



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
(QUÍMICA ACUÁTICA)

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN DE ESTRUCTURAS  
QUÍMICAS DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN *PALYTHOA*  
*CARIBAEORUM***

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

**PRESENTA:**  
**JOSÉ FERNANDO LAZCANO PÉREZ**

**TUTOR:**  
**Dr. ROBERTO A. ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**COMITÉ TUTOR:**  
Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**  
Dr. LEOVIGILDO QUIJANO  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Dr. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES  
**UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACION DE LA  
FAC. DE QUÍMICA (SISAL, YUCATÁN)**  
Dra. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ  
**INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

MÉXICO, D. F. ENERO 2015



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.



# **Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Aislamiento, purificación y elucidación de estructuras químicas de péptidos con actividad biológica en *Palythoa caribaeorum***

## **TESIS**

**que para obtener el grado académico de**

**DOCTOR EN CIENCIAS  
(QUÍMICA ACUÁTICA)**

**presenta**

**M. en C. JOSÉ FERNANDO LAZCANO PÉREZ**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. ROBERTO A. ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS  
MONTEROS**

**COMITÉ TUTORAL: Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ  
Dr. LEOVIGILDO QUIJANO  
Dr. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES  
Dra. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**

**México, D.F. enero, 2015.**

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Coordinación de Estudios de Posgrado, por facilitarme realizar mis estudios de Doctorado y el apoyo que me brindó como estudiante, entre otros, los recursos para actividades de formación recibidos del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgar la beca para la realización de este proyecto, así como por el apoyo del Programa de Fortalecimiento Académico del Posgrado de Alta Calidad.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por darme la oportunidad de desarrollar mi trabajo de tesis y al personal de la Coordinación, Dra. Gloria Villaclara, Diana Juárez, Lupita Godoy, Chantal Ruiz y Gaby Almaraz, quienes me dieron todo su apoyo.

Al Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros, un excelente ser humano, quien me proporcionó todos los medios para realizar este trabajo así como todo el apoyo incondicional que brindó durante la realización del proyecto principalmente en los momentos más difíciles.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez, Dra. Judith Sánchez Rodríguez, Dr. Leovigildo Quijano y Dr. Sergio Rodríguez Morales por brindarme su tiempo y consejos en los exámenes y revisiones.

A los miembros del Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, Dr. David E. García, Biól. Isabel Arenas, Cand. Dr. Héctor Castro Martínez y Dr. Oscar Vivas por su valioso apoyo para la realización de los registros electrofisiológicos y tratarme como uno más de los suyos.

A la M. en C. Yadira Rufino del laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría por su apoyo en la realización de las pruebas de actividad antiparasitaria.

A la M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan y M. en C. Antonio Nieto Camacho de la Unidad de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM por su apoyo con las pruebas de actividad sobre líneas cancerosas humanas y citotoxicidad aguda en *Artemia*.

A Cinthia Zavala Monterrubio por su valiosa ayuda en el laboratorio con los experimentos.

Al Dr. Ricardo González Muñoz quien lideró el muestreo de *P. caribaeorum* e identificó a los organismos.

A la M. en C. Geraldine García Uribe y M. en C. Manuela Muhlia Montero por su ayuda en la colecta de muestras.

A la Dra. Nuria Sánchez Puig por su colaboración durante la escritura y edición de los artículos publicados.

A la Dra. Ariana Zavala Moreno por su valioso apoyo con la escritura y elaboración de la tesis.

A toda mi familia, a mis padres por su cariño y todo el apoyo incondicional, a mis hermanos Ale, Beto y Adriana por toda su ayuda durante los momentos más difíciles.

A mis grandes amigos Miriam y Manuel, quienes me apoyaron mucho en el hospital y las quimioterapias y no me dejaron solo; Ricardo, Geraldine, Thaydé, Manuela, Lidia, Fausto, Ari, Fernando López, por su amistad y grandes aventuras.

A mis compañeros de laboratorio Ari, Fernando, Lalo, Maggie, Cinthia, Dulce, Miguel, Edson y Sergio por su ayuda y colaboración.

## CONTENIDO

### INTRODUCCIÓN

<b>I</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b>	1
1. 1	Filo Cnidaria.....	2
1. 2	Toxinas de anémonas.....	3
1. 3	El estudio de los cnidarios en México.....	12
1. 4	Canales iónicos.....	13
<b>II</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	17
<b>III</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>IV</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
<b>V</b>	<b>ÁREA DE ESTUDIO</b> .....	21
<b>VI</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	
6. 1	Muestreo.....	22
6. 2	Obtención del extracto crudo.....	22
6. 3	Purificación parcial de las toxinas.....	22
6. 4	Bioensayos.....	24
6. 4. 1	Evaluación de la actividad hemolítica.....	24
6.4.2	Evaluación de la actividad de fosfolipasa A2.....	25
6.4.3	Evaluación de la actividad antiparasitaria.....	26
6.4.4	Inhibición de líneas celulares de cáncer humano.....	27
6.4.5	Ensayo de actividad neurotóxica y toxicidad aguda.....	28
6.4.6	Registro electrofisiológico sobre neuronas.....	29
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	32
<b>VIII</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	45
<b>IX</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	54
<b>X</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama típico de un organismo de la clase Anthozoa.....	2
Figura 2. Alineamiento de las toxinas tipo 1 que afectan canales de Na <sub>v</sub> .....	5
Figura 3. Alineamiento de las toxinas de la familia Stichodactylidae tipo 2 que afectan canales de Na <sub>v</sub> . .....	6
Figura 4. Toxinas tipo 2 que afectan Na <sub>v</sub> aisladas de organismos de la familia Thalassantidae. ....	6
Figura 5. Alineamiento de las toxinas tipo 3 que afectan canales de Na <sub>v</sub> .....	6
Figura 6. Alineamiento de las toxinas tipo 4 que afectan canales de Na <sub>v</sub> .....	6
Figura 7. Alineamiento de las toxinas tipo 1 que afectan canales K <sub>v</sub> .....	7
Figura 8. Kaliclodinas de <i>Anemonia sulcata</i> .....	7
Figura 9. Toxinas tipo 3 que afectan canales de potasio .....	7
Figura 10. Nuevas toxinas de <i>B. cangicum</i> .....	8
Figura 11. Alineamiento de las actinoporinas. ....	9
Figura 12. Citolisinas del grupo 3.....	10
Figura 13. Inhibidores de proteasas identificados en anémonas .....	10
Figura 14. <i>Palythoa caribaeorum</i> . ....	17
Figura 15. Estructura química de la Palytoxina.....	18
Figura 16. Distribución de los arrecifes que constituyen el SAV. ....	21
Figura 17. Nematocistos observados en muestras del raspado de la base estolonar y pólipos. ....	32
Figura 18. Cromatograma de exclusión molecular del extracto crudo. ....	33
Figura 19. Cromatograma de intercambio catiónico de F2. ....	33
Figura 20. Cromatograma de HPLC fase reversa de la F2.....	34
Figura 21. Espectro de MALDI-TOF-MS del péptido purificado a partir de la F2.....	35

Figura 22. Porcentaje de hemólisis del extracto crudo a diferentes concentraciones. ....	36
Figura 23. Actividad hemolítica de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico. ....	36
Figura 24. Actividad de fosfolipasa de los dos sustratos probados comparados con la actividad de la PLA2 de páncreas bovino. ....	37
Figura 25. Porcentaje de mortalidad de trofozoitos de <i>Giardia intestinalis</i> a diferentes concentraciones de extracto crudo. ....	38
Figura 26. Imágenes de microscopio del efecto del veneno de <i>P. caribaeorum</i> sobre trofozoitos de <i>G. intestinalis</i> . ....	38
Figura 27. Porcentaje de inhibición de células de distintas líneas cancerosas humanas. ....	39
Figura 28. Porcentaje de mortalidad de crustáceos de la especie <i>Artemia salina</i> . ....	40
Figura 29. Efecto del veneno total de <i>P. caribaeorum</i> sobre canales de $Na_v$ 1.7. ....	41
Figura 30. Efecto de la fracción F2 de la filtración en gel de <i>P. caribaeorum</i> sobre canales de $Na_v$ 1.7. ....	41
Figura 31. Respuesta de la aplicación del péptido puro sobre la corriente de sodio. ....	42
Figura 32. Efecto del extracto total sobre los canales $Ca_v$ 2.2. ....	43
Figura 33. Inhibición de la corriente de calcio por la fracción F2. ....	44
Figura 34. Inhibición de la corriente de potasio. ....	45

### LISTA DE TABLAS

Tabla I. Mecanismo y sitio de acción de algunas toxinas de $Na_v$ . ....	15
Tabla II. Toxinas y fármacos que afectan canales de $Ca_v$ . ....	16
Tabla III. Composición de las soluciones de registro. ....	30
Tabla IV. Composición de las soluciones de pipeta. ....	30
Tabla V. Actividad antiprotozoaria sobre <i>Giardia intestinalis</i> . ....	38

## RESUMEN

Los zoantideos son un grupo de cnidarios que no ha sido estudiado ampliamente desde el punto de vista farmacológico al igual que otros grupos como las anémonas y las medusas, a pesar de tener orgánulos venenosos como los nematocistos. *Palythoa caribaeorum* es un zoantideo muy abundante en los sistemas arrecifales mexicanos y habita en zonas someras de los mismos. En este trabajo se exploraron varios efectos biológicos de su veneno como son la actividad citotóxica y neurotóxica así como su posible actividad farmacológica sobre parásitos y líneas celulares cancerosas humanas. El veneno mostró actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos y de fosfolipasa. Adicionalmente, presentó efecto sobre los tres principales tipos de canales iónicos regulados por voltaje  $Na_v$ ,  $K_v$  y  $Ca_v$ . Así mismo, se logró purificar y elucidar la estructura primaria de un péptido con actividad sobre canales  $Na_v 1.7$  de neuronas de rata. Este péptido tiene un mecanismo de acción similar al de las toxinas de anémonas que afectan canales de sodio regulados por voltaje. Este es el primer reporte de un veneno de cnidario que muestra actividad directa sobre canales de calcio regulados por voltaje. Por otro lado, la actividad hemolítica sobre eritrocitos fue dependiente de la concentración y una purificación parcial del extracto mostró algunas fracciones hemolíticas activas. Finalmente, el veneno inhibió el crecimiento del parásito *Giardia intestinalis* y el crecimiento de células de cáncer de pulmón.

## **ABSTRACT**

Zoanthids are a group of cnidarians whose toxins have not been pharmacologically studied as well as other cnidarians like sea anemones and jellyfishes despite the fact that they possess the typical venomous organelles called nematocysts. *Palythoa caribaeorum* is a common zoanthid that inhabits Mexican coral reefs and is well distributed along shallow zones. In this work, different biological effects of its venom were explored such as cytotoxic and neurotoxic activities, as well as its possible pharmacological activity on parasites and several human cancer cell lines. The venom showed hemolytic and phospholipase activity on human erythrocytes. It also showed a remarkable effect on the three main types of voltage-gated ion channels named  $Na_v$ ,  $K_v$  and  $Ca_v$ . The purification and primary structure determination of a toxin acting on  $Na_v 1.7$  of rat brain were achieved. This peptide has a similar mechanism of action as sea anemone  $Na_v$  toxins. On the other hand, the same venom had a dose-dependent hemolytic activity on human erythrocytes and a partial purification led to active fractions. Finally, the venom inhibited the growth of *Giardia intestinalis* and lung cancer cells. This is the first report of a cnidarian venom acting directly on voltage-gated calcium channels.

## INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos medicamentos y sustancias con fines terapéuticos va en ascenso en los últimos años. La existencia de enfermedades para las que no existen medicamentos, la resistencia de agentes patógenos, los avances en la biología molecular y el interés en la búsqueda de nuevos fármacos potentes y específicos han fomentado la identificación de moléculas "blanco" y el estudio de anomalías estructurales y funcionales a nivel de receptores y canales iónicos.

Los organismos del filo Cnidaria han sido ampliamente estudiados como una fuente de compuestos con acciones fisiológicas específicas sobre canales iónicos y han sido instrumentos valiosos para la caracterización de sus mecanismos. Se han encontrado nuevos tipos de toxinas bloqueadoras de canales de sodio y potasio a partir de diferentes especies de anémonas que no guardan homología con otras toxinas. Además, los estudios de sus venenos comienzan a vislumbrar su acción no sólo sobre canales iónicos dependientes de voltaje sino también sobre otros receptores poco explorados en la toxicología como los receptores glutamatérgicos, los sensibles a ácido y los receptores vaniloides.

En el presente trabajo, se describe la actividad tóxica del veneno aislado de un cnidario, específicamente del grupo de los zoantideos, organismos aún poco estudiados desde el punto de vista toxicológico a pesar de estar muy emparentados con las anémonas. En este estudio, se encontró que el veneno aislado de *Palythoa caribaeorum* contiene sustancias con potencial farmacológico y se describe la actividad electrofisiológica de un péptido con acción sobre canales de sodio regulados por voltaje.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Filo Cnidaria

El filo Cnidaria se compone de aproximadamente 10,000 especies clasificadas taxonómicamente dentro de cinco clases: Anthozoa (anémonas, zoantideos y corales), Scyphozoa (medusas), Cubozoa (cubomedusas), Hydrozoa (hidropólipos e hidromedusas) y Staurozoa (stauromedusas) (Daly et al., 2007). Son organismos casi exclusivos del ambiente marino a excepción de algunas especies de la clase Hydrozoa que viven en agua dulce. Son animales simples que presentan una simetría radial y tienen dos capas de células, una exterior, el ectodermo y una interior, el endodermo; entre ambas capas se encuentra la mesoglea que es una matriz no celular (fig.1). Los cnidarios son animales principalmente carnívoros, aunque algunas especies tienen la capacidad de obtener nutrientes a través de la fotosíntesis que realizan organismos unicelulares simbiotes llamados zooxantelas que se hospedan dentro de sus tejidos.

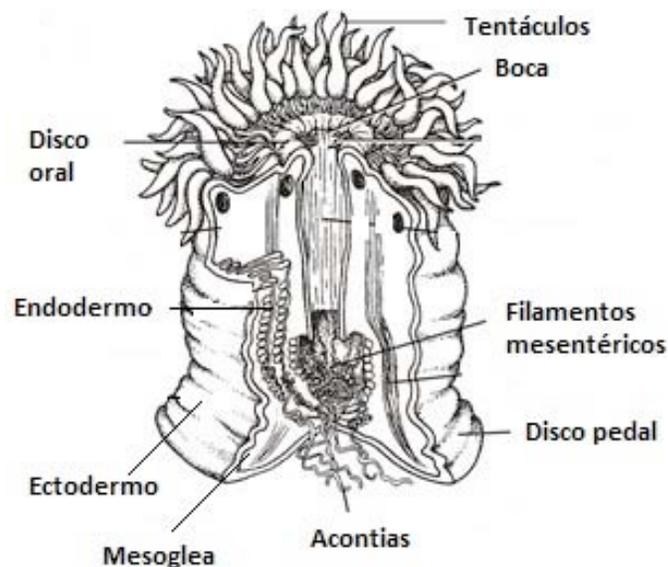


Figura 1. Diagrama típico de un organismo de la clase Anthozoa (modificado de Livingstone, 1994)

Los cnidarios se caracterizan principalmente porque todos sus organismos tienen la capacidad exclusiva de sintetizar orgánulos urticopunzantes intracelulares, llamados cnidocistos, que utilizan para atrapar a sus presas y defenderse de sus depredadores (Dunn, 1982). Existen aproximadamente 28 tipos diferentes de cnidocistos, divididos en tres categorías: los espirocistos que tienen una función adhesiva (2 tipos), los ptycocistos que tienen función de protección (1 tipo) y los nematocistos (25 tipos), (Mariscal, 1974). Dentro de los nematocistos se producen y almacenan toxinas que poseen una gran cantidad de sustancias de diversa naturaleza química tales como péptidos, proteínas, fosfolipasas, glicoproteínas, esteroides, aminas bioactivas y carbohidratos (Watters, 2005). Debido a que prácticamente todos los cnidarios son tóxicos, estos organismos representan una amplia fuente para el estudio de toxinas animales.

El estudio de estas sustancias tóxicas ha tenido relevancia desde el punto de vista médico, ya que al contacto con la piel humana pueden provocar efectos tanto sistémicos como locales, entre los cuales se encuentran los efectos dermatonecroticos, miotóxicos al corazón y en el sistema vascular de los pulmones entre otros (Torres y Aguilar, 2003). El contacto con los tentáculos de los cnidarios puede afectar primero a la piel produciendo edema, necrosis, dermatitis y urticaria. Posteriormente el veneno viaja a través del sistema linfático y los vasos capilares, y puede afectar el corazón o el sistema nervioso central. Además, son comunes las reacciones alérgicas en personas muy sensibles en las cuales pueden producir espasmos musculares y gangrena (Mebs, 2002). En casos muy severos puede haber dolor muy intenso, neuropatías, parálisis, dificultad respiratoria, síntomas oftalmológicos, mononeuritis múltiple y en varias ocasiones, la muerte (Burnett et al., 1998).

## 1.2. Toxinas de anémonas

Las toxinas de anémonas se encuentran entre las más estudiadas y más ampliamente caracterizadas en términos de su estructura y mecanismo de acción (Honma y Shiomi, 2006), mientras que las toxinas de otros cnidarios aún no han sido bien descritas, ya sea debido a su alta inestabilidad como en el caso de las medusas o bien, no han sido aisladas del todo como es el

caso de los zoantideos. De acuerdo con su blanco de acción, podemos clasificar las toxinas de la siguiente forma:

### **Neurotoxinas**

Son moléculas que afectan canales iónicos o receptores de membrana en células eléctricamente excitables. Las neurotoxinas se encuentran clasificadas hasta ahora en cuatro clases: aquellas que afectan canales de sodio, canales de potasio, canales sensibles a ácido, receptores de potencial transiente vaniloide tipo 1 (TRPV1) y algunas otras toxinas con efecto neurotóxico pero cuyo blanco de acción no ha sido aún descrito (Messerli y Greenberg, 2006; Frazao et al., 2012).

**a) Neurotoxinas que actúan sobre canales de sodio regulados por voltaje ( $Na_v$ ).** Fueron las primeras toxinas de anémonas que se reportaron y han sido las más estudiadas, probablemente por ser las más ampliamente distribuidas entre los cnidarios. Estas toxinas se unen al sitio 3 de los canales de sodio y retrasan el proceso de inactivación del canal durante el proceso de despolarización. De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, se han clasificado en cuatro tipos:

**a.1. Tipo 1:** Se conocen 35 de ellas y han sido aisladas de 13 especies de anémonas de la familia Actiniidae y dos especies de la familia Stichodactylidae. Tienen entre 46-49 aminoácidos, excepto Ae-I, la cual contiene 54 residuos (fig. 2). Todas ellas presentan tres puentes disulfuro y siguen el patrón de conectividad C1-C5, C2-C4 y C3-C6. Algunas de estas moléculas se han utilizado como herramientas farmacológicas importantes para el estudio de estos canales. Por ejemplo, ATX-II de *Anemonia sulcata* se une a la familia de canales  $Na_v1$  humanos con mayor potencia que otras toxinas peptídicas naturales.

**Aislamiento, purificación y elucidación de estructuras químicas de péptidos con actividad biológica en *Palythoa caribaeorum***

CGTX-II	-GVACRCDSDGPTVRGDSLSGTLWLT-----GGCPSGWHNCRGSGPFIGYCCKK-	48
CGTX-III	-GVACRCDSDGPTVHGDSLSGTLWLT-----GGCPSGWHNCRGSGPFIGYCCKK-	48
Cgx	-GVACRCDSDGPTVRGNSLSGTLWLT-----GGCPSGWHNCRGSGPFIGYCCKK-	48
Bg-II	-GASCRCDSDGPTSRGNTLTGTLWLI-----GRCPSGWHNCRGSGPFIGYCCKK-	48
Bg-III	-GASCRCDSDGPTSRGNTLTGTLWLI-----GRCPSGWHNCRGSGPFIGYCCKK-	48
Bc-III	-GVACRCDSDGPTSRGNTLTGTLWLT-----GGCPSGWHNCRGSGPFIGYCCKK-	48
APE1-1	-GIAACLCDSDGPSVRGNTLSGTIWL-----AGCPSGWHNCKSSGQLIGACCKQ-	47
APE1-2	-GVPCLCDSGPNVRGNTLSGTIWL-----AGCPSGWHNCKSSGPLIGACCKQ-	47
PCR1-2	-GVPCLCDSGPNVRGNTLSGTIWL-----AGCPSGWHNCKSSGPNIGWCKK-	47
Hk8a	-GVPCLCDSGPSVRGNTLSGTLWL-----FGCPSGWHNCKARGPTIGWCKK-	47
Hk16a	-GVPCLCDSGPSVRGNTLSGTLWL-----FGCPSGWHNCKAHGPTIGWCKK-	47
Hk2a	-GVPCLCDSGPSVRGNTLSGTLWL-----AGCPSGWHNCKAHGPTIGWCKK-	47
Hk7a	-GVPCLCDSGPSVHGNTLSGTIWL-----AGCPSGWHNCKAHGPTIGWCKK-	47
PCR2-10	-GVPCLCDSGPSVRGNTLSGI IWL-----FGCPSGWHNCRDHGPTIGWCKK-	47
APE2-2	-GVPCLCDSGPNVRGNTLSGILWL-----AGCPSGWHNCKAHGPTIGWCKKQ-	47
AP-C	-GVPCLCDSGPSVRGNTLSGILWL-----AGCPSGWHNCKAHGPTIGWCKKQ-	47
ATX-II	-GVPCLCDSGPSVRGNTLSGI IWL-----AGCPSGWHNCKKHGPTIGWCKKQ-	47
AFT-2	GGVPCLCDSGPSVRGNTLSGI IWL-----AGCPSGWHNCKAHGPTIGWCKKQ-	48
ATX-5	-GVPCLCDSGPSVRGNTLSGILWL-----AGCPSGWHNCKKHKPTIGWCKK--	46
PCR2-1	-GAACFCDSGPSVSGNTLSGILWL-----AGCPSGWHNCKAHGPNIGWCKK-	47
PCR2-5	-GVAACLCDSDGPSVSGNTLSGILWL-----AGCPSGWHNCKAHGPTIGWCKK-	47
PCR3-6	-GVSCLCDSGPSVSGNTLSGI IWL-----AGCPSGWHNCKAHGPNIGWCKK-	47
PCR3-7	-GVSCLCDSGPSVRGNTLSGILWFYP-----SGCPSGWHNCKAHGPTIGWCKKQ-	49
AP-A	-GVSCLCDSGPSVRGNTLSGTLWLWLP-----SGCPSGWHNCKAHGPTIGWCKKQ-	49
AP-B	-GVPCLCDSGPRPRGNTLSGILWFYP-----SGCPSGWHNCKAHGPNIGWCKK-	49
AFT-I	-GVAACLCDSDGPNVRGNTLSGTIWL-----AGCPSGWHNCKAHGPNIGWCKKQ-	47
Am-III	-GFOCRCDSDGPSVHGNTLSGTI WV-----TSCATGWHKCNSENELFHECCKQ-	47
Rc-I	-GVPCRCDSDGPSVHGNTLSGTI WV-----GSCETGWHKCNTEHNLFHECCKQ-	47
CgNa	-GVPCRCDSDGPSVHGNTLSGTI WV-----GSCASGWHKCNDEYNIA YECCKE-	47
CpI	-GVOCRCDSDGPSVHGNTLSGTI WV-----GSCASGWHKCNTEHNI FHECCKE-	47
Gigantoxin-II	-GVPCRCDSDGPHVRGNTLTGTI WV-----FGCPSGWHKCKQKGS---STCCKQ-	44
ATX-Ia	-GAACLCKSDGPNTRGNSMSGTI WV---FG---CPSGWNNC-EGRAI IGYCCKQ-	46
ATX-Ib	-GAPCLCKSDGPNTRGNSMSGTI WV---FG---CPSGWNNC-EGRAI IGYCCKQ-	46
AETX-I	-GAPCLCANS GPNTRGNDLNGI WV---FG---CPSGWHDC-HGRAMVGYCCQED	47
Ae-I	-GIPCLCVSDGPNSTRGNKLSGTI WMKTGGYGGNGC PKGWHFCGKSRGLLSDCCKQ-	54
	* * * . . ** * : : . * * . * . ** : *	** :

Figura 2. Alineamiento de las toxinas tipo 1 que afectan canales de Na<sub>v</sub>.(\*)Residuos conservados; (:) residuos semiconservados; (.) residuos no conservados con naturaleza química similar.

