



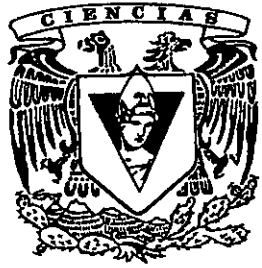
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

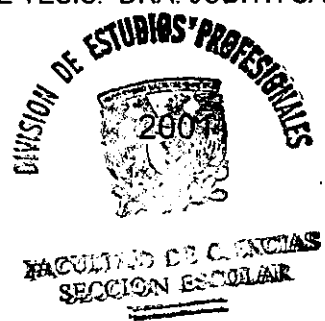
291546

PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA ESCIFOMEDUSA Aurelia aurita DEL CARIBE MEXICANO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:
GRISELDA AVILA SORIA



DIRECTOR DE TESIS: DRA. LOURDES SEGURA PUERTAS
COORDIRECTOR DE TESIS: DRA. JUDITH SANCHEZ RODRIGUEZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Purificación parcial y caracterización de la actividad biológica
de la escifomedusa Aurelia aurita del Caribe Mexicano"

realizado por GRISELDA AVILA SORIA.

con número de cuenta 9235223-6 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Lourdes Segura Puertas.

Segura.

Propietario

Dra. Judith Sánchez Rodríguez.

Judith Sánchez Rodríguez

Propietario

Dra. Maria Antonieta Aladro Lubel.

M. A. Aladro Lubel

Suplente

Biol. Alfonso Jose Vilchis Peluyera.

Alfonso

Suplente

M en I.B. Benito Estrada Mena.

[Signature]

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

[Signature]



Dra. Luisa A. Alba Lois

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DEDICADO A

**PROF. JULIO ANDRÉS ÁVILA
DRA. DEYANIRA SORIA ALVARADO**

**ANDRÉS
ADRIANA
ROSALÍA
Y
DIEGO ÁVILA SORIA.**

Al Mar Caribe por comprenderme y escucharme.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que con sus impuestos han pagado parte de mi educación en la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias por la formación recibida. Al Instituto de Ciencias del Mar y limnología así como a la Unidad Académica de Puerto Morelos; por las facilidades brindadas durante mi estancia en Quintana Roo.

A los miembros de comité del examen profesional: Dra. Maria Antonieta Aladro Lubel, Biol. Alfonso Vilchis Peluyera y al M en I.B. Benito Estrada Mena. por el tiempo dedicado así como por sus acertadas observaciones.

A todo el personal de la estación, que siempre me brindo puras sonrisas. A sus residentes: Mi cariño incondicional. Hidro. Biol. Alejandro Zugasti, Biol.Mar. Norma Estrada y Gloria Ramos, Oc. Claudia Rivera y Cesar Meiners, a Luis Gonzales, al Biol. Daniel Gasca y al Biol. Mar. Víctor Hugo Beltrán por tantas y tantas cosas vividas que solo nosotros podemos comprender, con ustedes he pasado momentos muy gratos e inolvidables y se que cada uno realizara cosas importantes en la vida, gracias por ser y estar.

A mis asesoras: Doc. Lourdes Segura Puertas, Dra. Judith Sánchez Rodríguez. por lidiar con mi terquedad e impaciencia y por brindarme en todo momento su cariño y comprensión,

De manera particular a la Biol. María Eugenia Ramos por ser mi amiguita, a la Biol. Laura Celis, Gabriel Rosado y Judith Vázquez

A la Dra. Patricia Thome, por ser tan linda y al Dr. Roberto Iglesias, por sus consejos y por ser siempre tan amables conmigo. En este sentido también como olvidar a M. En C. Marissa Calderón y M en C. Natalia Ayala

Al Dr. Edgar Heimer de la Coteria y Dr. Abel Aneiros, por inspirarme hacia este mundo increíble de la Bioquímica Marina.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias.

CONTENIDO

Resumen

Pag.

1.0	Introducción	1
1.1	Objetivos	4
1.2	Objetivos particulares	4
2.0	Zona de recolección	4
3.0	Materiales y métodos	5
3.1	Material biológico	5
3.2	Reactivos y productos químicos	5
3.3	Equipos y materiales	6
3.4	Recolección y procesamiento del material biológico	6
3.5	Aislamiento, descarga y caracterización de los nematocistos	6
3.6	Bioensayos de toxicidad en larvas nauplio de <i>Artemia salina</i>	7
3.7	Ensayos hemolíticos	7
3.8	Bioensayos en cangrejos <i>Ocypode quadrata</i>	8
3.9	Método de cuantificación de proteínas	8
3.10	Purificación parcial del extracto crudo de <i>Aurelia aurita</i>	8
3.11	Electroforesis en gel de acrilamida-SDS.	9
4.0	Resultados	9
4.1	Aislamiento, descarga y caracterización de los nematocistos de <i>A. aurita</i> .	9
4.2	Bioensayos de letalidad en larvas nauplio de <i>Artemia salina</i>	10
4.3	Ensayos hemolíticos	12
4.4	Bioensayos con extracto crudo en cangrejos <i>O. quadrata</i>	13
4.5	Purificación parcial del extracto crudo de <i>A. aurita</i>	13
4.6	Bioensayo con fracciones parcialmente purificadas en cangrejos <i>O. Quadrata</i> .	16
4.7	Ensayos hemolíticos con fracciones parcialmente purificadas	17
4.8	Electroforesis en gel de acrilamida-SDS	17
4.9	Dermatitis por contacto con <i>A. aurita</i>	18
5.0	Discusión	18
6.0	Conclusiones	23
7.0	Literatura citada	24
8.0	Apéndice de soluciones	30

RESUMEN.

Aurelia aurita (Linné, 1758) es una escifomedusa con una amplia distribución mundial y es considerada como una especie inocua en humanos, sin embargo esta especie en el Caribe Mexicano produce una evidente dermatitis. El propósito fundamental de este trabajo fue evaluar la biotoxicidad de los extractos crudos obtenidos de *A. aurita*, así como de las fracciones prepurificadas extraídas por medio de cromatografía sólido-líquido en las variantes de filtración en gel e intercambio iónico. Los ejemplares de *A. aurita* se recolectaron manualmente en las aguas del Caribe mexicano. Los nematocistos se aislaron, midieron y caracterizaron reconociéndose 2 tipos: atricos isorrizas y homotricos microbásicos euriteles. Los extractos crudos liofilizados (precipitado, sobrenadante y margen tentacular) se obtuvieron por el método modificado de Kem *et al.* (1989). La actividad citotóxica fue evaluada en nauplios de *Artemia salina* utilizando los extractos crudos a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) después de la eclosión. La actividad hemolítica se realizó con base en la técnica descrita por Rottini *et al.* (1990) utilizando eritrocitos de oveja, res y humano. La actividad neurotóxica de los extractos crudos y de las fracciones parcialmente purificadas se evaluó en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* mediante inyecciones intramusculares en la base de la tercera pata caminadora. Se determinó el peso molecular de los extractos crudos, así como de las fracciones biológicamente más activas (Aa-I y Aa-II) por medio de electroforesis en gel. Los resultados obtenidos con los nauplios de *A. salina* mostraron una mortalidad del 100% con una dosis de 0.1 mg/ml de precipitado y margen tentacular, a las 72 horas de la eclosión. Al evaluar la actividad hemolítica de los extractos crudos se observó una mayor sensibilidad en los eritrocitos de humano (63%), en contraste con los eritrocitos de oveja (31%) y los de res (30%). La unidad hemolítica se obtuvo sólo en los eritrocitos de humano con 0.6 y 0.2 mg de proteína de extracto crudo con y sin inhibidor de proteasas respectivamente. Al analizar la actividad neurotóxica en los cangrejos *Ocypode quadrata*, se advirtió una clara actividad biológica, caracterizada por fuertes contracciones tetánicas involuntarias de las extremidades, temblores, parálisis y posteriormente la muerte. Asimismo, se observó que conforme se avanzaba en la purificación de las toxinas, la actividad biológica se incrementaba. Finalmente, los extractos crudos tuvieron un peso molecular que fluctuó entre 18 y 120 KDa, en tanto que el de las fracciones Aa-I y Aa-II osciló entre 45 y 66 kDa.

1.0 INTRODUCCIÓN

Las investigaciones sobre toxinas de organismos marinos se iniciaron en los años 40's y 50's. Ya en la década de los 70's compañías farmacéuticas colaboraban con universidades de Estados Unidos, Japón, Bélgica, Francia y Australia en programas de investigación para evaluar los compuestos presentes en organismos marinos (Ross *et al.* 1967). Estos compuestos se han obtenido en diferentes phyla como protozoarios, esponjas, anélidos, artrópodos, moluscos, equinodermos y cordados. Sin embargo, uno de los phyla que ha llamado la atención de los investigadores y en donde se han desarrollado la mayoría de los estudios es el Phylum Cnidaria (Southcott, 1979).

Los compuestos que presentan actividad biológica de importancia farmacológica en los organismos marinos, son los metabolitos secundarios, dado que actúan como mensajeros químicos de acción selectiva sobre receptores bioquímicos en los seres vivos (Braekman & Daloz, 1983). En las toxinas marinas se encuentran principalmente los siguientes grupos químicos: aminas orgánicas (histamina y serotonina), colinesterasas (murexina), componentes amonio cuaternarios (tetraminas), esteroides glicosidos (holothurina), diversos componentes heterocíclicos (tetradotoxina y saxitoxina), terpenos, flavonoides, así como proteínas (hemolisinas, cardiotoxinas, enzimas) y péptidos (neuro y cardiotoxinas) (Béress & Béress 1984).

El Phylum Cnidaria agrupa cuatro clases: Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa y Anthozoa. De las 9000 especies de cnidarios conocidos se sabe que 70 de ellas causan daño al hombre ya sea por contacto directo con sus nematocistos o por ingestión (Béress, 1982). Los venenos de algunos de estos organismos se encuentran entre los más potentes hasta ahora conocidos (Halstead, 1978; Kem, 1989). Estos compuestos tóxicos están confinados en cápsulas citoplásmicas, los nematocistos (Watson & Wood, 1988), considerados como organelos intracelulares especializados. La estructura de los nematocistos es un tanto complicada considerando su tamaño diminuto (del orden de micrómetro), están constituidos por una cápsula que contiene la toxina y un filamento hueco enrollado en espiral. Los nematocistos se localizan a lo largo de la epidermis, inmersos en las células epitelio-musculares, son más abundantes en los tentáculos y brazos orales; el filamento de estas estructuras penetra e inyecta una mezcla de proteínas, péptidos y otros compuestos tóxicos que tienen como función la captura de las presas y de defensa contra la depredación. Hasta el momento se conocen entre 25 y 30 diferentes tipos de nematocistos (Mariscal, 1974).

Algunas especies de cnidarios como *Chiropsalmus quadrigatus*, *Carukia barnesi*, *Pelagia noctiluca*, *Chrysaora quinquecirrha*, *Physalia physalis*, *Chironex fleckeri* y *Millepora alcicornis* son capaces de producir graves daños, incluyendo la muerte en humanos (Burnett, 1991, Schwartz, 1977). Los daños infringidos por las toxinas de cnidarios pueden desencadenarse por la reacción inmune que provoca al entrar al organismo, o por el efecto tóxico generado por el veneno mismo; es tóxico principalmente al sistema cardiovascular, respiratorio y renal, lo que puede provocar la aparición de síntomas sistémicos acompañados de lesiones cutáneas, presentando gangrena, contracciones, neuritis, hiperpigmentación, ulceraciones en la córnea y como efecto de post-envenenamiento granulomas anulares (Burnett, 1991, Burnett *et al.*, 1996).

