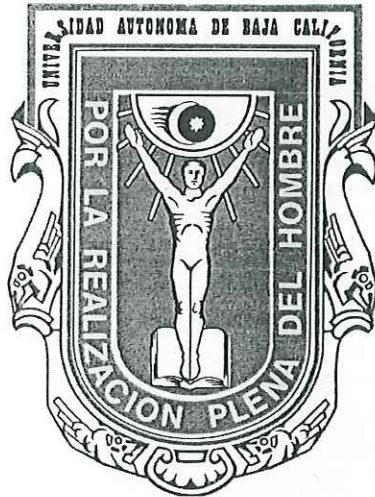
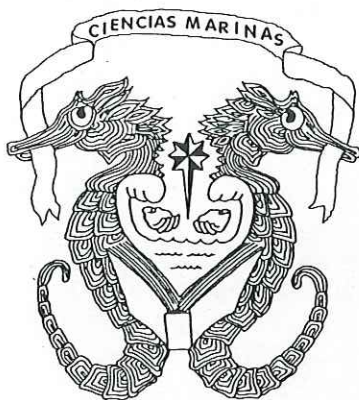


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJACALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS SUBSTANCIAS
ACTIVAS PRESENTES EN LA ANÉMONA *Lebrunia danae* (Duchassaing &
Michelotti, 1860).”



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

OCEANÓLOGA

PRESENTA:

KARINA CRUZ VÁZQUEZ

Ensenada Baja California, Agosto de 2004.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS SUBSTANCIAS
ACTIVAS PRESENTES EN LA ANÉMOMA *Lebrunia danae* (Duchassaing &
Michelotti, 1860).

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
OCEANÓLOGA

PRESENTA
KARINA CRUZ VÁZQUEZ

ENSENADA BAJA CALIFORNIA, AGOSTO DE 2004.

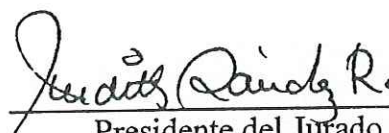
Resumen

Las toxinas de organismos marinos han sido tema de interés debido a que algunas presentan actividades específicas por lo que pueden ser utilizadas como importantes herramientas biológicas; otro aspecto a considerar es que muchas de ellas pueden tener potencial farmacológico. Para indicar cuales compuestos tienen potencial, es importante determinar el tipo de actividad biológica que presenta la toxina así como realizar la purificación de los compuestos responsables de esa actividad. *Lebrunia danae* (Duchassaing & Michelotti, 1860) es una anémona que se distribuye en el Atlántico desde Bermudas hasta Brasil y es considerada como uno de los cnidarios más tóxicos; a pesar de presentar potentes toxinas, no se ha tomado en cuenta para este tipo de investigaciones, por lo anterior se propuso el estudio de las toxinas de este especie. El primer paso consistió en la recolección de los organismos en la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo. Posteriormente se extrajeron los nematocistos, que son los organelos donde se aloja la toxina, mediante el método de Kem *et al.*(1989), de manera que al final se obtuvo el extracto crudo donde encontramos una gran cantidad de nematocistos. Se realizó la cuantificación de proteína en el extracto con el método de Bradford (1976). Se caracterizaron biológicamente las toxinas de esta anémona mediante bioensayos, posteriormente se realizó la purificación de los compuestos activos por medio de cromatografía líquida de baja presión y HPLC. Por medio de electroforesis en SDS-PAGE se determinó el peso molecular que presentan las diferentes proteínas que componen el extracto. Se evaluó la actividad biológica mediante bioensayo hemolítico con sangre de borrego, vaca y cerdo; citotóxico con *Artemia salina* y neurotóxico con cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*. Se identificaron los diferentes tipos de nematocistos registrando la presencia de microbásicos amastigóforos, macrobásicos amastigóforos y espirocistos. La electroforesis del extracto crudo presentó proteínas con peso molecular de 10 a 45 kDa. El extracto crudo de *L. danae* presentó actividad hemolítica con concentraciones de 0.006 a 0.238 mg de proteína/ml, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de hemólisis de los tipos de eritrocitos evaluados; la actividad citotóxica con una CL_{50} fue de 2.82 mg de extracto crudo/ml y neurotóxica a partir de una concentración de 6 mg de extracto crudo/ml. Solo diez de las 25 fracciones purificadas del extracto crudo, presentaron actividad neurotóxica mayor que el extracto crudo produciendo los efectos esperados y la muerte del organismo en menos de cinco minutos. Estas fracciones pasaron por el último proceso de purificación que consistió en HPLC, lográndose aislar una neurotoxina en la fracción F3b.


AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS SUBSTANCIAS
 ACTIVAS PRESENTES EN LA ANÉMOMA *Lebrunia danae*
 (Duchassaing & Michelotti, 1860)

TESIS
 QUE PRESENTA:
 KARINA CRUZ VÁZQUEZ

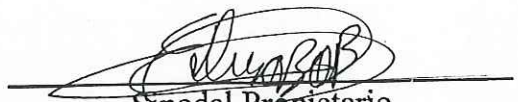
Aprobada por:



 Presidente del Jurado
 Dra. Judith Sánchez Rodríguez



 Sinodal Propietario
 M. en C. Juan Antonio Fernández Apango



 Sinodal Propietario
 Dr. Eduardo Durazo Beltrán

DEDICATORIA

*Papá, mamá, Gaby, Laura y Alejandro...
...solo por ustedes, esto es posible*

Agradecimientos

A Dios por ofrecerme este camino y llenarlo de tantas bendiciones

A mis padres porque su amor es mi base, con ustedes TODO, sin ustedes NADA, los amo

A mis hermanos Gaby, Laura y Alejandro por apoyar mis sueños y cuidarme en todo momento, tienen mi respeto y admiración...están en mi corazón.

A la Dra. Judith Sánchez por su amistad y apoyo incondicional, mil gracias

Al M.C. Juan Antonio Fernández Apango, por su apoyo pero sobretodo por mostrarme caminos y realidades.

Al Dr. Eduardo Durazo, por sus palabras de apoyo y constante motivación.

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

A la Dra Brigitta van Tussenbroek, por su confianza y apoyo durante este proyecto.

A mis amigos Angélica, Mary Carmen, Vanessa, Liz, Nicol, Karina Lugo, Alonso, Hiram y Juan Pablo porque es un verdadero privilegio contar con su amistad, son un tesoro invaluable en mi vida y una gran bendición. Gracias por estar junto a mi en todo momento sin importar la distancia, pero sobretodo por permitirme conocer este sentimiento tan noble y descubrir que no tiene límites, sin su apoyo y motivación sinceramente no sé donde estaría.

A todos los compañeros y amigos de la generación LV de oceanólogos

A Dariuz, por compartirme su luz e inspiración para vivir, te quiero.

A Vero, Andrea, Karina Jiménez, Ricardo, Roberto Domínguez, Marisol, Aimee, Gabriela, Lupita, sensei Xavier, Vania, Dorcas, Lean, Miguel Angel, Kor, Marissa, Donald y Cecy, a ustedes debo el descubrimiento y revaloración mas importante de mi vida que surgió de este sueño tan hermoso, por siempre estaré feliz y agradecida de haberlos conocido, de corazón, mil gracias por su amistad, paciencia, cariño, ayuda y comprensión.

A Gilberto, por mostrarme que los sueños se hacen realidad, ahora te creo; ilusión, paciencia, trabajo y esperanza, siempre de la mano; gracias por esta enseñanza y mucho más, no lo olvidaré...

Roberto González, mil gracias por tu ayuda y paciencia.

A la Dra. Lourdes Segura y M.C. Francisco Ruiz "Panchito", por sus consejos y ayuda, mil gracias.

A Marcy, Judith Vásquez, Amaury, Sr. Ramos, Don José y Gabriel, porque con ustedes todo es posible.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Importancia de los compuestos químicos marinos	1
1.2 Tamizado biomolecular combinatorio (screening): selección de especies y evaluación de las actividades biológicas	3
1.3 Phylum cnidaria	4
1.3.1. Clase Anthozoa	6
1.3.2. <i>Lebrunia danae</i>	9
2. Antecedentes	11
3. Objetivos	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos particulares	16
4. Metodología	17
4.1 Área de recolecta	17
4.2 Obtención del extracto crudo e identificación de nematocistos	19
4.3 Caracterización biológica del extracto crudo	20
4.3.1. Bioensayo de <i>Artemia salina</i> (actividad citotóxica)	20
4.3.2. Bioensayo hemolítico	21
4.3.3. Bioensayo neurotóxico	22
4.4 Purificación de polipéptidos activos	23
4.4.1. Cromatografía líquida de baja presión	23
4.4.2. HPLC	27
4.5 Cuantificación de proteína	27
4.6 Determinación de peso molecular por medio de electroforesis en SDS-PAGE	28
5. Resultados	31
5.1 Identificación y clasificación de nematocistos	31
5.2 Cuantificación de proteína y determinación de peso molecular del extracto crudo	33
5.3 Caracterización biológica del extracto crudo	36
5.3.1. Actividad citotóxica	36
5.3.2. Actividad hemolítica	39
5.3.3. Actividad neurotóxica	41
5.4 Purificación y evaluación de la actividad neurotóxica de los polipéptidos activos aislados	42

6. Discusiones	52
7. Conclusiones	65
8. Literatura citada	67
9. Anexos	73

Índice de figuras

Fig. 1 Estructuras de un nematocisto cargado (A) y descargado (B) (tomado de Williamson <i>et al.</i> , 1996)	6
Fig. 2 Morfología básica de una anémona (tomada de Halstead, 1988)	8
Fig. 3 Anémona <i>Lebrunia danae</i> (Duchassaing & Mechelotti, 1860) (tomada de Deloach <i>et al.</i> , 2002).....	10
Fig. 4 Área de recolecta de la anémona <i>Lebrunia danae</i>	18
Fig. 5 Microfotografía del nematocisto tipo I a punto de descargarse, identificado como microbásico amastigóforo (MiAm).....	32
Fig. 6 Microfotografía del nematocisto tipo II cargado, identificado como macrobásico amastigóforo (MaAm).....	32
Fig. 7 Microfotografía del nematocisto tipo III descargados, identificados como espirocisto (Sp).....	33
Fig. 8 Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE del extracto crudo de <i>L. danae</i>	35
Fig. 9 Gráfica de los valores acumulados de muerte y sobrevivencia contra el logaritmo de la concentración para estimar la LC ₅₀ del bioensayo de <i>Artemia salina</i> por el método de Reed-Muench.....	38
Fig. 10 Hemólisis de eritrocitos de vaca, borrego y cerdo causada por exposición a diferentes concentraciones del extracto de <i>L. danae</i>	40
Fig. 12 Purificación de la fracción activa número 3 obtenida en la cromatografía del extracto de <i>Lebrunia danae</i> en gel Sephadex G50. A) Cromatografía de intercambio aniónico en QAE Sephadex A-25 de la fracción tres (G50F3). B) Eliminación de sales de la fracción tres de QAE (QAEF3), en gel Sephadex G50. C) Intercambio catiónico en Fractogel EMD SO ₃ ⁻ -650 de la fracción dos desalada (QAEF3/G50F2). D, E, F y G) Eliminación de sales en gel G25 de las cuatro fracciones activas obtenidas del fractogel (Fractogel/F2, F5, F7 y F9). H, I, J y K). Purificación de las cuatro fracciones activas desaladas (F3b, F3e, F3h y F3k) en HPLC	48
Fig. 13 Purificación de la fracción activa número 7 obtenida en la cromatografía del extracto de <i>Lebrunia danae</i> en gel Sephadex G50. A) Cromatografía de intercambio aniónico en QAE Sephadex A-25 de la fracción siete (G50F7). B) Eliminación de sales de la fracción cuatro de QAE (QAEF4), en gel Sephadex G50. C) Intercambio catiónico en Fractogel EMD SO ₃ ⁻ -650 de la fracción dos desalada (QAEF4/G50F2). D) Eliminación de sales en gel G25 de la fracción activa número seis obtenida del fractogel (FractogelF6).....	49
Fig. 14 Purificación de la fracción activa número 9 obtenida en la cromatografía del extracto de <i>Lebrunia danae</i> en gel Sephadex G50. A) Cromatografía de intercambio aniónico en QAE Sephadex A-25 de la fracción uno (G50F1). B) Eliminación de sales de la fracción uno de QAE (QAEF1), en gel Sephadex G50. C) Intercambio catiónico en Fractogel EMD SO ₃ ⁻ -650 de la fracción dos desalada (QAEF1/G50F2). D, E y F) Eliminación de sales en gel G25 de las tres fracciones activas obtenidas del fractogel	

(Fractogel/F1, F2, y F6). **G, H e I).** Purificación de las tres fracciones activas desaladas (F9a, F9b, F9f) en HPLC.....50

Fig 15 Purificación de la fracción activa número 12 obtenida en la cromatografía del extracto de *Lebrunia danae* en gel Sephadex G50. **A)** Cromatografía de intercambio aniónico en QAE Sephadex A-25 de la fracción uno (G50F3). **B)** Eliminación de sales de la fracción uno de QAE (QAEF1), en gel Sephadex G50. **C)** Intercambio catiónico en Fractogel EMD SO_3^- -650 de la fracción dos desalada (QAEF1/G50F2). **D y E,)** Eliminación de sales en gel G25 de las dos fracciones activas obtenidas del fractogel (Fractogel/F1 y F6). **F y G).** Purificación de las dos fracciones activas desaladas (F12a y F12d) en HPLC51

Índice de tablas

Tabla I Medición de la longitud de los tres tipos de nematocistos encontrados en el extracto de <i>Lebrunia danae</i>	31
Tabla II Cuantificación de proteína en muestras de <i>L. danae</i> por el método de Bradford (1976)	33
Tabla III Tratamiento de los datos del bioensayo de <i>Artemia salina</i> por el método de Reed-Muench para determinar LC_{50}	38
Tabla IV Valores de hemólisis medida en absorbancia, correspondiente a eritrocitos de vaca, borrego y cerdo; expuestos a distintas concentraciones del extracto crudo de <i>Lebrunia danae</i>	40
Tabla V Evaluación neurotóxica de las fracciones purificadas hasta la eliminación de sales en gel Sephadex G-25.....	45

1. Introducción

1.1 Importancia de los compuestos químicos marinos

El medio marino constituye una enorme fuente potencial de nuevas moléculas de origen natural. Este potencial es más importante por el hecho de que los organismos marinos han evolucionado en un medio físico y químico distinto al del medio terrestre. Al igual que los bosques, el mar ofrece una excepcional fuente de biodiversidad. La naturaleza sésil de muchos organismos marinos los ha obligado a generar sustancias químicas únicas, usadas para defenderse, reproducirse y comunicarse (Habermehl, 1981).

Estos compuestos de origen marino llaman la atención de investigadores, ya que son sustancias que ejercen una especie de presión, generalmente tóxica, sobre otro organismo que se encuentra en su entorno. Dichos compuestos naturales presentan bioactividad cuando afectan la estructura y función de otros organismos. Debido a esto, se ha puesto gran énfasis en las biotoxinas o venenos más que en cualquier otra sustancia de origen marino, de hecho, se ha propuesto a los compuestos de origen marino como sustancias con potencial farmacológico presentando actividad anticancerígena, hemolítica, analgésica, anticoagulante, antipásmica, antibióticos, promoción o inhibición, y agentes hipertensores, así como enzimas, hormonas, narcóticos y vitaminas. Un ejemplo de esto fue la tetradotoxina, la cual ha sido usada para fines farmacológicos, pero su fuerte toxicidad ha hecho que su aplicación médica sea difícil (Martin y Padilla, 1973).

La mayoría de los compuestos con actividad biológica provienen de los denominados inicialmente *metabolitos secundarios*, y más recientemente, *productos del metabolismo especial*. Estas sustancias se han ido desarrollando en el curso de millones de años de evolución, como respuesta defensiva frente a patógenos y depredadores a través de mecanismos cuyos detalles en muchos casos todavía se desconocen. Los productos naturales, metabolitos secundarios u producidos por organismos marinos han recibido mayor interés en las últimas décadas ya que son considerados como una fuente de nuevas moléculas que pueden utilizarse de esta forma o bien desarrollarlas sintéticamente a partir de estas bases. Estos metabolitos son diversos en sus orígenes biosintéticos y rutas metabólicas. Un análisis filogenético de distribución de estos compuestos muestra que la mayoría (93%) se encuentran en 4 grupos (macroalgas, coelenterados, equinodermos y esponjas) (Faulker, 1993).