**a.2. Tipo 2:** Tienen entre 46-49 aminoácidos y también presentan tres puentes disulfuro. El patrón de conectividad de las cisteínas para formar los puentes es similar al de las toxinas de Tipo 1. Sus pesos moleculares varían entre 3,000 y 5,000 Da. Es interesante recalcar que se han aislado 10 toxinas diferentes de este tipo pertenecientes a anémonas de la familia Stichodactylidae (fig. 3) y recientemente se aislaron cuatro toxinas más de este tipo a partir de anémonas de la familia Thalassiantidae (Maeda et al., 2010) (fig. 4).

**Aislamiento, purificación y elucidación de estructuras químicas de péptidos con actividad biológica en *Palythoa caribaeorum***

```

Gigantoxin-III      AACKCDDDDGPDIRSATLTGTVDLGCNAGWEKSCASFYTILADCCRRPR- 48
ShP-I               AACKCDDEGPDIRTAPLTGTVDLGCNAGWEKSCASYTTIADCCRKKK- 48
Rp-III             GNCKCDDEGPNVRTAPLTGYVDLGYCNEGWEKSCASYYSPIAECRRKK- 48
Hm-V               GNCKCDDEGPNVRTAPLTGYVDLGYCNEGWEKSCASYYSPIAECRRKK-- 47
Hm-IV             GNCKCDDEGPNVRTAPLTGYVDLGYCNEGWDKSCASYYSPIAECRRKK- 48
Hm-III            GNCKCDDEGPNVRTAPLTGYVDLGYCNEGWEKSCASYYSPIAECRRKK- 48
Hm-I              ASCKCDDDDGPDVRSATFTGTVDLGCNAGWEKCLAVYTPVASCCRRKK- 48
SHTX-4            ASCKCDDDDGPDVRSATFTGTVDLGCNAGWEKCLAVYTPVASCCRRKKK- 49
Rp-II             ASCKCDDDDGPDVRSATFTGTVDLGCNAGWEKCTAVYTPVASCCRRKK- 48
Hm-II            GTCKCDDDDGPDVRTATFTGTFANCSWEKCLAVYTPVASCCRRKK- 48
. *****:*** :*:*.:** .: : ** .:*** : * : :*.***:

```

Figura 3. Alineamiento de las toxinas de la familia Stichodactylidae tipo 2 que afectan canales de Na<sub>v</sub>.

```

TLTX-Hh1x          VACKCDDDDGPDIRSATLTGTVDLGCNAGWEKSCASYTTVADCCRRPRS 49
TLTX-H1a           VACKCDDDDGPDIRSATLTGTVDLGCNAGWEKSCASYTTVIADCCRRPRS 49
TLTX-Ca1a          VACKCDDDDGPDVRSATFTGTVDLGCNAGWEKSCASYTTVIADCCRRPKG 49
*****:*****:*****: . *****:*****:*** .

```

Figura 4. Toxinas tipo 2 que afectan Na<sub>v</sub> aisladas de organismos de la familia Thalassantidae.

**a.3. Tipo 3:** Este grupo de toxinas está conformado por cuatro péptidos que poseen entre 27 y 32 aminoácidos estabilizados por ocho residuos de cisteína que forman cuatro puentes disulfuro (fig. 5).

```

Er-I              AGGKSTCCPCAMCKYTAGCPWGQCAHHCGCSE 32
PA-TX            AGGKSTCCPCAMCKYTAGCPWGQCAHHCGCSE- 31
Da-I             -GGKATCCPCFMCSYTAGCPWGQCAHHCGCSE- 30
Da-II            AGGKATCCPCFMCSYTAGCPWGQCAHHCGCSE- 31
***:***** ** . *****:*****:

```

Figura 5. Alineamiento de las toxinas tipo 3 que afectan canales de Na<sub>v</sub>.

**a.4. Tipo 4:** A este grupo pertenecen las calitoxinas I y II aisladas de la anémona *Calliactis parasitica*. Ambas tienen 46 residuos de aminoácidos (fig. 6).

```

CLX-1            IECKCEGDAPDLSHMTGTVYFSCCKGGDGSWSKNTYTAVADCCHQA 46
CLX-2           IECKCKGDAPDLSHMTGTVYFSCCKGGDGSWSKNTYTAVADCCHQA 46
*****:*****:

```

Figura 6. Alineamiento de las toxinas tipo 4 que afectan canales de Na<sub>v</sub>.

**b) Neurotoxinas que actúan sobre canales de K<sub>v</sub>:** Comprende 13 péptidos de los cuales 11 se aislaron de seis especies de anémonas de la familia Actiniidae y dos péptidos aislados de dos

especies diferentes de la familia Stichodactylidae. Al igual que las toxinas que actúan sobre canales de sodio se han clasificado en tres tipos de acuerdo con su secuencia de aminoácidos:

**b.1. Tipo 1:** Tienen entre 35-43 residuos y tres puentes disulfuro (fig. 7). Bloquean principalmente los canales K<sub>v</sub>1 (Shaker).

```

AETX-K      RSFERNQKRAKDYLKPKSECTQFR----CRTSMKYKYTNCKKTCGTC 42
ShK         -----RSCIDTIPKSRCTAFQ----CKHSMKYRLSFCRKTTCGTC 35
HmK         -----RTCKDLIPVSECTDIR----CRTSMKYRLN-LRKTTCGSC 34
AeK         -----GCKDNFSANTCKHVKANNNGC-SQKYATN-CAKTTCGKC 36
AsKS        -----ACKDNFAAATCKHVKENKNCG-SQKYATN-CAKTTCGKC 36
BgK         -----VCRDWFKETACRHAksLGNCRTSQKYRAN-CAKTCELC 37
            . * : * : * * * . * * *
    
```

Figura 7. Alineamiento de las toxinas tipo 1 que afectan canales K<sub>v</sub>

**b.2. Tipo 2:** Están representadas por las kalicludinas (AskCs) I-III. Bloquean los canales K<sub>v</sub>1 pero con menor potencia que las de tipo 1 y también poseen actividad como inhibidores de proteasas (fig. 8). Tienen entre 58-59 residuos.

```

AsKc1      INKDCLLPMDVGRASHPRYYNSSSRCEKFIYGGCRGNANNFHTLEECEKVCgVR- 58
AsKc2      INKDCLLPMDVGRASHPRYYNSSSRCEKFIYGGCRGNANNFITKKECEKVCgVR- 58
AsKc3      INGDCeLPKVVGRcRARFPRYYNLSsRRCEKFIYGGCGGNANNFHTLEECEKVCgVRS 59
            ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

Figura 8. Kalicludinas de *Anemonia sulcata*

**b.3. Tipo 3:** Representadas por las toxinas BDS-I y II de *Anemonia sulcata* y APETx-1 de *Anthopleura elegantissima* (fig. 9). Las primeras bloquean los canales K<sub>v</sub> 3.4 y la segunda bloquea el canal HERG. Am-II, aislada de *A. maculata*, no ha sido probada directamente sobre los canales, sin embargo se cree que por su gran parecido estructural con las otras toxinas, podría tener el mismo efecto.

```

BDS-I      -AAPCFcSGKPGRGDLWILRGTCPGGYGYTSNC-YKWP-NICCYPH- 43
BDS-II     -AAPCFcPGKPDrgDLWILRGTCPGGYGYTSNC-YKWP-NICCYPH- 43
Am-II      ALLsCRCEGKTEYGDkWLfhGGCONNYGYNYKC-FMKPGAVCCYPQN 46
APETx1     -GTTcYc-GKT-IGIYwFGTKTCPSNRGYTGsCGYFLG--ICCYPVD 42
            . * * * * . * * : * . * * . * : : * * *
    
```

Figura 9. Toxinas tipo 3 que afectan canales de potasio

**b.4.** Recientemente se descubrieron tres péptidos de la anémona *Bunodosoma cangicum* (Zaharenko *et al.*, 2008) y la evidencia experimental indica que bloquean los canales de potasio de forma similar a la toxina ShK (fig. 10)

```

Bcg21.75      NIVDVPCRDDYYRDSSGNG-VYDQLGGCGAA 30
Bcg23.41      NIIDVPCRPCYYRDSSGNC-VYDQLGDCGAA...
Bcg21.00      NIVDVPCRDDYYRSDGNCDVCCCKFG--GA-...
                **:*****  *****. **  *  ::*  **
    
```

Figura 10. Nuevas toxinas de *B. cangicum*

**c) Neurotoxinas que actúan sobre canales sensibles a H<sup>+</sup> (ASIC)**

APETx-2 es la única toxina conocida que bloquea los canales ASIC3. Tiene 42 residuos y presenta cierto parecido a las toxinas que afectan canales de potasio de tipo 3 pero no tiene ningún efecto sobre ellos (Diochot *et al.*, 2004).

```

APETx2      GTACSCGNSKGIYWFYRPSCTDRGYTGSCRYFLGTCCTPAD 42
    
```

Recientemente se caracterizó una nueva toxina de *Phymanthus crucifer* con actividad inhibitoria sobre ASIC y una actividad inhibitoria menor sobre canales de potasio. El péptido contiene 32 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 3477 Da (Rodríguez, A. *et al.*, 2014).

```

PhcrTx1      CASQGQKCKTKSDCCNGMWACAGTRGHTCYKPK 32
    
```

**d) Neurotoxinas que actúan sobre receptores TRPV1**

APHC1 es el primer polipéptido descubierto que modula el receptor TRPV1 y fue aislado de *Heteractis crispa* (Andreev *et al.*, 2008). Pesa 6187 Da y reduce la respuesta inducida por capsaicina en canales TRPV1 expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. Tiene alta similitud con inhibidores de tripsina tipo Kunitz aislados de anémonas. Se han probado extractos de otros cnidarios sobre estos canales y ninguno tuvo un efecto significativo por sí solo, sin embargo, se observó un efecto alostérico en la activación del canal cuando se aplicó el veneno con capsaicina (Cuyper *et al.*, 2006).

```

MKGTFILICLILIIAGFSFKSTQAGSICLEPKVVGPCYAYFRFRFYFDSETGKCTVFIYGGCEGNGNNFETLRACRAICRA
    
```

### Citolisinas

Son moléculas que afectan la membrana celular y afectan el equilibrio osmótico en la célula. Se dividen en cuatro clases de acuerdo con su peso molecular (Anderluh y Maček, 2002):

a) **Grupo 1:** son péptidos de 5-8 kDa con actividad antihistamínica y no son inhibidos por esfingomielina. No se conocen sus estructuras químicas.

b) **Grupo 2:** son el grupo más numeroso y se conocen como actinoporinas (fig. 11). En presencia de membranas lipídicas se oligomerizan para formar poros selectivos a cationes. Su acción es inhibida por esfingomielina. Tienen un peso alrededor de 20 kDa.

Eqt II	MSRLIIVFIVVTMICSATALPSKKIIDEDEDEKRSADVAGAVIDGASLSFDILKTVLEA	60
TenC	-----SADVAGAVIDGASLSFDILKTVLEA	25
Eqt IV	MSRLIIVFIVVSMICSATALPSKKIIDEDEKDEKRSVAVAGAI IKGAALTFNVLQTVLKA	60
Eqt V	MSRLIIVFIVVTMICAATALSSKKSINEDEKDEKRSVAVAGAVIEGATLTFNVLQTVLKA	60
St I	-----SELAGTIIDGASLTFEVLKVLGE	24
St II	-----ALAGTI IAGASLTFQVLKVLGE	23
HMg III	MNRLIVLFLIVTMICATIAVPSREEL-EDQKEYKRSALAGTI IEGASLGFQILDKVLGE	59
	:***:** **:* *::*..**	
Eqt II	LGNVKKRIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGPVATG	120
TenC	LGNVKKRIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGPVATG	85
Eqt IV	LGDISRKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGPVATG	120
Eqt V	LGDISRKIAVGIDNESGMTWTAMNTYFRSGTSDVILPHTVPHGKALLYNGQKDRGPVATG	120
St I	LGKVSARKIAVGIDNESGGTWTALNAYFRSGTSDVILPEVVPNTKALLYSGRKSSGPVATG	84
St II	LGKVSARKIAVGIDNESGGTWTALNAYFRSGTSDVILPEFVVPNTKALLYSGRKDTGPVATG	83
HMg III	LGKVSARKIAVGVDNESGGSWTALNAYFRSGTSDVILPEFVVPNQKALLYSGRKDTGPVATG	119
	**..:*****:***** :***:**:*****:***:.. ** : *****.*:.. *****	
Eqt II	AVGVLAYLMSDGNLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYKGRRADQRMYEELYNLSPFRG	180
TenC	AVGVLAYLMSDGNLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYKGRRADQRMYEELYNLSPFRG	145
Eqt IV	AVGVLAYAMSDGNLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYKGRRADQRMYEELYNLSPFRG	180
Eqt V	VGVLAYAMSDGNLAVLFSIPFDYNLYSNWWNVKVKYKGRRADQRMYEELYNLSPFRG	180
St I	AVAAAFAYMSNGNTLGVMFSPFDYNWYSNWWVDVKIYKGRRADQGMEDMYG-NPYRG	143
St II	AVAAAFAYMSSGNTLGVMFSPFDYNWYSNWWVDVKIYKGRRADQGMEDLYG-NPYRG	142
HMg III	AVAAAFAYMSNGHTLGVMFSPFDYNFYSNWWVDVKIYKGRRADQGMEDMYG-NPYRG	178
	.*..:** **.*:**:***:*** *****:***:.. *:* ***** ***:** .*:**	
Eqt II	DNGWHTRNLYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA	214
TenC	DNGWHTRNLYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA	179
Eqt IV	DNGWHERHLYGLKSRGFMNSSGQAILEIHVTKA	214
Eqt V	DNGWHNRDLGYGLKGRGFMNSSGQSILEIHVTKA	214
St I	DNGWYQKNLGYGLRMKGIMTSAGEAKMQIKISR-	176
St II	DNGWHEKNLGYGLRMKGIMTSAGEAKMQIKISR-	175
HMg III	DNGWHQKNLGYGLRMKGIMTSAGEAILQIRISR-	211
	*****:..*****:***:*.**.: :*****:	

Figura 11. Alineamiento de las actinoporinas.

c) **Grupo 3:** son proteínas de 30-40 kDa con o sin actividad de fosfolipasa A2 (fig. 12).

**Aislamiento, purificación y elucidación de estructuras químicas de péptidos con actividad biológica en *Palythoa caribaeorum***

```

Uc          DILQFSGMIRCATGRSAWKYFNYGNWCGWGGSGTAVDGVDS CORSHDWCYKRHDSCYPKI 60
Nv          AFWQFGRMDKCATGRRADYNGYGNWCGRGRGTPVDGVDRCCMVHDHCWDRDLVHCRPYS 60
Ac          GAFQFSYLKIKYTGRNPLDYWGYGWCWGLGGKGTVPDGDWCCYHDMCFNSITQGRPT 60
           ** . : : *** . * . ** ** * * ** . ** * * * * * * * * * : .

Uc          IPYIASTSGSHPSCSITCHSANN--RCQRDVCNCDKVAEECFARNTYH---PNNKH--- 111
Nv          NKYSYSDDRHPSCSITCNAGNND-SCEQSI CNCDKAAAEECFARNTYN---PNNKH--- 112
Ac          CSKNAPYHKNYFSGLKCS TGWLT SKCGRAICACDIAAVKCFMRNHFNNKYQNYKKNIC 119
           . : . . . * : . * : * * * . * : * * * * : * * :
    
```

Figura 12. Citolisinas del grupo 3.

**d) Grupo 4:** se conoce una toxina de este tipo, metridiolisina, aislada de *Metridium senile* (Bernheimer y Avigad, 1978). Pesa 80 kDa y es inhibida por el colesterol. Su secuencia de aminoácidos no está reportada.

**Inhibidores de proteasas**

Comprenden al menos 17 péptidos de entre 55 y 62 residuos (Norton, 2009). La posición de las seis cisteínas que tienen está altamente conservada y se caracterizan por no tener residuos de triptófano en sus estructuras (fig.13). Todas ellas se han clasificado como inhibidores del tipo Kunitz. Algunos de estos inhibidores tienen actividad bloqueadora en canales de potasio (Shiomi et al., 2003).

```

ShPI-1      -----SICSEPKKVGRCKGYFPRFYFDSETGKCTPF IYGGCGGNGNNFETLHQCR AICRA 55
ShPI-2      -----SFCLEPKRVGRCKGYFPRFYFD SKTGKCTPF IYGGCGGNGNNFETLHQCR AICRA 55
TI-IV       ----GSICLEPKVVGPC TAYFPRFYFDSETGKCTPF IYGGCEGNSYVDEKLHACR AICRA 56
AEGI-I      --DANSFCQLPAVVGKCRGYFPRFYNT EAGKCQQF IYGGCGGNRNNFETVEDCRAT CHS 58
AEGI-II     --DASSFCQLPAVVGKCRGYFPRFYNT EAGKCQQF IYGGCGGNRNNFETVEDCRAT CHS 58
SHTX-3      TEEMPALCHLQPDV PKCRGYFPRYYYNPEV GKCEQF IYGGCGGNKNNFVSFEACRATC II 60
AXPI-III    -HSSNDFCYLPAVRGR CRGYFPRYFFSSETGK CERF IYGGCGGNRNNFESAQECG STCYP 59
AXPI-I      -APVNEDCLLPKVGPCRAAVPRFYNSD SGKCEGF TYGGCHANANNFKTKDECKNACH- 58
AXAPI       -APVNEDCLLPKVGPCRAAVPRFYNSD SGKCEGF TYGGCHANANNFKTKDECKNACH- 58
AEAPI       -YPANEGCLLPMKVGPCRAAWPSYYN SKSEKCEEF TYGGCDANANNFQTEEECKKAC-- 57
AFAPI-I     -VPAN--CLLPMKVGPCRAHVPRFYNS SSGKCEGF TYGGCGANANNFQTKAQCEKACR- 56
AFAPI-III   -VPAN--CLLPMKVGPCRARVPRFYNS SSGKCEGF TYGGCGANANKFQTKAQCEKACA- 56
PI5-II      ---INGDCEL PKVVGPCRARFPRYYYNS SKRCEKF IYGGCGGNANNFHTLEECEK VCGV 57
           * . * . * : : . . . : * * * * * . * . * *
    
```

```

ShPI-1      -----
ShPI-2      -----
TI-IV       -----
AEGI-I      H---- 59
AEGI-II     H---- 59
SHTX-3      PL--- 62
AXPI-III    RE--- 61
AXPI-I      -----
AXAPI       -----
AEAPI       -----
AFAPI-I     -----
AFAPI-III   -----
PI5-II      RSVGR 62
    