Las toxinas de los cnidarios contienen una variedad de sustancias químicas que exhiben actividad biológica en varios sistemas de prueba. Algunas de las proteínas tóxicas presentan acción citotóxica (Neeman, *et al.*, 1980 a y b; Calton & Burnett, 1983; Endean, *et al.*, 1993), hemolítica (Walker, 1988; Bernheimer & Avigad, 1981; Dekker, 1988; Comis & Howden, 1989; Long-Rowe & Burnett 1994; Endean, *et al.*, 1993; Rottini, *et al.*, 1995; Guzman *et al.*, 1997; Alvarez, 1997), acción cardiotoxica (Kelman, *et al.*, 1984; Walker, 1977), algunas presentan actividad fosfolipasa A (Hessinger & Lenhoff, 1976; Lotan, *et al.*, 1995; Radwan *et al.*, 2001), así como también proteasa (Hessinger & Hessinger 1981; Calton & Burnett, 1982). Otras toxinas de cnidarios ejercen su efecto tóxico modificando las propiedades de los canales de sodio sensibles a voltaje involucrados en la generación del potencial de acción (Béress & Béress 1984).

Dentro de los cnidarios, las medusas constituyen un grupo importante desde varios puntos de vista, ecológico, oceanográfico y económico (Russell, 1970). Las medusas tienen además importancia médica, ya que varias especies se consideran dentro de los organismos más tóxicos que se conocen (Halstead, 1978) ocasionando problemas de salud pública en varias partes del mundo. Salvo algunas excepciones, aún no se cuenta con métodos de tratamiento adecuados para casos serios de envenenamiento.

Los estudios realizados con compuestos tóxicos que tienen actividad biológica presentes en medusas, coinciden en que a diferencia de otros cnidarios, en las medusas la gran mayoría de los compuestos presentan una termolabilidad e inestabilidad considerables, así como también un elevado peso molecular (Burnett, 1990). Así, Kelman *et al.*, (1984) al estudiar los compuestos de la escifomedusa *Chrysaora quinquecirrha* semipurificó una toxina mesentérica, de un peso molecular superior a los 108 kDa. Otros autores encontraron en la misma especie proteínas de alto peso molecular con actividad ácido proteasa (Calton & Burnett, 1982), así como endonucleasas (Neeman *et al.*, 1980c). En otra especie, *Rhopilonema nomadica*, se encontraron dos fracciones con actividad proteolítica, de 85 y 40 kDa (Guzman *et al.*, 1997). Por otro lado, Keen & Crone (1969) obtuvieron hemolisinas lábiles de extractos tentaculares

de *Chironex fleckeri*, encontrando una relación lineal entre el porcentaje de hemólisis y la concentración del extracto; las fracciones mostraron picos de 70 y 150 kDa. Bloom *et al.* (1988), estudiando esta misma especie, aislaron proteínas con actividad biológica tóxica entre los 30 y 200 kDa. Al estudiar las toxinas de la cubomedusa *Carybdea marsupialis* se purificó una toxina citolítica de peso molecular alrededor de los 102-107 kDa, termolábil, altamente inestable y de polaridad media (Rottini *et al.*, 1995).

Aurelia aurita (Lineé, 1758), es una escifomedusa (Fig. 1), con una amplia distribución geográfica, variando la potencia de sus toxinas en las diferentes localidades. Es considerada por lo general como una especie inocua o casi inofensiva para el ser humano (Russell, 1970). Sin embargo, esta escifomedusa puede ocasionar en el hombre lesiones cutáneas importantes (Burnett *et al.*, 1988).



Fig. 1. Dibujo de la escifomedusa *Aurelia aurita*.

Las investigaciones sobre la actividad biológica de las toxinas de esta especie, son limitadas. Kihura *et al.* (1988) encontraron que las toxinas de *A. aurita* en Japón producen un bloqueo irreversible en membranas musculares, así como una depolarización irreversible, iniciada probablemente por un incremento en la permeabilidad al sodio. Por otra parte, Pong-Prayoon *et al.* (1991) encontraron que la *A. aurita* de Thai mostraba acción hemolítica y proteolítica.

Radwan *et al.* (2001) compararon las propiedades químicas y tóxicológicas del veneno de los nematocistos de *A. aurelia* de Europa y de América, encontrando que el veneno crudo de la *Aurelia* proveniente del Mar Rojo es más potente que el de la Bahía de Chesapeake, EUA.

encontrando que el veneno crudo de la *Aurelia* proveniente del Mar Rojo es más potente que el de la Bahía de Chesapeake, EUA.

1.1 OBJETIVO GENERAL.

- ❖ Evaluar la actividad biológica de las toxinas de la *Aurelia aurita* del Caribe Mexicano.

1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Aislar, caracterizar y obtener la descarga de los nematocistos de ejemplares adultos de *Aurelia aurita*.
- ❖ Evaluar la actividad biológica de las toxinas mediante bioensayos (hemólisis y letalidad en larvas nauplio de *Artemia salina*).
- ❖ Purificar parcialmente las toxinas mediante cromatografía sólido-líquido.
- ❖ Evaluar la actividad biológica de las fracciones parcialmente purificadas, realizando ensayos de hemólisis en eritrocitos de mamífero y de toxicidad en cangrejos del género *Ocypode quadrata*.

2.0 ZONA DE RECOLECCIÓN

La recolección del material biológico se realizó en la Laguna Bojórquez, Cancún (Fig. 2), la cual forma parte del Sistema Lagunar Nichupté, que se encuentra localizado en la porción oriental de la Península de Yucatán, a los 21° 31'N y 84° 44'O (Jordán, 1978). La Laguna Bojórquez tiene una área de 2.47 km y dos canales de comunicación con el sistema lagunar. Su batimetría es irregular. La mayor profundidad es de 4 m, el resto de la laguna presenta una profundidad promedio de 1.70 m disminuyendo hacia las orillas y hacia el sur, donde se encuentran profundidades entre 1.30 y 1.50m (Merino & Gallegos, 1986). La laguna presenta características hiposalinas, llegando a 37.5 ‰ (Jordán, 1979). Los sedimentos de la laguna son de carbonatos de calcio, también existe una capa de materia orgánica en descomposición de varios centímetros de grosor (Merino & Gallegos, 1986).

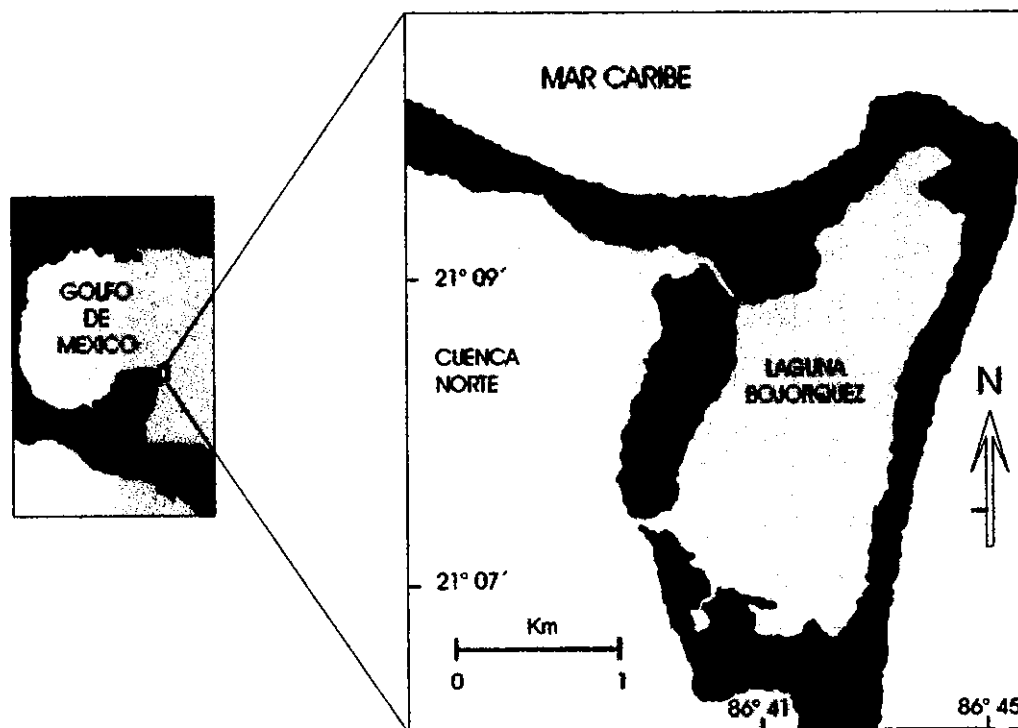


Fig. 2.- Ubicación de la zona donde se recolectaron los ejemplares del presente estudio.

3.0 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico.

Extracto crudo de la escifomedusa *Aurelia aurita*, larvas nauplio de *Artemia salina*, cangrejos del género *Ocypode quadrata*, eritrocitos de humano, res y cordero.

3.2 Reactivos y productos químicos.

Sephadex G-200 (Pharmacia Biotech), DEAE Sephadex A-50 (Sigma-Aldrich), Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich), Sephadex G-50, perlas de sílice (Sigma-Aldrich), agua desionizada, ácido acético, cloruro de sodio, fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), fosfato de sodio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich), persulfato de amonio (Sigma-Aldrich), metanol e isopropanol (Baker), coctel inhibidor de proteasas (Roche), reactivo de Bradford (Sigma-

Aldrich), N, N, N',N'-tetrametiletilendiamina "TEMED" (Sigma-Aldrich), marcadores de peso molecular (Bio-Rad): miosina 205 kDa; β -galactosidasa 116 kDa; fosforilasa 97 kDa; albúmina de bovino 66 kDa; ovoalbumina 45 kDa; anhidrasa carbónica 29 kDa; tripsinógeno 24 kDa; β -lactoglobulina 18 kDa.

3.3 Equipo y materiales

Vortex, balanza analítica (Mettler), nanopurificadora de agua Storage sistem (Barnstead), centrífuga (IEC/ Centra CL2), colector de fracciones (Pharmacia Biotech), bomba peristáltica de baja presión P-50 (Pharmacia Biotech), detector de UV-1 (Pharmacia Biotech), rotaevaporador (Re III Büchi), baño de agua (Büchi Modelo B480), espectrofotómetro (Aminco DW2), espectrofotómetro (Beckman) Modelo 35, liofilizador Freeze Drying Model 77500 (Labconco), refrigerador, fuente de poder Modelo EC500-90, Protean II Electrophoresis Cell Bio-Rad, celdas de vidrio (3 ml) para espectrofotómetro (Sigma-Aldrich), columnas de vidrio para cromatografía en gel (2 x 60 , 1.2 x 22, 1.8 x 50.2, 2.3 x 60 cm).

3.4 Recolección y procesamiento del material biológico

La recolección de los ejemplares adultos de *Aurelia aurita* se realizó en la Laguna Bojorquez, Cancún, a lo largo de 1999-2000. La captura se llevó a cabo desde la lancha con la ayuda de redes de mango largo con una abertura de malla de 500 micrómetros. Los ejemplares recolectados se colocaron en cubetas con aereación para su traslado al laboratorio.