Algunas sustancias de origen natural no se utilizan tal como han sido extraídas, sino que se modifican químicamente para aumentar su eficacia y/o disminuir sus efectos tóxicos. Un ejemplo de estas es el *topotecano*, medicamento usado para el tratamiento del cáncer de ovario. Además de las sustancias de aplicación directa como medicamentos, existen otras que probaron ser útiles como modelos moleculares o *moldes* para procesos de síntesis o semisíntesis química. La semisíntesis corresponde a la preparación de un compuesto químico en el laboratorio, a partir de una estructura química intermedia donde ya existan parte de la estructura química final, con la estereoquímica o disposición espacial requerida. De esta manera, se aumenta el

rendimiento final y facilita la preparación de moléculas complejas (Mongelli y Pomilio, 2002).

1.2 Tamizado biomolecular combinatorio (screening): selección de especies y evaluación de las actividades biológicas.

Elegir una especie para la búsqueda de actividad farmacológica, se basa en una serie de criterios que justifican el uso de determinado organismo, algunos de estos criterios son el grado de toxicidad de las sustancias, accesibilidad y disponibilidad del recurso, posición ecológica y por supuesto la estructura química de dichas sustancias. Uno de los criterios más utilizados es el de la biotoxicidad como indicador de propiedades farmacológicas generales. A menudo las sustancias tóxicas químicamente transformadas o utilizadas en dosis adecuadas, muestran actividades terapéuticas interesantes. Por tanto, el buscar moléculas activas se convierte en la búsqueda de toxinas, y el medio marino es rico en especies venenosas y urticantes (Braekman y Daloz, 1983).

Tradicionalmente, el primer paso de la investigación de productos naturales era el aislamiento y la purificación de los mismos posteriormente se investigaba si el compuesto tenía o no, actividad biológica. Lamentablemente muchos de los compuestos así obtenidos carecían de valor terapéutico. Por eso ahora la demostración de la existencia de actividad biológica precede necesariamente a los otros pasos en el desarrollo de nuevos medicamentos. La detección inicial de actividad biológica sirve para seleccionar o descartar extractos crudos. Una vez que esto se ha hecho, se procede

al fraccionamiento siguiendo cada una de sus etapas mediante la medida de actividad biológica, de modo que solo los compuestos activos sean aislados e identificados. El término “screening” o tamizado biomolecular combinatorio implica una rápida evaluación de muchas muestras, antes del estudio a profundidad de unas cuantas. El “screening” comprende un conjunto de ensayos, que en general señalan simplemente la presencia o ausencia de respuesta biológica. El material utilizado para observar respuestas biológicas es muy diverso y puede ser entre otros, una célula, un microorganismo, un insecto o una enzima. Los pilares fundamentales en un procedimiento de “screening” o tamizados biomolecular son los métodos de selección del material y los ensayos que se realizan con el mismo. El “screening” comprende dos etapas: el primario y secundario o de orden superior. Cada uno implica la realización de uno o más ensayos de actividad biológica (bioensayos) para encontrar el o los compuestos de interés (Mongelli y Pomilio, 2002).

1.3 Phylum Cnidaria.

El phylum Cnidaria está compuesto por cuatro clases: Hydrozoa (hidrozoarios), Scyphozoa (escifomedusas), Cubozoa (cubomedusas) y Anthozoa (anémonas y corales) (Halstead, 1988).

Las características más notables de los cnidarios son la simetría radial primaria en torno al eje oral-aboral derivado de un eje primario de la gástrula o simetría birradial con el desarrollo de un plano sagital, manteniendo caracteres radiales externos; cuerpo formado por tres capas, la epidermis externa, la gastrodermis y una mesoglea; una cavidad del cuerpo, el celenterón, que deriva del intestino primitivo y una abertura, la

boca, procedente del blastoporo; casi siempre existen una o más coronas de tentáculos alrededor de la boca; ausencia del aparato excretor y respiratorio; presencia de un aparato neurosensorial compuesto de una red nerviosa formada de protoneuronas y de varios tipos de células sensoriales, a veces reunidos en órganos sensoriales especiales; una marcada tendencia al polimorfismo, en los cnidarios se observan dos tipos morfológicos distintos, el medusoide o de forma medusa, que presenta el esquema del cuerpo típico de los cnidarios adaptado a nadar libremente, y la forma polipoide o hidroide adaptada a la vida sésil; órganos especiales de ataque y de defensa, llamados nematocistos, formados por células intersticiales (Meglitsch, 1978).

Los cnidarios al carecer de un sistema muscular y nervioso apropiado para atrapar presas con sus tentáculos, emplean un agente inmovilizador y la presencia de algo que sujeta la presa a los tentáculos, esto los convierte en carnívoros a pesar de ser animales de movimientos lentos. La presencia de estructuras como los nematocistos, característica básica de este grupo, les permite desempeñar dicha tarea, ya que éstos aturden, paralizan o matan a la presa o enemigo, envuelven el alimento y lo sujetan con los tentáculos. La toxina se aloja en los nematocistos, por lo tanto éstos juegan un papel importante en la defensa y captura de presas, dichas toxinas pueden llegar a tener un efecto paralizante en crustáceos y peces (Halstead, 1988).

Cada nematocisto está constituido por una cápsula, su contenido amorfo, una tapa y un tubo invertido a veces con la base ensanchada a modo de mango. Cuando el nematocisto se descarga, el tubo se evagina y el contenido de la cápsula se elimina, el tubo y su extremo a menudo están cubiertos de púas (Williamson *et al.*, 1996).

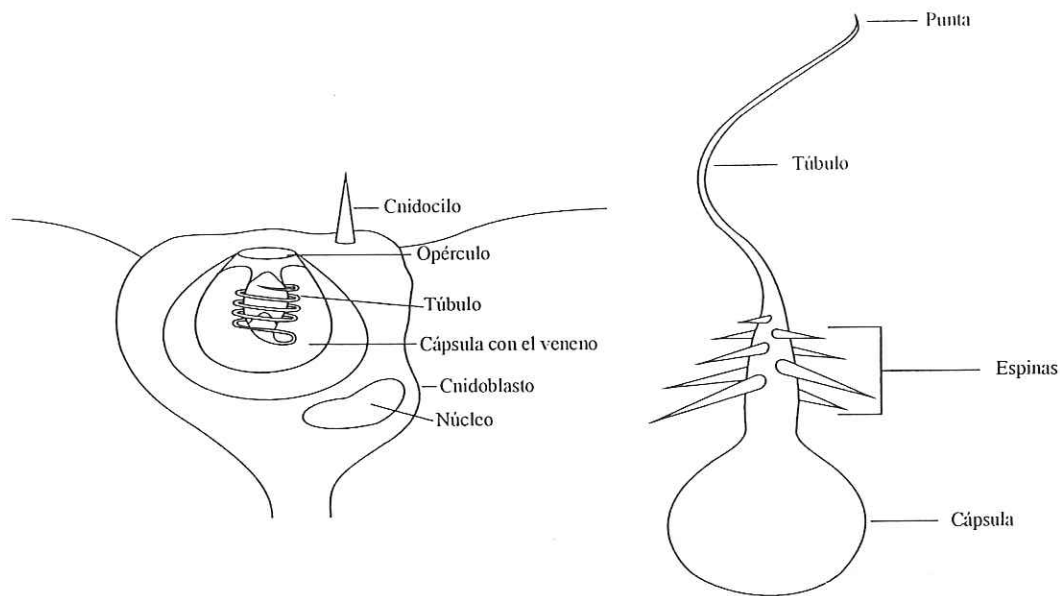


Fig. 1 Estructuras de un nematocisto cargado (A) y descargado (B) (tomado de Williamson *et al.*, 1996).

1.3.1 Clase Anthozoa

La clase Anthozoa está dividida en dos superclases: Alcyonaria y Zoantharia. Los anthozoos, literalmente animales flor, incluyen a las anémonas y corales. Una característica principal de esta clase es que el pólipo de estos animales prevalece, en tanto que la medusa no se llega a formar (Halstead, 1988).

Las anémonas presentan una simetría primaria radial, biradial o radio bilateral, esencialmente compuestas de dos capas epiteliales y una cavidad interna gastrovascular o celenteron, la cual se abre solamente por la boca; la mayoría tiene un cuerpo cilíndrico corto y la cavidad oral rodeada de un número variable de tentáculos (Halstead, 1988).

Una característica dominante del grupo es que los tentáculos poseen nematocistos y glándulas adhesivas; los primeros están colocados en los tentáculos marginales, generalmente agrupados en protuberancias, también pueden encontrarse en la epidermis de la región oral o en las partes internas de los tentáculos; las glándulas adhesivas al igual que los nematocistos, se encuentran en los tentáculos y éstas les permiten capturar pequeñas partículas de alimento. Generalmente poseen algas unicelulares en sus tentáculos y disco oral, las cuales fotosintetizan azúcares para su uso y suplementar su alimentación, estos azúcares pueden ser la mayor fuente de energía en las anémonas (Hall y Strichartz, 1990).

Un esófago muscular cuelga de la boca hacia la cavidad gastrovascular donde se conecta con las paredes del cuerpo por una serie de divisiones verticales llamada mesenterios. Estas divisiones son dobles en la gastrodermis, soportada por una capa central de gel llamada mesoglea incrementado así, la superficie digestiva del esófago, gracias a esto, la anémona puede digerir animales más grandes que ella como peces, erizos, crustáceos. (Hall y Strichartz, 1990).

Presentan una variedad de colores que les da una apariencia de flor. Cuando está cubierta por agua, el cuerpo y los tentáculos se expanden, si la anémona se ve expuesta a disturbios, los tentáculos se invaginan rápidamente y el cuerpo se contrae (Halstead, 1988).

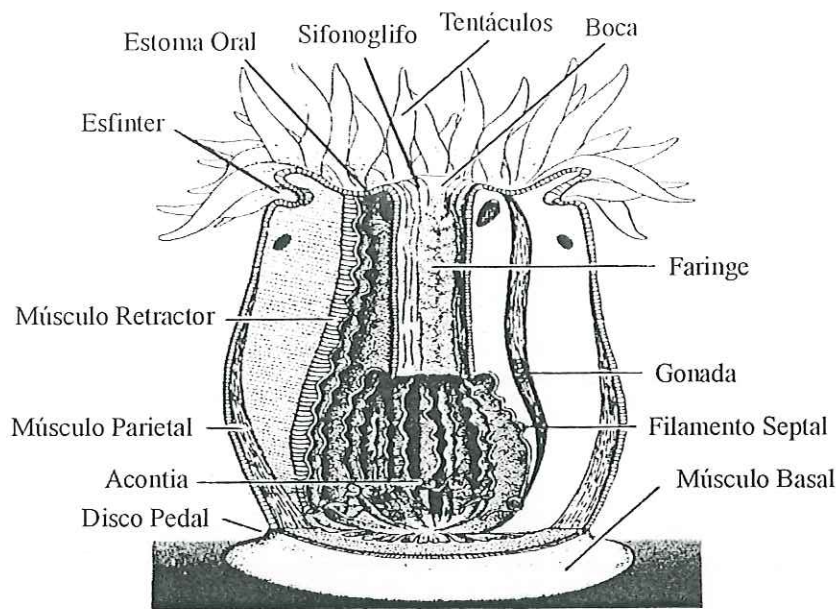


Fig. 2 Morfología básica de una anémona (tomado de Halstead, 1988)

Las anémonas abundan en aguas tropicales, pero también hay especies que habitan en el Ártico. Existen aproximadamente 600 especies solitarias o coloniales exclusivamente marinas, su rango batimétrico se extiende desde la zona intermareal hasta profundidades mayores de 5000 metros. Varían en tamaño, desde unos cuantos milímetros hasta medio metro de diámetro. La mayoría de las especies son sésiles y viven adheridas a objetos o diferentes tipos de sustrato, sin embargo, éstas pueden moverse si las condiciones del ambiente no son favorables, se deslizan con el disco basal (pedal) logrando moverse unos pocos milímetros por día (Hall y Strichartz, 1990).

1.3.2 *Lebrunia danae*

La anémona *Lebrunia danae* pertenecen a la subclase Zoantharia, familia Aliicidae del orden Actinaria, se distribuye en el Atlántico desde Bermuda hasta el sur de Brasil, localizada cerca de arrecifes coralinos a una profundidad que varía de 2 a 40 metros. Esta especie tiene como característica principal dos tipos de tentáculos, primarios y secundarios. Los primarios son típicos de la mayoría de las anémonas mientras que los secundarios son distintivos de esta especie (Cuningham y Goetz, 1996).

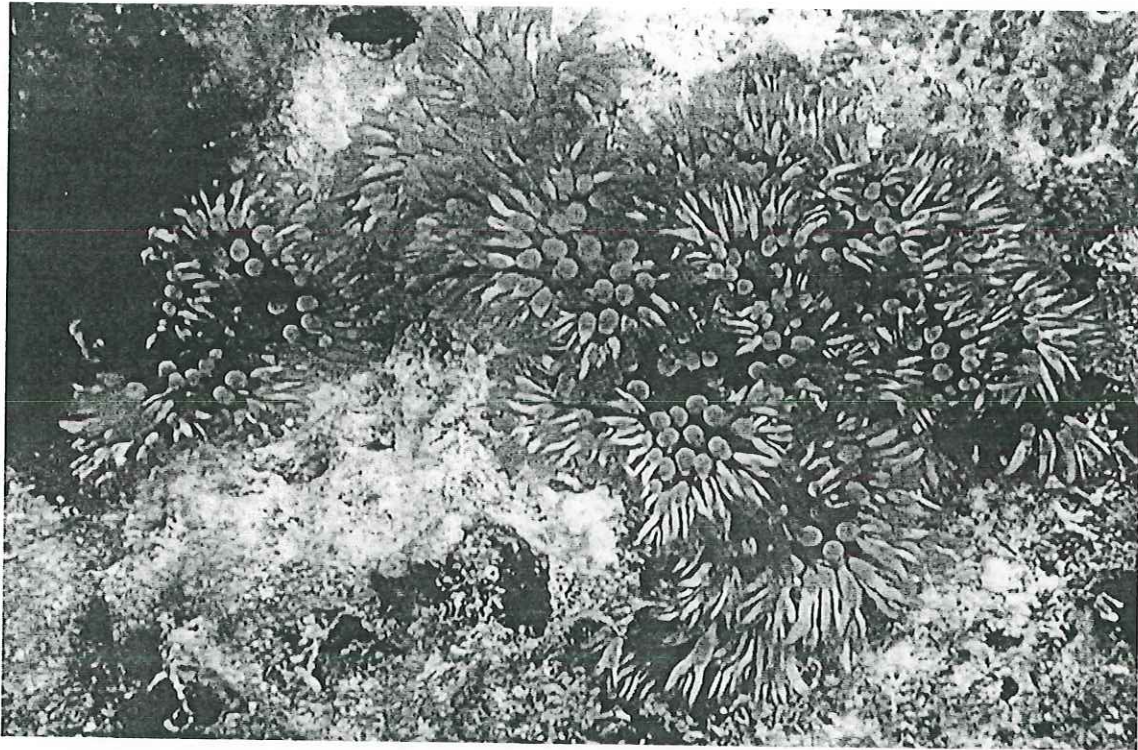


Fig. 3 *Lebrunia danae* (Duchassaing & Michelotti, 1860) (tomada de Deloach y Humnn, 2002).

2. Antecedentes

La primera extracción de toxinas de anémonas la realizó el fisiólogo francés Charles Richet en 1903, con la especie *Anemonia sulcata*, obteniendo dos sustancias, la talasina y congestina (Béress *et al.*, 2000). Shapiro (1968), reporta la primera purificación de una toxina, extraída de los tentáculos de la anémona *Condylactis gigantea*.

Un estudio sistemático consagrado al aislamiento y caracterización de las toxinas de anémonas, especialmente de *Anemonia sulcata* fue iniciado por L. Béress y R. Béress en 1966-1967 en la estación zoológica de Naples. Este trabajo reporta la purificación parcial de dos toxinas, toxina I (ATX I) y toxina II (ATX II). Ambas son polipéptidos de medio peso molecular (5000 MW) con efecto paralizante en cangrejos (*Carcinus maenas*) y mamíferos (ratones). Los métodos de purificación se perfeccionan a partir de 1974, obteniendo una tercera toxina (ATX III). Usando estas técnicas de aislamiento, Béress y Zwick (1980) encontraron cuatro toxinas en *Condylactis aurantiaca* (CTX I, II, III y IV) y dos en *Bolocera tuediae* (BTTX I y II) (citados en Béress *et al.*, 2000).

Norton *et al.* (1976), purificaron la toxina APC de la anémona del Pacífico, *Anthopleura elegantissima* y cuatro de *Heractis magnifica* previamente llamada *Radianthus paumotensis*.