```

Figura 13. Inhibidores de proteasas identificados en anémonas

## Otros polipéptidos

Aunque se han aislado otras toxinas de anémonas y elucidado sus respectivas estructuras, éstas no han sido caracterizadas funcionalmente, por ejemplo: AETX I y II de *Anemonia erythraea* con 59 residuos de aminoácidos, cinco puentes disulfuro y altamente tóxicas en crustáceos (Shiomi et al., 1997), la Gigantoxina I de *Stichodactyla gigantea*, que no es letal pero posee un potente efecto paralítico en crustáceos y muestra un 35% de homología en su secuencia con el factor de crecimiento epidérmico de los mamíferos (Shiomi et al., 2003), Am I de *Antheopsis maculata*, que tiene 27 residuos de aminoácidos y que al parecer, actúa sobre canales de sodio y Am II, que posee 46 residuos, causa parálisis en algunos crustáceos y es similar a la Gigantoxina I (Honma et al., 2005).

Estudios en acrorhagi (estructuras defensivas especiales que contienen ciertas especies de anémonas principalmente dentro de la familia Actiniidae) aislados de *Actinia equina* (Honma et al., 2005), resultaron en dos polipéptidos nuevos, las acrorhaginas I y II, de 50 y 44 residuos respectivamente, la primera sin homología alguna con cualquier otra toxina existente y la segunda presenta cierta homología con toxinas de otras especies como arañas y moluscos del género *Conus*.

Ovchinnikova et al. (2006) reportaron la purificación de un péptido con actividad antimicrobiana de 40 residuos de aminoácidos a partir de la mesoglea de la medusa *Aurelia aurita*. La aurelina mostró actividad contra bacterias Gram positivas y negativas. No mostró homología secuencial con algún otro péptido antimicrobiano reportado pero que tiene una similitud parcial con las defensinas y las toxinas bloqueadoras de K<sup>+</sup> de otras anémonas. La aurelina es un potente inhibidor de la integridad de la membrana de los linfocitos T por medio de los canales de potasio, de forma que pertenece a la familia de toxinas de la ShK.

Las hidralisinas consisten en un grupo de proteínas que forman poros de estructura , muy diferentes a las toxinas de otros cnidarios pero similares en actividad y estructura a las toxinas de bacterias y hongos (Sher et al., 2005). Las hidralisinas están formadas principalmente por hojas en forma de monómeros solubles. Su efecto es selectivo hacia receptores no fosfolipídicos y de

carbohidratos y se observó por la formación de poros de 1.2 nm de diámetro en las membranas de eritrocitos. Sin embargo, no se reportó actividad antimicrobiana.

Los trabajos con toxinas en anémonas han sido importantes como herramientas para el estudio de la estructura y función de los canales iónicos (Torres y Aguilar, 2003). Se han estudiado toxinas de aproximadamente 40 especies de anémonas, a pesar de tenerse reportadas aproximadamente unas 1200 especies en el mundo (Daly *et al.*, 2007). Ya que estos datos sugieren la distribución de péptidos tóxicos en todas las anémonas, el descubrimiento de nuevas moléculas con diversos efectos sobre distintos blancos moleculares específicos podría ser muy prometedor con todas aquellas especies aún no estudiadas, incluyendo otros cnidarios.

### 1.3 El estudio de los cnidarios en México

Los tóxicos producidos por los cnidarios que habitan los ecosistemas marinos mexicanos ha sido escasamente estudiado desde el punto de vista estructural (Torres, 2001), sin embargo, el campo de la toxicología en cnidarios se está desarrollando. Extractos en las anémonas *Bartholomea annulata* y *Stichodactyla helianthus* tienen efecto hemolítico y producen peroxidación en eritrocitos (Santamaría *et al.*, 2002; Monroy-Estrada *et al.*, 2006). Sánchez-Rodríguez y Cruz-Vázquez (2006), han reportado la presencia de neurotoxinas en *Lebrunia danae* y se han caracterizado tres lectinas en la anémona *Bunodeopsis antillensis* (Fenton-Navarro *et al.*, 2003). Experimentos con el veneno crudo y dos fracciones obtenidas de *Bunodeopsis globulifera* mostraron actividad inhibitoria contra células de cáncer de pulmón cuando se co-aplica con cisplatino (Monroy-Estrada *et al.*, 2013). Se piensa que la combinación de medicamentos antineoplásicos con toxinas de anémonas puede ayudar a la reducción de las dosis de quimioterapia y así mitigar los efectos secundarios. Recientemente, Santos *et al.* (2013), reportaron el efecto antiarritmogénico en corazón de ratas del veneno de la anémona *Condylactis gigantea*. Además, lograron purificar un péptido de 4.5 kDa que inhibe la corriente de los canales Erg1, aunque su secuencia de aminoácidos no fue reportada.

Las medusas son el grupo menos estudiado toxicológicamente en México. Se ha reportado la presencia de neurotoxinas y citolisinas en *Carybdea marsupialis* (Sánchez-Rodríguez et al., 2006) y una fracción de su veneno mostró ser neurotóxica en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con ARN total de cerebro de rata (Lazcano-Pérez, 2009). Esta fracción parece afectar un receptor de membrana acoplado a proteínas G y posiblemente un canal de potasio regulado por voltaje. Existen algunos estudios sobre la importancia toxicológica de *Linuche unguiculata* (Segura-Puertas et al., 2001) y *Aurelia aurita* (Segura-Puertas et al., 2002; Radwan et al., 2001), y se ha estudiado la actividad antitumoral y electrofisiológica del veneno de la medusa *Cassiopea xamachana* (Orduña-Novoa et al., 2003; Torres et al., 2001). Ponce et al. (2013) mostraron que el veneno de *A. aurita* inhibe los receptores de acetilcolina del sistema nervioso central de mamíferos expresados en ovocitos de *X. laevis*. Morales-Landa et al. (2007) detectaron actividad antimicrobiana en extractos de cnidarios como *C. marsupialis*, *C. xamachana*, *L. unguiculata*, *B. annulata*, *L. danae* y *S. helianthus*.

Finalmente, la importancia toxicológica de los corales de fuego se vislumbra en estudios realizados con *Millepora complanata* (Rojas et al., 2002; Ibarra-Alvarado et al., 2007). García-Arredondo et al. (2010, 2014) ha estudiado ampliamente las propiedades hemolíticas de este hidrozooario. En sus estudios destacó que el veneno contiene hemolisinas y fosfolipasas estables a temperaturas mayores a los 40°C y menores a los 100°C y que la acción hemolítica es independiente de la concentración de iones  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Posiblemente estos organismos y todos aquellos que aún no han sido estudiados como las anémonas coloniales, son una fuente potencial de nuevas sustancias con diferentes mecanismos de actividad biológica y novedosas estructuras moleculares.

#### 1.4 Canales iónicos

Las células nerviosas transmiten información a través de señales eléctricas basadas en el flujo de iones a través de sus membranas plasmáticas. En general, las células nerviosas tienen un potencial negativo llamado potencial de membrana en reposo (Purves, 2007). Un potencial de acción produce una abolición transitoria del potencial en reposo y lo hace positivo y se transmite a lo largo de los axones. De esta forma la información fluye a través del sistema nervioso. Las

señales eléctricas surgen del flujo de iones no distribuidos de forma uniforme a través de las membranas de las células nerviosas.

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que forman poros que conducen iones a través de ella y son muy importantes en la transmisión de la información en el sistema nervioso. Son altamente selectivos y la mayoría de ellos conducen una sola especie iónica como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ . Los canales iónicos se abren y se cierran en respuesta a estímulos determinados, es decir, están regulados y pueden ser: canales iónicos regulados por voltaje, es decir, se abren y se cierran en respuesta a un cambio en el potencial de la membrana; canales regulados por ligando los cuales operan por la unión de determinadas moléculas a ellos; y canales mecanosensibles que son regulados por fuerzas mecánicas que actúan sobre las membranas. Cuando un canal se abre, los iones fluyen a través de él de acuerdo con su gradiente electroquímico y producen una corriente eléctrica que puede ser detectada mediante técnicas electrofisiológicas.

**Canales de sodio:** son los responsables del inicio del potencial de acción en las células eléctricamente excitables. Normalmente están cerrados durante el potencial de membrana en reposo. Estos canales se abren cuando existe un estímulo que despolariza la membrana y dejan pasar selectivamente iones de  $\text{Na}^+$ . Ya abiertos y después de una fracción de tiempo, estos canales presentan el fenómeno de inactivación en el cual no conducen iones sin estar cerrados (Harvey *et al.*, 1993). Muchas toxinas en la naturaleza actúan sobre estos canales ya sea bloqueándolos como la tetrodotoxina, la saxitoxina y las  $\mu$ -conotoxinas o afectando su estado de inactivación como las  $\alpha$ -toxinas de los escorpiones y todas las toxinas de anémonas que se conocen hasta el momento (Arias, 2006). En los mamíferos existen nueve isoformas identificadas de estos canales clasificadas como  $\text{Na}_v1.1$  a  $\text{Na}_v1.9$  y se conocen seis sitios receptores de fármacos y neurotoxinas en ellos. Estos sitios están formados por aminoácidos básicos en los giros extracelulares del poro del canal (Tabla I) (Caterall *et al.*, 2005).

Tabla I. Mecanismo y sitio de acción de algunas toxinas de Na<sup>v</sup>

Sitio receptor	Toxina	Modo de acción
1	Tetrodotoxina, saxitoxina, $\mu$ -conotoxinas	Bloqueo del canal
2	Batracotoxina, veratridina	Mantienen una activación persistente
3	Toxinas de anémonas, -toxinas de escorpión	Prolongan la inactivación del canal
4	-toxinas de escorpión	Desplazan la activación del canal a potenciales más negativos
5	Brevetoxinas, ciguatoxinas	Desplazan la activación del canal a potenciales más negativos
6	-conotoxinas	Prolongan la inactivación del canal

**Canales de potasio:** son el grupo más grande y diverso de canales iónicos con hasta 12 familias conocidas hasta ahora (K<sub>v</sub>1-12). Las funciones fisiológicas que desempeñan son muy variadas. Participan en el mantenimiento del potencial de membrana y modulación de la excitabilidad eléctrica en neuronas y músculos (K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.2, K<sub>v</sub>1.5, K<sub>v</sub>1.6, K<sub>v</sub>2.1), regulan la señalización por calcio en linfocitos y oligodendrocitos (K<sub>v</sub>1.3) poshiperpolarización neuronal (K<sub>v</sub>1.4), repolarización del potencial de acción cardíaco (K<sub>v</sub>4.2, K<sub>v</sub>4.3), regulan la actividad de otros canales de potasio (K<sub>v</sub>5.1, K<sub>v</sub>6.1), etc. La actividad de muchos canales de potasio aún no se conoce (K<sub>v</sub>10.2, K<sub>v</sub>11.2, K<sub>v</sub>11.3 y K<sub>v</sub>12.1-12.3). Casi no se conocen activantes naturales o sintéticos de estos canales, sin embargo, muchas moléculas son capaces de bloquearlos. El tetraetilamonio (TEA) es un compuesto capaz de bloquear casi todos los tipos conocidos de canales de potasio. Los estudios sobre el bloqueo de canales de potasio por toxinas de anémonas se han enfocado hacia las familias K<sub>v</sub>1-4.

Las corrientes de potasio tipo A (I<sub>A</sub>) se describieron por primera vez en neuronas de moluscos y artrópodos. El término A deriva de su activación rápida a voltajes subumbrales seguida de una inactivación rápida. Se activan transientemente durante el decaimiento de la fase de poshiperpolarización del potencial de acción de forma que retarda la despolarización (Cai *et al.*, 2007). En lo mamíferos, la I<sub>A</sub> se encuentra en distintos subtipos de canales (K<sub>v</sub> 1.x, K<sub>v</sub> 3.x, y K<sub>v</sub>4.x).

**Canales de calcio:** regulan la entrada de calcio en respuesta a un potencial de acción. Los iones  $Ca^{2+}$  que entran a través de estos canales funcionan como segundo mensajero intracelular para iniciar diferentes eventos celulares como la liberación de neurotransmisores (Caterall, 2011). Es muy probable que las toxinas que afectan este canal inhiben la transmisión sináptica de la unión neuromuscular de la presa para producir una parálisis motora junto con otras toxinas que inhiban o activen canales de sodio y potasio (McDonough, 2007). Se clasifican de acuerdo con su actividad y son blanco de muchos fármacos principalmente sintéticos (tabla II). Se han caracterizado muy pocas toxinas que afectan este canal, las más estudiadas son principalmente de caracoles del género *Conus*, de arañas y de serpientes. Hasta el momento no existe reporte alguno sobre estudios realizados directamente sobre estos canales con venenos de cnidarios.

Tabla II. Toxinas y fármacos que afectan canales de  $Ca^{2+}_v$

Tipo	Subtipo	Fármaco	Modo de acción
L	$Ca_v1.1$ , $Ca_v1.3$ , $Ca_v1.4$	$Ca_v1.2$ , Dihidropiridinas, benzodiazepinas	Bloqueo del canal
P/Q	$Ca_v2.1$	-agatoxinas	Bloqueo del canal
N	$Ca_v2.2$	-conotoxinas	Bloqueo del canal
R	$Ca_v2.3$	SNX-482, poliamina de araña	Bloqueo del canal
T	$Ca_v3.1$ , $Ca_v3.3$	$Ca_v3.2$ , kurttoxina	Bloqueo del canal

## II. ANTECEDENTES

*Palythoa caribaeorum* (fig. 14) (Duchassaing y Michelotti, 1860), es un zoantideo o anémona colonial, formado por pólipos embebidos en una base estolonial de extensión masiva. Los pólipos tienen tentáculos marginales con nematocistos (basitricos, microbásicos *p*-mastigóforos y holotricos) y espirocistos. Forma extensas colonias con numerosos pólipos en depósitos rocosos y esqueletos calcáreos, que cuando uno es tocado, la colonia completa se retrae (González Muñoz, 2009, 2014).

En los arrecifes de plataforma como los del sistema Veracruzano, González-Muñoz (2005, 2014) reportó su amplia distribución y abundancia en la planicie arrecifal, especialmente en la subzona de arrecife posterior y la cresta arrecifal. Son las anémonas coloniales de mayor cobertura en estos sistemas, dominando comúnmente las zonas de rompiente (Sebens, 1982).



Figura 14. Fotografía de la especie de zoantideo *Palythoa caribaeorum* en su hábitat natural.

Desde el punto de vista toxinológico, *Palythoa caribaeorum* ha sido un organismo de extrema importancia por haberse reportado en él la existencia de la palytoxina (PTX), uno de los venenos más potentes hasta ahora conocidos (fig. 15). La palytoxina se encuentra principalmente en zoantidos de los géneros *Palythoa*, *Protopalythoa* y *Zoanthus* (Gleibs y Mebbs, 1999). Se aisló por primera vez en la especie *Palythoa toxica* pero su origen se cuestionó durante mucho

tiempo debido a que existían variaciones estacionales y regionales del contenido de la toxina en el organismo. Posteriormente se descubrió que algunas algas, crustáceos y peces herbívoros también contenían palytoxina, y finalmente se descubrió que los dinoflagelados del género *Ostreopsis* son los responsables de la generación de esta toxina (Usami et al., 1995). No existe hasta el momento ningún reporte sobre estudios de toxinas de origen proteico en *P. caribaeorum*.

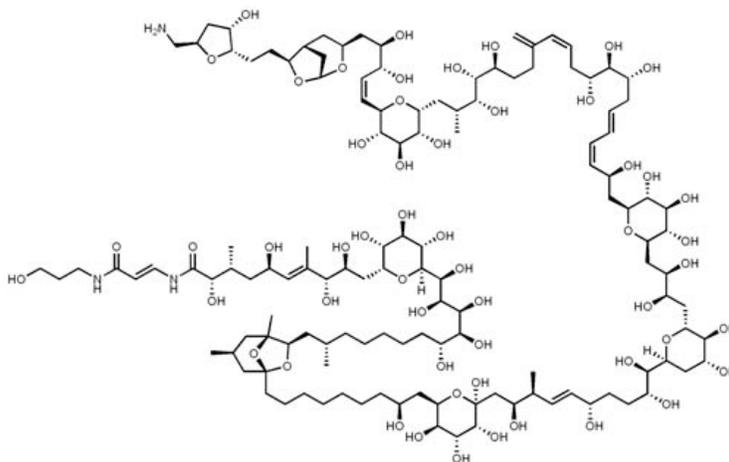


Figura 15. Estructura química de la palytoxina (Mebis, 2002)

Las toxinas de los zoantideos han sido muy poco estudiadas y solamente algunos compuestos de bajo peso molecular con actividad antiinflamatoria y antiparasitaria se han identificado a partir de este grupo (Lakshmi et al., 2004). A pesar de la diversidad de actividades reportadas en los venenos de los cnidarios en general, aún no existen reportes de actividad del veneno de los zoantideos sobre los diferentes canales iónicos regulados por voltaje o receptores de membrana. Recientemente se reportó que una fracción de bajo peso molecular extraída del zoantideo *Zoanthus sociatus* afecta la secreción de insulina de las células  $\beta$ -pancreáticas mediante la modulación de canales de calcio regulados por voltaje (Díaz-García et al., 2012). Aunque la naturaleza exacta de la molécula responsable de dicho efecto no se conoce y los experimentos no se realizaron directamente sobre los canales de calcio, este experimento sugiere la existencia de toxinas que afectan canales iónicos en los zoantideos.

Los estudios estructurales en toxinas de cnidarios se han centrado casi exclusivamente en las anémonas actiniarias. Los trabajos de Béress y Diochot se encuentran entre los más conocidos ya que reportan las estructuras primaria, secundaria y terciaria de las proteínas aisladas. De las neurotoxinas de anémonas que afectan los canales de sodio y potasio se han reportado sus secuencias completas e incluso el porcentaje de homología entre ellas y entre tipos (Norton, 1991; Messerli y Greenbeg, 2006). Diochot *et.al.* (2003), estudió los espectros de dicroísmo circular de las toxinas APETx1 y BDS I y observó que sus estructuras secundarias consisten en hojas y no detectó la presencia de hélices . Estudios similares se han hecho con APETx2 (Diochot *et al.*, 2004; Chagot *et al.*, 2005).

