



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

EFFECTOS DE LAS NEUROTOXINAS CONTENIDAS EN EL VENENO DE
***Bartholomea annulata* SOBRE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DEL**
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE MAMÍFEROS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
(QUÍMICA ACUÁTICA)

PRESENTA:
ANTÒNIA MARIA COLOM CASASNOVAS

TUTORA PRINCIPAL
DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)

COMITÉ TUTOR
DRA. MÓNICA A. TORRES RAMOS
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ
(INNNMVS)
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA (UNAM)
DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)
DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)

PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, MÉXICO
DICIEMBRE, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**EFFECTOS DE LAS NEUROTOXINAS CONTENIDAS EN EL VENENO DE
Bartholomea annulata SOBRE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DEL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE MAMÍFEROS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
(QUÍMICA ACUÁTICA)

PRESENTA:
ANTÒNIA MARIA COLOM CASASNOVAS

TUTORA PRINCIPAL
DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)

COMITÉ TUTOR
DRA. MÓNICA A. TORRES RAMOS
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ
(INNNMVS)
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA (UNAM)
DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)
DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)

PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, MÉXICO
DICIEMBRE, 2022

Dedicat a sa meva padrina d'en Rasqui...Bon viatge padrina

Papi, mami, Bartu i Eli simplement...GRÀCIES

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado con N° de becario 517866.

Al proyecto PAPIIT-UNAM IN217420 por su apoyo económico

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, a la Coordinadora Dra. Claudia Ponce de León y al personal administrativo; Diana, Lupita, Yazmín, Gabriela y Belem.

A la Universidad Autónoma Nacional de México

A la Dra. Judith Sánchez Rodríguez con el proyecto PAPIIT-UNAM IN 217420, por creer en mi y además brindarme su apoyo a lo largo de estos años tanto en el trabajo como a nivel personal, estaré siempre muy agradecida.

Al Instituto de Neurobiología Campus Juriquilla

Al Dr. Manuel Aguilar Ramírez con proyecto PAPIIT-UNAM IN208617 y al Dr. Rogelio Arellano Ostoia con proyecto PAPIIT-UNAM IN203519, por haberme dado un espacio en sus respectivos laboratorios y haberme brindado todo su apoyo para realizar los experimentos necesarios para concluir este proyecto.

A la Dra. Edith Garay Rojas por su apoyo técnico, por sus enseñanzas, su dedicación, paciencia y todo el apoyo personal que me ha dado durante todos estos años y que espero que así siga siendo. Gracias por siempre estar atenta, por tus palabras y cuidarnos a todos como si fuéramos uno más de tu familia.

Al Dr. Abraham Cisneros Mejorado por haberme ayudado y transmitido todos sus conocimientos en cultivos de neuronas y por siempre brindarme su amistad.

Al Biol. Andrés Falcón por su apoyo técnico en la separación de los extractos de *B. annulata* y por su gran ayuda a la solución de millones de problemas que surgieron en el día a día en el laboratorio sin nunca dejar de sonreír.

Al Dr. Roberto Arreguín del Instituto de Química y al Dr. Fernando Lazacano por haberme apoyado en los análisis de espectrometría de masas y secuenciación.

Al Comité Jurado integrado por la Dra. Mónica Torres Ramos, Dr. Roberto Arreguín, Dr. Manuel Aguilar y el Dr. Rogelio Arellano Ostoia por sus observaciones, comentarios y consejos que me han dado durante estos años.

Al Capitán Amaury, M. en C. Sergio Wendoline, M. en C. Amanda Pérez, M. en C. Edgard Escalante, M. en C. Miguel Ángel Gómez y a la Lic. Mariela, ya que han sido un factor clave en el trabajo del muestreo de *B. annulata*, sin su ayuda hubiera sido muy difícil llevar a cabo el trabajo.

Dra. Arisaí del Carmen Hernández por su apoyo en el laboratorio y ser una gran amiga.

Al Dr. Raúl Castillo por haberme ayudado en el área experimental y haberme dado muy buenos consejos, además de haber sido parte importante de mi vida durante este camino.

A Yamir Sánchez por haber aportado unas fotos muy bonitas de *B. annulata*.

A la M. en C. Aleida Flores porque a pesar de la distancia hemos conservado una bonita amistad y ser una gran confidente. Gracias Ale por escucharme, aconsejarme y animarme siempre.

Al Dr. Pablo Ordaz por la ayuda en las inyecciones de los ovocitos y por darle el sabor cubano al laboratorio.

A todos los compañeros que han pasado tanto por el laboratorio de Toxinología Marina, Neurofisiología Celular y Neurofarmacología Marina.

A mi familia que se elige, son los pilares que se necesitan cuando estás lejos de casa; Bolita, Gaby, Erika, Cindy y Fidel.

A Eli por darme todo su amor incondicional, por escucharme, por darme consejos, por hablar siempre conmigo, por no olvidarse de mis virtudes y aceptar mis defectos, por darle valor a todo lo que hago (incluidas mis canciones inventadas); simplemente gracias por siempre estar.

A mis amigas a la distancia que a pesar de que pasen años sin vernos, siempre están ahí; Mary, Gema, Eurnis, Lluca, Kimi, Magda, Ani, Eli y Elisa.

A mi familia Colom y Casasnovas, a mi abuela Antonia nunca olvidaré su sonrisa y el sabor de su sopita de pollo y a mi abuela Magdalena por siempre haberme consentido y haberse alegrado por cada logro conseguido.

A mi hermano Bartu que a pesar de ser un hombre de pocas palabras sé que soy su hermana preferida y cuando lo necesito está ahí.

A mi Cuchita y Vitocha

Y por último mi agradecimiento más especial para mi madre y para mi padre por haber confiado siempre en mí, por haberme dado todo su apoyo y cariño mallorquín, por decirme siempre que todo va a estar bien a pesar de que puede ser que no lo esté, pero sobre todo por entender que los sueños tienen que perseguirse a pesar de los km de mar que nos separan.

ÍNDICE

1. Introducción	13
1.1. Cnidarios.....	16
1.2. Canales iónicos	19
1.2.1. <i>Canales de sodio dependientes del voltaje (Nav)</i>	19
1.2.2. <i>Receptores GABA_A</i>	22
1.3. Neurotoxinas	25
1.3.1. <i>Neurotoxinas que afectan a los canales de sodio dependientes del voltaje (Nav)</i>	25
1.3.2. <i>Neurotoxinas que afectan a los receptores ácido γ-aminobutírico tipo A (GABA_ARs)</i>	26
1.3.3. <i>Estudios relacionados con neurotoxinas de anémonas</i>	27
1.4. Descripción de <i>Bartholomea annulata</i>	28
2. Antecedentes sobre los efectos provocados por el veneno de <i>B. annulata</i>	30
3. Justificación	32
4. Preguntas de investigación.....	34
5. Hipótesis.....	34
6. Objetivos	34
7. Materiales y Métodos	36
7.1. Muestreo de <i>B. annulata</i>	36
7.2. Obtención de extracto crudo.....	36
7.2.1. <i>Obtención y descarga de nematocistos (Extracto de Nematocistos)</i>	36
7.2.2. <i>Macerado de anémonas (Extracto de Anémonas)</i>	37
7.3. Purificación parcial del extracto crudo.....	38
7.3.1. <i>Tamizado molecular</i>	38
7.3.2. <i>Diálisis</i>	38
7.3.3. <i>Cromatografía de exclusión molecular</i>	38
7.3.4. <i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa (CLAR-FR)</i>	39
7.4. Re-purificación con CLAR-FR de la fracción de extracto crudo de nematocistos.....	39

7.5.	Determinación de proteínas	40
7.5.1.	<i>Cuantificación por el método de Bradford</i>	40
7.5.2.	<i>Determinación cuantitativa de proteínas</i>	41
7.5.3.	<i>Cuantificación por curva estándar de proteína</i>	41
7.6.	Bioensayo de monitoreo de actividad tóxica en cangrejos	42
7.7.	Electroforesis	42
7.8.	Análisis por espectrometría de masas.....	43
7.9.	Secuenciación de aminoácidos	43
7.10.	Análisis de la bioactividad por análisis electrofisiológico en ovocitos	43
7.10.1.	<i>Obtención de mRNA y cDNA</i>	43
7.10.2.	<i>Expresión heteróloga en ovocitos de X. laevis y electrofisiología</i>	44
7.11.	Electrofisiología y cultivos primarios de células neurales y células HEK293 transfectadas	47
7.12.	ELISA de GABA	51
7.13.	Análisis estadístico	51
8.	Resultados	52
8.1.	Análisis de extracto de anémonas (EA) y nematocistos (EN).....	52
8.2.	Efectos neurotóxicos de los extractos EN y EA inyectados en cangrejos <i>Ocypride quadrata</i>	55
8.3.	Electroforesis de EN y ENP	56
8.4.	Registros electrofisiológicos de los efectos del EN y EA en ovocitos y células neurales	57
8.4.1.	<i>Inhibición de la INav inducida por EA y EN</i>	57
8.4.2.	<i>Activación del GABA_AR inducido tanto por EA como por EN</i>	65
8.5.	Detección de GABA en EA y EN.....	75
8.6.	Purificación parcial del EA	75
8.6.1.	<i>Separación del EA utilizando cromatografía de exclusión molecular</i>	75
8.6.2.	<i>Registros electrofisiológicos de los efectos provocados por las fracciones (FI, FII y FIII) obtenidas mediante exclusión molecular</i>	76
8.6.3.	<i>Espectrometría de masas MALDI-TOF de las fracciones FII y FIII</i>	79
8.6.4.	<i>Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (CLAR-FR) de las fracciones FI, FII y FIII</i>	80

8.7.	Purificación parcial de EN	85
8.7.1.	Tamizado molecular del EN	85
8.7.2.	CLAR-FR del EN.....	86
8.7.3.	Espectrometría de masas MALDI-TOF de f9 del EN	89
8.7.4.	Secuenciación de la fracción f9 del EN.....	89
9.	Discusión	90
10.	Conclusiones.....	97
11.	Perspectivas.....	97
12.	Bibliografía	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación de cinco clases pertenecientes al filo Cnidaria	17
Figura 2.	Ilustración de la conformación de los canales de sodio	20
Figura 3.	Esquema de la estructura del receptor GABA _A	23
Figura 4.	Esquema que ilustra los diferentes sitios de unión de fármacos.....	24
Figura 5.	Localización y zona de muestreo de <i>Bartholomea annulata</i>	29
Figura 6.	Esquema modificado del método de expresión funcional de proteínas del cerebro de mamíferos utilizando ovocitos de rana <i>Xenopus laevis</i>	45
Figura 7.	Imágenes de nematocistos de <i>B. annulata</i> obtenidas por microscopia de contraste de fases.....	53
Figura 8.	Cuantificación de nematocistos totales, no descargados y descargados	54
Figura 9.	Los venenos de <i>B. annulata</i> y de <i>Cassiopea xamachana</i> presentaron efectos diferenciales sobre los órganos del cangrejo <i>Ocypode quadrata</i>	56

Figura 10. El sobrenadante del extracto de nematocisto contiene proteínas de diferentes pesos moleculares.....	57
Figura 11. El EA a diferentes concentraciones inhibió la INav expresada en los ovocitos-mRNA	58
Figura 12. El extracto de la anémona (EA) <i>B. annulata</i> inhibió la INav tanto de ovocitos-mRNA como de neuronas corticales de rata.....	59
Figura 13. Protocolo de activación de la INav neuronal para monitorear el curso temporal de los efectos provocados por los extractos bajo estudio.....	60
Figura 14. Curso temporal de la inhibición provocada por el EA sobre la INav en neuronas.....	61
Figura 15. Efecto inhibitorio del EN obtenido de incubaciones por 24 h o 48 h sobre INav	62
Figura 16. El EN de <i>B. annulata</i> inhibió la INav provocada por la apertura de hNav 1.6	63
Figura 17. El EN de <i>B. annulata</i> inhibió la INav generada por la apertura de hNav 1.5.....	64
Figura 18. El EN tuvo un efecto dependiente de la dosis sobre la INav de canales hNav 1.6 y además mostró ser termoestable	65
Figura 19. El EA generó respuestas Is en células neurales	66
Figura 20. La respuesta Is generada por EA es sensible a la concentración de iones Cl ⁻ en el medio extracelular	68
Figura 21. La corriente entrante provocada por EA fue parcialmente inhibida por un antagonista de GABA _A Rs	69
Figura 22. La respuesta de la corriente entrante que provocó AE en neuronas fue parcialmente inhibida por un bloqueador de GABA _A Rs	69
Figura 23. La bicuculina y la picrotoxina inhibieron la corriente entrante activada por EA en neuronas	70
Figura 24. El veneno de <i>B. annulata</i> activó receptores GABA _A suministrándolo tanto con perfusión como a través de la pipeta de eyección.....	71
Figura 25. El veneno de <i>B. annulata</i> activó los GABA _A R neuronales.....	72

Figura 26. El EA y el EN activaron una corriente entrante promovida por el flujo de Cl ⁻ en ovocitos expresando el GABA _A R neuronal	73
Figura 27. El EA activó el receptor GABA _A oligodendroglial (α3β2γ1) y el receptor GABA _A homomérico p1 expresados en ovocitos de rana	74
Figura 28. Fracciones de EA obtenidas con filtración en gel Sephadex G-50 M	76
Figura 29. Las fracciones FI-FIII obtenidas por cromatografía de exclusión molecular inhibieron la INav neuronal.....	77
Figura 30. La FII de Sephadex G-50 M inhibió la INav con una relación D-R que se correlaciona con su potencia de bloqueó del potencial de acción	78
Figura 31. Espectro de masas por MALDI-TOF de las FII y FIII obtenidas a partir de la cromatografía de Sephadex G-50 M del EA.....	79
Figura 32. Perfil cromatográfico obtenido con la purificación parcial de la fracción FI obtenida por Sephadex G-50 M.....	80
Figura 33. Perfil cromatográfico de la fracción FII obtenida por Sephadex G-50 M.....	82
Figura 34. Perfil cromatográfico de la fracción FIII obtenida por Sephadex G-50 M.....	83
Figura 35. El máximo de inhibición de INav neuronal fue obtenido en la f1 de FII por CLAR-FR.	84
Figura 36. El máximo de inhibición de INav neuronal fue obtenido en la f1 de FIII por CLAR-FR	85
Figura 37. Perfil cromatográfico de EN	86
Fig. 38. La INav fue inhibida por la f9 obtenida a partir de la CLAR-FR de EN	87
Figura 39. Perfil cromatográfico de f9 obtenida del EN (f9R del EN)	88
Figura 40. Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF de la fracción f9 del EN parcialmente purificada por CLAR-FR.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Toxinas obtenidas de distintas especies de anémonas que afectan canales Nav.	28
Tabla II. Fracciones obtenidas con el perfil cromatográfico de FI y la cuantificación de la proteína total de cada fracción después de ser concentradas.	81
Tabla III. Proteína total de cada una de las fracciones después de ser concentradas todas las fracciones obtenidas en cada una de las inyecciones.	82
Tabla IV. Proteína total de cada una de las fracciones obtenidas en la purificación parcial de la FIII.	83
Tabla V. Secuencias de los tres péptidos caracterizados en la f9 mediante espectrometría de masas con trampa de iones.	90

Resumen

La principal característica que tiene el filo Cnidaria, es la capacidad de producir un cóctel de toxinas que almacenan especialmente en los nematocistos, estructuras especializadas para la defensa y la caza. A pesar del gran número de especies que habitan los mares de México, el filo Cnidaria y en especial las especies de la clase Anthozoa a la cual pertenecen las anémonas, han sido exploradas en su potencial bioactivo solo en porcentajes muy bajos (alrededor del 4%). La búsqueda de sustancias en estas especies representa una oportunidad para el descubrimiento de nuevos principios activos con gran potencial para ser usados como herramientas moleculares para el desarrollo de nuevas estrategias tanto experimentales como terapéuticas. Es por esto que se deben seguir los estudios como parte del gran legado de diversidad biológica del país. Utilizando estrategias de frontera, en este trabajo se estudió la bioactividad del veneno de *Bartholomea annulata*, descubriendo dos efectos que no han sido reportados en los venenos de otras especies de anémonas. El primero de estos fue sobre canales de Na^+ dependientes del voltaje (Nav) y el segundo sobre los receptores-canal de GABA tipo A (GABA_AR). Las acciones fueron descubiertas mediante electrofisiología, utilizando proteínas de membrana del cerebro de mamíferos expresadas heterológicamente en ovocitos de *Xenopus laevis*. Además, los resultados mostraron que ambos efectos provienen de las toxinas contenidas en los nematocistos de *B. annulata*, los cuales fueron aislados y descargados de manera controlada, adaptando metodologías que permitieron la purificación de los nematocistos y su manipulación. Aquí demostramos que la(s) toxina(s) de *B. annulata* inhibió de forma potente la corriente de Na^+ generada por la apertura de canales Nav, incluyendo canales Nav de humano; el hNav 1.6 (canal sensible a TTX) y el hNav 1.5 (canal resistente a TTX). A diferencia de lo que se ha reportado previamente para toxinas de anémonas, el veneno de *B. annulata* no provocó retraso de la inactivación del canal Nav, lo cual indica mecanismos de acción distintos. El segundo efecto descubierto fue la actividad tipo agonista sobre diferentes GABA_ARs ; donde se incluyen los conformados por las subunidades $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ y el homomérico $\rho 1$. Fue demostrado que el GABA contenido en los nematocistos no representó una concentración suficiente para explicar una acción directa sobre los GABA_ARs .

La evidencia obtenida por espectrometría de masas sugiere que ambos efectos son generados por proteínas termoestables de un peso mayor a 3,000 Da. La información reportada aquí revela que las sustancias contenidas en *B. annulata* generan por lo menos dos potentes efectos novedosos sobre canales iónicos de mamíferos que son cruciales en la señalización del sistema nervioso central. La identificación de blancos moleculares de gran importancia brinda la oportunidad de realizar experimentos que permitan obtener las sustancias bioactivas purificadas, ya que estas toxinas podrían usarse como herramientas experimentales y/o para el desarrollo de fármacos con aplicaciones clínicas.

Abstract

The main characteristic of the Cnidarian phylum is the ability to produce toxins specially in their nematocysts, structures mainly used for defense and hunting. Despite the great number of species that inhabit Mexico's seas, the Cnidarian phylum and specially the species of the Anthozoa class, which sea anemones belong, their bioactive potential have been explored in very low percentages (around 4%). The research of new bioactive compounds represents an opportunity to discover new active principles with great potential to be used as a molecular tool for the development of novel experimental and therapeutic strategies. In here, the bioactivity of *Bartholomea annulata* venom was studied, and we identified two novel effects of the venom acting on voltage-gated Na⁺ (Nav) channels and on GABA receptor- channel type A (GABA_AR). These effects were discovered by electrophysiology, monitoring brain membrane proteins from mammals expressed in *Xenopus laevis* oocytes. It was shown that both effects were produced by toxins contained in the *B. annulata* nematocysts, structures that were isolated and discharged in controlled conditions, applying methodologies which allowed the nematocysts purification and manipulation. Different to the effect demonstrated previously for anemone toxins, reported as a delay in Nav channel inactivation, it was shown here that *B. annulata* toxin potently inhibited the current generated by Nav channels, including Nav human channels hNav 1.6 and hNav 1.5, which are TTX-sensitive and TTX-resistant channels, respectively. The second effect found was an agonistic activity on different GABA_ARs; including

$\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ and $\rho 1$ homomeric. It was demonstrated that GABA contained in the nematocysts was not the substance active in the venom.

Thus, evidence obtained by mass spectrometry suggested that both effects were produced by thermostable proteins bigger than 3,000 Da. This information reveals that *B. annulata* substances have at least two novel potent effects on mammalian ion channels that are crucial for nervous system signaling. The identification of these important molecular targets provides the opportunity for future experiments to purify the bioactive substances contained in the venom. Once purified, these toxins might be useful as experimental tools and/or for drug development of clinical use.

1. Introducción

Un gran número de seres vivos que habitan en el planeta tienen la capacidad de producir compuestos químicos activos, los cuales muchos pueden llegar a actuar como venenos. El veneno se define como un cóctel de toxinas y otros compuestos biológicos que son producidos tanto por bacterias y hongos, así como por animales y plantas, donde su síntesis tiene un propósito común, la supervivencia al ecosistema y a los depredadores. Estos organismos venenosos pueden provocar a sus víctimas desde dolor, enfermedades, hasta incluso provocar la muerte. Sin embargo, los compuestos contenidos en estos venenos también pueden tener una gran ventaja para los humanos ya que pueden ser utilizados como moléculas modelo para la síntesis de sustancias con interés farmacológico y/o de interés industrial (Gutiérrez-Ravelo y Estevez-Braun, 2009).

Desde tiempos ancestrales, las plantas terrestres y los microorganismos como las bacterias y los hongos han sido la fuente tradicional para la obtención de los compuestos activos que después fueron desarrollados para ser usados en la clínica, como es por ejemplo el caso de la morfina aislada de la amapola, la atropina de la belladona, o la penicilina purificada originalmente a partir del hongo *Penicillium glaucum* (Garateix, 2005). Aun cuando los productos naturales aislados de plantas terrestres han sido muy estudiados y utilizados en la industria

farmacéutica, en los años 40's los venenos de los animales terrestres también empezaron a jugar un papel importante en el estudio y producción de medicamentos a partir de sus compuestos bioactivos. A lo largo de los años se pudo observar que muchos animales (avispa, pájaros, ranas, serpientes, escorpiones, ciempiés y mamíferos, como por ejemplo los lorís o los ornitorrincos) eran capaces de producir venenos mortales como un sistema integrado de arma muy sofisticada, lo que hizo que estos venenos fueran un recurso muy importante y valioso para la medicina (Harvey, 2014; Calvete, 2017). En la actualidad se pueden encontrar en las farmacias algunos medicamentos como el Captopril, el cual fue diseñado a partir de un péptido aislado del veneno de la serpiente sudamericana *Bothrops jararaca* y que es comúnmente usado como antihipertensivo (Opie y Kowolik, 1995; Harvey, 2014) o el Exenatide® el cual es una versión sintética de la hormona exendina-4 aislada del monstruo de gila *Heloderma suspectum* y el cual se usa en el tratamiento de diabetes tipo 2 (Malhotra *et al.*, 1992; Peigneur y Tytgat, 2018).

A pesar de que el 70% del planeta está cubierto por océano y que el 84% de la diversidad del reino animal está representado por organismos marinos, en su mayoría venenosos (animal que administra su veneno a través de un mecanismo específico y como consecuencia provocará una herida) o ponzoñosos (animal sin un mecanismo específico de administración de venenos, principalmente el envenenamiento se produce por absorción o ingesta del organismo en sí) ; no es hasta apenas unas décadas cuando empezó a surgir un interés por la investigación de compuestos activos de origen marino (Fusetani y Kem 2009 y Blunt *et al.*, 2012). Desde el 2008 se han descubierto más de 1,000 compuestos marinos nuevos al año de los cuales más del 50% provienen de poríferos, el 30% de cnidarios y un 5% de otros filos. Estos compuestos se caracterizan por ser complejos, diversos y por tener una estructura novedosa (Lindequist *et al.*, 2016), muchos de ellos ya han sido probados en diferentes áreas, particularmente como agentes terapéuticos potenciales para diferentes patologías humanas como el cáncer, enfermedades autoinmunes, inflamatorias y neurológicas, entre otras (Houssen y Jaspar, 2005). Inclusive algunas moléculas de este tipo ya están en uso, como por ejemplo el ziconotide (Prialt®), un péptido ω -conotoxina que se obtuvo del veneno del caracol *Conus magus* y es utilizada para pacientes con dolores crónicos severos incluyendo dolor neuropático (Lindequist

et al., 2016), otro es la trabectedina, ET-743 (Yondelis®) aislada de una bacteria que se encuentra en la ascidia *Ecteinascidia turbinata* utilizada para tratar los sarcomas de tejido blando, melanomas y cáncer de mama (Van Kesteren *et al.*, 2003), y también el dalazatide (ShK-186) que aún se encuentra en fase clínica, el cual fue obtenido de la modificación del péptido ShK aislado de la anémona *Stichodactyla helianthus* (Castañeda *et al.*, 1995) y es usado para el tratamiento de las lesiones provocadas por la psoriasis (enfermedad autoinmune) (Prentis *et al.*, 2018).

Las anémonas son un grupo de organismos que pertenecen al filo Cnidaria, la característica principal de este filo es la capacidad de sintetizar y ensamblar unas estructuras microscópicas especializadas llamadas nematocistos, en donde se almacena una mezcla de diferentes compuestos, los cuales pueden tener una variedad de efectos, tanto citotóxicos y citolíticos como cardiotoxicos y neurotóxicos, entre otros (Fautin, 2009; Honma y Shiomi, 2006). Los estudios realizados muestran que las toxinas sintetizadas por la clase Anthozoa, clase a la cual pertenecen las anémonas contienen una gran riqueza de compuestos, con actividades farmacológicas antiinflamatorias y antibióticas, algunas de las cuales son inclusive usadas para el tratamiento del cáncer (Lazcano-Pérez *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta ahora solamente se han aislado toxinas contenidas en el veneno del 4% de las anémonas existentes, la mayoría obtenidas de la superfamilia Actinoidea (Prentis *et al.*, 2018; Santhanam, 2020). Muchos de los péptidos aislados de las anémonas tienen como blanco molecular canales iónicos o receptores expresados en la membrana de las células del sistema nervioso (Castañeda y Harvey, 2009; Lazcano-Pérez *et al.*, 2014). Como se sabe, los canales iónicos son moléculas esenciales en un amplio rango de funciones fisiológicas fundamentales como la señalización neuronal, la contracción muscular, el control del ritmo cardiaco y la secreción hormonal, entre muchas otras. Además, las alteraciones funcionales y estructurales asociadas a los canales iónicos constituyen la base de una gran cantidad de patologías neurológicas, neuromusculares y cardiovasculares (Garateix, 2005).

En el año 1976, Bergmann y colaboradores mostraron que una de las primeras toxinas aislada de la anémona *Anemonia sulcata* (Béress y Béress, 1975), provocaba una prolongación del

potencial de acción enlenteciendo selectivamente la inactivación del canal de sodio dependiente del voltaje (Nav) en el nervio de rana (Rathmayer y Béress, 1976). Hoy en día se conocen alrededor de 60 toxinas, que afectan a los canales Nav, las cuales están clasificadas en diferentes tipos de acuerdo con su secuencia de aminoácidos, siendo el enlentecimiento en la inactivación del canal el mecanismo de acción más común (Honma y Shiomi, 2006; Lazcano-Pérez *et al.*, 2016; Prentis *et al.*, 2018). Por todo lo comentado, es evidente la necesidad de seguir con estudios enfocados al descubrimiento de nuevos compuestos aislados de los venenos de anémonas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad sobre proteínas de membrana producida por las toxinas de la anémona *Bartholomea annulata*, la cual ha sido muy poco estudiada (Nesher *et al.*, 2013; Nesher *et al.*, 2014) y además describir dos efectos novedosos que aún no habían sido reportados en los venenos de estos organismos.

1.1. Cnidarios

Con registros fósiles que datan alrededor de 600 Ma, el filo Cnidaria es considerado uno de los linajes de animales venenosos más antiguos que existe (Jouiaei *et al.*, 2015). Está comprendido por aproximadamente 11,000 especies, las cuales se agrupan en función de su forma predominante polipoide o medusoide, en seis clases diferentes: Anthozoa, Cubozoa, Hydrozoa, Scyphozoa, Staurozoa y Myxozoa, tal y como se observa en la Figura 1 (D'Ambra y Lauritano, 2020). La mayoría de los cnidarios viven en el mar a diferentes niveles de profundidad, ya sea en forma de vida libre o fijos al sustrato. Sin embargo, también se han identificado alrededor de 40 especies de cnidarios viviendo en aguas continentales (mayormente hidrozoarios) (Jouiaei *et al.*, 2015; Santhanam, 2020).

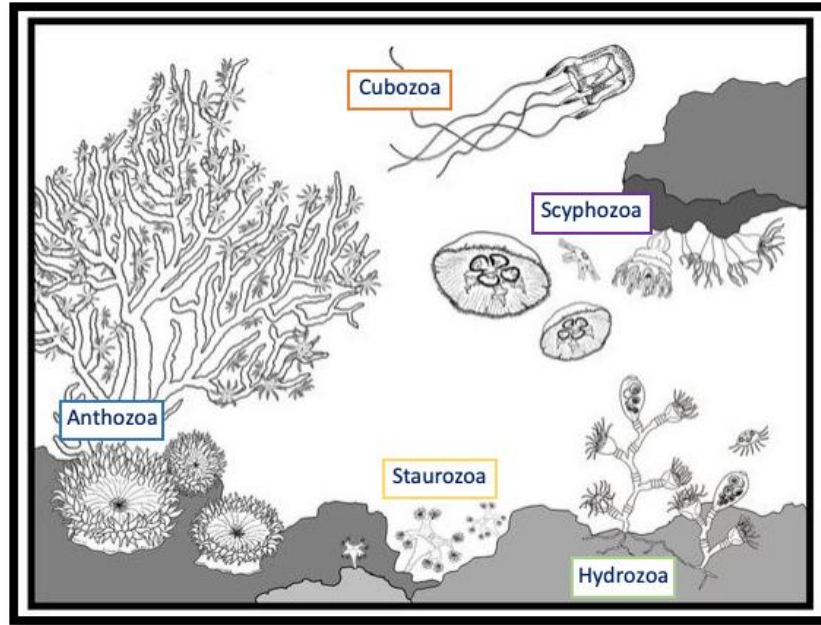


Figura 1. Representación de cinco clases pertenecientes al filo Cnidaria, (dibujo modificado de Louise Merquiol en D'ambra y Lauritano, 2020).

De todos los cnidarios reportados hasta la actualidad, solamente un 2% son considerados altamente venenosos y en consecuencia potencialmente peligrosos para el ser humano; algunos ejemplos de estas especies son *Chironex fleckery* (avispa de mar), *Physalia physalis* (fragata portuguesa) o *Carukia barnesi* (Santhanam, 2020; Brinkman *et al.*, 2012; Diaz-García *et al.*, 2012; Remigante *et al.*, 2018). Este filo está asociado a la capacidad que tienen de sintetizar y ensamblar en el citoplasma de los nematocitos (células especializadas) los nematocistos (estructuras microscópicas), los cuales son usados como armas biológicas; principalmente para la caza de sus presas o para su propia defensa, a pesar de que también pueden ser usados para la locomoción, digestión y competencia por espacio (Mariscal, 1974; Fautin, 2009; Beckman y Özbek, 2012).

Los nematocistos constituyen unas de las tres categorías de las estructuras que definió Mariscal en 1974 (espirocistos, ptiocistos y nematocistos), nombradas de forma general como cnidocistos. Existen 25 tipos diferentes de nematocistos cuyas formas pueden ser circulares o cilíndricas y sus longitudes oscilan entre 5-100 μm . Estructuralmente son cápsulas

microscópicas cerradas por un opérculo, donde en su interior se encuentra contenido un filamento enrollado con espinas que permitirán la administración del veneno. A este evento de inyección de sustancias bioactivas, causado por un estímulo mecánico-químico, se le llama descarga y es conocido como uno de los procesos más rápidos del reino animal, ya que se lleva a cabo en aproximadamente 3 ms (Holstein y Tardent, 1984; Fautin, 2009; Beckman y Özbek, 2012; Remigante *et al.*, 2018). Sin embargo, aún hay muchas incógnitas que se deben resolver en cuanto al aparato venenoso de los cnidarios. Recientemente algunos estudios mostraron que el suministro del veneno de estos organismos no está reducido al uso de nematocistos, si no que se han identificado diferentes estructuras celulares urticantes como por ejemplo los casiosomas, identificados en el orden Rhizostomeae, el cual incluye la especie de medusa invertida *Cassiopea xamachana* (Ames *et al.*, 2020) o las glándulas celulares ectodermales identificadas en algunas anémonas como *Nematostella vectensis* o *Anthopleura elegantissima* (Moran *et al.*, 2012).