Materiales activos de estructura novedosa han sido aislados en una gran cantidad a partir de cnidarios; de 9000 especies conocidas, aproximadamente 70 son reportadas como venenosas, causando intoxicación en el hombre por medio de sus nematocistos o bien, por la ingestión de los tejidos. Ejemplos importantes de anémonas venenosas son

Sagartia sp., *Actinia sp.* y *Amenonia sulcata* (Baslow, 1977). En extractos de tejidos de anémonas se han encontrado una variedad de sustancias químicas que presentan actividad biológica en varios sistemas de prueba; ejemplos de esto son *Anthopleura elegantissima* y *Metridium dianthus* de las cuales se extrajo ácido 2-aminoetilfosfónico, de *Antopleura xanthogrammica* se obtuvo ácido 2-metilaminoetilfosfónico, en *Zoanthus sociatus* se aisló ácido α -amino- β -fosfonopropionico y de *Palythoa sp.* se extrajo una potente toxina llamada palytoxina (Baslow, 1977).

Mebs y Gerbauer (1980), aislaron polipéptidos biológicamente activos en la anémona *Stoichactis sp.*, éstos presentaron actividad hemolítica e ictiotóxica.

Otro tipo de bioactividad reportada en anémonas, además de hemolítica y neurotóxica, es la que bloquea canales de potasio y sodio. Frelin *et al.*, 1984 (citados en Béress *et al.*, 2000) indican que la característica particular de ATX II y del tipo I de toxinas de anémonas, es que son capaces de discriminar entre canales de sodio de diferentes células de especies animales. La toxina de escorpión y algunas de las toxinas tipo II de otras anémonas no tienen este poder discriminante.

La investigación de la estructura y función de péptidos de anémonas fue iniciado por Barhanin *et al.* (1981, citados en Béress *et al.*, 2000) quienes mostraron que el sitio responsable de la fijación de ATX II al canal de sodio es distinto al sitio responsable para la toxicidad de estos péptidos.

Catterall y Béress (1988, citados en Béress *et al.*, 2000), demostraron que la toxina II de *Anemonia sulcata* (As II) se une, al igual que la α -toxina de escorpión, al mismo sitio del canal de sodio. Aunque estas observaciones han sido corroboradas por

otros laboratorios, no se asegura con certeza que exista una equivalencia con el sitio de unión de As II y α -toxina de escorpión.

Salgado y Kem (1992), evaluaron el efecto de tres neurotoxinas, estructuralmente diferentes, de las anémonas *Stichodactyla helianthus*, *Condylactis gigantea* y *Calliactis parasitica*, en los canales de sodio de crustáceos e insectos. Los resultados indican que las tres toxinas son particularmente tóxicas para los crustáceos, moderadamente tóxicas para insectos mientras que en mamíferos no se observó un efecto de toxicidad

Castañeda *et al.* (1995) analizaron la toxina de *Stichodactyla helianthus*, encontrando actividad bloqueadora de canales de potasio. Después de analizar la toxina de esta especie, determinaron que no existía homología con otros péptidos bloqueadores de canales de potasio de anémonas como el caso de *Bunodosoma granulifera*.

Además de la identificación de las sustancias bioactivas, se han propuesto diferentes métodos para la extracción del veneno, Malpezzi *et al.* (1993), utilizó un método de estimulación eléctrica para obtener el veneno puro de la anémona *Bunodosoma caissarum*, sin sacrificarla. Con este método se identificaron tres neurotoxinas, detectando actividad hemolítica y neurotóxica en cada una de ellas.

Béress *et al.* (2000), afirma que las secuencias de la mayoría de las toxinas de anémonas han sido elucidadas, con excepción de ATX III, la cual es una toxina corta. La secuencia de las toxinas son homólogas, todas están interconectadas por tres puentes disulfuro que estabilizan la estructura de la molécula y residuos de cisteína-6-media que

siempre se encuentra en la misma posición (7 y 8). Su peso molecular se encuentra en 2933 dalton (ATX III) y 5630 dalton (CTX III).

Anderluh y Maček (2002) afirman que en mas de 32 especies de anémonas se ha reportado efecto citolítico letal de péptidos y proteínas. Basado en su estructura primaria y propiedades funcionales, las citolisinas han sido clasificadas en cuatro grupos:

- Grupo I, consiste en péptidos de 5-8 kDa, representando este grupo se encuentran las toxinas de las anémonas *Tealia felina* y *Radianthus macrodactylus*. Estos péptidos forman poros en la fosfolipasa A₂ de las membranas.
- Grupo II es el más numeroso, comprende proteínas básicas de 20 kDa, la mayoría aisladas de la familia Actiniidae y Stichodactylidae. Equinotoxinas, esticolisinas y magnificalisinas de *Actinia equina*, *Stichodactyla helianthus*, y *Heteractis magnifica*, respectivamente.
- Grupo III, fosfolipasas A₂ citolíticas de 30-40 kDa de *Aiptasia pallida* (Familia Aiptasiidae) y citolisinas similares, debido a la actividad enzimática de *Urticina piscivora*.
- Grupo IV, una citolisina tiol-activada, y metridiolisina con una masa de 80 kDa de la especie *Metridium snile* (fam. Metridiidae).

Basándose en su peso molecular, las citolisinas se clasifican en:

a) Péptidos de 5-8 kDa con actividad antihistamina.

b) Proteínas formadoras de poros (pore forming) de 20kDa, inhibidas por esfingomiolina

c) Citolisinas con o sin actividad de fosfolipasa A₂ de 30-40 kDa

d) Un grupo de proteínas de 80 kDa, grupo representado por una citolisina de *Metridium senile*.

Dentro de las técnicas de purificación de polipéptidos, Sánchez *et al.* (1996) proponen un método bioquímico para la investigación de polipéptidos bioactivos en la anémona *Anemonia sulcata*, que consiste en simplificar el procedimiento de purificación de las cinco toxinas encontradas en esta especie (ATX I, II, III, IV y AS V) utilizando resina de poliestireno polidivinilbenzol Serdolit XAD-2.

Hashimoto (1979) indica que es importante detectar la toxicidad en un organismo para que a partir de esto se pueda elucidar la importancia de dicha toxina, los estudios para la detección de actividad biológica son requeridos para este propósito. Según Baslow (1977) la anémona *Lebrunia danae* se encuentra dentro de la lista de los cnidarios más venenosos y peligrosos para el hombre. A pesar de su alta toxicidad, esta especie no había sido estudiada con el fin de obtener y evaluar la actividad biológica de sus toxinas. La innegable importancia biológica que tienen estos estudios radica en la posibilidad de encontrar un importante valor terapéutico en las toxinas y poder aplicarlas en la farmacología. También pueden utilizarse como modelos moleculares para procesos de síntesis o semisíntesis química, como herramientas en biología experimental; o bien, simplemente para encontrar el tratamiento adecuado en las

afecciones que pueden causar en el hombre, al estar en contacto con estas sustancias de manera accidental.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Llevar a cabo el aislamiento y caracterización biológica de las sustancias activas de la anémona *Lebrunia danae*.

3.2 Objetivos particulares

Identificar los nematocistos de la anémona *Lebrunia danae*.

Evaluar la actividad citotóxica, hemolítica y neurotóxica del extracto crudo de la anémona *Lebrunia danae*.

Purificar los polipéptidos activos del extracto crudo de *L. danae*, mediante el uso de cromatografía de líquidos.

Evaluar la actividad neurotóxica de los polipéptidos purificados por medio de bioensayos.

4. Metodología

4.1. Área de recolecta

La laguna arrecifal de Puerto Morelos se encuentra ubicada en la porción nororiental de la península de Yucatán, entre los 20° 52' N y los 86° 51' O, en el estado de Quintana Roo (Ruiz-Rentería *et al.*, 1998). Comprendida entre la barrera coralina y la línea de costa, tiene una extensión aproximada de 7 km y una amplitud entre 350 y 1600 m; la profundidad varia entre 1 y 8 m, teniendo como promedio 3 m y presentando la máxima profundidad en la zona sur debido a dragados asociados a la actividad del puerto. La laguna termina al sur donde se forman bancos arrecifales aislados, hacia el norte la laguna se encuentra con los límites de Punta Tanchacté, en este punto el arrecife y la costa se acercan hasta una distancia de aproximadamente 150 m y la profundidad es menor a un metro; la laguna se estrangula en este lugar, por lo que en términos funcionales esta zona puede considerarse análoga a la boca de una laguna costera. El arrecife está compuesto por corales, escleractinios, gorgonáceos, y algas. La zona marina esta dividida en laguna arrecifal, arrecife posterior, cresta arrecifal y arrecife frontal. La mayor parte del fondo de la laguna arrecifal se encuentra cubierto por densas comunidades de pastos marinos, dominado por *Thalassia testudinum*. En algunas zonas se localizan fondos arenosos con escasa presencia pastos y algas coralinas. En otros lugares la roca subyacente aflora permitiendo la implantación de corales, que en la parte sur de la laguna forman importantes “cabezos” de varios metros de altura (Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1983).

Los ejemplares de *Lebrunia danae* se recolectaron entre febrero y septiembre del 2003, mediante el uso de buceo SCUBA en la Laguna arrecifal de Puerto Morelos, en una zona conocida como “La Bocana, que es una entrada del arrecife frontal con una profundidad promedio de cuatro metros (Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1983). Los organismos se encontraron adheridos a las rocas y corales de la zona los cuales se removieron del sustrato con ayuda de espátulas.

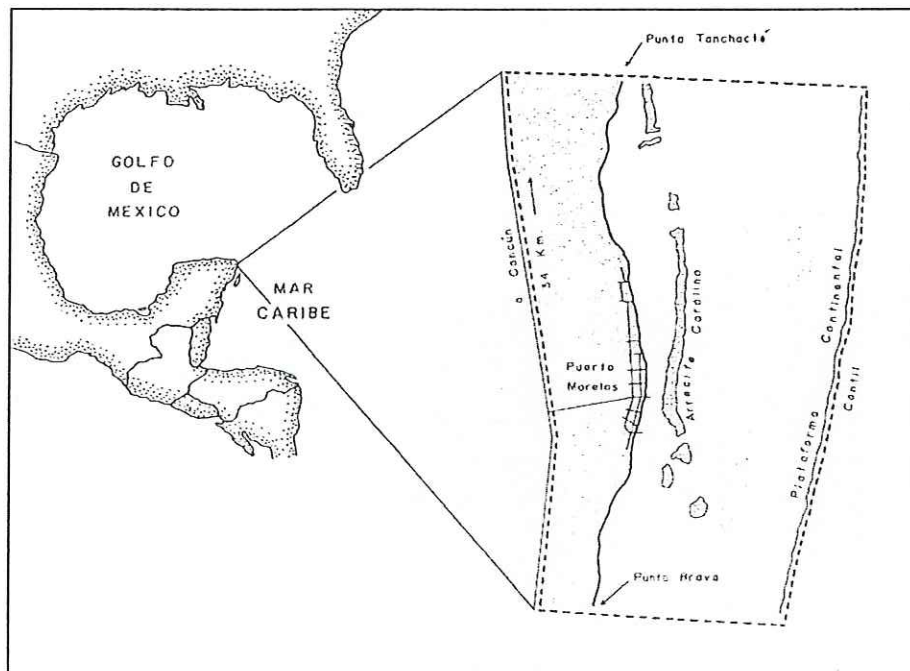


Fig. 4 Área de recolecta de *Lebrunia danae* (tomado de Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1983)

4.2. Obtención de extracto e identificación de nematocistos.

Los organismos recolectados se llevaron al laboratorio en cubetas con agua de mar, una vez en el laboratorio fueron tratados para obtener el extracto crudo. Para esta tarea se empleó el método modificado de Kem *et al.* (1989) (ciclos de congelado y descongelado), que consiste en colocar los organismos en un recipiente con agua desionizada, posteriormente se agitan de manera manual con la ayuda de una varilla de vidrio por un período de 20 minutos. Al terminar, los organismos se extrajeron de la solución para guardarlos en bolsas de plástico y congelarlos a -60° C por 30 minutos. Este procedimiento se repitió tres veces, descongelando los organismos en la misma solución, finalmente, ésta se transfirió a viales para congelarse nuevamente a -60° C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, el contenido de los viales se liofilizó. El proceso de liofilización tiene una duración aproximada de 48 horas, terminado el proceso, se pesó el extracto crudo obtenido.

Al momento de colocar los organismos en un recipiente con agua desionizada, estos reaccionan liberando un líquido denso color café, el cual contiene los nematocistos. Para identificar los nematocistos, se analizó dicha solución en un microscopio compuesto. Los nematocistos observados se midieron con una reglilla colocada en uno de los objetivos y se tomaron microfotografías utilizando una cámara Olympus SC35 type12 instalada en el microscopio. Solo se midieron los nematocistos descargados ya que Mariscal (1974), indica que tanto el diámetro de la cápsula como de los túbulos, así como el tamaño, la forma y la abundancia de las espinas sobre la superficie del túbulo, son criterios que se utilizan para la identificación. Finalmente con

la ayuda de una guía para los distintos tipos de cnida, se llevo a cabo la identificación (Williamson *et al.*, 1996 y Mariscal, 1974). Se determinó media y error estándar de los datos obtenidos.

4.3. Caracterización biológica del extracto crudo

4.3.1 Bioensayo de *Artemia salina*

Para evaluar la actividad citotóxica del extracto crudo de *Lebrunia danae* se realizó el bioensayo de *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982), obtenida mediante la eclosión de quistes (Anexo 1). Se realizaron preliminares con el objetivo de encontrar el intervalo de concentraciones que nos permitiera estimar la concentración letal media (CL₅₀). Se utilizaron organismos con un tiempo de vida de 24 horas. En el primer bioensayo preliminar, se probaron las concentraciones de 100, 50 y 10 mg/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 30 con un error de ± 1 artemia. Se prepararon tres réplicas para cada concentración. El tiempo de exposición a la toxina fue de 24 horas, en el que se registró conducta y mortalidad de los organismos al inicio y final del bioensayo. Las siguientes concentraciones a probar fueron de 1, 5 y 10 mg/ml. Con base en estos resultados preliminares, se probó un intervalo de concentraciones más bajo para encontrar la CL₅₀¹, en esta ocasión, las concentraciones fueron de 0.25, 0.5, 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 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

¹ CL₅₀ para este trabajo se define como la concentración a la que mueren el 50% de los organismos independientemente de que los datos sean o no normales

bioensayo se analizaron por el método estadístico de Reed-Muench para determinar CL_{50} .

4.3.2 Bioensayo hemolítico

La actividad hemolítica del extracto crudo de *Lebrunia danae* se probó en eritrocitos de vaca, cerdo y borrego, empleando el método modificado de Rottini *et al.* (1990 citados en Santamaría *et al.*, 2002). Se tomaron muestras de sangre fresca en tubos de ensayo que contenían solución Alsever (anexo 2) como anticoagulante, e inmediatamente fueron colocados en hielo para evitar hemólisis. El siguiente paso fue lavar los eritrocitos con solución Alsever para eliminar grasa y plasma. La muestra se centrifugó a 3500 RPM durante cinco minutos a una temperatura de 4° C. El sobrenadante se eliminó, mientras que el paquete celular precipitado, se resuspendió en la solución Alsever.

Para calibrar la cantidad de eritrocitos necesaria 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, se realizó de la siguiente manera. Primero se preparó un estándar, tomando 1 ml de la solución de eritrocitos lavados en 10 ml de Alsever. Se colocaron diferentes cantidades de esta solución, desde 30 a 50 μ l, completando el volumen a 1 ml con agua y solución Alsever, posteriormente se realizaron lecturas de absorbancia a 415 nm. Finalmente se encontró que al tomar 40.5, 36.5 y 42 μ l de la sangre de vaca, borrego y cerdo respectivamente, se obtenía el 100% de hemólisis en agua desionizada y 0% en solución Alsever para cada caso.

Una vez hecha la calibración de eritrocitos, se probó el efecto hemolítico de las toxinas de *Lebrunia danae*. Esto se hizo colocando 40.5, 36.5 y 42 μ l de la sangre de vaca, borrego y cerdo respectivamente, en tubos de ensayo con las siguientes concentraciones de extracto crudo disueltas en Alsever por triplicado: 10, 8, 6, 4, 2, 0.5, 0.25 mg/ml y control (solución de eritrocitos más solución Alsever), posteriormente se incubaron a 37°C por 30 minutos. Para determinar la cantidad de hemoglobina liberada (hemólisis) causado por las toxinas, se leyó la absorbancia de cada muestra a 415 nm. 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 entre los valores de hemólisis de cada tipo de eritrocito, se aplicó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, previo esto se realizaron las pruebas de Lilliefors y Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de los datos.

