



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

(QUÍMICA ACUÁTICA)

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ALGUNAS
NEUROTOXINAS DE LA ANÉMOMA *Bartholomea annulata*.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANTÒNIA MARIA COLOM CASASNOVAS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (PUERTO MORELOS)

COMITÉ TUTORAL: DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)

DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)

DRA. PATRICIA E. THOMÉ ORTIZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)

DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

MÉXICO, D. F. JULIO 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.



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

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
ALGUNAS NEUROTOXINAS DE LA
ANÉMONA *Bartholomea annulata***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (QUÍMICA ACUÁTICA)

PRESENTA

Antònia Maria Colom Casasnovas

Directora de Tesis: *Dra. Judith Sánchez Rodríguez*

Comité Tutorial: *Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez*

Dr. Sergio Rodríguez Morales

Dra. Patricia E. Thomé Ortiz

Dr. Abel Santamaría Del Ángel

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1 Phylum Cnidaria	15
2.2 Clase Anthozoa	21
2.3 Orden Actinaria	22
2.4 Canales iónicos	22
2.5 Tipos de toxinas	27
2.6 <i>Bartholomea annulata</i>	31
2.7 Estudios recientes	33
3. HIPÓTESIS	36
4. JUSTIFICACIÓN	37
5. OBJETIVOS	39
6. ÁREA DE ESTUDIO	40
7. MATERIALES Y MÉTODOS	41
7.1 Muestreo de <i>B. annulata</i>	41
7.2 Identificación de cnidocistos	41
7.3 Descarga de nematocistos	41
7.4 Cuantificación de proteínas	42
7.5 Ensayos de actividad	43
7.6 Electroforesis	46
7.7 Estrategia de separación	48
7.8 Ensayos electrofisiológicos	50
8. RESULTADOS	54
8.1 Recolecta de muestras	54
8.2 Identificación de cnidocistos	54
8.3 Obtención de extracto crudo	57
8.4 Pre-purificación de extracto crudo	63
8.5 Ensayos electrofisiológicos	77
8.6 Ensayo hemolítico	104
9. DISCUSIÓN	105
10. CONCLUSIÓN	114
11. BIBLIOGRAFÍA	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica	32
Tabla 2: Resumen recolecta de muestras	54
Tabla 3: Rendimiento del extracto crudo	57
Tabla 4: Concentración de proteínas de extracto crudo	58
Tabla 5: Características de los cangrejos inyectados con extracto crudo	59
Tabla 6: Efectos observados en los cangrejos inyectados con EC	59
Tabla 7: Resultados de actividad de EC en fosfolipasas	60
Tabla 8: Peso y volumen de EC usado para Sephadex G-50 M	63
Tabla 9: Rendimientos de las fracciones obtenidas con Sephadex G-50 M	65
Tabla 10: Concentración de proteínas de las fracciones obtenidas con Sephadex G-50 M	65
Tabla 11: Características de los cangrejos inyectados con las fracciones (Sephadex G-50 M)	66
Tabla 12: Efectos observados en los cangrejos inyectados con las fracciones	67
Tabla 13: Actividad de fosfolipasa de las fracciones Sephadex G-50 M	69
Tabla 14: Rendimiento de las fracciones obtenidas por ultrafiltración	72
Tabla 15: Concentración de proteínas de las fracciones obtenidas por UF	73
Tabla 16: Características de los cangrejos inyectados con las fracciones obtenidas por UF	73
Tabla 17: Efectos observados en los cangrejos inyectados con las fracciones ultrafiltradas	74
Tabla 18: Actividad de fosfolipasa de las fracciones obtenidas por UF	75
Tabla 19: Concentraciones de EC, fracciones y UF usadas para los ensayos electrofisiológicos	77
Tabla 20: Concentración proteica de los extractos utilizados en los ensayos electrofisiológicos	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Cnidario en fase polipoide	16
Fig. 2: Cnidario en fase medusoide	16
Fig. 3: Cladograma del phylum Cnidaria	18
Fig. 4: Esquema gráfico de las partes de un cnidocito	18
Fig. 5: Compuestos químicos de los nematocistos	19
Fig. 6: Esquema de sinapsis química	23
Fig. 7: Estructura de los canales de Na _v	25
Fig. 8: Estructura de los canales de Ca _v y K _v	26
Fig. 9: Imagen de <i>Bartholomea annulata</i>	32
Fig. 10: Imagen de Google Earth de la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos	40
Fig. 11: Diferentes tipos de nematocistos identificados en <i>B. annulata</i>	56
Fig. 12: Proceso de descarga de los nematocistos de <i>B. annulata</i>	57
Fig. 13: Actividad fosfolipásica del EC	61
Fig. 14: Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas obtenidas en el EC	62
Fig. 15: Cromatograma de Sephadex G-50 M	64
Fig. 16: Actividad fosfolipásica de los extractos pre-purificado con Sephadex G-50 M	70
Fig. 17: Electroforesis SDS-PAGE de FI y FIII obtenidas con Sephadex G-50 M	72
Fig. 18: Actividad fosfolipásica de las fracciones obtenidas por ultrafiltración	76
Fig. 19: Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones ultrafiltradas	77
Fig. 20: Representación gráfica de la actividad media de los ovocitos nativos (no microinyectados con ARNm)	78
Fig. 21: Registro de la respuesta de un ovocito nativo perfundido con EC a una concentración 50 µg proteína/ml	79
Fig. 22: Registro de la respuesta de los ovocitos nativos frente a los antagonistas Ac. Glut 10-4M y ACh 10-4 M	79
Fig. 23: Representación gráfica de los picos de intensidad de corrientes medias de los neurotransmisores en ovocitos microinyectados con ARNm	80
Fig. 24: Respuesta de los ovocitos microinyectados con ARNm, a un voltaje continuo a los neurotransmisores antagonistas	81
Fig. 25: Registro electrofisiológico de EC a una concentración de 5 mg/ml	82
Fig. 26: Registro de FII y 5-3f a una concentración 5mg/ml	83
Fig. 27: Representación gráfica del efecto de BTx a una concentración 5 mg/ml	83
Fig. 28: Diferencia porcentual entre Siw e losc a 5 mg/ml	84
Fig. 29: Registros de las corrientes obtenidas con BTx a concentración 1 mg/ml y 0.1 mg/ml	84
Fig. 30: Picos de corrientes obtenidos como respuesta de los ovocitos sometidos a concentraciones de veneno de 1 mg/ml y 0.1 mg/ml	86
Fig. 31: Registros obtenidos a partir de diferentes fracciones a concentraciones de 1 mg/ml y 0.1 mg/ml	87
Fig. 32: Diferencia porcentual entre Siw e losc a una concentración de 1 mg/ml y 0.1 mg/ml	88
Fig. 33: Registros con ovocitos inyectados con EGTA	90
Fig. 34: Picos de corriente medidos con ovocitos inyectados con EGTA	91
Fig. 35: Picos de corriente provocados por BTxs en ebullición durante 45 y 90 min	92
Fig. 36: Diferencias porcentuales entre Siw e losc provocados por toxinas	

Llevadas a ebullición durante 45 y 90 min	94
Fig. 37: Registros de respuestas obtenidas a partir de fracciones en ebullición durante 45 y 90 min	95
Fig. 38: Curvas I-V obtenidas a partir del suministro de los diferentes extractos	96
Fig. 39: Curvas I-V obtenidas a partir del suministro de los diferentes extractos con ovocitos inyectados con EGTA	99
Fig. 40: Curvas I-V obtenidas con extractos en ebullición 45 min	100
Fig. 41: Curva I-V de Na_v^+	101
Fig. 42: Representación porcentual del bloqueo de canales de Na_v	101
Fig. 43: Registros de EC bloqueando los canales de Na_v	102
Fig. 44: Registro de FIII bloqueando los canales de Na_v	102
Fig. 45: Representación porcentual de bloqueo de los canales de Na_v provocada por extractos llevados a ebullición	103
Fig. 46: Registro de una de las fracciones hervidas bloqueando los canales de Na_v	103
Fig. 47: Representación porcentual de hemólisis en eritrocitos de humano	104

S'horabaixa es pon es sol

Plorinyava l'infanto

No ploris minyo

No ploris

Que ta mareta es a prop

No nin no

No nin no

Una cançoneta pes nin petitó



Agradecimientos

Al proyecto.UNAM-PAPIIT IN 202714

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de pertenecer a una de las mejores universidades de Latinoamérica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyarme con la beca y hacer posible mi supervivencia y desarrollo del trabajo de investigación.

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por haberme permitido realizar mi tesis de maestría. A la Dra. Gloria Vilaclara, Diana, Gabriela, Lupita y Chantal por sus atenciones que han tenido conmigo.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM donde se me permitió desarrollar mis últimos experimentos de la tesis.

A la Dra. Judith Sánchez Rodríguez, que además de darme la oportunidad de poder trabajar en su laboratorio, de hacerme crecer como científica, tener paciencia y dedicación; también me ha dado su ayuda laboral y personal.

Al Dr. Rogelio Arellano Ostoia con el proyecto PAPIIT IN 205615, que me adoptó como una estudiante más de su laboratorio y me dio la oportunidad de aprender sobre un tema desconocido para mi, la electrofisiología.

A la Dra. Edith Garay Rojas por su paciencia y por dedicarme su tiempo en el laboratorio.

A mi comité tutorial, el Dr. Manuel Aguilar, la Dra. Patricia Thomé, el Dr. Sergio Rodríguez y al Dr. Abel Santamaría por todas sus observaciones y consejos que han hecho posible dar forma a mi trabajo.

M. en Ciencias Fernando Negrete y M. en Ciencias Cecilia Barradas por su ayuda en el pilar más importante de este proyecto, los muestreos de la anémona.

M. en Ciencias Laura Celis por su ayuda y atención en el laboratorio de Toxinología.

A Amauri Mendoza, el capitán de las lanchas que me permitió el muestreo.

A Horacio y Michelle por enseñarme a operar las campeonas del INB, las ranitas.

A Mirza por contagiarme su felicidad, por escucharme y por los momentos compartidos, a mis investigacholas Amanda por iluminar la vida ☺ a Ilinova por ser la mujer maravilla jugando a ser ruda pero yo sé que tiene un gran corazón. A Guillermo por enseñarnos a cantar, a Susy por hacernos reír y mantener el laboratorio impecable, a Sara, a Mirza, a Juanjo, a Paolo, y al gran Rodrigo que además de ser un amigo fue mi maestro de laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio del INB que me trataron más que bien y me dieron la oportunidad de conocerlos, Lupita porque es una persona increíble y otra amiga que me llevo a casa, Letty por su ayuda y también darme su amistad, Caro, Sofi, Anaí y Juan Pablo.

A mis compañeros de la UASA, Angie por abrirme su corazón y ser un punto de apoyo muy importante en Puerto Morelos, a mi David que más que amigo es como mi hermano, alguien que me ayudó tanto en la ciencia como en el día a día caribeño, Rubén y Luis Fer por los buenos momentos de diversión juntos, a Sac, Tatis y Alexis por esos momentos de convivencia, Axxa, Sergei, Wendo, Miriam, Roberto, Piedad, Nancy E., Leslie, Rogelio, Parmenio, Kelly, Tomás, Luis, las Gabys, Miguel, Mac, Tim, Elisa, Inti, Esme, Víctor, Ricardo y Rebeca.

A Mario por haber estado ahí en los momentos duros, por sus consejos y por las nuevas experiencias vividas.

A Oscar que sin sus recomendaciones y sus ánimos a pertenecer a la UNAM, no habría llegado nunca a Puerto Morelos.

A mis amigas Mary, Edurnis, Gemita, Elisendilla, Henarcilla y Ana Manzana por que a pesar de la distancia ellas me han demostrado que no es una barrera para nosotras.

A las trotamundos Ana y Elisa que hacen que me sienta menos mal en ese mundo de bichos raros que abandonan su pueblo y se van a conocer mundo.

A Raúl que dedicó sus horas a ayudarme con la electroforesis y que sin pensarlo ha acabado siendo una persona muy especial en mi vida. “Jo...tío es lo que hay”

A sa meva padrina d en Rasqui, que sempre té una rialla per tots y a la familia Colom que con sus mensajes me hacen reír todos los días, pero en especial a n es meu padrí Pep i a sa meva tia Nena que ya no están pero siguen con nosotros.

A mi abuela Magdalena que además de ser su “mascota” me ha apoyado en este camino que elegí a mi familia Casanovas y asociados al meu fillolet Biel, conco Andreu y tía Cati que siempre están para ayudarme cuando los necesito y cuando no también.

A mi mamá Pepi y a mi papá Tolo que sin ellos no habría conseguido ser lo que soy ni ser como soy, siempre me han apoyado, ayudado y animado a mis locuras de vivir experiencias lejos de ellos y a pesar de estar al otro lado del mundo siempre me han hecho sentir su cariño y todo su amor incondicional.

A mi hermano Bartomeu y mi cuñada Laia por su “sempre apunt”.

Pero sobretodo esto hoy no sería una tesis sin agradecerle a alguien muy importante para mi, alguien que me cuidó desde que era un bebé, que me enseñó que era viajar, que jugó conmigo, que me dió lecciones de vida, que me contó sus historias, alguien que me dedicó sus últimas palabras y alguien que nunca se cansó de decir “el NO, no existe” por él, que estoy segura que estaría muy orgulloso de mi, le dedico mi trabajo al meu padrinet Manuel.

Lista de Abreviaturas

ACh	Acetilcolina	m	m	Metro
AB-6	Acrilamida-Bisacrilamida	min	min	Minutos
APS	Persulfato de Amonio	mM	Mm	Milimolar
BTx	Toxinas de <i>B. annulata</i>		Mg SO ₄	Sulfato de Manganeso
°C	Grados centígrados		Na ⁺	Ión Sodio
Ca ²⁺	Ión Calcio		NaCl	Cloruro de Sodio
CaCl ₂	Cloruro de Calcio		Na HCO ₃	Bicarbonato de Sodio
Ca (NO ₃) ₂	Nitrato de calcio		nl	Nanolitros
cm	Centímetro		nm	Nanometros
DFA	Desferroxiamina		pH	Potencial de Hidrógenos
EC	Extracto crudo		PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
EGTA	Ácido tetracético etilen glicol		PNM	Productos Naturales
FI	Fracción uno			Marinos
FII	Fracción dos		Psi	Libra por pulgada
FIII	Fracción tres			cuadrada
g	Gramos		RN	Ringer normal
GABA	Ácido gamma-aminobutírico		ARNm	Ácido ribonucleico
GSH	Glutati6n reducido			mensajero
h	Hora		rpm	Revoluciones por minuto
HCl	Ácido clorhídrico		SCN	Sistema Nerviso Central
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulf6nico		SDS	Dodecilsulfato de sodio
			SDS-PAGE	Electroforesis en geles de
K ⁺	I6n Potasio			poliacrilamida
KCl	Cloruro de Potasio			desnaturalizantes
kDa	Kilodaltons		TEMED	Tetrametiletlen-diamina
K _v	Familia de los canales i6nicos dependientes del voltaje del potasio		μl	Microlitros
			UF	Ultrafiltraci6n
			V	Volts
M	Molaridad		5-HT	Serotonina
mm	Milímetro			

Resumen

Bartholomea annulata, es una anémona que se encuentra principalmente en el Mar Caribe, Golfo de México y Océano Atlántico Oeste. Se caracteriza por tener tentáculos largos y delgados de coloración café con bandas espirales en forma de anillos incompletos. Este cnidario, al igual que las demás especies pertenecientes al mismo *Phylum*, presenta cnidocistos, los cuales son pequeñas cápsulas que en su interior contienen un filamento enrollado con espinas. Ya sea como mecanismo de defensa o para la obtención de alimento, estos filamentos liberan estas espinas e inyectan sustancias activas (compuestas mayormente por proteínas y polipéptidos) a otros organismos. Este trabajo se enfocó en el aislamiento de las sustancias activas de esta especie donde se realizaron diferentes ensayos. Se comprobó la actividad del veneno mediante la inyección de extracto crudo en cangrejos, se observó la actividad de fosfolipasa mediante la medición de halos de actividad en geles de agarosa con una solución fisiológica con yema de huevo y se realizaron geles SDS-PAGE para poder ver el rango de bandas proteicas del extracto crudo aislado de la anémona. Además se aplicaron dos estrategias de separación, una fue la pre-purificación mediante Sephadex G-50 M y la otra fue la ultrafiltración mediante membranas de Millipore con cortes de 10, 5, 3 y 1 kDa. Con cada una de las fracciones obtenidas en la pre-purificación se hicieron los ensayos de actividad (prueba de actividad en cangrejos, fosfolipasa y ensayo hemolítico), electroforesis y ensayos electrofisiológicos para probar la neurotoxicidad de estos. Los ensayos electrofisiológicos se llevaron a cabo con ovocitos de la especie *Xenopus laevis* tanto inyectados con ARNm de cerebro de rata como ovocitos nativos, es decir, no inyectados con ARNm. En estas pruebas se observó que el extracto crudo y las fracciones pre-purificadas tenían una mayor respuesta en los ovocitos que están inyectados con ARNm. Se identificaron dos tipos de corrientes, una corriente lisa entrante y otra oscilatoria, donde se deduce que la corriente oscilatoria es provocada por la liberación de calcio intracelular. Debido al cambio de

conductancia las curvas I-V muestran que las toxinas de *B. annulata* provocan bloqueo en los canales de Sodio.

Abstract

Bartholomea annulata is a sea anemone typically found in the Caribbean Sea, the Gulf of Mexico and the Western Atlantic Ocea. Most of the species of this Phylum have venoms (mixtures of active compounds) that are used to catch their prey or as mechanism of defense, which are released form organelles called cnidocists.

In this research we focussed in the isolation of active compounds of these spicies, and carried out diferents bioassays. We tested the venom activity with by injections of crude extract in crabs, observed the presence of phospholipase activity, and performed SDS-PAGE electrophoresis to observe the protein bands range of the crude venom isolated from the sea anemone.

In addition, we applied two diferent protein separation strategies: pre-purification with Sephadex G-50 and ultrafiltration by Millipore membranes (10, 5, 3 & 1 kDa). Each pre-purified protein fraction obtained was tested for activity (crab, phospholipases and hemolytic assays), and submitted to electrophoresis and electrophysiologic assays.

The electrophysiologic assays demonstrated the neurotoxic effects of the venom and pre-purified fractions. In this assay we employed oocytes extracted from *Xenopus laevis* and we tested the crude venom and pre-purified fractions with native oocytes and oocytes injected with RNAm of rat brain. We could detect two current types just in injected oocytes, the first one was called, soft incoming current (S_{iw}) and the second one was called, oscilatory current (I_{osc}), the second current it could be due to the release of intra celular calcium. Also, we detected that both the crude venom and the pre-purified fractions were able to block voltage-dependent sodium channels.

1 Introducción

Los compuestos provenientes de los seres vivos llamados metabolitos secundarios pueden ser considerados como productos de la adaptación de un organismo para sobrevivir en un ecosistema particular. Su importancia es debida a la propia función biológica en los organismos que los producen y a las posibilidades de ser usados como agentes terapéuticos, como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, como materia prima para la síntesis de sustancias con interés farmacológico y/o interés industrial (Gutierrez Ravelo & Estevez Braun, 2009). De forma histórica los compuestos activos obtenidos de las plantas terrestres y los microbios han sido por mucho tiempo la fuente tradicional de uso medicinal, como es el ejemplo de la morfina adquirida de la amapola o la penicilina obtenida a partir de un hongo (Garateix, 2005).

Sin embargo, las investigaciones sobre los productos naturales marinos (PNM), fueron más tardías ya que, empezaron a surgir hace aproximadamente 75 años, a pesar de que el 84% del reino animal está representado por organismos marinos (Blunt *et al.*, 2012). En la última década han sido publicadas 5,000 estructuras nuevas provenientes de PNM, muchas de las cuales han sido probadas en diferentes campos, particularmente en el de agentes terapéuticos potenciales para diferentes enfermedades (Houssen & Jaspars, 2005); incluso algunos fármacos ya están en uso, como por ejemplo el Prialt[®] (Ziconotide) obtenido de un péptido aislado de *Conus magus* y usado para los enfermos de cáncer terminal como inhibidor de dolor, o Yondelis[®] aislada de una bacteria de una ascidia y que se emplea para tratar los sarcomas de tejido blando.

De forma más particular, y en relación con este trabajo, el phylum Cnidaria presenta unos orgánulos especializados llamados nematocistos, donde almacenan una gran variedad de toxinas, principalmente clasificadas en dos grupos: neurotoxinas y citolisinas.

Se sabe que las toxinas presentes en la clase Anthozoa contienen una gran riqueza de metabolitos con actividades farmacológicas antiinflamatorias y

antibióticas, algunos de los cuales son usados para tratamientos de cáncer (Lazcano-Pérez *et al.*, 2014).

Aunque muchos de los péptidos neurotóxicos aislados de las anémonas tienen como blanco los canales de sodio y potasio (Castañeda & Harvey, 2009; Lazcano-Pérez *et al.*, 2014) las investigaciones han estado más enfocadas a los canales de sodio (Castañeda & Harvey, 2009). Los canales iónicos son esenciales para un amplio rango de funciones fisiológicas incluyendo la señalización neuronal, contracción muscular, el ritmo cardíaco y la secreción hormonal, entre otras. Alteraciones funcionales y estructurales asociada a los canales iónicos constituyen la base de diferentes patologías neurológicas, neuromusculares y cardiovasculares (Garateix, 2005).

En este trabajo nos enfocamos al estudio del veneno producido por una especie de anémona llamada *Bartholomea annulata*, centrándonos en sus neurotoxinas a partir de los ensayos fisiológicos realizados.

2 Antecedentes

2.1 Phylum Cnidaria

Los Cnidarios son un filo que se conoce desde hace aproximadamente 2500 años. Actualmente están comprendidos en alrededor de 11,300 especies, las cuales se agrupan en cinco clases: Anthozoa, Cubozoa, Hydrozoa, Scyphozoa y Staurozoa (González-Muñoz, 2009).

Salvo las hidras y algunos otros hidrozoarios de agua dulce, la mayoría de los cnidarios son marinos. Gran parte de ellos viven en los litorales; las formas sésiles son abundantes en las costas rocosas o en formaciones coralinas de aguas tropicales (Barnes, 1979).

Se caracterizan por la presencia de tentáculos y por su simetría radial la cual contiene dos capas de células, ectodermo y endodermo. Además también se encuentra una matriz no celular, situada entre ambas capas celulares, llamada mesoglea (Frazão *et al.*, 2012). Se observan dos tipos estructurales distintos en el mismo filo. Uno de ellos es sésil, conocido con el nombre de pólipo y otro se encuentra nadando libremente el cual recibe el nombre de medusa (Barnes, 1979).

El cuerpo de los cnidarios puede presentar dos formas diferentes en el ambiente:

1) Cuerpo polipoide (Fig. 1), el cual presenta un tallo cilíndrico cuyo extremo oral, portador de la boca y numerosos tentáculos, se dirige hacia arriba y el extremo aboral u opuesto es donde permanece fijo al sustrato (Barnes, 1979). Tienen forma de saco, encontrándose en su interior una cavidad gástrica. Estos pueden vivir aislados como las anémonas o bien formando colonias más o menos grandes, estando los pólipos unidos por un exoesqueleto, como es el ejemplo de los corales o las gorgonias; aunque también existen colonias flotantes como la carabela portuguesa.

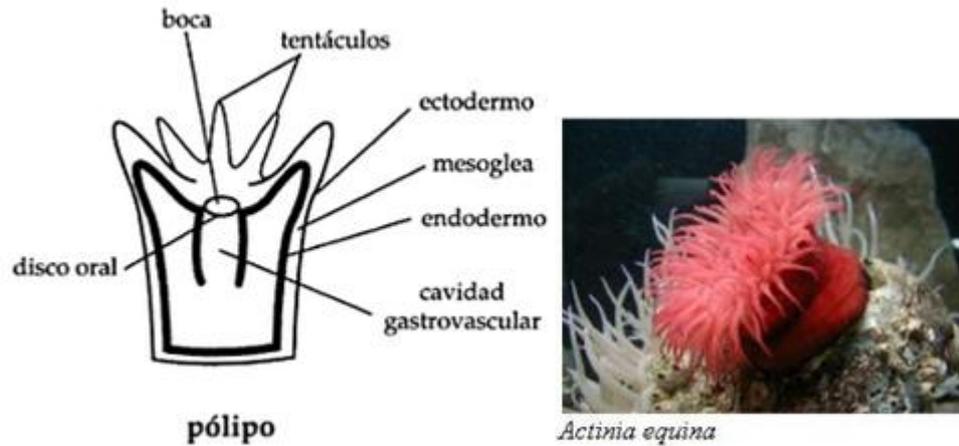


Fig. 1: Forma corporal de un polipoide.(modificado de Brusca & Brusca, 2005 en Segura-Puertas & Rodríguez-Martínez, 2007 y Bergillos & Rivas, 2013).

2) **Cuerpo medusoide** (Fig. 2), es de vida libre, con un cuerpo parecido a una campana o sombrilla con la parte convexa hacia arriba y la boca localizada en el centro de la superficie inferior, cóncava. Los tentáculos cuelgan hacia abajo a partir del borde de la campana (Barnes, 1979).

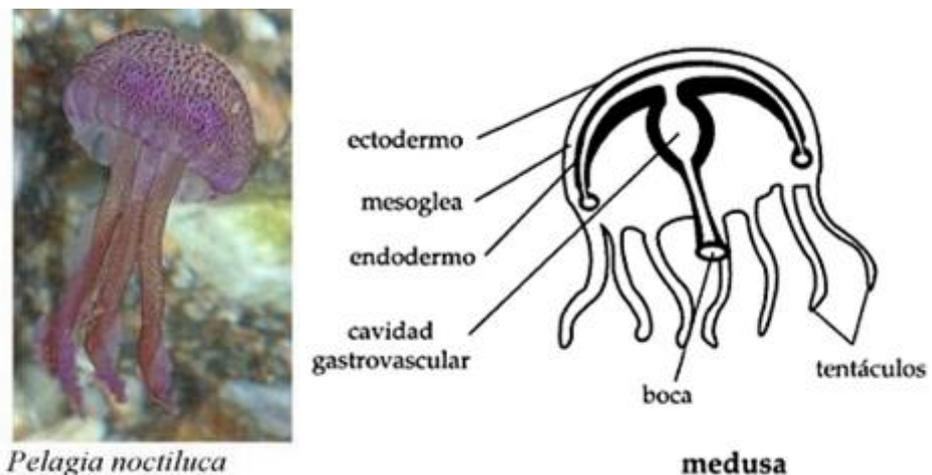


Fig. 2: Fase medusoide (Bergillos & Rivas, 2013 y modificado de Brusca & Brusca, 2005 en Segura-Puertas & Rodríguez-Martínez, 2007).

Algunos de estos animales muestran solamente forma polipoide, otros solo medusoide, mientras otros pasan por ambas formas durante el curso de su ciclo

vital (Barnes, 1979); por tanto, en función de cuál sea su fase predominante se clasifican en cinco clases (Fig. 3).

Clase Hydrozoa (Hidrozoarios): en esta clase se observan tanto la estructura polipoide como la medusoide y algunas especies incluso pasan por ambas formas en el transcurso de su ciclo vital. Son tres las características que unifican a los miembros de esta clase (Barnes, 1979).

- La mesoglea no es nunca celular.
- La gastrodermis carece de nematocistos.
- Las gónadas son epidérmicas.

Clase Scyphozoa (escifozoarios): son los cnidarios a que más frecuentemente se hace referencia como medusas. En esta clase la medusa es el individuo manifiesto y dominante en el ciclo vital; la forma polipoide queda restringida a una pequeña etapa larvaria (Barnes, 1979).

Clase Anthozoa (antozoarios): son cnidarios polipoides solitarios o coloniales en los que no se observa etapa medusoide. Los miembros de esta clase presentan muchas formas conocidas como anémonas, gorgonias, corales y trinitarias marinas (Barnes, 1979).

Clase Cubozoa (cubozoos): esta clase solo posee la fase medusoide, tienen una gran semejanza con las medusas de clase Scyphozoa, pero estas tienen forma de cubo, de aquí el nombre de su clase. Los cnidocitos que presentan estos organismos son realmente peligrosos para el ser humano, debido a su alta capacidad tóxica (Llosa, 2003).

Clase Staurozoa: nombrada recientemente; Marques y Collins, (2004) hicieron un análisis cladístico de la Medusozoa y la evolución de los cnidarios, donde establecieron que el orden Stauromedusa que se clasificaba en la clase Scyphozoa debía incluirse en una clase nueva llamada Staurozoa junto a la orden Conulatae, ya extinta. Las Stauromedusas suelen ser pequeñas y solitarias, viven

en mares templados y hábitats poco profundos cercanos a la costa (Collins & Daly, 2005).

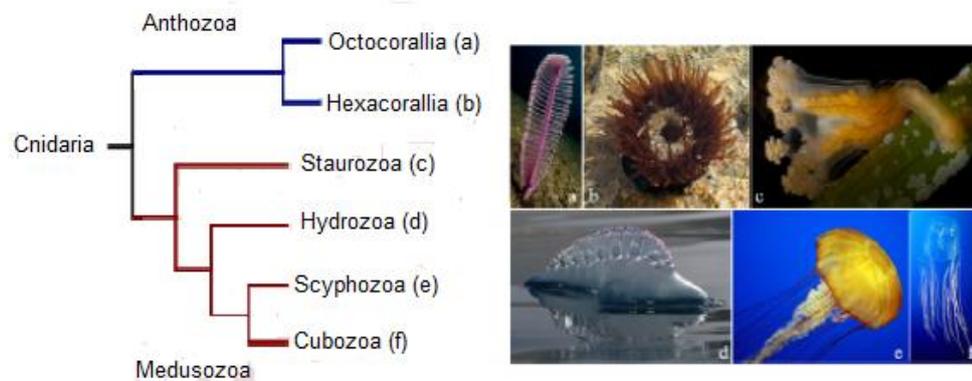


Fig. 3: Cladograma simple del phylum Cnidaria (Figura modificada de Frazão *et al.*, 2012).

Este filo Cnidaria se caracteriza por la presencia de unas células urticantes llamadas cnidocitos o cnidoblastos (Fig. 4), que se encuentran esparcidos por toda la epidermis alojados o invaginados en las células (Barnes, 1979). Son principalmente abundantes en los tentáculos de medusas, anémonas corales y pólipos de los hidroides (Sánchez-Rodríguez & Lucio-Martínez, 2011).

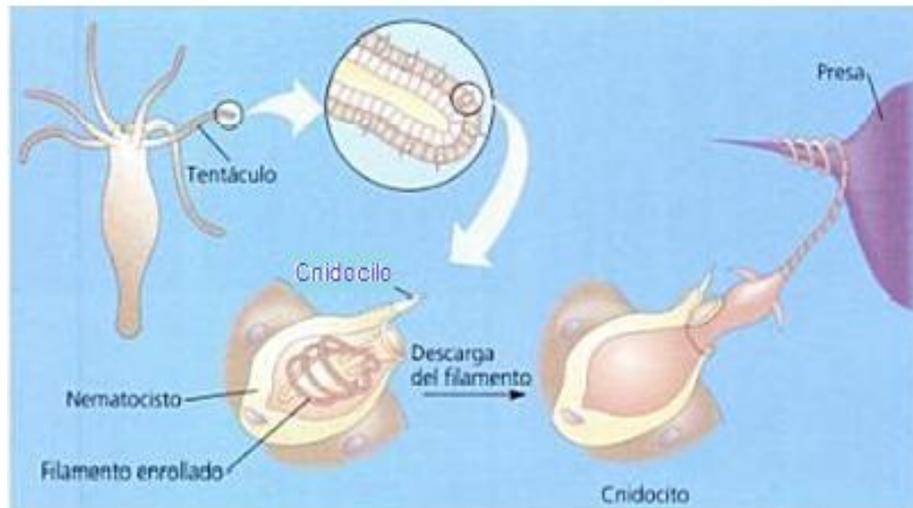


Fig. 4: Imagen de un cnidocito o cnidoblasto con un esquema gráfico de las diferentes partes del orgánulos, sin descargar y descargado (modificado de Campbell & Reece, 2007).