El veneno que contienen estas diferentes estructuras está compuesto por una gran variedad de sustancias activas, las cuales incluyen sustancias proteicas (péptidos, proteínas, enzimas y proteínas inhibidoras) y sustancias no proteicas (purinas, compuestos de amonio cuaternario, aminas biogénicas y betaínas) (Frazão *et al.*, 2012) cuyos efectos principales son citolíticos y neurotóxicos, entre otros (Béress y Béress, 1975; Castañeda *et al.*, 1995; Bruhn *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2001; Anderluh y Macek, 2001; Marino *et al.*, 2008; Frazão *et al.*, 2012; Lázcana-Pérez *et al.*, 2014; Morabito *et al.*, 2017).

En el caso particular de las neurotoxinas los efectos mayormente reportados son sobre diferentes canales iónicos dependientes de voltaje, tales como los canales Nav y de potasio (Kv). Sin embargo, también se han reportado efectos sobre receptores de membrana (ionotrópicos o metabotrópicos), como por ejemplo los receptores de potencial transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1) (Andreev *et al.*, 2008) o los canales sensibles a protones (ASIC) (Rodríguez *et al.*, 2013).

1.2. Canales iónicos

Los animales son capaces de propagar la información vital a través de la generación de señales eléctricas (Ahern *et al.*, 2016). 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 permite el paso de iones a través de ella y generan las condiciones para la formación de diferentes potenciales membranales. Estos potenciales juegan un papel muy importante en diferentes actividades celulares, tales como: transducción de señales, liberación de neurotransmisores, contracción muscular, secreción de hormonas, crecimiento, motilidad, etc. (Kozlov, 2018). Las células del sistema nervioso expresan diferentes tipos de canales como por ejemplo los canales dependientes del voltaje, los canales regulados por ligandos o los canales mecanosensibles (Unwin, 1989; Hille, 2001). Debido a que este trabajo está enfocado en los canales de Na⁺ dependientes del voltaje (Nav) y a receptores de GABA_A, estos son los que se describirán con mayor detalle a continuación.

1.2.1. Canales de sodio dependientes del voltaje (Nav)

Entre los canales iónicos de mayor interés por su participación en la generación y propagación de los potenciales de acción en células excitables, se encuentran los canales Nav (Hodgkin y Huxley, 1952a, 1952b, 1952c, 1952d; Hille, 2001; Salceda *et al.*, 2006; Ahern *et al.*, 2016). Estos canales tienen un papel muy importante en los mamíferos, ya que presentan selectividad a Na⁺ y pueden abrirse y cerrarse en respuesta a los cambios de voltaje de la membrana, y por tanto regular la permeabilidad de Na⁺ de la membrana celular, produciendo así una despolarización de la membrana y permitiendo la generación de los potenciales de acción o impulso nervioso (Hodgkin y Huxley, 1952b). A veces estos canales pueden sufrir mutaciones genéticas heredadas o espontáneas que provocan su mal funcionamiento, lo que puede conducir a diversas enfermedades que caen dentro de las denominadas canalopatías. La mayoría de las alteraciones genéticas que se producen en los canales Nav están asociadas a epilepsia, sin embargo, también pueden estar relacionadas algunas enfermedades cardíacas o

neuromusculares, ya que los canales Nav también se encuentran expresados en el músculo esquelético o músculo cardiaco (Ahern *et al.*, 2016).

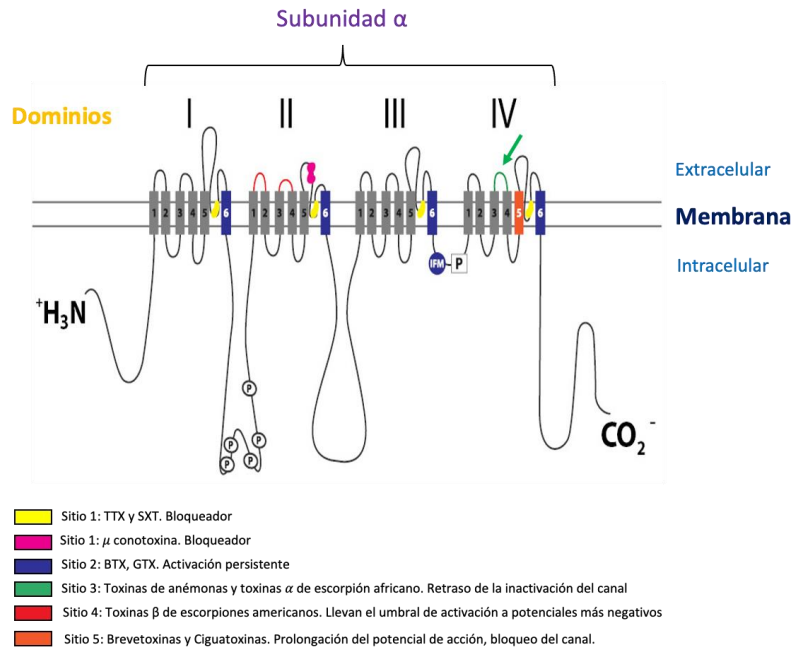


Figura 2. Ilustración de la conformación de los canales de sodio que muestra la localización de los diferentes sitios de unión de las principales neurotoxinas conocidas hasta ahora (figura modificada de Salceda y Ortega, 2009).

La conformación de los canales Nav fue descubierta a partir de diferentes estudios que se realizaron con saxitoxina y toxina β - de escorpión, que permitieron determinar la estructura principal y algunas funciones de uno de estos canales (Beneski y Catterall, 1980; Hartshorne *et al.*, 1982; Deuis *et al.*, 2017), donde se identificó que esta macromolécula está compuesta por una subunidad polipeptídica α (260 kDa); que conforma el poro conductor de iones y contienen el sensor de voltaje (Figura 2) y la subunidad auxiliar β (40 kDa), la cual modifica la expresión y cinética de apertura y cierre de los canales en función del potencial de membrana (Cestèle y Catterall, 2000; Moran *et al.*, 2009; Ahern *et al.*, 2016) así como también contribuyen a la migración celular (Ahern *et al.*, 2016). La subunidad principal α , está compuesta por cuatro dominios (D) transmembranales homólogos (DI al DIV), cada uno comprendido por seis

segmentos transmembranales (S1 al S6) que están conectados por asas polipeptídicas intra y extracelulares. En el segmento cuatro (S4) de cada dominio se encuentra el sensor de voltaje del canal, esto es debido a que la α hélice que lo conforma está cargada positivamente, esto permite detectar los cambios de potencial transmembranal, lo cual, ante una despolarización provoca un movimiento de la proteína que lleva a la apertura del poro del canal selectivo para iones Na^+ . Este poro está formado con la participación de los transmembranales S5 y S6 de cada uno de los dominios, mientras que las asas que unen a cada uno de los S5 y S6 conforman el filtro de selectividad para los iones Na^+ (Cestèle y Catterall, 2000) (Figura 2). Las subunidades α están codificadas por nueve genes diferentes; cada gen codifica un subtipo de la subunidad nombrados del 1.1 al 1.9. Éstos se expresan de forma diferencial en diferentes tejidos, por ejemplo, las subunidades 1.1, 1.2, 1.3 y 1.6 se encuentran expresadas principalmente en el sistema nervioso central (SNC), la subunidad 1.4 se encuentra expresada en el músculo esquelético mientras que la subunidad 1.5 en el músculo cardíaco (Diochot *et al.*, 2004). El canal Nav puede funcionar perfectamente con la expresión de la subunidad α , sin embargo, en la naturaleza funcionan como una multiproteína que integra las subunidades auxiliares β (1-4) cuyas funciones principales se mencionaron anteriormente (Ahern *et al.*, 2016).

Un punto muy importante a destacar de los canales Nav, es que suelen ser los principales blancos moleculares de los compuestos o moléculas presentes en los venenos de animales y plantas; es por eso que durante años este canal ha sido un importante objeto de estudio ya que a través de algunas toxinas se ha logrado entender mejor la morfología y cinética del canal (Catterall *et al.*, 2005; Honma y Shiomi, 2006). Hasta ahora se sabe que los canales de Na^+ de mamíferos tienen seis sitios de unión a toxinas, así como se muestra en la Figura 2. Éstas provocan alteraciones en la función del canal principalmente a través de dos mecanismos, uno es el bloqueo del poro, tal y como actúa la saxitoxina (SXT) o la tetrodotoxina (TTX). La TTX es una toxina bien estudiada, ésta se encuentra en diversos organismos marinos, principalmente el pez globo que la acumula en tejidos específicos, también se encuentra en anfibios y en bacterias que son probablemente la principal fuente de producción de TTX (Narahashi, 2001). El uso experimental de esta toxina ha sido tan significativo que los diferentes subtipos de canales (Nav 1.1-1.9) son clasificados en función de su sensibilidad a TTX (Lee y

Ruben, 2008), y su potente efecto ha sido de gran importancia fundamental en el estudio del funcionamiento del sistema nervioso (p. ej. Moore y Narahashi, 1967; Katz y Miledi, 1968). El segundo mecanismo de acción de neurotoxinas sobre los canales Nav, es el cambio conformacional del canal que influye ya sea sobre la apertura o sobre la inactivación del Nav, un ejemplo de ello son las toxinas de anémonas, las cuales en general provocan un enlentecimiento en el proceso de la inactivación del canal (Honma y Shiomi, 2006; Deuis *et al.*, 2017).

1.2.2. Receptores GABA_A

Otro canal iónico de interés en el contexto de este trabajo es el receptor a ácido γ -aminobutírico tipo A (GABA_AR), el cual es activado por el neurotransmisor inhibitorio mayoritario en el SNC de vertebrados, conocido como GABA (Jacob *et al.*, 2008; Michels y Moss, 2007).

El receptor ionotrópico GABA_A, es un canal selectivo de Cl⁻ (Jacob *et al.*, 2008), perteneciente a una superfamilia de canales iónicos pentaméricos regulados por ligando, donde se incluyen receptores de acetilcolina tipo nicotínicos (nAChR), los receptores de glicina (GlyR) y los receptores de serotonina tipo 3 (5HT₃R) (Miller y Aricescu, 2014; Jacob *et al.*, 2008; Michels y Moss, 2007).

Tal y como se ilustra en la Figura 3, el GABA_AR está conformado por cinco subunidades que pueden ser codificadas por diferentes genes conformando un receptor heteromérico, o en algunos casos específicos pueden ser constituidos por subunidades idénticas conformando un receptor homomérico. Actualmente se sabe que estas subunidades están codificadas por 19 genes diferentes: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, ρ 1-3, δ , ϵ , π y θ . El receptor GABA_A conformado por α 1 β 2 γ 2, es la más abundante en el cerebro (Miller y Aricescu, 2014; Borman, 2000), la estequiometría de esta combinación de subunidades regularmente es de 2 subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ . Cada una de las subunidades GABA_A presenta en su estructura cuatro dominios transmembranales (TM1-TM4), tanto las terminales amino como carboxilo se encuentran dispuestas en el lado extracelular, así como la asa que une a TM2 con TM3,

mientras que las asas que unen TM1-TM2 y entre TM3 y TM4 son intracelulares. Los dominios transmembranales TM2 en el pentámero se disponen conformando un poro central a través del cual permea principalmente el ion Cl^- (Jacob *et al.*, 2008; Michels y Moss, 2007).

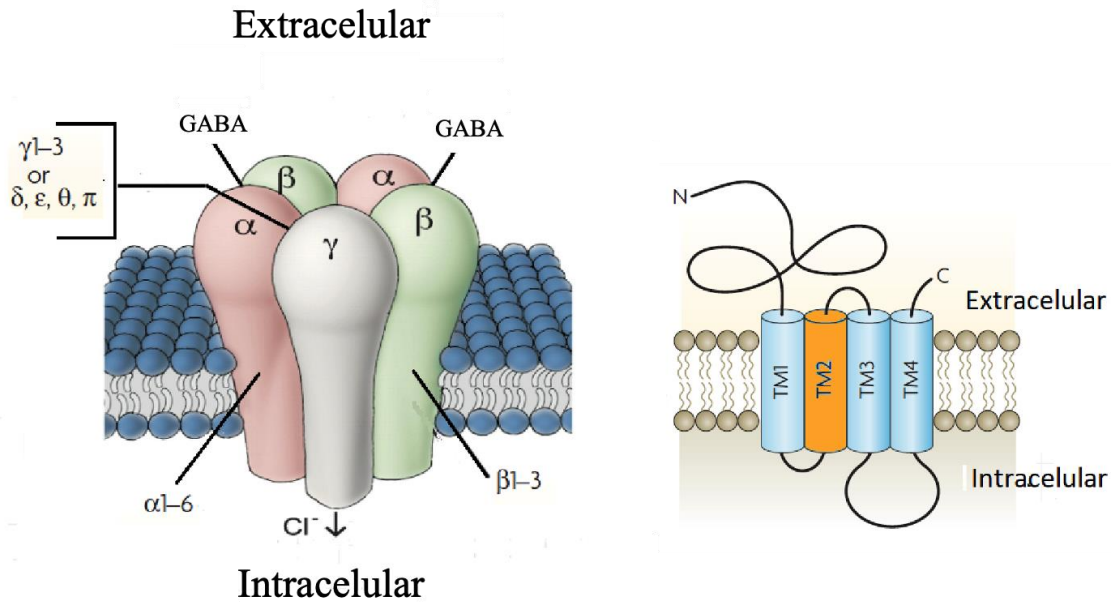


Figura 3. Esquema de la estructura del receptor GABA_A. En el lado izquierdo de la ilustración se muestran las 5 subunidades y los diferentes genes por los que pueden ser codificados (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, ρ 1-3, δ , ϵ , π y θ) (figura modificada de Uusi-Oukari y Korpi, 2010), mientras que en el lado derecho se encuentran representados los cuatro dominios transmembranales (TM1-TM4) que conforman cada una de las subunidades (figura modificada de Jacob *et al.*, 2008).

La función principal del GABA en el SNC es inhibir la actividad neuronal. Cuando el GABA se une extracelularmente al receptor GABA_A provoca un cambio conformacional de la proteína, el cual lleva a la apertura del poro central lo que permitirá el flujo del Cl^- a través del canal. La dirección del flujo de Cl^- dependerá de su gradiente electroquímico; por lo general, en neuronas maduras la corriente de Cl^- generada induce la hiperpolarización de la célula, produciendo así un efecto inhibitorio en la actividad neuronal, sin embargo, en células como los ovocitos de la rana

Xenopus o en oligodendrocitos su activación produce despolarización, debido a que los iones Cl^- presentan una concentración relativamente alta en el interior celular y su potencial de inversión se encuentra en valores despolarizantes de alrededor de -20 mV. Los GABA_A Rs están involucrados en numerosas enfermedades del SNC, tales como, la ansiedad, la depresión, el síndrome premenstrual, el alcoholismo, la epilepsia, el Alzheimer, el dolor crónico, el trastorno bipolar, así como con desórdenes del sueño, entre muchos otros (Jacob *et al.*, 2008; Michels y Moss, 2007).

Otra característica importante de los receptores GABA_A es ser el blanco molecular de varias sustancias utilizadas en la clínica (Figura 4), lo cual ha sido útil en el tratamiento de diferentes enfermedades. Un ejemplo de esto último es el hecho de que además de tener dos sitios específicos de unión a GABA, también presenta sitios de unión a varios compuestos de origen natural, como los neuroesteroides, la bicuculina, el muscimol y la picrotoxina, o también a compuestos sintetizados que los afectan, como, por ejemplo, las benzodiazepinas, los barbitúricos y las β -carbolinas (Korpi *et al.*, 2002; Macdonald y Olsen, 1994).

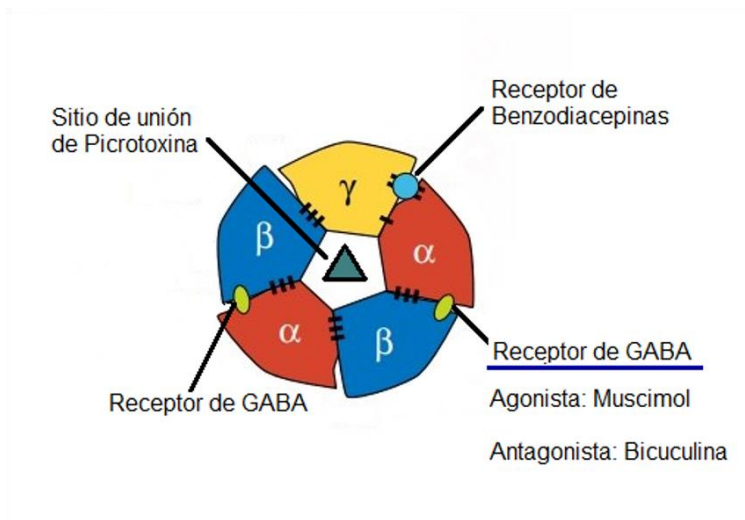


Figura 4. Esquema que ilustra los diferentes sitios de unión de fármacos (benzodiazepinas) y a compuestos de origen natural (picrotoxina, muscimol y bicuculina) del GABA_A R (figura modificada de Masiulis *et al.*, 2019).

1.3. Neurotoxinas

Las neurotoxinas son moléculas que se encuentran en los venenos producidos por animales, plantas e incluso microorganismos, las cuales interactúan principalmente sobre canales iónicos (Kozlov, 2018) provocando interferencia en los mecanismos y funciones fisiológicas del SN. Los mecanismos más comunes a través de los que actúan son el bloqueo de la comunicación celular tanto a nivel de la transmisión del impulso nervioso, como también sobre los eventos que ocurren en la sinapsis, provocando que el organismo afectado quede inmovilizado (Torres *et al.*, 2001; Ahern *et al.*, 2016).

Por lo tanto, es común que la mayoría de las neurotoxinas aisladas de anémonas presenten efectos sobre canales iónicos dependientes de voltaje ya sea de Na⁺, K⁺ o de Ca⁺⁺, canales esenciales en la comunicación neural (Salceda y Ortega, 2009).

1.3.1. Neurotoxinas que afectan a los canales de sodio dependientes del voltaje (Nav)

Muchos animales producen un arsenal de toxinas que tienen efecto sobre los canales Nav, éstas han permitido entender la función de los canales porque son una gran herramienta experimental. Neurotoxinas como la TTX, la SXT y las μ -conotoxinas son capaces de bloquear el poro del canal; en cambio las toxinas de las anémonas, de algunas arañas y de α -escorpiones (Cestèle y Catterall, 2000; Salceda *et al.*, 2006; Moran *et al.*, 2009) pueden provocar cambios en la cinética del canal provocando por ejemplo en este caso el enlentecimiento de la inactivación del canal Nav.

El mecanismo de acción mejor estudiado hasta ahora de las toxinas de las anémonas es el provocado al unirse en el sitio 3 del canal Nav (Figura 2), esta unión provoca un enlentecimiento en la inactivación del canal, de tal manera que el canal permanece abierto durante un mayor período de tiempo, aumentando el flujo de carga y prolongando por lo tanto la duración del potencial de acción (Norton, 2009; Wanke *et al.*, 2009). Estas neurotoxinas de origen peptídico, cuyo peso molecular varía entre 3 y 5 kDa (Norton, 2009; Wanke *et al.*,

2009), han sido clasificadas en cuatro tipos teniendo en cuenta su estructura primaria y los puentes disulfuro presentes en la molécula (Honma y Shiomi, 2006; Norton, 2009; Frãzao *et al.*, 2012; Lazcano *et al.*, 2014).

Tipo I: son cadenas de 45-50 aminoácidos (aa), los cuales se encuentran enlazados por tres puentes disulfuro.

Tipo II: proteínas constituidas por 45-50 aa, que al igual que el tipo I, también contienen tres puentes disulfuro en la secuencia de aa. La distribución de los tipos de toxinas I y II parece estar relacionada con la posición taxonómica de las anémonas.

Tipo III: están formados por cadenas de entre 27-32 aa 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.

1.3.2. Neurotoxinas que afectan a los receptores ácido γ -aminobutírico tipo A ($GABA_A$ Rs)

Hasta ahora solamente se han descrito dos neurotoxinas de origen marino que actúan sobre receptores GABAérgicos, la α -conotoxinas Iml aislada del molusco *Conus imperialis* y la α -neurotoxina Ls III aislada de la serpiente marina *Laticauda semifasciata*, ambas provocan un efecto inhibitorio sobre el receptor $GABA_A$ (Kudryastev *et al.*, 2015; Israel *et al.*, 2018). Sin embargo, no se han reportado toxinas de anémonas que funcionen como antagonistas o agonistas de este receptor.

A pesar de la poca información que hay de moléculas o compuestos neurotóxicos de origen marino con efecto sobre los $GABA_A$ R, se conocen tres importantes neurotoxinas de origen terrestre la picrotoxina, el muscimol y la bicuculina que tienen como diana molecular dichos receptores (Figura 4). La picrotoxina es un compuesto alcaloide policíclico sin átomos de nitrógeno, aislada de una planta de la familia *Menispermaceae* (Olsen, 2006). Esta toxina tiene

un efecto inhibitorio sobre la corriente generada por la apertura del receptor GABA_A. Actúa por lo tanto como un antagonista no competitivo, debido a que, su sitio de unión no es el mismo sitio de unión de GABA (Akaike *et al.*, 1985; Krishek *et al.*, 1996; Macdonald y Olsen, 1994; Korpi *et al.*, 2002). Otro compuesto alcaloide, en este caso aislado de plantas de la familia *Fumariace* es la bicuculina (Basha *et al.*, 2002), la cual también inhibe la respuesta a GABA. Sin embargo, la bicuculina actúa a través de un mecanismo de acción diferente a la picrotoxina, debido a que en este caso, la bicuculina es un antagonista competitivo; lo que significa que este compuesto compite por el mismo sitio de unión que tiene GABA en el receptor (Akaike *et al.*, 1985; Macdonald y Olsen, 1994; Korpi *et al.*, 2002). Por último, otra de las neurotoxinas de origen natural estudiada es el muscimol, compuesto isoxazolíxico alucinógeno aislado del hongo *Amanita muscaria*. El muscimol actúa como un agonista selectivo, lo que implica que activa los receptores GABA_A actuando como agonista en el mismo sitio de unión al GABA (Naik *et al.*, 1976; Macdonald y Olsen, 1994; Korpi *et al.*, 2002).

1.3.3. Estudios relacionados con neurotoxinas de anémonas

Desde el primer descubrimiento de tres toxinas aisladas de *Anemonia sulcata* (Béress *et al.* 1975; Honma y Shiomi, 2006) ya han sido aisladas más de 50 toxinas de diferentes especies de anémonas capaces de afectar a los canales Nav. En función de la clasificación mencionada en el apartado anterior, en el tipo I se han reportado 35 toxinas que tienen efecto sobre los canales Nav, aisladas de 13 especies de anémonas pertenecientes a la familia Actiniidae y la familia Stichodactylidae; mientras que en el tipo II se han identificado 10 toxinas obtenidas de las anémonas de la familia Stichodactylidae.

Tabla I. Toxinas obtenidas de distintas especies de anémonas que afectan canales Nav.

Especie	Toxina	Familia de toxina	Blanco molecular	Referencia
<i>Anemonia viridis</i>	ATX-I	Tipo I	Nav 1	Oliveira <i>et al.</i> , 2004
	ATX-II	Tipo I	Nav 1.1-1.6	Frãzao <i>et al.</i> , 2012
	ATX-III	Tipo III	Nav 1	
<i>Bunodosoma caissarum</i>	Bc-III	Tipo I	Nav 1.5	Malpezzi <i>et al.</i> , 1993 Oliveira <i>et al.</i> , 2004
<i>Bunodosoma cangicum</i>	Cangiotoxin-II	Tipo I	Nav 1.1 SCN1A	Zaharenko <i>et al.</i> , 2008;
			Nav 1.5 SCN5A	Zaharenko <i>et al.</i> , 2012
			Nav 1.6 SCN8A	
<i>Stichodactyla helianthus</i>	ShI	Tipo II	Nav 1	Kem <i>et al.</i> , 1989
<i>Calliactis parasítica</i>	Calitoxina I	Tipo IV	Nav	Cariello <i>et al.</i> , 1989

En el tipo III se han identificado dos toxinas, ATX III y PaTX y finalmente el tipo IV de la anémona *Calliactis parasítica* se han aislado calitoxina I y II (Honma y Shiomi, 2006). En la tabla I se hace un resumen de algunas toxinas que se han obtenido de diferentes especies de anémonas.

1.4. Descripción de *Bartholomea annulata*

La anémona *Bartholomea annulata* (Figura 5), la cual pertenece a la clase Anthozoa, orden Actinaria, familia Aiptasiidae y superfamilia Metridiidea, es localizada comúnmente en el Mar Caribe, Golfo de México y Océano Atlántico Oeste (Briones-Fourzán *et al.*, 2012; González-

Muñoz *et al.*, 2012; Grajales y Rodríguez, 2016; O'Reilly y Chadwick, 2017). Se distribuye en un amplio rango de profundidad, que van desde 1 hasta 40 metros.

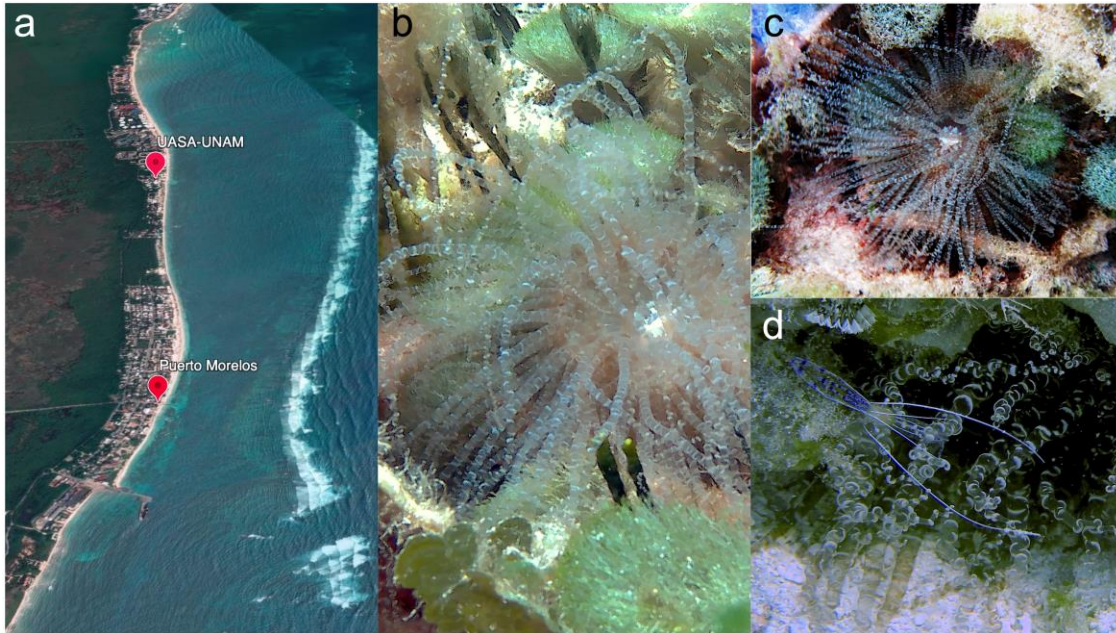


Figura 5. Localización y zona de muestreo de *Bartholomea annulata* en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo. a) Imagen satelital de Google Earth de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo, México; los puntos marcados sobre la imagen indican el pueblo de Puerto Morelos y la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales de la UNAM (UASA-UNAM) ($20^{\circ} 50' 45''$ N $86^{\circ} 52' 08''$ O y $20^{\circ} 50' 55''$ N $86^{\circ} 52' 52''$ O, respectivamente). b-d) La anémona *Bartholomea annulata* pertenece a la familia Aiptasiidae de la clase Anthozoa; es conocida comúnmente como la “anémona sacacorchos”, debido a las espirales que se observan en sus tentáculos (b y c). Regularmente se encuentra en las grietas de las rocas y en escombros de coral, y suele tener una relación simbiótica mutualista con el camarón limpiador *Ancylomenes pedersoni* d) y el camarón pistola *Alpheus armatus*. b) y c) Proporcionadas por Yamir Sánchez y d) Antònia Colom.

Con su columna alargada pueden medir entre 12 y 45 mm de alto. Presentan un disco pedal (8-24 mm de diámetro), situado en la parte inferior de la anémona con la función de unirse al sustrato, de color café claro o crema, semitransparente. Tienen entre 48 y 96 tentáculos largos, delgados, dispuestos en cuatro, cinco o seis ciclos, de color café oscuro semitransparente, con bandas espirales en forma de anillos incompletos. Esta gran cantidad de tentáculos pueden crecer hasta 12.5 cm de largo. Su disco oral mide entre 35 y 46 mm de diámetro, es liso y plano de color café más claro que los tentáculos, con pequeñas manchas en forma de puntos color

blanco, amarillento o verde blanco. Se han identificado cuatro tipos de cnidocistos; basitricos, microbásicos p- mastigóforos, microbásicos amastigóforos y espirocistos (Carlgren, 1949; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006; González-Muñoz *et al.*, 2012).

2. Antecedentes sobre los efectos provocados por el veneno de *B. annulata*

En el año 2002, Santamaría y colaboradores demostraron que el extracto crudo de *Bartholomea annulata* es capaz de inducir hemólisis y peroxidación lipídica, de manera dosis-dependiente en eritrocitos de ratón. Además, concluyeron que la respuesta hemolítica podría ser provocada por la actividad de las especies reactivas de oxígeno, debido a que la respuesta hemolítica fue atenuada por la incubación con glutatión reducido o desferroxiamina, que son sustancias antioxidantes.

Cuatro años más tarde, en el 2006, Sánchez-Rodríguez y colaboradores investigaron los parámetros de extracto crudo y veneno parcialmente purificado de *Bartholomea annulata* en diferentes modelos experimentales. Corroboraron la identificación de nematocistos realizada anteriormente por Carlgren (1949), mostrando que la manera más eficiente para descargar los nematocistos de *B. annulata* es con un tratamiento de agua desionizada. Además, evaluaron la potencia tóxica del extracto crudo en ratones, sugiriendo la presencia de toxinas que afectan su fisiología debido a que se observaron síntomas tales como: arritmia cardiaca y respiratoria, parálisis en las extremidades traseras y convulsiones espasmódicas. Los autores relacionaron estos síntomas, con los observados por Hessinger y Grove (1979) inyectando veneno de *Aiptasia pallida*. También se llevó a cabo la purificación parcial de los compuestos de *B. annulata* aplicando el método de purificación descrito por Kem y colaboradores (1989), el cual utilizaron para aislar las toxinas de la anémona *Stichodactyla helianthus*.

En el año 2007 Morales-Landa y colaboradores llevaron a cabo un estudio a partir de seis diferentes especies de cnidarios diferentes que habitan en el Mar Caribe; analizando *B. annulata*, se observó bioactividad en ensayos antiprotozoales con *Giardia intestinalis* a pesar de no ser el cnidario con mayor potencia tóxica para los protozoarios. También observaron

síndrome neuronal paralítico al inyectar tilapias con veneno de *B. annulata*; este mismo comportamiento también fue reportado con el veneno de *Carybdea marsupialis*.

Pascual y colaboradores (2007) examinaron la actividad inhibitoria con extractos de diferentes organismos marinos pertenecientes a diversos filos, sobre la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). La inhibición de esta enzima podría ser utilizada para el tratamiento de diabetes tipo 2 (Abbenante y Fairlie, 2005; Green *et al.*, 2006). Realizaron pruebas con extracto crudo y observaron que el veneno de *B. annulata* fue el que presentó el valor más bajo de IC₅₀ (concentración inhibitoria máxima media). Finalmente, estos investigadores sugieren que los inhibidores polipeptídicos podrían ser de un peso molecular de entre 5 a 7 kDa.