4.3.3 Bioensayo neurotóxico

La actividad neurotóxica del extracto crudo se evaluó mediante el bioensayo de cangrejo (Béress y Zwick, 1980). Para este bioensayo se recolectaron 15 cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* (10-15 gramos) a los cuales se les inyectó 0.01ml de cada concentración de extracto crudo en la tercera pata caminadora. Se registró el tiempo de respuesta observando reacciones de parálisis, convulsiones y muerte durante los primeros 60 minutos después de aplicar la toxina. Para determinar si existía actividad neurotóxica en el extracto se utilizaron concentraciones de 50, 40, 30, 20 y 10 mg/ml disueltas en agua desionizada. Con el fin de encontrar la concentración más baja donde se presentara el efecto neurotóxico, el siguiente intervalo de concentraciones a probar

fue de 10, 8, 6, 4 y 2 mg/ml, esta vez fue por duplicado. El control fue agua desionizada. Para las fracciones purificadas, se realizó el mismo bioensayo diluyendo 1 mg de la fracción liofilizada en un ml de agua desionizada.

4.4. Purificación de polipéptidos activos

4.4.1 Cromatografía líquida.

Se realizó una preevaluación de la actividad del extracto crudo 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 que concentración se presentaba el efecto neurotóxico. Una vez evaluada la actividad del extracto, se procedió a la purificación de la toxina mediante el uso de cromatografía líquida de baja presión, usando un cromatógrafo (Pharmacia Biotech). El primer paso fue la cromatografía de filtración en gel, donde se utilizó un gel tipo Sephadex G50, para separar los grupos de proteínas por tamaño molecular. Posteriormente se empleó un gel de intercambio aniónico QAE Sephadex A25 (Pharmacia Biotech). El siguiente paso fue la eliminación de sales en las muestras obtenidas en la cromatografía anterior, pasándolas por gel Sephadex G50. Siguiendo con la cromatografía de intercambio catiónico, se utilizó una columna empacada con Fractogel EMD SO_3^- 650 M (Merck). Nuevamente se realizó la eliminación de sales en las muestras obtenidas, en este caso, empleando un gel Sephadex G25. Las lecturas de transmitancia, en todos los casos, se realizaron a 280 nm.

Se pesaron 0.8128 g de extracto crudo liofilizado diluyéndolo en 25 ml de agua destilada. La muestra se centrifugó para eliminar sólidos, posteriormente se introdujo en

la columna de Sephadex G-50 (5 x 90 cm) para llevar a cabo la separación del extracto en fracciones de diferente tamaño molecular, utilizando como eluente ácido acético a una concentración 0.7 M, velocidad de flujo en la columna de 3 ml/min y fracciones de 20 ml.

Una vez obtenidas las fracciones, se eligieron aquellas que mostraron mayor valor de transmitancia en el cromatograma (dos de bajo peso molecular, dos de alto peso molecular y una intermedia) y aquellas que presentaron actividad neurotóxica en cangrejos. Posteriormente, estas fracciones se pasaron por la columna de intercambio iónico (Aniónico) de QAE Sephadex A-25 (1.2 x 50 cm), en este caso se utilizó un gradiente escalonado y como eluente acetato de amonio con concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M a un pH de 8.5, el flujo en la columna fue de 2.0 ml/min con fracciones de 15 ml. El siguiente paso consistió en desalar las muestras en Sephadex G50 (2.1 x 89 cm) utilizando ácido acético 0.7 M como eluente con un flujo de 3ml/min recolectando fracciones de 15 ml. Posteriormente se utilizó la columna de intercambio catiónico, Fractogel EMD SO_3^- -650 M (1 x 23 cm), de igual manera se utilizó un gradiente escalonado de acetato de amonio con concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M a un pH de 5.4, el flujo en la columna fue de 2.0 ml/min y las fracciones de 15 ml. El último paso de la purificación en cromatografía líquida consistió en desalar las muestras en Sephadex G-25 (2 x 80 cm), utilizando el mismo eluente que en los casos anteriores para cromatografía de filtración en gel, en este caso la velocidad del flujo fue de 2ml/min con fracciones de 15 ml.

Cada fracción identificada en el cromatograma (picos), se concentró a presión reducida en un volumen aproximado de 15 ml en un rotaevaporador a una temperatura máxima de 30° C. Finalmente se evaluó la actividad neurotóxica de cada una de éstas mediante el bioensayo de cangrejo (Béress y Zwick, 1980).

4.4.2. HPLC

Las fracciones con actividad neurotóxica se sometieron al último proceso de purificación que se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una equipo Varian. Se utilizó acetonitrilo, ácido trifluoroacético y agua grado HPLC como buffers de elusión. 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 5µm, módulo de distribución de solventes ProStar, detector UV-VIS para medir longitud de onda a 280 nm y automuestreador ProStar. La corrida por muestra tuvo una duración de 70 minutos.

4.5. Cuantificación de proteína

Se determinó el contenido de proteína presente en el extracto crudo de *L. danae* siguiendo el método de Bradford (1976) con un kit de *Bio-Rad Protein Assay* (anexo 4). La curva de calibración se realizó con un estándar de suero de albúmina a concentraciones de 1.2, 2, 4.4, 6.6, 8.8 y 10 mg/ml. Posteriormente se analizó la muestra, utilizando extracto crudo liofilizado de *L. danae* a concentraciones de 5, 10 y 15 mg/ml. Se aplicó un tratamiento de regresión lineal para los datos de la curva de calibración y con esto determinar el contenido de proteína en la muestra.

4.6. Determinación de peso molecular por medio de electroforesis en SDS-PAGE.

Para conocer el intervalo de peso molecular del extracto de *L. danae* se realizó una electroforesis en SDS-PAGE a una concentración de 12 % (anexo 6) de acuerdo al método de Laemmli (1970) (citado en Smith, 1994). Las muestras migraron a un voltaje constante de 20 volts durante cuatro horas, corriendo dos geles a un tiempo en una misma cámara. Se colocaron los marcadores de bajo peso molecular (Amersham Biosciences) y extracto crudo a una concentración de 100 mg/ml por duplicado en el mismo gel. Se utilizaron 2 μ l de marcadores por canal, mientras que de muestra se colocaron 4 μ l. La tinción con la técnica de Coomassie (Kruger, 1994) duró aproximadamente 24 horas; para desteñir los geles, el proceso se realizó con una mezcla de metanol-ácido acético 25% : 30 % (anexo 2).

5. Resultados

5.1. Identificación y clasificación de nematocistos de *Lebrunia danae*

Al analizar el extracto obtenido de la anémona *L. danae* al microscopio, se observaron tres tipos de nematocistos diferentes, los cuales se catalogaron en tres diferentes tipos I, II y III. Al medir la longitud de 20 estructuras de cada tipo, se encontraron dimensiones promedio de 4.95, 18.3 y 17.25 μ m para el tipo I, II y III respectivamente.

Tabla I Medición de la longitud de los tres tipos de nematocistos encontrados en el extracto de *Lebrunia danae*

Tipo I	Tipo II	Tipo III
5	20	20
5	20	20
5	19	23
5	19	20
5	21	16
5	19	20
5	19	20
5	18	20
5	15	15
5	18	19
5	19	14
3	19	15
6	16	15
5	18	18
5	17	15
5	15	16
5	15	13
5	20	15
5	19	15
5	20	16
4.95 \pm 0.51	18.30 \pm 1.81	17.25 \pm 2.77

Con base a las dimensiones y características de los nematocistos se realizó la identificación por medio de la clave (Williamson *et al.*, 1996), teniendo como resultado que los nematocistos tipo I son **microbásico amastigóforo** (MiAm), los tipo II **macrobásicos amastigoforos** (MaAm) y los tipo III **espirocistos** (Sp).



Fig. 5 Microfotografía del nematocisto tipo I a punto de descargarse, identificado como **microbásico amastigóforo** (MiAm).

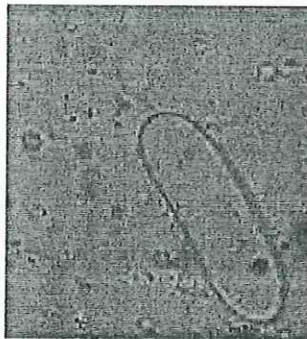


Fig. 6 Microfotografía del nematocisto tipo II descargado, identificado como **macrobásico amastigóforo** (MaAm).

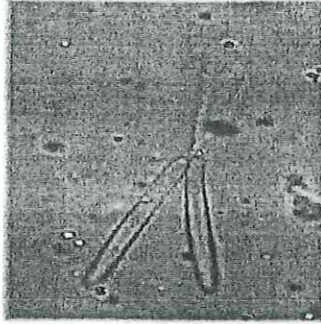


Fig. 7 Microfotografía de nematocistos tipo III descargados, identificados como espirocistos (Sp).

5.2 Cuantificación de proteína y determinación del peso molecular del extracto crudo.

Se determinó el contenido de proteína presente en el extracto crudo, utilizando concentraciones de 5, 10 y 15 mg/ml de extracto liofilizado. Se encontró una concentración máxima de 1.184 mg/ml en 15 mg/ml de extracto, mientras que en la concentración de 5 mg/ml no se reporta concentración (tabla II).

Tabla II Cuantificación de proteína en extracto crudo de *Lebrunia danae*.

Concentración (mg/ml)	Absorbancia	Proteína (mg/ml)
5	0.000	0
10	0.050	0.237
15	0.084	1.184

Con base a la electroforesis de extracto crudo, se obtuvieron 5 bandas claramente identificadas mediante la tinción con la técnica Coomassie. Estas cinco bandas se encuentran entre los valores de 10 y 45 kDa (fig. 8). De acuerdo a las bandas que

muestra el marcador (estándar), la primera le corresponde un valor de 10 kDa (I), seguida de una de 14.3 (II), 20.1 (III), 30 (IV) y 45 kDa (V).

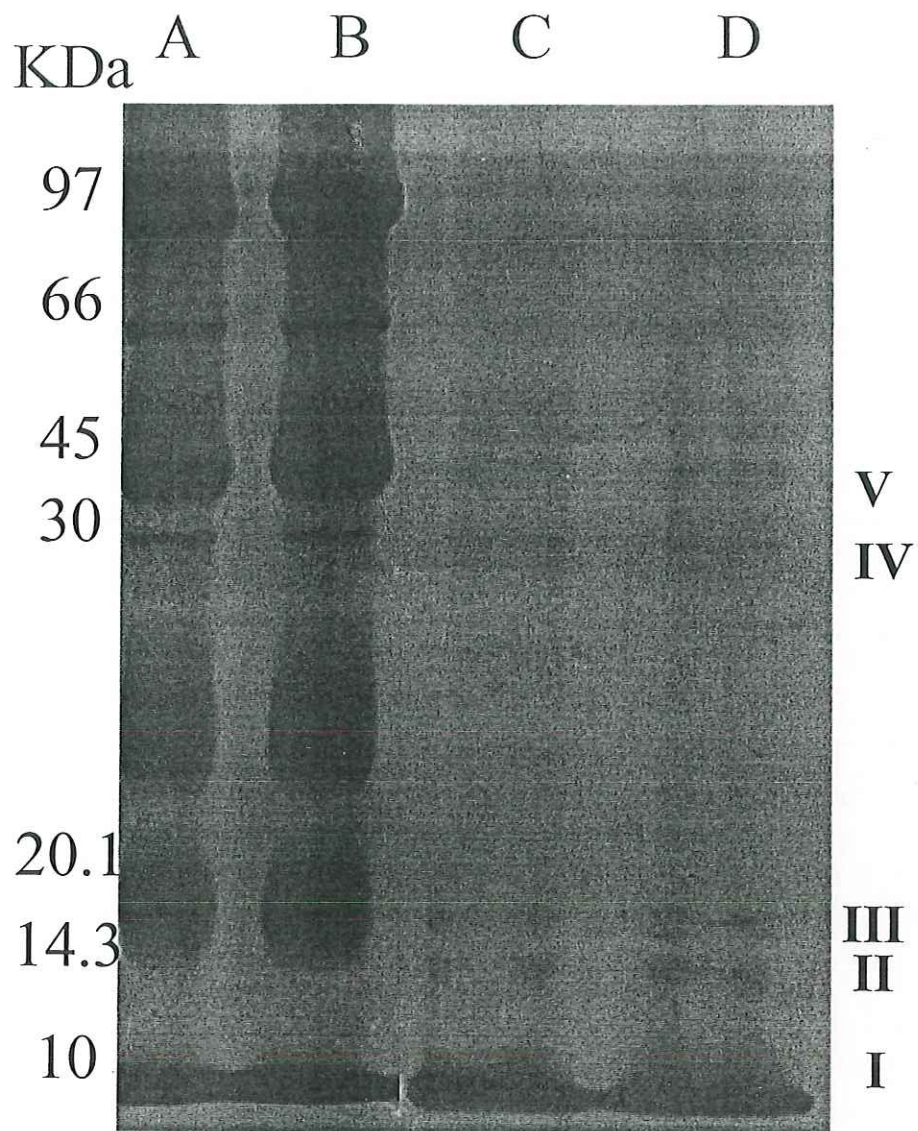


Fig. 8 Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE con una concentración de 12 %. Los carriles A y B corresponden al marcador de bajo peso molecular, C y D corresponden al extracto crudo en concentración de 100 mg/ml.

5.3 Caracterización biológica del extracto crudo

5.3.1. Actividad citotóxica

Basándonos en preliminares, se decidió aplicar un intervalo con concentraciones de 8, 6, 4, 2, 0.5 y 0.25 mg/ml para estimar la CL_{50} . Como lo indica la tabla III, en la concentración más alta (8 mg/ml) se presentó una mortalidad del 96.9 %, mientras que para la concentración mas baja (0.25 mg/ml) ésta fue de 3.4%.

Para estimar CL_{50} se utilizó el método estadístico Reed-Muench, que es el recomendado específicamente para el tratamiento de los datos obtenidos en el bioensayo de *Artemia salina* según Wah (1993). Con base a lo anterior, se construyó una grafica de valores de mortalidad y sobrevivencia (valores acumulados) contra logaritmo de las concentraciones (fig. 9). El punto de intersección de estas líneas nos indicaría el logaritmo de la dosis letal media, valor que corresponde a 0.45. Posteriormente se calculó el error estándar con un nivel de confianza del 95%. La dosis letal que se encontró para el extracto crudo de *L. danae* fue de **2.82 mg/ml**.

Tabla III. Tratamiento de datos del bioensayo de *Artemia salina* por el método de Reed-Muench para estimar CL_{50} .

Concentración (mg/ml)	Log de la concentración	Muertos	Vivos	Muertos acumulados	Vivos acumulados	% Mortalidad
10	1	30	0	125	0	100
8	0.903	27	3	95	3	96.9
6	0.778	26	4	68	7	90.6
4	0.602	23	7	42	14	75
2	0.301	12	18	19	32	37.3
0.5	-0.301	4	26	7	58	10.8
0.25	-0.602	3	27	3	85	3.4

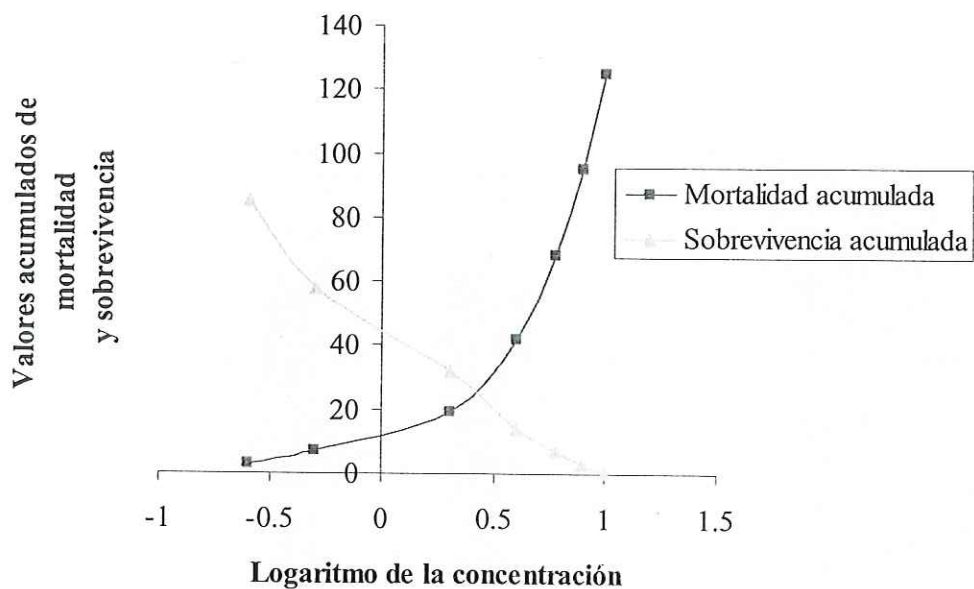


Fig. 9 Gráfica de los valores acumulados de mortalidad y supervivencia contra el logaritmo de la concentración para estimar la CL_{50} del bioensayo de *Artemia salina* por el método de Reed-Muench

5.3.2. Actividad hemolítica

La actividad hemolítica se observó mediante una curva dosis-respuesta (fig. 10) que presenta la cantidad de hemoglobina liberada, medida en valores de transmitancia, causada por el efecto de las distintas concentraciones de extracto crudo de la anémona *Lebrunia danae*. El extracto crudo causó hemólisis en los tres tipos de eritrocitos expuestos a la toxina en un intervalo de concentraciones de 0.006 a 0.238 mg de proteína/mg (tabla IV). Al medir la actividad hemolítica aparentemente se observó una mayor sensibilidad por los eritrocitos de borrego, seguido por los eritrocitos de vaca y finalmente los eritrocitos de cerdo; sin embargo, no se determinaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis al 95%, $H_{cal} = 0.25$ vs. $H_{crit} = 5.819$) entre los valores de hemólisis en los tres tipos de eritrocitos.

