UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

“Caracterización de toxinas presentes en el veneno de la medusa *Chrysaora sp.* de la Laguna costera Mandinga, Veracruz”

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctora en Biología Experimental

PRESENTA

M. en C. Mayra Pamela Becerra Amezcua

Comité Tutoral:

Director

Dr. Humberto González Márquez

Asesoras:

Dra. Xochitl Guzmán García

Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00080
Matrícula: 2123801269

CARACTERIZACIÓN DE TOXINAS PRESENTES EN EL VENENO DE LA MEDUSA *Chrysaora sp.* DE LA LAGUNA COSTERA MANDINGA, VERACRUZ.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 4 del mes de noviembre del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA ISABEL DEL CARMEN GUERRERO LEGARRETA
DRA. XOCHITL GUZMAN GARCIA
DRA. IRENE DE LOS ANGELES BARRIGA SOSA
DRA. RAQUEL GARCIA BARRIENTOS

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: MAYRA PAMELA BECERRA AMEZCUA

MAYRA PAMELA BECERRA AMEZCUA
ALUMNA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. MARIA ISABEL DEL CARMEN GUERRERO LEGARRETA

VOCAL

DRA. XOCHITL GUZMAN GARCIA

VOCAL

DRA. IRENE DE LOS ANGELES BARRIGA SOSA

SECRETARIA

DRA. RAQUEL GARCIA BARRIENTOS

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020. Número de la beca otorgada por CONACyT: 351898/240459.

La experimentación para la obtención de resultados de esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Expresión Génica del Departamento de Ciencias de la Salud y en el laboratorio de Ecotoxicología del Departamento de Hidrobiología, ambos, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, este trabajo contó con el apoyo financiero del CONACyT mediante el proyecto 105961-M y el proyecto Indicadores de Integridad Ecológica y Salud Ambiental 2014-2018.

También se contó con el apoyo de dos becas otorgadas por la Universidad Autónoma Metropolitana para la participación en Eventos de Difusión y de Investigación en Ciencia y Tecnología, con el que pude presentar resultados de esta tesis en dos congresos Internacionales; VI Congreso de la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental A.C. en la Universidad Autónoma de Baja California del 8-10 de Octubre de 2014 y 18th World Congress of the International Society on Toxinology en Oxford, Inglaterra del 25-30 de septiembre de 2015.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

"Caracterización de toxinas presentes en el veneno de la medusa *Chrysaora sp.* de la Laguna costera Mandinga, Veracruz"

que presentó

M. en C. Mayra Pamela Becerra Amezcua

El día 4 de noviembre del año 2016.

Sinodales:

Dra. Isabel Guerrero Legarreta _____
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
Presidente

Dra. Raquel García Barrientos _____
Universidad Politécnica de Tlaxcala
Secretario

Dra. Xochitl Guzmán García _____
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Vocal

Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa _____
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Vocal

COMITÉ TUTORAL

Director

Dr. Humberto González Márquez

Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Laboratorio de Expresión Génica.

Asesora

Dra. Xochitl Guzmán García

Departamento de Hidrobiología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Laboratorio de Ecotoxicología.

Asesora

Dra. María Isabel del Carmen Guerrero Legarreta

Departamento de Biotecnología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Laboratorio de Macromoléculas.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Humberto González Márquez por todas las enseñanzas y apoyo brindado antes y durante la realización de esta tesis, a mis asesoras, la Dra. Xochitl Guzmán García, quien me ha acompañado en mi formación desde que iba en la licenciatura y que gran parte de lo que soy ahora se lo debo a ella; a la Dra. Isabel Guerrero Legarreta por su apoyo y sugerencias durante todo el proyecto, que para mi fueron muy valiosas por su gran experiencia. A los tres muchas gracias por confiar en mi y en este proyecto que desde hace mucho quería realizar.

A la Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa y a la Dra. Raquel García Barrientos por el tiempo y las correcciones realizadas a esta tesis, cuyas aportaciones fueron muy importantes para mi.

A la Dra. Griselda Ávila Soria de la Universidad de Guadalajara, por la revisión y sugerencias al anteproyecto, las cuales fueron muy valiosas para encaminar el proyecto, por la gran experiencia que tiene sobre medusas; a mi amiga y colega M. en C. Dalia Ponce, estudiante de Doctorado de la Universidad Melbourne, Australia por su apoyo y sugerencias, sin las cuales no hubiera podido avanzar en este proyecto por la complejidad de las proteínas presentes en este tipo de venenos; al M. en C. Alejandro Puente Tapia estudiante de Doctorado del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMyC) de la Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina por brindarme las guías de identificación y apoyo en la taxonomía de las medusas. A la Lic. Mónica Alejandra Rincón Guevara del Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas, CBS, UAM Iztapalapa, por el curso exprés de

preparación de muestras para obtener huella peptídica y por el tiempo brindado para el aprendizaje sobre la obtención de secuencias peptídicas De Novo, muchas gracias por el conocimiento que me brindaste muy importante para mi formación. A la Biol. e HT Irma Hernández Calderas del laboratorio de Ecotoxicología por su asesoría y apoyo en la realización de todas las técnicas histológicas. Al Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo por la ayuda y asesoría en la extracción de ADN y al M. en Biol. Exp. Iván Oseguera López por todo el apoyo y sugerencias en la metodología de biología molecular, ambos del laboratorio de Expresión Génica de la UAM-I.

A la Dra. Reyna Fierro Pastrana y a la Dra. Irma Jiménez Morales del Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I, por el préstamo de la centrífuga refrigerada, el lector de ELISA y el aparato de Isoelectroenfoque para la realización de geles en 2-D.

Al Dr. Gabriel Guillen Solís, Técnico Académico del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Dr. Sergio Huerta Ochoa de la planta piloto de fermentación de medio sólido del Departamento de Biotecnología de la UAM-I por el préstamo del disruptor celular para la obtención de veneno.

A las Doctoras que conformaron el jurado de examen predoctoral, Dra. Patricia Ramírez Romero, Dra. Guadalupe Barrera Escorcia, Dra. Raquel García Barrientos y Dra. Xochitl Guzmán García por sus valiosos comentarios y correcciones al artículo de investigación, muy importantes para su publicación.

A mis alumnos de servicio social y proyecto de investigación de la carrera de hidrobiología, por incorporarse a este proyecto siempre mostrando interés y entusiasmo, al Hidrobiol. Misael Hernández Díaz por su ayuda en la extracción de

sangre de peces, ensayos hemolíticos y en la realización de los frotis sanguíneos, a Tania Gazca Vázquez por su ayuda en la extracción e identificación de ADN y al Hidrobiol. Saúl López Vite por el apoyo en las colectas, procesamiento de muestras, mantenimiento de los organismos en acuarios, toma de fotografías, ensayos con pez cebra y por todo el apoyo brindado en la realización de este proyecto. A la Biol. Esmeralda Bravo Hernández por su apoyo en la estandarización y construcción del acuario para medusas. A los pescadores Gerardo y Hugo por su ayuda en la colecta de las medusas.

A todos los compañeros de los diferentes laboratorios que estuvieron apoyándome durante esta etapa de mi vida, del laboratorio de Expresión Génica a Ingrid, Indra, Olivia, Marcos, Jesica, Paty, Mariana, Iván y Alejandro, del laboratorio de Ecotoxicología Misael, Ángel, Roman, Roberto, Gaby, Kartagena, Ale, Tania, Diana, Ceci, Laura, Claudia, Mario y Carlos; del laboratorio de Macromoléculas Ariadna y Olivia.

Finalmente a mi familia, que cuando el camino se percibía muy complicado de continuar, siempre me impulsaron a seguir con palabras de aliento y su apoyo incondicional; a mis padres por darme la vida, su amor incondicional y porque siempre han confiado en mi y en lo que puedo lograr, a mis hermanos Mara y Said que los amo con todo mi corazón, porque siempre estuvieron ahí cuando necesitaba que alguien me escuchara; a Saúl por ser mi compañero de vida, por aguantarme, apoyarme y escucharme cuando más lo necesitaba, gracias por compartir conmigo una etapa más de nuestras vidas.

DEDICATORIA

Esta tesis quiero dedicarla a la vida y a las medusas que para mi son seres maravillosos.

***Las flores del mar*.**

Danza sobre las olas, vuelo flotante,
ductilidad, perfección, acorde absoluto
con el ritmo de las mareas,
la insondable música
que nace allá en el fondo y es retenida
en el santuario de las caracolas.

La medusa no oculta nada,
más bien despliega
su dicha de estar viva por un instante.
Parece la disponible, la acogedora
que sólo busca la fecundación,
no el placer ni el famoso amor,
para sentir: -Ya cumplí,
ya ha pasado todo.
Puedo morir tranquila en la arena
donde me arrojarán las olas que no perdonan.

Medusa, flor del mar. La comparan
con la que petrifica a quien se atreve a mirarla.
Medusa blanca como la X'Tabay de los mayas
y la Desconocida que sale al paso y acecha
desde el Eclesiastés al pobre deseo.

Flores del mar y el mal las Medusas.
Cuando eres niño te advierten:
Limítate a contemplarlas.
Si las tocas, las espectrales
te dejarán su quemadura,
la marca a fuego, el estigma
de quien codicia lo prohibido.

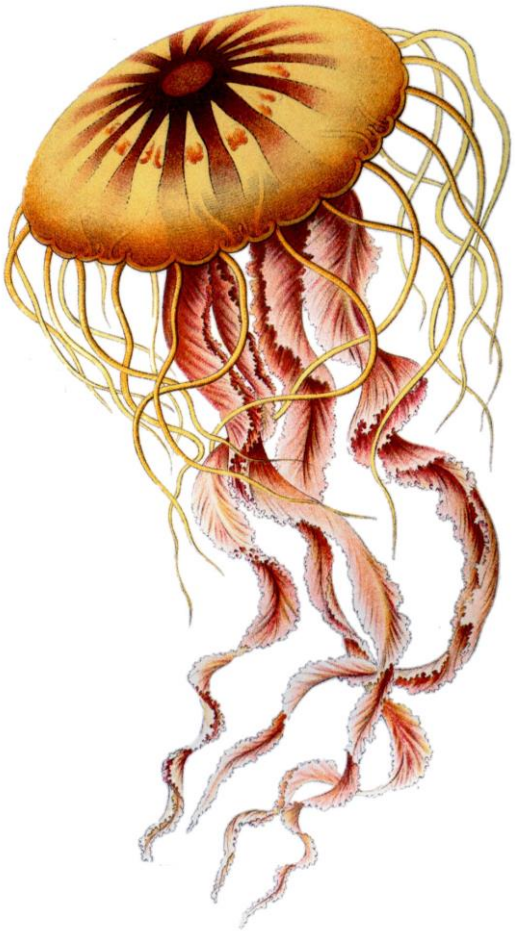
Quizá dijiste en silencio:
-Pretendo asir la marea,
acariciar lo imposible.

Nunca lo harás: las medusas
no son de nadie celestial o terrestre.
Son de la mar que no es ni mujer ni
prójimo.

Son peces de la nada, plantas del viento,
quizá espejismos,
gasas de espuma ponzoñosa

En Veracruz las llaman aguas malas.

José Emilio Pacheco



RESUMEN

El Filo Cnidaria contiene alrededor de 11,000 especies existentes que incluyen a las medusas, cuya característica importante es la presencia de unas células especializadas llamadas cnidocitos; las toxinas obtenidas del veneno de los cnidocitos tienen el potencial de ser una herramienta con la cual estudiar algunos sistemas fisiológicos complejos, además de poder ser utilizadas para la fabricación de nuevos fármacos y el conocimiento de su funcionamiento ayuda a la protección de posteriores envenenamientos en seres humanos; el objetivo principal de este trabajo fue evaluar y caracterizar toxinas del veneno de la medusa *Chrysaora sp.* colectada en la laguna Mandinga, Veracruz, México; para lograr este objetivo fue necesario el registro de parámetros fisicoquímicos, así como el estudio de aspectos biológicos, morfológicos e histológicos obtenidos en campo y en el laboratorio; algunas medusas colectadas fueron trasladadas al laboratorio y colocadas en un acuario para su mantenimiento, y otras fueron procesadas en campo para la extracción de veneno. La especie fue determinada mediante el análisis del gen de la subunidad mitocondrial citocromo c oxidasa III (COIII), y la toxicidad fue evaluada en ensayos *in vivo*, utilizando al pez *Danio rerio* como modelo biológico, y ensayos *in vitro* midiendo la actividad hemolítica y de fosfolipasa A_2. Las proteínas presentes en el veneno se analizaron mediante geles de electroforesis de 1 y 2 dimensiones, la obtención de la huella peptídica y secuenciación de péptidos trípticos mediante secuenciación De Novo. Las condiciones adecuadas para el acuario fueron un volumen mayor a 545 L, una salinidad de 28 ‰ y una temperatura de 30 ºC. La principal afectación observada durante la aclimatación fue la eversión de la campana. La medusa presente en Mandinga es *Chrysaora sp.;* durante la colecta se reconocieron seis patrones de coloración que podrían estar relacionados con la salinidad; el tamaño de la medusa varia de acuerdo con la época de colecta, mostrando un mayor tamaño durante la época de lluvias (8.96±2.4 cm) y una predominancia de hembras con gónadas en estado maduro. El veneno causa sobre el pez *Danio rerio* convulsiones, parálisis, hemorragia en los ojos y disturbios en la circulación, afecta principalmente el tejido branquial, causa hiperemia en la pseudobranquia y en el hígado, y afecta los eritrocitos posiblemente por la actividad de una PLA2 con 596 U/mg del extracto crudo. Los patrones proteicos del veneno son heterogéneos por la habilidad de estas proteínas a agregarse, el rango de pI de estas proteínas se encuentra en un pH de 3-7.5, el análisis por espectrometría de masas mostró que la proteínas que se encuentran en mayor abundancia en este veneno son neurotoxinas de peso molecular de 20 kDa y una metaloproteinasa con una secuencia de dominio conservado de unión a Zn^{+2} que provoca la hemorragia observada en los principales efectos del envenenamiento de esta medusa. Este trabajo contribuyó a la caracterización biológica y de las toxinas de la medusa *Chrysaora sp.,* además de la identificación adecuada de la especie; también se encontró una metaloproteinasa de secuencia conservada no reportada hasta el momento para estas medusas, relacionada estrechamente con la citotoxicidad del veneno, causando hemorragia como otras metaloproteinasas encontradas en venenos de serpientes.

ABSTRACT

The phylum Cnidarian contains about 11,000 species, the jellyfishes has cells specialized (cnidocitos) that contain toxins; this toxins have the potential to be a tool with which to study some complex physiological systems, in addition to being used for the manufacture of new drugs and obtaining knowledge of its operation helps protect subsequent poisonings on humans; the main objective of this study was to evaluate and characterize toxins from the venom of the jellyfish *Chrysaora sp*. found in the lagoon Mandinga, Veracruz, Mexico; to achieve this objective, the study of biological aspects was necessary, such as physic-chemical and morphological parameters, also histological analysis of the jellyfishes collected in the field, the species was determined by analyzing the mitochondrial subunit cytochrome c oxidase III (COIII) molecule and toxicity was evaluated *in vivo* tests, using the *Danio rerio* fish as a biological model, and *in vitro* assays measuring the hemolytic and phospholipase A_2 activities. Proteins present in the venom were analyzed by electrophoresis in one and two dimensions, obtaining the peptide fingerprint and sequencing tryptic peptide by De Novo sequencing.

The conditions suitable for aquarium of this jellyfish, is a volume greater than 545L, a salinity of 28°/ºº and a temperature of 30°C. The main affectation was the bell Evert of the hood observed during acclimatization. Six color patterns were recognized that could be related to salinity, also the size of the jellyfish varies according to the period of collection, the size was a larger (8.96±2.4 cm) during the rainy season and the females having a predominance with gonads mature state, the specie of the jellyfish in this coastal lagoon is *Chrysaora sp*.; its venom causes convulsions, paralysis, bleeding in the eyes and disturbances in circulation on the *Danio rerio* fish, mainly affects the gill tissue, cause hyperemia in pseudobranch and liver, and affects erythrocytes possibly by the activity of PLA2 with 596U/mg of crude extract. Venom protein patterns are heterogeneous by the ability of these proteins to aggregate, the range of pI of these proteins is within a pH range of 3-7.5, mass spectrometry analysis showed that the most abundant proteins in this venom are neurotoxins with a molecular weight of 20 kDa and a metalloproteinase with a conserved sequence binding domain to Zn^{+2}, causing bleeding observed in the main effects of this jellyfish poisoning. This work contributed to biological and toxins characterization of the jellyfish *Chrysaora sp*., in addition to the genetic identity of the species; a metalloproteinase was also found, characterized by a conserved novel sequence not reported to date for this jellyfish and related to cytotoxicity of the venom, causing bleeding as other metalloproteinase that found in snake venoms.

ÍNDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN GENERAL 1-1

1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS CNIDARIOS 1-1

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA CLASE SCYPHOZOA 1-4

1.3 CÉLULAS ESPECIALIZADAS (CNIDOCITOS O CNIDOBLASTOS) 1-6

1.4 VENENO DE CNIDARIOS 1-10

1.5 CITOLISINAS 1-11

1.6 ANTECEDENTES 1-13

1.6.1 Medusas en México 1-13

1.6.2 Medusa Chrysaora sp. 1-14

1.6.3 Estudios de venenos de medusas en México 1-15

2 JUSTIFICACIÓN 2-16

3 HIPÓTESIS 3-16

4 OBJETIVO GENERAL 4-17

5 OBJETIVOS PARTICULARES 5-17

6 CAPÍTULO 1. MANTENIMIENTO DE MEDUSAS PARA INVESTIGACIÓN 6-18

6.1 INTRODUCCIÓN 6-18

6.2 ANTECEDENTES 6-20

6.3 MATERIAL Y MÉTODOS 6-22

6.3.1 Montaje del acuario 6-22

6.3.2 Obtención de medusas para acuario 6-24

6.3.3 Alimentación de medusas 6-25

6.4 RESULTADOS 6-26

6.4.1 Obtención de medusas para acuario *6-26*

6.4.2 Montaje del acuario *6-26*

6.4.3 Alimentación de medusas *6-28*

6.5 DISCUSIÓN 6-28

7 CAPITULO 2. CARACTERIZACIÓN DE LA MEDUSA *CHRYSAORA SP.* 7-32

7.1 INTRODUCCIÓN 7-32

7.2 ANTECEDENTES 7-34

7.3 METODOLOGIA 7-36

7.3.1 Obtención de ejemplares *7-36*

7.3.2 Identificación de la especie por claves dicotómicas *7-36*

7.3.3 Análisis histológico *7-37*

7.3.4 Análisis de cnidoma *7-38*

7.3.5 Análisis de datos *7-38*

7.4 RESULTADOS 7-38

7.4.1 Obtención de ejemplares *7-38*

7.4.2 Identificación de la especie por claves dicotómicas *7-39*

7.4.3 Análisis histológico *7-42*

7.4.4 Análisis de cnidoma *7-44*

7.5 DISCUSIÓN 7-46

8 CAPITULO 3. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE POR BIOLOGÍA MOLECULAR 8-50

8.1 INTRODUCCIÓN 8-50

8.2 ANTECEDENTES 8-51

8.3 METODOLOGÍA 8-52

8.3.1 Obtención de ejemplares *8-52*

8.3.2 Extracción y cuantificación de ADNm *8-52*

8.3.3 Amplificación y secuenciación del gen COIII *8-53*

8.3.4 Determinación de identidad genética *8-55*

8.4 RESULTADOS 8-56

8.4.1 Extracción de ADN *8-56*

8.4.2 Amplificación y secuenciación del gen COIII *8-58*

8.5 DISCUSIÓN 8-67

9 CAPITULO 4. CARACTERIZACIÓN DE TOXINAS DE *CHRYSAORA SP*. 9-71

9.1 INTRODUCCIÓN 9-71

9.2 ANTECEDENTES 9-73

9.2.1 Estudios sobre problemas de salud pública con Cnidarios *9-73*

9.2.2 Investigaciones con extractos de cnidarios *9-74*

9.2.3 Signos y síntomas de la picadura de Chrysaora sp. *9-75*

9.2.4 Estudios de proteínas citolíticas *9-75*

9.2.5 Toxinas de cnidarios con actividad de fosfolipasa A_2 ..... *9-77*

9.3 METODOLOGÍA 9-77

9.3.1 Obtención de ejemplares *9-77*

9.3.2 Extracción de nematocistos *9-78*

9.3.3 Preparación de veneno *9-79*

9.3.4 Cuantificación de Proteínas por el método de Lowry *9-80*

9.3.5 Análisis in vivo de toxinas de Chrysaora sp. *9-80*

9.3.6 Análisis in vitro *9-82*

9.4 RESULTADOS 9-85

9.4.1 Extracción de nematocistos *9-85*

9.4.2 Efectos del extracto crudo de Chrysaora sp. en D. rerio *9-87*

9.4.3 Análisis histopatológico y de morfología de eritrocitos *9-87*

9.4.4 Ensayo hemolítico In vitro *9-90*

9.4.5 Ensayo de actividad de fosfolipasa A_2 (PLA2) *9-92*

9.5 DISCUSIÓN 9-92

10 CAPITULO 5. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL VENENO DE LA MEDUSA *CHRYSAORA SP.* 10-98

10.1 INTRODUCCIÓN 10-98

10.2 ANTECEDENTES 10-99

10.2.1 Estudios del veneno de la medusa Chrysaora sp. *10-99*

10.3 METODOLOGÍA 10-100

10.3.1 Obtención de veneno *10-100*

10.3.2 Fraccionamiento parcial del extracto crudo mediante columnas de intercambio iónico 10-100

10.3.3 Análisis de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) *10-101*

10.3.4 Análisis de proteínas mediante electroforesis de dos dimensiones *10-101*

10.3.5 Tinción de geles de electroforesis *10-102*

10.3.6 Análisis de proteínas mediante espectrometría de masas *10-103*

10.4 RESULTADOS 10-105

10.4.1 Análisis de extracto crudo *10-105*

10.4.2 Fraccionamiento parcial de extracto crudo las proteínas de cnidocistos de la medusa Chrysaora sp. *10-107*

10.4.3 Análisis de proteínas mediante espectrometría de masas *10-110*

10.5 DISCUSIÓN 10-120

11 CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS. 11-126

11.1 CONCLUSIONES 11-126

11.2 PERSPECTIVAS 11-128

12 PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS Y PRODUCCIÓN ACADÉMICA 12-131

13 REFERENCIAS 13-133

14 ANEXO HISTOLOGÍA 14-145

15 ANEXO BIOLOGÍA MOLECULAR 15-148

16 ANEXO PROTEÍNAS 16-156

17 ABREVIATURAS 17-183

18 PUBLICACIÓN 18-185

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CAPAS TISULARES EN CNIDARIOS. 1-1

FIGURA 2. CLASIFICACIÓN DEL PHYLUM CNIDARIA (ÁVILA-SORIA, 2009). 1-3

FIGURA 3. ESQUEMA GENERAL DE UNA ESCIFOMEDUSA. 1-4

FIGURA 4. ESQUEMA DE ROPALIA MODIFICADO DE BRUSCA Y BRUSCA (2003) Y MORANDINI Y MARQUES (2010). 1-5

FIGURA 5. ESTRUCTURAS DEL CNIDOCITO REPRESENTATIVO DEL FILO CNIDARIA (ERIN, 2001). 1-6

FIGURA 6. DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE LOS TIPOS DE CNIDOCISTOS (KASS-SIMON Y SCAPPATICCI, 2002). 1-9

FIGURA 7. ACUARIO TIPO KREISEL. 6-19

FIGURA 8. ACUARIO PARA MEDUSAS. 6-23

FIGURA 9. EFECTOS OBSERVADOS EN EL COMPORTAMIENTO Y MORFOLOGÍA DE LAS MEDUSAS DURANTE LA ESTANDARIZACIÓN. 6-27

FIGURA 10. PUNTOS DE MUESTREO EN LA LAGUNA DE MANDINGA, VERACRUZ. 7-36

FIGURA 11. ESQUEMA DE CORTES PROCESADOS PARA ANÁLISIS HISTOLÓGICO 7-37

FIGURA 12. DIFERENCIAS ENTRE DIÁMETROS DE LA CAMPANA Y PESOS. 7-39

FIGURA 13. ESTRUCTURAS PRINCIPALES DE LA MEDUSA CHRYSAORA SP. 7-40

FIGURA 14. PATRONES DE COLORACIÓN ENCONTRADOS EN LAS COLECTAS. 7-40

FIGURA 15. PREDOMINANCIA DE LOS PATRONES DE COLORACIÓN DE CHRYSAORA ENCONTRADOS POR ÉPOCA 7-41

FIGURA 16. ESTRUCTURAS RECONOCIDAS EN CORTES HISTOLÓGICOS. 7-42

FIGURA 17. GÓNADA MASCULINA Y FEMENINA DE LA MEDUSA CHRYSAORA SP. 7-43

FIGURA 18. CNIDOCITOS EN CÉLULAS EPITELIALES DE LOS TENTÁCULOS DE LA MEDUSA. 7-44

FIGURA 19. CNIDOCITOS PRESENTES EN CHRYSAORA SP. 7-45

FIGURA 20. ADN EXTRAÍDO DE GÓNADAS DE MEDUSA. 8-58

FIGURA 21. PCR CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ADN. 8-58

FIGURA 22. AMPLIFICACIONES CORRESPONDIENTES AL GEN COIII. 8-59

FIGURA 23. AMPLIFICACIÓN A DIFERENTES TEMPERATURAS. 8-60

FIGURA 24. ANÁLISIS FILOGENÉTICO MOLECULAR POR EL MÉTODO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD CON SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE MEDUSAS.....8-64

FIGURA 25. ANÁLISIS FILOGENÉTICO MOLECULAR POR EL MÉTODO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD UTILIZANDO SECUENCIAS DE PROTEÍNAS DE ESCIFOMEDUSAS.....8-66

FIGURA 26. ESQUEMA GENERAL DE PROCESAMIENTO DE MEDUSAS PARA EXTRACCIÓN DE VENENO.....9-78

FIGURA 27. PROCESAMIENTO DE NEMATOCISTOS PARA OBTENCIÓN DE VENENO.....9-79

FIGURA 28. CANTIDAD DE NEMATOCISTOS OBTENIDOS POR COLECTA.....9-86

FIGURA 29. PORCENTAJE DE TIPOS DE NEMATOCISTOS PRESENTES EN LA MEDUSA CHRYSAORA SP.....9-86

FIGURA 30. HEMORRAGIA CAUSADA POR EL VENENO DE LA MEDUSA CHRYSAORA SP. EN EL PEZ CEBRA.....9-87

FIGURA 31. EFECTOS HISTOLÓGICOS CAUSADOS POR EL VENENO DE LA MEDUSA CHRYSAORA SP. EN PEZ DANIO RERIO... 9-89

FIGURA 32. PRINCIPALES EFECTOS OBSERVADOS EN ERITROCITOS DE PECES CEBRA.....9-90

FIGURA 33. DIFERENCIAS ENTRE LA HEMÓLISIS CAUSADA POR EL VENENO DE LA MEDUSA CHRYSAORA SP. EN DIFERENTES GRUPOS SANGUÍNEOS HUMANOS Y EN ERITROCITOS DE PECES.....9-91

FIGURA 34. CURVA DOSIS-RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA EN ERITROCITOS DE PECES.....9-91

FIGURA 35. PERFILES PROTEICOS DEL VENENO DE LA MEDUSA CHRYSAORA SP..... 10-107

FIGURA 36. FRACCIONAMIENTO DLE EXTRACTO CRUDO DE LAS PROTEÍNAS DE CNIDOCISTOS DE LA MEDUSA CHRYSAORA SP. EN COLUMNAS ANIÓNICAS DE BIO-SCALE MINI UNO Q..... 10-108

FIGURA 37. PROTEÍNAS OBTENIDAS DEL FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE CNIDOCISTOS DE LA MEDUSA CHRYSAORA SP POR COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO BIO-SCALE MINI UNO Q..... 10-108

FIGURA 38. FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DEL EXTRACTO CRUDO PROTEÍNAS DE CNIDOCISTOS DE LA MEDUSA CHRYSAORA SP. EN COLUMNAS DE INTERCAMBIO CATIÓNICO DE BIO-SCALE MINI UNO S..... 10-109

FIGURA 39. ELECTROFORESIS DE LAS PROTEÍNAS OBTENIDAS DEL FRACCIONAMIENTO PARCIAL DE LAS PROTEÍNAS DEL EXTRACTO CRUDO PROTEÍNAS DE CNIDOCISTOS DE LA MEDUSA CHRYSAORA SP. EN COLUMNAS DE INTERCAMBIO CATIÓNICO DE BIO-SCALE MINI UNO S..... 10-110

FIGURA 40. HUELLA PEPTÍDICA DE PÉPTIDO DE LA PROTEÍNA DE 100 KDA AISLADA DE CHRYSAORA SP 10-112

FIGURA 41. HUELLA PEPTÍDICA DE LA PROTEÍNA DE 50 KDA CHRYSAORA SP. 10-113

FIGURA 42. HUELLA PEPTÍDICA DE LA PROTEÍNA DE 37 KDA CHRYSAORA SP. 10-114

FIGURA 43. HUELLA PEPTÍDICA DE LA PROTEÍNA DE 20 KDA CHRYSAORA SP 10-115

FIGURA 44. AGRUPAMIENTO DE LAS RELACIONES DE LA METALOPROTEINASA DE CHRYSAORA SP..... 10-119

FIGURA 45. SIMILITUD EN 3-D DE LA SECUENCIA CONSERVADA CON LA CADENA A DE LA ENZIMA 1 HIGH CHORIOLYTIC, ENZIMA ZINC PROTEASA DEL PEZ ORYZIAS LATIPES. 10-119

FIGURA 46. AGRUPAMIENTO DE LAS RELACIONES DE LA METALOPROTEINASA DE CHRYSAORA SP. CON SECUENCIAS DE CNIDARIOS. 10-120

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. POSIBLES CAUSAS Y SOLUCIONES DE LAS OBSERVACIONES DURANTE LA ESTANDARIZACIÓN DEL ACUARIO DE MEDUSAS. 6-30

TABLA 2. SALINIDAD Y TEMPERATURA REGISTRADAS PARA MANDINGA, VERACRUZ 7-39

TABLA 3. CEBADORES UTILIZADOS 8-54

TABLA 4. VOLÚMENES PARA PCR 8-54

TABLA 5. CANTIDADES DE ADN OBTENIDO DE LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS DE LA MEDUSA 8-56

TABLA 6. DATOS MORFOMÉTRICOS DE LAS MEDUSAS UTILIZADAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR. 8-57

TABLA 7. ADN OBTENIDO DE LA GÓNADA. 8-57

TABLA 8. CANTIDADES DE ADN OBTENIDAS EN LA AMPLIFICACIÓN. 8-59

TABLA 9. RESULTADOS DE IDENTIDAD GENÉTICA Y SIMILITUDES CON GENOMAS DE MEDUSAS PARA LA MEDUSA NÚMERO 1. 8-60

TABLA 10. DISTANCIAS GENÉTICAS UTILIZANDO SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS CON EL MODELO DE MÁXIMA PROBABILIDAD PARA MEDUSA 1 8-61

TABLA 11. SIMILITUDES DE SECUENCIA MEDUSA 2 CON GENOMAS DE MEDUSAS 8-61

TABLA 12. DISTANCIAS GENÉTICAS CON EL MODELO DE MÁXIMA PROBABILIDAD PARA MEDUSA 2 8-62

TABLA 13. SIMILITUDES DEL GENOMA DE CHRYSAORA SP. TRADUCIDO CON PROTEÍNAS DE ESCIFOMEDUSAS. 8-63

TABLA 14. DISTANCIAS GENÉTICAS CON EL MODELO JTT DE LA TRADUCCIÓN DEL GEN OBTENIDO A PROTEÍNA 8-65

TABLA 15. BÚSQUEDA DE SIMILITUDES DE MS DE LAS PROTEÍNAS DEL VENENO DE LA MEDUSA CHRYSAORA SP. ANALIZADAS. 10-111

TABLA 16. RESULTADOS DE SIMILITUDES DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS POR SECUENCIACIÓN DE NOVO 10-116

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS CNIDARIOS

El Filo Cnidaria contiene alrededor de 11,000 especies existentes que incluyen medusas, anémonas, corales e hidras. Los cnidarios son metazoas diploblásticos, es decir, que son animales que terminan su desarrollo embrionario en la fase de gástrula y por lo tanto tienen sólo dos hojas embrionarias, ectodermo y endodermo; y en la parte intermedia, la mesoglea derivada principalmente del ectodermo. Presentan elementos musculares y nerviosos diferenciados, una verdadera cavidad digestiva y un esqueleto hidrostático (Figura 1) (Brusca y Brusca, 2003).

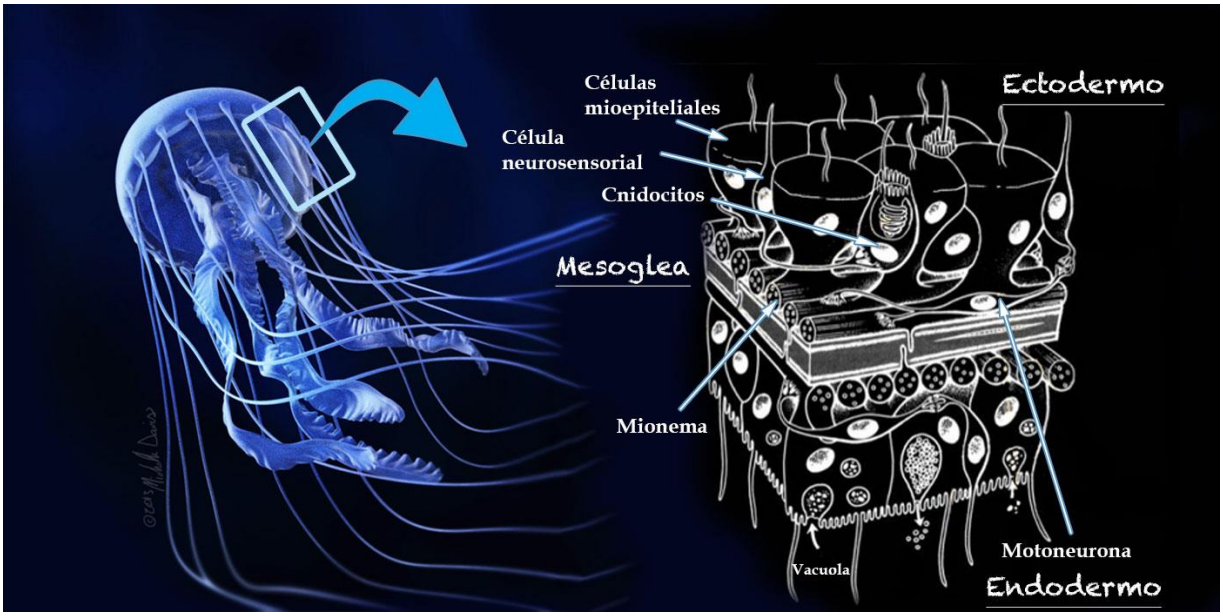


Figura 1. *Capas tisulares en cnidarios.*

Imagen y esquema modificados de Michell (2016), Ruppert et al. (2004) y Ávila-Soria (2009).

Los cnidarios poseen simetría radial, una boca rodeada por tentáculos y la cavidad digestiva tiene forma de saco. No presentan ano. Carecen de sangre, y de órganos respiratorios y excretores. Pueden tener esqueleto calizo y fibras musculares en los epitelios. El sistema nervioso está representado por una red de células nerviosas, que en ningún caso llegan a constituir un sistema nervioso central. En algunos individuos se aprecian manchas oculares o estatocistos (Brusca y Brusca, 2003; Gispert et al., 1999).

Los individuos son de dos tipos, pólipos y medusas: los pólipos son sésiles, presentan un cuerpo tubular con un extremo cerrado (base con la que se adhiere al sustrato) y en el otro se encuentra la boca rodeada de tentáculos. Esta forma de organización es la más primitiva y sencilla, su tamaño varía dependiendo de la especie, sin embargo, suelen ser pequeños. Se distingue también entre dos tipos, hidropólipos y antopólipos, según presenten o no septos que dividan internamente al pólipo en cámaras (Gispert et al., 1999).

Las medusas son móviles y pelágicas, se hayan en mares abiertos y lagos, con frecuencia lejos de la costa (Hickman y Martínez, 2009); poseen un cuerpo gelatinoso en forma de sombrilla (campana) con tentáculos en el borde, y rodeando la boca se localizan los brazos orales; presentan también un saliente de la superficie de la campana llamado manubrio, estructura que conecta los brazos orales y la boca. Las medusas miden de 12 mm a 2 m de diámetro, y sus tentáculos alcanzan los 10 m de longitud (Brusca y Brusca, 2003; Gispert et al., 1999; Hickman y Martínez, 2009). Se diferencian dos tipos de medusas, las hidromedusas, provistas de velo (repliegue cuya función es llenar y vaciar de agua a la medusa con el fin de que ésta

avance), y las escifomedusas, con umbrela aplanada, mayor número de tentáculos y sin velo (Gispert et al., 1999).

La reproducción de los Cnidarios puede ser asexual, por gemación (formación de colonias de tipo polipoide), o sexual, por gametos. En el caso de la reproducción sexual suele presentarse una alternancia de generaciones: una fase fija (pólipo) y una reproducción sexual por gametos en la fase libre (medusa); sin embargo, en muchas especies falta uno u otro tipo de organización. La larva que se origina tras la fecundación, es ciliada y se denomina plánula (Gispert et al., 1999; Hickman y Martínez, 2009).

Los taxónomos están de acuerdo en integrar cuatro clases: Hidrozoos, Escifozoos, Antozoos y Cubozoos (Figura 2); son de origen marino, aunque hay algunos de agua dulce; encontrándose con mayor abundancia en hábitats marinos poco profundos, especialmente lugares con temperaturas cálidas y regiones tropicales (Brusca y Brusca, 2003; Gispert et al., 1999).