El cnidocito es una célula redondeada u oval, con un núcleo basal. Uno de los extremos de la célula contiene una proyección corta y rígida, parecida a una cerda llamada cnidocilo, con una estructura similar al flagelo, expuesta a la superficie (Barnes, 1979) y cuya función es la detección de los estímulos táctiles externos.

En el interior de la célula se encuentran las cápsulas llamadas cnidocistos o nematocistos, ya que a pesar de ser un tipo de cnidocisto también se les llama así ya que estos son los cnidocistos más comunes en este filo. Estas cápsulas contienen un filamento enrollado con una serie de espinas en la base o bien distribuidas en toda la longitud del filamento, donde se contienen las sustancias tóxicas. La composición de los cnidocistos no es conocida en detalle, pero contienen una gran variedad de compuestos químicos (Fig. 5). Alrededor de unos 250 de estos compuestos han sido identificados como sustancias proteicas (péptidos, proteínas, enzimas y proteínas inhibidoras) y sustancias no proteicas (purinas, compuestos de amonio cuaternario, aminas biogénicas y betaínas), a pesar de que la mayoría son péptidos y proteínas (Frazão *et al.*, 2012). El extremo de la cápsula, que está dirigido hacia fuera, está cubierto por un casquete u opérculo (Barnes, 1979) el cual se abre cuando se produce el estímulo táctil externo.

Sustancias en nematocistos		
Bradiquinina	Hemolisina	Serotonina
Histamina	Prostaglandinas	ATP
Hialuronidasa	Fosfodiesterasa	Nucleosidasa
Proteasas ácidas	Proteasas alcalinas	DNAasa
Fibrinolisisina	Aminopeptidasa	RNAasa
Fosfatasa ácidas	Complejo de ataque de membrana	

Fig. 5: Compuestos químicos identificados en nematocistos (Bergillos & Rivas, 2013).

Las principales funciones de los nematocistos son la obtención de alimento, defenderse de los depredadores y la adhesión al sustrato durante la locomoción en el caso de los pólipos (Kass-Simon & Scappaticci, 2002; Sánchez-Rodríguez &

Lucio-Martínez, 2011). Las sustancias activas que presentan los cnidarios, contienen polipéptidos que pueden interactuar con los canales del Sodio y Potasio (Norton, 1991; Sánchez-Rodríguez & Cruz-Vazquez, 2006; Terlau & Olivera, 2004) teniendo una función neurotóxica (Lotan *et al.*, 1995; Sánchez-Rodríguez *et al.* 2006 b) y citolisinas que atacan a la membrana de la célula (Anderluh & Maček, 2002) teniendo una función citolítica (Lotan *et al.* 1995; Sánchez-Rodríguez *et al.* 2006 b).

Los patrones que determinan el mecanismo de descarga (Fig. 4) no son del todo claros. Hay dos posibles hipótesis de mecanismos de descarga, una es la hipótesis de la diferencia osmótica y la otra es la hipótesis de la contracción (Mariscal *et al.*, 1976).

Hasta ahora se han descubierto 28 tipos de cnidocistos, divididos en tres subcategorías (Mariscal *et al.*, 1977).

Nematocistos: el veneno presente en este filo está confinado principalmente en los nematocistos (Kass-Simon & Scappaticci, 2002). Existen 25 tipos diferentes (Mariscal *et al.*, 1977). Poseen una gruesa cápsula de doble pared, son basófilos y presentan adjunto un filamento con diferentes construcciones y armaduras (Mariscal, 1974).

Se pueden dividir en Astomocnidae o Stomocnidae dependiendo de si su filamento está abierto o cerrado en la punta.

Los Astomocnidae presentan un hilo cerrado, los cuales funcionan para envolver su presa. En cambio, los Stomocnidae son nematocistos penetrantes con el hilo abierto, lo que le permite liberar la toxina. La mayoría de los nematocistos pertenecen a esta categoría (Mariscal, 1974).

Espirocistos: presentan dos tipos diferentes (Mariscal *et al.*, 1977). Son exclusivos de la clase Anthozoa. Los espirocistos están caracterizados por presentar una delgada cápsula de una sola pared, la cual contiene en su interior

un largo filamento enrollado desarmado de diámetro uniforme (Mariscal, 1974). La función de estos orgánulos es de la inmovilización mecánica de la presa y son adhesivos a diferencia de los nematocistos (Frazão *et al.*, 2012).

Pticocistos: Solamente existe un tipo de estos cnidocistos (Mariscal *et al.*, 1977). Carecen de espinas, tienen una función adhesiva y se usan para construir el tubo en el que viven. Estos orgánulos son exclusivos del orden Ceriantharia y más concretamente de la anémona *Ceriantheopsis americanus* (Mariscal *et al.*, 1977).

2.2 Clase Anthozoa

Es la clase más numerosa de los cnidarios, ya que, incluye más de 6,000 especies. Presentan una boca que conduce a una faringe tubular que se extiende a más de la mitad de camino en la cavidad gastrovascular. La faringe deriva del ectodermo invaginado. La cavidad gastrovascular está dividida por tabiques o mesenterios longitudinales, en compartimientos radiados, y los bordes mesentéricos ostentan nematocistos. El nematocisto de la clase Anthozoa tiene su extremo superior dividido en tres partes que se pliegan hacia atrás (Barnes, 1979).

La clase Anthozoa a la vez se divide en tres subclases (Barnes, 1979):

Subclase Octocorallia o Alcyonaria: pólipo con ocho tentáculos pinados, casi enteramente colonial.

Subclase Hexacorallia o Zoantharia: pólipos con más de ocho tentáculos, rara vez pinados. Se pueden encontrar de forma solitaria o colonial.

Subclase Tabulata: antozoarios coloniales extintos, con tubos esqueléticos calcáreos firmes, conteniendo plataformas horizontales o *tabulas*, sobre las cuales descansa el pólipo.

2.3 Orden Actinaria

Actinaria incluye a organismos que viven de forma solitaria conocidos como anémonas verdaderas (Dunn, 1982; González-Muñoz, 2009). Actualmente el orden comprende aproximadamente 1,200 especies incluidas en 220 géneros y 46 familias (Daly *et al.*, 2007; González-Muñoz, 2009).

2.3.1 Anémonas

Las anémonas son pólipos solitarios, con longitudes que oscilan desde 1.5 cm a 5.0 cm, con diámetro variable.

Habitan aguas costeras en todos los confines del mundo, pero son especialmente de mayor abundancia en los océanos tropicales. Suelen vivir adheridas a las rocas, conchas, maderos sumergidos, y algunas labran madrigueras en el lodo o en la arena. Las hay también que viven fijadas a medusas y aguamares, y cierto número de especies son comensales en conchas de cangrejos ermitaños.

Ostentan a menudo colores brillantes. Pueden ser de color blanco, verde, azules, anaranjadas, rojas e inclusive pueden presentar una combinación de estos colores.

2.4 Canales iónicos

El sistema nervioso de los animales diblásticos y triblásticos está constituido principalmente por las neuronas y las células gliales. Las neuronas al recibir estimulación inician un potencial de acción en el cono axónico, debido a que es donde se encuentra la mayor densidad de canales de Na^+ , y éste es conducido hasta el final del axón a través de un fenómeno autopropagable.

La comunicación entre las neuronas tiene lugar en las sinapsis, donde dependiendo de cómo se transfiera la información entre las neuronas las sinapsis pueden ser clasificadas como eléctricas o químicas (Sherwood, 2011) (Fig. 6).

Sinapsis eléctrica: a través de este tipo de comunicación neuronas y/o células gliales contiguas se conectan por medio de una unión tipo “gap” o “unión comunicante” (gap junction), las cuales permiten que los iones fluyan directamente entre los citoplasmas de dos células por lo regular en cualquier dirección.

Sinapsis química: en la sinapsis química la información se transmite mediante un mensajero químico a través del espacio que separa a dos células, involucrando una estructura entre, por ejemplo, la terminal del axón (neurona presináptica) y las dendritas o cuerpo celular de una segunda neurona (neurona postsináptica). El proceso de transmisión química se desencadena cuando el potencial de acción en una neurona presináptica se propagada hasta la terminal del axón provocando la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje en el botón sináptico, esto debido al cambio local del potencial de membrana. El consecuente aumento del calcio intracelular promoverá la liberación de un neurotransmisor (e.g., acetilcolina, dopamina, noradrenalina, serotonina,

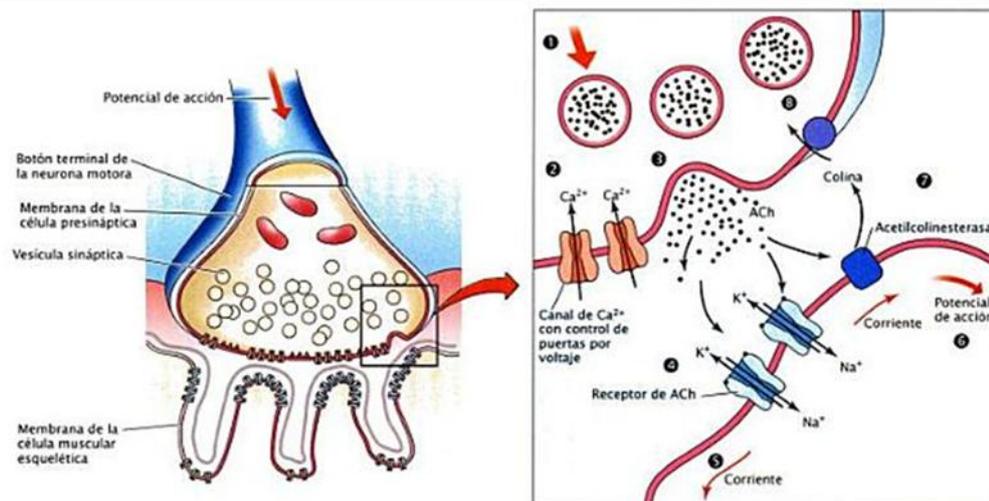


Fig. 6: Esquema de sinápsis química. Se lleva a cabo, mediante un mensajero químico a través de un espacio entre dos neuronas, involucrando las neuronas presinápticas y las postsinápticas. Los neurotransmisores son liberados por un impulso nervioso producido en la terminal nerviosa presináptica relacionado con la liberación de calcio intracelular, donde estos se unirán a receptores postsinápticos, provocando la apertura de canales iónicos cambiando su potencial de membrana. Imagen de (Hill & Wyse, 2006).

glutamato o GABA) que difunde a través del espacio sináptico uniéndose a receptores que se encuentran en la membrana postsináptica. La mayoría de los neurotransmisores activan rutas de segundos mensajeros vía receptores acoplados a la proteína G o receptores que son parte integral de canales iónicos llamados receptores-canal.

En buena medida, la generación y mantenimiento de las propiedades eléctricas del sistema nervioso, y sus capacidades de comunicación intercelular, recae en el funcionamiento de proteínas integrales de membrana, que permiten el paso de iones a través de ella y generan las condiciones para la generación de diferentes potenciales membranales. Las células del sistema nervioso expresan tres tipos de canales iónicos que son de interés en el presente estudio ya que suelen ser blancos moleculares a través de los que diferentes toxinas naturales provocan sus efectos.

Canales dependientes del voltaje

Los canales iónicos específicos para sodio, calcio y potasio son muy similares en cuanto a su estructura general (Fig. 7 y 8b).

Los canales de Na^+ son complejos transmembranales (Fig. 7) compuestos por subunidades polipeptídicas α y subunidades auxiliares, como es en el caso de los vertebrados que presentan subunidades β (Moran *et al.*, 2009). El poro conductor de iones está contenido en la subunidad α y las subunidades β son elementos auxiliares que modifican la cinética y la dependencia de voltaje de la apertura y cierre del canal (Salceda & Ortega, 2009).

Las proteínas llamadas subunidades α están compuestas por cuatro dominios homólogos (D_1 - D_4), cada uno comprendido por seis segmentos transmembranales (S_1 - S_6) en configuración helicoidal α , unidos por asas extracelulares. La estructura del canal del Ca^{2+} es muy similar (Fig. 8b).

Los canales de Na^+ presentan seis sitios receptores, capaces de reconocer toxinas peptídicas solubles en agua. La zona receptora de las toxinas de las anémonas,

arañas y escorpiones es el sitio 3 (Moran *et al.* 2009), donde su unión provoca bloqueo o enlentecimiento de la inactivación del canal de tal manera que permanecerá abierto durante un período más largo y además prolonga la duración del potencial de acción en el músculo y en las neuronas (Norton, 2009; Wanke *et al.*, 2009).

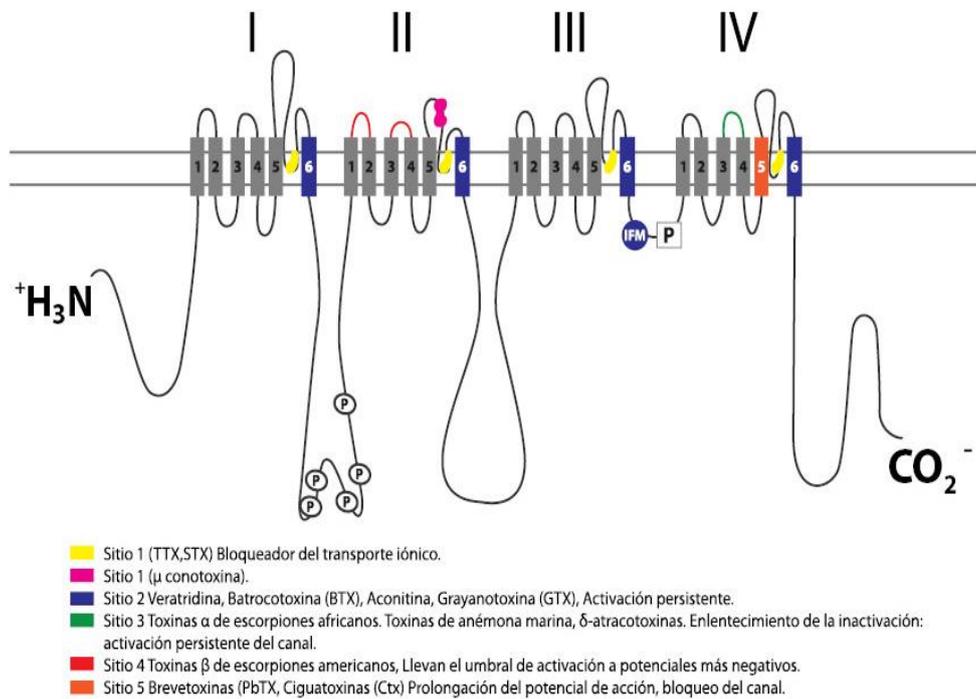


Fig. 7: Esquema que muestra la localización de diferentes sitios de unión de neurotoxinas. El punto de interés, sitio receptor 3, puede ser ocupado por varios grupos de toxinas polipeptídicas como las toxinas del escorpión, las toxinas de las anémonas y algunas de las toxinas de las arañas y avispa. Estas toxinas bloquean o inhiben el proceso de inactivación de los canales uniéndose a la asa extracelular ubicada entre los segmentos transmembranales IVS3-S4 (Salceda & Ortega, 2009).

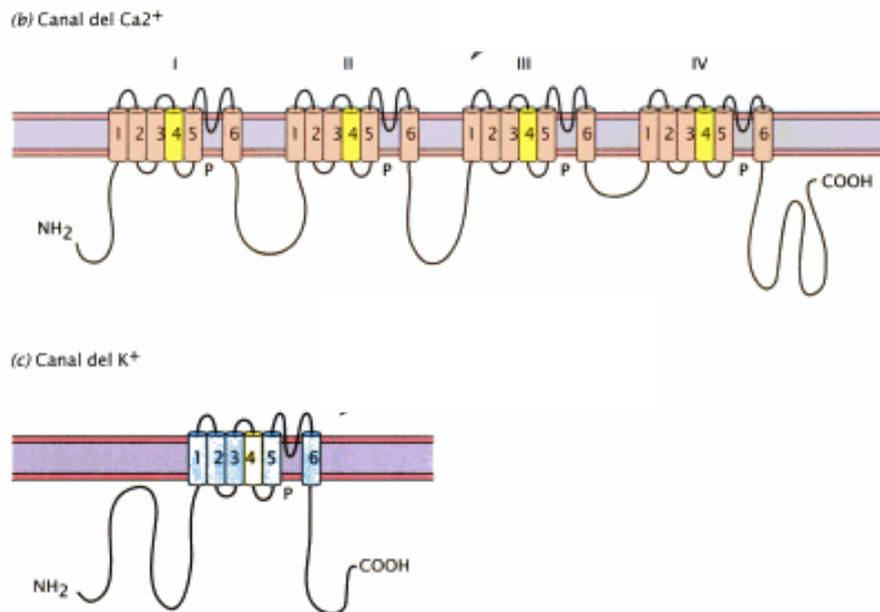


Fig. 8: Imagen de la estructura de los canales de calcio (b) y potasio (c) dependientes del voltaje (Hill & Wyse, 2006).

Los canales del Potasio se encuentran altamente expresados en la mayoría de las células del organismo pero especialmente en el cerebro, el corazón y los músculos (Birnbaum *et al.*, 2004).

Como se observa en la figura 8c la estructura del canal de K^{+} presenta similitud con uno de los dominios del sodio, conformado por cuatro subunidades α capaces de formar un canal a través de los que pasan los iones potasio, con dominios transmembranales, los cuales están conectados por una región bucle o asas extracelulares que entran y salen de la bicapa lipídica por el lado exterior de la membrana plasmática. Este bucle se llama dominio P y forma parte esencial del poro del canal (Birnbaum *et al.* 2004).

Canales activados a través de receptores sensibles a ligandos

La apertura de estos canales está relacionada con la unión del neurotransmisor a receptores específicos.

Esta unión específica provoca la apertura de canales iónicos a través de dos mecanismos generales:

1) Unión del neurotransmisor a un receptor-canal.

Algunos mensajeros extracelulares tienen la tarea de abrir o cerrar receptores tipo canal activados por sustancias químicas específicas, donde el fin es regular el movimiento de determinados iones a través de la membrana. En este caso, el receptor funciona además como canal iónico. Cuando el mensajero extracelular apropiado se une al receptor tipo canal, el canal se abre o se cierra dependiendo de la señal; como por ejemplo, cuando los receptores tipo canal de la membrana postsináptica se abren debido a la unión de un neurotransmisor (Sherwood, 2011).

2) Unión del neurotransmisor a un receptor acoplado a una proteína G.

El fenómeno se lleva a cabo cuando un primer mensajero (neurotransmisor o químico extracelular) se une a un receptor de membrana acoplado a una proteína G, provocando, por ejemplo, la activación de la enzima fosfolipasa C (proteína efectora). Esa enzima rompe al fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) obteniendo como producto dos segundos mensajeros diferentes, el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP₃). Finalmente el IP₃ provocará la apertura de canales iónicos permeables al Ca²⁺, que se encuentran en el retículo endoplasmático y liberando el calcio en el citosol (Sherwood, 2011); este aumento de Ca²⁺ citoplásmico puede generar una diversidad de respuestas entre las que se encuentra la apertura de canales iónicos en la propia membrana de la célula.

2.5 Tipos de toxinas

La estrategia más utilizada por los organismos productores de metabolitos secundarios que actúan como toxinas es bloquear o alterar la comunicación celular que se lleva a cabo principalmente en la sinapsis química (Torres, 2001), provocando que el organismo inmovilice a la presa o depredador. El blanco más común son los canales iónicos y los receptores de membrana, interfiriendo en importantes funciones fisiológicas neuronales y/o musculares.

En este trabajo se describirán dos tipos de toxinas: neurotoxinas y citolisinas

2.5.1 Neurotoxinas

Las neurotoxinas pueden ser producidas por organismos comprendidos de diferentes niveles taxonómicos, capaces de ejercer una acción tóxica actuando sobre los diferentes mecanismos y procesos fisiológicos del sistema nervioso central (SCN).

La mayoría de neurotoxinas que se encuentran en las anémonas presentan efectos sobre los canales iónicos de sodio o de potasio (Salceda & Ortega, 2009).

▪ **Neurotoxinas que afectan a los canales de sodio**

Las neurotoxinas que pueden actuar sobre los canales del Na⁺ se clasifican en tres categorías en función de los péptidos, su estructura primaria y los puentes disulfuro que presentan. Su peso molecular oscila entre 3-5 KDa (Norton, 2009).

Según Lazcano y colaboradores (2014), Frãzao y coautores (2012) y Norton (2009) la clasificación de las neurotoxinas es la siguiente:

Tipo I: son cadenas de 45-50 residuos de aminoácidos, los cuales se encuentran enlazados por tres puentes disulfuro. Este tipo de neurotoxina está presente en la familia *Actiniidae*.

Tipo II: proteínas constituidas por 45-50 residuos de aminoácidos, que al igual que el tipo I, también contienen tres puentes disulfuro en la secuencia de aminoácidos. Además tienen en común la longitud de sus cadenas, en lo único que difieren es en la secuencia de aminoácidos.

Tipo III: están formadas por cadenas de entre 27-32 aminoácidos, estabilizadas por 4 puentes disulfuro. Han sido identificadas en algunas especies, pero no son tan comunes como el tipo I y II.

Tipo IV: presentan 46 aminoácidos, representadas por la Calitoxina I y II.

▪ **Neurotoxinas que pueden afectar a los canales de potasio**

Las neurotoxinas capaces de activar los canales de K^+ presentan un peso molecular que varía entre 3.5 y 6.5 kDa (Honma & Shiomi, 2006). Según Castañeda y Harvey (2009) estas toxinas se clasifican en cuatro tipos diferentes según su estructura y la función que llevan a cabo.

Tipo I: compuesta por 35-37 residuos de aminoácidos, unidos por tres puentes disulfuro. Su acción es la de bloquear corrientes de canales con varias subunidades de K_v y también de conductancia intermedia tales como los canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} .

Tipo II: compuesta por 58-59 residuos de aminoácidos y tres puentes disulfuro. Al igual que el Tipo I pero con menor potencia, su función es bloquear el canal $K_v1.2$.

Tipo III: compuesta por cadenas de 41-42 residuos de aminoácidos y tres puentes disulfuro. Bloquean corrientes relacionadas con subunidades de los canales K_v3 y también bloquean canales ERG.

Tipo IV: Presentan 28 residuos de aminoácidos y dos puentes disulfuro; todavía no es conocida la especificidad del bloqueo del canal, pero los estudios que se realizaron con dendrotoxina mostraron que es capaz de reemplazar la unión de la dendrotoxina de las membranas sinaptosomales.

2.5.2 Citolisinas

Las citolisinas son compuestos activos que provocan la formación de poros en las membranas celulares, promoviendo la disolución o degeneración de las células. Muchas son las especies de anémonas capaces de producir péptidos citolíticos. Las citolisinas son importantes ya que sirven como modelo para estudiar la

interacción proteína-membrana lipídica (Anderluh & Maček, 2002). Además también se realizan importantes estudios dirigidos a la erradicación de las células tumorales y parásitos (Tejuca *et al.*, 2009); pueden funcionar como cardio estimulantes, y tener propiedades antihistamínicas (Frazão *et al.*, 2012; Klyshko *et al.*, 2004), entre otras.

Basándose en su estructura primaria y las propiedades funcionales las citolisinas se clasifican en cuatro grupos polipeptídicos:

Tipo I: tienen un peso molecular que va de 5-8 kDa, y que forman poros en las membranas que contienen fosfatidilcolina (Anderluh & Maček, 2002). Estudios que se realizaron con la especie de anémona *T. felina* y *R. macrodactylus* mostraron que tenían actividad antihistamínica (Frazão *et al.*, 2012).

Tipo II: son el grupo de citolisinas más estudiado producido por las anémonas y tienen un peso molecular de 20 kDa (Anderluh & Maček, 2002). También son llamadas Actinoporinas, debido a la capacidad que tienen de unirse a los dominios fosfolipídicos de la membrana del organismo hospedador, oligomerizando y formando poros catiónicos selectivos (Frazão *et al.*, 2012). En común con muchas toxinas que forman poros, las actinoporinas son muy solubles en agua, proteínas estables pero sin embargo su actividad es conocida por la formación de poros en las membranas oligoméricas, que consta de tres o cuatro monómeros. Los poros resultantes son permeables a las moléculas pequeñas y a solutos, lo cual provoca un desequilibrio osmótico donde al final tendrá a cabo la lisis celular (Anderluh & Maček, 2002).

Tipo III: estas toxinas presentan un peso molecular entre 30-40 kDa y están formadas por citolisinas con o sin actividad de PLA₂; es un tipo de citolisina que aparece en muy pocas especies de anémonas, como por ejemplo en *Aptasia pallida* y en el género *Urticina*. (Frazão *et al.*, 2012).

Tipo IV: son citolisinas activadas por tiol, con un peso molecular de 80 kDa. Hasta ahora el único representante de este grupo de toxinas está presente en la

especie *Metridium senile* la cual es capaz de producir metriodiolisina (Frazão, 2012).

2.6 *Bartholomea annulata*

Bartholomea annulata (Fig. 9) es típicamente encontrada en el Mar Caribe, en el Golfo de México y en el Océano Atlántico Oeste. Se distribuye desde la costa Este de Texas hasta el Atlántico de Florida, siendo Bermudas el punto más septentrional de su área de distribución. La especie también se extiende hacia el Sur hasta la costa Norte de América del Sur (Zeiller, 1974).

Esta anémona se encuentra a menudo bajo salientes pero es más común encontrarla como habitante de la arena entre poblaciones de algas *Halimeda sp.* Por lo general, están unidas a los agujeros y grietas presentes en los arrecifes de coral, zonas rocosas u otros sustratos sólidos (Jennison, 1981; Zeiller, 1974). Están distribuidas a diferentes rangos de profundidades, desde 1 m hasta 40 m.

Puede medir más de 51 mm de alto. Presenta un disco pedal, situado en la parte inferior de la anémona con la función de unirse al sustrato, bien desarrollado, de contorno irregular, más amplio que la columna, de color café claro o crema, semitransparente. Tiene un margen tentaculado, con tentáculos largos, delgados, dispuestos en cuatro, cinco o seis ciclos, dependiendo del grado de desarrollo del organismo, de color café oscuro semitransparente, con bandas espirales en forma de anillos incompleto. Esta gran cantidad de tentáculos pueden crecer hasta 12.5 cm. Su disco oral es pequeño, liso y plano de color café más claro que los tentáculos, con pequeñas manchas en forma de puntos color blanco, amarillento o verde blanco y pueden tener manchas triangulares sobre los tentáculos del primer ciclo. Son cuatro los tipos de cnidocistos que contiene, basitricos, microbásicos p-mastigóforos, microbásicos amastigóforos y espirocistos (González-Muñoz, 2009).

Tabla 1: Clasificación taxonómica de la anémona *Bartholomea annulata*. Clasificación obtenida de: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Bartholomea_annulata/

Reino	Animalia
Phylum	Cnidaria
Clase	Anthozoa
Subclase	Hexacorallia
Orden	Actinaria
Familia	Aiptasiidae
Género	<i>Bartholomea</i>
Especie	<i>Bartholomea annulata</i>

Esta especie posee una simbiosis mutualista con el camarón chasqueador *Alpheus armatus* Rathbun 1901, el cual beneficia a la anémona evitando su depredación por el poliqueto gusano de fuego. El camarón obtiene protección y camuflaje, además se alimenta de detritos y limpia permanentemente el refugio, lo que permite a la anémona extender sus tentáculos y retraerse completamente cuando es perturbada (González-Muñoz, 2009).



Fig. 9: Imagen de *Bartholomea annulata* en simbiosis con un camarón chasqueador. Imagen obtenida de: http://fgmeeresbiologie.de/meeresbiologie_uebung/html/slides%20clips/sl_aktinien_bio.html

2.7 Estudios relacionados

En el año 2002 Santamaría y colaboradores publicaron un artículo donde el objetivo del trabajo fue aportar información sobre mecanismos como la respuesta hemolítica y la peroxidación lipídica en eritrocitos de ratón provocados por los venenos de *Bartholomea annulata*. También se investigó sobre la posible correlación entre el daño oxidativo de los radicales libres y las respuestas hemolíticas mediante pruebas de acción con dos antioxidantes generales, GSH (glutatión reducido) y DFA (desferroxiamina) (Santamaría *et al.*, 2002). En este trabajo demostraron que el extracto crudo de la anémona es capaz de provocar hemólisis en los eritrocitos de ratón, además de mostrar que el efecto es dependiente de la concentración, es decir la hemólisis aumenta a medida que aumenta la concentración del extracto crudo, siendo significativas las concentraciones de proteínas 0.150 mg/ml y 0.224 mg/ml. También se comprobó que al incubar los eritrocitos con extracto crudo y GSH en un tubo y DFA en otro tubo estos compuestos eran capaces de atenuar la respuesta hemolítica reduciendo su actividad.

Finalmente se comprobó que la peroxidación lipídica, al igual que en la actividad hemolítica, depende de la concentración donde fue significativa la misma concentración que lo fue para la hemólisis, 0.150 mg/ml y 0.224 mg/ml respectivamente, sugiriendo que la acción peroxidativa puede contribuir al efecto hemolítico.

Por tanto, estos autores discuten que el extracto crudo de *B. annulata* es efectivo para provocar efectos tóxicos en los eritrocitos de rata tanto en hemólisis como en peroxidación lipídica.

Años más tarde, concretamente en el 2006, Sánchez-Rodríguez y colaboradores publicaron un artículo, donde se investigaron los parámetros de extracto crudo y veneno parcialmente purificado de *Bartholomea annulata* en diferentes modelos experimentales (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006 b). Corroboraron la identificación de los nematocistos realizada anteriormente por Calgren (1949), además de

afirmar que la solución más eficiente utilizada para la descarga de nematocistos fue el agua destilada al igual que lo que observó Hymen (1940).

También hicieron ensayos con ratones y cangrejos donde sugirieron la posible presencia de neuropéptidos y compuestos cardiotóxicos. Cuando las ratas fueron sometidas a una determinada dosis de extracto crudo mostraron síntomas de arritmias cardíacas y por otro lado los cangrejos mostraron síntomas de parálisis. Además se estandarizó un método de separación con cromatografía líquida de baja y alta presión.

Por último, en el año 2007 Morales-Landa y colaboradores llevaron a cabo una investigación a partir de seis especies de cnidarios diferentes del Mar Caribe siendo una de ellas la especie de estudio, donde el objetivo del artículo fue evaluar a partir de estas distintas especies las actividades tanto antiprotozoarias, antimicrobianas y tóxicas mediante diferentes bioensayos (Morales-Landa *et al.*, 2007).

Uno de los objetivos de este trabajo es llevar a cabo ensayos electrofisiológicos para comprobar la posible presencia de neurotoxinas en el extracto de *B. annulata*. Hasta ahora no hay ningún artículo publicado en relación a estudios electrofisiológicos de esta especie de anémona; pero sí se han realizado otros estudios relacionados con las respuestas electrofisiológicas de las toxinas de algunos cnidarios u otros productos naturales extraídos de organismos marinos. En 2001 Torres y colaboradores reportaron tres diferentes respuestas provocadas al suministrar el veneno de *Cassiopea xamachana* en los ovocitos de rana y la presencia de tres canales nativos catiónicos presentes en la membrana de los ovocitos (Torres *et al.*, 2001).

Además se han reportado otros estudios de generación de corrientes provocada por los venenos de medusas en diferentes modelos de células, como las causas de despolarización en los músculos de rana provocados por el veneno de *Aurelia* sp. (Kihara *et al.*, 1988; Torres *et al.*, 2001), y la apertura de los canales catiónicos en las fibras nerviosas de las ranas debido a la acción tóxica del veneno de *Chrysaora* sp. (Dubois *et al.*, 1983; Torres *et al.*, 2001).

En el 2014 Lazcano-Pérez y colaboradores aislaron del zoantideo *Palythoa caribaeorum* una neurotoxina de bajo peso molecular, donde reportaron que la toxina fue capaz de inactivar los canales de sodio que se encontraban en el ganglio cervical superior (Lazcano-Pérez *et al.*, 2014).