El último estudio de *B. annulata* publicado fue en el 2018 por Oliveira y colaboradores, donde a partir de varios extractos obtenidos de diferentes cnidarios del Caribe, entre ellos *B. annulata*, evaluaron la actividad toxicológica y el potencial como agentes antitumorales y antiofídicos de dichos extractos. Principalmente *B. annulata* mostró tener una gran actividad proteolítica, pero también el extracto de la anémona fue capaz de neutralizar la coagulación inducida por el veneno de la serpiente *Bothrops jararacussu*, inhibir la actividad hemorrágica inducida por el veneno de la serpiente *Bothrops moojeni* y además mostró efecto antitumoral contra las células Jurkat.

En un estudio previo, Colom-Casasnovas (2015) realizó pruebas de bioactividad, utilizando el extracto crudo (EA) y el extracto parcialmente purificado de *B. annulata* aplicando dos métodos diferentes de separación; el de filtración en gel usando Sephadex G-50 M y el de ultrafiltración con membranas de corte Amicon (Millipore) usando agitación. Además, fue mostrado que el EA no tiene ningún efecto sobre ovocitos nativos de rana *X. laevis*, pero sí muestra diferentes respuestas eléctricas en ovocitos que expresan diferentes proteínas a través de la inyección del mRNA purificado de cerebro de rata. Con la finalidad de realizar una primera búsqueda sistemática de diferentes efectos, provocados por compuestos bioactivos de *B. annulata* sobre proteínas de membrana del cerebro de mamífero, se llevaron a cabo diferentes experimentos electrofisiológicos utilizando como modelo el ovocito de rana. Éste es un eficiente modelo

experimental para llevar a cabo la búsqueda de nuevos blancos moleculares, ya que tiene la capacidad de expresar de manera heteróloga proteínas de membrana funcionales susceptibles de ser estudiadas electrofisiológicamente. Entre los efectos observados se identificaron de manera consistente: 1) una corriente entrante rápida y lisa, nombrada I_s , 2) una corriente entrante lenta y oscilatoria, la cual fue nombrada I_{osc} (estas dos respuestas estuvieron asociadas a un aumento de la conductancia de la membrana) y, 3) la inhibición de la corriente de sodio dependiente del voltaje, nombrada I_{Nav} . En el ovocito de *X. laevis* las corrientes oscilatorias suelen estar relacionadas con un aumento de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{++}]_i$ promovido por la activación de la fosfolipasa C; este aumento provoca la apertura de canales de Cl^- dependientes de Ca^{++} generando la respuesta I_{osc} (Miledi *et al.*, 1989; Arellano *et al.*, 2012). Para corroborar que el EA activó I_{osc} por un mecanismo similar, el aumento de $[Ca^{++}]_i$ fue inhibido con EGTA como agente quelante. Al cargar intracelularmente los ovocitos con EGTA, la respuesta provocada al aplicar EA constó solamente de respuesta I_s , mientras que la I_{osc} fue eliminada, confirmando así que I_{osc} fue producida más probablemente por un aumento de $[Ca^{++}]_i$, mientras que I_s mostró no depender de Ca^{++} intracelular. Finalmente, todas las fracciones que fueron purificadas parcialmente, tanto con Sephadex G- 50M como con ultrafiltración con membranas, mostraron que también eran capaces de inhibir la I_{Nav} , efecto que también provocaba el EA.

3. Justificación

Actualmente en el mundo hay registradas entre 1.5 y 2 millones de especies de animales y plantas, sin embargo, las nuevas predicciones estiman que el 86% de especies terrestres y el 91% de especies marinas aún no han sido descubiertas (Sweetlove, 2011). México es considerado el quinto país más megadiverso del mundo, el cual se calcula que posee entre 180,000 y 216,000 especies (Llorente- Bousquets y Ocegueda, 2008) donde la variedad de especies marinas también tiene un papel importante debido a los diferentes ecosistemas marinos que se encuentran a lo largo del país, tales como; arrecifes, praderas y bosques de algas, cañones submarinos y aguas hidrotermales, entre otros. En el caso de los cnidarios, se ha

reportado que en el planeta existen aproximadamente 10,000 especies de las cuales 853 se han identificado en México (datos de la SEMARNAT). A pesar de la gran complejidad de estas especies venenosas existentes tanto en México como en el resto del planeta, la información que existe actualmente sobre sus toxinas es aún incipiente. En particular, de anémonas, solo un 4% de las especies existentes han sido estudiadas, y en su mayoría pertenecen a la superfamilia Actinoidea (Prentis *et al.*, 2018). Es por esto, que debido a la gran biodiversidad de especies y el bajo porcentaje de entidades químicas y efectos reportados hasta ahora, es necesario que se sigan realizando estudios más detallados aumentando así la probabilidad de encontrar nuevas moléculas que sean capaces de actuar sobre blancos moleculares de forma específica y efectiva.

Nuestra evidencia experimental (Colom-Casasnovas, 2015) sugiere que las toxinas de *B. annulata* son capaces de interactuar con proteínas de membrana del SNC de mamíferos expresadas en ovocitos de rana, debido a que se observó una inhibición de la corriente producida a través de los canales Nav, sugiriendo un posible bloqueo del canal, entre otras respuestas de interés. En los trabajos reportados hasta ahora se ha demostrado que las toxinas de anémonas enlentecen la cinética de inactivación del canal Nav, provocando que el potencial de acción se prolongue. Algunos ejemplos de toxinas que provocan dicho efecto son; ATX-II aislada de *Anemonia sulcata* actualmente conocida como *Anemonia viridis*, ApC obtenida de *Anthopleura elegantissima* y CGTX-II purificada de *Bunodosoma cangicum* (Rathmayer y Berés, 1976; Salceda *et al.*, 2006; Zaharenko *et al.*, 2012). Sin embargo, el análisis del veneno de *B. annulata* mostró que contiene una sustancia que provoca la inhibición de la corriente generada por la activación de los canales Nav, lo que indica que podría tratarse de un mecanismo de acción no reportado en otras especies de anémonas, siendo nuestra hipótesis que la disminución de la corriente es más bien consecuencia del bloqueo del canal Nav. Dada la importancia que esta sustancia pueda tener y de sus mecanismos de acción se requiere de su purificación, lo cual llevará a una caracterización con mayor detalle de sus posibles sitios de acción sobre la proteína del canal Nav y de los posibles efectos diferenciales sobre los distintos subtipos de canales Nav.

En conjunto, esta información podría tener importancia para el uso de toxinas de *B. annulata* como una herramienta farmacológica como precursor para el desarrollo de medicamentos.

4. Preguntas de investigación

¿El veneno de *B. annulata* presenta neurotoxinas capaces de inhibir la corriente generada por la apertura de los canales Nav del SNC?

¿El mecanismo de acción de las neurotoxinas inhibitorias de *B. annulata* incluye el retraso de la inactivación o el bloqueo del poro de los canales Nav?

¿Cuáles subtipos de canales Nav son afectados por las toxinas de la anémona?

¿Es una neurotoxina que afecta de forma específica a los canales Nav o podría afectar a otros miembros de la superfamilia de canales dependientes de voltaje?

¿Alguna neurotoxina aislada de *B. annulata* activa o inhibe otro tipo de canales?

5. Hipótesis

La anémona *Bartholomea annulata* presenta neurotoxinas capaces de afectar a la corriente generada por la apertura de canales Nav y las generadas a través de la apertura de receptores-canal activados por neurotransmisores.

6. Objetivos

Objetivo general

Identificar los efectos provocados por las toxinas presentes en el veneno de la anémona *B. annulata* sobre proteínas de membrana del sistema nervioso central de mamíferos;

especialmente las involucradas en la generación del potencial de acción y receptores sinápticos sensibles a neurotransmisores.

Objetivos específicos

1. Extraer de los nematocistos los compuestos bioactivos del veneno de la anémona *B. annulata*
2. Caracterizar los efectos provocados por las toxinas de *B. annulata* sobre una colección de proteínas de membrana del SNC de mamíferos en el sistema de expresión heterólogo de ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.
3. Definir el efecto de las toxinas de *B. annulata* sobre los canales de Na⁺ dependientes de voltaje de mamíferos.
4. Definir el efecto de las toxinas de *B. annulata* sobre los receptores canal tipo GABAérgico.
5. Estudiar la especificidad de las toxinas contenidas en el veneno de *B. annulata* sobre canales de Na⁺ dependientes del voltaje sensibles a TTX y resistentes a TTX, utilizando expresión heteróloga de los canales hNav 1.6 y hNav 1.5.
6. Confirmar los efectos encontrados en los sistemas de expresión heteróloga en proteínas de membrana endógenas utilizando neuronas corticales del cerebro de mamífero.
7. Determinar la posible especificidad de las toxinas de *B. annulata* sobre los receptores GABAérgicos.
8. Llevar a cabo una purificación parcial de las toxinas contenidas en el veneno de *B. annulata* utilizando cromatografía líquida de alta y baja resolución identificando las fracciones que presentan los efectos observados.
9. Determinar el contenido de GABA en el veneno de *B. annulata*.

7. Materiales y Métodos

7.1. Muestreo de *B. annulata*

Los muestreos de *B. annulata* se realizaron en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (20° 50' 45" N 86° 52' 08" O; 20° 50' 55" N 86° 52' 52" O (Figura 5), la cual está ubicada en el área norte de la costa de Quintana Roo en México.

Se realizaron 23 muestreos en un período de 12 meses a partir del mes de agosto del 2016 hasta agosto del 2017, cumpliendo con las normas establecidas en el permiso PPF-066/20 de colecta proporcionado por la Dirección General de Ordenación Pesquera y Acuicultura en Quintana Roo, México; con el fin de obtener extracto crudo para la realización de la tesis de investigación.

Las anémonas se obtuvieron mediante buceo autónomo en diferentes zonas de profundidad máxima de 8 m, situadas a lo largo de la laguna arrecifal de Puerto Morelos. Los muestreos se llevaron a cabo utilizando una espátula fina de aluminio para poder separar las anémonas del sustrato rocoso, siempre teniendo el máximo cuidado para no estresar al organismo y no dañar la zona arrecifal. Una vez que se obtuvieron las muestras necesarias se conservaron en bolsas herméticas con agua de mar y por último fueron transportadas a la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, donde fueron procesadas.

7.2. Obtención de extracto crudo

Se aplicaron dos métodos diferentes para la obtención de extracto crudo:

7.2.1. Obtención y descarga de nematocistos (Extracto de Nematocistos)

Las anémonas se lavaron con agua de mar filtrada con una membrana de 0.45 µm, para así poder eliminar los restos de piedra de donde se extrajeron (Ständker *et al.*, 2006), se pesaron y se sometieron a seis ciclos de congelado (1 h) y descongelado (30 min). Una vez que fueron

completados los ciclos, se introdujeron los cuerpos de las anémonas en un vaso de precipitado con dos volúmenes de agua Milli-Q conservándolas a 4°C, removiendo cada 10 min el contenido durante 2 horas (método modificado de Kem *et al.*, 1989). Después de este tiempo, la preparación fue filtrada con una malla de 100 µm, la parte líquida obtenida fue colocada en tubos cónicos para centrifuga de 50 ml, que fueron dejados en reposos aproximadamente 12 h a 4°C permitiendo la precipitación de los nematocistos. Este último procedimiento fue realizado con el mismo grupo de anémonas a las 24 h y a las 48 h. Pasado el tiempo de cada una de las extracciones (precipitaciones) de nematocistos, fue hecho un primer lavado con una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS en mM: 2.74 NaH₂PO₄, 7.2 Na₂HPO₄, pH 7.2) con Tritón al 0.01% (PBS-T) y a lo largo de 24 h fueron hechos dos lavados más con PBS (método modificado de Bloom *et al.*, 1998). Finalmente, el precipitado obtenido para cada una de las extracciones a diferentes horas se resuspendió en 10 ml de PBS y se tomó de cada una de las muestras, una alícuota para observar al microscopio y cuantificar los nematocistos no descargados.

Una vez obtenidos los nematocistos, se realizó la descarga mecánica de los nematocistos, aplicando tres veces consecutivas, una fuerza de 6.2x10⁷ Pa. Para esto fue utilizada una prensa de French (SLM-AMINCO, Urbana, IL, USA) como homogenizador disruptor de células.

A continuación, el extracto que se obtuvo fue centrifugado a 10⁵ x g durante una hora a 4°C, para así asegurar la precipitación de las cápsulas de nematocistos y obtener el sobrenadante como el extracto crudo de nematocistos (EN). Finalmente, el sobrenadante fue dializado usando una membrana de 3000 Da por 24 h, liofilizado a presión reducida (Labconco® modelo freezone® 4.5) y conservado a -30°C.

7.2.2. Macerado de anémonas (Extracto de Anémonas)

Fue realizado otro procedimiento para obtener los nematocistos descargados. Los cuerpos enteros de las anémonas fueron homogenizados en agua milliQ (Pyrex Brand Tenbroek 15 ml) y centrifugados (5810-R de Eppendorf®) a 3.2x10³ x g a 4°C durante 10 min. Terminada la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 3.2x10³ x g a 4°C durante

10 min más. Finalmente, se volvió a decantar el sobrenadante para posteriormente ser dializado con una membrana de 3,000 Da, liofilizado a presión reducida (Labconco® modelo freezone® 4.5) y conservado a -30°C.

7.3. Purificación parcial del extracto crudo

En la purificación también se usaron dos métodos diferentes para cada uno de los extractos obtenidos.

7.3.1. Tamizado molecular

El sobrenadante obtenido mediante la descarga de nematocistos con la prensa de French se ultra filtró con una membrana de corte de 30 kDa (Amicon® Ultra-15) utilizando la centrífuga 5810-R de Eppendorf® a 3,220 x g a 4°C durante 1.5 h. Una vez que se llevó a cabo la ultrafiltración se resuspendieron las proteínas mayores a 30 kDa con el mismo volumen que se ultra filtró. Tanto la muestra de menor a 30 kDa y la de mayor a 30 kDa fueron conservadas a -30°C.

7.3.2. Diálisis

Todas las muestras, tanto de EA como de EN, fueron dializadas con un límite de poro de membrana de 3,000 Da. Las muestras se dializaron con agua Milli-Q y se dejaron en agitación durante 24 h a 4°C. Se hizo un primer recambio de agua Milli-Q en las primeras 12 h y se volvieron a dejar dializando 12 h más en las mismas condiciones de agitación y temperatura. Una vez que se terminaron de dializar las muestras fueron liofilizadas y conservadas a -30°C.

7.3.3. Cromatografía de exclusión molecular

Se hizo una primera separación con el extracto de las anémonas (EA) utilizando una matriz de Sephadex G-50 M (Pharmacia Biotech®). Diferentes alícuotas de EA diluidas a una concentración de extracto total de 50 mgml⁻¹ fueron eluidas en una columna de 136 ml. La

columna se equilibró con la misma solución amortiguadora que se usó para disolver las muestras. Las diferentes alícuotas fueron eluidas a un flujo lineal constante de 0.3 mlmin^{-1} , y fueron monitoreadas a una absorbancia de 280 nm y colectadas en fracciones de 5 ml. Finalmente fueron colectados los picos de las fracciones observados en el cromatograma (Figura 28), y fueron concentrados utilizando un rotaevaporador a una temperatura de 29°C dejándolas en un volumen mínimo de 10 ml, para posteriormente ser dializadas con una membrana de 3,000 Da, liofilizadas y conservadas a -30°C .

7.3.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa (CLAR-FR)

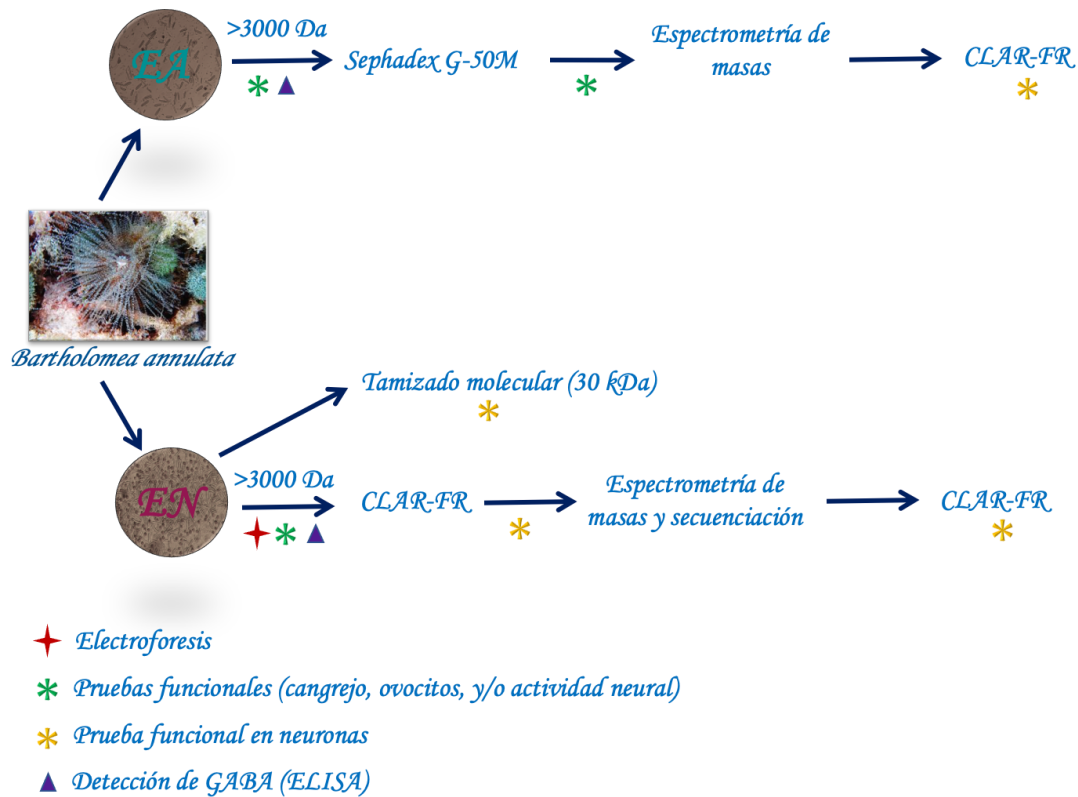
Tanto las fracciones de EA obtenidas con Sephadex G-50 M como el EN fueron purificadas parcialmente utilizando CLAR-FR (Agilent Biotechnologies 1100); para ello se usó una columna Vydac C18 de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$ y diámetro de poro 100 \AA con pre-columna C18. Las muestras se inyectaron en un bucle de 5 ml a una velocidad de flujo de 1 mlmin^{-1} . Se usó un protocolo con elución isocrática de 10 min a 0% de solución B (acetonitrilo 90% + 0.085 % TFA) seguido de un gradiente lineal de 0 a 100% de solución B en 100 min. Las muestras fueron monitoreadas a una absorbancia de 220 nm, colectadas manualmente en tubos Eppendorf (1.7 ml) y concentradas en una centrífuga con vacío (Savant SC 110 A Speed Vac® Plus).

7.4. Re-purificación con CLAR-FR de la fracción de extracto crudo de nematocistos

En la purificación parcial del EN fueron obtenidas 9 fracciones diferentes, donde la fracción número 9 (fracción bioactiva) fue purificada mediante CLAR-FR. Se hicieron cambios en el protocolo, ya que se consideró el tiempo de retención de la fracción y el porcentaje de acetonitrilo a la que se obtuvo la fracción. La muestra se eluyó a partir del 47% de acetonitrilo con un flujo isocrático de 10 min y después con un gradiente lineal de 0.1% de acetonitrilo por min. Para la separación se usó el cromatógrafo Agilent Biotechnologies 1100 y una columna

Vydac C18 de 250 mm con un tamaño de partícula de 5 μm y diámetro de poro 100 \AA con pre-columna C18 de 10 mm y las otras características iguales a la columna. La longitud de onda a la que se monitoreó la muestra fue de 220 nm. La fracción obtenida fue colectada y concentrada en la centrifuga al vacío (Savant SC 110 A Speed Vac[®] Plus).

El siguiente diagrama resume la estrategia de separación que se llevó a cabo para a cada uno de los extractos EA y EN, así como su uso experimental.



7.5. Determinación de proteínas

7.5.1. Cuantificación por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas, de los extractos y fracciones obtenidas con Sephadex G-50 M se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976), el cual consiste en determinar la

concentración total de proteínas utilizando un colorante hidrofóbico (Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio-Rad), el cual forma un complejo proteína-colorante.

La curva patrón se realizó utilizando albúmina de suero bovino (BSA) a diferentes concentraciones (0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.2, 0.25 y 0.5 mgml⁻¹). Muestras de 5 ml tanto de los diferentes extractos y fracciones que se analizaron, como el estándar de BSA, fueron agregadas a 250 ml de colorante a temperatura ambiente; se dejó en agitación 5 min y se leyó la absorbancia de las diferentes muestras con un microlector de placas (Stat Fax 4200, Awareness Technology) a una longitud de onda de 595 nm.

7.5.2. Determinación cuantitativa de proteínas

La determinación de proteínas de las diferentes fracciones obtenidas mediante cromatografía de alta resolución fue estimada midiendo el área bajo la curva. Para ello fue asumida el área total del cromatógrafo como el 100% de proteínas analizadas; con base en esto se determinó la concentración de la fracción de interés.

7.5.3. Cuantificación por curva estándar de proteína

La cuantificación de la fracción re-purificada se hizo mediante la curva estándar de insulina B bovina oxidada (Hernández-Sámano *et al.*, 2019). Para ello, se hicieron cromatografías en fase reversa de diferentes concentraciones de insulina (5, 10, 18, 25 y 35 µgml⁻¹) y se obtuvieron las áreas de cada una de las fracciones, por lo que se hizo una curva estándar representando el área de la fracción contra la cantidad de insulina B oxidada.

Por otro lado, se midió el área de la fracción re-purificada y se interpoló en la curva estándar de insulina B oxidada, obteniendo la cantidad aproximada de proteína de la fracción re-purificada.

7.6. Bioensayo de monitoreo de actividad tóxica en cangrejos

La finalidad de este bioensayo fue llevar a cabo el monitoreo de la actividad tóxica de los extractos (EA y EN) y fracciones obtenidas con Sephadex G-50M. Este ensayo se realizó utilizando cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* obtenidos en la playa que se encuentra anexa de la Unidad de Sistemas Arrecifales de Puerto Morelos de la UNAM (20° 50' 45" N 86° 52' 08" O; 20° 50' 55" N 86° 52' 52" O).

Diferentes cangrejos fueron inyectados (50 µl) con diferentes alícuotas de EA, EN y fracciones de Sephadex G-50 M disueltas en PBS; otro grupo de animales fue inyectado con PBS como control.

La inyección fue hecha en el tercer pereiópodo del cangrejo (Béress y Béress, 1975; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006) y el comportamiento de los animales fue monitoreado de manera individual. Los cangrejos que murieron fueron disecados para observar el estado de sus órganos.

7.7. Electroforesis

Los extractos obtenidos fueron analizados en geles desnaturalizantes (Laemmli, 1970) al 16% y 20% de acrilamida en la zona de separación (376 mM Tris-HCl, pH 8.8; 16 o 20% (p/v) acrilamida/bis-acrilamida; 0.1% (p/v) SDS; 0.1% (p/v) persulfato de amonio (APS); 0.106% (v/v) N, N, N, N'-tetrametiletildiamina (TEMED)), y de 4 % de acrilamida en la zona de apilamiento (250 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% acrilamida/bis-acrilamida; 0.1% (p/v) SDS; 0.1% (p/v) PSA; 0.066% (v/v) TEMED). Para la separación también se utilizó un amortiguador de elución que contiene Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, 0.1% (p/v) SDS. El marcador de peso molecular pre-teñido (Precision Plus Protein Dual Xtra Standard, Bio-Rad) y las muestras se cargaron en los pozos del gel (2 µl de marcador y 15 µl de muestra) y se eluyeron a 15 mA (mini-PROTEAN®II cell, Bio-Rad). La elución de las muestras se detuvo antes de que el colorante indicador del frente de proteínas se saliera de la matriz del gel.

7.8. Análisis por espectrometría de masas

Las fracciones FII y FIII obtenidas mediante exclusión molecular y la f9 obtenida por CLAR-FR fueron analizadas químicamente utilizando la técnica de desorción/ionización por láser asistida en matriz acoplado al analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Se añadieron 5 μ l de solución saturada de ácido sinapínico (>99.0% de pureza para MALDI-MS, Sigma, St. Louis, MO, USA) a 5 μ g de las diferentes muestras liofilizadas. Se depositó 1 μ l de esta solución en la placa MALDI dejándose secar a temperatura ambiente. El espectro fue registrado en modo lineal positivo en un espectrómetro de masas (Microflex Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con láser de nitrógeno $\lambda = 337$ nm y 20 kV de aceleración de voltaje (Lazcano-Pérez *et al.*, 2017).

7.9. Secuenciación de aminoácidos

Las secuencias de aminoácidos de la f9 fueron determinadas por espectrometría de masas utilizando un espectrómetro de masas con trampa de iones Esquire (Bruker-Franzen Analytical, GmbH, Alemania) en modo de iones positivos (Lázcano-Pérez *et al.*, 2014).

Estos resultados fueron obtenidos en colaboración con el Dr. Fernando Lazcano y el Dr. Roberto Arreguín del Instituto de Química de la UNAM.

7.10. Análisis de la bioactividad por análisis electrofisiológico en ovocitos

7.10.1. Obtención de mRNA y cDNA

El poli(A)-mRNA fue purificado del cerebro de ratas adultas Wistar (Figura 6); para ello se extrajo el mRNA total del cerebro usando el método guanidina/fenol/cloroformo seguido de cromatografía de oligo(dT)-celulosa (Chomczynsky y Sacchi, 1987). Fueron realizadas 19 extracciones de cerebros de ratas diferentes; en cada extracción se analizó la calidad de la muestra mediante electroforesis y la relación de absorbancia 260/280 nm. Cada extracción fue disuelta a 1 ng μ l⁻¹ en agua y almacenadas a -80°C hasta ser usadas para ser inyectadas en

ovocitos de rana de *Xenopus laevis*, y ser evaluada su capacidad de expresión heteróloga de canales iónicos y receptores de membrana (ver más adelante).

Las secuencias de cDNA codificantes (Figura 6) para las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 2$, $\gamma 1$ y $\gamma 2$ del GABA_AR se obtuvieron de los tejidos neurales aplicando la misma metodología reportada anteriormente en Ordaz y cols. (2021), mientras que la secuencia codificante de la subunidad $\rho 1$ fue donada por el Dr. Ataúlfo Martínez-Torres (Martínez-Torres y Miledi, 2001). Todas las subunidades fueron amplificadas y cada fragmento obtenido fue clonado en el vector pXENEX1 en los sitios NcoI, BamHI y NotI. Los plásmidos fueron linealizados con la enzima Hind III y utilizados como moldes para la síntesis in vitro de cRNA utilizando el “kit” T7 mMACHINE mMACHINE siguiendo el protocolo estándar (Ambion Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU.). Finalmente, el cRNA fue disuelto a 0.1 ngnl^{-1} en agua para su expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis*.

7.10.2. Expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis* y electrofisiología

Ovocitos (Figura 6) en estadio V y VI de ranas de *Xenopus laevis* fueron disecados de los lóbulos ováricos y microinyectados con 50 nl de mRNA (1 ngnl^{-1}) purificado de cerebro de rata ó 50 nl de solución que contenía cRNA de las diferentes subunidades GABA_A (0.1 ngnl^{-1}) (Pérez-Samartin *et al.*, 2017). Después de 48 h de microinyectados los ovocitos, fueron tratados con colagenasa (0.5 mgml^{-1}) en solución de Ringer Normal (RN) de rana (mM: 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES, pH 7.0) durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, fueron desfoliculados utilizando pinzas finas y fueron incubados hasta el momento de ser registrados, en solución estéril normal de Barth (mM: 88 NaCl, 1 KCl, 2.4 NaHCO₃, 0.33 Ca (NO₃)₂, 0.4 CaCl₂, 0.82 MgSO₄, 5 HEPES, suplementado con $70 \text{ } \mu\text{gml}^{-1}$ gentamicina, pH 7.4) a una temperatura de 16-18°C (Ordaz *et al.*, 2021).

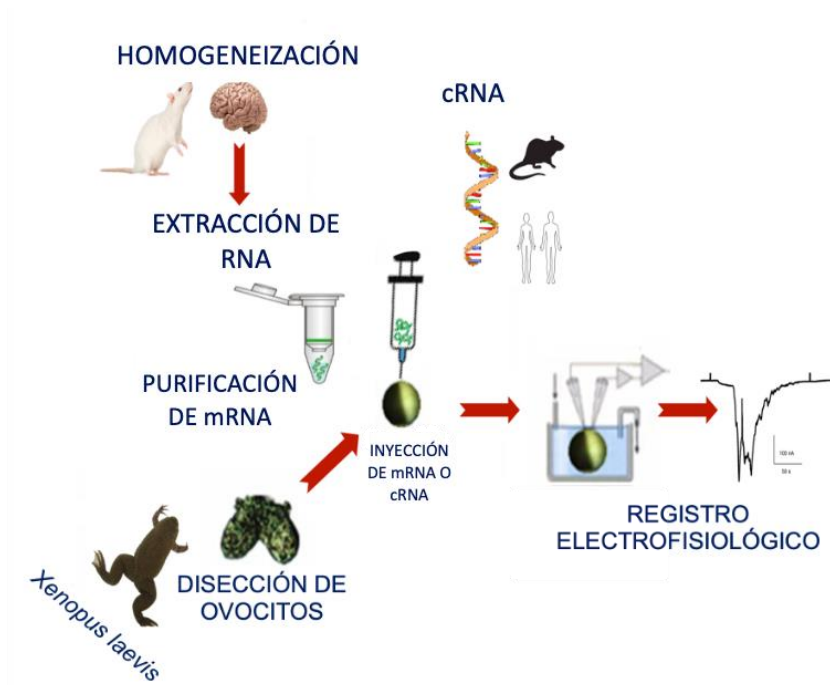


Figura 6. Esquema modificado del método de expresión funcional de proteínas del cerebro de mamíferos utilizando ovocitos de rana *Xenopus laevis*. Se purificó por un lado el mRNA total del cerebro de ratas Wistar adultas y por otro lado se obtuvo el cDNA codificante de diferentes subunidades del GABA_AR. Según la necesidad del experimento, las preparaciones fueron microinyectadas en ovocitos de *X. laevis*. Finalmente, las proteínas expresadas fueron registradas funcionalmente utilizando la técnica de control de voltaje con dos electrodos (Modificado de Miledi *et al.*, 1989).

Después de dos o más días de la inyección del mRNA o de cRNA, fueron monitoreadas las corrientes transmembranales usando la técnica de control voltaje con dos electrodos (Arellano y Miledi, 1993). Para ello, se usaron dos microelectrodos (1 MΩ) insertados en el ovocito bajo estudio para poder llevar a cabo los registros de las corrientes transmembranales, las cuales fueron monitoreadas mediante un amplificador Axon GenClamp 500 B (Molecular Devices, San José, CA, USA). Las respuestas eléctricas fueron digitalizadas y almacenadas usando un convertidor analógico-digital (Axon DigiData 1200; Molecular Devices) y un software especializado (pClamp v9; Molecular Devices) para su posterior análisis (Pérez-Samartín *et al.*, 2017)

Durante los registros, los ovocitos se mantuvieron a un potencial de membrana de -60 mV y se perfundieron continuamente (10 ml min^{-1}) con RN. El veneno y diferentes neurotransmisores (serotonina, 5 HT; ácido γ -aminobutírico, GABA; acetilcolina, Ach; ácido glutámico, Glut) fueron aplicados a través de la perfusión.

Para activar los canales dependientes del voltaje (Na^+ , K^+ y Ca^{++}), fueron aplicados protocolos de pulsos de voltaje que permitieron relacionar los cambios en la corriente transmembranal con los cambios de voltaje provocados, y construir las relaciones corriente-voltaje (I-V). En general, estos protocolos de pulsos fueron aplicados mientras los ovocitos fueron controlados a -100 mV y el potencial de membrana fue entonces cambiando de -80 a $+40 \text{ mV}$ por 250 ms en incrementos de 20 mV , entre cada incremento el potencial regresaba a -100 mV por 200 ms . Las respuestas de corriente fueron medidas en el estado estacionario o en el pico de la corriente de entrada dependiendo de la respuesta analizada (I_s o I_{Nav}).