A cada uno de los ejemplares se le cortó el margen tentacular, colocándolos en bolsas herméticas etiquetadas con el nombre de la especie, la fecha y la localidad de recolecta, refrigerándose a -70° C donde permanecieron hasta su procesamiento.

3.5 Aislamiento, descarga y caracterización de los nematocistos.

Con el propósito de obtener la descarga de los nematocistos, se implementaron tres métodos: El primero consistió en hacer dos preparaciones con el margen tentacular de las medusas, a una de las preparaciones se le adicionó agua desionizada, y a la otra una gota de ácido acético. El segundo fue el método modificado de Kem *et al.* (1989). En este método las muestras se descongelaron agitándolas en agua desionizada por un lapso de 30 minutos. Posteriormente, se separaron los tentáculos del homogeneizado resultante, manteniendo este último a 4° C. Los tentáculos se congelaron a -70° C en donde permanecieron por un lapso de dos horas. Transcurrido este tiempo, se procesaron tanto el homogeneizado como los tentáculos adicionando el primero al segundo y agitando para descongelar por aproximadamente 15 minutos. El procedimiento se repitió dos veces más. Finalmente, los tentáculos fueron separados del homogeneizado el cual se centrifugó a 3000 r.p.m.

durante 10 minutos. Se separó el precipitado del sobrenadante y de cada uno se tomó una alícuota para ser observada al microscopio con el objeto de asegurarse de la descarga de los nematocistos. Ambas muestras se guardaron en frascos a -40° C para su posterior liofilización.

El tercer método utilizado, fue una modificación del anterior, el margen tentacular no se separó del homogeneizado y se le agregó un inhibidor de proteasas, posteriormente se agitó con perlas de vidrio tres veces durante un minuto y se centrifugó a 15,000 g durante 15 minutos a 0° C. Se separó el precipitado del sobrenadante y de cada fase se tomó una alícuota para ser observada al microscopio. Las muestras se mantuvieron a -40° C para su posterior liofilización.

La caracterización de los nematocistos se llevó a cabo con base en la clasificación propuesta por Mariscal (1974).

3.6 Bioensayos de toxicidad en larvas nauplio de *Artemia salina*

Para evaluar la actividad tóxica del material liofilizado (precipitado, sobrenadante y margen tentacular sin centrifugar), se realizaron bioensayos de toxicidad con larvas nauplio de *Artemia salina*, a partir de las 24, 48 y 72 hrs después de la eclosión. Se realizaron observaciones de conducta y mortalidad a diferentes horas de haber añadido los extractos crudos (1, 3, 5 y 10 hrs). Se utilizaron seis vasos de precipitados y en cada uno se colocaron 30 artemias en 150 ml de agua de mar filtrada y con luz y aireación constantes. En tres de los vasos, se adicionaron 0.1 mg/ml de los extractos liofilizados de *A. aurita* previamente disueltos en agua desionizada, los tres vasos restantes se mantuvieron como controles.

Este experimento se realizó por triplicado, expresándose los resultados como promedios +/- la desviación estándar. Por otra parte, para determinar si existían diferencias significativas entre los tiempos y los tratamientos, se aplicó el estadístico "t" Student para pruebas significativas con 95% de confianza ($P < 0.05$).

3.7 Ensayos hemolíticos.

Con el propósito de efectuar pruebas de hemólisis con los extractos crudos obtenidos, se utilizó el método modificado de Rottini *et al.*, (1990) descrito para citólisis bacteriana. Se emplearon eritrocitos de humano (sangre RH-), oveja y res. Para la evaluación hemolítica de las fracciones parcialmente purificadas, se trabajó exclusivamente con los eritrocitos de humano.

Se preparó una solución fisiológica de Alsever pH 7.4, compuesta de dextrosa anhidra, citrato, de sodio, cloruro de sodio y ácido cítrico. A 2 ml de sangre se le adicionaron 20 ml de solución de Alsever, se mezclaron y posteriormente se concentraron por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 5 min, el precipitado se resuspendió en 20 ml de solución fisiológica de Alsever, después de tres

repeticiones se recuperó el precipitado y se resuspendió en 20 ml de Alsever frío. Con la finalidad de calibrar al 0 y 100 % de hemólisis, a partir de la suspensión final, se realizaron diferentes diluciones con solución de Alsever y agua desionizada, las cuáles se agitaron ligeramente y se incubaron a 30 ° C por un lapso de 30 min, después se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 4 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 415 nm y como blanco se utilizó la solución de Alsever.

Una vez que se determinó el 0 y 100% de hemólisis, se probaron diferentes concentraciones de los extractos crudos (5, 10, 30, 50 y 70 mg). Para este ensayo se utilizó el sobrenadante del margen tentacular (con y sin inhibidor de proteasas) liofilizado. Las muestras se incubaron a 30 °C en un baño de agua, durante 30 minutos, posteriormente se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante 4 minutos. Se registró la lectura de absorbancia del sobrenadante. Con los datos obtenidos de 0 y 100% de hemólisis, se generó una recta y se calcularon los porcentajes de hemólisis de las muestras por interpolación. Se determinó la unidad hemolítica (HU50) definida como la cantidad de proteína requerida para causar el 50% de hemólisis.

3.8 Bioensayos en cangrejos *Ocypode quadrata*

Para realizar los bioensayos de toxicidad con cangrejos de la especie *O. quadrata* se tomó 0.1 mg de extracto crudo por cada 10 gr de peso del organismo y se inyectó vía intramuscular en la base entre la coxa y el isquión del tercer pereiópodo. Se tomaron datos de peso del organismo, volumen de muestra aplicada, así como la conducta presentada por los organismos a los 5, 10, y 20 minutos después de ser suministrada la dosis. La misma metodología se siguió para evaluar la actividad de las fracciones prepurificadas.

3.9 Método de cuantificación de proteínas.

Con el objeto de determinar la cantidad de proteína del extracto crudo, así como de las fracciones obtenidas, se siguió el método de Bradfordt (1976).

3.10 Purificación parcial del extracto crudo.

Para aislar los componentes activos del extracto crudo de *Aurelia aurita*, se utilizó la técnica de cromatografía sólido-líquido de baja presión, en las variantes de filtración en gel, así como de intercambio iónico. Para ello se tomaron 75 mg del extracto crudo y se disolvieron en 5 ml de agua nanopura, la cual se filtró en una membrana de 0.45 micrómetros. La muestra así obtenida se colocó en una columna de filtración en gel (Sephadex G-200-120), equilibrada y eluída con una solución isocrática de buffer de fosfatos pH 7.2. Cada una de las fracciones obtenidas por este método se pasaron por un gel de intercambio iónico (DEAE Sephadex A-50); las fracciones eluyeron con buffer de fosfatos pH 6.3 en un gradiente escalonado 0.05, 0.1, 0.3 y 0.5 M. Todas las fracciones eluídas por el paso cromatográfico anterior fueron

desaladas aplicándolas a una columna de filtración en gel (Sephadex G-100) utilizando como eluyente una solución isocrática de ácido acético 0.2 M. Las fracciones se concentraron al vacío en un rotaevaporador y se liofilizaron para ser evaluadas en bioensayos de toxicidad con cangrejos y en ensayos hemolíticos con eritrocitos humanos.

Por último, con el extracto crudo, se realizó una corrida de prueba con Sephadex G-50 equilibrada y eluída con una solución isocrática de ácido acético 0.3 M.

3.11 Electroforesis.

Con el propósito de conocer el intervalo de peso molecular en el que se encuentran los extractos crudos (precipitado y sobrenadante), así como de las fracciones que presentaron actividad biológica, se realizó electroforesis en gel de acrilamida, de acuerdo con el método de Laemmli (1970), teñido con azul de Coomassie. El gel se preparó en condiciones desnaturalizantes (SDS) y reductoras (B-mercaptoetanol al 5 %), con un gradiente de concentración de acrilamida del 10 al 20%. Las muestras migraron a un voltaje constante de 20 volts por 12 horas y se utilizaron marcadores de proteínas de alto y bajo peso molecular para geles de poliacrilamida-SDS.

4.0 RESULTADOS.

4.1 Aislamiento y caracterización de los nematocistos de *Aurelia aurita*

Al estudiar los nematocistos de *Aurelia aurita* se observó que esta escifomedusa posee dos tipos de nematocistos: homotricos microbásicos euriteles (HME) y atricos isorrizas (AI). En los primeros la cápsula es de forma ovoide, la porción basal del túbulo descargado es delgada y corta (menos de tres veces la longitud de la cápsula), además presenta una dilatación en la parte basal que se encuentra ornamentada con espinas del mismo tamaño. En los atricos isorrizas la cápsula también es ovoide, sin embargo, es más pequeña que en los (HME), el túbulo descargado se encuentra ligeramente dilatado distalmente y no presenta espinas (Fig. 3 A).

Los nematocistos se midieron con la ayuda de un microscopio compuesto obteniendo lo siguiente: los HME cargados midieron en promedio (n=20) 15.2 μm , apreciándose una disminución en el tamaño, una vez descargados de 11.2 μm . Los AI cargados midieron 7.2 μm y 7 μm los descargados.

Al evaluar los diferentes métodos de descarga de los nematocistos empleados en este trabajo, se observó que el más exitoso (hasta con un 90% de descarga) fue el método modificado de Kem *et al.* (1989) utilizando el uso de homogenizador, perlas de vidrio e inhibidor de proteasas (Fig. 3B).

desaladas aplicándolas a una columna de filtración en gel (Sephadex G-100) utilizando como eluyente una solución isocrática de ácido acético 0.2 M. Las fracciones se concentraron al vacío en un rotaevaporador y se liofilizaron para ser evaluadas en bioensayos de toxicidad con cangrejos y en ensayos hemolíticos con eritrocitos humanos.

Por último, con el extracto crudo, se realizó una corrida de prueba con Sephadex G-50 equilibrada y eluida con una solución isocrática de ácido acético 0.3 M.

3.11 Electroforesis.

Con el propósito de conocer el intervalo de peso molecular en el que se encuentran los extractos crudos (precipitado y sobrenadante), así como de las fracciones que presentaron actividad biológica, se realizó electroforesis en gel de acrilamida, de acuerdo con el método de Laemmli (1970), teñido con azul de Coomassie. El gel se preparó en condiciones desnaturizantes (SDS) y reductoras (B-mercaptoetanol al 5 %), con un gradiente de concentración de acrilamida del 10 al 20%. Las muestras migraron a un voltaje constante de 20 volts por 12 horas y se utilizaron marcadores de proteínas de alto y bajo peso molecular para geles de poliacrilamida-SDS.

4.0 RESULTADOS.

4.1 Aislamiento y caracterización de los nematocistos de *Aurelia aurita*

Al estudiar los nematocistos de *Aurelia aurita* se observó que esta escifomedusa posee dos tipos de nematocistos: homotricos microbásicos euriteles (HME) y atricos isorrizas (AI). En los primeros la cápsula es de forma ovoide, la porción basal del túbulo descargado es delgada y corta (menos de tres veces la longitud de la cápsula), además presenta una dilatación en la parte basal que se encuentra ornamentada con espinas del mismo tamaño. En los atricos isorrizas la cápsula también es ovoide, sin embargo, es más pequeña que en los (HME), el túbulo descargado se encuentra ligeramente dilatado distalmente y no presenta espinas (Fig. 3 A).

Los nematocistos se midieron con la ayuda de un microscopio compuesto obteniendo lo siguiente: los HME cargados midieron en promedio (n=20) 15.2 μm , apreciándose una disminución en el tamaño, una vez descargados de 11.2 μm . Los AI cargados midieron 7.2 μm y 7 μm los descargados.