La finalidad de estos estudios es poder abrir un camino a nuevos posibles medicamentos, actualmente hay dos fármacos importantes aislados obtenidos de productos naturales marinos. Uno es el Prialt® (Ziconotide), aprobado en el 2004 en Estados Unidos, obtenido de un péptido (ω -conotoxin MVIIA) aislado de una especie de caracol tropical llamado *Conus magus*. Es usado para enfermos de cáncer terminal, ya que es un inhibidor de dolor, donde su función es bloquear los canales dependientes de voltaje de calcio. Estos canales se encuentran exclusivamente en neuronas presinápticas donde regulan la despolarización inducida por el flujo de los iones calcio y tienen un importante rol en las señales de dolor (Molinski *et al.*, 2009).

Tres años más tarde, en 2007, la Unión Europea aprobó un compuesto antitumoral (Yondelis®/ecteinascidin-743/ET-743) aislado de una ascidea usado para tratamientos de sarcoma de tejidos blandos (Molinski *et al.*, 2009)

3 Hipótesis

Las neurotoxinas aisladas de la anémona *Bartholomea annulata* producen cambios en los potenciales de acción de los ovocitos de *Xenopus laevis*.

4 Justificación

La existencia de enfermedades para las cuales aún no se han encontrado medicamentos efectivos, la resistencia de algunos agentes patógenos e incluso la relación entre la identificación de nuevas moléculas “blanco” y las anomalías estructurales y funcionales a nivel de receptores y canales iónicos con diferentes patologías han provocado que en los últimos años haya incrementado el interés de la producción de nuevos medicamentos y de las estructuras moleculares con un fin terapéutico (Garateix, 2005).

Para asegurar el éxito en la búsqueda de nuevos fármacos es importante encontrar un número elevado de compuestos que posean una gran diversidad estructural que aumente las posibilidades de encontrar actividad sobre los blancos moleculares. Estas características podrían encontrarse en los productos naturales, debido a que, poseen una gran multiplicidad estructural y además, muchos son relativamente pequeños y tienen propiedades similares a los de los fármacos, es decir, pueden ser absorbidos y metabolizados (Garateix, 2005).

La mayoría de los estudios en relación con productos naturales han sido hechos en su mayoría con plantas terrestres y microorganismos, a pesar de que la flora y fauna marina excede la terrestre y que la existencia de sustancias naturales marinas con actividades útiles para el hombre se conoce desde la antigüedad; la farmacología es una ciencia nueva (Garateix, 2005).

En el caso en particular de *Bartholomea annulata* hay muy pocos estudios sobre las respuestas bioactivas que presenta el veneno de esta anémona (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006 b).

Los bioensayos realizados con ratones, cangrejos, peces, etc., permiten dar una idea de la actividad de los compuestos y caracterizar la potencia del veneno, dando a comprender qué tipo de toxinas son y como están afectando al sistema fisiológico de los animales a los que se han sometido a estas pruebas. Si se llevan a cabo bioensayos más selectivos como son ensayos electrofisiológicos se podrá obtener más información y obtener una mayor precisión en la detección de las sustancias activas que se pueden encontrar en *Bartholomea annulata*.

Además el aislamiento de las neurotoxinas de las anémonas tiene un gran interés de investigación desde el punto de vista biomédico, debido a su alta especificidad con los canales iónicos y no solo en crustáceos sino que también con otras especies (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2006 b). Ya que, se ha demostrado que su acción específica puede modificar las acciones de transmisión neuromuscular afectando a la función de los canales de sodio (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006 b).

Por todo lo anterior, es importante profundizar los estudios de las toxinas de esta especie para poder entender de una mejor manera su funcionamiento y por lo tanto como se podrían usar como herramientas para un posible uso farmacológico.

5 Objetivos

Objetivo general

- Aislar, pre-purificar y caracterizar la actividad biológica del extracto presente en la anémona *Bartholomea annulata*, que habita en la Laguna arrecifal de Puerto Morelos.

Objetivos específicos

- Aislar las toxinas que se encuentran presentes en la anémona *Bartholomea annulata*.
- Purificar de forma parcial los compuestos activos empleando técnicas de filtración con membranas de corte y cromatográficas.
- Evaluar la actividad biológica del extracto crudo y fracciones pre-purificadas en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*.
- Evaluar la actividad citolítica del extracto crudo y fracciones pre-purificadas en eritrocitos de humano y en fosfolipasas.
- Caracterizar los posibles efectos de las neurotoxinas presentes en el extracto crudo y fracciones pre-purificados mediante ensayos electrofisiológicos, usando el modelo de ovocitos de la especie *Xenopus laevis*.

6 Área de estudio

La Laguna Arrecifal de Puerto Morelos está ubicada en el área norte de la costa de Quintana Roo (Mar Caribe mexicano). La laguna se extiende desde la línea de costa hasta un arrecife coralino que corre ligeramente en diagonal a una distancia de ~ 500 a 2000 m de la costa. La profundidad en la laguna arrecifal es de ~ 1 a 4 m. El sistema arrecifal coralino de Puerto Morelos fue declarado área marina protegida en 1998, según el programa de manejo del Parque Nacional Arrecifal de Puerto Morelos del Instituto Nacional de Ecología. El fondo de la Laguna Arrecifal está compuesto principalmente por arena calcárea estabilizada por amplias praderas de pastos marinos, aunque en algunas partes aflora el pavimento calcáreo (Fig. 10).

La temperatura del agua es típicamente más alta en julio-septiembre (29.4-29.5 °C), y más baja durante enero-marzo (25.1-25.8 °C) (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

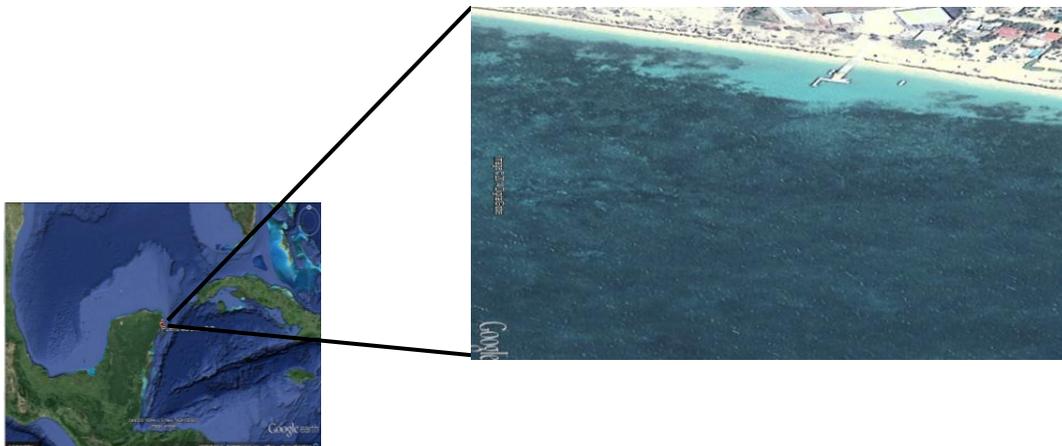


Fig. 10: Imagen de Google Earth de la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos.

7 Materiales y Métodos

7.1 Muestreo de *Bartholomea annulata*

Las anémonas fueron muestreadas mediante buceo libre en la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, en el estado de Quintana Roo. Los organismos que se extrajeron fueron los que se encontraban sobre conchas y rocas, mediante el uso de un martillo y cincel teniendo el máximo cuidado para no dañar y estresar a la anémona. Una vez colectadas, fueron transportadas a la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales en bolsas “Ziploc” conteniendo agua de mar y se colocaron en un estanque para ser aclimatadas hasta el momento de ser usadas.

7.2 Identificación de cnidocistos

Para la identificación de cnidocistos, se preparó una muestra en un porta objetos y se observó al microscopio óptico Labomed CxL. Para su identificación se usó la guía de Mariscal (1974).

7.3 Descarga de nematocistos

El fin de la descarga de los nematocistos, es la obtención de las sustancias activas y así obtener el extracto crudo. Para provocar y optimizar la descarga se usaron tres métodos consecutivos, el primero fue el método modificado de Kem *et al.*, (1989), el cual consistió en introducir la muestra de anémonas dentro de un vaso de precipitado con 200 ml de agua miliQ, agitando la muestra manualmente con una espátula por un período de 20 minutos aproximadamente. Posteriormente se removieron las anémonas, se separó el líquido del material sólido; este último se conservó durante 30 minutos en el ultracongelador REVCO a una temperatura de -60°C y la parte líquida se guardó en refrigeración a 4°C. Pasados 30 minutos aproximadamente se extrajo la muestra sólida del REVCO, se introdujo en el líquido y se hizo el mismo procedimiento de agitación y congelamiento en varias ocasiones, con el fin de descargar los nematocistos. Para ir revisando que los

nematocistos se estaban disparando, se observó una pequeña alícuota al microscopio Labomed CxL.

El segundo método de descarga fue mediante el maceramiento de las mismas anémonas usadas en el primer método. Para ello se utilizó un homogenizador de cristal Pyrex Brand Tenbroeck de 15 ml, donde se introdujo la muestra con agua desionizada y se maceró hasta que los nematocistos estaban descargados entre el 85-95%.

El tercer y último método que se utilizó fue sonicar la muestra de anémonas con la muestra usada para los dos métodos anteriores de descarga por un período de tiempo de 30 minutos.

Una vez aplicados los diversos métodos de descarga, se conservó la parte sólida de la muestra en un tubo falcon y la parte líquida fue centrifugada para separar el precipitado del sobrenadante, donde en este último consideramos que estaban los nematocistos descargados. La centrifugación se realizó a una temperatura de 4°C a 3,200 g, durante 10 minutos. Posteriormente se congelaron por separado el sobrenadante del precipitado y se liofilizó el sobrenadante. La liofilizadora que se usó fue de la marca Labconco® modelo freezone® 4.5. La liofilización consiste en un proceso de eliminación del agua mediante sublimación, se lleva a cabo en una cámara de vacío y así se obtiene el extracto crudo aislado de las anémonas.

7.4 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el método Bradford, (1976), utilizando el kit de Quick Start™ Bradford. El método de determinación de proteínas consiste en utilizar un colorante hidrofóbico, en este caso se usó el tinte de proteínas llamado Coomassie Brilliant Blue G-250, que en presencia de proteínas se une a ellas confiriéndoles color azul, de esa forma y mediante un espectrofotómetro las muestras se leyeron a una longitud de onda de 595 nm.

Se realizó primero una curva patrón con un estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA) con la finalidad de así obtener las concentraciones de proteínas de las muestras ya liofilizadas, a partir de la recta de regresión. La preparación para la medición de los estándares se basó en pipetear 20 μ l de las diferentes concentraciones de BSA (0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1.00 mg/ml) y añadirle 1 ml del reactivo de Bradford a cada tubo. El ensayo se realizó por triplicado. Después se procedió a la medición de la absorción de las diferentes concentraciones de los estándares al espectrofotómetro Turner SP-830 a 595 nm y así se obtuvo una curva patrón de absorbancia frente a concentración.

En cuanto a la cuantificación de proteínas de las muestras obtenidas, lo que se hizo fue preparar una cierta concentración a partir de muestra liofilizada con agua miliQ y hacer varias diluciones, se agregó 1 ml del reactivo de Bradford y se leyeron las muestras al espectrofotómetro. La concentración de proteínas se calculó a partir de la curva realizada con BSA.

7.5 Ensayos de actividad

Evaluación de toxicidad (actividad neurotóxica)

Este método sirve para poder comprobar que las proteínas aisladas de la anémona presentan una posible actividad neurotóxica. Para ello, se hicieron diluciones de la muestra del extracto crudo y se inyectaron entre 50 μ l y 100 μ l en la base del tercer pereiópodo del cangrejo de la especie *Ocypode quadrata*. Se observó el comportamiento que presentó cada uno de los cangrejos inyectados. Finalmente se llevó a cabo la disección para observar los daños provocados por el extracto en los órganos vitales del organismo.

Los cangrejos fueron recolectados en la zona de la playa que se está cercana a la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales de Puerto Morelos.

Actividad de fosfolipasa

El ensayo de actividad de fosfolipasa tiene la finalidad de comprobar si las sustancias activas de *Bartholomea annulata* tienen un efecto citolítico (enzimático). Los geles que se usaron para estos ensayos se prepararon según el método de Habermann & Hardt, (1972), con algunas modificaciones. Se prepararon tres soluciones: para la solución A, se preparó usando 12 ml de yema de huevo fresco en 36 ml de NaCl al 0.86%, para B, se disolvió agarosa a una concentración de 6 mg/ml con una solución de Tris-HCl al 50mM a pH de 7.95 y para C, se disolvió 1.47 g CaCl₂ en un ml de agua desionizada. Después, las soluciones se combinaron en volúmenes de 50:0.5:0.5 ml de B:A:C, respectivamente. La mezcla se repartió en cajas de Petri usando aproximadamente 15 ml en cada caja. Se dejaron reposar 3 horas, hasta que gelificaron. Posteriormente se dividió la caja en diferentes secciones en función del número de muestras a probar contando siempre con los controles negativo y positivo. Se realizaron pozos en el gel de aproximadamente 5.0 mm de diámetro en los cuales se les agregaron las muestras a probar. Como control negativo se usó agua miliQ y como positivo veneno de abeja. En los pozos se colocaron 20 µl de agua miliQ, veneno de abeja o muestra de extracto, y se monitoreó la actividad de las fosfolipasas como un crecimiento de los halos que se forman alrededor de los pozos. Se obtuvieron imágenes de las cajas a las 3, 6, 12, 24 y 48 horas de actividad. Después, las imágenes se analizaron con el programa Image J, con el cual se midieron el diámetro del pozo y el halo de actividad. Se calculó el índice Pz (Price *et al.*, 1982), que es la relación del diámetro del pozo entre el diámetro del halo, es decir, cuando menor es el valor de Pz mayor es la actividad de las fosfolipasas. Además para que el ensayo fuera significativo se hizo por triplicado.

Ensayo hemolítico

El ensayo de hemólisis se hizo en base al método modificado de Rottini *et al.*, (1990) usando eritrocitos de donante humano sano.

Se extrajeron 2 ml de sangre y se diluyeron con 30 ml de solución fisiológica de Alserve (preparación para 500 ml de solución: 450 ml de agua desionizada, 10.5 g de dextrosa anhidra, 4 g de Citrato de Sodio 2H₂O, 2.1 g de NaCl y 0.2 g de Ácido cítrico anhidro; finalmente se ajustó la solución a pH 7.4). La sangre diluida se homogenizó cuidadosamente y se centrifugó durante cinco minutos a 4°C a 2465 g, donde se eliminó el sobrenadante, ya que es donde se encuentra el plasma y la grasa, nuestro interés se centra solamente el paquete de células rojas. Finalmente los eritrocitos fueron resuspendidos al 1% con solución Alserver y se conservaron a 4 °C.

Una vez que se obtuvieron los eritrocitos al 1% se procedió a hacer una calibración.

La calibración de los eritrocitos se hizo estandarizando la solución a dos valores que se consideraron controles.

El primer control se obtuvo pipeteando 50 µl de la suspensión de eritrocitos al 1% en solución Alserver y 950 µl de solución fisiológica Alserver. Se incubó a 37 °C durante 30 min y se centrifugó durante 5 min a 3,200 g en una centrifuga Eppendorf® Centrifuge 5810 R y finalmente se hizo la lectura a una longitud de onda de 415 nm obteniendo una absorbancia próxima a 0, considerando así que este control negativo correspondía al 0% de hemólisis.

El segundo control se obtuvo pipeteando 50 µl de eritrocitos al 1% en la solución fisiológica y 950 µl de agua desionizada, al igual que el control negativo se incubó durante 30 min a 37 °C y se centrifugó durante 5 min a 3,200 g en una centrifuga eppendorf® Centrifuge 5810 R. Este se consideró el 100% de hemólisis debido a que, la lectura a una longitud de onda de 415 nm fue 1 o próxima a este valor.

Para proceder a realizar el bioensayo con las muestras de *B. annulata*, se pipetearon 50 µl de muestra a una determinada concentración y se le agregaron 50 µl de eritrocitos calibrados al 1% y 900 µl de solución Alserve. Una vez realizado el procedimiento se incubaron las muestras a diferentes

concentraciones durante 30 min a 37 °C y se centrifugaron a 3,200 g durante 5 min. Por último se leyeron las muestras a una longitud de onda de 415 nm y se compararon con los controles para estimar el porcentaje de hemólisis que produjo el veneno de la anémona.

7.6 Electroforesis

Análisis de los pesos moleculares de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS PAGE).

El propósito de hacer el análisis mediante electroforesis es obtener los pesos moleculares aproximados de las proteínas que se encuentran presentes en el extracto crudo en las fracciones semipurificadas o filtradas de de la anémona *B. annulata*.

El gel de separación de acrilamida al 12% se preparó según el método Laemmli (1970), se mezclaron 3.35 ml de agua miliQ, 2.5 ml de Tris-HCl 1.5M a un pH 8.8, 100 µl de SDS al 10% y 4 ml de acrilamida/bisacrilamida (29:1, BioRad). Para que ocurra la polimerización del gel se necesita añadir un volumen de 50 µl de persulfato de amonio (APS) al 10% y 5 µl de TEMED. La función de este gel es la separación de las macromoléculas en función de su tamaño.

Preparado el gel de separación, se llevó a cabo el gel de carga al 4% de acrilamida. Se mezclaron 6.1 ml de agua miliQ con 2.5 ml de Tris-HCl 0.5M a pH 6.8, además se le añadieron 100 µl de SDS al 10% y 1.33 ml de acrilamida/bisacrilamida (29:1, BioRad). Para que sucediera la polimerización del gel se añadieron 50 µl persulfato de amonio al 10% y 10 µl de TEMED.

La muestra de extracto crudo o de las fracciones antes de ser cargadas en los geles, se desnaturalizaron en buffer de carga (Laemmli, 1970) 5X, en una dilución 4:1 a 95°C por 4 min. Por otro lado, se usaron dos marcadores de pesos moleculares, Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope (Bio-Rad) y Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad) los cuales se utilizaron para comparar los pesos moleculares de las muestras analizadas. Las muestras y

el estándar se cargaron en los pozos de gel y se corrieron en una cámara electroforética con un amortiguador de corrimiento al 1X a 200 V. Las corridas se detuvieron antes de que el colorante indicador del frente de proteínas se saliera de la matriz del gel.

Terminado el tiempo necesario para realizar la electroforesis, se hizo una tinción del gel con azul de Coomassie al 1% en una solución fijadora de metanol al 40% y 10% de ácido acético diluido en agua miliQ. En esta solución se dejó teñir el gel durante 12 horas mediante agitación de forma constante. Finalmente y pasado el tiempo se destiñó con una solución de metanol: ac. acético: agua e proporciones 40: 10: 50 respectivamente.

Análisis de proteínas mediante electroforesis en gel Tris-Tricina (SDS-PAGE) (Schägger, 2006).

Esta metodología es comúnmente usada para la resolución de proteínas y péptidos de bajos pesos moleculares. Las proteínas se analizaron en geles al 16% de acrilamida en la zona de separación y 4% de acrilamida en la zona de apilamiento.

Para el gel 16% de acrilamida se mezclaron, 1.96 ml la solución buffer acrilamida/bisacrilamida (AB-6, 49.5% T, 6%C, donde T es el porcentaje total de acrilamida más bisacrilamida y C es el porcentaje de la concentración de bisacrilamida en relación a la concentración total), 4 ml de buffer gel 3X (3M Tris, 1M HCl, 0.3% SDS, pH 8.45), 4.32 g Urea, 1.2 ml Glicerol, 120 µl de 10% APS y 8 µl Temed; para el 10 % acrilamida se mezclaron, 0.8 ml de AB-6, 1.32 ml de Buffer gel 3X, 40 µl de 10% APS, 2 µl de Temed y 1.85 ml de agua desionizada; para el gel de aplilamiento 4% acrilamida se mezclaron, 14.5 ml de AB-6, 1ml de Buffer gel, 40 µl de APS, 4 µl de Temed y 2.636 ml de Agua destilada. En los casos de 16 y 14% acrilamida, las mezclas se preenfiraron antes de agregar el Temed.

Los geles se corrieron en Buffer Cátodo (0.1 M Tris, 0.1M Tricina, 0.1% SDS, pH ~8.25) del lado del electrodo negativo y Buffer Ánodo (0.1M Tris-HCl, pH 8.9) del

lado de electrodo positivo y a una corriente continua de 20 mA durante toda la separación y a temperatura ambiente

Las proteínas que se cargaron en el gel fueron desnaturalizadas a una temperatura de 95°C durante 5 min y teñidas con el amortiguador de Laemmli al 4X. Se usó como estándar para definir los pesos moleculares, Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio Rad).

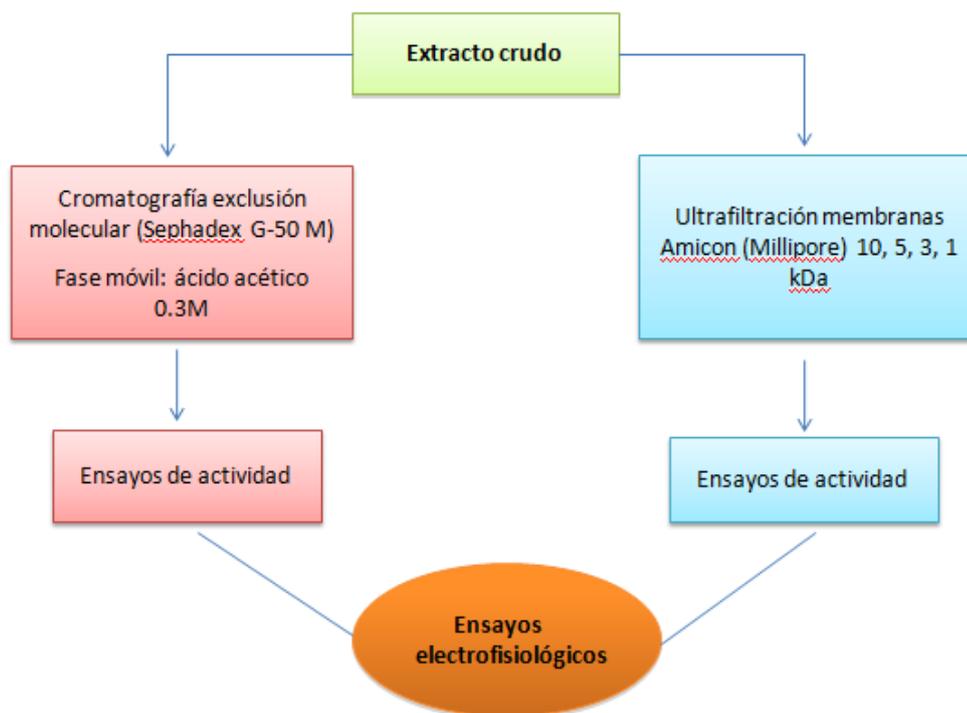
Una vez finalizada la electroforesis el gel se enjuagó con agua miliQ para limpiar las impurezas y detergentes durante 10 min y se le añadió azul de Coomassie por lo menos 6 horas y finalmente se destiñó con una solución de metanol:ac. acético:agua, con proporciones de 40:10:50 respectivamente.

7.7 Estrategia de separación

En el diagrama de flujo (1) se muestran las dos estrategias de separación que se llevaron a cabo, con el fin de perfeccionar las técnicas de pre-purificación.

En la primera estrategia se hizo una separación mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-50 M, una vez obtenidas las fracciones se hicieron varios ensayos para probar la actividad biológica con cangrejos, actividad de fosfolipasas, hemolítica, electrofisiológica en ovocitos de *Xenopus laevis* y electroforesis.

En la otra estrategia con el fin de mejorar la separación anterior, se hizo una pre-purificación con membranas Amicon usando membranas de 10, 5, 3 y 1 kDa. Con las diferentes fracciones obtenidas se realizaron ensayos de actividad citolítica, bioactividad con cangrejos, actividad hemolítica, ensayos electrofisiológicos y electroforesis.



1- Diagrama de flujo, donde se resumen las diferentes estrategias de separación que se llevaron a cabo para obtener extracto semipurificado.

Aislamiento de toxinas mediante cromatografía líquida de baja presión (Sephadex G-50 M).

La cromatografía líquida de baja presión separa las proteínas por exclusión molecular a través de una matriz de gel de filtración (Sephadex G-50 M) por el arrastre de una fase líquida. A medida que van pasando las proteínas por la matriz, las moléculas pequeñas son arrastradas a una velocidad menor que las de mayor tamaño, por lo que su tiempo de residencia en la matriz es mayor.

Para llevar a cabo la separación, lo primero que se hizo fue diluir una cantidad determinada de extracto crudo diluido en agua miliQ. Posteriormente, se centrifugó a 3,200 g a 4°C durante 10 minutos, para asegurar que no hay restos de material que pudieran bloquear la superficie de la columna y la separación.

Seguidamente se cargó la columna con la muestra, usando como eluyente ácido acético 0.3M (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006 b); así se obtuvo la primera separación de compuestos en función de su peso molecular, donde se separaron por fracciones. Una vez obtenidas las fracciones, se rotaevaporaron al vacío con

la finalidad de concentrar las fracciones obtenidas, se congelaron y se liofilizaron. Después de ser liofilizadas se pesaron y se realizaron los diferentes bioensayos correspondientes para comprobar en cuál de las fracciones había presencia de actividad biológica.

Ultrafiltración

Se emplearon dos métodos de ultrafiltración.

En el primer método, se filtró la muestra de extracto crudo solubilizado en agua miliQ, con un filtro de 1.5 μm y seguidamente de 1 μm , para así eliminar las impurezas que podrían saturar las membranas de corte.

La parte de muestra pre-filtrada se ultrafiltró en una serie de membranas Amicon (Millipore) de cortes de 10, 5, 3 y 1 kDa. Las membranas se montaron en la célula con agitación Amicon y después se cargó la muestra. A la cámara se le aplicó una presión de 3.5 psi con nitrógeno gaseoso. Obtenidas las diferentes muestras a diferentes cortes de membrana, se liofilizaron y se hicieron las evaluaciones biológicas correspondientes.

7.8 Ensayos electrofisiológicos mediante la técnica de control de voltaje.

Obtención de folículos

Los folículos se obtuvieron de ranas de la especie *Xenopus laevis*. Para ello se anestesiaron las ranas por hipotermia, manteniéndolas en hielo durante 30 min aproximadamente y posteriormente fueron sometidas a cirugía con el fin de disectar de 2 a 3 lóbulos ováricos. Se realizó una incisión abdominal de 0.5 cm aproximadamente, tanto en dermis como en músculo para obtener acceso a la cavidad abdominal y el ovario.

Los folículos extraídos se conservaron en una caja de Petri con solución Barth's Normal a pH 7.4 (NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO_3 2.4 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.33 mM, CaCl_2 0.4 mM, MgSO_4 0.82 mM, HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-

piperazinetanosulfónico) 5 mM y gentamicina 70 µg/ml) en la incubadora a 17.2 °C.

Por último la rana fue suturada y colocada en un estanque donde su recuperación fue supervisada durante tres semanas.

Tratamiento de los folículos

El primer paso fue separar los folículos de los lóbulos ováricos mediante pinzas y la observación en microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi 1000). Una vez separados se clasificaron los folículos en buen estado en el estadio V y VI según la clasificación de Dumont (1972) y finalmente se hicieron varios lavados con la solución de Barth's a pH 7.4.

Se dejaron reposar durante 24 horas en la incubadora a una temperatura de 18 °C aproximadamente.

Pasadas las 24 horas, se volvieron a clasificar los folículos en buen estado y se microinyectaron con 50 nl de ARNm purificado y extraído de ARN total de cerebro de rata (Chomczynski & Sacchi, 1987); utilizando una micropipeta Drummond a una concentración de 1 µg/µl. Se volvieron a dejar en la solución de Barth's pH 7.4 durante otras 24 horas incubándolos a 17.2°C.

El siguiente proceso fue su tratamiento con colagenasa a una concentración de 0.5 mg/ml diluida en Ringer Normal en un tiempo de incubación de 30 min, con el fin de remover las capas externas del folículo (epitelio superficial, teca, membrana basal, monocapa de células foliculares) y obtener el ovocito desnudo, para ello se usaron pinzas y un microscopio estereoscópico. Finalmente los ovocitos se dejaron reposar durante 2 días más para que se pudiera ver una buena expresión de los canales.

Técnica de control voltaje

Las respuestas eléctricas de los ovocitos fueron registradas utilizando la técnica de control de voltaje mediante la utilización de dos electrodos. Esta es una técnica que se utiliza para el estudio de las corrientes que fluyen a través de los

canales iónicos que presentan tanto los ovocitos control como los microinyectados con el ARNm del cerebro. Lo que se hace con esta técnica es controlar a un valor predeterminado el voltaje de la célula bajo estudio, de tal forma que sea posible medir la corriente transmembranal que fluye a este potencial. Con el voltaje transmembranal de la célula bajo control, la corriente que fluye a través de la membrana es proporcional a su conductancia y ésta se encuentra determinada por la apertura y cierre de canales iónicos.

El sistema que usamos consiste de dos microelectrodos intracelulares. Uno de ellos registra el voltaje (V') y otro inyecta corriente (I') a la célula. Debido a que el orden de magnitud de los voltajes registrados es pequeño, el electrodo de voltaje se conecta a un amplificador. La señal se compara con un voltaje comando o también llamado de mantenimiento (V) que es el valor del voltaje al que se desea controlar la membrana, la diferencia entre ellos es compensada por una inyección de corriente, a través del electrodo I' cuya magnitud es determinada a través de un circuito de retroalimentación negativo (FBA). En el baño se encuentra un tercer electrodo que mide a través de un amperímetro la corriente (I) que cruza la membrana de la célula.

Los electrodos intracelulares V' e I' utilizados fueron elaborados con capilares de vidrio de borosilicato con un diámetro interno y externo de 1.2 y 2 mm respectivamente (WPI, FI, EUA). Los electrodos fueron llenados con solución 3M KCl y se procuraba obtener una resistencia de 1-2 M Ω .

El amplificador de control de voltaje que se utilizó fue el GeneClamp 500B (Axon Instruments., CA, EUA). La señal de corriente transmembranal fue registrada y guardada de forma digitalizada utilizando el convertidor A/D Digidata 1200A. El programa que se usó para el registro de datos fue el pClamp 9.

El registro de los ovocitos tuvo lugar entre 24 y 48 horas después de ser desfoliculados con tratamiento de colagenasa.

Las respuestas electrofisiológicas se registraron mediante dos protocolos diferentes. Uno de voltaje continuo a -60 mV, para observar los cambios de corrientes que se producían cuando se suministraban las toxinas a los ovocitos. Se usó un potencial de -60 mV, debido a que es un potencial alejado del

potencial de equilibrio de sodio, potasio, calcio y cloro, por tanto nos permitió distinguir mejor las corrientes. El otro protocolo que se aplicó fue el de curva corriente-voltaje (I-V) donde se aplicaron pulsos de -100 a +40 mV, con el fin de observar los cambios de conductancia de los ovocitos una vez que fueron perfundidos con BTxs y así identificar los posibles tipos de corrientes y bloqueos de canales.

8 Resultados

8.1 Recolecta de muestras

Durante cada semestre, se recolectaron anémonas en la zona de la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos. En la tabla 2, se muestra la fecha del muestreo, el número de anémonas recolectadas y el peso húmedo de los organismos.

Tabla 2: Fecha de muestreos, el número de anémonas muestreadas recolectadas y el peso húmedo obtenido.

Día de muestreo	Número de anémonas	Peso húmedo total obtenido en cada muestreo (g)
Enero 2013	5	19.1
28/06/2013	8	29.8
08/07/2013	5	25.3
19/07/2013	3	5.5
13/01/2014	9	28.8
07/02/2014	22	28.4
17/02/2014	10	6.5
27/02/2014	11	45.2
25/06/2014	10	78.4
Total Final	83	267

8.2 Identificación de cnidocistos

La identificación de los diferentes tipos de cnidocistos que presenta *Bartholomea annulata* se hizo a partir de una alícuota de los extractos crudos que se obtuvieron de la descarga.

