



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

**QUÍMICA ACUÁTICA**

Aislamiento, purificación y caracterización de los compuestos neurotóxicos presentes en la anémona *Anemonia sargassensis* recolectada en la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo, México.

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**MARIELA ALVAREZ CARDENAS**

**TUTOR**

**DRA. JUDITH SANCHÉZ RODRÍGUEZ**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA (UNAM)**

**COMITÉ TUTOR**

**DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA (UNAM)**

**DR. SEGIO RODRÍGUEZ MORALES**  
**UNIDAD DE QUÍMICA SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA (UNAM)**

**DR. MANUEL MIRANDA ANAYA**  
**UMDI JURIQUILLA, FACULTAD DE CIENCIAS (UNAM)**

**DR. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA (UAQ)**

**PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, 2023**



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.

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá e indirectamente a mi papá, siempre conté con su apoyo para continuar con estudios y cualquier cosa que me haga sentir un ser humano pleno. Estoy segura de que su fe en un ser supremo es la que me ha mantenido segura hasta ahora.

A mi hermanita **Gaby**, por estar al pendiente de mí y cuidando a nuestras amadas mascotas.

A mi amada tía **Lola (Ma. Dolores Cárdenas)**, gracias por siempre creer en mí, te quedé debiendo tanto, tal vez la siguiente vida...

A la máxima casa de estudios, la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por abrirme amablemente las puertas hacia el posgrado y tenerme la paciencia para lograr obtener el grado.

Al **CONACYT**, que me otorgó la beca 595953 para poder continuar este posgrado.

A la **Dra. Judith Sánchez Rodríguez**, excelente investigadora y un mejor ser humano, que además de estar a cargo de sus alumnos académicamente, también lo hace en el ámbito personal y se lo agradezco infinitamente.

A la **M. en C. Sheila Narayan Chávez Villela**, por encontrar mis anémonas y ayudarme en las colectas.

A la **Dra. Aleida Jeannette Flores Pérez** por también ayudarme en las colectas, por ser una amiga inigualable, sin apegos materiales y buena consejera durante el posgrado. De verdad hacen falta más humanos así.

A la **Dra. Antònia María Colom Casasnovas**, que aceptó ser mi BFF y debido a su popularidad hizo muy fácil mi introducción y estancia en el laboratorio de Neurofisiología Celular.

Al **Dr. Alejandro García Arredondo**, el realizar una tesis con él no me bastó y quise volver a experimentar bajo su tutela, espero un día cercano poder dedicarme de lleno a las hermosas toxinas. Gracias por permitirme usar los equipos del laboratorio de productos naturales de la facultad de química de la **Universidad Autónoma de Querétaro**.

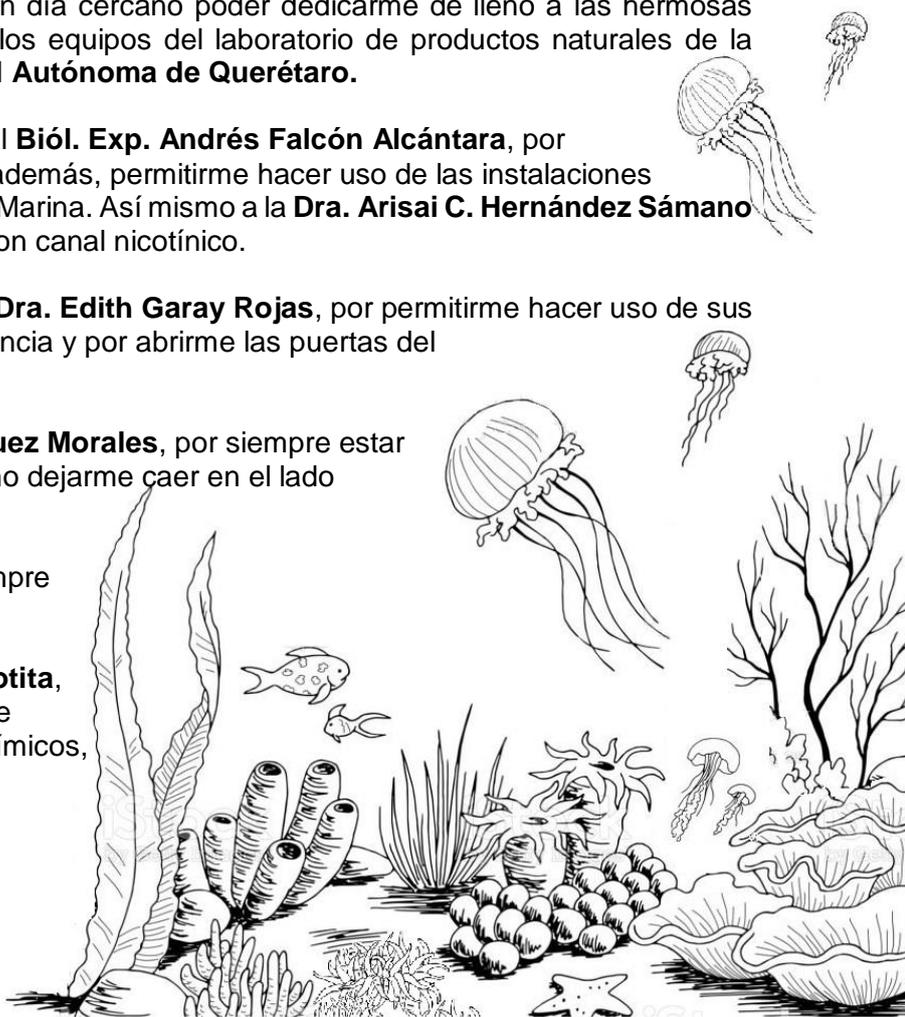
Al **Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez** y al **Biól. Exp. Andrés Falcón Alcántara**, por asesorarme en el uso de su HPLC y, además, permitirme hacer uso de las instalaciones del Laboratorio de Neurofarmacología Marina. Así mismo a la **Dra. Arisai C. Hernández Sámano** por su apoyo y préstamo del ovocito con canal nicotínico.

Al **Dr. Rogelio Arellano Osto**a y a la **Dra. Edith Garay Rojas**, por permitirme hacer uso de sus ranas, por instruirme con mucha paciencia y por abrirme las puertas del laboratorio de Neurofisiología Celular.

Al **Dr. y caballero Jedi Sergio Rodríguez Morales**, por siempre estar pendiente, presionarme, alentarme y no dejarme caer en el lado oscuro de la fuerza.

Al **Dr. Manuel Miranda**, por estar siempre pendiente y puntual a las revisiones.

A mis fallecidas bitches, **Canelita** y **Motita**, que me acompañaron cuando tuve que desvelarme y cuando tuve bajones anímicos, tiene un lugar especial en mi corazón.





No debemos olvidar que cuando se descubrió el radio nadie sabía que iba a ser útil en hospitales.

Era un trabajo de ciencia pura.

Y ello es prueba de **que el trabajo científico no debe considerarse desde el punto de vista de su uso directo.**

**Se debe realizar por sí mismo, por la belleza de la ciencia** y luego siempre existirá la posibilidad de que un descubrimiento científico se convierta en un beneficio para la humanidad.

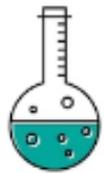


Maria Salomea Słodowska-Curie

1867-1934

Nobel de Física 1903

Nobel de Química 1911



## Índice

|   |    |
|---|----|
| Introducción  | 1  |
| Cnidarios   | 2  |
| <i>Clase Anthozoa- Anémonas</i>   | 4  |
| <i>Nematocistos</i>   | 5  |
| <i>Reacciones observables al contacto con anémonas</i>                                      | 6  |
| <i>Sistema nervioso</i>   | 8  |
| Importancia de las neurotoxinas   | 10 |
| <i>Toxinas que afectan los canales de sodio (Na<sup>+</sup>)</i>                            | 13 |
| <i>Toxinas que afectan el canal de potasio (K<sup>+</sup>)</i>                              | 15 |
| <i>Toxinas que afectan canales nicotínicos</i>  | 16 |
| Modelos biológicos para el rastreo de neurotoxinas  | 16 |
| <i>Regulación nerviosa del sistema entérico – Modelo de íleon de rata</i>                   | 17 |
| <i>Bloqueo de entrada de calcio a las células de músculo liso</i>                           | 19 |
| <i>Hiperpolarización de células del músculo liso</i>  | 20 |
| <i>Activación de un receptor adrenérgico.</i>   | 20 |
| <i>Repolarización y el periodo refractario</i>  | 20 |
| <i>Liberación de neurotransmisores</i>  | 21 |
| <i>Patch-clamp en ovocitos de rana</i>  | 22 |
| Justificación   | 26 |
| Objetivo general  | 27 |
| <i>Objetivos específicos</i>  | 27 |
| Materiales y métodos  | 28 |
| <i>Área de estudio</i>  | 28 |
| <i>Recolecta de organismos</i>  | 28 |
| <i>Obtención de extracto crudo</i>  | 28 |
| <i>Cuantificación de proteína</i>   | 29 |
| <i>Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE</i>   | 29 |
| <i>Medición de la actividad fosfolipasa</i>   | 29 |
| Purificación  | 30 |
| <i>Separación con membranas de corte por ultrafiltración del extracto crudo</i>             | 30 |
| <i>Separación del ultrafiltrado activo mediante filtración en gel en un sistema de FPLC</i> | 30 |
| Bioensayos  | 31 |
| <i>Ensayo de toxicidad en cangrejos <i>Ocypode quadrata</i></i>                             | 31 |
| <i>Ensayo de íleon aislado de rata</i>  | 31 |
| <i>Prueba de ovocitos de rana</i>   | 31 |
| <i>Técnica de control de voltaje</i>  | 32 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Diseño experimental</b>                                   | <b>33</b> |
| <b>Resultados y discusión</b>                                | <b>34</b> |
| <i>Recolecta de organismos</i>                               | 34        |
| <i>Preparación del extracto crudo</i>                        | 34        |
| <i>Liofilización y fraccionamiento</i>                       | 35        |
| <i>Cuantificación de proteínas por el método de Bradford</i> | 35        |
| <i>Bioensayo en cangrejos</i>                                | 37        |
| <i>Cromatografía en Sephadex G-50 M</i>                      | 38        |
| <i>Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE</i>          | 40        |
| <i>Ensayo de íleon de rata</i>                               | 41        |
| <i>Actividad fosfolipasa A2</i>                              | 44        |
| <i>Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAR)</i>   | 45        |
| <i>Ovocitos de rana</i>                                      | 47        |
| <b>Conclusiones</b>  | <b>53</b> |
| <b>Referencias bibliográficas</b>                            | <b>54</b> |

## Índice de tablas y figuras

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1  | Ilustración esquemática de la subunidad $\alpha$ del canal de sodio ..... | 14 |
| Figura 2  | Inervación de la pared del tubo digestivo.....                            | 18 |
| Tabla 1   | Rendimiento de las colectas.....  | 35 |
| Figura 3  | Curva de calibración para cuantificación de proteínas.....                | 36 |
| Tabla 2   | Cuantificación de proteínas de extracto crudo y fracciones.....           | 36 |
| Figura 4  | Efecto del extracto crudo en cangrejos.....                               | 37 |
| Figura 5  | Cromatograma de exclusión molecular (Sephadex G50 M).....                 | 38 |
| Tabla 3   | Rendimientos obtenidos después de Sephadex G50 M.....                     | 39 |
| Figura 6  | Gel de acrilamida 16%.....  | 40 |
| Figura 7  | Gel de acrilamida 16% después de ensayos biológicos.....                  | 41 |
| Figura 8  | Curva dosis-respuesta del extracto crudo sobre íleon de rata.....         | 42 |
| Figura 9  | Registros del extracto crudo y fracciones sobre íleon de rata.....        | 43 |
| Figura 10 | Gráfica de las evaluaciones sobre íleon de rata.....                      | 43 |
| Figura 11 | Grafica de actividad fosfolipasa.....                                     | 45 |
| Figura 12 | Cromatograma HPLC de la fracción ASII.....                                | 46 |
| Tabla 4   | Condiciones cromatográficas para el fraccionamiento de ASII.....          | 46 |
| Tabla 5   | Cuantificación teórica de proteínas de la fracción ASII.....              | 47 |
| Figura 13 | Registro obtenido de la fracción ASII sobre canales nicotínicos.....      | 48 |
| Figura 14 | Efectos del extracto crudo y fracciones sobre ovocitos nativos.....       | 49 |
| Figura 15 | Curvas I-V del extracto crudo y fracciones.....                           | 51 |
| Figura 16 | Bloqueo de gadolinio sobre extracto crudo.....                            | 51 |

## Introducción

Los arrecifes de coral son ecosistemas vulnerables. Por ello, la mayoría de los arrecifes de coral en México entran en alguna categoría de área natural protegida (ANP); son ecosistemas de los cuales muchas personas viven, ya que son fuente de actividades productivas como el turismo y la industria pesquera, proporcionan protección a ciudades y comunidades durante huracanes y tormentas tropicales, además de que son una fuente valiosa para la investigación con aplicación médica. Para su supervivencia en un hábitat altamente competitivo, los organismos que habitan el arrecife de coral desarrollan compuestos químicos incorporados en venenos y mecanismos de defensa. El potencial médico y farmacéutico de esos compuestos en cuanto a bioprospección e investigación para encontrar la cura de enfermedades es incalculable. Muchos economistas creen que es imposible determinar el valor de los arrecifes en el campo farmacéutico e incluso que el valor médico de los arrecifes no será nunca revelado si su destrucción no se evita (AIDA, 2015).

El ambiente marino presenta una gran diversidad de organismos; como ya se mencionó muchos han desarrollado mecanismos de defensa ante el medio competitivo en el que habitan, como es la producción de compuestos tóxicos ante otros organismos. La toxicidad de su veneno se debe a la alta especificidad por tejidos, células o receptores particulares, pudiendo ser fármacos ideales por dicha selectividad (Mebs, 2002). De este modo, no es de sorprenderse que en los últimos años los avances en el descubrimiento de productos naturales de origen marino hayan sido en su uso en ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer, enfermedades de transmisión sexual, condiciones inflamatorias y enfermedades microbianas, entre otras. (AIDA, 2015; Rocha *et al.*, 2011). El mar ha demostrado ser una abundante fuente de agentes farmacológicamente activos para el tratamiento de diversas enfermedades.

Los compuestos marinos bioactivos pueden ser utilizados para una variedad de aplicaciones: como herramientas moleculares, en cosméticos, como compuestos químicos puros, como nutracéuticos, y en industrias agroquímicas, entre otros. A pesar de lo anterior solo unos pocos productos derivados de compuestos marinos se encuentran actualmente en el mercado (ej. Prialt® y Yondelis®); muchos nuevos compuestos están ahora en línea de investigación clínica y muchos más están en desarrollo clínico. El hecho de que virtualmente los productos naturales marinos no pueden encontrarse en las farmacias no se debe precisamente a la limitada diversidad

de organismos marinos. De fuentes marinas se han obtenido 14 000 diferentes productos naturales, muchos de ellos siendo estructuralmente únicos y ausentes en los organismos terrestres. Un serio problema respecto al desarrollo de fármacos y la producción sostenible que comparten las esponjas, tunicados y otros invertebrados radica en las cantidades limitadas de biomasa disponible de poblaciones silvestres y la complejidad que implica el desarrollo de estos productos (Rocha *et al.*, 2011).

## **Cnidarios**

Los celenterados (nombre anterior actualmente en desuso) o cnidarios (del griego *knidi*, que significa ortiga) son animales con una estructura simétrica radial simple: una boca que es la apertura de una cavidad y una membrana corporal consistente de dos capas celulares (ectodermo y endodermo), separadas por una sustancia gelatinosa amorfa (mesoglea). Debido a la sensación que producen al ser tocados, los cnidarios son también conocidos como ortigas de mar (Bonamonte *et al.*, 2016).

El phylum Cnidaria tiene distribución mundial, aunque prevalece en mares tropicales y subtropicales. El phylum se subdivide en 5 clases: Scyphozoa (del griego skyphos= copa) comprende alrededor de 200 especies de medusas verdaderas; Anthozoa (del griego anthos= flor) comprende alrededor de 7 300 especies que se dividen en anémonas, corales duros y suaves, y plumas de mar; Hydrozoa comprende alrededor de 3300 especies en las que se encuentran corales de fuego (corales no verdaderos) e hidras; Cubozoa 36 especies de cubomedusas; y Staurozoa que comprende 50 especies. El phylum es antiguo y sus orígenes se remontan al último periodo criogénico del precámbrico, hace unos 640 millones de años; cuenta con más de 9 000 especies y representa uno de los phyla marinos más grandes. Estos organismos producen una variedad de péptidos y proteínas que actúan como neurotoxinas o citolisinas (Anderluh y Maček, 2002). El análisis de toxinas de muchas especies de anémonas esconde un rico repertorio de compuestos de diversos pesos moleculares tales como las toxinas polipeptídicas formadoras de poros de aproximadamente 20 kDa, toxinas polipeptídicas que actúan en canales de potasio de 3.5 a 6.5 kDa y toxinas que actúan en canales de sodio de 3 a 5 kDa (Anderluh y Maček 2002; Moran *et al.*, 2009).

En las primeras décadas del siglo XX era imposible aislar y caracterizar químicamente los compuestos de venenos, porque difícilmente existían las técnicas bioquímicas de

aislamiento; sin embargo, el químico francés Richet parcialmente purificó, estudió y nombró dos componentes activos de extractos tentaculares de anémonas europeas, “Congestina” y “Thalasina”, obtenidos principalmente de *Actinia equina* pero también de *Anemonia sulcata*. Posteriormente se encontró que la Thalasina libera histamina de los mastocitos y cuando se inyecta en la piel causa la liberación de una sustancia de reacción lenta, que más tarde se demostró era una prostaglandina. Aunque se pensó en un principio que la Thalasina era un ion trimetilamonio, estudios subsecuentes demostraron que esta simple amina carece de los efectos; por lo tanto, la identidad de la Thalasina es aún desconocida. En 1975 se aislaron inicialmente tres neurotoxinas peptídicas, los cuales son péptidos homólogos que retrasan el proceso de inactivación de los canales de sodio dependientes de voltaje. La secuencia de aminoácidos de la toxina ATXII de *A. sulcata* fue la primera en ser reportada como un péptido de cnidario (Turk y Kem, 2009). En 2008 Honma y su equipo de trabajo publicaron la elucidación estructural de cuatro toxinas peptídicas aisladas de *Stichodactyla haddoni*, tres de ellas (SHTX I-III) con efecto paralizador en cangrejos; se determinó que son toxinas que afectan los canales de potasio y una SHTXIV con efecto letal en cangrejos afectando los canales de sodio (Honma *et al.*, 2008).