En algunos de los experimentos, para quelar el Ca^{++} intracelular en los ovocitos, fue necesario inyectarlos con 500 pmol de ácido etilenglicol-bis (β -aminoetiléter) N,N,N',N',- tetraacético (EGTA), utilizando la eyección a presión a través de micropipetas que contenían una solución de 200 mM EGTA (HEPES 5 mM ajustado con KOH a pH 7) (Arellano y Miledi., 1993).

También, para el registro de ovocitos, el método de aplicación de fármacos utilizando la perfusión requiere de volúmenes de muestra elevados (10 ml por min de aplicación), varias de las muestras de veneno de la anémona no pueden ser utilizadas en estos volúmenes relativamente grandes, por lo que en este trabajo fue desarrollado un sistema de suministro mucho más eficiente (Figura 24 b). En este método se aplicaron los diferentes extractos, ya fuera EA o EN (en solución de RN), a través de pequeñas eyecciones a presión, de la solución conteniendo la muestra desde, una micropipeta colocada sobre la superficie del ovocito, aproximadamente $100 \mu\text{m}$, mientras el flujo general del medio externo fue mantenido en un nivel mínimo de 0.5 ml min^{-1} . Los pulsos de presión aplicados ($10\text{-}20 \text{ PSI}$) para lograr la eyección fueron controlados con un manómetro y la duración de los mismos fue regulada a través de un estimulador; de esta manera fueron aplicados pequeños volúmenes de muestra; regularmente

de 25 a 100 nl de la muestra fueron suficientes para activar las respuestas en ovocitos que expresaron los diferentes GABA_ARs.

7.11. Electrofisiología y cultivos primarios de células neurales y células HEK293

transfectadas

Cultivo de neuronas corticales. Se obtuvieron cultivos primarios de neuronas corticales a partir de embriones de rata Wistar en la etapa embrionaria E18 (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020). Para esto, fueron sacrificadas ratas Wistar preñadas del día E18 cumpliendo con la Guía de Uso Ético de Animales para Experimentación de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se extrajeron los embriones mediante cirugía, también cumpliendo con la guía ética de minimización de sufrimiento animal de la UNAM y los lineamientos de la guía ARRIVE y fueron disecados los cerebros. Con la finalidad de llevar a cabo una digestión enzimática, los cerebros obtenidos fueron resuspendidos en 4 ml de solución de HANKS sin iones divalentes (HBSS) conteniendo 400 µl de Tripsina (al 2.5% en HBSS, Sigma) y 40 µl de DNAsa I (al 0.4% en H₂O estéril, Sigma) para ser incubados a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ por 15 min. Después de este tiempo la digestión fue detenida añadiendo 4.5 ml de medio B27 Neurobasal + 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) y la preparación fue centrifugada a 10,000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue desechado y al precipitado de células le fue agregado 1 ml de medio B27 Neurobasal con 10% de SFB y el tejido fue dissociado mecánicamente; para esto fueron hechos tres pases sucesivos de la preparación a través de agujas hipodérmicas de diferentes diámetros, de 21G, 23G y finalmente 25G. Una vez dissociado el tejido fue realizado un filtrado usando una malla de 41 µm de diámetro de poro y la preparación filtrada se suspendió en 4 ml de medio B27 Neurobasal. Por último, de esta preparación se hizo una cuantificación de la densidad celular utilizando una cámara de Neubauer y 400 µl de células fueron sembradas a una densidad 3.5×10^4 , sobre cubreobjetos (diámetro de 12 mm) tratados con poli-L-Orbitina, estos fueron depositados individualmente en placas multipozos. A las 24 h de haber sembrado las células, se reemplazó el medio por B27 Neurobasal sin SFB y fueron incubadas a 37°C y 5% de

CO₂. Las células fueron entonces usadas para los registros electrofisiológicos de 7-12 días *in vitro* (DIV)

Cultivos de oligodendrocitos. Los cultivos primarios de OPCs se obtuvieron a partir de la corteza cerebral de rata Sprague-Dawley de entre 0 a 2 días postnatales (Barres *et al.*, 1992; Arellano *et al.*, 2016). Para esto fueron disecados los cerebros de los neonatos y se removieron los bulbos olfatorios, el cerebelo y el tronco cerebral; los hemisferios cerebrales fueron entonces divididos y los ganglios basales removidos, separando así las cortezas. Finalmente, se removieron las meninges y las preparaciones fueron resuspendidas en 4 ml de HBSS con 400 μ l de Tripsina (2.5% en HBSS, Sigma) y 40 μ l de DNasa I (al 0.4% en H₂O estéril, Sigma) e incubadas para su digestión enzimática durante 15 min a 37°C. Para detener la reacción enzimática fueron añadidos 4 ml de medio Dulbecco modificado de Iscove (IMDM, Gibco) + 10% SFB. Después, las preparaciones fueron centrifugadas a 1,000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y al precipitado le fue añadido un 1 ml de IMDM + 10% SFB. Con el fin de llevar a cabo una mejor disociación del tejido se realizaron pases sucesivos a través de jeringas con diferentes tamaños de agujas 21G y 23G, y finalmente se procedió a centrifugar a 1000 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue eliminado y al precipitado le fue añadido 1 ml de IMDM + 10% SFB, la preparación fue homogeneizada y 1 ml de esta suspensión con 9 ml de IMDM +10% SFB fueron depositados en frascos de 75 cm² tratados previamente con poli-D-lisina (PDL) (10 mg ml⁻¹), extendiendo la suspensión sobre la superficie. Los frascos se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ y al cabo de 24 h el medio fue cambiado a 10 ml de IMDM + 10% SFB a 37°C por frasco; después de este primer cambio de medio, se reemplazó subsecuentemente cada 3 días. Transcurridos 11 días *in vitro*, se hizo un cambio de medio y los frascos de cultivo fueron colocados en la incubadora a 37°C sobre un agitador orbital a 140 rpm durante 6 h (Suzumura *et al.*, 1984). Esto provocó que las células oligodendrogiales se desprendieran del sustrato y de la cama de astrocitos. Las células en suspensión fueron filtradas usando una malla de nylon de 10 μ m (Millipore) y la preparación fue incubada por 1 h a 37°C con 5% CO₂. Después, las preparaciones fueron transferidas a cajas Petri nuevas e incubadas durante 1 h más bajo las mismas condiciones. Estas incubaciones fueron realizadas para que la microglía quedara adherida al fondo de la caja. La suspensión celular fue transferida a tubos cónicos y fueron centrifugados a

1,000 rpm durante 10 min. El medio sobrenadante fue separado y el precipitado fue resuspendido utilizando 0.4 ml del medio; la preparación obtenida fue centrifugada nuevamente a 1,000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue separado por decantación y 0.4 ml de éste fue utilizado para re-suspender y homogenizar el precipitado; de esta suspensión se hizo una cuantificación de la densidad celular utilizando una cámara de Neubauer. Finalmente, se colocaron 10^4 células sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro tratados con PDL, y los cubreobjetos fueron depositados en placas multipozos; tras 30 min fueron añadidos 400 μ l de medio Sato (Johnston, 2014) en cada pozo, y fueron incubados a 37°C con 5% CO₂.

Células HEK293. Los extractos también fueron probados sobre células HEK293 (células de riñón embrionario de humano) expresando de manera estable canales Nav de humano, ya sea el hNav 1.5 (mayormente expresado en el músculo cardiaco) y clasificado como resistente a TTX (IC₅₀ > 30 nM) o el hNav 1.6 (expresado en su mayoría en el sistema nervioso central), clasificado como sensible a TTX (IC₅₀ < 30 nM). Estas líneas celulares transfectadas fueron donadas por la Dra. Rita Restano Cassulini (Restano-Cassulini *et al.*, 2017). Las células fueron mantenidas en medio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) con 10% SFB y 1% de antibiótico G418 (400 μ g ml⁻¹) a temperatura de 37°C y 5% de CO₂.

Control de voltaje en célula completa. Para el registro electrofisiológico de los diferentes tipos celulares (neurales y HEK293) se usó la técnica de control voltaje con un electrodo en célula completa, utilizando un amplificador Axon 700B (Molecular Devices). Las neuronas fueron constantemente perfundidas con solución externa (SEN, conteniendo en mM: 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ y 10 de HEPES, pH 7.3 con NaOH) o con solución SNav (conteniendo en mM: 21.25 TEA-Cl, 116.25 NaCl, 3.75 KCl, 1.5 CaCl₂, 1.475 MgCl₂, 8.75 HEPES, 5 glucosa y 0.1 CdCl₂, pH 7.3). Además, para las pipetas se usaron dos soluciones internas diferentes, una solución interna con TEA la cual permitió bloquear los canales Kv neuronales (SIN-TEA, conteniendo en mM: 22 TEA-Cl, 105 CsCl, 10 HEPES, 0.1 BAPTA, 1 MgCl₂, 10 NaCl, 4 Mg₂ ATP, 0.2 Na-GTP, 0.1 leupeptina, pH 7.4 (CsOH 1M)) o una solución interna normal de neurona (SIN, en mM: 5 NaCl, 130 KCl, 1 CaCl₂, 1.8 MgCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA, 0.2 Na-GTP y 2 Mg-ATP, pH 7.3 con KOH 1M). La solución para oligodendrocitos fue una solución externa (conteniendo en mM: 140

NaCl, 3 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7.4 (NaOH)) y la misma SIN que se usó para las neuronas. Las soluciones utilizadas para células HEK293 son las mismas que se utilizaron para el registro de los oligodendrocitos.

Las corrientes se registraron a diferentes potenciales fijos de membrana dependiendo del experimento específico de cada caso, fueron digitalizadas usando el convertidor analógico-digital Digidata 1400 (Molecular Devices), almacenadas y analizadas con el software pClamp 10 (Molecular Devices).

Fueron aplicados diferentes protocolos de registro; en el primero se construyeron curvas corriente voltaje (I-V) aplicando pulsos cuadrados de voltaje desde -100 mV a +40 mV en incrementos de 10 mV con pulsos de 250 ms de duración, mientras la célula fue mantenida a un potencial de membrana de -100 mV. En el segundo protocolo, consistió en aplicar pulsos despolarizantes de -20 mV ó a -10 mV desde un potencial de mantenimiento a -100 mV. Los pulsos despolarizantes con una duración de 20 ms fueron aplicados cada 0.75-1 s por varias decenas de segundos; este protocolo fue aplicado para seguir el curso temporal de los efectos provocados por los diferentes extractos o la TTX sobre la INav. En este protocolo regularmente, la corriente INav control fue monitoreada durante 10 s, seguido de la perfusión de una de las soluciones de prueba durante 5-10 s, tiempo suficiente para poder registrar los efectos de la solución de prueba, por ejemplo, el extracto crudo o diferentes fracciones del veneno. Una vez monitoreado el posible efecto sobre la célula, ésta fue lavada por varios segundos con SEN mientras se registraba la recuperación de la INav.

De manera similar, en un conjunto de experimentos para probar los efectos sobre el impulso nervioso provocados por diferentes diluciones de FII, se registraron los potenciales de acción en las neuronas corticales de cerebro de rata; estos fueron provocados aplicando pulsos de corriente despolarizante (0.65-0.85 nA) de 350 ms cada 500 ms.

Las curvas dosis-respuesta (D-R) fueron ajustadas a la ecuación:

$$I/I_{\max} = [(A1 - A2) / 1 + ([\text{extracto}] / EC_{50})^{nH}] + A2,$$

Utilizando para esto el método de mínimos cuadrados, donde EC_{50} es la concentración necesaria para que se produzca el 50% del efecto máximo del extracto, nH es la pendiente de la curva (coeficiente de Hill), $A1$ y $A2$ son los valores de corriente normalizada (I) inicial y final (I_{max}), respectivamente y $[extracto]$ es la concentración de FII o EN.

7.12. ELISA de GABA

Para llevar a cabo la detección de GABA en las muestras de EA y EN se hizo un inmunoanálisis de adsorción (ELISA) siguiendo el protocolo de instrucciones del Kit GABA ELISA (Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA). Los estándares titulados y las muestras diluidas fueron colocadas en una placa de pozos de microtitulación recubierta con el anticuerpo anti-GABA. A cada pozo de la placa le fue agregado el complejo GABA-Biotina y la muestra fue durante 1 h. Después de la incubación, la placa fue lavada y se añadió el conjugado de avidina-HRP a cada pozo, incubando por 45 min. Finalmente, el sustrato 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbencidina (TMB) fue agregado y la preparación incubada durante 30 min. Las muestras se leyeron a 450 nm en un lector de microplacas estándar.

7.13. Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como media \pm D.E. de al menos 4 células y en el caso de los ovocitos se obtuvieron células de 2 a 7 ranas diferentes. Las medias de los dos grupos se compararon mediante la prueba t de Student o, cuando correspondía, mediante análisis de varianza seguido de comparaciones post-hoc de las medias individuales mediante la corrección de Bonferroni. El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism (versión 6; La Jolla, CA). Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0.05$.

8. Resultados

8.1. Análisis de extracto de anémonas (EA) y nematocistos (EN)

En este trabajo se llevaron a cabo dos metodologías de descarga de nematocistos diferentes, en la primera fue obtenido el extracto de anémonas (EA) y en la segunda el extracto de nematocistos (EN).

Para la obtención del EA, metodología que ya había sido usada anteriormente en la tesis de maestría Colom-Casasnovas (2015), se descargaron los nematocistos de *B. annulata* a partir de la homogenización de todo el cuerpo de las anémonas y se obtuvieron 9 g de extracto total de anémona (6% de rendimiento). Además del contenido de los nematocistos usando este método de obtención de EA, el extracto incluye sustancias provenientes de los tejidos de la anémona (p. ej. Ames *et al.*, 2020; Moran *et al.*, 2012) al igual que de los simbioses que se hospedan en ella (Figura 7a). Es por ello que aquí fue diseñada otra metodología que permitiera llevar a cabo la descarga directa de los nematocistos, con la finalidad de obtener una muestra con mayor grado de pureza y que además permitiera confirmar que los efectos observados eran provenientes del contenido de los nematocistos. El proceso que se llevó a cabo para obtener el EN fue primero aislar los nematocistos y después descargarlos mecánicamente. La Figura 7a ilustra una imagen microscópica de contrastes de fases de una muestra de EA, donde se observa una muestra con un alto contenido de nematocistos, simbioses y tejidos de las anémonas. Sin embargo, cuando es comparada con la imagen de la Figura 7b y 7c donde fue aplicado el método modificado de Bloom y cols. (1998), con periodos de incubación de 24 ó 48 h, se puede observar que las muestras tienen mayor contenido de nematocistos y un número reducido de simbioses y de restos de tejidos del organismo. En la Figura 7c marcado con flechas blancas se observa una ampliación de la morfología de los nematocistos sin descargar, señalando el filamento enrollado contenido en el túbulo de algunos nematocistos.

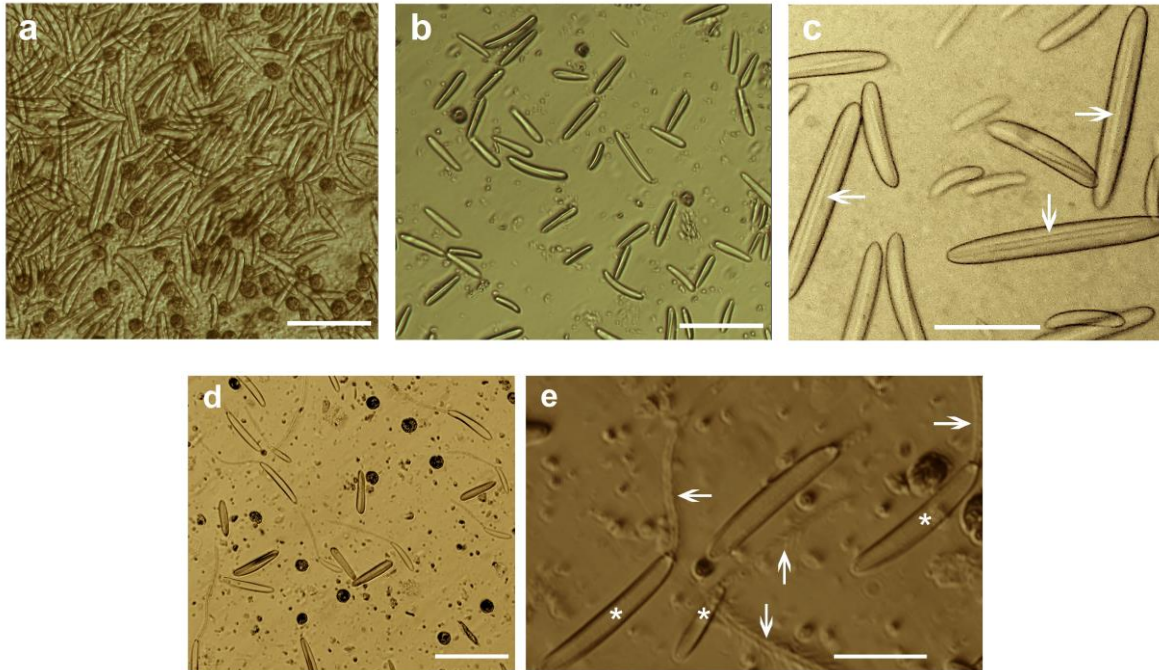


Figura 7. Imágenes de nematocistos de *B. annulata* obtenidas por microscopía de contraste de fases. La imagen a) ilustra las muestras que se obtuvieron a partir de la homogenización del cuerpo entero de *B. annulata*. En b) y c) imagen de los nematocistos obtenidos después de 48 h aplicando el método modificado de Bloom y cols. (1998); se observó una disminución de simbioses. Las flechas de la imagen c) señalan algunos nematocistos sin descargar, donde se puede apreciar el filamento contenido en el interior de la cápsula intacta. En las ilustraciones d) y e) se observan nematocistos descargados de la muestra en b), después de ser procesados utilizando la prensa de French a 6.2×10^7 Pa. Los asteriscos en e) muestran los nematocistos descargados, pudiendo observar que la cápsula está vacía y que el filamento ya ha sido eyectado (flecha blanca) (a, b, d; barra= 50 μm y c y d; barra= 20 μm).

Una vez obtenidos los nematocistos aislados a las 24 ó 48 h, estos fueron descargados utilizando la prensa de French a una presión de 6.2×10^7 Pa; la observación de estas muestras al microscopio se realizó con el objetivo de cuantificar los nematocistos descargados y no descargados, tal y como se observa en las imágenes de la Figura 7e (donde se marcan con asteriscos las cápsulas vacías de los nematocistos y con flechas los filamentos eyectados del túbulo) y la Figura 8. Esta última figura, la gráfica muestra la cuantificación por triplicado de los nematocistos no descargados (barras grises) y descargados (barras verdes) comparando las alícuotas que no habían pasado por la prensa de French con las alícuotas de las mismas muestras de anémonas procesadas con la prensa.

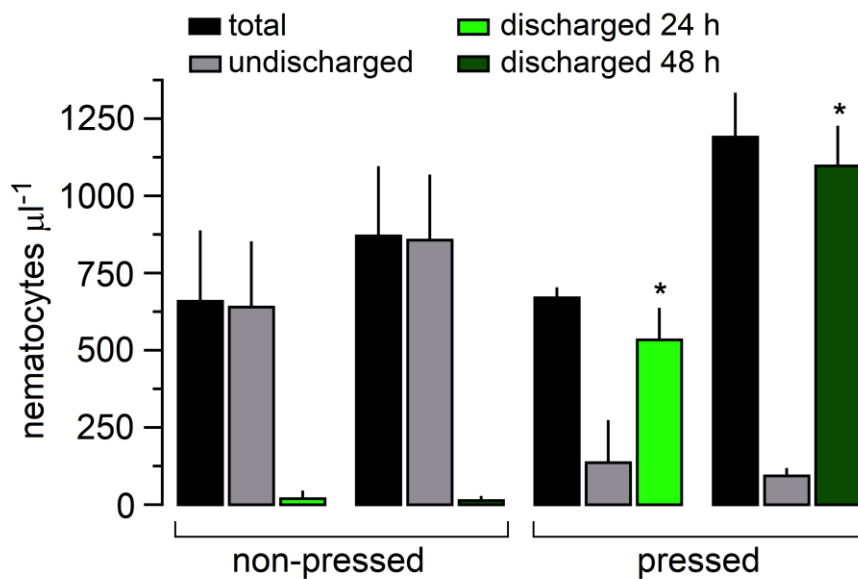


Figura 8. Cuantificación de nematocistos totales, no descargados y descargados (presados con la prensa de French) de preparaciones incubadas 24 h ó 48 h. En la gráfica se muestra la cuantificación de nematocistos totales, así como descargados y no descargados. En cada grupo, las barras de color negro representan el total de nematocistos, en gris los nematocistos no descargados y en verde los nematocistos descargados (por µl) utilizando la prensa de French. Se muestran ambas cuantificaciones de los nematocistos no presados y presados, obtenidos a partir de las preparaciones incubadas por 24 h (verde claro) ó 48 h (verde oscuro) por el método modificado de Bloom (media ± D.E, *p<0.05 nematocistos presados contra no presados de sus respectivos grupos).

La cuantificación mostró que el número de nematocistos aumentó al incrementar el tiempo de incubación de las muestras de 24 a 48 h, obteniendo 659 ± 229 y 870 ± 226 nematocistos por µl, respectivamente. Además, se pudo observar que el número de nematocistos no descargados antes de ser presados era muy bajo, 19 ± 27 y 13 ± 15 nematocistos por µl, respectivamente. Otro punto importante, es que los resultados indicaron que el método de descarga por prensa de French demostró ser muy eficiente, proporcionando un porcentaje alto de nematocistos descargados (Figura 8, barras verdes presado). Por ejemplo, en el caso de la muestra incubada durante 24 h, de un total de 670 ± 34 nematocistos por µl se descargaron por

compresión 533 ± 104 nematocistos por μl , mientras que en la muestra incubada por 48 h, de un total de $1,190 \pm 144$ nematocistos por μl fueron descargados $1,096 \pm 130$ nematocistos por μl .

8.2. Efectos neurotóxicos de los extractos EN y EA inyectados en cangrejos *Ocypode quadrata*.

Con la finalidad de confirmar la presencia de compuestos bioactivos contenidos en el veneno de *B. annulata*, preliminarmente fueron probados ambos extractos EA y EN inyectándolos en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* ($n=4$ para cada muestra). Los cangrejos fueron inyectados con $20 \mu\text{g}$ de extracto por g de cangrejo (de 7 a 15 g); los extractos fueron diluidos en $50 \mu\text{l}$ de PBS. Con ambos extractos fueron observados efectos tales como temblores en las patas locomotoras, quelas y ojos, movimientos incontrolados, periodos de parálisis llegando a la parálisis total y la muerte. Estas alteraciones fueron compatibles con efectos sobre el sistema neuromuscular como ha sido reportado en otros estudios (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006 y Morales-Landa *et al.*, 2007).

Uno de los cangrejos inyectados con EN fue disecado observando que los órganos internos estaban intactos (Figura 9a), a diferencia de lo que se puede ver en cangrejos inyectados con extracto obtenido de *Cassiopea xamachana* (Maravilla-Ulloa, 2015) que provoca necrosis de los órganos (Figura 9b), esto podría estar relacionado con la presencia de citolisinas en el extracto, posiblemente siendo mayor su concentración en el extracto de *C. xamachana* (Torres *et al.*, 2001).

Finalmente fueron inyectados cangrejos (peso 7-10 g; $n=4$) con $50 \mu\text{l}$ de PBS como grupo control, no se observó ningún síntoma de comportamiento anormal ni muerte.



Figura 9. Los venenos de *B. annulata* y de *Cassiopea xamachana* presentaron efectos diferenciales sobre los órganos del cangrejo *Ocypode quadrata*. Las imágenes ilustran los efectos de dos extractos de cnidarios diferentes sobre *O. quadrata*, en a) el cangrejo fue inyectado con EN de *B. annulata* y en b) el cangrejo fue inyectado con extracto ultrafiltrado entre 5 y 10 kDa de la medusa *C. xamachana* (Maravilla-Ulloa *et al.*, 2015).

8.3. Electroforesis de EN y ENP

En la literatura está reportado que la mayoría de las neurotoxinas aisladas y caracterizadas de los cnidarios son de origen proteico (Lazcano-Pérez *et al.*, 2016) es por ello, que se hizo un gel SDS-PAGE al 16% de acrilamida (Figura 10) donde se pudo hacer un primer análisis de la presencia del contenido proteico de EN (sobrenadante de la muestra) y de ENP que se obtuvo de la muestra al ser centrifugada a 100,000 x g. Además, la electroforesis permite obtener un estimado de los pesos moleculares de las proteínas; en la Figura 10 se puede observar que el EN tiene algunas bandas proteicas definidas como las de entre 100 y 75 kDa, entre 50 y 37 kDa, 25 kDa y entre 15 y 10 kDa. Sin embargo, ENP no muestra ninguna banda proteica definida. El perfil proteico de la muestra de EA fue reportado previamente (Colom-Casasnovas, 2015).

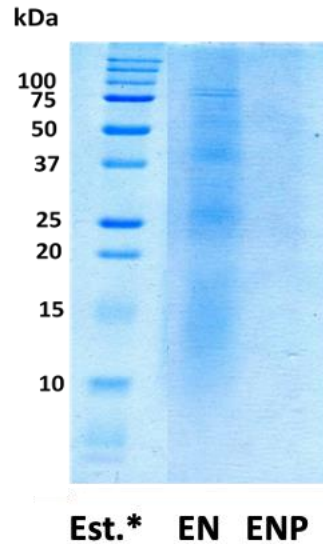


Figura 10. El sobrenadante del extracto de nematocisto contiene proteínas de diferentes pesos moleculares. Imagen de un gel SDS-PAGE al 16% de acrilamida teñido con azul de Coomassie, mostrando el perfil proteico del EN y extracto de nematocisto precipitado (ENP). En el primer carril (Est.*) se cargó el marcador de pesos moleculares que van desde 250 a 2 kDa (Precision Plus Protein Dual Xtra Standard), en el segundo carril se cargaron 1.23 µg de proteína de EN mientras que en el tercer carril se cargó el ENP.

8.4. Registros electrofisiológicos de los efectos del EN y EA en ovocitos y células neurales

De acuerdo con los hallazgos preliminares, mencionados en los antecedentes, en este trabajo se decidió continuar con la caracterización con mayor detalle de los efectos de AE sobre la activación de la respuesta I_s y sobre la inhibición de la I_{Nav} , además de demostrar que estos efectos eran provocados por las preparaciones del EN.

8.4.1. Inhibición de la I_{Nav} inducida por EA y EN

Los primeros registros que se hicieron con ovocitos expresando el mRNA de cerebro de rata (ovocito-mRNA) confirmaron que el EA a una concentración de 1 mgml^{-1} y 0.1 mgml^{-1} fue capaz de inhibir $96.5 \pm 4.97\%$ y $70.8 \pm 15.89\%$, respectivamente, el pico de corriente de la I_{Nav} medido a -20 mV (Figura 11).

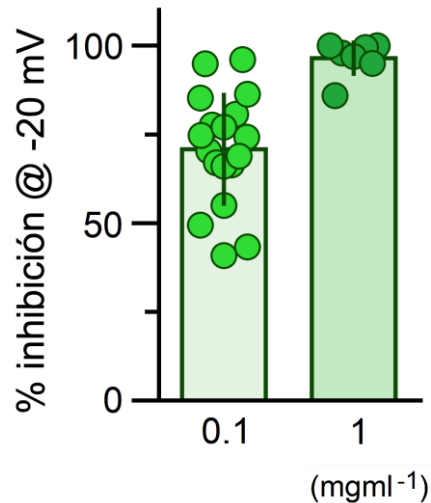


Figura 11. El EA a diferentes concentraciones inhibió la INav expresada en los ovocitos-mRNA. La gráfica ilustra el porcentaje de inhibición de la INav provocado por el EA sobre ovocitos expresando mRNA de cerebro de rata. La corriente entrante dependiente de voltaje activada a -20 mV (desde -100 mV) fue inhibida de manera muy potente por EA tanto a una concentración de 0.1 mgml⁻¹ (18 ovocitos, 7 ranas) como a 1 mgml⁻¹ (7 ovocitos, 3 ranas).

Debido al tamaño del ovocito, la cinética de la INav dentro del rango de potenciales de membrana que fueron probados resulta incierta. Es por esto que se decidió continuar el análisis de este efecto provocado por EA utilizando cultivos de neuronas corticales de rata; esto, al mismo tiempo, permitió poder monitorear con mayor control la INav y confirmar también los efectos del EA y el EN en canales Nav endógenos.

La Figura 12 ilustra la relación corriente-voltaje (I-V) para la corriente entrante generada en el rango de -100 a +40 mV tanto en ovocitos-mRNA (Figura 12a) como en neuronas corticales de rata (Figura 12b); para ambos casos la figura muestra la relación en la ausencia (círculos negros) y en la presencia de EA (círculos verdes). El EA provocó una inhibición de la corriente entrante en ambas preparaciones; además, el efecto inhibitorio tuvo lugar en todo el rango de potenciales de membrana aplicado en el protocolo de estimulación. El EA fue probado en 5 neuronas a una concentración de 0.1 mgml⁻¹, concentración que provocó una inhibición de 95.3 ± 3% (Figura 12b). Las características de la corriente entrante, en ambas preparaciones correspondieron con las de los canales de sodio dependientes de voltaje (INav) y reportadas previamente en varios trabajos de investigación (Narahashi, 2001; Lazcano-Pérez *et al.*, 2014).

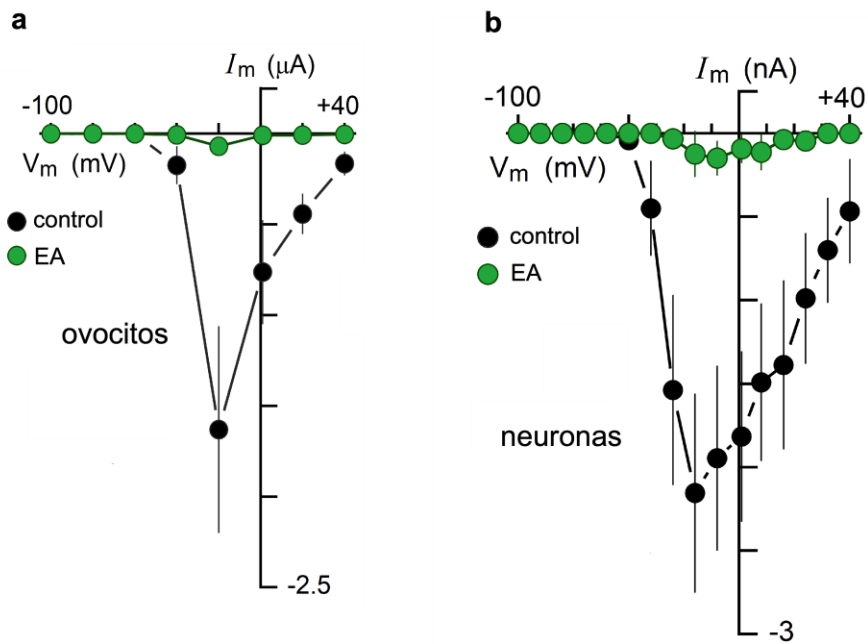


Figura 12. El extracto de la anémona (EA) de *B. annulata* inhibió la INav tanto de ovocitos-mRNA como de neuronas corticales de rata. Las gráficas corriente voltaje (I-V) en a) y b) muestran la generación de la corriente entrante provocada por la apertura de los canales Nav ya sea en ovocitos (8) o neuronas (5) (control, círculos negros), respectivamente; para ambos casos la aplicación de 1 mgml^{-1} de EA (círculos verdes) provocó una robusta inhibición de la INav en todo el rango de voltaje analizado (8 ovocitos y 5 neuronas).