Ambas alícuotas se observaron a 60X identificando 4 tipos diferentes. Los microbasicos p-mastigóforos (Fig. 11 A y B), los cuales, tienen un eje muy corto que va disminuyendo bruscamente en el filamento y presenta una ranura en forma de V prominente en la base (Mariscal, 1974). Los microbásicos amastigóforos (Fig.11 A) éstos no presentan ningún filamento después del eje.

Otro tipo de cnidocistos que se identificó fueron los espirocistos (Fig.11 C), con la particularidad que sólo están presentes en la clase Anthozoa.

Por último se observaron los basitrichous isorhizas los cuales presentan un filamento en el que la punta está abierta, por tanto se incluyen en la clasificación de los stomocnidae, además se observa que solo en la base de los filamentos presentan espinas bien desarrolladas (Mariscal, 1974).

Estos cuatro tipos de cnidocistos que se observaron en esta especie, se corresponden con los tipos que ya se habían reportado anteriormente González-Muñoz, (2009) y Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2006).

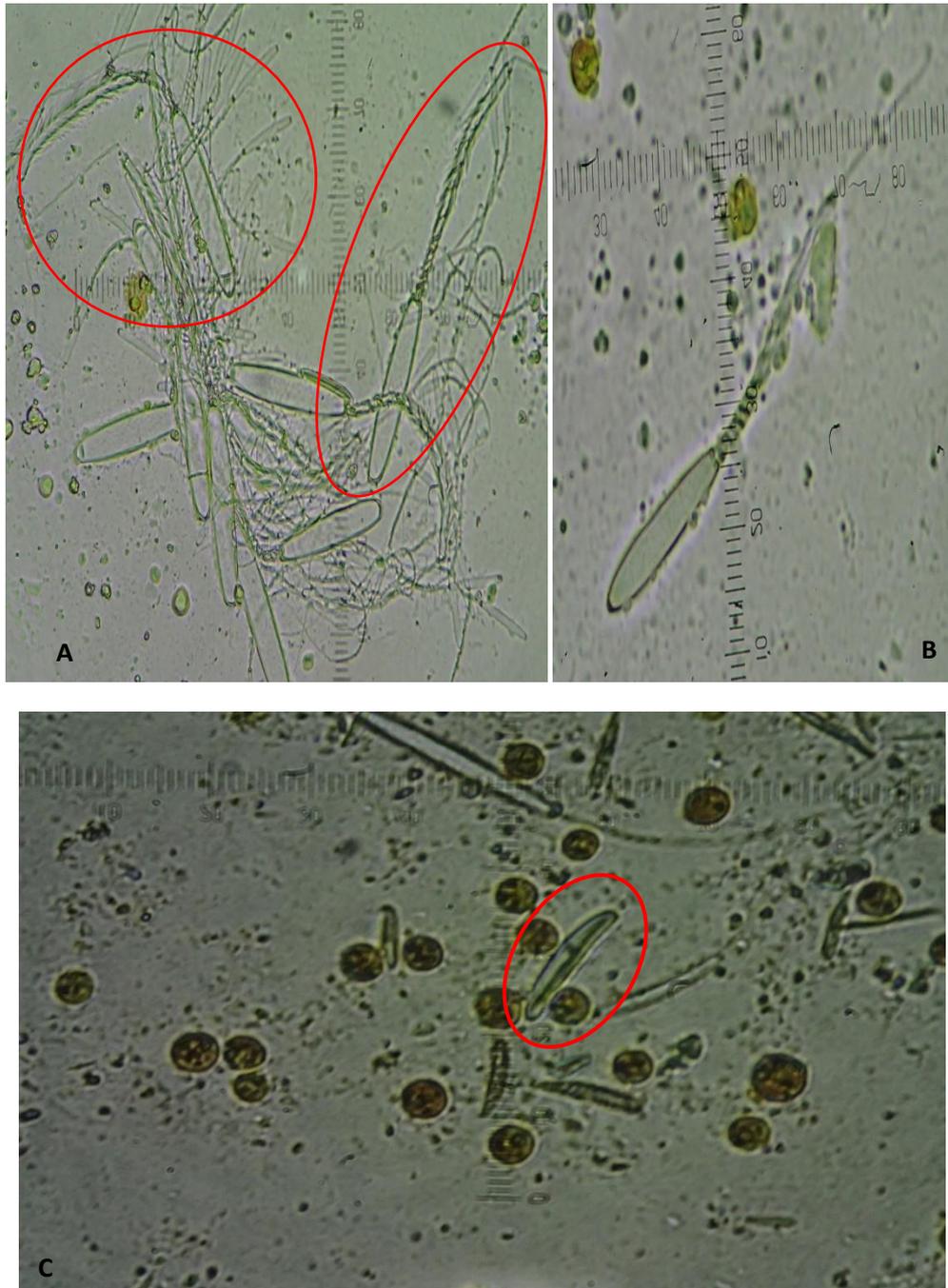


Fig. 11: Diferentes tipos de nematocistos identificados en *Bartholomea annulata*; (A), se puede observar una gran cantidad de nematocistos donde se observa un p-mastigóforo microbásico y un amastigóforo microbásico; (B), muestra un nematocisto p-mastigóforo microbásico; (C), la mayoría de cnidocistos están cargados, se observan también espirocistos, introducidos en la cápsula con forma de espiral.

8.3 Obtención de extracto crudo

Se aplicaron diferentes métodos para la obtención de nematocistos. El primero fue el método modificado de Kem *et al.* (1989), en el cual se descargaron los nematocistos por choque osmótico al introducir las anémonas en agua desionizada y someterlas a cambios de temperatura lo que les provocó un estrés resultando la descarga de estos (Fig. 12 A y B). El segundo método fue usando maceración y el tercero fue por sonicado, los cuales se encargan de romper las células.

Una vez obtenidos entre el 85-95% de nematocistos descargados y centrifugados, la muestra obtenida por los tres métodos diferentes, se liofilizó (Fig. 12 C) y en esta forma se obtuvieron los pesos secos de extracto crudo total.

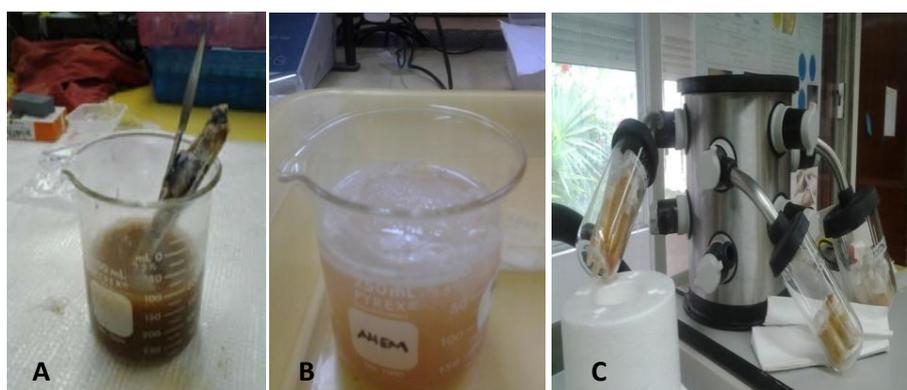


Fig. 12: En la imagen (A), se observa la extracción mediante agitación manual de acuerdo al método modificado de Kem *et al.* (1989). En la figura (B), se observa la solución obtenida después de la descarga de los nematocistos. En la imagen (C), las muestras de extracto crudo siendo liofilizadas.

En la tabla 3, se puede observar el peso seco después de que las muestras fueran liofilizadas y el rendimiento obtenido, en base al peso húmedo y el peso seco. Para ello se consideró que el peso húmedo es al 100% del rendimiento, obteniendo un 8.13% de rendimiento.

Tabla 3: Peso húmedo y peso seco, para calcular su rendimiento.

Peso húmedo total (g)	Peso seco extracto crudo total (g)	Rendimiento (%)
266.96	21.7	8.13

Cuantificación de proteínas

Una vez pesadas las muestras de extracto crudo obtenido, se procedió a hacer la cuantificación de la concentración de proteínas. A partir de una concentración de 10 mg/ml de extracto crudo diluido en agua desionizada se fueron haciendo diferentes diluciones y se procedió a leer las absorbancias de cada una a 595nm. Una vez obtenidas las lecturas, se calculó la concentración de proteína a partir de la curva patrón obtenida del estándar de albúmina de suero bovina (BSA) y se obtuvo un promedio aproximadamente de 0.5 mg de proteína por mg de extracto crudo, como se puede observar en la tabla 4.

Tabla 4: Concentración de mg de proteínas por mg de extracto crudo.

Proteína (mg)/ extracto crudo (mg)	DS
0.5959	±0.1398

Prueba de neurotoxicidad

Para verificar si las proteínas aisladas tenían o no una posible actividad neurotóxica, se inyectaron determinadas concentraciones de extracto crudo a tres diferentes cangrejos perteneciente a la especie *Ocypode quadrata*. Basándonos en la observación de los síntomas que presentaron los crustáceos después de ser inyectados se determinó la presencia de actividad. Se inyectó un volumen de 50 µl para cada cangrejo en el tercer pereiópodo del organismo. Los organismos fueron pesados y además se determinó su sexo. En la tabla 5 se presentan las características de los cangrejos inyectados, donde se observa que las concentraciones de proteínas inyectadas no fueron las mismas para cada cangrejo, a pesar de no poder ser comparables entre los cangrejos inyectados, en

la tabla 6 muestra que los cangrejos tuvieron prácticamente los mismos síntomas bajo los efectos del extracto crudo.

Tabla 5: Características de los cangrejos inyectados con extracto crudo

	Cangrejo 1	Cangrejo 2	Cangrejo 3
Concentración proteínas (mg/ml).	2.9796	1.16	1.408
Volumen inyectado μl	50	50	50
Cantidad inyectada de proteína (mg)	0.14898	0.058	0.0704
μg prot/g de cangrejo	9.6740	2.88	6.34
Sexo	Hembra	Macho	-
Peso (g)	15.4	20.08	11.1

Tabla 6: Efectos que se observaron en el comportamiento del cangrejo.

Efectos	Cangrejo 1	Cangrejo 2	Cangrejo 3
Burbujeo por la boca	✓	✓	✓
Temblores	✓	✓	✓
Movimiento descoordinados de los ojos	✓	✓	X
Parálisis	✓	✓	✓
Oscurecimiento del caparazón	✓	X	✓
Muerte	✓	✓	✓

Actividad de fosfolipasa

Empleando medios sólidos con agarosa, es posible poder medir los halos de actividad enzimática para determinar la actividad de fosfolipasa.

En este caso, se observó la actividad en dos diferentes concentraciones de proteínas de extracto crudo usando tres réplicas. Los halos de actividad se midieron a diferentes horas (3, 6, 12, 24 y 48 h) mediante un programa de procesamiento de imagen digital, llamado Image J, para así poder calcular el Pz medio de actividad midiendo el diámetro de halo de los controles como el halo que forman los extractos en el gel entre el diámetro de pozo (Tabla 7). Se usó un

volumen de 20 µl para cada uno de los pozos, donde dos de ellos se ocuparon con un control negativo (agua desionizada) y un control positivo (veneno de abeja).

Tabla 7: Cálculo de Pz a partir de la medición de los diámetros de los pozos entre los diámetros de los halos de actividad de las muestras a diferentes horas.

	µg proteína	Pz 3h	Pz 6h	Pz 12h	Pz 24h	Pz 48h
*Control +	6.86	0.5900	0.4516	0.3725	0.2845	0.1787
EC(10 mg/ml)	119.186	1	0.9868	0.8390	0.5922	0.4588
EC(5 mg/ml)	59.592	1	1	1	0.9252	0.6771
*Control -	0	1	1	1	1	1

*Control -, agua milliQ; Control +, veneno de abeja cuantificado por el método de Bradford (1976).

En la figura 13 se vió la actividad fosfolipídica de la abeja a las 48 horas, en el caso de los extractos crudos se probaron dos concentraciones diferentes donde la actividad aumentaba con una mayor concentración. Además, en EC de mayor concentración se ve como empezó a tener actividad a partir de las 6 horas, sin embargo, en EC de menor concentración la actividad se vió a partir de las 12 horas.

Fosfolipasas Extracto Crudo

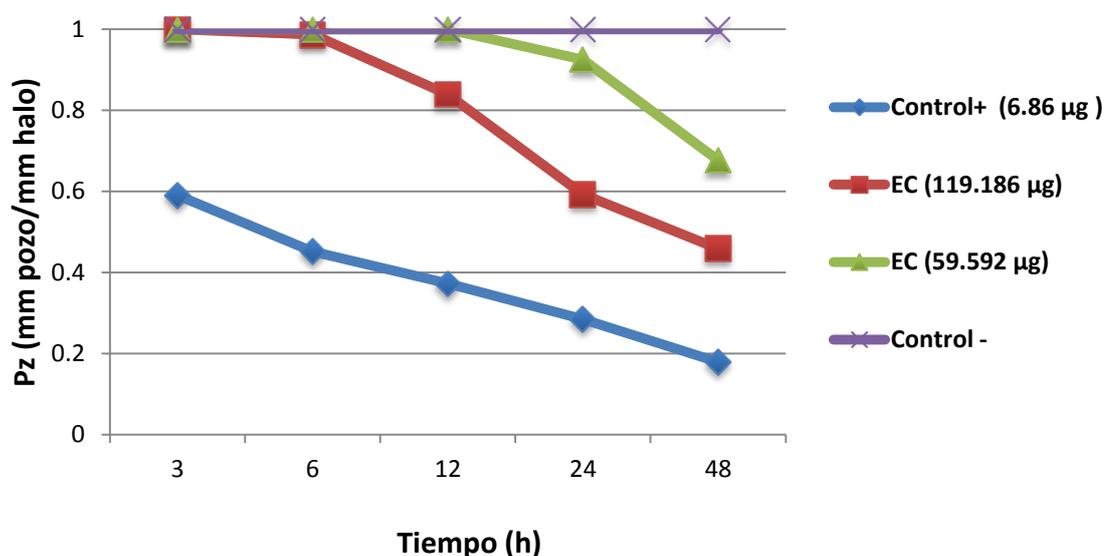


Fig. 13: Representación de la actividad de fosfolipasas. En el eje de coordenadas Y se ve representado la actividad Pz (mm de pozo/mm de halo) contra el tiempo de medición. El control positivo es el veneno de abeja (6.86 µg de proteína), el negativo es el agua desionizada y las dos diferentes concentraciones de proteínas de extracto crudo (EC) (µg de proteína) inoculadas en el gel de agarosa.

Análisis de proteínas mediante electroforesis (SDS PAGE).

Para este ensayo, se preparó un gel Tris-HCl de acrilamida al 12%, (Fig. 14) y un gel Tris-tricina con acrilamida al 16%, donde se corrió una muestra de extracto crudo para cada uno con una cantidad de proteína de 297.964 µg para el gel al 12% de acrilamida y una cantidad de 148.982 µg para el gel de acrilamida al 16%. En estos dos geles se observaron bandas de proteínas a diferentes pesos moleculares, donde en el gel de Tris-tricina se pudo observar una mejor definición de bandas incluso hasta pesos moleculares bajos, como las que se encuentran entre 10 y 5 kDa. Sin embargo, en la figura 14 (a) se puede ver que el marcador de proteínas solo corrió hasta 15 kDa y además las bandas de proteínas no quedaron tan definidas como en la figura 14 (b), a pesar de que la figura 14 (a) tenía una mayor cantidad de proteína y por el aspecto de amplitud de sus bandas mayor cantidad de sales que la figura 14 (b). Para la figura 14 (a) se ven bandas muy marcadas entre 100-75 kDa, 50-37 kDa y 20-15 kDa en

cambio en la figura 14 (b) hay más bandas marcadas entre 250-100 kDa, 150-100 kDa, en 50 kDa, en 37 kDa, en 25 kDa, entre 25-15 kDa entre 15-10 kDa y entre 10-5 kDa.

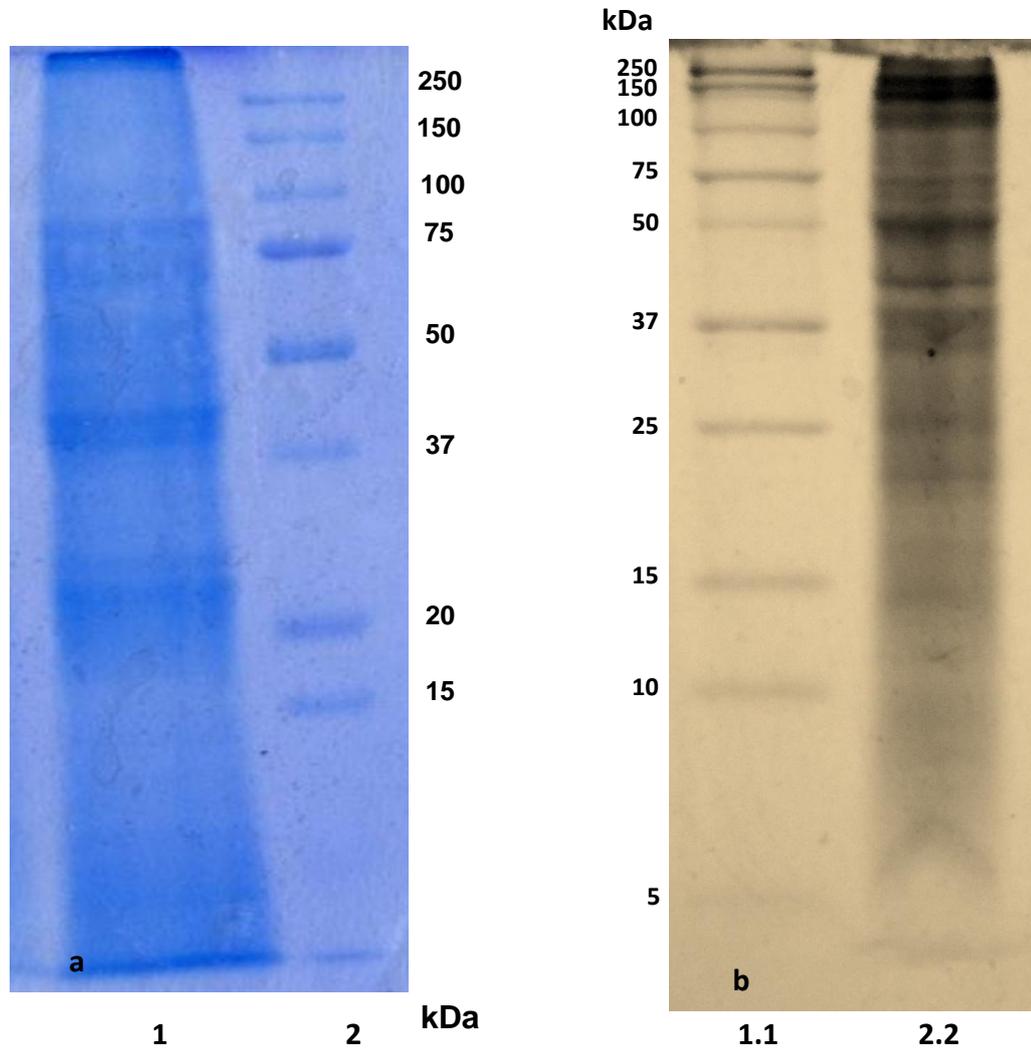


Fig. 14: Electroforesis (a) gel Tris-HCl con acrilamida al 12% carril 1, extracto crudo con una cantidad de proteína de 297.964 μg ; carril 2, estándar de proteínas Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad). (b), gel de Tris-tricina con acrilamida al 16%; el carril 1.1, estándar de proteína Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad); carril 2.2, extracto crudo con una cantidad de proteína de 148.982 μg . Ambos geles se tiñeron con azul de Coomassie, no obstante la figura (a) está retocada con un filtro blanco y negro porque se pueden apreciar mucho mejor las bandas que a en la imagen a color.

8.3 Pre-purificación de extracto crudo

8.3.1 Separación de proteínas mediante cromatografía líquida de baja presión (Sephadex G-50 M).

El fraccionamiento de 8 g de extracto crudo, se realizó mediante 5 corridas cromatográficas en una columna de Sephadex G-50 M, donde se usó como disolvente, ácido acético 0.3 M.

En la tabla 8 se muestran los pesos y el volumen de disolución usado para cada una de las cromatografías realizadas.

Tabla 8: Extracto crudo purificado en columna de Sephadex G-50 M

Muestra	Peso (g)	Volumen de disolución (Agua desionizada) (mL).
1	2.5	60
2	1.5	46
3	1.5	36
4	1.5	50
5	1.5	50
6	2.5	60

Se usó un flujo de 2.5 ml/min, se recolectaron fracciones de 17 ml y se leyó a una longitud de onda de 280 nm.

Para las muestras separadas en columna de exclusión (1, 2, 5 y 6) se obtuvieron tres fracciones. Para las muestras 3 y 4 que solo se obtuvieron dos picos, por lo anterior, estas se trabajaron de manera independiente. Se puede observar en la figura 15, uno de los perfiles cromatográficos obtenidos, así como la manera en que se reunieron las fracciones sobre las que se llevaron a cabo los ensayos de actividad.

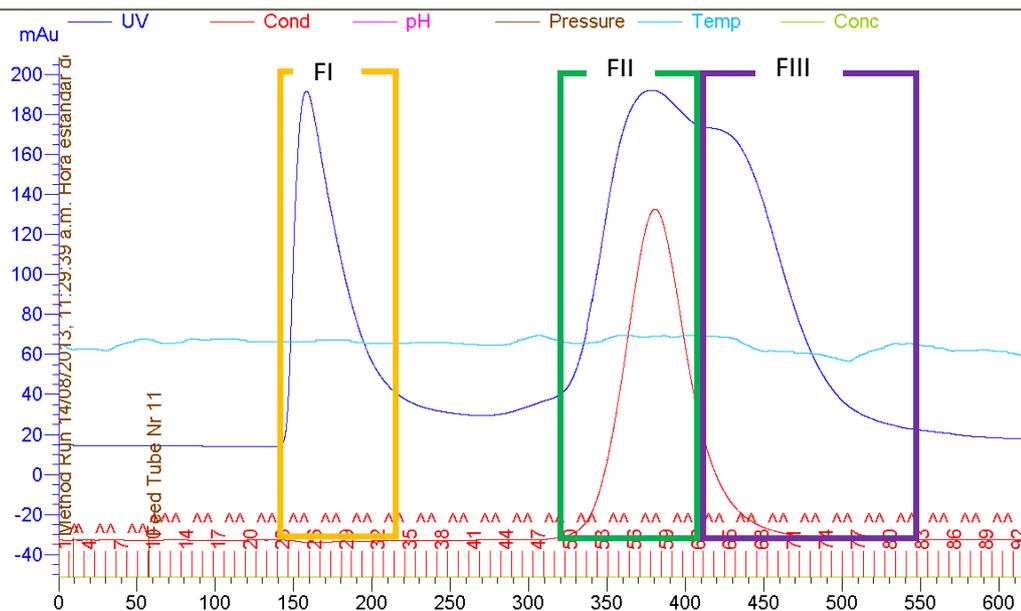


Fig. 15: Cromatograma de Sephadex G-50 M, a una concentración de extracto crudo de 41.6 mg/ml. Utilizando como disolvente ácido acético 0.3M, flujo 2.5 ml/min, fracciones de 17 ml Se diferencian tres fracciones, donde la elución de proteínas se monitorea a una longitud de onda de 280 nm.

Una vez que se separaron las fracciones, se concentraron al vacío a una temperatura menor de 30°C en un rotaevaporador y se liofilizaron. Las cantidades y rendimiento de cada fracción se encuentran en la tabla 9; se tomó como 100% de muestra 8 g de extracto obteniendo un rendimiento total de 32.2%. También se observa (tabla 9) que la fracción de mayor rendimiento fue la FII, pero debemos tener en cuenta que el organismo presenta una cantidad considerable de sales, donde acuerdo con el elevado pico de conductividad del cromatograma (Fig. 15) en la FII, podríamos suponer que estas se encuentran en esta fracción.

Tabla 9: Peso seco en gramos obtenidos de cada fracción mediante cromatografía líquida de baja presión, Sephadex G-50 M, además del cálculo del rendimiento para cada fracción y el rendimiento total.

	Peso seco (g)	Rendimiento (%)
FI	0.6989	8.74
FII	1.6943	21.18
FIII	0.1882	2.35
Total extracto pre-purificado	2.5814	32.2675

Cuantificación de proteínas

Se cuantificó el contenido de proteínas utilizando el método de Bradford (1976). Donde primeramente se hizo una curva patrón con un estándar de albúmina de suero bovino. Obtenida la recta, se hizo una disolución de 50 mg/ml para la FI y FII y de 20 mg/ml para la FIII y se cuantificaron las proteínas. En la tabla 10, se ven reflejados los mg de proteínas por mg de extracto pre-purificado para cada una de las fracciones, donde se observa que la FII es la que presentó menor concentración de proteínas por tanto nos da un indicativo más de la elevada presencia de sales en esta fracción en correspondencia con el rendimiento obtenido (tabla 9).

Tabla 10: Concentración de proteína (mg) con respecto a mg de extracto de las distintas fracciones pre-purificadas en Sephadex G-50M. La cuantificación se realizó con el método de Bradford (1976).

	mg de proteína/mg de extracto	DS
FI	0.2821	±0.0551
FII	0.0041	±0.00073
FIII	0.01305	±0.00844

Ensayo de neurotoxicidad en cangrejos

Al igual que como se hizo con el extracto crudo, después de obtener las fracciones fue necesario realizar el monitoreo de las sustancias activas con las fracciones pre-purificadas. Se realizaron pruebas con seis cangrejos de la especie *O. quadrata*; a cada organismo se le inyectó una determinada concentración de cada una de las fracciones pre-purificadas. En la tabla 11, se describen las características del cangrejo y en la tabla 12 los efectos que presentaron los cangrejos al inyectar las fracciones. A pesar de que, no es representativo comprar los efectos que provocaron las toxinas en los cangrejos inyectados con las diferentes fracciones, debido a que no se inyectó la misma concentración de proteína para cada cangrejo, se observó que todos los cangrejos mostraron efectos de toxicidad al ser inyectados, por tanto, si podemos decir que la toxina tuvo efecto en los organismos probados.

Tabla 11: Características de los cangrejos inyectados con las diferentes fracciones.

Cangrejo FI

	Cangrejo 1	Cangrejo 2
Concentración de extracto (mg/ml)	50	10
Concentración de proteínas (mg/ml)	14.1074	1.437
Volumen inyectado (μ l)	100	150
Cantidad inyectada de proteínas (mg)	1.41074	0.215
μ g prot/g de cangrejo	148.4989	21.0703
Sexo	Macho	Hembra
Peso (g)	9.5	10.23

Cangrejo FII

	Cangrejo 1	Cangrejo 2
Concentración de extracto (mg/ml)	50	50
Concentración de proteínas (mg/ml)	0.2066	0.2931
Volumen inyectado (µl)	50	100
Cantidad inyectada de proteínas (mg)	0.01033	0.02931
µg prot/g de cangrejo	0.4850	3.118
Sexo	Macho	Hembra
Peso (g)	21.3	9.4

Cangrejo FIII

	Cangrejo 1	Cangrejo 2
Concentración extracto (mg/ml)	20	50
Concentración de proteínas (mg/ml)	0.2611	0.7324
Volumen inyectado (µl)	100	50
Cantidad inyectada de proteínas(mg)	0.02611	0.03662
µg prot/g de cangrejo	2.3106	3.3291
Sexo	Macho	Macho
Peso (g)	11.3	11

Tabla 12: Efectos observados en los cangrejos inyectados con las fracciones FI, FII y FIII.

Efectos con FI	Cangrejo 1	Cangrejo 2
Burbujeo por la boca	✓	✓
Temblores	✓	✓
Movimientos descoordinados de los ojos	X	✓
Parálisis	X	✓
Oscurecimiento del caparazón	✓	✓
Muerte	✓	✓

Efectos con FII	Cangrejo 1	Cangrejo 2
Burbujeo por la boca	✓	✓
Temblores	✓	✓
Movimientos descoordinados de los ojos	✓	✓
Parálisis	X	✓
Oscurecimiento del caparazón	✓	X
Muerte	✓	✓

Efectos con FIII	Cangrejo 1	Cangrejo 2
Burbujeo por la boca	✓	✓
Temblores	✓	✓
Movimientos descoordinados de los ojos	✓	✓
Parálisis	✓	X
Oscurecimiento del caparazón	X	✓
Muerte	X	✓

Actividad de fosfolipasas

La actividad de fosfolipasa se realizó para comprobar la presencia de actividad citolítica en las fracciones pre-purificadas de *B.annulata*. Para ello, se utilizaron los geles de agarosa con yema de huevo y se midió el diámetro de los halos de actividad para así calcular el Pz (mm pozo/mm halo de actividad) mediante un programa digital (Image J). Se inoculó un volumen de 20 µl de concentración de cada fracción obtenida. Las mediciones se realizaron a las 3, 6, 12, 24 y 48 horas después de la aplicación de las muestras. En la tabla 13 y en la representación gráfica de la figura 16 se presentan los resultados obtenidos, donde se vio que FI y FII tuvieron actividad, en cambio FIII no mostró indicios de actividad. Estos

resultados no son comparables unas fracciones con otras debido a que, la concentración de proteínas no es la misma para cada fracción, por tanto, es un ensayo que nos permitió ver la actividad fosfolipídica pero no hacer una comparativa de actividad entre fracciones.

Tabla 13: Resultados de los Pz de actividad de las fosfolipasas calculados a partir de la relación del diámetro de los pozos (mm) y el diámetro de los halos de actividad (mm) para cada una de las fracciones.

	µg proteína	Pz 3h	Pz 6h	Pz 12h	Pz 24h	Pz .48h
*Control +	6.86	0.5547	0.4554	0.3687	0.2751	0.2070
FI(50 mg/ml)	282.148	1	1	1	0.8635	0.7946
FII(50 mg/ml)	4.1320	1	1	0.6816	0.4868	0.3834
FIII(20 mg/ml)	5.222	1	1	1	1	1
*Control -	0	1	1	1	1	1

*Control – se usó agua milliQ y para el *control + se usó veneno de abeja previamente cuantificada con el método de Bradford (1976).

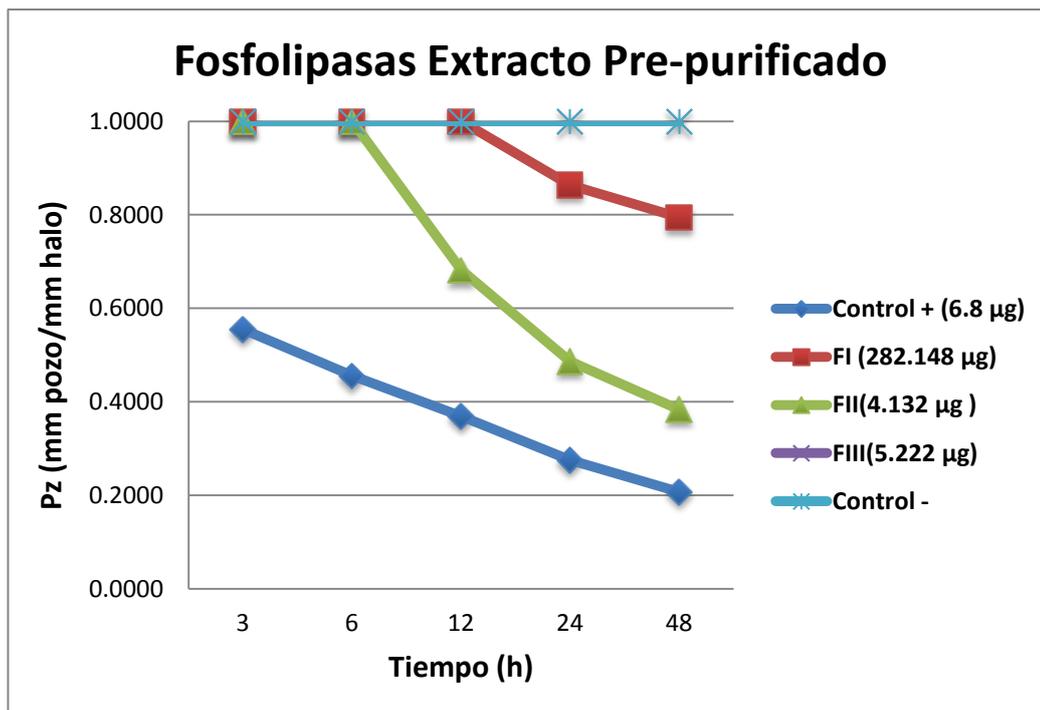


Fig. 16: Representación gráfica de la actividad fosfolipasa de las fracciones pre-purificadas (FI, FII, FIII) de *Bartholomea annulata* evaluadas a diferentes tiempos. El control y FIII no tuvieron actividad por lo que se solapa su representación.

