

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS TOXINAS CON ACTIVIDAD
EN LOS CANALES IÓNICOS PRESENTE EN LA ANÉMONA *Lebrunia danae*
(Duchassaing & Michelotti, 1860)”.



TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OCEANÓLOGO

PRESENTA:
NORMA LAURA LUCIO MARTÍNEZ

Ensenada, Baja California a 10 de Septiembre de 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS TOXINAS CON ACTIVIDAD
EN LOS CANALES IÓNICOS PRESENTE EN LA ANÉMONA *Lebrunia danae*
(Duchassaing & Michelotti, 1860)”.

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OCEANÓLOGO**

**PRESENTA:
NORMA LAURA LUCIO MARTÍNEZ**

Ensenada, Baja California a 10 de Septiembre de 2009

RESUMEN

Las anemonas han desarrollado a lo largo de la evolución mecanismos de defensa entre los que destaca la producción de compuestos bioactivos para hacer frente a un medio competitivo por los recursos y los nutrientes. La presencia de nematocistos, característica exclusiva de los celenterados a la que se asocia su toxicidad. La mayoría de las toxinas son proteínas y sustancias de bajo peso molecular, que tienen como sitio blanco de acción general las enzimas, los receptores, canales iónicos y membranas. El efecto letal y paralizante de la toxina parece ser causado, en su mayor parte, por las proteínas que actúan directamente sobre las neuronas colinérgicas por ser cardio y neurotóxicas, producen un enlentecimiento en el proceso de inactivación de la corriente de Na^+ y prolongan los potenciales de acción. Estos compuestos peptídicos tienen diferentes actividades biológicas entre ellas se encuentran propiedades antitumorales, inmunodepresivas y con gran actividad en los canales iónicos. Para conocer los compuestos que tienen actividad biológica, es necesario realizar una purificación de los compuestos. La anémona *Lebrunia danae* (Duchassaing & Michelotti, 1860) presenta una distribución en el Atlántico desde Bermuda hasta el sur de Brasil, al ser considerado como un cnidario tóxico se propuso el estudio de las toxinas en el presente trabajo. Se colectaron organismos en la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo, posteriormente se descargaron los nematocistos por el método de Kem *et al.*, (1989), obteniendo extracto crudo que fue separado en dos partes, el primero para determinar su actividad biológica y el segundo tratado de forma orgánica para determinar actividad en células de cáncer y canales iónicos. Se cuantificó la proteína presente en el extracto crudo por el método de Bradford (1976) y por medio de electroforesis en SDS-PAGE se determinó el peso molecular de las proteínas (Laemmli, 1970). La caracterización biológica se realizó con el primer extracto mediante bioensayos neurotóxico en *Ocyropsis quadrata* y citotóxico en *Artemia salina* y *Harengula humeralis* evaluando su actividad mediante hemólisis en eritrocitos tipo A⁺, B⁺ y O⁺. La determinación de la actividad en el extracto orgánico fue caracterizada mediante fase reversa y ensayos citotóxicos en células H460 y canales iónicos de Na^+ . Se encontraron tres distintos tipos de nematocistos: microbásico amastigoforo, macrobásico amastigoforo y espirocistos. La electroforesis del extracto crudo de *L. danae* presentó proteínas con peso molecular de 10, 13.8, 21, 25 y 35KDa y una concentración promedio de 0.553mg proteína /ml, en cuanto a la hemólisis no encontramos diferencias significativas entre los tres distintos tipos de eritrocitos evaluados; la actividad citotóxica en *Artemia* con una CL_{50} de 2.889 mg de extracto crudo/ml y en *H. humeralis* con 0.05mg extracto crudo/ml. Solo una de las 4 fracciones purificadas del extracto crudo presentó actividad neurotóxica en menos de 5 minutos, esta fracción fue aislada en HPLC. Dentro del extracto orgánico se encontró un efecto excitador del canal iónico de Na^+ entre el rango de 1.065 y 1.699 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y actividad en la línea celular (H460) cáncer de pulmón entre el rango de 0.605 y 2.049 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS TOXINAS CON ACTIVIDAD EN
LOS CANALES IÓNICOS PRESENTE EN LA ANÉMOMA *Lebrunia danae*
(Duchassaing & Michelotti, 1860)”.

TESIS

QUE PRESENTA:
NORMA LAURA LUCIO MARTÍNEZ

APROBADA POR

Dra. Judith Sánchez Rodríguez
Presidente del Jurado

Dra. Irma E. Soria Mercado
Sinodal Propietario

M.C. Steephen Arturo Martínez Guerrero
Sinodal Propietario

DEDICATORIA

A mis papas por todo su apoyo
.....Angie, Ana, Vero, Jessi gracias hermanix 😊

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo su apoyo y amor.

A mis hermanas Angie, Ana, Vero, Jessi por cuidarme y estar en todas mis loqueras, las quiero☺

A Steep por formar parte de mis sueños

A la Dra Judith Sánchez por su amistad y apoyo muchísimas gracias

A la Dra Irma Soria por su gran apoyo y amistad durante mi formación profesional.

Al M.C. Steephen A. Martínez por su apoyo incondicional y motivación.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM Puerto Morelos, Quintana Roo por el apoyo recibido en sus instalaciones.

A Jess amiga gracias por tu apoyo y ayuda.

A Rich, Heidi y Amaury gracias por el apoyo en la colecta de organismos.

A todos los chicos de pastos, gracias por hacer divertida la estancia en Puerto.

Al personal académico del ICMYL mil gracias.

Al personal académico de la Facultad de Ciencias Marinas UABC gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	8
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 OBJETIVO GENERAL	17
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
4. METODOLOGÍA.....	18
4.1 ÁREA DE RECOLECTA DEL ORGANISMO.....	18
4.2 RECOLECCIÓN DE ORGANISMOS, EXTRACCIÓN, DESCARGA E IDENTIFICACIÓN DE NEMATOCISTOS POR MEDIO DE CAMBIO OSMÓTICO Y TÉRMICO.....	20
4.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DEL EXTRACTO.....	22
4.4 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR POR MEDIO DE ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE.....	22
4.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO CRUDO CON LOS SIGUIENTES BIOENSAYOS:.....	23
4.5.1 Bioensayo Neurotóxico	23
4.5.2 Bioensayo citotóxico.....	23
4.5.3 Ensayo hemolítico (Martín & Padilla, 1973).....	25
4.6 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO.....	26
4.6.1 Cromatografía líquida.....	26
4.7 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD.....	28
4.7.1 Obtención de extractos	28
4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30

5. RESULTADOS	32
5.1 IDENTIFICACIÓN DE NEMATOCISTOS.....	32
5.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DEL EXTRACTO.....	34
5.3 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR POR MEDIO DE ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE.....	34
5.4 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL EXTRACTO CRUDO CON LOS SIGUIENTES BIOENSAYOS:	35
5.4.1 Bioensayo neurotóxico.....	35
5.4.2 Bioensayo citotóxico.....	36
5.4.3 Ensayo hemolítico (Martín & Padilla, 1973).....	39
5.5 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO.....	42
5.5.1 Cromatografía líquida.....	43
5.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD.....	49
5.6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	50
6. DISCUSIONES.....	54
7. CONCLUSIONES.....	61
8. BIBLIOGRAFÍA	63

LISTA DE TABLAS

Tabla I Toxinas aisladas a partir de diferentes especies de anémonas (Prior Mier, 2002).....	11
Tabla II Compuestos presentes en cnidarios (Devi <i>et al.</i> , 2006).....	14
Tabla III Cuantificación de proteína en el extracto crudo en la anémona <i>Lebrunia danae</i>	34
Tabla IV Valores acumulados de valores mortandad y supervivencia de <i>Artemia salina</i> en distintas concentraciones del extracto crudo de la anémona <i>Lebrunia danae</i>	36
Tabla V Tiempo de vida de <i>Harengula humeralis</i> con la inyección ventral a distintas concentraciones del extracto crudo de la anémona <i>Lebrunia danae</i>	38
Tabla VI Indicador de diferencia significativa entre los distintos tipos de sangre analizados A ⁺ , B ⁺ y O ⁺	41
Tabla VII Masas de las fracciones obtenidas en la separación del extracto crudo por cromatografía en columna fase reversa (C-18).....	49
Tabla VIII Actividad y bloqueador en canal iónico de Na ⁺ de las 7 fracciones obtenidas; se remarcan en negro las fracciones que presentaron mayor actividad.....	50
Tabla IX Actividad de las 7 fracciones obtenidas en células de cáncer de pulmón H460. Se remarcan en negro las fracciones que presentaron mayor actividad.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de una anémona (vista longitudinal) (Figura tomada de web.nhm.ku.edu en Mayo 2009).....	2
Figura 2 Cnidae representativos del Phylum Cnidaria, mostrando condición cargada y descargada del cnidae dentro del cnidocito (Figura tomada de web.nhm.ku.edu en Mayo 2009).	4
Figura 3 <i>Lebrunia danae</i> (Duchassaing & Michelotti, 1860).....	16
Figura 4 Área de colecta de la anemona <i>Lebrunia danae</i> (tomado de Merino-Ibarra y Otero Dávalos, 1983).	20
Figura 5 Micrografía del nematocisto descargado identificado como Microbásico mastigoforo (MiAm)	32
Figura 6 Micrografía del nematocisto descargado identificado como Macrobásico amastigoforo (MaAm).....	33
Figura 7 Micrografía del nematocisto sin descargar, identificado como Espirocisto (Sp).	33
Figura 8 Electroforesis en gel acrilamida SDS-PAGE en una concentración de 12%. Los carriles B y C corresponden al extracto crudo de la anémona <i>Lebrunia danae</i> en una concentración de 6.7mg/ml y los carriles A y D al marcador de bajo peso molecular.	35
Figura 9 Gráfica de concentración letal media de <i>Artemia salina</i> determinados a partir del logaritmo de la concentración con respecto a los valores acumulados de mortandad y supervivencia.....	37
Figura 10 Gráfica de concentración letal media determinados a partir de la concentración con respecto al porcentaje del tiempo de vida de <i>Harengula humeralis</i>	38
Figura 11 Dosis-respuesta de la hemólisis determinada en eritrocitos tipo A ⁺ a una absorbancia a 415nm, causada por exposición a las diferentes concentraciones del extracto de <i>L. danae</i>	39

Figura 12 Dosis-respuesta de la hemólisis determinada en eritrocitos tipo B ⁺ a una absorbancia a 415nm, causada por exposición a las diferentes concentraciones del extracto de <i>L. danae</i>	40
Figura 13 Dosis-respuesta de la hemólisis determinada en eritrocitos tipo O ⁺ a una absorbancia a 415nm, causada por exposición a las diferentes concentraciones del extracto de <i>L. danae</i>	40
Figura 14 Indicador de hemólisis con respecto a la concentración de extracto crudo de la anémona <i>Lebrunia danae</i>	42
Figura 15 Separación por cromatografía líquida de baja presión del extracto crudo de <i>L. danae</i> con 1g del extracto cargado con Sephadex G-50 M en una columna de 2.5 x 51cm durante 36hrs como eluente ácido acético a 0.7M a una velocidad de flujo constante de 2ml/min.	43
Figura 16 Separación por cromatografía de intercambio aniónico de la fracción III-G-50 en QAE Sephadex A-25 en una columna de 46 x 0.5 cm a un flujo de 1ml/min, como eluente acetato de amonio con gradiente escalonado que va del 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M todos a pH de 8.3.....	44
Figura 17 Separación por cromatografía de intercambio catiónico de la fracción III-G50/I-QAE cargado con Fractogel EMD SO ₃ ⁻ en una columna de 37.5 x 0.5 cm a un flujo de 2ml/min con buffer de acetato de amonio con gradiente escalonado que va de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M a un pH de 5.4.....	44
Figura 18 Eliminación de sales con Sephadex G-25 de la fracción III-G50/I-QAE/I-Fractogel en una columna de 73 x 1.5 cm a un flujo de 1.5ml/min en ácido acético 0.3 M.	45
Figura 19 Separación por cromatografía líquida de alta resolución de la fracción III-G50/I-QAE/I-Fractogel/II-G25 utilizando como buffer de elusión acetonitrilo, ácido trifluoroacético y agua grado HPLC, se utilizó un gradiente escalonado de 10 a 90 % con una columna C4, de 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm, módulo de distribución de solventes ProStar, detector UV-VIS para medir longitud de onda a 280 nm y automuestreador ProStar. La corrida para muestra tuvo una duración de 80 minutos.	46
Figura 20 Separación por cromatografía líquida de alta resolución de la fracción III-G50/I-QAE/I-Fractogel/III-G25 utilizando como buffer de elusión acetonitrilo, ácido trifluoroacético y agua grado HPLC, se utilizó un gradiente escalonado de 10 a 90 % con una columna Microsorb C4, de 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm,	

módulo de distribución de solventes ProStar, detector UV-VIS para medir longitud de onda a 280 nm y automuestreador ProStar. La corrida para muestra tuvo una duración de 80 minutos. 47

Figura 21 Separación por cromatografía líquida de alta resolución de la fracción III-G50/I-QAE/I-Fractogel/IV-G25 utilizando como buffer de elusión acetonitrilo, ácido trifluoroacético y agua grado HPLC, se utilizó un gradiente escalonado de 10 a 90 % con una columna Microsorb C4, de 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm, módulo de distribución de solventes ProStar, detector UV-VIS para medir longitud de onda a 280 nm y automuestreador ProStar. La corrida para muestra tuvo una duración de 80 minutos. 48

Figura 22 Activación del canal iónico de Na⁺ probado en cada una de las fracciones obtenidas. 51

Figura 23 Bloqueador del canal iónico de Na⁺ probado en cada una de las fracciones obtenidas. 51

Figura 24 Supervivencia de las células de cáncer de pulmón H460 probadas en cada una de las fracciones obtenidas. 53

1. INTRODUCCIÓN

El medio marino alberga una gran cantidad de especies que han sido explotadas en todo el mundo, tanto para consumo humano directo, como para aislar sustancias bioactivas y otros compuestos. Las condiciones variables y en ocasiones extremas del ambiente marino, han generado una serie de adaptaciones fisiológicas en los organismos que ahí habitan, tales como la producción de toxinas y enzimas (Prior Mier, 2002).

El phylum Cnidaria contiene mas de 10 000 especies divididas en tres clases: Hydrozoa (hydra), Scyphozoa (medusas) y Anthozoa (anémonas y corales) (Campbell, 1993; Gómez, 2004).

Las anémonas son organismos que presentan forma de pólipo adaptada a la vida bentónica sésil con una distribución que abarca la mayoría de los hábitats desde las zonas tropicales hasta el ártico y de la zona intermareal hasta la zona pelágica. En promedio las anémonas marinas miden de 1.5 a 5.0cm de longitud, con un diámetro que va desde 4mm hasta más de un metro. Su color varia dependiendo la especie (Barnes, 1980).

La simetría de las anémonas es radial en el eje oral aboral (Fig. 1) y está constituido en forma de bolsa con una sola apertura, rodeada de tentáculos, que sirve como admisión del alimento y como emisión de los residuos no digeribles (Hickman, 1994). Su estructura consiste de un saco digestivo rodeado de una red nerviosa, una región gonadal, una región muscular delgada y una pared de protección. Para su protección, cuentan con estructuras secretoras de sustancias adhesivas que le

permiten cubrirse de arena, conchas y otros objetos. A pesar de ser un mecanismo, su poca movilidad la hace presa de anguilas, estrellas, lenguados, nudibranquios, bacalaos, entre otros (Gosner, 1978 en Gómez, 2004).

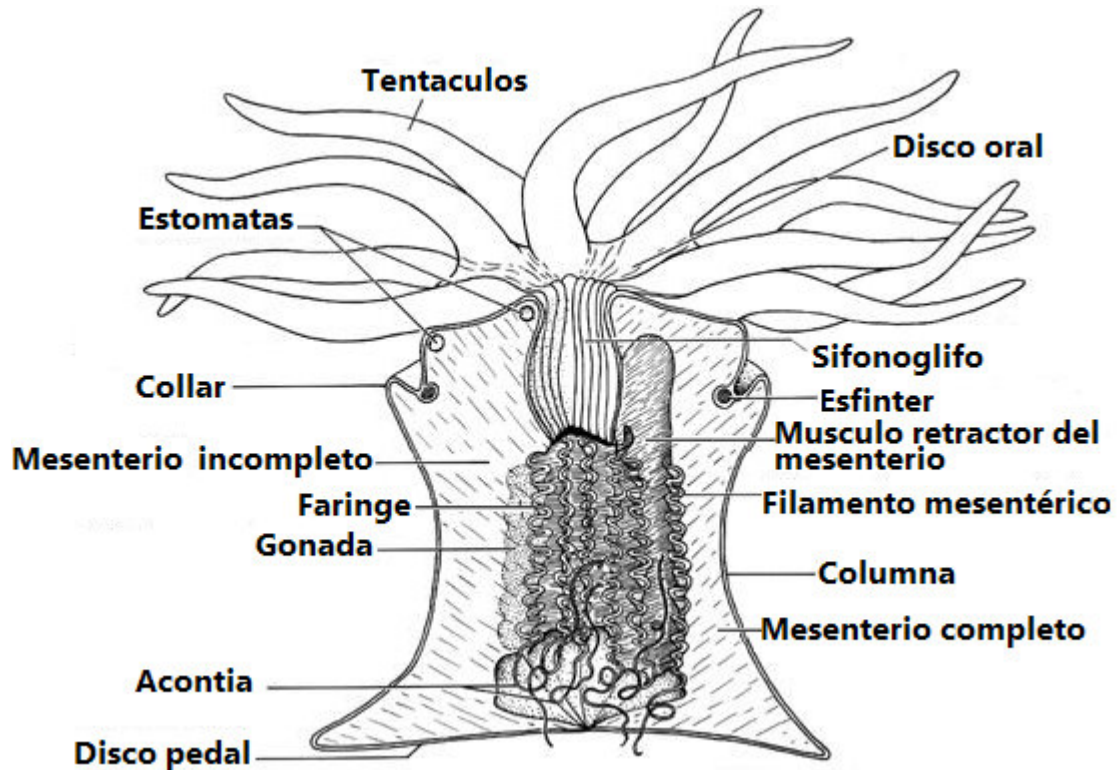


Figura 1 Estructura de una anémona (vista longitudinal) (Figura tomada de web.nhm.ku.edu en Mayo 2009).