Para explorar el curso-temporal de los efectos provocados por el EA (y otros tratamientos, ver más adelante) sobre la amplitud de la respuesta INav, se utilizó un protocolo como el que se ilustra en la Figura 13; en éste fueron aplicados pulsos a -20 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV y cada pulso tuvo una duración de 20 ms . Fueron aplicados consecutivamente cada 0.75 a 1 s por un período de 70 a 85 s y la secuencia de aplicación de los tratamientos fue por lo general como sigue: primero fue realizado un período control de 10 s de activación de la INav, subsecuentemente los diferentes tratamientos fueron suministrados por 5 ó 10 s , y al término del tratamiento experimental las células fueron lavadas con SEN.

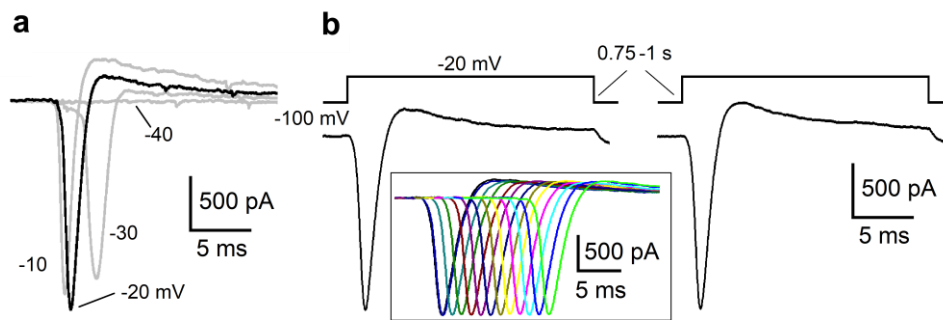


Figura 13. Protocolo de activación de la INav neuronal para monitorear el curso temporal de los efectos provocados por los extractos bajo estudio. En a) se ilustra la INav activada en neuronas a -40, -30, -20 y a -10 mV desde un potencial fijo de mantenimiento de -100 mV. La corriente máxima regularmente se obtuvo a -20 mV. En b) se ilustra el protocolo para probar los efectos de los extractos; de manera similar la INav fue activada despolarizando la membrana a -20 mV desde -100 mV, durante 20 ms cada 0.75-1 s y estos pulsos fueron repetidos por varios segundos mientras se aplicaron los tratamientos experimentales. Para mostrar el curso temporal completo de un experimento en particular, los trazos fueron superimpuestos como se muestra en el inserto, el cual ilustra 12 estímulos consecutivos.

La Figura 14a muestra el curso temporal de la inhibición de INav cuando se suministró el EA, aplicando el protocolo descrito; las neuronas fueron despolarizadas por 20 ms a -20 mV desde un potencial de -100 mV cada 0.75 s. Después de 10 pulsos perfundiendo SEN como control (trazos negros) fue suministrado el EA durante 10 s (trazos verdes), tiempo en el que la INav fue eliminada; finalmente se llevó a cabo el lavado con SEN que provocó recuperación de la INav después de varios segundos (trazos negros). En la gráfica de la Figura 14b se muestra el efecto del mismo protocolo aplicado en 5 neuronas al administrar 0.1 mgml^{-1} del EA (círculos verdes, cada punto representa la media \pm D.E.); estos datos indicaron que la inhibición de la INav provocada por el extracto tuvo lugar con un t_{50} de $2.88 \pm 0.03 \text{ s}$ y que la recuperación de la corriente requirió en la mayoría de los casos un lavado de 30 a 45 s. En esta misma gráfica (Figura 14b) también se representaron las corrientes salientes (círculos amarillos) activadas en el mismo potencial de -20 mV, más probablemente correspondientes a canales de K^+ dependientes del voltaje (Kv); estas corrientes no fueron significativamente afectadas por el extracto.

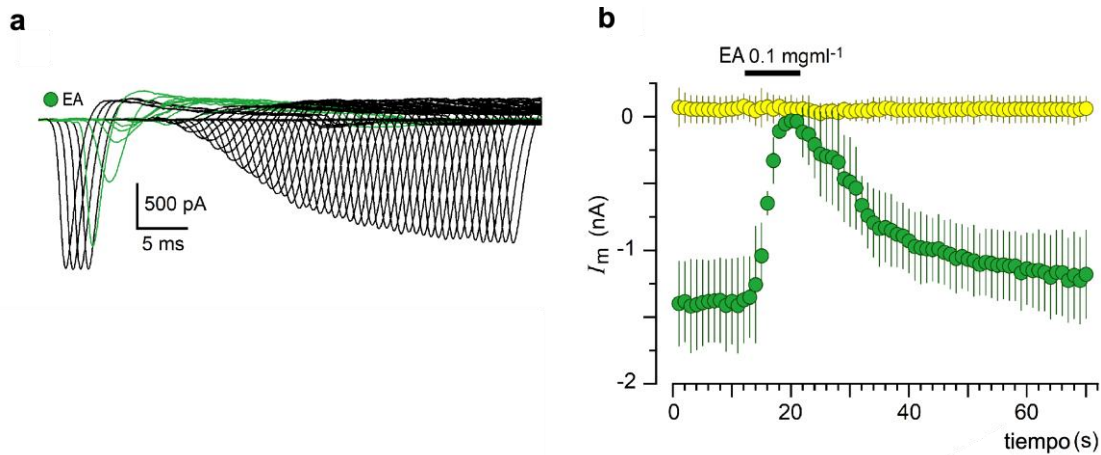


Figura 14. Curso temporal de la inhibición provocada por el EA sobre la INav en neuronas. a) Las corrientes fueron activadas como en la Figura 13. Después del registro control (trazos negros), las neuronas fueron expuestas a EA (trazos verdes) durante 10 s. Durante la aplicación del extracto INav fue inhibida; ésta se recuperó después del lavado con SEA. La gráfica en b) muestra el efecto monitoreado en 5 neuronas diferentes (media \pm D.E.) usando el mismo protocolo; la barra negra indica la aplicación de EA, los círculos verdes la corriente entrante que fue eliminada al aplicar el extracto y los círculos amarillos muestran que las corrientes salientes no presentaron ningún cambio significativo.

Un estimado de la τ_{50} de inactivación producida por el EA no mostró alteraciones significativas; por ejemplo, en un grupo de neuronas ($n=6$) la constante de inactivación control fue de 0.97 ± 0.48 ms, mientras que el mismo parámetro medido en la INav con 50% de inhibición fue de 1.13 ± 0.7 ms, valores que no mostraron diferencia estadística.

Estos mismos experimentos realizados con el EA fueron corroborados con el EN, debido a que es una preparación donde se intentó obtener la totalidad del extracto directamente de los nematocistos de la anémona, permitiendo así confirmar que los efectos que provocan los compuestos activos de *B. annulata* provenían del contenido de los nematocistos.

En la Figura 15 se muestra el curso temporal y la potencia de los efectos provocados por el EA y el EN sobre la INav neuronal. En una concentración de 1 mgml^{-1} de EA la INav fue inhibida $77.9 \pm 12.6\%$ ($n=4$ neuronas), mientras que 1 mgml^{-1} de EN obtenido del mismo grupo de anémonas, incubado por 24 ó 48 h, inhibió la INav $56.8 \pm 5.2\%$ (círculos verdes claro; $n=5$ neuronas) y $69.4 \pm 4.4\%$ (círculos verdes oscuro; $n=5$ neuronas), respectivamente (Figura 15). Ambos extractos de EN (24 ó 48 h) provocaron una menor inhibición del pico de la corriente y tuvieron un curso

temporal más lento al ser comparado con el EA; sin embargo, el efecto inhibitorio fue muy similar.

Las muestras de EN de 48 h que no habían sido prensadas para llevar a cabo la descarga de los nematocistos (círculos grises; Figura 15b) tuvieron una muy baja actividad ($9.2 \pm 4.7\%$) sobre el pico de la INav. Estos resultados sugirieron fuertemente que el efecto sobre la INav fue debido a sustancias que están contenidas directamente en los nematocistos de *B. annulata*.

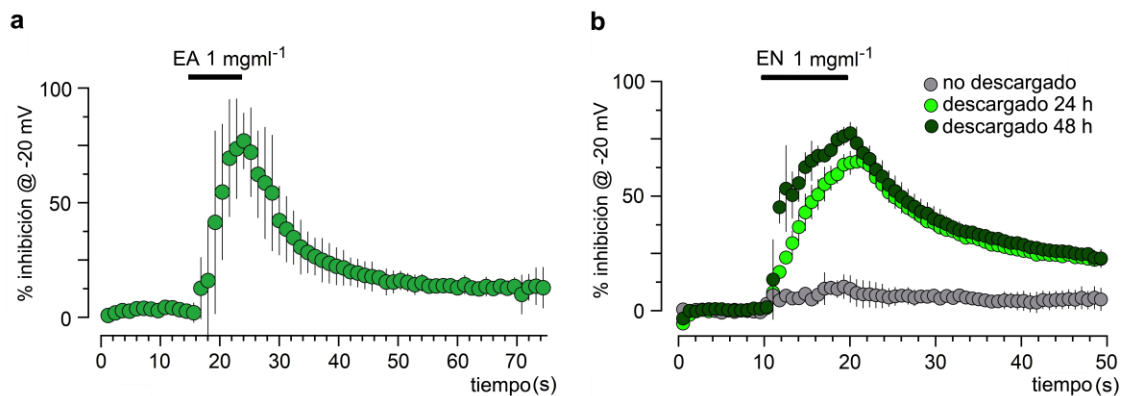


Figura 15. Efecto inhibitorio del EN obtenido de incubaciones por 24 h o 48 h sobre INav. En la gráfica a) se muestra el efecto típico de EA (1 mgml^{-1}) sobre la INav de neuronas a usando el protocolo de la Figura 14. b) Un grupo de anémonas del mismo lote fueron procesadas por el método modificado de Bloom y cols.1998 y sus nematocistos fueron descargados a las 24 ó a las 48 h, los extractos correspondientes fueron probados para evaluar los efectos sobre la INav neuronal activada a -20 mV (verde claro y verde oscuro, respectivamente) desde -100 mV . En gris se muestra el nulo efecto de una muestra de 48 h cuyos nematocistos no fueron descargados. Los círculos de a) y b) representan la media \pm D.E. de 4 a 6 neuronas.

Hasta ahora, una de las toxinas mejor estudiadas y que se sabe que es potente bloqueadora de canales Nav, es la TTX (Narahashi, 1974). La identidad molecular del sitio de unión de TTX en el canal Nav es bien conocido (Narahashi *et al.*, 2001). Por esto, en este estudio se hicieron experimentos con células HEK293 que expresaban canales hNav 1.6 ó hNav 1.5 y así poder explorar si el efecto provocado por el EN actúa de manera similar o en el mismo sitio de unión de TTX. Es sabido que TTX actúa de forma diferencial sobre distintos subtipos de canales Nav; siendo hNav 1.6 un canal sensible a TTX mientras que hNav 1.5 es insensible a TTX (Lee y Ruben, 2008). El protocolo de monitoreo de la INav en las células HEK293 fue similar al

realizado en las neuronas, donde la INav fue activada mediante la aplicación periódica de pulsos despolarizantes a valores cercanos al pico de corriente. Tal y como se muestra en la Figura 16, la perfusión de 1 mgml^{-1} de EN inhibió de manera robusta la corriente generada por la apertura del canal hNav 1.6; este efecto fue similar al observado cuando fue suministrada a las mismas células 50 nM de TTX (Figura 16 a; trazos lilas).

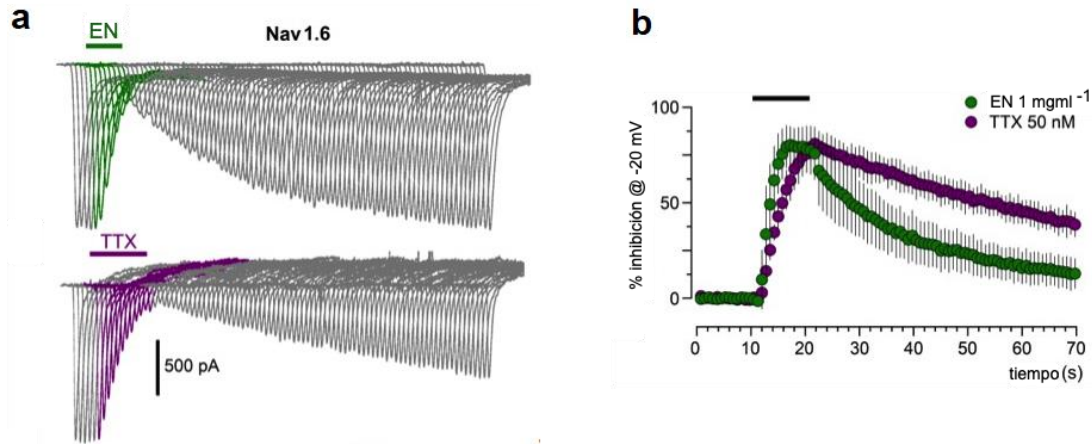


Figura 16. El EN de *B. annulata* inhibió la INav provocada por la apertura de hNav 1.6. a) Las células HEK293 expresando canales hNav 1.6 fueron monitoreadas eléctricamente, la INav fue activada como en la Figura 14. En a) los trazos ilustran la aplicación de 1 mgml^{-1} de EN como es indicado por la barra verde superior; durante la perfusión de EN, la INav decrece progresivamente (trazos verdes) y se recupera durante el lavado. Los trazos en lila muestran el efecto de 50 nM de TTX usando el mismo protocolo. La gráfica b) muestra el curso temporal del efecto inhibitorio producido por cada tratamiento (media \pm D.E., de 6 a 10 células).

En experimentos similares, la aplicación de 1 mgml^{-1} de EN también inhibió fuertemente la corriente generada por la activación del canal hNav 1.5 (Figura 17); sin embargo, tal y como se esperaba, en este canal insensible a TTX, al perfundir 50 nM de TTX en las mismas células se pudo observar que la toxina no afectó la respuesta (Figura 17a; trazos en lila).

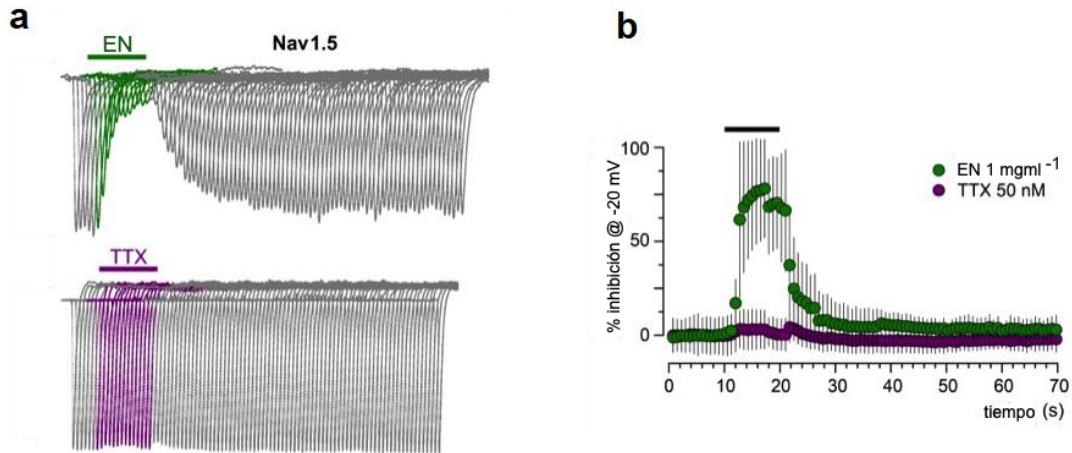


Figura 17. El EN de *B. annulata* inhibió la INav generada por la apertura de hNav 1.5. a) Las células HEK293 que expresaban los canales hNav 1.5 fueron estimuladas para registrar la INav sobre el cual se monitoreó el efecto de EN (trazos en verde) y TTX (trazos lila); como era de esperar la TTX no afectó la INav, mientras que, el EN provocó la inhibición de la INav de los canales hNav 1.5. El curso temporal tanto del efecto del EN como de TTX fue graficado en b) (media \pm D.E. de 5 células en cada tratamiento).

Comparando los rangos de inhibición y recuperación del EN y de TTX sobre la corriente de hNav 1.6, parece que EN actuó con mayor rapidez que TTX. El efecto del EN sobre hNav 1.6 fue dosis dependiente mostrando una EC_{50} estimada de $155 \pm 34 \mu\text{gml}^{-1}$ tal y como se muestra en la Figura 18a, obtenida perfundiendo las células con diferentes concentraciones de EN. También se observó que las muestras de 1 mgml^{-1} de EN ya sea hervidas por 15 min o incubadas por 24 h a 37°C , tuvieron la misma actividad sobre la INav de hNav 1.6 que los efectos mostrados por la misma concentración control del EN (Figura 18b). Estos efectos fueron también confirmados tratando muestras de EA (datos no publicados).

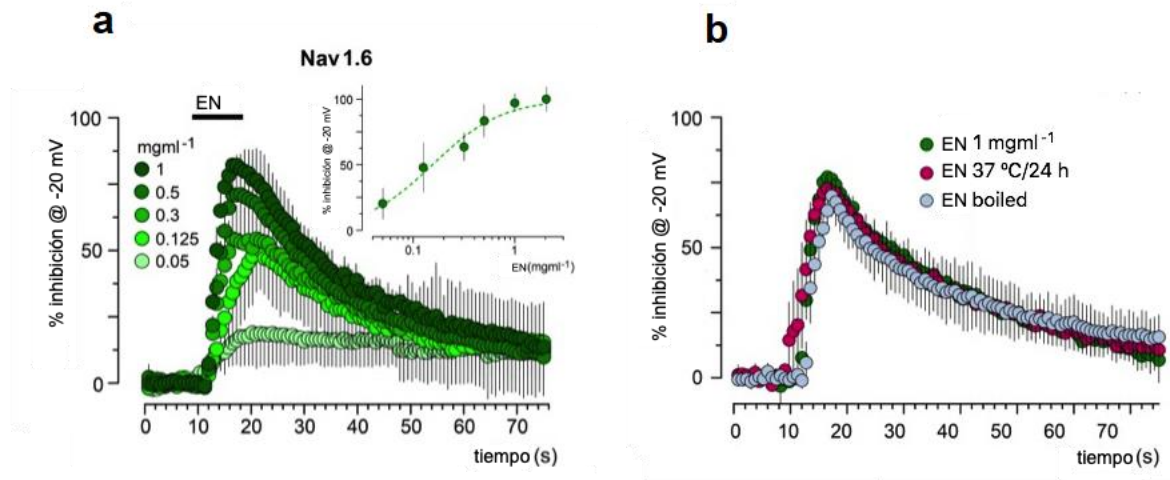


Figura 18. El EN tuvo un efecto dependiente de la dosis sobre la INav de canales hNav 1.6 y además mostró ser termoestable. La gráfica en a) muestra la relación dosis-respuesta del efecto de EN sobre INav en células expresando hNav 1.6. Diferentes concentraciones ($1-0.05 \text{ mgml}^{-1}$) de EN fueron aplicadas a 6 células diferentes. Los puntos representan la media \pm D.E. del efecto. La inhibición máxima normalizada para cada una de las concentraciones (gráfico en el inserto) fueron graficados y los puntos obtenidos fueron ajustados a una curva D-R (línea discontinua verde, $EC_{50} = 155 \pm 34 \mu\text{gml}^{-1}$). En b) se muestra el curso temporal control de la inhibición de INav producida por 1 mgml^{-1} de EN (círculos verdes), así como el efecto producido por EN que fue hervido 15 min (círculos azul claro) y el de EN incubado a 37°C durante 24 h (círculos rosas). Cada punto representa la media \pm D.E. de 5 células en cada caso.

8.4.2. Activación del $GABA_A$ R inducido tanto por EA como por EN

Como se mencionó al inicio de esta sección, al ser aplicado en ovocitos-mRNA el EA activó dos corrientes entrantes diferentes, la I_s y la I_{osc} . Los experimentos de quelación de Ca^{++} intracelular indicaron que la activación de la I_{osc} estaba relacionada con un aumento del Ca^{++} , probablemente como producto de la activación de la fosfolipasa C a través de un receptor metabotrópico, mientras que la activación de la I_s fue claramente independiente del aumento de Ca^{++} . Además, la respuesta I_s fue activada rápidamente y su recuperación fue también rápida en cuanto el extracto fue retirado del medio extracelular; esto sugirió que esta respuesta no estaba relacionada con la activación de un receptor metabotrópico. Al ser una corriente entrante y estar asociada a un aumento de la conductancia de membrana, esta corriente podría ser debida a la apertura de una gran variedad de canales expresados en el SNC; sin embargo, por su rapidez de activación, sugería que el mecanismo de acción era directo, por lo que la

categoría de canales más plausible en este mecanismo fueron los receptores-canal, esto incluiría a los receptores gabaérgicos, los glutamatérgicos e histaminérgicos, entre otros. Después de identificar la activación de la Is en ovocitos-mRNA, se exploró la posible activación de la respuesta tanto en oligodendrocitos como en neuronas corticales mantenidas *in vitro*, esto con dos finalidades principales. La primera, semejante al caso de la inhibición de la INav, fue de interés definir si este tipo de corrientes también aparecían en el ambiente endógeno de las células neurales, o si eran producto de la expresión heteróloga. Y segundo, definir si en el ambiente neural se pudiera esclarecer algunas de las propiedades farmacológicas básicas de la respuesta Is.

Como se ilustra en la Figura 19, la respuesta fue generada tanto en neuronas corticales como en oligodendrocitos, uno de los principales tipos de microglía. En el caso de las neuronas se observó que varias fueron sensibles al EA, generando corrientes entrantes lisas asociadas con un aumento de la conductancia (Figura 19 izquierda) de manera similar a las corrientes provocadas en el ovocito.

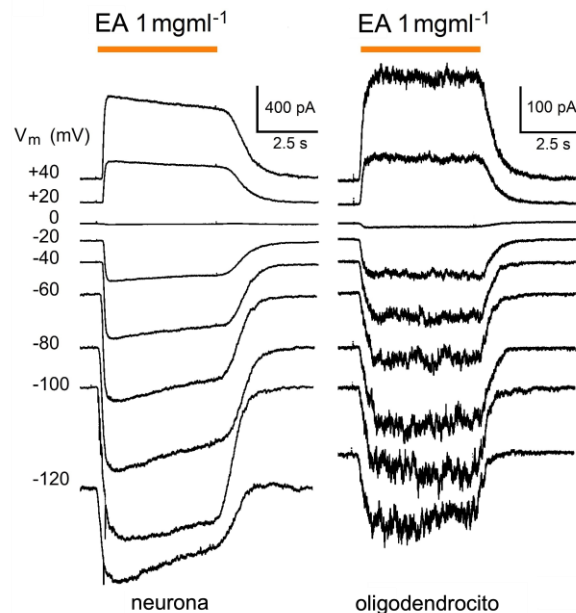


Figura 19. El EA generó respuestas Is en células neurales. Los trazos ilustran la respuesta de corriente típica provocada por 1 mgml^{-1} de EA aplicado, mientras las células fueron mantenidas en diferentes potenciales, como se indica con números a la izquierda de los trazos, tanto en neuronas como en oligodendrocitos; en ambos casos EA provocó una respuesta entrante con un potencial de inversión cercano a 0 mV.

Mientras que los oligodendrocitos también respondieron al EA, a pesar de que la amplitud de respuesta por lo general fue menor (Figura 19 derecha). En la curva I-V el aumento de la conductancia fue evidente; ésta fue construida aplicando pulsos de voltaje a diferentes valores (como se ilustra en los trazos de la Figura 19) y midiendo la corriente máxima correspondiente, estos valores fueron graficados en la Figura 20 para las respuestas obtenidas en neuronas. La relación I-V confirma que el potencial de inversión de la respuesta de corriente generada por el EA tuvo un valor de 0 mV; esto sugirió que el veneno activó canales catiónicos inespecíficos, o selectivos a Cl⁻, ya que el flujo de iones a través de cualquiera de estos podría tener un potencial de inversión de cero. Otra posibilidad fue que se tratara de canales no selectivos por donde pudieran permear tanto aniones como cationes, como ocurre por ejemplo, con la apertura de canales formados por conexones (p. ej. Arellano *et al.*, 1995; Ebihara, 1996). Dado que una posibilidad es el flujo de iones Cl⁻, fueron llevados a cabo experimentos donde fue suministrado el EA a 0.5 mgml⁻¹ en una solución externa que contenía una baja en concentración de Cl⁻ de 36.5 mM comparada con la concentración control de SE de 146 mM Cl⁻. Como se puede observar de la Figura 20, las relaciones I-V obtenidas en cada solución mostraron que en condiciones control E_{rev} fue de -8.8 ± 3.5 mV, mientras que en la solución con bajo Cl⁻ el E_{rev} cambió a valores positivos de $+16.2 \pm 4.3$ mV, mientras que la corriente entrante aumentó en amplitud.

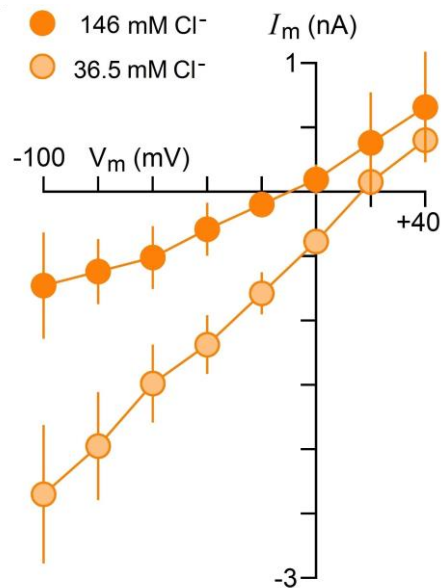


Figura 20. La respuesta I_s generada por el EA es sensible a la concentración de iones Cl⁻ en el medio extracelular. El gráfico muestra la relación I-V de la respuesta provocada por EA en neuronas en solución externa con 146 mM de Cl⁻ (círculos de color naranja oscuros) ó con solución externa que contenía 36.5 mM de Cl⁻ (círculos de color naranja claro). El E_{rev} de la respuesta se desplazó a potenciales de membrana más positivos en la solución externa de bajo Cl⁻ al mismo tiempo que la corriente entrante aumentó en amplitud.

Estos resultados indicaron que la respuesta de corriente entrante parecía ser acarreada principalmente por iones Cl⁻, y el receptor de mayor importancia en el SN que activa corrientes de Cl⁻ es el GABA_AR. Para poder explorar la posible participación de GABA_AR en la respuesta provocada por el EA se utilizaron dos drogas que afectan a estos receptores (Figuras 21 y 22); la picrotoxina que es un bloqueador de los receptores gabaérgicos tipo GABA_A y la bicuculina que es un antagonista competitivo de los receptores (Korpi *et al.*, 2002; Macdonald y Olsen, 1994; Akaike *et al.*, 1984). Para ambas drogas se observó en neuronas una clara inhibición de la respuesta entrante provocada por EA.

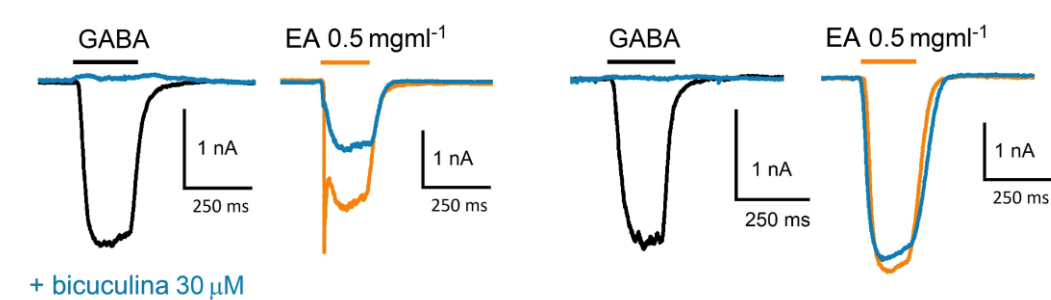


Figura 21. La corriente entrante provocada por EA fue parcialmente inhibida por un antagonista de GABA_ARs. En esta figura se observa la farmacología de la corriente entrante generada por EA en neuronas. Los trazos muestran el efecto de la bicuculina (30 μ M) sobre la corriente entrante provocada por 0.5 mgml⁻¹ de EA. Se ilustran trazos representativos de dos neuronas diferentes; en cada caso primero se registró la corriente a GABA (5 μ M; trazos negros) o a EA (0.5 mgml⁻¹; trazos naranjas), y subsecuentemente las aplicaciones de cada agonista fue realizada junto con bicuculina en cada caso (trazos superimpuestos en azul para la misma neurona). En el caso de la respuesta a GABA, la bicuculina muestra un fuerte efecto inhibitorio en todos los casos. Sin embargo, el efecto provocado por bicuculina sobre la respuesta a EA es menos potente y variable; para diferentes neuronas probadas, en algunas neuronas la corriente entrante se inhibió parcialmente y en pocos casos el efecto fue mucho menor.

En la Figura 23 se ilustra un resumen de los resultados obtenidos para el análisis de los efectos de los inhibidores de la respuesta a GABA en neuronas, comparados con el efecto sobre las respuestas provocadas por el EA.

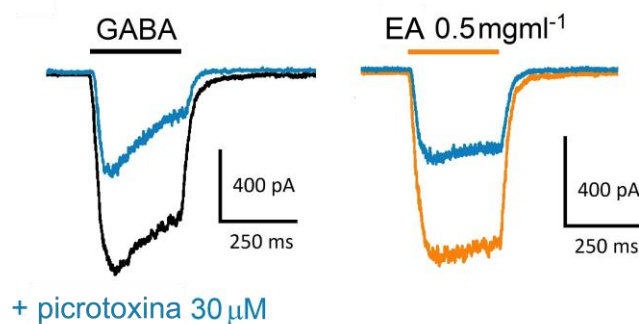


Figura 22. La respuesta de la corriente entrante que provocó AE en neuronas fue parcialmente inhibida por un bloqueador de GABA_ARs. Fueron realizados experimentos similares a la Figura 21, pero en este caso usando la picrotoxina (30 μ M) como bloqueador del GABA_AR. El trazo negro corresponde con la corriente activada por GABA (5 μ M), el trazo naranja es la respuesta a EA (0.5 mgml⁻¹) en la misma neurona y finalmente los trazos en azul corresponden a las respectivas respuestas en presencia de la picrotoxina.

Por ejemplo, en 5-7 neuronas estudiadas (Figura 23), la aplicación de bicuculina inhibió la corriente provocada por 30 μ M de GABA al $19 \pm 18.1\%$ de la corriente control, mientras que la picrotoxina la bloqueó alrededor del 50% de la respuesta de GABA ($48.2 \pm 7.6\%$). En las mismas neuronas la bicuculina y la picrotoxina inhibieron la corriente activada con 0.5 mgml^{-1} de EA a un $57.5 \pm 24.4\%$ y $52.2 \pm 12.8\%$ de la respuesta control, respectivamente (Figura 23).

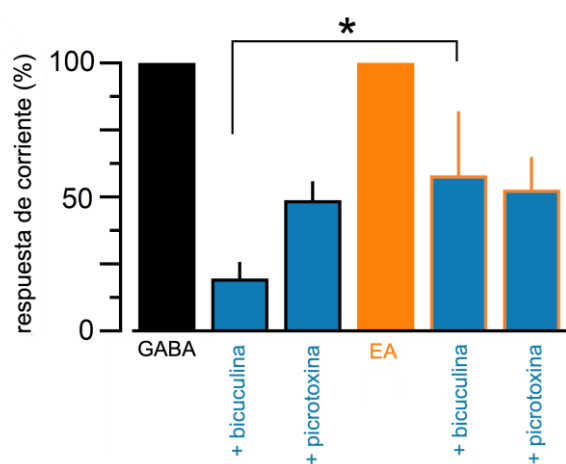


Figura 23. La bicuculina y la picrotoxina inhibieron la corriente entrante activada por EA en neuronas. La gráfica muestra las respuestas normalizadas (media \pm D.E.) obtenidas en 8 neuronas para GABA (en negro) y EA (en naranja) en la ausencia y la presencia de las drogas como se indica. La respuesta en presencia de cada fármaco fue normalizada frente a la amplitud alcanzada cuando solamente fue aplicado GABA o EA (* $p < 0.05$ para el efecto de bicuculina sobre la respuesta generada por GABA o EA).