En la figura 16 observamos que la FII es la que presentó mayor actividad comparada con FI, que tuvo muy poca actividad y FIII que no tuvo actividad. Esperaríamos que FIII no tuviera actividad fosfolipídica, debido a que es una fracción con predominación de proteínas de bajo peso molecular y donde podrían encontrarse las neurotoxinas y no citolisinas. Sin embargo, esperaríamos que FI tuviera mayor actividad que FII, no obstante la FII tiene mayor concentración de sales que FI, como se vio en el cromatograma y por tanto, también podrían tener influencia las sales de esta fracción en la actividad registrada.

Análisis de los pesos moleculares de las proteínas mediante electroforesis (SDS-PAGE)

Para los geles de Tris-HCl con acrilamida al 12% se usó Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope (Bio-Rad), con rango de peso molecular de 250 a 15 kDa. Se cargaron en cada gel un volumen de 5 µl de extracto con 70.50 µg en FI y 3.26 µg en FIII de proteína. En los geles que se ven en la figura 17 solamente están representadas las fracciones I y III; la fracción II no quedó suficientemente teñida para que se pudieran apreciar las bandas.

En la imagen de la figura 17, observamos que no se obtuvo una buena separación cromatográfica, debido a que las bandas de (a) y (b) son muy parecidas, se esperaría que en la FIII las bandas marcadas estuvieran por debajo de 15 kDa y en la FI estuvieran por arriba. Se puede ver que las bandas que hay en la figura 17 (a) y (b) son muy

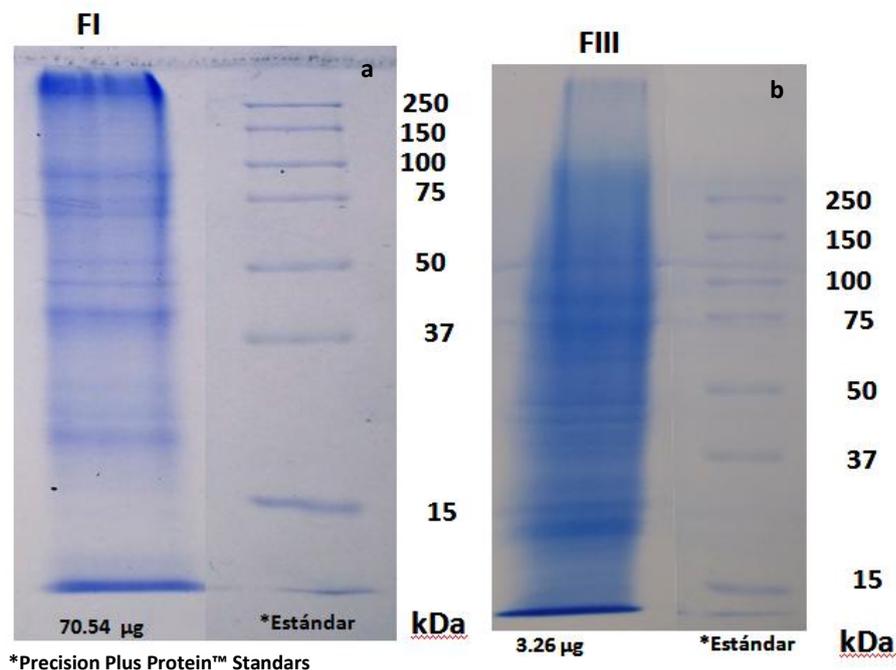


Fig. 17: Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie (a) FI (70.54 µg de proteína); (b) FIII (3.26 µg de proteína). Se utilizó como marcador indicador de los pesos moleculares Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope (Bio-Rad).

8.3.2 Separación mediante ultrafiltración

La separación mediante membranas de corte, como se mencionó anteriormente se realizó por dos métodos diferentes.

❖ *Membranas Amicon (millipore) con cortes de 10, 5, 3, 1 kDa*

Se filtró un total de 8 g de extracto crudo diluido en un volumen de agua milliQ de 460 ml.

En la tabla 14 se pueden observar los mg de extracto recuperado después de ser filtrados y liofilizados. Los respectivos rendimientos se calcularon basándonos en que el 100% de su rendimiento son los 8 g de extracto crudo que se sometió a la pre-purificación.

Tabla 14: Extracto obtenido después de ser ultrafiltrado y sus rendimientos para cada cantidad obtenida.

	Extracto UF*	Rendimiento (%)
+10 KDa (mg)	485.9	6.1427
10-5 KDa (mg)	114	1.4412
5-3 KDa (mg)	173.8	2.1972
3-1 KDa (mg)	~42.4	0.5360
<1 KDa (g)	2.0913	26.4380.
Total UF (g)	2.8765	36.3619

*Extracto UF: extracto ultrafiltrado

Cuantificación de proteínas

La cuantificación se hizo mediante el método de Bradford (1976), como se explicó en la metodología y se usó como estándar serum albúmina bovina (BSA). Se cuantificaron las proteínas de cada una de las fracciones obtenidas con las membranas de corte y se calculó el promedio la concentración de mg de proteína para cada extracto ultrafiltrado (Tabla 15).

Tabla 15: Cuantificación de proteínas de las fracciones obtenidas a partir de las membranas de corte, mediante el método de Bradford (1976). Relación mg de proteína por mg de extracto ultrafiltrado y su desviación estándar.

	mg de Proteína/ mg extracto UF	SD
+10 kDa	0.2438	±0.0825
10-5 kDa	0.1812	±0.0667
5-3 kDa	0.2129	±0.0951
3-1 kDa	0.0220	±0.0080

Bioensayo de neurotoxicidad en cangrejos

Se recolectaron 4 cangrejos de la especie *O. quadrata*, y se les inyectó una cierta cantidad de proteína obtenida de los extractos filtrados (Tabla 16). Los efectos registrados después de la inyección se encuentran en la Tabla 17.

Tabla 16: Características de cada uno de los cangrejos a los que se le inyectó extracto.

Cangrejo +10 kDa

Concentración extracto (mg/ml)	14
Concentración de proteínas (mg/ml)	2.596
Volumen inyectado (µl)	50
Cantidad de proteína inyectada (mg)	0.1298
µg prot/g de cangrejo	7.0162
Sexo	Macho
Peso (g)	18.5

Cangrejo 10-5 kDa

Concentración extracto (mg/ml)	14
Concentración de proteínas (mg/ml)	2.5371
Volumen inyectado (µl)	50
Cantidad de proteína inyectada (mg)	0.1268
µg prot/g de cangrejo	8.4009
Sexo	Macho
Peso (g)	15.1

Cangrejo 5-3 kDa

Concentración extracto (mg/ml)	12
Concentración de proteínas (mg/ml)	2.555
Volumen inyectado (μl)	50
Cantidad de proteína inyectada (mg)	0.1278
μg prot/g de cangrejo	7.7896
Sexo	Macho
Peso (g)	16.4

Cangrejo 3-1 kDa

Concentración extracto (mg/ml)	14
Concentración de proteínas (mg/ml)	0.308
Volumen inyectado (μl)	50
Cantidad de proteína inyectada (mg)	0.0154
μg prot/g de cangrejo	2.1096
Sexo	Macho
Peso(g)	7.3

Tabla 17: Efectos observados en los cangrejos inyectados con los diferentes extractos separados por UF.

Efectos	Cangrejo +10	Cangrejo 10-5	Cangrejo 5-3	Cangrejo 3-1
Burbujeo por la boca	✓	✓	✓	✓
Temblores	✓	✓	✓	✓
Movimientos descoordinados de los ojos	✓	✓	✓	✓
Parálisis	✓	✓	✓	✓
Oscurecimiento del caparazón	✓	✓	✓	✓
Muerte	✓	✓	✓	✓

Las fracciones que se usaron para inyectar los cangrejos tienen una concentración muy parecida de proteínas exceptuando la fracción de 3-1 kDa, sin embargo la tabla de comportamiento de cangrejos refleja que todos indistintamente de la concentración tuvieron los mismos efectos al ser inyectados, por tanto, todas las fracciones que se probaron fueron activas para los cangrejos.

Actividad de fosfolipasas

En la siguiente tabla (Tabla 18) y gráfica (Fig. 18) se observan las actividades de las fosfolipasas, mediante los promedios de Pz con respecto al tiempo de medición. Las cantidades usadas son muy similares para cada fracción exceptuando la fracción 1-3 kDa que tiene una cantidad de proteínas menor, por tanto no puede haber una comparativa total entre todas las fracciones, pero si se pudo observar actividad con todas las fracciones. Se vió el mismo Pz medio final para las fracciones con las cantidades de proteínas similares, es decir +10 kDa, 10-5 kDa y 5-3 kDa.

Tabla 18: Pz medio (mm de pozo/mm de halo) de cada una de los extractos filtrados en función del tiempo a las que se realizaron las mediciones.

	Cantidad de proteína (μg)	Pz (3h)	Pz (6h)	Pz (12h)	Pz (24h)	Pz (48h)
*Control +	37.04	0.5985	0.4660	0.3900	0.2898	0.2285
+ 10 KDa	51.92	1	1	0.7660	0.5253	0.4493
10-5 KDa	50.742	1	0.9077	0.7049	0.5480	0.4519
5-3 KDa	51.1	1	1	0.9163	0.7318	0.4829
3-1 KDa	6.16	1	1	1	1	0.7187
*Control -	0	1	1	1	1	1

*Control +, veneno de abeja; concentración de proteínas estimada mediante método de Bradford, 1976. *Control -, agua milliQ.

Fosfolipasas Extracto Ultrafiltrado

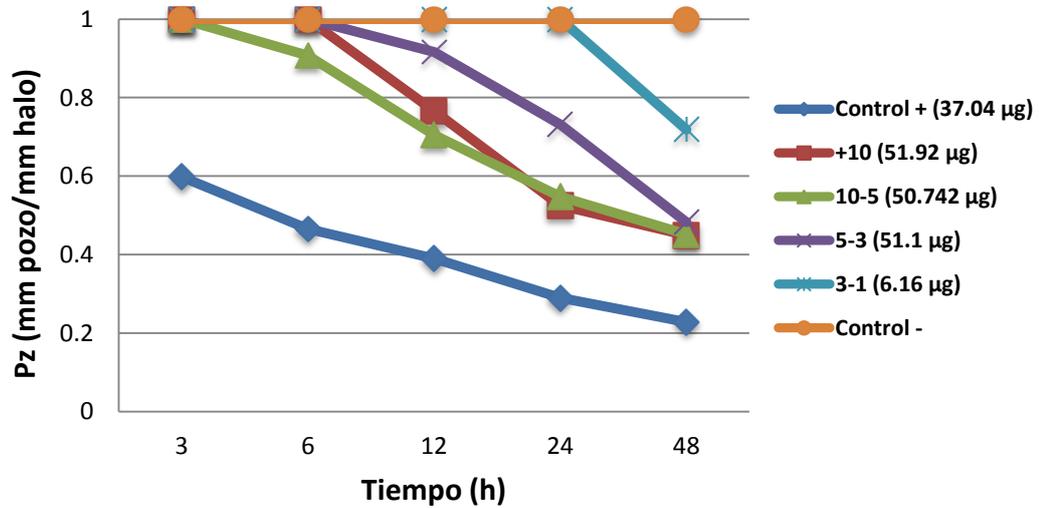


Fig. 18: Representación gráfica de los Pz promediados a partir de las mediciones de los diámetros de los pozos entre los diámetros de los halos de actividad frente al tiempo.

Análisis de los pesos moleculares de las proteínas mediante electroforesis (SDS-PAGE).

Se hizo una electroforesis al 12% de acrilamida (Fig. 19) de cada una de las fracciones obtenidas en la ultrafiltración para así, poder comprobar si se había hecho una buena separación proteica en función de su peso molecular. Se usaron dos estándares diferentes Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (Bio-Rad) y Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad) finalmente se hizo una tinción con azul de comassie.

Los resultados obtenidos que se ven en la figura 19 nos muestran que no se llevó a cabo una buena separación, debido a que, el gel nos muestra que en las fracciones hay bandas en pesos moleculares que no se corresponden y además bandas muy parecidas de una fracción a otra.

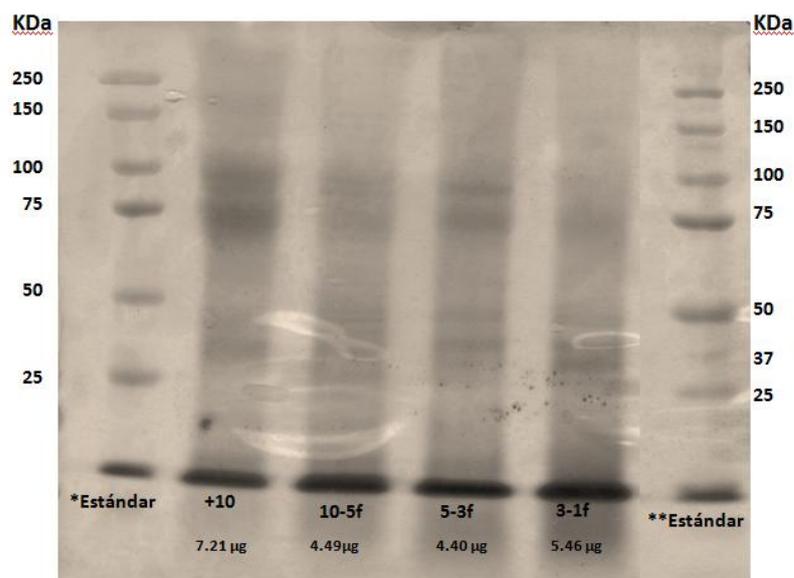


Fig. 19: Imagen de un gel de acrilamida al 12%, teñido con azul de comassie. En el primer carril se observa el estándar Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (Bio-Rad). Los siguientes carriles muestran las fracciones de +10, 10-5, 5-3 y 3-1 kDa, debajo de cada carril se ve la cantidad de proteína usada cuantificada por el método de Bradford (1976). Finalmente el último carril presenta el estándar Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad).

8.4 Ensayos electrofisiológicos

Para los ensayos de electrofisiología en ovocitos se usaron tres diferentes concentraciones y a partir de esas concentraciones se hicieron diferentes registros en base al objetivo del estudio. En la siguiente Tabla 19 se pueden ver las tres concentraciones diferentes que se han usado, a pesar de que cada fracción también fue cuantificada mediante el método de Bradford (1970), para saber la concentración real de proteína de cada extracto usado.

Tabla 19: Resume las tres diferentes concentraciones totales de los diferentes extractos tanto pre-purificados como crudo que se han usado en estos ensayos electrofisiológicos.

	Concentración	Concentración	Concentración
Extracto crudo fracción	5mg/ml	1 mg/ml	0.1 mg/ml

❖ Ensayos con ovocitos nativos

Uno de los objetivos de este trabajo de investigación fue comprobar la existencia de compuestos neurotóxicos, por tanto un primer punto importante fue probar el efecto que las toxinas (BTxs) provocaban sobre ovocitos que no estaban inyectados con el ARNm del cerebro. Para ello, se realizaron registros de voltaje continuo con un potencial de -60 mV (Fig. 20 y 21). Además se hizo una comparación de la respuesta de las toxinas con los neurotransmisores GABA, serotonina, ác. glutámico (Glut), acetilcolina (ACh) (Fig. 20 y 22).

La representación gráfica muestra que los ovocitos nativos tuvieron una pequeña corriente prácticamente imperceptible en los registros al perfundir el extracto crudo y las fracciones, al igual que la serotonina y la acetilcolina; en cambio, el ác. glutámico y GABA no mostraron ningún tipo de corriente.

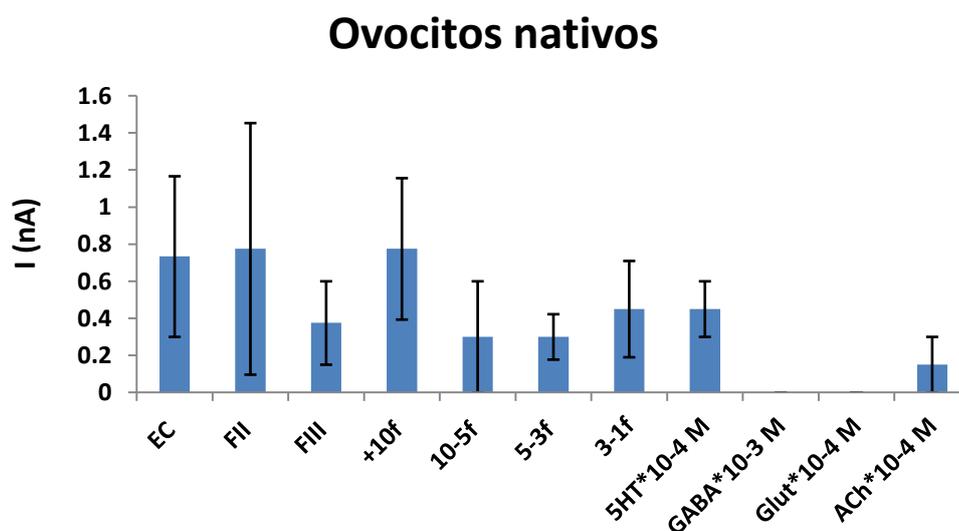


Fig. 20: Representación gráfica de la actividad media de los ovocitos nativos perfundidos con extracto crudo y pre-purificado a 0.1 mg/ml con cuatro neurotransmisores agonistas (serotonina (5HT) 10^{-4} M, GABA 10^{-3} M, ácido glutámico 10^{-4} M y acetilcolina (ACh) 10^{-4} M), como medida de control para corroborar la ausencia de efecto en estos ovocitos nativos.

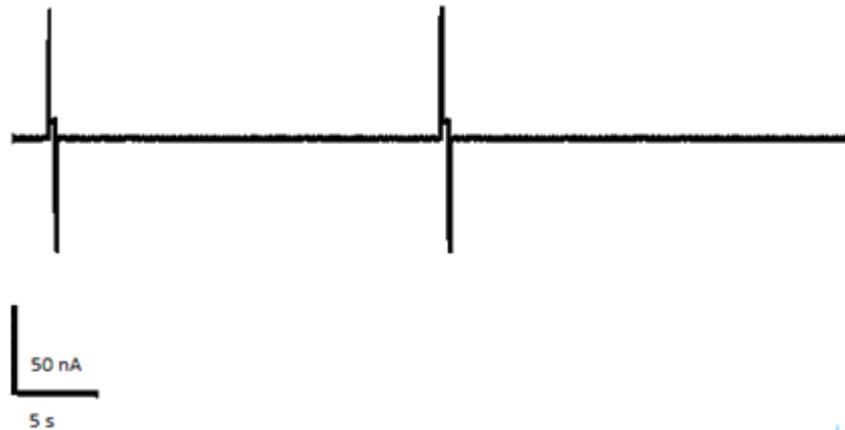


Fig. 21: Ejemplo de la respuesta de un ovocito no microinyectado con ARNm de cerebro de rata a un voltaje controlado de -60 mV y perfundido a ARN agregándole extracto crudo a 0.1 mg/ml correspondiente a una concentración de proteína de 50 μ g de proteína/ml.

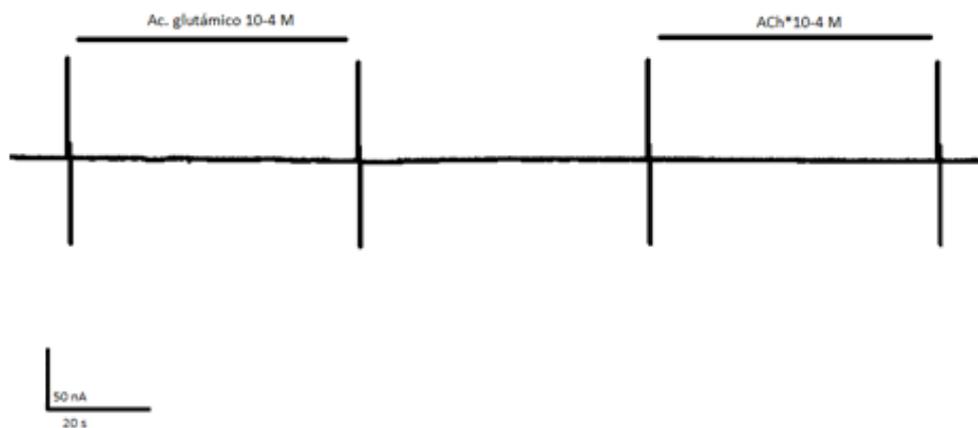


Fig. 22: Ejemplo de la acción de dos neurotransmisores (ác. glutámico* 10^{-4} y ACh* 10^{-4}) en ovocitos nativos a un voltaje controlado de -60 mV.

❖ **Ensayos con ovocitos microinyectados con ARNm de cerebro de rata.**

Una vez que obtuvimos el resultado de los extractos tanto crudo como el de las fracciones en los ovocitos nativos, el segundo paso fue probar el efecto que producía el veneno en los ovocitos inyectados con ARNm de cerebro de rata. En cada caso se realizaron diversos registros a diferentes concentraciones (Tabla 20). Para observar cuál era la respuesta de los ovocitos frente al suministro de las toxinas, se aplicaron dos protocolos diferentes, uno fue el protocolo de voltaje

continúo a -60 mV y el segundo protocolo fue las curvas I-V a diferentes potenciales (-100 a +40 mV).

1) Registro con voltaje continuo a -60 mV

Cada vez que se realizó un registro con los ovocitos microinyectados con RNAm en voltaje continuo a -60 mV, primero se llevaron a cabo registros con los neurotransmisores (GABA 10^{-3} M, ACh 10^{-4} M, ác. glutámico 10^{-4} M, 5HT 10^{-4} M) considerados como control positivo. En las figuras 23 y 24 (a,b) se puede observar las diferentes respuestas de los antagonistas en el ovocito y ver la diferencia de respuesta que hay entre las figuras (20 y 22) de los ovocitos no inyectados con los que sí estaban inyectados.

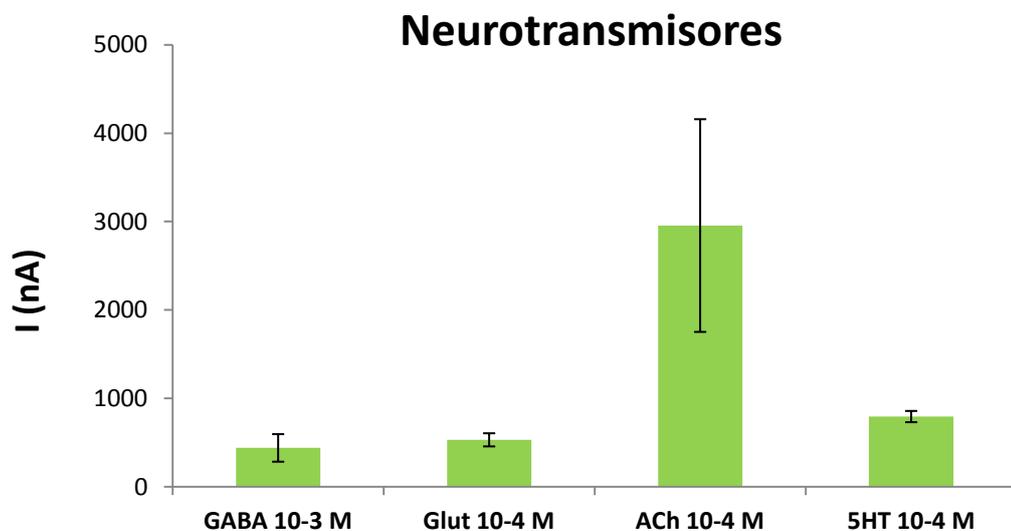


Fig. 23: Representación gráfica de los picos de las corrientes promediadas entre todos los controles positivos registrados

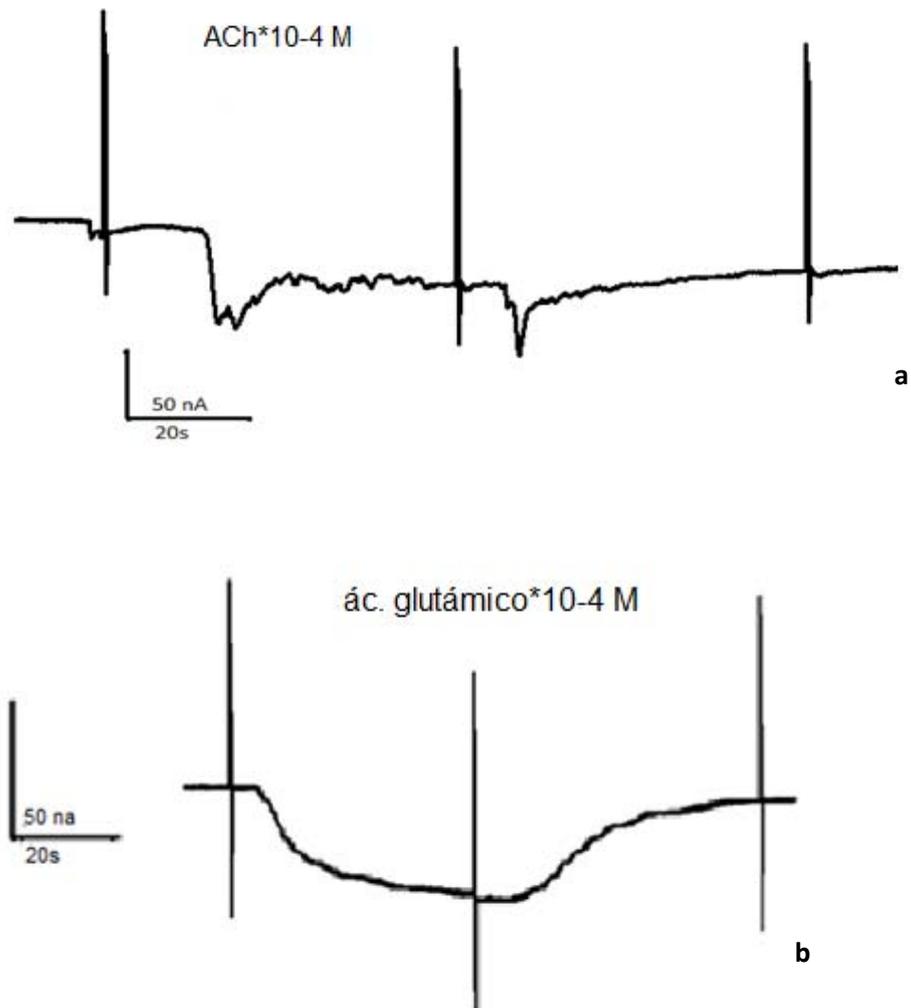


Fig. 24: Respuesta obtenida de dos de los neurotransmisores probados en los ovocitos microinyectados en RNAm, a un voltaje continuo de -60 mV. a) acetilcolina a 10^{-3} M. b) ácido glutámico a 10^{-3} M.

Una vez que se hubo verificado que los ovocitos tenían receptores a GABA, ACh, 5HT y ác. glutámico considerándolos así controles positivos, se procedió a obtener registros de las respuestas de los ovocitos frente al suministro de veneno aislado de *B. annulata*.

En primer lugar se le suministró al ovocito extracto crudo (EC) a una concentración total de 5 mg/ml (Fig. 25). Se observó que las toxinas (BTxs) provocaban dos tipos de corrientes: la primera corriente lisa que se llamó corriente lisa entrante (Siw) y la segunda corriente, también entrante, donde se observaron oscilaciones, que se llamó corriente oscilatoria (Iosc).

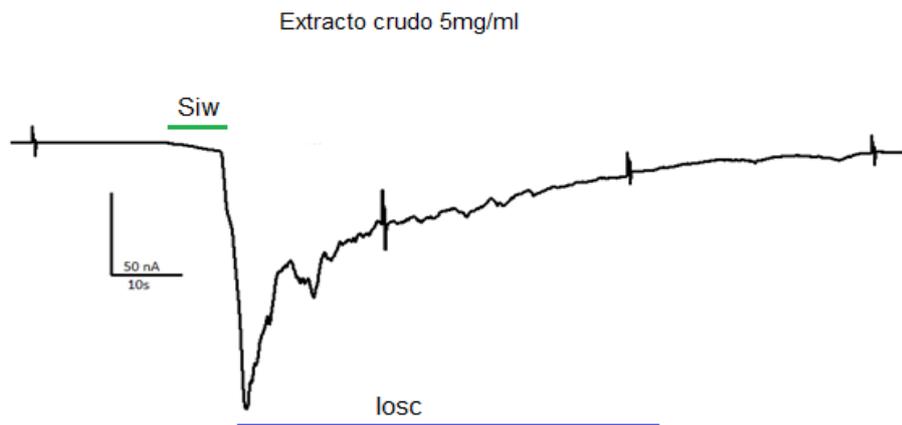


Fig. 25: Registro electrofisiológico de EC a una concentración total de 5 mg/ml (2.5 mg de proteína/ml). Se puede ver una línea verde que indica la corriente entrante denominada lisa (Siw) y con una línea azul se ve marcada la corriente entrante oscilatoria (Iosc).

Además, se obtuvieron registros con las fracciones FII y 5-3f; solamente se hicieron pruebas con estas dos fracciones debido a que se usaron las fracciones con mayor cantidad de extracto, a pesar de que se obtuvieron más fracciones de la pre-purificación como se verá en los siguientes registros.

Como se ve en la figura 26 (a y b) 5-3f siguió el mismo patrón que EC con la diferencia que el ovocito no se recuperó provocando su deterioro irreversible; sin embargo, FII sólo produce la aparición de una corriente lisa.



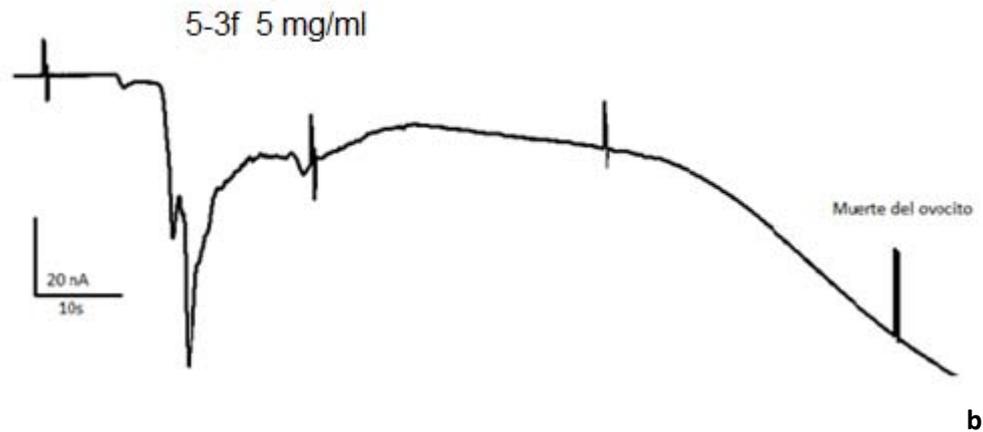


Fig. 26: Registros de BTx a una concentración total de 5 mg/ml y a un voltaje continuo -60 mV a) FII con una concentración de proteínas de 1.2 mg/ml b) fracción 5-3f a una concentración de 2.2 mg de proteína/ml.

Se graficaron los picos de las corrientes tanto lisa (Siw) como oscilatoria (Iosc) y también la diferencia porcentual entre Siw e Iosc que presentaron cada uno de los extractos que fueron registrados (Fig. 27 y 28). En la gráfica 27 se ve como La corriente oscilatoria (Iosc) es mayor que la corriente lisa (Siw) para el extracto crudo y la fracción ultrafiltrada (5-3f) en cambio, para FII solo tuvo lugar la corriente lisa.