Las anémonas se alimentan de varios invertebrados y algunas especies de gran tamaño son capaces de atrapar peces. La presa es paralizada por los nematocistos, atrapada por los tentáculos, llevada por ellos a la boca y por acción de los músculos radiales de los mesenterio, la presa es engullida (Barnes, 1980).

Su reproducción comúnmente es asexual por fisión, pueden ser hermafroditas o dioicos (Barnes, 1980). Su respiración y excreción es realizada por simple difusión en cualquier parte de su superficie corporal. Su sistema nervioso es simple, formado por

células localizadas entre la mesoglea y que unen el ectodermo con el endodermo. No presentan cerebro o centro coordinador de los impulsos nerviosos.

Todos los cnidarios producen cnidocistos o cnidae, que son organelos para inmovilizar a sus presas, los cuales pueden ser aglutinantes, envolventes o penetrantes, siendo los espirocistos, ptycocistos y nematocistos (Fig. 2). Los únicos cnidarios que son capaces de secretar los tres tipos de cnidae son los antozoos y precisamente los actinarios son los que presentan en su mayor diversidad morfológica con respecto a otros antozoos (Shick, 1991; Prior Mier, 2002).

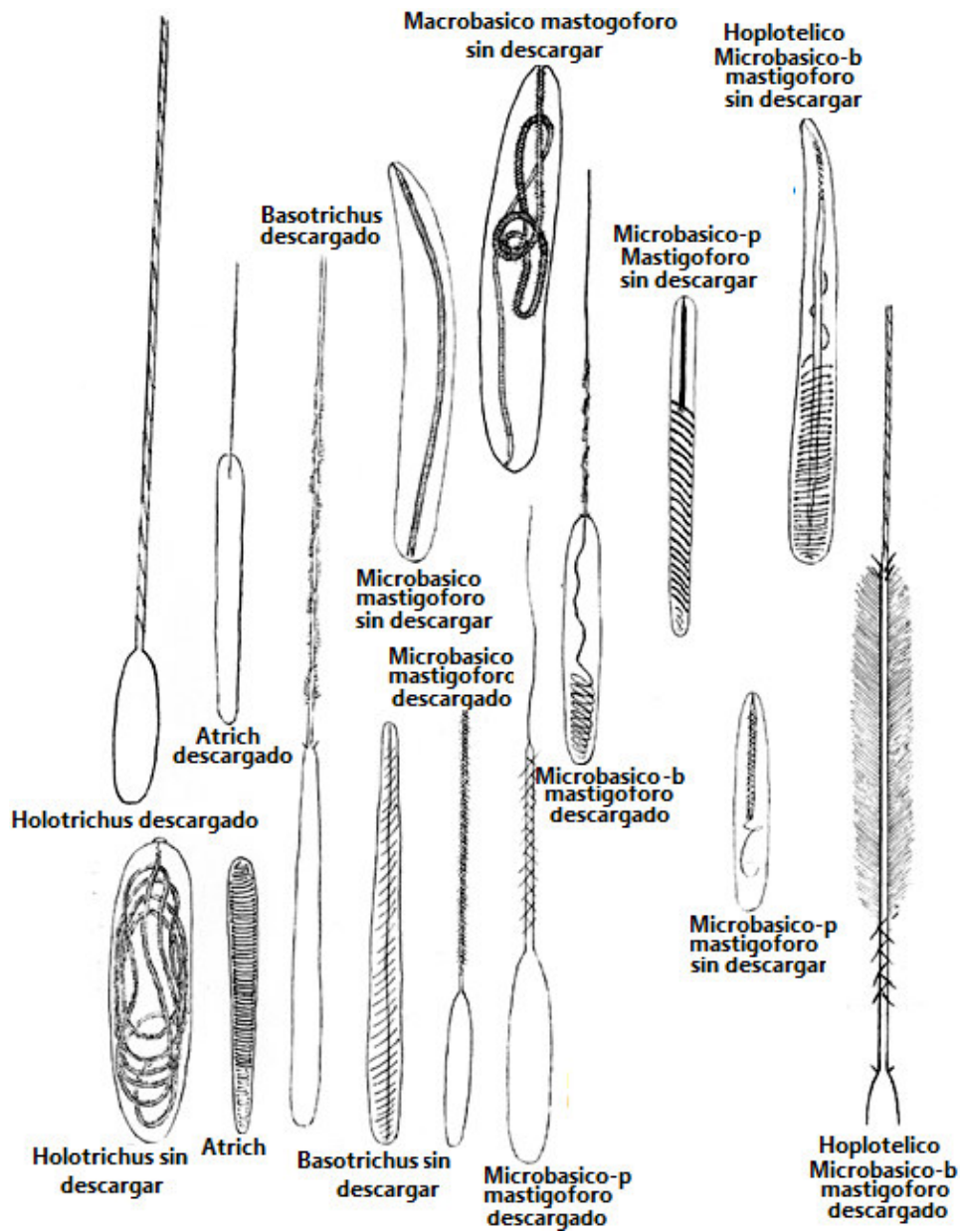


Figura 2 Cnidae representativos del Phylum Cnidaria, mostrando condición cargada y descargada del cnidae dentro del cnidocito (Figura tomada de web.nhm.ku.edu en Mayo 2009).

Las anémonas contienen una variedad interesante de compuestos biológicamente activos, incluyendo algunas toxinas potentes (Mathias *et al.*, 1960; Beress, 1982; Eno *et al.*, 1998). Por esta razón muchos investigadores ponen especial atención en la

actividad biológica de la proteína molecular de varias especies de anémonas (Eno *et al.*, 1998).

La mayoría de las toxinas son proteínas y sustancias de bajo peso molecular, que tienen como sitio blanco de acción general las enzimas, los receptores, los canales iónicos y las membranas (Castañeda, 2000).

Las características físicas y químicas de las proteínas varían enormemente debido a las diferencias en la secuencia de los aminoácidos. Los aminoácidos unidos a la cadena polipeptídica pueden ser positiva o negativamente cargados, ser neutrales y polares o neutrales e hidrofóbicos. Aunado a esto, la formación de estructuras secundarias y su plegamiento para dar lugar a la estructura terciaria dan como resultado una forma, tamaño y distribución de los residuos sobre la superficie de la proteína que la hacen única. Estas diferencias hacen posible separarla de una gran mezcla, aun cuando se encuentren otras sustancias, como ácidos nucleídos, polisacáridos o lípidos (Marshak, 1996 en Prior Mier, 2002).

De acuerdo a su peso molecular, se pueden diferenciar entre tres grupos de polipéptidos aislados de cnidarios (Halstead, 1984):

- 1) 2000 a 3000 Daltones
- 2) 4000 a 6000 Daltones
- 3) 10000 a 300,000 Daltones

Y de acuerdo a su modo de acción las toxinas de anémonas pueden ser divididas en neurotóxicas (rara vez exceden los 5KD), que interactúan con canales iónicos y las

citolisinas (generalmente de 20KD), las cuales dañan las membranas formando poros o canales (Samejima, 2000 en Prior Mier, 2002).

Las neurotoxinas de anémonas son de particular interés ya que actúan disminuyendo la tasa de inactivación de canales de Na⁺ y por lo tanto prolongan la fase de repolarización en membranas excitables. Esto causa una liberación excesiva de neurotransmisores que da lugar a convulsiones y parálisis de la presa (Shick, 1991 en Prior Mier, 2002).

Las citolisinas son un grupo heterogéneo de proteínas que no parecen unirse a receptores en la membrana celular y algunas veces presentan afinidad por ciertos lípidos, como la esfingomielina, siendo las citolisinas una de los principales constituyentes del veneno de las anémonas. En la actualidad se han aislado más de 30 de estas proteínas de aproximadamente 20 especies diferentes de anémonas. La función de algunas citolisinas puede ser lítica pero su principal efecto será la producción de dolor, inflamación y parálisis neuromuscular (Shick, 1991 en Prior Mier, 2002).

Las toxinas de los cnidarios contienen un cierto número de compuestos cuaternarios de los cuales la tetramina es toxicológicamente, el más activo. También contienen 5-hidroxitriptamina, histamina, liberadores de histamina y proteínas de peso molecular relativamente bajo. El efecto letal y paralizante de la toxina parece ser causado, en su mayor parte, por las proteínas que actúan directamente sobre las neuronas colinérgicas (Findlay *et al.*, 1965 en Prior Mier, 2002). Estos compuestos peptídicos tienen diferentes actividades biológicas entre ellas se encuentran

propiedades antitumorales, inmunodepresivas y con gran actividad en los canales iónicos (Helmer de la Cotera *et al.*, 2002 en Torrens, 2004).

En estudios recientes se ha mostrado que la expresión de ciertos canales puede estar ligada al comportamiento biológico de líneas celulares cancerígenas específicas, por ello las toxinas de las anémonas son de gran importancia en el análisis de canales de Na⁺ dependientes de voltaje. Estas toxinas se unen a la cara extracelular del canal en el locus llamado sitio 3 y selectivamente retarda la inactivación corriente, principalmente por inhibir las transiciones del canal abierto, al estado inactivado prolongando el potencial de acción a través de la cinética de su capacidad para enlazar con el sitio 3 extracelular (entre S3 y S4 en DIV) sobre canales de Na_v en una forma dependiente de potencial de membrana.

En el presente trabajo se propone purificar y caracterizar compuestos bioactivos de la anémona *Lebrunia danae* , observar la actividad que presenta en canales iónicos de Na⁺ y en células cancerígenas de pulmón (H460).

2. ANTECEDENTES

La primera caracterización de una anémona fue realizada en 1968 cuando Shapiro purificó una toxina de *Condylactis gigantea* (Shapiro, 1968; Bosmans, 2007). Esta toxina apareció a causa del incremento en la acción potencial de la duración en el axón de la langosta gigante.

Todas las anémonas poseen nematocistos urticantes, utilizados como defensa y/o captura de sus presas, por ello es de especial interés su estudio y efectos sobre los organismos. En los nematocistos de *Aiptasia pallida* se encontró que la actividad hemolítica en células de conejo y la actividad de la fosfolipasa A son requeridas por los iones de calcio, que actúan sobre la membrana de fosfolípidos degradando así las células rojas (Hessinger., *et al*, 1974).

A partir de *Anemonia sulcata* se aislaron y caracterizaron dos toxinas, la Toxina I (ATX I con DL50 2 µg/kg) y la Toxina II (ATX II con DL50 2 µg/kg). Ambas toxinas son polipéptidos de peso molecular medio (MW 5000) con efecto paralizante en crustáceos y mamíferos. ATX II tiene como característica particular el discriminar entre canales de sodio de diferentes células de especies animales a diferencia de otros organismos que no tienen este poder discriminante (Béress *et al.*, 2000). Con pequeñas modificaciones de esta técnica se encontraron cuatro toxinas en la anémona *Condylactis aurantiaca* (CTX I; II; III IV) y dos toxinas en *Bolocera tuediae* (BTTX I y II) (Béress & Zwick, 1984).

Pocos años después, más de 50 toxinas activas a canales de Na⁺ habían sido identificadas, donde la primera caracterización de estas proteínas son las

estimulaciones cardíacas y neurotóxicas (Barhanin *et al.*, 1981; Sánchez - Rodríguez y Cruz-Vázquez, 2006; Bosmans, 2007).

Scheuer (1986) y Rinehart *et al.* (1990) mencionan que existen compuestos químicos que provienen de fuentes marinas que tienen actividad biológica; entre los más importantes se encuentran los agentes antitumorales, antivirales, antibacterianos, anti-leucémicos, antiinflamatorios, reguladores de secreciones gástricas, neurotóxicos entre otros (Kelly, 1997).

Kem y Dunn (1988), encontraron dos toxinas con actividad hemolítica a partir de la anémona *Stichodactyla helianthus*, la Esticolisina I (StI) y Esticolisina II (StII), correspondiendo la primera de ellas a la citolisina III descrita por Blumenthal y Kem (1983) y la segunda de ellas presenta la misma secuencia amino terminal del polipéptido C1 de Kem y Dum (Lanio *et al.*, 2001). Esta anémona presentó actividad bloqueadora de canales de potasio, no existiendo homología con otros péptidos bloqueadores de los mismo canales como el caso de *Bunodosoma granulifera* (Castañeda *et al.*, 1995).

En 1991, Norton propuso una clasificación de polipéptidos de anémonas, dividido este grupo en tres clases, dos de ellas con moléculas que contienen 16-19 residuos de aminoácidos (tipo 1 y 2) y una comparación pequeña fue el otro grupo tipo 3, que comprende a los polipéptidos que contienen de 27-32 residuos (Norton, 1991; Honma *et al.*, 2003; Bosmans, 2007).

La identificación de toxinas polipéptidas en invertebrados marinos, es un instrumento de identificación, purificación y caracterización de voltaje sensible en

canales de Na. En la anémona *Anthopleura xanthogrammica* se identificó y caracterizó el nivel del canal tóxico de sodio en cultivos celulares de neuroblastoma y líneas celular de tumor de ratas. Encontrando seis nuevas toxinas, cinco de estas nuevas isoformas similares al tipo I de 47 polipéptidos nativos de *Anthopleura elegantissima*, *Anthopleura fuscoviridis* y *Anemonia sulcata*, pero uno aparenta ser la unión de dos previamente identificados de 49 residuos de toxina de *A. xanthogrammica*. La nueva fracción tóxica de 49 residuos, PCR 3-7, interactúa con el canal de sodio con una alta afinidad en el intercambio de sodio (Kelso & Blumenthal, 1998).

En la purificación y caracterización de dos diferentes lectinas de la anémona *Bunodeopsis antillienis*, se encontró que presenta un compuesto hemaglutinante con actividad en la sangre humana tipo A (N-acetilgalactosamina-galactosa-fructosa) con peso molecular de 28,900 por media de masa espectral, y con la sangre humana de tipo B (galactosa-galactosa-fructosa) con tres fracciones (BAA-B1-3). Los pesos moleculares de BAA-B (1), BAA-B (2) y BAA-B (3) son 39,350, 28,300 y 17,550 respectivamente y solo en la fracción 3 presentó hemaglutinación (Fenton *et al.*, 2003).

No hay muchos trabajos relacionados con la acción que ejercen las toxinas de anémonas en insectos o mamíferos (Pelhate *et al.*, 1984; Bosmans, 2007); en comparación con el escorpión α - y β -toxinas (Cohen *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2005; Bosmans, 2007), que de este último existe una mayor investigación. Norton (1991), elaboró un trabajo sobre distintas actividades de toxinas aisladas de anémonas, realizados en cangrejos y ratones encontrando la dosis letal media (DL₅₀) que presentó cada uno de ellos ante cada toxina. La mayor actividad se presentó en el

ratón con la toxina Sh-I >15 000 (µg/kg), seguida de ATX-I >4000 (µg/kg) y en el cangrejo con las toxinas AFT-I y II de 100-150(µg/kg) (Bosmans, 2007).

Rivero, A., *et al* (2003) encontraron que *Lebrunia danae* contiene 0.066mg de proteína así como presencia inhibidora total de metalo carboxipeptidasas de 25.79Ut y una actividad específica de 5.34U/mg quienes constituyen una clase importante de enzimas de diversa localización y gran variedad de funciones así como en procesos patogénicos tales como: respuestas alérgicas e inflamatorias, artritis reumatoidea, enfermedades circulatorias, diabetes tipo I, Hepatitis B, entre otros (Skidel, 1996), procesos de coagulación/fibrinólisis, mecanismos de defensa y cáncer, resultando con ello ser una fuente potencial de este tipo de inhibidor.

Tabla I Toxinas aisladas a partir de diferentes especies de anémonas (Prior Mier, 2002)

ESPECIE	TOXINA AISLADA	REFERENCIA
<i>Palythoa caribaeorum</i>	C-PTX	Béress L., <i>et al.</i> , 1983
<i>Anthopleura elegantissima</i>	APE1 – APE5	Bruhn T., <i>et al.</i> , 2001
	Antho – Rpamida (II)	Cartensen K., <i>et al.</i> , 1992 (1993)
	Antho – RFamida	
	Antho – RWamida	
	Antho – RNamida	Grimmelikhuijzen CJ <i>et al.</i> , 1990

<i>Anthopleura xanthogrammica</i>	Ax1 & Ax2	
	ApA	Norton TR., 1976
<i>Stichodactyla helianthus</i>	ShI	Kem W.R., <i>et al.</i> , 1989
	ShK	Castañeda <i>et al.</i> , 1995
	St I & StII	Lanio M. E., 2001
<i>Actinia equina</i>	Equinatoxinas I & II	Komatsu S., <i>et al.</i> , 1992
<i>Actinia cari</i>	Caritoxinas I, II y III	
<i>Actinia tenebrosa</i>	Tenebrosin - C	Galletis P., <i>et al.</i> , 1990
<i>Heteractis magnifica</i>	EnT	
	Dos citolisinas	Khooks <i>et al.</i> , 1993
<i>Halicurias sp.</i>	Halicurina	Ishida M., <i>et al.</i> , 1997
<i>Stoichactis kenti</i>	kenitina	Bernheimer AW & Lai CY 1985
<i>Condylactis aurantiaca</i>	Toxinas I, II, III y IV	Béress R., <i>et al.</i> , 1976
<i>Callieatis parasitica</i>	Calitoxina	Cariello L., <i>et al.</i> , 1989
<i>Urticina piscivora</i>		Cline E., <i>et al.</i> , 1995

En cuanto a tratamientos farmacológicos que utilizan compuestos aislados de anemonas se encuentran los estimulantes cardiacos (Devi *et al.*, 2006) por mencionar algunos, así como los mencionados en la tabla II. .