Tabla IV. Valores de hemólisis medida en absorbancia correspondiente a eritrocitos de vaca, borrego y cerdo; expuestos a distintas concentraciones de extracto crudo de la anémona *Lebrunia danae*.

Concentración de extracto (mg Proteína/ml)	Vaca	Borrego	Cerdo
0.238	0.395	0.496	0.501
0.190	0.385	0.485	0.409
0.143	0.269	0.329	0.188
0.095	0.178	0.195	0.129
0.048	0.075	0.075	0.082
0.012	0.013	0.014	0.032
0.006	0.004	0.003	0.030

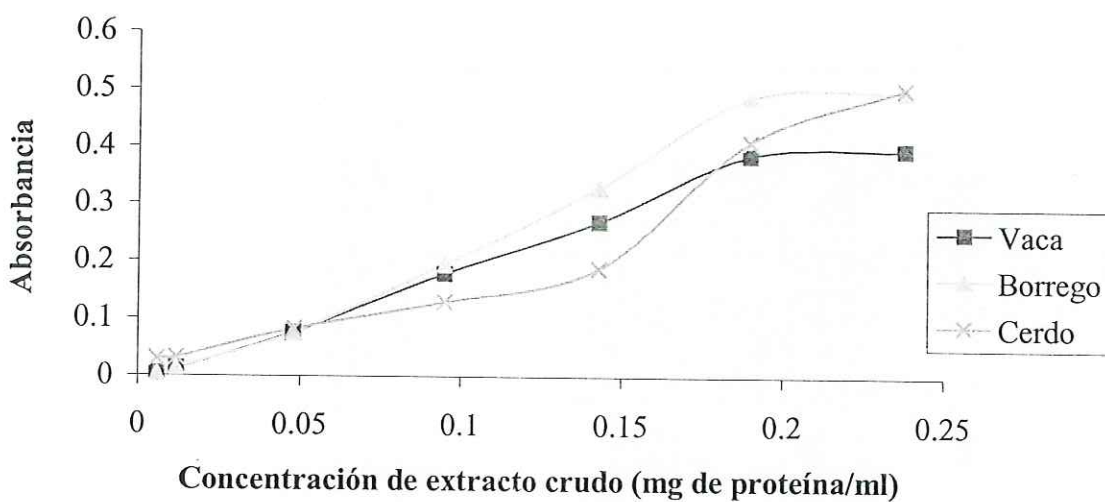


Fig. 10 Curva de dosis-respuesta representando la hemólisis de los eritrocitos de vaca, borrego y cerdo, medida en absorbancia a 415 nm, causada por exposición a las diferentes concentraciones del extracto de *L. danae*

5.3.3. Actividad neurotóxica

Se probó el efecto neurotóxico del extracto crudo de *Lebrunia danae* inyectando 0.1 ml de diferentes concentraciones de extracto crudo a cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*. Iniciamos probando concentraciones de 50 a 10 mg/ml para encontrar la concentración más baja en la que se observara efecto. Con las concentraciones de 50 a 10 mg/ml la respuesta fue inmediata, los organismos presentaron lentitud en sus movimientos al momento de inyectar la toxina, se observó parálisis parcial en las patas, posteriormente se presentaron convulsiones fuertes que terminaron con una parálisis total, los organismos murieron antes de 60 minutos.

Finalmente se probaron concentraciones de 8, 6, 4 y 2 mg/ml, para esta parte se utilizaron dos organismos por concentración. Se encontró que a partir de los 4 mg/ml no ocurría ninguna reacción, al igual que en 2 mg/ml. En las concentraciones de 6 y 8 mg/ml, los organismos tuvieron convulsiones leves y parálisis sólo en el apéndice donde se aplicó la toxina (tercera pata caminadora). La muerte ocurrió en un tiempo mayor a 60 minutos. Los organismos que sobrevivieron a las concentraciones más bajas estuvieron bajo observación durante seis horas antes de ser liberados, durante este tiempo no presentaron ninguna reacción que revelara un efecto neurotóxico.

Este preliminar fue necesario para probar la existencia de la actividad neurotóxica y determinar la concentración más baja donde se presenta dicho efecto que fue a los 6mg/ml. A partir de esto, se inició la purificación de los compuestos activos presentes en el extracto mediante cromatografía líquida de baja presión.

5.4 Purificación y evaluación de la actividad neurotóxica de los polipéptidos activos aislados.

La primera cromatografía de este proceso de purificación se realizó en Sephadex G-50 (5 x 90 cm), extrayendo 14 fracciones de las cuales, sólo se consideraron aquellas que presentaron mayor valor de transmitancia (picos) considerando dos de alto peso molecular (F3 y F7), dos de bajo peso molecular (F11 y F12) y una intermedia (F9). Las cinco fracciones (Fig. 11) seleccionadas se evaluaron mediante el bioensayo de cangrejo (Béress & Zwick, 1980) para detectar actividad neurotóxica. Sólo cuatro fracciones resultaron activas (F3, F7, F9 y F12), causando efectos en el cangrejo, tales como parálisis, convulsiones y posteriormente la muerte de los organismos.

El siguiente paso de la purificación fue la cromatografía de intercambio aniónico en QAE Sephadex A-25 (1.2 x 50 cm). De los cuatro cromatogramas correspondientes a las fracciones activas, nuevamente se seleccionaron las fracciones que presentaron mayor valor de transmitancia, en este caso no se realizó el bioensayo con cangrejo para continuar con la siguiente fase de purificación, que consistió en la eliminación de sales, en Sephadex G-50 (2.1 x 81 cm). En este caso sólo se seleccionaron dos fracciones centrales de cada cromatograma, que es donde ocurre la eliminación de las sales presentes en la muestra.

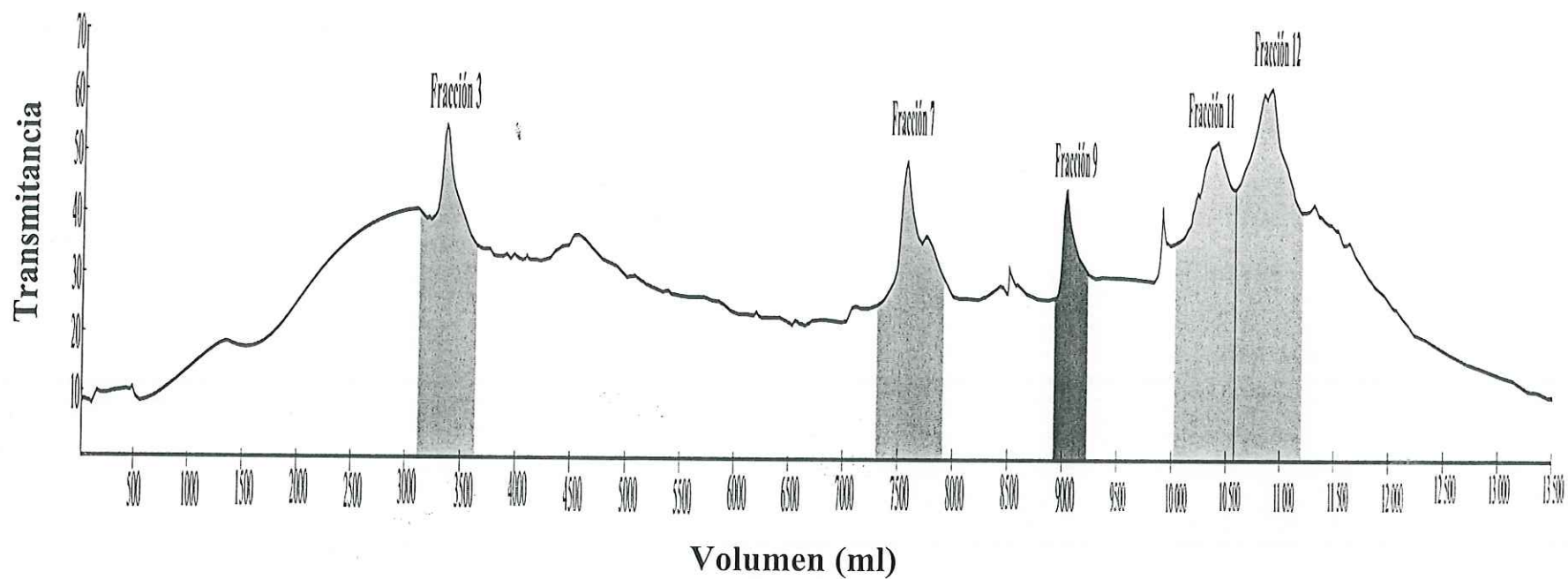


Fig. 11 Fracciones activas obtenidas de la purificación del extracto crudo de la anémona *Lebrunia danae* en cromatografía líquida de gel Sephadex G50 (5 x 95 cm)

A continuación se realizó la cromatografía de intercambio catiónico en Fractogel EMD SO_3^- -650 M (1 x 23 cm), en este paso la selección fue variada, basándose nuevamente en el hecho de elegir aquellas fracciones que presentaron mayor valor de transmitancia (picos) y además la concentración del eluyente (acetato de amonio), ya que esperábamos que los compuestos de interés salieran durante las primeras concentraciones del gradiente tales como 0.01, 0.05, 0.1 y 0.3 M. En el caso de la fracción G50F3/QAEF1/G50F2, se tomaron 9 fracciones del cromatograma (F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8 y F9). Para la fracción G50F7/QAEF4/G50F2 se seleccionaron las fracciones F1, F2, F4 y F6. En el caso de G50F9/QAEF1/G50F2, las fracciones F1, F2, F4 y F6; finalmente para G50F12/QAEF1/G50F2 las fracciones F1, F2, F4 y F6. Una vez más se realizó la eliminación de sales de todas las muestras seleccionadas por gel Sephadex G25 (2 x 80 cm). El proceso de purificación (cromatogramas), así como la selección de las fracciones activas se muestra gráficamente en las figuras 12, 13, 14 y 15.

Para continuar con el último paso de la purificación, que corresponde al HPLC, se realizó nuevamente el bioensayo de cangrejo que nos permitiría identificar y purificar solo aquellas fracciones que presentaran actividad neurotóxica. La tabla V muestra el nivel de actividad neurotóxica de cada fracción, así como las reacciones de los organismos.

Tabla V Evaluación neurotóxica de las fracciones purificadas en Sephadex G-25

Fracción		Nivel de actividad
F3	a	*
	b	**
	c	*
	d	*
	e	**
	f	--
	g	--
	h	**
	i	--
	j	/
	k	**
F7	a	--
	b	*
	c	*
	d	**
F9	a	**
	b	**
	c	/
	d	/
	e	*
	f	**
F12	a	**
	b	--
	c	*
	d	**

** Activa, parálisis inmediata después de aplicar la toxina, presenta fuertes convulsiones (1 ó 2 minutos) y la muerte ocurre en menos de cinco minutos.

* Poco activa, los organismos presentan parálisis después de cinco minutos, convulsiones leves antes de los 10 minutos, la muerte ocurre entre 15 y 60 minutos después de haber aplicado la toxina.

-- no activa, el organismo se recupera sin presentar reacción tóxica

/ fracción tóxica, no presenta ninguna reacción del efecto neurotóxico, sin embargo el organismo muere en un tiempo menor a dos minutos

Una vez identificadas las fracciones activas (**) se procedió a la purificación en HPLC. El tiempo de corrida para cada muestra fue de 70 minutos, midiendo transmitancia a una longitud de onda de 280 nm. En total se analizaron nueve fracciones con el propósito de aislar las neurotoxinas en su estado más puro. Este objetivo se cumplió con la fracción F3b, logrando tener una señal única en el cromatograma (Fig. 12, H), el cual es detectado a los 39 minutos de la corrida (tiempo de retención). Es de notar que en la misma fracción (F3), el resto de los cromatogramas aparecen dos o más señales (Fig. 12. I, J y K), lo que indica la presencia de más de un compuesto. Para los casos de las fracciones 9 (Fig. 14, G, H e I) y 12 (Fig. 15, F y G), los cromatogramas muestran varias señales, indicando que el proceso de purificación no fue el indicado para el tipo de compuestos que se presentan en estas muestras.

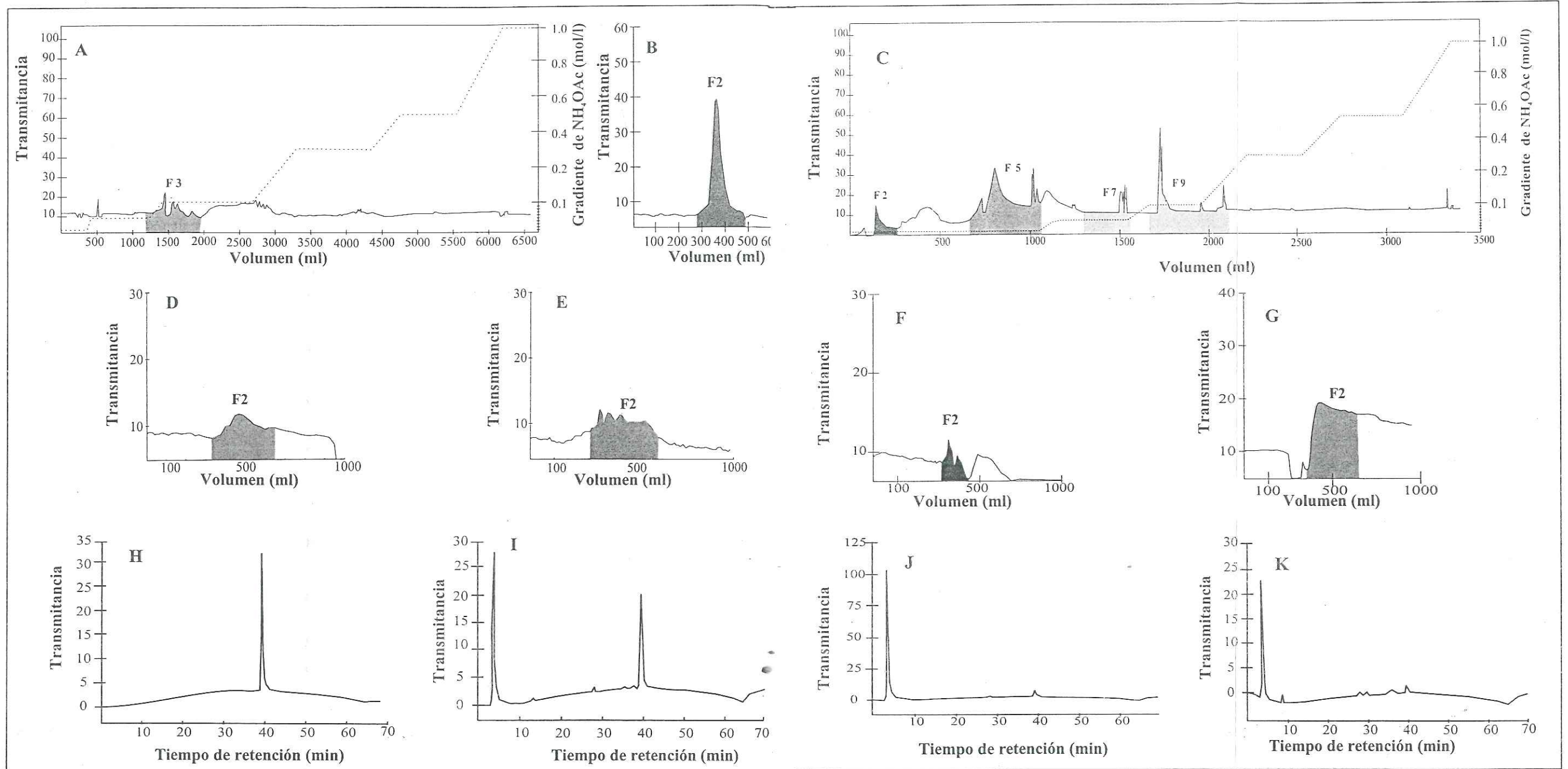


Fig. 12 Purificación de la fracción activa número 3 obtenida en la cromatografía del extracto de A-25 de la fracción tres (G50F3). B) Eliminación de sales de la fracción tres de QAE (QAEF3), en gel (QAEF3/G50F2). D, E, F y G) Eliminación de sales en gel G25 de las cuatro fracciones activas activas desaladas (F3b, F3e, F3h y F3k) en HPLC.