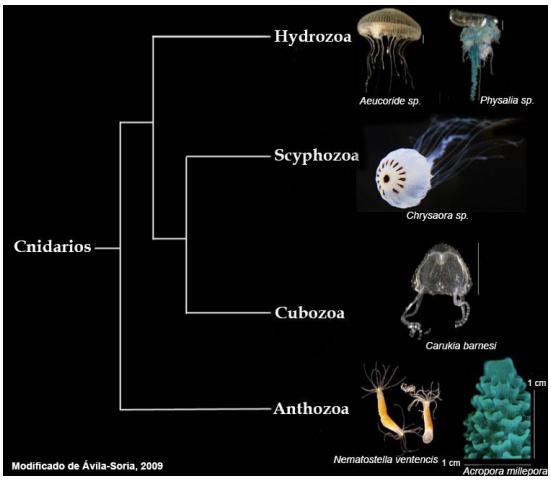


Figura 2. *Clasificación del Phylum Cnidaria (Ávila-Soria, 2009).*

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA CLASE SCYPHOZOA

A esta clase pertenecen las medusas cuyo estado predominante es el de meduzoide; los pólipos individuales (scyphistomae) son pequeños y poco visibles pero a menudo de larga vida, producen medusas por nacimiento asexual (estrobilación); el coelenteron (cavidad gastrovascular) en esta clase está dividido por cuatro mesenterios longitudinales (oral-aboral); las medusas craspedotes (sin velo), tiene típicamente una capa delgada de mesoglea, pigmentación distinta, tentáculos filiformes; órganos sensibles en las muescas, y a veces en los tentáculos; los gametos están presentes en la gastrodermis, presentan cnidocitos en la epidermis y en la gastrodermis; la boca puede o no tener manubrio (Figura 3) (Brusca y Brusca, 2003).

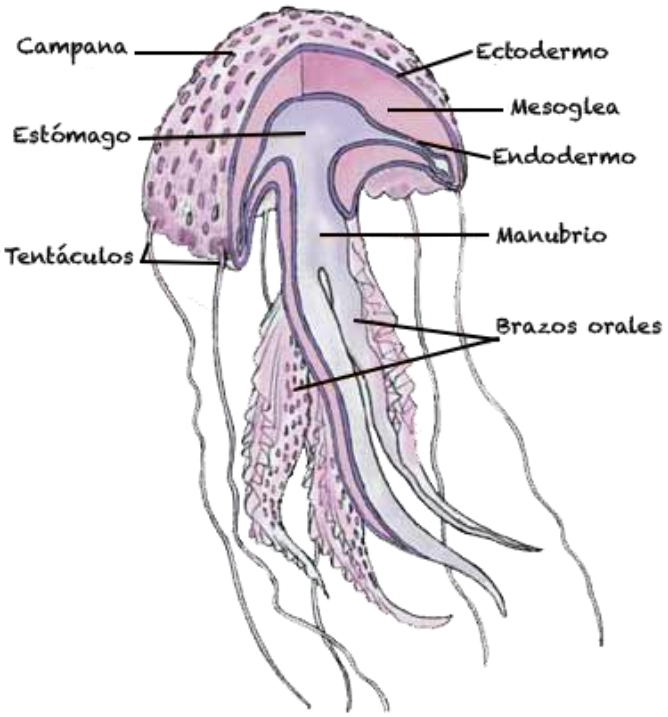


Figura 3. *Esquema general de una escifomedusa.*

Los márgenes de la escifomedusas usualmente presentan ropalias, que son centros sensoriales con una concentración de neuronas epidermales, un par de quimiosensores, estatocistos (órganos sensoriales que les permiten mantener el equilibrio) y un ocelo (célula fotosensible) (Figura 4).

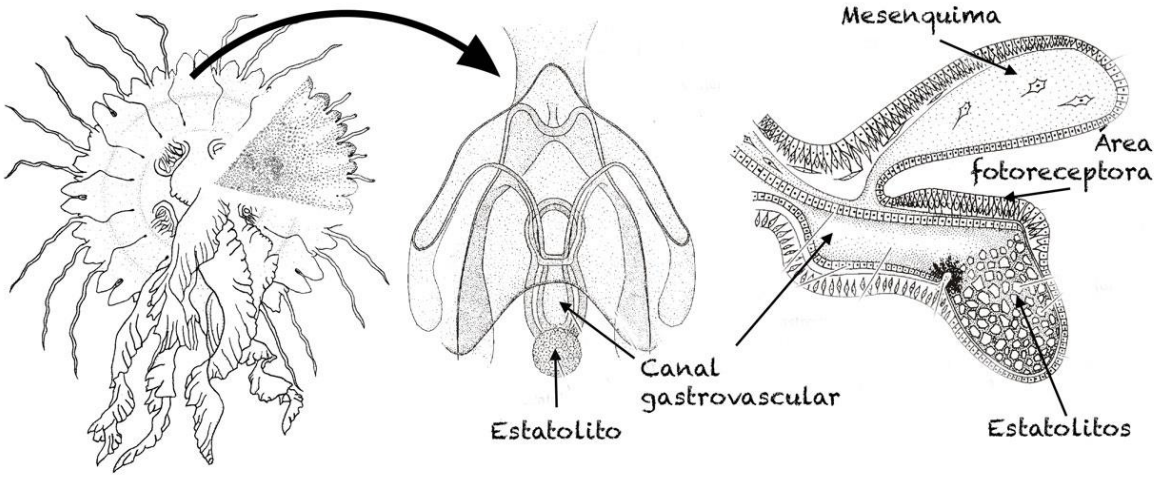


Figura 4. *Esquema de ropalia modificado de Brusca y Brusca (2003) y Morandini y Marques (2010).*

La reproducción en las medusas adultas pertenecientes a la clase escifozoa depende de la especie, pero los gametos siempre se derivan de la gastrodermis, y generalmente se localizan alrededor de la boca; la mayoría de las especies son dioicas, y la fertilización es externa o en bolsas gástricas de la hembra. La gastrulación es mediante invaginación y resulta en una larva llamada plánula, que en algunas especies como *Chrysaora* es incubada y desarrollada por cuidado parental en quistes sobre el cuerpo de la medusa (Brusca y Brusca, 2003).

1.3 CÉLULAS ESPECIALIZADAS (CNIDOCITOS O CNIDOBLASTOS)

Una característica importante es la presencia de unas células exclusivas de este grupo animal, los cnidoblastos o cnidocitos; se producen en invaginaciones de las células ectodérmicas y, en algunas formas, de las células gastrodérmicas, son especialmente abundantes en los tentáculos; el cnidocito dispone de una estructura llamada cnidocisto que consiste en una cápsula, un filamento y un cnidocilo (Figura 5) (Hickman y Martínez, 2009; Kass-Simon y Scappaticci, 2002).

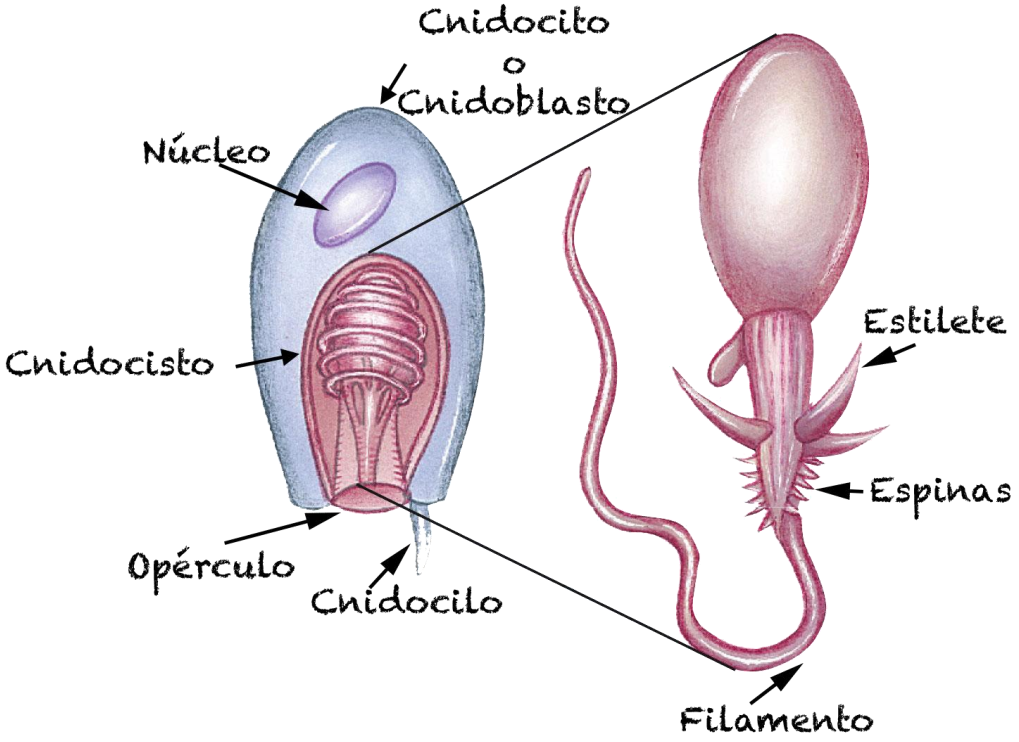
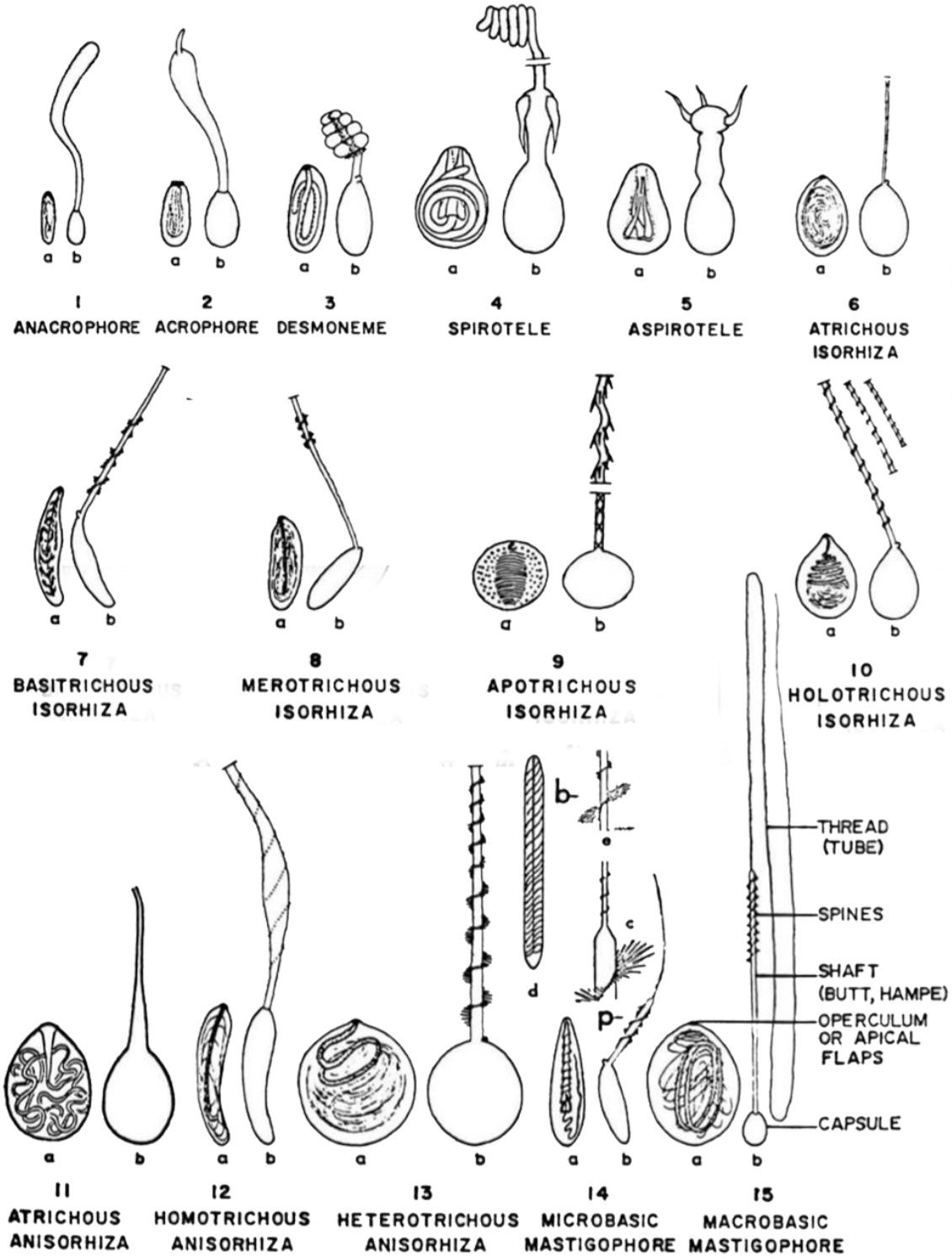


Figura 5. *Estructuras del Cnidocito representativo del filo cnidaria (Erin, 2001).*

La cápsula está compuesta principalmente de dos tipos de proteínas: mini colágenos y glicoproteínas NOWA, de manera que combinan resistencia y flexibilidad (Ozbek et al., 2004); el filamento es una continuación del extremo estrechado de la cápsula, está cubierto por una tapa u opérculo y en el interior del filamento no descargado puede llevar minúsculas púas o espinas; y el cnidocilo es un cilio modificado, que funciona como un gatillo, ya que dispara el cnidocisto con una velocidad de 2 metros por segundo y una aceleración de 40 000 veces la de la gravedad que penetra instantáneamente en la presa (Hickman y Martínez, 2009; Mackie, 2002).

Existen más de 25 tipos diferentes de cnidocistos (Figura 6); los tres más comunes son los nematocistos, los espirocistos y los pticocistos; intervienen en procesos tales como la captura de alimento, mecanismos de defensa y adhesión al sustrato. Cuando un cnidocisto se descarga, es absorbido y reemplazado por otro nuevo. No todos tienen púas o inyectan veneno. Los cnidocistos adhesivos generalmente no se descargan para la captura del alimento, tienen la punta final cerrada, con la que envuelven o se adhieren a la presa y éstas pueden tener o no espinas alrededor del túbulo (Hickman y Martínez, 2009; Kass-Simon y Scappaticci, 2002).

Los cnidocistos están inervados por lo que se encuentran en comunicación con el resto del organismo, pero pueden ser estimulados para descargar individualmente, es decir, son efectores independientes; sin embargo, se ha encontrado que su descarga puede también ser afectada por eventos en células nerviosas y no-nerviosas que los rodean (Mackie, 2002).


1
ANACROPHORE
2
ACROPHORE
3
DESMONEME
4
SPIROTELE
5
ASPIROTELE
6
ATRICHOUS
ISORHIZA
7
BASITRICHOUS
ISORHIZA
8
MEROTRICHOUS
ISORHIZA
9
APOTRICHOUS
ISORHIZA
10
HOLOTRICHOUS
ISORHIZA
THREAD
(TUBE)
SPINES
SHAFT
(BUTT, HAMPE)
OPERCULUM
OR APICAL
FLAPS
CAPSULE
11
ATRICHOUS
ANISORHIZA
12
HOMOTRICHOUS
ANISORHIZA
13
HETEROTRICHOUS
ANISORHIZA
14
MICROBASIC
MASTIGOPHORE
15
MACROBASIC
MASTIGOPHORE

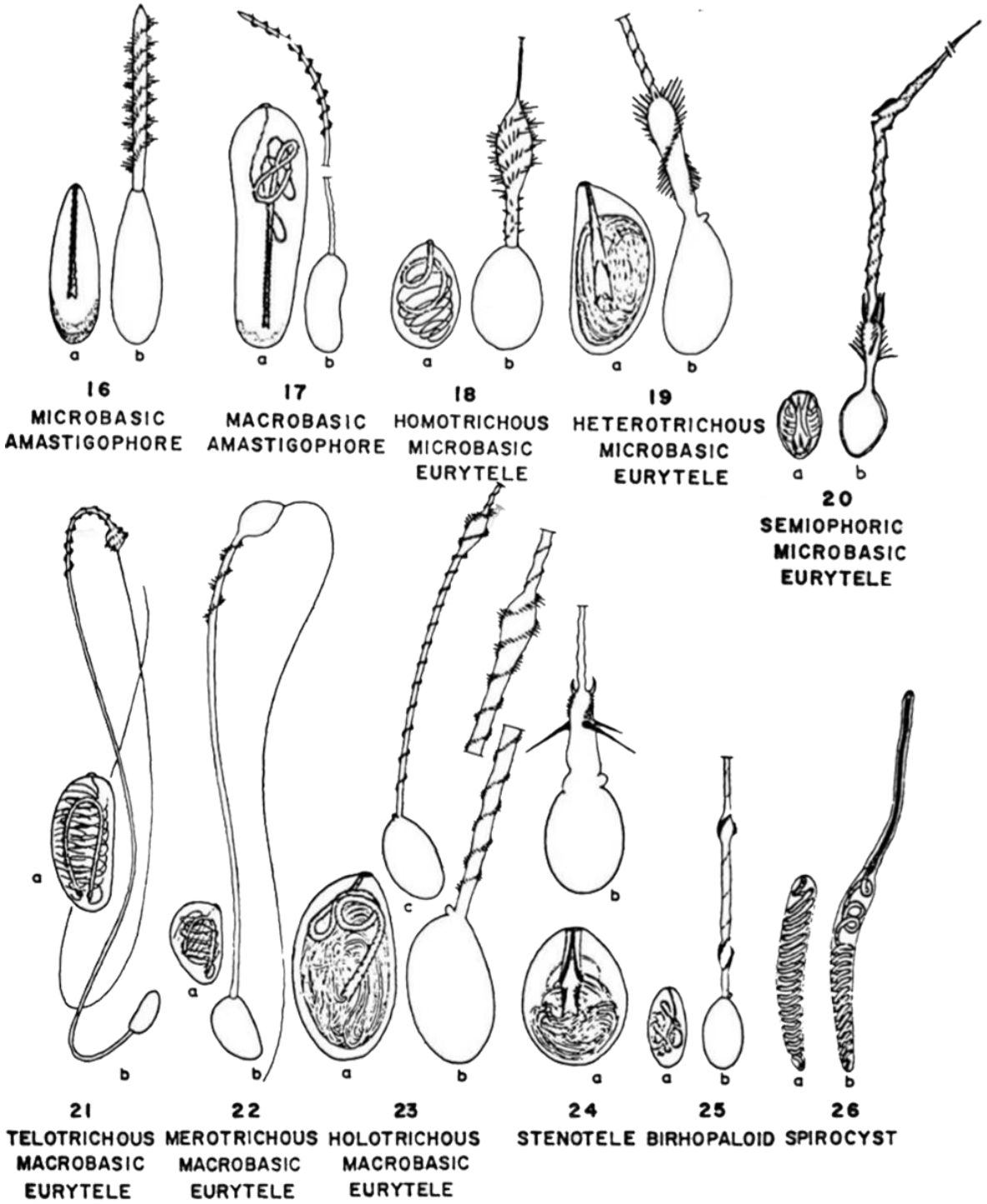


Figura 6. *Diferencias estructurales entre los tipos de cnidocistos (Kass-Simon y Scappaticci, 2002).*

El mecanismo de descarga de un nematocisto se debe a una combinación de fuerzas tensionales generadas durante la formación del nematocisto, y a la asombrosa presión osmótica que hay en el interior del nematocisto (140 atmósferas). Cuando se estimula su descarga, la alta presión osmótica interna hace que el agua se precipite dentro de la cápsula, el opérculo se abre, y el rápido incremento de la presión hidrostática dentro de la cápsula, empuja con gran fuerza al filamento de éste haciendo que se evagine hacia el exterior. En el extremo evertido del filamento, las púas se extienden hacia fuera permitiendo así penetrar a la presa e inyectar el veneno (Hickman y Martínez, 2009). Además de existir mecanismos de presión osmótica interna y energía mecánica almacenada en las paredes de los nematocistos, hay ácidos en el interior, lo que podría significar que diferencias de pH entre la matriz de la célula y el citoplasma podrían conducir la descarga de los túbulos al incrementar la presión de la matriz contra la pared del nematocisto (Berking y Herrmann, 2006).

1.4 VENENO DE CNIDARIOS

Los venenos provenientes de los nematocistos de cnidarios son, en su mayoría, péptidos y polipéptidos que producen reacciones tóxicas como dermonecrosis, hemólisis y reacciones inmunológicas que pueden causar anafilaxis. Entre los efectos fisiológicos representativos de las toxinas de cnidarios están el incremento de la permeabilidad de la membrana de iones de calcio y sodio lo cual inicia una cascada de reacciones que alteran la homeostasis celular; además de que estas anormalidades pueden ocurrir en las células de varios órganos simultáneamente. *In*

vitro, los venenos de cnidarios son hidrofóbicos, termolábiles, tienen la habilidad de agregarse o degradarse y el rango de potencia entre venenos de diferentes especies de cnidarios es muy amplio (Williamson et al., 1996); en humanos pueden producir desde una leve comezón hasta un gran dolor, e incluso la muerte, sin embargo, sólo una pequeña fracción (menos del 1%) de las especies de cnidarios conocidos se han implicado en picaduras pero es probable que casi todos los miembros del filo sean tóxicos por lo menos para algunos animales (Barceloux, 2008; Hickman y Martínez, 2009; Turk y Kem, 2009).

1.5 CITOLISINAS

Algunos organismos sintetizan péptidos o proteínas que inducen la permeabilidad de la membrana como estrategia para causar en la célula necrosis o muerte celular por apoptosis (Anderluh et al., 2011). Las citolisinas, son polipéptidos de cadena simple, solubles en agua que poseen la capacidad de insertarse y acomodarse dentro de las membranas celulares espontáneamente; son un grupo de toxinas producidas por bacterias, plantas y animales; que dañan las membranas celulares a través de la degradación enzimática de los lípidos (por la acción de fosfolipasas y esfingomielinasas) o la integridad de la membrana formando poros transmembranales (por toxinas formadoras de poros, TFP). El mecanismo general de acción de las TFPs puede ser separado en distintos pasos: 1) secreción de proteínas solubles que se unen a la membrana mediante el reconocimiento específico de lípidos o dominios lipídicos, 2) oligomerización en la membrana, y 3) la proyección de segmentos específicos anfifílicos polipeptídicos, a través de la bicapa lipídica para

hacer un poro transmembranal hidrófilo (Anderluh y Lakey, 2008).

Las citolisinas de cnidarios son importantes por su utilidad para entender una gran variedad de procesos que ocurren en la membrana celular, como las interacciones a nivel de membrana entre lípidos y proteínas. Dada la posibilidad de conducirlas hacia tejidos específicos y su capacidad lítica, son estudiadas como prometedores agentes anti-tumorales; además, se han reportado en ellas propiedades anticoagulantes y cardiovasculares (Anderluh y Maƒçek, 2002).

Una de las citolisinas más importantes encontradas en los venenos de cnidarios son las que tienen actividad de fosfolipasa A_2, identificada en todas las clases del phylum cnidaria (Fernandez et al., 2011), tiene funciones tóxicas para la captura y digestión de la presa, así como de defensa (Nevalainen et al., 2004). Los estudios estructurales sobre la fosfolipasa A_2 han tenido un interés especial debido en parte a que la enzima es activa en la interfase membrana-agua y actúa como una sonda de la estructura de la membrana. Una fosfolipasa A_2 es capaz de causar hemólisis o ruptura de los hematíes, por medio de la liberación de una cadena de ácido graso de la fosfatidilcolina que produce 1-acilglicerofosforilcolina, a la que se le domina con mayor frecuencia lisolecitina, la cual es un excelente detergente que solubiliza las membranas y por lo tanto causa lisis celular, siendo los eritrocitos más sensibles a esta acción (Mathews et al., 2002).

Las fosfolipasas A_2 (PLA2) son enzimas que pertenecen a una familia de proteínas, clasificadas en 12 grupos; que comparten función enzimática y estructural similares. De acuerdo con las características bioquímicas y de origen celular, las fosfolipasas

se clasifican como: citosólica (cPLA2), secretora (sPLA2) e intracelular (iPLA2). Las PLA2 de venenos son de tipo secretoras, son tóxicas e inducen efectos farmacológicos mediados probablemente por receptores de membrana. Las isoenzimas de las PLA2 tienen un proceso evolutivo acelerado, debido al rápido cambio en los exones, más no en los intrones ni en las regiones reguladoras de los genes, estas modificaciones difieren a las que ocurren en los genes de isoenzimas ordinarias. Los productos de la hidrólisis de fosfolípidos, obtenidos a partir de fospolipasas A_2 además desempeñan un rol biológico estratégico como mediadores lipídicos en diversos procesos patológicos, la supresión de su producción podría ayudar a diseñar terapias alternativas. Los metabolitos del ácido araquidónico son de particular interés por constituir una gran familia de eicosanoides, implicados en numerosas actividades fisiológicas y la producción excesiva está relacionada con la fisiopatología de numerosas enfermedades como inflamación, alergia, daño cerebral, cáncer, metástasis, desórdenes cardiovasculares, etc. (Jiménez et al., 2005).

1.6 Antecedentes

1.6.1 Medusas en México

A nivel mundial existen más de 2000 especies diferentes de medusas; en México se han documentado 289 especies de medusas desde 1897, de las cuales 176 habitan el Océano Pacífico, 167 en el Golfo de México y 161 en el Caribe mexicano (Gasca y Loman-Ramos, 2014). Dentro de las especies más comunes y abundantes en el Pacífico y el Atlántico mexicanos se encuentran: *Bougainvillia muscus*, *Lizzia alvarinoae*, *Cytaeis tetrastyla*, *Stomotoca pterophylla*, *Euphysora gracilis*, *Eucheilota*

duodecimalis, *Clytia discoida*, *C. folleata*, *Liriope tetraphylla*, *Solmundella bitentaculata*, *Cunina octonaria*, *Aglaura hemistoma*, *Rhopalonema velatum*, *Nausithöe punctata*, *Pelagia noctiluca* y *Aurelia aurita* (Loman-Ramos et al., 2007; Segura-Puertas et al., 2010; Segura-Puertas et al., 2003). Aún siguen siendo escasos los estudios sobre medusas en México; y es de esperarse que surjan más especies conforme aumenten los estudios (Gasca y Loman-Ramos, 2014); por su parte en Mandinga, Veracruz únicamente se ha reportado la presencia de la medusa de *Phyllorhiza punctata* (Ocaña-Luna et al., 2010), sin embargo es reconocido por pescadores de la zona la presencia también de *Aurelia aurita*, *Stomolophus meleagris* y *Chrysaora sp.* siendo esta última la que causa más picaduras dolorosas en pescadores.

1.6.2 Medusa *Chrysaora sp.*

La medusa *Chrysaora* es una de las especies más reconocidas y ecológicamente importantes de las costas de Estados Unidos y el Golfo de México, formando agregaciones en los estuarios del Atlántico; esta medusa también es conocida por su gran presión predadora sobre el zooplancton e ictioplancton (Purcell, 1992, 1997; Purcell y Cowan Jr, 1995), causando pérdidas económicas por el impacto negativo sobre la pesca (Purcell, 1997), así como la afectación en el turismo por sus picaduras (Burnett y Calton, 1977; Burnett et al., 1968).

Para esta especie no existen reportes sobre su distribución en México; sin embargo, un estudio realizado por Graham (2001), reporta la presencia de esta medusa en el norte del Golfo de México y preferencia por salinidades típicas de los estuarios;

Chrysaora sp. es una escifomedusa que tiene dos formas morfológicas durante su ciclo de vida; la primera, en forma de pólipo, que puede reproducirse de manera asexual y encontrarse de manera solitaria o formando colonias. Posteriormente, el pólipo estrobila en una éfira que tiene varios estadios diferentes caracterizados por cambios morfológicos (Calder, 1972), ambos estadios de vida se han encontrado típicamente en salinidades entre 5 y 20 ‰ (Purcell et al., 1999).

1.6.3 Estudios de venenos de medusas en México

Se han estudiado algunos aspectos toxinológicos de medusas presentes en nuestro país; Segura-Puertas et al. (2002) realizó el análisis la actividad hemolítica, tóxica y neurotóxica de *Aurelia aurita*. De la medusa *Cassiopea xamachana* se ha estudiado la actividad electrofisiológica y hemolítica (Torres et al., 2001), además de su posible efecto antitumoral en el sistema nervioso central en tumores inducidos por N-Etil-N-Nitroso urea en ratas (Orduña-Novoa et al., 2003). De *Carybdea marsupialis* se describió una neurotoxina de 120 kDa y tres citolisinas de 220, 139 y 36 kDa con efecto hemolítico (Sánchez-Rodríguez et al., 2006); y del extracto crudo de *Pelagia noctiluca* se analizó la actividad neurotóxica en cangrejos *Ocypode quadrata*, además de la actividad hemolítica en eritrocitos humanos tipo A^+ (Sánchez-Rodríguez y Lucio-Martínez, 2011). El estudio más reciente sobre venenos de medusas en México es el realizado por Ponce et al. (2013), en donde se analiza la actividad neurotóxica del veneno de *Aurelia aurita* en receptores nicotínicos de acetilcolina y en cangrejos *Ocypode quadrata*. De la medusa *Chrysaora sp.* no existen reportes en nuestro país sobre su toxicidad o compuestos de esta medusa

2 JUSTIFICACIÓN

En México existen alrededor de 289 especies de medusas, pero existen pocos estudios sobre su distribución y la toxicidad de sus venenos. La medusa *Chrysaora sp.* provoca grandes proliferaciones que generan una problemática en las pesquerías de la zona por su gran presión predadora sobre el zooplancton e ictioplancton, además de causar irritaciones en la piel de las personas que tienen contacto con sus tentáculos; también en el veneno de esta medusa se ha detectado actividad hemolítica, antitumoral y antioxidante, por lo que sus toxinas podrían tener potencial biotecnológico, lo que justifica esta investigación en donde se pretende contribuir a la caracterización de toxinas presentes en el veneno de *Chrysaora sp.* colectada en nuestro país, dando prioridad a la caracterización del efecto hemolítico y de fosfolipasa A_2 relacionado con los principales efectos sistémicos. Los resultados de este trabajo también contribuyen al entendimiento de la interacción de este tipo de toxinas con la membrana celular y evaluar su posible uso como agentes antitumorales.

3 HIPÓTESIS

La medusa *Chrysaora sp.* colectada en Mandinga, Veracruz contiene en sus toxinas principalmente citolisinas que causan hemólisis relacionada con la presencia de fosfolipasas de tipo A_2, causando los principales efectos sistémicos de su picadura.

4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar y caracterizar las toxinas del veneno de la medusa *Chrysaora sp.* colectada en la laguna Mandinga, Veracruz, México.

5 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las temporadas de proliferaciones de las medusas *Chrysaora sp.* en la laguna Mandinga, Veracruz para realizar la colecta de organismos.
- Determinar el método de colecta para la obtención de muestras para su análisis *in vivo*, posmorten y obtención de veneno.
- Identificar la especie mediante un análisis morfológico, histológico y molecular.
- Caracterizar los efectos *in vivo* de las toxinas en peces cebra *Danio rerio*.
- Caracterizar *in vitro* el efecto hemolítico de las toxinas en eritrocitos humanos y de peces, así como analizar la actividad de fosfolipasa A_2.
- Analizar e identificar las proteínas presentes en el veneno mediante técnicas de espectrometría de masas tipo MALDI-TOF.

6 Capítulo 1. MANTENIMIENTO DE MEDUSAS PARA INVESTIGACIÓN

6.1 INTRODUCCIÓN

Los acuarios más importantes del mundo, como el Monterrey Bay Aquarium, y de nuestro país, como el acuario de Xcaret y el acuario de Veracruz; en los últimos años han construido grandes instalaciones para exponer medusas y reproducirlas en cautiverio; lo que ha generado información importante sobre la biología de algunas medusas (Lecompte et al., 2010).

El acuario de las medusas debe cumplir unas normas muy estrictas para poder mantenerlas en cautiverio. Las medusas son muy delicadas y, por lo tanto, es necesario que permanezcan suspendidas en el agua. Si golpean contra las paredes del acuario, podrían salir heridas. Por lo tanto, el flujo de agua en el acuario tiene que mantener la medusa suspendida, sin perturbar su equilibrio. Además, un acuario de medusas no debe tener los ángulos agudos, ya que podrían quedar atrapadas en ellos y resultar lastimadas (Lecompte et al., 2010; Pierce, 2005; Raskoff et al., 2003; Widmer, 2008).

En un acuario de medusas es necesario replicar las condiciones de vida de la medusa tanto como sea posible. Para ello, el acuario requiere de un sistema de filtración similar al de un acuario de coral. Un acuario de medusas requiere filtración biológica, mecánica y química para garantizar las condiciones de agua. Además, se necesita un espumador de proteínas para eliminar todas las proteínas en exceso del agua, ya que puede ser peligroso para el bienestar de las medusas (Widmer, 2008).

Las medusas son también muy sensibles a la luz. Mientras que algunas especies requieren semi-oscuridad para sobrevivir, algunas otras especies dependen de la luz intensa para realizar la fotosíntesis de su alimento. La iluminación depende de la especie que se desea conservar (Pierce, 2005; Raskoff et al., 2003; Widmer, 2008).

El acuario puede ser cilíndrico o un tanque tipo Kreisel de estilo circular que está diseñado específicamente para medusas y otros animales acuáticos delicados. Estos tanques no tienen esquinas, lo que reduce el riesgo de lesiones a los animales. El diseño básico consiste en una sección cilíndrica entre dos hojas de acrílico que permite una circulación característica del agua que no daña a los organismos. El agua entra y sale del acuario a través de pantallas en la parte superior del tanque, permitiendo que el flujo sea circular y lento, esto mantiene a las medusas en el centro del tanque sin dañar sus cuerpos frágiles. Estos tanques reciben el nombre de kreisel, por la palabra alemana para carrusel (Lecompte et al., 2010; Pierce, 2005; Raskoff et al., 2003; Widmer, 2008).

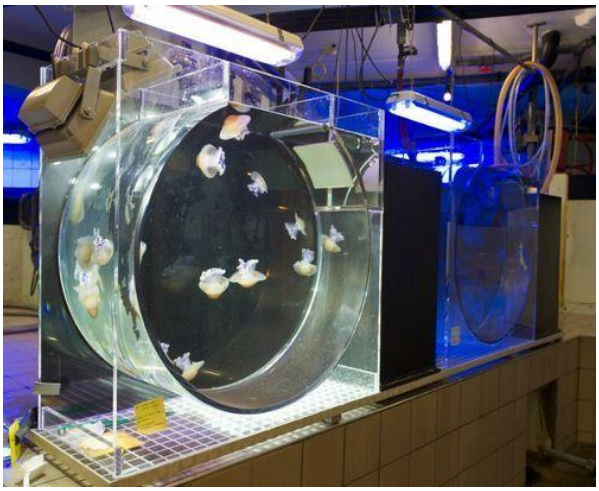


Figura 7. *Acuario tipo Kreisel.*

6.2 ANTECEDENTES

Anteriormente, la crianza de medusas había sido restringida a acuarios que se encontraban cerca de la costa y en donde las medusas podrían ser reemplazadas regularmente con especímenes recién capturados del mar; hasta 1932 el acuario de Berlín fue el primero en obtener la estrobilación de medusas luna (*Aurelia aurita*), sin embargo, toda la información técnica sobre la crianza de medusas fue extraviada cuando el encargado perdió su puesto en este acuario, se necesitaron 30 años más (1968) para volver a obtener la estrobilación en cautiverio de esta especie por Yoshitaka Abe, quién fue el primero en montar una exhibición de éfiras de medusas permanentemente en el acuario Ueno en Tokio. A finales de 1970, el acuario de Dusseldorf utiliza por primera vez y exitosamente el tanque tipo Kreisel para la cría de medusas luna. Los tanques tipo Kreisel se desarrollaron, originalmente, por biólogos marinos de la universidad alemana de Kiel para la observación de organismos planctónicos marinos pequeños (Greve, 1968).

A finales de 1980, el acuario de la bahía de Monterey desarrolló un nuevo diseño Kreisel para mantener medusas y en 2002, abrió su exposición “Living Art” que incluía piezas de arte y medusas vivas, esta exposición fue el inicio de la cría de medusas para su exhibición en varios acuarios del mundo (Lange et al., 2016). Uno de los acuarios que adoptó estas exhibiciones de medusas y mantiene una cooperación con la Universidad de Yamagata es el acuario Kamo, ambas partes están interesadas en la investigación genética de las subespecies de la medusa Palau (*Mastigias papua*) (Murakami, 2016).

Por su lado, el acuario de la bahía de Monterey es uno de los pocos acuarios interesados en investigar, principalmente el Dr. Chad Widmer, quién tiene colaboración con el Instituto de investigación del acuario de la bahía de Monterey (Monterey Bay Aquarium Research Institute), laboratorios Moss Landing Marine y otras instituciones, también han publicado seis artículos en donde se describe ciclos de vida de medusas, incluyendo dos nuevas especies de zonas profundas del cañón de Monterey, así como numerosos artículos acerca de medusas, calamares y gusanos marinos (Knowles, 2016); el Dr. Widmer también escribió el primer libro acerca de información para ayudar a científicos, acuaristas y profesionales para mantener de una mejor manera a diferentes especies de medusas llamado “How to keep Jellyfish in Aquariums” (Widmer, 2008).

Aunque el montaje de acuarios para exhibición ha aumentado en los últimos años, son pocos los acuarios montados para la investigación, ya que el modo de captura de los organismos, el comportamiento individual, el diseño del acuario, la alimentación y la calidad del agua contribuyen al éxito del estudio y se necesita investigación adicional para poder lograr este propósito. Uno de los pocos estudios es el de la medusa *Chironex fleckeri* (Cnidaria:Cubozoa), realizado por Hamner et al. (1995) en donde se analizan la natación, alimentación, circulación y visión.

Klein et al. (2016) estudió a la medusa *Cassiopea sp.* manteniendo en acuarios de 1 L de volumen, a una sola medusa (diámetro de campana 14-26 mm), conservando la saturación de oxígeno y circulación de agua, el objetivo principal de este estudió fue medir los efectos de la contaminación sobre la zooxantela de la medusa,

encontrando que, cuando se reduce la salinidad, se incrementa la susceptibilidad a la exposición de herbicidas durante la temporada de lluvias.

Uno de los estudios más recientes es una colaboración entre la Universidad de Yamagata y el acuario Kamo para el estudio de la evolución de las medusas que habitan en lagunas marinas de Palau, basando su investigación en las medusas *Aurelia sp.,* manteniéndolas en el acuario desde la plánula, hasta que ocurre la metamorfosis a pólipo, seguida de la estrobilación y la metamorfosis a éfira para finalmente tener al organismo adulto, durante estas etapas se observaron las características morfológicas a detalle (Hanzawa et al., 2016).

A pesar de que el montaje de un acuario de medusas no es sencillo, es necesario debido al problema que implica encontrar medusas en campo, la razón principal es que aunque se conocen los problemas que implica la proliferación masiva de medusas, aún existe poca información sobre las causas y ubicación de estas proliferaciones; existen varias teorías en donde se indica que puede ser debido al aumento de salinidad, pesca descontrolada, contaminación, temperatura del agua, dirección de las corrientes; sin embargo, aunque sabemos que en México ocurren proliferaciones de medusas, no existen reportes de los lugares y especies que causan este problema.

6.3 MATERIAL Y MÉTODOS

6.3.1 Montaje del acuario

Se construyó una pecera de 80x70x30 cm tipo kreisel de vidrio de 6 mm de grosor, en el interior se colocó una división para caída de agua al filtro con cristal de 6 mm

de grosor y en el interior se formó un decágono con placas de acrílico de 6 mm de grosor pegadas con silicón (Figura 8).