En los estudios realizados con anémonas, se obtuvo la evidencia de que pueden producir cuatro grupos de polipéptidos con actividad citolítica; la clasificación está basada en su peso molecular: a) péptidos de 5 – 8 kDa con actividad antihistamínica; b) proteínas aproximadamente de 20 kDa, las cuales son formadoras de poros, con afinidad a la esfingomielina; c) citolisinas con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> de entre 30 y 40 kDa, y un grupo de proteínas de 80 kDa representado por la citolisina de la especie *Metridium senile*. Las citolisinas han sido empleadas como modelos para estudiar la interacción entre las proteínas y la membrana lipídica y se han examinado para erradicar células tumorales entre otros (Anderluh y Maček, 2002).

Las neurotoxinas son polipéptidos con pesos moleculares de entre 3 – 6.5 kDa que pueden ser clasificadas de acuerdo con su sitio de acción o con sus sitios de unión en los canales iónicos. Las que han sido detectadas en los nematocistos de anémonas poseen una alta afinidad por los canales iónicos de membranas excitables y provocan potenciales de acción extremadamente prolongados generando una masiva liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas (Mebs, 2002). En estudios más recientes se ha llegado a la conclusión de que el cambio ambiental ha forzado probablemente la diversificación de toxinas de anémonas, de hecho, no solo ha habido

variaciones en la configuración de las mismas, sino que se ha demostrado que cada una es codificada por una familia diferente de genes (Moran *et al.* 2009).

### **Clase Anthozoa- Anémonas**

La clase Anthozoa de acuerdo con Segura-Puertas y colaboradores (2007) incluye a las anémonas y otros cnidarios con esqueletos (como los corales escleractineos) y sin esqueleto (como las anémonas tubo); también a las plumas de mar, corales azules y corales negros; es la clase más grande del phylum y cuenta con más de 6 000 especies. Dada la intención de este trabajo, nos enfocaremos principalmente en las anémonas, las cuales siempre tienen más de ocho tentáculos y la mayoría se fijan de manera permanente o temporal en sustratos sólidos por secreciones provenientes de un disco bien diferenciado.

Las anémonas tienen cuerpo transparente debido a su alto contenido acuoso, por encima del 95% del peso corporal; fuera del agua pierden su forma y parecen una masa gelatinosa. Su cuerpo está formado de una columna cilíndrica muscular con un disco oral plano, en cuyo centro se abre la boca, rodeada por una o varias series de tentáculos. En el extremo opuesto se encuentra un disco basal amplio, que puede ser muscular e interviene en la locomoción o en el anclaje del animal al sustrato; poseen dos estructuras anatómicas relacionadas, la faringe y los mesenterios, que son únicos entre los pólipos de los cnidarios. La faringe o estomodeo es un conducto tubular que se extiende desde la boca hasta más allá de la mitad de la cavidad gastrovascular. En la mayoría de las especies, la faringe contiene al menos un canal longitudinal flagelado llamado sifonoglifo, que facilita la circulación del agua hacia la cavidad gastrovascular permitiendo mantener el esqueleto de tipo hidrostático sobre el cual opera el sistema muscular; además permite el intercambio de gases a través de la superficie gastrodérmica. La faringe de la mayoría de las anémonas presenta dos sifonoglifos en posición opuesta. Los mesenterios longitudinales (completos e incompletos) son dobleces de la pared del cuerpo que dividen la cavidad gastrovascular; poseen músculos longitudinales retractores que permiten a los pólipos retraerse; además de proveer soporte, posiblemente incrementan el área superficial para la absorción de alimentos y para el intercambio gaseoso. La musculatura está formada por células epiteliomusculares derivadas tanto del ectodermo como del endodermo; la musculatura epidermal es longitudinal en los tentáculos y radial en el disco oral. La musculatura circular está bien desarrollada en la gastrodermis columnar. Aunque la mayoría de los

antozoos son sésiles, algunos son capaces de una locomoción limitada; en las anémonas existen por lo menos cuatro formas de locomoción: por lo general se deslizan con el disco pedal, pero también pueden caminar utilizando los tentáculos, se entierran y nadan momentáneamente. El sistema nervioso consiste en una red nerviosa (plexo) que recibe la información de células sensoriales y estimula a varios juegos de músculos especializados; es capaz de coordinar las actividades de cada pólipo en la captura de las presas. Su reproducción sexual ocurre por gemación, fragmentación o también fertilización de gametos interna o externa; carecen de una fase medusoide predominando la forma polipoide. Algunas especies tienen ciclos reproductivos mensuales, otras se reproducen solo durante ciertos meses del año y otras más una vez al año (Fernández del Álamo y Rivas, 2007).

### **Nematocistos**

A diferencia de muchos otros animales venenosos, las anémonas carecen de una glándula venenosa u órgano de inyección. En su lugar, para la entrega de veneno usan a los nematocistos, distribuidos en todo su cuerpo, mismos que son reemplazados después de la descarga. Los nematocistos son las secreciones especializadas, no vivas, de las células conocidas como nematocitos. Está bien documentado que estas secreciones son comunes en las plánulas y que los nematoblastos aparecen en los embriones 12 horas después de la fertilización (Kass-Simon y Scappaticci, 2002).

A pesar de la inusual diversidad morfológica y genética, todos los cnidarios producen estructuras anatómicas urticantes llamadas nematocistos, que son usadas para la defensa y caza. Los nematocistos son estructuras proteináceas complejas intracelulares y su liberación es considerada uno de los procesos más rápidos en la naturaleza; este armamento de nanojeringas soporta presiones de aproximadamente 150 atm antes de descargarse y traspasar la piel de sus presas o predadores a aceleraciones de más de 5 millones de gravedad, haciéndolo uno de los eventos biomecánicos más rápidos conocidos. La mayoría del volumen celular del nematocito está ocupado por el nematocisto, una vesícula larga derivada del aparato de Golgi; los nematocistos se someten a un proceso de ensamblado, maduración y migración, al final del cual son desplegados típicamente en el ectodermo de los tentáculos de caza. Una vez totalmente cargados se convierten en un microarmamento (Rachamim *et al.*, 2014).

La estructura de la cápsula del nematocisto en sí misma está compuesta de una mezcla de proteínas reticuladas por puentes disulfuro intermoleculares que la proveen de fuerza y elasticidad, con proteínas estructurales adicionales formando sus púas. La matriz altamente compacta dentro de la cápsula está compuesta principalmente por poli- $\gamma$ -glutamato asociado con cationes. Tras la activación del nematocito, el agua fluye a través de la pared, causando la disociación de la matriz agregada y resulta en el aumento de la presión osmótica que conduce a la descarga explosiva del nematocisto (Rachamim *et al.*, 2014).

En un estudio hecho por Moran y colaboradores en 2012 con la anémona *Nematostella vectensis* se demostró, por medio del empleo de inmunohistoquímica e imagenología, que la neurotoxina Nv1 (tipo I) estaba presente en compartimientos diferentes a los nematocistos. A pesar de que la anémona produce nematocistos 24 h después de la fertilización, la neurotoxina solo es funcional en anémonas adultas y aparece marcada por el anticuerpo en pólipos que se desarrollan 9 días después de la fertilización; esta anémona presenta nematocistos delgados y largos, pero las células teñidas con el anticuerpo son gruesas, ligeramente redondeadas, carecen de nematocistos y están llenas con vesículas del anticuerpo, lo que sugiere que estas son células glandulares. En el mismo trabajo se probó el anticuerpo en la neurotoxina Av2 de la anémona *Anemonia viridis* que es una especie poco relacionada con *N. vectensis*, pero que presenta similitudes con su neurotoxina Nv1; se tiñeron células glandulares parecidas a las encontradas en *N. vectensis*, aunque en menor cantidad. En *A. viridis*, además también se tiñeron numerosas fibras en el tentáculo que después se reveló eran túbulos de nematocistos descargados. Este estudio deja en claro que, aunque los nematocistos son los orgánulos especializados en la entrega de toxinas por excelencia, que a su vez hacen esta entrega más rápida, no son los únicos compartimientos de almacenamiento de toxinas y que las toxinas también pueden ser liberadas al medio directamente.

### **Reacciones observables al contacto con anémonas**

Notablemente los cnidarios carecen de un sistema de protección tradicional como los organismos superiores, tal como barreras impermeables (cutícula, exoesqueleto), hemolinfa y células fagocíticas migratorias. Adicionalmente viven en hábitats normalmente llenos de virus, bacterias, protistas y parásitos, a los cuales están constantemente expuestos y aun así ellos no parecen vulnerables a patógenos; esto se

debe a los compuestos de defensa contenidos en los nematocistos (Mariottini y Grice, 2016). Es bien conocido que las anémonas son una rica fuente de proteínas y polipéptidos biológicamente activos; muchas toxinas citolíticas, neuropéptidos e inhibidores de proteinasa se han identificado de ellas (Zhang *et al.*, 2016).

Se han observado muchos casos de reacciones al contacto con anémonas y existe un espectro variable en cuanto a su toxicidad; algunas especies solo producen una sensación de quemadura y prurito, mientras que otras son capaces de producir afecciones más graves. Para la especie *Anemonia sulcata*, algunas reacciones comienzan después del contacto accidental con el animal mientras otras son provocadas dado que algunas personas, a pesar de ser advertidas sobre sus efectos, gustan de jugar con ellas. Desde el punto de vista clínico, las anémonas inducen las mismas lesiones que las provocadas por medusas, pero de acuerdo con grupo de Benamonte y colaboradores (2016), los síntomas son más marcados. Morfológicamente, además del aspecto eritematoso y edematoso, las lesiones son la mayoría de las veces vesiculares y en ocasiones necrotizantes. Si el edema es lo suficientemente serio puede crear un angioedema. Dependiendo de la gravedad clínica de las lesiones, el curso del malestar tiene una duración que va de 15 a 30 días y puede estar acompañada de síntomas subjetivos y sistémicos graves; el dolor y sensación de quemadura son a veces intolerables, tal como el malestar, dolor de cabeza, náusea y vómito; la debilidad muscular y los calambres, están casi siempre presentes. Las secuelas discrómicas son mucho más frecuentes después de reacciones a anémonas que a medusas. Las manifestaciones clínicas de dermatitis causadas por anémonas dependen en gran medida de la magnitud de las lesiones. Muchas reacciones locales serias, como las ulceraciones que duran varios meses, se han reportado de las anémonas *Actinodendron plumosum* y *Triactis producta*. La anémona *Phyllodiscus semoni* (una de las más peligrosas, común en el Océano Pacífico oeste) puede inducir falla renal aguda con daño en el endotelio glomerular en humanos. De la anémona *Actinia equina* fueron aisladas muchas equinatoxinas, potentes proteínas citolíticas y la equistatina un inhibidor de cistein proteasas. La equistatina ha demostrado ser un inhibidor muy potente de papaína y un inhibidor específico de la proteína aspártica catepsina D. Mientras las proteasas de cisteína como papaína se han implicado en varias enfermedades del sistema nervioso central, como tumores cerebrales, Alzheimer, infarto cerebral, lesiones cerebrales, enfermedades neurológicas autoinmunes y ciertas formas de epilepsia, la proteinasa aspártica de catepsina D está involucrada en la patogénesis de cáncer de mama y posiblemente en Alzheimer (Rocha *et al.*, 2011).

## **Sistema nervioso**

Con un peso de alrededor de 2 kg el sistema nervioso humano es uno de los más pequeños y, sin embargo, de los más complejos sistemas y aparatos del cuerpo. Esta red intrincada de miles de millones de neuronas está organizada en dos subdivisiones principales; el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico.

El sistema nervioso central (SNC) está formado por el encéfalo y la médula espinal. El encéfalo es la parte del SNC que se localiza en el cráneo y contiene aproximadamente 100 000 millones de neuronas. La médula espinal está conectada con el encéfalo a través del foramen magno del hueso occipital y está rodeada por los huesos de la columna vertebral. El SNC procesa diversos tipos de información sensitiva aferente. Es también la fuente de los pensamientos, emociones y recuerdos. La mayoría de los impulsos nerviosos que estimulan a los músculos para que se contraigan y a las glándulas para que aumenten su secreción se originan en el SNC (Tortora y Derrickson, 2010).

El sistema nervioso periférico (SNP) incluye los nervios craneales y espinales y está dividido en un sistema nervioso somático (SNS) y un sistema nervioso entérico (SNE) del que se hablará más adelante. La neurona preganglionar tiene su cuerpo celular en el SNC y su axón mielinizado se extiende desde el SNC hasta un ganglio autónomo, que es un conjunto neuronal en el SNP. El cuerpo celular de la segunda neurona también se encuentra en este ganglio, pero su axón se extiende desde el ganglio hasta el efector (músculo liso, músculo cardíaco o glándula) (Tortora y Derrickson, 2010; Flórez, 2005).

El sistema nervioso lleva a cabo un complejo conjunto de tareas. Permite percibir diferentes olores, hablar y recordar hechos pasados; también proporciona señales que controlan los movimientos del cuerpo y regulan el funcionamiento de los órganos internos. Estas actividades pueden ser agrupadas en 3 funciones básicas: sensitiva (aferente), integradora (de proceso) y motora (eferente).

*Función aferente.* Los receptores sensitivos detectan los estímulos internos como el aumento de la tensión arterial, y los externos, como la sensación que produce una gota

de agua cuando cae por el brazo. Esta información sensitiva es transportada luego hacia el encéfalo y la medula espinal a través de los nervios craneales y espinales.

*Función integradora.* El sistema nervioso procesa la información sensitiva analizando y tomando decisiones para efectuar las respuestas adecuadas.

*Función eferente.* Una vez que la información sensorial ha sido integrada, el sistema nervioso puede generar una respuesta motora adecuada activando efectores (músculos y glándulas) a través de los nervios craneales y espinales. La estimulación de los efectores produce la contracción de un músculo o estimula una glándula para aumentar su secreción (Tortora y Derrickson, 2010).

La estructura del SNC se distingue por su capacidad de organizarse de forma integrada. Un punto crítico en dicha organización es la variedad de vías neuroquímicas que se van descubriendo en cada nivel, por restringido que éste sea. Desde el punto de vista neurofarmacológico, el primer sistema de integración en el SNC es la propia neurona, que es una célula particularmente capacitada para recibir de forma simultánea un número incontable de señales externas, traducirlas e incorporarlas en su propia biología. Todas las posibilidades de expresión de la información de una neurona quedan anuladas sin receptores adecuados. Las neuronas tienen excitabilidad eléctrica, es decir la capacidad para responder a un estímulo y convertirlo en un potencial de acción que se propaga a lo largo de la membrana plasmática de una neurona. Se inicia y se desplaza por el movimiento de iones (como los de sodio y potasio) entre el líquido intersticial y el interior de la neurona a través de canales iónicos específicos en su membrana plasmática (Tortora y Derrickson, 2010).

Existe un lógico deseo de correlacionar una vía neuroquímica concreta con una función fisiológica nerviosa determinada y específica. Cada latido, cada impulso nervioso, cada movimiento y pensamiento está estrechamente controlado por el flujo de iones a través de las membranas celulares (Flórez, 2005).

Una neurona es capaz de conducir señales rápidamente por alternar entre variar y mantener un potencial eléctrico en relación con el medio extracelular. Todas las neuronas mantienen un potencial eléctrico negativo en relación con el ambiente extracelular. Este potencial negativo provee una fuerza de conducción para partículas cargadas: en ausencia de otras fuerzas, las cargas positivas tienden a entrar en la célula y las cargas negativas suelen ser repelidas por esta. Las características de las células

nerviosas que contribuyen a su habilidad de mantener el potencial eléctrico son: la membrana neuronal celular es diferencialmente permeable a iones. En reposo la mayoría de las neuronas son altamente permeables a  $K^+$ , algo permeables a  $Cl^-$  y solo un poco permeables a  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  (Flórez, 2005).

### **Importancia de las neurotoxinas**

La característica esencial del sistema nervioso central es su capacidad ilimitada para la comunicación interneuronal; comunicación, recepción, integración y expresión son las bases nucleares de la función del sistema nervioso. La comunicación se ejecuta mayoritariamente mediante la transmisión química; por lo tanto, depende de la interacción de moléculas, lo que permite un amplio campo para la manipulación farmacológica. Una molécula transmisora debe estar presente en la terminación sináptica y, por lo tanto, ser sintetizada por la neurona a la que dicha terminación pertenece; debe ser liberada como resultado de la actividad específica de la neurona y debe ser capaz de influir selectiva y específicamente sobre la neurona postsináptica a través de receptores específicos. El transmisor puede interactuar con receptores de membrana asociados directa o indirectamente con la apertura de canales iónicos, que origina despolarización o hiperpolarización, acompañadas de reducción en la resistencia eléctrica de la membrana. Otras veces, en cambio, el transmisor provoca despolarización o hiperpolarización como consecuencia del cierre de canales iónicos y aumento de la resistencia de la membrana. En ocasiones, sin embargo, el transmisor no modifica el potencial de membrana o la conductancia iónica, sino que condiciona a la neurona postsináptica de forma que queda sensibilizada o desensibilizada a la acción de otros transmisores excitadores o inhibidores; la modificación puede ser enormemente variable, aunque requiere un sitio inicial de ataque (receptor) y un sistema operativo que traduzca la señal recibida (segundo mensajero) (Flórez, 2005).

La transmisión fisiológica de los estímulos nociceptivos se produce a través de pequeñas neuronas pseudounipolares del ganglio de la raíz dorsal. Las terminales libres de estas neuronas se distribuyen por la piel, los músculos, la duramadre, las articulaciones, las arterias y las vísceras. La mayoría de los nociceptores son polimodales y pueden transmitir estímulos mecánicos, mecánicos y térmicos, o térmicos y químicos. Esta comunicación de nada serviría si no dispusiera de la capacidad de integración en patrones convenientemente codificados que permiten la manifestación

de las diversas formas de conducta: movimiento, lenguaje, sensaciones, ideación y emociones (Flórez, 2005).