Como se observa en estas condiciones, 30 μ M de picrotoxina provocó una disminución semejante de la respuesta de la corriente tanto para GABA como para EA (Figura 23). Los resultados mostrados sugieren fuertemente que EA activó GABA_A R neuronales. Debido a que de manera endógena una neurona puede expresar una diversidad de GABA_A R con diferentes propiedades farmacológicas, se analizaron los efectos de EA sobre ovocitos expresando el GABA_A R compuesto por las subunidades $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, ya que se sabe que estos receptores son los que se expresan mayoritariamente en las neuronas.

Como se ilustra en la Figura 24 la aplicación de 10 μM GABA a ovocitos expresando el receptor $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (trazo en negro) generó una corriente robusta entrante con las características de respuestas típicas a GABA a través de GABA_ARs .

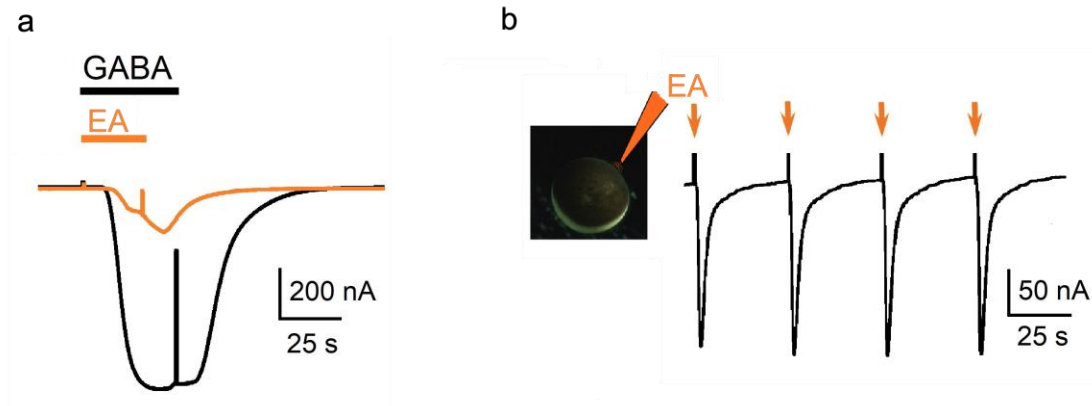


Figura 24. El veneno de *B. annulata* activó receptores GABA_A suministrándolo tanto con perfusión como a través de la pipeta de eyección. a) Los trazos ilustran las corrientes entrantes del receptor GABA_A neuronal $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ expresado en ovocitos de rana *Xenopus*; las células fueron mantenidas a -60 mV y perfundidas con GABA ($10 \mu\text{M}$; trazos negros) ó EA (1 mg ml^{-1} ; trazo naranja). En b) el EA fue aplicado cerca de la membrana del ovocito usando el método de eyección, el cual consiste en administrar un pequeño volumen ($25\text{-}75 \text{ nl}$) del contenido de una micropipeta cargada con EA (0.5 mg ml^{-1}). Cada aplicación es señalada con una flecha naranja; 4 aplicaciones fueron hechas sucesivamente mostrando que la corriente generada fue robusta y reproducible.

En estos mismos ovocitos la aplicación de 0.5 mg ml^{-1} EA (trazo naranja) provocó una corriente entrante con las características de la *Is* mostrada anteriormente en los ovocitos-mRNA. Debido a que la perfusión general del ovocito implica utilizar un volumen considerable ($5\text{-}10 \text{ ml}$ por minuto) de la solución conteniendo el extracto (en el ejemplo, fueron aplicados 5 ml de solución en alrededor de 25 s), los experimentos de este tipo resultan inviables por la cantidad de material requerido. Por tanto, fue ideado un método de aplicación que utilizó volúmenes mucho más pequeños. Esto se logró posicionando una pipeta de eyección en la cercanía del ovocito como se ilustra en la Figura 24b. La pipeta contenía el EA en solución RN y cuando una nanodosis de esta solución fue eyectada de la pipeta, por un pulso de presión controlado, el EA difundió hasta la superficie del ovocito donde ejerció su efecto como mostramos en los

siguientes experimentos. La aplicación de GABA fue hecha por el método convencional, perfundiendo el agonista, mientras que las aplicaciones de EA fueron hechas aplicando la solución a través de la pipeta externa de eyección, estas respuestas pueden ser repetidas varias veces en el curso de un experimento y fueron por completo reproducibles (ver Figura 24).

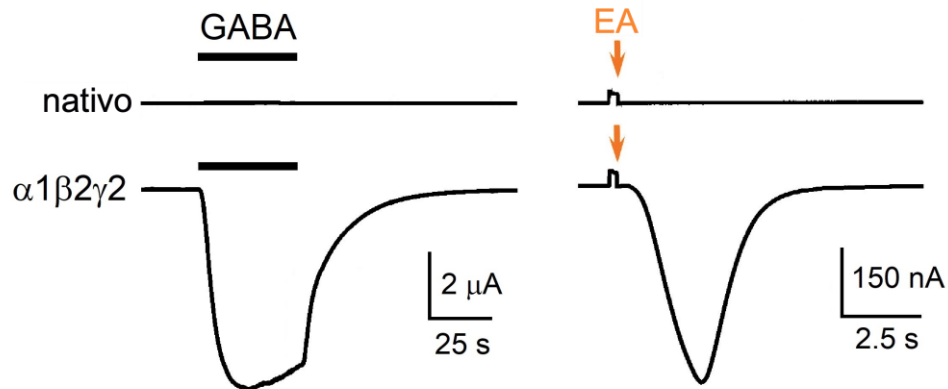


Figura 25. El veneno de *B. annulata* activó los GABA_AR neuronales. Los trazos en el renglón superior muestran la corriente de membrana de ovocitos no inyectados mantenidos a -60 mV, mientras que los trazos inferiores corresponden a ovocitos inyectados con el cRNA de las subunidades $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ del GABA_AR. En ambos casos las células fueron estimuladas con GABA (10 μ M) o EA (1 mgml⁻¹), como lo señala la barra negra de perfusión o la flecha naranja de eyección, respectivamente. Respuestas para ambas sustancias solo fueron observadas en los ovocitos expresando el receptor $\alpha 1\beta 2\gamma 2$.

La Figura 25 ilustra las respuestas provocadas por GABA y EA en dos condiciones: los trazos en la parte superior corresponden a aplicaciones hechas sobre ovocitos nativos, donde no se observó ninguna respuesta, mientras que los trazos de abajo corresponden a aplicaciones en ovocitos expresando el receptor neuronal $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Como puede observarse (Figura 25) tanto 10 μ M GABA como 1 mgml⁻¹ de EA (y EN ver Figura 26) activaron corrientes entrantes en los ovocitos expresando el GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. La relación I-V de las respuestas a los extractos fue construida activando la corriente, tanto para el EA como para el EN, utilizando el método de eyección mientras el potencial de membrana fue controlado en diferentes valores de -100 a +40 mV. El E_{rev} para ambas respuestas fue de -22.8 ± 2.6 mV como se muestra en la Figura 29, este valor correspondió con el potencial de inversión para Cl⁻ en los ovocitos.

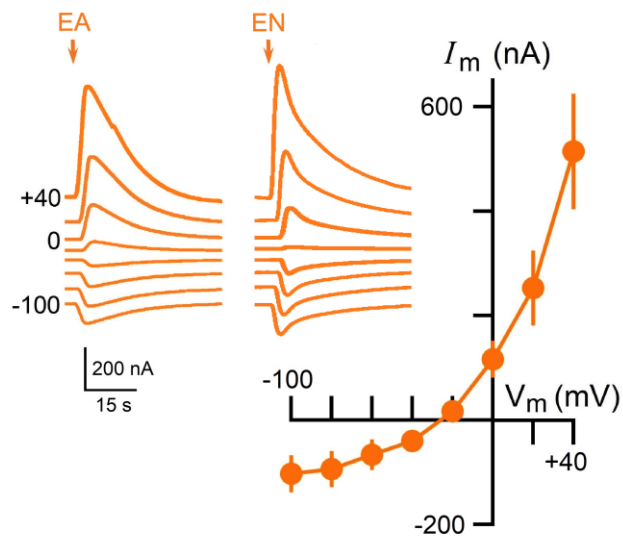


Figura 26. El EA y el EN activaron una corriente entrante promovida por el flujo de Cl^- en ovocitos expresando el GABA_AR neuronal. La figura ilustra la relación I-V de la respuesta provocada por el EA o el EN en ovocitos. Los trazos naranjas indican las respuestas de corriente a diferentes potenciales, de -100 a +40 mV, provocados por la aplicación del EA o del EN. Las amplitudes de respuesta al EA en cada potencial fueron promediadas y graficadas (media \pm D.E.); ambos E_{rev} tuvieron un valor cercano a -20 mV (6 ovocitos, 2 ranas).

Tanto el EA como el EN tuvieron también efecto sobre ovocitos expresando GABA_AR_5 compuestos por otras subunidades, especialmente, los receptores los compuestos por las subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ típicamente expresados en células oligodendrogliales (Ordaz *et al.*, 2021) y los homoméricos de $\rho 1$.

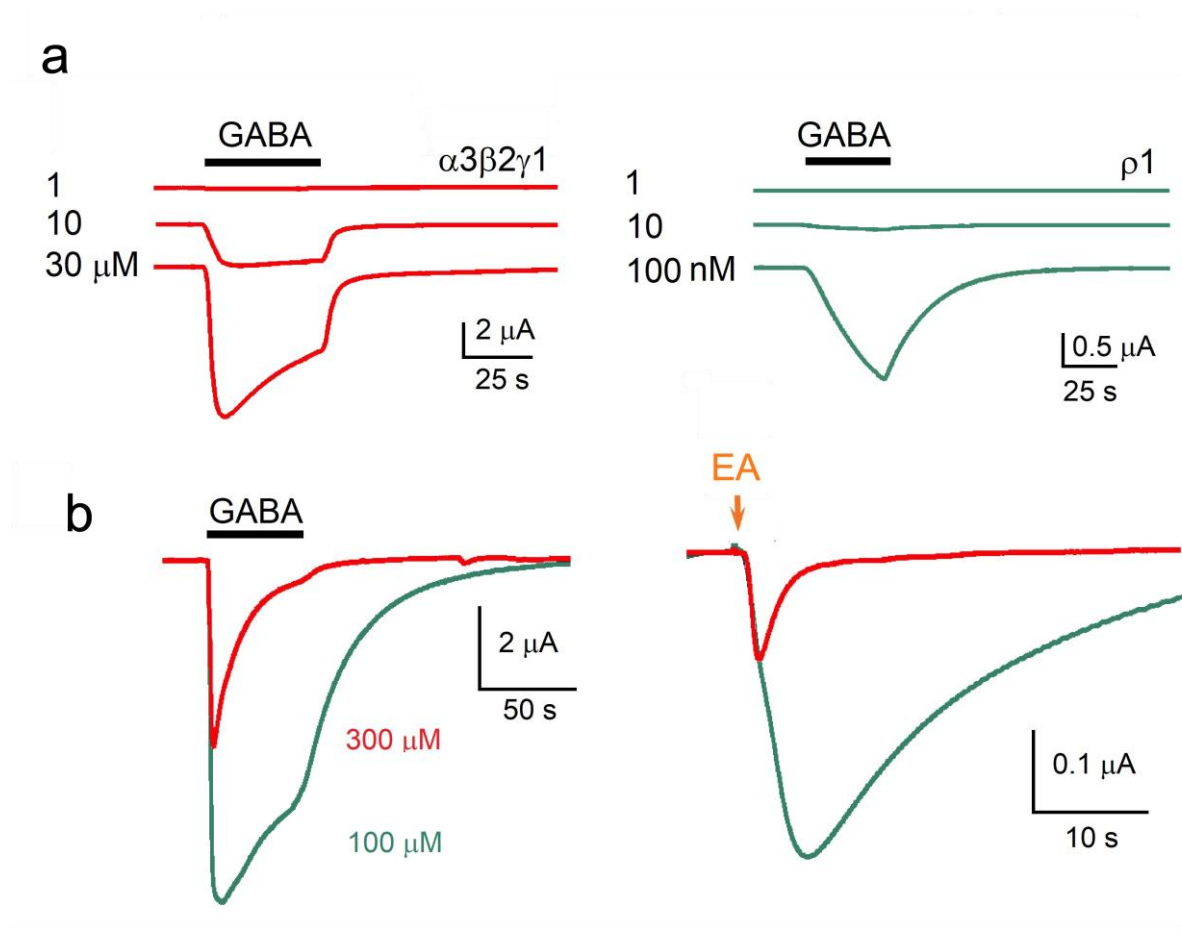


Figura 27. El EA activó el receptor $GABA_A$ oligodendroglial ($\alpha3\beta2\gamma1$) y el receptor $GABA_A$ homomérico $\rho1$ expresados en ovocitos de rana. En a) se muestran las respuestas a diferentes concentraciones de GABA tanto para $GABA_A$ R $\alpha3\beta2\gamma1$ como para el $\rho1$. En b) los trazos de la izquierda ilustran las respuestas provocadas por la máxima concentración de GABA al ser aplicado en ovocitos expresando el receptor $\alpha3\beta2\gamma1$ (trazos rojos) o el receptor $\rho1$ (trazos verdes); mientras que los trazos de la derecha muestran la respuesta, de los mismos ovocitos, provocada por el mismo volumen de 1 mg ml^{-1} de EA. Los trazos son representativos del resultado obtenido en 7 diferentes ovocitos de 3 ranas diferentes.

El receptor $\alpha3\beta2\gamma1$ tiene una EC_{50} para GABA de $80 \mu\text{M}$ con un umbral de respuesta cercano a $1 \mu\text{M}$ (Arellano *et al.*, 2016) (trazos rojos en Figura 27). Por otro lado, el receptor neuronal expresado en la membrana de los ovocitos tiene una EC_{50} alrededor de $100 \mu\text{M}$ con un umbral también cercano a $1 \mu\text{M}$, mientras que el $GABA_A$ R homomérico $\rho1$ tiene una EC_{50} de $1.2 \mu\text{M}$, con un umbral en el rango nanomolar (Figura 27, trazos verdes). Usando los mismos parámetros de aplicación por el método de inyección desde la micropipeta, las respuestas

obtenidas en los receptores oligodendroglial y homomérico (Figura 27b), tuvieron siempre una relación de amplitud esperada para el respectivo GABA_AR expresado, por lo que, las respuestas del receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ fueron de menor amplitud para un volumen del EA determinado, comparado a las obtenidas al estimular el receptor $\rho 1$. Dado que el receptor oligodendroglial requiere de concentraciones mayores a 1 μM de GABA para su activación, los resultados sugieren que si la respuesta fuera provocada por GABA contenido en el veneno, éste debería contener concentraciones por arriba de este nivel.

8.5. Detección de GABA en EA y EN

Los resultados anteriores podrían estar indicando que EA y EN contienen GABA en una concentración mayor a 1 μM , ya que esta concentración es el umbral de respuesta del GABA_AR tanto neuronal como oligodendroglial. Debido a esto las muestras fueron analizadas usando una prueba ELISA específica para detección de GABA, la cual tiene una sensibilidad de detección nanomolar. Para esto, a tres muestras tanto de EA como de EN, que mostraron actividad sobre los receptores $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ y $\alpha 3\beta 2\gamma 1$, les fue estimada por la prueba de ELISA el contenido de GABA, determinando que estas muestras contenían una concentración de GABA de 9.97 ± 1.8 nM. Esta concentración de GABA sugirió que *B. annulata* contiene un compuesto en su veneno que funciona como un potente agonista y/o potenciador del GABA_AR diferente al GABA.

8.6. Purificación parcial del EA

8.6.1. Separación del EA utilizando cromatografía de exclusión molecular

Como primera aproximación para separar las toxinas involucradas en los efectos que se describieron, se llevó a cabo la cromatografía de exclusión molecular usando Sephadex G-50 M, cuyo objetivo fue separar las sustancias contenidas en el extracto en función de su peso molecular. En el patrón cromatográfico del EA (Figura 28) fueron separados tres picos, los cuales se identificaron como fracciones FI, FII y FIII, donde se presume que la FI tiene contenidas las moléculas de mayor peso molecular y en la FII y FIII las de menor. En el

cromatograma de la Figura 28, la columna fue cargada con 1 ml de extracto crudo a una concentración de 50 mgml^{-1} . Se utilizó PBS para eluir la muestra a una velocidad de flujo de 0.3 mlmin^{-1} .

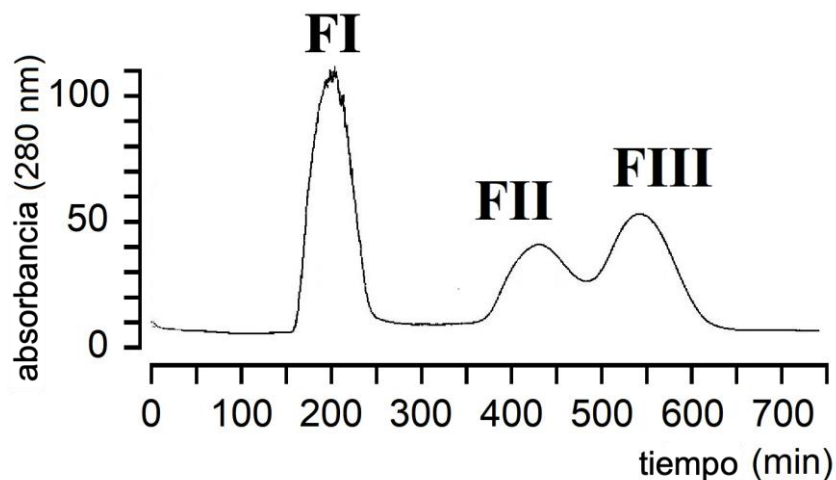


Figura 28. Fracciones de EA obtenidas con filtración en gel Sepahdex G-50 M. La columna de $90 \times 8 \text{ cm}$, fue equilibrada con PBS, la absorbancia fue monitoreada a 280 nm y las fracciones se colectaron a un flujo de $300 \mu\text{lmin}^{-1}$. Se detectaron tres picos de absorbancia, los cuales se dividieron en tres fracciones nombradas FI, FII y FIII.

8.6.2. Registros electrofisiológicos de los efectos provocados por las fracciones (FI, FII y FIII) obtenidas mediante exclusión molecular

8.6.2.1. Inhibición de INav inducidas por FI, FII y FIII

Los bioensayos de estas fracciones sobre la INav neuronal (Figura 29) indicaron que la FI a una concentración de 1 mgml^{-1} no afectó la corriente de Na^+ , mientras que la FII mostró tener un efecto potente de inhibición de la INav del $99.82 \pm 0.47\%$. La FIII también tuvo actividad e inhibió la corriente de Na^+ en un $79.5 \pm 25.9\%$; sin embargo, esta fracción mostró tener una mayor dispersión comparada a la FII. La inhibición medida para FII y su curso temporal fueron similares a los efectos provocados por el EA y el EN (Figura 29).

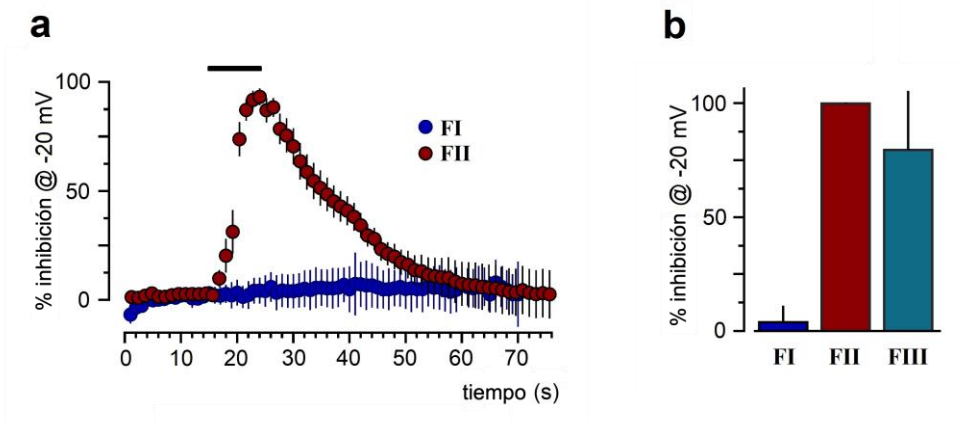


Figura 29. Las fracciones FI-FIII obtenidas por cromatografía de exclusión molecular inhibieron la INav neuronal. En a) se muestra el curso temporal de los efectos de FI y FII (1 mgml^{-1}) sobre la INav (media \pm D.E.) activada a -20 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV utilizando el protocolo de la Figura 13 (6-14 neuronas en cada caso) b) La gráfica de barras muestra el resumen de los datos de la inhibición provocada por cada una de las fracciones a una concentración de 1 mgml^{-1} .

La sensibilidad de la INav a la fracción FII mostró de forma clara una relación D-R con una dosis media de $80.4 \pm 16 \mu\text{gml}^{-1}$, tal y como se ilustra en la Figura 30. Fue entonces importante confirmar que la FII que presentó la mayor actividad tenía efecto sobre la generación de potenciales de acción provocados en las neuronas corticales, ya que esta es la actividad funcional que depende de la apertura de los canales Nav. Para esto, lo que se hizo fue aplicar pulsos de corriente constante (de 0.65 a 0.85 nA) para generar potenciales de acción cada 1 - 1.2 s al 30% por encima del umbral de activación, y evitar con esto fallas en la generación de los impulsos. Una vez establecida la amplitud de estimulación, fueron aplicadas diferentes concentraciones desde 0.01 a 1 mgml^{-1} de FII durante 10 s ($n=4$, Figura 29a); fue observado que se provocó una inhibición completa del potencial de acción desde la dilución de 0.05 mgml^{-1} después de 3 a 4 s de perfusión (Figura 29b), mientras que de 0.1 a 1 mgml^{-1} fue observada una mayor eficacia de inhibición, bloqueando los potenciales de acción desde el primer segundo de la aplicación. La FII en estas concentraciones produjo un rápido bloqueo del potencial de acción y la duración del mismo no se vio afectada durante la aplicación de la fracción. En todas las concentraciones ensayadas, la recuperación de la amplitud del potencial de acción fue completa después del lavado.

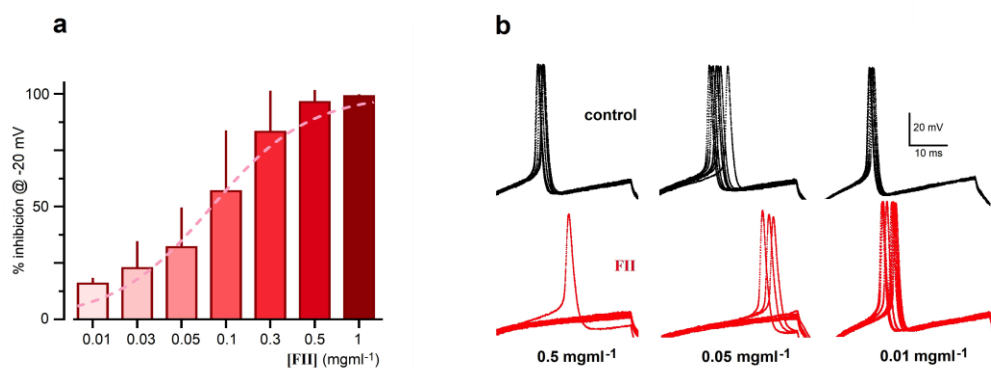


Figura 30. La FII de Sephadex G-50 M inhibió la INav con una relación D-R que se correlaciona con su potencia de bloqueó del potencial de acción. a) La fracción FII fue probada en diferentes concentraciones y la curva D-R fue construida y ajustada, indicando que la EC_{50} para FII fue de $80 \pm 16 \mu\text{g ml}^{-1}$. b) Los trazos ilustran el efecto de tres concentraciones de FII sobre la generación del potencial de acción. Los trazos en negro (10 trazos superpuestos en cada caso) corresponden a los potenciales de acción control, es decir, previo a la aplicación de FII a la concentración señalada abajo. Los trazos en rojo fueron obtenidos durante la aplicación de FII en la misma neurona de los controles. En este ejemplo los potenciales de acción fueron activados por pulsos despolarizantes de 0.75 nA de amplitud y 35 ms de duración.

Estas mismas fracciones fueron probadas sobre células precursoras de oligodendrocitos, donde se observó el mismo comportamiento anteriormente visto sobre la INav generada en las células neuronales corticales, donde FI no mostró tener efecto sobre la corriente, a diferencia de FII y FIII que inhibieron la INav (datos no publicados).

8.6.2.2. Activación del $GABA_A$ R inducida por FI, FII y FIII

Las fracciones también mostraron potencia diferencial en neuronas: 1 mgml⁻¹ de FI no generó ninguna corriente entrante en 7 neuronas probadas; 1 mgml⁻¹ de FII generó una corriente entrante de $1,128 \pm 763$ nA (13 neuronas), mientras que la FIII generó un pico de corriente de 170.3 ± 112 nA (7 neuronas), sugiriendo que el efecto fue provocado por una sustancia que se encontró principalmente en la fracción FII.

8.6.3. Espectrometría de masas MALDI-TOF de las fracciones FII y FIII

A continuación, fue realizado un análisis químico de las fracciones FII y FIII, las dos fracciones que mostraron efecto robusto sobre INav; para esto fue utilizada la espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 31). En ambas fracciones se pudo observar que el rango de masa molecular estaba entre 3 y 12 kDa; el espectro de la FII mostró que es una fracción con mayor complejidad en su composición que la FIII. Fueron detectados componentes que podrían ser equivalentes en ambas fracciones; p. ej. en FII fueron detectadas m/z 5,914.34 y 12,382.10 y en FIII m/z 5,911.56 y 12,368.31 (Figura 34); esto podría explicar por qué ambas fracciones tienen efectos similares. Sin embargo, también cabe la posibilidad de que existieran dos sustancias diferentes en cada una de las fracciones FII y FIII y que ambas estuvieran produciendo el mismo efecto sobre la INav.

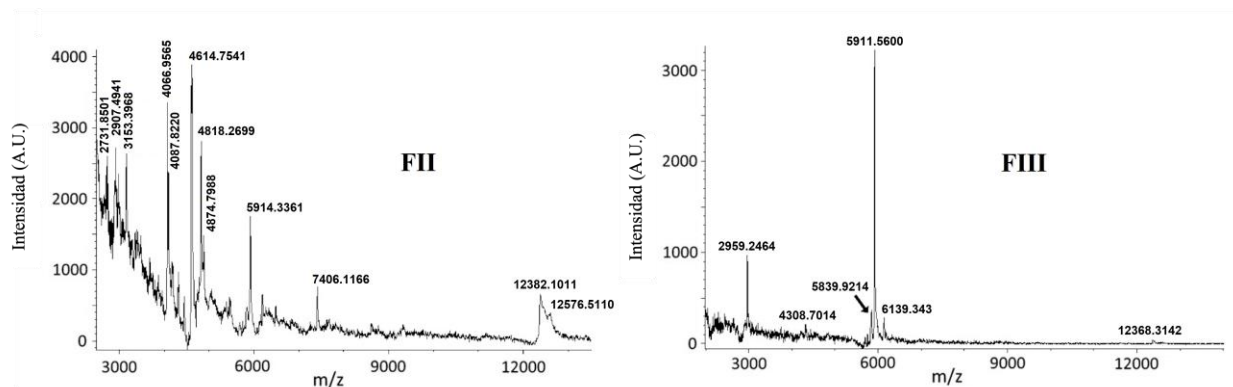


Figura 31. Espectro de masas por MALDI-TOF de las FII y FIII obtenidas a partir de la cromatografía de Sephadex G-50 M del EA. En ambas imágenes los números indican las masas (m/z) de las principales señales detectadas.

8.6.4. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (CLAR-FR) de las fracciones FI,

FII y FIII

Con el objetivo de continuar con la purificación de las fracciones obtenidas en la separación por exclusión molecular utilizando Sephadex G-50 M, FI, FII y FIII fueron separadas en función de la hidrofobicidad de los compuestos utilizando cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.

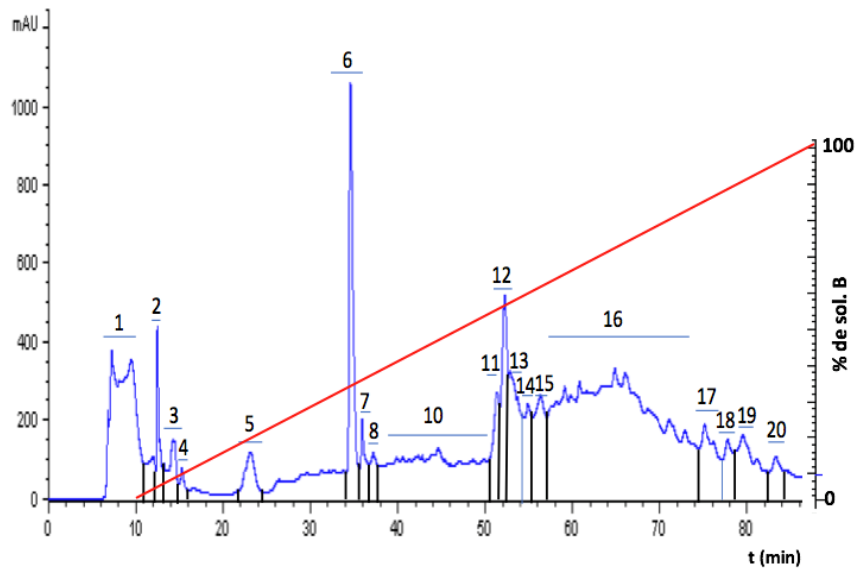


Figura 32. Perfil cromatográfico obtenido con la purificación parcial de la fracción FI obtenida por Sephadex G-50 M. En la barra del eje X se representa el tiempo de retención al que salen las fracciones de la muestra y en el eje Y se representan las unidades de absorbancia. Los números y líneas representan las fracciones que se colectaron de FI. Se hicieron 8 inyecciones diferentes con un total de 2.6 mg de proteína; para ello se usó un gradiente lineal de 0 a 100% aumentando al 1% de solución B (acetonitrilo 90% + 0.085% TFA) por minuto, con una elución isocrática al principio de 10 min. La velocidad de flujo fue de 1 mlmin⁻¹. Se usó una columna C18, analítica y la muestra se leyó a una longitud de onda de 220 nm.

Tal y como se ilustra en la Figura 32, en el cromatograma de la FI se obtuvieron 20 fracciones diferentes inyectando un total de 2.6 mg de proteína dividido en 8 inyecciones diferentes. Con estas fracciones no se hicieron pruebas de bioactividad, solamente fueron cuantificadas de forma semicuantitativa (Tabla II).

Tabla II. Fracciones obtenidas con el perfil cromatográfico de FI y la cuantificación de la proteína total de cada fracción después de ser concentradas.

Nº DE FRACCIÓN	µg DE PROTEÍNA	Nº DE FRACCIÓN	mg DE PROTEÍNA
1	261	11	66
2	567	12	145.5
3	14	13	112
4	0.7	14	90
5	153	15	54
6	102	16	1311
7	18	17	88
8	18.5	18	53
9	7	19	149
10	86	20	32

Un proceso similar se siguió para el cromatograma de la FII; en la Figura 33 se observa que para esta fracción se obtuvieron 8 fracciones inyectando un total de 133 µg de proteína, mientras que en la FIII se inyectaron 84 µg de proteína y también se obtuvieron 8 fracciones (Figura 34). Además, cada una de las fracciones fue cuantificada y los resultados se muestran en las Tablas III y IV).