Figura 8. *Acuario para medusas.*

Se montó un filtro de 80x50x30 cm de vidrio de 6 mm de grosor, con cuatro compartimientos para las diferentes fases del filtro construidas con vidrio de 3 mm de grosor. En el primer compartimento se colocaron bioesferas que funcionan como filtro biológico, en el segundo, rocas con 400 veces más superficie que también funciona

como filtro biológico, además de tener varios tipos de iones, que funcionan como filtro químico; en este mismo compartimento se encuentra también carbón activado como filtro químico; en el tercero se encuentra nylon con poliéster que sirve como filtro mecánico; finalmente en el último compartimento se encuentra una bomba sumergible con eje de cerámica, marca Aquasub modelo 4221, con capacidad de 3500 L/H, puede alcanzar una altura de 3.8 m, y un voltaje de 110/120 V; y un espumador marca Biopro, modelo SK-75, que funciona con una bomba de aspiración-Venturi acoplada a una aguja-rueda impulsora que corta el aire en una espuma densa que es inyectada en la cámara de reacción, lo que permite la creación de micro burbujas que atrapan proteínas y materia orgánica, disolviendo la proteína y otros contaminante que son removidos en una copa colectora, para esto tiene una cabeza de poder que completa 800 L/H.

Después del montaje, se agregó al acuario, agua destilada con sal marina marca Instant Ocean, inicialmente con una salinidad aproximada de 30 ‰ y posteriormente se modificó según los resultados. Al agua se le agregaron 80 ml de bacteria líquida para acuarios marca Biopro NitroBacter para la generación del filtro biológico.

Durante los primeros días la salinidad y la temperatura se medían diariamente y cada tercer día el amonio presente en el agua.

6.3.2 Obtención de medusas para acuario

Las medusas se colectaron en la laguna de Mandinga, Veracruz durante el mes de marzo, se detectaron visualmente en la superficie del agua y se capturaron mediante redes de mango largo con un haz de malla de 0.05 mm. Para su transporte, se

colocaron en bolsas de plástico con un volumen de agua salina en una relación >3:1 con respecto al volumen de las medusas, se removió todo el aire y las bolsas selladas se colocaron en un baño de agua dentro de una hielera. La temperatura se bajó gradualmente hasta tener una temperatura final de 5 ºC menos de la temperatura inicial con hielo según lo reportado por Pierce (2009).

6.3.3 Alimentación de medusas

Para la alimentación se eclosionaron quistes de artemia marca Azul, hidratándolos con agua corriente y aireación durante 1 hr, posteriormente a 500 ml de agua potable se le agregaron 100 ml de hipoclorito de sodio mezclando bien, se colocaron los quistes hidratados y filtrados con papel filtro y se pusieron en aireación aproximadamente 5 min (hasta que el color cambie de café a naranja), posteriormente se agrega de 2 a 3 lentejas de hidróxido de potasio y se lavan con agua corriente hasta que el olor a cloro desaparezca. Los quistes lavados y filtrados se colocan en una pecera con agua marina con aireación constante durante 24 hr.

También se eclosionaron en 1.5 L de agua destilada con 57 g de sal marina Instant Ocean y se agregaron 0.5 g de quiste, se mantuvieron en aireación e iluminación constante con un foco de 60 w durante 24 hr. También se alimentaron con artemias adultas y copépodos rojos.

6.4 RESULTADOS

6.4.1 Obtención de medusas para acuario

La época de colecta más propicia para la medusa *Chrysaora sp.* en la Laguna de Mandinga es a inicios del mes de marzo y en el mes de julio, que se encuentran con mayor abundancia; si la colecta se realiza en el mes de marzo el acuario debe tener una salinidad de 28 ‰ y en el mes de julio de 14 ‰ (Datos plasmados en anexos del laboratorio de histología). El transporte de medusas vivas fue el adecuado, las medusas llegan en buen estado, sin embargo, la aclimatación para pasar al acuario lleva aproximadamente 24 hr porque se tardan en recuperar.

6.4.2 Montaje del acuario

Durante la estandarización de parámetros fisicoquímicos se pudieron observar cambios en el comportamiento y morfología de las medusas que se pueden apreciar en la Figura 9, como son: medusas que se comen a otras medusas colocándose una sobre otra y digiriendo principalmente la campana de la otra medusa, transparentación de la campana, campana evertida, campana aplanada por largo tiempo y poco pulsante, medusa con tentáculos retraídos, contracción de todo el cuerpo, el margen de la campana irregular o roto, burbujas atrapadas en la campana de la medusa y orificios en la campana.

A pesar de que las condiciones del acuario fueron adecuadas después de la estandarización, las medusas aclimatadas en el acuario no sobrevivieron, ya que para este volumen de agua (aprox. 168 L) únicamente pueden habitar máximo tres

medusas por la extensión de sus tentáculos, importante para su alimentación; si se colocan más medusas comienzan alimentarse de otras medusas.

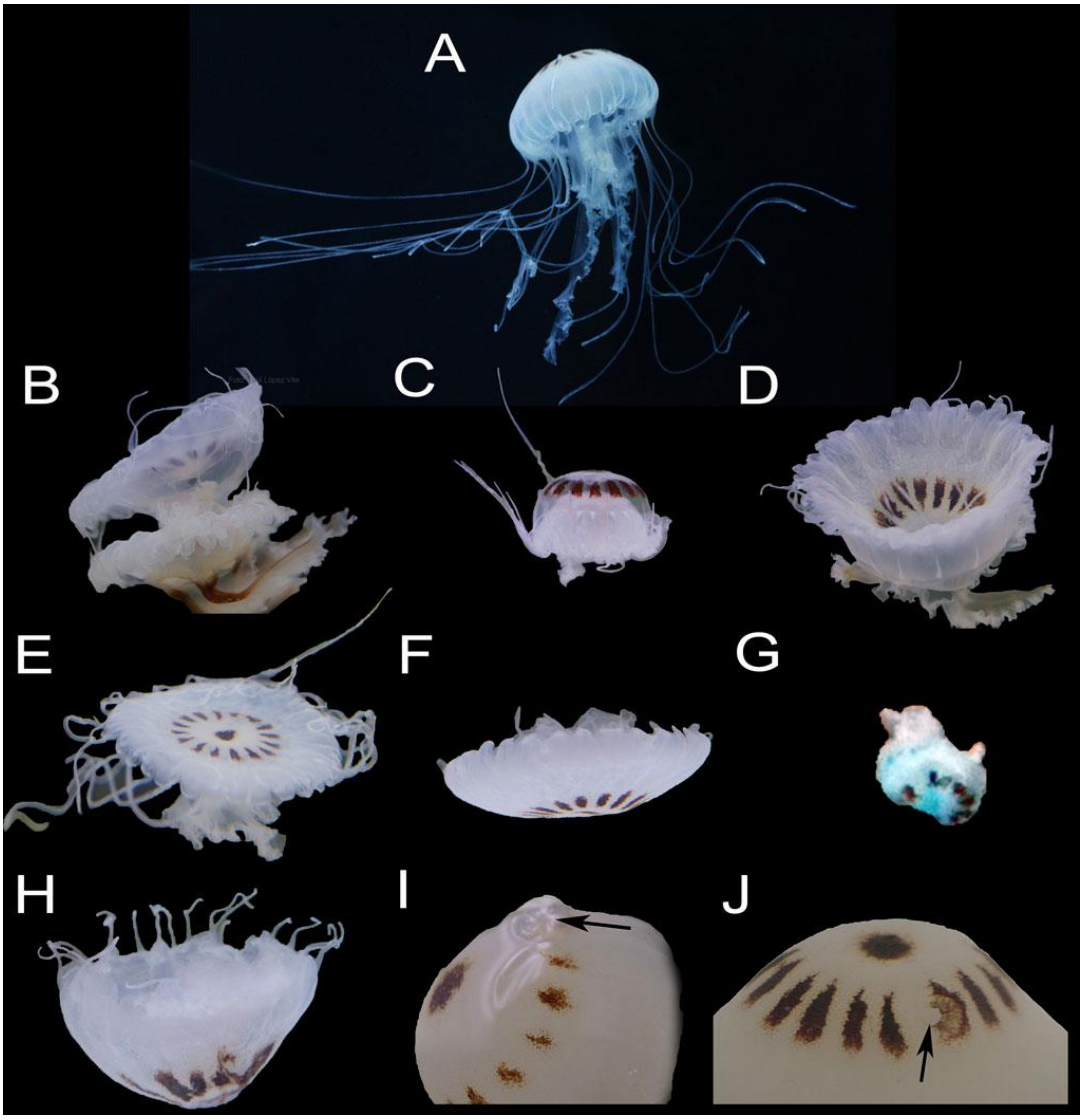


Figura 9. *Efectos observados en el comportamiento y morfología de las medusas durante la estandarización.*

A) Medusa aclimatada durante un mes, B) Medusas que se alimentan de otras medusas, C) Transparentación de la campana, D) Eversión de la campana, E) Campana aplanada, F) Tentáculos retraídos, G) Contracción de todo el cuerpo de la medusa, H) Margen de la campana irregular, I) Burbujas en la campana y J) Orificios de la campana. Fotografías de Saúl López Vite.

6.4.3 Alimentación de medusas

Este tipo de medusas tiene preferencia por alimentarse con artemias adultas, debido a que detectan sus vibraciones y pueden cazarlas con sus tentáculos, de otra manera hay que colocar el alimento muy cerca de la cavidad oral para que puedan alimentarse. Las medusas deben alimentarse 3 a 5 veces al día, de lo contrario las medusas reducen su tamaño hasta morir (efecto observado en la Figura 9 G).

En el caso de la eclosión de artemias, el método usando hipoclorito de sodio no fue eficiente debido a que no hubo eclosión, mientras que con el método utilizando una lámpara se obtuvo una eclosión de un 70% aprox.

6.5 DISCUSIÓN

A pesar de la importancia de la incorporación de acuarios de medusas para la investigación, pudimos observar en este estudio que el montaje es muy complicado sobre todo para medusas de este género. Widmer (2008) indica que *Chrysaora fuscescens, Chrysaora achlyos, Chrysaora melanaster* y *Chrysaora colorata* necesitan tres tipos diferentes de acuarios para su cultivo, dependiendo de la fase en la que se encuentren, para la fase I que representa a medusas mayores de 10 mm de diámetro de la campana es necesario una placa de cultivo con agitador de aprox. 20 cm de diámetro, para la fase II (medusas de 10-45 mm de diámetro) se necesita un acuario tipo pseudokreisel con flujo de 30 cm de diámetro y finalmente para las medusas en fase III (mayores a 45 mm de diámetro) es necesario un acuario tipo kreisel de 152 cm de diámetro. El acuario construido en este estudio es un poco menos de la mitad del recomendado (70 cm de diámetro), lo que pudo ser el principal

problema en el mantenimiento de esta especie de medusas, causando que las medusas se comieran unas a otras, permitiendo únicamente tener a tres medusas durante un mes en etapa adulta.

La construcción del acuario para medusas fue la adecuada para la fase adulta, se trata de una pecera tipo Kreisel, elaborada con un decágono de acrílico como indican varios autores (Lecompte et al., 2010; Pierce, 2005; Raskoff et al., 2003; Widmer, 2008). La principal dificultad en la construcción de acuarios para medusas destinados a la investigación es disminuir los costos de construcción, ya que la mayoría de este tipo de acuarios se construyen en su totalidad en acrílico, como es el caso de los grandes acuarios de exhibición, lo que aumenta los costos en un 50%; en este caso se integró dos materiales: el vidrio y el acrílico lo que abarato costos sin embargo había filtraciones hacia zonas donde no se podía realizar limpieza.

La observación más evidente durante la estandarización de parámetros fisicoquímicos fue la eversión de la campana y con base en lo reportado por Widmer (2008), esto se debe a un shock de temperatura o de salinidad; estos dos parámetros fueron los más difíciles de estandarizar, ya que de acuerdo con lo observado en campo, este tipo de medusas toleran baja salinidad (14 ‰) en época de lluvias lo que dificultó madurar el agua con la salinidad adecuada, ya que se desconocía estos valores por la falta de información. Por otro lado, los efectos observados durante la estandarización se explican de la misma manera por el mismo autor (Tabla 1) y brinda posibles soluciones que no pudimos implementar porque las medusas murieron antes de poder ajustar cada problema.

Tabla 1.Posibles causas y soluciones de las observaciones durante la estandarización del acuario de medusas.

Signo o Síntoma	Posible causa	Posible solución
Transparentación de la campana.	Mucho flujo, por lo que la sección de la campana es propensa a blanquearse.	Reajustar flujo de agua.
Eversión de la campana.	Shock de temperatura o salinidad, dieta inadecuada.	Checar y ajustar temperatura y salinidad.
Campana aplanada.	Flujo de agua inadecuado que no permite ejercitarse a la medusa.	Reajustar las corrientes del tanque, cambiar dieta y checar calidad de agua.
Tentáculos retraídos.	Salinidad inapropiada.	Salinidad puede estar baja (más común), checarla y ajustarla
Contracción de todo el cuerpo de la medusa.	Dieta inadecuada, calidad del agua inadecuada, temperatura fuera de los rangos, o alimentación con copépodos rojos.	Limpiar tanque, cambiar dieta, checar temperatura.
Margen de la campana irregular o roto.	Dieta inadecuada, en algunas ocasiones las medusas se atacan entre si o pueden golpearse con el tanque.	Cambiar dieta, limpiar el tanque para asegurarse que no se estén golpeando y esterilizarlo.
Burbujas en la campana.	Causado por burbujas de aire.	No poner sistema de aireación en contacto con las medusas.
Orificios en la campana.	Dieta inadecuada, calidad del agua inadecuada.	Cambiar dieta, reajustar variables de tanque o esterilizar el tanque con cloro.

Con lo que respecta a la alimentación es necesario alimentar esta especie con una cantidad importante de artemias que fue el alimento de preferencia, por su gran presión predadora (Purcell, 1992; Purcell y Cowan Jr, 1995); Widmer (2008) reporta que a medusas adultas de este género es necesario alimentarlas con 500-1000 ml de artemias (*Artemia nauplii*) diariamente sin embargo en este estudio observamos que hay que alimentarlas con menos cantidad de artemias pero más veces al día (aprox. 5 veces) porque si se coloca mucho alimento la mayoría se va al filtro y se pierde pero si no se alimenta constantemente las medusas van reduciendo su tamaño hasta que mueren.

7 CAPITULO 2. CARACTERIZACIÓN DE LA MEDUSA *CHRYSAORA SP.*

7.1 INTRODUCCIÓN

El género *Chrysaora* presenta varias especies cuya sistemática y taxonomía aún continúan siendo confusas y es de fundamental importancia para conocer la biodiversidad de los ambientes marinos y mixhoalinos (Morandini y Marques, 2010), además de que los cnidomas han sido utilizados como herramientas taxonómicas por muchos años y estos se relacionan con la toxicidad de su veneno (Gershwin, 2006).

Las medusas por otro lado, tienen un grado de organización tisular basado en células organizadas que actúan como unidades funcionales, aunque muchas células tienen cierta independencia; la ectodermis costa de diferentes tipos celulares (Brusca y Brusca, 2003):

a) **Células mioepiteliales o epiteliomusculares**. Este tipo de células son cilíndricas con dos partes definidas; una epitelial apical y otra basal contráctil que posee filamentos de actinia y miosina, por lo que tienen doble función, revestimiento y contráctil. La contracción es llevada a cabo por el agua que penetra en la cavidad gastrovascular funcionando como un esqueleto hidrostático.

b) **Células intersticiales o basales.** Están en la base de las células mioepiteliales, tienen un núcleo muy grande, son ricas en ribosomas y son totipotentes, por lo que pueden originar cualquier otro tipo celular.

c) **Cnidocitos.** Se localizan por toda la epidermis, invaginados en las células mioepiteliales, especialmente en los tentáculos. Tienen un cilio rígido (cnidocilio), que es un receptor de estímulos; en la parte basal tiene prolongaciones que se contactan con otras células o con el sistema nervioso (cnidopodios); en el interior tiene una gran vacuola (cnido o nematocisto) dentro del cual se encuentra el filamento urticante que al dispararse causa la picadura de estos organismos.

d) **Células nerviosas.** Se sitúan abajo de la epidermis y forman un plexo. Pueden ser no polarizadas (protoneuronas) y polarizadas (bipolares o multipolates).

e) **Células sensoriales.** Son alargadas y tienen el extremo apical redondeado o provisto de un cilio sensible, la zona basal provista de una o varias prolongaciones se conecta con las neuronas.

f) **Células glandulares.** Son antisépticas, lubricantes, sujeción, protección, enredo de presas, producción de burbujas de gas, etc.

La mesoglea es una matriz gelatinosa con abundante colágeno y precolágeno, es anhista (sin células), a la que pueden migrar amebocitos procedentes del ectodermo y ayuda a sostener el cuerpo y la gastrodermis por otro lado consta de:

a) **Células nutritivomusculares o mioepiteliales gastrales.** Son semejantes a las mioepiteliales, pero son más altas y estrechas, tienen la parte contráctil menos desarrollada en la base, no tienen prolongaciones y con 2 a 5 flagelos del lado apical que usan para mover los líquidos de la cavidad gastrovascular. Este tipo de células se caracteriza por la doble posibilidad de pinocitocis y fagocitosis, por

lo que recogen los materiales parcialmente digeridos y los pasan al resto de las células. La parte contráctil es perpendicular a la de la ectodermis.

b) **Células secretoras.** Son de tipo apocrino, algunas flageladas, en cuyo interior producen una gran variedad de sustancias como mucopolisacáridos, mucoproteínas, enzimas digestivas, etc., que lubrican y digieren los alimentos.

7.2 ANTECEDENTES

El género *Chrysaora* fue descrito por primera vez en 1810 por Péron y Lesueur (1810), es el género que contiene mayor número de especies dentro de la subclase Discomedusae y aunque es bastante común en todos los océanos algunas especies asignadas se encuentran mal descritas, mientras que otras han sido registradas con poca frecuencia, además hay registros en áreas geográficas restringidas pero ningún estudio comparativo para evaluar su estado taxonómico (Morandini y Marques, 2010).

La primera visión global de la diversidad de las especies *Chrysaora* fue elaborada por Mayer (1910) en donde incluye 15 especies; los estudios más recientes fueron realizados por Gershwin y Collins (2002) en donde se reportan 10 especies y por Morandini y Marques (2010) quienes realizan una revisión del género, así como una descripción taxonómica de muestras de todo el mundo, proporcionan observaciones complementarias de varios acuarios públicos sobre ciclos de vida, además de la realización de una clave para la identificación de especies.

Estudios sobre la caracterización histológica de medusas son escasos, uno de ellos es el elaborado por Satterlie et al. (2005) en donde se analiza la musculatura de la

cubomedusa *Tripedalia cystophora* usando inmunohistoquímica con un anticuerpo de anti-actina; Shaposhnikova et al. (2005) estudiaron los patrones de las células mesogleales, encontrando que están involucradas en la formación de fibras no colágenas de la mesoglea llamadas fibras elásticas. El análisis realizado por Kotova et al. (2015) observa la mesogleina, una proteína que constituye uno de los principales componentes de la mesoglea por varios procedimientos y uno de ellos es la inmunocitoquímica para comprobar la diferenciación entre especies de *Aurelia aurita*.

Aunque se sabe que el análisis del cnidoma es una importante herramienta para la taxonomía y el estudio de la toxicidad en medusas existen también pocos antecedentes sobre este tema; Gershwin (2006) elaboró un catálogo para ser usado por taxónomos, y toxinólogos para identificar especies y picaduras de especies de cubomedusas; McClounan y Seymour (2012) por otro lado analizaron la relación entre el veneno y la ontogenia del cnidoma, observando que la toxicidad de la medusa *Chironex fleckeri* está relacionada con la alimentación; las medusas grandes que se alimentan principalmente de vertebrados presentan una gran proporción de mastigoforos en su cnidoma comparado con medusas más jóvenes y pequeñas que se alimentan de invertebrados.

Por lo que el objetivo principal de este capítulo es caracterizar a la medusa *Chrysaora sp.* de la laguna de Mandinga, analizando su taxonomía, histología y su cnidoma.

7.3 METODOLOGIA

7.3.1 Obtención de ejemplares

Las medusas se colectaron en la laguna de Mandinga, Veracruz (Figura 10) durante el mes de marzo (n=96) y julio del 2014 (n=57) y abril del 2015 (n=46), se detectaron visualmente en la superficie del agua y se capturaron mediante redes de mango largo con un haz de malla de 0.05 mm; las medusas fueron fijadas en formol 4% para su análisis morfológico e histológico (n=10).

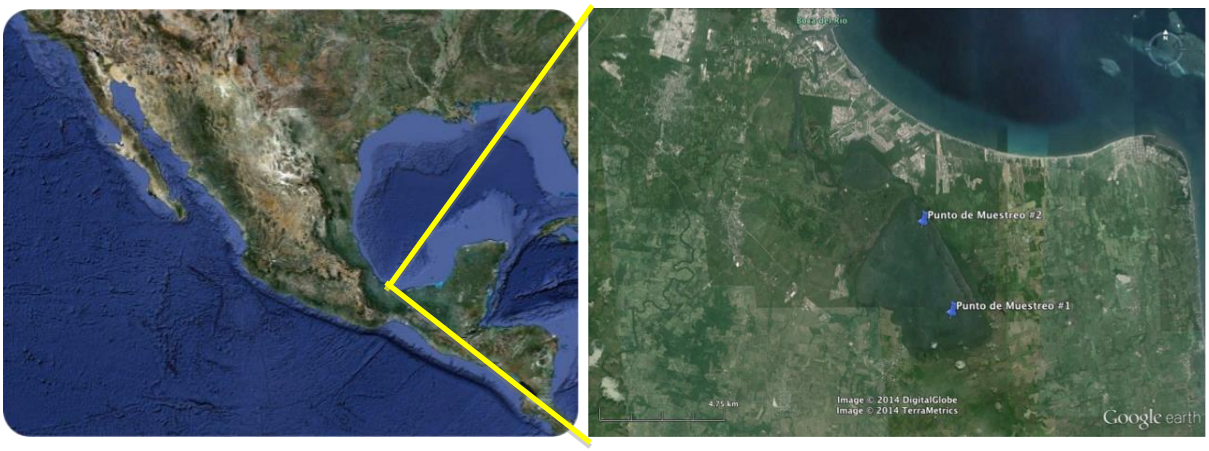


Figura 10. *Puntos de muestreo en la laguna de Mandinga, Veracruz.*

7.3.2 Identificación de la especie por claves dicotómicas

Se realizó un análisis taxonómico de las medusas, tomando aspectos como, longitud de la campana, peso, número de tentáculos, cantidad de ropalio, lóbulos marginales, canales gastrovasculares, tamaño y tipo de nematocistos, patrón de coloración y ubicación basando los resultados en lo reportado por Gershwin y Collins (2002) y Morandini y Marques (2010).

7.3.3 Análisis histológico

Se realizaron dos pequeños cortes en una medusa del género *Chrysaora sp.* (Figura 11) para estandarizar la técnica histológica en esta especie. Se realizaron cortes longitudinales y transversales en micrótomo de 5 μm de grosor, los tiempos de deshidratación y de tinción con hematoxilina-eosina se observan en el anexo de histología. Una vez estandarizada la técnica se realizó un análisis de las estructuras principales de la medusa *Chrysaora sp.* y se observó en qué estructuras se presentan en mayor cantidad los cnidocitos.

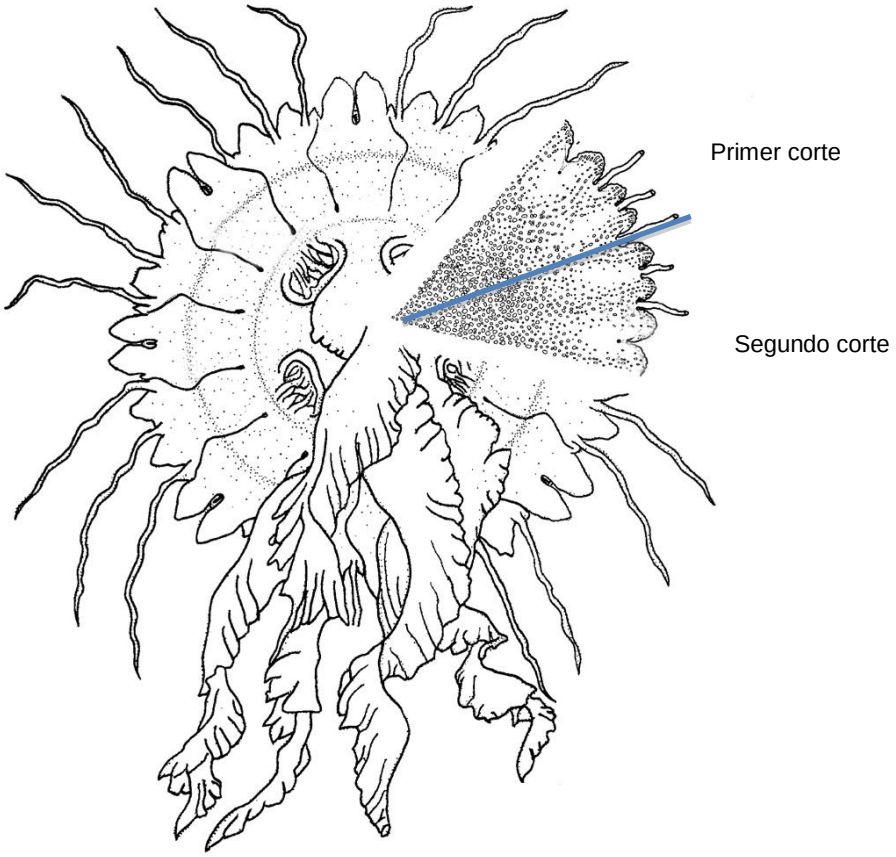


Figura 11. *Esquema de cortes procesados para análisis histológico.*

7.3.4 Análisis de cnidoma

Se identificaron los cnidocitos característicos de esta especie y se realizaron mediciones de los mismos (n=15) con ayuda del programa Image J64, tomando como referencia reglillas micrométricas.

7.3.5 Análisis de datos

Los datos morfométricos de diámetro y peso se evaluaron mediante pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov, prueba aceptada para datos mayores de 50, aceptando la normalidad cuando el valor de significancia sea >0.5, al dar resultados no normales se realiza una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis de muestras independientes) para observar si hay diferencias significativas. Los datos morfométricos son representados con el promedio$\pm$desviación estándar. El programa estadístico utilizado en todos los datos es IBM SPSS Statistics versión 20.

7.4 RESULTADOS

7.4.1 Obtención de ejemplares

La salinidad y temperatura correspondientes a los muestreos se muestran en la tabla 4, la normalidad para los datos de diámetro y peso es rechazada según la prueba estadística, y de acuerdo con la prueba no paramétrica hay diferencias significativas entre las épocas de muestreo, las medusas colectadas en el mes de julio son mayores en cuanto tamaño y peso, datos que se observan en la gráfica comparativa de los diámetros de la campana y pesos (Figura 12).

Tabla 2. Salinidad y Temperatura registradas para Mandinga, Veracruz.

	Marzo 2014	**Julio 2014**	**Abril 2015**
Salinidad (‰)	26	14	24
Temperatura (ºC)	28	30	29

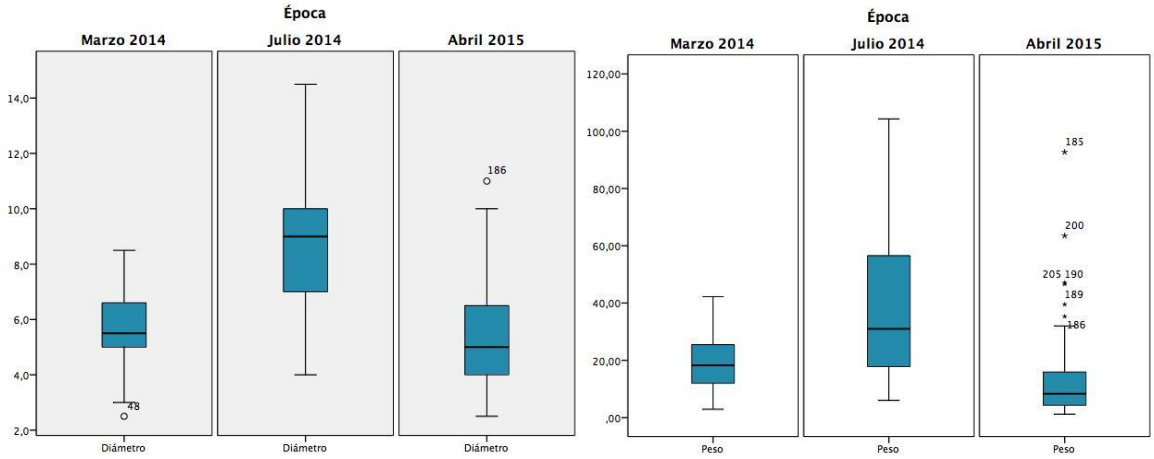


Figura 12. *Diferencias entre diámetros de la campana y pesos.*

7.4.2 Identificación de la especie por claves dicotómicas

Las medusas colectadas tienen un diámetro de la campana de 5.73±1.20 cm en época de secas, con mayor frecuencia de 5 cm y de 8.96±2.44 cm en época de lluvias con mayor frecuencia medusas de 7 cm, con lóbulos marginales redondeados (3-8 por octante, con mayor frecuencia 4), 8 ropalios, de 24-34 tentáculos (3-5 por octante) con una longitud de 7.69±6.11 cm con mayor frecuencia de 12 cm, brazos orales con una longitud de 8.64±8.09 cm con mayor frecuencia de 5 cm, septos sin

adelgazamiento hacia el centro (Figura 13), con diámetro subgenital de 1/5 el diámetro total de la campana, y 6 patrones de coloración diferentes (Figura 14).

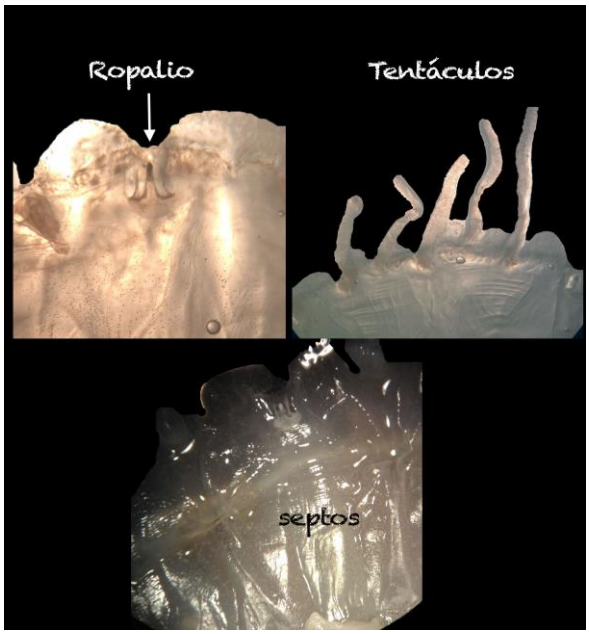


Figura 13. *Estructuras principales de la medusa Chrysaora sp.*

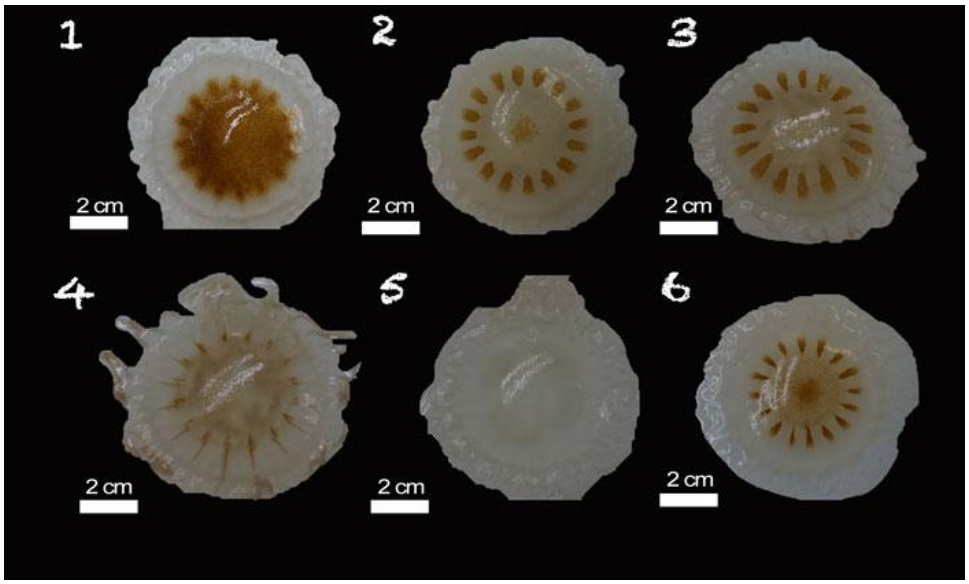


Figura 14. *Patrones de coloración encontrados en las colectas.*

Con lo que respecta al patrón de coloración, la predominancia cambia de acuerdo con la época de colecta, en época de secas el patrón predominante es el número 2 con un 39% y en la época de lluvias es el número 5 con un 43%; los que se presentan en menor proporción son el patrón 1 y 6 en ambas épocas (Figura 15).

De acuerdo con las claves reportadas por Morandini y Marques (2010), las medusas en este estudio corresponden a la especie a *Chrysaora kynthia;* y según la clave taxonómica reportada por Gershwin y Collins (2002), las medusas de este muestreo tienen un patrón de coloración rojizo, marrón o marrón claro, con o sin rayas visibles, campana típicamente con menos de 30 cm de diámetro, más o menos aplanada, los brazos orales tienden a ser solitarios que se extienden desde el manubrio, tienen más de 24 tentáculos, el color de fondo es claro con manchas oscuras, a menudo con motas o rayas, ubicación en el Atlántico occidental que puede ser el este de Estados Unidos y Golfo de México, por lo cual la especie corresponde a *Chrysaora quinquecirrha.*

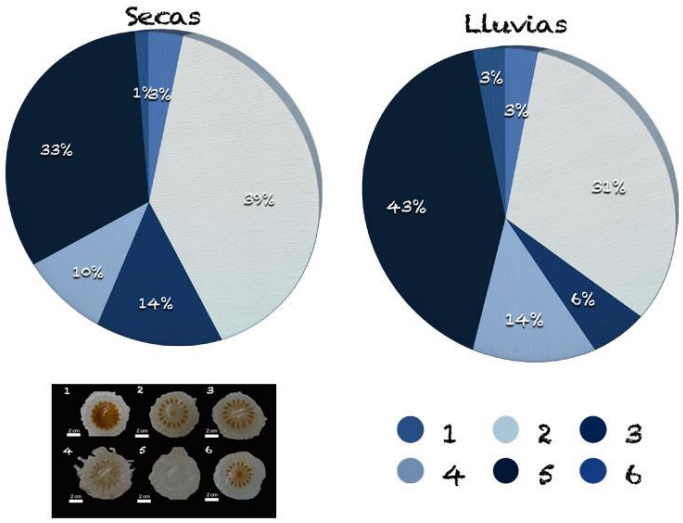


Figura 15. *Predominancia de los patrones de coloración de Chrysaora encontrados por época.*

7.4.3 Análisis histológico

Durante el análisis histológico de la medusa *Chrysaora sp.* pudimos observar que no hubo diferencias en las técnicas de fijación, así como, el uso de anestesia durante la realización de dicha fijación; en todas ellas se puede realizar la infiltración con parafina fácilmente, además de que no se presentaron problemas durante el corte y la tinción de los diferentes tejidos. Con ayuda de este análisis se encontró que los tipos celulares que presentan estos organismos son células epiteliomusculares cilíndricas, células intersticiales, cnidocitos, células sensoriales, mesoglea, células secretoras, y además de que en los cortes de los brazos orales se pudo observar algunas mórulas resultado de la fecundación del cigoto (Figura 16 D).

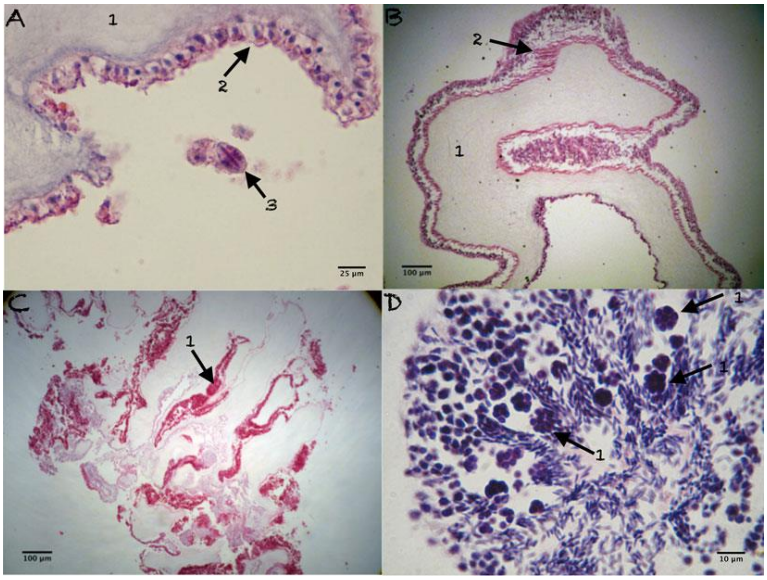


Figura 16. *Estructuras reconocidas en cortes histológicos.*

A) Mesoglea (1) conformada por tejido conjuntivo, células epiteliomusculares cilíndricas (2), y Cnidocitos característicos del phylum (3). B) células sensoriales (1).C) Células secretoras (1). D) Mórulas de huevos fecundados (1) en brazos orales.

En las medusas analizadas (n=12) colectadas en el mes de julio de 2015 también se pudo observar la gónada masculina y la femenina con un 83% hembras y un 17% machos. Todas las gónadas se encontraron en su estado maduro, las hembras en su mayoría presentaron una acumulación de gránulos de yema y en algunos casos se pudo observar el nucléolo en los oocitos (Figura 17B); en los machos espermatocitos y espermatozoides están presentes (Figura 17A).