La generación de señales eléctricas en las neuronas requiere que las membranas plasmáticas establezcan gradientes de concentración para iones específicos y que estas membranas sufran cambios rápidos a su permeabilidad a estos iones. Los canales iónicos son proteínas transmembrana que contienen una estructura especializada llamada poro que permite el cruce de iones específicos por la membrana celular. Algunos canales contienen estructuras que los hacen sensibles al potencial eléctrico a través de la membrana y se abren o cierran en proporción a la magnitud del potencial de membrana. Otros tipos de canales iónicos son abiertos por señales químicas, como los neurotransmisores de manera extracelular y los segundos mensajeros de manera intracelular. Otros incluso responden a estímulos mecánicos, a cambios de temperatura o a una combinación de estas señales. Muchos tipos de canales iónicos han sido caracterizados a nivel tanto genético como proteico, lo que nos ha dado una gran cantidad de subtipos de canales que se expresan de modo diferente en células neuronales y no neuronales (Purves *et al.*, 2012).

Los canales iónicos son esenciales para un amplio rango de funciones fisiológicas incluyendo la señalización neuronal, la contracción muscular, el ritmo cardíaco y la secreción hormonal, entre otras. Alteraciones funcionales y estructurales asociadas a los canales iónicos constituyen la base de diferentes patologías neurológicas, neuromusculares y cardiovasculares. A continuación, se listan algunos ejemplos:

En pacientes con pérdida de memoria y Alzheimer se han encontrado alteraciones en canales de potasio, proteincinasa, mecanismos de regulación de calcio intracelular, receptores del tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), etcétera.

En enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y esquizofrenia sugieren alguna anomalía en los receptores colinérgicos nicotínicos (Etcheberrigaray *et al.*, 1994; Newhouse, 1997).

En el infarto cerebral, en la demencia asociada al SIDA y otras enfermedades neurodegenerativas se produce una estimulación excesiva del complejo NMDA, que provoca un flujo excesivo de calcio que desencadena la liberación de radicales libres y daño neuronal subsecuente. Con el desarrollo de antagonistas al NMDA se abre una posibilidad para la intervención terapéutica en estos casos e incluso se sabe que estos

canales están implicados en diferentes tipos de plasticidad neuronal y conductual (Lipton, 1996; Trujillo, 1995).

En el tratamiento de la epilepsia se ha utilizado la supresión de determinadas corrientes de calcio dependientes de voltaje (Dichter, 1997).

Los canales de sodio voltaje dependientes son los blancos moleculares de los anestésicos locales, de las drogas antiarrítmicas clase I y de muchos anticonvulsivantes (Ragsdale *et al.*, 1996; Taylor y Narashimhan, 1997).

Mutaciones específicas de los canales de calcio se asocian a enfermedades como la migraña, ataxia y epilepsia (Terwindt *et al.*, 1998).

Diversas investigaciones han demostrado que los compuestos activos de muchos venenos son péptidos; una vez inyectados en el cuerpo de la víctima, se difunden por el organismo hasta que se unen a sus receptores blanco donde muestran alta especificidad debido a su complejidad estructural. Dependiendo de su tamaño, estabilidad e interacción con los blancos moleculares, los péptidos pueden actuar rápidamente, con elevada potencia y con especificidad, lo cual es altamente deseable para los compuestos de uso terapéutico. Los péptidos de venenos son prometedores, ya que son el resultado de muchos millones de años de evolución. Debido a que no son moléculas señalizadoras endógenas no son detenidas por degradación enzimática, sino que más bien están diseñadas para eludirla. Tales péptidos tienen dos estrategias básicas para resistir las peptidasas circulantes y aumentar su estabilidad *in vivo*. En primer lugar, muchos poseen terminales amino o carboxilo modificados. En segundo lugar, presentan puentes disulfuro entrecruzados, que induce conformaciones rígidas lo cual los hace moléculas líderes prometedoras (Garateix *et al.*, 2000).

Las anémonas han sido fuente de compuestos capaces de ejercer acciones fisiológicas muy específicas sobre diferentes canales iónicos en tejidos excitables y han constituido instrumentos valiosos en la caracterización de los mecanismos moleculares subyacentes al funcionamiento de los canales de sodio en tejido muscular y nervioso. A partir de las anémonas; *Bunodosoma granulifera*, *Stichodactyla helianthus*, *Anemonia sulcata* y *Heteractis magnifica* se han encontrado una clase de toxinas bloqueadoras de canales de potasio  $K_v$  y  $K(Ca)$ ; estas últimas presentes en gran número en linfocitos T, por lo que la inhibición de los mismos puede ser utilizada para tratamientos con la finalidad de evitar el rechazo de trasplantes de órganos. Los canales  $K(Ca)$  tienen

amplia distribución en el sistema nervioso, cardiovascular y gastrointestinal por lo que el conocimiento de las interacciones con las toxinas de anémonas puede proporcionar información importante acerca de la modulación selectiva de dichos sistemas. Las neurotoxinas también pueden participar en la construcción de modelos para el estudio de patologías, como es el caso de las toxinas que se unen al sitio 3 del canal de sodio (obtenidas de escorpiones y anémonas); sus efectos son similares a los observados en algunas enfermedades genéticas como la miotonía y la parálisis periódica en el músculo esquelético (Miljanich, 1997; Aneiros *et al.*, 1993; Garateix *et al.*, 2000).

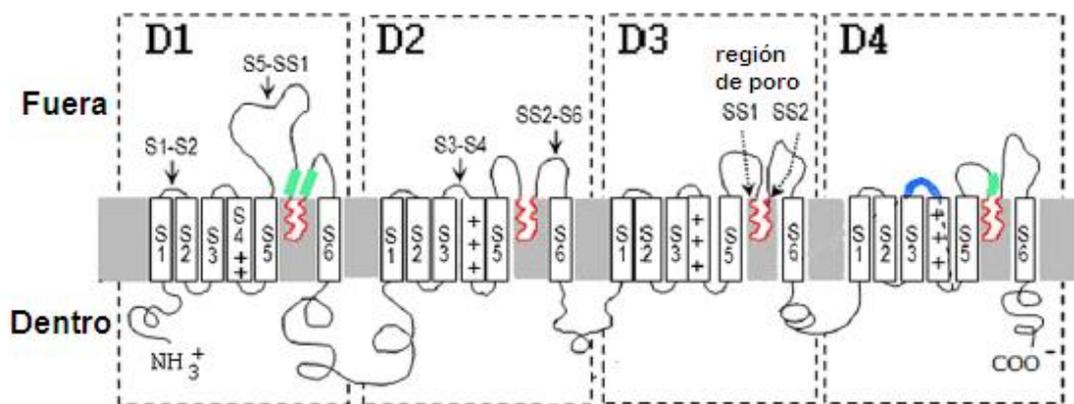
### **Toxinas que afectan los canales de sodio (Na<sup>+</sup>)**

Las anémonas se han convertido en una fuente de toxinas que mejoran la actividad de neuronas por el cambio en la cinética de los canales de sodio se puede esperar que sus efectos se puedan magnificar por el bloqueo simultáneo de canales de potasio; esto es debido a la aparente tendencia que tienen los venenos de animales a producir toxinas que actúan de manera sinérgica en diferentes blancos moleculares en el mismo sistema fisiológico (Castañeda y Harvey, 2009).

Los canales de sodio dependientes de voltaje (Na<sub>v</sub>) tienen un rol primordial en la excitabilidad de la mayoría de los animales ya que permiten la iniciación y la propagación de potenciales de acción; se activan durante la despolarización de la membrana de su potencial de reposo de -60mV provocando una breve y brusca despolarización que descarga un potencial de acción. Estos canales son complejos transmembranales formadores de poros, compuestos de una subunidad  $\alpha$  y subunidades auxiliares tales como las  $\beta$  en vertebrados y subunidades tipo E en insectos, la subunidad  $\alpha$  de 260 kDa está compuesta por 4 dominios homólogos (D1-D4), cada uno comprende 6 segmentos transmembranales (S1-S6); en la Figura 1 se muestra esquemáticamente un canal de sodio (Moran *et al.*, 2009).

Debido a su rol crucial en la excitabilidad los canales de sodio Na<sub>v</sub>s se han convertido en los blancos principales de una amplia variedad de toxinas. Se han elucidado siete sitios receptores de neurotoxinas en las subunidades  $\alpha$ . Cuatro de estos sitios, formados por las asas extracelulares que conectan los segmentos transmembranales de la subunidad  $\alpha$ , son reconocidos por toxinas peptídicas solubles en agua. El sitio receptor 1 es el blanco de las  $\mu$  conotoxinas de los venenos de caracoles *Conus sp*; el sitio

receptor 3 es un blanco para toxinas de anémonas, escorpiones y arañas; el sitio receptor 6 es el blanco de las  $\delta$  conotoxinas de caracoles *Conus sp.* Además de las  $\mu$  conotoxinas, todas estas toxinas afectan las propiedades de apertura del canal de sodio  $Na_v$ , tanto la activación (sitio receptor 4) o inactivación (sitios receptores 3 y 6) y son llamados por lo tanto “modificadores de apertura”. De los trabajos de Béress y Béress (1975), se sabe que aislaron toxinas que afectan los canales de sodio de *Anemonia sulcata* (ahora llamada *Anemonia viridis*) y las llamaron ATX I, ATX II y ATX III (nombradas hoy Av1, Av2 y Av3, respectivamente). Se encontró que estas toxinas afectan los potenciales de acción del cangrejo de río y los potenciales de acción por inhibición de la inactivación de la conductancia de sodio en neuronas aisladas de cangrejo de río. Los resultados de la inhibición de la inactivación resultan en potenciales de acción prolongados que pueden resultar en parálisis contráctil y muerte. La determinación de la secuencia de aminoácidos de estas toxinas revela que Av1 y Av2 tienen 46 y 47 residuos de aminoácidos respectivamente y comparten una alta identidad secuencial, mientras que Av3 contiene solo 27 residuos de aminoácido y su secuencia no se relaciona con Av1 y Av2. La comparación de las toxinas Av1, Av2 y Av3 reveló que pertenecen a al menos dos familias de proteínas (Moran *et al.*, 2009).



**Fig. 1.** Ilustración esquemática de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio. La principal región identificada afectada por toxinas de *Anemonia viridis* es el asa S3-S4 en D4 (azul) (imagen traducida de Moran *et al.*, 2009).

Entre los componentes de los venenos de cnidarios mejor estudiados están las potentes neurotoxinas tipo I de anémonas. Estos son péptidos de 46-61 aminoácidos que inhiben la inactivación de los canales de sodio dependientes de voltaje, induciendo por lo tanto parálisis en la presa o predador (Moran *et al.*, 2012).

## Toxinas que afectan el canal de potasio (K<sup>+</sup>)

La importancia de los canales de potasio radica en su función para llevar a la neurona despolarizada después de la entrada de sodio a la repolarización. Cuando el potencial de membrana está cercano a +50 mV los canales de potasio se abren permitiendo a los iones K<sup>+</sup> dejar la célula. Los canales iónicos de potasio son menos sensibles a los cambios en el potencial de membrana que los canales iónicos de sodio y en consecuencia se abren después; los iones K<sup>+</sup> dejan la neurona porque las cargas de sodio intracelular ahora en mayor concentración los repelen; un corto periodo después de que los canales de potasio se abren los canales de sodio se cierran y de este modo se detiene el flujo de sodio hacia la célula. La continua salida de potasio de la neurona regresa la neurona a su potencial negativo (Klein y Thorne, 2007).

Las neurotoxinas de 3.5 a 6.5 kDa que actúan sobre canales de potasio fueron descubiertas a mediados de los 90's. Las 11 toxinas aisladas de anémonas que afectan canales de potasio son divididas en tres tipos basados en sus características estructurales y funcionales. **Las toxinas tipo 1** (compuestas de 35-37 aminoácidos) incluyen ShK de *Stichodactyla helianthus*, AsKS (kaliseptina) de *Anemonia sulcata*, BgK de *Bunodosoma granulifera*, HmK de *Heteractis magnifica* y AeK de *Actinia equina* y bloquean los canales de potasio Kv1. **Las toxinas tipo 2** (compuestas de 58 o 59 aminoácidos que incluyen AsKC 1-3 kaliclutinas 1-3) son homólogas a los inhibidores de proteasa tipo Kunitz (por ejemplo, los inhibidores de tripsina pancreática bovina) y exhiben bloqueo de los canales de potasio Kv1 tanto como la actividad inhibidora de proteasa. Tres toxinas (compuestas de 42 o 43 aminoácidos), BDS-I y II de *Anemonia sulcata* y APETx1 de *Antopleura elegantissima*, son miembros de las **toxinas tipo 3**. BDS-I y II son los primeros bloqueadores específicos de los canales potasio Kv3.4. De *Anemonia erythraea* se ha aislado una toxina que afecta el canal de potasio tipo I nombrada AETX K (Hasegawa *et al.*, 2006).

Las estructuras moleculares de los canales de sodio y de potasio sensibles al voltaje son similares; sin embargo, los canales de potasio tienen la particularidad de que, en lugar de ser una sola cadena con cuatro secuencias homologas, están formados por cuatro cadenas separadas, cada una con sus seis segmentos transmembranales; es decir, están formados por cuatro subunidades, en cuyo centro está el poro. La región que forma el poro de los canales está entre S5 y S6; en los canales de potasio el

segmento S4 contiene al sensor de voltaje y comparte más de 90% de similitud en la secuencia equivalente al canal de sodio (Fernández de Miguel, 2003).

### **Toxinas que afectan canales nicotínicos**

Los receptores nicotínicos a acetilcolina (nAChRs) son canales catiónicos no selectivos conocidos por ser afectados por una amplia variedad de neurotoxinas. Los canales nAChRs musculares en vertebrados están divididos en subtipos fetales ( $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ ) y adultos ( $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ ) que dependen de la estequiometría de subunidades y el estado de desarrollo del músculo. Ambos subtipos se encuentran en las membranas postsinápticas de la unión neuromuscular y su inhibición ha demostrado derivar en una parálisis muscular. Estos canales son blanco de una variedad de neurotoxinas producidas por serpientes de las familias Elapidae e Hydrophiidae, y caracoles marinos *Conus*. Las  $\alpha$ -neurotoxinas tienen como blanco a los canales nAChRs y presentan gran afinidad y selectividad; sin embargo, homólogos débiles de neurotoxinas (CM10, CM12 de *Naja haje annulifera* y S5C10 de *Dendroaspis jamesoni*), cadoxina de *Bungarus candidus* y LSIII de *Laticauda semifasciata* han demostrado producir un bloqueo neuromuscular reversible. De manera similar, conotoxinas de las subfamilias  $\alpha 3/5$  y  $\alpha 4/7$  y la familia  $\alpha A$  han mostrado selectividad remarcable por los canales nicotínicos. En estudios realizados por Ponce y colaboradores (2013) evaluando fracciones obtenidas del veneno de la medusa *Aurelia aurita* se demostró la inactivación dependiente de dosis de los canales nicotínicos adultos y fetales.

### **Modelos biológicos para el rastreo de neurotoxinas**

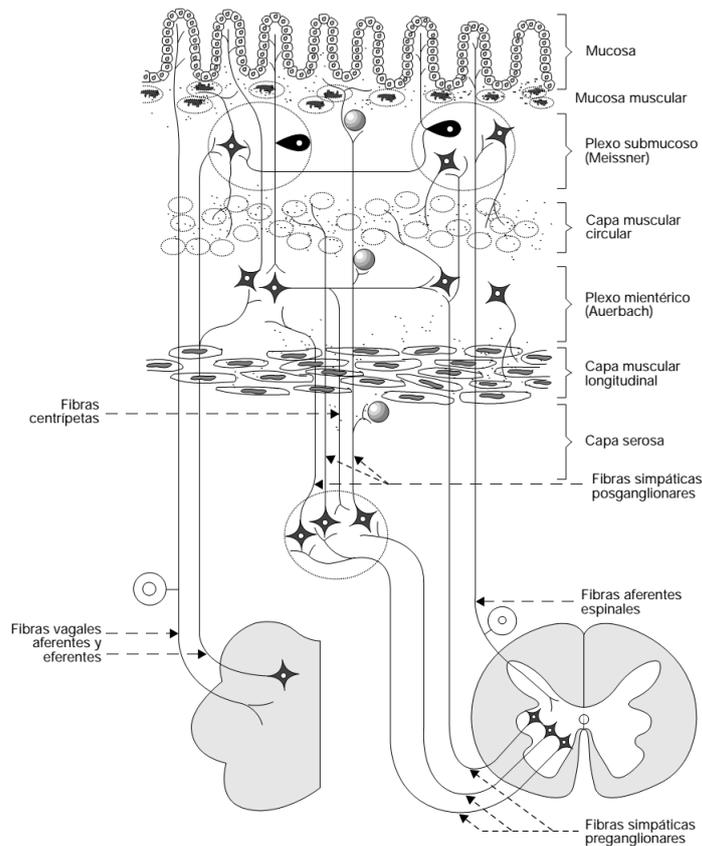
Como ya se ha descrito, los blancos de muchas de las neurotoxinas presentes en los venenos de cnidarios son específicos de canales iónicos que se encuentran en las células de sus presas; en la búsqueda biodirigida se utilizan diversos modelos biológicos que se adecuan según las respuestas que se van obteniendo. En la búsqueda de neurotoxinas los modelos biológicos a utilizar para el rastreo de una toxina dependen del enfoque que se dé al estudio (es decir, qué es lo que se está buscando en este veneno), el hábitat en que se desarrolla y desenvuelve nuestro espécimen de estudio y los efectos observados en sus presas comunes. Es así como se decidió probar los extractos obtenidos a partir de *Anemonia sargassensis* en dos modelos biológicos, por lo cual tenemos la necesidad de explicar los efectos más comunes observados en cada uno de estos bioensayos, lo cual nos permite llegar a algunas conclusiones sobre nuestros extractos.

## Regulación nerviosa del sistema entérico – Modelo de íleon de rata

Según lo tratado por Flórez y colaboradores (2005) la regulación nerviosa de la función gastrointestinal se caracteriza por un elevado grado de autonomía. Aunque se recibe la influencia del sistema nervioso autónomo presenta características muy especiales que la separan claramente de la regulación en otros órganos. Estas características son; **a)** la existencia de un sistema nervioso entérico (SNE) virtualmente independiente del control nervioso central; **b)** la existencia de gran número de neuronas intrínsecas ( $10^7$  a  $10^8$ ); **c)** la enorme diversidad de tipos neuronales y de neurotransmisores, especialmente neuropéptidos, y **d)** la frecuencia con que una misma neurona contiene dos o más cotransmisores. De esta manera, este sistema controla la motilidad, las secreciones exocrina y endocrina, y la microcirculación del tubo digestivo, e interviene en la regulación de sus procesos inmunológicos e inflamatorios.