Tabla II Compuestos presentes en cnidarios (Devi *et al.*, 2006).

CLASE DE FÁRMACO/ COMPUESTO	ORGANISMO	QUÍMICA	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA	MECANISMO MOLECULAR DE ACCIÓN	CIUDAD	REFERENCIA
Cardiovascular/ Equinatoxina	<i>Actinia equina</i>	Proteína	Cardiotóxico	liberación LDH	SLOV	Bunc <i>et al.</i> , 1999
Equistatina	<i>Actinia equina</i>	Proteína	Cisteína proteinasa y catespina D inhibición	Actividad inhibitoria	SLO	Lenarcic y Turk, 1999
Obelin	<i>Obelia longissima</i>	Proteína	Bioluminiscencia basada en inmunoensayo de pequeños péptidos	Competencia con obelin- octapetido proteína en fusión	USA	Matvev <i>et al.</i> , 1999

Por otro lado y en mayor cantidad se encuentran compuestos de las esponjas marinas que son utilizados como tratamientos del asma, cáncer, antibióticos y antiinflamatorias (Devi *et al.*, 2006).

Por mencionar algunas esponjas con compuestos anticancerígenas se encuentran las especies: *Halichondria okadai*, *Psammaplysilla sp.*, *Discodermia dissolute*, *Cymbastella sp.*, *Jaspis digonoxea*, *Agelas mauritanus* con sus compuestos correspondientes E7386 halichondrin B derivado, NVP-LAQ824 Psammaplin derivado, Discodermolide, HTI-286 Hemiasterlin derivado, LAF-389 Bengamide B derivado, KRN-700 Agelasphin derivado (Simmons *et al.*, 2005).

Por otro lado algunos compuestos de los organismos tratados en enfermedades se encuentran los arrecifes de coral, se sabe que contienen compuestos antiinflamatorios y anticancerígenos, moluscos con compuestos utilizados en funciones de los receptores nicotínicos en el cerebro, como Alzheimer, Parkinson y la epilepsia así como los Bryozoarios en enfermedades tratadas con quimioterapia como la melanoma y la leucemia (Devi *et al.*, 2006).

Lebrunia danae

La anémona *Lebrunia danae* pertenece a la subclase Zoantharia, familia Aliicidae del orden Actinaria, su distribución abarca en el Atlántico desde Bermuda hasta el sur de Brasil, localizada cerca de arrecifes coralinos a una profundidad de 2 a 40 metros. Esta especie tiene como característica principal dos tipos de tentáculos, primarios y secundarios (Fig. 3). Los primarios son típicos de la mayoría de las anémonas

mientras que los secundarios son distintivos de esta especie (Cunningham y Goetz, 1996; Cruz, 2004).

Cruz-Vázquez en el 2004 aisló y caracterizó biológicamente las sustancias activas presentes en la anémona *Lebrunia danae*, evaluando la actividad biológica por medio de bioensayos con sangre de borrego, vaca y cerdo; citotóxico con *Artemia salina* y neurotóxico con cangrejos. Con una actividad hemolítica de 0.006 a 0.236mg de proteína/ml, una CL_{50} de 2.82mg/ml de extracto crudo neurotóxica a partir de concentraciones de 6mg/ml de extracto crudo. Solo diez de 25 fracciones purificadas del extracto crudo, presentaron actividad neurotóxica mayor que el extracto crudo produciendo la muerte de los cangrejos en menos de cinco minutos.

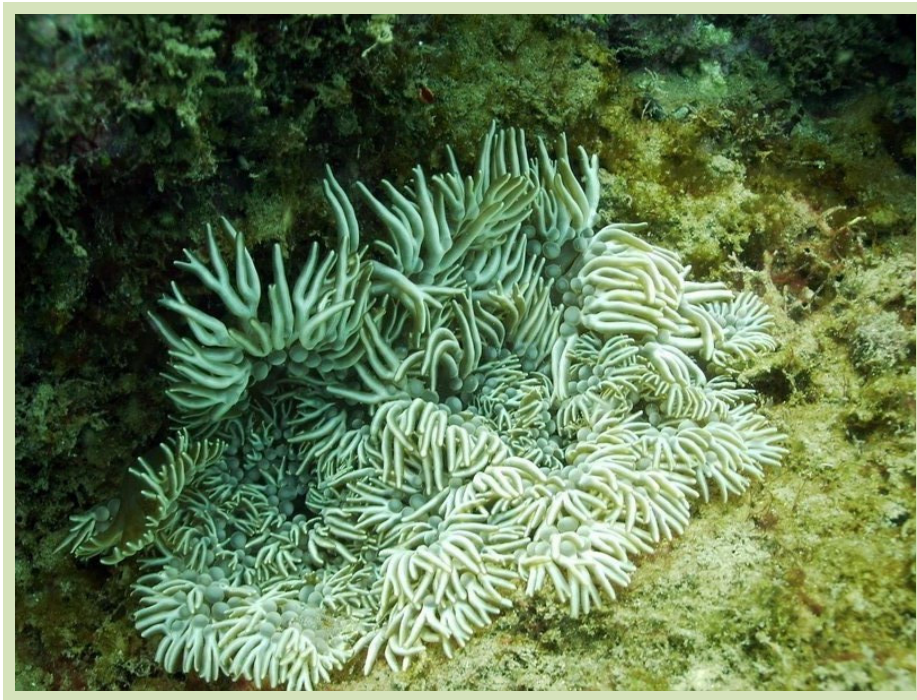


Figura 3 *Lebrunia danae* (Duchassaing & Michelotti, 1860)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar, purificar y caracterizar los compuestos bioactivos presentes en la anémona *Lebrunia danae*.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar micrografías de los cnidocistos presentes en la anémona *Lebrunia danae*.
2. Cuantificar y determinar proteína en extracto crudo
3. Determinar mediante el bioensayo del cangrejo la DL₅₀ utilizando el extracto crudo.
4. Determinar y cuantificar el grado de hemólisis en el extracto crudo.
5. Purificar los compuestos activos mediante cromatografía de líquidos.
6. Aislar los compuestos activos presentes en los nematocistos de la anémona.
7. Determinar mediante el bioensayo de electrofisiología si los péptidos aislados actúan a nivel de receptores y /o canales iónicos.
8. Determinar la actividad en células anticancerígenas

4. METODOLOGÍA

4.1 ÁREA DE RECOLECTA DEL ORGANISMO

Las anémonas de la especie *Lebrunia danae* se recolectaron en la Laguna arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo, situada a los 20°50' de latitud Norte y 86°55' de longitud Oeste, posee un sistema arrecifal de barrera con orientación norte-sur, con una altura promedio sobre el nivel medio del mar de 10m. En la parte norte de Quintana Roo, el suelo es del tipo terra-rosa, mientras que hacia el sur predominan los suelos que son ricos en humus (SEP, 1982 en Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1991).

El arrecife está compuesto por corales esclerinos, gorgonaceos, algas y otros organismos asociados; la zona marina está dividida en la laguna arrecifal, arrecife posterior, cresta arrecifal y arrecife frontal (Jordán *et al.*, 1981 en Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1991).

La zona es de carácter tropical, con tres vientos dominantes: 1) los Alisios, presentes durante todo el año y en particular en verano, con una velocidad media de 30m/seg, soplando generalmente de noroeste a suroeste; 2) los noreste, que se presentan durante otoño y el invierno en la parte norte de Quintana Roo; 3) los ciclones, cuyos movimientos giratorios alcanzan grandes velocidades y azotan al estado, principalmente durante los meses de agosto, septiembre y octubre (SEP, 1982 en Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1991).

El régimen de mareas en el área corresponde al tipo mixto semidiurno, de baja amplitud (Merino y Otero, 1991).

Durante la mayor parte del año los arrecifes del parque nacional están expuestos a olas generadas por los vientos Alisios. En la laguna arrecifal las olas son bajas ya que la barrera arrecifal funciona como eficiente dissipador de la energía del oleaje; (Merino y Otero, 1991) midiendo una altura de 0.14m en la zona de playa y un periodo de aproximadamente 2 segundos (Contreras *et al.*, 2000).

Los valores de salinidad registrados, entre 1993 y 1995, por el proyecto CARICOMP, tuvieron una media de 36.0ppm (Merino y Otero, 1991).

Determinaciones realizadas por el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM (ICMyL) (1984), durante el periodo marzo de 1982 a julio 1983, indican un valor promedio de oxígeno disuelto de 4.99ml/l (Contreras *et al.*, 2000).

Las aguas costeras presentan un carácter oceánico y oligotrófico, con gran estabilidad vertical, temperatura entre los 24.75 y 32.85°C, su pH promedio de 8.34 y la alcalinidad de 2.47 (meq/l) (Merino y Otero, 1991).

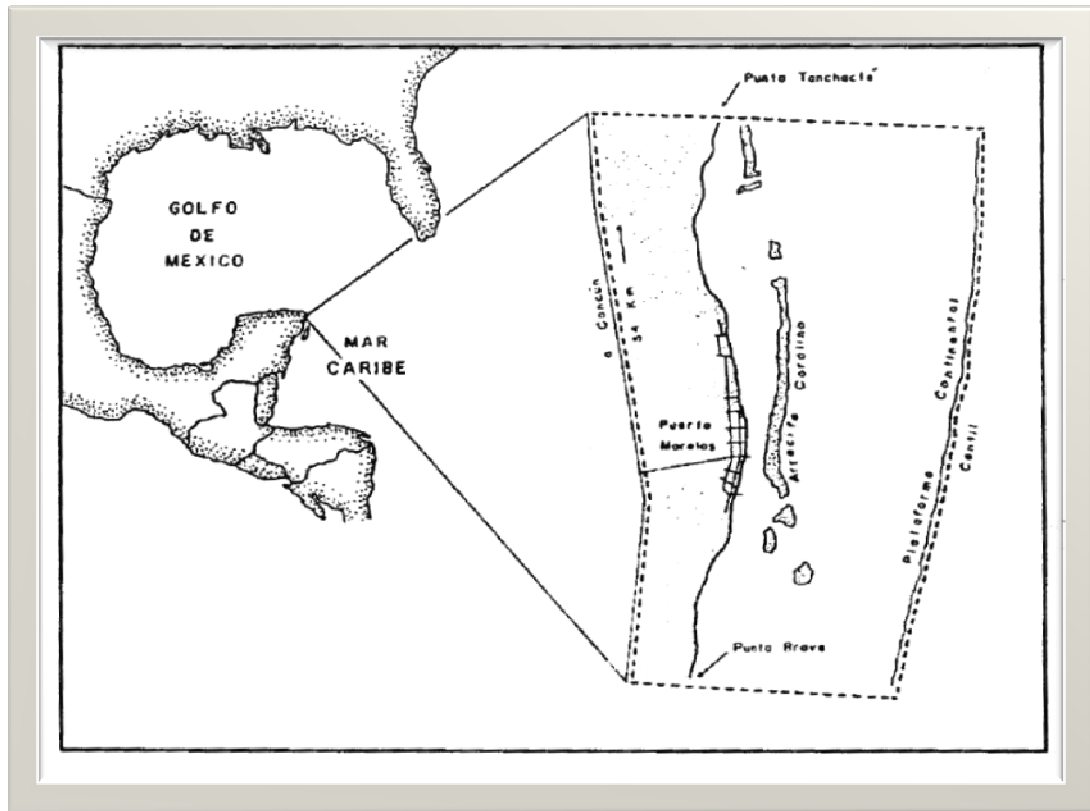


Figura 4 Área de colecta de la anémona *Lebrunia danae* (tomado de Merino-Ibarra y Otero Dávalos, 1983).

4.2 RECOLECCIÓN DE ORGANISMOS, EXTRACCIÓN, DESCARGA E IDENTIFICACIÓN DE NEMATOCISTOS POR MEDIO DE CAMBIO OSMÓTICO Y TÉRMICO.

La recolección de anémonas *Lebrunia danae* fue mediante el uso de buceo SCUBA en la zona conocida como “La Bocana” que es la entrada de la Laguna arrecifal de Puerto Morelos. Los organismos se encontraban adheridos a las rocas y corales de la

zona, los cuales se removieron con ayuda de espátulas posteriormente colocados en bolsas de plástico para su traslado al laboratorio.

En el laboratorio fue realizada la descarga de los nematocistos mediante el método modificado de Kem, *et al.* (1989), que consiste en congelar los organismos a -60°C por 30 minutos y posteriormente colocarlos en agua desionizada agitando de manera manual con la ayuda de una varilla de vidrio por un periodo de 20 minutos y este proceso se realizó 3 veces, en la misma solución.

Una vez realizado lo anterior se tomó una muestra del extracto para observar al microscopio y comprobar que la mayoría de los nematocistos estuvieran descargados. Se realizó su identificación y la toma de micrografías, con un microscopio compuesto, utilizando una cámara Olympus SC32 type 12 instalada en el microscopio. Identificando por medio del método de Mariscal (1974), que indica el medir con una reglilla el diámetro de la cápsula como de los túbulos, tamaño, forma, abundancia de las espinas sobre la superficie del túbulo.

La solución con los nematocistos ya descargados, fue separada en dos partes, la primera parte fue centrifugada y el sobrenadante transferido a viales para ser congelados a -60°C y posterior a ello se liofilizaron. Ya liofilizado, se pesó el extracto crudo obtenido, con el fin de obtener el rendimiento.

La segunda parte fue empleada para la determinación del compuesto, mencionado más adelante.

4.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DEL EXTRACTO

Se cuantificó el extracto crudo liofilizado de la anémona *L. danae* por medio del método de Bradford (1976). El kit empleado fue de Bio-Rad Protein Assay donde la concentración total de proteína se estimó mediante la lectura de su absorbancia a una longitud de onda de 595nm, con un espectrofotómetro marca ThermoSpectronic Genesys modelo TM 20.

Para la realización de la curva de calibración se prepararon cuatro estándares de gama globulina de bovino a: 0.25, 0.5, 0.75, 0.9mg/ml. Se pipeteó 100µl del estándar por triplicado de cada concentración, y se agregó 5.0ml de reactivo de Bradford (1:4), a cada tubo y se agitó en vortex.

Se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos y posteriormente se leyeron a 595nm.

Para el análisis de la muestra se utilizó 3mg del extracto liofilizado resuspendido en 1ml de agua desionizada, a concentraciones de 2, 5, 8, 11, 14, 20µg/ml. Se aplicó un tratamiento de regresión lineal para los datos de la curva de calibración y con esto se determinó el contenido de proteína en la muestra.

4.4 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR POR MEDIO DE ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE.

Para determinar el peso molecular del extracto de *L. danae* se realizó una electroforesis en SDS-PAGE a una concentración de 12% de acuerdo al método de

Laemmli (1970). Las muestras migraron en un voltaje constante de 100volts durante 2 horas, corriendo dos geles a un tiempo en la misma cámara.

Se colocaron marcadores de bajo peso molecular (Amersham Biosciences) y extracto crudo a una concentración de 100mg/ml por duplicado en el mismo gel. Se utilizaron 2µl de marcadores por canal, mientras que de muestra se colocaron 15µl. La tinción fue realizada por la técnica de Coomassie (Kruger, 1994) durante aproximadamente 12 horas. Para desteñir los geles, el proceso se realizó con una mezcla de metanol-acido acético 25%:30%.

4.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO CRUDO CON LOS SIGUIENTES BIOENSAYOS:

4.5.1 Bioensayo Neurotóxico

Ensayo en *Ocypode quadrata* (Beress y Zwick, 1980)

Para probar la toxicidad del extracto crudo y de las fracciones pre-purificadas de *L. danae* se inyectaron cangrejos en el tercer apéndice caminador. Se registraran los efectos causados por las toxinas como la parálisis y/o muerte, así como el tiempo de respuesta y se sexaron cada uno de los organismos probados. Cada organismo pesó.

4.5.2 Bioensayo citotóxico

***Artemia salina* (Meyer et al., 1982)**

Para la evaluación de la actividad citotóxica obtenida mediante la eclosión de quistes. Se realizaron pruebas preliminares con el objetivo de encontrar el intervalo de

concentración que nos permitiera estimar la concentración letal media (CL₅₀) se utilizaron nauplios con un tiempo de vida de 24 horas. En el bioensayo preliminar, se probaron las concentraciones de 10 a 400mg/ml de extracto crudo disuelto en agua de mar; colocando y ajustando el volumen dentro del vial al agregar los organismos, que en cada caso fue de 30 con un error de ± 1 artemia. Se prepararon tres réplicas por cada concentración. El tiempo de exposición a la toxina fue de 24 horas, en el que se registró la conducta y mortalidad de los organismos al inicio y final del bioensayo. Con base en estos resultados preliminares, se probó un intervalo de concentración para encontrar la CL₅₀. En esta ocasión la concentración fue de 80 a 200mg/ml, de igual manera, el tiempo de exposición fue de 24 horas registrando conducta y mortalidad al término del mismo. Los resultados obtenidos del bioensayo se analizaron por el método estadístico de Reed-Muench para determinar CL₅₀.