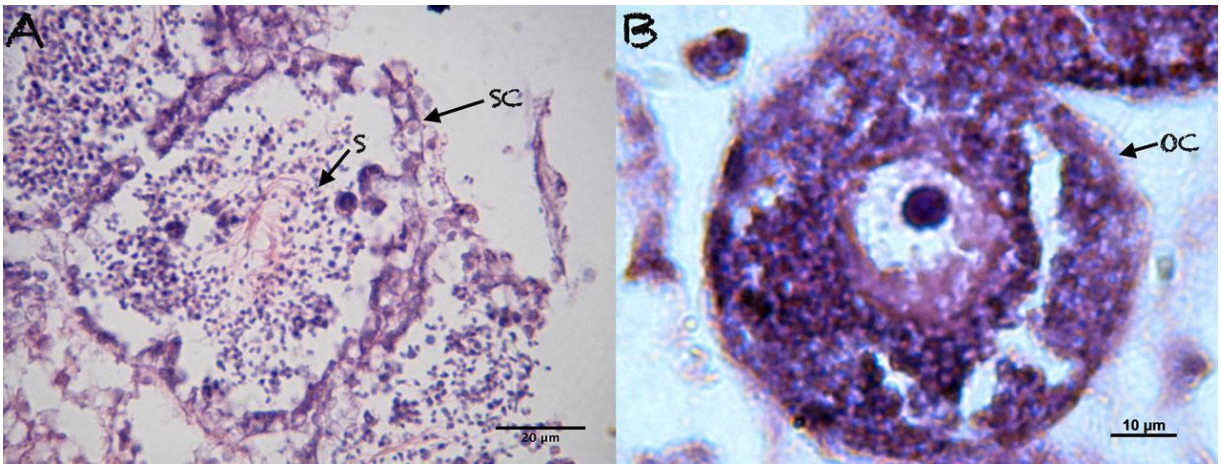


Figura 17. *Gónada masculina y femenina de la medusa Chrysaora sp.*

A) Espermatocito (sc) y espermatozoides (s) B) Oocitos (oc) en el centro se observa el nucléolo.

Los cnidocitos se encontraron únicamente en los tentáculos de la medusa, se pudieron apreciar entre las células epiteliales (Figura 18), y se pudieron observar los cuatro tipos de cnidocitos característicos del género: *Holotrichous O-isorhiza*, *Holotrichous a-isorhiza*, *Holotrichous A-isorhiza* y *Heterotrichous microbásicos*.

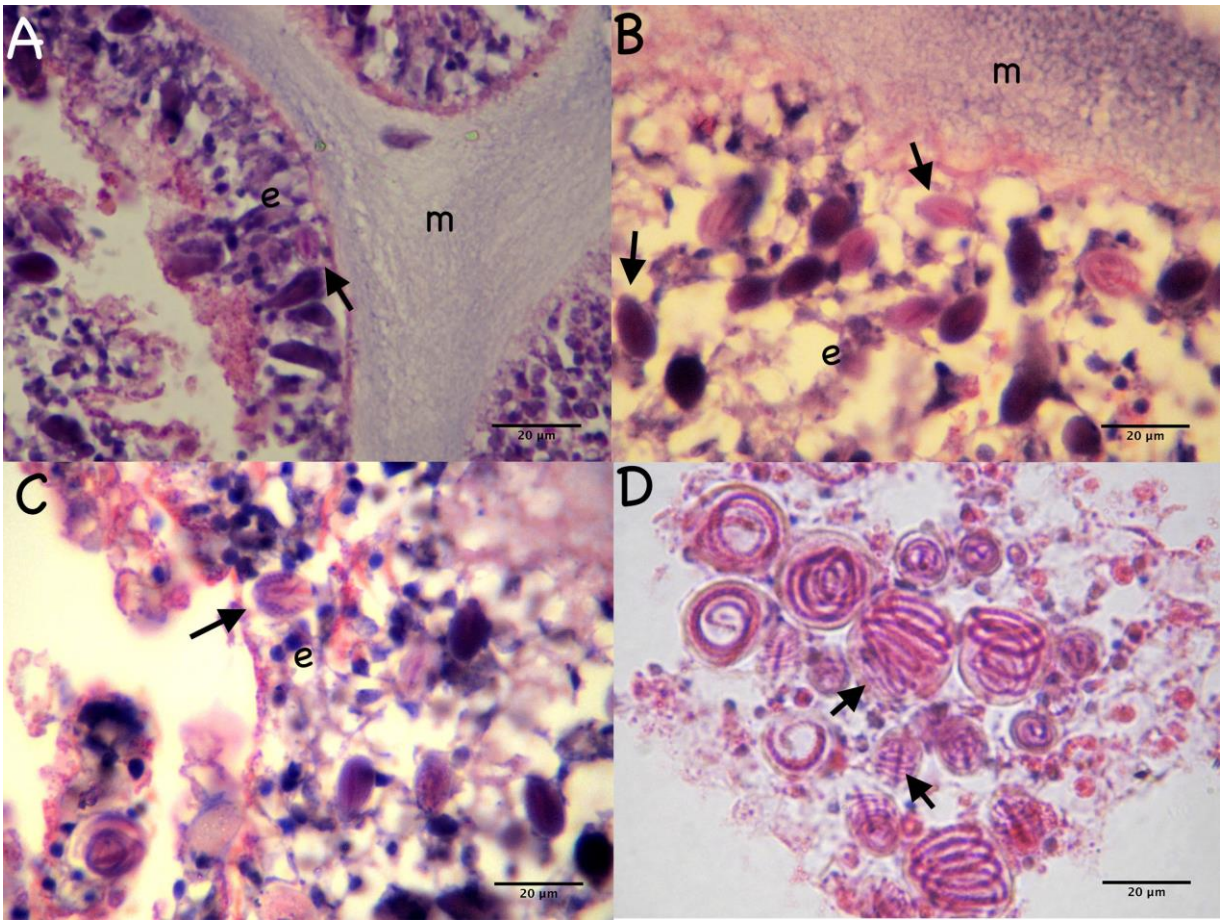


Figura 18. *Cnidocitos en células epiteliales de los tentáculos de la medusa. En A, B y C se observan cortes longitudinales de la medusa en donde se observa la mesoglea (m) y cnidocitos (flechas) inmersos en la epidermis (e), en D se observa un corte transversal del tentáculo con dos diferentes tipos de nematocistos representativos del género Chrysaora señalados con flechas, de mayor tamaño Holotrichous O-isorhiza y de menor tamaño Heterotrichous microbasic.*

7.4.4 Análisis de cnidoma

En los tentáculos de esta medusa existen 4 tipos diferentes de cnidocitos (Figura 19): los *Holotrichous O-isorhiza* con un tamaño promedio de 22.50±6.46 µm de largo y 19.43±5.98 µm de ancho, los *Holotrichous A-isorhiza* de 18.19±2.04 µm de alto y 10.40±1.95 µm de ancho, *Heterotrichous microbasic* de 11.65±3.22 µm de alto y

6.78±2.19 μm de ancho y *Holotrichous a-isorhiza* de 7.35±1.19 μm de alto y 4.46±0.82 μm de ancho. En mayor proporción se encontraron los nematocistos de tipo *Heterotrichous microbasic* que tienen dos o más tipos de espinas, con el túbulo proximal una y media veces más largo que el largo de la cápsula y con espinas alrededor. Los que le siguen en cantidad son los de tipo *Holotrichous a-isorhiza* y *Holotrichous A-isorhiza* con el túbulo espinado uniforme del mismo diámetro, difieren entre sí por el tamaño; finalmente los *Holotrichous O-isorhiza* tienen las mismas características con un túbulo uniforme espinado con un tamaño más grande y sensibilidad mayor que los otros tres tipos.

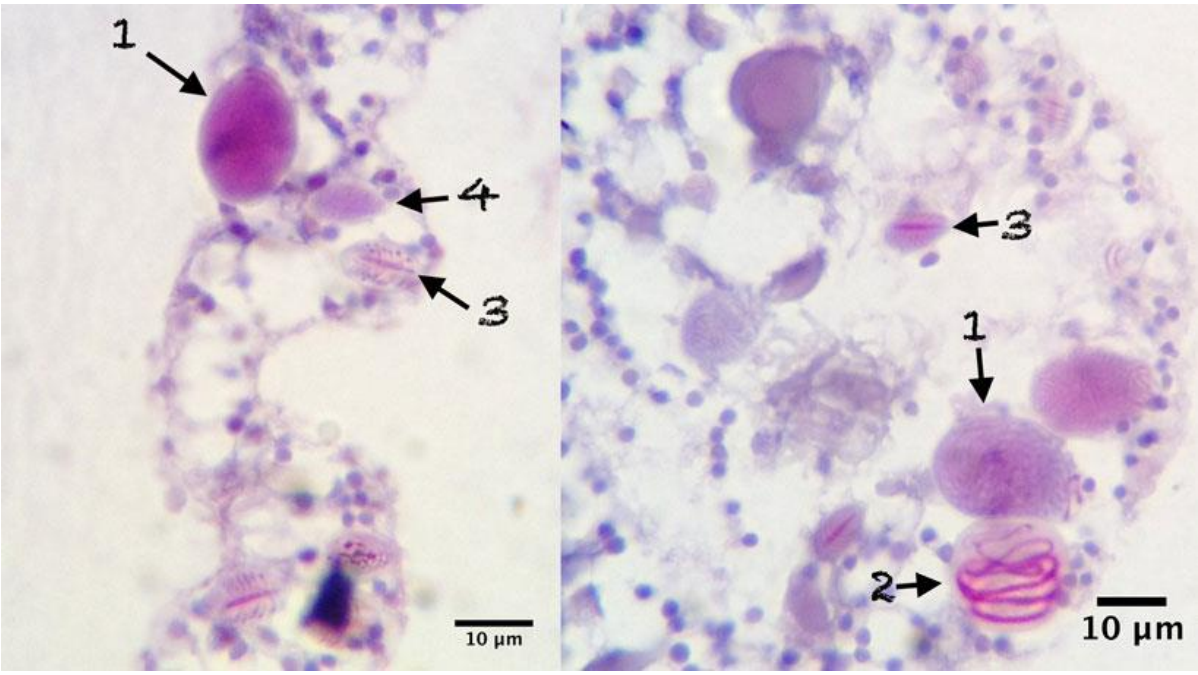


Figura 19. *Cnidocitos presentes en Chrysaora sp.*

Holotricous A-isorhiza (1), Holotricous O-isorhiza (2), Heterotricous microbasic (3) y Holotricous a-isorhiza (4).

7.5 DISCUSIÓN

Desde la perspectiva biológica, las lagunas costeras del Golfo de México poseen características propias propiciadas por factores hidrológicos y por la tasa de recambio de agua (Alber, 2002). La laguna de Mandinga tiene una extensión de 3250 HA, está asociada al río Jamapa, que nace con los deshielos del Pico de Orizaba, y recorre 150 km; corre de oeste a este y recibe varios afluentes de los ríos Huatusco, Cotaxtla, Totolapan, que desembocan en el Golfo de México, en un lugar conocido como Boca del Río próximo a la ciudad de Veracruz, la hidrología de esta Laguna en 1996 indica que la salinidad mínima registrada es de 4.4 ‰ y la máxima de 32.9 ‰, y los valores de temperatura son 26.2 ºC como la mínima y 33 ºC como la máxima (Caso et al., 2004). En este estudio encontramos que el rango de temperatura y salinidad en donde se detecta presencia de la medusa *Chrysaora sp.* es de 28-30 ºC y 14-26 ‰, que concuerda con los datos reportados por Purcell et al. (1999) para la especie *Chrysaora quinquecirrha*, cuya colecta se realizó en el mes de julio de 1995 y 1996 en la Bahía de Chesapeake, la salinidad reportada fue de 14.1 ‰ y 14.4 ‰, y la temperatura de 29.1 ºC y 25.5 ºC, lo que demuestra que para esta especie las condiciones idóneas para su proliferación son los datos antes mencionados.

El mismo estudio realizado por Purcell et al. (1999) sugiere que el patrón de coloración se debe a que las medusas presentes en la Bahía de Chesapeake son una población local adaptada a salinidades medias ya que durante su colecta encontraron mayor presencia de medusas blancas sin pigmentación oscura; sin embargo, nosotros encontramos que cuando las condiciones de salinidad son de 14

‰, el patrón predominante es el blanco, que concuerda con lo encontrado por estos autores, y cuando la salinidad es de 24-26 ‰ el patrón predominante es el 2 de la Figura 14, lo que sugiere que la coloración esta relacionada con factores ambientales y no determina una especie diferente, más específicamente la salinidad puede estar implicada en los cambios de coloración como se observa en estudio realizado a *Dunaliella salina*, que al incrementar la salinidad incrementa el número de células que contienen pigmento (Nikookar et al., 2004). Además de que la temporada de sequias y la de lluvias determinan el comportamiento de los parámetros hidrológicos del sistema, siendo significativa la influencia del mar en la temporada de secas y la del río Jamapa en la época de lluvias (Luna et al., 1982), lo que muestra que el factor ambiental principal que se modifica durante estos muestreos es la salinidad.

Con lo que respecta al cambio en el tamaño, que fue estadísticamente significativo, se puede deber principalmente que durante la época de lluvias los nutrientes son más abundantes en esta laguna (Contreras et al., 1996), este aumento del nitrógeno provoca un aumento en la producción primaria del fitoplancton fotosintético que conduce a zonas de bajo oxígeno, lo que beneficia a las medusas debido a que pueden alimentarse sin tener competidores en zonas con estas condiciones (Nakar et al., 2011), además de que, los pólipos de esta medusa pueden sobrevivir y propagarse asexualmente durante periodos prolongados de hipoxia (Condon et al., 2001). Durante esta época también las medusas con diámetro de campana de 7 a 14.5 cm presentan madurez sexual tanto hembras cómo machos, lo que sugiere, como en otras especies de medusas, que durante esta época se lleva a cabo la reproducción (Macchi et al., 1995), por otro lado, las diferencias observadas en la

estructura ovárica en escifozoos reflejan relaciones filogenéticas, la estructura ovárica de esta medusa tiene semejanzas con la de la medusa *Linuche unguiculata*, observándose cuerpos de yema en los oocitos maduros (Eckelbarger y Larson, 1992).

De acuerdo con las claves reportadas por Morandini y Marques (2010) la especie corresponde a *Chrysaora kynthia,* ya que los datos morfométricos obtenidos concuerdan con la mayoría de la diagnosis, pero no es así para la distribución y la gónada que caracteriza a esta especie en forma de w invertida, que no se muestra en la especie encontrada, por lo que, se utilizó otra clave taxonómica reportada por Gershwin y Collins (2002), según esta clave las medusas de este muestreo corresponden a la especie *Chrysaora quinquecirrha* cuya diagnosis no corresponde totalmente, en que las lóbulos marginales por octante en esta especie son comúnmente 6 y en este estudio encontramos 4, los brazos orales 6 veces más grande que el diámetro de la campana tampoco concuerda ya que los brazos generalmente son 2 ó 3 veces más grandes o inclusive en algunos casos más pequeños.

Gracias al análisis histológico pudimos dar evidencia de la reproducción sexual de la medusa, tal cómo señala en su estudio Littleford (1939), las hembras capturan el esperma liberado por la boca de los machos, la fertilización se lleva a cabo también en la boca de la hembra y los huevos fertilizados permanecen unidos a los brazos orales de la hembra hasta que completen su desarrollo a plánula para que se libere y se asiente en el substrato, que es dónde encontramos las mórulas de varios huevos fecundados.

Por otro lado, en el análisis del cnidoma pudimos observar los cuatro tipos de cnidocitos representativos del género *Chrysaora* basados en la guía de identificación de Morandini y Marques (2010), las medidas del tipo *Holotrichous O-isorhiza* y *Heterotrichous microbasic* concuerdan con las medusas *C. quinquecirrha* de Maryland, Estados Unidos de Norteamérica, pero las de *Holotrichous A-isorhiza* concuerdan con esta misma especie pero de Delaware, Estados Unidos de Norteamérica y las de *Holotrichous a-isorhiza* no concuerda con ninguna de las dos, por lo que podría tratarse de otra especie.

Ambas claves de identificación utilizadas en este estudio se basan en que *C. quinquechirra*, medusa la cual se reporta en nuestro país, tiene 40 tentáculos, este dato es el que más difiere con nuestras observaciones ya que nosotros encontramos que tiene de 24-34 tentáculos; ya que la morfología cambia de un sitio a otro es necesario el análisis mediante técnicas moleculares para definir correctamente la especie de la que se trata.

8 CAPITULO 3. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE POR BIOLOGÍA MOLECULAR

8.1 INTRODUCCIÓN

La taxonomía de muchos grupos de zooplancton no es clara posiblemente por la escasez relativa de los caracteres morfológicos que distingan los taxones (Dawson, 2004; Mayer, 1910), la taxonomía tradicional para este tipo de organismos está sujeta a una revisión frecuente en los niveles taxonómicos de clase (Marques y Collins, 2004); por lo que marcadores moleculares específicos pueden ser secuenciados para compararlos; usualmente los que han sido utilizados universalmente para el estudio de este tipo de especies son las regiones: Subunidad I de citocromo c oxidasa mitocondrial (COI) (Dawson y Jacobs, 2001; Holland et al., 2004), ARN ribosomal 16S (16S) (Collins, 2002), el espacio transcrito interno de la región I nuclear (ITS-1) (Dawson y Jacobs, 2001), 5.8S, 18S y 28S ADN ribosomal (Bayha et al., 2010; Dawson, 2004), además del genoma mitocondrial lineal (Kayal et al., 2012). Una de las moléculas utilizadas para determinar el nivel de la estructura genética de las poblaciones en los estuarios de *Chrysaora* es la subunidad III de citocromo c oxidasa (COIII) (Bayha, 2005).

Las técnicas moleculares también se han empleado para estudiar procesos evolutivos dentro de las especies, tales como la tasa de evolución y diferenciación geográfica; el estudio de la variación dentro de una especie a nivel molecular permite indagar sobre los procesos que podrían estar dando lugar a las distribuciones de las

medusas y si existen estructuras genéticas dentro de poblaciones de una misma especie (Bayha, 2005); además este tipo de técnicas también ayudan en el estudio de especies invasoras (Holland, 2000).

Chrysaora encontrada en el Golfo de México y en el Atlántico ha sido considerada por muchos años una sola especie *C. quinquechirra* (Mayer, 1910), además de que diversas formas morfológicas incluyendo las variantes en la coloración podrían representar diferentes especies; por lo que las técnicas moleculares brindan una ventaja para el estudio de esta especie y reconocer específicamente de que especie se trata.

8.2 ANTECEDENTES

La evolución de la clase scyphozoa a nivel molecular se ha estudiado analizando el gen 18S (Marques y Collins, 2004), secuencias 5.8S, 18S y 28S de ADN ribosomal (Bayha et al., 2010; Dawson, 2004); y los estudios más recientes se realizan con genomas mitocondriales (Kayal et al., 2012; Shao et al., 2006).

El antecedente más relevante para este estudio es el realizado por (Bayha, 2005), quien señala que dos especies distantes de *Chrysaora* están presentes en el Atlántico y Golfo de México, nombrando a la especie encontrada en aguas costeras como *C. quinquechirra* y a la encontrada en aguas estuarinas como *Chrysaora sp.;* en este estudio se analizaron cinco regiones mitocondriales (16S, citocromo b, citocromo c oxidasa subunidad I, citocromo c oxidasa subunidad III y NADH-ubiquinona oxidoreductasa cadena 5) siendo citocromo c oxidasa subunidad III la más variable en términos de rango de divergencia y secuencia promedio de

divergencia, por lo que fue la utilizada para el estudio de la estructura filogeográfica. En este estudio también utilizamos esta molécula que nos puede dar mayor información a qué especie pertenece la medusa encontrada en la Laguna de Mandinga.

8.3 METODOLOGÍA

8.3.1 Obtención de ejemplares

Las medusas se colectaron en la laguna de Mandinga, Veracruz durante el mes de julio del 2014 y abril del 2016, se detectaron visualmente en la superficie del agua y se capturaron mediante redes de mango largo con un haz de malla de 0.05 mm; a las medusas colectadas en julio del 2014 se les cortaron los brazos orales y fueron fijados en solución de RNAlater marca ThermoFisher SIENTIFIC y almacenados a -70 ºC, el resto de las medusas fueron fijadas en alcohol 90% y almacenadas a temperatura ambiente; las medusas colectadas en abril del 2016 fueron congeladas inmediatamente con hielo seco y almacenadas a -20 ºC.

8.3.2 Extracción y cuantificación de ADNm

Para la extracción de ADNm se utilizó un estuche de extracción (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega) usando el protocolo de aislamiento de ADN genómico para tejidos animales (hígado y cerebro de ratón) (protocolo en anexos de biología molecular).

Se realizó la cuantificación del ADN extraído en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 marca Thermo SCIENTIFIC y se verificó la información mediante geles de

agarosa 0.8% de la siguiente manera: Se colocó 30 ml de TAE 1X y 0.24 g de agarosa, se calentó hasta fundir completamente, se adicionó 1µl de gelred™ y se mezcló, se vertió la solución en una canastilla de electroforesis, se colocó un formador de pozos y se dejó gelificar (aprox. 15 min). Para el corrimiento del gel se agregó amortiguador de corrimiento (TAE 1X, 265-320 ml, preparación anexo biología molecular) frío y se prepararon las muestras con 2 µl de amortiguador de carga 6X marca Fermentas (Thermo Scientific) y 2 µl de ADN o 2 µl de marcador molecular GeneRuler™ 100 pb marca Fermentas (Thermo Scientific) para colocarlas en los pozos; la electroforesis se llevo a cabo a 100 V por 45 min y se visualizó el gel en un transluminador.

8.3.3 Amplificación y secuenciación del gen COIII

Se realizó la amplificación de ADNm por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de la región mitocondrial de la subunidad III de citocromo c oxidasa (COIII), de dos individuos colectados en abril de 2016, ya que fueron los únicos a los cuales se les extrajo correctamente el ADN, uno corresponde al patrón de coloración 3 y el otro al 1 de la Figura 14.

La PCR fue realizada con los cebadores reportados por Bayha (2005) para esta molécula con las secuencias que se observan en la Tabla 3, sintetizados por Uniparts-México con una purificación de desalado estándar.

Tabla 3. Cebadores utilizados

Cebador	Secuencia	Propósito
PMGMT-23	ATTTAGTTGATCCTAGGCCTTGACC	PCR
PMGMT-24	ACTCAAACCACATCTACAAAATG	PCR
KMBMT-69	GGGCTTTTTTCTTAACTTTTGG	Secuenciación
KMBMT-70	TAGCAGCTTCAAAACCAAAATG	Secuenciación

Las condiciones para la PCR fueron 2 min a 95 ºC, seguido de 36 ciclos a 95 ºC por 30 seg, 45-50 ºC por 1 min y 72 ºC por 1:30 min, finalizando con un ciclo a 72 ºC por 10 min. Los volúmenes para cada reacción se observan en la Tabla 4 y corresponden al protocolo de la mezcla MasterMix de PCR marca PROMEGA colocada para la reacción que contiene: Taq ADN polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$ y amortiguadores de reacción. La reacción se llevo a cabo en un termociclador de gradiente Multigene Optimax Labnet International y Techgene.

Tabla 4. Volúmenes para PCR

Componente	Volumen	Concentración
Agua libre de nucleasas	9.5 µl	N.A.
PCR Master Mix, 2X	12.5	1X
Primer PMGMT-23, 10 µM	1 µl	1.0 µM
Primer PMGMT-24, 10 µM	1 µl	1.0 µM
DNA template	1 µl	<250ng
Volumen total	**25µl**	

Los productos de la PCR fueron analizados mediante geles de agarosa 2% (procedimiento descrito en extracción de ADN) a 35 V por 1:45 hrs, los productos de PCR que fueron positivos fueron purificados con un estuche Genelute PCR Clean-Up mediante el protocolo que se encuentra en los anexos de biología molecular.

La secuenciación se llevo a cabo en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS) de la Unidad Iztapalapa,

Universidad Autónoma Metropolitana mediante un secuenciador automático ABI PRISM 3100 Avant de cuatro capilares.

8.3.4 Determinación de identidad genética

Las secuencias obtenidas con los dos cebadores (ida y regreso) fueron visualizadas y editadas mediante el programa Geneious 9.1.5 de Biomatters, eliminando los extremos que no tienen buena calidad para la obtención de secuencias consenso de cada medusa; la identidad genética y la similitud con otras secuencias encontradas en el GenBank fue analizada con las bases de datos del servidor National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) mediante el programa BLASTN para análisis de nucleótidos, en la base de datos de otros optimizado para secuencias de alta similaridad (megablast) y en el de BLASTX para la base de datos que busca a partir de una secuencia de nucleótidos su traducción a proteínas.

La identidad genética se realizó utilizando herramientas de interferencia filogenética acotadas a la obtención de una topología soportada con secuencias homólogas de 3 especies de medusas, utilizando nucleótidos y 10 secuencias de especies de escifomedusas para proteínas.

A las secuencias homólogas de medusas obtenidas se les realizó una alineación múltiple en el programa CLUSTAL Omega usando el servidor del European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute usando la configuración predeterminada (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).

La generación de la topología de relaciones filogenéticas y las distancias genéticas con los grupos comparados se obtuvieron mediante el modelo de máxima

probabilidad en el programa Mega 7 (Kumar et al., 2016), el modelo evolutivo para la generación del árbol filogenético para las secuencias obtenidas de nucleótidos de medusas fue el Modelo general de tiempo reversible (GTR) (Nei y Kumar, 2000) y para las secuencias de proteínas de escifomedusas (traducción) fue el modelo de matriz Jones-Taylor-Thornton (JTT) para proteínas (Jones et al., 1992).

8.4 RESULTADOS

8.4.1 Extracción de ADN

Los resultados de la concentración de ADN total (ADNt) obtenidas de las diferentes estructuras de la medusa durante la extracción se representan en la Tabla 5, estos datos demuestran que de la estructura donde se obtiene mayor cantidad de ADN es la gónada, la cual se lisó fácilmente, mientras que de la estructura que presentó más problemas durante el lisado es la campana, obteniéndose mayor cantidad que de los brazos orales. Sin embargo, cuando se realizó el gel para la comprobación de la cuantificación del ADN se pudo observar que estaba degradado posiblemente por el almacenamiento por lo que no se pudo llevar a cabo la PCR con este ADN.

Tabla 5. Cantidades de ADN obtenido de las diferentes estructuras de la medusa.

Muestra	ADN (ng/µl)	Abs.260nm	Abs.280nm	260/280	260/230
Gónada	353.5	7.071	3.678	1.92	1.18
Campana	30.4	0.607	0.383	1.58	0.30
Brazos	11.0	0.221	0.102	2.17	0.22

Los datos de la extracción utilizando las medusas congeladas inmediatamente después de su colecta con hielo seco se muestran en la Tabla 7, estos datos corresponden a la gónada de la medusa 1 y 2, cuya clave de identificación es de la siguiente manera #deorganismoPuntodemuestreo.organismo_lugardecolecta.fecha, que fueron las únicas encontradas en el muestreo de Abril del 2016 cuyos datos morfométricos se presentan en la Tabla 6, el gel correspondiente a esta extracción se representa en la Figura 20.

Tabla 6. Datos morfométricos de las medusas utilizadas en biología molecular.

Muestra	**Patrón de coloración**	**Longitud Brazos orales (cm)**	**Diámetro de la campana (cm)**	**Peso total (g)**	**Tentáculos por octante**	**Lóbulos por octante**
01PM01.med_manver.080316	3	10	8	44.3	3	4
02PM01.med_manver.080316	1	6	6	17.6	3	4

Tabla 7. ADN obtenido de la gónada.

Muestra	ADN (ng/µl)	Abs.260nm	Abs.280nm	260/280	260/230
01PM01.med_manver.080316a	191.2	3.825	2.077	1.84	1.47
01PM01.med_manver.080316b	615.4	12.308	6.762	1.82	1.51
02PM01.med_manver.080316	68.8	1.376	0.876	1.57	0.73

a y b corresponden a la misma medusa

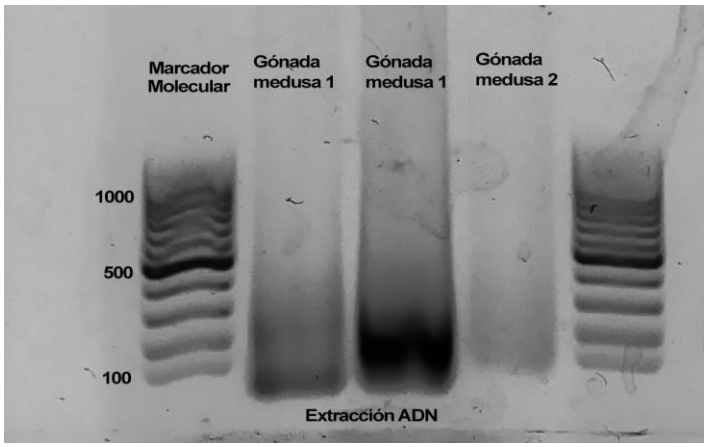


Figura 20. *ADN extraído de gónadas de medusa.*

Se muestra el marcador molecular en ambos lados y diferentes concentraciones de ADN de la gónada de la medusa, 382.4 ng en el primer carril de izquierda a derecha, en el segundo 1.2 µg y en el tercer carril 137.6 ng.

8.4.2 Amplificación y secuenciación del gen COIII

La amplificación se llevó a cabo utilizando lo que correspondería a 615 y 3077 ng de ADN para determinar la cantidad correcta para la amplificación además del tamaño correcto del amplificado (500-786 pb), observando que colocando 615 ng se amplifica y con 3077 ng no se amplifica (Figura 21).

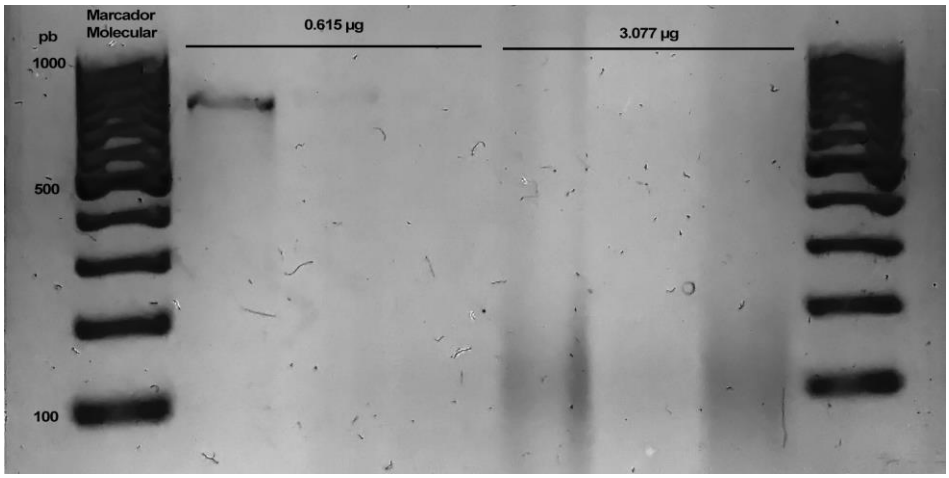


Figura 21. *PCR con diferentes concentraciones de ADN.*

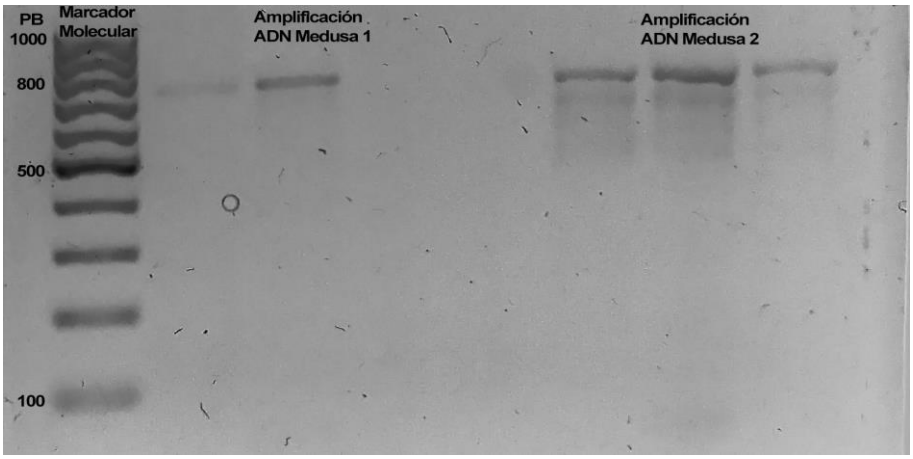


Figura 22. *Amplificaciones correspondientes al gen COIII.*

La amplificación entonces se llevo a cabo con 615 ng del ADN de la medusa 1 y 68.8 ng de la medusa 2, obteniendo las cantidades del amplificado presentadas en la Tabla 8 (sólo en las que se observa una banda en el gel) y comprobaciones en la Figura 22. Con lo que respecta a la temperatura el amplificado se obtiene en un rango de temperatura de 47-50 ºC observado en la Figura 23.

Tabla 8. Cantidades de ADN obtenidas en la amplificación.

Muestra	ADN (ng/µl)	Abs.260nm	Abs.280nm	260/280	260/230
01PM01.med_manver.080316a*	493.2	9.863	5.397	1.83	2.15
01PM01.med_manver.080316b	494.2	9.884	5.380	1.84	2.17
01PM01.med_manver.080316c	514.3	10.285	5.715	1.80	2.19
02PM01.med_manver.080316a	418.0	8.360	4.630	1.81	2.00
02PM01.med_manver.080316b*	503.7	10.074	5.607	1.80	2.09
02PM01.med_manver.080316c	475.1	9.502	5.282	1.80	2.08

*Muestras que fueron utilizadas para secuenciación, la terminación a, b y c se refieren a las replicas.

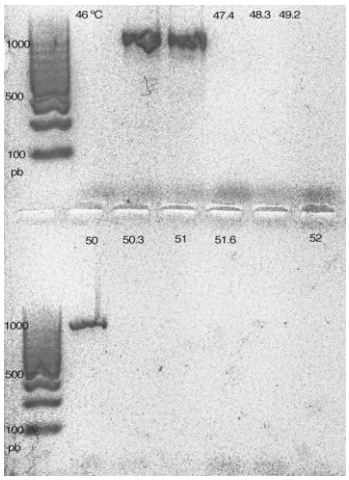


Figura 23. *Amplificación a diferentes temperaturas.*

Para la medusa 1 se obtuvo una secuencia consenso de 689 pb con nucleótidos que presentaban una alta calidad (secuencia presentada en anexos de biología molecular), esta secuencia fue la utilizada para la búsqueda de identidad en las bases de datos de NCBI, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 9 para genomas de medusas.

Tabla 9. Resultados de identidad genética y similitudes con genomas de medusas para la medusa número 1.

Organismo	Gen	Cobertura	Identidad	Acceso
Chrysaora sp.	Genoma Parcial mitocondrial EK-2011	99%	92%	JN700941.1
Cyanea capillata	Genoma Parcial mitocondrial	99%	82%	JN700937.1
Haliclystus sanjuanenensis	Genoma Parcial mitocondrial	85%	80%	JN700944.1

Las secuencias alineadas obtenidas en la búsqueda (nucleótidos) fueron utilizadas para realizar una alineación múltiple Clustal W y las distancias genéticas por máxima probabilidad obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 10.

Tabla 10. Distancias genéticas utilizando secuencias de nucleótidos con el modelo de máxima probabilidad para medusa 1

Especies	1	2	3
Haliclystus sanjuanenensis			
Cyanea capillata	0.307		
Chrysaora sp. Mandinga	0.255	0.196	
Chrysaora sp.	0.291	0.196	0.078

Para la medusa 2 se obtuvo una secuencia consenso de 695 pb (secuencia presentada en anexos de biología molecular), obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 11 para genomas de medusas.

Tabla 11. Similitudes de secuencia medusa 2 con genomas de medusas.

Organismo	Gen	Cobertura	Identidad	Acceso
Chrysaora sp.	Genoma Parcial mitocondrial EK-2011	99%	93%	JN700941.1
Cyanea capillata	Genoma Parcial mitocondrial	99%	82%	JN700937.1
Haliclystus sanjuanenensis	Genoma Parcial mitocondrial	84%	79%	JN700944.1

Las distancias genéticas (nucleótidos) para la medusa 2 fueron obtenidas de la misma manera que la medusa 1 cuyos resultados se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Distancias genéticas con el modelo de máxima probabilidad para medusa 2

Especies	**1**	**2**	**3**
Haliclystus sanjuanenensis			
Cyanea capillata	0.307		
Chrysaora sp. Mandinga	0.269	0.201	
Chrysaora sp.	0.291	0.196	0.073

La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima probabilidad basado en el modelo de tiempo real reversible (Nei y Kumar, 2000). Se muestra el árbol (Figura 24) con la más alta probabilidad log (-1699.2331). El árbol inicial para la búsqueda heurística fue obtenido automáticamente mediante la aplicación de logaritmos Neighbor-Join y BioNJ a matrices de distancias por parejas estimada mediante el método de máxima probabilidad compuesta (MCL) y luego seleccionar la topología con un valor de probabilidad log superior. El árbol está dibujado a escala con longitudes de rama medidos con el número de sustituciones por sitio, se analizaron 4 secuencias de nucleótidos eliminando todas las posiciones que contienen diferencias y datos faltantes. Hubo un total de 586 posiciones en el último conjunto de datos. El análisis evolutivo se realizó en MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

La similitud entre las dos secuencias es de un 99% teniendo 680 de 689 nucleótidos idénticos, lo que indica que ambas medusas pertenecen a la misma especie y el patrón de coloración no es un indicativo que pertenecen a especies diferentes; por

esta razón se utilizó la secuencia de la medusa 2 para la construcción de los árboles filogenéticos (Figura 24 y 25) y la búsqueda por traducción (blastx), utilizando el código genético de mitocondrias de invertebrados, cuyos resultados se muestran en la Tabla 13, como en esta búsqueda se obtienen más resultados se delimitó a secuencias de escifomedusas, se usaron los 11 resultados más significativos.

Tabla 13. Similitudes del genoma de Chrysaora sp. traducido con proteínas de escifomedusas.