Las neuronas del SNE se agrupan en pequeños ganglios conectados entre sí por haces de fibras nerviosas que forman el plexo mientérico de Auerbach y el submucoso de Meissner. El plexo mientérico se extiende a todo lo largo del intestino, proporcionando inervación motora a las capas musculares longitudinal y circular, e inervación secretomotora a las células de la mucosa; también emite sus proyecciones a los ganglios de la submucosa, a los ganglios entéricos de la vesícula biliar y al páncreas, y a los ganglios que se encuentran en el tracto gastrointestinal (Figura 2).

El plexo submucoso presenta su máximo desarrollo en el intestino delgado donde desempeña un papel importante en el control de la secreción. Además de inervar el epitelio glandular, las neuronas inervan la *muscularis mucosae*, las células endocrinas intestinales y los vasos de la submucosa (Flórez, 2005 y Purves *et al.*, 2012).



**Fig. 2.** Inervación intrínseca y extrínseca de la pared del tubo digestivo (imagen tomada de cap. 44 Flórez, 2005).

En los ganglios se encuentran las células fuertemente adheridas unas a otras, los nervios y las terminaciones nerviosas aferentes, y abundantes células gliales que se asemejan a los astrocitos del SNC.

En términos neuroquímicos, todas las fibras preganglionares simpáticas y parasimpáticas poseen como neurotransmisor específico o primario la acetilcolina, que ejecuta la transmisión por interacción con receptores colinérgicos nicotínicos. Aunque el neurotransmisor puede ser liberado por la terminación nerviosa y salir al espacio sináptico en reposo y de forma espontánea, mayoritariamente lo hace en respuesta al estímulo provocado por el potencial de acción que despolariza la membrana presináptica. Este cambio de voltaje activa canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del voltaje, permitiendo así la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las moléculas transmisoras se encuentran almacenadas en vesículas; su liberación consiste básicamente en la migración desde la vesícula hacia la membrana presináptica, donde ocurre la fusión de membranas, la formación de un poro que comunica ambas estructuras y el vertido del interior vesicular al espacio sináptico.

La acetilcolina, la noradrenalina y los cotransmisores son liberados por un mecanismo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , se difunden al espacio sináptico e interactúan con receptores específicos, situados unos en la membrana postsináptica y otros en la presináptica.

Los efectos de la acetilcolina observados en el aparato gastrointestinal incluyen el aumento del peristaltismo y la relajación de esfínteres, que producen una brusca aceleración del tránsito intestinal, con heces diarreicas y dolores cólicos. Es un estimulante del peristaltismo, incrementa la secreción gástrica y tiene aplicaciones en caso del íleon paralítico, pero puede llegar a producir cuadros diarreicos y dolores tipo cólico (Flórez, 2005).

El potencial de acción es generado por dos clases de canales voltaje dependientes que son activados secuencialmente, uno selectivo a sodio y otro selectivo a potasio, y en contraste el canal receptor a acetilcolina genera un potencial permitiendo el paso de ambos iones con casi igual permeabilidad. En segundo lugar, el flujo de sodio a través de los canales voltaje dependientes es regenerativo: por incremento de la despolarización de la célula, el influjo de sodio abre más canales dependientes de voltaje. Esta característica regenerativa es responsable de la propiedad todo o nada del potencial de acción. En contraste, el número de canales acetilcolina abiertos durante el potencial sináptico es regulado por la acetilcolina disponible. La despolarización producida por el influjo de sodio a través de estos canales activados por ligando no desencadena la apertura de más canales.

### ***Bloqueo de entrada de calcio a las células de músculo liso***

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje se encuentran en la membrana celular y en membranas intracelulares de múltiples tejidos; se han identificado 5 subtipos (L, N, P, Q y T). Los subtipos T y L están en neuronas, miocitos cardiacos, células musculares lisas y células endócrinas. A pesar de que las células se encuentran sumergidas en elevadas concentraciones de calcio, los niveles del catión que se encuentran en el citosol de forma libre son extremadamente bajos. Solo cuando las membranas se excitan permiten el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula, la concentración baja rápidamente, ya que en el citosol el  $\text{Ca}^{2+}$  es secuestrado eficientemente por orgánulos y proteínas (Flórez, 2005).

La entrada de calcio a la célula permite una contracción más prolongada del músculo liso, es en este tipo de músculo y en células no musculares que el receptor de calcio es la calmodulina y es absolutamente requerida para la activación de la cadena ligera de miosina cinasa; esta enzima cataliza la fosforilación de la cadena ligera de miosina de 20,000 Daltons que es obligatoria para la actividad de la actomiosina ATPasa (Cheung, 1980).

### ***Hiperpolarización de células del músculo liso***

Los canales de potasio se caracterizan por existir casi completamente en cada célula eucariota; sin embargo, en las células excitables tienen la función de repolarizar la célula, es decir regresarla de su estado de reposo; la apertura de dichos canales se lleva a cabo cuando el potencial de acción ronda entre +40 mV y +55 mV, que es aproximadamente el potencial de acción al cual se inactivan los canales de sodio. Al abrirse los canales de potasio dependientes de voltaje permiten la salida de potasio al espacio extracelular; es común que los canales queden abiertos un poco más de tiempo una vez que se haya alcanzado el potencial de -60 mV, y este periodo de apertura prolongada ocasiona una hiperpolarización en la célula; si el canal permanece abierto la célula no regresará a su estado de reposo (Flórez, 2005).

### ***Activación de un receptor adrenérgico.***

Los receptores adrenérgicos tienen diferentes efectos dependientes del tipo, o del órgano que se estimule; en el tracto gastrointestinal predomina la acción relajadora de los  $\beta$ -adrenorreceptores sobre la contractura de los  $\alpha$ -adrenorreceptores; a este efecto en el músculo liso se suma la acción que inhibe la liberación de acetilcolina en células del plexo entérico (Flórez, 2005).

### ***Repolarización y el periodo refractario***

Después, los canales de  $K^+$  se abren y el potasio deja la célula (los canales de potasio son menos sensibles a los cambios en el potencial de membrana que los canales de

sodio y por lo tanto se abren después); los iones de potasio salen porque ahora hay una mayor cantidad de iones  $\text{Na}^+$  en la célula. Poco después de que los canales de potasio se abren los canales de sodio se cierran y el sodio deja de entrar a la célula. La salida continua de iones  $\text{K}^+$  causa que el interior de la célula se vuelva otra vez más negativo que el exterior.

Por un breve periodo de tiempo durante la generación del potencial de acción la neurona es completamente resistente a una estimulación mayor; este periodo recibe el nombre de periodo refractario absoluto, durante el cual la neurona no puede generar otro potencial, sin importar que tan intenso sea el estímulo. El periodo refractario absoluto es seguido por el periodo refractario relativo durante el cual la neurona puede generar otro potencial de acción solo en respuesta a un estímulo más intenso de lo normal. El periodo refractario relativo corresponde a cuando el potencial de membrana se vuelve ligeramente más negativo (en el interior) de lo normal durante el proceso de recuperación. Durante este periodo de gran negatividad (-80 mV en lugar de -70 mV) se dice que la membrana celular está hiperpolarizada (Flórez, 2005).

### ***Liberación de neurotransmisores***

Cuando un potencial de acción alcanza la terminal presináptica los canales iónicos de calcio se abren y permiten la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula. La entrada de calcio provoca el movimiento de vesículas sinápticas al sitio de liberación en la membrana presináptica, donde las moléculas de neurotransmisores son liberados a la hendidura sináptica (Klein y Thorne, 2007).

Los receptores para transmisores pueden ser clasificados en dos grupos mayoritarios dependiendo de cómo controlan los canales iónicos en la célula postsináptica. Los receptores ionotrópicos son un tipo de canal iónico que abre cuando se enlaza el transmisor. El segundo tipo son los receptores metabotrópicos que actúan indirectamente en los canales iónicos por activación de una cascada bioquímica como segundo mensajero dentro de la neurona postsináptica. Ambos tipos de receptores pueden resultar en excitación o inhibición (Flórez, 2005).

## Patch-clamp en ovocitos de rana

Los ensayos electrofisiológicos son de gran importancia en el descubrimiento moderno de drogas y muchas propuestas han sido desarrolladas en varias aplicaciones prácticas.

Los ovocitos de rana *Xenopus laevis* son huevos inmaduros que tienen una larga historia en estudios de ovogénesis, fertilización, morfogénesis y desarrollo embrionario. En 1970 se descubrió que los ovocitos traducen prácticamente cualquier RNA mensajero que es inyectado en su citoplasma.

Los receptores de membrana y los canales iónicos se encuentran entre los blancos de los fármacos más importantes y una medición electrofisiológica directa de las corrientes iónicas transmembranales es el método de elección para analizar los efectos de potentes fármacos en receptores transmembranales (Molnar y Hickmann, 2007). El potencial de membrana se puede medir insertando un microelectrodo de vidrio con una punta muy fina en el interior de la célula. En el momento en que la punta del electrodo penetra la membrana se registra un potencial negativo en el interior. El valor del potencial de membrana varía de un tipo a otro entre -45 mV y -90 mV.

La caracterización morfológica detallada de los ovocitos de *Xenopus* más usada es la de Dumont (1972), que definió 6 estados de desarrollo. Nombrando estado I al periodo previtelogénico, donde el ovocito es todavía una célula pequeña y transparente (50 – 300  $\mu\text{m}$  de diámetro), al estado de completo desarrollo del ovocito IV seguido del proceso vitelogénico donde el ovocito alcanza su tamaño máximo de (1 200 a 1 400  $\mu\text{m}$  de diámetro) y adquiere su apariencia característica, opaca y polarizada. En cualquier estadio de desarrollo los folículos son un sistema complejo multicelular que consta del ovocito en sí rodeado por muchos envoltorios celulares y no celulares. La capa adyacente inmediatamente al ovocito es el envoltorio vitelino, que comienza en el estadio de desarrollo II y rodea completamente el ovocito en el estadio III de desarrollo. Adyacente a la superficie del envoltorio vitelino se encuentra una monocapa discontinua de células foliculares. En el estadio II las células comienzan a desarrollar un fino proceso macrovilli el cual se extiende, a través de los poros en el envoltorio vitelino hasta la membrana del ovocito. Al mismo estado, el ovocito desarrolla sus propios procesos de membrana (microvilli). El macrovilli y el microvilli del ovocito hacen numerosos contactos formando una compleja red que crece y es mantenida a través de los estados III y IV (1 000 – 1 400  $\mu\text{m}$ ). Directamente sobre las células foliculares hay una membrana formada principalmente de colágeno, la cual separa las capas de células foliculares de los tejidos

inferiores. La capa final externa es el epitelio ovárico interno. Las células foliculares también ayudan a mantener un microambiente adecuado para el ovocito, producen y secretan esteroides y otros factores que promueven la maduración y el crecimiento del ovocito. La comunicación entre las células foliculares y el ovocito no es solo paracrina; estas estructuras de membrana tienen canales eléctricos y metabólicos de comunicación que establecen continuidad directa entre el citoplasma de las células acopladas.

Las respuestas eléctricas de los folículos pueden ser divididas en las corrientes que requieren la presencia de células foliculares y las corrientes que son independientes de ellas; estas últimas originadas en el ovocito por sí mismo. El folículo responde a numerosos neurotransmisores, péptidos y hormonas que generan una variedad de respuestas de corrientes de membrana. Las primeras respuestas descritas fueron aquellas generadas por agonistas colinérgicos y catecolaminérgicos (Kusano *et al.*, 1982). Estos estudios mostraron que la activación de receptores a acetilcolina muscarínicos genera corrientes de membrana multifásicas en las cuales la amplitud de los diferentes componentes varía enormemente entre folículos de diferentes ranas. Un componente de estas respuestas a ACh es una corriente característica oscilatoria que se preserva después de la defoliculación. La respuesta oscilatoria y una corriente suave asociada tienen un mecanismo que involucra un incremento del calcio intracelular vía activación de fosfolipasa C (PLC), producción de IP<sub>3</sub>, movilización de calcio intracelular y la apertura de canales de calcio dependientes de cloro. En ovocitos de algunas ranas, la corriente oscilatoria generada por ACh incluye un componente inicial agudo que puede estar sobre los 20  $\mu$ A de amplitud.

En 1989 Miledi y Woodward encontraron en una serie de experimentos que las corrientes de potasio que se generaban en los ovocitos de *Xenopus* por la acción de catecolaminas, agonistas purinérgicos, gonadotrofinas, péptido vasoactivo intestinal (VIP) y prostanglandinas se reducían en más del 90% y en algunos casos eran totalmente abolidas. En contraste las corrientes oscilatorias de cloro (Cl<sup>-</sup>) y cationes divalentes se preservaron después de la defoliculación. Los ovocitos que están en su estadio final de desarrollo (estadio IV) han completado la ovogénesis y son competentes para ovulación y subsecuente fertilización. Tienen aproximadamente 1.3 mm de diámetro y un volumen aproximado de 1  $\mu$ L; tienen un bien definido polo animal café (que contiene la mayoría de los núcleos) y un hemisferio vegetal débilmente pigmentado (que contiene plaquetas de yema). Entre los dos hemisferios hay un anillo delgado unipigmentado, llamado banda o cinturón ecuatorial. Los ovocitos totalmente

desarrollados de *Xenopus laevis* están encerrados en un folículo envolvente antes de la maduración y la ovulación; estudios previos en la rana *Rana pipiens*, presumiblemente similar a *Xenopus*, revelaron que hay cuatro capas celulares fuera del ovocito: el epitelio superficial, la teca o capa conectiva, la capa de células foliculares y la membrana vitelina. Los ovocitos pueden ser liberados de su envoltura folicular por desfoliculización enzimática (tratando el tejido ovárico con una preparación que contenga colagenasa cruda), o por desfoliculización manual (disección manual con pinzas) (Liu y Liu, 2006).

La superficie de la membrana de un ovocito completamente desarrollado despliega una sorprendente diversidad de corrientes iónicas. Se sabe que contiene canales de cloro activados por calcio, canales de calcio activados por despolarización y por hiperpolarización, al menos dos tipos de canales de sodio y dos tipos de canales de potasio. Es así como los canales en la membrana de los ovocitos nativos son un fructífero campo de estudio en sí mismos, particularmente porque están localizados en una célula grande que facilita los análisis electrofisiológicos y bioquímicos (Parker y Miledi, 1988).

Las respuestas eléctricas nativas en ovocito de *Xenopus* están divididas en corrientes iónicas que requieren la presencia de células foliculares y las corrientes que son independientes del folículo, es decir generadas en la membrana del ovocito en sí; es sobre las últimas que ahondaremos un poco más dado que para este trabajo se usaron ovocitos nativos.

El ovocito nativo presenta canales de:

**Sodio ( $Na^+$ ):** Que son activados por una despolarización prolongada de la membrana y pierden actividad por una prolongada repolarización; una vez producido el canal puede abrirse y cerrarse eléctricamente (Kado y Baud, 1981). Según estudios realizados por Baud y Kado (1984) el desarrollo de la corriente de  $Na^+$  es independiente de la concentración de  $Ca^{2+}$  externa pero no en su totalidad, como lo demostraron los estudios realizados por Bossi y colaboradores (1998). El ovocito nativo también cuenta con canales de sodio que son excitables hasta que se mantiene una corriente de entrada después de que la membrana ha sido despolarizada por un tiempo; es decir, no son excitables en su estado basal y son inducidos por una larga despolarización o por una serie de pequeñas despolarizaciones iterativas; en el estudio realizado por Charpentier y colaboradores (1995) se muestra que es posible la activación por la acción de una

proteína cinasa C; estos canales tienen un potencial de equilibrio de aproximadamente 45 mV (Kusano *et al.* 1982).

*Potasio (K<sup>+</sup>):* Entre los estudios sobre canales de potasio en ovocitos nativos se encuentran los realizados por Burckhardt y Frömter (1992) que identifican canales de potasio que pueden ser bloqueados por TEA<sup>+</sup> y Ba<sup>2+</sup>. El potencial de equilibrio experimental del canal de potasio es -100 mV medido por Kusano y colaboradores en 1982.

*Cloro (Cl<sup>-</sup>):* Los canales de cloro nativos de los ovocitos de rana tienen un potencial de inversión de -14 mV según los experimentos hechos por Kusano y colaboradores en 1982.

## **Justificación**

*Anemonia sargassensis*, un organismo perteneciente al phylum Cnidaria, que presenta poca movilidad y que habita sobre los pastos marinos en la zona somera, se caracteriza por contar con mecanismos de defensa potentes, que pueden causar daño a sus depredadores; por lo anterior constituye una fuente rica de compuestos bioactivos novedosos con alto potencial farmacológico que vale la pena explorar; las neurotoxinas en especial son importantes en el estudio de canales iónicos del sistema nervioso debido a su alta selectividad.

### **Objetivo general**

Aislar, purificar y caracterizar los compuestos con actividad neurotóxica del extracto crudo y fracciones presentes en la anémona *Anemonia sargassensis*, siguiendo un esquema biodirigido.

### **Objetivos específicos**

Purificar de forma parcial los compuestos neurotóxicos de un extracto crudo de la anémona *Anemonia sargassensis* empleando ultrafiltración y cromatografía de líquidos.

Evaluar la actividad biológica del extracto crudo y fracciones purificadas parcialmente en cangrejo fantasma, íleon aislado de rata y ovocitos de rana.

## **Materiales y métodos**

### **Área de estudio**

La Laguna Arrecifal de Puerto Morelos está ubicada en el área norte de la costa de Quintana Roo (Mar Caribe Mexicano). La laguna se extiende desde la línea de costa hasta un arrecife coralino que corre ligeramente en diagonal a una distancia de ~500 a 2 000 m de la costa; la profundidad en la laguna arrecifal es de aproximadamente 1 a 4 m y el fondo está compuesto principalmente por arena calcárea estabilizada por amplias praderas de pastos marinos, aunque en algunas partes aflora el pavimento calcáreo. La temperatura del agua es típicamente más alta en julio-septiembre (29.4-29.5°C) y más baja durante enero-marzo (25.1-25.8 °C) (González- Muñoz *et al.*, 2015).

### **Recolecta de organismos**

Los ejemplares de *Anemonia sargassensis* se recolectaron manualmente mediante buceo libre. Los organismos se encuentran en la zona de pastos, adheridos a éstos, a una profundidad de 0.5 a 1.5 metros de acuerdo con lo reportado por González-Muñoz y colaboradores (2015).