Al evaluar los diferentes métodos de descarga de los nematocistos empleados en este trabajo, se observó que el más exitoso (hasta con un 90% de descarga) fue el método modificado de Kem *et al.* (1989) utilizando el uso de homogenizador, perlas de vidrio e inhibidor de proteasas (Fig. 3B).

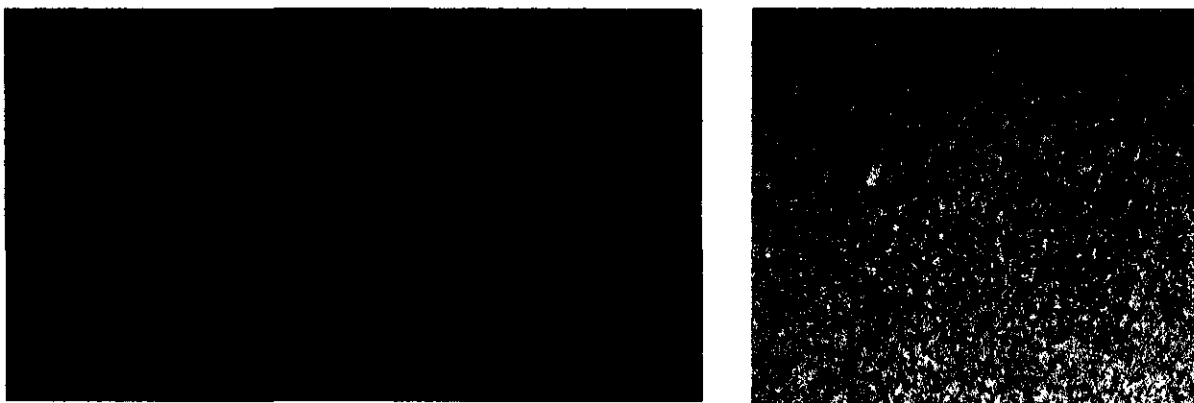


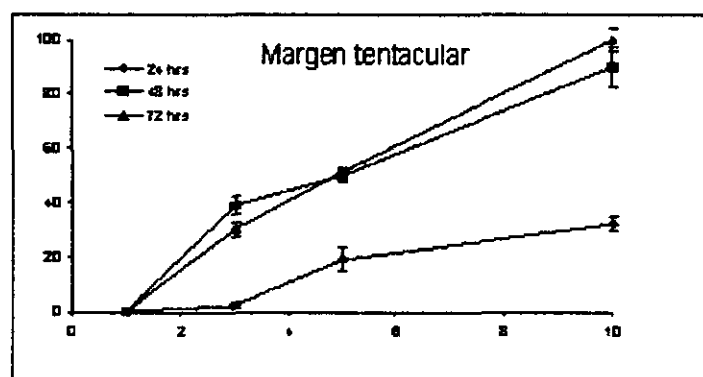
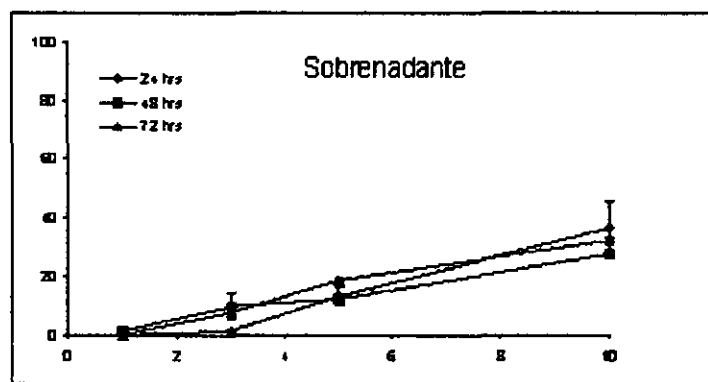
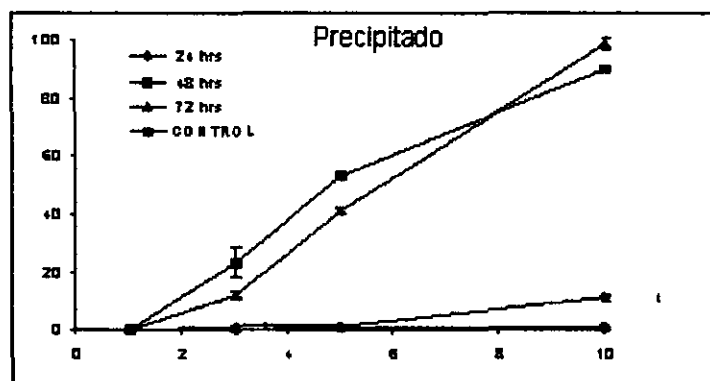
Fig. 2 A) Fotografía (1000 X) de los dos tipos de nematocistos presentes en *A. aurita*: Homotricos Microbásicos Euriteles (HME), mostrando su filamento (fi) y Atricos isorizas (AI). B) Fotografía (480 x) de los nematocistos aislados y descargados por el método modificado de Kem *et al.*, (1989).

4.2 Bioensayos de letalidad en larvas nauplio de *Artemia salina*

Al evaluar la actividad biológica de los extractos crudos obtenidos de *Aurelia aurita* (precipitado, sobrenadante y margen tentacular) en larvas nauplio de *Artemia salina*, se observó que durante todo el tiempo de experimentación un número escaso de organismos control moría.

Por el contrario, los nauplios expuestos a los diferentes tratamientos presentaban una mortalidad considerable. Con los tres extractos la etapa crítica se registró desde la tercera hasta la quinta hora de haberlos aplicado, a partir de las 24, 48 y 72 horas de la eclosión. La mortalidad de los organismos tratados con el sobrenadante fue menor, a diferencia de los expuestos con el precipitado y el margen tentacular, en los cuáles a las 29 horas de eclosión y 5 horas de exposición a los extractos, el 50 % de la población había muerto. Después de las 82 horas de la eclosión y pasadas 10 horas de exposición con estos dos extractos (precipitado y margen tentacular), el 100 % de los organismos experimentales habían muerto. Esto es, que 0.1 mg/ml de los extractos liofilizados (precipitado y margen tentacular) fueron suficientes para producir la muerte de todos los organismos experimentales. Asimismo, se encontró que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) tanto en los tiempos como en los diversos tratamientos aplicados. Los controles no presentaron diferencias significativas, en tiempos y tratamientos, por lo que sólo se muestran en una ocasión en la gráfica del precipitado (Fig 4).

(%) Acumulativo de mortalidad



Tiempo (h)

Fig 4.- Actividad toxica en nauplios de *Artemia salina*, después de 24, 48 y 72 horas de exposición con los extractos crudos de la especie en estudio (precipitado, sobrenadante y margen tentacular).

4.3 Pruebas hemolíticas.

La actividad hemolítica se observó en una curva dosis respuesta, en la que la cantidad de hemoglobina liberada por efecto de la concentración de la toxina (sobrenadante del margen tentacular) se mide en un espectrofotómetro a 415 nm de longitud de onda. Al evaluar la actividad hemolítica se observó una mayor sensibilidad en los eritrocitos de humano (63 %), en contraste con los de cordero (31 %) y los de res (30 %). La unidad hemolítica se obtuvo únicamente con los eritrocitos de humano con 0.6 mg de proteína (Fig.5).

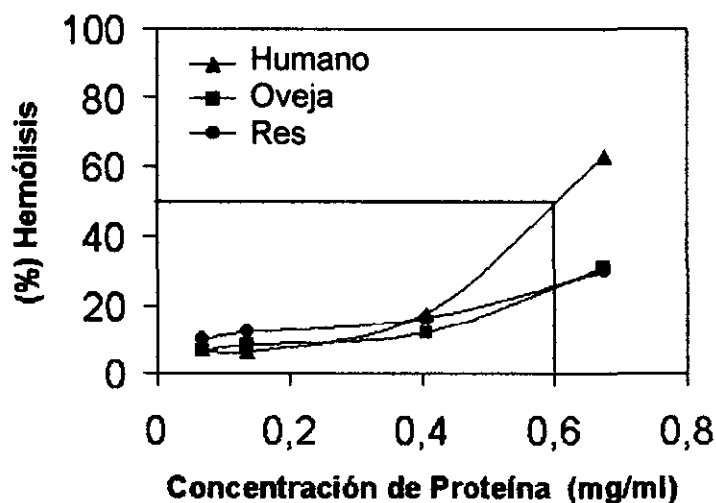


Fig 5.- Actividad hemolítica del extracto crudo de *Aurelia aurita*. en eritrocitos de humano, cordero y res. Se observa la HU y mayor sensibilidad en el primer tipo de eritrocitos así como una relación concentración-absorbancia, en la cual es directamente proporcional la concentración de extracto y el porcentaje de hemólisis.

Se evaluó además la actividad del extracto al cual se le adicionó inhibidor de proteasas obteniéndose la unidad hemolítica con 0.218 mg de proteína (Fig.6).

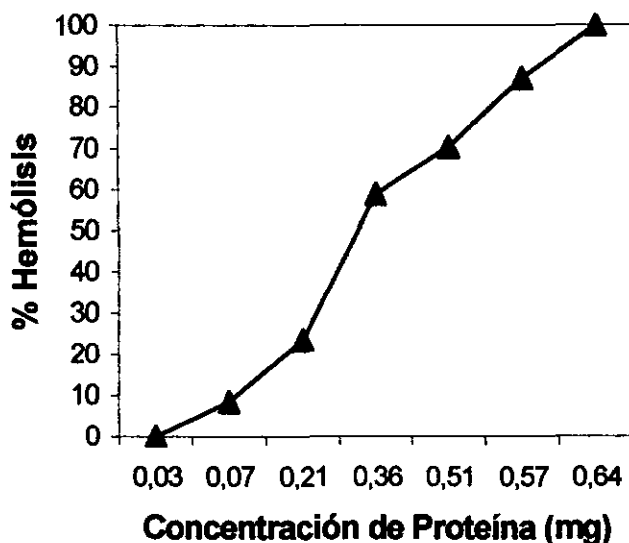


Fig 6.- Actividad hemolítica en eritrocitos de humano con inhibidor de proteasas incluido en el extracto crudo, obtenido por el método modificado de Kem *et al.* (1989); se muestra en la grafica el valor obtenido de HU.

4.4 Bioensayos con extracto crudo en cangrejos *Ocypode quadrata*.

Las pruebas realizadas con el precipitado y sobrenadante del margen tentacular (1.35 y 3.08 mg/0.1 ml de proteína respectivamente) en cangrejos, mostraron una evidente actividad biológica en estos crustáceos. A los pocos segundos de ser suministrada la dosis, se observaron fuertes contracciones en los músculos de los apéndices caminadores, acompañados de movimientos espasmódicos considerables. Las patas se tornaron temblorosas con movimientos laterales involuntarios de los apéndices caminadores, en especial de los segundos anteriores, habiendo pérdida de la locomoción, así como del control de las quelas. Los individuos tratados con el precipitado murieron en un promedio de 4 minutos después de la administración del extracto, mientras que los cangrejos tratados con el sobrenadante morían a los 9 minutos. Los resultados derivados de este ensayo mostraron que el precipitado tiene una actividad biológica más potente que el sobrenadante.