Organismo	**Proteína**	**Cobertura**	**Identidad**	**Acceso**
Chrysaora sp.	COIII	99%	90%	AER54516.1
Cyanea capillata	COIII	99%	84%	AER54490.1
Chrysaora quinquecirrha	COIII	99%	82%	YP_007516986.1
Rhizostoma pulmo	COIII	99%	81%	AET13222.1
Catostylus mosaicus	COIII	99%	81%	AET13208.1
Aurelia sp. 4	COIII	99%	81%	BAR46014.1
Aurelia sp. 3	COIII	99%	81%	BAR45999.1
Pelagia noctiluca	COIII	99%	81%	AER54629.1
Aurelia aurita	COIII	99%	80%	ADY15477.1
Cassiopea frondosa	COIII	99%	74%	YP_004940466.1
Mastigias sp.	COIII	97%	78%	AMR36713.1

La secuencia obtenida resultado de la traducción se presenta en los anexos de biología molecular, al igual que los alineamientos con las secuencias presentadas en la Tabla 13, los resultados obtenidos para las distancias genéticas utilizando el modelo JTT con aminoácidos se representan en la Tabla 14. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima probabilidad basado en el modelo de Jones

et al. (1992), se muestra en árbol con la más alta probabilidad log (-1826.6696) (Figura 25). El árbol inicial para la búsqueda heurística fue obtenido automáticamente mediante la aplicación de logaritmos Neighbor-Join y BioNJ a matrices de distancias por parejas estimada mediante el modelo JTT y luego seleccionando la topología con valor log superior de probabilidad. El árbol es dibujado a escala con longitudes de rama medidos con el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 12 secuencias de aminoácidos, eliminando todas las posiciones que contienen diferencias y datos faltantes. Hubo un total de 224 posiciones en el último conjunto de datos. El análisis evolutivo se realizó en MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

Figura 24. *Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud con secuencias de nucleótidos de medusas.*

Tabla 14. Distancias genéticas con el modelo JTT de la traducción del gen obtenido a proteína

Especie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Pelagia noctiluca											
Cassiopea frondosa	0.235										
Chrysaora sp.	0.225	0.327									
Mandinga Chrysaora sp.	0.165	0.263	0.107								
Mastigias sp.	0.228	0.161	0.266	0.211							
Cyanea capillata	0.167	0.222	0.196	0.135	0.190						
Chrysaora quinquecirrha	0.172	0.230	0.218	0.156	0.217	0.106					
Catostylus mosaicus	0.174	0.225	0.230	0.170	0.151	0.138	0.142				
Rhizostoma pulmo	0.219	0.263	0.235	0.175	0.173	0.153	0.206	0.139			
Aurelia aurita	0.209	0.277	0.238	0.175	0.193	0.135	0.158	0.132	0.134		
Aurelia sp. 4	0.208	0.225	0.240	0.165	0.193	0.163	0.191	0.132	0.139	0.072	
Aurelia sp. 3	0.199	0.226	0.227	0.159	0.182	0.148	0.171	0.112	0.120	0.062	0.037

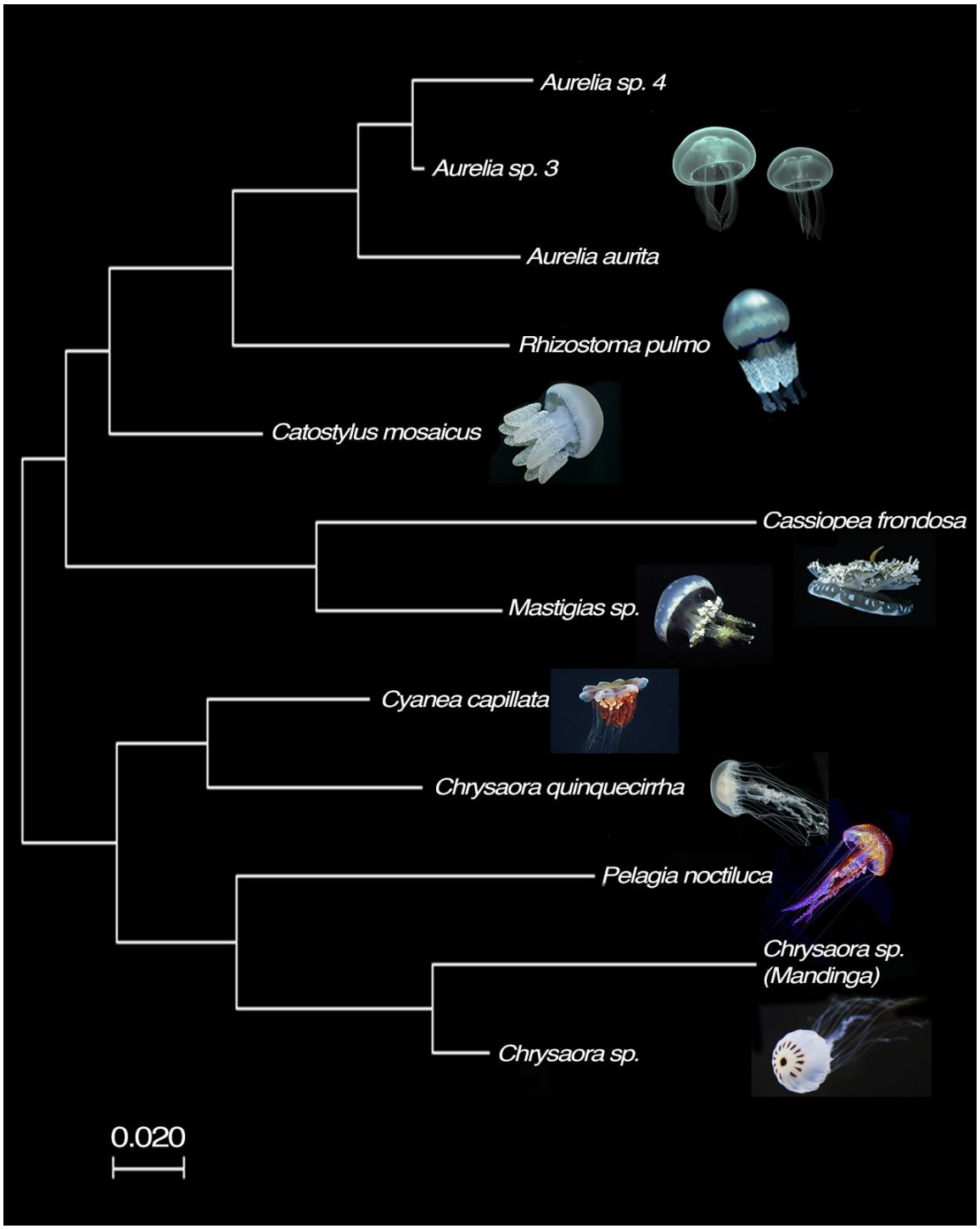


Figura 25. *Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud utilizando secuencias de proteínas de escifomedusas.*

8.5 DISCUSIÓN

Marcadores moleculares específicos son de gran utilidad para el estudio de la variación genética entre especies para explicar procesos evolutivos, sobre todo en organismos como las medusas cuyas claves taxonómicas no son útiles para determinar la especie en la mayoría de los casos (Marques y Collins, 2004). La aplicación de las técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN íntegro y puro; a lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, esto depende del organismo de estudio, el tejido disponible y su estado de conservación (Alejos Velázquez et al., 2014). A pesar de que en el estudio reportado por Bayha (2005) indica que la estructura en dónde se encontraba más cantidad de ADN eran los brazos orales, en este estudio tuvimos poca cantidad de ADN de esta estructura por lo que tuvimos que estandarizar, logramos observar que la mejor extracción se realiza utilizando la gónada del organismo y el mejor método para la conservación fue el congelamiento al momento de la colecta con hielo seco, esto garantiza que el ADN no se degrade.

Con lo que respecta a la amplificación de la PCR, el protocolo está diseñado para la amplificación de fragmentos estándar y la cantidad adecuada para obtener una buena amplificación es >10 ng y <615 ng (Serrato Díaz et al., 2014), razón por la cual al poner 3077 ng de ADN no se obtuvo amplificación; de este organismo se obtiene una buena amplificación colocando aprox. 69 ng.

El ADN mitocondrial de todas las medusas contiene un grupo de genes conservados que codifican para 13 subunidades de proteínas involucradas en la cadena

transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa (Kayal et al., 2012), una de ellas es la COIII, una de las cinco regiones mitocondriales analizadas por Bayha (2005), esta región presentó 595 pb y fue la que mostró mayor variabilidad en función a la divergencia entre individuos (0-3%), haciendo esta región la más útil para el estudio de la filogeografía de *Chrysaora sp*. La divergencia analizada en este estudio para esta región concuerda con el estudio antes mencionado, con una divergencia entre individuos del 1%; sin embargo el número de pares de bases obtenidos no corresponde, ya que se obtuvieron en la secuencia concenso 695 pb mientras que Kayal et al. (2012) reporta que presenta 786 pb en cnidarios en todas las clases, lo que podría indicar que la región estudiada tiene diferente tamaño dependiendo de la especie o el cebador utilizado.

El análisis por distancias genéticas utilizando nucleótidos demostró que la medusa *Chrysaora sp*. presente en Mandinga tiene mayor similitud con *Chrysaora sp*. de las costas de Bocas del Toro, Panamá, teniendo valores de distancia genética pequeños (0.073-0.078), mientras que con otras especies de cnidarios es aprox. tres veces más, con divergencias de 7.3 a 7.8%, y de acuerdo con lo reportado por Dawson y Jacobs (2001), para considerar que la especie analizada pertenece a una nueva especie se debe considerar la región analizada; se sugiere entonces por estos autores que para ITS-1 una divergencia de 5 a 15% es un indicativo de tener una nueva especie, mientras que para COI se necesita de un 10 a 20% de divergencia. Tomando en cuenta que la composición de Adenina y Tiamina entre COI y COIII es la misma (64%), la proporción de aminoácidos ricos en Glicina y Cisteina podría ser similar y, por lo tanto, también el porcentaje de mutación (Kayal et al., 2012), por lo

que se podría considerar el mismo porcentaje de divergencia para identificar la especie con la secuencia COIII. El análisis utilizando esta región indica que la identidad genética de la medusa presente en la laguna Mandinga es cercana a *Chrysaora sp.* de Panamá, sin embargo, se necesita el análisis de más regiones para identificar si se trata de la misma especie.

Cuando se realiza el análisis de divergencia con las secuencias traducidas la diferencia entre la medusa de Mandinga y de Panamá es del 10.7%, lo que indica que podría pertenecer a una especie diferente de medusa pero como la traducción se realizó de manera automática podría contener errores, por lo que se consideró para la identidad genética únicamente el análisis con nucleótidos, sin embargo cabe señalar que la divergencia con la secuencia de *C. quinquecirrha* es de 21.8% comprobando así los resultados obtenidos con las guías de identificación.

Por otro lado podemos confirmar lo reportado por Bayha (2005), quién indica que existe una divergencia entre estas dos especies con dos hábitats distintos (estuarios y costas), él indica que esta especie está más relacionada genéticamente con *C. hysoscella* de las costas Africanas que con *C. quinquechirra*, sin embargo en nuestras búsquedas de similitudes no encontramos similitud con otras medusas pertenecientes al género *Chrysaora* más que con *C. quinquechirra,* en la búsqueda utilizando la traducción del gen, mientras que para los genes está más relacionada con *Cyanea capillata* que concuerda también con lo dicho por este autor en dónde analizó la semejanza utilizando otros genes (COI, ITS-1 y 16S) encontrando el mismo resultado.

Con lo que respecta al patrón de coloración no encontramos, al igual que Bayha (2005), que exista evidencia que sugiera que los diferentes patrones de coloración representen distintos grupos genéticos, sino que esta diferencia esta dada por factores ambientales como lo indicamos en el capítulo anterior de esta tesis.

9 CAPITULO 4. CARACTERIZACIÓN DE TOXINAS DE *CHRYSAORA SP*.

9.1 INTRODUCCIÓN

Una gran variedad de organismos terrestres y marinos producen veneno; el cual se sintetiza en tejidos o glándulas especializadas que se conectan con estructuras de aplicación; la composición de estos venenos van desde péptidos, polipéptidos de baja y alta masa molecular, aminas, lípidos, esteroides, aminopolisacáridos, quinonas, glucósidos y aminoácidos libres, serotonina, histamina y otras substancias, llamadas toxinas, que permiten al organismo tener un espectro de toxicidad más extenso (Adams y Olivera, 1994). Las toxinas son una defensa biológica que ayuda a las especies en procesos tales como nutrición, sobrevivencia, procreación y protección de territorio, incrementando así las probabilidades de sobrevivencia, proliferación y diseminación (Garateix, 1997; Rappuoli y Montecucco, 1997). Estas toxinas interrumpen la actividad de enzimas, receptores o canales iónicos teniendo un efecto en los sistemas nervioso central y periférico, el sistema cardiovascular, neuromuscular, coagulación sanguínea y homeostasis (Williamson et al., 1996); por esta razón las toxinas tienen el potencial de ser una herramienta con la cual estudiar algunos sistemas fisiológicos complejos, además de también poder ser utilizadas para la fabricación de nuevos fármacos y sobre todo el conocimiento de su función ayuda a la protección de posteriores envenenamientos en seres humanos (Watkins, 2008).

Por otro lado, el uso del modelo biológico *Danio rerio* (pez cebra) en la investigación biomédica básica y en investigaciones sobre salud ambiental se ha convertido en una herramienta que ofrece varias ventajas técnicas y prácticas para el estudio de los principales procesos biológicos, así como efectos y mecanismos de varias toxinas ambientales, además, proporciona una visión conceptual en muchos aspectos de la biología de los vertebrados, la genética, la toxicología y la enfermedad. Un aspecto adicional que apoya el uso de pez cebra como una especie modelo es la amplia gama de herramientas y la información que está disponible para esta especie, incluyendo el conocimiento de la secuencia del genoma (http://zfin.org) (Pyati et al., 2007; Segner, 2009). Las ventajas técnicas que ofrece el modelo de pez cebra son la facilidad y costos de mantenimiento, la duración de los ensayos, alta fecundidad, la facilidad de observación, así como la manipulación, la disponibilidad de la información genética, la existencia de cepas mutantes, y susceptibilidad tanto para avance y retroceso genética (Segner, 2009). Los peces cebras alcanzan su madurez sexual a los tres meses de edad, sin embargo, la fecundidad es mucha más alta que en los ratones; cada semana, un par de pez cebra puede producir cientos de embriones; además los embriones y larvas son ópticamente transparentes, lo que permite una fácil visualización de la morfología celular y movimiento. También el alto grado de homología entre el genoma del pez cebra y de los humanos hace que tales descubrimientos especialmente pertinente para el estudio de enfermedades humanas (Pyati et al., 2007).

Existe escasa información sobre los efectos de toxinas de cnidarios *in vivo* y sobre

órganos por separado exceptuando la que se tiene en víctimas humanas, no lo es así para los estudios moleculares y celulares. Muchos de estos estudios se basan en efectos neurotóxicos sobre canales iónicos en membranas excitables (Cestele y Catterall, 2000; Diochot et al., 2007, Smith, 2007 #101). Aunque la histopatología se emplea a menudo como una herramienta para la detección y evaluación de los efectos de xenobióticos mediada en los organismos acuáticos, pocos estudios se han dedicado a la investigación de las consecuencias histopatológicas de la exposición del veneno de medusas en peces, por lo que en este estudio se pretende caracterizar los efectos *in vivo* del veneno de la medusa *Chrysaora sp.* en el pez cebra *Danio rerio*, así como los efectos *in vitro* de las citolisinas con efecto hemolítico en eritrocitos humanos y de peces, así como el de fosfolipasa A_2 para tratar de elucidar el efecto fisiológico de las toxinas presentes en esta medusa.

9.2 ANTECEDENTES

9.2.1 Estudios sobre problemas de salud pública con Cnidarios

Las medusas pueden causar serios daños a la salud pública por su picadura dolorosa y en ocasiones hasta mortal. Los primeros casos reportados corresponden a la especie *Physalia sp.* (Russell y Nagabhushanam, 1996). El cnidario marino considerado el más venenoso es el cubozoa *Chironex fleckeri*, que habita en el norte de Australia; el trabajo pionero sobre este animal y su veneno fue realizado por Hugo Flecker, justo después de la segunda guerra mundial, intensificando la investigación sobre estas medusas en 1970, después de fatalidades ocurridas a causa de *C. fleckeri* (Barnes, 1964; Baxter y Marr, 1969; Flecker, 1952).

9.2.2 Investigaciones con extractos de cnidarios

En las primeras décadas del siglo XX, el aislamiento y caracterización de toxinas de animales venenosos estaban limitados a las metodologías bioquímicas de la época, sin embargo, el fisiólogo francés Richet en 1903 purificó parcialmente, estudió y nombró a dos componentes activos de extractos tentaculares de anémonas europeas principalmente de *Actinia equina* y *Anemonia sulcata*; “congestina y talasina” (Richet, C. , 1903; Richet, C., 1903). La Talasina después se descubrió que libera histamina en mastocitos cuando se inyecta dentro de la piel, lo cual implica una serie de reacciones relacionadas con una alergia severa, como lo es la anafilaxis (Jacques y Schachter, 1954). La congestina es un péptido formador de poros que causa edema pulmonar y tiene efectos cardiovasculares (Sket et al., 1974). Richet también reportó la presencia de una toxina no dializable llamada “hipnotoxina” en los tentáculos de *Physalia physalis*; un sifonóforo comúnmente conocido como fragata portuguesa (Tamkun y Hessinger, 1981). Richet en 1913 recibió el premio nobel de fisiología y medicina por el descubrimiento de la anafilaxis en sus estudios con extractos de toxinas de cnidarios; la anafilaxis es una reacción hipersensible del sistema inmune a un antígeno y pone potencialmente en peligro la vida (Turk y Kem, 2009).

Estudios con extractos de anémonas *Adamsia palliata* demostraron que los cangrejos son especialmente sensibles a este tipo de venenos, ya que en el momento de ser inyectados rápidamente presentan convulsiones y flexión en los apéndices caminadores lo que hace que no puedan caminar y eventualmente

mueran (Cosmovici, 1925); sin embargo, a pesar de la sensibilidad de los crustáceos a esta anémona, existe una excepción de un cangrejo comensal (simbiótico) *Eupagarus prideauxii*, el cual no es afectado ni con una gran dosis de este veneno, debido a una sustancia en la sangre que es todavía desconocida y que esta ausente en otros crustáceos; la inyección de pequeñas cantidades de hemolinfa de *E. prideauxii* dentro de especies no comensales, les genera una resistencia temporal al extracto tóxico de *Adamsia palliata* (Turk y Kem, 2009). Estos estudios señalan que se podría utilizar dicho componente desconocido en la hemolinfa de este organismo para tener cierta resistencia a los venenos de Cnidarios.

9.2.3 Signos y síntomas de la picadura de Chrysaora sp.

En la mayoría de los casos los efectos son menores, la zona que es tocada por los tentáculos de este organismo reacciona como si se tratara de una quemadura fuerte (Lira Galera et al., 1989). En los casos más graves aparece insuficiencia vascular después de la picadura y existe un caso de mononeuritis con suero hipermune (Dart, 2004).

9.2.4 Estudios de proteínas citolíticas

Además de las neurotoxinas, las citolisinas han sido de gran interés desde 1970, Hessinger y Lenhoff (1973) descubrieron una interesante citolisina en el veneno de los nematocistos de *Aiptasia pallida*; fue el primer reporte de la existencia de una fosfolipasa A en venenos de cnidarios, junto con un factor proteico lítico indirecto el veneno de *Aiptasia pallida* es hemolítico y se convirtió en el primer representante de las ahora conocidas actiporinas, un grupo de citolisinas de las cuales han sido

aisladas la equinantoxina llamada después A. equina debido a su fuente (Hessinger y Lenhoff, 1973; Turk y Kem, 2009). Devlin (1974) reportó potentes proteínas hemolíticas presentes en la anémona *Stichodactyla helianthus*, esta hemólisis fue estudiada con detalle por Bernheimer y Avigad en 1976, quienes descubrieron la afinidad con la esfingomielina de esta toxina y demostraron que la presencia de este lípido era imprescindible para la permeabilidad citolítica de las células y liposomas. Pronto se observó que la toxina forma canales iónicos artificiales en las membranas celulares (Bernheimer y Avigad, 1976; Devlin, 1974; Michaels, 1979). Desafortunadamente un importante fragmento del péptido hidrofóbico cerca del N-terminal se pierde durante la purificación por HPLC, la parte que se perdió de la secuencia se pudo evidenciar después mediante análisis de espectrometría de masas mostrando que la citolisina III de Stoichactis es la misma que sticholisina II (Stevens et al., 2002).

Algunos venenos de las clases scifozoa, cubozoa e hidrozoa muestran actividad citolítica, incluyendo hemólisis, y propiedades despolarizantes de la membrana celular (Burnett y Calton, 1977; Keen, 1969; Kihara et al., 1988; Kleinhaus et al., 1973; Walker, 1977); sin embargo, la purificación es muy difícil y esto ha retrasado la investigación científica, especialmente de los extractos crudos tentaculares; pero gracias a los métodos de centrifugación por gradiente de densidad, se ha podido purificar al menos pequeñas cantidades de diferentes nematocistos (Turk y Kem, 2009).

9.2.5 Toxinas de cnidarios con actividad de fosfolipasa A_2

Existen recientemente descripciones a detalle de que toxinas de cnidarios tienen actividad enzimática como la fosfolipasa A_2 (PLA2) y que se encuentra en venenos de organismos pertenecientes a las clases Anthozoa, Cubozoa, Hydrozoa y Scyphozoa, pero en mayores concentraciones en el coral de fuego *Mllepora sp*., *Pocillopora damocornis*, *Adamsia carciniopados* y en los tentáculos de la medusa *Chironex fleckeri*. Algunas enzimas PLA2 poseen actividad hemolítica y citolítica (Nevalainen et al., 2004) pero existe escasa o nula información sobre el efecto *in vivo* de estas fosfolipasas en mamíferos (Suput, 2009).

9.3 METODOLOGÍA

9.3.1 Obtención de ejemplares

Para la colecta de medusas se realizaron muestreos en el mes de marzo y julio del 2014 a la laguna Mandinga. Las medusas se detectaron visualmente en la superficie del agua y fueron capturadas manualmente mediante redes de mango largo de 0.05 mm de haz de malla. Las medusas fueron procesadas al momento de su colecta cortando los tentáculos del margen tentacular y colocándolos en agua con la salinidad del agua de la colecta y manteniéndolos a 4 ºC hasta su posterior procesamiento (Figura 26).

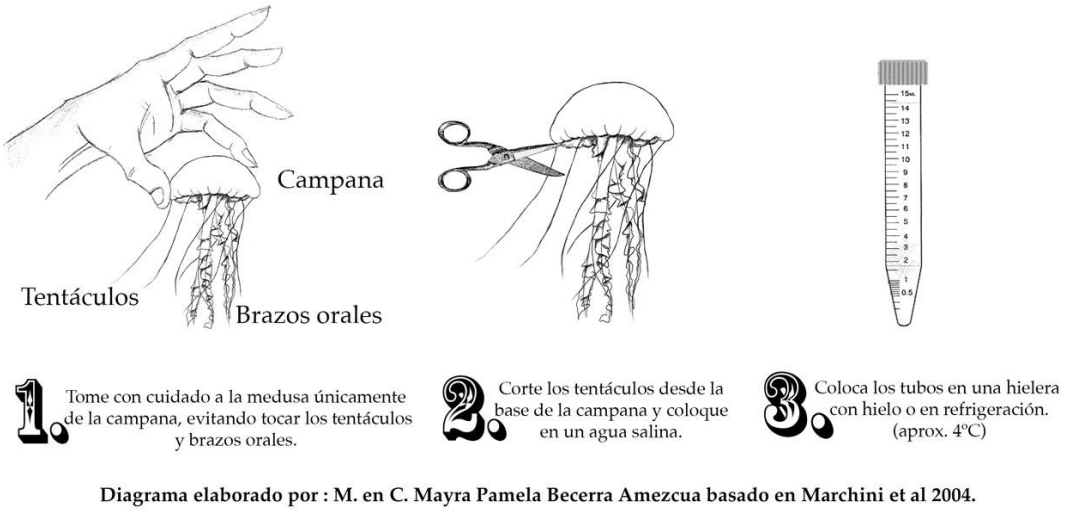


Figura 26. *Esquema general de procesamiento de medusas para extracción de veneno.*

9.3.2 Extracción de nematocistos

A los tentáculos almacenados a 4 °C se les realizó filtraciones con un haz de malla de 50 μm y recambios de agua cada semana hasta que se observó, bajo análisis en microscopio óptico, una gran cantidad de nematocistos libres de acuerdo con lo reportado por Bloom et al. (1998).

Para limpiar los nematocistos y eliminar restos celulares, se utilizó la técnica reportada por Marchini et al. (2004), generando gradientes discontinuos de Percoll marca Sigma-Aldrich; para el Percoll pesado se utilizó 88% de Percoll con 12% agua salina (28 ‰) y para el Percoll ligero se utilizó 26% de Percoll y 74% de agua salina, sobre este se colocó 2 ml de la muestra de nematocistos y se centrifugó a 48 000 x *g* a 4 °C por 15 min. Se tomaron fracciones de 1 ml para ser analizadas en el microscopio y verificar la presencia de nematocistos; las fracciones identificadas con nematocistos fueron lavadas con agua salina para eliminar el Percoll, centrifugando

con las características anteriormente descritas en cada lavado (Figura 27). Después de limpiar los nematocistos se les realizó un conteo para determinar la cantidad total obtenida por cada tipo de nematocisto.

9.3.3 Preparación de veneno

Para la extracción del veneno se resuspendieron los nematocistos obtenidos por el gradiente de Percoll con 500 µl de amortiguador 20 mM de Fosfato de Sodio, 0.15 M de Cloruro de Sodio pH 6.7 frío (Brinkman et al., 2014), y la ruptura se realizó con perlas de vidrio de 0.5 mm Sigma-Aldrich X250465, en un homogenizador Sartorius Mikro-Dismembrador U a 2000 rpm por 1 min incubando en hielo 1 min y repitiendo el procedimiento de 5 a 8 veces hasta que se obtuvo el mayor porcentaje de ruptura, que se dedujo examinando por medio de microscopio óptico (Figura 27). La suspensión se limpio a través de centrifugación a 20000 x *g* a 4 °C por 20 min (Ávila-Soria, 2009; Bloom et al., 1998; Brinkman y Burnell, 2008).

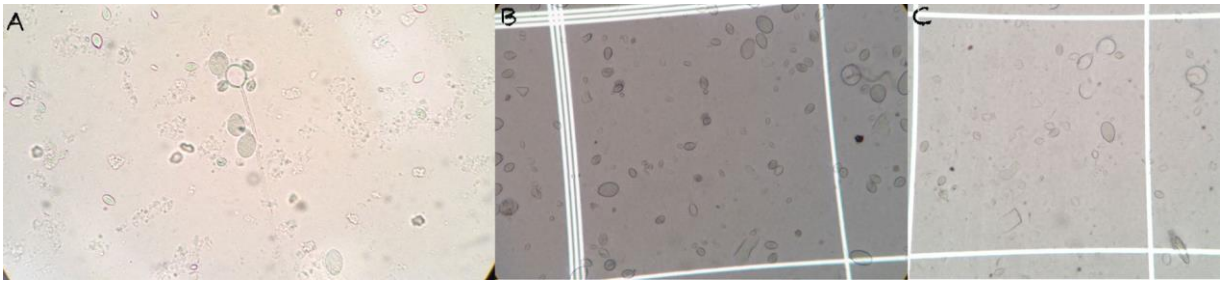


Figura 27. *Procesamiento de nematocistos para obtención de veneno.*

A) Nematocistos con restos celulares, B) Nematocistos limpios después de gradiente de Percoll, y C) Ruptura de nematocistos con perlas de vidrio.

9.3.4 Cuantificación de Proteínas por el método de Lowry

La cuantificación de proteínas se llevo a cabo mediante la técnica reportada por Lowry et al. (1951) de la siguiente manera: En 10 tubos para microcentrífuga se colocaron por duplicado una alícuota de albúmina 0.5 mg/ml del suero bovino (BSA) (0, 10, 20, 30 y 40 µl) y se llevó a un volumen final de 200 µl con la solución de extracción de proteínas anteriormente descritas. Se le adicionó a cada tubo 20 µl de desoxicolato de sodio 0.15% y se mezcló con ayuda de un vortex, se dejaron reposar los tubos por 10 min a temperatura ambiente y se adicionó a cada uno 20 µl de TCA y se mezcló. Se centrifugaron los tubos por 15 min a 3000 x *g*, decantando el sobrenadante.

Se disolvió el botón de proteína en 200 µl solución amortiguadora usada en la extracción de veneno (sección 9.3.3), adicionando 200 µl también a los tubos blancos. Se adicionaron 200 µl de la solución CTC, se mezcló y se dejó reposar por 10 min, se agregaron 100 µl de Folin-Ciocalteu al 20%, inmediatamente se mezcló y se dejó reposar por 30 min. Se determinó la concentración con una curva estándar leyendo la absorbencia con una longitud de onda de 750 nm.

9.3.5 Análisis *in vivo* de toxinas de Chrysaora sp.

9.3.5.1 Mantenimiento de organismos

Peces zebra *Danio rerio* fueron aclimatados en condiciones de laboratorio durante 8 semanas antes del experimento (longitud total 2.6±0.09 cm, peso 0.3±0.07 g). La densidad media de los peces en el acuario fue uno por 2 L, el agua tuvo aeración mecánica y sistema de filtración biológico (Power Filter DoPhin H300 (430 L/H)). El

50% del agua del acuario fue manualmente renovada cada 2 semanas. El acuario se mantuvo con un fotoperiodo de 12 hrs luz 12 hrs oscuridad y una temperatura de 27 ºC. Los peces fueron alimentados con alimento seco (flaky Wardley) tres veces al día mediante un alimentador automático.

9.3.5.2 Ensayo de Toxicidad

Peces juveniles *D. rerio* fueron inyectados vía intraperitoneal con cinco concentraciones de veneno (2, 20, 200, 400 y 500 µg/g) basándonos en la metodología reportada por Kinkel et al. (2010) y con una concentración (0.5 µg/g) de manera subcutánea de acuerdo con Cheung et al. (2014). El grupo control fue inyectado con solución amortiguadora de extracción. Después de la inyección los signos, síntomas y mortalidad fueron cuidadosamente observados y registrados cada 6 hrs por 24 hrs.

9.3.5.3 Análisis histopatológico y de morfología de los eritrocitos

El efecto del veneno de *Chrysaora sp.* sobre tejidos fue determinado después de 24 hrs de exposición y en el caso de las concentraciones más altas (400 y 500 µg/g) y de los peces inyectados subcutáneamente inmediatamente después de la inyección. Los peces fueron capturados y anestesiados en agua a 4 ºC para la extracción de sangre (Pedroso et al., 2012); y fueron inmediatamente sacrificados de acuerdo con las guías éticas usada por el programa de investigación intramural (NIH por sus siglas en inglés) (http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/zebrafish.pdf). Las muestras de tejido fueron fijadas en solución de Davidson´s a temperatura ambiente por 9 días para posteriormente ser embebidos en parafina en un procesador de

tejidos (TP 1020, Leica Microsystems). Los bloques de parafina fueron elaborados en un módulo con parafina caliente (EG 1140h, Leica Microsystem).

Cortes longitudinales de 5 µm fueron realizados con un micrótomo (Mocrotom HM 315) acoplado a un sistema de transferencia de tejidos con un baño caliente a 50 ºC. Las secciones fueron montadas en portaobjetos de vidrio y teñidos con Hematoxilina-Eosina (Guzmán-García et al., 2009). Todas las secciones patológicas fueron examinadas por microscopio óptico. Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos heparinizados (Pedroso et al., 2012), los frotis sanguíneos, uno por individuo, fueron realizados con sangre fresca, fijados con etanol 100% y teñidos con colorante Giemsa, las células sanguíneas fueron examinadas bajo inmersión y fotografiadas.

9.3.6 Análisis *in vitro*

9.3.6.1 Ensayo hemolítico

La actividad hemolítica fue medida usando eritrocitos de *Cyprinus carpio* y humanos tipo A, B y O. Aproximadamente 1 ml de sangre de pez, mediante punción venosa caudal, fue colectada de cada pez (4 peces, peso 80g±22 g), los cuales fueron anestesiados con 0.001% de benzocaína y 3 ml de sangre humana fue obtenida usando una aguja heparinizada mediante punción venosa.

El ensayo fue realizado de acuerdo con lo reportado por Young et al. (1986): la sangre fue lavada tres veces con solución salina de fosfatos (PBS) con 1% de gelatina bacteriológica, centrifugando cada vez a 2500 x *g* por 15 min. Después de los lavados se hizo una dilución 1:100 para el conteo de eritrocitos en una cámara de Neubauer.

Para generar la curva de calibración se colocaron 5 ml con $6x10^7$ eritrocitos/ml para romperlos en un sonicador Branson 350 con una fuerza de 70 W por 4 min y se mezclaron en proporciones crecientes con eritrocitos sin sonicar para realizar la curva de calibración con 0, 25, 50, 75 y 100% de hemólisis, por triplicado.

Alícuotas de células (200 µl) se colocaron un una microplaca de 96 pocillos de fondo plano adicionando diferentes concentraciones de extracto crudo de *Chrysaora sp.* por pozo, para comprobar sensibilidad de eritrocitos humanos fue colocado 20 µg de veneno a cada tipo sanguíneo, y posteriormente a los eritrocitos más sensibles y a los de peces fueron colocados 0, 10, 20, 30, 40 y 60 µg de veneno a cada pozo, como control positivo de lisis se usó 10 µl detergente extrán neutro para lavado de material de laboratorio. La placa se incubó por 20 min a 37 ºC, se agitó con un vortex de placas por 2 min y se midió la absorbencia (abs) usando un lector de microplacas a 630 nm de longitud de onda; todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

9.3.6.2 Ensayo específico de fosfolipasa A_2

Para el análisis de la actividad específica de la enzima fosfolipasa A_2 se llevó a cabo la metodología reportada por Jiménez et al. (2003) de la siguiente manera: para la preparación del sustrato se colocaron alícuotas de dilinoleoyl fosfatidilcolina en cloroformo (25 mg/ml) secadas con N_2, se agregó rápidamente un buffer de TRIS-HCl 50 mM pH 8.5 con desoxicolato de sodio 10 mM hasta tener una concentración final de 1.3 mM de dilinoleoyl fosfatidilcolina (DL-PC) y se llevó a equilibrio por 10 min a 25 °C.

Para el ensayo, la reacción estándar media (1 ml) contenía como amortiguador TRIS-HCl 50 mM, pH 8.5 con 3 mM de desoxicolato de sodio, 65 μM de DL-PC, 0.23 μg/ml de lipoxigenasa como enzima acopladora y 0.25 μg/ml de fosfolipasa A_2 (Fosfolipasa A_2 de Páncreas bovino, Sigma, P8913). La reacción comenzó cuando se agregó la fosfolipasa A_2 al medio y fue seguida con un espectrofotómetro por el incremento en la absorbencia a 234 nm por 30 min. Se colocaron controles negativos tanto para la fosfolipasa A_2 como para la enzima de acoplamiento (lipoxigenasa), todos los tubos fueron medidos por triplicado, para en análisis de actividad se colocó 143 μg/ml de veneno de serpiente *Borthrops asper* donado por Birmex S.A. de C.V. como un control positivo, al igual que 0.25 µg/ml de fosfolipasa A_2 de páncreas bovino (Sigma P8913) y 5 μg/ml del veneno de *Chrysaora sp*.

Las unidades de actividad se obtuvieron mediante lo reportado por Bonilla y Zavaleta (1997) por la siguiente fórmula:

$$UEF = \frac{UF}{\mu g\ de\ proteína}$$

Donde

$$UF = \frac{(Abs.60 - Abs.0)x\ 1000}{tiempo\ (50\ \mathrm{min})}$$

9.3.6.2 Análisis de los datos

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, la media y la desviación estándar fueron determinados para todos los parámetros y expresados como la media ± DS (desviación estándar). Los datos fueron analizados empleando pruebas de normalidad, así como, pruebas T-student para diferencias entre número de nematocistos obtenidos para cada uno de los muestreos, pruebas de varianza de una vía (ANOVA) y prueba de menos diferencia significativa de Fisher para comparaciones múltiples para la comparación de sensibilidades de los diferentes tratamientos. Todos los análisis fueron realizados en el programa estadístico IBM SPSSStatistics versión 20, con un valor de significancia de 0.05.

9.4 RESULTADOS

9.4.1 Extracción de nematocistos

Las diferencias obtenidas en el número de nematocistos obtenidos en las técnicas utilizadas se representan en la Figura 28, en donde se observa que el número de nematocistos por medusa fue mayor en el primer muestreo que en el último, aunque las medusas corresponden a la misma época y por lo tanto tamaño de la campana, lo que indica que el tamaño no se relaciona con el número de nematocistos sino con el método de extracción.

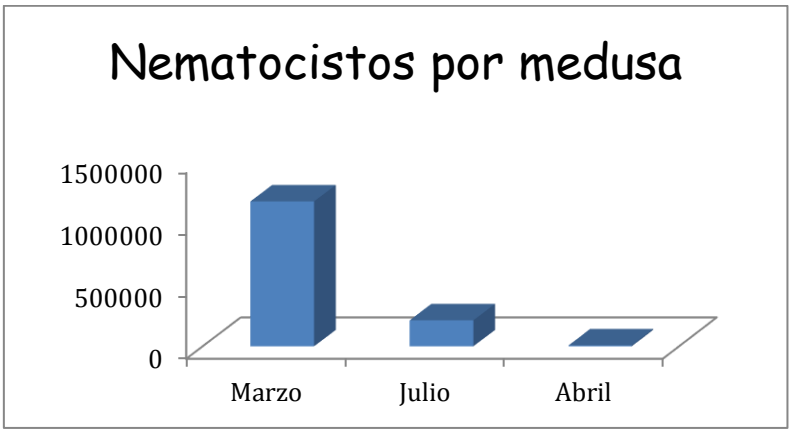


Figura 28. *Cantidad de nematocistos obtenidos por colecta.*

En las extracciones también se pudo observar que el nematocisto que se encuentra en mayor porcentaje es *Heterotritrichous microbasic*, seguido de *Holotrichous a-isorhiza*, *Holotrichous A-isorhiza*, y *Holotrichous O-isorhiza* (Figura 29), lo que representa que la toxicidad de esta medusa podría corresponder principalmente al nematocisto *Heterotrichous microbasic*.

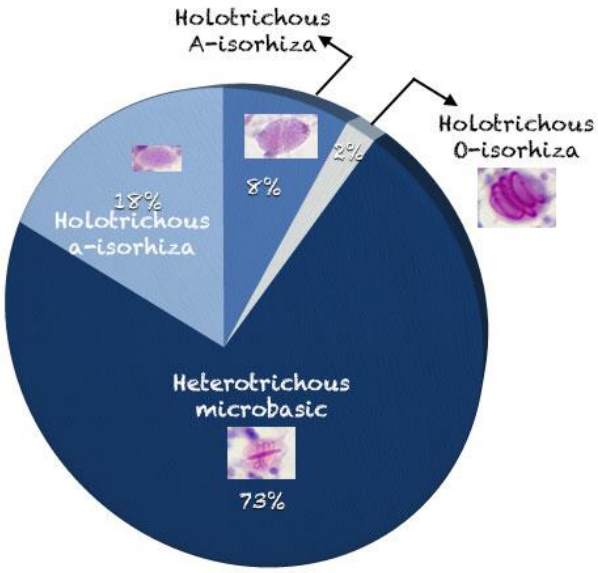


Figura 29. *Porcentaje de tipos de nematocistos presentes en la medusa Chrysaora sp.*

9.4.2 Efectos del extracto crudo de *Chrysaora sp.* en *D. rerio*

El efecto más representativo del veneno de esta medusa sobre este modelo biológico es la aparición de hemorragia ocular después de aplicar 200, 400 y 500 µg/g vía intraperitoneal y en la inyección subcutánea (0.5 µg/g) (Figura 30); en el caso de la dosis de 200 µg/g este efecto desapareció completamente después de 24 hr. Por otro lado, la inyección subcutánea también mostró convulsiones y parálisis en las aletas anal, pectoral, dorsal y caudal, lo que hizo que el pez no pudiera nadar con normalidad, no oxigenaron sus branquias y por lo tanto murieron (66%), en el caso de los peces que no murieron la parálisis desapareció después de pocos segundos. Los peces inyectados con la dosis de 2 y 20 µg/g vía intraperitoneal no mostraron efectos aparentes.