Lebrunia danae en gel Sephadex G50. A) Cromatografía de intercambio aniónico en QAE Sephadex G50. C) Intercambio catiónico en Fractogel EMD SO_3^- -650 de la fracción dos desalada obtenidas del fractogel (Fractogel/F2, F5, F7 y F9). H, I, J y K). Purificación de las cuatro fracciones

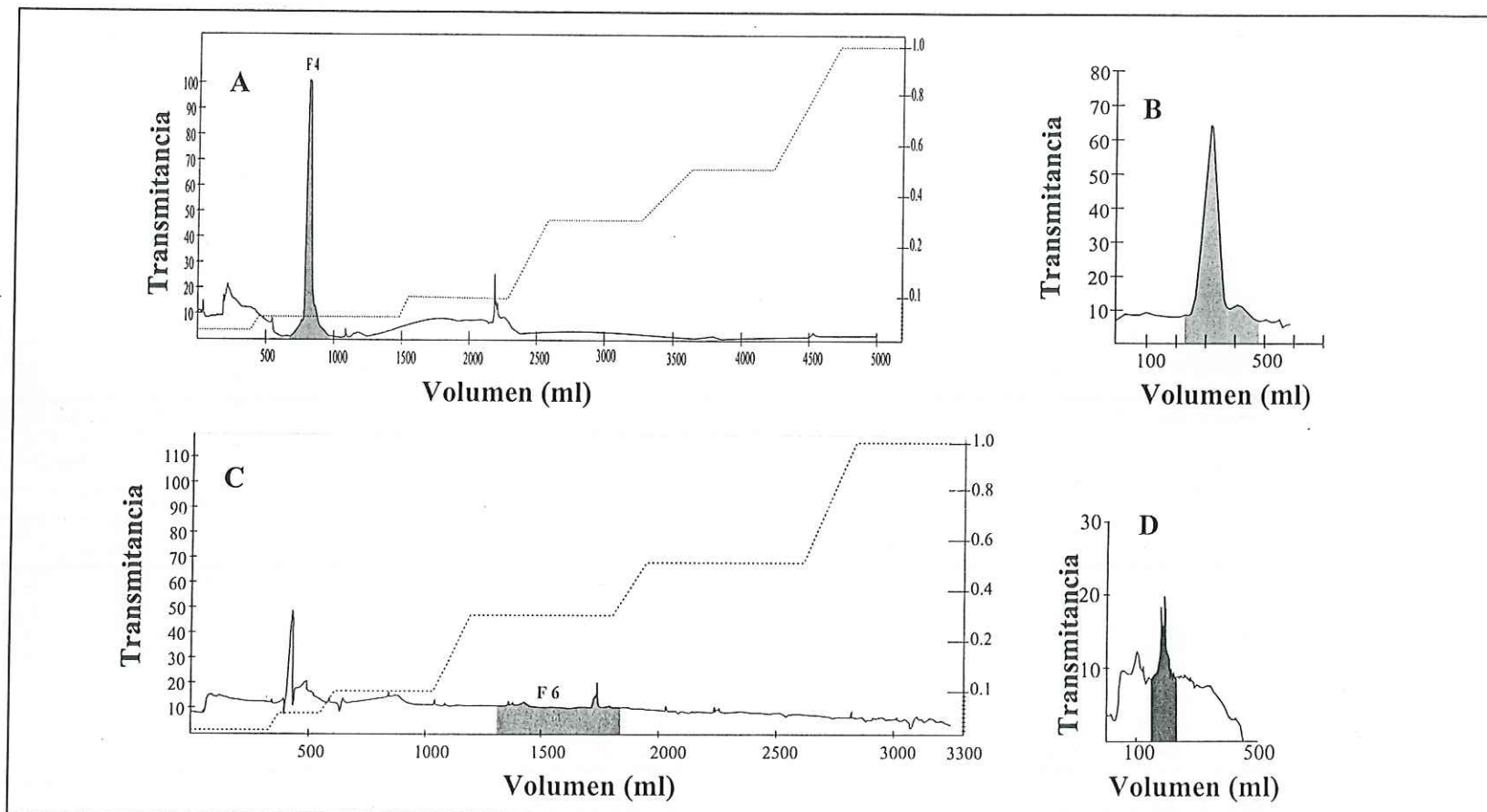


Fig 13 Purificación de la fracción activa número 7 obtenida en la cromatografía del extracto de *Lebrunia danae* en gel Sephadex G50. A) Cromatografía de intercambio aniónico en QAE Sephadex A-25 de la fracción siete (G50F7). B) Eliminación de sales de la fracción cuatro de QAE (QAEF4), en gel Sephadex G50. C) Intercambio catiónico en Fractogel EMD SO_3^- -650 de la fracción dos desalada (QAEF4/G50F2). D) Eliminación de sales en gel G25 de la fracción activa número seis obtenida del fractogel (FractogelF6).

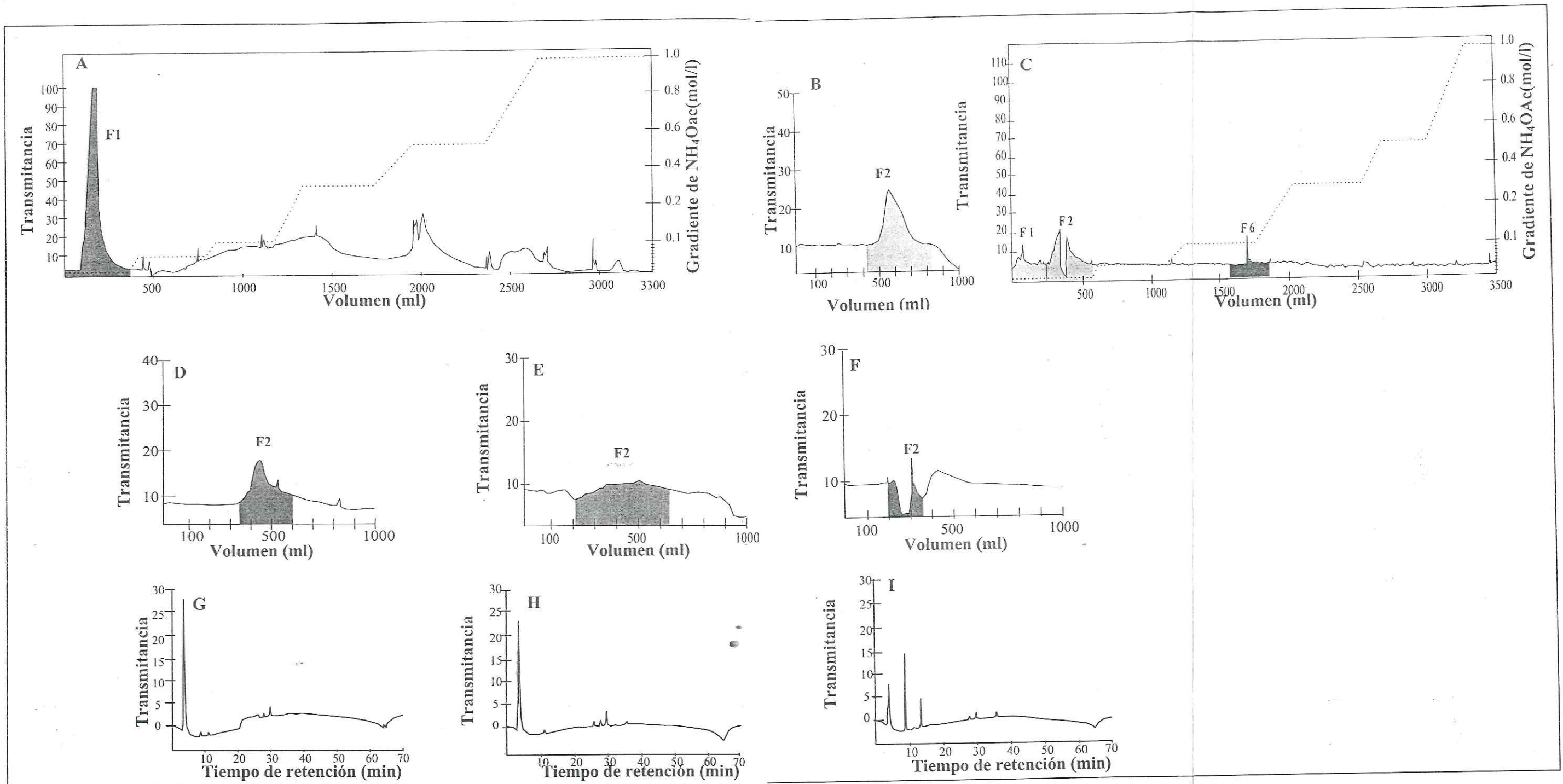


Fig. 14 Purificación de la fracción activa número 9 obtenida en la cromatografía del extracto de *Lebrunia danae* en gel Sephadex G50. A) Cromatografía de intercambio aniónico en QAE Sephadex Sephadex G50. C) Intercambio catiónico en Fractogel EMD SO_3^- -650 de 1 a fracción dos desalada del fractogel (Fractogel/F1, F2, y F6). G, H e I). Purificación de las tres fracciones activas desaladas (F9a, F9b, F9f) en HPLC

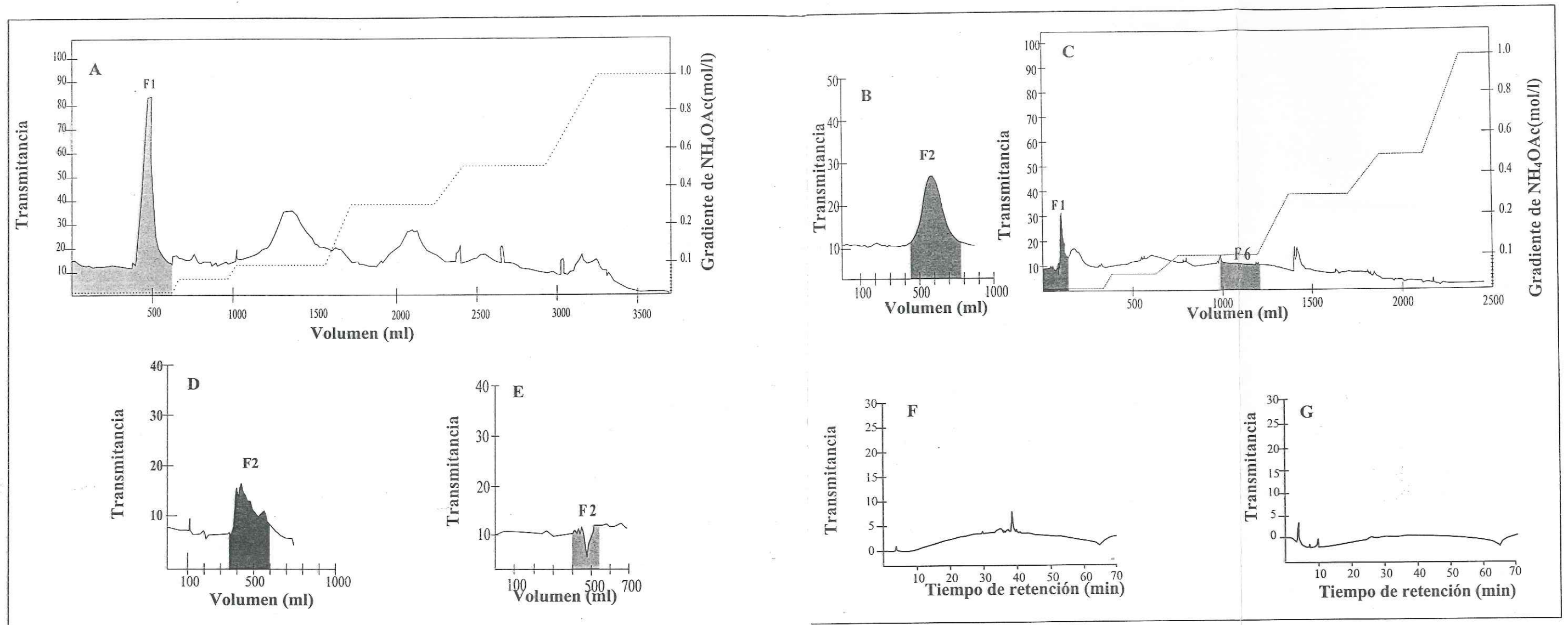


Fig 15 Purificación de la fracción activa número 12 obtenida en la cromatografía del extracto de *A-25* de la fracción uno (G50F3). **B)** Eliminación de sales de la fracción uno de QAE (QAEF1), en (QAEF1/G50F2). **D y E,**) Eliminación de sales en gel G25 de las dos fracciones activas obtenidas del F12d) en HPLC.

Lebrunia danae en gel Sephadex G50. **A)** Cromatografía de intercambio aniónico en QAE Sephadex gel Sephadex G50. **C)** Intercambio catiónico en Fractogel EMD SO_3^- -650 de la fracción dos desalada fractogel (Fractogel/F1 y F6). **F y G,**) Purificación de las dos fracciones activas desaladas (F12a y

6. Discusiones

Cuando se cuenta con una especie que no ha sido evaluada con anterioridad, es conveniente iniciar los estudios con la evaluación del tipo de actividad biológica que presentan las toxinas, una vez hecho esto se puede iniciar la purificación de los compuestos activos. Esto ha sido apoyado por Mongelli y Pomilio (2002) en donde sugieren que el primer paso en la investigación de productos naturales debe ser la demostración de la actividad biológica, precediendo necesariamente a los otros pasos en el desarrollo de nuevos medicamentos. La detección inicial de actividad biológica sirve para seleccionar o descartar extractos crudos. Posteriormente se procede al fraccionamiento siguiendo cada una de sus etapas mediante determinación de la actividad biológica, de modo que solo los compuestos activos sean aislados e identificados. Por lo anterior, el extracto crudo de *Lebrunia danae* se sometió a pruebas para evaluar la actividad citotóxica, hemolítica y neurotóxica. Posteriormente para la purificación sólo se seleccionaron aquellos compuestos que presentaron actividad neurotóxica, esto fue posible mediante bioensayos utilizando cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* (Béress y Zwick, 1980). Conforme se iban purificando los compuestos activos, mediante el uso de los diferentes tipos de cromatografía líquida (intercambio iónico y filtración en gel) se aplicaba el bioensayo antes mencionado para seleccionar las fracciones activas y continuar con su purificación.

El primer paso de esta investigación, consistió en identificar las estructuras que guardan la toxina, llamadas nematocistos. Se aislaron e identificaron tres tipos de

nematocistos: microbásico amastigóforo (MiAm), macrobásico amastigóforo (MaAm) y espirocistos (Sp). Para la identificación se utilizó la clave de Williamson *et al.* (1996).

El método utilizado en este trabajo para la extracción de nematocistos (Kem *et al.* 1989) (ciclos de congelado-descongelado en agua destilada) fue efectivo para aislar los tres tipos, ya que en todas las preparaciones siempre se encontraron los mismos organelos. Esta técnica nos permitió analizar suficientes nematocistos para la identificación, tomando diferentes preparaciones en las que fue posible medirlos para determinar la longitud promedio en cada tipo, siendo de $4.95 \pm 0.51 \mu\text{m}$ para MiAm, $18.3 \pm 1.81 \mu\text{m}$ para MaAm y $17.25 \pm 2.77 \mu\text{m}$ en el caso de los espirocistos (tabla I).

