. Adem, A., Aneiros, A., Castañeda, O., Harvey, A., Jolkkonen, M., Sotolongo, V. (1991). **New toxins from marine organisms.** Toxicon 29, 1168- 1178.
- Kass-Simon, G., Scappaticci, Jr., A. A. (2002). **The behavioral and developmental physiology of nematocysts.** Can. J. Zool. 80: 1772-1794.
- Kem, W. R. (1988). **Sea anemone toxins structure and action. In: Hessinger, D.A., Lenhof, H.M. (Eds.). The Biology of Nematocysts.** Academic Press, Inc, San Diego, pp. 375-405.

- Kem, W. R., Parten, B., Pennington, M. W., Dunn, B. M., Price, D. (1989). **Isolation and characterization, and amino acid sequence of polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus***. *Biochem. J.* 28, 3483-3489.
- Kem W.R., Pennigton, M., Dunn, B. (1990). **Sea anemone polypeptide toxins affecting sodium channels**. Initial structure activity investigations. *Marine toxins origin structure and molecular pharmacology*. 279-289.
- Kem, W., Pennington M., Norton, R. (1999). **Sea anemone toxins as templates for the design of immunosuppressant drugs**. *Perspectives in drug discovery and design*. 15, 111-129.
- Kruger, N. J. (1994). **The Bradford method for protein quantitation**. **En: Methods in molecular Biology**. Basic Protein and Peptide Protocols. Walker, J. M. (ed.). Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 9-15.
- Loret, E. P., Menéndez Soto Del Valle, R., Mansuelle, P., Sampieri, F., Rochat, H. (1994). **Positively charged amino acid residues located similarly in sea anemone and scorpion toxins** *J. Biol. Chem.* 269: 16785-16788.
- Maček, P. (1992). **Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones (Actiniaria)**. *F.E.M.S. Microbiol. Immunol.* 105, 121-130.
- Maček, P., Lebez, D. (1981). **Kinetics of hemolysis induced by equinatoxin, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia 6uímic***. **Effects of some ions and pH**. *Toxicon* 19, 233-240.
- Maček, P., Lebez, D. (1988). **Isolation and characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia uímic* L.** *Toxicon* 26, 441-451.
- Maček, P., Belmonte, G., Pederzoli, C., Menestrina, G. (1994). **Mechanism of action of equinatoxin-II, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia 6uímic* L. belonging to the family of actinoporins**. *Toxicology* 87, 205-227.
- Malpezzi, E.L., De Freitas, J.C., Muramoto, K., Kamiya, H. (1993). **Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure**. *Toxicon* 37, 853-864.

- Marco, J.L. (2002). **Fronteras de la enfermedad de Alzheimer. Capítulo 8 Inhibidores clásicos y nuevos inhibidores de la acetilcolinesterasa para tratar la enfermedad de Alzheimer.** Consejo superior de investigaciones científicas. Instituto de Química Orgánica General. pp. 143-155.
- Martínez-Martos, J. M., Ramírez-Expósito, M. J., Iribar-Ibabe, C., Peimado-Herreros, J. M. (1998). **Las neurotoxinas naturales como herramientas farmacológicas para el estudio del sistema nervioso central.** Rev. Neurol. 26, 584-591.
- Matsunaga, S., Moore, R. E., Mieczcuzura, W. P., Carmichael, W. W. (1989). **Anatoxina(s), a potent anticholinesterase from Anabaena flos-aquae.** J. Am. Chem. Soc. 111, 8021-8023.
- Mebs, D., Gerbauer, E. (1980). **Isolation of proteinase inhibitory, toxic and hemolytic polypeptides from sea anemone *Stoichactis* sp.** Toxicon 18,97-106.
- Mebs, D. (2001). **Toxicity in animals. Trends in evolution?** Toxicon 39, 87-96.
- Mebs, D. F. (2002). **Venomous and Poisonous Animals. A handbook for biologist, Toxicologists, Physicians and Pharmacists.** Medpharm Scientific Publishers, CRC Press.
- Meglitsch, P. A. (1978). **Zoología de los invertebrados.** 2ª ed. H. Blume Ediciones. España. 906 pp.
- Menéndez, R., Mas, R., García, M., Garateix, A. (1990). **Anticholinergic effects of a high moléculas weight polypeptide from *Physalia physalis*.** Comp. Biochem. Physiol. 95, 63-69.
- Merino-Ibarra, M., Otero-Dávalos, L. (1983). **Atlas ambiental costero-Puerto Morelos, Quintana Roo.** CONACYT-UNAM.
- Miledi, R. (1982). **A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes.** Proc. R. Soc. Lond. B. 215, 491-497.
- Minagawa, S., Ishida, M., Nagashima, Y., Shiomi, K. (1998), **Primary structure of a potassiums channel toxin from the sea anemone *Actinia equina*.** FEBS Lett. 427, 149-151
- Narahashi, T. (1974). **Chemicals as tools in the study of excitable membranes.** Physiol Rev., 54, 813- 819.
- Norton T., Shibata, S., Kashiwagi, M., Bentley, I. (1976) **Isolation and characterization of the cardiotoxic polypeptides anthopleurin-A from the tentacles of the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*.** J Pharm. Sci. 65, 1368-1374.