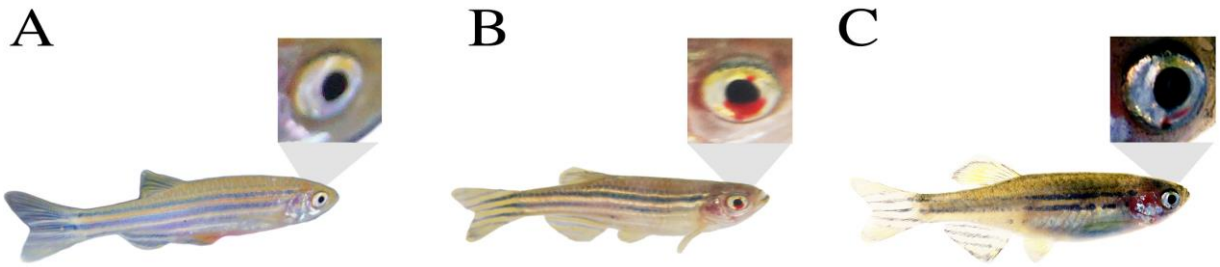


Figura 30. *Hemorragia causada por el veneno de la medusa Chrysaora sp. en el pez cebra. Fotografías de Saúl López Vite.*

9.4.3 Análisis histopatológico y de morfología de eritrocitos

El análisis histopatológico mostró que este veneno en el pez cebra causa principalmente disturbios en la circulación y la principal estructura afectada es la pseudobranquia, que se deriva del primer arco branquial y se localiza por detrás del

opérculo, esta compuesta por lamelas branquiales, tejido conectivo y filas paralelas de vasos sanguíneos; esta estructura presentó hiperemia (exceso de sangre en un sitio) en muchas áreas y en todas las dosis aplicadas, tanto intraperitoneal como subcutáneamente (Figura 31 A y B).

La branquia también fue afectada, ésta estructura contiene un soporte central para los filamentos branquiales o lamelas primarias y numerosas lamelas secundarias; el tejido presenta hiperplasia (un incremento en el número de células) e hipertrofia (un incremento en el tamaño celular), lo que hace que el tejido epitelial se una en las lamelas secundarias, este efecto fue observado sólo en la aplicación de dosis más altas (200, 400 y 500 µg/g) (Figura 31 C y D).

El hígado fue afectado sólo cuando se aplicó la dosis más alta (500 µg/g) mostrando hiperemia en algunos sitios, también se puede apreciar en la Figura 31E el hígado control con hepatocitos poligonales con sinusoides y la vena principal con eritrocitos.

En los frotis sanguíneos principalmente fueron observados eritrocitos con equinocitocis (hematíes con espículas), este efecto fue observado en todas las dosis aplicadas vía intraperitoneal (Figura 32B); también se observó hemólisis (un incremento en el tamaño del núcleo) presentado en todas las dosis aprox. 1.4% de las células presentaron este efecto en dosis pequeñas (2 y 20 µg/g) y 15.6% en la aplicación de dosis altas (200, 400 y 500 µg/g) (Figura 32C). En el caso de los peces analizados después de 24 hrs de ser inyectados también se observó poiquilocitocis (presencia anormal en la forma de los eritrocitos) (Figura 32D)

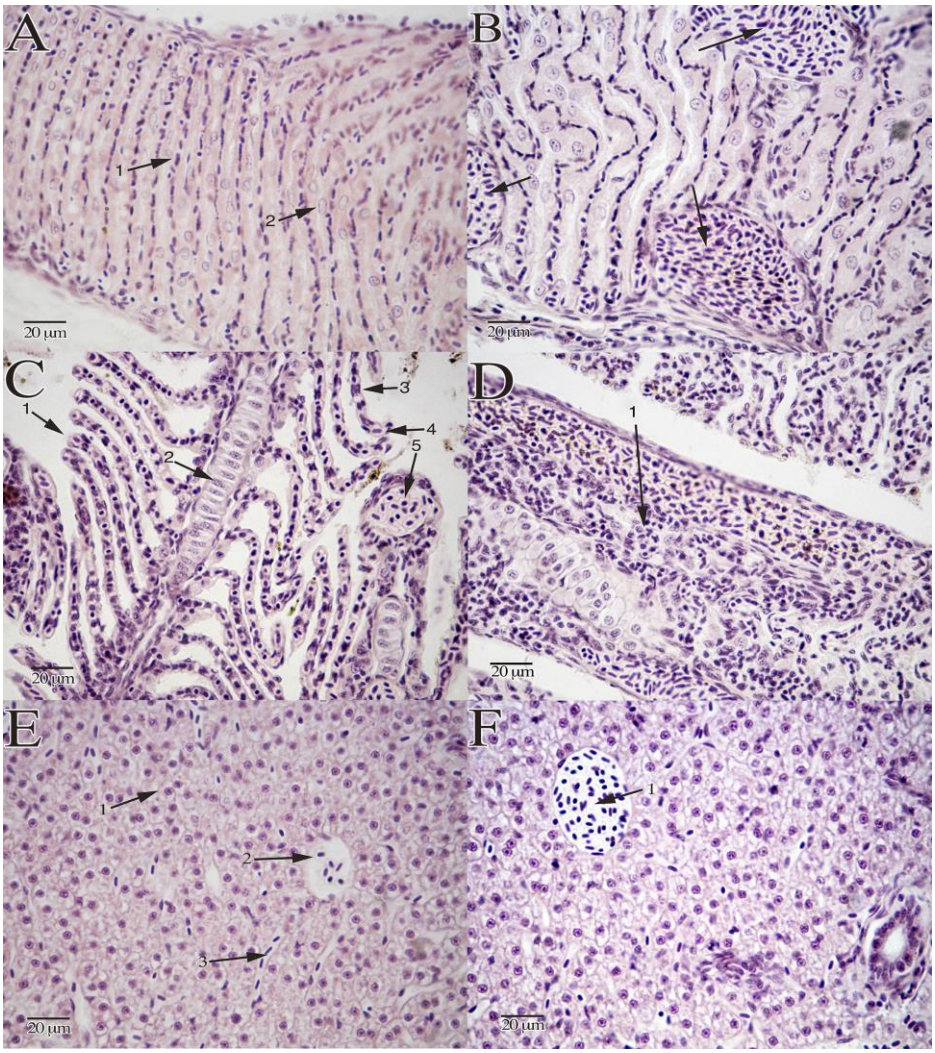


Figura 31. *Efectos histológicos causados por el veneno de la medusa Chrysaora sp. en pez Danio rerio.*

(A) Pseudobranquia control con eritrocitos (1) y células epiteliales (2) (B) Hipertermia encontrada en las dosis altas (flechas) (microfotografía de organismo inyectado con 500 µg/g) (C) Branquia control con lamelas secundarias (1), tejido cartilaginoso (2), células pilares (3), eritrocitos en lúmenes capilares (4) y vasos arteriales (5) (D) Fusión de lamelas branquiales por hiperplasia e hipertrofia (1) en el epitelio de la branquia (microfotografía de organismo inyectado con 400 µg/g) (E) Hígado control con hepatocitos (1), la vena principal (2) y los sinusoides con eritrocitos (3) (F) Hiperemia (1) sólo en la dosis de 500 µg/g.

Células binucleadas (células que contienen dos núcleos primarios) y cromatina condensada (células que exhiben un patrón nuclear moteado) (Figura 32E). Los organismos inyectados subcutáneamente no mostraron algún efecto sobre los eritrocitos.

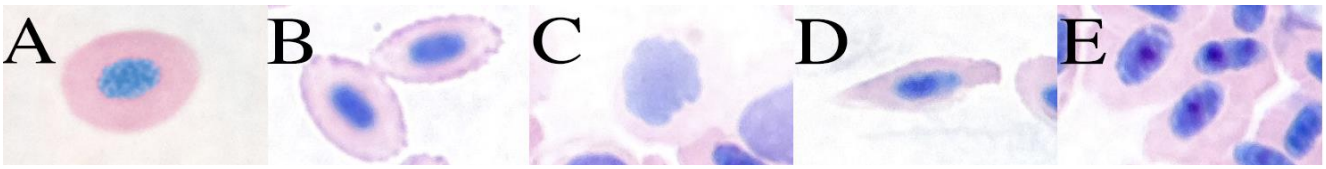


Figura 32. *Principales efectos observados en eritrocitos de peces cebra.*

A) Eritrocitos control, B) Equinocitos, C) Hemólisis, D) Poiquilocitosis y E) Anormalidades nucleares.

9.4.4 Ensayo hemolítico *In vitro*

En el ensayo hemolítico se obtuvo que el veneno de esta medusa tiene una hemólisis de 23% para el tipo B, seguido del tipo O con 14%, y siendo el más resistente el tipo A con 9% al aplicar 20 µg (Figura 33). Haciendo al grupo B estadísticamente más sensible que los otros dos tipos según la prueba ANOVA. También se realizó una prueba de sensibilidad entre eritrocitos humanos más sensibles (tipo B) y eritrocitos de peces, obteniendo que los de peces son estadísticamente más sensibles, resultados observados en la Figura 33 según la prueba de Fisher, se muestra de la misma manera la curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones de veneno en eritrocitos de peces en la Figura 34.

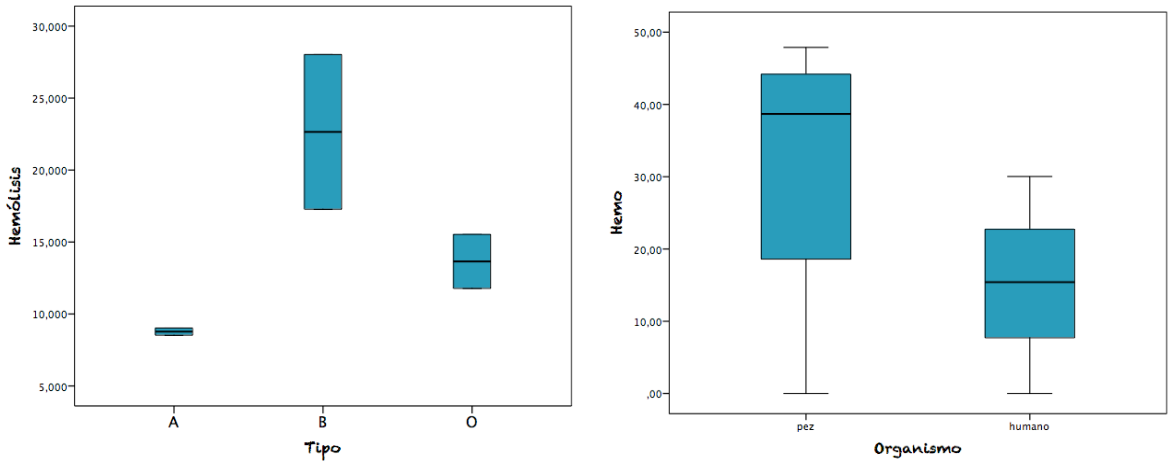


Figura 33. *Diferencias entre la hemólisis causada por el veneno de la medusa Chrysaora sp. en diferentes grupos sanguíneos humanos y en eritrocitos de peces.*

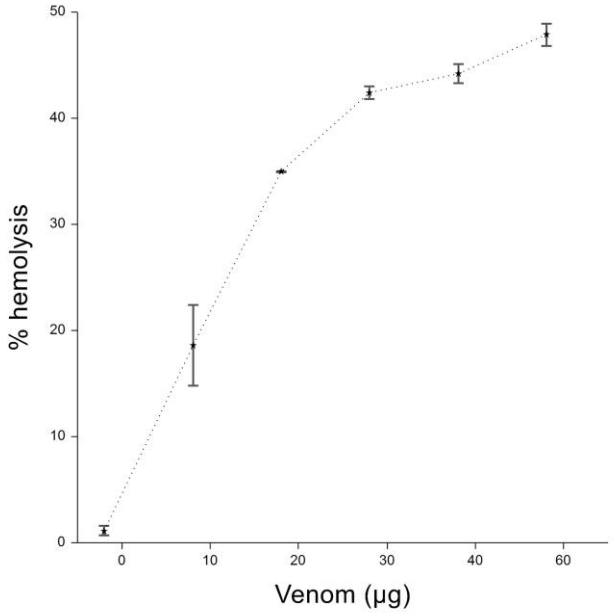


Figura 34. *Curva dosis-respuesta de la actividad hemolítica en eritrocitos de peces.*

9.4.5 Ensayo de actividad de fosfolipasa A_2 (PLA2)

Durante la realización del ensayo específico para fosfolipasa A_2 se observó que la medusa *Chrysaora sp.* presenta 596±0.03 U/mg, mientras que el veneno de serpiente *Bothrops asper* muestra 62±0.34 U/mg.

9.5 DISCUSIÓN

El método de extracción de nematocistos reportado por Bloom et al. (1998) fue el adecuado ya que para esta especie se obtuvieron nematocistos libres sin ningún tipo de contaminación, este método de obtención de veneno ha sido adoptado por varios autores como un método reproducible y rápido (Bailey et al., 2005; Carrette y Seymour, 2004; Kintner et al., 2005; Ramasamy et al., 2003; Winter et al., 2007); sin embargo, el número de nematocistos obtenidos en las colectas cambió principalmente a que los gradientes de Percoll realizados en el primer muestreo fueron realizados con más velocidad de centrifugación (48 000 x *g)* en una ultracentrífuga, esto ayudó a que los nematocistos quedarán limpios usando únicamente una centrifugación; con menos velocidad como indica Brinkman (2008), fue necesario realizar mayor número de centrifugaciones para que quedarán limpios lo que hizo que se perdiera mayor cantidad, además otro aspecto importante a considerar es que entre más fresca esta la muestra es más fácil quitar los tentáculos del margen tentacular y por lo tanto, obtener una mayor cantidad de nematocistos.

Por otro lado, encontramos en el conteo que el tipo de nematocisto que se encuentra en mayor porcentaje es el *heterotrichous microbasic* que concuerda con los resultados del análisis del cnidoma de esta medusa por medio de histología (Sección

7 Capítulo 2), lo que podría significar que la toxicidad de la medusa esta dada principalmente por este tipo de nematocisto, sin embargo, hay que realizar más estudios en esta especie para comprobarlo, en otros estudios relacionan la presencia de la mayor cantidad de nematocistos del tipo *mastigophores* en el cnidoma de *Chironex fleckeri* con la mayor fracción tóxica del veneno que actúa en vertebrados (McClounan y Seymour, 2012).

En términos de toxicidad, el entendimiento de los mecanismos tóxicos en modelos *in vivo* podría ayudar al desarrollo de mejores tratamientos contra envenenamientos de cnidarios, adicionalmente, las recientes investigaciones de los efectos de toxinas de cnidarios en modelos *in vivo* son escasos en comparación con los estudios a nivel celular y molecular (Suput, 2009). Aunque existen reportes de la actividad hemolítica relacionada con los envenenamientos de la medusa *Chrysaora sp.*, este es el primer estudio que describe estos efectos en un modelo *in vivo*, que se ha convertido en una herramienta muy útil para entender los diferentes mecanismos de toxicidad, sobre todo de medusas que se encuentran en nuestro país.

El estudio realizado por Li et al. (2014) es un análisis a profundidad de la toxicidad *in vivo* del veneno de la medusa *Stomolophus meleagris* en ratones, la dosis letal media (DL_{50}) fue de 2.92 µg/g y causó inflamación glomerular renal, estenosis de la vesícula renal, dilatación de los túbulos renales, dilatación de la vena sinusoide hepática, edema pulmonar y derrame pleural maligno. El análisis patológico mostró que le riñón y el hígado fueron dañados significativamente pero el corazón, el bazo y el estómago no tenían cambios observables; los ratones también mostraron

convulsiones, sangrado de la boca, piloerección, disnea y muerte. Lo que contrasta con este estudio en términos de toxicidad ya que no encontramos otro síntoma más que la aparición de sangrado ocular en el ojo del pez por ambas vías; la principal diferencia entre la inyección subcutánea e intraperitoneal es la muerte incluso en dosis bajas (0.5 µg/g), esto se debe posiblemente que mediante esta vía de administración, el veneno entra rápidamente en contacto en el sistema nervioso, causando parálisis en las aletas, lo que impidió que el pez pueda nadar y las branquias no se oxigenaron, por lo tanto muere; esto nos da información importante acerca de las toxinas presentes en este veneno, ya que estos efectos (convulsiones y parálisis) indican la presencia de neurotoxinas; efectos observados también en este modelo con otras neurotoxinas (Baraban et al., 2005; Tiedeken et al., 2005), sin embargo la inyección intraperitoneal nos brinda también información importante sobre los posibles blancos moleculares como en este caso las células branquiales y hepáticas.

La función de la pseudobranquia aún es desconocida pero varios estudios sugieren que tiene muchas funciones en la respiración, osmoregulación y funciones sensoriales (Rahim et al., 2014). La principal teoría es que regula la presión sanguínea ocular, suministrándole sangre al ojo por medio de circulación arterial (Parry y Holliday, 1960); esto explicaría la relación de la hemorragia ocular encontrada y la hiperemia observada en la pseudobranquia.

El análisis histopatológico demostró que el veneno de la medusa *Chrysaora sp.* causa disturbios en la circulación como la presencia de hiperemia en la

pseudobranquia y el hígado, así como hiperplasia e hipertrofia en la branquia. La hiperemia es causada en respuesta a un vasodilatador químico y la hiperplasia e hipertrofia por una irritación química (Morrison et al., 2007), que de acuerdo con lo reportado por Flores-Lopes y Thomaz (2011) son daños que pertenecen al estado I y II de la clasificación de daños de los estados progresivos en los tejidos; esto indica que los tejidos funcionan normalmente y los daños son completamente reversibles en estas etapas. Los efectos encontrados en este estudio difieren a lo reportado por Muhvich et al. (1991), donde los principales órganos afectados fueron el hígado y el riñón presentando necrosis, sin embargo, en este estudio presentamos efectos subletales, razón por la cual al aumentar la dosis podríamos ver los mismos efectos.

Existen pocos estudios que examinan los efectos del veneno de medusas sobre peces; en un estudio elaborado por Kintner et al. (2005) reporta la mortalidad, pero no analiza los efectos de toxicidad, en este trabajo la dosis letal fue de 60.37 µg/g para la medusa *Chiropsalmus sp.* y de 2.2 µg/g para *Chironex fleckeri*, esto demuestra que la medusa *Chrysaora sp.* es menos venenosa que estas dos medusas, sin embargo, otros estudios reportan la dosis letal de esta especie en ratones que es de 0.2 µg/g (Suganthi et al., 2012) y 0.37 µg/g (Radwan et al., 2000); estas diferencias pueden estar dadas porque esta especie sea una especie críptica como se ha observado en otras medusas (Dawson y Jacobs, 2001; Holland et al., 2004) o la identificación taxonómica no es correcta, ya que los estudios taxonómicos en las escifomedusas aún es controversial (Bayha et al., 2010).

La equinocitosis encontrada puede estar relacionada por la acción de una PLA2

presente en el veneno, como en otros venenos de serpientes (Walton et al., 1997); esta actividad no esta reportada para esta medusa, sin embargo el análisis de actividad de PLA2 muestra que tiene mayor actividad que el veneno de serpiente *Borthrops asper;* este efecto también es observado en todos los eritrocitos lo que demuestra que la hemólisis observada puede estar relacionada con la acción indirecta de una PLA2. La equinocitosis ha sido clasificada en tres tipos de acuerdo con la etapa de progresión: tipo I con orillas irregulares u onduladas sin la presencia definida de espículas, tipo II con múltiples proyecciones desafiladas y tipo III con muchas proyecciones de membrana finas uniformemente espaciadas. Con las dosis aplicadas (2-500 µg/g) sólo se observó equinocitosis tipo I y II.

La presencia de poiquilocitosis habla de daño en el hígado (Harvey, 2012), lo cual concuerda con lo observado en el análisis histopatológico, sin embargo como es un daño reversible es posible que este efecto desaparezca, si el animal se recupera completamente de la picadura. Las células binucleadas por otro lado, están asociadas con la interferencia en el proceso final de división celular y cromatina condensada con etapas tempranas de la apoptosis por lo que esto no es concluyente (Torres-Bugarín et al., 2013).

Los eritrocitos humanos son más sensibles que los humanos pero también con los de otros animales, ya que se ha reportado que el veneno de esta medusa causa el 50% de hemólisis en eritrocitos de cerdo con una dosis de 150 µg/ml (Long-Rowe y Burnett, 1994), mientras que en peces sólo fue necesario 60 µg/ml para provocar el mismo efecto; la hemólisis producida *in vivo* e *in vitro* difieren considerablemente

porque los modelos *in vitro* no pueden mimetizar las interacciones complejas que suceden en los modelos *in vivo* como la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los componentes (Evans, 2008).

10 CAPITULO 5. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL VENENO DE LA MEDUSA *CHRYSAORA SP.*

10.1 INTRODUCCIÓN

Los venenos de cnidarios son hidrofóbicos, relativamente termolábiles, y tienen la habilidad de agregarse o degradarse especialmente bajo condiciones *in vitro* (Othman y Burnett, 1990; Williamson et al., 1996); además de que la toxicidad decrece durante la purificación, almacenaje y concentración de la muestra, por lo que determinar las condiciones ópticas para estos procedimientos es fundamental para poder caracterizar adecuadamente los componentes del veneno; por ejemplo las muestras de veneno de la medusa *Carybdea rastoni* pueden ser almacenadas con una alta concentración de sales (0.8 M de NaCl) en una solución amortiguadora de fosfatos 5 mM (pH 6) a 4 ºC y el 90% de la actividad hemolítica puede ser retenida por más de 6 meses de almacenaje (Nagai, 2003).

Por esta razón la purificación de sus componentes y su descripción es complicada, pero las herramientas tecnológicas de la actualidad han permitido separar algunas toxinas importantes y secuenciarlas por su código genético (Brinkman y Burnell, 2009). El aprovechamiento protéomico ha sido utilizado para identificar y secuenciar una mayor cantidad de proteínas de los nematocistos de algunas medusas realizando un análisis computacional de la secuencia de aminoácidos para identificar

su posible estructura, función y mecanismos de acción (Brinkman y Burnell, 2007; Weston et al., 2013).

10.2 ANTECEDENTES

10.2.1 Estudios del veneno de la medusa *Chrysaora sp*.

Del veneno de esta medusa se han encontrado hemolisinas de masa molecular mayor a 6 kDa pero menor a 10 kDa, con 4.5 unidades de actividad, inhibidas por glicoforinas (Long y Burnett, 1989). Se ha detectado actividad de hialuronidasa que es activa en un rango de pH de 4 a 9, con un punto isoeléctrico entre 9.5 y 10.2, en este estudio también se comprobó que su veneno hemoliza más a eritrocitos de ratas y cerdos, con un pH óptimo para la hemólisis de 8.3 (Long-Rowe y Burnett, 1994). En un estudio se reportó la toxicidad de este veneno en hepatocitos de rata midiendo el porcentaje de lactado deshidrogenasa y detectando que no produce poros membranales (Houck et al., 1996). Se ha purificado el veneno por medio de electroforesis capilar en donde se encontró que las proteínas de bajo peso molecular son las que producen hemólisis (Bloom et al., 2001). Produce muerte en peces de la especie *Adina xenica* cuando es inyectado por vía intraperitoneal, la actividad es termoestable (Ishikawa et al., 2004). Un estudio reciente indica que el veneno de esta especie tiene propiedades antioxidantes, también hacen una purificación parcial del veneno pero no llegan a la elucidación estructural de la proteína (Suganthi et al., 2012).

10.3 METODOLOGÍA

10.3.1 Obtención de veneno

El veneno fue obtenido mediante la metodología reportada en la sección 9.3.2, 9.3.3 y 9.3.4; excepto que para el fraccionamiento parcial con la columna de intercambio iónico de fuerza aniónica (Bio-Scale^{TM} Mini UNOsphere^{TM} Q) se utilizó como solución amortiguadora de extracción 25 mM de ácido 2-(N-morpholino) ethanesulfulfonic (MES), 100 mM de Cloruro de Sodio (NaCl) pH 7.4; y cómo no se tuvo una buena solubilidad de proteínas se resuspendieron en una solución 20 mM de Tris-HCl, 1% tritón pH 8. Para la columna de fuerza catiónica (Bio-Scale^{TM} Mini UNOsphere^{TM} S) se utilizó por otro lado la misma solución amortiguadora de extracción reportada en la sección 9.3.3 pero posteriormente se realizó una diálisis con una membrana de celulosa para eliminar las sales con una solución amortiguadora 0.20 mM de ácido acético pH 5, durante toda la noche a 4 ºC. Todos los procedimientos descritos en este capítulo fueron realizados con extractos frescos.

10.3.2 Fraccionamiento parcial del extracto crudo mediante columnas de intercambio iónico

Para la preparación de la columna de fuerza aniónica se realizaron lavados con 6 ml de una solución amortiguadora de Tris-HCl 20 mM pH=8 y 15 ml de Tris-HCl 20 mM pH=8, NaCl 1 M; se equilibró con 15 ml de solución amortiguadora de baja salinidad (Tris-HCl 20 mM pH=8) y se inyectó 3 ml con aproximadamente 0.65 mg de extracto crudo, realizando un gradiente escalonado de salinidad (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 M de NaCl), se recuperaron fracciones de 1 ml y se medió la absorbencia a 280 nm. Para

la columna de fuerza catiónica se realizó el mismo procedimiento, pero con una solución amortiguadora de ácido acético 20 mM pH 5, con un gradiente escalonado de salinidad (0, 0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.50, 0.75, 1 M de NaCl).

10.3.3 Análisis de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Para realizar un análisis de las proteínas del extracto crudo, se realizó una electroforesis en gel con una concentración de poliacrilamida de 12%, preparado en condiciones nativas, así como desnaturalizantes (SDS) y reductoras (β-mercaptoetanol al 5%), de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Los geles fueron teñidos con plata y para el análisis por espectrometría de masas con azul de comassie coloidal.

10.3.4 Análisis de proteínas mediante electroforesis de dos dimensiones

Se realizó una precipitación de proteínas con acetona 100% y tres lavados con acetona 70% centrifugando a 13500 x *g* por 20 min a 4 ºC. La muestra precipitada se solubiliza y reduce en 125 μl de solución de rehidratación (Urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, anfolitos Bio lyte 1.2% (pH 3-10), DTT, azul de bromofenol 0.002%), la muestra (125 μl) fue aplicada a los geles en tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 7 cm, pH 3-10, se cubrieron con aceite mineral y se incubaron 24 hr a 20 ºC usando un Bio-Rad Protean de manera pasiva. Las tiras IPG fueron corridas a 250 V 20 min, 4000 V por 1 hr, 4000 V hasta 16000 V/h; después las proteínas fueron equilibradas 15 min en una solución de equilibrio I (6 M Urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% glicerol, 130 mM DTT) y 15 min en una solución de equilibrio II (6 M

Urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% glicerol, 135 mM yodoacetamida). Las tiras de gel fueron removidas de la solución de equilibrio y colocadas sobre un gel de poliacrilamida 12% para la segunda dimensión. Los geles fueron teñidos con plata.

10.3.5 Tinción de geles de electroforesis

La tinción de los geles de electroforesis fue realizada después de la fijación en una solución de 50% metanol 5% ácido acético durante toda la noche. La tinción de plata fue elaborada mediante el siguiente protocolo: los geles fueron lavados tres veces con agua mili-Q durante 15 min, posteriormente fueron incubados en una solución 0.02% de tiosulfato de sodio y enjuagados con agua mili-Q dos veces por 1 min, fueron incubados en una solución de plata (0.1% de $AgNO_3$, 0.028% de formaldehído 37%) por 1 hr en oscuridad, transcurrido el tiempo se desecha la solución de plata y se remplaza por una solución 2.4% de carbonato de sodio anhidro, 0.028% de formaldehído 37% y 0.0125% de tiosulfato de sodio 10% hasta que aparezcan puntos o bandas claramente visibles; para detener la reacción se descarta la solución anterior y se coloca una solución 4% Tris base, 2% ácido acético por 15 min, los geles fueron almacenados en agua mili-Q.

Para la tinción de comassie coloidal se lavó el gel con agua mili-Q 3 veces por 10 min, se incubó el gel en una solución 33% metanol, 17% sulfato amónico y 3% ácido fosfórico por 1 hr, se añadió a esta solución azul coomassie G-250 hasta que quedó una concentración final de 0.06% a partir de una solución de Coomassie 66% disuelta en metanol y se dejó toda la noche; finalmente se descartó la solución y se lavó con agua mili-Q hasta que el fondo quedó lo más claro posible.

10.3.6 Análisis de proteínas mediante espectrometría de masas

Proteínas del veneno (60 µg) fueron identificadas con un SDS-PAGE 12% en condiciones reductoras, teñido con azul de comassie coloidal, durante todo el proceso se tomaron medidas de limpieza exhaustivas para evitar contaminación por queratina. Las bandas más visibles (100, 50, 37 y 20 kDa) fueron cortadas, desteñidas con bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 50 mM-acetonitrilo 50%, y posteriormente cortadas en cubos de aprox. 1 mm^3 para realizar la reducción y alquilación en gel de las proteínas con 10 mM de DTT en 50 mM de NH_4HCO_3 y 50 mM de yodoacetamida en NH_4HCO_3; se deshidrataron los fragmentos de gel con 100% de acetonitrilo (CH_3CN) para realizar la digestión en gel con 12.5 ng/µl de tripsina grado proteómica (Sigma T6567) a 37 ºC toda la noche. La extracción de los péptidos trípticos se llevo a cabo con una solución 50% CH_3CN, 0.1% ácido trifluoroacético (TFA).

10.3.6.1 Obtención de Huellas peptídicas (MS)

Los péptidos trípticos fueron analizados en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Autoflex speed, Bruker, mediante la colocación de la muestra en una matriz de solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinamico en CH_3CN 35% y TFA 0.01%, se mezclaron 1:1 en la placa 4 µl y fueron colocados en dos pozos. Las huellas peptídicas fueron adquiridas en un rango de detección de 500 a 3500 Da, con una resolución de 5 GS/s, la adquisición fue de tipo reflector, con un voltaje de polaridad positiva, la calibración se realizó mediante un estuche (SIGMA, ProteomeMass™ Peptide and Protein MALDI-MS Calibration 1001663545), con un voltaje de ión de

19.13 kV y del reflector de 21.17 kV, con una supresión de la matriz de tipo deflexión y una detección base de 2500 V y una reflexión base de 1700 V.

10.3.6.2 Obtención de espectros de fragmentación (MS/MS)

De cada una de las huellas peptídicas se obtienen espectros de fragmentación de 5-10 masas, dependiendo de la muestra, con un rango de detección de 40 al ión precursor, con una resolución de 2.50 GS/s, el voltaje de ión fue de 6.05 kV y del reflector de 24.48 kV

10.3.6.3 Secuenciación De novo de péptidos por MS/MS

Como los resultados en las búsquedas de similitud de los espectros obtenidos no fueron significativos se realizó una secuenciación De novo para cada uno de los espectros MS/MS obtenidos, utilizando las reglas aplicadas para este tipo de secuenciación basadas en las observaciones del Profesor Donald F. Hunt y el Dr. Jeffrey Shabanowitz de la Universidad de Virginia en el software mMass, tomando en cuenta lo siguiente: como los péptidos se originaron a partir de digestión con tripsina, el ion 175 corresponde a R y 147 a K, en la mayoría de los casos se comenzó por el ión precursor hasta que se alcanzó el péptido terminal lo que indica una secuencia posiblemente correcta, para validar la secuencia se verificaron los iones mediante la fórmula: $(M+H)^{1+}$=y+b -1, y los iones **a** restando al ion **b** 28, así como los fragmentos internos y los iones imonio.

El grupo de secuencias potenciales se evaluaron utilizando el software PEAKS, introduciendo la posible secuencia, y los iones del espectro original son etiquetados, incluyendo los fragmentos internos, pérdida de agua y amoniaco, el programa analiza el mejor ajuste de las posibles secuencias con una evaluación visual de los datos,

utilizando estrictos criterios de exactitud de masas con un error de 0.6 Da y la presencia o ausencia del ion observado, así como fragmentos internos.

10.3.6.4 Análisis de resultados

Los datos fueron analizados en Mascot con modificaciones variables de oxidación de metionina, fosforilación en serina, treonina y tirosina, desaminación de Asparagina y ácido aspártico, así como modificaciones fijas de carbamidometil de cisteína; la enzima utilizada tripsina con dos anclajes perdidos. Los datos fueron buscados con una tolerancia en la fragmentación iónica de 0.6 Da. Los espectros de huella peptídica MS y MS/MS fueron analizados en la base de datos de SwissProt 2016_05 con 551193 secuencias y 196822649 residuos, la taxonomía en la que se buscó fue otros Metazoas con 10470 secuencias. El puntaje es -10*Log (P), donde P es la probabilidad que la concordancia sea un evento al azar, los puntajes mayores significativos dependen de la muestra analizada ($p<0.05$). La búsqueda de la similitud de las secuencias fue utilizando la base de datos de Uniprot utilizando la palabra Toxin y Venom, realizando las alineaciones en el programa de NCBI. La secuencia conservada fue analizada mediante árboles de distancia de los resultados y estructuras 3D de macromoléculas mediante el programa Cn3D versión 4.3.1 obtenido del mismo servidor.

10.4 RESULTADOS

10.4.1 Análisis de extracto crudo

De cada medusa colectada se obtienen en promedio 462346.227±620846.42 nematocistos y de cada nematocisto se obtiene 0.96±0.62 ng de proteína, por lo que

aprox. se obtienen 0.447 mg por medusa. Las proteínas presentes en el veneno de la medusa *Chrysaora sp.* se pueden apreciar en la Figura 35, donde se puede observar que las proteínas de mayor abundancia en el extracto crudo son de 15, 20, 70, 90, 100 y 250 kDa aprox., y 10 más de menos abundancia, cuando se analizó el gel en condiciones nativas únicamente aparecen 5 bandas, con dos de mayor abundancia con pesos menores de aproximadamente 30 kDa. Lo que no coincide con el gel analizado con tinción de azul de comassie coloidal dónde únicamente aparecen 3 proteínas de mayor abundancia de aprox. 100, 50 y 37 kDa, estas bandas fueron las que se analizaron por espectrometría de masas porque fueron las que presentaron mayor cantidad de proteína, agregando la banda de 20 por ser la que posiblemente tuviera actividad de fosfolipasa A_2 reportada por otros autores. En el gel 2-D podemos observar que el perfil también cambia un poco teniendo proteínas de mayor abundancia una menor a 15 kDa, se conserva la de 20 kDa, varias isoformas de la banda entre 20 y 25 kDa, 2 o 3 proteínas de mucha abundancia que corresponden a la banda de 40 kDa pero que no fueron separadas correctamente en su punto isoeléctrico (pI) y finalmente una proteína de 80 kDa; sin embargo, siempre coincidió que el punto isoeléctrico de las proteínas presentes en este veneno se encuentra en un pH menor a 7.5.

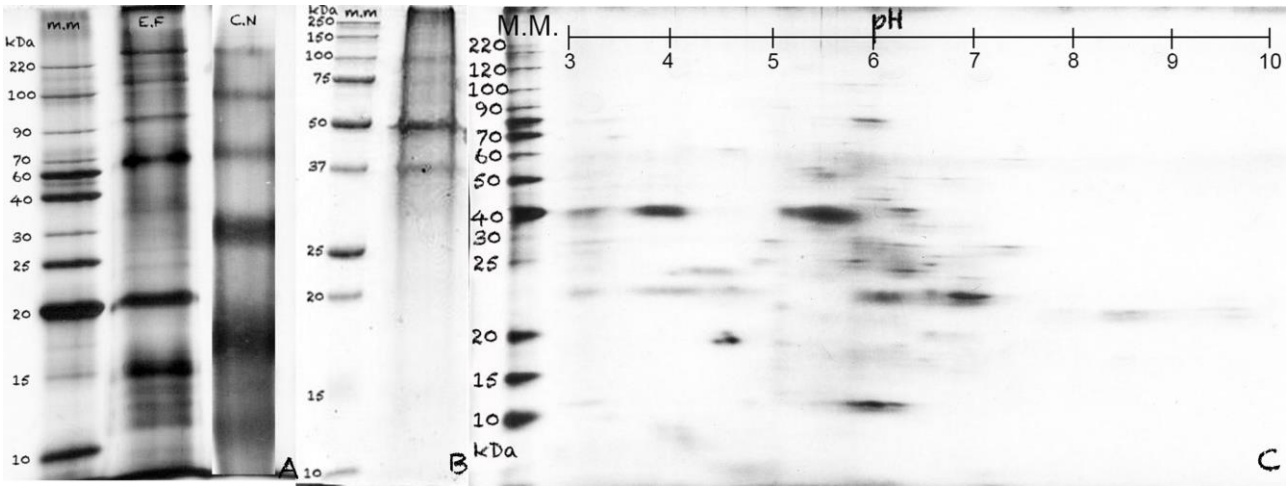


Figura 35. *Perfiles proteicos del veneno de la medusa Chrysaora sp.*

A) Extracto crudo teñido con plata, se representa con m.m. el marcador molecular, E.F. el extracto crudo obtenido con solución amortiguadora de fosfatos y C.N. representa el extracto crudo obtenido mediante condiciones nativas. B) Extracto crudo teñido con azul de comassie coloidal para análisis con espectrometría de masas. C) Extracto crudo analizado mediante electroforesis de 2 dimensiones.

10.4.2 Fraccionamiento parcial de extracto crudo las proteínas de cnidocistos de la medusa *Chrysaora sp.*

El fraccionamiento parcial del extracto crudo con una columna de intercambio aniónico se puede observar en la Figura 36, en dónde se observa que la mayoría de las proteínas quedaron en lo no retenido, observando una pequeña elución de proteínas cuando se aplica una fuerza iónica de 0.2 y 0.4, sin embargo, en el gel de electroforesis sólo fue posible observar una banda de 50 kDa al aplicar 0.4 y 0.5 M de NaCl.