***Harengula humeralis* (Lehmann, 1980)**

Para la evaluación de la actividad citotóxica obtenida mediante la inyección en la parte ventral de 0.1ml de extracto crudo de *Lebrunia danae* en organismos de la especie *Harengula humeralis* a distintas concentraciones con el objetivo de encontrar el intervalo de concentración letal media (CL₅₀). El tamaño promedio de los organismos de prueba fue de 10cm y con un peso de 10 gr. Estos fueron recolectados frente a la costa del ICMYL en Puerto Morelos Quintana Roo.

Los organismos una vez recolectados fueron transportados en tinas para su posterior acondicionamiento durante una semana en un estanque circular con flujo abierto.

En el bioensayo preliminar, se probaron las concentraciones de 3, 5, 10, 20mg/ml de extracto crudo disuelto en agua desionizada, por triplicado, además se realizó biometría a los organismos. El tiempo de exposición a la toxina fue de 24 horas, en el que se registró la conducta y mortalidad de los organismos al inicio y final del bioensayo. Con base en estos resultados preliminares, se probó concentraciones de 0.012, 0.037, 0.05, 0.075, 0.1, 0.015 y 0.2 mg/ml, de igual manera el tiempo de exposición fue de 24 horas registrando conducta y mortalidad al término del mismo. Los resultados obtenidos del bioensayo se analizaron por el método estadístico de Reed-Muench para determinar CL₅₀.

4.5.3 Ensayo hemolítico (Martín & Padilla, 1973)

La actividad hemolítica del extracto liofilizado de *L. danae* se probó en eritrocitos humanos de sangre tipo A⁺, B⁺ y O⁺, empleando el método modificado de Rottini *et al.* (1990 citados en Santamaría *et al.*, 2002). Se tomaron muestras de sangre fresca en tubos de centrifuga de 15ml que contenían 2 ml de Alsever como anticoagulante para evitar hemólisis, e inmediatamente fueron colocados en hielo. Enseguida se lavaron los eritrocitos con 20 ml de solución Alsever para eliminar grasa y plasma. La muestra se centrifugó a 3500 rpm por cinco minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se eliminó, y finalmente el paquete celular precipitado, se resuspendió en solución Alsever fría.

Posteriormente se calibró la cantidad de eritrocitos necesarios para el bioensayo, es decir la cantidad de eritrocitos por mililitro con la que se logra el 0% de hemólisis en solución Alsever y 100% de hemólisis en agua desionizada, para ello se preparó un estándar: con 1 ml de la solución de eritrocitos lavados en 10 ml de Alsever. Se

colocaron diferentes cantidades de esta solución, desde 5 a 35(μ l) completando el volumen a 1 ml con agua y solución Alsever; posteriormente se realizaron lecturas de absorbancia de 415nm. Finalmente se encontró que al tomar 25, 16 y 20 μ l de las sangre A⁺, B⁺ y O⁺, respectivamente, se obtenía el 100% de hemólisis en agua desionizada y 0% en solución Alsever para cada uno de ellos.

Ya realizado la calibración de eritrocitos, se probó el efecto hemolítico de las toxinas de *Lebrunia danae*. Esto se realizó colocando 25, 16 y 20 μ l de las sangre A⁺, B⁺ y O⁺ respectivamente, en tubos de ensayo con 2ml a las siguientes concentraciones de extracto crudo disueltas en Alsever por triplicado: 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000 μ l/ml y control (solución de eritrocitos mas solución Alsever), posteriormente se incubaron a 37°C por 30 minutos. Para determinar la cantidad de hemoglobina liberada (hemólisis) causada por las toxinas, se leyó la absorbancia de cada muestra a 415nm, con un espectrofotómetro marca ThermoSpectronic Genesys modelo TM 20. Los resultados de hemólisis se graficaron contra la concentración del extracto crudo en una curva de dosis-respuesta. Finalmente, para encontrar si existían diferencias significativas se realizó un indicador para comparar los tres distintos tipos de sangre analizadas en la anémona *L. danae*.

4.6 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

4.6.1 Cromatografía líquida

Se realizó una pre-evaluación de la actividad del extracto crudo liofilizado utilizando el bioensayo con cangrejo (Béress y Zwick, 1980), esto con el fin de saber si el extracto presentaba alguna actividad antes de iniciar la purificación y a partir de esta

concentración se presentaba el efecto neurotóxico. Una vez evaluada la actividad del extracto crudo, se procedió a la purificación de la toxina mediante el uso de cromatografía líquida de baja presión, usando un cromatógrafo marca Pharmacia Biotech, con detector UV a 280nm.

Se pesaron 3 g del extracto crudo liofilizado para diluirlo en 10 ml de agua desionizada, se centrifugó a una velocidad 3500 rpm durante 5 minutos para eliminar sólidos, y el sobrenadante, fue introducido en la columna cromatográfica para su purificación.

Se inició con la cromatografía de filtración en gel, con un gel tipo Sephadex G50 M, para separar los grupos de proteínas por tamaño molecular, en una columna de 2.5 x 51cm durante 36hrs como eluente se empleo ácido acético a 0.7M a una velocidad de flujo constante de 2ml/min a una amplitud de 2. La colecta se realizó mediante la identificación en el cromatograma de la fracciones, posteriormente se rotaevaporarán a presión reducida con una temperatura máxima de baño de 30 °C, cada una de las fracciones fue probada en cangrejos para evaluar la actividad en cada uno de las fracciones (siendo esta última secuencia realizada durante todo el procedimiento).

Se eligieron las fracciones más activas para ser pasadas por un gel de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25 en una columna de 46 x 0.5 mm a una amplitud de 0.1 a un flujo de 1 ml/min, como eluente se empleó acetato de amonio con gradientes que van del 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M todos a pH de 8.3.

Posterior a ello la fracción más activa fue pasada por cromatografía de intercambio catiónico, Fractogel EMD SO₃ en una columna de 37.5 x 0.5 mm a un flujo de 2ml/min

a una amplitud de 0.1 corrida con acetato de amonio con gradientes que van de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1M a un pH de 5.4.

El siguiente paso fue la eliminación de sales en la muestra con actividad, en este caso se empleó el gel Sephadex G25 en una columna de 73 x 1.5 mm a un flujo de 1.5ml/min a una amplitud de 0.2 corrido en ácido acético 0.3M.

Finalmente como última parte de la purificación se llevó a cabo la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de las fracciones parcialmente purificadas y con actividad biológica.

En un equipo Varian Modelo 230 utilizando como buffer de elusión acetonitrilo, ácido trifluoroacético y agua grado HPLC, con un gradiente escalonado de 10 a 90 % con una columna Nucleosil C4, de 250 x 4.6mm y un tamaño de partícula de 5 µm, módulo de distribución de solventes ProStar, detector UV-VIS para medir longitud de onda a 280nm y automuestreador ProStar. La corrida para muestra tuvo una duración de 80 minutos.

4.7 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD

4.7.1 Obtención de extractos

Del segundo extracto de los nematocistos ya descargados mencionado anteriormente se colocaron en una mezcla de metanol:diclorometano 7:3 se dejaron extraer por 7 días, enseguida se filtró con papel Whatman de 0.16mm de tamaño de poro para flujo medio de cromatografía, con el propósito de eliminar la mayor cantidad de materia orgánica visible presente en el extracto.

Una vez libre de materia orgánica, la muestra fue concentrada a presión reducida mediante rotaevaporación a una temperatura del baño no mayor a 30 °C, con el fin de que los compuestos no se desnaturalizaran, posterior a ello el compuesto fue liofilizado y pesado con el fin de obtener el rendimiento.

Se colocaron 50mg del extracto orgánico liofilizado con un poco de gel de sílice C-18 y 5 ml de agua destilada con el fin de hidratar el compuesto, posterior a ello fue colocado en una columna de 3 x 19 empacada con gel de sílice fase reversa C-18 previamente hidratado con agua desionizada. La columna se corrió, mediante un sistema al vacío, iniciando con 200 ml de mezclas de agua:metanol 3:1, 2:1, 1:1 y 1:2, 1:3, y 500 ml de las fracciones agua:metanol 1:3, metanol 100 %, metanol:Acetonitrilo 1:1 y acetonitrilo 100%.

Cada una de las fracciones fue concentrada a presión reducida mediante rotaevaporación a sequedad a una temperatura del baño no mayor a 30 °C, seguido de ello todas las fracciones fueron pesadas y corridas en Cromatografía en Capa Delgada (CCD), en placas de vidrio Poligram cubiertas con una capa de sílice fase reversa C-18 de 0.2mm de espesor de 2.5 x 7.5cm cada una de las fracciones antes mencionadas se eluyeron con diferentes mezclas de agua, metanol y una última fracción de 200 mL de Acetonitrilo. Todas las fracciones fueron corridas en CCD, empleando placas cromatográficas de gel de sílice fase reversa C-18 y como eluentes mezclas de disolventes hasta obtener condiciones óptimas mediante las cuales se observaron los diferentes compuestos presentes en las fracciones. Como agente revelador se empleó vainillina al 2 % y 0.1 % de ácido sulfúrico en etanol y se

calentaron sobre una plancha de calentamiento a la más baja temperatura (esta secuencia fue empleada durante todo el procedimiento).

Posterior a ello se continuó con la determinación del compuesto mejor separado, encontrando en este caso una conglomeración de compuestos en la fracción de acetonitrilo 100% por lo que se procedió a separar nuevamente en una columna al vacío de 3 x 19 cm empacada con gel de sílice fase reversa C-18 y como disolvente Metanol 100%.

Las fracciones fueron seguidas por CCD y las similares agrupadas para ser corridas nuevamente en una columna por gravedad C-18 fase reversa y como disolvente Metanol colectando cada 4 ml por vial.

Cada fracción separada se le realizó el ensayo citotóxico para células de cáncer de pulmón H460, con la finalidad de obtener la actividad presente en ellas, así como su actividad en canales iónicos de Na⁺.

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el bioensayo de la hemólisis se determinó un indicador para observar si existía una diferencia significativa, entre los tres distintos tipos de sangre analizadas en la anémona *L. danae* en base a la siguiente fórmula:

$$I_h = \frac{(C_e * Absorbancia)}{(Estándar)}$$

I_h = Indicador de hemólisis

C_e = Concentración del extracto crudo

Absorbancia = Absorbancia a 415nm a distintas concentraciones

Estándar = Estándar de anticoagulante

En cuanto al bioensayo de *Artemia salina* se determinó la DL_{50} de acuerdo a Lehmann (1979).

5. RESULTADOS

5.1 IDENTIFICACIÓN DE NEMATOCISTOS

Se obtuvo un total de 12.3042 gr de peso seco extraído a partir de la homogenización de 12 anémonas enteras de la especie *L. danae*. Este material se observó al microscopio para verificar la descarga de los nematocistos, obteniendo micrografías y con ello observando tres distintos tipos según la guía de identificación de Mariscal 1974, que nos indica de acuerdo al tamaño, forma y cantidad de espinas el tipo de nematocisto:

- Microbásico amastigoforo (MiAm) (Fig. 5)
- Macrobásico amastigoforo (MaAm) (Fig. 6)
- Espirocistos (Sp) (Fig. 7)

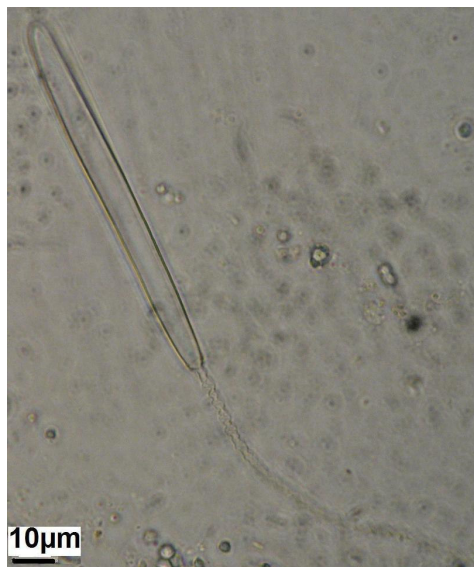


Figura 5 Micrografía del nematocisto descargado identificado como **Microbásico mastigoforo (MiAm)**

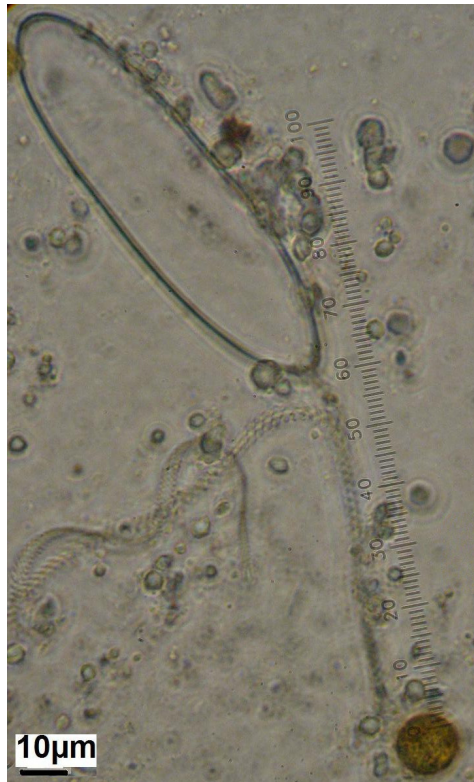


Figura 6 Micrografía del nematocisto descargado identificado como **Macrobásico amastigoforo (MaAm)**

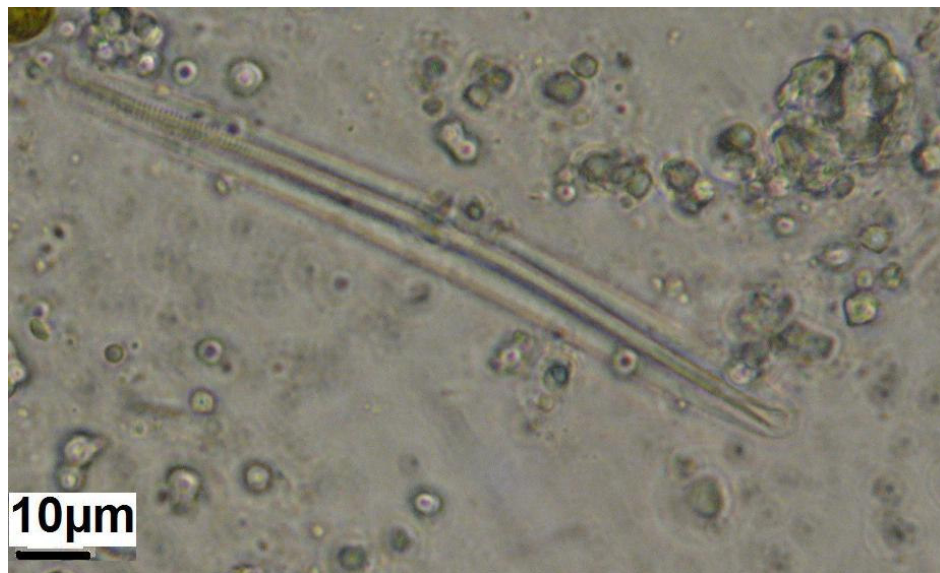


Figura 7 Micrografía del nematocisto sin descargar, identificado como **Espirocisto (Sp)**.

5.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DEL EXTRACTO

Se cuantificó el contenido de proteína del extracto crudo liofilizado presente en la anémona *L. danae* por medio del método de Bradford (1976) en concentraciones de 2, 5, 8, 11, 14 y 20mg/ml presentando una concentración promedio de 0.553mg/ml (tabla III).

Tabla III Cuantificación de proteína en el extracto crudo en la anémona *Lebrunia danae*.

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ABSORBANCIA	PROTEÍNA (mg/ml)
2	0.451	0.537
5	0.477	0.545
8	0.487	0.548
11	0.523	0.559
14	0.523	0.559
20	0.557	0.570

5.3 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR POR MEDIO DE ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE.

Se identificaron claramente 5 bandas mediante la tinción de Comassie, con valores reconocidos de acuerdo a las bandas estándares de bajo peso molecular con valores de I) 10, II) 13.8, III) 21, IV) 25 y V) 35KDa (Fig. 8).