### **Obtención de extracto crudo**

La obtención del extracto crudo se realizó mediante el método modificado de Kem y colaboradores (1989). Los organismos se congelaron a -20 °C y posteriormente se sumergieron en agua desionizada y se agitaron manualmente por 20 min aproximadamente, se extrajeron los organismos y se congelaron nuevamente a -60 °C por una hora y la solución se mantuvo en refrigeración a 4 °C; lo anterior se realizó por lo menos 3 veces (ciclos). Posteriormente el extracto se filtró a través de gasa para eliminar el tejido restante, se centrifugó a 16 000 g por 10 min a 4 °C para separar el sobrenadante del precipitado. El precipitado se maceró usando un homogenizador manual de vidrio con la finalidad de disparar los nematocistos; para ello se tomaron alícuotas y se observaron al microscopio óptico; al observar por lo menos 70% de los nematocistos disparados, se centrifugó nuevamente, se separó el sobrenadante del precipitado y se congeló para ser liofilizado.

## **Cuantificación de proteína**

Con la finalidad de obtener la concentración de proteína contenida en el extracto crudo de la anémona se utilizó el método de Bradford (1976), empleando azul de Coomassie G250 en donde la forma roja se convierte en azul a través de la unión del tinte con proteínas. El complejo formado tiene un alto coeficiente de extinción que da una gran sensibilidad; además es un proceso rápido y no hay un requerimiento crítico de tiempo para el ensayo.

Para la determinación del contenido de proteínas totales en el extracto y las fracciones se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) a las siguientes concentraciones: 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{g/mL}$ . Tanto a las muestras como los estándares se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford para obtener un volumen total de 255  $\mu\text{L}$ . Las mezclas se agitaron y se dejaron reaccionar durante 5 min y posteriormente se leyeron a una  $\lambda$  de 590 nm.

## **Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE**

Para evaluar el peso molecular aproximado de los componentes del extracto crudo y de las fracciones, se realizaron ensayos de electroforesis en geles de acrilamida al 16% y 20% con buffer de Tris-HCl pH 8.8. Las muestras de los extractos se desnaturalizan en buffer de carga; 0.0625 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol como tinte (Laemmli, 1970), en una proporción 2:1 por 5 minutos a 95 °C; se cargan 15  $\mu\text{L}$  de muestra por pozo. Adicionalmente se utilizan 2  $\mu\text{L}$  de estándares de proteína; Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standars (10 a 250 kDa) y Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standars (2 a 250 kDa) de Bio-Rad®. Los geles se corren a 175 V y se tiñen con tinción de plata ProteoSilver™ SIGMA-ALDRICH™.

## **Medición de la actividad fosfolipasa**

Para la medición de la actividad se utilizó el kit de ensayo sPLA<sub>2</sub> de Cayman Chemical Company© en el cual se usa la 1,2-dithio-heptanoil-tiofosfatidilcolina que sirve como sustrato para la mayoría de las fosfolipasas PLA<sub>2s</sub> y PLA<sub>2</sub>. Después de la hidrólisis del enlace tioéster en la posición sn-2 efectuada por PLA<sub>2</sub>, los tioles libres son detectados usando DTNB (5,5'-dithio-bis-(2-ácido nitrobenzoico)) por absorbancia a 414 nm,

efectuando lecturas en intervalos de 1 min, por un periodo mínimo de 10 min para el cálculo de una pendiente. Una pendiente pronunciada muestra una alta actividad fosfolipasa.

## **Purificación**

### **Separación con membranas de corte por ultrafiltración del extracto crudo**

El fraccionamiento se realizó por ultrafiltración mediante membranas de corte de peso molecular, utilizando una celda con agitación (Millipore®) de 200 mL de volumen, empleando nitrógeno gaseoso (5 psi) y membranas Amicon de 10 y 1 kDa. La fracción menor a 10 kDa y mayor a 1 kDa se liofilizó para su posterior uso en las pruebas de bioactividad, así como para determinar el rendimiento del proceso.

### **Separación del ultrafiltrado activo mediante filtración en gel en un sistema de FPLC**

Posteriormente, la fracción de entre 1 a 10 kDa se purificó mediante el uso de cromatografía líquida de baja presión; se utilizó como matriz de separación Sephadex G-50 M, que es un medio que separa por medio de tamaño molecular; las dimensiones de la columna de separación usada son 42.5 cm de largo por 5 cm de diámetro; se utilizó como eluyente ácido acético 0.3 M y se analizó la columna a un flujo de 2.5 mL/ min. El software empleado para la detección de las señales es Prime View.

### **Análisis de las fracciones activas mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAR)**

Finalmente se analizaron las fracciones activas mediante CLAR (HPLC, por sus siglas en inglés), utilizando las siguientes condiciones: columna de fase reversa C18(2) Luna (250 X 45 mm, tamaño de partícula 5 µm, diámetro del poro 100Å Phenomenex®) y como fase móvil A agua ( 0.1% de TFA) y acetonitrilo (0.1% de TFA) como fase móvil B en un gradiente que comenzó con 100% de fase móvil A, hasta llegar a un máximo de 100% de B; el volumen de inyección utilizado fueron 500 µL, esta separación se realizó con la finalidad de continuar analizando las fracciones.

## **Bioensayos**

### **Ensayo de toxicidad en cangrejos *Ocypode quadrata***

Se realizó un monitoreo biológico de la actividad del extracto crudo utilizando el bioensayo neurotóxico en cangrejos propuesto por Béress y Béress (1971). Los cangrejos *Ocypode quadrata* (comúnmente conocido como Cangrejo Fantasma) se inyectaron en la sección de la coxa del tercer pereiópodo con la finalidad de saber si el extracto presenta actividad neurotóxica y posteriormente se usó este bioensayo para realizar la separación biodirigida para localizar la(s) fracción(es) activa(s).

### **Ensayo de íleon aislado de rata**

Ratas de sexo indistinto de un peso aproximado de entre 200-300 g se sacrificaron por dislocación cervical; posteriormente se removió el íleon, se limpió y se cortó en segmentos (1 cm), los cuales se montaron en baños orgánicos de 5 mL de capacidad que contenían solución de Krebs-Henseleit, de la siguiente composición: NaCl, 118 mM; KCl, 4.7 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM y D-(+)-glucosa, 11 mM. Esta solución se gasificó con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Las contracciones espontáneas de segmentos de íleon se registraron en un polígrafo Grass con transductor de presión. Después 10 minutos de estabilización y calibrando la tensión a 1 g, se agregó la sustancia a evaluar y un control positivo de clasificando su buen estado según la respuesta (Rojas *et al.*, 2002; Ping *et al.*, 2012; Daisuke *et al.*, 2014).

### **Prueba de ovocitos de rana**

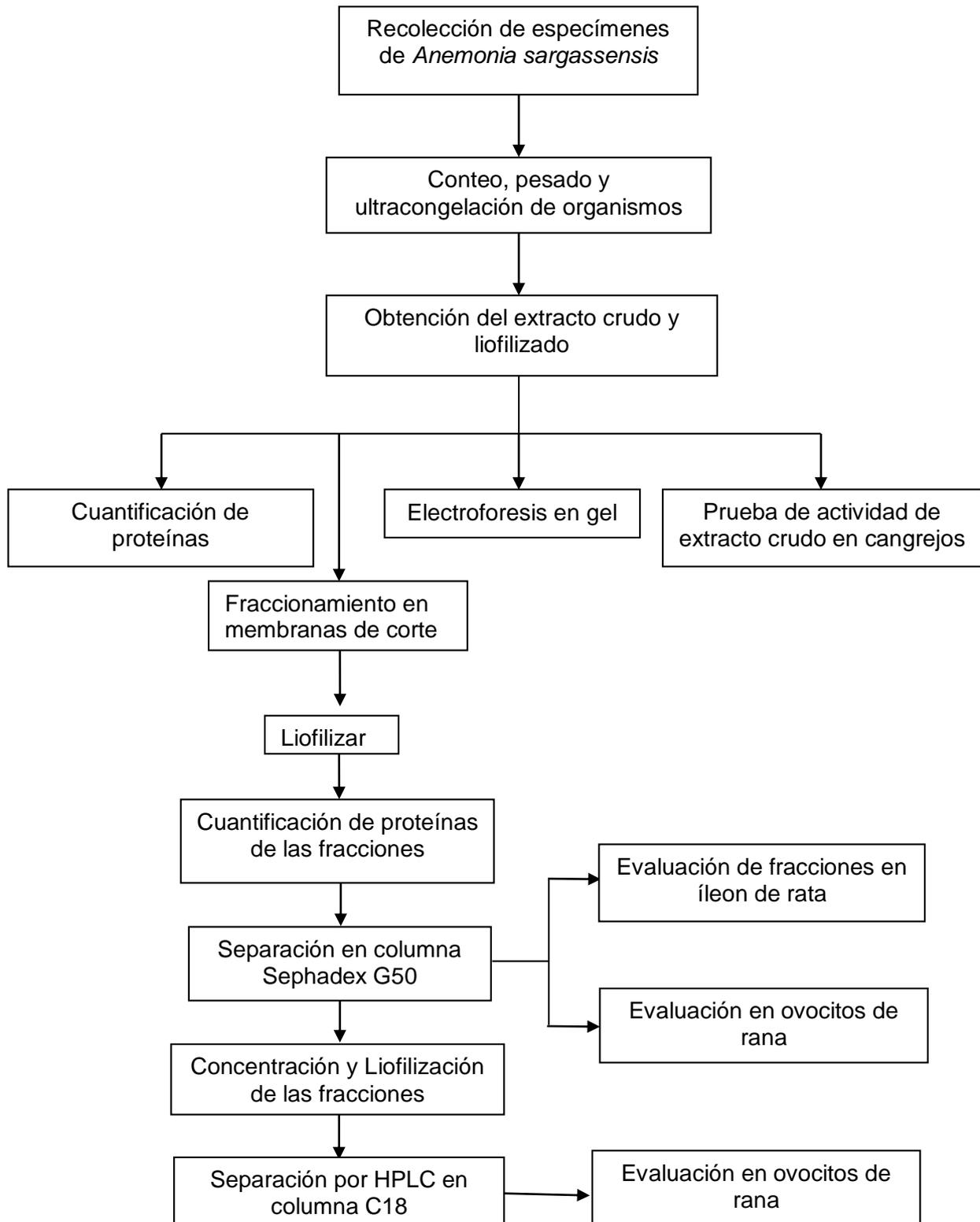
Se obtuvieron folículos de ranas de la especie *Xenopus laevis* anestesiadas por hipotermia, manteniéndolas en hielo durante 30 min y diseccionando de 2 a 3 lóbulos ováricos, que se conservaron en solución de Barth; NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2.4 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.33 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.4 mM, HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) 5 mM y gentamicina 70 µg/mL a pH 7.4 a 17.2 °C; se separan y clasifican los lóbulos ováricos mediante pinzas y observación al microscopio determinando su buen estado según la clasificación de Dumont (1972). Se mantienen por 24 h incubándolos a 18 °C en solución de Barth. Para la expresión de canales se inyectan 50 nL de ARNm y ARN total extraído de cerebro de rata (Chomczynski y Sacchi, 1987); se dejaron una vez más en solución de Barth durante 24 h a 17.2 °C. Se hace un

tratamiento con colagenasa a una concentración de 0.5 mg/mL por un tiempo de 30 min, con el fin de remover las capas externas del folículo (epitelio superficial, teca, membrana basal y monocapa de células foliculares), y obtener el ovocito desnudo. Finalmente se dejan reposar durante 2 días para una buena expresión de los canales.

### **Técnica de control de voltaje**

Las respuestas eléctricas de los ovocitos se registran utilizando la técnica de control del voltaje mediante el uso de dos electrodos. Lo que se hace con esta técnica es mantener un voltaje determinado en la célula en estudio (-60 mV), de tal manera que sea posible medir la corriente transmembranal que fluye a este potencial cuando se suministran las toxinas a los ovocitos. -60 mV es un potencial alejado del potencial de equilibrio de las corrientes de sodio, potasio, calcio y cloro, lo que nos permite distinguir mejor las corrientes (Kusano *et al.*, 1982).

## Diseño experimental



## **Resultados y discusión**

### **Recolecta de organismos**

Se realizaron 10 colectas para obtener un total de 1 439 ejemplares de *Anemonia sargassensis*, con un peso húmedo total de 260.83 g. Cabe resaltar que los organismos parecen estacionales ya que su aparición y colecta fue posible solo en los meses de marzo a junio.

De las primeras 7 colectas correspondientes a 223.32 g de peso húmedo se obtuvieron 6.71 g de extracto crudo liofilizado. Para el fraccionamiento se utilizaron 5.5 g dejando de este modo 1.21 g de extracto crudo para estudios posteriores.

De las 3 últimas colectas se obtuvieron 219 anémonas con un peso húmedo de 37.50 g y un liofilizado de 1.68 g que se fraccionó en su totalidad.

En la Tabla 1 en la sección de liofilización se muestran los rendimientos obtenidos de las colectas.

### **Preparación del extracto crudo**

Se utilizó el método modificado de Kem y colaboradores (1989) que consistió en realizar ciclos de congelado y descongelado de las anémonas. Con la finalidad de obtener la mayor cantidad de las toxinas contenidas en los organismos, se observaron al microscopio óptico alícuotas del extracto crudo; dado que pocos nematocistos se observaron descargados, se continuó con la maceración de los organismos, utilizando un homogeneizador de tejidos manual de 15 mL marca PYREX®. Se maceraron las muestras hasta lograr una descarga de por lo menos el 70% de los nematocistos.

## Liofilización y fraccionamiento

Inmediatamente después de la maceración se procedió a centrifugar el extracto crudo, con la finalidad de separar el sobrenadante del precipitado. El sobrenadante se colocó en tubos Falcon de 50 mL, para después congelar y llevar a sequedad por liofilización, obteniéndose un total de 8.39 g.

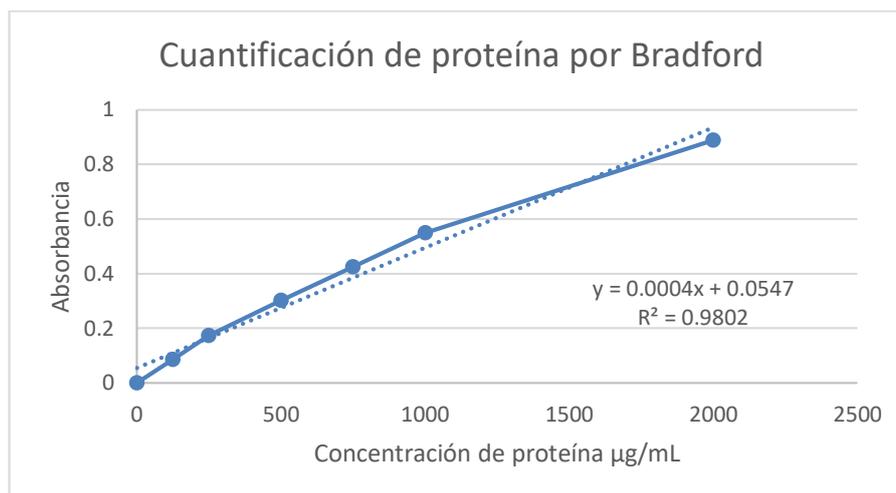
7.18 g de extracto crudo fueron separados mediante ultrafiltración usando membranas de corte de 10 y 1 kDa; la fracción intermedia fue sometida a cromatografía de exclusión en una columna de Sephadex G50 M y se obtuvieron 2 fracciones ASI y ASII.

|                                |   |                  | <b>Cantidad</b>          | <b>Rendimiento</b> |
|--------------------------------|---|------------------|--------------------------|--------------------|
| <i>Anémonas primeras</i>       | 7 | 1 220 organismos | 223.32 g                 | 100%               |
| <i>colectas</i>                |   |                  | (peso húmedo)            |                    |
| <i>Extracto Crudo primeras</i> | 7 |                  | 6.71 g                   | 3.00%              |
| <i>colectas</i>                |   |                  | Solo se procesaron 5.5 g | 2.46%              |
| <i>Anémonas últimas</i>        | 3 | 219 organismos   |                          | 100%               |
| <i>colectas</i>                |   |                  | 37.50 g (peso húmedo)    |                    |
| <i>Extracto crudo últimas</i>  | 3 |                  | 1.68 g                   | 4.5%               |
| <i>colectas</i>                |   |                  |                          |                    |

**Tabla 1.** Rendimiento de las colectas.

## Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976), usando una microplaca, del cual se obtuvo la curva de calibración (Figura 3); la absorbancia presentada por una muestra de concentración 20 mg de extracto crudo/mL (n= 5) fue de 0.676, correspondiente a 1 553.25 µg de BSA/mL, lo que nos da una concentración de 99.80 µg de proteína/mg de extracto crudo.



**Fig. 3.** Curva de calibración obtenida usando BSA como estándar de proteína.

En la Tabla 2 se muestra la cuantificación de proteínas del extracto crudo y de las fracciones obtenidas por fraccionamiento por exclusión molecular y del extracto crudo de ambas colectas.

| <b>Fracción</b>           | <b>Cantidad (g)</b> | <b>Proteínas (µg/mg)</b> |
|---------------------------|---------------------|--------------------------|
| <i>Extracto crudo</i>     | 6.71                | 99.80                    |
| <i>ASI</i>                | 0.0526              | 319.1                    |
| <i>ASII</i>               | 0.53                | 7.56                     |
| <b>Últimas 3 colectas</b> |                     |                          |
| <i>ASI</i>                | 0.48                | 88.02                    |
| <i>ASII</i>               | 0.8018              | 5.78                     |

**Tabla 2.** Cuantificación de proteínas de Extracto crudo y las fracciones.

El ensayo de Bradford (1976), es uno de los métodos más populares para la determinación de la concentración de proteínas. El colorante azul brillante de Coomassie G-250 se une principalmente a residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina; una de las desventajas de usar BSA como estándar de proteína es que produce una fuerte tinción con el colorante, pudiéndose subestimar el contenido de proteínas.

En el ensayo de Bradford (1976), la albúmina sérica es más sensible que otras proteínas, por eso al utilizarse como estándar la concentración en la muestra es subestimada; no obstante, al no contar con otra proteína como la inmunoglobulina G o la lisozima, se continuó usando este estándar y se toma la cantidad de proteínas resultante de la cuantificación como referencia para los experimentos subsecuentes.