La descarga de los nematocistos puede ser debida a estímulos químicos y/o mecánicos producidos por la victima o la presa. Hessinger (1988) menciona que las toxinas están diseñadas ya sea para tener un efecto inmediato de defensa, para urticar o inducir dolor en un depredador potencial o para tener un efecto ofensivo inmediato, matando o paralizando a la presa.

Algunos trabajos utilizan la homogenización para descargar los nematocistos, Bloom *et al.* (1998) mencionan que cualquier tratamiento fuerte, ya sea físico o químico afectaría la toxina. En el caso de *L. danae*, para descargar estos organelos fue suficiente la agitación vigorosa del extracto crudo en solución, mediante el uso de una varilla de vidrio. Long-Rowe y Burnett (1994, citado en Ávila-Soria, 2001) indican que los estímulos mecánicos más utilizados para romper las células y liberar la toxina, son la homogenización y centrifugación, sin embargo esto puede provocar la pérdida de cierta actividad biológica. El hecho de haber utilizado un estímulo menos agresivo que los

mencionados, nos asegura que el efecto que pueda tener sobre la naturaleza química de la toxina será mínimo. Además se utilizó agua desionizada que es un buen medio para mantener la actividad de las toxinas sin necesidad de medios químicos que puedan alterar procesos.

Monastyrnaya *et al.* (2002) indican que las anémonas producen muchas proteínas y polipéptidos activos, tales como neurotoxinas, citolisinas y fosfolipasas. Las neurotoxinas de anémonas son herramientas importantes en la investigación neurofisiológica y farmacológica. Cerca de 30 citolisinas se han caracterizado en más de 20 especies de anémonas. Todas estas son básicamente proteínas. El mayor interés de estas proteínas se debe a la variedad de propiedades farmacológicas, tales como cardioestimuladores, antitumorales y antimicrobiales entre otras.

Se sabe que los compuestos tóxicos de interés están en el contenido protéico del extracto, es por eso que se determina la cantidad de proteína en el extracto crudo, así como la determinación de peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE, para identificar el tamaño de las diferentes proteínas que comprende dicha mezcla. Monastyrnaya *et al.* (2002) mencionan que las proteínas presentes en las toxinas aisladas de la anémona *Radianthus macrodactylus*, son de alto peso molecular con un valor de 20 kDa. En el extracto de *L. danae* encontramos proteínas con tamaño de 10 a 45 kDa, y por cada 15 mg/ml de extracto crudo se encontró 1.84 mg/ml de proteína.

Para determinar la actividad biológica del extracto crudo se realizaron tres tipos de bioensayos, cada uno con un fin específico, el primero de ellos fue el citotóxico, que consistió en evaluar el efecto tóxico del extracto crudo de *L. danae* en *Artemia salina*; el

bioensayo hemolítico para detectar las toxinas que afectan específicamente membranas celulares y el bioensayo con cangrejos para identificar neurotoxinas en el extracto crudo y a partir de esto, asilar y purificar las sustancias responsables de dicho efecto.

Munro y Blunt (1987 citados en Montiel-Pichardo, 1999) mencionan que el bioensayo con *Artemia salina* es una prueba simple de letalidad y un buen indicador de citotoxicidad, lo que lo hace ideal para la rápida evaluación de procedimientos de fraccionación. Meyer (1982) afirma que utilizar *Artemia salina* como organismo de prueba correlaciona positivamente con actividad antitumoral y contra cáncer. A pesar de no ser específico para actividad antitumoral ni indicador de alguna acción fisiológica particular, este bioensayo puede utilizarse para monitorear un significativo número de compuestos con actividad citotóxica, ya que es una prueba económica y requiere de poco tiempo para llevarlo a cabo.

Para este bioensayo se utilizaron concentraciones de 0.25 a 10 mg de extracto crudo /ml, se encontró 100% de mortalidad en la concentración de 10 mg/ml, mientras que la mortalidad mas baja, que fue de 3.4%, a una concentración de 0.25 mg/ml. El efecto citotóxico fue evidente durante los primeros minutos, en las concentraciones altas (4, 6, 8 y 10 mg/ml) a las que los organismos fueron expuestos, ya que de inmediato se presentaron reacciones tales como poco movimiento, dificultad en el nado y la muerte. Situación que no se presentó en las concentraciones bajas (0.25, 0.5 y 2 mg/ml), donde aparentemente los organismos no sufrieron efecto alguno al momento de exponerlos a la toxina. Pasadas 24 horas, se presentó mortalidad en algunos organismos. Al término del bioensayo (24 horas), los organismos sobrevivientes de las concentraciones bajas se

encontraron sin ninguna alteración al igual que los organismos controles que no estuvieron expuestos a la toxina, en contraste, los sobrevivientes de concentraciones altas presentaron dificultad en el nado y poco movimiento.

Wah (1993) menciona que para determinar la CL_{50} , pueden utilizarse los métodos estadísticos de DeBeer, Litchfield y Wilcoxon así como el método Probit de Miller y Tainter, pero sugiere que el método estadístico Reed-Muench es el más conveniente para determinar la CL_{50} en bioensayos con *Artemia salina* ya que se asume que un organismo que sobrevive a una dosis dada podría haber sobrevivido a una dosis más baja y viceversa, un animal que murió a cierta dosis podría haber muerto a cualquier dosis mas alta. Por lo tanto, la información de cualquier grupo puede sumarse a otros grupos en un intervalo de dosis probadas.

Utilizando el método estadístico de Reed-Muench, se estimó una CL_{50} de 2.82 mg/ml para el extracto de *L. danae*. Fernández-Apango² (2004, com. pers.) registra actividad citotóxica con una CL_{50} de 5.78 mg/ml para la anémona *Anthopleura elegantísima*. Haciendo comparación entre estas dos especies, *Anthopleura elegantísima*, registra una CL_{50} mayor que *Lebrunia danae*, haciendo evidente que ésta última presenta toxinas más potentes por tener una CL_{50} más baja; sin embargo, es necesario mencionar que los métodos de extracción son diferentes, ya que para *Anthopleura elegantísima* el extracto crudo se realizó con el organismo completo, lo que representa una mezcla de más componentes, mientras que el extracto de *Lebrunia danae* se obtiene a partir de los nematocistos, una factor a considerar, ya que éste podría

² Fernández-Apango, J.A. Facultad de Ciencias Marinas, UABC. A.P. 453, Ensenada, B.C. México. apango@uabc.mx

determinar la potencia de una toxina. En medusas, Estrada-Muñoz (2001) encontró actividad citotóxica en el extracto crudo de la medusa *Carybdea marsupialis*, y registró el 100% de mortalidad a una concentración de 0.1 mg/ml. Podemos notar la amplia diferencia de concentración requerida para el 100% de mortalidad entre la anémona *L. danae* y esta medusa, ya que en el caso de la anémona fue necesario una concentración de 10 mg/ml para esta mortalidad. Por otro lado Meyer *et al.* (1982) reporta especies con dosis letales mayores de 1000 µg/ml que fueron activas contra cáncer. Con lo anterior podríamos decir que el extracto crudo de *L. danae* podría presentar actividad citotóxica y con potencial para ser probada contra cáncer.

El ensayo de hemólisis es un procedimiento cuantitativo muy simple que permite detectar la actividad citolítica que actúa sobre las membranas celulares. La sensibilidad de estos ensayos depende de varios factores, entre los que destacan el tipo de eritrocitos, el método de conteo de los eritrocitos usado y las condiciones de incubación (Kem, 1988). El bioensayo hemolítico se utiliza de manera estándar para conocer el efecto que podría tener la toxina a nivel celular, asimismo conocer el posible potencial que ésta representa. Por otro lado Maček *et al.* (1994) indican que la hemólisis representa una prueba muy sensible, lo cual es útil para caracterizar citolisinas de anémonas. Para evaluar la hemólisis en este trabajo, se utilizaron eritrocitos de borrego, vaca y cerdo; los cuales presentaron distintos niveles de sensibilidad respecto a las diferentes concentraciones de extracto crudo de *Lebrunia danae* (0.006 a 0.238 mg de proteína/ml). El extracto causó hemólisis en los tres tipos de eritrocitos.

Zugasti-Cruz (2001) afirma que el veneno de la anémona *Bartholomea annulata* provoca la hemólisis en eritrocitos de perro, conejo, humano y ratón, en concentraciones de 0.02 a 0.224 mg de proteína/ml. En dicho estudio los eritrocitos de perro fueron los más sensibles a la toxina. Se ha encontrado actividad hemolítica en los extractos de un gran número de cnidarios como *Chironex fleckere*, *Chrysaora quinquecirrha*, *Physalia physalis*, *Aiptasia palida* e *Hidra oligactis* entre otros (Klug *et al.*, 1989 citados en Estrada-Muñoz, 2001).

El efecto hemolítico se representó en una curva de dosis-respuesta donde claramente se observa que al aumentar la concentración de toxina (mg de proteína/mg), el rompimiento de células se incrementa (hemólisis), de manera que la cantidad de hemoglobina liberada al medio es mayor; esto se demuestra al obtener mayores valores de absorbancia (fig.10).

Se desconocen las causas por las que los eritrocitos de diversas especies muestran diferentes grados de hemólisis cuando se les aplican compuestos citolíticos de anémonas, ya que no se ha encontrado una relación directa entre la proporción de los esfingolípidos (principalmente la esfingomielina) existente en cada tipo de eritrocito con respecto a la lisis, utilizando el mismo tipo de toxina (Maček *et al.*, 1994). La diferencia en la composición lipídica de los eritrocitos, puede ofrecer una posible explicación para la variación en la sensibilidad al mismo extracto. Sin embargo, con base a la prueba estadística de Kruskal-Wallis ($H_{cal} = 0.25$ vs. $H_{crit} = 5.819$), en este trabajo no encontramos diferencia significativa en la respuesta de los tres tipos de eritrocitos expuestos al extracto de *L. danae*.

Santamaría *et al.* (2002), encontraron que el extracto crudo de la anémona *Bartholomea annulata* contiene citolisinas, ya que es capaz de inducir hemólisis en eritrocitos de ratón. Además afirman que la respuesta hemolítica fue dependiente de la concentración, sugiriendo que el conjunto de toxinas es directamente proporcional al contenido de proteína. En efecto, al determinar el contenido de proteína en el extracto de *L. danae*, encontramos que mientras mayor fue contenido de proteína, el efecto hemolítico fue mayor en los tres tipos de eritrocitos que se utilizaron para este bioensayo.

Para evaluar la actividad neurotóxica, se utilizaron cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, los cuales son altamente sensibles a las neurotoxinas. Este bioensayo está bien documentado con anémonas, Béress y Zwick, (1980) indican que es un método estándar como principio de la caracterización de la actividad biológica y los efectos fisiológicos que ésta pueda producir en el organismo. Las respuestas de un efecto neurotóxico consisten en convulsiones, parálisis y muerte. La investigación realizada demuestra que el extracto crudo de *Lebrunia danae* posee neurotoxinas potentes que causaron efecto en los organismos. Estos resultados coinciden con otras especies de cnidarios como las medusas *Carybdea marsupialis* (Estrada-Muñoz, 2001) *Aurelia aurita* (Ávila-Soria, 2001) y la anémona *Bartholomea annulata* (Zugasti-Cruz, 2001).

Por otro lado Monastyrnaya *et al.* (2002) purificaron y caracterizaron 5 polipéptidos activos de la anémona *Radianthus macrodactylus* (RTX-A, RTX-S, RTX-G, RmI y RmII) las cuales presentaron actividad hemolítica, histaminolítica e inhibidora de proteasas. En este estudio se utilizaron cangrejos para determinar la dosis letal media,

encontrando valores de 4.5, 14.3 y 2.4 y 16 mg/kg para las toxinas RTX-A, RTX-6, RTX-5 y Rml respectivamente. Afirman que las diferencias en la dosis letales se debe al grado de purificación de las citolisinas y la presencia de compuestos no proteicos.

Este bioensayo nos prueba que evidentemente existe la actividad neurotóxica en el extracto de *Lebrunia danae*, a partir de estas pruebas se inicio la purificación de los compuestos responsables de tal efecto.

Con el fin de clasificar las fracciones que contienen los compuestos activos, durante la purificación, se utilizaron nuevamente cangrejos para hacer una selección de estas fracciones. El bioensayo se realizó dos veces; una después de la primera cromatografía en Sephadex G50 (14 fracciones), donde se separan los grupos por peso molecular y la segunda, después de todo el proceso de purificación por geles de intercambio iónico (catiónico y aniónico) así como eliminación de sales en Sephadex G50 y G25 (25 fracciones). En este punto, se seleccionaron las fracciones activas para continuar con el último paso de la purificación que fue en HPLC. De las 25 fracciones obtenidas, 5 fueron inactivas, 3 tóxicas y 17 activas; de éstas sólo se tomaron las 10 fracciones con mayor actividad, el criterio de selección que se utilizó en este caso, fue tomar aquellas que presentaban parálisis inmediata, convulsiones en el primer minuto y muerte antes de cinco minutos. Estas reacciones fueron más intensas que las observadas con el extracto crudo.

Además de fracciones con actividad neurotóxica, encontramos otras con efecto tóxico (F3j, F9c y F9d), donde el organismo murió en un tiempo menor a 2 minutos, sin presentar las reacciones que indican un efecto neurotóxico.

La intensidad de los efectos de la actividad neurotóxica en el organismo, con fracciones purificadas, se atribuye a que en éstas ya no existe una mezcla tan heterogénea de polipéptidos como en el extracto crudo, que probablemente interfieren en el efecto. Estas fracciones se purificaron en HPLC, con el fin de obtener el compuesto más puro que causara dicho efecto. Esto sólo fue posible para la fracción F3b, presentando un cromatograma donde se aprecia claramente la señal de un sólo compuesto, lo que significa que la purificación del compuesto activo en esta fracción fue exitosa. El resto de las fracciones presentaron señales de dos o más compuestos, lo que indica que posiblemente en estas muestras teníamos isotoxinas las cuales se requiere separar de manera manual para poder caracterizarlas por separado. Se aisló una potente neurotoxina de la anémona *Lebrunia danae*, que pertenece a la fracción F3b. Béress y Béress, (1984) señalan que los polipéptidos neurotóxicos que actúan a nivel de los canales de sodio, presentan puentes de disulfuro que mantienen su estabilidad estructural y funcional durante el proceso de purificación. Con base a estas observaciones se sugiere la presencia de polipéptidos neurotóxicos que actúan a nivel de los canales de sodio y están ejerciendo efectos adversos sobre las células musculares, produciendo contracciones en los apéndices caminadores.

7. Conclusiones

Se aislaron e identificaron tres tipos de nematocistos en el extracto crudo de *Lebrunia danae*, los cuales fueron microbásico amastigóforo (MiAm), macrobásico amastigóforo (MaAm) y espirocistos (Sp).

El extracto crudo de *L. danae* contiene proteínas con tamaño molecular de 10 a 45 kDa.

El extracto crudo de la anémona *L. danae* presenta actividad hemolítica en concentraciones de 0.006 a 0.238 mg de proteína/ml en eritrocitos de borrego, vaca y cerdo.

No se encontraron diferencias significativas en los valores de hemólisis causados por el extracto de *L. danae* en los tres tipos de eritrocitos evaluados.

El bioensayo de *Artemia salina* mostró la existencia de actividad citotóxica en el extracto crudo de la anémona *L. danae* con una CL_{50} de 2.82 mg/ml.

Mediante el bioensayo con cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* se determinó la existencia de actividad neurotóxica en el extracto crudo de *L. danae*, encontrando que el efecto es perceptible desde una concentración de 6 mg de extracto crudo/ml presentando reacciones tales como convulsiones, contracciones de apéndices, parálisis y la muerte, esto sugiere que existe actividad a nivel de canales de sodio.

Solo diez de las 25 fracciones purificadas del extracto de *L. danae*, mediante cromatografía líquida, presentaron mayor actividad neurotóxica que el extracto crudo.

Se aisló y purificó mediante HPLC, una neurotoxina a los 39 minutos (tiempo de retención) del extracto crudo de *L. danae* en la fracción F3b.

8. Literatura citada

- Anderluh, G. & P. Maček. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria). *Toxicon* Vol 40. 111-124 pp.
- Avila-Soria, G. 2001. Purificación parcial y caracterización de la actividad biológica de la escifomedusa *Aurelia aurita* del Caribe Mexicano. Tesis de licenciatura. UNAM. 30 pp.
- Baslow, M.H. 1977. *Marine pharmacology: a study of toxins and other biologically active substances of marine origin*. Robert E. Krieger Publishing Company, Huntington, New York. 327 pp.
- Béress, L. & R. Béress. 1984. Biologically active compounds from marine invertebrates. *Nova Acta Leopoldina*. 56 (255): 153-159
- Béress, L. & J. Zwick. 1980. Purification two crab-paralizing polypeptides from the sea anemone *Bolocera tuediae*. *Mar. Chem.* 8: 333-338.
- Béress, L., T. Bruhn, J. Sánchez-Rodríguez, E. Wachter & H. 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-Euaclaire (eds.). Birkhäuser Verlag, Germany. 32-55 pp.
- Bloom, D. A., J. Burnett & P. Alderslade. 1998. Partial purification of box jellyfish *Chironex fleckeri* nematocyst venom isolated at the beachside. *Toxicon*, 36(8): 1075-1085.