4.5 Purificación del extracto crudo de *Aurelia aurita*

Una vez que se filtraron 25 mg de extracto crudo (sobrenadante), se pasaron a través de una columna de filtración en gel con un flujo de 1 ml/min, y una atenuación 0.5 a 1. Se obtuvieron fracciones de 3 ml, y la muestra se leyó a una longitud de onda de 280 nm. De este primer paso cromatográfico, se obtuvieron 6 fracciones que se concentraron por rotaevaporación. En la fracción 4 se identificó la actividad biológica (Fig.7), por lo que se pasó por un gel de intercambio iónico con un flujo de 0.7 ml/min y una atenuación de 0.2 a

0.5, obteniendo fracciones de 5 ml. A partir de este segundo paso cromatográfico se eluyeron 4 fracciones de las cuáles sólo la 3 presentó bioactividad (eluyó con 0.3 M). Esta fracción se aplicó en una columna de filtración en gel con un flujo óptimo de 2.5 ml/min, una atenuación de 0.5 y fracciones de 3 ml. Las fracciones activas así obtenidas y denominadas Aa-I y Aa-II (Fig. 8) se concentraron al vacío en un rotaevaporador y se liofilizaron, para evaluar su actividad biológica en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*.

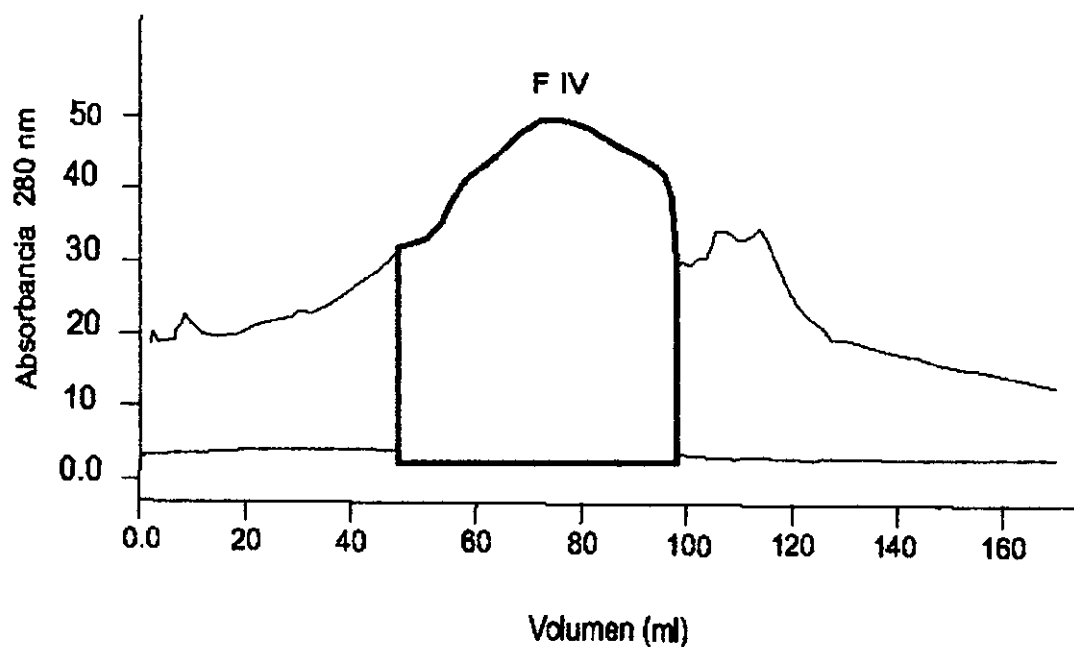


Fig 7 .- El perfil representa el primer paso cromatográfico de la purificación parcial de las toxinas de *Aurelia aurita*, en un gel de filtración Sephadex G-200-120. Sombreada se muestra la fracción biológicamente activa (IV) en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*.

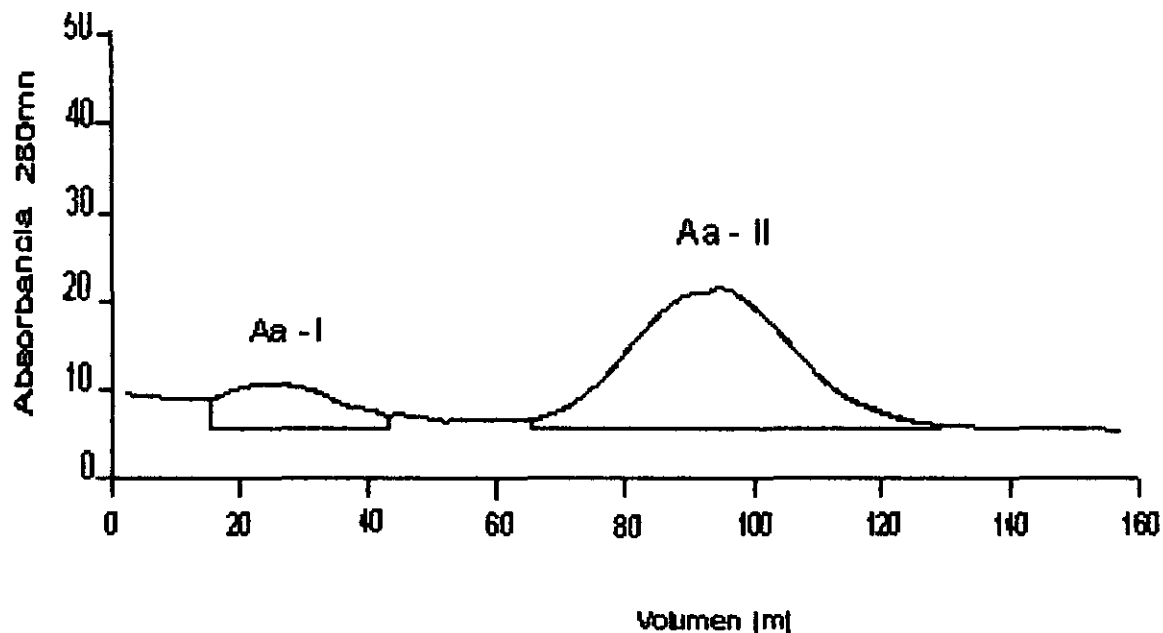


Fig 8 .- Se muestra el perfil cromatográfico de Sephadex G-100 donde eluyeron dos fracciones biológicamente activas en *Ocypode quadrata*. Aa-I y Aa-II. (parcialmente purificadas).

Es importante señalar que se obtuvieron picos mejor definidos y menores tiempos de elución como resultado de utilizar como primer paso cromatográfico un gel de filtración (Sephadex G-50), empleando como eluyente una solución isocrática de ácido acético 0.3 M a un flujo de 3 ml/min con una atenuación de 0.1 fracciones de 15 ml. Se obtuvieron 6 fracciones las cuáles se concentraron y liofilizaron, identificándose la fracción 4 como activa (Fig .9).

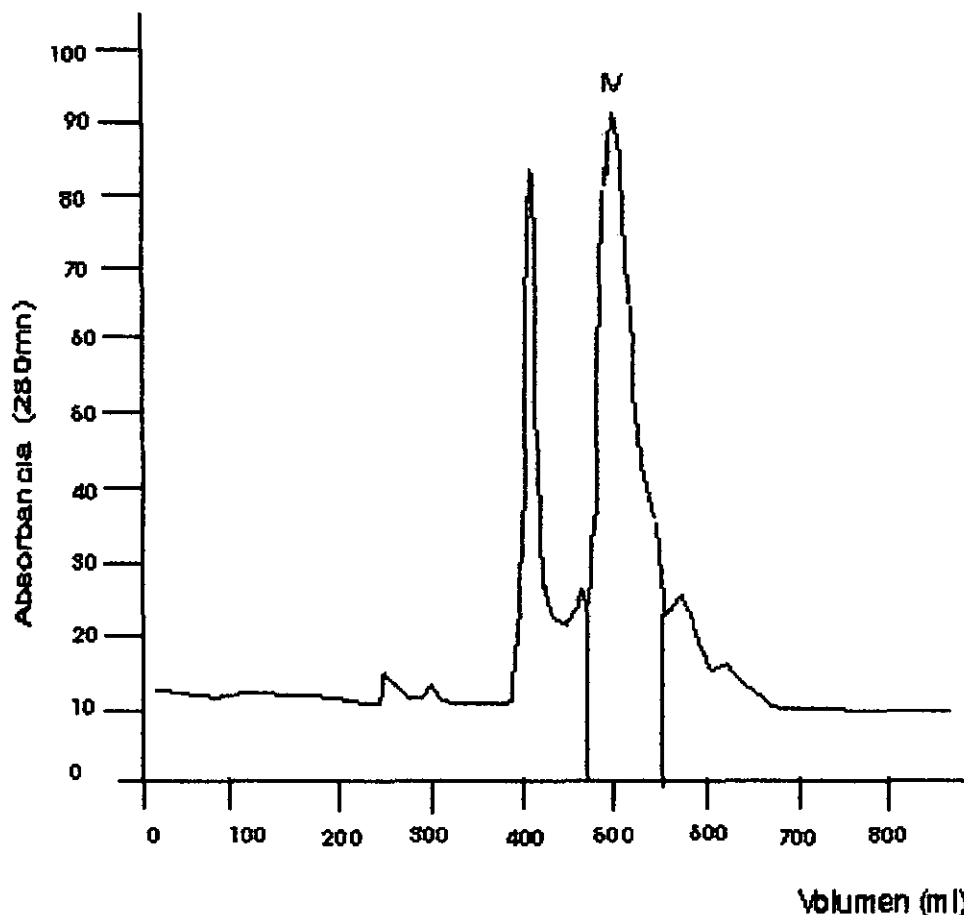


Fig 9 .- Purificación parcial del extracto crudo, en gel de Sephadex G-50, se muestra la fracción biológicamente activa (IV) en cangrejos *Ocypode quadrata*.

4.6 Bioensayos con fracciones tóxicas en cangrejos *Ocypode quadrata*.

En estos ensayos se observó que conforme avanzaba el proceso de la purificación parcial, las fracciones bioactivas se iban tornando cada vez más tóxicas. Las fracciones prepurificadas Aa -I y Aa -II provenientes de filtración en gel (Sephadex G-100) al ser suministradas (0.6 μ g/0.1ml de proteína y 0.1ml de fracción, sin concentrar ni liofilizar), presentaban una evidente actividad tóxica. En el caso de los cangrejos tratados con la fracción Aa-I se observó que en unos cuantos segundos los apéndices caminadores presentaban movimientos involuntarios rápidos (en particular los segundos anteriores), posteriormente perdían por completo la movilidad y morían a los 8 minutos. La fracción Aa -II resultó ser más tóxica, ya que inmediatamente después de aplicada la dosis, los organismos arrastraban las patas traseras (en especial las segundas anteriores) y antes del minuto presentaban ausencia de la actividad locomotora, posteriormente extendían los apéndices caminadores y morían antes de los 5 minutos. Estos mismos resultados se observaron al probar la fracción 4 proveniente de filtración en gel (Sephadex G-50), sin embargo, en este caso la muerte de los cangrejos ocurría poco después de los 3 minutos.

4.7 Pruebas hemolíticas con fracciones parcialmente purificadas.

No se observó actividad hemolítica significativa con ninguna de las fracciones parcialmente purificadas.

4.8 Electroforesis.

Con base en la electroforesis en gel de acrilamida se obtuvieron, en los extractos crudos, bandas de proteína desde los 18 hasta los 250 kDa y las fracciones bioactivas parcialmente purificadas (Aa-I y Aa-II) mostraron intervalos de peso molecular entre 45 y 66 kDa (Fig. 10).