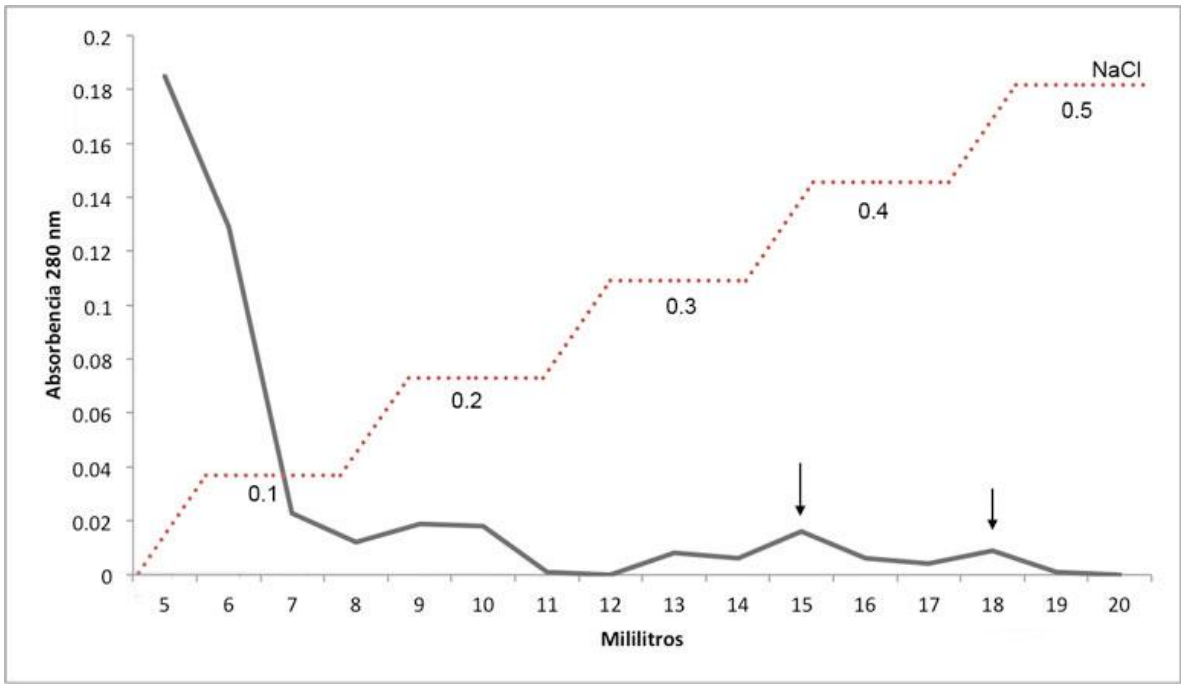


Figura 36. *Fraccionamiento dle extracto crudo de las proteínas de cnidocistos de la medusa Chrysaora sp. en columnas aniónicas de Bio-Scale Mini Uno Q.*

Se señala con flechas los picos en donde se observa una banda de 50 kDa.

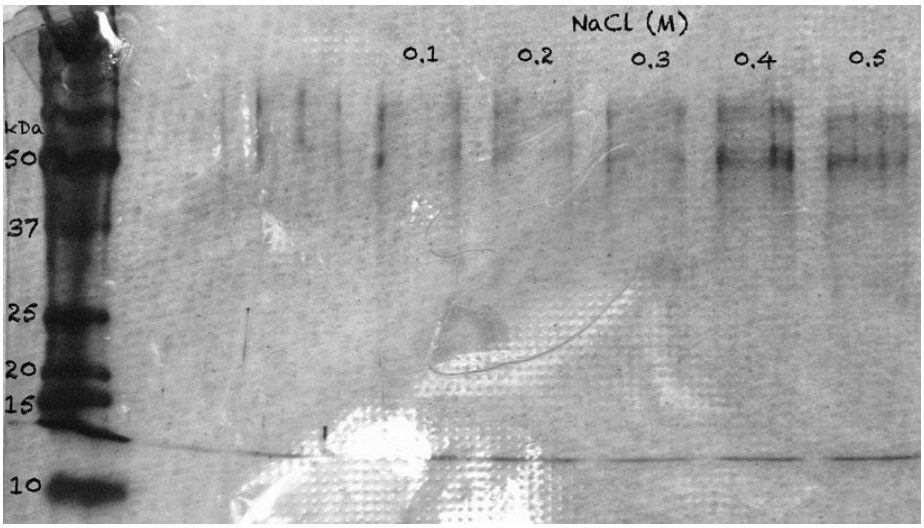


Figura 37. *Proteínas obtenidas del fraccionamiento de las proteínas de cnidocistos de la medusa Chrysaora sp por columna de intercambio aniónico Bio-Scale Mini Uno Q.*

Por otro lado, el fraccionamiento parcial por columnas de intercambio catiónico se puede observar en la Figura 38, en donde se observa una mejor separación teniendo una mejor elución de proteínas aplicando una fuerza iónica de 0.25 M de NaCl; sin embargo, en el gel sólo se observan algunas bandas de más abundantes, de aprox. 25 kDa (Figura 39).

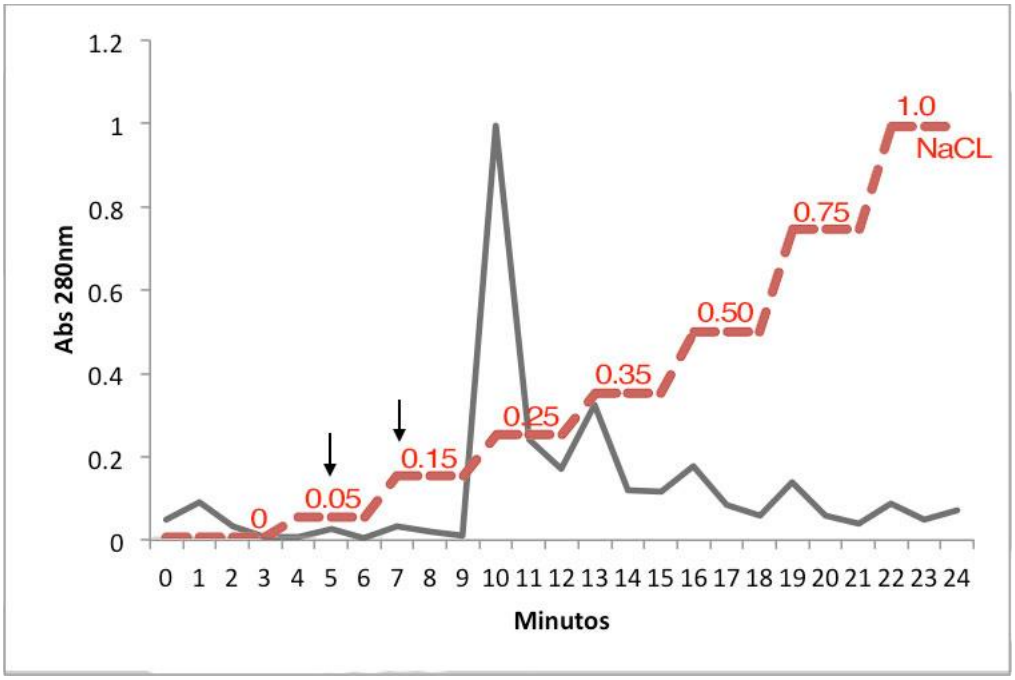


Figura 38. *Fraccionamiento de las proteínas del extracto crudo proteínas de cnidocistos de la medusa Chrysaora sp. en columnas de intercambio catiónico de Bio-Scale Mini Uno S. Se señala con flechas los picos en donde se observa una banda de 25 kDa.*

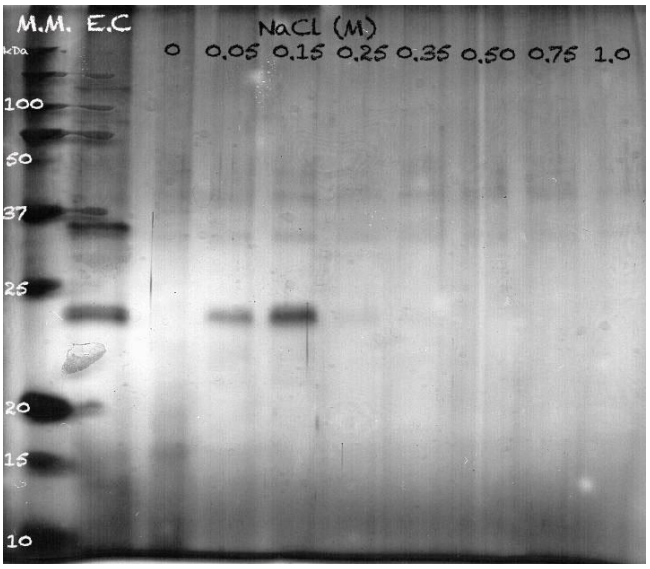


Figura 39. *Electroforesis de las proteínas obtenidas del fraccionamiento parcial de las proteínas del extracto crudo proteínas de cnidocistos de la medusa Chrysaora sp. en columnas de intercambio catiónico de Bio-Scale Mini Uno S.*

10.4.3 Análisis de proteínas mediante espectrometría de masas

Los espectros correspondientes a la huella peptídica de los péptidos analizados se muestran en las Figuras 40-43 y los resultados de similitud se presentan en la Tabla 15, todas estas proteínas tienen una mayor semejanza con conotoxinas, excepto la proteína de 20 kDa que tiene mayor semejanza con una fosfolipasa D, sin embargo, estas similitudes no son significativas.

Los espectros de fragmentación de cada péptido tríptico se encuentran en el Anexo de proteínas, así como las secuencias obtenidas con la secuenciación De novo, como los resultados en la búsqueda Mascot de estos fragmentos no fueron significativos, se analizaron únicamente las secuencias que se encuentran en la Tabla 16.

En los resultados de similitud fue encontrada una secuencia conservada con la cual se realizó un dendrograma de agrupamiento utilizando proteínas de varios organismos (Figura 44) y proteínas de cnidarios (Figura 46). La similitud de esta secuencia en proteínas 3-D similares de observa en la Figura 45, donde se observa la semejanza de aminoácidos con la cadena A de la enzima 1 High Choriolytic, enzima Zinc proteasa del pez *Oryzias latipes,* no se mostraron las semejanzas para cnidarios porque no existen muchas proteínas reportadas en 3-D.

Tabla 15. Búsqueda de similitudes de MS de las proteínas del veneno de la medusa Chrysaora sp. analizadas.

Banda (kDa)	**Proteína**					
	Nombre	**Puntuación**	**Taxonomía**	**Masa nominal**	**pI calculado**	**% de cobertura**
100 (Fig 40)	Kappa-conotoxina	26	*Conus vexillum*	8256	8.6	28
	Kappa-conotoxina	26	*Conus emaciatus*	8198	8.7	28
50 (Fig. 41)	Conotoxina C16.5	20	*Conus californicus*	9216	8.92	32
37 (Fig. 42)	Conotoxina Eb6.14	20	*Conus ebraeus*	8139	8.84	24
20 (Fig. 43)	Fosfolipasa D	24	*Loxosceles intermedia*	34520	6.11	16

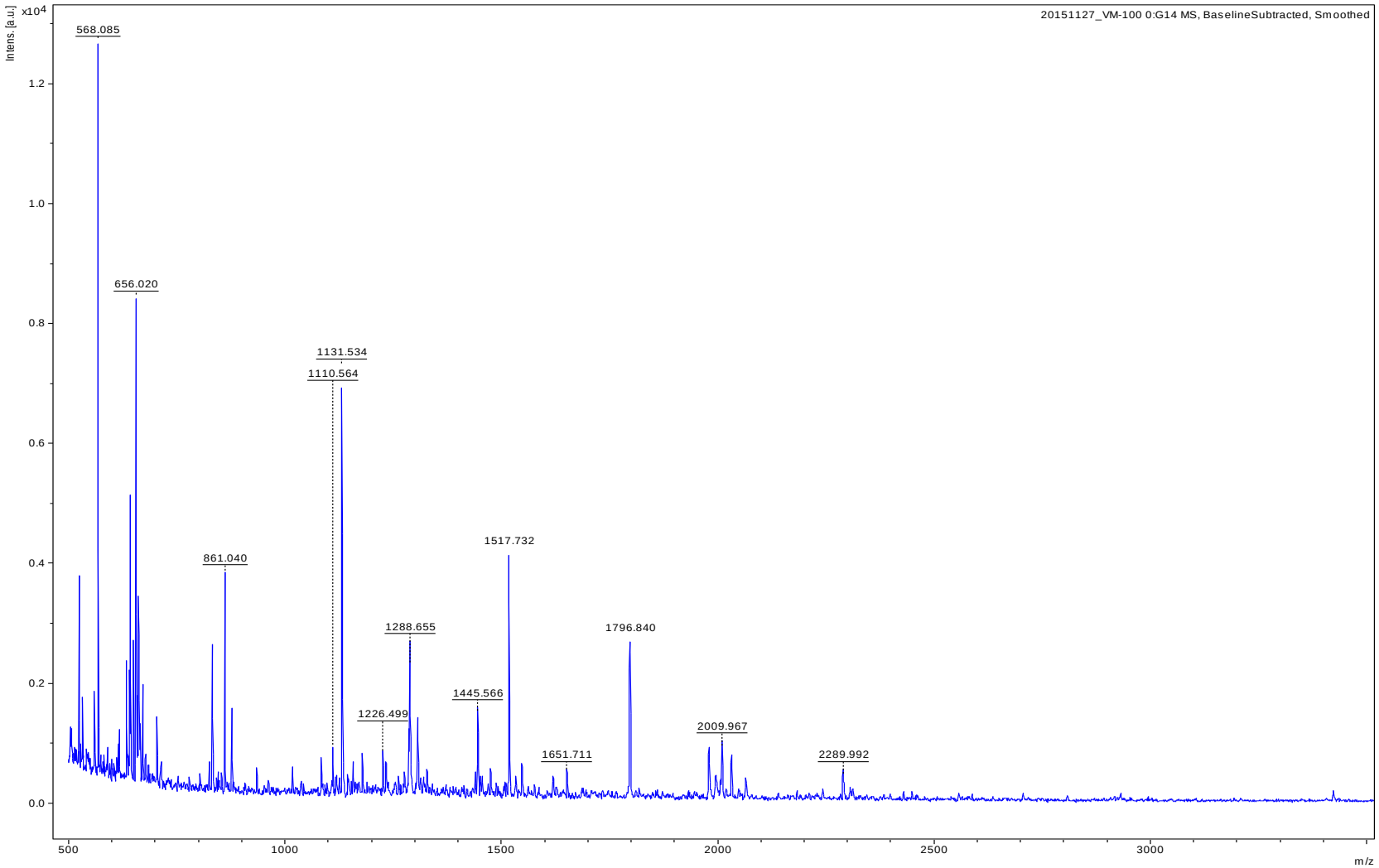


Figura 40. *Huella peptídica de péptido de la proteína de 100 kDa aislada de Chrysaora sp .*

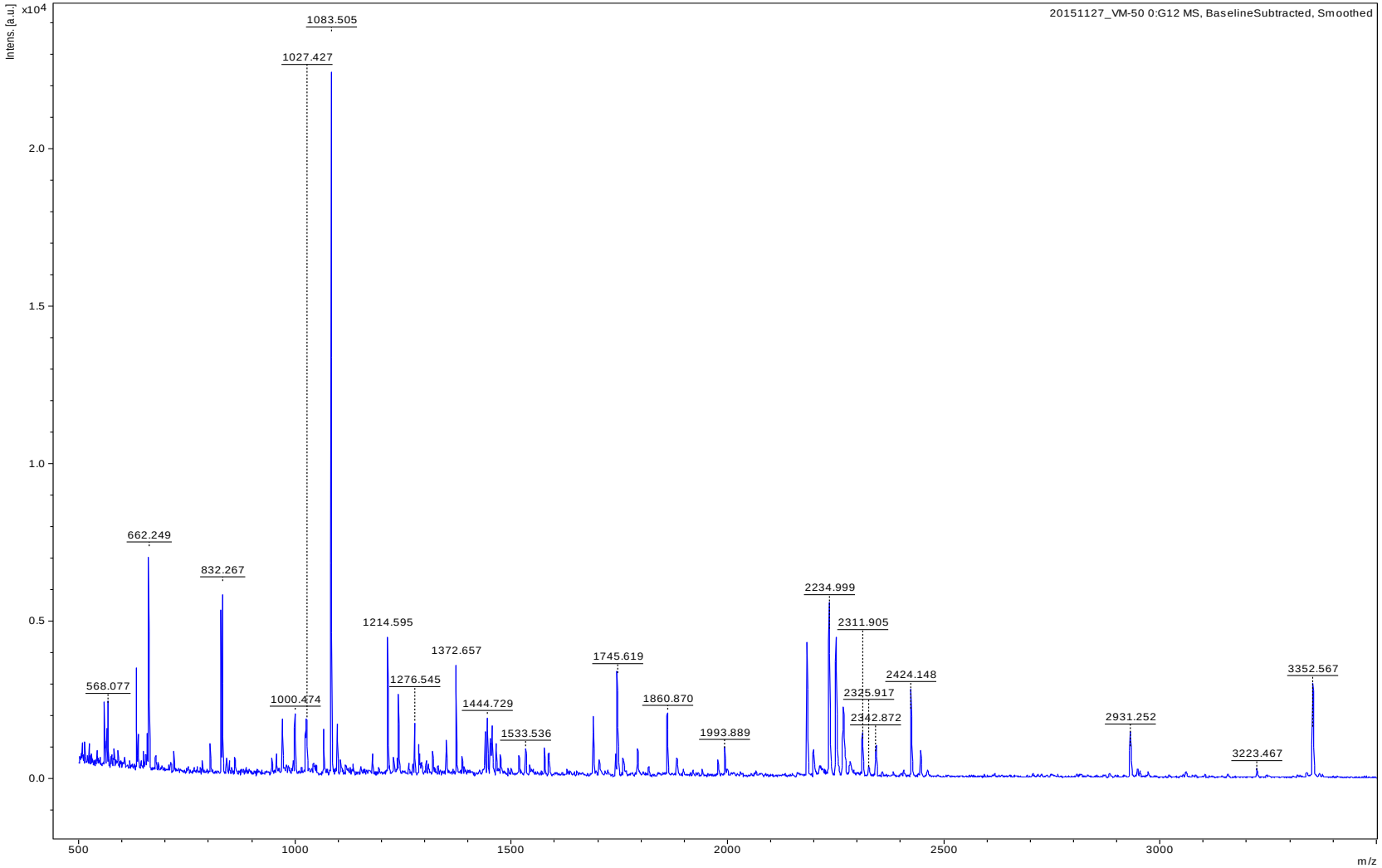


Figura 41. *Huella peptídica de la proteína de 50 kDa Chrysaora sp.*

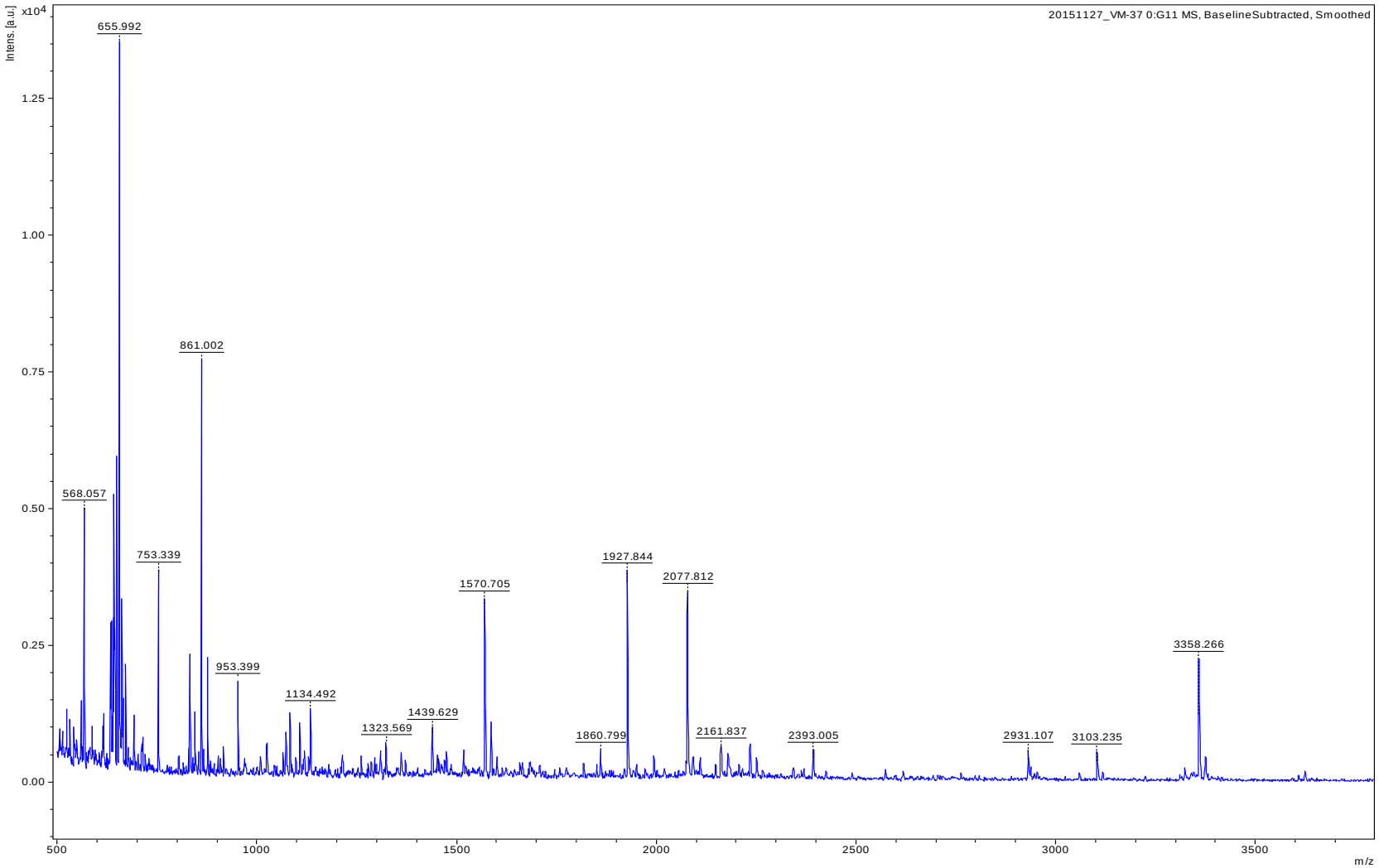


Figura 42. *Huella peptídica de la proteína de 37 kDa Chrysaora sp.*

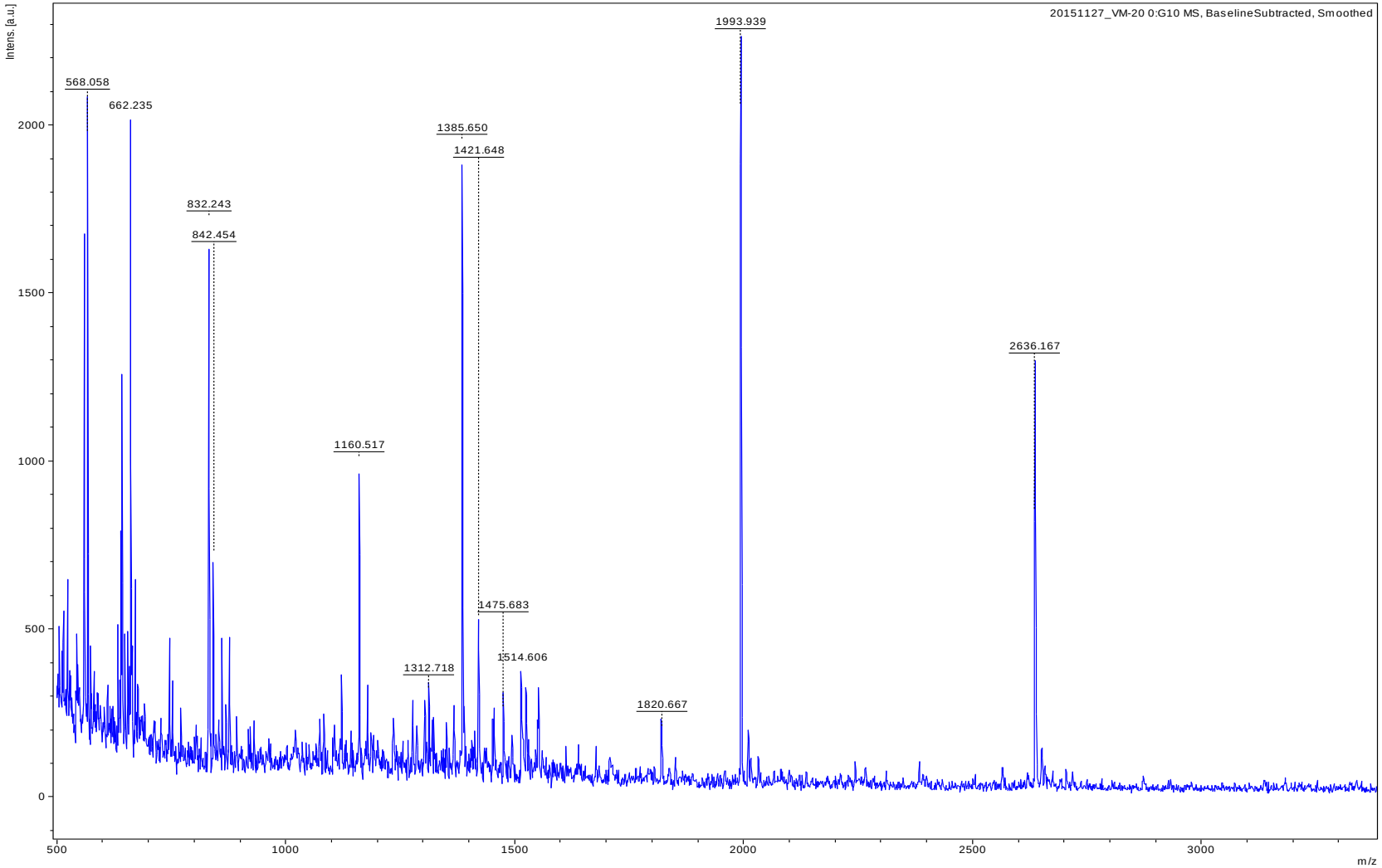


Figura 43. *Huella peptídica de la proteína de 20 kDa Chrysaora sp*

Tabla 16. Resultados de similitudes de las secuencias obtenidas por secuenciación De novo

Proteína (kDa)	Secuencia	m/z	Nombre	Cobertura (%)	Identidad (%)	Valor E	Organismo de homología	Longitud a.a.	Base de datos	Acceso
100	KDHCKNYHGHYGMYDHK.R	2289.99	Zinc metaloproteinasa	66	80	2e-05	*Trimeresurus stejnegeri*	621	Uniprot venom	Query_228158
	EHVD$\frac{I}{L}$NAGGC$\frac{I}{L}$YT$\frac{I}{L}$H.R EHVDLNAGGCLYTLH.R*	1796.83	Zinc metaloproteinasa	81	58	0.003	*Ophiophagus hannah*	611	Uniprot venom	Query_80919
	AWPGPV$\frac{I}{L}$TDMY$\frac{I}{L}$.R AWPGPVITDMYL.R*	1517.73	Zinc metaloproteinasa	38	80	0.002	*Protobothrops jerdonii*	478	Uniprot venom	Query_129455
	TMDYGNSVFV.R	1288.65	Factor de coagulación IX	81	58	1e-04	*Mus musculus*	471	Uniprot venom	Query_21851
	RMVGYTH$\frac{I}{L}$.R RMVGYTHLR*	1131.53	Zinc metaloproteinasa	44	100	0.006	*Bitis arietans*	515	Uniprot venom	Query_225244
50	ER$\frac{I}{L}$GTMPGTFDEDGASHFD$\frac{I}{L}$FEPNMHDM.R ERIGTMPGTFDEDGASHFDIFEPNMHDM.R*	3352.56	Péptido amfifático CT2	24	86	3e-05	*Vaejovis mexicanus smithi*	69	Uniprot venom	Query_51790
	HSYHRMGDPYDYNS$\frac{I}{L}$MHFPVDGH.R HSYHRMGDPYDYNSIMHFPVDGHG.R*[1]	2931.25	Metaloproteinasa 1	50	58	0.001	*Aurelia aurita*	215	NCBI	AAX09930.1
	ESTA$\frac{I}{L}$WGTVHY$\frac{I}{L}$FP$\frac{I}{L}$GFNES.R ESTALWGTVHYLFPLGFNES.R*	2424.14	Zinc metaloproteinasa	76	40	0.008	*Cerberus rynchops*	615	Uniprot venom	Query_19251

	AMEFKFMHSCEYPPYS$\frac{I}{L}$.R AMEFKFMHSCEYPPYSL.R*	2234.99	U1-Hexatoxina-Hv1a	38	75	3e-04	*Hadronyche versuta*	68	Uniprot venom	Query_234827
	KSCKAY$\frac{I}{L}$FDDGWRN.R KSCKAYLFDDGWRN.R*	1860.87	Mu-terafotoxina Hhn2o	46	86	1e-04	*Haplopelma hainanum*	83	Uniprot venom	Query_52711
	GSHDDDDGSSPSVDNS.R	1745.61	Conotoxina sr5a	41	71	5e-04	*Conus spurius*	44	Uniprot venom	Query_206405
	FF$\frac{I}{L}$EERQYS.R FFLEERQYS.R*	1372.65	Zinc Metaloproteinasa	70	71	0.001	*Ophiophagus hannah*	611	Uniprot venom	Query_893339
	RG$\frac{I}{L}\frac{I}{L}$AEQNTG.R RGILAEQNTG.R*	1214.59	Zinc Metaloproteinasa	63	71	0.001	*Daboia russelii*	615	Uniprot venom	Query_178589
	Y$\frac{I}{L}$AVA$\frac{I}{L}$YD.R YLAVALYD.R*	1083.50	Proteinasa serina	55	100	5e-04	*Crotalus adamanteus*	262	Uniprot venom	Query_154693
37	SNATHS$\frac{I}{L}$FHCTGRHPQWYFVEFSHWK.R SNATHSLFHCTGRHPQWYFVEFSHWK.R*	3358.26	Ácido L-amino oxidasa	29	100	0.008	*Echis ocellatus*	504	Uniprot venom	Query_163157
	AMHMPSWGCCM$\frac{I}{L}$GWEVR$\frac{I}{L}$RV$\frac{I}{L}$GDWI.R AMHMPSWGCCMIGWEVRIRVIGDWI.R*	3103.23	Conotoxinas Pu5.6	23	83	3e-04	*Conus pulicarius*	60	Uniprot venom	Query_159345
	HGWPVMY$\frac{I}{L}$EMDYDS$\frac{I}{L}$MHFTSMAN.R HGWPVMYIEMDYDSIMHFTSMAN.R*	2931.10	Proteína expresada en nematocistos	50	75	6e-05	*Nematostella vectensis*	287	Uniprot venom	Query_134390
	QSRGASHVTYKCDHR$\frac{I}{L}$SYE.R QSRGASHVTYKCDHRLSYE.R*	2393.00	Conotoxina Bt15a	20	100	0.003	*Conus betulinus*	87	Uniprot venom	Query_251498
	A$\frac{I}{L}$NYEFKDPEANAVDEP.R AINYEFKDPEANAVDEP.R*	2077.81	Zinc metaloproteinasa	50	86	3e-04	*Macrovipera lebetina*	614	Uniprot venom	Query_57789

	F$\frac{I}{L}$QNESYTVESE$\frac{I}{L}\frac{I}{L}$T.R FIQNESYTVESEIIT.R*	1927.84	Veneno activador de protombina pseutarina-C	68	100	0.011	*Pseudonaja textilis*	1460	Uniprot venom	Query_230027
	GVFFRA$\frac{I}{L}$GSSRAF.R GVFFRALGSSRAF.R*	1570.70	Zinc metaloproteinasa	42	83	0.008	*Trimeresurus stejnegeri*	484	Uniprot venom	Query_240761
	RKC$\frac{I}{L}$FS$\frac{I}{L}$SCRA.R RKCIFSISCRA.R*	1439.62	Hexatoxina U15-Mg1b	41	100	2e-04	*Macrothele gigas*	65	Uniprot venom	Query_169393
	THSYTP.R	861.001	Zinc metaloproteinasa	57	100	0.005	*Echis ocellatus*	614	Uniprot venom	Query_215682
20	WKPSFNDKTSPGYQEEEPV$\frac{I}{L}$.R WKPSFNDKTSPGYQEEEPVI.R*	2636.16	Terafotoxina Cg1c	28	83	8e-04	*Chilobrachys guangxiensis*	124	Uniprot venom	Query_168411
	SDAHA$\frac{I}{L}$GPMTQVSNSGQH.R SDAHAIGPMTQVSNSGQH.R*	1993.93	Colecistoxina	36	71	0.002	*Varanus varius*	113	Uniprot venom	Query_244377
	PGFSKDGEAENDSGVVG.R	1820.66	Acetilcolinesterasa	94	57	6e-05	*Tetronarce californica*	586	Uniprot venom	Query_94776
	GFFNVEE$\frac{I}{L}$TACR GFFNVEEITACR*	1385.64	Terafotoxina-Cg 1b	50	83	3e-05	*Chilobrachys guangxiensis*	50	Uniprot venom	Query_12959
	HATRHNR$\frac{I}{L}$.R HATRHNRI.R*	1160.51	Toxina S6C6	77	81	6e-04	*Dendroaspis jamesoni kaimosae*	63	Uniprot venom	Query_33510

*Secuencias con mayor similitud [1]Secuencia con dominio conservado

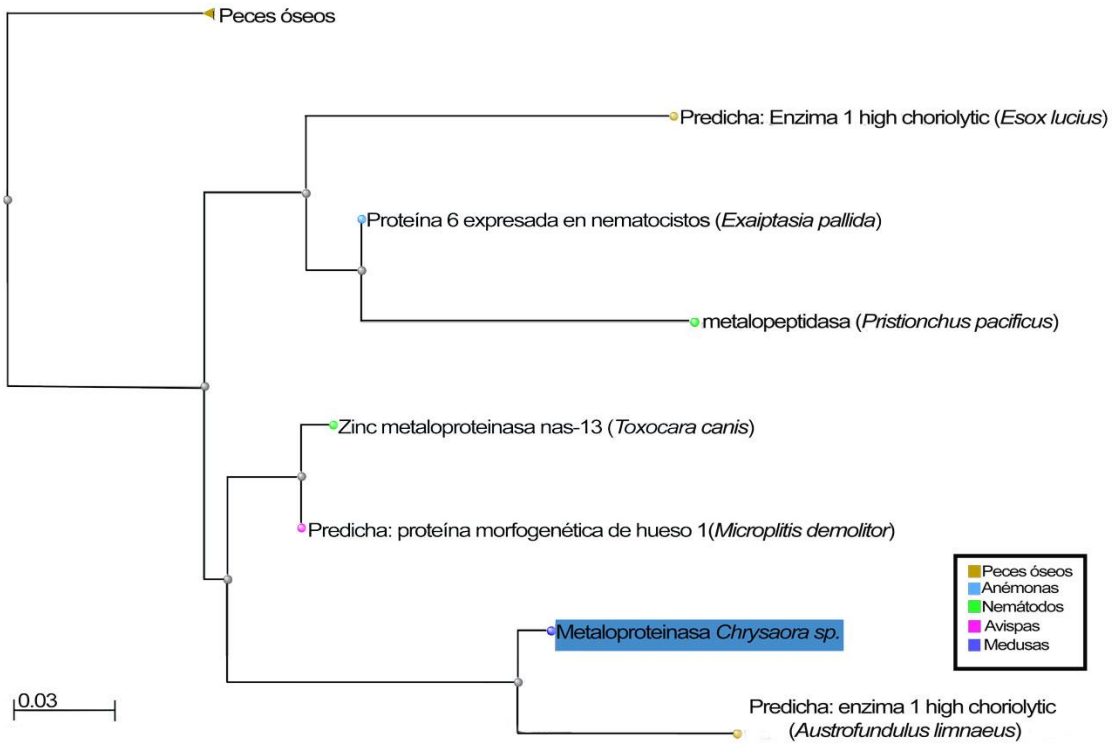


Figura 44. *Agrupamiento de las relaciones de la metaloproteinasa de Chrysaora sp.*

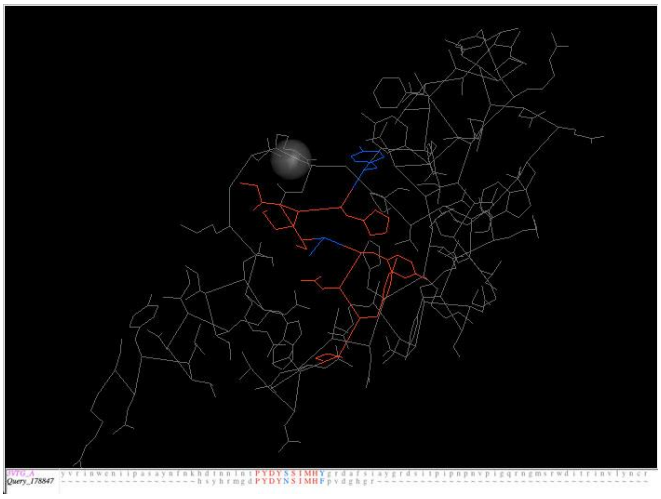


Figura 45. *Similitud en 3-D de la secuencia conservada con la cadena A de la enzima 1 High Choriolytic, enzima Zinc proteasa del pez Oryzias latipes.*

En rojo aminoácidos iguales y azul aminoácidos diferentes.