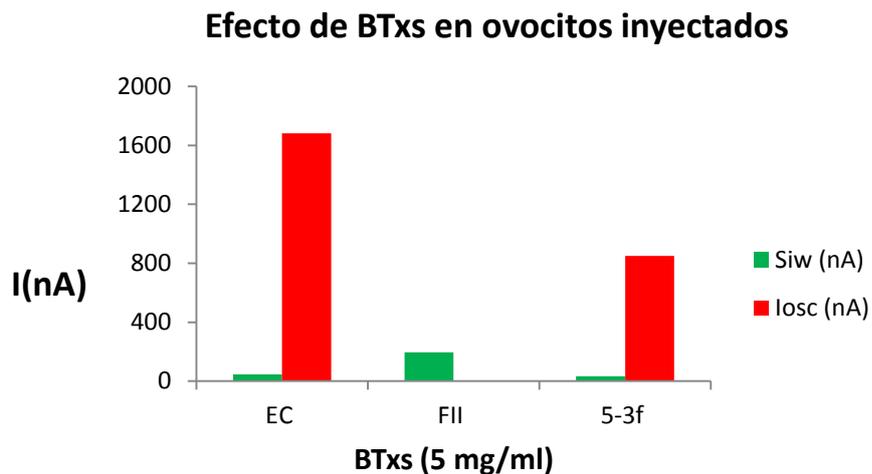


Fig. 27: En esta gráfica se muestran los diferentes picos de corriente medidos en (nA) provocada por los tres extractos a 5mg/ml y una concentración de proteína de 2.5 mg/ml de extracto para EC, 1.2 mg proteína/ml de extracto para FII y 2.2 mg de proteína/ml de extracto para la fracción 5-3.

Diferencia porcentual entre Siw e losc

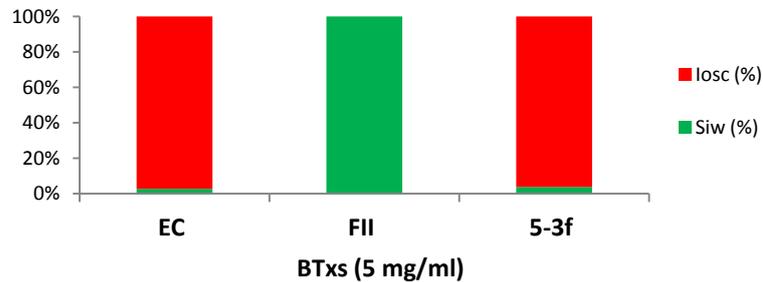
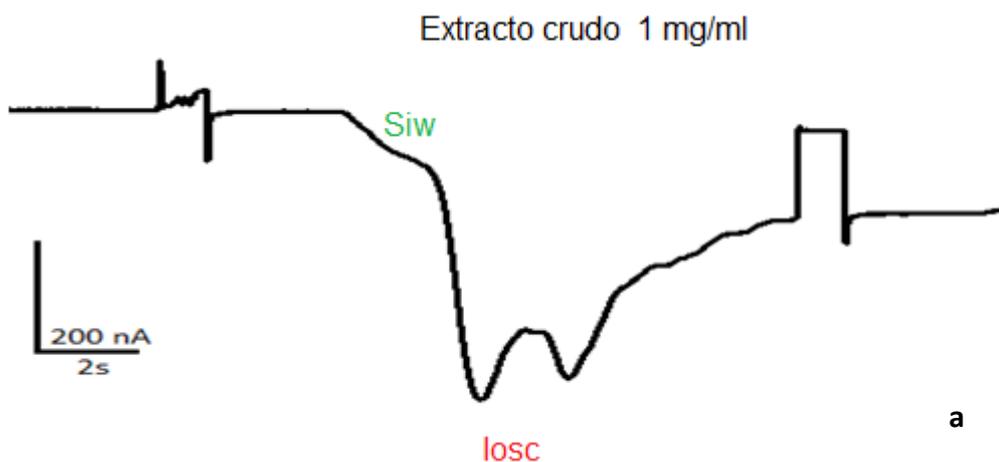


Fig. 28: Gráfica donde se observa la diferencia de porcentaje de los dos tipos de corrientes diferentes identificadas en los registros.

Una vez que se realizaron los registros a una concentración de extracto elevada (5 mg/ml) se consideró disminuir las concentraciones a 1 mg/ml y a 0.1 mg/ml para ver como respondían los ovocitos a las BTxs. En este caso, a diferencia del anterior sí se comprobó el efecto para el extracto crudo y para cada una de las fracciones obtenidas tanto por cromatografía de exclusión molecular como por ultrafiltración.

Al igual que en los registros anteriores, primeramente se observó cual era la respuesta de los ovocitos con EC (Fig. 29 a y b), donde se observaron las mismas corrientes que en el registro de la figura 25, una corriente lisa entrante y otra corriente entrante oscilatoria.



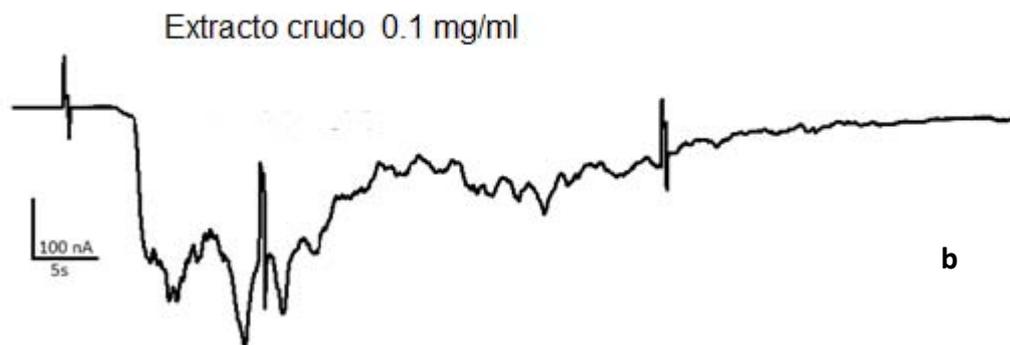


Fig. 29: Registros del efecto del EC a un voltaje continuo de -60 mV, donde en cada caso se observa el mismo patrón de una corriente lisa (Siw) y una oscilatoria (Iosc). En el registro a) la concentración es de 1 mg/ml (500 μ g de proteína/ml) y en el registro b) la concentración es de 0.1 mg/ml (50 μ g de proteína/ml).

Después del extracto crudo se probaron las fracciones obtenidas mediante cromatografía líquida y las que se obtuvieron por ultrafiltración. Todas estas fracciones provocaron la misma respuesta en el ovocito que la que provocó el EC. Se diferenció la corriente lisa y la corriente oscilatoria, sin embargo, como se muestra en la gráfica de la figura 30 (a y b), la FIII obtenida con Sephadex G-50 M, fue la que provocó mayores picos de corriente oscilatoria; en el ovocito siendo la que tiene una menor concentración de proteínas (como se puede ver en la tabla 20 de la concentración de proteínas).

Tabla 20: Resumen de la concentración de proteína que presenta cada uno de los extractos usados en el registro, que corresponde a una concentración total de 1 mg/ml.

BTxs	μ g de proteína/ml
Extracto crudo	500
FII	240
FIII	165
+10f	721.5
10-5f	450
5-3f	440
3-1f	547

Efecto de BTxs en ovocitos inyectados

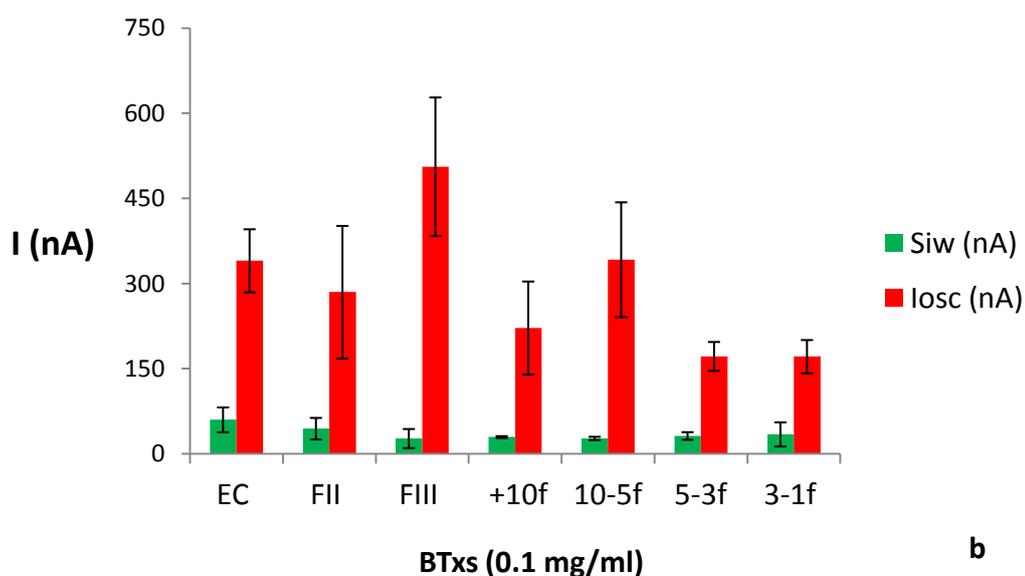
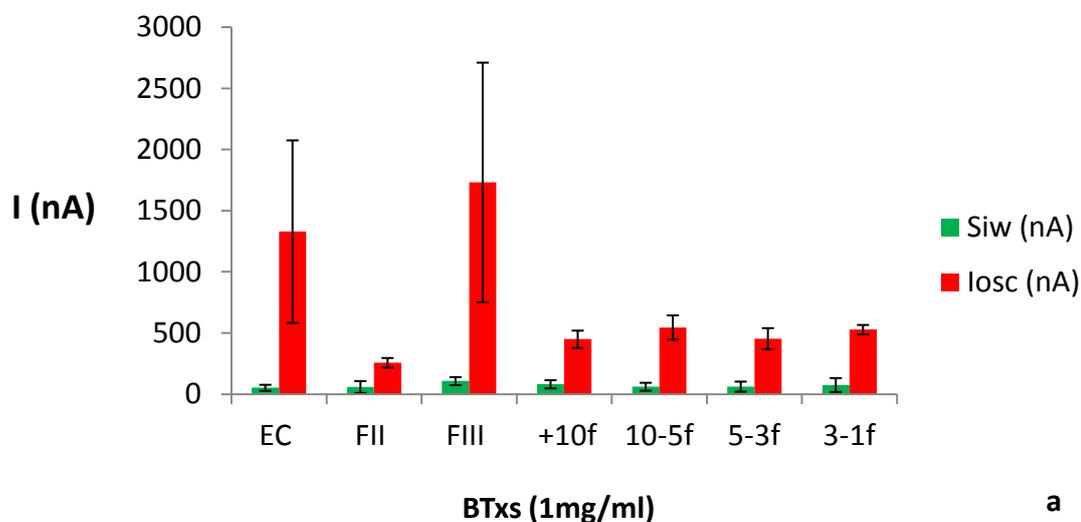
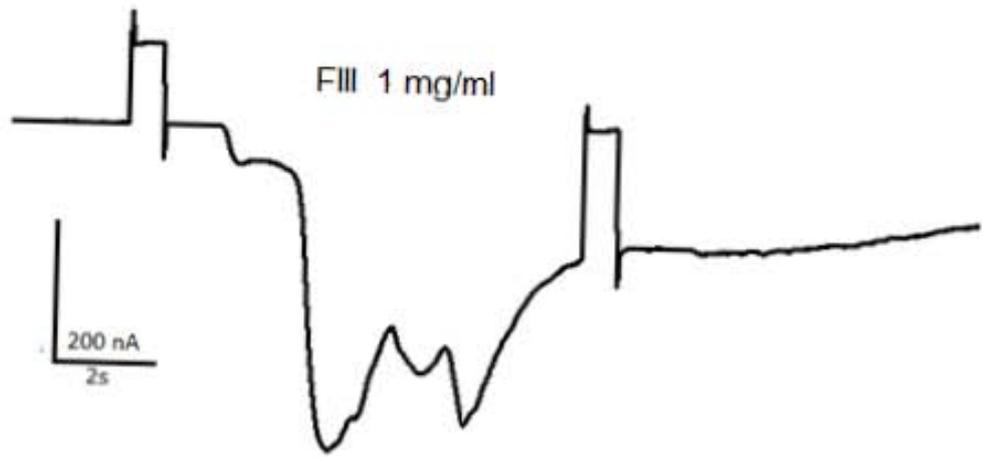
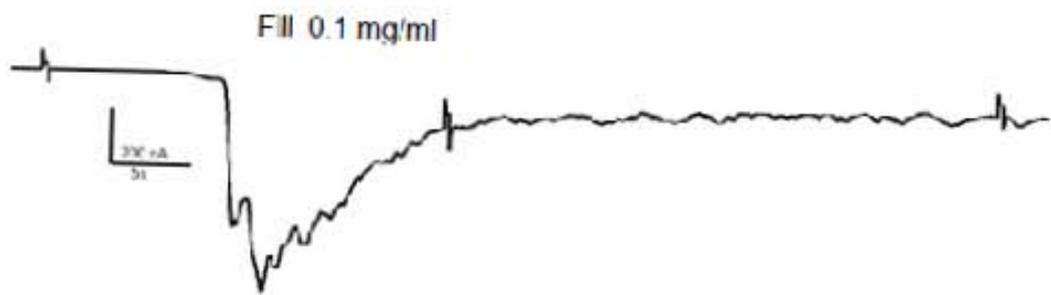


Fig. 30: Se graficaron los picos de corrientes obtenidos en las respuestas de los ovocitos frente al suministro de BTxs en fracciones y en extracto crudo. En la gráfica a) la concentración total es de 1 mg/ml y en la gráfica b) la concentración es de 0.1 mg/ml; en la tabla 20 se puede ver la concentración real de proteínas que tiene cada una de las fracciones y el extracto crudo.

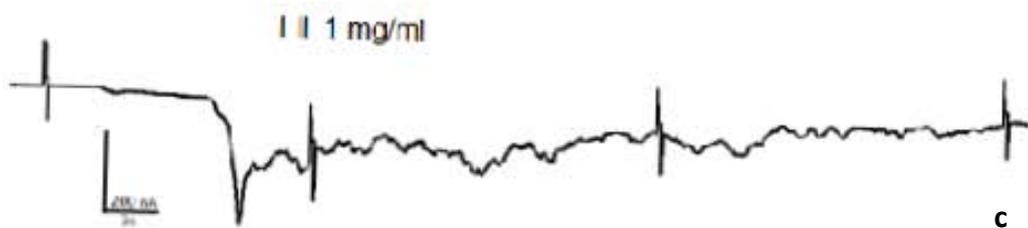
En la figura 31 (a, b, c, d) se pueden ver algunos ejemplos de los registros que se obtuvieron a partir de algunas de las fracciones.



a



b



c

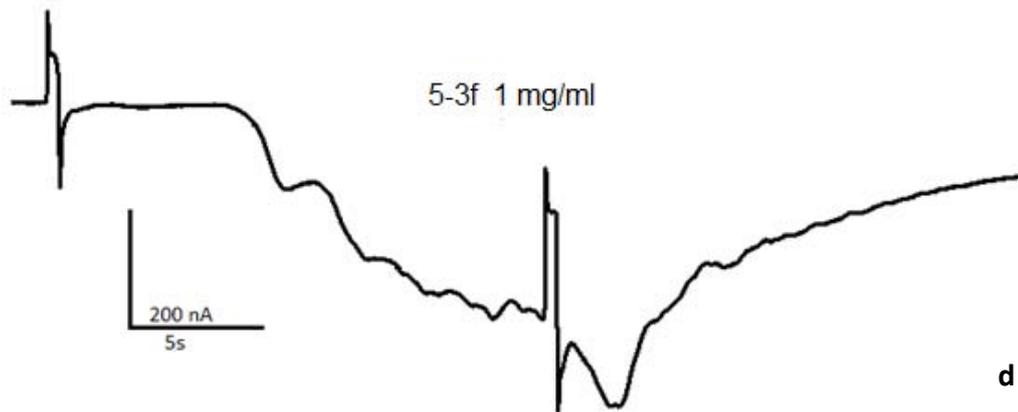
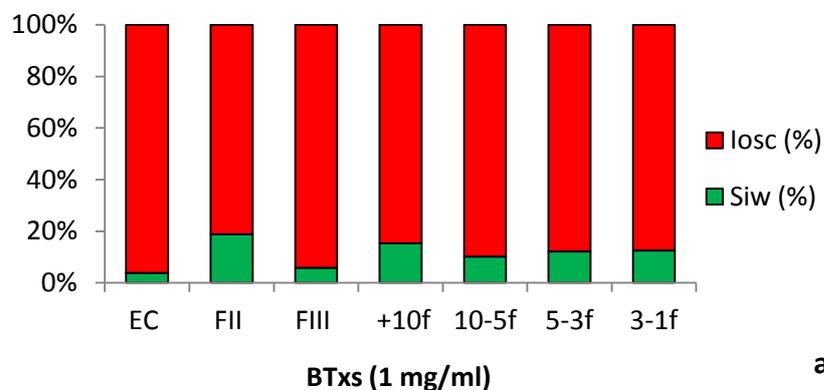


Fig. 31: Ejemplo de algunos de los registros obtenidos a voltaje continuo de -60 mV. La imagen a) y b) son algunos de los registros de la respuesta del ovocito sometido a FIII a dos diferentes concentraciones, 1 mg/ml (165 μ g de proteína/ml) y 0.1 mg/ml (16.5 μ g de proteína/ml). En la imagen c) se puede ver uno de los registros de FII a una concentración total de 1 mg/ml (24 μ g de proteína/ml); finalmente la imagen d) es un registro de la fracción 5-3f a una concentración de 1 mg/ml a una concentración (440 μ g de proteína/ml).

En los registros se ve que la FIII es la que obtuvo mayor respuesta de corriente oscilatoria incluso mayor a la que se vio en los registros de extracto crudo.

Además, se graficó la diferencia porcentual entre Siw e Iosc, obtenidas en las dos concentraciones diferentes que se probaron tanto de EC como de las fracciones. En estas se pudo observar que la FII también obtenida por Sephadex G-50 M presenta un porcentaje de corriente entrante lisa mayor a las demás fracciones, a pesar de no ser la más potente (Fig. 32 a y b).

Diferencia porcentual entre Siw e Iosc



a

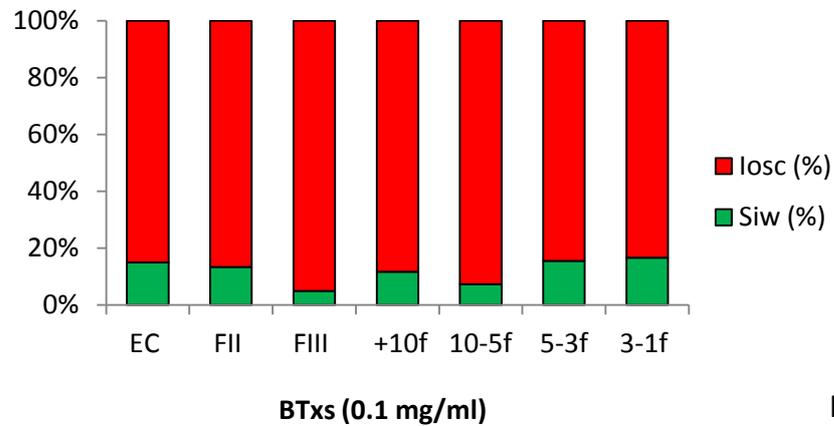


Fig. 32: Gráficas representativas de la diferencia porcentual entre Siw e Iosc obtenida en los registros de extracto crudo y pre-purificado a) concentración total de 1 mg/ml b) concentración total de 0.1 mg/ml.

Para distinguir las dos corrientes generadas lo que se hizo fue inyectar los ovocitos con ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), el cual funcionó como agente quelante cumpliendo con la función de inhibir la corriente oscilatoria; debido a que ésta posiblemente fuera generada a través de la liberación de los iones calcio intracelular activando subsecuentemente a los canales iónicos de Cl^- dependientes del Ca^{2+} en la membrana del ovocito.

El registro se hizo con el mismo procedimiento que en los registros anteriores, a un voltaje de -60 mV continuo y con los mismos neurotransmisores mencionados anteriormente (Fig. 33 a) como controles positivos, todas las fracciones y extracto crudo también mencionados en los registros anteriores a una concentración total 0.1 mg/ml; las concentraciones de proteínas se encuentran en la tabla 20. En las imágenes de la figura 33 b y c se puede ver el comparativo de la corriente que provocan las BTxs del extracto crudo en el mismo ovocito antes de ser inyectado y después de ser inyectado con EGTA.

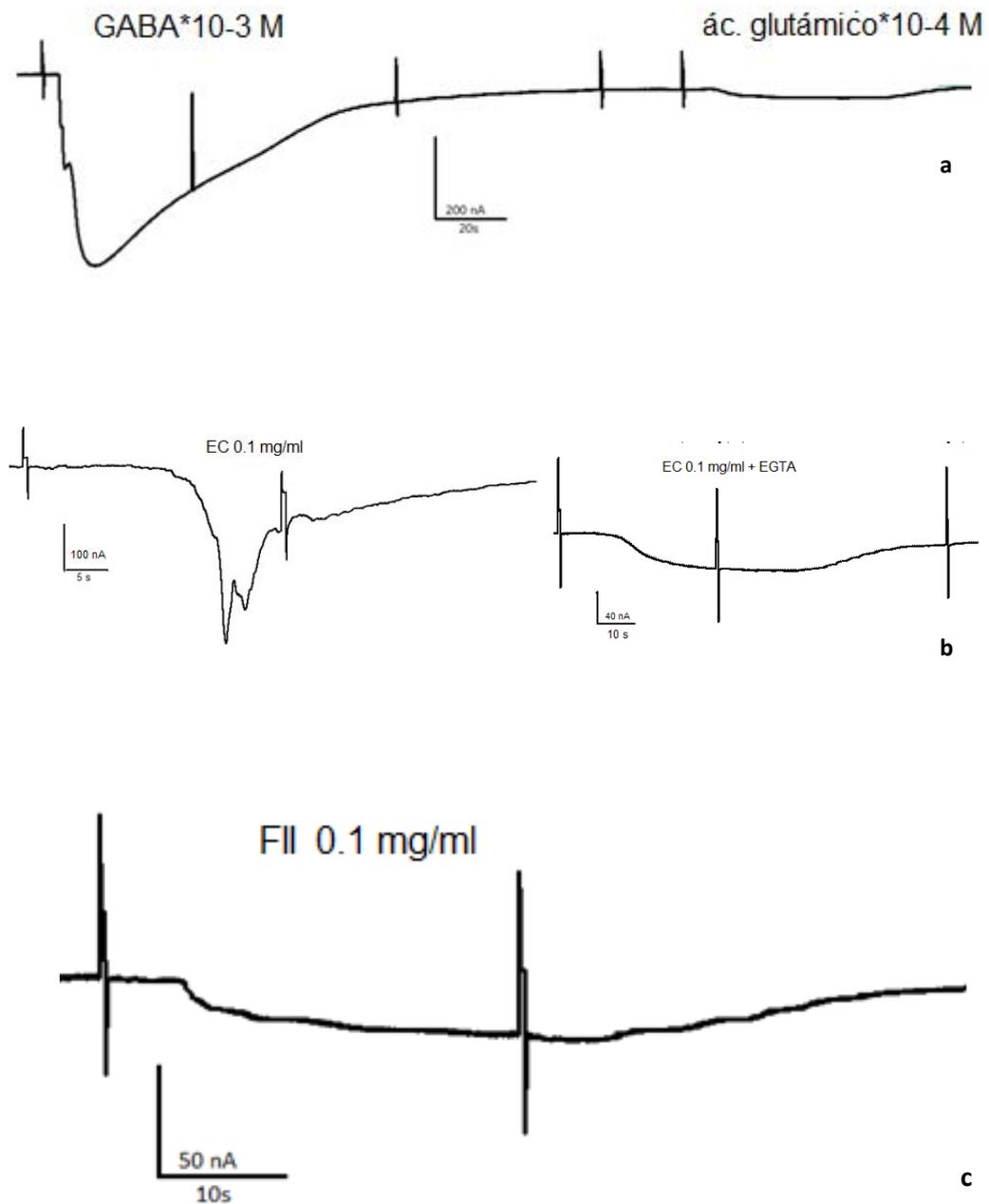


Fig. 33: En el registro a) se ven los neurotransmisores los cuales los ovocitos respondieron a ellos. En el registro b), se puede observar el mismo ovocito antes de ser inyectado y después de ser inyectado con EGTA con la misma concentración de EC a 0.1 mg/ml (49.9 μ g de proteína/ml). En la imagen del registro c) se puede ver el efecto de la FII a 0.1 mg/ml (23.6 μ g de proteína/ml) en el ovocito inyectado con EGTA.

Finalmente en la gráfica 34 a y b se representaron los picos de corriente lisa para los neurotransmisores y cada una de las fracciones.

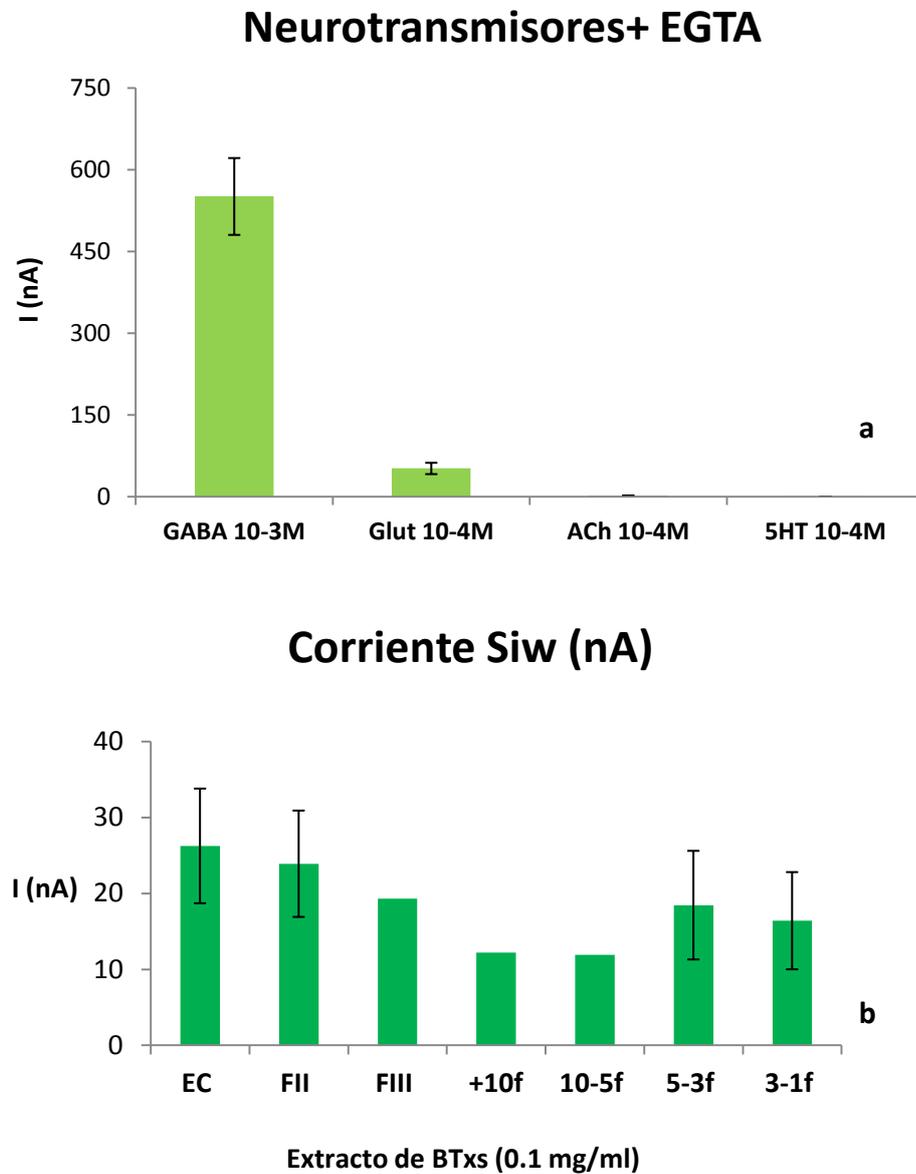
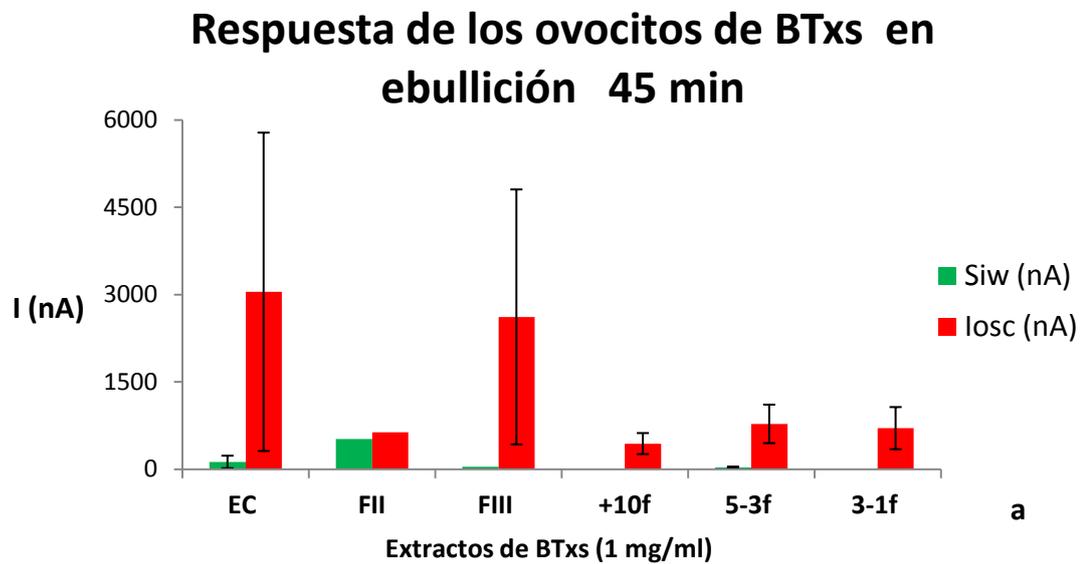


Fig. 34: Representación gráfica de los picos de corriente medidos en los registros de los controles positivos (a) y en las diferentes fracciones y extracto crudo (b) a una concentración de 0.1 mg/ml.

La gráfica de la figura 34 presenta el EC y otras fracciones con barra de error estándar con una n=3, sin embargo, hay tres columnas que no presentan barra de error, debido a que solo se hizo una vez y por tanto, no son representativas a diferencia de las otras.

Para finalizar con el protocolo de voltaje continuo a -60 mV, se quiso probar la naturaleza química de la proteína de cada uno de los extractos obtenidos en cromatografía, ultrafiltración y extracto crudo; se llevaron a ebullición las diferentes muestras a 98 °C durante 45 y 90 min. La cantidad de extracto que se usó fue de 1mg/ml para cada una de las fracciones probadas (Fig. 35); para saber la concentración de proteína véase la tabla 20.