- 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.
- Braekman, J.C. y D.Dalozze. 1983. "Los medicamentos del mar" *Mundo científico* 26(3). 600-609.
- Castañeda, O., V. Sotolongo, A.M. Amor, R. Stocklin, A. J. Anderson, A.L. Harvey, A. Engstrom, C Wernstedt & E Karlsn. 1995 Characterization of potassium channel toxin from the gigantean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 33:5, 603-613.
- Cunnigham, P. & P. Goetz. 1996. *Pisces guide to venomous and toxic marine life of the world*. Loney Planet, Oakland, CA. 160 pp.
- Deloach, P. y N. Humnn. 2002. Reef creature identification. Florida Caribbean Bahamas. 2a ed. New World Publication. 448 pp.
- Estrada-Muñoz, N.A. 2001. Caracterización de la actividad biológica de las toxinas de *Carybdea gigantean* Linné 1758 (Cnidaria: Cubozoa). Tesis de licenciatura. UABCS. 47 pp.
- Faulker, J. 1993. Academia chemistry and discovery of bioactive marina naturals products. En: *Pharmaceutical and bioactive natural products*. Attaway D.H. y O.R. Zaborsky (eds.). Plenum Press, New York. 459-474 pp.
- Habermehl, G.G. 1981. *Venomous animals and their toxins*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 195 pp.

- Hall, S. & G. Strichartz. 1990. Marine Toxins. Origin, structure and molecular pharmacology. ACS Symposium Series 418. American Chemical Society, Washington, D. C. 377 pp.
- Halstead, B.W. 1988. *Poisonous and venomous marine animals of the world*. 2a ed. The Darwin Press, Inc Princeton New Jersey. 288 pp.
- Hashimoto, Y. 1979. *Marine toxins and other bioactive marine metabolites*. Japan Scientific Societies Press. 369 pp.
- Hessinger, D.A. 1988. Nematocyst Venoms and toxins. En: The biology of Nematocyst. Hessinger, A. y H.M. Lenhoff. (eds.). Academic press Inc, New York. 333-368 pp.
- Kem, W.R. 1988. Sea anemone toxins: Structure and action. En: The Biology of Nematocyst. Hessinger, A. y H.M. Lenhoff. (eds.). Academic press Inc, New York. 375-405 pp.
- Kem, W. R., B. Parten, M.W. Pennington, B.M, Dunn & D. Price. 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.J. 1994. The Bradford method for protein quantitation. En: Methods in Molecular Biology. Basic Protein and Peptide Protocols. Walker, J.M. (ed). Humana Press. Totowa, New Jersey. 9-15 pp.
- Maček, P., G. Belmonte, C. Pederzoli y G. Menestrina. 1994. Mechanims of action of Equinotoxin- II, a cytolisin from of actinosporins. *Toxicology* 87: 205-227 pp.

- Malpezzi, E.L., J.C. De Freitas, K.Muramoto & H. Kamiya. 1993. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* 37:7, 853-864 pp.
- Mariscal, R.N. 1974. Nematocysts. En: *Coelenterate Biology Reviews and New Perspectives*. Muscatine, L. y H. M. Lenhoff (eds.). Academic Press, New York. 132-153 pp.
- Martin, D.F. & G.M. Padilla. 1973. *Marine pharmacognosy: action or marine biotoxins at cellular level*. Academic Press New York and London. 317 pp.
- Mebis, D. & E. Gerbauer. 1980. Isolation of proteinase inhibitory, toxic and hemolytic polypeptides from a sea anemone *Stoichactis* sp. *Toxicon* 18, 97-106 pp.
- Meglitsch, P.A. 1978. *Zoología de los invertebrados*. 2ª ed. H. Blume Ediciones. España. 906 pp.
- Merino-Ibarra, M. & L. Otero-Dávalos. 1983. *Atlas ambiental costero-Puerto Morelos, Quintana Roo*-. CONACYT-UNAM.
- Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nicols & J.L. McLaughlin. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research* 45: 31-34 pp.
- Monastyrnaya, M.M., T.A. Zykova, O.V. Apalikova, T.V. Shwets & E.P. Kozlovskaya. 2002. Biologically active polypeptides from the tropical sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon* 40: 1197-1217 pp.
- Mongelli, E. R. y A. B., Pomilio. 2002. Nuevos medicamentos y etnomedicina. Del uso popular a la industria farmacéutica. *Ciencia Hoy*. 12 (68):

- Montiel-Pichardo, A. 1999. Compuestos biológicamente activos de la esponja *Chondrilla nucula*. Tesis de licenciatura. FCM, UABC, 61 pp.
- Norton TR, Shibata S, Kashiwagi M, Bentley I (1976) Isolation and characterization of the cardiotoxic polypeptides anthopleurin-A from the tentacles of the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. J Phram. Sci. 65 : 1368-1374 pp.
- Ruíz-Rentería, F., B. Van Tussenbroek y E. Jordán-Dahlgren. 1998. Characterization of the Puerto Morelos (México) CARICOMP site. En: Caribbean Coastal Marine Productivity (CARICOMP). UNESCO. París. 57-66 pp.
- Salgado, V.L. y W.R. Kem. 1992. Actions of three structurally distinct sea anemone toxins on crustacean and insect sodium channels. *Toxicon* 30:11, 1365-1381 pp.
- Sánchez, J., T. Bruhn, A. Aneiros, E.Wachter y L.Béress. 1996. A simple biochemical method in the search for bioactive polypeptides in a sea anemone (*Anemonia sulcata*). *Toxicon* 34:11/12, 1361-1366 pp.
- Santamaría, A., J. Sánchez-Rodríguez, A. Zugasti, A. Martínez, S. Galván-Arzate y L. Segura-Puertas. 2002. A venom extract from the sea anemone *Bartholomea annulata* produces haemolysis and lipid peroxidation in mouse erythrocytes. *Toxicology* 173: 221-228 pp.
- Shapiro, B.I. 1968. Purification of a toxin from tentacles of the anemone *Condylactis gigantean*. *Toxicon* 5:253-259 pp.
- Smith, J.M. 1994. Polyacrilamide gel electrophoresis of proteins. En: *Methods in Molecular Biology. Basic Protein and Peptide Protocols*. Walker, J.M. (ed). Humana Press. Totowa, New Jersey. 23-34 pp.

Wah, S. T. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. En: Bioactive Natural Products, detection, isolation and structural determination. S.M. Colegate & R.J. Molyneux (eds.). CRC Press. 441-456 pp.

Williamson, J.A., P.J. Fenner & W.J. Burnett. 1996. Venomous and poisonous marine animals. University of New South Wales Press, Australia. 504 pp.

Zugasti-Cruz, A. 2001. Caracterización toxinológica de péptidos bioactivos de la anemone *Bartholomea annulata* (LeSuer, 1817). Tesis de Maestría en Ciencias del Mar. UNAM. 77 pp.

9. Anexos

Anexo I

Eclosión de quistes de *Artemia salina*

1. Lavar con agua destilada aproximadamente 2 g de quistes deshidratados.
2. Remojar los quistes con una solución de hipoclorito de sodio al 10% en agua destilada por aproximadamente 30 minutos, este paso se realiza para ablandarlos.
3. Tamizar y lavar abundantemente con agua destilada a los quistes para remover completamente el hipoclorito de sodio
4. Transferir los quistes a un frasco de eclosión conteniendo agua de mar filtrada y pasada por ultravioleta.

Notas:

Mantener el sistema a una temperatura de 29 ± 1 °C, aireación constante e iluminación.

Los primeros organismos eclosionan en dos días y la mayoría de ellos hasta el cuarto día.

Alimentar a los nauplios diariamente con cultivos de microalgas (*Tetraselmis suecica* o *Chaetoceros* sp.) hasta su utilización.

Separar a los nauplios de los quistes aprovechando el fototropismo positivo de los primeros.

Transferir los nauplios a otros sistema de aireación hasta que alcancen el estadio deseado (aproximadamente 10 días).

Anexo II

Solución Alsever para bioensayo hemolítico

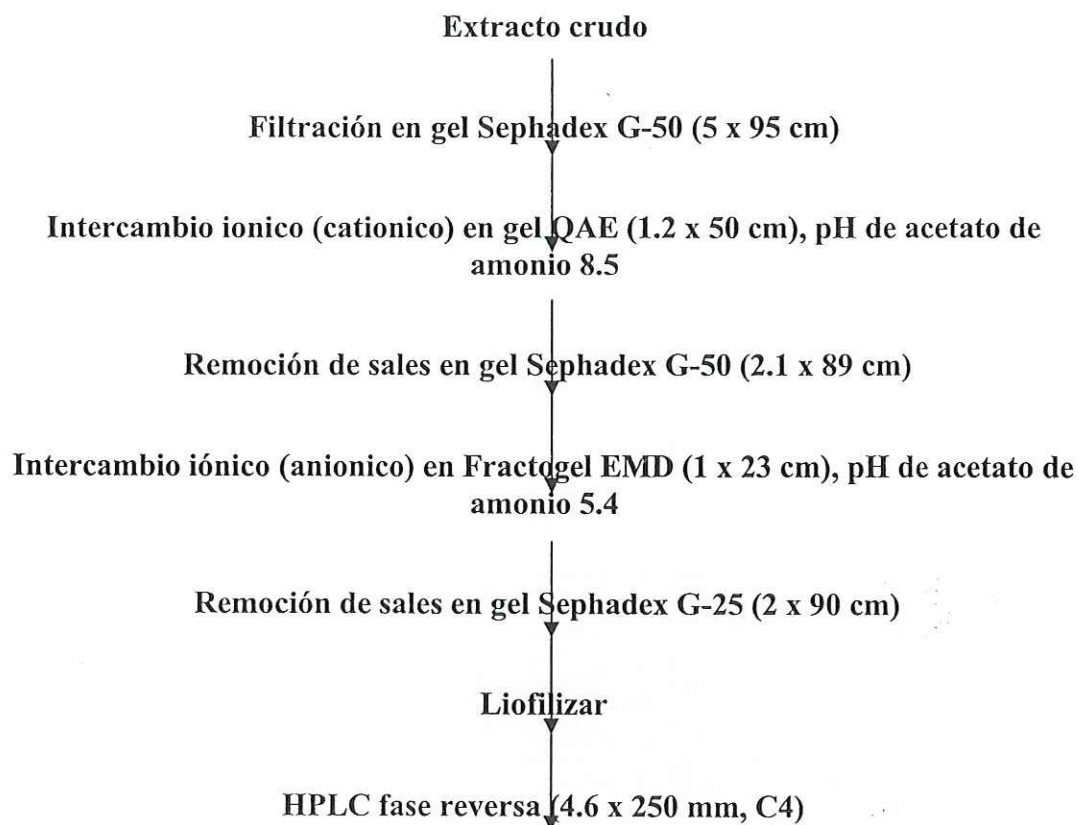
Agua desionizada	900 ml
Dextrosa anhidra	21 g
Citrato de sodio 2H ₂ O	8 g
NaCl	4.2g
Ácido cítrico anhidro	0.4g

Tinción Coomassie para electroforesis en SDS-PAGE

- Solución de azul de Coomassie : 0.2 g de azul Coomassie en 90 ml de metanol: agua 1:1 v:v y 10 ml de ácido acético glacial.
- Fijar geles en una solución 25% isopropanol 10% ácido acético por 30 minutos.
- Tinción : sumergir el gel en 5 volúmenes. de colorante al menos 1 h con agitación suave (el máximo se consigue en 3 h).
- Desteñir : habitualmente mediante cambios repetidos de 10% acético en 20% metanol:agua.

Anexo III

Diagrama para la purificación de toxinas de *Lebrunia danae*



Anexo IV

Bio-Rad Protein Assay basado en el Método Bradford (1976)

Rehidratación del estándar

Para rehidratar los estándares de globulina gama de bovino y suero de albúmina liofilizados, agregue 20 ml de agua desionizada y mezcle hasta disolver. Si el estándar no se usa en 60 días, puede guardarse en alícuotas y congelarse a -20°C .

Procedimiento estándar

1. Prepare el reactivo para teñir diluyendo 1 parte de reactivo colorante concentrado (*Dye Reagent Concentrate*) con 4 partes de agua destilada. Filtrar en papel Whatman # 1 para remover partículas. El reactivo diluido podría usarse por dos semanas manteniéndolo a temperatura ambiente.
2. Prepare 3 a 5 diluciones de estándar de proteína, la cual sea representativa a la solución de proteína que se quiere probar. El intervalo lineal del ensayo para BSA es 0.2 a 0.9 mg/ml, considerando un IgG el intervalo lineal es de 0.2 a 1.5 mg/ml (pregunta 4 del manual, mas información).
3. Pipetear 100 μl de cada dilución de estándar y muestra en tubos de ensayo por duplicado o triplicado.
4. Agregue 5.0 ml de reactivo colorante diluido en cada tubo, posteriormente agite en vórtex.
5. Incube a temperatura ambiente por lo menos 5 minutos. El incremento de absorbancia se vera con el tiempo; las muestras no deben incubarse por mas de una hora.
6. Leer absorbancia a 595 nm.

Ensayo

Utilizar reactivo concentrado

Concentraciones del estándar de 1.2 a 10 mg/ml

Diluir 52.08 μl del stock de suero de albúmina de bovino de concentración 1.44mg/ml en 1.5 ml para obtener una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.

Concentración (mg/ml)	Estándar (50 $\mu\text{g/ml}$)	Agua desionizada (μl)	Reactivo colorante concentrado (μl)	Total (μl)
Blanco	-	800	200	1000
1.2	19.2	780.8	200	1000
2.0	32	768	200	1000
4.4	70.4	729.6	200	1000
6.6	105.6	694.4	200	1000
8.8	140.8	659.2	200	1000
10	160	640	200	1000

Anexo V

Reactivos y preparación de geles para SDS-PAGE gel (Sistema Laemmli buffer)

A. Acrilamida/bis

29.2 g de acrilamida en 100 ml

0.8 g de N'N'-bis-methylene-acrilamida en 100 ml

Aforar solución a 300 ml con agua desionizada, filtrar y almacenar a 4°C en oscuridad (máximo 30 días)

B. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

18.15 g Tris Base

Ajustar pH a 8.8 con HCl 6 N. Aforar a 150 ml con agua desionizada y guardar a 4°C.

C. 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

6 g de Tris base

Ajustar pH a 6.8 con HCl &N. Aforar a 100 ml con agua desionizada y almacene a 4°C

D. 10 % SDS

Disuelva 10 g de SDS en 100 ml de agua desionizada.

E. Sample buffer (SDS reducing buffer) (Guarde a temperatura ambiente)

Agua desionizada 3.8 ml

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 1.0 ml

Gilcerol 0.8 ml

10% (w/v) SDS 1.6 ml

2-mercaptoetanol 0.4 ml

1 % (w/v) azul bromofenol 0.4 ml

Diluir muestra en una proporción 1:4 con sample buffer, incubar a 95° po 4 minutos.

F. 5X Electrode (running) buffer, pH 8.3

Tris base 9g

Glicina 43.3 g

SDS 3g

Aforar a 600 ml con agua desionizada

Almacenar a 4°C, diluir 60 ml de 5X stock con 240 ml de agua desionizada para una corrida.

Geles 12 %

Agua desionizada	3.35 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml
10% (w/v) SDS stock	100µl
Acrilamida/Bis (30 % stock)	4.0 ml
10% persulfato de amonio	50 µl
TEMED	5 µl

Gel para colocar muestra (stacking gel)

Agua desionizada	6.0 ml
0.5 M tris- HCl, pH 6.8	2.5 ml
10% (w/v) SDS stock	100µl
Acrilamida/Bis (30 % stock)	1.33 ml
10% persulfato de amonio	50 µl
TEMED	5 µl

Estándares de bajo peso molecular (Amersham Biosciences):

Ovoalbumina	45,000
Anhidrasa carbónica	30,000
Inhibidor de Tripsina	20,100
Lisozima	14,300
Aprotinina	6,500
Insulina cadena B	3,500
Insulina cadena A	2,500