### Bioensayo en cangrejos

La prueba de actividad en cangrejos *Ocypode quadrata* se realizó según el método reportado por Béress y Béress (1971); se hizo por triplicado en dosis calculadas según el peso de los especímenes, de 2.58  $\mu\text{g}$  de proteína/g de peso hasta 4.41  $\mu\text{g}$  proteína/g de peso, observándose en todos los especímenes la expulsión de fluidos a los 5 s después de la inyección, pérdida de la movilidad casi inmediata, cambio rápido en la coloración, temblores, burbujeo y estiramiento repentino de las extremidades posteriores; aproximadamente 10 min después de la inyección se registra la muerte. Al realizar la disección de los organismos se observa en el interior de los cangrejos los órganos degradados (Figura 4).



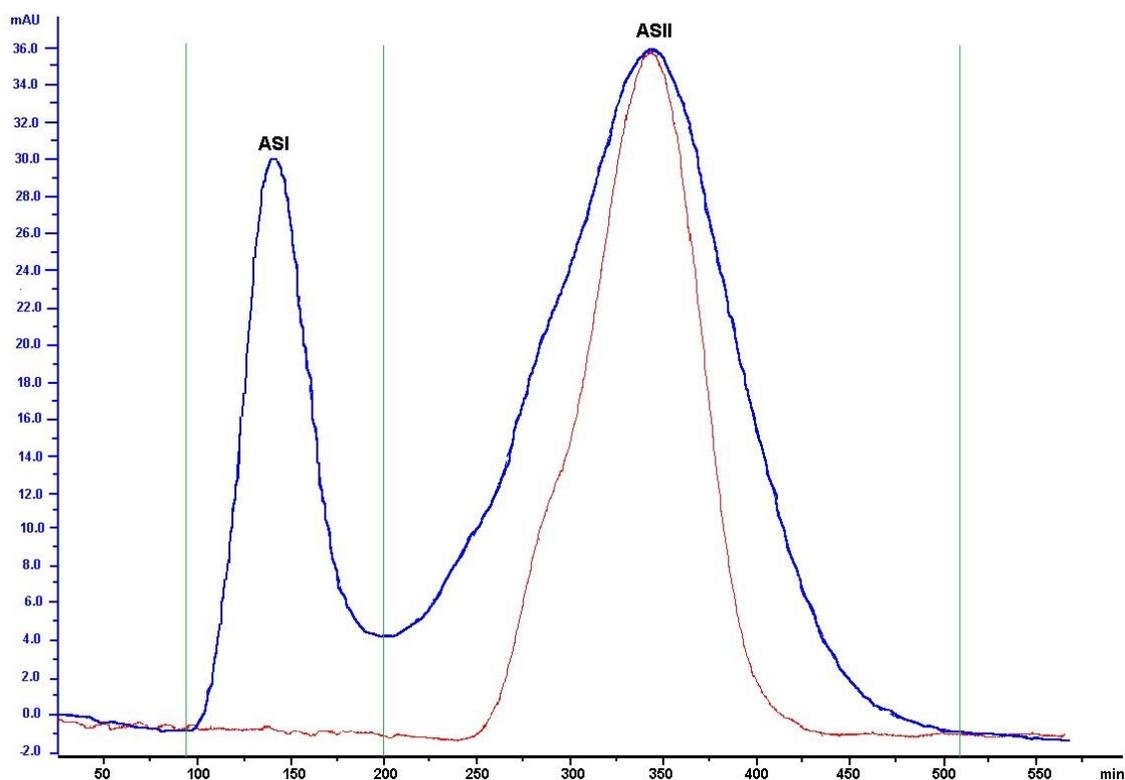
**Fig. 4.** Efectos del extracto crudo en cangrejos. Se observa el interior de los cangrejos con los órganos degradados.

En crustáceos, el sistema nervioso es primitivo y el cerebro se puede considerar un ganglio central en la que se encuentran neuronas de forma y función única (Sandeman *et al.*, 1982). A pesar de lo primitivo de su sistema se sabe que también cuentan con sistema neuromuscular que puede ser afectado por diversas toxinas de predadores como lo es *Anemonia sargassensis*.

Las pruebas realizadas en cangrejos fantasma solo fueron hechas con el extracto crudo debido al bajo rendimiento, por lo que no se evaluó la actividad de las fracciones para determinar si la letalidad continúa observándose después de la purificación y fraccionamiento de la misma.

### Cromatografía en Sephadex G-50 M

Se realizó la separación de la fracción obtenida después de utilizar las membranas de corte correspondiente a compuestos entre 1 y 10 kDa; el dextrano reticulado es un gel en el cual pueden separarse proteínas globulares con un rango de  $1 \times 10^3$  a  $3 \times 10^4$  Daltons, obteniéndose el siguiente cromatograma.



**Fig. 5.** Cromatograma de exclusión molecular (Sephadex G50 M), donde se muestran las fracciones obtenidas; las líneas verdes indican los tiempos a los que fueron colectados las señales; la línea roja indica la conductividad.

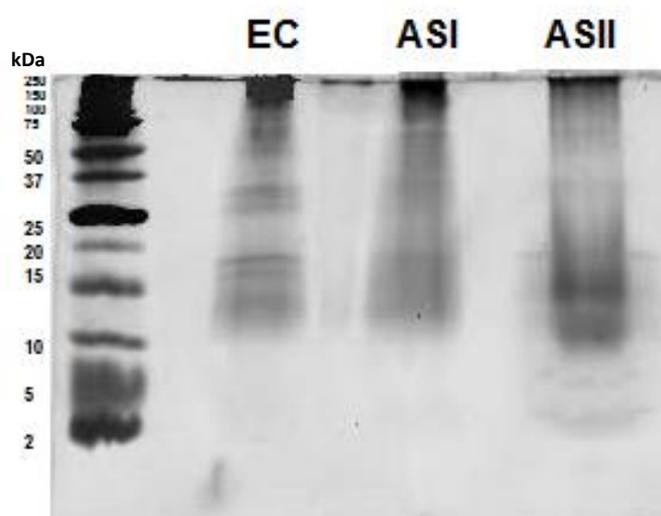
Se utilizó un flujo de 2.5 mL/min y la detección se realizó a 280 nm que es la absorbancia a la que se detectan los aminoácidos con anillos aromáticos presentes en las fracciones. Analizando el cromatograma se cree que el primer pico, correspondiente a la fracción ASI, no fue totalmente retenido por el Sephadex G-50 dado que las moléculas más grandes, es decir fuera del rango de separación de la fase estacionaria, son eluidas dentro o justo después del volumen muerto correspondiente al 30% del volumen total de la columna. Teniendo en cuenta que la columna tiene un volumen igual a 834.5 mL (el 30% corresponde a 250.35 mL= 100 minutos), la aparición de esta señal pasados los 100 minutos nos indica la poca o nula interacción de los compuestos -presentes en la fracción ASI con la fase estacionaria. En la fase móvil inmediata al volumen muerto se encuentran moléculas de tamaño intermedio, que acceden completamente a los poros de la fase estacionaria; tomando eso en cuenta tenemos el pico correspondiente a ASII, que se observa a los 200 minutos; las moléculas más pequeñas como las sales usualmente eluyen después de un volumen total de columna – correspondiente en este caso a 835.5 mL= 333 minutos- y son detectadas por un cambio en la conductividad; en nuestro caso además de que ya se había usado una membrana de 1 kDa para evitar la presencia de sales, se observa un cambio en la conductividad pero dentro del volumen total; una posible explicación que se da es que estas proteínas pueden tener una carga que provoca el cambio en la conductividad (General Electric, 2014). Tampoco se descarta la idea de que el corte pudo haber sido poco eficiente ya que, por el origen de las muestras, es difícil desalinizar totalmente. En la Tabla 3 se muestran los rendimientos obtenidos después de esta separación con respecto al extracto crudo fraccionado.

|   | <b>Cantidad</b> | <b>Rendimiento</b>   |
|---|-----------------|----------------------|
| <i>Extracto Crudo primeras 7 colectas</i> | 6.71 g          | 3%                   |
| <i>Extracto procesado</i>                 | 5.5 g           | 2.46%                |
| <i>Fracción ASI</i>                       | 0.0526 g        | 0.023%               |
| <i>Fracción ASII</i>                      | 0.53 g          | 0.23%                |
| <i>Extracto Crudo últimas 3 colectas</i>  | 1.68 g          | 4.5% se procesó todo |
| <i>Fracción ASI</i>                       | 0.4883 g        | 1.30%                |
| <i>Fracción ASII</i>                      | 0.8018 g        | 2.13%                |

**Tabla 3.** Rendimientos obtenidos del fraccionamiento del extracto crudo mediante gel permeable sephadex G50 M.

## Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE

Se realizaron geles de electroforesis al 16% de acrilamida, en el que se evaluaron el extracto crudo y las fracciones ASI Y ASII a concentraciones de 20 µg de proteína por pozo (según método de Bradford (1976) con BSA como estándar); para revelar el gel se utilizó tinción de plata. El gel obtenido se muestra en la Figura 6.

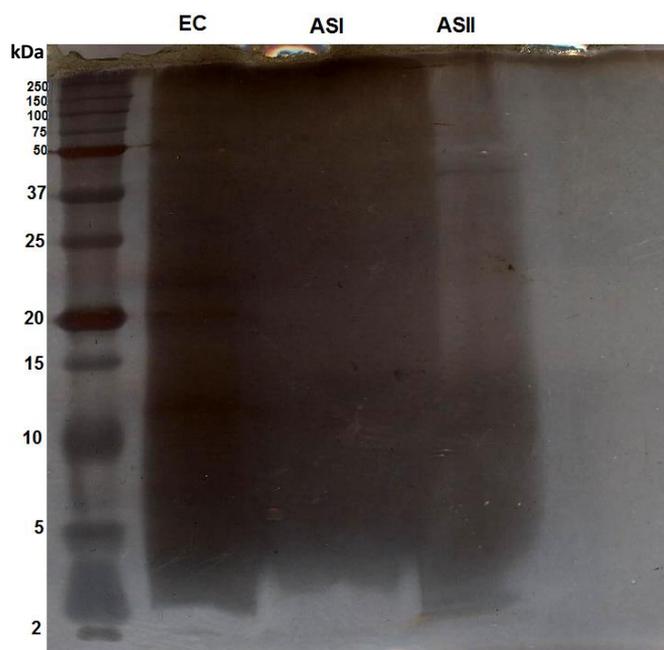


**Fig. 6.** Gel de acrilamida al 16%. Primera columna Marcador Dual; EC) Extracto crudo; ASI) Fracción ASI; ASII) Fracción ASII.

El marcador Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards ofrece una mezcla de 12 proteínas recombinantes con pesos que van desde 2 kDa hasta 250 kDa. En la Figura 6, en el extracto crudo, se observan líneas correspondientes a 10, 20, por debajo de 37, 50 100 y 150 kDa, lo cual tiene lógica porque es un extracto que no ha sido fraccionado de ninguna manera. En la fracción ASI se observan líneas en 15, 20, 37 y 75 kDa, mientras que en la fracción ASII se observan líneas poco marcadas de pesos de 2, 5, 10 y 15 kDa, lo que se corresponde al ser la última fracción recolectada de la cromatografía de exclusión.

Después de realizar los ensayos biológicos y una diálisis extra a todas las fracciones, la actividad biológica de todas (dializadas y no dializadas), se perdió, a pesar del cuidado y la mínima manipulación.

Se realizó una vez más la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976), y se obtuvo una disminución en la concentración de proteína; con estas fracciones se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 16% (Figura 7). El gel se dejó más tiempo de exposición al tinte de plata ya que a pesar de que la cuantificación de proteínas ya era mínima se esperaba que las líneas aun aparecieran, pero solo se alcanzan a observar algunas levemente marcadas en el extracto crudo, en pesos entre 10 y 25 kDa; en las fracciones logran observar líneas en ASII entre 50 y 37 kDa, y líneas muy tenues entre 10 y 8 kDa.

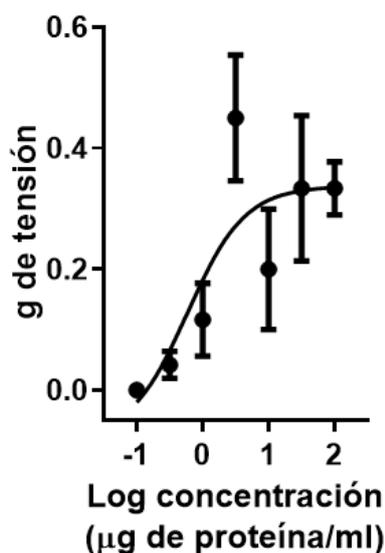


**Fig. 7.** Gel de acrilamida 16 %, después de ensayos biológicos, tinción de plata, primera columna marcador Dual, EC) Extracto crudo; ASI) Fracción I; ASII) Fracción II.

### Ensayo de íleon de rata

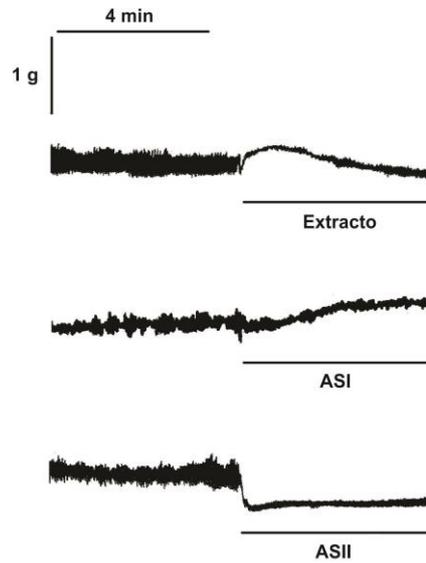
En el ensayo de íleon de rata se realizó la curva dosis-respuesta con el extracto crudo con una  $n=3$  (Figura 8), graficando el logaritmo de la concentración de proteínas contra la respuesta registrada, donde se observó un efecto contráctil en los segmentos de íleon. Se obtiene una  $EC_{50}$  de  $0.5957 \mu\text{g}$  de proteína/mL y se llega a un  $E_{\text{max}}= 0.3166 \text{ g}$ ; es decir a una concentración de  $31.6 \mu\text{g}$  de proteína/mL. Se observa un punto máximo a la concentración correspondiente a  $3.16 \mu\text{g}$  de proteína/mL lo anterior puede ser debido a que al tratarse de un extracto que contiene muchos compuestos, es esta la

concentración a la que los compuestos que producen contracción maximizan su efecto, posiblemente porque se encuentren en mayor concentración que aquellos que producen relajación o que puede presentarse una competencia por el sitio de unión.

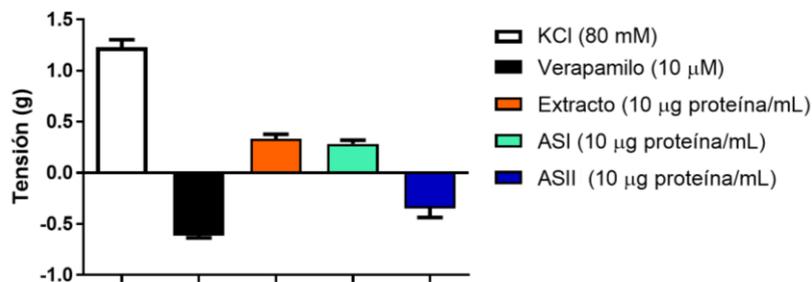


**Fig. 8.** Curva dosis-respuesta del extracto crudo de *Anemonia sargassensis*, en íleon aislado de rata.

Las fracciones obtenidas fueron evaluadas como el extracto crudo, a concentraciones iguales de 10 µg de proteína/mL (n=3); se observaron contracción y relajación respectivamente: la fracción ASI produjo un 86.3% de la contracción observada con el extracto crudo y un 23.09% de la contracción efectuada por el control. Para la fracción ASII se observa un 57.14% de la relajación efectuada por el control. Como controles de contracción y relajación fueron usados cloruro de potasio (KCl) a una concentración 80 mM y Verapamilo a una concentración 10 µM, respectivamente (Figura 10). Los efectos observados por las fracciones y el extracto completo se muestran de manera esquemática en la Figura 9.



**Fig. 9.** Registros representativos del extracto y las fracciones evaluados en íleon de rata calibrado a 1 gramo de tensión.



**Fig. 10.** Representación gráfica de las evaluaciones sobre íleon de rata del extracto crudo y las fracciones ASI y ASII contra los controles de KCl y Verapamilo.

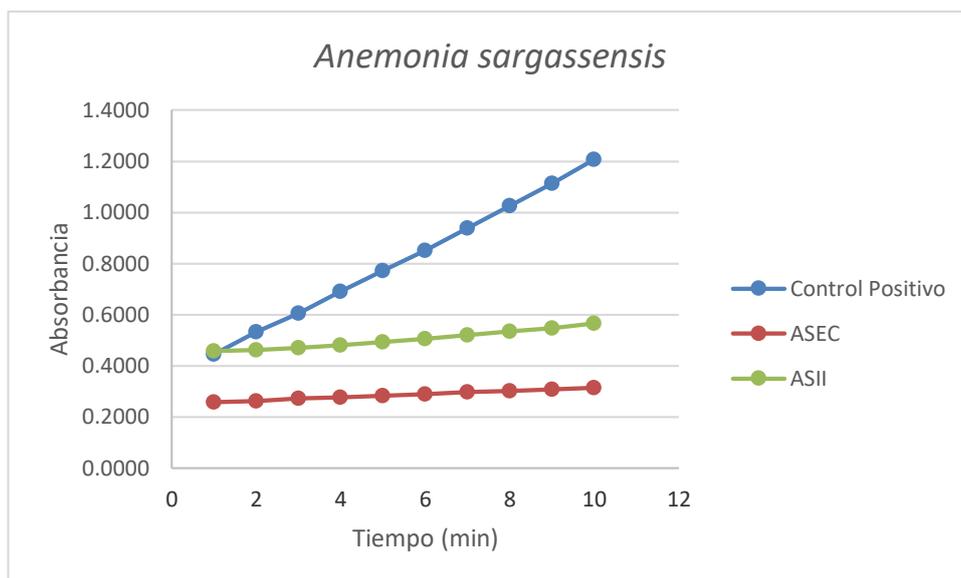
Es remarcable el hecho de que con un solo paso de cromatografía se puedan separar las acciones del extracto crudo a manera de mostrar efectos contrarios en el íleon aislado de rata; no obstante estamos conscientes de que existe una gran cantidad de compuestos presentes en cada una de las fracciones, como pudimos observar, y sabemos que predomina la acción de los compuestos que contraen en el extracto crudo, sobre aquellos que producen una relajación, ya que esta última es evidente hasta después del fraccionamiento del extracto crudo.