Respuesta del ovocito a BTxs en ebullición 90 min

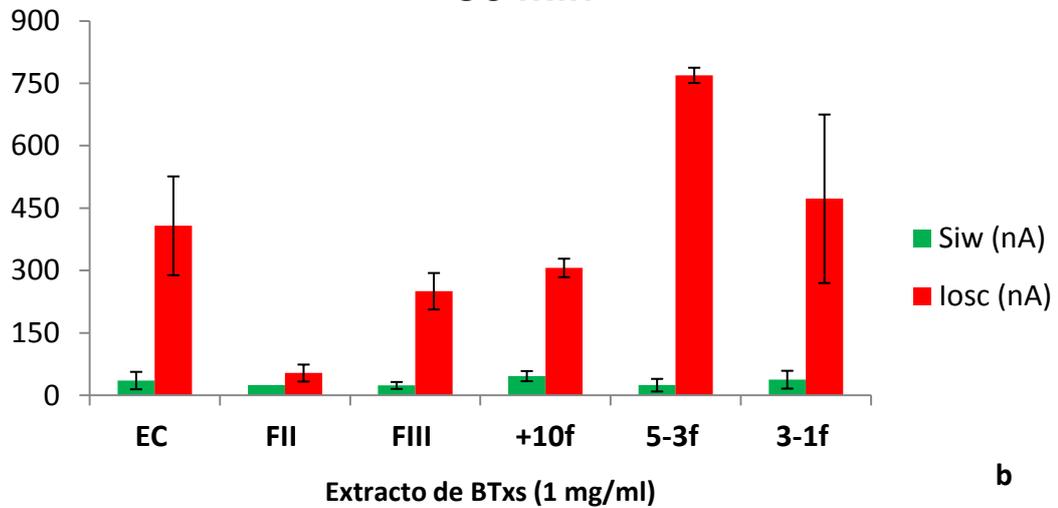
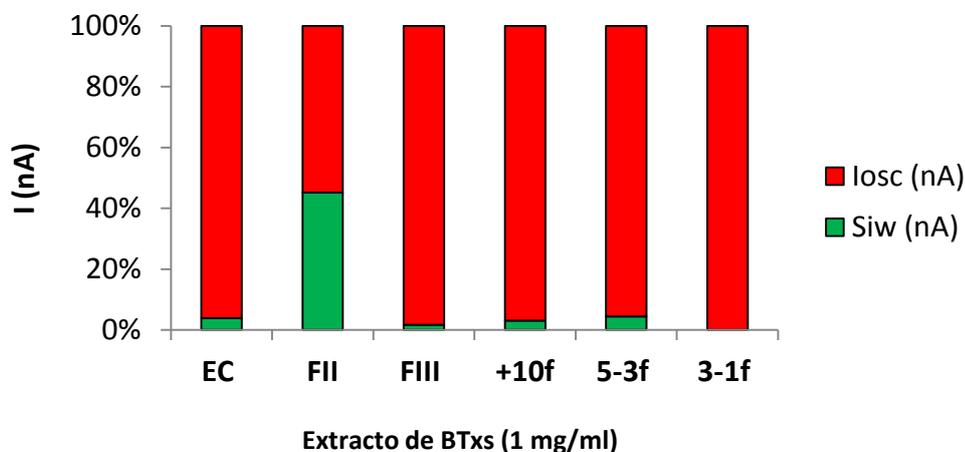


Fig. 35: Estas gráficas muestran los picos de corrientes que se midieron en los registros, con cada uno de los extractos de BTxs llevados a un punto de ebullición de 98 °C durante 45 min a) y a 90 min b).

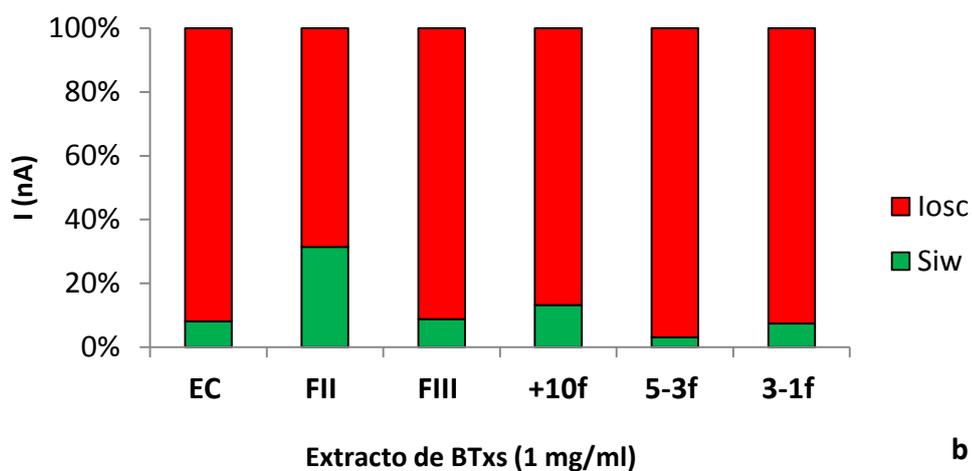
A pesar de este tratamiento, se siguieron observando dos tipos de corrientes lisa y oscilatoria (Fig. 35 a y b). Sin embargo se observó una disminución de la corriente lisa (Siw) exceptuando la fracción II donde se pudo observar que la corriente lisa era más notoria que en los demás registros ya que. La diferencia porcentual entre Siw e Iosc (Fig. 36 a y b) muestra que las BTxs de la FII tiene un porcentaje mayor de corriente lisa y frente a las demás fracciones. También se puede observar una disminución de pico de corriente oscilatoria en la fracción FIII para el extracto que fue llevado a ebullición durante 90 minutos.

Diferencia porcentual entre Siw e losc de extractos en ebullición 45 min



a

Diferencia porcentual entre Siw e losc de extractos en ebullición 90 min



b

Fig. 36: Gráfica representativa de la diferencia porcentual entre Siw e losc obtenida en los registros de extractos llevados a ebullición durante 45 min a) y 90 minutos b) a 98 °C.

En la figura 37 a y b hay algunos ejemplos de registros obtenidos con los extractos de BTxs llevados a ebullición 45 minutos y a 90 minutos.

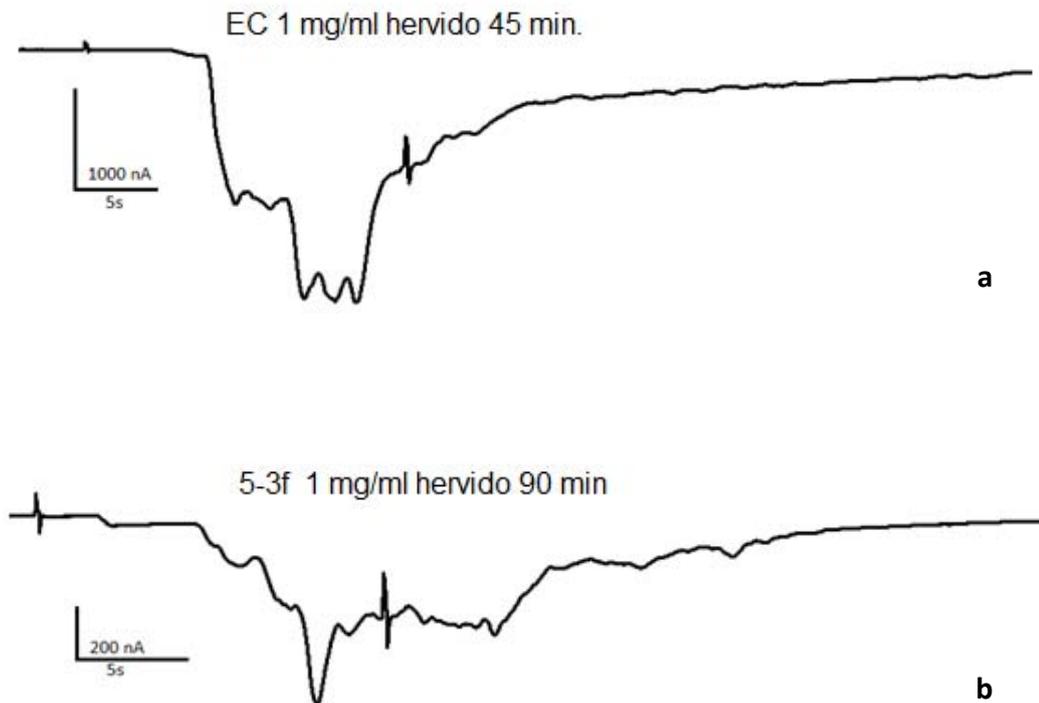


Fig. 37: Imagen de dos registros obtenidos en voltaje continuo (-60 mV). a) extracto crudo en ebullición durante 45 minutos a una concentración total de 1 mg/ml (499.2 μg de proteína/ml) b) fracción ultrafiltrada 5-3f en ebullición durante 90 min a concentración de 1 mg/ml (440.3 μg de proteína/ml). Los dos extractos fueron llevados al mismo punto de ebullición, 98 °C.

2) Curvas I-V

El otro protocolo que se aplicó fue el de curvas I-V, con la finalidad de poder relacionar el cambio de conductancia de la corriente principalmente lisa y además relacionarlo con el posible bloqueo de canales de Na^+ también observado en los registros I-V.

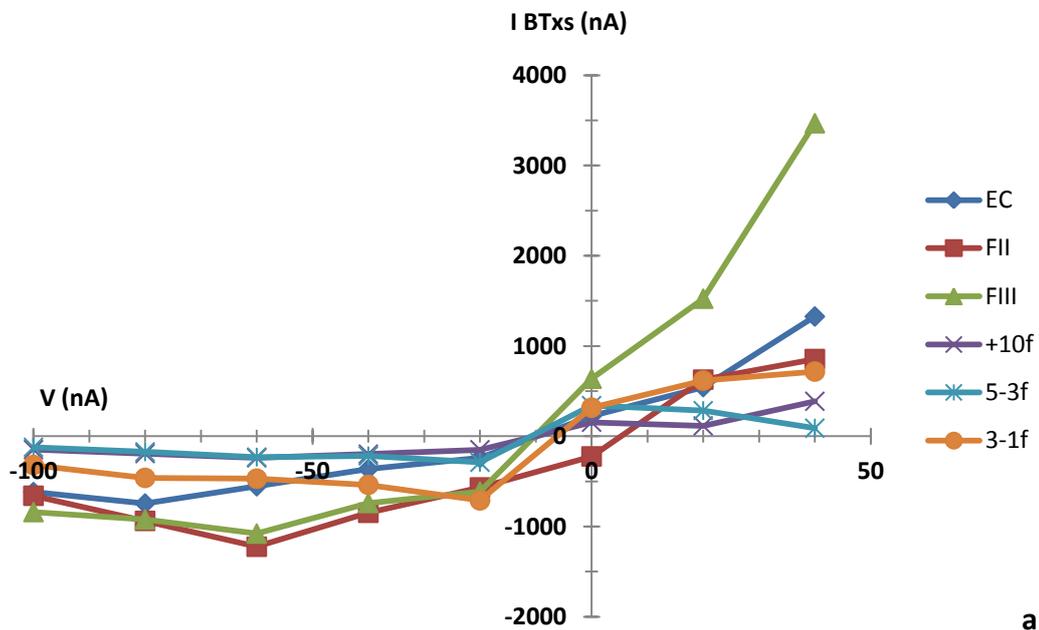
Se aplicaron pulsos de -100 a +40 mV (en incrementos de 20 mV) en ovocitos controlados a -100 mV.

Lo primero que se hizo fue graficar la relación corriente-voltaje de cada uno de los resultados de los registros de BTxs de los diferentes extractos con el fin de poder analizar mejor la corriente Siw . Para ello, primero se midieron las corrientes para cada voltaje antes de ser aplicadas las toxinas cuando la membrana no sufre ningún estímulo (control), luego se midió el pico de las corrientes para cada voltaje mientras fueron aplicadas las BTxs; finalmente se resta la corriente que generan BTxs del control para así poder discernir los

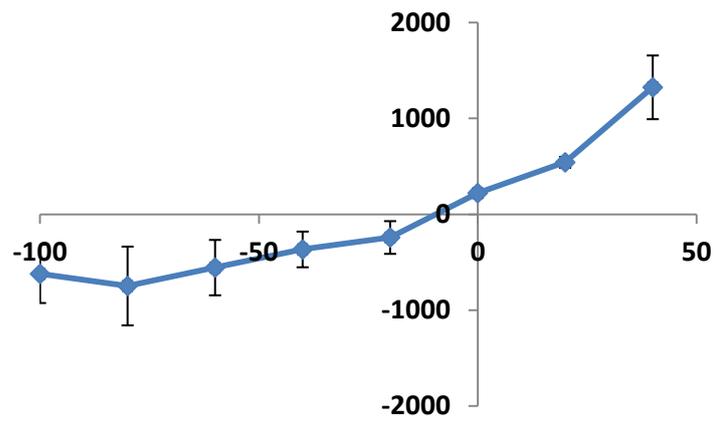
cambios provocados por las toxinas. En las siguientes gráficas I-V se pueden ver las corrientes provocadas por las BTxs de los diferentes extractos a una concentración de 0.1 mg/ml (Fig. 38 a), las respuestas de los ovocitos cuando fueron inyectados con EGTA (Fig. 39 a y b) y por último las corrientes de los extractos (1mg/ml) que fueron llevados a ebullición durante 45 min a 98°C (Fig. 40).

En la figura 38, lo que se hizo fue aislar las tres curvas I-V (Fig. 38 b, c y d) más importantes y se colocaron por separado para tener una mejor observación de la corriente que produjo cada una de las BTxs de los diferentes extractos. Se consideraron importantes el EC, la FIII (debido a que en todas las representaciones gráficas se observó que fue la que provocó mayor corriente oscilatoria) y la FII, que fue la que tuvo mayor corriente lisa a pesar de no ser la fracción con más potencia.

Curvas I-V BTxs

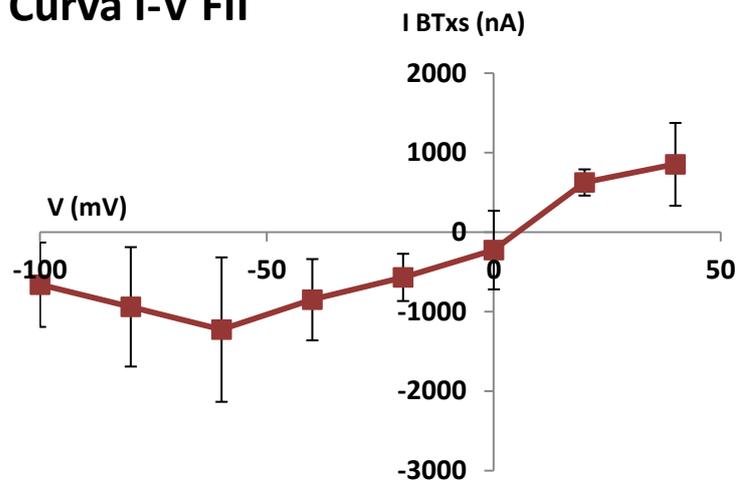


Curva I-V EC



b

Curva I-V FI



c

Curva I-V FIII

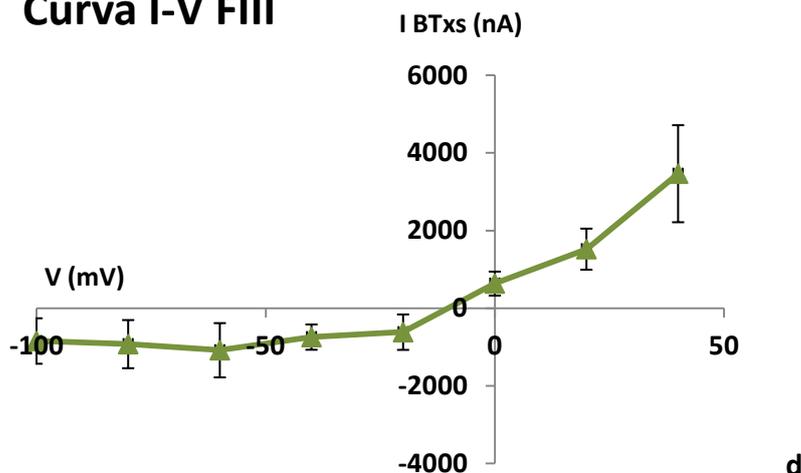
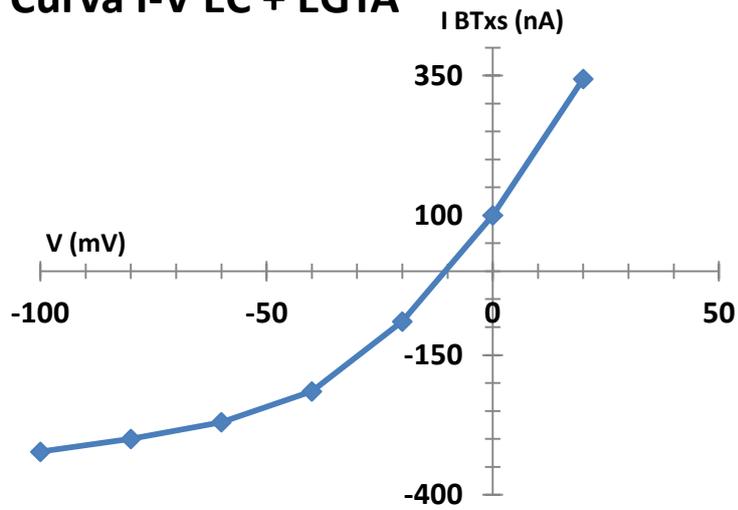


Fig. 38: En la gráfica (a) se representaron todas las curvas I-V, haciendo una comparación del efecto de las toxinas de cada extracto crudo o fracción a una concentración total de 0.1 mg/ml. Se muestra individualmente las curvas del EC (b), la fracción II (c) que es la fracción con mayor lisa (Siw) en los registros de voltaje continuo y la fracción III (d) que es la más potente y además la que tiene mayor corriente oscilatoria (Iosc) en los registros de voltaje continuo a -60 mV.

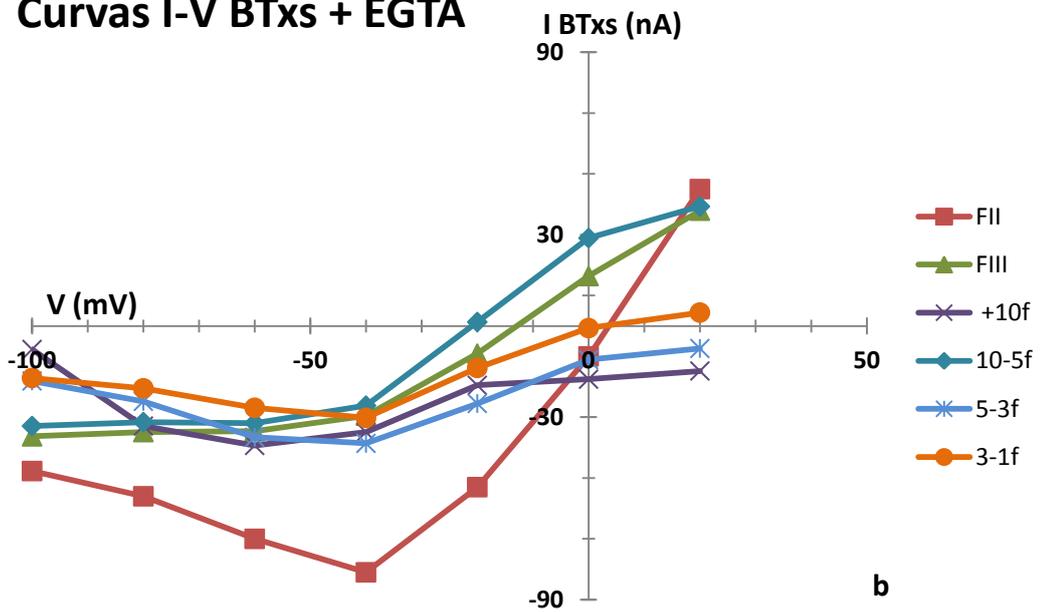
En la Fig. 39 se muestra las curvas I-V de los ovocitos que fueron inyectados con EGTA; la curva del EC está separada de las demás fracciones, debido a que, se usaron diferentes concentraciones. Para el extracto crudo se usó 1 mg/ml y para las demás fracciones se usó 0.1 mg/ml. La función del EGTA fue comprobar que la corriente Iosc era provocada por la liberación de calcio intracelular relacionada con los canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} .

Curva I-V EC + EGTA



a

Curvas I-V BTxs + EGTA



b

Fig. 39: En la gráfica a) se representó la corriente que produjeron las BTxs del EC, a una concentración de 1 mg/ml, en un ovocito inyectado con EGTA. En b) se graficó el efecto, también en un ovocito inyectado con EGTA, de las toxinas de cada una de las fracciones a una concentración de 0.1 mg/ml.

Por último se representaron gráficamente las corrientes que provocaron las BTxs de los extractos tanto fraccionados como crudo hervido con una concentración de 1 mg/ml durante 45 min a una temperatura de 98°C. Estos tratamientos nos sirvieron para saber un poco más de la naturaleza química de estas toxinas.

Curvas I-V BTxs hervidas

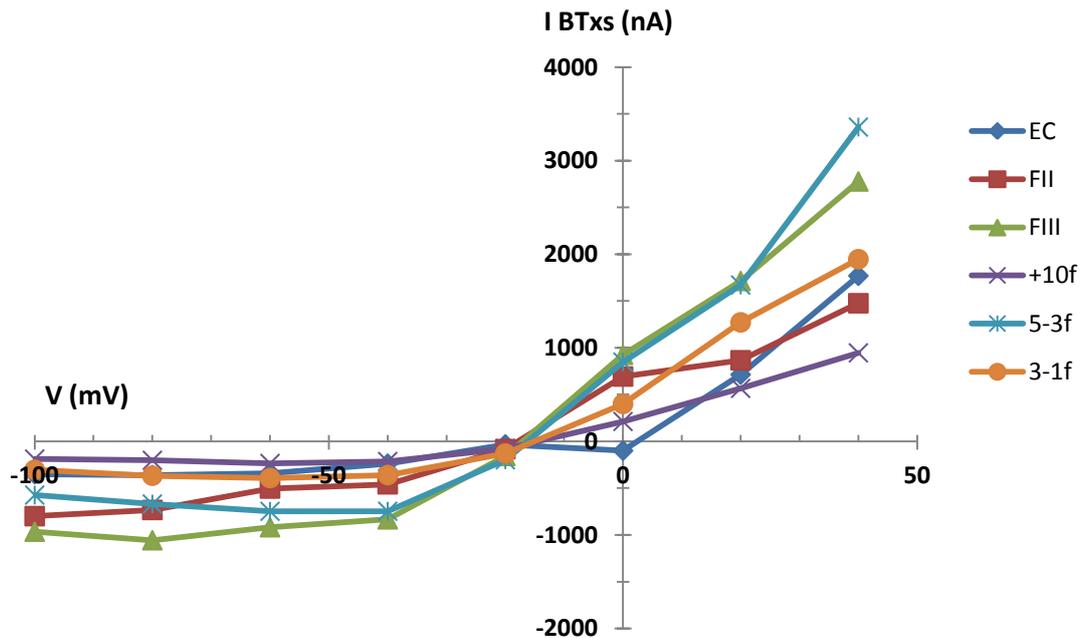


Fig. 40: Representación gráfica de las corrientes provocadas por BTxs en ebullición durante 45 min a una concentración de 1 mg/ml.

Con este protocolo observamos también un posible bloqueo de Na^+ que provocaron las toxinas. Esta también se registró para cada una de los extractos fraccionados como el extracto crudo. En la gráfica de la figura 40, se ve una representación del cambio de conductancia cuando BTxs bloquean el canal de sodio, para ello nos basamos en la FIII.

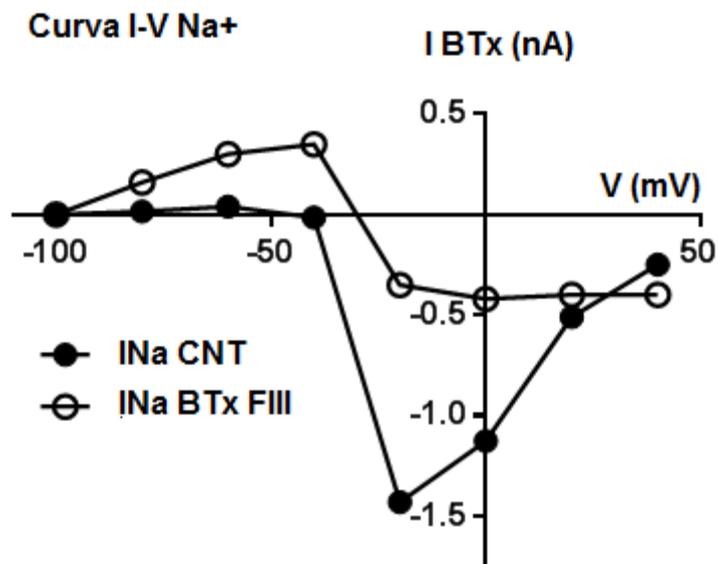


Fig. 41: Representación gráfica corriente-voltaje para observar el efecto sobre la corriente de sodio controlada (INa CNT) provocada por las BTx de la FIII.

A partir de los registros y los picos de corriente del sodio calculamos el porcentaje de bloqueo que provocaron las BTxs de cada uno de los extractos (Fig. 41)

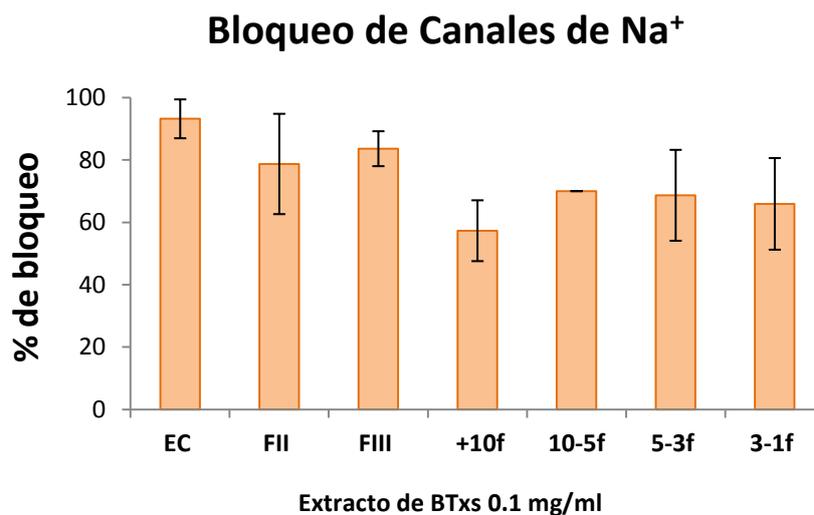


Fig. 42: Representación del bloqueo de los canales de sodio para los diferentes extractos obtenidos de *Bartholomea annulata* a 0.1 mg/ml.

En las figuras 43 y 44 se pueden observar algunos de los registros que se obtuvieron con diferentes extractos. El de la fracción III es el registro que representa la gráfica de la curva I-V en la figura 41.

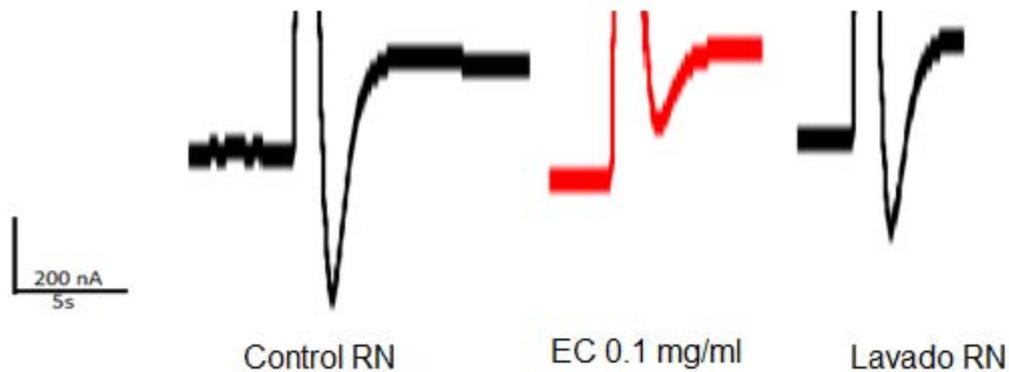


Fig. 43: Ejemplo de uno de los registros de bloqueo de los canales de Na^+ con extracto crudo a 0.1 mg/ml (concentración de proteína 49.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de extracto). Se observan tres picos de intensidad de corriente (I (nA)) diferentes, el primero es el considerado como control perfundido con Ringer Normal, el segundo pico donde se observa el bloqueo del canal de sodio por el efecto del extracto crudo y por último el pico de recuperación y lavado con RN.



Fig. 44: Ejemplo de uno de los registros donde se observó bloqueo de los canales de Na^+ con la fracción FIII obtenida por Sephadex G-50 a 0.1 mg/ml con una concentración de 17.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína/ml de extracto.

Este mismo protocolo de curvas I-V se aplicó para las muestras de los diferentes extractos que fueron hervidas durante 45 min a 1 mg/ml.

En la figura 45 se representó el porcentaje de bloqueo de los canales de Na^+ que se obtuvo a partir del suministro de los extractos pre-purificados, ultrafiltrados y crudo en ebullición.

Bloqueo de los Canales de Sodio

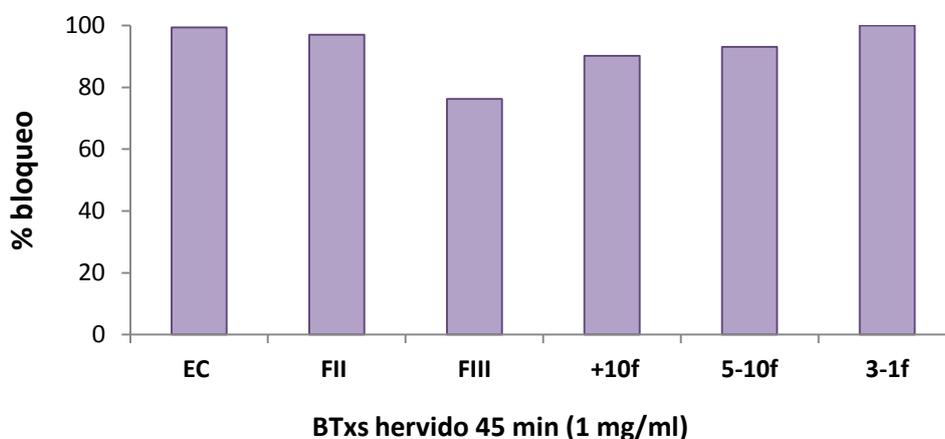


Fig. 45: Gráfica donde se representa el porcentaje de capacidad de bloqueo de Na_v que tuvieron los diferentes extractos en ebullición durante 45 min.

En la gráfica no se representó el error estándar como en las anteriores, debido a que este protocolo con las muestras hervidas durante 45 min solo se aplicó una vez a diferencia de los demás casos que se realizó por triplicado.

En la figura 46 se puede ver un ejemplo de uno de los registros que se obtuvieron cuando se aplicó el protocolo I-V para poder comprobar que además de tener efecto a un voltaje fijo de -60 mV mostrando los dos tipos de corrientes, también se quiso comprobar si tenía la capacidad de bloquear los canales de Na^+ .

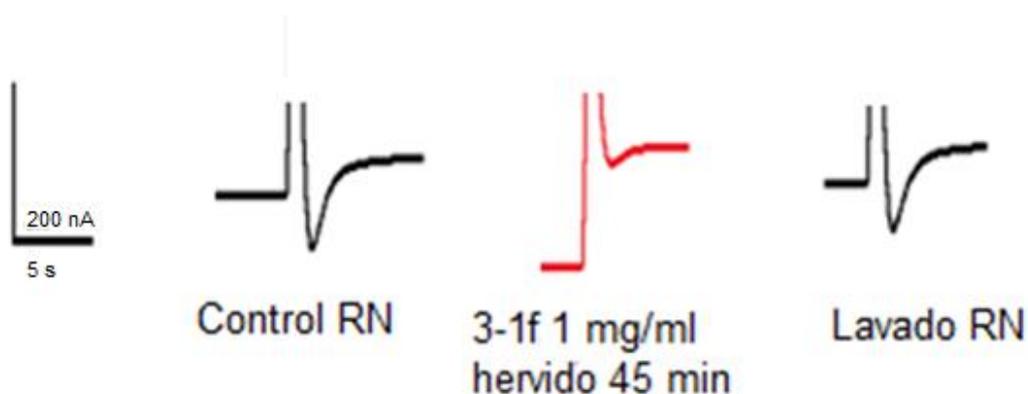


Fig.46: Ejemplo de uno de los registros donde se aplicó el protocolo I-V para comprobar la efectividad del bloqueo de los canales de Sodio con extracto (3-1 f) hervido durante 45 min.