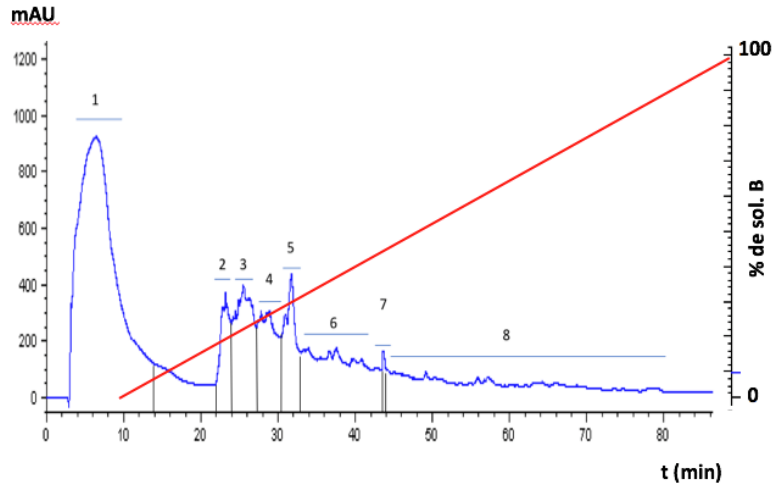


Figura 33. Perfil cromatográfico de la fracción FII obtenida por Sephadex G-50 M. En el eje X está representado el tiempo de retención de las fracciones, en el eje Y se representan las unidades de absorbancia, las líneas numeradas marcan la división de fraccionamiento que se realizó y por último a la derecha la Tabla se indica la cantidad de proteína total de cada una de las fracciones después de ser concentradas todas las inyecciones que se realizaron. El protocolo de elución fue 10 min de isocrático y seguir con un gradiente lineal de 0% a 100% de solución B (acetonitrilo 90% + 0.085% TFA), aumentando cada minuto 1% de solución B. La velocidad de flujo fue de 1 mlmin⁻¹. Se usó una columna C18 analítica y la muestra se leyó a una longitud de onda de 220 nm.

Tabla III. Proteína total de cada una de las fracciones después de ser concentradas todas las fracciones obtenidas en cada una de las inyecciones.

Nº DE FRACCIÓN	µg DE PROTEÍNA
1	27
2	37
3	6
4	1
5	8
6	19
7	20
8	11

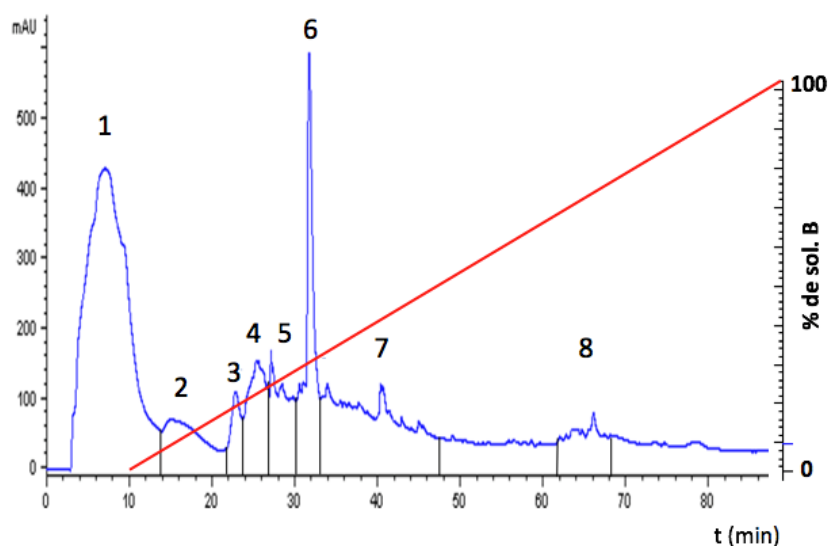


Figura 34. Perfil cromatográfico de la fracción III obtenida por Sephadex G-50 M. En el eje X está representado el tiempo de retención de las fracciones y en el eje Y las unidades de absorbancia. Las fracciones están enumeradas de la 1 a la 8. El protocolo de elución fue 10 min de flujo isocrático y un gradiente lineal de 0% a 100% de solución B (acetonitrilo 90% + 0.085% TFA) aumentando cada minuto el 1% de solución B, el cual está marcado con una línea de color rojo. La velocidad de flujo fue de 1 mlmin⁻¹. Se usó una columna C18, analítica y la absorbancia fue monitoreada a 220 nm.

Tabla IV. Proteína total de cada una de las fracciones obtenidas en la purificación parcial de la III.

Nº DE FRACCIÓN	µg DE PROTEÍNA
1	44
2	5
3	2
4	6
5	5
6	9
7	10
8	2

8.6.4.1. Registros electrofisiológicos: Inhibición de INav provocada por las fracciones obtenidas por CLAR-FR.

Los registros electrofisiológicos se hicieron sobre neuronas corticales de rata, permitiendo así identificar las fracciones con actividad sobre la INav. En las siguientes figuras se ilustra gráficamente el porcentaje de inhibición de la corriente de Na⁺ provocado por el suministro de las fracciones tanto de FII (Figura 35) como de FIII (Figura 36) obtenidas por CLAR-FR. En ambos casos la f1 es la que tiene efecto sobre la INav provocando el $99.6 \pm 0.42\%$ (n=2) de inhibición en el caso de la FII f1 y el $80.43 \pm 9.4\%$ (n=6) de inhibición en el caso de FIII f1.

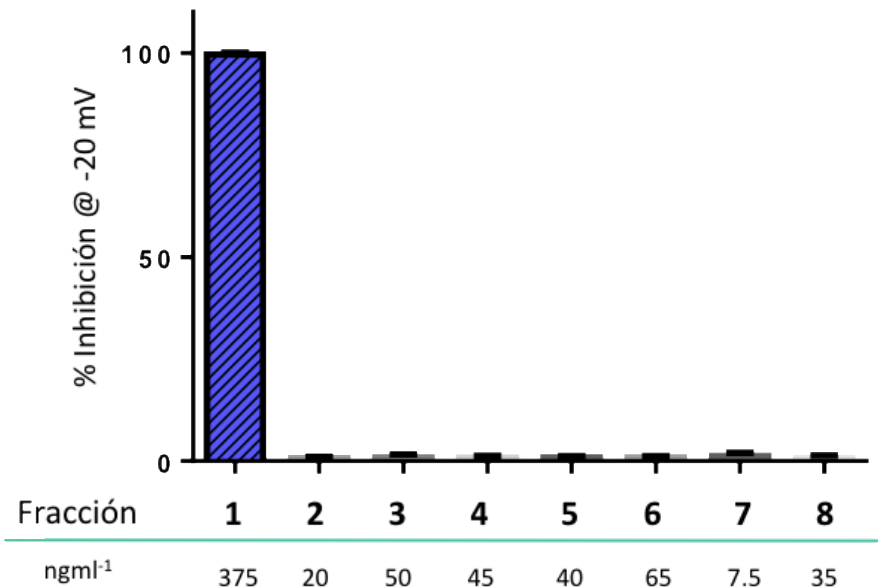


Figura 35. El máximo de inhibición de INav neuronal fue obtenido en la f1 de FII por CLAR-FR. En esta gráfica se representó el porcentaje de inhibición de la INav provocado por las diferentes fracciones obtenidas al purificar parcialmente con CLAR-FR la fracción FII. En el eje de las X está representado el número de fracción y la concentración de proteína probada y en el eje de las Y está representado el porcentaje de inhibición de la INav.

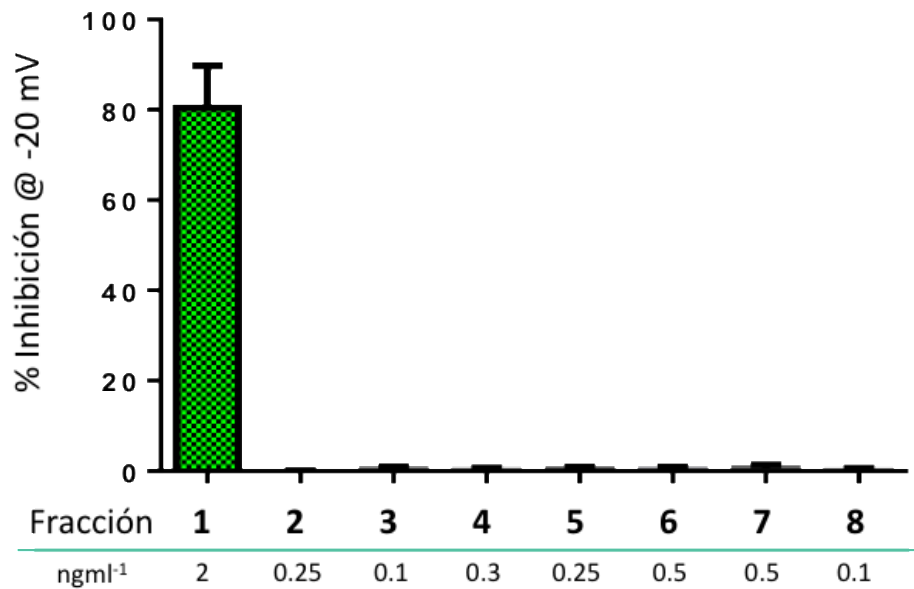


Figura 36. El máximo de inhibición de INav neuronal fue obtenido en la f1 de FIII por CLAR-FR. En esta gráfica se representó el porcentaje de inhibición de la corriente de Na⁺ provocado por las diferentes fracciones de FIII obtenidas por CLAR-FR. En el eje de las X está representado el número de fracción y la concentración de proteína probada y en el eje de las Y está representado el porcentaje de inhibición de la INav.

8.7. Purificación parcial de EN

8.7.1. Tamizado molecular del EN

Como primer paso de purificación parcial del EN fue ultrafiltrar la muestra con una membrana de corte de 30 kDa; sin embargo, al realizar las pruebas de bioactividad con registros electrofisiológicos utilizando neuronas corticales de rata, se observó que los efectos sobre la INav no eran significativos ($15.57 \pm 13.27\%$, n=2), por tanto las muestras perdieron la actividad

durante este proceso de separación, ya que la muestra de EN, previamente probada sobre diferentes tipos celulares, sí mostró tener efecto inhibitorio sobre la INav.

8.7.2. CLAR-FR del EN

Debido a que no hubo efectos significativos al aplicar la estrategia de purificación utilizando las membranas de corte de 30 kDa, decidimos llevar a cabo directamente la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, donde fueron obtenidas 9 fracciones (Figura 37). Se inyectó un total de muestra de 1.5 mg de proteína en 8 inyecciones diferentes.

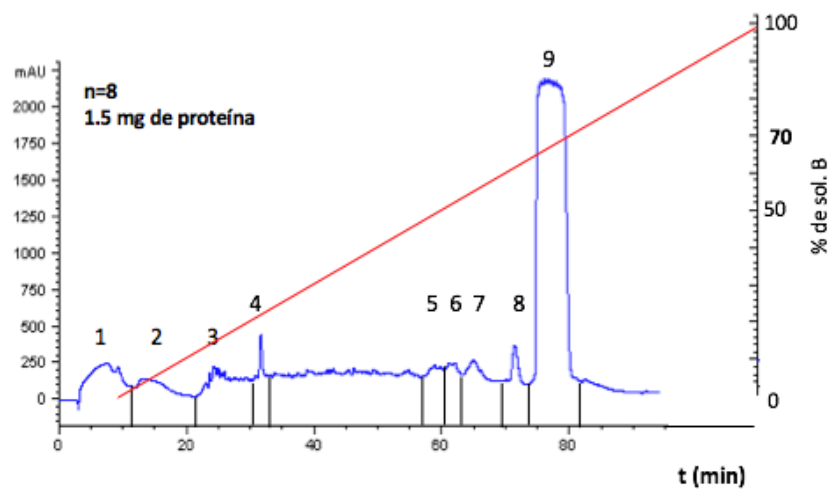


Figura 37. Perfil cromatográfico de EN. En el eje X se representa el tiempo de retención de las fracciones, en el eje Y las unidades de absorbancia y a la derecha se puede ver el porcentaje de solución B. Finalmente representado con la línea roja el gradiente lineal de 0 a 100 % de solución B (acetonitrilo 90% + 0.085% TFA) y en números cada una de las fracciones obtenidas. Se aplicó un protocolo con velocidad de flujo de 1 ml min^{-1} , un flujo isocrático de 10 min al 0% de solución B y finalmente un gradiente lineal de 0 a 100% al 1% por minuto de solución B. La muestra se monitoreó a una absorbancia de 220 nm y se usó una columna C18, analítica.

Fue observado electrofisiológicamente que la fracción f9 de EN, presentó un efecto inhibitorio sobre la INav (Figura 38). Para esto fueron realizados ensayos de actividad con las 9 fracciones que se obtuvieron de la cromatografía, excepto la f2. Como se puede ver en la Figura 38, la fracción f9 con una concentración de proteína de $8 \mu\text{gml}^{-1}$ tuvo un efecto del $95.47 \pm 5.61\%$ en la inhibición de la INav en neuronas corticales de rata (7 neuronas). Además, se analizó el curso temporal con que la fracción provocaba el efecto sobre el canal Nav; se observó que en el

momento en que era aplicada f9 el efecto fue rápido al igual que su lavado (Figura 38), efectos similares a los observados con EN.

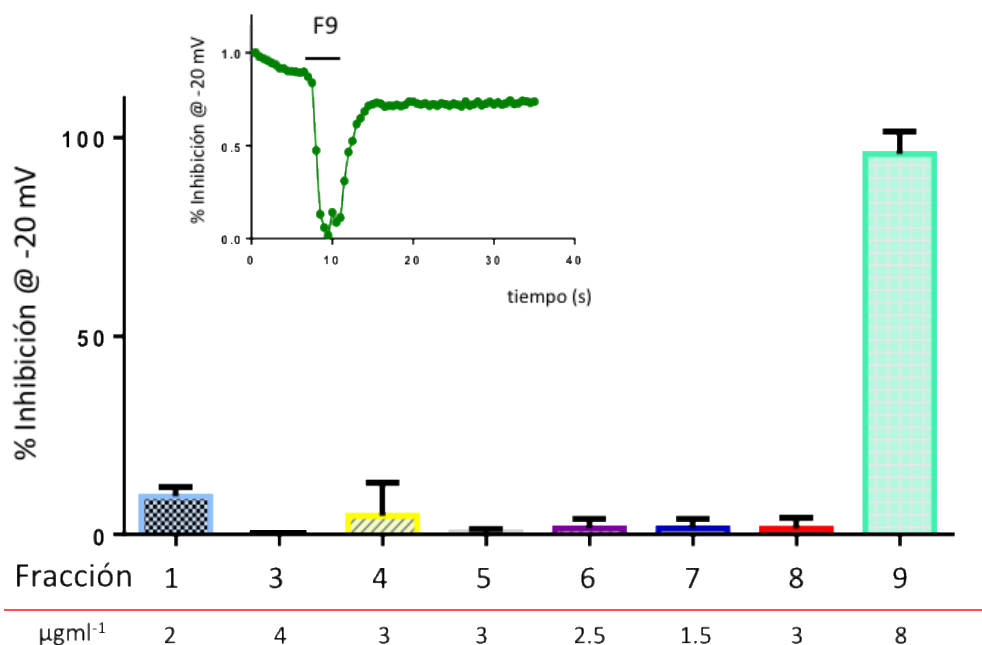


Fig. 38. La INav fue inhibida por la f9 obtenida a partir de la CLAR-FR de EN. La gráfica ilustra los efectos de las fracciones obtenidas de la cromatografía líquida de alta resolución del EN sobre la INav. En el eje X se representó el número de fracción y la concentración de proteína que se probó en cada caso, y en el eje Y el porcentaje alcanzado de inhibición de la INav. La f9 produjo un efecto inhibitorio del $95.47 \pm 5.61\%$ a una concentración de 8 mgml^{-1} de proteína. Cada una fracción fue probada en 7 neuronas diferentes. La gráfica en el inserto ilustra el curso temporal de la inhibición por f9 (8 µgml^{-1}) sobre la INav.

Para continuar con la separación de las sustancias activas, en la Figura 39 se ilustran experimentos para obtener una repurificación de la f9 de EN llamada f9R. Del perfil cromatográfico obtenido se observó que al final del pico, éste se cerró con una mayor amplitud (marcado a la izquierda en rojo), por lo que pensamos que podría haber sido otra fracción que no se hubiera podido separar correctamente de la fracción mayoritaria. Por esto, se recuperó la parte marcada en rojo y se volvió a purificar en las mismas condiciones aplicadas; fue observado (Figura 39, gráfico inferior) que perteneció a la misma fracción obtenida en la imagen de la parte superior en la figura. En total fueron realizadas 11 inyecciones de f9 de EN

con un volumen total de 200 μ l, donde en la purificación fue obtenido un aproximado de 800 μ g de proteína según la cuantificación realizada con insulina B oxidada como estándar (ver sección métodos). Sin embargo, al realizar los ensayos de bioactividad con f9R de EN no fue observada actividad sobre los canales Nav; es decir, al parecer durante este proceso de repurificación la actividad de la sustancia se perdió.

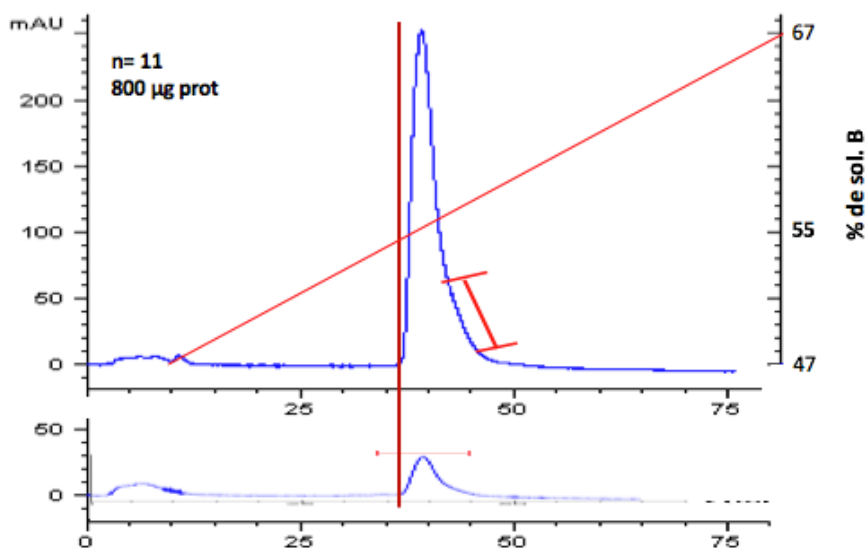


Figura 39. Perfil cromatográfico de f9 obtenida del EN (f9R del EN). En la figura de la parte superior se observa la fracción 9 obtenida en la purificación; se ha marcado en rojo la parte amplia de la fracción. Ésta se volvió a purificar para averiguar si era parte de la fracción inicial obtenida. En el gráfico inferior se muestra el cromatograma de esta región amplia de la fracción inicial. El protocolo que se aplicó para esta purificación fue una elución isocrática de 10 min con 47% de solución B (acetonitrilo 90% + 0.085% TFA) seguido de un gradiente lineal de 47% a 100% aumentando cada minuto 0.1% de solución B. Se utilizó una columna C18 analítica y la muestra se leyó a una longitud de onda de 220 nm.

8.7.3. Espectrometría de masas MALDI-TOF de f9 del EN

Fue realizado un análisis químico de la f9 del EN utilizando la técnica de ionización por electrospray (ESI), sin embargo, no se obtuvieron resultados consistentes. Por lo tanto, se decidió realizar el análisis con MALDI-TOF; en éste se pudieron identificar tres picos mayoritarios mostrados en la Figura 40.

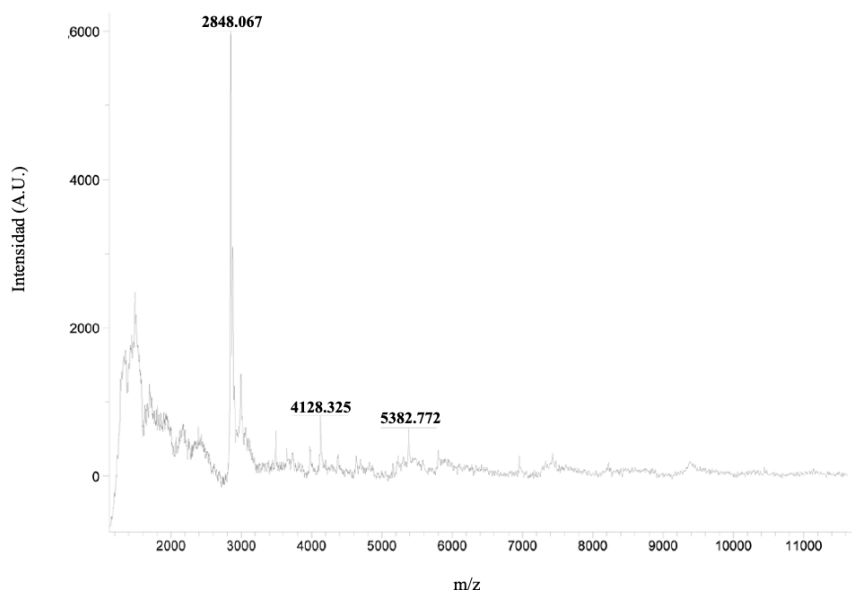


Figura 40. Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF de la fracción f9 del EN parcialmente purificada por CLAR-FR. La f9 es la fracción que retiene el efecto mayor de inhibición sobre la INav.

8.7.4. Secuenciación de la fracción f9 del EN

Estos resultados fueron corroborados aplicando la técnica de espectrometría de masas con trampa de iones que permitió detectar tres secuencias en la f9 del EN, mostrada en la Tabla V; los pesos moleculares de estas secuencias coincidieron con los pesos moleculares del espectro obtenido por MALDI-TOF (Figura 40). Los resultados obtenidos mostraron que f9 del EN no fue purificada totalmente, debido a que se obtuvieron varias secuencias y varias señales de diferentes pesos moleculares (Figura 40 y la Tabla V).

Tabla V. Secuencias de los tres péptidos caracterizados en la f9 mediante espectrometría de masas con trampa de iones.

SECUENCIA	PM (Da)	PI
MKALCTLAFLSTGCAMLIHC DNKACGM	2848	7.7
GPVTQEF CWLNLEHCKETASLQMILKMRASTWVYN	4129	6.7
MDKLSTARLEQLKACLGEAKPVLELVTLRQESLKVILCAAIDEASKDKL	5383	6.1

Estas secuencias fueron finalmente analizadas mediante el programa

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

para detectar similitudes con otras proteínas de cnidarios; sin embargo, no se encontró ninguna similitud significativa. Esto sugiere el descubrimiento de péptidos nuevos con actividad sobre el sistema nervioso.

9. Discusión

Actualmente se han caracterizado alrededor de 60 toxinas aisladas del veneno de anémonas que tienen efecto sobre los canales Nav, provocando principalmente un retraso en la inactivación de estos canales (Lazcano-Pérez *et al.*, 2016; Norton, 2009; Honma y Shiomi, 2006). Los resultados descritos en este trabajo muestran dos nuevos efectos tóxicos producidos por sustancias que están contenidos en los nematocistos de *B. annulata*, cada una actuando sobre importantes proteínas de membranas del sistema nervioso de mamíferos: los canales Nav y los GABA_AR. El reconocimiento de efectos específicos de toxinas o la potencia de éstas, es una gran ventaja para poder orientar la búsqueda de nuevos principios bioactivos. Aquí, mostramos que *B. annulata* cuenta con sustancias que actúan sobre el sistema nervioso tanto de vertebrados

como de invertebrados, con efectos sobre cangrejos y sobre proteínas de membrana de vertebrados, específicamente las del sistema nervioso de roedores y humanos. Los efectos novedosos que se reportan en este trabajo, indican claramente la importancia de estudiar el potencial de bioactividad de compuestos provenientes de diferentes familias de cnidarios que aún permanecen inexplorados (Prentis *et al.*, 2018; Thangaraj *et al.*, 2019).

La obtención de los compuestos activos de las anémonas se consigue aplicando comúnmente tres diferentes métodos, uno es la estimulación eléctrica, otro es la homogenización del cuerpo del animal, el cual fue aplicado en este trabajo, y por último el método de “ordeñar” la anémona; este método que fue desarrollado por Barnes, 1967 donde su objetivo fue obtener el veneno puro de los tentáculos de las medusas (Fu *et al.*, 2021). El principio de la metodología de Barnes (1967) es muy parecido al desarrollado en este estudio, con el cual logramos obtener directamente los nematocistos modificando el método de Bloom y cols. (1998). El método permitió obtener los nematocistos de manera selectiva y provocar su descarga de una manera controlada, aplicando condiciones de presión física que provocaran expulsar el contenido de los nematocistos sin afectar la integridad estructural de los simbiontes (ver por ejemplo, Iglesias-Prieto *et al.*, 1993). Esto permitió confirmar con mayor certeza que los efectos observados fueron generados por compuestos contenidos en los nematocistos, ya que fue demostrado que los nematocistos que no fueron sometidos a la maniobra de descarga por presión presentaron una actividad prácticamente nula.

Los canales Nav y GABA_AR son esenciales para llevar a cabo las funciones neurales por lo que los efectos sobre estos canales podrían explicar por sí mismos la letalidad del veneno al ser administrado a animales (Morales-Landa *et al.*, 2007; Béress *et al.*, 1976; Rodríguez *et al.*, 2012), e incluyendo también la exposición accidental en humanos a algunos venenos de cnidarios (Brinkman *et al.*, 2012; Remigante *et al.*, 2018; Ballesteros *et al.*, 2021). Mientras que los canales Nav son los responsables de la generación del impulso nervioso, los GABA_ARs son importantes moléculas efectoras del neurotransmisor GABA, que es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso. Actualmente, la mayoría de las neurotoxinas que se han aislado de anémonas (p. ej. BgK, ShK, CGTX II y CgNa) muestran efectos sobre canales Nav o Kv (Aneiros *et al.*, 1993; Castañeda *et al.*, 1995; Ständker *et al.*, 2006; Moran *et*

al., 2009; Zaharenko *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2019; Madio *et al.*, 2019; D' Ambra y Lauritano, 2020). Las neurotoxinas peptídicas que actúan sobre los canales Nav han sido ampliamente estudiadas y han sido clasificadas en cuatro tipos diferentes (Honma y Shiomi, 2006). El mecanismo de acción de la mayoría de estas neurotoxinas que se unen a los canales Nav, es provocar un retraso de la inactivación del canal y por ende un aumento en la duración del potencial de acción (Catteral y Béress, 1978; Ständker *et al.*, 2006; Ahern *et al.*, 2016). Sin embargo, en este trabajo se mostró que el veneno de *B. annulata* puede actuar sobre los canales Nav con un mecanismo de acción diferente a lo que se ha reportado hasta ahora, ya que las sustancias contenidas en su veneno inhibieron la respuesta de la corriente de Nav en todos los rangos de voltaje probados, sin afectar a la inactivación y la dependencia de la activación del voltaje. Además, se presume que la inhibición de la INav causa un bloqueo rápido que fue dependiente de la dosis, afectando la generación del potencial de acción en las neuronas corticales sin ningún efecto sobre la duración del mismo, sugiriendo así que el efecto de inhibición del veneno de la anémona *B. annulata* es más compatible con un bloqueo del poro del canal Nav. Sin embargo, se requieren más experimentos para poder describir con mayor detalle los mecanismos que están involucrados en esta inhibición. En este trabajo no se consiguió elucidar la identidad química de la toxina o toxinas que provocan dichos efectos, no obstante, los resultados indican que se trata de una molécula o moléculas termoestables, ya que la actividad del extracto crudo fue mantenida en muestras hervidas o cuando fueron incubadas a 37°C durante 24 h, incubación que comúnmente produce inactivación de sustancias activas (Torres *et al.*, 2001). Además, las muestras fueron dializadas con membranas de corte de 3,000 Da; por lo tanto, la(s) molécula(s) activas son >3000 Da. Estas características son acordes con los resultados que se obtuvieron de la electroforesis y los análisis de espectrometría de masas, donde se mostró la presencia de péptidos en los rangos esperados. En algunos trabajos ya ha sido reportada la estabilidad térmica de las toxinas de las anémonas, cuya característica está asociada a la presencia de puentes disulfuro, ya que le dan estabilidad a la estructura de la molécula (Honma y Shiomi, 2006; Béress *et al.*, 1976; Ravindran *et al.*, 2010). Otra evidencia obtenida en este estudio es que el mecanismo de acción del veneno de la anémona es diferente al de TTX, ya que la(s) toxina(s) de *B. annulata* inhibió la corriente que

fluye tanto por el canal hNav 1.6, que es sensible a TTX, como también el hNav 1.5, que es resistente a TTX (Lee y Ruben, 2008; Israel *et al.*, 2017). Ha sido reportado que algunas toxinas bloquean el poro de canales Nav uniéndose a un sitio diferente al de TTX; una de las mejores estudiadas es la toxina GIIIA64 que fue aislada del veneno de caracoles *Conus* (Dudley *et al.*, 2000). Es por lo tanto necesario que se lleven a cabo un mayor número de experimentos que permitan detallar y establecer el posible mecanismo de la(s) neurotoxina(s) de *B. annulata* sobre el canal Nav, y en especial la participación de sitios de bloqueo diferentes al utilizado por TTX. El descubrimiento de nuevas moléculas con efecto sobre el canal Nav de mamíferos sigue siendo muy limitado, por lo que, es de gran interés el descubrimiento de nuevas moléculas que pudieran actuar de una manera específica y además diferencial, ya que permitiría el diseño y desarrollo de nuevas herramientas moleculares (Kubota *et al.*, 2017). Además, la regulación de los canales Nav no solamente es importante en la fisiología del sistema nervioso, sino que también tiene varias implicaciones en diferentes enfermedades tales como el cáncer (Hernández-Plata *et al.*, 2012; Israel *et al.*, 2018; Kozlov, 2018; Jayathilake y Gunathilake, 2020). Los análisis de espectrometría indican que el efecto de inhibición sobre los canales Nav es provocado por un(os) compuesto(s) de naturaleza proteica; es por ello que se llevaron a cabo los primeros pasos de purificación con la finalidad de obtener el compuesto lo más puro posible. Se aplicaron dos estrategias de separación diferentes, con el EA se hizo una purificación parcial por cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-50 M, y posteriormente por cromatografía de alta resolución en fase reversa; esta última es la que fue aplicada para el EN. Para el EA, con exclusión molecular, fueron obtenidas tres fracciones nombradas FI, FII y FIII, donde solamente FII y FIII mostraron efecto sobre los canales Nav; sin embargo, el efecto de FIII no fue tan robusto como el de FII, esto podría ser debido a que la sustancia activa está más concentrada en la fracción FII, o alternativamente, que esta última fracción contiene otra sustancia que permite una sinergia en su acción. Los efectos de la FII son dependientes de la dosis, y además fue confirmado directamente que la inhibición de los canales Nav provocó el bloqueo de los potenciales de acción. También, se corroboró con los resultados de la espectrometría de masas, que la FII y FIII contienen moléculas mayores a los 3,000 Da, en concordancia con reportes que indican que el peso molecular de las de toxinas de anémonas

con efectos sobre canales iónicos está entre 3-7 kDa (Honma y Shiomi, 2006). Siguiendo con la estrategia de separación de dichas fracciones, se realizó una separación de la FII y FIII utilizando CLAR-FR, donde fue observado que el efecto en ambas estaba sobre la primera fracción obtenida llamada f1. Cuando se aplica esta técnica, que separa las moléculas en función de su polaridad, en la primera fracción, son colectadas las moléculas que eluyen rápidamente, y que por tanto no quedan adheridas a la columna debido a su alta polaridad. Ha sido descrito que una de las características estructurales de neurotoxinas de anémonas, con efectos sobre canales Nav, es la presencia de parches expuestos de residuos de aminoácidos hidrofóbicos que son requeridos para que la toxina se una al sitio 3 del canal Nav (Frazão *et al.*, 2012); por lo tanto, la alta polaridad de la fracción activa de *B. annulata* parece indicar que los resultados obtenidos aquí tampoco parecen corresponder con determinantes definidos previamente (Frazão *et al.*, 2012). No obstante los mismos autores indican que las características estructurales de toxinas como la CgNa son también muy diferentes a la mayoría de las reportadas, donde el parche de residuos hidrofóbico no es expuesto y por tanto se presume que es la razón por la cual el efecto sobre INav es más débil. Además, esta toxina solamente tiene efecto sobre canales S-TTX. Por lo tanto, parece ser que la f1 de FII y la f1 de FIII produjeron su efecto de inhibición sobre la INav a través de un mecanismo diferente a los reportados hasta ahora en neurotoxinas de anémonas; es probable también que la estructura de esta(s) molécula(s) no tenga relación con lo descrito hasta ahora.