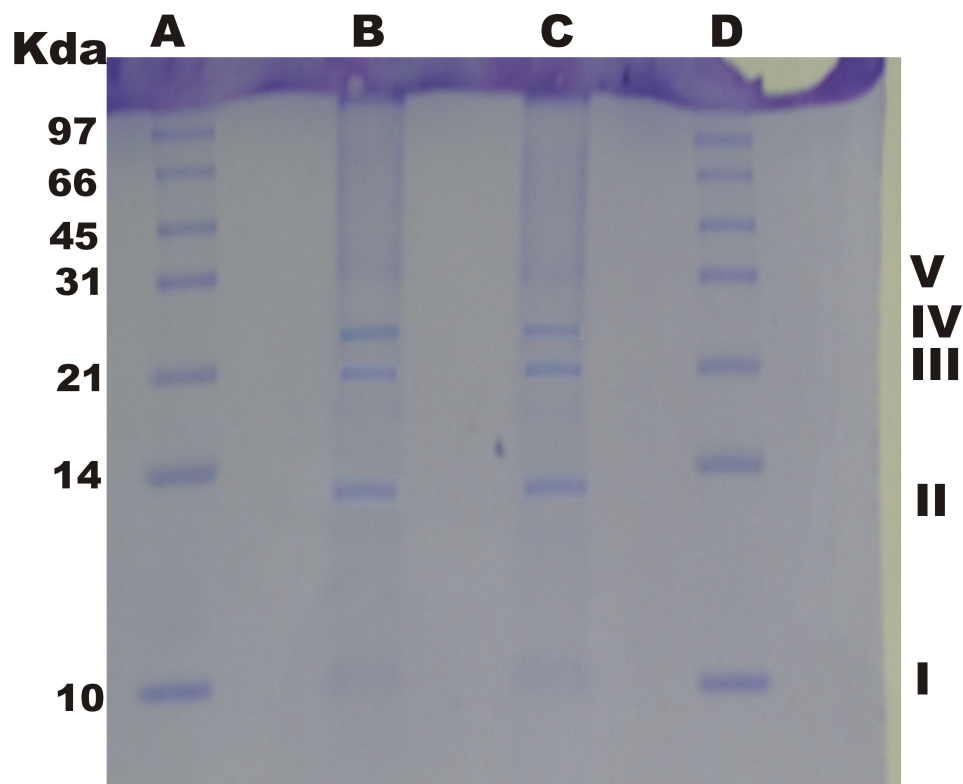


Figura 8 Electroforesis en gel acrilamida SDS-PAGE en una concentración de 12%. Los carriles B y C corresponden al extracto crudo de la anémona *Lebrunia danae* en una concentración de 6.7mg/ml y los carriles A y D al marcador de bajo peso molecular.

5.4 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL EXTRACTO CRUDO CON LOS SIGUIENTES BIOENSAYOS:

5.4.1 Bioensayo neurotóxico

- Ensayo en *Ocypode quadrata* (Béress y Zwick, 1980)

Con el apoyo de este bioensayo se fue monitoreando la fracción activa en cada una de las columnas utilizadas durante la realización de la cromatografía líquida de alta presión. Observando inmediatamente después de la inyección de 0.1ml del extracto crudo de la anémona *L. danae* en la tercera pata caminadora del cangrejo una

reacción de lentitud en movimientos, seguido de la pérdida parcial de las patas y finalmente convulsiones hasta llegar a la muerte de los organismos, se seleccionaron los que murieran en un tiempo máximo de 60 minutos.

5.4.2 Bioensayo citotóxico

- Bioensayo en *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982)

De acuerdo a la actividad previa registrada en Cruz, 2004 se tomaron las concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 3.5, 4, 5 y 6mg/ml para estimar la CL₅₀.

Por lo anterior, para el siguiente bioensayo se utilizaron las concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 3.5, 4, 5, 6mg/ml, con una muerte del 100% a los 6mg/ml como indica la tabla VI y la concentración menor de muerte registrada fue de 1mg/ml con el 1.8%.

Para determinar la CL₅₀ se graficó la mortalidad y supervivencia con respecto al logaritmo de la concentración, el punto de intersección de estas líneas nos indica el logaritmo de la dosis letal media, correspondiente a 0.5 mg/ml. Encontrando una correlación del 95 % y una dosis letal media de 2.889 mg/ml determinado a partir de Lehmann (1979).

Tabla IV Valores acumulados de valores mortandad y supervivencia de *Artemia salina* en distintas concentraciones del extracto crudo de la anémona *Lebrunia danae*.

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	MUERTAS	VIVAS
Agua de mar	0.0	30
0.5	0.0	30.0
1	1.0	29.0

2	11.0	19.0
3	12.0	17.5
3.5	16.5	14.0
4	21.5	9.5
5	25.0	6.0
6	30.0	0.0

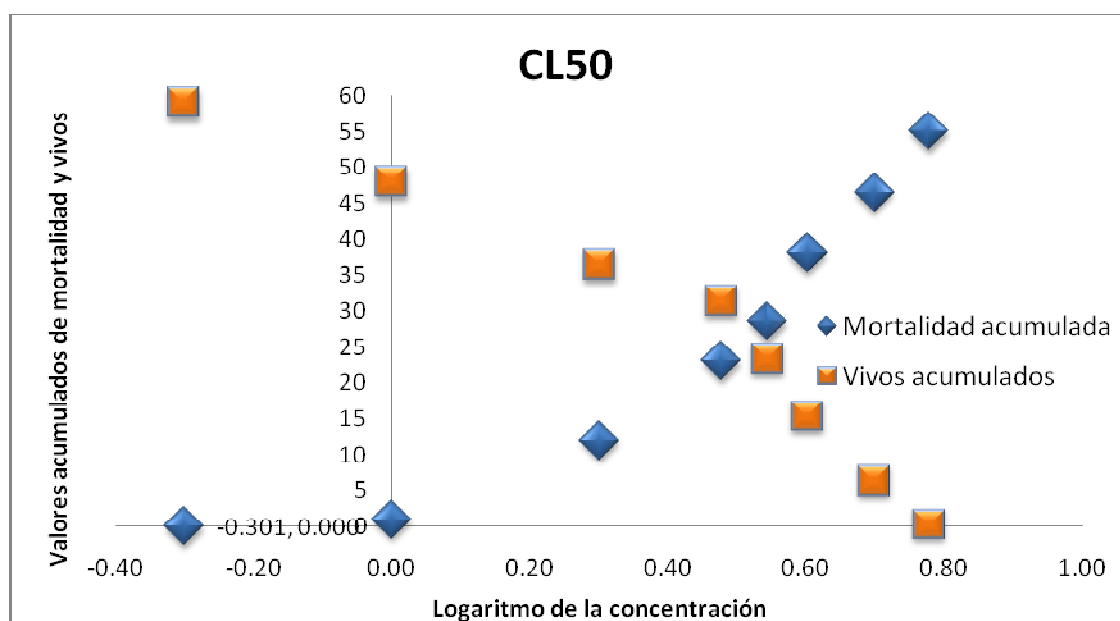


Figura 9 Gráfica de concentración letal media de *Artemia salina* determinados a partir del logaritmo de la concentración con respecto a los valores acumulados de mortandad y supervivencia.

- Bioensayo en *Harengula humeralis* (Lehmann, 1980)

Con ayuda de bioensayo preliminar, en la especie se determinaron las concentraciones 0.012, 0.037, 0.05, 0.075, 0.1, 0.15 y 0.2 mg/ml para estimar la CL₅₀ con organismos de 7 a 9 cm de longitud y con peso de 5 a 8 gr. De acuerdo a la tabla V se encontró una CL₅₀ de 0.05 mg/ml con un tiempo de vida de 6.74 horas.

Tabla V Tiempo de vida de *Harengula humeralis* con la inyección ventral a distintas concentraciones del extracto crudo de la anémona *Lebrunia danae*

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	TIEMPO DE VIDA (horas)
0	24.00
0.012	17.35
0.037	11.99
0.05	6.74
0.075	5.76
0.1	5.07
0.15	3.91
0.2	1.61

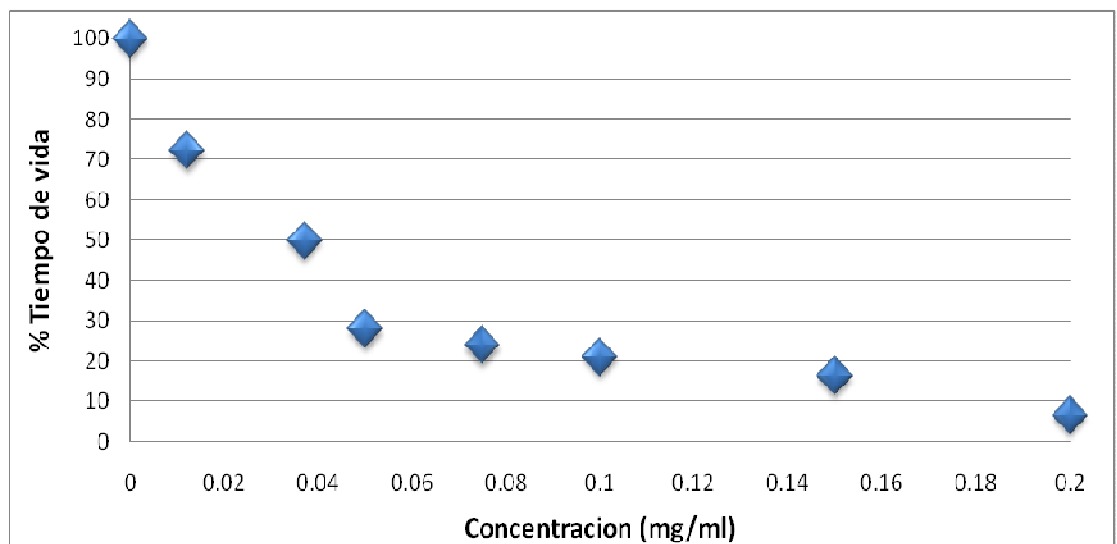


Figura 10 Gráfica de concentración letal media determinados a partir de la concentración con respecto al porcentaje del tiempo de vida de *Harengula humeralis*.

5.4.3 Ensayo hemolítico (Martín & Padilla, 1973)

Se encontró una actividad debida a la desintegración de los eritrocitos o también llamada hemólisis en tres distintos tipos de sangre A⁺, B⁺ y O⁺, medido a partir de la absorbancia causada por distintas concentraciones a cada una de ellas del extracto crudo de la anémona *Lebrunia danae* (Figs. 11, 12 y 13).

En eritrocitos tipo A⁺ se encontró una concentración promedio de 0.9518 µg de proteína/mg en B⁺ 0.8791 µg de proteína/mg y finalmente en O⁺ una concentración promedio de 0.9629 µg de proteína/mg. Con ello se observa que se tiene una mayor sensibilidad en los eritrocitos tipo O⁺, seguidos del tipo A⁺ y finalmente en B⁺.

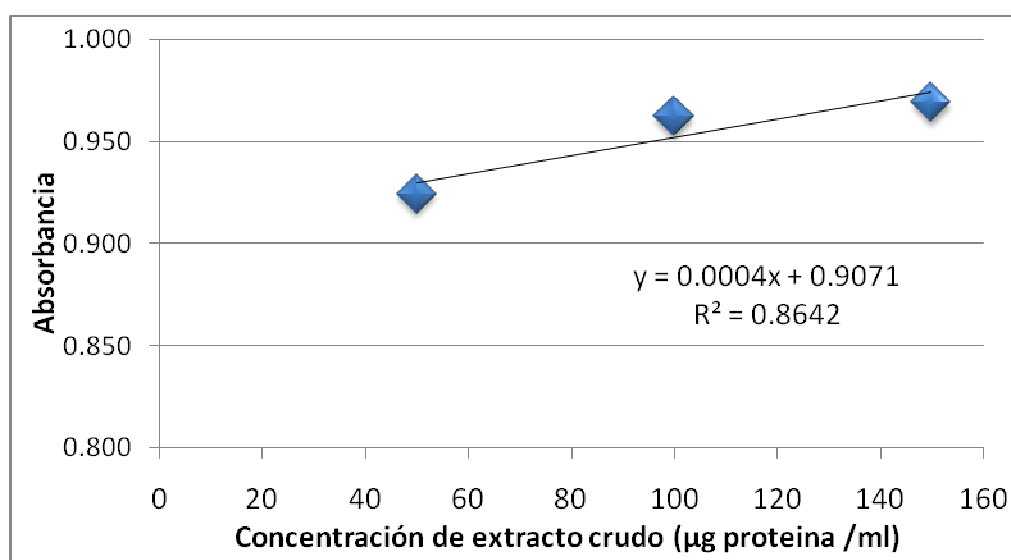


Figura 11 Dosis-respuesta de la hemólisis determinada en eritrocitos tipo A⁺ a una absorbancia a 415nm, causada por exposición a las diferentes concentraciones del extracto de *L. danae*

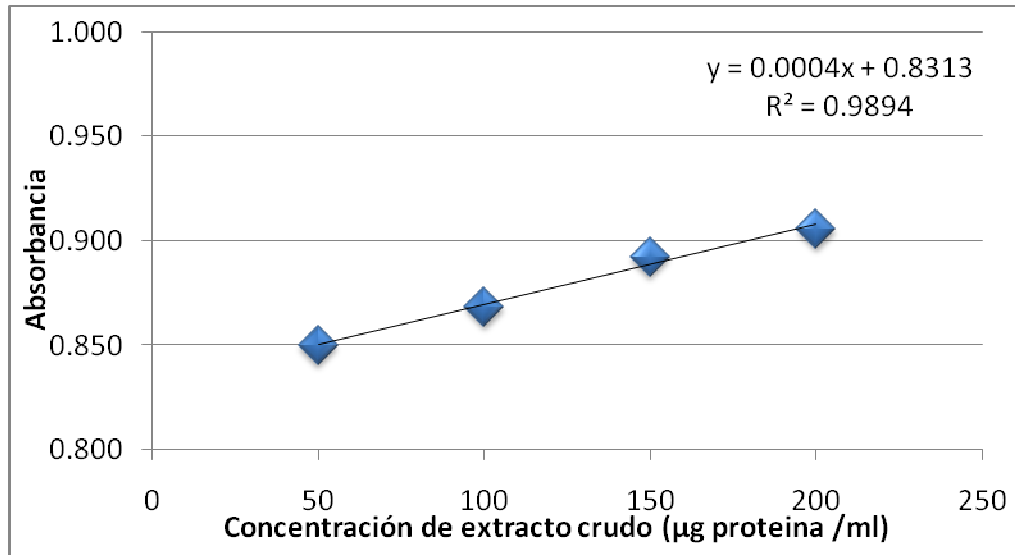


Figura 12 Dosis-respuesta de la hemólisis determinada en eritrocitos tipo B⁺ a una absorbancia a 415nm, causada por exposición a las diferentes concentraciones del extracto de *L. danae*

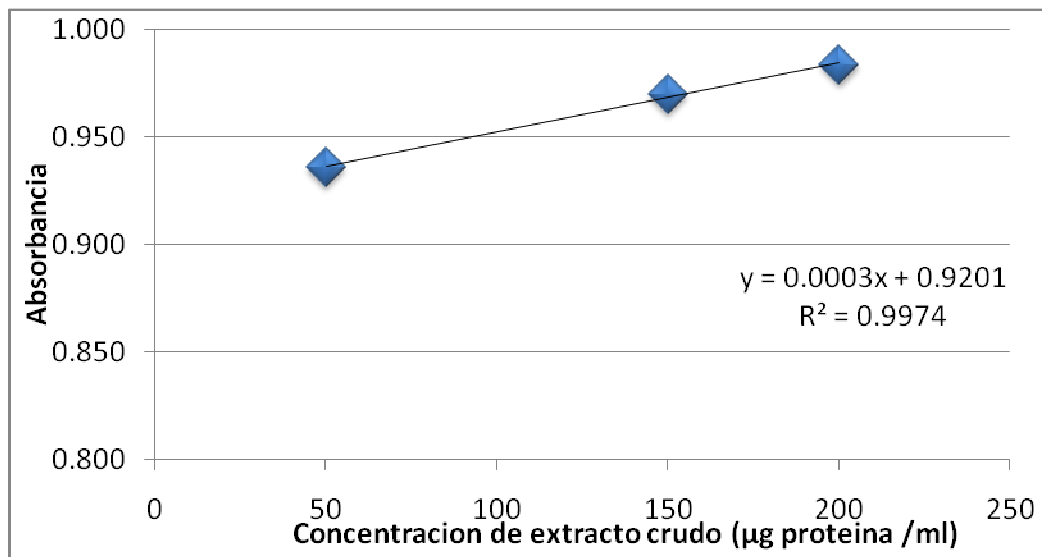


Figura 13 Dosis-respuesta de la hemólisis determinada en eritrocitos tipo O⁺ a una absorbancia a 415nm, causada por exposición a las diferentes concentraciones del extracto de *L. danae*

Torrens (2004), menciona que no existe diferencia significativa entre los distintos tipos de sangre, para cuantificar hemólisis por inducción de la toxina del Cnidario

Carybdea marsupialis por ello se realizó un indicador (Tabla VI) para observar si existía una diferencia significativa, entre los tres distintos tipos de sangre analizadas en la anémona *L. danae* en base a la siguiente fórmula:

$$I_h = \frac{(C_e * Absorbancia)}{\text{(Estándar)}}$$

I_h = Indicador de hemólisis

C_e = Concentración del extracto crudo

Absorbancia = Absorbancia a 415nm a distintas concentraciones

Estándar = Estándar de anticoagulante

Tabla VI Indicador de diferencia significativa entre los distintos tipos de sangre analizados A⁺, B⁺ y O⁺.

CONCENTRACIÓN	A	B	C	INDICADOR
50	1.848666667	2.65625	2.339166667	2.28136111
100	3.848	5.4270833	-	4.63754167
150	5.814	8.365625	7.2725	7.15070833
200	-	-	9.833333333	9.83333333

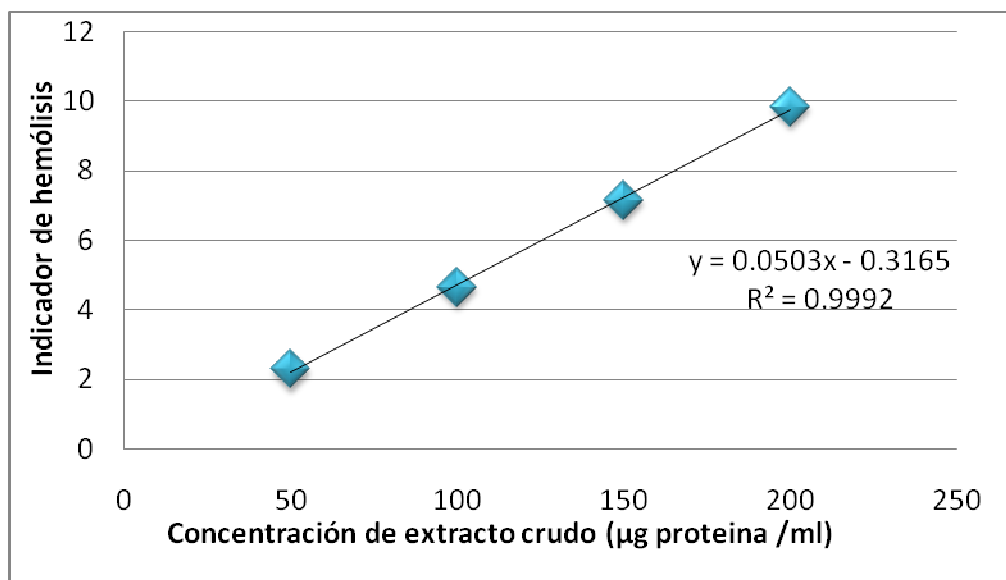


Figura 14 Indicador de hemólisis con respecto a la concentración de extracto crudo de la anémona *Lebrunia danae*.