Con la explicación dada en la sección de Sistema Nervioso Entérico de los antecedentes y los efectos observados de la evaluación del extracto crudo y de las fracciones obtenidas se pueden suponer algunas acciones. Comenzando por el extracto crudo,

sabemos que en éste se encuentran muchos compuestos activos que pueden estar estimulando diversos mecanismos de acción; no obstante se observa una respuesta en el aumento en la contracción del intestino y del movimiento peristáltico, parecida a la observada en otros experimentos por la acetilcolina; el mismo efecto puede ser atribuido a los compuestos contenidos en la fracción ASI, dado que después del fraccionamiento con membranas de corte y cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50 M, esta fracción continúa generando el 23.09% del efecto en el íleon Siguiendo los antecedentes de toxinas que se encuentran en el género *Anemonia* la acción puede deberse a la unión de la toxina al sitio 3 de los canales de sodio, que enlentece el proceso de inactivación de los canales de sodio, que despolariza la membrana de las neuronas que se encuentran en el plexo submucoso y el plexo mientérico, provocando la entrada de calcio a la neurona y la fusión de membranas para finalmente causar la liberación de acetilcolina hacia el espacio extracelular que en este caso corresponde a la capa muscular circular y a la mucosa. En la fracción ASII se observa un efecto totalmente contrario al generado por la fracción ASI y por el extracto completo; creemos que esta fracción puede estar actuando también por unión a canales de sodio, pero en lugar de mantener el proceso de inactivación, los bloquea; puede actuar de igual manera bloqueando canales de calcio tipo L ubicados en el músculo liso, impidiendo la contracción del mismo o puede tener una función enzimática como la colinesterasa. Tampoco se descarta el hecho de que pueda estar actuando sobre receptores muscarínicos de las células musculares del intestino.

### **Actividad fosfolipasa A2**

Para la medición de la actividad fosfolipasa se utilizaron 10 µg de proteína por pozo y por triplicado del extracto completo EC y de la fracción ASII, y se compararon contra el estándar de veneno de abeja. Se utilizó solo esta fracción debido a que en teoría contiene moléculas con un tamaño menor a 10 kDa -como quedó demostrado en el gel de poliacrilamida- y no debería presentar actividad fosfolipasa A2; esta fracción es de especial interés en este estudio. La actividad se siguió durante 10 minutos, leyendo a una  $\lambda$  414 nm. El control de veneno de abeja tuvo una hidrólisis del 1,2-ditio heptanoil-tiofosfatidilcolina de 17.85 µM/min/mL (100% de hidrólisis en las condiciones de análisis), para el extracto completo (EC) una hidrólisis de 0.13 µM/min/mL (0.72%) y para la fracción ASII una hidrólisis de 0.25 µM/min/mL (1.4%). Las rectas se encuentran en la Figura 11.



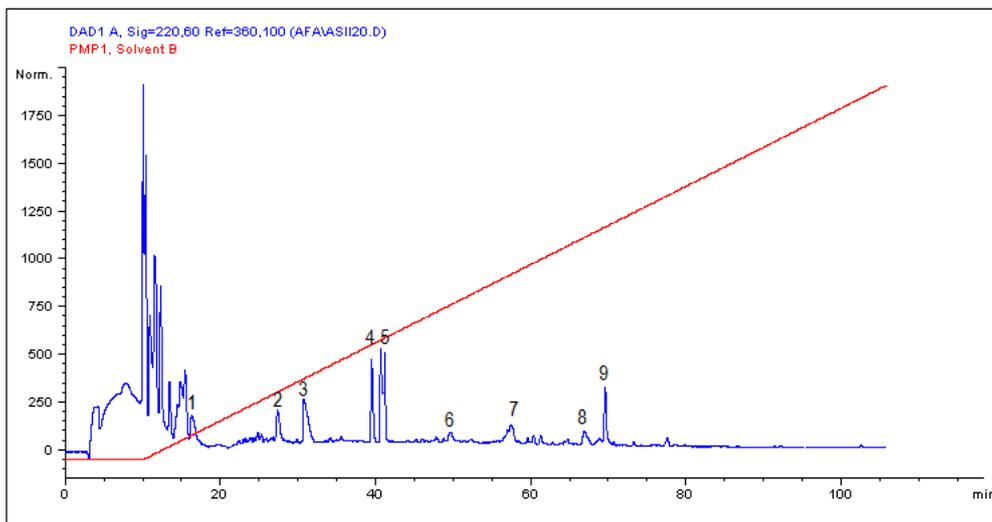
**Fig.11.** Actividad fosfolipasa monitoreada durante 10 min.

Se cree que la actividad fosfolipasa presentada por la fracción de interés es causada por compuestos de un tamaño mayor a 10 kDa, ya que el fraccionamiento por membranas de corte no es un método de purificación totalmente confiable; incluso es conocido como método de pre-purificación que, si bien no fracciona completamente, nos ofrece un extracto más limpio para posteriores usos.

En el gel de poliacrilamida se observan líneas mayores a 10 kDa, que prueban lo aquí discutido; además como se planteó en los antecedentes en la sección de toxinas de anémonas, las fosfolipasas son siempre de tamaños mayores a 10 kDa.

### **Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAR)**

La fracción ASII fue sometida a separación por cromatografía de alta eficiencia, por inyección de prueba se determinó que las mejores condiciones de separación eran comenzar con un 100% de solución A= agua + 0.1% de TFA hasta llegar a un máximo de 50% de solución B= acetonitrilo + 0.1% de TFA, en una columna C18(2) Phenomenex® Luna tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ , diámetro del poro 100Å, con flujo de 1 mL/min con un tiempo de análisis de 144 min; el volumen de muestra fue de 500  $\mu\text{L}$  con un contenido aproximado de  $\approx 50 \mu\text{g}$  proteína por inyección se efectuaron 22 inyecciones, igual a 1,121.35 $\mu\text{g}$  de proteína total; la detección de las señales se efectuó a absorbancias de 210, 220 y 280 nm, obteniéndose el cromatograma de la Figura 12.



**Fig. 12.** Cromatograma de ASII; la línea roja muestra el gradiente de elución del solvente B en A con respecto al tiempo; la señal azul es registrada a 220 nm.

Las condiciones cromatográficas se presentan en la Tabla 4; se usó un flujo constante de 1 mL/min

| TIEMPO (min) | %A  | %B  |
|--------------|-----|-----|
| 10           | 100 | 0   |
| 110          | 0   | 55  |
| 2            | 0   | 100 |
| 5            | 0   | 100 |
| 2            | 100 | 0   |
| 15           | 100 | 0   |
| 144 min      |     |     |

**Tabla 4.** Condiciones de corrida: tiempos y gradiente de la fracción ASII.

En el cromatograma y con las condiciones antes descritas, se observa que en los primeros minutos hay poca resolución entre las señales; las primeras señales, que corresponden a compuestos altamente polares, fueron colectadas e identificadas como la parte no retenida de los compuestos presentes en la fracción ASII; las señales que se repitieron en cada inyección fueron llevadas a sequedad por medio de un equipo “Speed Vac” y concentrados en un solo recipiente; para evitar el gasto del material seco en una cuantificación, se realizó un cálculo teórico de las proteínas contenidas en cada señal colectada, obteniéndose los resultados de la Tabla 5.

| Tiempo de retención (min) | %B   | Señal | µg de Proteína |
|---------------------------|------|-------|----------------|
| 16.23                     | 3.1  | 1     | 37.77          |
| 27.31                     | 8.6  | 2     | 61.96          |
| 30.71                     | 10.3 | 3     | 151.06         |
| 39.44                     | 14.7 | 4     | 128.04         |
| 40.61                     | 15.3 | 5     | 276.80         |
| 49.58                     | 19.7 | 6     | 22.96          |
| 56.99                     | 23   | 7     | 92.52          |
| 68.8                      | 29.4 | 8     | 31.21          |
| 69.53                     | 30   | 9     | 110.21         |

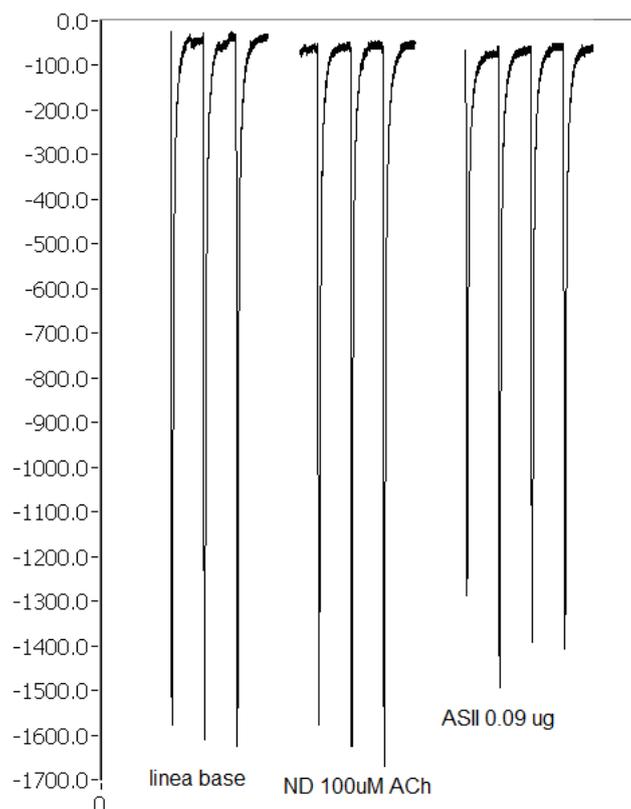
**Tabla 5.** Cuantificación teórica de proteínas de la fracción ASII.

Las señales más pequeñas o que no aparecían en cada inyección también fueron colectadas y llevadas a sequedad y son identificadas como “pools” presentes entre los análisis.

### **Ovocitos de rana**

Se analizaron el extracto crudo y las 2 fracciones del veneno obtenido de *Anemonia sargassensis* en ovocitos nativos de rana *Xenopus laevis*, ya que se sabe que hay expresión de canales nativos.

En una sola evaluación efectuada, sobre un ovocito manipulado e incubado por 9 días para la expresión de canales nicotínicos, se encontró que la fracción ASII puede afectar los canales nicotínicos  $\alpha 3\beta 2$  provocando una inactivación del 20% que es reversible. El registro obtenido se muestra en la Figura 13, el ovocito se dejó incubar con 3 µL de la fracción ASII a una concentración de 30 µg proteína/mL, es decir 0.09 µg de proteína.

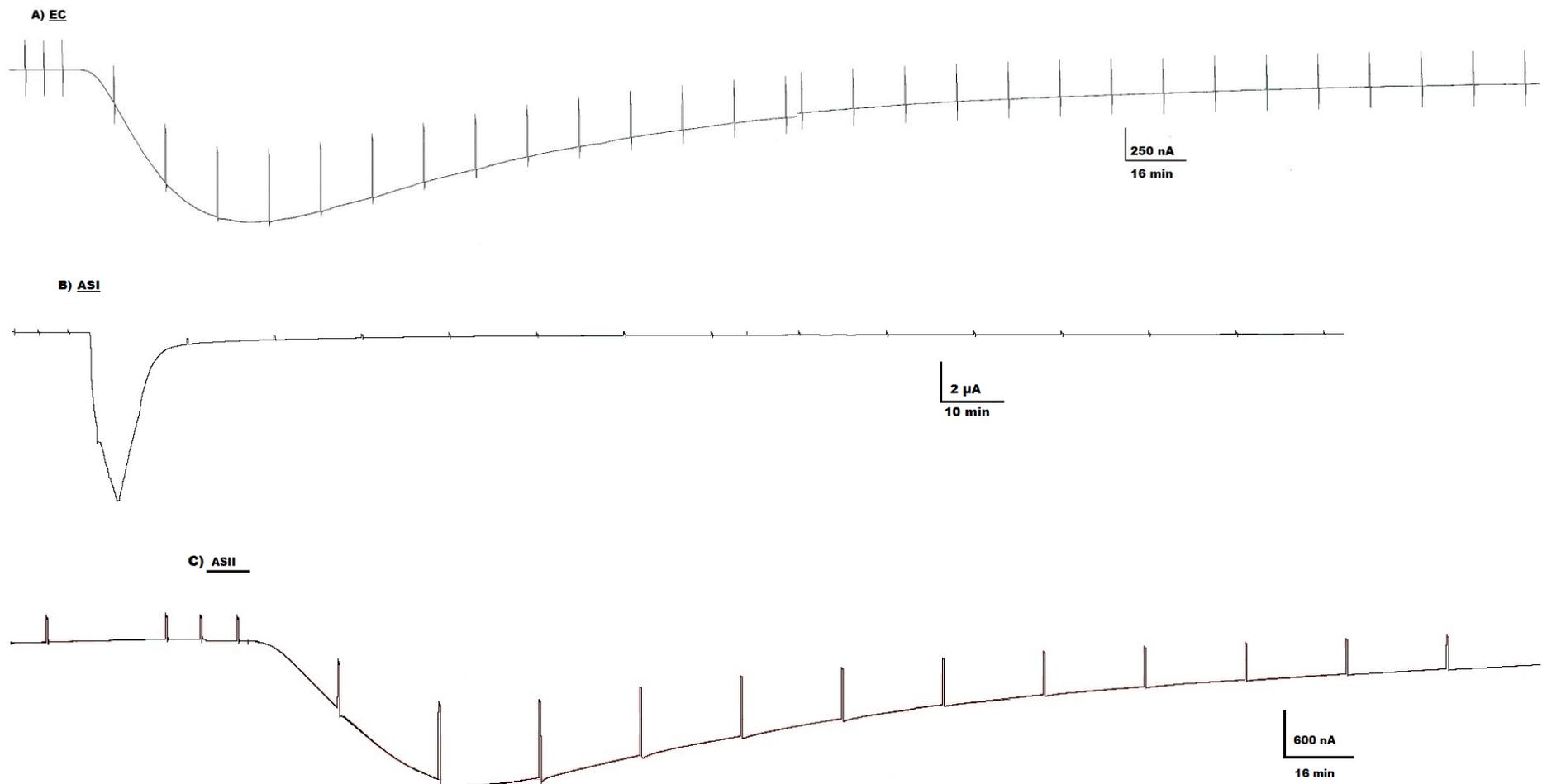


**Fig.13.** Registro obtenido de la fracción ASII sobre canales nicotínicos

Después de la incubación y efectuando enjuagues cada minuto y pulsos de -70 mV, se puede observar la recuperación casi completa de los canales.

En ovocitos de rana nativos, se hicieron pruebas con el extracto crudo (EC) y las fracciones (ASI y ASII) obteniéndose resultados de un total de 46 ovocitos, obtenidos de 9 ranas diferentes con potencial de reposo  $-32 \pm 19$  mV (media  $\pm$  S.E.).

El extracto completo de *Anemonia sargassensis* (EC) generó una respuesta entrante asociada con el incremento de conductancia en la membrana a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 10 s con recuperación casi total del ovocito como puede observarse en la Figura 14A; si la dosis se aumentaba a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 10 s el ovocito moría. Las fracciones ASI y ASII también fueron probadas obteniéndose las respuestas también entrantes de la Figura 14B y 14C, a dosis de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 10 s, y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 20 s, respectivamente; estas dosis también fueron decididas respecto a la intensidad que se observaba después de la aplicación. Estas corrientes siempre estuvieron presentes; las intensidades medidas fueron; para EC  $264 \pm 77$  nA en  $n=6$  ovocitos, para ASI  $1.96 \pm 0.35$   $\mu\text{A}$  en  $n=5$  ovocitos y para ASII  $615 \pm 65$  nA en  $n=10$ .

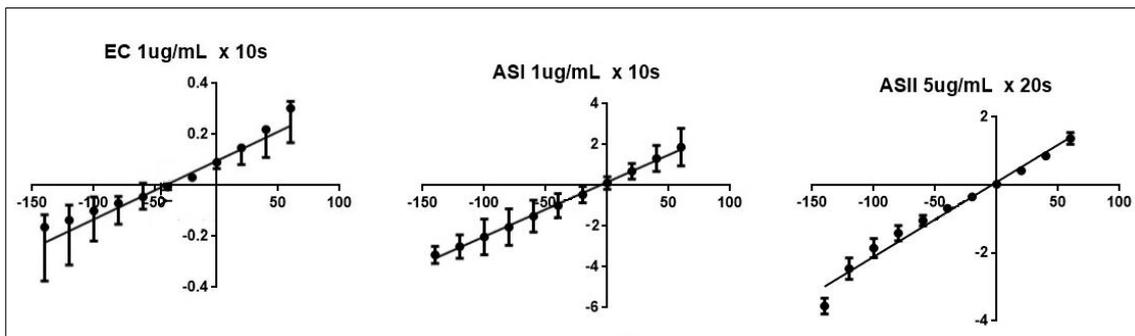


**Fig. 14.** Se observan los efectos del **A)** extracto crudo (EC) por 16 min; **B)** fracción ASI por 10 min y **C)** fracción ASII por 16 min.

El efecto máximo después de la aplicación del EC se observa casi de inmediato y la mayoría de los ovocitos no recuperaban su potencial inicial de membrana. Esto no es extraño ya que el extracto crudo no fue purificado de ninguna manera y es muy probable que, aunque en una concentración mínima, contenga fosfolipasas, como la mayoría de los venenos. El efecto de la fracción ASI observado en la Figura 14B era inmediato a la aplicación y se enjuaga rápidamente lo cual nos demuestra que se trata de compuestos muy polares, con poca afinidad por las membranas lipídicas; como ya se ha discutido antes estos compuestos corresponden a la parte no retenida en la separación por Sephadex G-50 M. El efecto máximo que se observa tras la aplicación de la fracción ASII durante 20 s es observable 2 min después de la aplicación; es decir es de acción lenta y como se aprecia en la Figura 14C tarda mucho en enjuagarse, lo cual nos habla de un compuesto poco polar y con alta afinidad al sustrato que se esté uniendo; en este caso se debe aclarar que la recuperación de los ovocitos al potencial inicial nunca sucedió. Como los ovocitos en la fracción ASII, no tenían una recuperación completa (Fig. 14C) y tomando como base la poca actividad fosfolipasa mostrada para asegurar que el efecto es debido a las proteínas contenidas en las fracciones y no a sales, las fracciones se sometieron a un proceso de diálisis en una membrana Spectrum™ tubos de membrana Spectra/Por™ la cual retiene moléculas de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  Daltons. Después de este paso se perdió la actividad de todos los extractos y fracciones, lo cual se puede corroborar con el gel de la Figura 7.