### III. HIPÓTESIS

El veneno de *Palythoa caribaeorum* contiene citolisinas y neurotoxinas con estructuras químicas diferentes a las de las toxinas de otras anémonas aisladas hasta el momento.

### IV.OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo General

Purificar y elucidar la estructura química de algunas toxinas aisladas de *Palythoa caribaeorum*.

#### 4.2. Objetivos particulares

- Determinar la presencia tanto de hemolisinas como neurotoxinas en el veneno del zoantideo.
- Caracterizar el veneno de *Palythoa caribaeorum* mediante estudios de actividad neurotóxica, hemolítica, antiparasitaria y de inhibición de líneas cancerosas humanas.
- Aislar y purificar las toxinas presentes por medio de técnicas cromatográficas.
- Determinar la estructura de las toxinas mediante las técnicas de espectrometría de masas y degradación de Edman.

## V. ÁREA DE ESTUDIO

El Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV) (fig. 16), está formado por 25 arrecifes de los cuales 13 se localizan frente a Antón Lizardo y el resto enfrente del Puerto de Veracruz. Se enlaza al noroeste con el SAV Norte, situado enfrente de la Laguna de Tamiahua y al este con el Sistema de Campeche y Yucatán (Gutiérrez et al., 1993; Tunnell et al., 2007).

Este sistema es uno de los más importantes en México por su tamaño y el número de especies. El SAV está formado por bajos, islas y arrecifes situados en la porción interna de la plataforma continental en el Golfo de México, los cuales se elevan desde profundidades cercanas a los 40 m (Tunnell et al., 2007). El sistema incluye dos grupos de arrecifes geográficamente separados. El primer grupo, o grupo del norte, incluye a 13 arrecifes ubicados frente a las costas de la ciudad de Veracruz y comprende ocho arrecifes de plataformas emergentes (Gallequilla, Anegada de Adentro, La Blanquilla, La Gallega, Pájaros, Isla Verde, Tierra Nueva e Isla Sacrificios), dos arrecifes de bancos sumergidos (parches de arrecife sumergidos: Bajo Mersey y Lavandera) y tres arrecifes costeros (Punta Gorda-Punta Majahua, Hornos y Punta Mocambo). El segundo grupo de arrecifes en el SAV, o grupo del sur, se localiza frente a la costa del pueblo pesquero Antón Lizardo y comprende 12 arrecifes de plataformas emergentes, Anegada de Afuera, Topatillo, Santiaguillo, Anegadilla, Polo, Isla de Enmedio, Aviso, Blanca, Chopas, El Rizo, Cabezo y El Gioté.

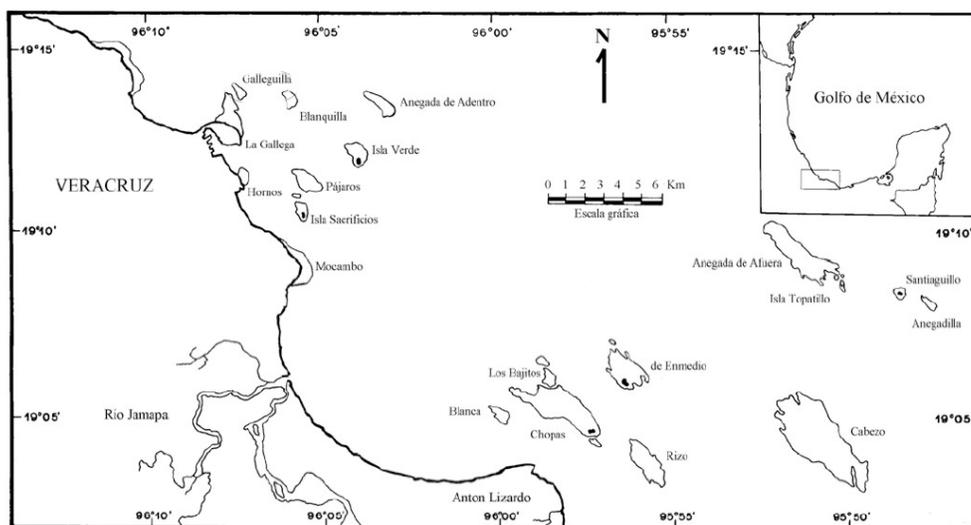


Figura 16. Distribución de los arrecifes que constituyen el SAV (tomada de Carricart-Ganivet y Horta-Puga, 1993).

## **VI. METODOLOGÍA**

### **6.1. Muestreo**

Los ejemplares de *Palythoa caribaeorum* se recolectaron en el mes de septiembre, de forma manual con ayuda de martillo y cincel para extraerlos del sustrato, mediante buceo libre. Los organismos se depositaron en bolsas de plástico con cierre hermético y se congelaron a -4°C para ser transportados al laboratorio. Posteriormente, se congelaron a -30°C hasta su uso.

### **6.2. Obtención del extracto crudo**

Los organismos se descongelaron y se fragmentaron con un martillo y un desarmador al mismo tiempo que se eliminaba la base rocosa y el tejido esponjoso. Posteriormente se pesaron 545.1 g de esta muestra, se colocaron en un vaso de precipitados de 2 L y se agregó 1 L de agua desionizada y un inhibidor de proteasas (Complete Mini de Roche). Los organismos se exprimieron cuidadosamente para exponer los tentáculos de los pólipos al medio y con ayuda de un cepillo se manipularon para lograr una mejor descarga de los nematocistos. El extracto obtenido se centrifugó a 4°C a 30 000 rpm durante 15 min. Se tomó el sobrenadante, se liofilizó y se almacenó a -30°C.

### **6.3. Purificación parcial de las toxinas**

#### **6.3.1. Separación por cromatografía de exclusión molecular**

Como primer paso, se realizó una separación cromatográfica del veneno en una columna de exclusión molecular de 118 x 1.5 cm y con una matriz de Sephadex G-50. Se inyectó 1 g de extracto disuelto en una solución 0.1 M de acetato de amonio (pH 7.0). Esta misma solución se utilizó como eluyente. El flujo fue de 0.3 ml/min y se recolectaron fracciones de 3 ml con un colector de fracciones Water (Millipore). Se leyó a 280 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech).

### **6.3.2. Separación por cromatografía de intercambio iónico**

Este segundo paso sólo se utilizó para prepurificar las hemolisinas del veneno. Se utilizó una columna de intercambio catiónico Bio-gel TSK de sulfopropil TSK SP-5-PW (BIO-RAD) de 7.5 x 0.75 cm. La columna se equilibró con una solución amortiguadora A de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M (pH 7.5). También se preparó una solución amortiguadora B de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M y NaCl 1M (pH 7.5). La muestra se diluyó en la solución amortiguadora A y se aplicó en la columna. Se eluyó por 15 min en la misma solución. Posteriormente se hizo un gradiente de 0%A-100%B por 30 min y se mantuvo en 100% de B por 20 min. Finalmente se hizo un gradiente de 100%B a 100%A de 30 min. El flujo fue de 1.0 ml/min.

### **6.3.3. Separación por HPLC en fase reversa**

Se disolvieron 2 mg de la fracción 2 (F2) obtenida por exclusión molecular en 800 l de agua desionizada y se inyectó en una columna analítica Purospher STAR C18 (5 mm) de 250 x 4,6 mm y con un gradiente lineal de agua (0.1% TFA) -acetonitrilo (0.1% TFA) del 0-60% de acetonitrilo en 60 min a un flujo de 1 ml/min. Se obtuvieron varias fracciones y los nueve picos con mayor concentración de proteína (llamados a-i), se secaron en un concentrador Speed-Vac ISS110 y se enviaron a análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.

### **6.3.4. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación**

La masa molecular del péptido activo se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF. A 5 µg del péptido se le agregaron 5 µl de una solución saturada de ácido 4-hidroxi- -cianocinámico ultrapuro. 1 µl de esta mezcla se depositó en una placa para MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente. El espectro se registró en modo lineal positivo en un espectrómetro Bruker Microflex con un láser de nitrógeno a =337 nm y un intervalo de masas de 1000 a 30,000 Da. La secuencia de aminoácidos se determinó en un espectrómetro de masas Esquire con trampa de iones (Bruker-Franzen Analytical, GmbH, Germany) en modo positivo y confirmado por degradación de Edman en un secuenciador (LF 3000, Beckman Instruments, Irvine, CA).

#### 6.4. Bioensayos

A continuación se presentan las pruebas de actividad biológica que se realizaron en el transcurso del proyecto con el extracto y en algunos casos con las fracciones obtenidas por filtración en gel y HPLC en fase reversa:

- Evaluación de la actividad hemolítica en eritrocitos humanos
- Evaluación de la actividad de fosfolipasa A2
- Actividad antiparasitaria contra *Giardia intestinalis*
- Actividad inhibitoria sobre líneas celulares cancerosas humanas:

U251 de glía de sistema nervioso central

PC-3 de próstata

K-562 de leucemia

HCT-15 de colon

MCF-7 de mama

SKLU-1 de pulmón

- Pruebas de actividad neurotóxica y toxicidad aguda: actividad en crustáceos de la especie *Platychoirograpsus spectabilis* y en *Artemia salina*
- Registros electrofisiológicos en canales de sodio, calcio y potasio regulados por voltaje sobre neuronas de ganglio cervical superior de rata mediante la técnica de Patch-Clamp.

##### 6.4.1. Evaluación de la actividad hemolítica

Para este bioensayo, se utilizaron eritrocitos humanos de sangre tipo O+ de un donador sano. La sangre se extrajo con jeringa (3ml) e inmediatamente se colocó en 50 ml de solución Alsever (composición M: glucosa 0.11, citrato de sodio 0.03, cloruro de sodio 0.07, ácido cítrico 0.002, pH7.4). Se centrifugó a 2500 rpm a 4°C por cinco minutos. El sobrenadante se eliminó en cloro y los eritrocitos se lavaron nuevamente con solución Alsever. La operación se repitió dos veces.

Se preparó un stock de 100 mg/ml del extracto crudo y se hicieron diluciones con la sangre para obtener 10 concentraciones de 1 a 10mg/ml. Las muestras se incubaron a 37°C por

30 minutos, se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min a 4 °C y se leyó en un espectrofotómetro a 415nm en una celda de cuarzo. Se utilizaron eritrocitos en Alsever como control negativo (0% de hemólisis) y eritrocitos en agua desionizada como control positivo (100% de hemólisis).

#### **6.4.2. Determinación de la actividad de fosfolipasa A2**

La actividad de fosfolipasa A2 se evaluó siguiendo el manual de ensayo para actividad PLA2 del Manual de Worthington Biochemical Corporation:

Reactivos:

a. Solución 0.1 M de  $\text{CaCl}_2$

b. Solución 1 M de NaCl

c. Emulsión de L-a-Fosfatidilcolina: Pesar 2g de L-a-Fosfatidilcolina, se adicionó 2.5 ml de 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  y 7.5 ml de NaCl 1 M, se agitó durante 30 minutos a 4 °C, se sonicó la mezcla durante 10 minutos y posteriormente y se llevó a un volumen de 100 ml.

d. Solución 0.002M de NaOH.

PLA2 de páncreas bovino:

Se disolvió la fosfolipasa a una concentración de 0.1mg/ml en agua destilada. Se mantuvo esta solución stock en hielo mientras se realizaba el ensayo.

Procedimiento:

La reacción se llevó acabo a una temperatura de 25 °C. Se midieron 4 ml de emulsión de L- -Fosfatidilcolina. Se ajustó el pH a 8.9 con hidróxido de sodio 0.01 N. Posteriormente se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de PLA2 e inmediatamente el pH comienza a bajar (por la liberación del ácido graso en la posición 2 del glicerol) y se registró el volumen de NaOH requerido para regresar el pH a 8.9 después de 3 minutos. Pasados dos minutos más, se agrega NaOH nuevamente para reajustar el pH a 8.9. Este procedimiento se realizó con PLA2 de páncreas bovino a las concentraciones de (10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{l}$ ) para calcular la actividad específica. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento con el veneno y F2.

Cálculos:

$[(\text{Velocidad de muestra} - \text{Velocidad de blanco}) \times \text{N NaOH} \times 1000] / \text{mg enzima en mezcla}$ .

Una unidad fue 1meq de L-a – fosfatidilcolina hidrolizada a L-a- lisofosfatidilcolina y un acido graso liberado por minuto a un pH de 8.9 a 25 °C

#### **6.4.3. Evaluación de la actividad antiparasitaria**

Los ensayos se realizaron con trofozoítos del parásito *Giardia intestinalis* (WB cepa de referencia, American Type Culture Collection 30957) proporcionada por el laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría. Los trofozoítos se cultivaron en tubos de 13x100 mm y medio TYI-S-33. Cuando los trofozoítos se encontraban en monocapa (fase logarítmica de crecimiento), se les decantó el medio y se sustituyó con una solución amortiguada de fosfatos (PBS 1X, pH 7.0). Los tubos se colocaron en hielo por 15 minutos y se centrifugaron durante 5 min a 3500 rpm. El PBS se decantó, el precipitado se colocó en un tubo eppendorf y los trofozoítos se cuantificaron en una cámara de Neubauer. Los ensayos se realizaron en tubos eppendorf, el volumen final fue de 1.5 ml. Se utilizó medio TYI-S-33 con un contenido de 50 000 trofozoítos/ml al que se agregó el extracto de *P. caribaeorum* a diferentes concentraciones (1000, 500, 250, 125 o 62.5 µg). Los controles fueron trofozoítos expuestos a 10 µg/ml de metronidazol (control positivo) y trofozoítos sin extracto (control negativo). Los tubos se incubaron durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se enfriaron en hielo durante 15 min y se centrifugaron. El medio de cultivo se descartó, se sustituyó con medio sin extracto y se incubaron otras 24 horas a 37°C. Finalmente, los trofozoítos se cuantificaron en una cámara de Neubauer. Se tomó como el 100% a los trofozoítos que no se expusieron al extracto y se realizó el cálculo de la población para cada uno. Se realizaron 6 experimentos de forma independiente. Se cuantificó la susceptibilidad de los trofozoítos al metronidazol a diferentes concentraciones (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6125, 0.312 y 0.156 µg/ml).

Finalmente, se calculó el porcentaje de trofozoítos muertos y los cálculos de IC<sub>50</sub> y IC<sub>90</sub> se realizaron con el programa estadístico Origin (versión 8.0).

#### 6.4.4. Screening primario para determinar el porcentaje de inhibición de líneas celulares de cáncer humano

La técnica utilizada para evaluar la inhibición de líneas celulares de cáncer humano está basada en una técnica estandarizada por el Instituto Nacional de Cáncer en los Estados Unidos (Skehan *et al.*, 1990).

Las líneas celulares utilizadas para probar la actividad del veneno de *P. caribaeorum* pertenecen al panel del National Cancer Institute y fueron las siguientes: K562 de leucemia mieloblástica crónica, HCT-15 de colon, MCF-7 de mama, PC-3 de próstata, U251 de glía del sistema nervioso central y SKLU de pulmón.

Para cosecharlas, se adicionó 1 ml de tripsina-EDTA 0.05% a cada línea en botellas de cultivo (excepto para la línea K562). Inmediatamente de que las células se desprenden del frasco se agregaron 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) con el fin de inactivar la tripsina. Las células en suspensión se depositaron en tubos cónicos de polipropileno de 15 ml y se centrifugaron por 3 min a 3000 rpm. Una vez formado el paquete celular, se agregó medio de cultivo para resuspenderlas. Posteriormente, se tomaron 10  $\mu$ l de la suspensión y se agregaron 180  $\mu$ l de azul de tripano y se determinó el número de células vivas mediante un hematocitómetro. Se hicieron los ajustes necesarios para inocular las células en un volumen de 100  $\mu$ l/pozo en una placa estéril de 96 pozos. Cada placa se inoculó con dos líneas celulares por triplicado y se preincubó a 37°C por 24 h en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa.

Se tomaron 100  $\mu$ l de una solución stock de 20 mg/ml del veneno en medio de cultivo y se agregaron a cada pozo para tener un volumen final de 200  $\mu$ l. La placa se incubó por 48 h a 37°C. Al terminar el periodo de incubación, las células se fijaron *in situ*. Se agregaron 50  $\mu$ l de una solución de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50% y se incubó a 4°C por 60 min. El sobrenadante se desechó y las placas se lavaron cinco veces con agua desionizada y secadas al ambiente. Las células fijadas se tiñeron con 100  $\mu$ l de una solución al 0.4% de sulforodamina B (SRB) y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. La SRB no unida se removió con tres lavados de ácido acético al 1% y se dejó secar al ambiente. A las placas teñidas se les agregó 100  $\mu$ l de buffer TRIS y se agitaron por 10 min para favorecer la disolución del complejo. Posteriormente, se

midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a una longitud de 515 nm. El porcentaje de inhibición del crecimiento celular (%IC) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%IC = 100 - ((DO_t - DO_b) / (DO_c - DO_b)) * 100$$

donde:

DO<sub>t</sub>: promedio de los pozos tratados con el veneno

DO<sub>c</sub>: promedio de los pozos tratados con DMSO

DO<sub>b</sub>: promedio de los pozos testigo (sin células)

#### **6.4.5. Ensayos de actividad neurotóxica y toxicidad aguda**

Para observar *in vivo* que el veneno tiene actividad neurotóxica, se utilizó el típico ensayo con cangrejos descrito por varios autores (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006; Honma *et al.*, 2008). Se compraron cangrejos de la especie *Platychoirograpsus spectabilis*. Se les inyectó 0.1ml de cada extracto crudo en el tercer apéndice caminador en dosis de 3, 6, 16 y 30 mg/ml y se observaron las reacciones. Como control, se inyectó agua.

Otro ensayo que se realizó sobre crustáceos fue el ensayo de toxicidad aguda sobre *Artemia salina* (Sam, 1993). Se contaron 10 ejemplares en 100 µl de agua de mar preparada y se colocaron en una microplaca de 96 pozos de fondo plano (COSTAR) y se agregaron 100 µl de una solución a una concentración ya ajustada del veneno. El volumen final en cada pozo fue de 100µl. Se hicieron tres soluciones de extracto crudo de 10, 100 y 1000 ppm. Se observó el número de muertes a 24 y 48 h de exposición. Cada prueba se hizo por triplicado. Como control negativo se colocaron nauplios en agua de mar. El control positivo no se realizó en estos ensayos ya que se tienen los datos previos de una curva de mortalidad con dicromato de potasio.