- Norton, R. (1991). **Structure and structure-function relationship of sea anemone proteins that interact with the sodium channel.** *Toxicon* 29, 1051-1084.
- Norton, R. S. (1998) **Structure and function of peptides and protein toxins from marine organisms.** *J. Toxicol. Toxin Rev.* 17, 99-130.
- OpusXpress (Dirección). (2000). Molecular devices: **automated parallel oocyte voltage clamp** (video)
- Osmond, P. (2003). www.deepseaimages.com
- Pederzoli, C., Belmonte, G., Dalla Serra M., Macek, P., Transferri, G. (1995). **Biochemical and cytotoxic properties of conjugates of transferring with equinatoxin II, a cytolyisin from a sea anemone.** *Bioconjugate Chem.* 6, 166-173.
- Pohl, J., Hubalek, F., Byrnes, K., Nielsen, K., Woods, A., Pennington, M. (1995). **Solution structure of ShK toxin a novel potassium channel inhibitor from a sea anemone.** *Letters in peptide science* 1, 291-297.
- Pong-Prayoon, U., Bohloin, L., Wassuwat, S. (1991). **Neutralization of toxic effects of different crude jellyfish venoms by an extract of *Ipomea pes-caprae* (L).** *R. Br. J. Ethnopharmac.* 35, 65-9.
- Rivera, F., Frías, A., Castañeda, O., Mas, R., Betancourt, D., Pérez, J. (1987). **Anticholinesterasic properties of crude extracts from *Stoichactis helianthus* and *Condylactis gigantea*.** Abstracts Neurosciences Intermosq-meeting. 94.
- Rodríguez-Fuentes, G., Gold-Bouchot, G. (2004). **Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Marine environmental research* 58, 505-509.
- Ruíz-Rentería, F., Van Tussenbroek, B., Jordán-Dahlgren, E. (1998). **Characterization of the Puerto Morelos (México) CARICOMP site.** En: **Caribbean Coastal Marine Productivity (CARICOMP).** UNESCO. París. pp. 57-66.
- Rathmayer, W. (1976). **Sea anemone toxins: tools in the study of excitable membranes.** *Advances in Cytopharmacology*, 3, 335-344.
- Salgado, V., Kem. W. (1992). **Actions of three structurally distinct sea anemone toxins on crustacean and insect sodium channels.** *Toxicon* 30, 1365-1381.

- Schweitz, H., Bruhn, E., Guillemare, M., Danielle, M., Lancelin, J., Béress, L., Lazdunski, M. (1995) **Kalicludines and kalseptine: two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels.** J. Biol. Chem. 42, 25121-25126.
- Shapiro, B.I. (1968). **Purification of a toxin from tentacles of the sea anemone *Condylactis gigantea*.** Toxicon 5, 253-259.
- Skoog, A., West, D., Holler, F. (1992). **Química analítica.** 6^a ed. McGraw Hill. 612 pp.
- Suput, D. (1986). **Effects of equinatoxin on the membrane of skeletal muscle fibre.** Period. Biol. 88, 210-211.
- Suput, D., Rubly, N., Meves, H. (1987). **Effects of Equinatoxins on single myelinated nerve fibres. In: Progress in venom and toxin research**
- Smith, J. M. (1994). **Polyacrilamide gel electroforesis of proteins. En: M Methods in molecular Biology. Basic Protein and Peptide Protocols.** Walker, J. M. (ed.). Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 23-24.
- Takechi, M., Tanaka, Y. (1980). **Purification and characterization of anticholinesterase factor from the venom of *Naja naja atra*.** Biochem. Biophys. Acta. 623, 354-359.
- Torres-Ramos, M., Aguilar, M. (2003). **Recent advances in Cnidarian neurotoxin research.** Comments on Toxinology 9,161-174.
- Torres-Ramos, M. (2001). **Actividad biológica del veneno de la medusa *Casiopea xamachana*.** Estudios electrofisiológicos y bioquímicos. Tesis de doctorado. Centro de Neurobiología. UNAM. 130 pp.
- Turk, T., P. Maček, Suput, D. (1995). **Inhibition of acetylcholinesterase by a pseudozoanthoxanthin-like compound isolated from the zoanthid *Parazoanthus axinellae* (O. Schmidt).** Toxicon 33, 133-142 pp.
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Kirkpatrick, C.J. (2001). **The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans.** Japanese Journal of Pharmacology. 85, 2-10.
- Williamson, J. A., Fenner, P. J., Burnett, W. J. (1996). **Venomous and poisonous marine animals.** University of New South Wales Press, Australia. 504 pp.

Zorec, R., Tester, M., Maček, P., Mason, W.T. (1990). **Cytotoxicity of equinatoxin-II from the sea anemone *Actinia equina* involves ion channel formation and an increase in intracellular calcium activity.** J. Membrane Biol. 118, 243-249.