En el caso del EN también se siguieron varias estrategias de purificación; la primera que se utilizó fueron membranas de exclusión molecular de 30 kDa, observando que las fracciones obtenidas, tanto la mayor como la menor a 30 kDa, perdieron su actividad, por lo que esta estrategia no se continuó. El protocolo de cromatografía elegido para continuar fue la de separar las moléculas activas contenidas en EN utilizando CLAR-FR; utilizando este método fueron obtenidas 9 fracciones diferentes, todas (excepto la fracción f2) fueron probadas sobre canales Nav en neuronas y solo la fracción llamada f9 tuvo efecto. La f9 en este caso fue la fracción más hidrofóbica con un tiempo de retención de aproximadamente 74 min, obteniendo un resultado contrario a lo que se obtuvo con la f1 de FII y de FIII, siendo por lo tanto, que f9 contiene las moléculas más apolares y por tanto un resultado más aproximado a lo reportado

en Frazão y cols. (2012). Esta fracción fue analizada mediante espectrometría de masas indicando que se trataba de moléculas proteicas de bajo peso molecular con un rango de 3,000-6,000 kDa, lo que se corresponde a las neurotoxinas reportadas en por ejemplo por Honma y Shiomi, 2006. Además, al caracterizar la f9 mediante secuenciación, fueron obtenidas tres secuencias que no tuvieron relación con secuencias reportadas en las bases de datos. Un paso subsecuente de purificación de f9, provocó que la fracción obtenida perdiera su efecto neurotóxico sobre los canales Nav neuronales. Por tanto, la fracción f9 aún contiene diferentes moléculas, de las cuales no se logró obtener mayor información para tratar de definir si pudieran tener alguna relación con la inhibición de INav. Se requiere diseñar otras estrategias de separación más eficientes con el fin de purificar la(s) molécula(s) capaces de provocar la inhibición de INav.

El segundo efecto que se observó en este trabajo es la activación de GABA_AR, lo que implica que la(s) molécula(s) contenida en el veneno de la anémona que actuó como un agonista GABAérgico, mecanismo de acción que no había sido descrito para ninguna toxina aislada de anémona. La sustancia del veneno de *B. annulata* actúa de forma rápida, por lo que fue capaz de provocar la apertura del canal en un rango de milisegundos así como recuperarse rápidamente una vez que las células fueron lavadas; este mecanismo es muy parecido al que provoca el conocido agonista muscimol, el cual es producido por el hongo *Amanita muscaria* (Johnston, 2014). En realidad, hay muchas sustancias de origen natural donde se ha descrito que GABA_AR es su blanco molecular (p.ej. picrotoxina, β -carbolinas); todas ellas provocan potentes efectos sobre las funciones del sistema nervioso. Además, ya han sido descritos dos péptidos aislados de venenos de animales marinos que inhiben los GABA_ARs, estas sustancias provienen de las especies *Laticauda semifasciata* y *Conus imperialis* (Kudryavtsev *et al.*, 2015). En el caso específico del veneno de *B. annulata*, la sustancia activa es capaz de actuar sobre tres tipos de GABA_AR con diferentes identidades moleculares (el neuronal, el receptor oligodendroglial y el receptor homomérico $\rho 1$), indicando que la sustancia activa en el veneno de *B. annulata* no presenta selectividad por diferentes GABA_ARs. Por esto, la primera idea fue suponer que el veneno contenía GABA per se; se ha documentado que en cnidarios existe la

expresión del sistema de señalización GABAérgico, ya que se ha relacionado con la regulación de descarga de sus nematocistos, entre otras funciones (Scappaticci y Kass-Simon, 2008). Si fuera el caso, el veneno debería contener GABA en concentraciones en el rango cercano a 10 μ M, ya que es la concentración necesaria para poder activar los receptores analizados. Sin embargo, los resultados de los ensayos de ELISA con una sensibilidad nanomolar a GABA, mostraron que la concentración de GABA en el veneno era alrededor de 10 nM. Esto es una fuerte indicación de que la molécula responsable de la activación del GABA_AR, es de diferente naturaleza a GABA. Por lo tanto, la sustancia activa puede corresponder a un agonista de GABA o, alternativamente, el veneno podría contener un potente modulador positivo que aumentaría la sensibilidad de los GABA_ARs, y esto ser suficiente para que concentraciones nM de GABA puedan activar al receptor.

Otro resultado, es que el veneno no solamente activa los receptores GABA_A, ya que se pudo observar que al aplicar el veneno sobre las neuronas corticales, éste provocaba corrientes entrantes en células expuestas a bicuculina, un potente antagonista competitivo del sitio de GABA. También, este hallazgo podría ser explicado, si la bicuculina antagoniza la unión de la sustancia activa de manera diferente a como lo hace sobre GABA.

En resumen, es importante remarcar la importancia de la presencia de una molécula contenida en el veneno capaz de inhibir la actividad del sistema nervioso central, siendo destacable que parece ser que este mecanismo de acción no es encontrado comúnmente en los venenos de cnidarios. Este efecto combinado con la potente molécula bloqueadora de canales Nav, hace que el veneno de *B. annulata* sea un arma farmacológica altamente eficaz.

El avance tanto de las técnicas bioquímicas y moleculares podrán ayudar a obtener más información detallada de la identidad de las sustancias contenidas en los venenos de muchas especies, incluyendo las de los cnidarios. Este estudio demuestra que la anémona común del Caribe *B. annulata* es una importante fuente de nuevas neurotoxinas que tienen como blancos moleculares proteínas esenciales para el funcionamiento del sistema nervioso central de mamíferos.

10. Conclusiones

En este trabajo concluimos que:

- EN y EA inhibe la respuesta INav.
- EA tiene la capacidad de bloquear por completo el potencial de acción.
- EN y la fracción FII de Sephadex G-50 M tienen una respuesta sobre la INav dependiente de la dosis
- EA y EN activan los GABA_ARs
- La(s) molécula(s) que provocan estos efectos son de naturaleza proteica y mayores a 3,000 Da, indicando que la(s) molécula(s) tiene características similares a neurotoxinas de otras anémonas reportadas previamente.
- La(s) molécula(s) que provocan estos efectos son termoestables, esto sugiere la presencia de puentes disulfuro en su estructura.
- La(s) sustancia(s) que inhibe INav no distingue entre canales R-TTX y S-TTX, esto sugiere que sus mecanismos de acción son diferentes.
- La(s) sustancia(s) que activa GABA_ARs es inespecífica activando varios subtipos de estos receptores.
- Las sustancias activas están contenidas en los nematocistos.
- Es probable que la sustancia que activa GABA_ARs no sea un agonista, si no un potente modulador alostérico positivo de los receptores.
- El mecanismo de acción de la(s) sustancia(s) que inhibe los canales Nav es diferente al reportado al previamente para los venenos de anémona.

11. Perspectivas

Muchos organismos que viven en el medio marino tienen la capacidad de sintetizar moléculas bioactivas, siendo de importancia el estudio de sus blancos moleculares, ya que sus mecanismos de acción pueden llegar a ser un factor clave en el desarrollo de nuevas herramientas tanto terapéuticas como experimentales. A pesar de la gran diversidad de estas

moléculas, los estudios realizados aún siguen siendo escasos, debido a que la caracterización de las moléculas y la identificación de los blancos moleculares representan dos cuellos de botella importantes en el momento de desarrollar estos temas de investigación. En este trabajo, tanto la expresión de canales iónicos y receptores de membrana en ovocitos, neuronas y células HEK293 ayudaron a revelar dos efectos importantes provocados por las moléculas contenidas en el veneno de *B. annulata*, sobre dos proteínas que son esenciales en el sistema nervioso central; los canales Nav y los GABA_ARs. Sin embargo, es necesario seguir ampliando el conocimiento en este trabajo, en dos grandes rubros: 1) explorar si existen otros efectos relevantes sobre las propiedades de membrana neuronales, y 2) es imprescindible esclarecer qué molécula(s) están provocando los diferentes efectos.

12. Bibliografía

Abbenante, G. & Fairlie, D. P. Protease inhibitors in the clinic. *Med. Chem.* **1** (1), 71-104 (2005).

Ahern, C. A., Payandeh, J., Bosman, F. & Chanda, B. The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *J. Gen. Physiol.* **147** (2), 1-24 (2016).

Akaike, N., Hattori, K. & Carpenter, D. O. Bicuculline and picrotoxin block γ -aminobutyric acid-gated Cl⁻ conductance by different mechanisms. *Experientia* **41** (1), 70-71 (1985).

Ames, C. L. *et al.* Cassiosomes are stinging-cell structures in the mucus of the upside-down jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Commun. Biol.* **3**, 67 (2020).

Anderluh, G. & Macek, P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria). *Toxicon* **40**, 111-124 (2001).

Andreev, Y. A. *et al.* Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J. Biol. Chem.* **283** (35), 23914-23921 (2008).

Aneiros, A. *et al.* A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1157**, 86-92 (1993).

Arellano, R. O. & Miledi, R. Novel Cl⁻ currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* **102**, 833-857 (1993).

Arellano, R. O., Woodward, R. M. & Miledi, R. A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **484**, 593-604 (1995).

- Arellano, R. O., Woodward, R. M. & Miledi, R. Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. In *Ion Channels* Vol. 4 (ed. Narahashi, T.) 203–259 (Springer, 1996).
- Arellano, R. O., Robles-Martínez, L., Serrano-Flores, B., Vázquez-Cuevas, F. & Garay, E. Agonist-activated Ca^{2+} influx and Ca^{2+} -dependent Cl^- channels in *Xenopus* ovarian follicular cells: Functional heterogeneity within the cell monolayer. *J. Cell. Physiol.* **227**, 3457–3470 (2012).
- Arellano, R. O. *et al.* Axon-to-glia interaction regulates GABA_A receptor expression in oligodendrocytes. *Mol. Pharmacol.* **89**, 63–74 (2016).
- Ballesteros, A. *et al.* Differing effects of vinegar on *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa) and *Carybdea marsupialis* (Cnidaria: Cubozoa) stings-implications for first aid protocols. *Toxins* **13** (8), 509 (2021).
- Barnes, J. H. Extraction of cnidarian venom from living tentacle. *Animal Toxins*, 115-129 (1967).
- Barres, B. A. *et al.* Cell death and control cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* **70**, 31–46 (1992).
- Basha, A. S., Mishra, K. R., Jha, N. R., Pandey, B. V., Singh, P. U. Effect of berberine and (+/-) bicuculline isolated from *Corydalis chaerophylla* on spore germination of some fungi. *Folia Microbiol.* **47** (2), 161-165 (2002).
- Beckman, A. & Özbek, S. The Nematocyst: a molecular map of the Cnidarian stinging organelle. *Int. J. Dev. Biol.* **56**, 577-582 (2012)
- Beneski, D. & Catterall, W. A. Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivate of scorpion toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77** (1), 639-643 (1980).
- Béress, L. & Béress, R. Purification of three polypeptides with neuro- and cardiotoxic activity from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Toxicon* **13**, 359-367 (1975).
- Béress, R., Béress, L. & Wunderer, G. Purification and characterisation of four polypeptides with neurotoxic activity from *Condylactis aurantiaca*. *Hope-Seyler's Z Physiol. Chem.* **357**, 409–414 (1976).
- Bergman, C., Dubois, J. M., Rojas, E. & Rathmayer, W. Decreased rate of sodium conductance inactivation in the node of Ranvier induced by polypeptide toxin from sea anemone. *Biochim. Biophys. Acta.* **455**, (1) 173-184 (1976).
- Bloom, D. A., Burnett, J. W. & Alderslade, P. Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beachside. *Toxicon* **36**, 1075–1085 (1998).
- Blunt, J.W., Coop, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R., Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 144-222 (2012).
- Borman, J. The “ABC” of GABA receptors. *TIPS* **21**, (11) 16-19 (2000).
- Bradford, M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).

- Brinkman, D. L. *et al.* Venom proteome of the box jellyfish *Chironex fleckeri*. *PLOS One* **7**, e47866 (2012).
- Briones-Fourzán, P., Pérez-Ortiz, M., Negrete-Soto, F., Barradas-Ortiz, C. & Lozano-Álvarez, E. Ecological traits of Caribbean Sea anemones and symbiotic crustaceans. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **470**, 55–68 (2012).
- Bruhn, T. *et al.* Isolation and characterization of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Toxicon* **39**, 693-702 (2001).
- Carlgren, O. A survey of the Ptychodactaria, Corallimorpharia and Actinaria. *Kungl. Svenska Vetenskapsakad. Handl.* **3**, 1–121 (1949).
- Calvete, J. J. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. *Biochem. J.* **476**, 611–634 (2017).
- Cariello, L. *et al.* Calitoxin, a neurotoxic peptide from the sea anemone *Calliactis parasitica*: amino acid sequence and electrophysiological properties. *Biochemistry* **28**, 2484-2489 (1989).
- Castañeda, O. & Harvey A. L. Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. *Toxicon* **54** (8), 1119-1124 (2009).
- Castañeda, O. *et al.* Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* **33** (5), 603-613 (1995).
- Catterall, W. A. & Béress, L. Sea anemone toxin and scorpion toxin share a common receptor site associated with the action potential sodium ionophore. *J. Biol. Chem.* **253** (20), 7393-7396 (1978).
- Catterall, W. A., Goldin, A. L. & Waxman, S. G. International union of pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationship of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol. Rev.* **57** (4), 397-409 (2005).
- Cestèle, S. & Catterall, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie.* **82** (9-10), 883-892 (2000).
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
- Cisneros-Mejorado, A. *et al.* Demyelination-remyelination of the rat caudal cerebellar peduncle evaluated with magnetic resonance imaging. *Neuroscience* **439**, 255–267 (2020).
- Colom-Casasnovas, A. Aislamiento y caracterización de algunas neurotoxinas de la anémona *B. annulata*. *Tesis de maestría Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología-UNAM* (2015).
- D’Ambra, I. & Lauritano, C. A. Review of toxins from cnidaria. *Mar. Drugs.* **18**, 507 (2020).
- Deuis, J. R., Mueller, A., Israel, M. R. & Vetter, I. The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators. *Neuropharmacology* **127**, 87-108 (2017).

Diaz-Garcia, C. M. *et al.* Toxins from *Physalia physalis* (Cnidaria) raise the intracellular Ca²⁺ of beta-cells and promote insulin secretion. *Curr. Med. Chem.* **19**, 5414-5423 (2012).

Diochot, S., Loret, E., Bruhn, T., Béress, L. & Lazdunski, M. APETx1, a New toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-Gated human *Ether-a-go-go*—related gene potassium channels. *Mol. Pharmacol.* **64** (1), 59-69 (2003).

Dudley, S. C. *et al.* μ -Conotoxin GIIIA interactions with the voltage-gated Na⁺ channel predict a clockwise arrangement of the domains. *J. Gen. Physiol.* **116**, 679–689 (2000).

Ebihara, L. *Xenopus* connexin38 forms hemi-gap-junctional channels in the nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* **71** (2), 742-748 (1996).

Fautin, D. G. Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon* **54**, 1054-1064 (2009).

Frazão, B., Vasconcelos, V. & Antunes, A. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actinaria) toxins: an overview. *Mar. Drugs* **10**, 1812-1851 (2012).

Fu, J., Liao, Y., Jin, A. H. & Gao, B. Discovery of novel peptide neurotoxins from sea anemone species. *Front. Biosci.-Landmark* **26** (11), 1256-1273 (2021).

Fusetani, N. & Kem, W. Marine toxins as research tools (Ed. Fusetani, N. & Kem, W.) 2-3 (Springer, 2009).

Garateix, A. El mar: fuente de fármacos. *Elementos* **12**, 39-47 (2005).

González-Muñoz, R., Nuno, S., Sánchez-Rodríguez, J., Rodríguez, E. & Segura-Puertas, L. First inventory of sea anemones (Cnidaria: Actinaria) of the Mexican Caribbean. *Zootaxa* **3556**, 1–38 (2012).

Grajales, A. & Rodríguez, E. Elucidating the evolutionary relationship of the Aiptasiidae, a widespread cnidarian-dinoflagellate model system (Cnidaria: Anthozoa: Actinaria: Metridioidea). *Mol. Phylogenet. Evol.* **94**, 252–263 (2016).

Green, B. D., Flatt, P. R. & Bailey, C. J. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: A newly emergent drug class for the treatment of type 2 diabetes. *Diab. Vasc. Dis. Res.* **3** (3), 159-165 (2006).

Gutiérrez-Ravelo, A. y Estévez-Braun, A. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. XXI. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat* (Esp) **103** (2), 409-419 (2009).

Hartshorne, R. P., Messner, D. J., Coppersmith, J. C. & Catterall, W. A. The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. *J. Biol. Chem.* **257** (23), 13888-13891 (1982)

Harvey, A. L. Toxins and drugs discovery. *Toxicon* **92**, 193-200 (2014).

Hernández-Plata, E. *et al.* Overexpression of Nav 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *Int. J. Cancer* **130**, 2013–2023 (2012).

Hernández-Sámamo, A. C. *et al.* α D-conotoxins in species of the Eastern Pacific: the case of *Conus princeps* from Mexico. *Toxins* **11** (7), 405 (2019).

Hessinger, D. A. & Grove, R. I. Antibodies to sea anemone nematocyst venom- II. Neutralization of the hemolytic phospholipase A2 and lethal activities by purified antibodies produced in response to attenuated venom. *Toxicon* **17**, 109-120 (1979).

Hille, B. *Ion channels of excitable membranes* 1-7 (Sinauer Associates, Inc. 2001).

Hodgkin, A. L. & Huxley A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **116**, 449–472 (1952a).

Hodgkin, A. L. & Huxley A. F. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **116**, 473– 496 (1952b).

Hodgkin, A. L. & Huxley A. F. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **116**, 497–506 (1952c).

Hodgkin, A. L. & Huxley A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500–544 (1952d).

Holstein, T. & Tardent, P. An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. *Science* **223** (4638), 830-833 (1984).

Honma, T. & Shiomi, K. Peptide toxins in sea anemones: Structural and functional aspects. *Mar. Biotechnol.* **8**, 1-10 (2006).

Houssen, W. E. & Jaspars, M. Isolation of marine natural products. *Nat. Prod. Isol.* **20**, 353-390 (2005).

Iglesias-Prieto, R., Govin, N. S. & Trench, R. K. Isolation and characterization of three membrane-bound chlorophyll-protein complexes from four dinoflagellate species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **340**, 381–392 (1993).

Israel, M. R., Tay, B., Deuis, J. R. & Vetter, I. Chapter three- sodium channels and venom peptide pharmacology. *Adv. Pharmacol.* **79**, 67-116 (2017).

Israel, M. R., Morgan, M., Tay, B. & Deuis, J. R. Toxins as tools: Fingerprinting neuronal pharmacology. *Neurosci. Lett.* **679**, 4-14 (2018).

Jacob, C. T., Moss, J. S. & Jurd, R. GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Rev. Neurosci.* **9** (5), 331-343 (2008).

Jayathilake, J. M. N. J. & Gunathilake, K. V. K. Cnidarian toxins: Recent evidences for potential therapeutic uses. *Eur. Zool. J.* **87** (1), 708–713 (2020).

Johnston, G. A. R. Muscimol as an ionotropic GABA receptor agonist. *Neurochem. Res.* **39**, 1942–1947 (2014).

- Jouiaei, M. *et al.* Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins* **7**, 2251-2271 (2015).
- Katz, B. & Miledi, R. The effect of local blockage of motor nerve terminals. *J. Physiol.* **199**, 729-741 (1968).
- Kem, W. R., Parten, B., Pennington, M. W., Price, D. A. & Dunn, B. M. Isolation, characterization, and amino acid sequence of polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* **28**, 3483-3489 (1989).
- Korpi, R. E., Gründer, G. & Lüddens, H. Drug interactions at GABA_A receptors. *Prog. Neurobiol.* **67** (2), 113-159 (2002).
- Kozlov, S. Animal toxins for channelopathy treatment. *Neuropharmacology* **132**, 83-97 (2018).
- Krishek, B. J., Moss, S. J. & Smart, T. G. A functional comparison of the antagonist bicuculline and picrotoxin at recombinant GABA_A receptors. *Neuropharmacology* **35**, 1289-1298 (1996).
- Kubota, T., Dang, B., Carvalho-de-Souza, J. L., Correa, A. M. & Benzanilla, F. Nav channel binder containing a specific conjugation-site based on a low toxicity β -scorpion toxin. *Sci. Rep.* **7**, 16329 (2017).
- Kudryavtsev, D. S. *et al.* Neurotoxins from snake venoms and α -conotoxin Iml inhibit functionally active ionotropic γ -aminobutyric acid (GABA) receptors. *J. Biol. Chem.* **290**, (37) 22747-22758 (2015).
- Laemli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- Lazcano-Pérez, F. *et al.* A purified Palythoa venom fraction delays sodium current inactivation in sympathetic neurons. *Toxicon* **82**, 112-116 (2014).
- Lazcano-Pérez, F., Hernández-Guzmán, U., Sánchez-Rodríguez, J. & Arreguín-Espinosa, R. Cnidarian neurotoxic peptides affecting central nervous system targets. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **16**, 173-182 (2016).
- Lazcano-Pérez, F., Arellano, R. O., Garay, E., Arreguín-Espinosa, R. & Sánchez-Rodríguez, J. Electrophysiological activity of a neurotoxic fraction from the venom of box jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **191**, 177-182 (2017).
- Lee, C. H. & Ruben, P. C. Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels* **2**, 407-412 (2008).
- Liao, Q., Feng, Y., Yang, B. & Lee, S.-Y. Cnidarian peptide neurotoxins: A new source of various ion channel modulators or blockers against central nervous system disease. *Drug Discov. Today* **24**, 189-197 (2019).
- Lindequist, U. Marine-Derived Pharmaceuticals-Challenges and opportunities. *Biomol. Ther.* **24** (6), 561-571 (2016).
- Llorente-Bousquets, J. y Ocegueda, S. Estado del conocimiento de la biota. *En capital natural de México*, vol I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México, 283-322 (2008).

- Macdonald, L. R. & Olsen, W. R. GABA_A receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 569-602 (1994).
- Madio, B., King, G. E. & Undheim, E. A. B. Sea anemone toxins: A structural overview. *Mar. Drugs* **17**, 325 (2019).
- Malhotra, R., Singh, L., Eng, J. & Raufman J-P. Exendin-4, a new peptide from *Heloderma suspectum* venom, potentiates cholecystinin-induced amylase release from rat pancreatic acini. *Regul. Pept.* **41**, 149-156 (1992).
- Malpezzi, E.L., de Freitas, J. C., Muramoto, K. & Kamiya, H. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* **45**, 207-217 (1993).
- Maravilla-Ulloa, I. Extracción y caracterización de compuestos con actividad antitumoral de *Cassiopea xamachana*. *Tesis de maestría Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología-UNAM* (2015).
- Marino, A., Morabito, R., Pizzata, T. & La Spada, G. Effect of various factors on *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphozoa) crude venom-induced haemolysis. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **151** (1), 144-149 (2008).
- Mariscal, R. Nematocysts. *Coelenterate Biol. Rev.* 129-178 (1974).
- Martínez-Torres, A. & Miledi, R. Expression of γ -aminobutyric acid p1 and p1 Δ 450 as gene fusion with the green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 1947–1951 (2001).
- Masiulis, S. *et al.* GABAA receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature* **565** (7740), 454-459 (2019).
- Michels, G. & Moss, J. S. GABA_A Receptors: properties and trafficking. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42** (1), 3-14 (2007).
- Miledi, R., Parker, I. & Sumikawa, K. Transplanting receptors from brains into oocytes. In *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures*, 57–90 (Raven Press, 1989).
- Miller, S. P. & Aricescu, A.R. Crystal structure of human GABA_A receptor. *Nature* **512** (7514), 270-275 (2014).
- Moore, J. W. & Narahashi, T. Tetrodotoxin's highly selective blockage of an ionic channel. *Fed. Proc.* **26** (6), 1655-1663 (1967).
- Morabito, R. *et al.* Crude venom from nematocysts of *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa) elicits a sodium conductance in the plasma membrane of mammalian cells. *Sci. Rep.* **7**, 41065 (2017).
- Morales-Landa, J. L. *et al.* Antimicrobial, antiprotozoal and toxic activities of cnidarian extracts from the Mexican Caribbean Sea. *Pharm. Biol.* **45**, 37–43 (2007).
- Moran, Y., Gordon, D. & Gurevitz, M. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels—molecular and evolutionary features. *Toxicon* **54** (8), 1089-1101 (2009).

- Moran, Y. *et al.* Neurotoxin localization to ectodermal gland cells uncovers an alternative mechanism of venom delivery in sea anemone. *Proc. R. Soc. B* **279**, 1351-1358 (2012).
- Naik, S. R., Guidotti, A. & Costa, E. Central GABA receptor agonists: comparison of muscimol and baclofen. *Neuropharmacology* **15** (8), 479-484 (1976).
- Narahashi, T. Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiol. Rev.* **54**, 813–889 (1974).
- Narahashi, T. Pharmacology of tetrodotoxin. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **20**, 67–84 (2001).
- Nesher, N. *et al.* AdE-1, a new inotropic Na⁺ channel toxin from *Aiptasia diaphana*, is similar to, yet distinct from, known anemone Na⁺ channel toxins. *Biochem. J.* **451**, 81-90 (2013).
- Nesher, N., Zlotkin, E. & Hochner, B. The sea anemone toxin AdE-1 modifies both sodium and potassium currents of rat cardiomyocytes. *Biochem. J.* **461**, 51-59 (2014).
- Norton, R. S. Structures of sea anemone toxins. *Toxicon* **54** (8), 1075-88 (2009).
- Oliveira, J. S. *et al.* Binding specificity of sea anemone toxins to Na_v 1.1-1.6 sodium channels: unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop. *J. Biol. Chem.* **279**, 3323-3335 (2004).
- Oliveira C. S. *et al.* Pharmacological characterization of cnidarian extracts from the Caribbean Sea: evaluation of anti-snake venom and antitumor properties. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **24** (2018).
- Olsen, W. R. Picrotoxin-like channel blockers of GABA_A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, (16) 6081-6082 (2006).
- Opie, H. L. & Kowolik, H. The discovery of captopril: from large animals to small molecules. *Cardiovasc. Res.* **30**, 18-25 (1995).
- Ordaz, P. R. *et al.* GABA_A receptors expressed in oligodendrocytes cultured from the neonatal rat contain $\alpha 3$ and $\gamma 1$ subunits and present differential functional and pharmacological properties. *Mol. Pharmacol.* **99**, 133–146 (2021).
- O'Reilly, E. E. & Chadwick, N. E. Population dynamics of corkscrew sea anemones *Bartholomea annulata* in the Florida Keys. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **567**, 109–123 (2017).
- Pascual, I. *et al.* Screening of inhibitors of porcine dipeptidyl peptidase IV activity in aqueous extracts from marine organisms. *Enz. and Microb. Tec.* **40**, 414-419 (2007).
- Peigneur, S. & Tytgat, J. Toxins in drug discovery and pharmacology. *Toxins* **10**, 126 (2018).
- Pérez-Samartín, A. *et al.* Inwardly rectifying K⁺ currents in cultured oligodendrocytes from rat optic nerve are insensitive to pH. *Neurochem. Res.* **42**, 2443–2455 (2017).

Prentis, P. J., Pavasovic, A. & Norton, R.S. Sea anemones: quiet achievers in the field of peptide toxins. *Toxins* **10**, 36 (2018).

Rathmayer, W. & Béress, L. The effect of toxins from *Anemonia sulcata* (Coelenterata) on neuromuscular transmission and nerve action potentials in the crayfish (*Astacus leptodactylus*). *J. Comp. Physiol.* **109** (3), 373-382 (1976).

Ravindran, V. S., Kannan, L. & Venkateshvaran, K. Biological activity of sea anemone proteins: I. Toxicity and histopathology. *Indian J. Exp. Biol.* **47**, 1225–1232 (2010).

Remigante, A. *et al.* Impact of scyphozoan venoms on human health and current first aid options for stings. *Toxins* **10** (4), 133-151 (2018).

Restano-Cassulini, R., Garcia, W., Paniagua-Solís, J. E. & Possani, L. D. Antivenom evaluation by electrophysiological analysis. *Toxins* **9**, 74 (2017).

Rhangaraj, S., Bragadeeswaran, S. & Gokula, V. Bioactive compounds of sea anemones: a review. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **25**, 1405-1416 (2019).

Rodríguez, A. A. *et al.* Peptide fingerprint of the neurotoxic fractions isolated from the secretions of sea anemone *Stichodactyla helianthus* and *Bunodosoma granulifera*. New members of the APETx-like family identified by a 454 pyrosequencing approach. *Peptides* **34**, 26–38 (2012).

Rodríguez, A. A. A novel sea anemone peptide that inhibits acid-sensing ion channels. *Peptides* **53**, 3-12 (2014).

Salceda, E. & Ortega, A. Neurotoxinas: significado biológico y mecanismos de acción. *Elementos* **74**, 29-37 (2009).

Salceda, E. *et al.* Effects of ApC, a sea anemone toxin, on sodium currents of mammalian neurons. *B. Res.* **1110** (1), 136-143 (2006).

Sánchez-Rodríguez, J., Zugasti, A., Santamaría, A., Galván-Arzate, S. & Segura-Puertas, L. Isolation, partial purification and characterization of active polypeptide from the sea anemone *Bartholomea annulata*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **99**, 116–121 (2006).

Santamaría, A. *et al.* A venom extract from the sea anemone *Bartholomea annulata* produces haemolysis and lipid peroxidation in mouse erythrocytes. *Toxicology* **173**, 221-228 (2002).

Santhanam, R. *Biology and Ecology of Venomous Marine Cnidarians* (ed. Santhanam, R.) 1-5 (Springer 2020).

Scappaticci, A. A. & Kass-Simon, G. NMDA and GABA_B receptors are involved in controlling nematocyst discharge in hydra. *Comp. Biochem. Physiol. A* **150**, 415–422 (2008).

Ständker, L. *et al.* A new toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation. *Toxicon* **48**, 211-220 (2006).

Suzumura, A., Bath, S., Eccleston, A. P., Liask, R. P. & Silberberg, D. H. The isolation and long-term culture of oligodendrocytes from newborn mouse brain. *Brain Res.* **324** (2), 379-383 (1984).

Sweetlove, L. Number of species on Earth tagged at 8.7 million. *Nature* (2011).

Torres, M. *et al.* Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon* **39**, 1297-1307 (2001).

Unwin, N. The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron* **3**, (6) 665-676 (1989).

Uusi-Oukari, M. & Korpi, E. R. Regulation of GABA_A receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol. Rev.* **62** (1), 97-135 (2010).

Van Kesteren, Ch. *et al.*, Yondelis (trabectedin, ET-743): the development of an anticancer agent of marine origin. *Anticancer drugs* **14**, 487-502 (2003).

Wanke, M., Zaharenko, A. J., Redaelli, E. & Schiavon, E. Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltage-gated sodium channel isoforms. *Toxicon* **54** (8), 1102-1111 (2009).

Yoon, K. W., Douglas, F. C. & Rothman, S. M. Multiple mechanisms of picrotoxin block of GABA-induced currents in rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* **464**, **423-439** (1993).

Zaharenko, A. J. *et al.* Revisiting cangitoxin, a sea anemone peptide: Purification and characterization of cangitoxins II and III from the venom of *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon* **51**, 1303-1307 (2008).

Zaharenko, A. J. *et al.* Characterization of selectivity and pharmacophores of type 1 sea anemone toxins by screening seven Na_v sodium channel isoforms. *Peptides* **34**, 158-167 (2012).