#### **6.4.6. Registros electrofisiológicos sobre canales iónicos regulados por voltaje**

Las neuronas del ganglio cervical superior de rata (GCS) se aislaron de ratas cepa Wistar de 5 semanas de edad y se manejaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el Uso, Cuidado y Reproducción de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Las ratas se anestesiaron con CO<sub>2</sub> y posteriormente se decapitaron con una guillotina. Se disecaron los ganglios y se colocaron en una caja con solución de Hank's, se les quito el tejido conectivo y se cortaron en pequeñas secciones. Los ganglios seccionados se transfirieron a una solución que contenía 20 U/ml de papaína y se incubaron a 37 °C por 20 minutos, pasado ese tiempo, se cambió la solución por otra que contenía una mezcla de 1 mg/ml de colagenasa tipo I y 10 mg/ml de dispasa, y se incubaron nuevamente a 37 °C por 40 min, disgregando el tejido mecánicamente cada 20 min. Terminado ese tiempo, la suspensión celular se centrifugó dos veces a 180 g por 7 min con medio Leibovitz (L-15) y una vez en medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal y 1% de penicilina-estreptomicina. Las neuronas se cultivaron en cajas de poliestireno cubiertas con poli-L-lisina (1mg/ml) e incubadas en una atmosfera de 95% aire y 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las neuronas se usaron dentro de las primeras 24 horas después del sembrado.

Las corrientes iónicas se registraron utilizando la técnica de Patch-Clamp en configuración de célula completa. Esta configuración permite el estudio poblacional de los canales presentes en la membrana celular y la diálisis de moléculas hacia el interior de la célula a través de la pipeta de registro. Las corrientes fueron registradas con un amplificador EPC-9 (Heka Instruments). Se utilizaron pipetas de registro con una resistencia de 1.8 – 2.2 M que se elaboraron con vidrio de borosilicato Kimax 51 y con un estirador de pipetas (Sutter Instruments). Las resistencias se compensaron al menos en un 60%. La frecuencia de muestreo fue de 10 KHz y la señal se filtró a 2.9 KHz. La adquisición de los datos se llevó a cabo con el programa Pulse (Heka Instruments) y el análisis posterior a la adquisición fue realizado con el programa OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation). Los protocolos de voltaje empleados se muestran en cada figura. Las corrientes se normalizaron respecto a la capacitancia de la célula. Donde fue apropiado, los datos se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media. La diferencia estadística se evaluó con la prueba *t* de Student y la hipótesis nula fue rechazada con  $p < 0.05$ .

**Aislamiento, purificación y elucidación de estructuras químicas de péptidos con actividad biológica en *Palythoa caribaeorum***

Las soluciones empleadas para aislar a las corrientes iónicas de calcio, de sodio y de potasio, se presentan en las Tablas III y IV.

Tabla III. Composición de cada una de las soluciones de registro empleadas para aislar las corrientes de Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.

Compuesto	I <sub>Ca</sub> [mM]	I <sub>Na</sub> [mM]	I <sub>K</sub> [mM]
NaCl	160	60	160
KCl	2.5		2.5
TEA-Cl		103	
Glucosa	8	8	8
CaCl <sub>2</sub>	5		5
MgCl <sub>2</sub>	1	2.9	1
HEPES	10	10	10
TTX	0.0002		0.0002
Nifedipina	0.005	0.005	0.005
CdCl <sub>2</sub>		0.1	0.1
	pH 7.4 NaOH	pH 7.4 NaOH	pH 7.4 NaOH

Tabla IV. Composición de cada una de las soluciones de pipeta empleadas para aislar las corrientes de Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.

Compuesto	I <sub>Ca</sub> [mM]	I <sub>Na</sub> [mM]	I <sub>K</sub> [mM]
CsCl	140	140	
KCl			175
TEA-Cl	32	32	
Glucosa	8		
CaCl <sub>2</sub>			
MgCl <sub>2</sub>	1	1	5
HEPES	10	10	5
BAPTA-4Cs	0.1	0.1	0.1
ATP-Mg	4	4	4

**Aislamiento, purificación y elucidación de estructuras químicas de péptidos con actividad biológica en *Palythoa caribaeorum***

---

GTP	0.3	0.3	0.3
Leupeptina	0.1	0.1	0.1
		pH 7.4 CsOH	

## VII. RESULTADOS

### Obtención del extracto

Se recolectaron aproximadamente 7 kg de *Palythoa caribaeorum* en peso húmedo. Se tomó una muestra para tomar fotografías de los nematocistos en la base estolonial y los pólipos. Se encontraron holotricos y microbásicos p-mastigóforos (fig. 17), aunque también se han reportado basitricos en los tentáculos de *P. caribaeorum* (González-Muñoz, 2009, 2014).

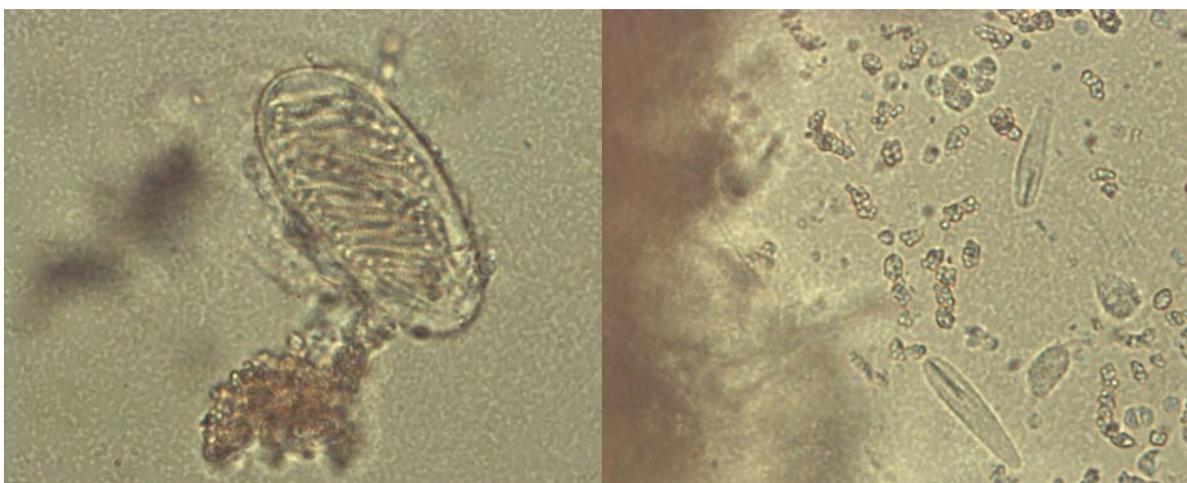


Figura 17. Nematocistos observados en muestras del raspado de la base estolonial y pólipos. A: holotrico; B: microbásico p-mastigóforo. Las fotografías se tomaron en un microscopio óptico con un aumento de 1000X con aceite de inmersión.

Se obtuvieron aproximadamente 2.832 g de extracto crudo a partir de 500 g de *Palythoa* en peso húmedo.

### Purificación parcial de las toxinas

El primer paso de purificación, una cromatografía de exclusión molecular, dio como resultado tres fracciones (fig. 18). Estas tres fracciones se liofilizaron y se guardaron hasta su uso. La fracción 1 (F1) se precipitó al resuspenderla. La fracción 2 (F2) fue soluble en agua. Esta fracción se sometió a la purificación por fase reversa y el cromatograma se presenta más adelante.

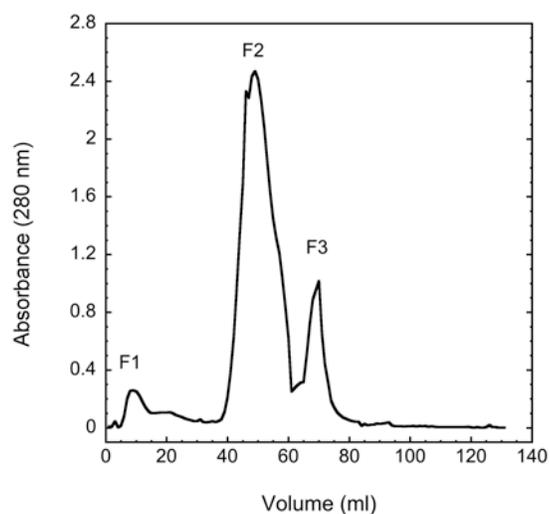


Figura 18. Cromatograma de exclusión molecular del extracto crudo.

En el caso de las hemolisinas, como segundo paso se realizó una cromatografía de intercambio catiónico en el que se obtuvieron 7 fracciones (fig. 19).

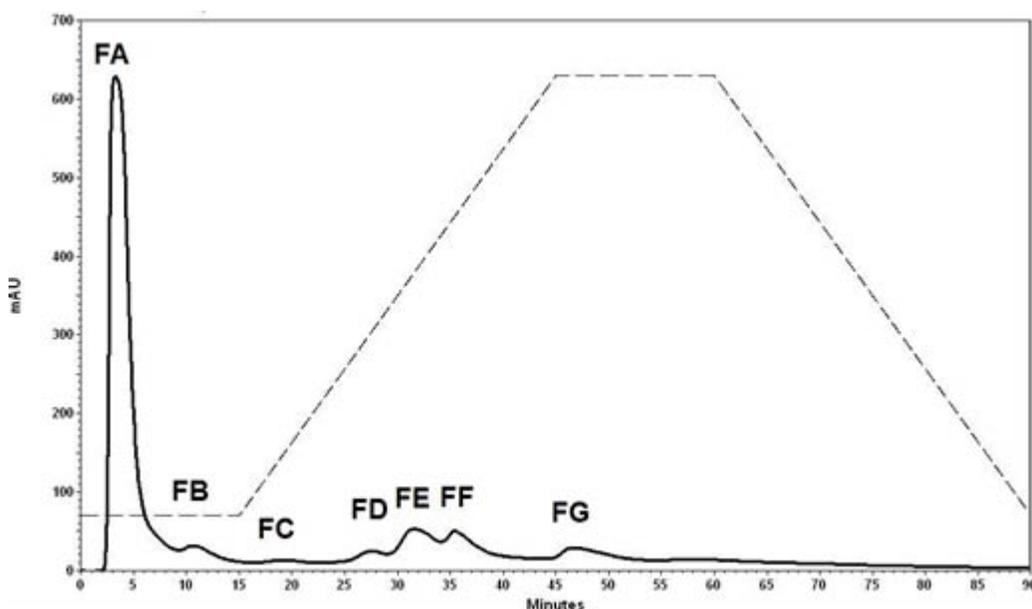


Figura 19. Cromatograma de intercambio catiónico de F2.

En el caso de las neurotoxinas, como segundo paso se realizó un fraccionamiento por HPLC en fase reversa de F2 y se obtuvieron varias fracciones de las cuales se seleccionaron las nueve fracciones más abundantes (fig. 20). Se realizaron pruebas electrofisiológicas sobre canales de sodio con todas ellas y la fracción activa se sometió a un análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF (fig. 21).

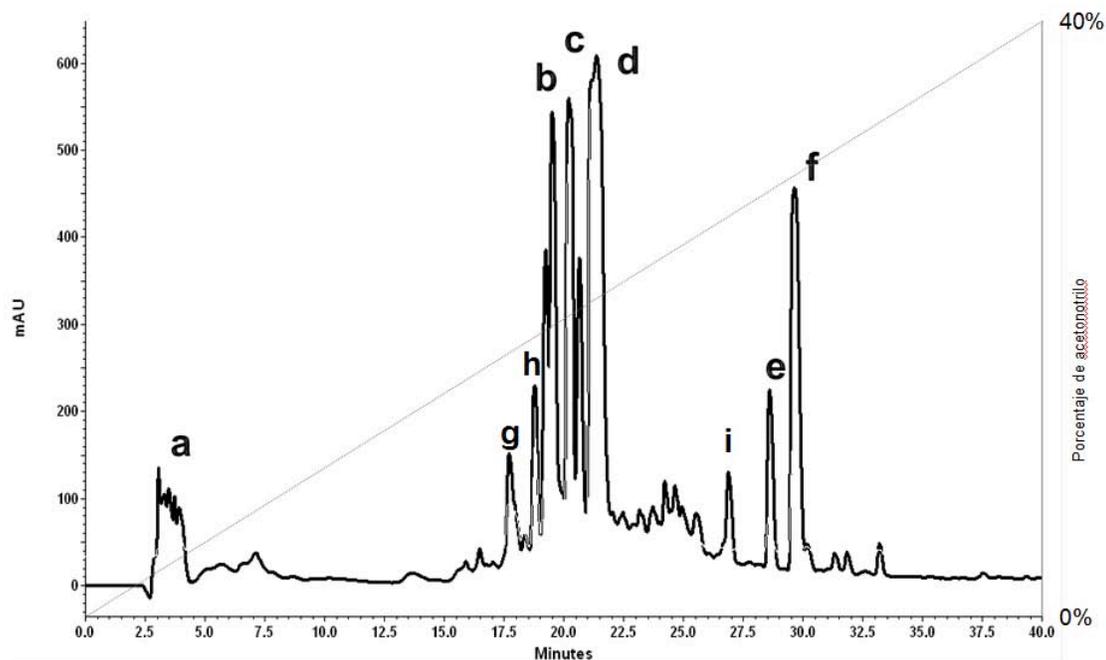


Figura 20. Cromatograma de HPLC fase reversa de F2. Las letras a-i muestran las fracciones seleccionadas para su análisis por espectrometría de masas y registros electrofisiológicos.

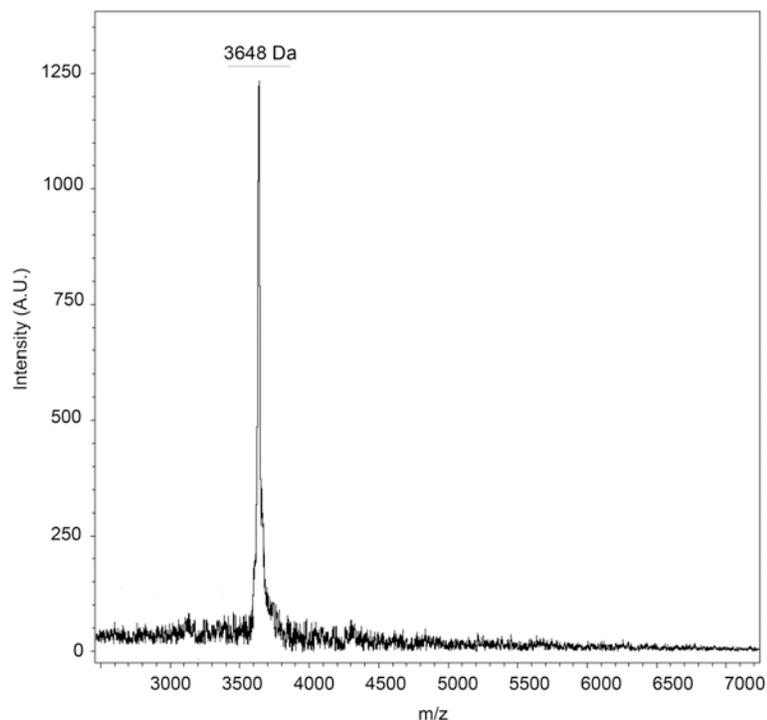


Figura 21. Espectro de MALDI-TOF-MS del péptido purificado a partir de la F2. Este péptido es el responsable del retraso en la inactivación de los canales  $Na_v1.7$ .

### Evaluación de la actividad hemolítica en eritrocitos humanos

Los experimentos de hemólisis se realizaron con el extracto total, las fracciones obtenidas de pasar éste por la columna de filtración en gel y las fracciones obtenidas de pasar la fracción activa de filtración gel por una columna de intercambio catiónico. Además, para tener una idea de la termoestabilidad de las muestras, el experimento también se realizó con el veneno calentado a 60° y 100°C. Como se observa en la fig. 22, el veneno alcanza el 100% de hemólisis a partir de una concentración de 2.6 mg/ml de proteína y comienza a perder actividad a temperaturas superiores a los 60°C. Sin embargo, no se pierde totalmente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

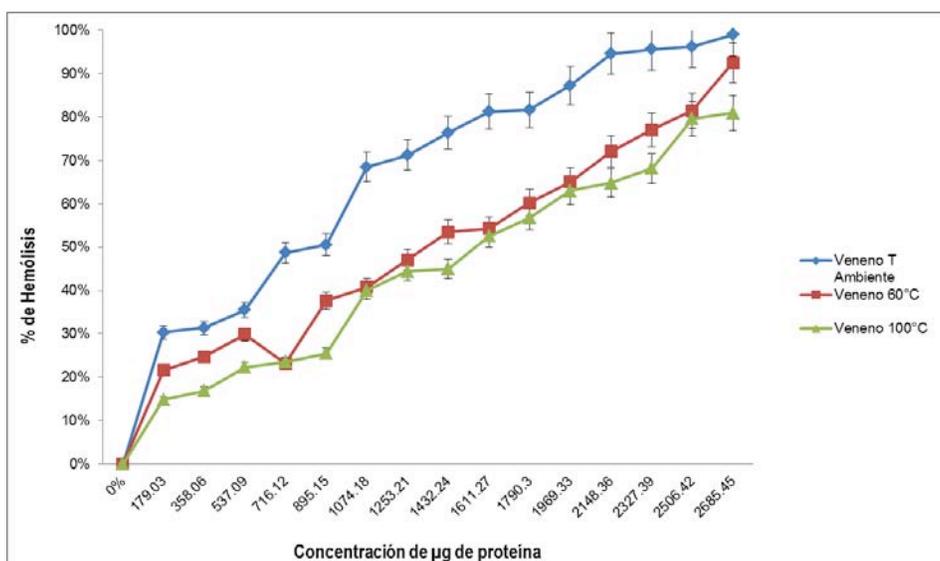


Figura 22. Porcentaje de hemólisis del extracto crudo a diferentes concentraciones.

Después de determinar que existe actividad hemolítica en el veneno, se hizo la misma prueba con las fracciones obtenidas de la purificación por filtración en gel con Sephadex G-50 y la fracción activa fue la fracción 2 (no se muestran los resultados). Esta fracción F2 se pasó por una columna de intercambio catiónico y se obtuvieron siete fracciones (FA-FG). Todas ellas se probaron para determinar la actividad hemolítica y las fracciones FD, FF y FG tuvieron la mayor actividad (fig. 23).

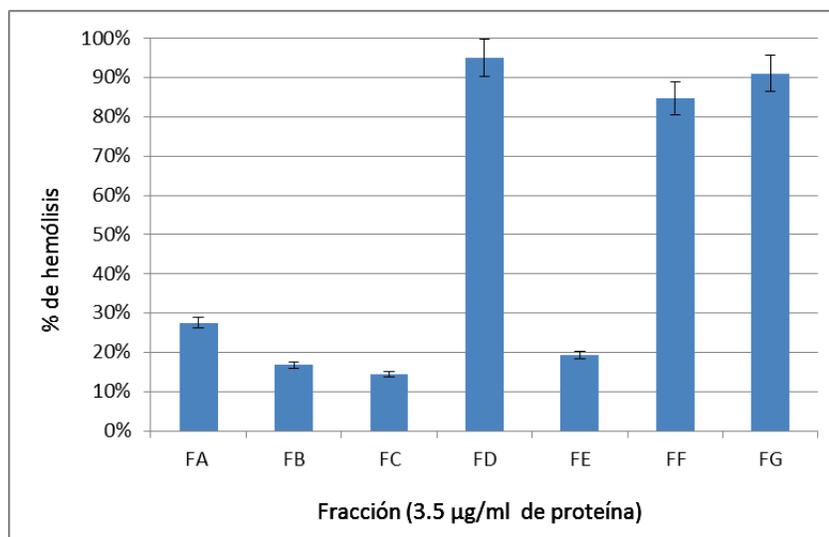


Figura 23. Actividad hemolítica de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico.

Otra forma de evaluar la actividad citolítica del veneno es a través de experimentos que evalúen su actividad como fosfolipasa A2 (PLA2). Se utilizó una PLA2 como control positivo y agua como control negativo. La fig.24 muestra las actividades obtenidas después de probar el veneno y la F2 de la cromatografía de filtración en gel. Se puede apreciar que la actividad de F2 es mucho más elevada que el veneno total.

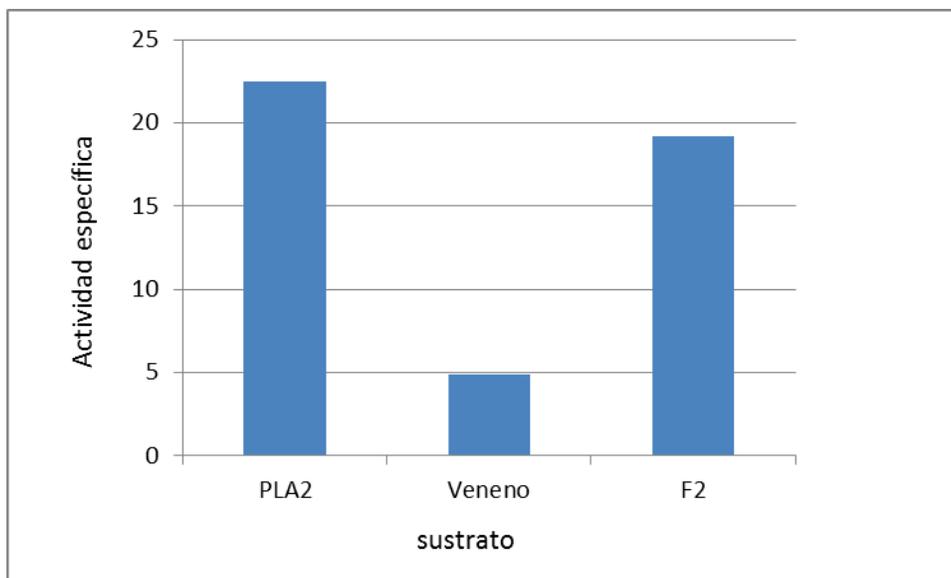


Figura 24. Actividad de fosfolipasa de los dos sustratos probados comparados con la actividad de la PLA2 de páncreas bovino.

En la fig. 25 se muestra el porcentaje de trofozoítos muertos con cada una de las concentraciones analizadas. La máxima concentración valorada fue de 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y el porcentaje de muerte de los trofozoítos fue de 96.71%. El análisis de los datos se realizó con el programa Origin 8.0. por medio de un modelo logístico y aplicando la ecuación  $y=A_2+(A_1-A_2)(1+(x/x_0)^p)$ . La concentración inhibitoria calculada para el 50% y 90% (IC50 e IC90) se presentan en la tabla V. Los trofozoítos expuestos a 24 horas con extracto (500 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 24 horas de recultivo en medio TYI-S-33 sin extracto mostraron daño. Las imágenes se registraron en un microscopio Olympus BX50 y el programa Imagen-Pro Insight (Media Cybernetics) (fig. 26).

Tabla V. Actividad antiprotozoaria sobre *Giardia intestinalis* del veneno de *Palythoa caribaeorum*

Muestra	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	IC <sub>90</sub> (µg/ml)
veneno	183.54	302.05
metronidazol	0.281	3.05

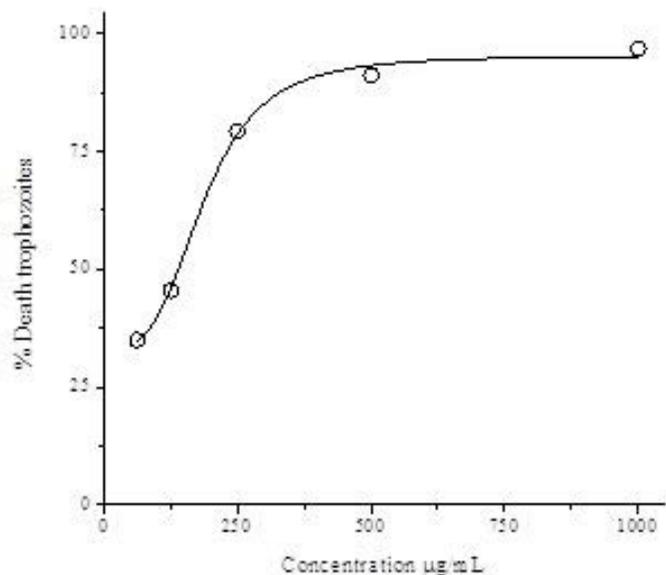


Figura 25. Porcentaje de mortalidad de trofozoitos de *Giardia intestinalis* a diferentes concentraciones de extracto crudo.

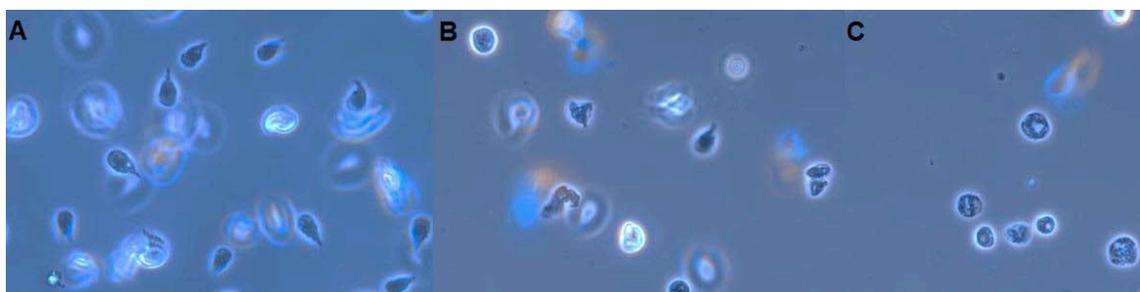


Figura 26. Imágenes de microscopio del efecto del veneno de *P. caribaeorum* sobre trofozoitos de *G. intestinalis*. A) Trofozoitos no expuestos al veneno (piriformes, citoplasma refringente, flagelos y disco succionador). B) Expuestos a 500 µg/ml de veneno. Se observan algunos organismos aumentados de tamaño y amorfos. C) Expuestos a 1000 µg/ml de veneno. Escasos trofozoitos con pérdida de la morfología típica, aumentados de volumen y con vacuolas en el citoplasma.

Finalmente, el extracto se probó en seis líneas celulares cancerosas humanas y se observó el mayor efecto inhibitorio (53.7%) en la línea SKLU-1 de cáncer de pulmón seguido de un efecto del 44.73% y 42.87% sobre cáncer de glía de sistema nervioso central y leucemia respectivamente.

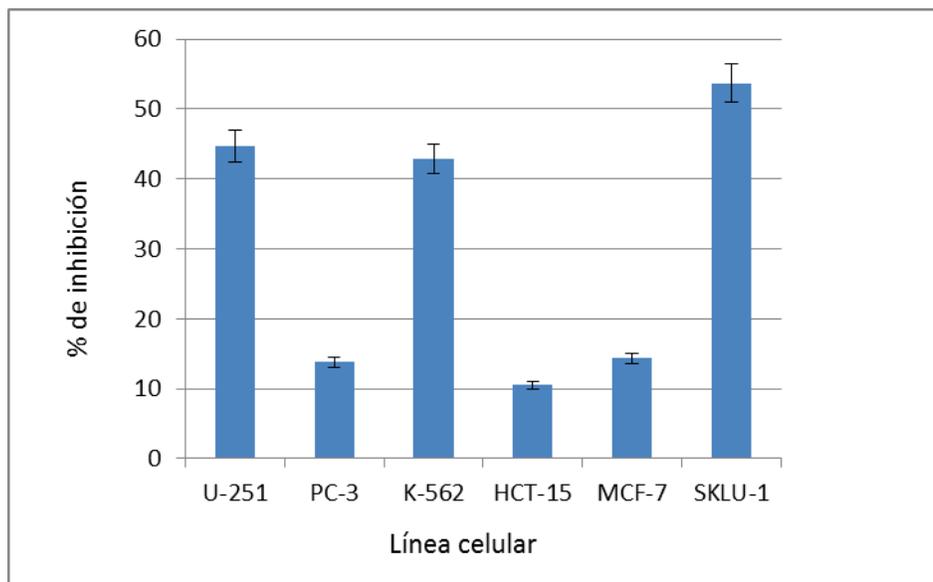


Figura 27. Porcentaje de inhibición de células de distintas líneas cancerosas humanas (U-251: glía de sistema nervioso central; PC-3: próstata; K-562: leucemia; HCT-15: colon; MCF-7: mama; SKLU: pulmón).

### Evaluación de la actividad neurotóxica y toxicidad aguda

En ninguno de los cangrejos inyectados se observaron los síntomas típicos de actividad neurotóxica como temblores o parálisis, sin embargo, después de aproximadamente 3 horas, todos murieron. Se observó casi un 60% de mortalidad de *Artemia salina* con una concentración de 1000 ppm en 48 h (fig. 28).

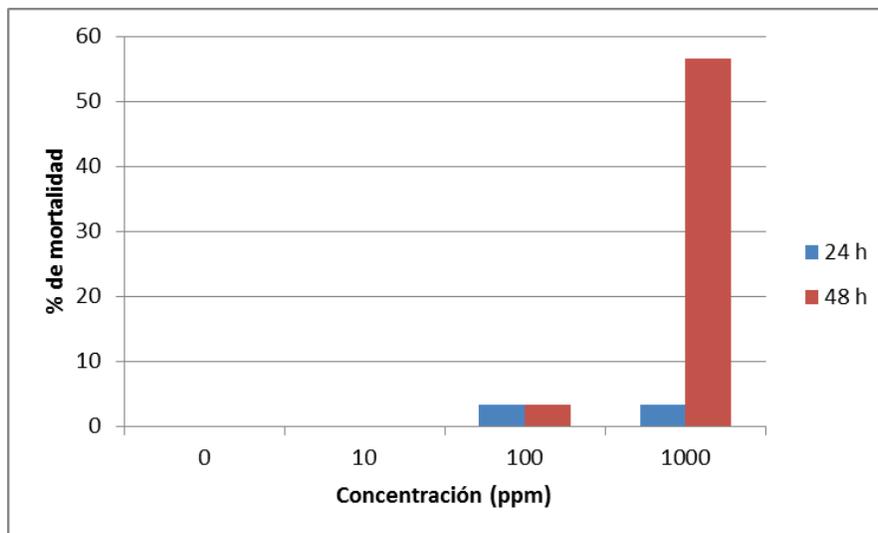


Figura 28. Porcentaje de mortalidad de crustáceos de la especie *Artemia salina* al aplicarse diferentes concentraciones del extracto.

### Registros electrofisiológicos sobre neuronas de rata

Los registros electrofisiológicos se realizaron sobre el extracto crudo (PA) y la fracción 2 (F2) sobre canales iónicos dependientes de voltaje. Los estudios electrofisiológicos sobre canales de sodio mostraron que el extracto modula la inactivación del canal de sodio ( $Na_v1.7$ ) regulado por voltaje (fig. 29). A continuación se hizo el mismo experimento con F2 obtenida por exclusión molecular y el resultado fue similar (fig. 30). El efecto tanto del extracto como de F2 es reversible en más del 50%, ya que se puede observar que la corriente después del lavado se recupera y vuelve a parecerse a la condición control.

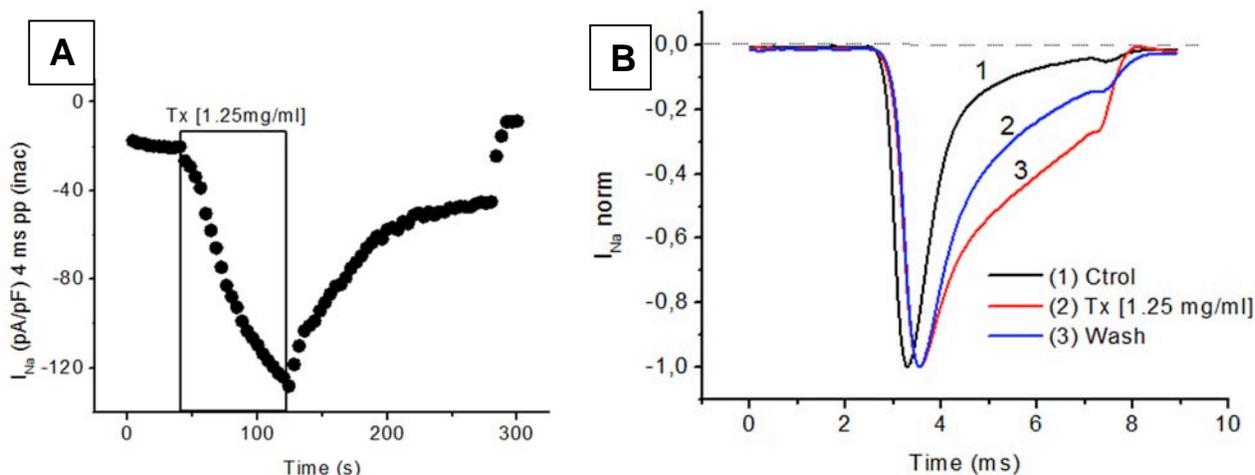


Figura 29. Efecto del veneno total de *P. caribaeorum* sobre canales de sodio  $Na_v$  1.7. A) Curso temporal de la amplitud de corriente durante la fase de decaimiento de la corriente de sodio. La corriente se evocó con un pulso cuadrado desde  $-80$  mV a  $-20$  mV por 5 ms cada 4 s. El valor de la amplitud de corriente se normalizó respecto al tamaño de la célula (pA/pF). La aplicación de la toxina está marcada en un recuadro. B) Curvas representativas obtenidas durante la aplicación del (1) control, (2) veneno, (3) lavado, (4) TTX.

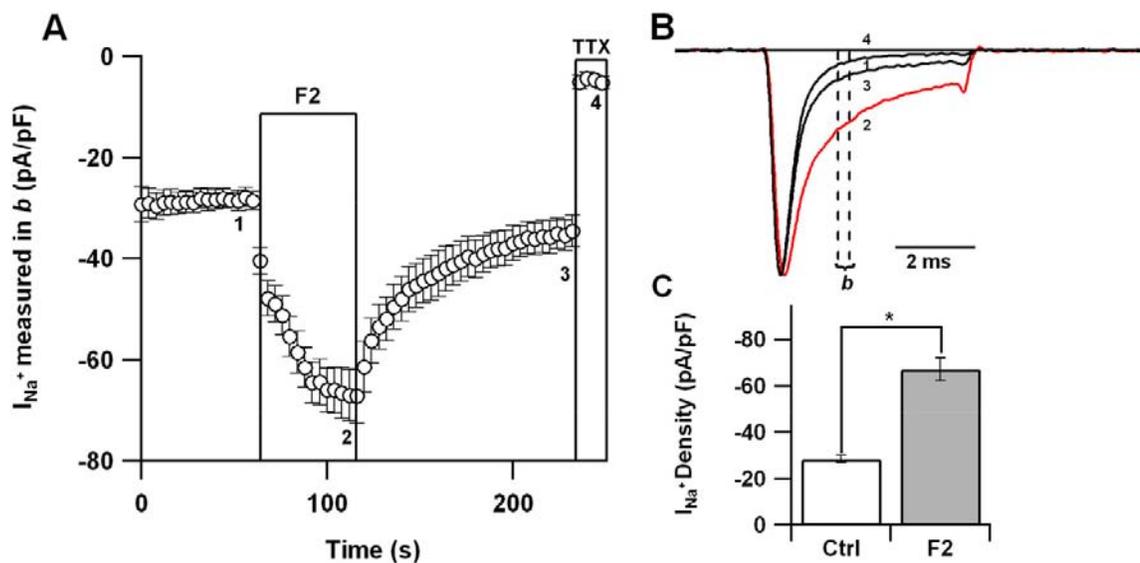


Figura 30. Efecto de la fracción F2 de la filtración en gel de *P. caribaeorum* sobre canales de sodio  $Na_v$  1.7. A) Curso temporal de la amplitud de corriente durante la fase de decaimiento de la corriente de sodio. La corriente se evocó con un pulso cuadrado desde  $-80$  mV a  $-20$  mV por 5 ms cada 4 s. El valor de la amplitud de corriente se normalizó respecto al tamaño de la célula. La aplicación de F2 y la TTX están marcadas en un recuadro. B) Trazos representativos obtenidos durante las condiciones (1) control, (2) F2, (3) lavado, y (4) TTX. C) Densidad media de la corriente bajo condiciones control y después de aplicar el veneno.

Como se mencionó anteriormente, el registro sobre canales de  $Na_v^{+1.7}$ , se realizó con las fracciones obtenidas de la separación de F2 por HPLC en fase reversa. La fig. 31, muestra el resultado obtenido con la única fracción activa (n=4).

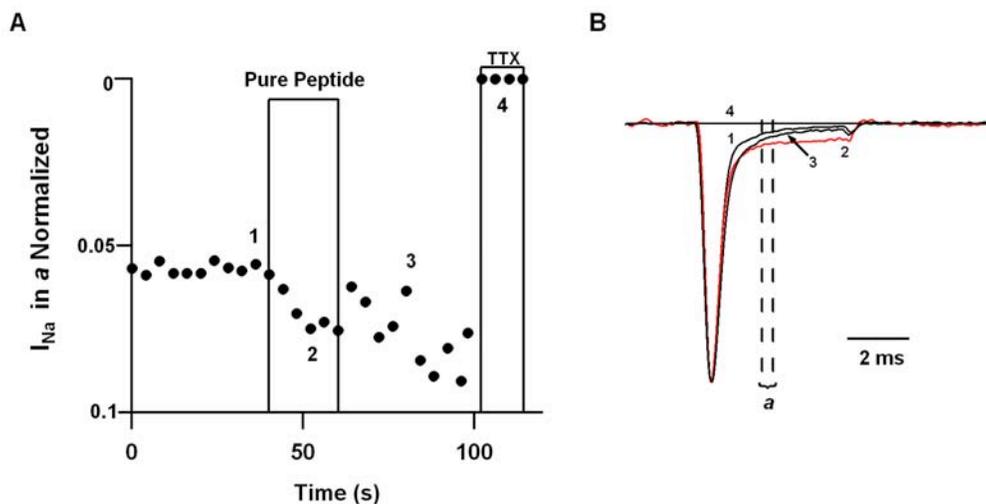


Figura 31. Respuesta de la aplicación del péptido puro sobre la corriente de sodio. A) Curso temporal de la amplitud de corriente de sodio normalizada durante la fase de decaimiento de la inactivación. B) Trazos representativos de la corriente de sodio durante las condiciones (1) control, (2) péptido puro 3  $\mu$ M, (3) lavado, (4) TTX 100 nm. TTX produce un bloqueo total de canal.

Debido a que los canales de sodio y los canales de calcio comparten muchas características estructurales y filogenéticas, se decidió probar el veneno sobre ellos. Las neuronas del GCS de rata contienen principalmente una población homogénea de canales de calcio  $Ca_v2.2$  (tipo N), por esta razón se decidió utilizar este modelo experimental. También contienen una pequeña proporción de canales tipo L y para bloquear estos canales, se adicionó nifedipina  $5 \mu\text{M}$  a la solución de registro. Los experimentos mostraron una inhibición de la corriente de calcio en un  $54\% \pm 2$  ( $n = 9$ ) por parte del veneno (fig. 32).

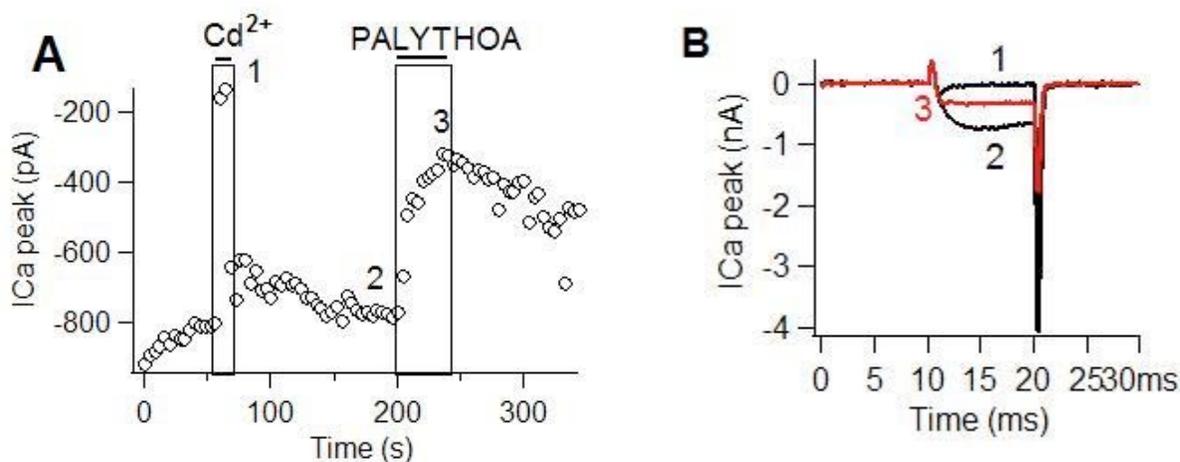


Figura 32. Efecto del extracto total sobre los canales  $Ca_v2.2$  en neuronas del GCS de rata. A) Curso temporal de la amplitud de la corriente de calcio obtenida por un pulso cuadrado a  $-10 \text{ mV}$ , desde un potencial de mantenimiento de  $-80 \text{ mV}$ . (1) en presencia de cadmio, (2) después del lavado, (3) en presencia del extracto total. B) Trazos representativos obtenidos del panel A: (1)  $\text{Cd}^{2+}$ , (2) lavado, (3) extracto.

De la misma manera, se evaluó el efecto de la fracción F2 sobre el curso temporal de la corriente de calcio  $Ca_v2.2$  (Fig 33A). Se puede observar que al aplicar la F2 se inhibió la corriente y que este efecto fue reversible después del lavado. Para corroborar que se estaba registrando una corriente de calcio se aplicó  $\text{Cd}^{2+}$   $0.1 \text{ mM}$  en la solución de registro. La figura 33B, muestra trazos representativos obtenidos del curso temporal en la distintas condiciones de experimentación.

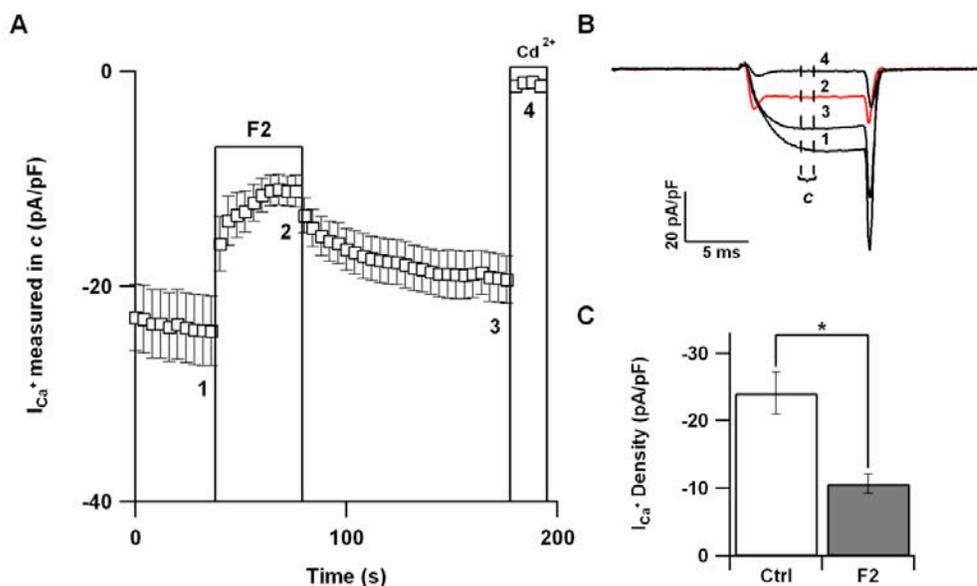


Figura 33. Inhibición de la corriente de calcio por la fracción F2 de la filtración en gel en la corriente de calcio. A) Curso temporal de la corriente de calcio. La amplitud de la corriente se normalizó respecto al tamaño de la célula. F2, muestra el efecto de la la fracción sobre la amplitud de la corriente. B) Trazos representativos obtenidos durante la aplicación de (1) solución control, (2) fracción 2, (3) lavado, (4)  $CdCl_2$ . C) Densidad media de la corriente bajo condiciones control y después de aplicar el extracto. \*Estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$ .

Finalmente, el veneno se probó sobre la corriente de potasio de tipo A en las mismas neuronas del ganglio cervical superior de rata y con la misma concentración. Los resultados mostraron una reducción en la amplitud de la corriente medida del pico. Esta inhibición fue estadísticamente significativa comparada con el control (fig. 34).