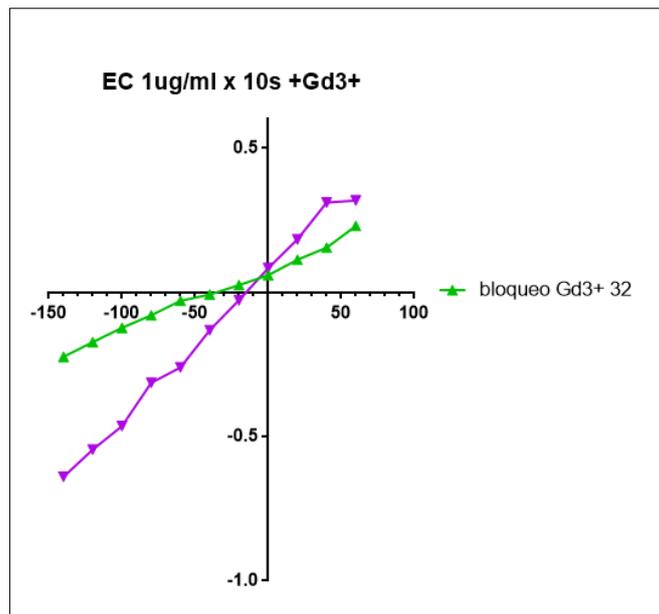
Debido a la cantidad tan pequeña de las fracciones obtenidas por HPLC, estas fracciones no fueron probadas en los ovocitos de rana.

Para la obtención de las curvas intensidad-voltaje fue aplicado un protocolo de pulsos con una duración de 4.5 s de 11 pulsos con un rango de -120 a +60 mV, con incrementos de +20 mV. Dicho protocolo fue aplicado a un mismo ovocito en solución Ringer normal (en reposo) y en el pico máximo de la aplicación del extracto crudo y las fracciones ASI y ASII, los ovocitos fueron mantenidos a -60 mV; este potencial se encuentra alejado de los potenciales de equilibrio para  $K^+$  (-100 mV),  $Na^+$  (+50 mV),  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$  (-30 mV) en estas células (Kusano *et al.*, 1982). Las curvas Intensidad contra voltaje obtenidas de una  $n=3$  para el extracto completo y cada una de las fracciones se muestran en la Figura 15; para cada pulso de voltaje, la corriente de membrana en reposo fue restada a la generada durante el pico de la corriente experimental y los valores obtenidos fueron graficados.



**Fig. 15.** Se observan los efectos de derecha a izquierda con una n=3, de **EC)** Extracto crudo con un potencial de inversión promedio de 11.06 mV, **ASI)** fracción 1 de extracto con un potencial de inversión muy cercano a 0 mV, **ASII)** fracción 2 del extracto con un potencial de inversión muy cercano a 0 mV.

En un principio se probó la competencia de extracto completo contra gadolinio y se obtuvo la gráfica mostrada en la Figura 16; se sabe que el gadolinio en su forma elemental tiene la capacidad de unirse a los canales de calcio (McDonald *et al.*, 2015) y aunque si bien se observa una pérdida del efecto del extracto completo, el efecto no se pierde totalmente; esto refuerza nuestra idea de que está habiendo más de un canal estimulado con el extracto completo.



**Fig. 16.** Bloqueo de gadolinio sobre extracto crudo, en el mismo ovocito.

El potencial de inversión  $E_{inv}$  de una corriente es un parámetro que depende del tipo y la concentración (intracelular y extracelular) de los iones que acarrean dicha corriente. En un canal selectivo a un solo tipo de ion, el  $E_{inv}$  es igual al potencial de equilibrio ( $E_{eq}$ ) descrito por la ecuación de Nerst:

$$E_{eq} = \frac{RT}{zF} \text{Log} \frac{[X]_e}{[X]_i}$$

Donde R es la constante de los gases ( $8.318 \text{ VC K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ), T es la temperatura en grados Kelvin, z es la carga del ion, F es la constante de Faraday ( $9.648 \times 10^4 \text{ Cmol}^{-1}$ ) y  $[X]_e$  y  $[X]_i$  es la concentración del ion "X" extra e intracelular, respectivamente.

Los  $E_{inv}$  para corrientes que fluyen a través de canales que son permeables a más de un tipo de ion, por ejemplo el canal nicotínico, pueden ser predichos por ecuaciones, como la del "campo constante" de Goldman-Hodgkin-Katz, que toma en cuenta además de las concentraciones de los iones las permeabilidades para cada uno de ellos a través del canal (Hille, 1984); así, el  $E_{inv}$  para un canal permeable de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  está dado por la ecuación:

$$E_{inv} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_K[K^+]_e + P_{Na}[Na^+]_e}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i}$$

Donde  $P_K$  y  $P_{Na}$  corresponden a las permeabilidades de cada ión a través del canal. En varias condiciones experimentales la ecuación anterior es de mayor utilidad al expresarla en términos de la tasa de permeabilidades, la cual nos dice qué tan permeable es un ion con respecto a otro; en el caso de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  esta tasa está descrita por la siguiente ecuación para la sustitución total de  $\text{Na}^+$ .

$$\frac{P_K}{P_{Na}} = \frac{[Na^+]_e}{[K^+]_e} \exp\left(\Delta E_{inv} \frac{F}{RT}\right)$$

En donde  $\Delta E_{inv}$  es el cambio de potencial de inversión producido por la sustitución de  $\text{Na}^+$  por  $\text{K}^+$  en el medio (Hille, 1984).

En experimentos previos sobre toxinas de cnidarios probadas sobre ovocitos de rana se han sustituido los iones en la solución de Ringer para poder deducir, a través de las ecuaciones anteriores, sobre qué canales están actuando; ya que las respuestas que se están observando en este trabajo no son específicas, se puede deducir que es debido a que las fracciones aún no están puras; no obstante cada fracción ofrece una respuesta muy distinta, cuando se trató de continuar con los experimentos nos percatamos que los extractos habían perdido actividad y por lo mismo estas pruebas ya no se pudieron concretar.

## Conclusiones

El rendimiento de extracto crudo obtenido de la anémona *Anemonia sargassensis* es de 3.00 % y 4.5%, en la primera y la segunda colecta, respectivamente, lo que corresponde a lo esperado para cnidarios por su alto contenido de humedad.

La concentración de proteínas en los extractos es de 99.80 mg/g y 88.02 mg/g en la primera y la segunda colecta.

El extracto crudo tuvo efecto neurotóxico en los cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, lo que nos comprueba el efecto en canales de sodio, cuyo bloqueo produce parálisis que puede conducir a la muerte.

En la fracción ASII se observa el efecto contrario al observado en el extracto crudo y en la fracción ASII, relajación del íleon; eso puede deberse a la presencia de neurotoxinas y citolisinas, respectivamente, que producen cambios en la conductividad de la membrana.

En los experimentos realizados en ovocitos de rana se tienen resultados poco concluyentes; debido a que se trata de una mezcla compleja, se sugiere continuar con la purificación y caracterización de las fracciones activas.

Cabe resaltar la evidente presencia en la fracción ASII de un compuesto de unión irreversible a los ovocitos, o con alta afinidad por las membranas de los mismos, que evita la recuperación completa de los ovocitos; por el tamaño de las moléculas contenidas en la fracción y el tiempo que el ovocito conservó su integridad se puede descartar una fosfolipasa.

En conclusión, la anémona *Anemonia sargassensis* nos ofrece una fuente de compuestos con alto potencial farmacológico que deben ser estudiados en investigaciones futuras, en especial la fracción ASII que contiene compuestos con menor polaridad.

## Referencias bibliográficas

AIDA (Interamerican Association for Environmental Defense). (2015). La Protección de los Arrecifes de Coral en México. Rescatando La Biodiversidad Marina y sus Beneficios Para la Humanidad. pp. 1-32.

Anderluh G. y Macěk P. (2002). Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria). *Toxicon* 40: 111-124.

Aneiros A., García I., Martínez J., Harvey A., Anderson A., Marshall D., Engstrom A., Hellman U. y Karlsson E. (1993). A potassium channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, aminoacid sequence and biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1157: 86-92.

Baslow, M. H. (1969). Marine pharmacology: A study of toxins and other biologically active substances of marine origin. Williams & Wilkins Company Huntington, N. Y., pp. 327

Baud, C. y Kado, R.T. (1984). Induction and disappearance of excitability in the oocyte of *Xenopus laevis*: a voltage-clamp study. *Journal of Physiology* 356: 275-289.

Béress, L. y Béress, R. (1971). Reinigung Zweier krabbenlähmender Toxine aus der Seeanemone *Anemonia sulcata*. *Kieler Meeresforsch* 27, 117-127.

Béress L. y Béress R. (1975). Purification of three polypeptides with neuro- and cardiotoxic activity from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Toxicon* 13: 359 – 367.

Bonamonte D., Filoni A., Verni P. y Angelini G. (2016). Dermatitis caused by coelenterates. *Aquatic Dermatology* 3: 13- 88.

Bossi E., Centinaio E., Moriondo A. y Peres A. (1998). Ca<sup>2+</sup>-dependence of the depolarization-inducible Na<sup>+</sup> current of *Xenopus* oocytes. *Journal of Cellular Physiology* 174: 154-159.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Burckhardt B.C. y Frömter E. (1992). Pathways of  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflügers Archiv* 420: 83-86.

Castañeda O. y Harvey A.L. (2009). Discovery and characterization of cnidarians peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. *Toxicon* 54:1119-1124.

Charpentier G., Béhue N., y Fournier F. (1995). Phospholipase C activates protein kinase C during induction of slow Na current in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archiv*. 429: 825-831.

Cheung W.Y. (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207: 19 – 26.

Chomczynski P. y Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156 – 159.

Mori D., Watanabe N., Kaminuma O., Murata T., Hiroi T., Ozaki H. y Hori M. (2014). IL-17A induces hypo-contraction of intestinal smooth muscle via induction of iNOS in muscularis macrophages. *Journal of Pharmacological Sciences* 125: 394-405.

Devlin J.P. (2006). Isolation and partial purification of hemolytic toxin from sea anemone, *Stoichalis helianthus*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 63: 1478-1480.

Dichter M.A. (1997). Basic mechanisms of epilepsy: targets for therapeutics intervention. *Epilepsia* 38: S2-S6.

Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of morphology* 136: 153-179.

Etcheberrigaray E., Gibson G.E. y Alkon D.L. (1994). Molecular mechanisms of memory and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 747: 245-255.

Fernández de Miguel F. R. (2003). El cerebro estudia al cerebro. Manual Moderno. Editor Luis Francisco Gil Holguín. México D.F., pp. 51.

Fernández del Álamo M.A. y Rivas G., (2007). Niveles de organización en animales. Prensas de Ciencias. México D.F., pp. 66-68.

Flórez J. (2005). Farmacología general del sistema nervioso autónomo, en: *Farmacología Humana*, Editorial Elsevier Masson pp. 217-221.

Friese U.E. (1993). Sea anemones... As a Hobby. THF Publications, Inc., New Jersey, pp. 320.

Garateix A., Vega R., Salceda E., Cebada J., Aneiros A. y Soto E. (2000). BgK anemone toxin inhibits outward K currents in snail neurons. *Brain Research* 864: 312-314.

García-Arredondo J.A., Rodríguez-Rios L., Díaz-Peña L.F. y Vega-Angeles R. (2015). Pharmacological characterization of venoms for three theraphosid spiders: *Poecilotheria regalis*, *Ceratogyrus darlingi* and *Brachypelma epicureanum*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 21: 1-9.

General Electric. (2014). Size Exclusion Chromatography Principles and Methods. Handbook from GE Healthcare Life Sciences. pág. 132. Uppsala, Sweden.

González-Muñoz R., Simões N., Tello-Musi J.L., Sánchez-Rodríguez J. y Rodríguez E. (2015). New records of sea anemones (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) in the Mexican Caribbean. *Marine Biodiversity Records* 8: 1- 7.

Hasegawa Y., Honma T., Nagai H., Ishida M., Nagashima Y. y Shiomi K. (2006). Isolation and cDNA cloning of a potassium channel peptide toxin from the sea anemone *Anemonia erythraea*. *Toxicon* 48: 536-542.

Hille, B. (1984). Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, pps. 13-21.

Honma T., Kawahata S., Ishida M., Nagai H., Nagashima Y. y Shiomi K. (2008). Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*. *Peptides* 29: 536-544.

Kado R.T. y Baud C. (1981). *The rise and fall of electrical excitability in the oocyte of Xenopus laevis*. *Journal of Physiologie* 77: 1113-1117.

Kass-Simon G. y Scappaticci A.A. (2002). The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Canadian Journal of Zoology* 80: 1772-1794.

Kem W. R., Parten B., Pennington M. W., Price D. A., y Dunn B. M. (1989). Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 28: 3483-3489.

Klein S.B. y Thorne B.M. (2007). *Biological Psychology*. Worth Publishers. pp. 112-115.

Kusano K., Miledi R. y Stinnakre J. (1982). Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *Journal of Physiology* 328: 143-170.

Laemmli U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 – 685.

Lipton S.A. (1996). Similarity of neuronal cell injury and death in AIDS dementia and focal cerebral ischemia: potential treatment with NMDA open-channel blockers and nitric oxide-related species. *Brain Pathology* 4: 507-517.

Liu X. S. y Liu X.J. (2006). Oocyte isolation and enucleation. En: Liu, X.J. (eds.) *Xenopus Protocols*. *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>, Vol. 322. Humana Press.

Mariottini G.L. y Grice I.D. (2016). Antimicrobials from Cnidarians. A new perspective for anti-infective therapy?. *Marine Drugs* 14 (3); 48.

Mebis D. (2002). *Venomous and Poisonous Animals: A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists*. Medpharm Scientific Publishers Stuttgart, CRC Press, pp. 339.

Miledi R., y Woodward R.M. (1989). Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *The Journal of Physiology* 416: 601-621.

Milijanich G. (1997). Venom peptides as human pharmaceuticals. *Science and Medicine* 6-15.

Molnar P. y Hickman J.J. (2007). Patch-Clamp Methods and Protocols. Methods en Molecular Biology (403), Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 319.

Moran Y., Gondon D. y Gurevitz M. (2009). Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels- molecular and evolutionary features. *Toxicon* 54: 1089-1101.

Moran Y., Genikhovich G., Gordon D., Wienkoop S., Zenkert C., Özbek S., Technau U. y Gurevitz M. (2012). Neurotoxin localization to ectodermal gland cells uncovers an alternative mechanism of venom delivery in sea anemones. *Proceedings of The Royal Society of London B, Biological Sciences* 279: 1351-1358.

Newhouse P.A. (1997). Nicotinic system involvement in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Implications for therapeutics. *Drugs Aging* 3: 206-228.

Parker I. y Miledi R. (1988). A calcium-independent chloride current activated by hyperpolarization in *Xenopus oocytes*. *Proceedings of The Royal Society of London B, Biological Sciences* 233: 191-199.

Ping M., Lin W., Shinlong Y., Huan L., Rui L. y Ren L. (2012). A novel frog skin peptide containing function to induce muscle relaxation. *Biochimie* 94: 2508-2513.

Ponce D., López-Vera E., Aguilar M.B. y Sánchez-Rodríguez J. (2013). Preliminary results of the *in vivo* and *in vitro* characterization of tentacle venom fraction from the jellyfish *Aurelia aurita*. *Toxins* 5: 2420 – 2433.

Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Hall W.C., LaMantia A.S. y White L.E. (2012). *Neurociencia. Panamericana*. pp. 57, 62 y 63.

Rachamim T., Morgenstern D., Aharonovich D., Brekhman V., Lotan T. y Sher D. (2014). The dynamically evolving nematocyst content of an Anthozoan, a Scyphozoan and a Hydrozoan. *Molecular Biology and Evolution* 32: 740-753.

Ragsdale D.S., McPhee J.C., Scheuer T. y Catterall W.A. (1996). Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic and anticonvulsant block of voltage-gated Na Channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 9270-9275.

Rocha J., Peixe L., Gomes N.C.M. y Calado R. (2011). Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds- An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Marine Drugs* 9: 1860-1886.

Rojas A., Torres M., Rojas J.I., Feregrino A. y Heimer-de la Cotera E.P. (2002). Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hidrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon* 40: 777-785.

Rojas-Molina A, García-Arredondo A, Ibarra-Alvarado C, y Bah M. (2012). *Millepora* ("fire corals") species: toxinological studies until 2011. *Advances in environmental research*; 26.

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

Sandeman D., Sandeman R., Derby C. y Schmidt M. (1992). Morphology of the brain of crayfish, crabs, and spiny lobsters: A common nomenclature for homologous structures. *Marine Biological Laboratory* 183: 304 – 326.

Segura-Puertas M.L. y Rodríguez-Martínez R.E. (2007). Phylum Cnidaria. En: Fernández Álamo M.A. y Rivas G. (Eds.). *Niveles de organización en animales*. Distrito Federal. México: las prensas de ciencias.

Shiomi K., Qian W.H., Lin X.Y., Shimakura K., Nagashima Y. y Ishida M. (1997). Novel polypeptide toxins with crab lethality from the sea anemone *Anemonia erythraea*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1335: 191-198.

Taylor C.P. y Narashimhan L.S. (1997). Sodium channels and therapy of central nervous system diseases. *Advances in Pharmacology* 39: 47-98.

Terwindt G.M., Ophorff R.A., Haan J., Sandkuijl L.A., Frants R.R. y Ferrari M.D. (1998). Migraine, ataxia and epilepsy: a challenging spectrum of genetically determined calcium channelopathies. Dutch Migraine Genetics Research Group. *European Journal of Human Genetics* 4: 297-307.

Tortora G. J., y Derrickson B. (2010). *Principios de Anatomía y Fisiología* (11° ed.). Editorial Médica Panamericana.

Trujillo K.A. (1995). Excitatory amino acids and drugs of abuse: a role for N-methyl D-aspartic receptors in drug tolerance sensitization and physical dependence. *Drug and Alcohol Dependence* 38: 139-154.

Turk T. y Kem W.R. (2009). The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon* 54: 1031-1037.

Cheung W.Y. (Ed.) (1980). *Calcium and Cell Function. Vol. 1 Calmodulin*. United States of America: Academic Press.

Walker, J.M. (1994). *Basic Protein and Peptide Protocols*. Hatfield, UK: Human Press. pp. 23-34.

Zhang H., Du M., Xie J., Liu X., Sun J., Wang W., Xin X., Possani L.D., Yea K. y Lener R.A. (2016). Autocrine-based selection of drugs that target ion channels from combinatorial venom peptide libraries. *Angewandte Chemie* 128: 1-6.