8.5 Ensayo hemolítico

El ensayo hemolítico se realizó con extracto crudo y con las fracciones obtenidas de Sephadex G-50 M y con las de ultrafiltración. Además se hirvieron las fracciones +10f y la de 10-5f a 95 °C durante 20 min, con el fin de observar si las proteínas de mayor peso molecular eran menos termostables que las proteínas de menor peso molecular. Este experimento nos permitió mostrar que el veneno de *B. annulata* producía hemólisis en los eritrocitos de sangre humana. En la siguiente imagen (Fig. 47) se observa el porcentaje de hemólisis comparados con un control negativo (Alsever + eritrocitos) y un control positivo (H₂O + eritrocitos).

En la Fig. 47 se observa que ninguno de las fracciones ni el EC producen el 50% de hemólisis. Las fracciones UF tienen porcentajes similares y se ve como las fracciones UF que fueron llevadas a ebullición disminuye su actividad hemolítica. Por otra parte las fracciones obtenidas con Sephadex G-50 M tienen un patrón más coherente, debido a que FII tiene mayor actividad hemolítica que FIII, ya que consideramos que en FIII las toxinas tuvieron un efecto más parecido al neurotóxico que al citolítico.

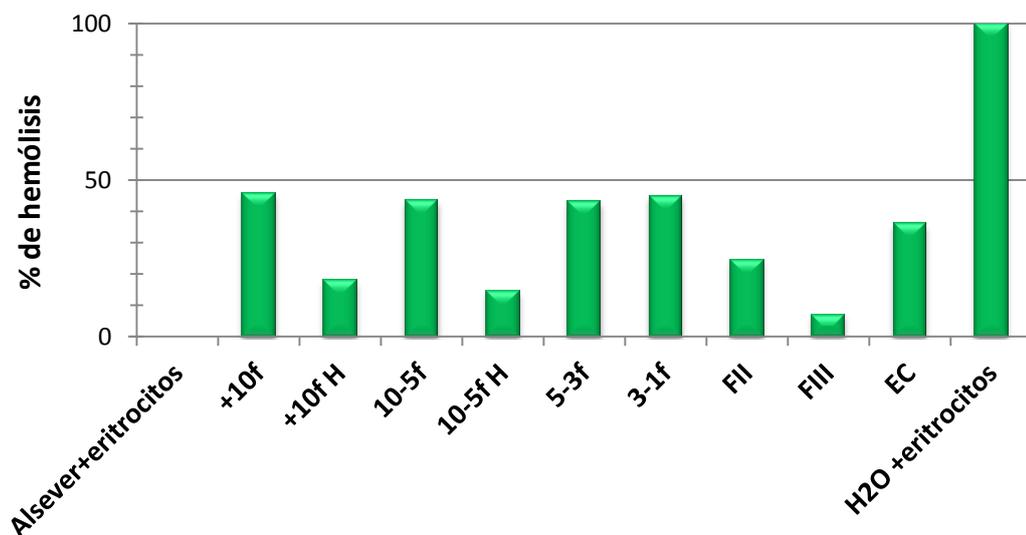


Fig 47: Porcentaje de hemólisis provocado en los eritrocitos de humano tratados con: el extracto crudo (124.8 µg), las muestras pre-purificadas sin hervir (+10f (36.07 µg); 10-5f (22.5 µg); 5-3f (22.01 µg); 3-1f (27.33 µg); FII (16.5 µg) y FIII (16.5 µg)) y las muestras pre-purificadas hervidas durante 20 min a 95 °C (+10f H (36.07 µg) y 10-5f (22.5 µg)).

9 Discusión

Identificación de cnidocistos

Una característica del phylum cnidaria es la presencia de unos orgánulos urticantes llamados nematocistos dentro de células especializadas denominados cnidocistos. Existe una gran variedad de tipos morfológicos de cnidocistos que sirve como un elemento para la clasificación taxonómica de estos organismos González-Muñoz, (2009) y Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2006 b). En el presente trabajo se identificaron los diferentes tipos de cnidocistos que, que permitieron confirmar la identidad de la anémona *B. annulata*. Tres de los cuatro tipos de cnidocistos identificados, están clasificados en la subcategoría de nematocistos que son, basitrichous isorhizas, microbásico p-mastigoforo y microbásico amastigoforo y un tipo está clasificado en la subcategoría de espirocisto, tal y como los clasificó Sánchez-Rodríguez y colaboradores en el 2006 (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2006 b). Obtener información bibliográfica del organismo identificando acerca de los compuestos químicos que presenta el organismo de estudio, puede ayudar a realizar un buen esquema de separación de metabolitos (Houssen & Jaspars, 2005)

Por otro lado, varias metodologías se han ensayado para lograr la descarga de los nematocistos; uno de los más sencillos y relativamente efectivo es el de congelación y descongelación de la anémona en agua desionizada (Kem *et al.*, 1989 y Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2006 b). En este trabajo se usó dicha metodología con una subsecuente maceración y sonicación, que optimizaron las descargas.

Rendimiento

Los inconvenientes que tiene el estudio de compuestos bioactivos en organismos marinos, es el bajo rendimiento que suelen proporcionar y la complejidad de su estructura molecular (Faulkner, 2000).

Para que se pueda obtener una cantidad de compuestos adecuada para estudios farmacológicos, es necesario recolectar un número considerable de organismos. Esto es debido a que contienen un porcentaje de agua alrededor del 90%, si no se pueden extraer más de 100 g de la especie que se va a estudiar es un indicativo de la dificultad de extracción de la especie y en consecuencia de la dificultad de obtener una cantidad importante de compuesto (Faulkner, 2000). Un ejemplo es el caso de la esponja localizada en Sudáfrica, *Spirastrella spinispirulifera* donde para conseguir el aislamiento de 10.7 mg de un compuesto antitumoral se necesitaron 2.5 toneladas de la esponja (Houssen & Jaspars, 2005).

La dificultad de síntesis de estos compuestos, como ya se mencionó anteriormente, los PNM suelen ser muy complejos donde implica muchos pasos para poder realizar su síntesis. Además, la extracción de grandes cantidades de organismos no solo afecta al ámbito económico sino que también puede provocar un impacto ambiental y desequilibrio en el sistema marino.

Para el caso de *B. annulata*, a partir de una muestra de 83 ejemplares, se determinó que esta especie tiene un rendimiento de extracto crudo de 8.13% en peso seco, considerando que un cnidario en promedio está formado por aproximadamente un 90-95% de agua aproximadamente, nos indica que el rendimiento de esta especie no es bajo el rendimiento, ya que se estima que el rendimiento del extracto crudo suele estar en un 10%.

Otro inconveniente es la abundancia de sales que pueden afectar los procesos de separación y disminuir el rendimiento (Houssen & Jaspars, 2005). Por un lado la metodología de ultrafiltración que se obtuvo un rendimiento total de extracto del 15% descartando la fracción menor a 1 kDa, por tanto si se tiene en cuenta que las sales se encuentran en pesos moleculares bajos (menor a 1 kDa), más del 50% que se perdió de la muestra podrían ser sales.

Por otro lado, en la separación con Sephadex G-50 M la FII es donde se obtuvo mayor rendimiento de todas las fracciones obtenidas por este método (Tabla 9); sin embargo, en el cromatograma se observó que la mayor conductividad se encontró en esta misma fracción (figura 15), lo que sugirió ser una fracción rica en sales.

Finalmente, el rendimiento obtenido por cromatografía de exclusión molecular y por ultrafiltración con membranas fue prácticamente el mismo, siendo 0.1% mayor el obtenido por ultrafiltración que la cromatografía con Sephadex G-50 M.

Neurotoxicidad

Béress y Zwick, (1980) en Sánchez-Rodríguez & Cruz-Vázquez (2006), estandarizaron el método para caracterizar la actividad biológica y los efectos fisiológicos que las neurotoxinas pueden producir, mediante la inyección en cangrejos. En el año 2001 Bruhn y colaboradores reportaron que *Anthopleura elegantissima* tuvo efectos tóxicos en cangrejos de la especie *Carcinus maenas*.

En este trabajo también se hicieron bioensayos en cangrejos de la especie *O. quadrata*, donde se inyectó tanto extracto crudo como las diferentes fracciones obtenidas en la separación cromatográfica por exclusión molecular así como el extracto obtenido por ultrafiltración. Este tipo de bioensayo también es reportado en Sánchez-Rodríguez *et al.*, (1996; 2005; 2006), donde también hicieron ensayos de neurotoxicidad en *O. quadrata*, tanto con extracto crudo como con fracciones activas obtenidas.

En el caso del presente estudio con *B. annulata*, 3 µg de proteína por gramo de cangrejo, fue la cantidad suficiente para poder ver el efecto neurotóxico, sin embargo, en otro trabajo de Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2006 b), se reportó que para *B. annulata* se usó una cantidad de 15 µg por cada organismo para ver la actividad, por lo tanto se usó más extracto para ver el efecto en los cangrejos que en este estudio. Además se hizo un ensayo de neurotoxicidad con tilapias con esta misma anémona donde la dosis letal media fue de 104 mg de proteína/Kg de organismo.

También se hicieron pruebas con las fracciones que fueron pre-purificadas por medio de cromatografía de filtración en gel, en Sephadex G-50 M (FI, FII y FIII), para comprobar en cuál de ellas se encontraba la actividad. Se observó que en FII una concentración de 0.5 µg por gramo de cangrejo fue suficiente para tener efecto en el cangrejo inyectado, en cambio, la fracción FI y FIII se usaron unas concentraciones mayores de proteína (21 µg de proteína/g de cangrejo y 3.3 µg

de proteína/g de cangrejo respectivamente) para que se pudiera observar un posible comportamiento neurotóxico. La FIII mostró efecto pero el cangrejo no murió, pudiéndonos indicar la ausencia de citolisinas, ya que si estas hubieran estado presentes el cangrejo habría muerto por efecto membranólítico.

Para el extracto filtrado con las membranas se observa actividad en un rango de entre 8-2 μg de proteína por gramo de cangrejo.

Se realizó un análisis de disección en los cangrejos inyectados con las fracciones ultrafiltradas, para observar los tejidos internos. Se vio que con los extractos de más de 10 y entre 10 y 5 kDa los organismos estaban degradados, donde se asume la presencia de posibles compuestos citolíticos, en cambio para los cangrejos inyectados con extracto de 5-3 y 3-1 kDa al abrirlos se vio que los órganos estaban prácticamente intactos, lo que podría sugerir la presencia de compuestos con actividad neurotóxicas.

No se puede hacer una comparativa de la potencia de las fracciones que se inyectaron en los organismos, debido a que las concentraciones de las fracciones de Sephadex G-50 no son las mismas que las concentraciones de las fracciones obtenidas por ultrafiltración, pero sí todas las fracciones mostraron actividad

Fosfolipasas

Los ensayos de actividad de fosfolipasas se hicieron para todos los tipos de extractos obtenidos hasta ahora. En la figura 13 se ve la actividad de extracto crudo, donde se observó que ésta empezó después de las 6 horas en el extracto de mayor concentración y a las 12 horas el de menor, indicando que en este caso la actividad es dependiente de la concentración, cuando mayor concentración menor es Pz. El Pz marca la actividad de forma descendente cuanto menor sea el Pz mayor es la actividad.

En el caso de las fracciones obtenidas por Sephadex G-50 M, como se muestra en la figura 16, la FII, empezó a aumentar su actividad transcurridas las 6 horas, la FI también muestra actividad más tardía después de las 12 horas y la FIII no mostró

actividad la cual en la gráfica se ve solapada con el blanco. Podríamos considerar que la razón de que FIII no tuviera actividad en fosfolipasas, es porque, contiene proteínas de pequeño peso molecular, donde según Norton (2009) y Honma & Shiomi (2006) clasificaron estas toxinas como neurotóxicas que pueden afectar tanto, canales de sodio como de potasio dependientes del voltaje y no citolíticas. Para las fracciones separadas por ultrafiltración, en la figura 18 se vio como todas las fracciones presentaron actividad, donde 10-5f mostró el crecimiento de los halos las primeras 3 horas. Pasadas 48 horas el extracto de + 10f KDa y el de 10-5f KDa se juntan en un mismo punto donde la actividad terminó siendo muy parecida para las fracciones +10f, 10-5f y 5-3f KDa.

Otro caso es el de 3-1 KDa, donde solo mostró una ligera actividad a las 48 horas y no en las primeras horas.

A diferencia de lo que se observó en los cangrejos de la ausencia de actividad citolítica en los extractos (5-3 y 3-1 KDa) cuando los cangrejos fueron diseccionados, en este ensayo se muestra que si hay presencia de fosfolipasas, se puede esperar que la concentración no sea tan elevada como en las demás extractos de pesos moleculares altos y por eso no se vio el efecto membranolítico en los órganos de los organismos. Asumiendo que las citolisinas como las clasificó Norton (2009) son de elevados pesos moleculares.

En estos ensayos, al igual que el caso anterior con la prueba de actividad biológica en cangrejos, tampoco se puede hacer una comparación de cuál es la fracción que tiene mayor actividad, debido a que las concentraciones de proteínas utilizadas para este experimento no fueron las mismas para todas las fracciones y por tanto, no sería representativo compararlas.

Geles SDS.PAGE

Los geles SDS-PAGE tanto de tricina como de glicina o conocido comúnmente como Laemmli SDS-PAGE cubren un rango de peso molecular de 500-1KDa. Según Schägger (2009), reportó que los geles de Laemmli SDS-PAGE son óptimos para proteínas con pesos moleculares mayores a 30 KDa y para pesos moleculares de menos de 30 KDa los geles de Tricina SDS-PAGE. En este caso se

vio como en el gel de tricina las bandas moleculares de bajo peso quedaron marcadas a diferencia de los geles de glicina, donde en las figuras 14 (a) y 17 se observa que los dos estándares usados se marcaron hasta un peso molecular de 15 KDa y las bandas de las proteínas tanto de extracto crudo como de las fracciones son más intensas por encima de los 15 KDa. Esto se debe a que el límite de apilamiento en el sistema de Laemmli es demasiado alto y la proteína de bajo peso molecular aparece más bien como una mancha cerca del gel que no es posible distinguir (Shägger, 2009).

En los geles SDS-PAGE de la figura 14 (a) se ven bandas en los pesos moleculares entre 150-100, 75,75-50, 50, 50-37, 37-20 KDa y ligeramente se observan bandas por debajo de los 15 KDa. En el año 2001 Sánchez-Rodríguez & Lucio-Martínez reportaron bandas visibles en pesos moleculares de 34,48 y 90-200 KDa, para la especie *Pelagia noctiluca*. Para *Carybdea marsupialis* Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2006) publicaron los pesos moleculares del extracto crudo de este cnidario perteneciente a la clase cubozoa obtenidos mediante electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970) al 12%, de 220, 97, 66, 45, 31, 31-20, 20, 20-14 y menos de 14 KDa. Donde supusieron que la actividad hemolítica del veneno de los nematocistos en los glóbulos rojos de oveja fue por causa de las proteínas marcadas entre 102 y 107 KDa.

Cabe decir que a pesar de tratarse de una comparación entre una anémona y dos especies de medusa hay rangos de peso moleculares que coinciden con *B. annulata*.

Debido a que en este trabajo el objetivo es la neurotoxicidad y como describió Norton (2009), las proteínas dependientes del voltaje de Na^+ y K^+ se encuentran en rangos de bajo peso molecular, se hizo un gel de tricina a un porcentaje del 16%. Estos geles cubren rangos de pesos moleculares de 1-100 KDa ofreciendo una alta resolución especialmente para las proteínas o péptidos de rangos moleculares bajos, a causa de que una concentración menor de acrilamida usada en los geles facilitan el corrimiento del contenido proteico.

Las bandas vistas en la figura 14 (b) son entre 250-100, 75-50, 37, 25, 25-15, 15-10, 10-5 y 5, lo cual se puede suponer que en alguna de estas bandas de bajo peso molecular podrían encontrarse las neurotoxinas que se quiere estudiar.

Además, los geles de glicina que se hicieron para las fracciones de ultrafiltración y de Sephadex G-50 M (fig. 17 y 19) muestran que no se realizó una buena separación, debido a que, lo que se esperaría es que las fracciones con altos pesos moleculares, tuvieran bandas marcadas en la parte superior del gel y a medida que las fracciones tuvieran menor peso molecular las bandas de la parte superior menos marcadas y más intensas en la parte inferior. En el caso de los geles cargados con las fracciones de ultrafiltración, todos presentan bandas muy similares.

Ensayos electrofisiológicos

En los ensayos realizados con el modelo de ovocito de la especie *Xenopus laevis* se observó principalmente que los ovocitos nativos tenían una respuesta muy pequeña, donde la corriente no fue mayor a 0.8 nA, frente a los que estaban microinyectados con el RNAm de cerebro de rata, así que podríamos sugerir que estas toxinas son más específicas en receptores o canales iónicos que están relacionados con el sistema nervioso. En el trabajo de Torres y colaboradores, 2001 ellos probaron efectos de la medusa *C. xamachana* en ovocitos nativos es decir, no microinyectados con RNAm. Esto puede ser debido a que los ovocitos son unas células que contienen gran diversidad de canales iónicos y receptores nativos que responden a diferentes neurotransmisores, hormonas y péptidos (Arellano *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 2001).

Otras observaciones que se hicieron es que básicamente el ovocito al ser suministrado el veneno pre-purificado como el extracto crudo tuvo dos comportamientos en las corrientes. El primero es que, inmediatamente después de perfundir el veneno se observó una corriente entrante lisa (Siw), donde no se puede explicar a que es debido ese efecto, ya que se necesitan realizar más experimentos para poder caracterizar el tipo de corriente. El segundo comportamiento es la observación de una corriente también entrante oscilatoria que se podría pensar que son debidas a la liberación de calcio intracelular, debido a la activación de los receptores acoplados a proteínas G, las cuales

resultan ser estimuladoras de las fosfolipasas C provocando un aumento en la síntesis de IP3 y así liberar calcio intracelular. Este caso también fue reportado en Torres y colaboradores, 2001 debido a que el veneno de la medusa estudiada también provocaba una corriente oscilatoria la cual se sugirió que provenía de la liberación del calcio intracelular, debido a que se hicieron pruebas incubando los ovocitos con BAPTA, agente quelante que evita la liberación del calcio y por tanto, que no se exprese la corriente oscilatoria. Este proceso se hizo en el caso de la anémona *B. annulata* donde se inyectó el ovocito con un agente quelante EGTA inhibidor de la liberación de calcio, donde también se observó el mismo efecto en la corriente que en el trabajo de Torres y colaboradores, 2001; donde desapareció la oscilatoria y sólo se presentó la corriente lisa.

Al igual que en el trabajo de Torres *et al.*, 2001 se observó que cada uno de los ovocitos tenía una respuesta diferente con respecto a la intensidad de corriente, a pesar de que todos seguían el mismo patrón, primero una corriente lisa y seguido una oscilatoria, debido a eso se hicieron varios registros para cada extracto y a diferentes concentraciones, donde se logró promediar las intensidades de corriente y calcular su error estándar. Se puede decir que no se encontró una relación entre la concentración de proteína y el efecto, es decir, en FIII se observa que es el que tiene menor concentración de proteína y sin embargo es el que normalmente mostró mayor efecto de corriente oscilatoria incluso que el extracto crudo.

Otro experimento que se hizo fue comprobar la estabilidad de las proteínas que se encuentran en el veneno de *B. annulata* para ello se hirvieron las muestras a 98°C durante 45 y 90 minutos y se vio que seguían mostrando efecto y se pudieron identificar los dos tipos de corrientes (Siv e Iosc), esto se podría deber a la gran estabilidad de los puentes disulfuros de las proteínas presentes en el veneno.

Por último se hicieron curvas I-V para analizar mejor la corriente lisa, debido a que, la corriente oscilatoria ya teníamos indicios depende de los canales de calcio dependientes del cloro, sin embargo, la corriente lisa observando las curvas I-V donde la corriente se hace cero a un potencial de -20 mV, podemos deducir que

lo que provocaron las BTxs fue abrir todos los canales, creando una corriente inespecífica.

Además se midieron los picos de corriente, para poder ver la capacidad de bloqueo de los canales de sodio dependientes del voltaje, donde se observó que tanto, los extractos hervidos como los que no estaban hervidos tuvo un gran porcentaje de bloqueo del canal.

10 Conclusiones

- Cuatro tipos de cnidocistos permitieron confirmar la identidad taxonómica de *B. annulata*.
- Se obtuvo un rendimiento de extracto crudo del 8.13% de peso seco, pudiendo sugerir que es un rendimiento óptimo sabiendo que esta cerca del rendimiento promedio de extracto crudo de otros organismos marinos.
- El extracto ultrafiltrado con membranas de corte obtuvo un rendimiento de 36.3 % y el extracto pre-purificado con cromatografía de exclusión molecular se obtuvo un rendimiento de 32.26 %. En el caso de la separación por exclusión molecular se observa mayor rendimiento en el FII a pesar de su baja concentración de proteínas y en la ultrafiltración el mayor rendimiento se observa en el extracto menor a 1 kDa, pudiendo sugerir que en estas dos fracciones es donde se encuentra la mayor presencia de sales.
- Todos los cangrejos que fueron inyectados con los diferentes extractos obtenidos mostraron actividad, donde se observó que los extractos ultrafiltrados tuvieron una mayor efectividad en un menor tiempo.
- El ensayo de fosfolipasas mostró la presencia de halos de actividad en extracto crudo y los extractos pre-purificados. La FII resultó ser la más activa sin embargo, no se puede hacer una comparación de actividad entre los extractos debido a la diferencia de concentraciones de proteínas que presentan cada una de las fracciones.
- En la electroforesis no se observó una separación clara debido a la presencia de bandas de diferentes rangos de pesos moleculares, tanto en los extractos pre-purificados como filtrados con las membranas de corte.
- En los registros electrofisiológicos, se obtuvo una mayor respuesta en los ovocitos de *Xenopus laevis* microinyectados con RNAm de cerebro de rata, donde podríamos sugerir que los diferentes extractos usados en este modelo, afectan a células relacionadas con el sistema nervioso.
- Los ovocitos inyectados con el agente quelante (EGTA) mostraron la pérdida de la corriente oscilatoria (Iosc) y la presencia de la corriente lisa, sugiriendo que Iosc está relacionada con la liberación de calcio intracelular.
- Las proteínas propias del veneno de *B. annulata* son termoestables.
- Las curvas I-V mostraron una corriente inespecífica, debido a que se hace cero a un potencial de -20 mV.
- Se observó un bloqueo probablemente relacionada con canales de sodio.

- Los ensayos de actividad hemolítica fueron positivos para los diferentes extractos, observando que las muestras que fueron hervidas redujeron su actividad asumiendo que podrían haberse degradado las proteínas de alto peso molecular.

11 Bibliografía

- Anderluh, G., Macek, P., 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 40, 111–24.
- Arellano, R.O., Woodward, R.M., Miledi, R., 1996. Ion Channels. *Ion channels*, Springer US 203–259. doi:10.1007/978-1-4899-1775-1
- Béress, L., Zwick, J., 1980. PURIFICATION OF TWO CRAB-PARALYSING POLYPEPTIDES FROM THE SEA ANEMONE BOLOCERA TUEDIAE. *Mar. Chem.* 8, 333–338.
- Bergillos Gasi3n, F., Rivas Fern3ndez, M.A., 2013. TOXINOLOGIA CLINICA. LESIONES POR PICADURAS Y MORDEDURAS DE ANIMALES, Volume 1. Bubok.
- Birnbaum, S.G., Varga, A.W., Yuan, L.-L., Anderson, A.E., Sweatt, J.D., Schrader, L.A., 2004. Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol. Rev.* 84, 803–833. doi:10.1152/physrev.00039.2003
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G., Prinsep, M.R., 2012. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 29, 144–222. doi:10.1039/c2np00090c
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Campbell, N.A., Reece, J.B., 2007. *Biolog3a*. Ed. M3dica Panamericana.
- Castañeda, O., Harvey, A.L., 2009. Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. *Toxicon* 54, 1119–1124. doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.032
- Collins, A.G., Daly, M., 2005. A new deepwater species of stauromedusae, *Lucernaria janetae* (Cnidaria, Staurozoa, Lucernariidae), and a preliminary investigation of stauromedusan phylogeny based on nuclear and mitochondrial rDNA data. *Biol. Bull.* 208, 221–230.
- Daly, M., Brugler, M.R., Cartwright, P., Collins, A.G., Dawson, M.N., Fautin, D.G., France, S.C., McFadden, C., Opresko, D.M., Rodriguez, E., Romano, S.L., Stake, J.L., 2007. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus.
- Dubois, J., Tanguy, J., Burnett, J., 1983. Ionic Channels Induced By Sea Nettle Toxin in the nodal membrane. *Biophys. J.* 42, 199–201.
- Dumont, J.N., 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136, 153–79. doi:10.1002/jmor.1051360203
- Dunn, D.F., 1982. *Cnidaria. Synopsis Classif. Living Org.*

- Faulkner, D.J., 2000. Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 77, 135–145. doi:10.1023/A:1002405815493
- Frazão, B., Vasconcelos, V., Antunes, A., 2012. Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Mar. Drugs* 10, 1812–1851. doi:10.3390/md10081812
- Garateix, A., 2005. El mar: fuente de fármacos. *Elementos* 12, 39–47.
- González-Muñoz, R.E., 2009. p r e s e n t a. Anémonas (Anthozoa Actinaria, Corallimorpharia y Zoanthidea) del Arrecife Puerto Morelos, Quintana Roo.
- Gutierrez Ravelo, A., Estevez Braun, A., 2009. Relevancia De Los Productos Naturales En El. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat* 103, 409–419.
- Habermann, E., Hardt, K.L., 1972. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal. Biochem.* 50, 163–173. doi:10.1016/0003-2697(72)90495-2
- Hill, R.W., Wyse, G.A., 2006. *Fisiología Animal*. Ed. Médica Panamericana.
- Honma, T., Shiomi, K., 2006. Peptide toxins in sea anemones: Structural and functional aspects. *Mar. Biotechnol.* 8, 1–10. doi:10.1007/s10126-005-5093-2
- Houssen, W.E., Jaspars, M., 2005. Isolation of Marine Natural Products. *Nat. Prod. Isol.* 20, 353–390. doi:10.1007/978-1-61779-624-1_14
- Hymen, L., 1940. *The Invertebrates: Protozoa through Ctenophora*.
- Jennison, B.L., 1981. Reproduction in three species of sea anemones from Key West, Florida. *Can. J. Zool.* 59 (9), 1708–1719.
- Kass-Simon, G., Scappaticci, Jr., A.A., 2002. The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Can. J. Zool.* 80, 1772–1794. doi:10.1139/z02-135
- Kem, W.R., Parten, B., Pennington, M.W., Price, D.A., Dunn, B.M., 1989. Isolation , Characterization , and Amino Acid Sequence of a Polypeptide Neurotoxin Occurring in the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 28, 3483–3489.
- Kihara, H., Anraku, M., Ohno, M., Hashimura, S., 1988. Tetrodotoxin-unaffected depolarization of frog muscles induced by the venom of jellyfish (Genus *aurelia*). *Jpn. J. Physiol.* 38, 839–849. doi:10.2170/jjphysiol.38.839
- Klyshko, E. V, Issaeva, M.P., Monastyrnaya, M.M., Il'yna, A.P., Guzev, K. V, Vakorina, T.I., Dmitrenok, P.S., Zykova, T.A., Kozlovskaya, E.P., 2004. Isolation, properties and partial amino acid sequence of a new actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon* 44, 315–24. doi:10.1016/j.toxicon.2004.06.006
- Lazcano-Pérez, F., Vivas, O., Román-González, S. a., Rodríguez-Bustamante, E., Castro, H., Arenas, I., García, D.E., Sánchez-Puig, N., Arreguín-Espinosa, R., 2014. A purified

- Palythoa venom fraction delays sodium current inactivation in sympathetic neurons. *Toxicon* 82, 112–116. doi:10.1016/j.toxicon.2014.02.013
- Llosa, Z.B., 2003. *Zoología General*.
- Mariscal, R., 1974. Nematocysts. *Coelenterate Biol. Rev.* ... 129–178.
- Mariscal, R., Bigger, C., McLean, R., 1976. The Form and Function of Cnidarian Spirocysts. *Cell Tissue Res.* 474, 465–474. doi:10.1007/bf00215997
- Mariscal, R.N., McLean, R.B., Cadet, H., 1977. Cell and Tissue The Form and Function of Cnidarian Spirocysts. *Cell Tissue Res.* 178, 427–433.
- Marques, A.C., Collins, A.G., 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebr. Biol.* 123, 23–42. doi:10.1111/j.1744-7410.2004.tb00139.x
- Molinski, T.F., Dalisay, D.S., Lievens, S.L., Saludes, J.P., 2009. Drug development from marine natural products. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 69–85. doi:10.1038/nrd2487
- Morales-Landa, J.L., Zapata-Pérez, O., Cedillo-Rivera, R., Segura-Puertas, L., Simá-Alvarez, R., Sánchez-Rodríguez, J., 2007. Antimicrobial, Antiprotozoal, and Toxic Activities of Cnidarian Extracts from the Mexican Caribbean Sea. *Pharm. Biol.* 45, 37–43. doi:10.1080/13880200601026325
- Moran, Y., Gordon, D., Gurevitz, M., 2009. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels--molecular and evolutionary features. *Toxicon* 54, 1089–101. doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.028
- Norton, R.S., 1991. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* 29, 1051–1084. doi:10.1016/0041-0101(91)90205-6
- Norton, R.S., 2009. Structures of sea anemone toxins. *Toxicon* 54, 1075–88. doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.035
- Rodríguez-Martínez, R.E., Ruíz-Rentería, F., van Tussenbroek, B., Barba-Santos, G., Escalante-Mancera, E., Jordán-Garza, G., Jordán-Dahlgren, E., 2010. Environmental state and tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 58, 23–43.
- Rottini, G., Dobrina, a, Forgiarini, O., Nardon, E., Amirante, G. a, Patriarca, P., 1990. Identification and partial purification of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. *Infect. Immun.* 58, 3751–3758.
- Salceda, E., Ortega, A., 2009. Neurotoxinas : SIGNIFICADO BIOLÓGICO y mecanismos de acción. *Elementos* 74, 29–37.
- Sánchez-Rodríguez, J., Cruz-Vazquez, K., 2006. Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860). *Arch. Toxicol.* 80, 436–441. doi:10.1007/s00204-006-0059-3

- Sanchez-Rodríguez, J., Lucio-Martínez, N., 2011. Isolation and prepurification of active compounds in venom from *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa: Pelagiidae) from the Caribbean Sea. *Ciencias Mar.* 37, 369–377. doi:10.7773/cm.v37i3.1893
- Sánchez-Rodríguez, J., Torrens, E., Segura-Puertas, L., 2006. Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolytins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom. *Arch. Toxicol.* 80, 163–168. doi:10.1007/s00204-005-0023-7
- Sánchez-Rodríguez, J., Zugasti, A., Santamaría, A., Galván-Arzate, S., Segura-Puertas, L., 2006. Isolation, partial purification and characterization of active polypeptide from the sea anemone *Bartholomea annulata*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 99, 116–121. doi:10.1111/j.1742-7843.2006.pto_428.x
- 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. doi:10.1016/S0300-483X(02)00035-5
- Schägger, H., 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 16–22. doi:10.1038/nprot.2006.4
- Sherwood, L., 2011. *Fisiología humana: de las células a los sistemas.*
- Tejuca, M., Anderluh, G., Dalla Serra, M., 2009. Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon* 54, 1206–14. doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.025
- Terlau, H., Olivera, B.M., 2004. Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* 84, 41–68. doi:10.3109/15569548509014416
- Torres, M., Aguilar, M.B., Falcón, A., Sánchez, L., Radwan, F.F.Y., Burnett, J.W., Heimerde la Cotera, E.P., Arellano, R.O., 2001. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon* 39, 1297–1307. doi:10.1016/S0041-0101(01)00081-2
- Wanke, E., Zaharenko, A.J., Redaelli, E., Schiavon, E., 2009. Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltage-gated sodium channel isoforms. *Toxicon* 54, 1102–11. doi:10.1016/j.toxicon.2009.04.018
- Zeiller, W., 1974. *Tropical marine invertebrates of southern Florida and the Bahama Islands.*