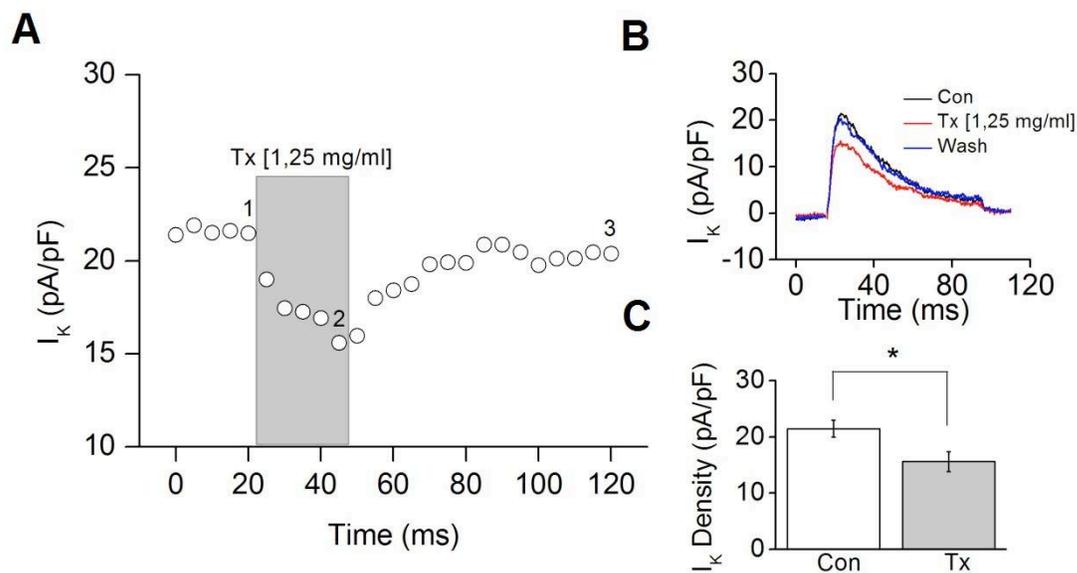


Figura 34. Efecto del extracto total sobre la corriente de potasio tipo A. A) Curso temporal de la corriente de potasio tipo A medida al pico de la corriente, B) Trazos representativos del curso temporal en condiciones control, con toxina y en el lavado. C) Resumen de datos de la densidad de corriente. \*Estadísticamente significativo  $p < 0.05$ .

## VIII. DISCUSIÓN

En los últimos años, se han encontrado muchos compuestos peptídicos de origen marino con una amplia variedad de efectos farmacológicos como antitumorales, antibióticos, antifúngicos, antivirales, inmunosupresores, insecticidas, entre otros (Lazcano-Pérez et al., 2012). La extracción de proteínas a partir de su fuente natural, generalmente se hace en medio acuoso o se utiliza un amortiguador de forma que su actividad no se pierda. En este trabajo se utilizó agua para la extracción ya que se ha mostrado que no afecta en gran medida la actividad esperada (Standker et al., 2006; Sánchez-Rodríguez et al., 2006; Morales-Landa et al., 2007; Rodríguez et al., 2014). Los efectos del veneno extraído con agua sobre canales iónicos, eritrocitos, líneas celulares cancerígenas y actividad de fosfolipasa se observaron sin problema lo que indica que la extracción del veneno en medio acuoso es un método adecuado para la investigación de tóxicos de cnidarios.

Uno de los ensayos más comunes para evaluar la actividad tóxica, no sólo del veneno de cnidarios sino de especies venenosas en general, es observar su actividad *in vivo*. En este trabajo se seleccionó el típico ensayo de toxicidad sobre crustáceos que durante años ha sido utilizado para monitorear la actividad neurotóxica del veneno de medusas y anémonas (Béress y Béress, 1971; Shiomi et al., 2003; Sánchez-Rodríguez et al., 2006). Este ensayo ha sido muy útil para la identificación de neurotoxinas ya que la aplicación del veneno en estos organismos provoca convulsiones en los cangrejos seguidas de parálisis rígida o flácida y, en casi todos los casos, la muerte. Los cangrejos inyectados con el veneno de *P. caribaeorum* no presentaron convulsiones. Sin embargo, se observó una parálisis flácida y posteriormente la muerte de todos ellos, por lo que este veneno es letal a las concentraciones probadas. Efectos similares se han observado por Shiomi (2003) con la gigantoxina I de *S. gigantea*, la cual al ser inyectada en cangrejos no mostró convulsiones ni fue letal pero se observó la parálisis.

Otro ensayo de toxicidad *in vivo* del veneno de cnidarios es el ensayo sobre *Artemia salina* (Meyer et al., 1982) y es considerado como una herramienta preliminar útil para predecir la actividad tóxica de extractos y compuestos químicos naturales (Solís et al., 1993). Este procedimiento ha sido utilizado por Sánchez-Rodríguez y colaboradores en numerosas ocasiones

como un ensayo de citotoxicidad para evaluar dosis letal de venenos de anémonas (Sánchez-Rodríguez y Cruz-Vázquez, 2006). Los resultados obtenidos con el veneno de *P. caribaeorum* mostraron que el veneno no es tóxico en *Artemia* a corto plazo. Esto puede deberse a la forma en la que el veneno entra al organismo. En este caso, los compuestos tóxicos entran de forma oral y es posible que se desnaturalicen o descompongan mediante un proceso digestivo. Esto no sucedió cuando el veneno fue aplicado de forma parenteral en los cangrejos.

Las propiedades hemolíticas de los extractos de cnidarios están ampliamente reportadas y estudiadas para diferentes especies (Santamaría et al., 2002; Suput, 2009) aunque no en todos los casos se ha determinado el mecanismo de acción de las toxinas citolíticas que los conforman. Muchas de estas toxinas pueden tener actividad como fosfolipasas (enzimas que catalizan la hidrólisis de fosfolípidos de membrana) o porinas (proteínas que forman poros en la membrana celular). Se ha visto la existencia de ellas en muchas especies de cnidarios de diferentes clases y se piensa que participan en procesos de captura y digestión de sus presas además del síndrome de envenenamiento en el sitio del contacto con cnidarios (Nevalainen et al., 2004). El veneno de *P. caribaeorum* contiene al menos tres sustancias de este tipo de acuerdo con los resultados que obtuvimos de los experimentos realizados. La actividad hemolítica del extracto fue muy evidente y es dependiente de la concentración. Las hemolisinas de este organismo parecen tener pesos moleculares por debajo de los 30 KDa, ya que la fracción hemolíticamente activa de las fracciones obtenidas al pasar el veneno por una columna de Sephadex G50 se encuentra en este intervalo de pesos. Las hemolisinas de este veneno parecen ser estables a temperaturas menores a los 60°C al igual que las hemolisinas conocidas de otras anémonas (Kem, 2002; Sánchez-Rodríguez, comunicación personal) y no pierden totalmente su actividad calentándolas a temperaturas superiores a los 60°C. El mecanismo de acción de estas hemolisinas es aún desconocido y se requiere de la realización de experimentos específicos una vez que las toxinas se encuentren totalmente purificadas.

Por otro lado, la actividad de fosfolipasa del veneno fue otra característica estudiada. Las fosfolipasas de tipo A2, que son del tipo de las que se han encontrado en cnidarios, se unen a los fosfolípidos, los hidrolizan y dan como productos un lisofosfolípido y un ácido graso como el ácido araquidónico (Murakami y Kudo, 2002). Los metabolitos derivados del ácido araquidónico como

las prostaglandinas y los tromboxanos, controlan una gran variedad de funciones celulares como el proceso de inflamación (Smith *et al.*, 2000). Estos procesos son los que están implicados en el síndrome de envenenamiento por contacto con cnidarios. Las razones por la que sustancias de este tipo se encuentren en el veneno de los nematocistos comprenden el matar a la presa o el de repeler a sus depredadores, sin embargo, se sabe que las fosfolipasas también constituyen parte del sistema digestivo de los cnidarios (Nevalainen, 2004).

Los ensayos de actividad antiparasitaria con *G. intestinalis* mostraron que el veneno contiene sustancias capaces de eliminar al parásito. La  $IC_{90}$  fue de aproximadamente  $300\mu\text{g/ml}$ , cantidad elevada comparada con el metronidazol. Sin embargo, es importante mencionar que es un extracto total. Cuando observamos al microscopio a los trofozoítos expuestos al veneno, se observó el cambio de forma de los mismos. Los trofozoítos que no se expusieron al veneno de *P. caribaeorum* mostraron una morfología típica de los: forma piriforme, presencia de los 4 pares de flagelos, disco suctor íntegro en la región ventral, citoplasma refringente. Los trofozoítos expuestos a  $500\mu\text{g/ml}$  y  $1000\mu\text{g/ml}$  mostraron una forma redondeada, presencia de vacuolas y algunos se encontraron lisados. Esto indica que la sustancia activa afecta a nivel de membrana al parásito de forma que podría estar formando poros y finalmente lisar a los organismos. Las citolisinas y/o las fosfolipasas contenidas en el extracto podrían ser las responsables de este efecto por lo que sería muy interesante purificar estos compuestos y realizar las pruebas nuevamente. Las citolisinas generalmente generan poros en las membranas de las células y afectan el equilibrio osmótico de las mismas lo que explica no sólo la actividad hemolítica en los eritrocitos sino que también podría explicar la actividad antiparasitaria. No existen muchos reportes sobre efectos de venenos y toxinas purificadas de cnidarios sobre parásitos, sin embargo, el estudio de extractos con actividad antibacteriana obtenidos a partir de cnidarios comienza a realizarse. Ovchinnikova *et al.* (2006) reportaron la purificación de un péptido con actividad antimicrobiana de 40 residuos de aminoácidos a partir de la mesoglea de la medusa *Aurelia aurita*. La aurelina mostró actividad contra bacterias Gram positivas y negativas. No mostró homología secuencial con algún otro péptido antimicrobiano reportado pero tiene una similitud parcial con las defensinas y las toxinas bloqueadoras de  $K^+$  de otras anémonas.

Los animales que producen veneno son conocidos por los efectos negativos que causan cuando existe un contacto con ellos como las reacciones alérgicas, dermatitis, hemorragias, coagulación intravascular, necrosis, paro respiratorio, entre otros. Por esta razón son una fuente de sustancias con propiedades farmacológicas muy diversas y sus toxinas han sido utilizadas en la investigación de nuevas moléculas para el tratamiento de muchas enfermedades incluyendo al cáncer y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Veiga et al., 2009). La terapia contra el cáncer es una de las principales áreas de estudio en donde se utilizan péptidos y proteínas de extractos animales. Algunos de estos compuestos se unen específicamente a las membranas de células cancerosas de forma que afectan su migración a otros tejidos y su proliferación. Algunos péptidos de animales venenosos como los escorpiones, abejas, arañas y anémonas han sido purificados y caracterizados (Deshane et al., 2003). En cuanto a los venenos de anémonas, se han realizado estudios de actividad en líneas celulares cancerosas humanas con resultados positivos, es decir, se ha encontrado que pueden inhibir el crecimiento de las células malignas. En el caso de *Palythoa*, el veneno total inhibió más del 50% del cáncer de pulmón. Este resultado indica que el veneno contiene sustancias con gran actividad contra células malignas de esta línea celular y que además no daña a otras células sanas como los linfocitos y macrófagos que son células altamente susceptibles a las quimioterapias conocidas. No podemos determinar aún cuáles son las moléculas responsables de este proceso, sin embargo, sabemos que las citolisinas pueden unirse a moléculas receptoras en las membranas de las células y generar poros o romper las membranas de forma que destruyan el equilibrio osmótico de estas. El veneno de *P. caribaeorum* contiene toxinas citolíticas que funcionan de esta forma por lo que un primer intento de encontrar a estas moléculas citotóxicas sería probar las toxinas purificadas sobre las líneas celulares en estudio. Estudios previos ya han demostrado la efectividad de las citolisinas de anémonas para inhibir células malignas (Panchal, et al., 1996).

Los cnidarios son considerados organismos carnívoros y para poder atrapar a sus presas es necesario inmovilizarlas y matarlas. Por esta razón, sus venenos contienen toxinas que alteran el funcionamiento del sistema nervioso de aquellos organismos que les sirven de alimento como crustáceos y peces. Es bien sabido que las toxinas de los antozoarios, como las anémonas, alteran los canales iónicos de células excitables pero los venenos de los zoantideos aún no han sido investigados en este sentido. El veneno obtenido de *P. caribaeorum* se probó en los tres tipos

principales de canales iónicos regulados por voltaje ( $\text{Na}_v^+$ ,  $\text{K}_v^+$  y  $\text{Ca}_v^{2+}$ ) y se obtuvieron resultados muy interesantes. Los experimentos mostraron que *P. caribaeorum* tiene toxinas que son capaces de afectar los tres tipos de canales. Esta es la primera vez que se muestra en cnidarios que un mismo veneno puede afectar simultáneamente tres tipos de canales.

El efecto del extracto sobre canales  $\text{Na}_v^+$  1.7 coincide con el efecto que producen todas las toxinas de anémonas que han sido reportadas hasta ahora con acción sobre esta familia de canales. Este veneno retardó el proceso de inactivación del canal de sodio, de forma que los iones  $\text{Na}^+$  continúan fluyendo al interior de la célula durante más tiempo, por lo que el potencial de acción dura más. La consecuencia fisiológica de este proceso generalmente se ve reflejada en la parálisis de la presa y generalmente culmina con la muerte por paro cardíaco o respiratorio.

El fraccionamiento del veneno de *P. caribaeorum* mediante cromatografía de filtración en gel dio tres fracciones, de las cuales, la fracción 2 tuvo el mismo efecto en los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  que el veneno total en las neuronas de rata. Este tipo de neuronas contienen principalmente canales  $\text{Na}_v$ 1.7 (Catterall et al., 2005; Toledo-Aral et al., 1997) y canales  $\text{Ca}_v$ 2.2 (Plummer et al., 1989; Regan et al., 1991). Esta distribución permitió un estudio del efecto del veneno y las toxinas en una población homogénea de canales iónicos. La fracción 2 incrementó la corriente de sodio en menos de 40 s y el efecto fue reversible después del lavado (n=5). Como la amplitud de la corriente depende del tamaño de la célula, se comparó la densidad de la corriente dividiendo su amplitud entre la capacitancia de la membrana. La amplitud se midió durante la fase de decaimiento como el valor medio de los puntos registrados en 1.7 y 2 ms después de la aplicación del pulso. La fracción 2 indujo cambios importantes en la fase de decaimiento de la corriente de sodio. La densidad de la corriente durante su aplicación tuvo el doble de intensidad comparada con el decaimiento en el control. De la misma forma que lo que se ha reportado para todas las toxinas de anémonas que actúan sobre canales de sodio regulados por voltaje, el veneno de *P. caribaeorum* también presentó como blanco los canales de sodio retardando su inactivación, de acuerdo con el mecanismo general propuesto para la interrupción de la comunicación del sistema nervioso para paralizar a sus presas. Una vez visto este resultado, esta fracción dos fue purificada mediante fase reversa para identificar al componente responsable de dicho efecto. Los experimentos electrofisiológicos en los canales  $\text{Na}_v$ 1.7 mostraron que un péptido presente en esta

fracción es el responsable de la cinética lenta de inactivación en este tipo de canales. Este péptido consiste de 32 aminoácidos con un peso molecular de 3648 Da y cuya secuencia es GELIKMVYARNQFPMSTCDRACWSAVILNKEG. La masa promedio teórica de este péptido es de 3632.27 Da sin formar un puente disulfuro. Una posible explicación a esta diferencia de masas es que exista una oxidación en alguna de las metioninas del péptido (M6 ó M15) y que el péptido no esté formando un puente disulfuro. Es de gran importancia señalar que esta secuencia no se asemeja a ninguna otra toxina reportada de cnidarios y representa una nueva familia de toxinas de cnidarios que afectan canales de sodio. Esta toxina se caracterizaría por no formar puentes disulfuro (en contraste con las demás toxinas de cnidarios que afectan canales de sodio las cuales tienen tres o cuatro puentes disulfuro).

El péptido aislado de *P. caribaeorum* fue capaz de retardar la inactivación del canal en las neuronas de GSC de rata a una concentración de 3 $\mu$ M, sin embargo, se observó una respuesta menor que la observada con la fracción 2 y el veneno total. Esto podría deberse a que el péptido se aplicó a una concentración demasiado baja. La exposición de la célula a la solución de registro no mostró la inactivación mientras que los experimentos con el péptido puro mostraron una actividad similar en tres neuronas más.

Ya que los canales de sodio y de calcio comparten muchas características estructurales, se decidió probar el veneno sobre canales de calcio. Las neuronas del ganglio cervical superior de rata contiene principalmente canales Ca<sub>v</sub>2.2 (tipo N) y en menor proporción, canales Ca<sub>v</sub>1 (tipo L). Para eliminar las posibles interferencias con los canales tipo L, se agregaron 5  $\mu$ M de nifedipina a la solución que se perfundió. La corriente se evocó con un pulso cuadrado desde -80 mV a -0 mV cada 4 s y se definió como la componente de la corriente sensible a 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>. El efecto del veneno sobre los canales Ca<sub>v</sub>2.2 fue muy interesante. Se observó un bloqueo de la corriente en menos de 40 ms (n=9) y este efecto fue reversible con el lavado. Este resultado es muy novedoso ya que demuestra que los venenos de cnidarios pueden contener neurotoxinas que afecten los canales de calcio. Actualmente, no existe ningún reporte de algún veneno o toxina de este filo que haya sido probado sobre estos canales por lo que esta es la primera vez que se reporta este efecto.