Se observa en la figura 14 que el indicador de hemólisis se comporta de una forma lineal lo que nos indica que al aumentar la concentración, aumenta la hemólisis observando que no existe una diferencia de comportamiento entre los tres distintos tipos de eritrocitos.

Es por ello que de acuerdo a este indicador se estandarizaron los datos para observar su comportamiento y se observó un crecimiento lineal con respecto a la concentración.

5.5 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

La purificación se realizó con 1g de extracto crudo liofilizado de *L. danae* hidratado con 20ml de agua desionizada en la figura 15 se muestra el cromatograma obtenido de la purificación en Sephadex G-50 con la separación de cuatro fracciones de la toxina, evaluadas cada una de las fracciones en la especie *Ocypode cuadrata* (Beress y Zwick, 1980), resultando la fracción III con actividad neurotóxica, determinada por

parálisis de sus extremidades, convulsiones hasta llegar a la muerte de los organismos, en un tiempo máximo de 60 minutos.

Posterior a ello con la previa selección de la fracción activa se introdujo en una columna de intercambio aniónico en QAE Sephadex A 25, resultando 8 fracciones de las cuales solo las de mayor absorbancia se les realizó el bioensayo de cangrejo para determinar su actividad neurotóxica, resultando la fracción I-QAE activa, visto en la figura 15.

Seguido de ello se realizó una cromatografía de intercambio catiónico en Fractogel EMD SO_3^- con un total de 9 fracciones determinando la actividad en I-Fractogel (Fig. 17), para su posterior eliminación de sales con Sephadex G-25 M (Fig. 18).

5.5.1 Cromatografía líquida

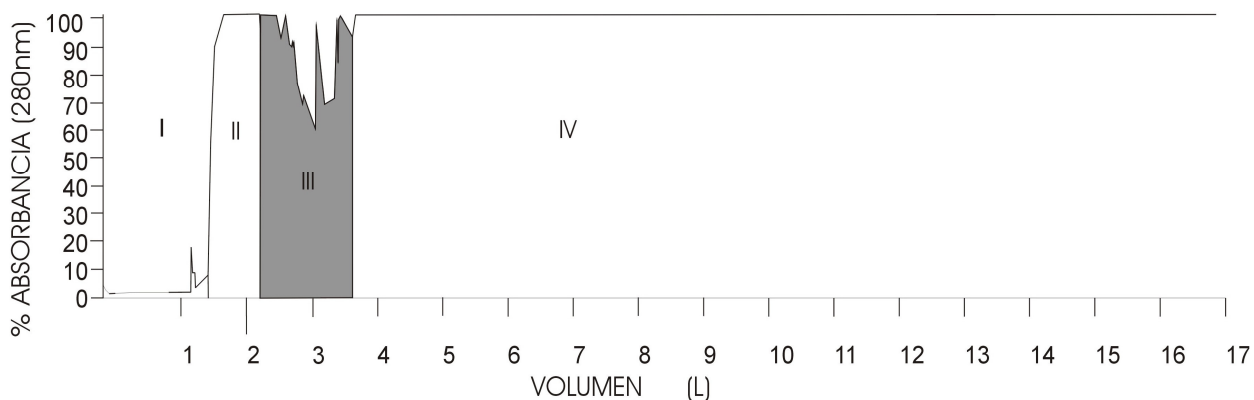


Figura 15 Separación por cromatografía líquida de baja presión del extracto crudo de *L. danae* con 1g del extracto cargado con Sephadex G-50 M en una columna de 2.5 x 51cm durante 36hrs como eluente ácido acético a 0.7M a una velocidad de flujo constante de 2ml/min.

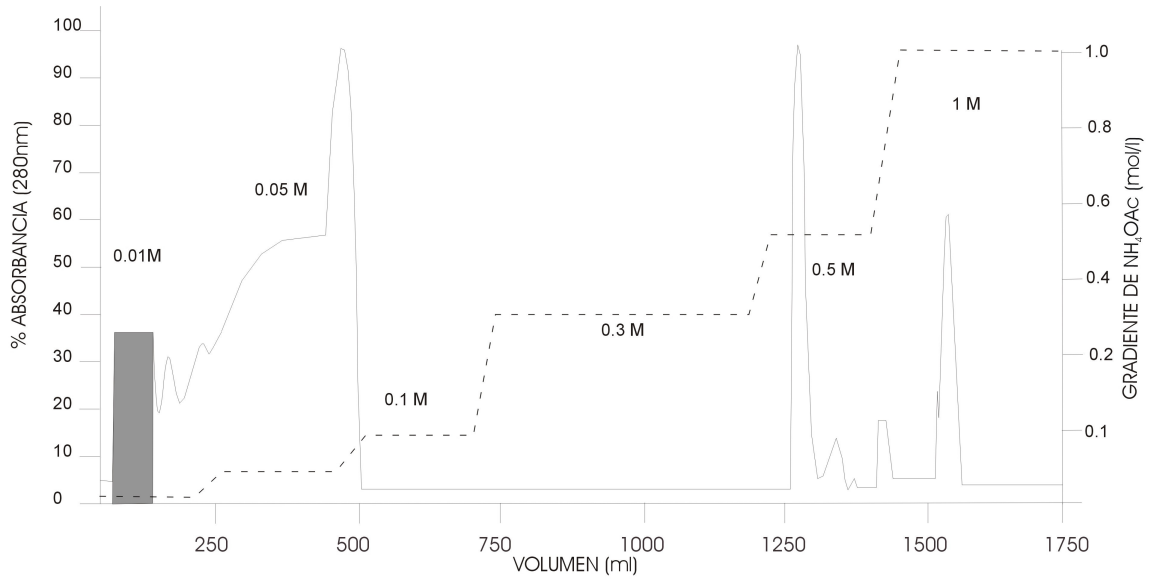


Figura 16 Separación por cromatografía de intercambio aniónico de la fracción III-G-50 en QAE Sephadex A-25 en una columna de 46 x 0.5 cm a un flujo de 1ml/min, como eluente acetato de amonio con gradiente escalonado que va del 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M todos a pH de 8.3.

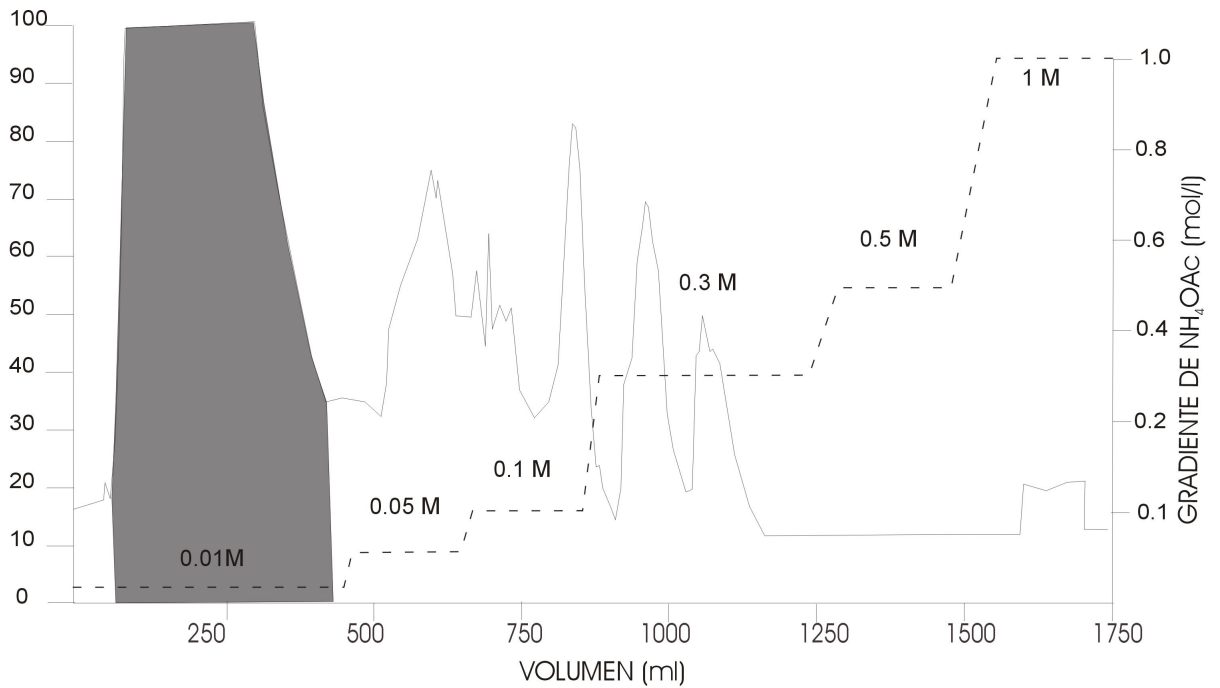


Figura 17 Separación por cromatografía de intercambio catiónico de la fracción III-G50/I-QAE cargado con Fractogel EMD SO_3^- en una columna de 37.5 x 0.5 cm a un flujo de

2ml/min con buffer de acetato de amonio con gradiente escalonado que va de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M a un pH de 5.4.

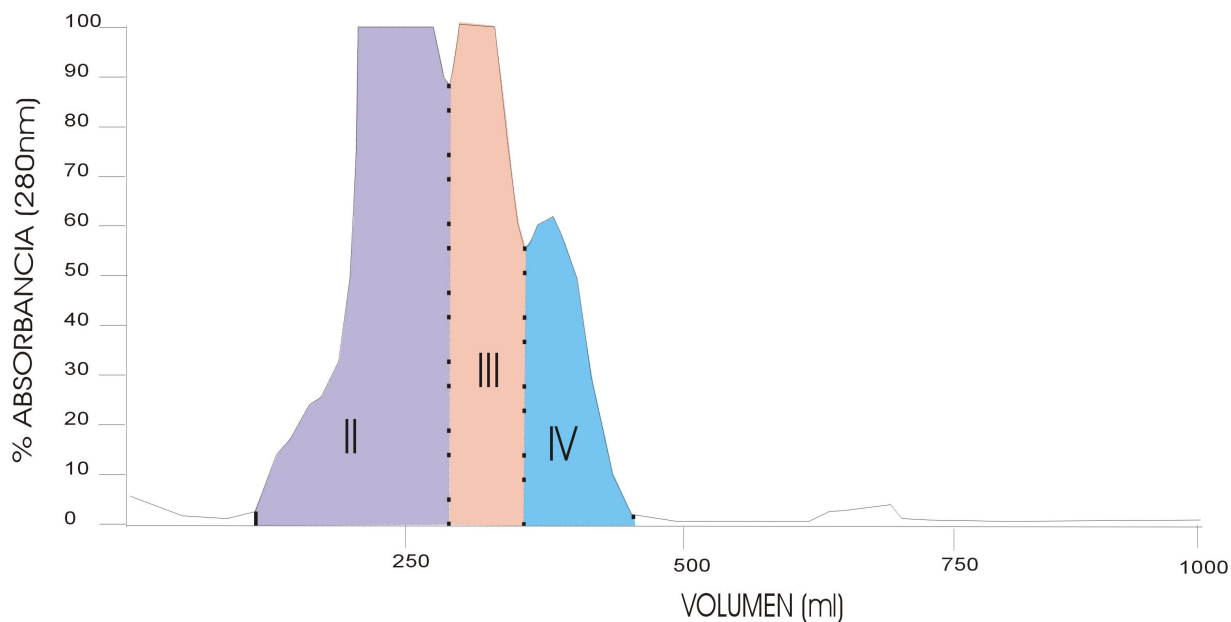


Figura 18 Eliminación de sales con Sephadex G-25 de la fracción III-G50/I-QAE/I-Fractogel en una columna de 73 x 1.5 cm a un flujo de 1.5ml/min en ácido acético 0.3 M.

Seguido de la eliminación de sales mediante Sephadex G-25 se procedió a la separación por cromatografía líquida de alta resolución, de las tres fracciones obtenidas y al mismo tiempo con actividad neurotóxica en cangrejos (Figs. 19, 20 y 21).

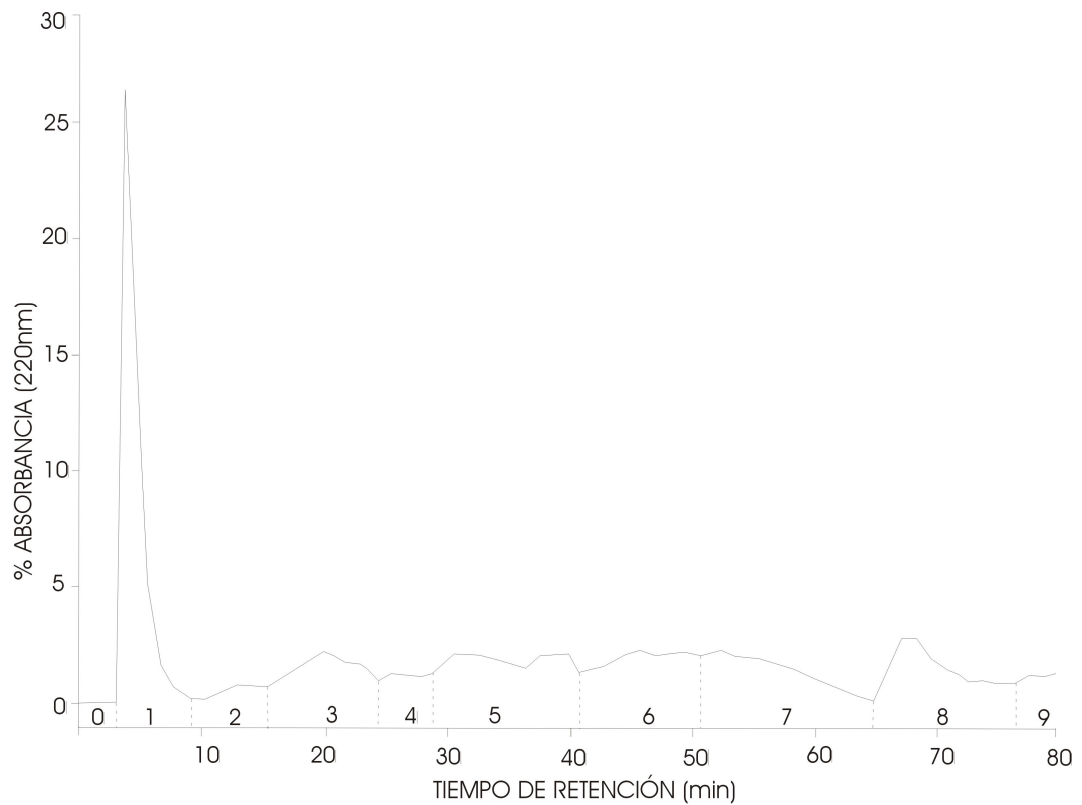


Figura 19 Separación por cromatografía líquida de alta resolución de la fracción III-G50/I-QAE/I-Fractogel/II-G25 utilizando como buffer de elusión acetonitrilo, ácido trifluoroacético y agua grado HPLC, se utilizó un gradiente escalonado de 10 a 90 % con una columna C4, de 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 μ m, módulo de distribución de solventes ProStar, detector UV-VIS para medir longitud de onda a 280 nm y automuestreador ProStar. La corrida para muestra tuvo una duración de 80 minutos.