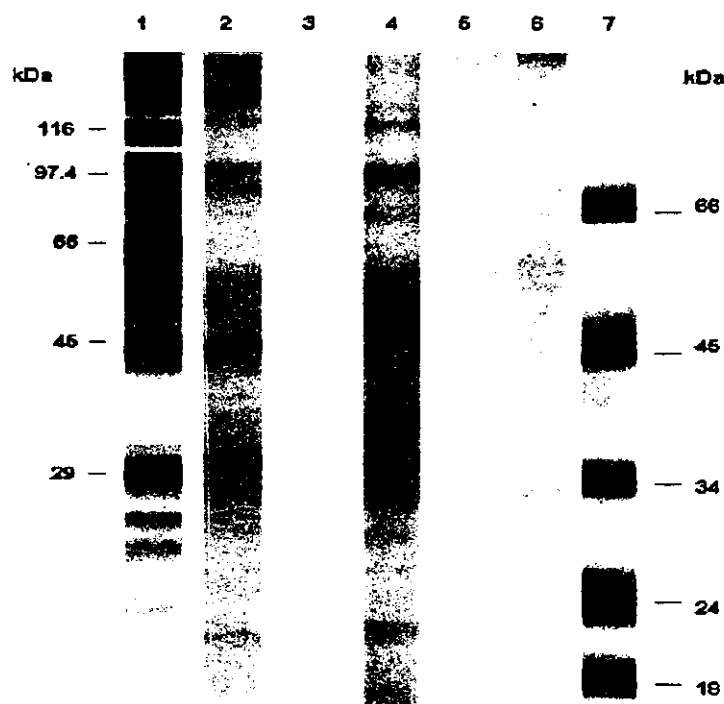


Fig 10 .- Electroforesis en gel de acrilamida SDS, de extractos en crudo y de fracciones parcialmente purificadas con actividad biológica. La electroforesis se llevó a cabo por el método de Laemmli (1970), con un gradiente discontinuo de acrilamida de 5 a 10 %, las muestras migraron a voltaje constante de 20 volts por 12 horas. El carril 2 corresponde al precipitado, el 3 al mucus, el carril 4 al sobrenadante. Mientras que el 5 y 6 corresponden a las fracciones Aa-2 y Aa-1 respectivamente. El carril 1 y 7 representan los estándares de peso molecular.

4.9 Dermatitis por contacto con *Aurelia aurita*.

Con el objeto de evaluar el efecto de la toxina en humanos, la autora de esta investigación se aplicó en la región abdominal, la secreción mucosa liberada al cortar el margen tentacular de *Aurelia aurita*. El efecto inmediato fue una sensación de cansancio y una dermatitis moderada, que se incrementó con el paso de los días. La dermatitis apareció cinco minutos después de la aplicación de la secreción, la cual se puede apreciar en la Fig. 11, tomada 3 días después del contacto con la secreción. La dermatitis se caracterizó por la presencia de pequeñas ronchas de color rojizo de 2 mm, acompañadas de escozor. La afección perduró por un lapso de 10 días.



Fig 11 .- La fotografía de la zona urticada tomada tres días después del contacto con el mucus de *A. aurita*, se pueden apreciar las evidentes ronchas eritematosas (2 mm) provocadas por las toxinas de la especie en estudio.

5.0 DISCUSION

Aurelia aurita tiene dos tipos de nematocistos, homotricos microbásicos euriteles (HME) y atricos isorrizas (AI) lo que coincide con lo observado por (Russell, 1970) para esta especie. Las características morfológicas de ambos tipos concuerdan con las descritas previamente por Mariscal (1974). La descarga de estos organelos fue más exitosa con el tercer método empleado

4.9 Dermatitis por contacto con *Aurelia aurita*.

Con el objeto de evaluar el efecto de la toxina en humanos, la autora de esta investigación se aplicó en la región abdominal, la secreción mucosa liberada al cortar el margen tentacular de *Aurelia aurita*. El efecto inmediato fue una sensación de cansancio y una dermatitis moderada, que se incrementó con el paso de los días. La dermatitis apareció cinco minutos después de la aplicación de la secreción, la cual se puede apreciar en la Fig. 11, tomada 3 días después del contacto con la secreción. La dermatitis se caracterizó por la presencia de pequeñas ronchas de color rojizo de 2 mm, acompañadas de escozor. La afección perduró por un lapso de 10 días.



Fig 11 .- La fotografía de la zona urticada tomada tres días después del contacto con el mucus de *A. aurita*, se pueden apreciar las evidentes ronchas eritematosas (2 mm) provocadas por las toxinas de la especie en estudio.

5.0 DISCUSION

Aurelia aurita tiene dos tipos de nematocistos, homotricos microbásicos euriteles (HME) y atricos isorizas (AI) lo que coincide con lo observado por (Russell, 1970) para esta especie. Las características morfológicas de ambos tipos concuerdan con las descritas previamente por Mariscal (1974). La descarga de estos organelos fue más exitosa con el tercer método empleado

(incluyendo una variante al método modificado de Kem *et al.* (1989). La ventaja más importante fue una mayor descarga de los nematocistos dado que se incrementó considerablemente el estímulo mecanosensible aplicado a las cápsulas, como consecuencia del uso combinado de un homogeneizador y perlas de vidrio. Además, se evitó la desnaturalización de las proteínas y los péptidos, agregando una combinación de inhibidores de proteasas, y manteniendo la temperatura a 4° C durante la agitación.

Se utilizaron nauplios de *Artemia salina* para evaluar la potencia tóxica del veneno de *A. aurita* debido a las ventajas que presenta este recurso. En primer lugar, se necesitan cantidades mínimas de toxinas, dado que se requiere de un volumen pequeño de agua para llevar a cabo el experimento. Por otro lado, los quistes deshidratados de *A. salina* son accesibles todo el año, su transportación es fácil, los nauplios se obtienen rápidamente y el cultivo necesita poco mantenimiento, lo que permite tener un stock base para poder extraer los nauplios en los diferentes tiempos que requiera el experimento.

Los ensayos de letalidad realizados con nauplios de *A. salina*, mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el porcentaje de mortalidad acumulativo entre grupos controles y los tratados con toxinas; los grupo control presentaron 0.73% de mortalidad máxima, en contraste con los tratados con el sobrenadante, en donde se obtuvo una mortalidad de 36.66 % (81 hrs). Los organismos tratados con el margen tentacular, sin centrifugar y con el precipitado, presentaron un incremento significativo en el porcentaje acumulativo de mortalidad y, al finalizar el experimento (82 hrs), el 100 % de la población de nauplios de *Artemia salina* había muerto. Este resultado puede deberse a que en el margen tentacular (sin centrifugar), así como en el precipitado, se concentran la mayor cantidad de los nematocistos y por lo tanto de péptidos bioactivos. El contraste existente entre la mortalidad observada en los grupos controles y la registrada en los tratamientos, es una evidencia clara que indica que en el extracto crudo de *Aurelia aurita* existen compuestos que ejercen efectos tóxicos en *Artemia salina*.

A la fecha no existen antecedentes del empleo de estos crustáceos para evaluar la actividad biológica de organismos marinos, específicamente de medusas, por lo que es importante estandarizar este experimento para determinar la biotoxicidad de cnidarios.

La acción hemolítica de *Aurelia aurita* ha sido descrita previamente por otros autores en ejemplares recolectados en las costas de Thai (Pong-Prayon *et al.*, 1991), en el Mar Rojo y en la Bahía de Chesapeake (Radwan *et al.*, 2001). En el caso de la *Aurelia aurita* del Caribe Mexicano, se observó una mayor sensibilidad a las toxinas con los eritrocitos de humano, en contraste con los otros dos tipos sanguíneos. Estos resultados no se pueden comparar con los obtenidos en estudios previos, debido a que en ellos se utilizaron únicamente eritrocitos humanos. Sin embargo, esta misma respuesta coincide con las registradas en otras especies de medusas, como es el caso de *Chrysaora*

quinquecirrha (Long-Rowe & Burnett, 1994) y *Cassiopea xamachana* (Torres *et al.*, 2001). La respuesta diferencial de los diversos tipos de eritrocitos a un mismo veneno, puede estar relacionada con el contenido de lípidos de la membrana celular (Berenheimer & Rudy, 1986), así como con el mecanismo de acción de los compuestos tóxicos presentes en los extractos, como lo sugieren, Torres *et al.* 2001.

Por otro lado, en el presente estudio se requirió una concentración de 0.6 mg de proteína y 0.22 mg de proteína con el método modificado de Kem *et al.* (1989) al que se le adicionó inhibidor de proteasas, para obtener el 50 % de hemólisis en eritrocitos humanos. Por el contrario, en las investigaciones realizadas por Radwan *et al.* (2001) con ejemplares de *A. aurita* del Mar Rojo y de la Bahía de Chesapeake, se determinaron concentraciones de 1 y 8 μ g de proteína respectivamente, para producir el 50% de hemólisis en eritrocitos de humano. Estas diferencias indican que la actividad biológica de la *Aurelia aurita* del Caribe es menos potente que las de otras regiones geográficas. Sin embargo, el que presente una menor actividad hemolítica, con respecto a la de otras localidades, no excluye que existan otros compuestos con diferentes mecanismos de acción y biológicamente más tóxicos en las toxinas de la *A. aurita* del Caribe Mexicano.

Es importante señalar que en los ensayos hemolíticos se obtuvieron mejores resultados al utilizar el extracto con inhibidores de proteasas, ya que se requirió de una concentración menor de toxina para obtener el 50 % de hemólisis. Estos datos sugieren que la naturaleza química de la toxina es proteica, y que es necesario utilizar inhibidores de proteasas al preparar los extractos, para evitar una pérdida de la actividad biológica, debido a la presencia de proteasas que están degradando a las proteínas responsables de la acción hemolítica.

En cuanto a la actividad tóxica del extracto crudo evaluada en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, se observó una actividad motora violenta e involuntaria, parálisis y muerte. Estas pautas conductuales coinciden con los resultados obtenidos con otras dos especies de medusas del Caribe, *Cassiopea xamachana* y *Carybdea marsupialis* (Segura com. pers.), así como con la anémona *Bartholomea annulata* (Zugasti com. pers.). Además, las conductas son muy similares a las observadas en otras especies de cangrejos al aplicar el extracto crudo de *Chrysaora quinquecirrha* (Blanquet, 1972), *Physalia physalis* (Lane & Dodge, 1958; Menéndez *et al.*, 1989) y varias anémonas con las que se iniciaron y se han realizado la mayor parte de este tipo de estudios (Blanquet, 1968; Hessinger *et al.*, 1973)

Al comparar los resultados de este trabajo con los obtenidos por Radwan *et al.* (2001) quienes estudiaron las toxinas de *A. aurita* del Mar Rojo y de la Bahía de Chesapeake, se observaron diferencias y similitudes. Entre estas últimas se aprecia lo siguiente: en los tres casos el volumen de la columna, la matriz cromatográfica, el eluyente y el volumen de las fracciones fueron similares. No

obstante, estas similitudes en los parámetros de purificación, los perfiles cromatográficos muestran apreciables diferencias entre la *A. aurita* de las tres zonas. Este hecho apoya lo mencionado por Radwan *et al.* (2001) en cuanto a que las diferencias químicas entre los venenos se podrían encontrar reflejadas en los patrones de elución.