Los canales de potasio utilizados para los experimentos aquí descritos son los que producen una corriente temporal saliente o tipo A ( $I_A$ ). Este tipo de canales son rectificadores y se encuentran inactivados durante los potenciales normales de reposo. Esta corriente  $I_A$  muestra una activación extremadamente rápida después de la despolarización y rápidamente se inactiva (Rogawski, 1985). En el presente trabajo, descubrimos que el veneno de *P. caribaeorum* inhibe la corriente saliente transiente tipo A de potasio de neuronas de ganglio cervical superior de rata. Este tipo de corriente es producida por los subtipos  $K_v1.4$ ,  $K_v3.3$ ,  $K_v3.4$ ,  $K_v4.1$ ,  $K_v4.2$  y  $K_v4.3$  y aunque no es posible discernir el tipo específico de canal del que se trata con el protocolo que se hizo en este trabajo, experimentos futuros podrían realizarse para determinarlo. Este es un descubrimiento novedoso ya que sólo un par de toxinas de araña (SNX-482 de *Hysteroocrates gigas* y Tx3-1 de *Phoneutra nigriventer*) han mostrado un efecto similar (Kimm y Mean, 2014; Gomes, et al., 2013). Esta es la primera vez que se reporta la actividad inhibitoria de la corriente de tipo A de potasio por el veneno de un cnidario.

Las neurotoxinas han sido moléculas esenciales para la identificación y purificación de blancos moleculares que se encuentran en células excitables y también han sido muy importantes para el análisis de la distribución de estos blancos así como la caracterización de sus distintas isoformas y funciones fisiológicas. La habilidad de estas toxinas para unirse con tal afinidad a su blanco ha sido crucial para la caracterización de diversas moléculas de importancia farmacológica y en particular de los canales iónicos. Los canales de sodio regulados por voltaje ( $Na_v$ ) son los responsables del inicio de los potenciales de acción y su propagación en las células eléctricamente excitables (Catterall et al., 2005) por lo que son un blanco importante de los venenos de muchos animales incluyendo a los cnidarios. Todas las toxinas de anémonas aisladas hasta el momento que afectan los canales de sodio regulados por voltaje lo hacen a través de la inactivación del canal, mismo efecto que nuestro extracto muestra. Se sabe que estas toxinas actúan específicamente en el sitio 3 ubicado entre los segmentos 3 y 4 del dominio IV del canal (Wanke et al., 2009) y además actúan sobre siete de las nueve isoformas que se conocen del canal ( $Na_v1.1$ - $Na_v1.7$ ). Es muy probable entonces que *P. caribaeorum* contenga al menos una toxina que afecte los canales de sodio de esta forma aunque no necesariamente sea de las mismas familias de toxinas reportadas hasta el momento.

Los iones de calcio que entran a la célula a través de los canales de calcio regulados por voltaje (Ca<sub>v</sub>) funcionan como segundos mensajeros de las señales eléctricas e inician diferentes eventos celulares (Catterall, 2012). Si el organismo tiene una toxina que modula canales de calcio, sería la primera toxina reportada hasta ahora en un cnidario que afecte estos canales.

Procedimientos de purificación posteriores mostrarán la naturaleza química de los compuestos responsables de los efectos observados en este trabajo. Los trabajos con toxinas en anémonas han sido importantes como herramientas para el estudio de la estructura y función de los canales iónicos, interacción membrana-receptor y podrían representar una fuente de compuestos terapéuticos novedosos.

El trabajo mostró que *P. caribaeorum* posee compuestos con actividades citolíticas, neurotóxicas y antiparasitarias. La naturaleza química de dichos compuestos está aún por elucidarse. Se han estudiado toxinas de aproximadamente 40 especies de anémonas, a pesar de tenerse reportadas aproximadamente unas 800 especies en el mundo. Ya que muchos estudios sugieren la distribución de péptidos tóxicos en todas las anémonas, el descubrimiento de nuevas moléculas con diversos efectos sobre distintos blancos moleculares específicos podría ser muy prometedor con todas aquellas especies aún no estudiadas, incluyendo otros cnidarios. Posiblemente estos organismos y todos aquellos que aún no han sido estudiados como las anémonas coloniales, son una fuente potencial de nuevas sustancias con diferentes mecanismos de actividad biológica y novedosas estructuras moleculares.

El estudio de los organismos marinos ha despertado interés en los últimos 25 años. De todos ellos se han aislado compuestos con estructuras química novedosas y con grandes diferencias respecto de los compuestos derivados de organismos terrestres incluyendo plantas y animales. La actividad encontrada va desde compuestos antihelmínticos, antibacterianos, antiparasitarios, antimicóticos, antivirales, antiinflamatorios, antiplaquetarios; muchos de ellos con actividad contra patologías humanas que afectan los sistemas cardiovascular, endócrino, inmune y nervioso (Mayer *et al.*, 2009) e incluso muchos de ellos con actividad antitumoral en fases preclínica y clínica (I y II) (Nuijen *et al.*, 2000; Newman y Cragg, 2004).

De entre todos los organismos marinos venenosos, los cnidarios y en especial las medusas, representan un asunto global de salud y económica en varias regiones como Australia y otras regiones tropicales en donde existen especies capaces de producir problemas severos de salud y envenenamiento (Brinkman y Burnell, 2009; Mariotinni y Pane, 2010). Por esta razón, actualmente los cnidarios son vistos como una importante fuente potencial de productos farmacéuticos (Rocha *et al.*, 2011). Por ejemplo, la pseudopterosina aislada del gorgónido o coral blando *Pseudoterogorgia elisabethae* se encuentra en fase preclínica por su actividad antimalárica, antituberculosis, antiviral y anticancerígena, mientras que la eleutherobina y las sarcodictinas aisladas de varios corales se encuentran en fase clínica (Rodríguez *et al.*, 2004; Mayer y Gustafson, 2008). Por otro lado, una toxina de origen peptídico aislada de *Stichodactyla helianthus* bloquea los canales  $K_v1.3$  en linfocitos T humanos y es una herramienta potencial muy útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Beeton *et al.*, 2005; Pennington *et al.*, 1996).

Aunque las anémonas no se encuentran en contacto con los insectos, son depredadores de crustáceos, los cuales también pertenecen al filo Arthropoda y por lo tanto se piensa que sus venenos pueden de igual manera afectar los canales iónicos de insectos con el fin de desarrollar insecticidas. Las toxinas Sh-I de *S. gigantea* y Cg-II de *Condylactis gigantea* son letales en crustáceos y cucarachas y no son tóxicas en ratones. Experimentos con *Periplaneta americana* mostraron que ambas toxinas retrasan la inactivación de los canales  $Na_v$  (Salgado y Kem, 1992). La toxina ATX-II de *Anemonia sulcata* bloquea canales de sodio de *Drosophila melanogaster* y tiene una alta afinidad por membranas neuronales en cucarachas (Warmke *et al.*, 1997). La toxina Av3 de *Anemonia viridis* actúa sobre el sitio 3 de canales  $Na_v$  y es activa en crustáceos e insectos pero no en mamíferos. Es altamente tóxica en larvas de mosca azul de la carne, se une a membranas neuronales de cucarachas e inhibe la inactivación de canales de  $Na_v$  en *Drosophila* (Moran *et al.*, 2007).

Finalmente, los venenos de origen animal tienen una gran diversidad de sustancias activas con efectos muy variados en la fisiología celular por lo que es importante identificar los componentes de estos venenos y sus blancos específicos con la finalidad de encontrar candidatos

para pruebas clínicas en el tratamiento de enfermedades. Con el avance de la biología molecular es posible producir toxinas recombinantes a gran escala para su uso terapéutico (Banerjee et al., 2004). La aplicación clínica de estas toxinas ya es evidente en el tratamiento de patologías como la hipertensión y la trombosis; su aplicación como analgésicos y actualmente está en auge su aplicación para el tratamiento de enfermedades infecciosas y aquellas relacionadas con patologías de los canales iónicos, SIDA y cáncer.

## IX. CONCLUSIONES

El veneno de *Palythoa caribaeorum* contiene una amplia variedad de toxinas que tienen actividad neurotóxica y citotóxica.

El estudio electrofisiológico mostró que el veneno es capaz de afectar los tres principales tipos de canales iónicos regulados por voltaje ( $Na_v$ ,  $K_v$  y  $Ca_v$ ).

El veneno de *P. caribaeorum* contiene al menos una toxina de 3.6 KDa que modula a los canales de  $Na_v 1.7$  que es responsable de una cinética de inactivación muy lenta en este tipo de canal y cuyo mecanismo es consistente con otras toxinas de anémonas.

La toxina aislada con actividad sobre canales  $Na_v 1.7$  tiene una estructura diferente a las de otras toxinas de sodio aisladas de anémonas.

El veneno contiene sustancias con propiedades biológicas tales como antineoplásicas y antiparasitarias que podrían ser explotadas como posibles fármacos.

## X. REFERENCIAS

1. Anderluh, G., Maček, P. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 40:111-124.
2. Andreev, Y.A., Kozlov, S.A., Koshlev, S.G., Ivanova, E.A., Monastyrnaya, M.M., Kozlovskaya, E.P., Grishin, E.V. 2008. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J. Biol. Chem.* (283) 35:23914-23921.
3. Arias, H.R. 2006. Marine Toxins Targeting Ion Channels. *Mar. Drugs* 4:37-69.
4. Banerjee, A., Chisti, Y., Banerjee, U.C. 2004. Streptokinase- a clinically useful thrombolytic agent. *Biotech. Adv.* 22:287-307.
5. Beeton, C., Pennington, M.W., Wulf, H., Singh, S., Nugent, D., Crossley, G., Khaytin, I., Calabresi, P.A., Chen, C.Y., Gutman, G.A., George, K. 2005. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol. Pharmacol.* 67:1360-1381.
6. Béress L., Béress R. 1971. Reinigung zweier krabbenlähmender Toxine aus der Seeanemone *Anemonia sulcata*. *Kiel Meeresforsch* 27:117-27.
7. Bernheimer, A.W., Avigad, L.S. 1978. A cholesterol-inhibitable cytolytic protein from the sea anemone *Metridium senile*. *Biochim. Biophys. Acta.* 541:96-106.
8. Bloom, D., Burnett, J. and Alderslade, P. 1998. Partial Purification of Box Jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beachside. *Toxicon* 36:1075-1085.
9. Brinkman, D., Burnell, J. 2007. Identification, cloning and sequencing of two major venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. *Toxicon* 50:850-860.
10. Brinkman, D., Burnell, J. 2009. Biochemical and molecular characterization of cubozoan protein toxins. *Toxicon* 54:1162-1173.
11. Burnett, J., Weinrich, D., Williamson, J.A., Fenner, P.J., Lutz, L.L., Bloom, D.A. 1998.

- Autonomic neurotoxicity of jellyfish and marine animal venoms. Clin. Autonom. Res. 8:125-130.
12. Cai, S.Q., Li, W., Sesti, F. 2007. Multiple modes of A-type potassium current regulation. Curr. Pharm. Design 13:3178-3184.
  13. Carrette, T., Seymour, J. 2004. A rapid and repeatable method for venom extraction from cubozoan nematocysts. Toxicon 44:135-139.
  14. Carricart-Gaviné, J.P. y G. Horta-Puga. 1993. Arrecifes de Coral en México p. 81-92. En: Biodiversidad Marina y Costera de México. S.I. Salazar-Vallejo y N.E. González (eds.) Com. Nal. Biodiversidad y CIQRO, México, 865 pp.
  15. Catterall, W.A., Goldin, A.L., Waxman, S.G. 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. Pharmacol. Rev. 57:397-409.
  16. Catterall, W.A. 2012. Voltage-gated calcium channels. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3:a003947.
  17. Chagot, B., Escoubas, E., Diochot, S., Bernard, C., Lazdunski, M., Darbon, H. 2005. Solution structure of APETx2, a specific peptide inhibitor of ASIC 3 proton-gated channels. Protein Science 14:2003-2010.
  18. Cuypers, E., Yanagihara, A., Karlsson, E., Tytgat, J. 2006. Jellyfish and other cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels. FEBS Letters 580:5728-5732.
  19. Daly, M., Brugler, M., Cartwright, P., Collins, A., Dawson, M., Fautin, D., France, S., McFadden, C., Opresko, D., Rodríguez, E., Ronamos, S., Stake, J. 2007. The Pylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. Zootaxa 1668:127-182.
  20. Deshane, J., Garner, C.C., Sontheimer, H. 2003. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. J. Biol. Chem. 278:4135-4144.

21. de Vries, D.J., McCauley, R.D., Walker, F. 1994. Identification of marine organism extracts active at the EGF binding site of human A431 cells. *Toxicon* 32(5):553-559.
22. Diaz-García, C. M., Sanchez-Soto, C., Fuentes-Silva, D., Leon-Pinzon, C., Dominguez-Perez, D., Varela, C., Rodriguez-Romero, A., Castaneda, O., Hiriart, M. 2012. Low molecular weight compounds from *Zoanthus sociatus* impair insulin secretion via  $Ca^{+2}$  influx blockade and cause glucose intolerance in vivo. *Toxicon* 59(2): 306-14.
23. Diochot, S., Schweitz, H., Béress, L., Lazdunski, M. 1998. Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivation potassium channel Kv 3.4. *J. Biol. Chem.* 273: 6744-6749.
24. Diochot, S., Loret, E., Bruhn, T., Béress, L., Lazdunski, M. 2003. APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *Mol. Pharmacol.* 54: 59-69.
25. Diochot, S., Baron, A., D Rash, L., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., Lazdunski, M. 2004. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid sensitive channel in sensory neurons. *The EMBO Journal* 23:1516-1525.
26. Dunn, D.F. 1982. Cnidaria, in *Synopsis and Classification of Living Organisms*. Ed. Sybil P. Parker McGraw-Hill Book Co., New York, pp. 669-706.
27. Endean, R., Monks, S.A., Cameron, A.M. 1993. Toxins from the box-jellyfish *Chironex fleckeri*. *Toxicon* 31:397-410.
28. Fenton-Navarro, B., Arreguín, B., García-Hernández, E., Heimer, E., Aguilar, M.B., Rodríguez-A, C., Arreguín-Espinosa, R. 2003. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Buneodopsis antillensis*. *Toxicon* 42 525-532.
29. Frazao, B., Vasconcelos, V., Antunes, A. 2012. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: an overview. *Mar. Drugs* 10:1812-1851.
30. García-Arredondo, A., Rojas-Molina, A., Ibarra-Alvarado, C., Iglesias-Prieto, R. 2010. Effects

of bleaching on the pharmacological and toxicological activities elicited by the aqueous extracts prepared from two "fire corals" collected in the Mexican Caribbean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 396:171-176.

31. García-Arredondo, A., Murillo-Esquivel, L.J., Rojas, A., Sánchez-Rodríguez, J. 2014. Characteristics of hemolytic activity induced by the aqueous extract of the Mexican fire coral *Millepora complanata*. *J. Venom. Pois. Animal. Incl. Trop. Dis.* 20:49-57.
32. Gleibs, S., Mebs, D. 1999. Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon* 37:1521-1527.
33. Gomes, G., Dalmolin, G., do Nascimento Cordeiro, M., Gomez, M.V., Ferreira, J., Rubin, M. 2013. The selective A-type K<sup>+</sup> current blocker Tx3-1 isolated from the *Phoneutria nigriventer* venom enhances memory of naive and Ab25-35-treated mice. *Toxicon* 73:26-27.
34. González-Muñoz, R.E. 2005. Estructura de la comunidad de anémonas del Arrecife La Galleguilla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 53 p.
35. González-Muñoz, R.E. 2009. Anémonas (Anthozoa: Actiniaria, Corallimorpharia y Zoanthidea) del arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. 80 p.
36. González-Muñoz, R.E. 2014. Análisis taxonómico de las especies de anémonas arrecifales (Cnidaria: Anthozoa) del Golfo de México y Mar Caribe Mexicano. caracterización y análisis morfológico y genético de las variaciones intraespecíficas entre los morfotipos de la especie *Phymanthus crucifer* (Le Sueur, 1817). Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. 188 p.
37. Goodwyn, M.H., Telford, M. 1971. The nematocyst toxin of *Metridium*. *The Biological Bulletin* 140: 389-399.
38. Gusmani, L., Avian, M., Galil, B., Patriarca, P., Rottini, G. 1997. Biologically active polypeptides in the venom of the jellyfish *Rhopilema nomadica*. *Toxicon* 35: 637-648.

39. Harvey, A.L., Anderson, A.J., Rowan, E.G. 1993. Toxins affecting ion channels en Natural and Synthetic Neurotoxins. Editado por Alan Harvey. Academic Press, Londres. 359 pp.
40. Honma, T., Hasegawa, Y., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y., Shiomi, K. 2005. Isolation and molecular cloning of novel peptide toxins from the sea anemone *Antheopsis maculata*. *Toxicon* 45:33-41.
41. Honma, T., Minagawa, S., Nagai, H., Ishida, M., Nagashima, Y., Shiomi, K. 2005. Novel peptide toxins from acrorhagi, agresive organs of the sea anemone *Actinia equina*. *Toxicon* 46:768-774.
42. Honma, T., Shiomi, K. 2006. Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects. *Mar. Biotechnol.* 8:1-10.
43. Honma, T., Kawahata, S., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y., Shiomi, K. 2008. Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*. *Peptides* 29:536-544.