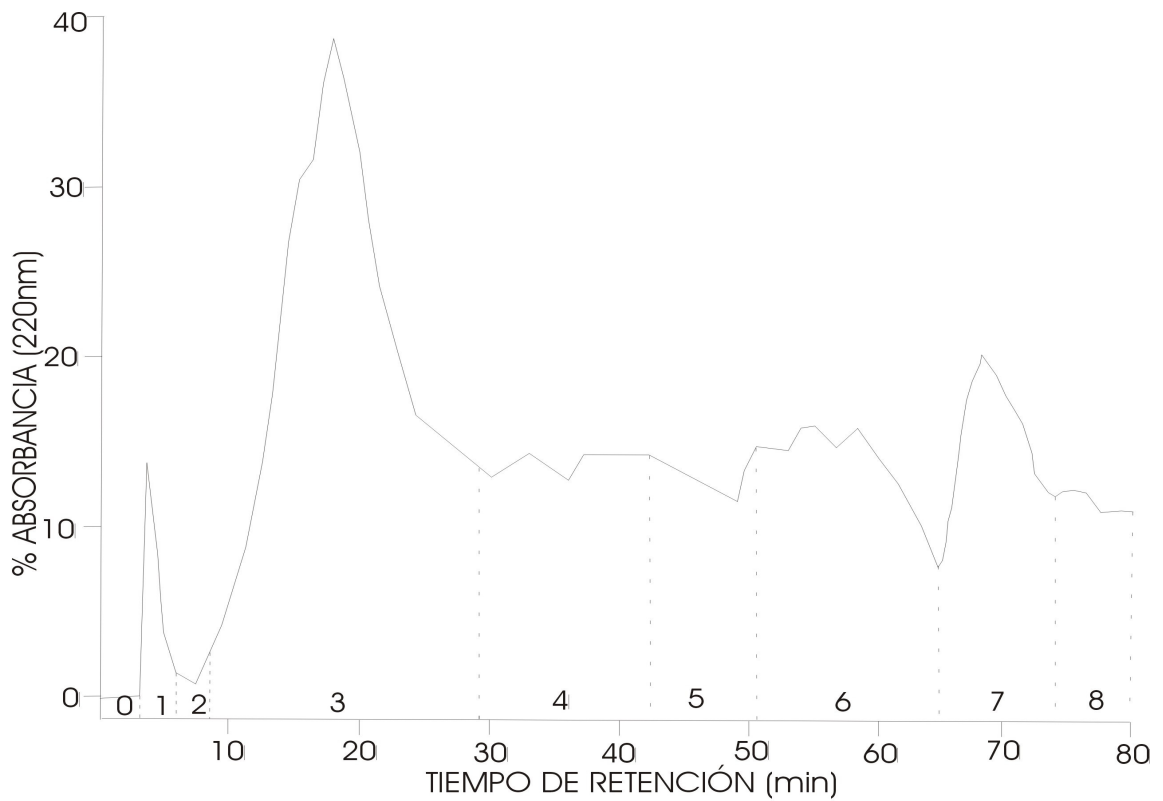


Figura 20 Separación por cromatografía líquida de alta resolución de la fracción III-G50/I-QAE/I-Fractogel/III-G25 utilizando como buffer de elusión acetonitrilo, ácido trifluoroacético y agua grado HPLC, se utilizó un gradiente escalonado de 10 a 90 % con una columna Microsorb C4, de 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 μ m, modulo de distribución de solventes ProStar, detector UV-VIS para medir longitud de onda a 280 nm y automuestreador ProStar. La corrida para muestra tuvo una duración de 80 minutos.

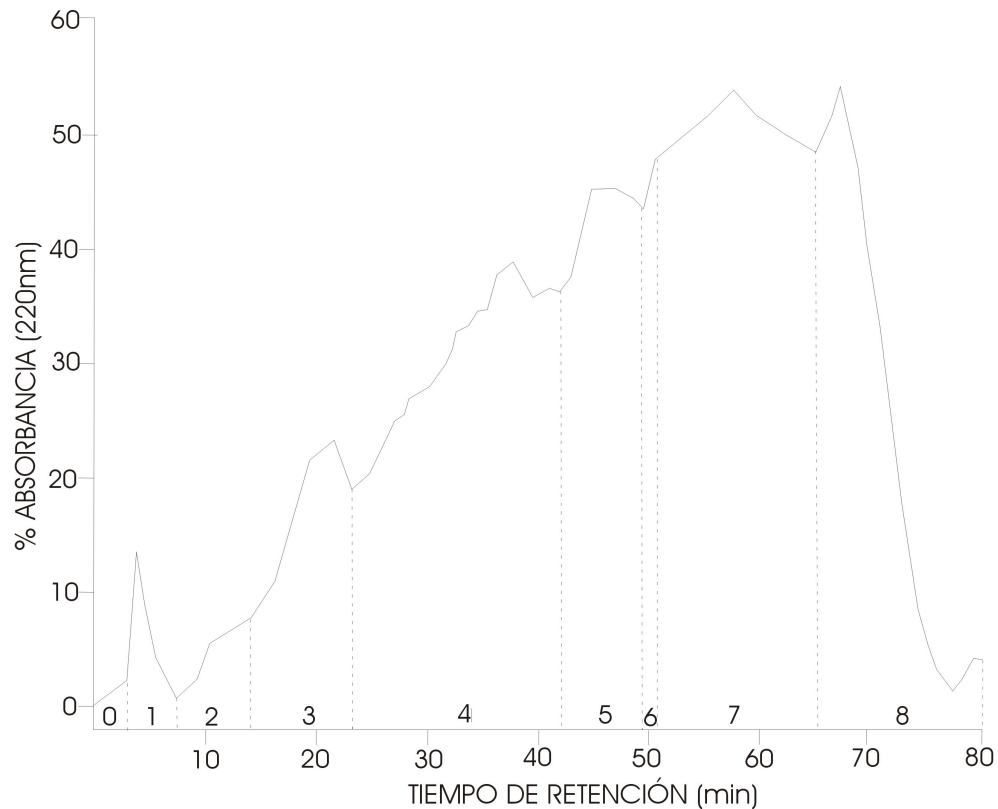


Figura 21 Separación por cromatografía líquida de alta resolución de la fracción III-G50/I-QAE/I-Fractogel/IV-G25 utilizando como buffer de elusión acetonitrilo, ácido trifluoroacético y agua grado HPLC, se utilizó un gradiente escalonado de 10 a 90 % con una columna Microsorb C4, de 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 μ m, módulo de distribución de solventes ProStar, detector UV-VIS para medir longitud de onda a 280 nm y automuestreador ProStar. La corrida para muestra tuvo una duración de 80 minutos.

Por lo que finalmente se obtuvieron tres fracciones con actividad en cangrejos derivadas de cada una de las fracciones pasadas por cromatografía líquida de alta resolución:

- 1) III-G50/I-QAE/I-Fractogel/II-SephadexG25/1HPLC
- 2) III-G50/I-QAE/I-Fractogel/III-SephadexG25/3HPLC
- 3) III-G50/I-QAE/I-Fractogel/IV-SephadexG25/7HPLC

Los tiempos de muerte de los cangrejos oscilaron entre los 3 y 4 minutos para las tres fracciones activas, por lo que no se vio una diferencia significativa entre ellas.

5.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD

De la mezcla orgánica realizada a partir de nematocistos descargados de la anémona *L. danae* colocados en una mezcla de metanol:diclorometano 7:3 libre de materia orgánica se liofilizó obteniendo 4.5631g.

Se inició con 50mg del extracto crudo orgánico liofilizado sometido a una separación mediante cromatografía de fase reversa C-18 en una columna de 3 x 19 obteniendo nueve fracciones; cada fracción fue concentrada por rotavoración y secada al vacio con un gran total obtenido de aproximadamente 42mg.

Tabla VII Masas de las fracciones obtenidas en la separación del extracto crudo por cromatografía en columna fase reversa (C-18).

FRACCIÓN	ELUENTE	PROPORCIÓN	MASA (gr)
A	Agua	100	0.0116
AM 3:1	Agua : Metanol	3 : 1	0.0134
AM 2:1	Agua : Metanol	2 : 1	0.0007
AM 1:1	Agua : Metanol	1 : 1	0.0007
AM 1:2	Agua : Metanol	1 : 2	0.0137
AM 1:3	Agua : Metanol	1 : 3	0.0008
M	Metanol	100%	0.0005
MA 1:1	Metanol : Acetonitrilo	1 : 1	0.0007

A 100	Acetonitrilo	100%	No se determino
-------	--------------	------	-----------------

5.6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

5.6.1.1 Determinación de actividad en canales iónicos

Los extractos orgánicos obtenidos a partir de cromatografía en fase reversa se le realizaron ensayos citotóxicos sobre canales iónicos y líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón (H460).

En cuanto al bioensayo de canal de Na⁺, se encontró en una concentración de 20 ug/ml que existe un mayor actividad en Agua:Metanol 1:3 con 1.699 ug/ml comparado con el bloqueo que fue casi la tercera parte en Agua:Metanol 2:1 con 0.606 ug/ml, visto en la tabla VIII.

Tabla VIII Actividad y bloqueador en canal ionico de Na⁺ de las 7 fracciones obtenidas; se remarcan en negro las fracciones que presentaron mayor actividad.

FRACCIÓN	ACTIVIDAD 20 ug/ml	BLOQUEADOR 20 ug/ml
A	1.065	0.102
AM 3:1	1.695	0.149
AM 2:1	1.615	0.606
AM 1:1	1.146	0.088
AM 1:2	1.234	0.103
AM 1:3	1.699	0.521
M	1.549	0.254

PbTX-2	1.585	
STX		1.422

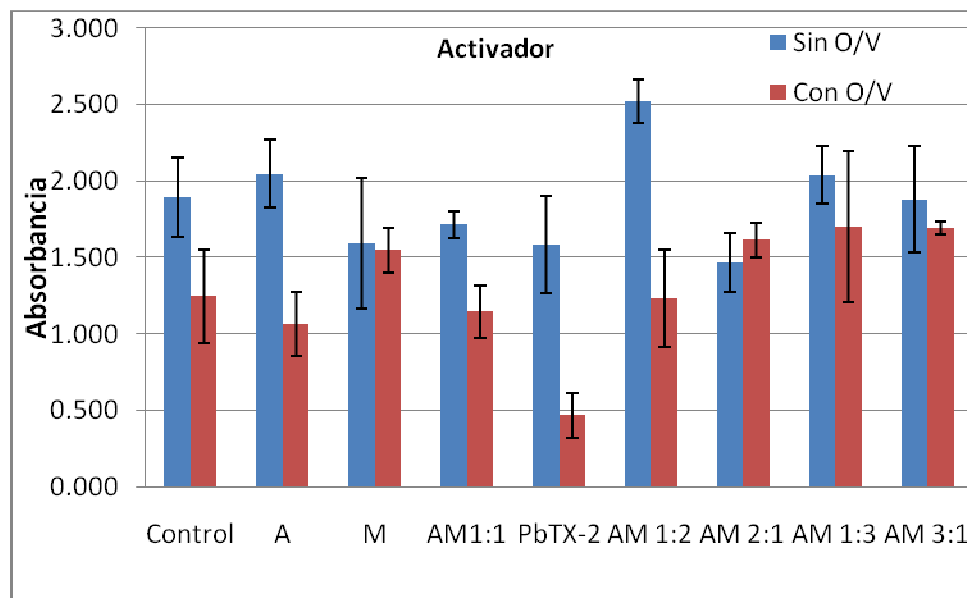


Figura 22 Activación del canal iónico de Na⁺ probado en cada una de las fracciones obtenidas.

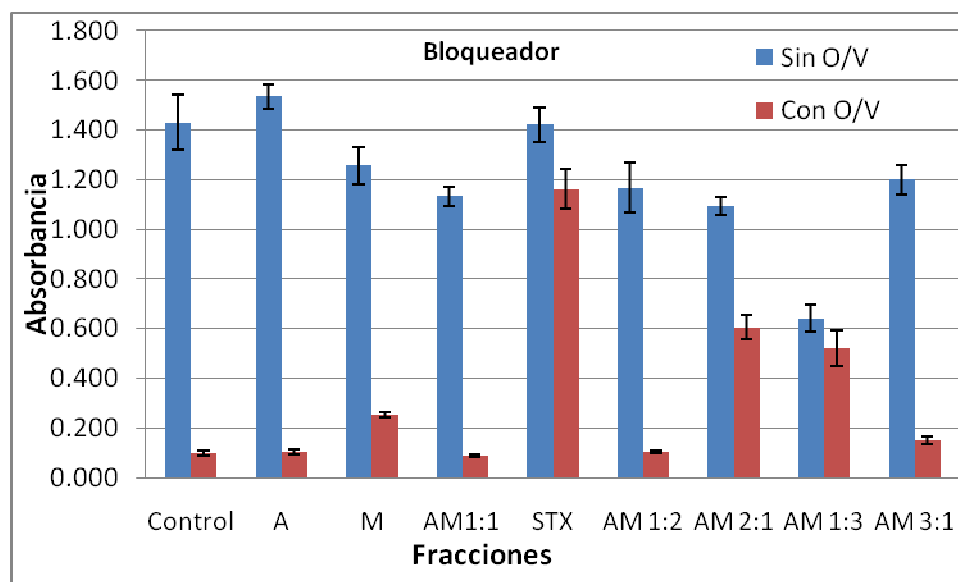


Figura 23 Bloqueador del canal iónico de Na⁺ probado en cada una de las fracciones obtenidas.

Por lo que se observa que existe mayor activación que bloqueo del extracto de *L. danae* debido a que existe una mayor apertura del canal que un bloqueo, de casi la tercera parte de activación.

5.6.1.1 Determinación de actividad en células anticancerígenas

La mayor actividad encontrada en las células de cáncer de pulmón H460 fue en la fracción Agua:Metanol 1:3 con 1.667 ug/ml en la concentración de 3 ug/ml por lo que en la menor concentración fue donde se encontró la mayor actividad seguido de 1.677 ug/ml en la fracción de Agua:Metanol 2:1 en la misma concentración.

Tabla IX Actividad de las 7 fracciones obtenidas en células de cáncer de pulmón H460. Se remarcan en negro las fracciones que presentaron mayor actividad.

FRACCIÓN	ACTIVIDAD 3 ug/mL	ACTIVIDAD 30 ug/ml
A	1.862	1.837
AM 3:1	2.035	1.139
AM 2:1	1.647	0.530
AM 1:1	2.033	1.314
AM 1:2	2.049	1.601
AM 1:3	1.666	0.533
M	0.605	0.531

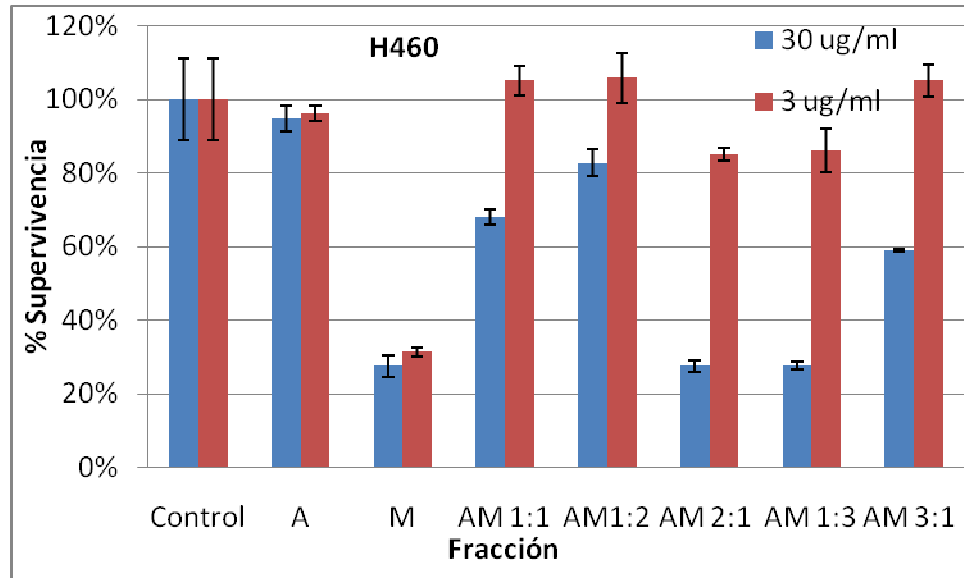


Figura 24 Supervivencia de las células de cáncer de pulmón H460 probadas en cada una de las fracciones obtenidas.

6. DISCUSIONES

Debido a que existe poca información sobre las toxinas presentes en la anémona *Lebrunia danae* se optó por llevar a cabo la purificación de los compuestos activos evaluando con ello su actividad citotóxica, neurotóxica y hemolítica, mediante la técnica de Kem, *et al.*, (1989).

Se selecciono la técnica de Kem, *et al.* (1989), debido a que se induce la descarga de los nematocistos por medio de estímulos mecánicos.

Se tomó un estímulo mecánico de baja intensidad para la descarga de los nematocistos, ya que según Pantin (1942) los estímulos químicos, físicos o algún tratamiento fuerte pueden romper la célula y liberar la toxina pero provocan la pérdida de cierta actividad biológica. Por ello se descargaron con una varilla de agitación y un mortero de vidrio con la finalidad de que la toxina no sufra daño en su composición química.

Posterior a la descarga de los nematocistos se identificaron tres tipos de ellos con la ayuda de un microscopio compuesto. Estos fueron: Microbásico amastigoforo (MiAm), Macrobásico amastigóforo (MaAm) y Espirocistos (Sp), según la guía de identificación de Mariscal (1974), en la que se midió el diámetro de la cápsula, como de los túbulos, tamaño, forma, abundancia de las espinas sobre la superficie del túbulo, coincidiendo todos con los encontrados por Cruz (2004).

En cuanto a la cuantificación de proteína del extracto crudo se encontró una concentración mayor de 0.57 mg/ml en 20 mg/ml, esta cantidad de proteína es menor a la reportada por Cruz (2004) quien obtuvo 1.18 mg/ml cuando se probó en 15 mg/ml

y según Morales (2007) quien reportó 8.5 mg/ml a la misma concentración. Lo anterior debido a que posiblemente la descarga de nematocistos fue mayor en los últimos casos. Cabe mencionar que si las proteínas sufren cambios de pH, alteraciones en la concentración o variaciones bruscas de temperatura, la solubilidad de las proteínas puede verse reducida hasta el punto de producirse la precipitación. Las proteínas que se hallan en este estado sufren una variación de conformación denominada desnaturalización (Nelson y Cox, 2006) y con ello se dice que el extracto crudo al salir del rango reportado con anterioridad por los otros autores pudo haber sufrido alguna desnaturalización.

El peso molecular fue determinado con estándares de bajo peso, encontrando bandas bien definidas con valores de I) 10, II) 13.8, III) 21, IV) 25 y V) 35KDa, similares a la reportadas en Cruz (2004).