Al analizar los extractos crudos utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, se observaron múltiples bandas de proteína de alto peso molecular, tal y como ha sido obtenido para otras especies de medusas (Walker, 1988) como *Chrysaora quinquecirrha* (Kelman *et al.*, 1984; Caiton & Burnett, 1982), *Chrysaora achlyos* (Radwan *et al.*, 2000), *Rhopilonema nomadica* (Guzmani *et al.* 1997), *Chironex fleckeri* (Keen & Crone, 1969; Endean *et al.*, 1993; Bloom *et al.*, 1998) y *Physalia physalis* (Menéndez *et al.*, 1989) los cuales se encuentran en un intervalo de 20 a 200 kDa.

En la *Aurelia aurita* del Caribe se determinaron bandas de proteína con un intervalo de peso molecular de entre 18 y 120 kDa. En contraste, Radwan *et al.* (2001) determinaron un intervalo ligeramente más amplio de entre 5 y 210 kDa para las especies de *A. aurita* procedentes del Mar Rojo y de la Bahía de Chesapeake. Se determinó también el peso molecular de las fracciones parcialmente purificadas y activas en cangrejos (Aa-I y Aa-II) registrándose un peso molecular de entre 45 y 66 kDa. Es importante resaltar que hasta el momento no se tiene información de los pesos moleculares de proteínas activas de medusas, probadas en cangrejos.

Al evaluar la acción de las fracciones tóxicas parcialmente purificadas de *Aurelia* en cangrejos, se requirió de una menor cantidad de proteína, en contraste con el extracto crudo, observándose síntomas de intoxicación más dramáticos en un tiempo más corto. En el caso de las fracciones Aa-I y Aa-II, se aplicaron cantidades del orden de μg de proteína y el efecto tóxico aparecía casi inmediatamente después de inyectada la dosis. Esto se atribuye a que en las fracciones parcialmente purificadas ya no existe una mezcla tan heterogénea de polipéptidos como en el extracto crudo, que probablemente interfieran en la acción del compuesto tóxico.

Por otro lado, las conductas tan específicas que mostraron los crustáceos como respuesta a las fracciones tóxicas como son, arrastrar las patas traseras, en particular las segundas anteriores, contracciones tetánicas involuntarias, pérdida de la locomoción y la muerte, son respuestas que han sido observadas en otras especies de cangrejos en estudios previos con toxinas marinas.

Se han realizado estudios similares en crustáceos para probar fracciones tóxicas de cnidarios (Fujita *et al.*, 1983 & Warashina, 1988), salvo que en estos casos se han utilizado membranas musculares aisladas de los apéndices caminadores. Sin embargo, con base en las observaciones realizadas y comparándolas con los resultados obtenidos por otros autores, se sugiere la presencia de polipéptidos neurotóxicos que actúan a nivel de los canales de

sodio y que están ejerciendo efectos adversos sobre las células musculares, produciéndoles contracciones tetánicas en los apéndices caminadores. Es importante señalar que los polipéptidos neurotóxicos que actúan a nivel de los canales de sodio, presentan puentes disulfuro que mantienen su estabilidad estructural y funcional durante el proceso de purificación (Béress & Béress, 1984).

Al evaluar la actividad hemolítica de las fracciones obtenidas por cromatografía sólido-líquido, se encontró que dicha actividad decreció al someterse al proceso de purificación parcial. Esto ha sido observado en estudios previos con toxinas de medusas, como lo demuestran Calton & Burnett (1973), Hessinger (1988), Edean *et al.* (1993), Guzman *et al.*, (1997) y con otros cnidarios (Bernheimer & Avigad, 1976; Tamkun & Hessinger, 1981). En este caso, las proteínas que actúan en la membrana celular de los eritrocitos (hemolisinas) son altamente termolábiles, como se ha observado en *Chrysaora quinquecirrha* (Long-Rowe & Burnett, 1994) y *Carybdea marsupialis* (Rottini *et al.*, 1995) entre otras. Este factor pudo haber sido responsable de la pérdida de la actividad hemolítica del veneno de *A. aurita*, debido a que el tiempo de elución al que se sometían algunas de las fracciones era de alrededor de 22 horas a temperatura ambiente, causando la desnaturalización de proteínas susceptibles a la temperatura. Aunado a esto, hay que recordar la presencia de proteasas en el veneno de las medusas, muy bien documentada por varios autores entre los que destacan, Comis & Howden, (1989), Williamson *et al.* (1996) y Southcott (1979). Otro factor que pudo haber influido en la pérdida de la actividad de las fracciones parcialmente purificadas, se basa en la propuesta de Hessinger (1988) quien sugiere que la potencia tóxica total es el resultado de la cooperatividad y el sinergismo entre varios componentes del veneno crudo; lo que indica que al separarse los compuestos bioactivos durante la purificación parcial, la actividad biológica no será la misma que la observada en su estado nativo.

Aurelia aurita es una escifomedusa con una amplia distribución mundial y considerada por algunos autores como inocua en humanos (Russell, 1970) y por otros como venenosa (Cleland & Southcott, 1965). En esta investigación se observó una dermatitis evidente producida por el mucus de esta especie que había generado polémica en cuanto a su potencia urticante, y que sin embargo, en las aguas del Caribe produce lesiones cutáneas significativas.

Los resultados de Burnett *et al.* (1988), Radwan *et al.* (2001) y los obtenidos en este trabajo apoyan la teoría propuesta por Kem (1988) quien sostiene que la potencia urticante de una misma especie, varía de acuerdo a la localidad en que habita, lo que trae consigo que pudiesen existir diferencias en los compuestos tóxicos. Es probable que la variación en la toxicidad dentro de una misma especie, pueda estar relacionada con la edad, el sexo, la parte del organismo, la profundidad y la estación del año, como lo plantean Bakus *et al.* (1986), o incluso con cambios ambientales bruscos. Además, estos mismos

autores argumentan que la toxicidad defensiva es característica de aguas tropicales donde se incrementan las interacciones depredador-presa, como es el caso de la zona donde se recolectó la especie en estudio.

6.0 CONCLUSIONES

Aurelia aurita posee dos tipos de nematocistos: atricos isorrizas y homotricos microbásicos euriteles. La descarga de estos organelos resultó más exitosa (90%) con uno de los métodos utilizados, que incluye una variante al método modificado de Kem *et al.* (1989).

Los resultados de los bioensayos indican que en los extractos crudos (precipitado, sobrenadante y margen tentacular) de *Aurelia aurita* existen compuestos que ejercen efectos tóxicos en las larvas nauplio de *Artemia salina*. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto en los tiempos como en los tratamientos utilizados. Se observó que 0.1 mg/ml de precipitado y margen tentacular fueron suficientes para matar el 100 % de la población después de las 72 horas de la eclosión.

Se detectó actividad hemolítica en el extracto crudo de *A. aurita* observándose: a) una clara relación dosis-respuesta, en la que al aumentar la dosis se incrementó el porcentaje de hemólisis, b) mayor sensibilidad a las toxinas en los eritrocitos de humano (63%), en contraste con los de cordero (31%) y los de res (30%), c) la unidad hemolítica en eritrocitos de humano (50% de hemólisis) se obtuvo con 0.6 mg de proteína, mientras que con el inhibidor de proteasas se alcanzó con 0.36 mg de proteína. Lo que indica que el compuesto es proteico, ya que es susceptible a la desnaturalización por proteasas.

Al evaluar la actividad de las fracciones parcialmente purificadas, se observó que la actividad hemolítica decreció drásticamente, esto debido probablemente a la termolabilidad de este tipo de compuestos y/o a la interacción con otros componentes presentes en el extracto crudo.

Se registró una actividad biológica evidente en los cangrejos *Ocypode quadrata* al ser inyectados con extracto crudo, así como con las fracciones parcialmente purificadas (Aa-I y Aa-II). Estas fracciones, presumiblemente neurotóxicas, tienen un intervalo de peso molecular que varía entre 45 y 66 kDa. Además, se observó una reacción tóxica más dramática y la muerte en menor tiempo con dosis del orden de μg .

La escifomedusa *Aurelia aurita* del Caribe Mexicano es capaz de producir dermatitis, caracterizada por la aparición de ronchas eritematosas urticariformes. Los síntomas inmediatos producidos por las toxinas fueron sensación de fatiga, seguida de ardor y prurito; las ronchas persistieron por un lapso de 11 días.

7.0 LITERATURA CITADA.

Alvarez, M.C., 1997. The roles of ionic strength on the enhancement of the hemolytic activity of sticholisin I, A cytolysin from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, **36**(1):165-178.

Bakus, G.J., B. Shulte & P. Targett, 1986. Chemical ecology of marine organism; an overview. *J.Chem. Ecol.*, **12**:951-957.

Béress, L., 1982. Biologically active compounds from coelenterates. *Pure & Appl Chem.*, **54**(10): 1981-1994.

Béress, L., & R. Béress, 1984. Biologically active compounds from marine invertebrates. *Nova Acta Leopoldina*, **56**(255):153-159.

Bernheimer, A.W., & S.L. Avigad, 1976. Properties of a toxin from the sea anemone *S. helianthus* including specific binding to sphingomyelin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**:467-461.

Bernheimer, A.W., & S.L. Avigad, 1981. New cytolysins in sea from the West Coast of The United States. *Toxicon*, **19**(4): 529-534.

Bernheimer, A.W., & B. Rudy, 1986. Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochem. Biohys. Acta*, **864**(1):123-41.

Blanquet, R.S., 1968. Properties composition of the nematocyst toxin of the sea anemone, *Aiptasia pallida*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **25**:893-902.

Blanquet, R.S., 1972. A toxic protein from the nematocyst of the scyphozoan medusa, *Chrysaora quinquecirrha*. *Toxicon*, **10**:103-109.

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 proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, **72**:248-254.

Braeckman, J.C., & D. L Daloz, 1983. Los Medicamentos del Mar. *Mundo Científico*, **26**: 42-47.

Burnett, J.W., 1990. Some natural jellyfish toxins. Pp 333-335 In: Marine Toxins: origin, structure and molecular pharmacology. Hall, S. & G. Strichartz. (eds.) American Chemical Society, Washinton D.C.