44. Ibarra-Alvarado, C., García, J.A., Aguilar, M.B., Rojas, A., Falcón, A., Heimer de la Cotera, E.P. 2007. Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 146:511-518.
45. Ishikawa, T., Vucenik, I., Shamsuddin, A., Niculescu, F., Burnett, J.W. 2004. Two new actions of sea nettle (*Chrysaora quiquecirrha*) nematocyst venom: studies on the mechanism of actions on complement activation and on the central nervous system. *Toxicon* 44:895-899.
46. Kem, W.R. 2002. Anthozoan neurotoxins. En *Handbook of Neurotoxicology*. Vol. 1. Editado por E.J. Massaro, Humana Press Inc. pp. 529-572.
47. Kimm, T., Bean, B.P. 2014. Inhibition of A-Type Potassium current by the peptide toxin SNX-482. *J. Neuroscience.* 34(28): 9182-9189.
48. Komayama, T., Noguchi, K., Matsuzaki, T., Sakanashi, M., Nakasone, J., Miyagi, K., Sakanashi, M., Sakanashi, M. 2003. Haemodynamic effects of the crude venom of nematocysts of the box-jellyfish *Chiropsalmus quadrigatus* (Habu-kurage) in anaesthetized

- rabbits. *Toxicon* 41:621-631.
49. Lakshmi, V., Saxena, A., Pandey, K., Bajpai, P., Misra-Bhattacharya, S., 2004. Antifilarial activity of *Zoanthus* species (Phylum Coelenterata, Class Anthzoa) against human lymphatic filaria, *Brugia malayi*. *Parasitol. Res.* 93 (4): 268-73.
50. Lane, C.E., Dodge, E. 1958. The toxicity of *Physalia* nematocysts. *The Biological Bulletin* 115:219-226.
51. Lazcano-Pérez, J.F. 2009. Aislamiento, purificación y caracterización de las neurotoxinas presentes en la cubomedusa *Carybdea marsupialis*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 71 p.
52. Lazcano-Pérez, F., Román-González, S.A., Sánchez-Puig, N., Arreguín-Espinosa, R. 2012. Bioactive peptides from marine organisms: a short overview. *Protein and peptide Letters* 19:700-707.
53. López-Martínez, R., Méndez-Tovar, L.J., Hernández-Hernández, F., Castañón-Olivares, R. 1995. *Micología Médica: Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. Editorial Trillas, primera edición, México. 194 p.
54. Maeda, M., Honma, T., Shiomi, K. 2010. Isolation and cDNA cloning of type two sodium channel peptide toxins from three species of sea anemones (*Cryptodendrum adhaesivum*, *Heterodactyla hemprichii* and *Thalassianthus aster*) belonging to the family Thalassiantidae. *Comp. Biochem. Physiol. (B)* 157:389-393.
55. Mariottini, G.L., Pane, L. 2010. Mediterranean jellyfish venoms: a review on Scyphomedusae. *Mar. Drugs* 8:1122-1152.
56. Mariscal, R.N. 1974. Nematocysts. In: Muscatine, C.L. & Lenhoff, H. (eds). *Coelenterata Biology*. Academic Press, Inc. London. pp. 129-178.
57. Mayer, AMS., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G.S., Hamann, M.T., 2009. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-

- inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790:283-308.
58. Mayera, A.M.S., Gustafson, K.R. 2008. Marine pharmacology in 2005–2006: Antitumour and cytotoxic compounds. *Eur. J. Can.* 44:2357-2387.
59. McDonough, S. I. 2007. Gating modifier toxins of voltage-gated calcium channels. *Toxicon* 49:202-212.
60. Mebs, D. 2002. *Venomous and Poisonous Animals, A Handbook for biologists, toxicologists and toxinologists, physicians and pharmacists.* Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart. 339 p.
61. Menéndez Valderrry, J.L., Lorenzo Corchón, A. Las anémonas, corales, medusas e hidrozoos; los Cnidarios y los Ctenóforos. *Asturnatura.com* (en línea) Num. 40. 12/09/2005. (Consultado el 10/07/2009). Disponible en <http://www.asturnatura.com/articulos/cnidarios/inicio.php>. ISSN 1887-5068.
62. Messerli, S.M., Greenberg, R.M. 2006. Cnidarian toxins acting on voltage-gated ion channels. *Mar. Drugs* 4:70-81.
63. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLoughlin, J.L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *J. Med. Plan. Res.* 45:31–34
64. Monroy-Estrada, H., Segura-Puertas, L., Galván-Arzate, S., Santamaría, A., Sánchez-Rodríguez, J. 2006. The crude venos from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* induces haemolysis and slight peroxidative damage in rat and human erythrocytes. *Toxicology in Vitro* 21:398-402.
65. Monroy-Estrada, H.I., Chirino Y.I., Soria-Mercado, I.E., Sánchez-Rodríguez, J. 2013. Toxins from the Caribbean sea anemone *Bunodeopsis globulifera* increase cisplatin-induced cytotoxicity of lung adenocarcinoma cells. *J. Venom. Anim. Tox. Incl. Trop. Dis.* 19 (12): 1-9.

66. Morales-Landa, J.L., Zapata-Pérez, O., Cedillo-Rivera, R., Segura-Puertas, L., Simá-Álvarez, R., Sánchez-Rodríguez, J. 2007. Antimicrobial, antiprotozoal, and toxic activities of cnidarian extracts from the mexican Caribbean Sea. *Pharmaceutical Biology* 45:37-43.
67. Moran, Y., Kahn, R., Cohen, L., Gur,, M., Karbat, I., Gordon, D., Gurevitz, M. 2007. Molecular analysis of the sea anemone toxin Av3 reveals selectivity to insects and demonstrates the heterogeneity of receptor site-3 on voltage gated Na<sup>+</sup> channels. *Biochem. J.* 406:41-48.
68. Murakami, M., Kudo, I. 2002. Phospholipase A2. *J. Biochem.* 131:285-292.
69. Nagai, H., Takuwa, K., Nakao, M., Ito, E., Miyake, M., Noda, M., Nakajima, T. 2000. Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish *Carybdea rastoni*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 275:582-588.
70. Nagai, H., Takuwa, K., Nakao, M., Sakamoto, B., Crow, G., Nakajima, T. 2000. Isolation and Characterization of a Novel Protein Toxin from the Hawaiian box jellyfish *Carybdea alata*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 275:589-594.
71. Nevalainen, T.J., Peuravuori, H.J., Quinn, R.J., Llewellyn, L.E., Benzie, J.A.H., Fenner, P.J., Winkel, K.D. 2004. Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol., Part B* 139:731-735.
72. Newman, D.J., Cragg, G.M. 2004. Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. *Curr. Med. Chem.* 11:1693-1713.
73. Norton, R.S. 1991. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* 29:1051-1084.
74. Norton, R.S. 2009. Structure of sea anemone toxins. *Toxicon* 54:1075-1088.
75. Nuijen, B., Bouma, M., Manada, C., Jimeno, J.M., Schellens, J.H.M., Bult, A. 2000. Pharmaceutical development of anticancer agents derived from marine sources. *Anti-cancer Drugs.* 11:793-811.
76. Orduña-Novoa, K., Segura-Puertas, L., Sánchez-Rodríguez, J., Meléndez, A., Nava-Ruíz, C.,

- Rembao, D., Santamaría, A., Galván-Arzate, S. 2003. Possible antitumoral effect of the crude venom of *Cassiopea xamachana* (Cnidaria: Scyphozoa) on tumors of the central nervous system induced by N-ethyl-N-nitrosourea ENU in rats. *Proc. West. Pharmacol. Proc.* 46:85-87.
77. Ochivnikova, T.V., Balandin, S.V., Aleshina, G.M., Tagaev, A.A., Leonova, Y.F., Krasnodembsky, E.D., Men'shenin, A.V., Kokryakov, V.N. 2006. Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348:514-523.
78. Panchal, R. G., E. Cusak, S. Cheley, and H. Bayley. 1996. Tumor protease-activated, pore-forming toxins from a combinatorial library. *Nature Biotech.* 14:852-856.
79. Pennington, M.W., Mahnir, V.M., Krafft, D.S., Zaydenberg, I., Byrnes, M.E., Khaytin, I., Crowley, K., Kem, W.R. 1996. Identification of three separate binding sites on SHK toxin, a potent inhibitor of voltage-dependent potassium channels in human T-lymphocytes and rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 219:696-701.
80. Phillips, J.H., Jr., Abbott, D.P. 1957. Isolation and assay of the nematocyst toxin of *Metridium senile fimbriatum*. *The Biological Bulletin* 113:296-301.
81. Plummer, M.R., Logothetis, D.E., Hess, P., 1989. Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* 2: 1453-1463
82. Ponce, D. López-Vera, E., Aguilar, M.B., Sánchez-Rodríguez, J. 2013. Preliminary results of the in vivo and in vitro characterization of a tentacle venom fraction from the jellyfish *Aurelia aurita*. *Toxins* 5: 2420-2433.
83. Purves, D., Augustine, G. Fitzpatrick, D., Hall, W.C., Lamantia, A-S., McNamara, J.O., Williams, S.M. 2007. *Neurociencia*. 3a. ed. Ed. Panamericana. 856 pp.
84. Radwan, F.F.Y., Burnett, J.W., Bloom, D.A., Coliano, T., Eldefrawl, M.E., Erderly, H., Aurelian, L., Torres, M., Heimer de la Cotera, E.P. 2001. A comparison of the toxinological characteristics of two *Cassiopea* and *Aurelia* species. *Toxicon* 39:245-257.

85. Radwan, F.F.Y. 2002. Comparative toxinological and immunological studies on the nematocyst venoms of the Red Sea fire corals *Millepora dichotoma* and *M. platyphylla*. *Comparative Biochemistry and Physiology part C*, 131:323-334.
86. Ramasamy, S., Isbister, G.K., Seymour, J.E., Hodgson, W.C. 2003. The in vitro effects of two chirodropid (*Chironex fleckeri* and *Chiropsalmus* sp.) venoms: efficacy of boxjellyfish antivenom. *Toxicon* 41:703-711.
87. Regan, L.J., Sah, D.W., Bean, B.P., 1991. Ca<sup>2+</sup> channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and omega-conotoxin. *Neuron* 6, 269-280.
88. Rocha. J., Peixe, L., Gomes, N.C.M. 2011. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds- an overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Mar. Drugs* 9:1860-1886.
89. Rodríguez, A.A., Salceda, E., Garateix, A.G., Zaharenko, A., Peigneur, S., López, O., Pons, T., Richardson, M., Díaz, M., Hernández, Y., Standker, L., Tytgat, J., Soto, E. 2014. A novel sea anemone peptide that inhibits acid-sensing ion channels. *Peptides* 53:3-12.
90. Rodríguez-Chávez, J.L., Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., Delgado, G. 2014. In vitro activity of "mexican arnica" *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives against *Giardia intestinalis*. *Parasitology* 1-9.
91. Rodríguez, I.I., Yan-Ping Shi, García, O.J., Rodríguez, A.D., Mayer, A.M.S., Sánchez, J.A., Ortega-Barria, E., González, J. 2004. New Pseudopterosin and seco-Pseudopterosin diterpene glycosides from two colombian isolates of *Pseudopteroorgia elisabethae* and their diverse biological activities. *J. Nat. Prod.* 67(10):1672-1680.
92. Rogawski, M.A. 1985. The A-current: how ubiquitous a feature of excitable cells is it? *Trends Neurosci.* 8:214-219.
93. Rojas, A., Torres, M., Rojas, J.I., Feregrino, A., Heimer de la Cotera, E.P. 2002. Calcium-dependant smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora*

- complanata*. *Toxicon* 40:777-785.
94. Rottini, G., Gusmani, L., Parovel, E., Avian, M., Patriarca, P. 1994. Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Toxicon* 33:315-326.
95. Salgado, V.M., Kem W.R. 1992. Actions of three structurally distinct sea anemone toxins on crustaceans and insect channel toxins. *Toxicon* 30:1365-1381.
96. Sam, T.W. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp *Artemia salina* en *Bioactive Natural Products*. CRC Press p.p. 441-445.
97. Sánchez-Rodríguez, J., Cruz-Vázquez, K. 2006. Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds of the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing y Michelotti, 1860). *Arch. Toxicol.* 80:436-441.
98. Sánchez-Rodríguez, J., Torrens, E., Segura-Puertas, L. 2006. Partial purification and characterization of a novel neurotoxin neurotoxin and three cytolytins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom. *Arch. Toxicol.* 80:163-168.
99. Santamaría, A., Sánchez-Rodríguez, J., Zugasti, A., Martínez, A., Galván-Arzate, S., Segura-Puertas, L. 2002. A venom extract from the sea anemone *Bartholomea annulata* produces haemolysis and lipid peroxidation in mouse erythrocytes. *Toxicology* 173:221-228.
100. Santos, Y., Martínez, M., Sandoval, A., Rodríguez, A.A., Falcón, A., Heimer de la Cotera, E.P., Aguilar, M.B., Flores, P., Félix, R., Arreguín, R. 2013. Arrhythmogenic effect of a crude extract from sea anemone *Condylactis gigantea*: posible involvement of Erg1 channels. *Toxicon* 67:47-54.
101. Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J-M., Béress, L., Lazdunski, M. 1995. Kalicludines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive potassium channels. *J. Biol. Chem.* 270: 25121-25126.
102. Sebens, K.P. 1982. Asexual reproduction in *Anthopleura elegantissima* (Brandt) (Anthozoa:Actinaria): seasonality and spatial extent of clones. *Ecology* 63:434:444.

103. Segura-Puertas, L., Ramos, M.E., Arámburo, C., Heimer de la Coteria, E.P., Burnett, J.W. 2001. One *Linuche* mystery solved: all 3 stages of the coronate scyphomedusa *Linuche unguiculata* cause seabather's eruption. *J. Am. Acad. Dermatol.* 44:624-648.
104. Segura-Puertas, L., Ávila-Soria, G., Sánchez-Rodríguez, J., Ramos-Aguilar, M.E., Burnett, J.W. 2002. Some toxinological aspects of *Aurelia aurita* (Lineé) from the mexican caribbean. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 8:1-11.
105. Shiomi, K., Qian, W.H., Lin, X.Y., Shimakura, K., Nagashima, Y., Ishima, M. 1997. Novel polypeptide toxins with crab toxicity from the sea anemone *Anemonia erythraea*. *Biochim. Biophys. Acta* 1335:191-198.
106. Shiomi, K., Honma, T., Ide, M., Nagashima, Y., Ishima, M., Chino, M. 2003. An epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *Toxicon* 41:229-236.
107. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nation. Canc. Inst.* 82:1100-1112.
108. Sher, D., Fishman, Y., Zhang, M., Lebediker, M., Gaathon, A., Mancheño, J.M., Zlotkin, E. 2005. Hydralisins, a new category of -pore-forming toxins in Cnidaria. *J. Biol. Chem.* 280:22847-22855.
109. Smith, W.L., Garavito, R.M., 2000. Cyclooxygenases: structural, celular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69:145-182.
110. Solís, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., Phillipson J.D. 1993 A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant Med* 59:250-252.
111. Spagnuolo, A., Zanetti, L., Cariello, L., Piccoli, R. 1994. Isolation and characterization of two genes encoding calitoxins, neurotoxic peptides from *Calliactis parasitica* (Cnidaria). *Gene* 138:187-191.

112. Standker, L., Beress, L., Garateix, A., Christ, T., Ravens, U., Salceda, E., Soto, E., John, H., Forssmann, W.G., Aneiros, A. 2006. A new toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation.
113. Suput, D. 2009. In vivo effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon* 54: 1190-1200.
114. Toledo-Aral, J.J., Moss, B.L., He, Z.J., Koszowski, A.G., Whisenand, T., Levinson, S.R., Wolf, J.J., Silos-Santiago, I., Haleboua, S., Mandel, G., 1997. Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1527-1532
115. Torres Ramos, M. 2001. Actividad biológica del veneno de la medusa *Cassiopea xamachana*: estudios electrofisiológicos y bioquímicos. Tesis de Doctorado. Centro de Neurobiología. UNAM, 116 p.
116. Torres, M.; Aguilar, M.B. 2003. Recent advances in cnidarian neurotoxic research. *Comments on Toxicology*. 9:161-174.
117. Tunnell, J.W., Jr. 2007. Reef Distribution (chapter 2). In Tunnell, J.W. Jr., Chavez, E.O. and Withers, K. (eds) *Coral Reefs of the Southern Gulf of Mexico*. Texas A&M University Press, College Station, TX, 216 p.
118. Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kau, Y., Yasumoto, T. 1995. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *J. Am. Chem. Soc.* 117:5389-5390.
119. Veiga, A.B.G., Berger, M., Guimaraes, J.A. 2009. *Lonomia obliqua* venom: Pharmacotoxicological effects and biotechnological perspectives. En: De Lima, M.E., Pimienta, A.M.C., Rochat, H. (Eds.), *Animal Toxins: state of the art: perspectives in health and biotechnology*. UFMG, Belo Horizonte, pp. 372-390.
120. Warmke, J.W., Reenan, R.A., Wang, P., Qian, S., Arena, J.P., Wang, J., Wunderler, D., Liu, K., Kaczorowski, G.J., Van der Ploeg, L.H., Ganetzky, B., Cohen, C.J. 1997. Functional expression of *Drosophila* para sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. *J. Gen. Physiol.* 110:119-133.

121. Winke, E., Zaharenko, A.J., Redaelli, E., Schiavon, E. 2009. Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltage-gated sodium channels isoforms. *Toxicon* 54:1102-1111
122. Watters, M.R. 2005. Tropical Marine Neurotoxins: venoms to drugs. *Semin. Neurol.* 25:278-289.
123. Welsh, J.H.; Brock, P.B. 1958. Quaternary ammonium bases in the coelenterates. *The Biological Bulletin* 115:551-561.
124. Wittle, L.W., Scura, E.D., Midlebrook, R.E. 1974. Singing coral (*Millepora tenera*) toxin: a comparison of crude extracts with isolated nematocysts extracts. *Toxicon* 12:481-486.
125. Worthington Biochemical Corporation Manual ( septiembre 2012) <http://www.worthington-biochem.com/pla/assay.html>.
126. Zaharenko, A.J., Richardson, M., Carvalho Pimenta, D., Konno, K., Portaro, F.C.V., de Freitas, J.C. 2008. Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: novel peptides belonging to new classes of toxins. *Comp. Biochem. Physiol. Part D* 3:219-225.