Durante la purificación se utilizaron distintos tipos de cromatografía líquida de intercambio iónico y filtración por gel, seguido de ello se determinó la fracción activa con ayuda de cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* (Béress y Zwick, 1980), con un ensayo preliminar para observar el efecto presente en el extracto crudo, observando la respuesta que presentaban durante los primeros 60 minutos, seleccionando con esta misma base la fracción activa de la purificación.

La purificación se realizó iniciando con Sephadex G-50 con el que se logró separar las fracciones por peso molecular, seguido de geles de intercambio aniónico y catiónico, como la eliminación de sales en Sephadex G-25. La fracción activa encontrada en *L. danae* fue III-G50/I-QAE/I-Fractogel/Sephadex G-25 y las tres fracciones obtenidas de esta última fueron corridas en HPLC.

La caracterización del extracto como neurotóxico y citotóxico se realizó con *Artemia salina* que es un examen indirecto para actividad anticancerígena. Este ensayo mide el grado de toxicidad reflejado en el porcentaje de mortalidad del crustáceo y puede ser indicativo de la presencia o efecto de algún compuesto o metabolito. Existe también una correlación de que el 90 % de las sustancias que han sido probadas en *Artemia* y que resultan tóxicas, han sido tóxicas e inhiben el crecimiento de líneas celulares de cáncer (McLaughlin, 1991; Torres, 2001).

Con el extracto crudo se analizaron distintas concentraciones tomando como referencia la actividad previamente reportada por Cruz (2004), con una máxima concentración de 8mg/ml con una mortalidad del 96.9 % y su dosis letal media de 2.82 mg/ml en comparación con lo encontrado en este trabajo, donde la CL_{50} fue menor, con un valor de 0.5 mg/ml y una DL_{50} muy similar de 2.889 mg/ml. Por lo anterior en el extracto crudo se observó una actividad citotóxica por lo que presentó un alto potencial anticancerígeno comprobado más adelante en el bioensayo con células H460.

Los peces son organismos vertebrados y pueden ser usados para la evaluación de las sustancias presentes en las anémonas, debido a que en ocasiones ellos forman parte del alimento sirviendo como parte sustancial de sus necesidades metabólicas mediante la absorción de materia disuelta en el ambiente (Beress, *et al.*, 1975).

El siguiente bioensayo de citotoxicidad se realizó en *Harengula humeralis*, un pez con distribución en el Caribe. Se inyectaron vivos en la parte ventral usando distintas concentraciones. Se determinaron las concentraciones en mg/ml por no existir una diferencia significativa entre el peso y longitud de ellos. Ya inyectada la toxina en los

organismos se tuvieron en observación durante 24 horas para finalmente determinar su CL₅₀ de 0.05 mg/ml con un tiempo de vida de 7.14 horas.

La actividad hemolítica es uno de los métodos biológicos ampliamente utilizado por ser sensible, rápido y sencillo, conllevando a la realización de un tratamiento dosis-respuesta rigurosa. Este ensayo se basa en la capacidad de la toxina de romper los glóbulos rojos liberando al medio la hemoglobina afectando específicamente membranas celulares, dicho ensayo se realizó en distintas concentraciones determinadas en tres distintos tipos de sangre A⁺, B⁺ y O⁺, cuya medición se realizó a 415 nm.

En eritrocitos tipo B⁺ se encontró 0.8791 µg de proteína/mg seguidos de tipo A⁺ con una concentración promedio de 0.9518 µg de proteína/mg y finalmente en tipo O⁺ con una concentración promedio de 0.9629 µg de proteína/mg. Con ello se observa que se tiene una mayor sensibilidad en los eritrocitos tipo B⁺, seguidos del tipo A⁺ y finalmente tipo O⁺. El extracto causó hemólisis en los tres tipos de eritrocitos.

Cruz, (2004) encontró que *L. danae* contiene toxinas que son capaces de inducir hemólisis en eritrocitos de borrego, vaca y cerdo; los cuales presentaron distintos niveles de sensibilidad respecto a las diferentes concentraciones del extracto crudo, con ello se puede determinar que tanto eritrocitos humanos como de animales la anémona *L. dane* induce hemólisis.

Santamaría *et al.*, (2002) reporta que la anémona *Bartholomea annulata* contiene citolisinas capaces de inducir la hemólisis en eritrocitos de ratón, con un efecto directamente proporcional entre el aumento del contenido de proteína y la hemólisis,

por mencionar la acción de las toxinas de las anemonas en eritrocitos de organismos terrestres.

Las toxinas con acción sobre canales de Na^+ son polipéptidos con 3 puentes de disulfuro y tienen pesos moleculares de alrededor de 5KDa (Garateix, *et al.*, 2003). Peso cercano al encontrado en *L. danae* con 10KDa en la primera banda del gel en poliacrilamida.

El principal efecto de las neurotóxicas es retrasar la inactivación de canales de sodio mediante disparos repetitivos (cardiotóxicas) y el efecto de la arritmia, por lo cual el canal permanece abierto durante más tiempo, esto provoca un incremento notable en la excitabilidad de nervios y músculos, como consecuencia del aumento en la liberación de acetilcolina desde las terminaciones nerviosas (Castañeda, 2000). Los canales sodio constituyen un importante objetivo para los diferentes grupos de neurotoxinas que han contribuido a la caracterización estructural y funcional de este canal (Benoit, 1998 en Aneiros *et al.*, 2004).). El uso de toxinas, tales como sondas estructurales ha llevado a la identificación de la región del poro, sensor de voltaje, filtro de la selectividad y los segmentos del canal Na^+ vinculados a la inactivación.

Béress *et al.*, 1975 aislaron una serie de polipéptidos análogos a partir de la anémona *Anemonia sulcata* (ATXI, II, III Y IV), toxinas con propiedades similares han sido aisladas a partir de otras especies: *Anthopleura xantogrammica*, *Radianthus paumotensis*, *Condylactis gigantea*, *Heteractis macrodactylus*, *Phyllactis flosculifera*, *Stichodactyla giganteum* y *Stichodactyla helianthus*. Todas provocan actividad espontánea y repetitiva en axones y en músculo esquelético o cardíaco. Las propiedades químicas y las relaciones estructura-actividad de las toxinas de las

anémonas que actúan a nivel de los canales de sodio han sido revisadas ampliamente por Norton en 1991 (Castañeda, 2000).

Dada la importancia de la caracterización de los organismos por medio de los canales iónicos, se decidió analizar la actividad en canales de Na^+ de *L. danae* encontrando que actúa de forma muy similar en cuanto activador-bloqueador, debido que aunque sea en distintos rangos, se observa el mismo sentido de acción.

En un mayor rango se observa la activación, por parte de *L. danae* por lo que el canal presentó un retraso de inactivación provocando un incremento en la excitabilidad, como consecuencia del aumento en la liberación de acetilcolina desde las terminaciones nerviosas, ocurriendo con ello la unión del acetilcolina con su receptor, abriendo el canal llamado canal iónico regulado por ligando (Rudy *et al.*, 1992).

A partir de diferentes especies de anémonas se han obtenido diversos compuestos de naturaleza proteica, incluyendo a las citolisinas (proteínas de alrededor de 20 KDa que forman poros en las membranas celulares), además de toxinas polipeptídicas con acción sobre canales de Na^+ y K^+ . Algunos autores han sugerido que estos tres tipos de compuestos podrían actuar de forma sinérgica: las citolisinas podrían inicializar la despolarización de las células provocando la activación de los canales de Na^+ ; las toxinas Na^+ , al enlentecer el proceso de inactivación, y las de K^+ , al evitar la repolarización de la membrana, contribuirán a mantener la célula despolarizada produciendo una liberación en el neurotransmisor, así como potentes efectos en el corazón, las células musculares y las endocrinas (Schweitz *et al.*, 1995, Kem *et al.*, 1999 en Garateix *et al.*, 2003).

Fraser *et al* (1999) Mencionan que los canales de Na⁺ también juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer, porque según sus resultados participan en el desarrollo morfológico de las células MAT-LyLu de tal manera que podrían estar involucrados en el potencia metastático de estas células (Vargas, 2004).

En el bioensayo citotóxico de cáncer de pulmón H460 se encontró actividad relacionada a: una menor concentración del extracto mayor actividad y a mayor concentración se pierde la acción del extracto de *L. danae*.

Se encontraron las mismas fracciones activas en cáncer de pulmón H460 y en canales iónicos de Na⁺, por lo que la actividad se conserva en las mismas fracciones esto coincide con Fraser *et al* (1999) debido a que las fracciones presentes son citotóxicas y al actuar de forma sinérgica están relacionados por la capacidad de la toxina presente dentro de la anémona *L. danae*.

7. CONCLUSIONES

1. A partir del extracto crudo de *Lebrunia danae*, y mediante el método de Kem *et al.*, (1989) se aislaron tres distintos tipos de nematocistos: Microbásico amastigoforo (MiAm), Macrobásico amastigoforo (MaAm) y Espirocistos (Sp), identificados según Mariscal (1974).
2. El extracto crudo de *Lebrunia danae* contiene un promedio de proteína de 0.553mg/ml y pesos moleculares identificados de 10, 13.8, 21, 25 y 35KDa.
3. El bioensayo de *Artemia salina* mostró actividad citotóxica con una DL₅₀ de 2.889mg/ml en el extracto crudo.
4. El bioensayo en *Harengula humeralis*, mostró actividad citotóxica con una CL₅₀ de 0.05mg/ml en el extracto crudo.
5. En el bioensayo hemolítico no se encontraron diferencias significativas entre los tres distintos tipos de eritrocitos humanos al ser analizado el extracto crudo.
6. La fracción activa fue determinada por actividad neurotóxica observada en *Ocypode quadrata*
7. El extracto orgánico de *L. danae* presentó un efecto excitador de canal iónico de Na⁺ entre el rango de 1.065 y 1.699 ug/mL

8. El extracto orgánico de *L. danae* presentó actividad en la línea celular (H460) cáncer de pulmón entre el rango de 0.605 y 2.049 ug/mL

8. BIBLIOGRAFÍA

Aneiros, A., Garateix, A. 2004. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography*. 804: 41-53.

Barnes, R., Ruppert, E., 1980. *Zoología de los invertebrados*. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. México. 1114pp.

Béress, L., Zwick, J. 1980. Purification two crab-paralizing polypeptides from the sea anemone *Bolocera tuediae*. *Mar. Chem.* 8: 333-338.

Béress, L., Zwick, J. 1984. Biologically Active Compounds from Marine Invertebrates. 56: 153-159

Béress, L., Möller, H. 1975. Effect on fishes of two toxic polypeptides isolated from *Anemonia sulcata*. *Marine Biology*. 32: 189-192.

Béress, L., Bruhm, T., Sánchez, J., Wachter E., Schweitz. 2000. Sea anemone toxins acting on Na⁺ Channels and K⁺ Channels: Isolation and Characterization. En: *Methods and tools in biosciences and medicine animals toxin. Facts and protocols* Rochat, H. & M.F. Martin-Euclaire (eds.). Birkhäuser Verlag, Germany. 32-55pp.

Bosmans, F., Tytgat, J. 2007. Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na⁺ channels. *Toxicon* 49:550-560.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Castañeda, O. 2000. Toxinas animales: acciones facilitadoras de la transmisión colinérgica. *Revista biológica*. Vol. 14. N.1 1:15

Castañeda, O., Sotolongo, V., Amor, A.M., Stocklin, R.R., Anderson, A.J., Harvey, A.L., Engrstrom, A., Wernstedt, C., Karlsten, E. 1995. Characterization of potassium channel toxin from the gigantean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 33:5, 603-613.

Contreras, K., Jordán, E., Huitron, J. 2000. Programa de manejo Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos: México. Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 222 pp.

Cruz, K. 2004. Aislamiento y caracterización biológica de las sustancias activas presentes en la anémona *Lebrunia danae* (Duchassaing & Michelotti, 1860). Tesis licenciatura. UABC. 62 pp.

Devi, A., Sudarsanam, D. 2006. Biodiversity of marine pharma. School of Genomics. Loyola College Chennai.

Eno, A., Kenya, R., Ibu, T. 1998. Biological properties of a venom extract from the sea anemone, *Bunodosoma Cavernata*. *Toxicon* 36:2013-2020

Fenton, B., Arreguin, B., García, E., Heimer, E., Aguilar, M., Rodríguez, C., Arreguin, R. 2003. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillienis*. *Toxicon* 42: 525-532.

Fraser, S., Ding, Y., Liu, A., Foster, C., Djamgoz, B. 1999. Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cell line. *Cell Tissue Res.* Springer Verlag. 295:505-5120

Garateix, A., Salceda, E., Aneiros, A., Soto, E. 2003. *Bunodosoma granulifera*: Fuente de péptidos con acción sobre canales iónicos. *Avicennia*, revista de ecología, oceanología y biodiversidad tropical. 16: 13-21.

Gómez, C. 2004. Evaluación de la inducción de citocromo P450 y la actividad de enzimas asociadas al metabolismo de los hidrocarburos policíclicos aromáticos en la anémona *Anthopleura elegantissima*. Tesis de maestría en ciencias. CICESE. 70pp.

Halstead, L. 1984. *Poisonous and Venous Marine Animals of the World*. The Darwin Press, INC. Princeton, New Jersey. Pp 99-185.

Hessinger, D., Lenhoff, H. 1974. Degradation of red cell membrane phospholipids by sea anemone nematocyst venom. *Toxicon* 12:379:383.

Hickman, C., Hickman, P., Roberts, S., Larson, A. 1994. *Principios Integrales de Zoología*. Quinta Ed. Dubuque, IA: Wm C. Brown Publihsers.

Kelly, L. 1997. Compuestos bioactivos de la esponja *Pseudosuberites pseudos*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. UABC. 75pp.

Kelso, G., Blumenthal, K. 1998. Identification and characterization of novel sodium channel toxins from the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. *Toxicon* 36: 41-51.

- Kem, W., Paten, R., Pennington, W., Dunn, B., Price, D. 1989. Isolation and characterization, and amino acid sequence of polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochem. J.* 28:3483-3489
- Kruger, N. 1994. The Bradford method for protein quantitation. En: *Methods in Molecular Biology. Basis Protein and Peptide Protocols*. Walker, J. M. (ed) Humana Press. Totowa, New Jersey. 9-15 pp.
- Laemli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. T4. *Nature* 227. 680:685.
- Lanio, M., Morera, V., Alvarea, C., Tejuca, M., Gómez, T., Pazos, F., Besada, V., Martínez, D., Huerta, V., Padron, G., Angeles, M. 2001. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 39. 187:194.
- Mariscal, R. 1974. Nematocyst. En: *Coelenterate Biology Reviews and New Perspectives*. Muscatine, L. y H. M. Lenhoff (eds). Academic Press, New York. 132-153 pp.
- Martin, D., Padilla, M. 1973. *Marine pharmacognosy: action or marine biotoxins at cellular level*. Academic Press New York and London. 317pp.
- Merino-Ibarra, M., Otero-Dávalos, L. 1983. *Atlas ambiental costero-Puerto Morelos, Quintana Roo*. CONACYT-UNAM.
- Meyer, B., Ferrigni, J., Putnam, L., Jacobsen, B., Nicols, E., McLaughlin, J. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research* 45:31-34pp.

- Merino, M., Otero, D. 1991. Atlas ambiental costero. Puerto Morelos Quintana Roo. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. 80pp.
- Morales, J., Zapata. O., Cedillo, R., Segura, L., Sima, R. y Sánchez, J. 2007. Antimicrobial, Antiprotozoal, and toxic activities of cnidarian extracts from the mexican caribbean sea. *Pharmaceutical biology*. 45, 37-43.
- Nelson, D., Cox, M. 2006. Lehninger, Principios de bioquímica 4ta Ed. Editorial Omega.
- Pantin, C. 1942. The excitation of nematocysts. *J. exp. Biol* 19, 294-310.
- Prior Mier, A. 2002. Aislamiento y caracterización de toxinas peptídicas de la anémona *Anthopleura xanthogrammica*. Tesis de maestría en ciencias. CICESE. 68pp.
- Rivero, A., Delfín, J., Peralta, N., Díaz, D., Días, J., Guitart, B., González, E., Chávez, M. 2003. Detección de actividad inhibidora de carboxipeptidasa A en diferentes organismos marinos. *Revista Biológica*. Vol. 17 N. 2
- Rudy, B., Iverson, L. 1992. Ion Channels. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc. New York.
- Santamaría, A., Sánchez, J., Zugasti, A., Martínez, A., Galván, S., Segura, L. 2002. A venom extract from the sea anemone *Bartholomea annulata* produces haemolysis and lipid peroxidation in mouse erythrocytes. *Toxicology* 173:221-228.
- Simmons, L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., Gerwick, W. 2005. Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*. 4:333-342.

Skidel, R. 1996. Structure and function of mammalian zinc carboxypeptidases in zinc metalloproteases in health and disease. Ed Nigel M. Hooper. Taylor and Francis. Ltd.

Torrens, E. 2004. Aislamiento y purificación de proteínas con actividad hemolítica y neurotóxica de la cubomedusa *Carybdea marsupialis* (Linee 1758). Tesis de maestría en ciencias. UNAM. 94pp.

Torres, A. 2001. Aislamiento y caracterización de cianobacterias marinas productoras de compuestos de interés biomédico. Tesis de maestría en ciencias. CICESE. 94pp.

Vargas, C. 2004. Identificación y aislamiento de dos agentes citotóxicos provenientes del caracol marino *Conus californicus*. Tesis de maestría en ciencias. CICESE. 54pp.

Paginas consultas en internet:

www.web.nhm.ku.edu consultado en Mayo 2009