- Burnett, J.W., 1991. Clinical manifestation of jellyfish envenomation. *Hidrobiologia*, **217**:629-635.
- Burnett, J.W., G.J. Calton & J.B. Larsen, 1988. Significant envenomation by *Aurelia aurita*, the moon jellyfish. *Toxicon*, **26**(2):215-17.
- Burnett, J.W., D.A. Blooms, S.I. Makufu, H. Houck, L. Vanucci & S.C. Aurelian, 1996. Coelenterate venom research 1991-1995: clinical, chemical and immunological aspects, *Toxicon*, **34**(11): 1377-1383.
- Burnett, J.W., D. Weinrich, A.J. Williamson, P.J. Fenner, L.L. Lutz & A.D. Bloom, 1988. Autonomic neurotoxicity of jellyfish and marine animals venoms. *Clinical Autonomic Research*, **8**(2): 125-130.
- Calton, G.J., & J.W. Burnett, 1973. The purification of portuguese Man-of-War nematocyst venom by gel diffusion. *Pharm.*, **4**:267-270.
- Calton, G.J., & J.W. Burnett, 1982. Partial purification and characterization of the acid protease of the sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) nematocyst venom. *Comp. Biochem. Physiol.*, **72**:93-97.
- Calton, G.J., & J.W. Burnett, 1983. Partial purification and characterization of the alkaline protease of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) nematocyst venom. *Comp. Biochem. Physiol.*, **74**: 361-364.
- Cleland, J.B., & R.V. Southcott, 1965. Injuries to man from marine invertebrates in the Australian region. *Nat. Health Med. Research. Counc. Special Report.*, **12**: 165.
- Comis, R.F., & E.M. Howden, 1989. Stabilization of lethal and hemolytic activities of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) venom. *Toxicon*, **27**(4):439-447.
- Dekker, M., 1988. Handbook of Natural Toxin Marine Toxins and Venoms. Academic press Inc, New York. 597p.
- Endean, R.S., A. Monks & A.M. Cameron, 1993. Toxins from the box-jellyfish *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, **31**(4):397-410.
- Fujita, S., A. Warashina & M. Satake, 1983. Binding characteristics of a sea anemone toxin from *Parasicyonis actinostoloides* with crayfish leg nerves. *Comp. Biochem. Physiol.*, **76**:25-32.
- Guzmani, I., A. Massimo, P. Patriarca & G. Rottini, 1997. Biologically active polypeptides in the venom of the jellyfish *Rhopilema nomadica*. *Toxicon*, **35**(5):637-648.

Halstead, B.W., 1978. *Poisonous and venomous marine animals of the world*. The Darwin Academic Press Inc, New Jersey, 1257 p.

Hessinger, D.A., 1988. "Nematocyst Venoms and Toxins". Pp 333-368 In: The biology of nematocysts. Hessinger, D.A & H.M. Lenhoff (eds.). Academic Press Inc, New York.

Hessinger, D.A. & H.M. Lenhoff, 1976. Membrane structure and function. Mechanism of hemolysis induced by nematocyst venom: roles of phospholipase A and direct lytic factor. *Arch. Biochem. Biophys*, **173**:603-613.

Hessinger, D.A. & J.A. Hessinger, 1981. Methods for rearing sea anemones in the laboratory. Pp 153-170 In: Committee on Marine Invertebrates (eds). Marine invertebrates. National Academy Press, Washington D.C.

Hessinger, D.A., H.M. Lenhoff. & L. Kahn, 1973. Haemolytic, phospholipase A, and nerve-affecting activities of sea anemone nematocyst venom. *Nat. new. Bio*, **24**:125-127.

Jordán, E., 1978. Prospección biológica de la laguna de Nichupté, Cancún, Q. Roo, México. *An. Inst. Cien. Mar y Limnol. Univ. Nac. Autón. Méx.*, **5**(1):179-188.

Jordán, E., 1979. Estructura y composición de arrecifes coralinos en la región noreste de la Península de Yucatán, México. *An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nac. Autón. Méx.*, **6**(1):69-86.

Keen, T.E. & H.D. Crone, 1969. The hemolytic properties of extracts of tentacles from the cnidarian *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, **7**: 55-63.

Kelman, N.S., J.G. Calton & W.J. Burnett, 1984. Isolation and partial characterization of a lethal sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) mesenteric toxin. *Toxicon*, **22**(1):139-144.

Kem, W.R., 1988. Sea anemone toxin: Structure and action. Pp 375-405 In: The biology of Nematocyst. Hessinger, A. & H.M Lenhoff. (eds.). Academic press Inc, New York.

Kem, W.R., 1989. Peptide chain toxins of marine animals. Pp 69-83 In: Biomedical importance of marine organism. Fautin, D.G. (ed.). California Academy of Science.

Kem, W.R., B. Parten, M.V. Penington, B.M. Dung & D. Price, 1989. Isolation and characterization and sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochem.*, **28**:3483-89.

Kihura, H., M. Anraku, M. Ohno & S. Hashimura, 1988. Tetrodotoxin-unaffected depolarization of frog muscles induced by the venom of jellyfish (Genus *Aurelia*). *Jap. J. Physiol.*, **38**:839-49.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, **227**:680-685.

Lane, C.E. & E. Dodge, 1958. The toxicity of *Physalia physalis* nematocyst. *Biol. Bull. Mar. Biol.*, **115**:219-225.

Long-Rowe, K.O & W.J. Burnett, 1994. Characteristics of hyaluronidase and hemolytic activity in fishing tentacle nematocyst venom *Chrysaora quinquecirrha*. *Toxicon*, **32**(2):165-174.

Lotan, A., L. Fishman & E. Zlotkin., 1995. Delivery of a nematocyst. *Nature*, **375**:456.

Mariscal, R.N., 1974. Nematocysts. Pp 132-153 In: Coelenterate Biology Reviews and new perspectives. Muscatine, L, & H.M. Lenhoff. (eds.). Academic Press, New York.

Menéndez, R.A., M. Garateix & M. Chavez, 1989. Effects of a high molecular weight toxin from *Physalia physalis* on glutamate responses. *Neurosci.*, **33**(2) 269-273.

Merino, M. & M. Gallegos, 1986. Evaluación del impacto ambiental generable sobre el Sistema Lagunar Nichpté por el dragado programado para rellenar el lote 18-A en Cancún Quintana Roo. Report to PIADISA by Universidad Autónoma de México. México D.F. Pp 87.

Neeman, I., J.G. Calton & W.J. Burnett, 1980a. Cytotoxicity and dermonecrosis of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) Venom. *Toxicon*, **18**: 55-63.

Neeman, I., J.G. Calton & W.J. Burnett, 1980b. An Ultrastructural study of the venoms from the sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) and Portuguese Man-of-War (*Physalia physalis*) on cultured chinese hamster ovary K-1 cells. *Toxicon*, **18**:495-501.

- Neeman, I., J.G. Calton & W.J. Burnett, 1980c. Purification of a novel endonuclease presente in *Chrysaora quinquecirrha* venom. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.*, **192**:732-738.
- Pong-Prayoon, U., L. Bohlin & S. Wasowat, 1991. Neutralization of toxic effects of different crude jellyfish venoms by an extract of *Ipomoea pes-caprue* (L.) R.Br. *J. Ethnopharmac.*, **25**:65-9.
- Radwan, F.F., L. Gershwin & J.W. Burnett, 2000. Toxinological studies on the nematocyst venom of *Chrysaora achlyos*. *Toxicon*, **38**:1581-1591.
- Radwan, F.F., J.W. Burnett, D.A. Bloom, T. Coliano, M.E. Eldefrawi, H. Erderly, L. Aurelian, M. Torres & E. Heimer de la Coteria, 2001. A comparison of the toxinological characteristics of two *Cassiopea* and *Aurelia* species. *Toxicon*, **39**:245-257.
- Ross, S., F. Nigrelli, F. Stempien & T. Cecil, 1967. Substances of potencial biomedical importance from marine organism. *Federa. Proc.*, **26**:1167-1205.
- Rottini, G., L. Guzmani., E. Parovel., M. Avian & P. Patriarca, 1995. Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Caribdea marsupialis*. *Toxicon*, **33**(3):315-326.
- Rottini, G., A. Dobrina, O. Forgiarini, E. Nardon, G.A. Amirante & P. Patriarca, 1990. Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. *Infec. Immun.*, **58**(11):3751-3758.
- Rusell, F.R.S., 1970. The Medusae of the British Islands. Cambridge University Press, 283 p.
- Schwartz, S., 1977. Venomous marine animals of Florida: Morphology, Behavior, Health Hazards. *J. Florida Ma.*, **84**(7): 433-440.
- Southcott, R.V., 1979. "Marine Toxins". Pp 25-106 In: Handbook of Clinical Neurology. Vinken P.J & G.W. Brown (eds.). Elsevier/North-Holland. Publishing. Company. Germany.
- Tamkun, M.M., & D.A. Hessinger, 1981. Isolation and partial characterization of a hemolytic and toxic protein from the nematocyst venom of the Portuguese Man-War. *Physalia physalis*. *Biochem. Biophys. Acta*, **667**:87-98.
- Torres, M., B.M. Aguilar, A. Falcon, L. Sánchez, F. F. Radwan, J.W. Burnett, E.P Heimer de la Coteria & O.R. Arellano, 2001 A Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon*, (In press).

Walker, M.J.A., 1977. Pharmacological and biochemical properties of a toxin containing material from the jellyfish, *Cyanea capillata*. *Toxicon*, **15**: 3-14.

Walker, M.J.A., 1988. "Colenterate and Echinoderm Toxins: Mechanism and actions". Pp 280-309 In: Handbook of Natural Toxin. (3). Marine Toxin and venoms. Anthony T.T & M. Dekker (eds.). Academic press Inc. New York.

Warashina, A., 1988. Potential-dependent action of *Anemonia sulcata* toxins III and IV on sodium channels in crayfish giant axons. *European.J. of Physiol.*, **411**:88-93.

Watson, G., & I. Wood, 1988. Colloquium on terminology. Pp 21-23 In: The biology of nematocysts. Hessinger D.A & H.M. Lenhoff. (eds.). Academic Press Inc, New York.

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

8.0 APENDICE DE SOLUCIONES

- ❖ Solución de Alsever pH 7.4. La cual contiene para un litro:

Agua desionizada	900 ml.
Dextrosa anhidra	21.0
Citrato de sodio $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	8.0
Cloruro de sodio NaCl	4.2
Acido cítrico anhidro $C_6H_8O_7$	0.4 gr.

- ❖ Buffers de fosfatos pH 7.2 y 6.3

Soluciones Stock.

A: Solución 0.2 M de fosfato de sodio monobásico 27.8 g en 1000 ml

B: Solución 0.2 M de fosfato de sodio dibásico 53.65 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ó 71.7 gr. de $Na_2HPO_4 + 12H_2O$ en 1000 ml.

X ml de A + y ml de B, diluidos en un total de 200 ml.

X	y	pH
77.5	22.5	6.3
28.0	72.0	7.2

- ❖ Ácido acético 0.1M
- ❖ Ácido acético 0.2M
- ❖ Ácido acético 0.3M
- ❖ Soluciones stock para SDS-PAGE (De acuerdo al sistema de buffer de Laemmli (1970))
 - a) Acrilamida/Bis (30 % T, 2.67 % C)
 - Acrilamida 146.0 g
 - N`N`-BIS-metileno-acrilamida 4.0 g
 - Aforar a 500 ml con agua desionizada, filtrar y almacenar a 4°C en oscuridad.
 - b) 1.5 M Tris-HCL, pH 8.8
 - 54.45 g de Tris base
 - 60 ml de agua destilada
 - Ajustar a pH 8.8 con 1 N de HCL. Aforar a 300 ml con agua desionizada.
 - Mantener a 4°C.

- c) 0.5 M Tris-HCL, pH 6.8
 - 6 g de Tris base
 - 60 ml de agua desionizada
 - Ajustar a pH 6.8 con 1 N de HCL, agua desionizada a 100 ml.

- d) 10 % (p/v) SDS

- e) 10 % de Persulfato de Amonio

- f) Buffer reductor SDS
 - 62.5 mM Tris-HCL , pH 6.8
 - 10% Glicerol
 - 2 % SDS
 - 5 % β -Mercaptoetanol
 - 0.05 % Azul de Bromofenol

- g) 5x Buffer electrodo
 - 25 mM Tris base
 - 192 mM glicina
 - 0.1% SDS, pH 8.3

- h) Fijador
 - Ac acético 10 %
 - Isopropanol 5 %

- l) Desteñidor
 - Acido acético 10 %
 - Metanol 30 %