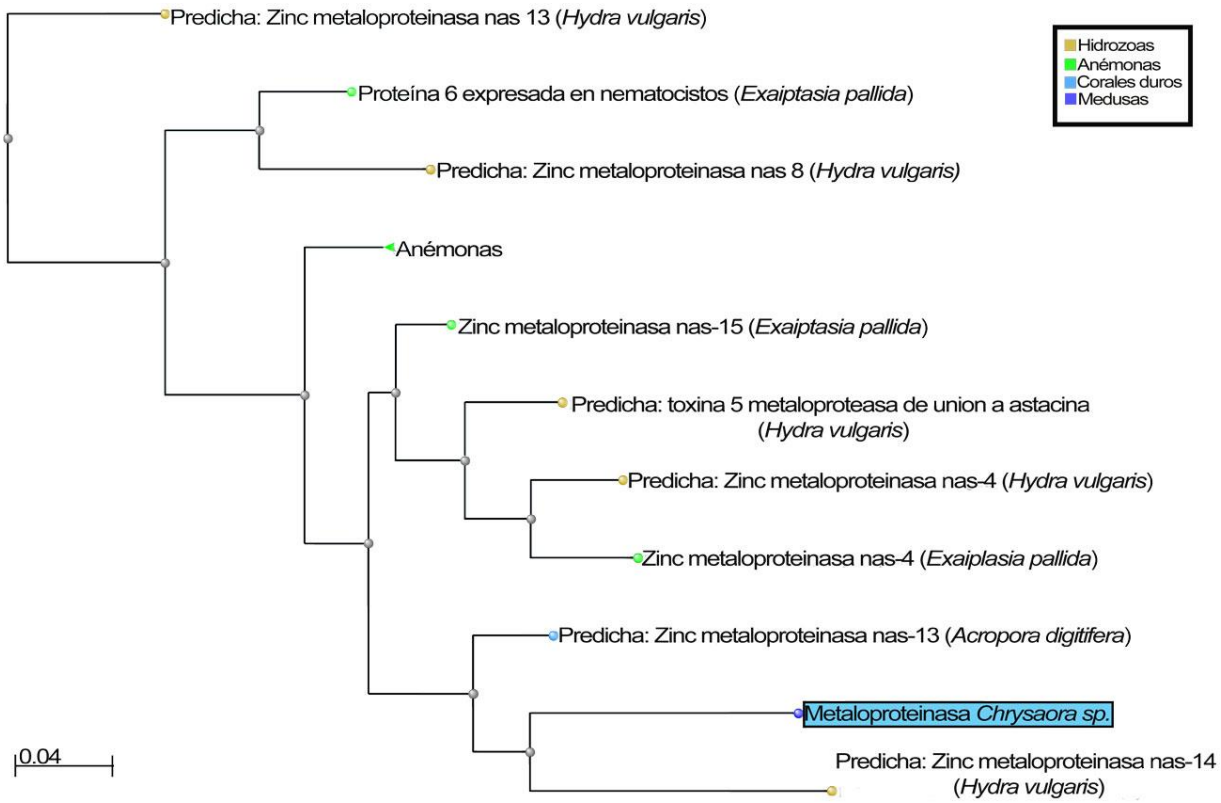


Figura 46. *Agrupamiento de las relaciones de la metaloproteinasa de Chrysaora sp. con secuencias de cnidarios.*

10.5 DISCUSIÓN

La caracterización de los venenos de medusas ha producido varios resultados principalmente por los diferentes métodos de extracción y las técnicas empleadas para aislar componentes del veneno (Currie, 1994; Wiltshire et al., 2000); en este estudio utilizamos la metodología adoptada en los últimos años por diferentes autores (Brinkman, 2008), usando perlas de vidrio, sin embargo, las características bioquímicas de las proteínas del veneno de medusas se desconocen debido a que este tipo de proteínas son termolábiles, tienen la habilidad de agregarse y desagregarse, y no tienen una unión específica (Othman y Burnett, 1990). La

principal complicación que se tuvo durante el desarrollo de este estudio fue la elección de una solución amortiguadora adecuada para la extracción de proteínas, inicialmente se realizó la extracción con un amortiguador con las mismas características reportadas por Brinkman (2008), esta misma autora reporta que la salinidad podría tener un efecto en la extracción de proteínas pero es este estudio observamos que con esta solución amortiguadora y diferentes cantidades de NaCl, no existe una buena solubilidad de proteínas; en otros estudios el veneno de *Chrysaora quinquecirrha* es obtenido mediante un amortiguador de fosfato 0.1 M pH 6.0 (Long y Burnett, 1989) y un amortiguador de fosfato pH 7.4 para su purificación parcial (Suganthi y Bragadeeswaran, 2013); pero nosotros tuvimos buenos resultados en cuanto a solubilidad de proteínas utilizando el amortiguador reportado por Brinkman et al. (2014) un buffer de fosfatos 20 mM, 0.15 M de fuerza iónica y pH 6.7.

Por otro lado, los resultados muestran que los patrones proteicos del veneno de esta medusa son heterogéneos, como en los estudios de venenos de otras medusas; Wiltshire et al. (2000) y Bloom et al. (1998) sugieren que esta diferencia se puede deber a la congelación-descongelación repetida de las proteínas, sin embargo, en este estudio se realizaron pequeños lotes con cantidades conocidas de nematocistos para evitar esta congelación-descongelación, todos los experimentos fueron realizados con proteínas recién extraídas por lo que se concuerda más con lo sugerido por Othman y Burnett (1990), quiénes proponen que estas diferencias pueden deberse a la agregación proteica.

Cuando se realizó el fraccionamiento parcial con columnas UNOsphere™ Q de intercambio aniónico se obtuvo únicamente una banda de 50 kDa, pero no se observó una separación adecuada de las proteínas, ya que no se encontraron picos definidos en la separación, Othman y Burnett (1990) sugiere que este tipo de columnas son las más adecuadas para muestras que tienen un valor de pI en un intervalo de 5-6, al igual que las que se encuentran más cercanas a la neutralidad, que es el rango en el cual se encontraban las proteínas de este veneno, pero se observó que con las columnas UNOsphere™ S de intercambio catiónico se obtuvo una mejor separación, aunque sólo se pudo observar una banda de aprox. 25 kDa, el cromatograma muestra unos picos más definidos. Brinkman y Burnell (2008) lograron purificar parcialmente proteínas hemolíticas de la medusa *Chironex fleckeri* con esta columna de intercambio catiónico, aunque no reporta el pI de esta proteína, sin embargo, se necesita una mayor cantidad de proteína para realizar un fraccionamiento más adecuado, estos autores utilizaron de 2.5-4 mg, y en este estudio se utilizó menos de 1 mg de proteína que es lo que se tenía disponible.

El análisis de proteínas por espectrometría de masas, mostró que no existen similitudes por huella peptídica, sin embargo, el análisis de similitudes de las secuencias obtenidas por secuenciación De novo sugiere que la proteína de 20 kDa tiene similitud con diferentes neurotoxinas, dos fragmentos tienen similitud con una terafotoxina que proviene del veneno de una araña, aunque la función es desconocida se piensa que posiblemente inhibe canales iónicos, otro fragmento tiene similitud con una colecistoxina, un neuropéptido hipotensivo que se une al receptor tipo A de colecistokinina, que regula la presión sanguínea; otro fragmento tiene

similitud con la toxina S6C6 una neurotoxina que incrementa la acetilcolina presináptica y finalmente un fragmento tiene similitud con una acetilcolinesterasa. De acuerdo con los análisis de toxicidad de este veneno en el pez cebra, lo síntomas sugieren la presencia de neurotoxinas dentro de los componentes del veneno que podrían tener la presencia de una acetilcolinesterasa, pero se necesitan más estudios para comprobar esta actividad.

Por otro lado, las bandas de 37, 50 y 100 kDa mostraron similitud con una zinc-metaloproteinasa. Los resultados indican que están presentes dos fragmentos de diferentes masas (37 y 50 kDa) con el mismo ion precursor y una masa de 2931.1071 y 2931.2521 respectivamente, así mismo una secuencia muy parecida (HGWPVMYIEMDYDSIMHFTSMAN.R y HSYHRMGDPYDYNSIMHFPVDGHG.R), los espectros de fragmentación son prácticamente iguales, lo que indica que estas bandas podrían pertenecer a la misma proteína; las pequeñas diferencias entre estas secuencias se deben a que al elegir entre los posibles aminoácidos, se debe elegir el pico más intenso y comprobar con ambas series la presencia de fragmentos internos, si se comprueban ambas cosas se podrían tener dos posibles secuencias, pero en el caso de la banda de 50 kDa los resultados dieron similitud con secuencias conservadas de esta proteína, por lo que se podría considerar que es la secuencia más correcta.

Las enzimas presentes en los venenos de medusas tienen un papel muy importante en varios efectos patofisiológicos, como el hemolítico, miotoxico y neurotóxico (Hessinger y Lenhoff, 1976); la mayoría de los estudios sobre la función enzimática del veneno de las medusas se ha centrado en la presencia de fosfolipasas A_2,

aunque se han detectado metaloproteinasas en diferentes medusas por análisis de proteómica y transcriptómica (Ponce et al., 2016), existen pocos estudios sobre la actividad de proteasas y su importancia toxinológica, uno de ellos es el realizado por Lee et al. (2011), en donde se evaluó esta importancia de las proteasas mediante la inhibición y no inhibición de metaloproteinasas en un ensayo de citotoxicidad, y sus resultados sugieren que las metaloproteinasas contribuyen en esta citotoxicidad.

La metaloproteinasa presente en el veneno de la medusa *Chrysaora sp.* tiene similitud con algunas metaloproteinasas descritas en venenos de serpientes; estas metaloproteinasas son algunas de las toxinas más abundantes y son responsables de hemorragia en las presas, también interfieren en el sistema homeostático facilitando la pérdida de sangre de la vasculatura de la presa; estas moléculas están estrechamente relacionadas filogenéticamente con una familia de genes conocidos como ADAMs (A Disintegrin and metalloprotease) en donde se encuentran algunas proteasas acopladas a la matriz de la membrana con un dominio metaloproteasa y un dominio desintegrina (Gutiérrez y Rucavado, 2000; Takeda et al., 2012; Wolfsberg et al., 1995). Este tipo de metaloproteinasas inducen hemorragia por rexis en los vasos capilares, en el que las células endoteliales sufren degeneración y ruptura, por lo que los eritrocitos y otros componentes de la sangre escapan (Gutiérrez y Rucavado, 2000), estos efectos fueron observados en el pez cebra (Sección 9 Capítulo 4) cuyo principal efecto fue la hemorragia ocular, lo que demuestra la presencia de esta metaloproteinasa.

Todas la similitudes de las secuencias obtenidas para *Chrysaora sp.* dan como resultado metaloproteinasas pertenecientes a la clase P-III, este tipo de

mataloproteinasas se caracterizan por tener las más diversas actividades biológicas, además de tener una alta actividad hemorrágica, con un solo dominio de metaloproteinasa (M), uno desintegrina (D) y uno rico en cisteínas (C) (Takeda et al., 2012); además forman la subfamilia de las “Reprolisinas” debido a que comparten la misma organización estructural de dominios, a su vez forman parte la familia de las “Metzincinas”, que se caracterizan por ser metaloproteinasas dependientes de Zn^{+2}, las cuales presentan dominios de unión al Zn^{+2} similares con secuencias consenso idénticas HEXXHXXGXXH (Gutiérrez y Rucavado, 2000), esta secuencia consenso es la que nos dio similitud con la secuencia obtenida HSYHRMGDPYDYNSIMHFPVDGHG.R de esta medusa, que de acuerdo con el árbol de distancias obtenido de las bases de datos de NCBI tiene mayor similitud con la secuencia de la proteína del pez *Austrofundulus limnaeus* (Figura 44), y cuando se limita la búsqueda a proteínas de cnidarios tiene mayor similitud con diferentes metaloproteinasas de *Hydra vulgaris* (Figura 46).

11 CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.

11.1 CONCLUSIONES

El diámetro de la campana para un acuario adecuado para mantener medusas de la especie de *Chrysaora* estudiada en este trabajo debe ser mayor a 152 cm y con un volumen mayor a 545 L. La época más adecuada para adquirir medusas para el acuario en Mandinga, Veracruz es a principios del mes de marzo. Durante la aclimatación de medusas, la afectación principal observada fue la eversión de la campana que se resuelve ajustando salinidad a 28 ‰ y temperatura a 30 ºC antes de introducir las medusas al acuario. La mejor alimentación de esta especie de medusas es con artemias adultas (*Artemia nauplii)* diariamente más de tres veces al día.

Las condiciones ambientales que favorecen las proliferaciones de la medusa *Chrysaora sp.* es de 28-30 ºC de temperatura y 14-26 ‰ de salinidad, la coloración por otra parte, podría estar relacionada con los cambios de salinidad teniendo un patrón predominante blanco sin manchas oscuras cuando la salinidad es de 14 ‰ y un patrón con pequeñas manchas triangulares alrededor de la campana y un punto en el centro de color café rojizo cuando la salinidad es de 24-26 ‰. El tamaño de la medusa durante las colectas de secas y lluvias es diferente, mostrando un tamaño mayor durante la época de lluvias, esto podría deberse principalmente al aumento de nutrientes en el agua durante esta época. Estas medusas presentan células epiteliomusculares cilíndricas, células intersticiales, cnidocitos, células sensoriales, mesoglea y células secretoras. No fue posible identificar la especie de medusa

mediante las claves taxonómicas, ni por el cnidoma, esta medusa tiene los cnidocitos únicamente en los tentáculos, se pudieron apreciar entre las células epiteliales los cuatro tipos de cnidocitos característicos del género: *Holotrichous O-isorhiza, Holotrichous a-isorhiza, Holotrichous A-isorhiza* y *Heterotrichous microbásicos*. También se pudo evidenciar la reproducción sexual de esta medusa, observando las gónadas en estado maduro con una predominancia de hembras y cigotos fecundados en brazos orales, lo que demuestra que durante la época de lluvias se encuentra en reproducción.

El mejor método de conservación del ADN de medusa es el congelamiento en el lugar de colecta con hielo seco, la estructura que posee mayor cantidad de ADN es la gónada, para una adecuada amplificación del gen COIII es necesario una cantidad de aproximadamente 69 ng y una temperatura con un rango de 47-50 ºC para la unión del cebador a la cadena de ADN. La medusa colectada en Mandiga es la especie *Chrysaora sp.* que tiene mayor similitud genética con la escifomedusa *Pelagia noctiluca* que con *Chrysaora quinquecirrha*, medusa identificada por claves dicotómicas.

El veneno de la medusa *Chrysaora sp.* aquí estudiado, provoca convulsiones, parálisis, hemorragia en los ojos y disturbios en la circulación, afectando principalmente el tejido branquial, causando hiperemia en la pseudobranquia y en el hígado, relacionada con dilatación vascular en el pez cebra *Danio rerio*. El veneno también afecta los eritrocitos presentando hemólisis tanto en eritrocitos humanos como de peces, el tipo sanguíneo humano más sensible a este veneno es el tipo B,

sin embargo, los eritrocitos de peces son mucho más sensibles al veneno, la presencia de equinocitosis en eritrocitos del pez cebra indica la presencia de una PLA2, lo que indica que la hemólisis posiblemente sea por la actividad de una PLA2 con 596 U/mg del extracto crudo.

Los patrones proteicos del veneno de esta medusa son heterogéneos por la habilidad de estas proteínas a agregarse, el rango de pI de estas proteínas se encuentra en un rango de pH de 3-7.5, el análisis por espectrometría de masas mostró que la proteínas que se encuentran en mayor abundancia en este veneno no tienen semejanza por huella peptídica con ninguna proteína reportada, sin embargo, el análisis de las secuencias de los péptidos trípticos evidenció que existen en mayor abundancia neurotoxinas de peso molecular de 20 kDa y una metaloproteinasa con una secuencia con dominio conservado de unión a Zn^{+2} que provoca la hemorragia observada en los principales efectos del envenenamiento de esta medusa, como es observado en venenos de serpientes, esta hemorragia es por rexis en los vasos capilares, en el que las células endoteliales sufren degeneración y ruptura, por lo que los eritrocitos y otros componentes de la sangre escapan.

11.2 PERSPECTIVAS

Para conocer la toxicidad de las medusas presentes en nuestro país para su utilidad como herramientas moleculares o en la industria biotecnológica es importante primero conocer sus aspectos biológicos, debido a que la información es escasa o nula, una gran herramienta que nos sirve para lograr este propósito, debido a la dificultad que implica encontrar medusas en el campo, sobre todo las medusas que

se encuentran en mar abierto por la falta de reportes de las proliferaciones en nuestro país, es la construcción de acuarios para medusas, esto nos brindaría información sobre si la toxicidad de las medusas cambia a través de los diferentes estadios de vida o se conserva, además de conocer si la toxicidad se relaciona con el tipo de alimentación.

Por el otro lado conocer los aspectos biológicos nos proporciona información sobre las proliferaciones que se han reportado a nivel mundial y poder brindar estrategias de erradicación o disminución de estas proliferaciones, ya que causan problemas en la pesca de la zona; buscar la utilidad de estas y otro tipo de medusas podría brindar a la comunidad alternativas para este problema, además de *Chrysaora sp*., también están presentes medusas como *Aurelia aurita*, *Phyllorizha punctata* y *Stomolophus meleagris,* de las cuales no existen reportes ni estudios biológicos, exceptuando por la medusa *Phyllorizha punctata*, no se conocen las temporadas ni los parámetros fisicoquímicos que favorecen la entrada de estas especies a la laguna, ni si la identificación es la adecuada o son especies crípticas como se ha observado en este estudio y en *Aurelia aurita;* también es importante el análisis por biología molecular ya que las claves dicotómicas nos son suficientes para identificar adecuadamente la especie, este tipo de caracterización de ADN mitocondrial en medusas es relativamente nuevo y existen muy pocos genes de medusas reportados, esto representa una línea de investigación que puede ser explotada.

El estudio sobre las toxinas de medusas en nuestro país es muy escaso, sería importante continuar con el análisis del veneno de esta medusa, debido a que se encontró en el análisis de toxicidad evidencia de que en el veneno se encuentra una

fosfolipasa A_2, esta enzima es importante ya que es activa en la interfase membrana-agua y actúa como una sonda de la estructura de la membrana, se podría realizar un análisis profundo de las proteínas presentes en el veneno por espectrometría de masas o su búsqueda por medio de la generación de librerías genéticas.

Aunque se detectó la presencia de neurotoxinas, (banda 20 kDa) es necesario realizar ensayos de neurotoxicidad de esta proteína para observar su efecto sobre canales iónicos.

La metaloproteinasa encontrada en este estudios es una citolisina implicada mayormente en los signos y síntomas que causa la picadura de esta medusa pero al ser una proteína nueva reportada se necesitan más estudios para la búsqueda de su utilidad en la industria biotecnológica, ya que podría ser un prometedor agente antitumoral, podría probarse su actividad lítica en cultivos celulares de algunas líneas celulares de cáncer, y al tener una secuencia conservada se podría realizar un estudio más a profundidad de la proteína; con la utilización de anticuerpos se podría localizar directamente en los nematocistos de la medusa y observar si se localiza en uno o en varios tipos, ya que se ha querido relacionar la toxicidad con algunos tipos de nematocistos y no se ha podido evidenciar esto por el retraso en la caracterización de toxinas de medusas, también podrían realizarse estudios de western blot para localizar la proteína en los diferentes perfiles proteicos obtenidos de esta medusa.

12 PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS Y PRODUCCIÓN ACADÉMICA

Publicación: Becerra-Amezcua, M.P., I. Guerrero-Legarreta, H. González-Márquez y X. Guzmán-García. 2016. *In vivo* analysis of effects of venom from the jellyfish *Chrysaora sp.* in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicon* 113:49-54.

Publicación enviada: Becerra-Amezcua, M.P., I. Guerrero-Legarreta, X. Guzmán-García y H. González-Márquez. Medusas como fuente de productos naturales y sustancias bioactivas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*.

Publicación en preparación: Becerra-Amezcua, M.P., I. Guerrero-Legarreta, X. Guzmán-García y H. González-Márquez. Characterization and identification of the jellyfish *Chrysaora sp.* from Mandinga lagoon, Mexico. *Hydrobiologia.*

Publicación en preparación: Becerra-Amezcua, M.P., I. Guerrero-Legarreta, X. Guzmán-García y H. González-Márquez. Metalloproteinase identification of the venom of jellyfish *Chrysaora sp*.

Presentación en congreso internacional: Mayra Pamela Becerra Amezcua, Humberto González Márquez, Xochitl Guzmán García, María Isabel Guerrero Legarreta. “Actividad hemolítica y de fosfolipasa del veneno de la Medusa *Chrysaora sp.*”. VI Congreso de la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental A.C. Universidad Autónoma de Baja California del 8-10 de Octubre de 2014.

Presentación en congreso internacional: Becerra Amezcua, M.P.; López Vite, S.A.; Guzmán García, X.; González Márquez, H.; Guerrero Legarreta, I.; Hernández

Calderas, I. “Sublethal Effects of jellyfish (*Chrysaora sp*.) Venom in zebrafish (*Danio rerio*)”. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular, VI International Congress of Histology and Tissue Engineering y II Congreso Iberoamericano de Histología, celebrado en Bilbao del 16 al 18 de Septiembre de 2015.

Presentación en congreso internacional: Mayra P Becerra, Xochitl Guzmán, Isabel Guerrero, Saúl López, Misael Hernández, Irma Hernández, Humberto González. “Analysis *in vivo* of sublethal effects of venom from the jellyfish *Chrysaora sp.* In zebrafish (*Danio rerio*)”. 18th World Congress of the International Society on Toxinology. Oxford, Inglaterra del 25-30 de septiembre de 2015.

Presentación en congreso nacional: Becerra-Amezcua, M. Pamela, Hernández-Calderas, Irma, Gazca-Vázquez, Tania, González-Márquez, Humberto, Guerrero-Legarreta, Isabel y Guzmán-García, Xochitl. ”Identificación y caracterización histológica de la medusa *Chrysaora sp.* de la Laguna Mandinga, Veracruz, México”. XXXVIII Congreso Nacional de Histología y III Congreso Iberoamericano de histología. Instituto de Ciencias Agropecuaias de la UAEH, Tulancingo, Hidalgo del 26-28 de octubre del 2016.

Incorporación de servicio social: alumno Misael Hernández Díaz con el proyecto “Pruebas ecotoxicológicas en células de peces” de la Licenciatura en Hidrobiología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. 2015.

Incorporación de servicio social: alumno Saúl López Vite con el proyecto “Efecto del veneno de la medusa *Chrysaora sp*. en el pez cebra *Danio rerio*” de la Licenciatura en Hidrobiología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. 2016.

13 REFERENCIAS

Adams, M. E., y Olivera, B. M. (1994). Neurotoxins: overview of an emerging research technology. *Trends Neurosci, 17*(4), 151-155.

Alber, M. (2002). A conceptual model of estuarine freshwater inflow management. *Estuaries, 25*(6), 1246-1261. doi:10.1007/bf02692222

Alejos Velázquez, L. P., Aragón Martínez, M. d. C., y Cornejo Romero, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. In A. Cornejo Romero, A. Serrato Díaz, B. Rendón Aguilar, & M. G. Rocha Munive (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 274). México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Anderluh, G., y Lakey, J. H. (2008). Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. *Trends Biochem Sci, 33*(10), 482-490. doi:S0968-0004(08)00182-5 [pii] 10.1016/j.tibs.2008.07.004

Anderluh, G., y Maƒçek, P. (2002). Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon, 40*(2), 111-124. doi:10.1016/s0041-0101(01)00191-x

Anderluh, G., Sepi, K., Turk, T., y Maek, P. (2011). Cytolytic Proteins from Cnidarians. *Acta Chim. Slov., 58*, 724–729.

Ávila-Soria, G. (2009). *Molecular characterization of Carukia barnesi and Malo kingi, Cnidaria; Cubozoa; Carybdeidae.* (Doctor of Philosophy), James Cook University, Australia.

Bailey, P. M., Bakker, A. J., Seymour, J. E., y Wilce, J. A. (2005). A functional comparison of the venom of three Australian jellyfish--*Chironex fleckeri*, *Chiropsalmus sp*., and *Carybdea xaymacana*--on cytosolic Ca2+, haemolysis and *Artemia sp.* lethality. *Toxicon, 45*(2), 233-242. doi:S0041-0101(04)00443-X [pii] 10.1016/j.toxicon.2004.10.013

Baraban, S. C., Taylor, M. R., Castro, P. A., y Baier, H. (2005). Pentylenetetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience, 131*(3), 759-768. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.11.031

Barceloux, D. G. (2008). *Medical toxicology of natural substances : foods, fungi, medicinal herbs, plants, and venomous animals*. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons.

Barnes, J. H. (1964). Cause and Effect in Irukandji Stingings. *Med J Aust, 1*, 897-904.

Baxter, E. H., y Marr, A. G. (1969). Sea wasp (*Chironex fleckeri*) venom: lethal, haemolytic and dermonecrotic properties. *Toxicon, 7*(3), 195-210.

Bayha, K. M. (2005). *The molecular systematics and population genetics of four coastal ctenophores and scyphozoan jellyfish of the U.S. Atlantic and Gulf of Mexico.* (Doctor of Philosophy), University of Delaware. (3181885)

Bayha, K. M., Dawson, M. N., Collins, A. G., Barbeitos, M. S., y Haddock, S. H. (2010). Evolutionary relationships among scyphozoan jellyfish families based

on complete taxon sampling and phylogenetic analyses of 18S and 28S ribosomal DNA. *Integr Comp Biol, 50*(3), 436-455. doi:icq074 [pii] 10.1093/icb/icq074

Berking, S., y Herrmann, K. (2006). Formation and discharge of nematocysts is controlled by a proton gradient across the cyst membrane. *Helgol Mar Res 60*, 180-188.

Bernheimer, A. W., y Avigad, L. S. (1976). Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73*, 467-471.

Bloom, D. A., Burnett, J. W., y Alderslade, P. (1998). Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beachside. *Toxicon, 36*(8), 1075-1085. doi:S0041010198000968 [pii]

Bloom, D. A., Radwan, F. F., y Burnett, J. W. (2001). Toxinological and immunological studies of capillary electrophoresis fractionated *Chrysaora quinquecirrha* (Desor) fishing tentacle and *Chironex fleckeri* Southcott nematocyst venoms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 128*(1), 75-90. doi:S1532-0456(00)00180-0 [pii]

Bonilla, C., y Zavaleta, A. (1997). Estudio Bioquímico del veneno de la serpiente *Bothrops hyoprorus*. *Rev Med Exp, 14*(2), 18-32.

Brinkman, D., y Burnell, J. (2007). Identification, cloning and sequencing of two major venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. *Toxicon, 50*(6), 850-860. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.06.016

Brinkman, D., y Burnell, J. (2008). Partial purification of cytolytic venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. *Toxicon, 51*(5), 853-863. doi:S0041-0101(07)00462-X [pii] 10.1016/j.toxicon.2007.12.017

Brinkman, D. L. (2008). *The Molecular and Biochemical Characterisation of Venom Proteins from the Box Jellyfish, Chironex fleckeri.* (Doctor of Philosophy), James Cook University, Australia.

Brinkman, D. L., y Burnell, J. N. (2009). Biochemical and molecular characterisation of cubozoan protein toxins. *Toxicon, 54*(8), 1162-1173. doi:S0041-0101(09)00093-2 [pii] 10.1016/j.toxicon.2009.02.006

Brinkman, D. L., Konstantakopoulos, N., McInerney, B. V., Mulvenna, J., Seymour, J. E., Isbister, G. K., y Hodgson, W. C. (2014). *Chironex fleckeri* (box jellyfish) venom proteins: expansion of a cnidarian toxin family that elicits variable cytolytic and cardiovascular effects. *J Biol Chem, 289*(8), 4798-4812. doi:10.1074/jbc.M113.534149

Brusca, R. C., y Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates* (2nd ed.). Sunderland, Mass: Sinauer Associates.

Burnett, J. W., y Calton, G. J. (1977). The chemistry and toxicology of some venomous pelagic coelenterates. *Toxicon, 15*(3), 177-196. doi:10.1016/0041-0101(77)90044-7

Burnett, J. W., Stone, J. H., Pierce, L. H., Jr., Cargo, D. G., Layne, E. C., y Sutton, J. S. (1968). A Physical and Chemical Study of Sea Nettle Nematocysts and their Toxin. *Journal of Investigative Dermatology, 51*(5), 330-336. doi:10.1038/jid.1968.137

Calder, D. (1972). Development of the sea nettle *Chrysaora quinquecirrha*. *Chesapeake Sciencie, 13*, 40-44.

Carrette, T., y Seymour, J. (2004). A rapid and repeatable method for venom extraction from cubozoan nematocysts. *Toxicon, 44*(2), 135-139. doi:10.1016/j.toxicon.2004.04.008

Caso, M., Pisant, I., y Ezcurra, E. (2004). *Diagnóstico Ambiental del Golfo de México*. México: Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT).

Cestele, S., y Catterall, W. A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie, 82*(9-10), 883-892.

Cheung, E., Chatterjee, D., y Gerlai, R. (2014). Subcutaneous dye injection for marking and identification of individual adult zebrafish (*Danio rerio*) in behavioral studies. *Behav Res Methods, 46*(3), 619-624. doi:10.3758/s13428-013-0399-x

Collins, A. G. (2002). Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology, 15*(3), 418-432. doi:10.1046/j.1420-9101.2002.00403.x

Condon, R. H., Decker, M. B., y Purcell, J. E. (2001). Effects of low dissolved oxygen on survival and asexual reproduction of scyphozoan polyps (*Chrysaora quinquecirrha*). *Hydrobiologia, 451*(1), 89-95. doi:10.1023/a:1011892107211

Contreras, F., Castañeda, O., Torres-Alvarado, R., y Gutiérrez, M. (1996). Nutrientes en 39 lagunas costeras mexicanas. *Revista de Biología Tropical, 44*(2), 417-425.

Cosmovici, N. L. (1925). Action convulsivante des poisons d'Adamsia palliata sur le *Carcinus moenas*. *C.R. Soc. Biol. Paris 92*, 1469-1470.

Currie, B. (1994). Clinical implications of research on the box-jellyfish *Chironex fleckeri*. *Toxicon, 32*(11), 1305-1313. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(94)90403-0

Dart, R. C. (2004). *Medical Toxicology*: Lippincott, Williams & Wilkins.

Dawson, M. N. (2004). Some implications of molecular phylogenetics for understanding biodiversity in jellyfishes, with emphasis on Scyphozoa. *Hydrobiologia, 530*(1), 249-260. doi:10.1007/s10750-004-2659-3

Dawson, M. N., y Jacobs, D. K. (2001). Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biol Bull, 200*(1), 92-96.

Devlin, J. P. (1974). Isolation and partial purification of hemolytic toxin from sea anemone *Stoichactis helianthus*. *J. Pharm. Sci. , 63*, 1478-1480.

Diochot, S., Salinas, M., Baron, A., Escoubas, P., y Lazdunski, M. (2007). Peptides inhibitors of acid-sensing ion channels. *Toxicon, 49*(2), 271-284. doi:10.1016/j.toxicon.2006.09.026

Eckelbarger, K. J., y Larson, R. (1992). Ultrastructure of the ovary and oogenesis in the jellyfish Linuche unguiculata and *Stomolophus meleagris*, with a review of ovarian structure in the Scyphozoa. *Marine Biology, 114*(4), 633-643. doi:10.1007/bf00357260

Erin, P. (2001). Chapter 31 Biology 1110. *Studyblue.*

Evans, G. O. (2008). *Animal Hematotoxicology: A Practical Guide for Toxicologists and Biomedical Researchers* (C. Press Ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.

Fernandez, I., Valladolid, G., Varon, J., y Sternbach, G. (2011). Encounters with venomous sea-life. *The Journal of Emergency Medicine, 40*(1), 103-112.

Flecker, H. (1952). Irukandji sting to North Queensland bathers without production of weals but with severe general symptoms. *Med J Aust, 2*(3), 89-91.

Flores-Lopes, F., y Thomaz, A. (2011). Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. *Braz J Biol, 71*(1), 179-188.

Garateix, A. (1997). Toxinas marinas. *Elementos 4*(26), 41-46.

Gasca, R., y Loman-Ramos, L. (2014). Biodiversidad de Medusozoa (Cubozoa, Scyphozoa e Hydrozoa) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad, 85, Supplement 1*, 154-163. doi:http://dx.doi.org/10.7550/rmb.32513

Gershwin, L., y Collins, A. (2002). A preliminary phylogeny of Pelagiidae (Cnidaria, Scyphozoa), with new observations of *Chrysaora colorata* comb. nov. *Journal of Natural History, 36*, 127-148.

Gershwin, L.-A. (2006). Nematocysts of the Cubozoa. *Zootaxa, 1232*, 1-57.

Gispert, C., Navarro, J., Ruiz Fernández, X., Ribas, T., y Pejoan, J. (1999). *Zoología: Invertebrados*: Océano.

Graham, W. M. (2001). Numerical increases and distributional shifts of *Chrysaora quinquecirrha* (Desor) and *Aurelia aurita* (Linne) (Cnidaria: Scyphozoa) in the northern Gulf of Mexico. *Hydrobiologia, 451*, 97-111.

Greve, W. (1968). The “planktonkreisel”, a new device for culturing zooplankton. *Marine Biology, 1*(3), 201-203. doi:10.1007/bf00347112

Gutiérrez, J. M., y Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases:Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie, 82*(9–10), 841-850. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01163-9

Guzmán-García, X., Ramírez-Romero, P., y López-Vite, S. (2009). *Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos*. México.

Hamner, W., Jones, M., y Hamner, P. (1995). Swimming, feeding, circulation and vision in the Australian box jellyfish, *Chironex fleckeri* (Cnidaria:Cubozoa). *Marine and Freshwater Research, 46*(7), 985-990. doi:http://dx.doi.org/10.1071/MF9950985

Hanzawa, N., Gotoh, R. O., Nakauchi, Y., Funahashi, A., Kanematsu, H., Miyashita, M., . . . Okuizumi, K. (2016). Collaboration between Yamagata University and Kamo Aquarium – Rapid adaptive evolution of jellyfishes inhabiting marine lakes in Palau. *Der Zoologische Garten, 85*(1–2), 34-41. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.zoolgart.2015.09.007

Harvey, J. W. (2012). Chapter 4 - Evaluation of Erythrocytes. In J. W. Harvey (Ed.), *Veterinary Hematology* (pp. 49-121). Saint Louis: W.B. Saunders.

Hessinger, D. A., y Lenhoff, H. M. (1973). Assay and properties of the hemolysis activity of pure venom from the nematocysts of the acontia of the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Arch Biochem Biophys 159*, 629-638.

Hessinger, D. A., y Lenhoff, H. M. (1976). Mechanism of Hemolysis induced by nematocyst venom: roles of phospholipase A and direct lytic factor. *Arch Biochem Biophys, 173*, 606-613.

Hickman, C. P., y Martínez, F. P. (2009). *Principios Integrales de Zoología*: McGraw-Hill Interamericana de España.

Holland, B. S. (2000). Genetics of marine bioinvasions. *Hydrobiologia, 420*(1), 63-71. doi:10.1023/a:1003929519809

Holland, B. S., Dawson, M. N., Crow, G. L., y Hofmann, D. K. (2004). Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Marine Biology, 145*, 1119-1128.

Houck, H. E., Lipsky, M. M., Marzella, L., y Burnett, J. V. (1996). Toxicity of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha)* fishing tentacle nematocyst venom in cultured rat hepatocytes. *Toxicon, 34*(7), 771-778.

Ishikawa, T., Vucenik, I., Shamsuddin, A., Niculescu, F., y Burnett, J. W. (2004). Two new actions of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) nematocyst venom: studies on the mechanism of actions on complement activation and on the central nervous system. *Toxicon, 44*(8), 895-899. doi:10.1016/j.toxicon.2004.08.017

Jacques, R., y Schachter, M. (1954). A sea anemone extract (thalassine) which liberates histamine and a slow reacting substance. *Br J Pharmacol 9*, 49-52.

Jiménez, K. L., Zavaleta, A. I., Izaguirre, V., y Yarleque, A. (2005). Biología celular y molecular de las fosfolipasas A2. *Ciencia e Investigación, VII*(1), 17-32.

Jiménez, M., Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F., y Pérez-Gilabert, M. (2003). A continuous spectrophotometric assay for phospholipase A(2) activity. *Anal Biochem, 319*(1), 131-137.

Jones, D. T., Taylor, W. R., y Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences : CABIOS, 8*(3), 275-282. doi:10.1093/bioinformatics/8.3.275

Kass-Simon, G., y Scappaticci, A. A. (2002). The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Can J Zool, 80*, 1772-1794.

Kayal, E., Bentlage, B., Collins, A. G., Kayal, M., Pirro, S., y Lavrov, D. V. (2012). Evolution of Linear Mitochondrial Genomes in Medusozoan Cnidarians. *Genome Biology and Evolution, 4*(1), 1-12. doi:10.1093/gbe/evr123

Keen, T. E. B. (1969). The hemolytic properties of extracts of tentacles from the cnidarian *Chironex fleckeri*. *Toxicon, 7*, 55-63.

Kihara, H., Anraku, M., Ohno, M., y Hashimura, S. (1988). Tetrodotoxin unaffected depolarization of frog muscles induced by the venom of jellyfish (Genus *Aurelia*). *Jap J Physiol, 38*, 839-849.

Kinkel, M. D., Eames, S. C., Philipson, L. H., y Prince, V. E. (2010). Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *J Vis Exp*(42). doi:10.3791/2126

Kintner, A. H., Seymour, J. E., y Edwards, S. L. (2005). Variation in lethality and effects of two Australian chirodropid jellyfish venoms in fish. *Toxicon, 46*(6), 699-708. doi:10.1016/j.toxicon.2005.07.015

Klein, S. G., Pitt, K. A., y Carroll, A. R. (2016). Reduced salinity increases susceptibility of zooxanthellate jellyfish to herbicide toxicity during a simulated rainfall event. *Environ Pollut, 209*, 79-86. doi:10.1016/j.envpol.2015.11.012

Kleinhaus, A. L., Cranefield, P. F., y Burnett, J. W. (1973). The effects on canine cardiac Purkinje fibers of *Chrysaora quinquecirrha* (sea nettle) toxin. *Toxicon, 11*(341-349).

Knowles, T. (2016). The History of Jelly Husbandry at the Monterey Bay Aquarium. *Der Zoologische Garten, 85*(1–2), 42-51. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.zoolgart.2015.09.008

Kotova, A. V., Kovtun, O. A., Podgornaya, O. I., y Adonin, L. S. (2015). Mesoglein differences between two jellyfish populations of the genus *Aurelia*. *International Aquatic Research, 7*(2), 123-131. doi:10.1007/s40071-015-0096-8

Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. doi:10.1093/molbev/msw054

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 227*(5259), 680-685.

Lange, J., Tai, M., y Kaiser, R. (2016). Husbandry of jellyfish, from the beginning until today. *Der Zoologische Garten, 85*(1–2), 52-63. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.zoolgart.2015.09.009

Lecompte, O., Villamil, L., y Cedeño, C. (2010). Un acuario para las medusas. *Expeditio, 4*, 67-75.

Lee, H., Jung, E.-s., Kang, C., Yoon, W. D., Kim, J.-S., y Kim, E. (2011). Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity. *Toxicon, 58*(3), 277-284. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.06.007

Li, R., Yu, H., Yue, Y., Liu, S., Xing, R., Chen, X., . . . Li, P. (2014). In depth analysis of the *in vivo* toxicity of venom from the jellyfish *Stomolophus meleagris*. *Toxicon, 92*, 60-65. doi:10.1016/j.toxicon.2014.10.002

Lira Galera, I. E., Müdespacher Ziehl, C., y Cifuentes Lemus, J. L. (1989). *Guía ilustrada de animales marinos venenosos de México y el Caribe*. México: Limusa S.A. de C.V.

Littleford, R. (1939). The life cycle of *Dactylometra quinquecirrha*, L. Agassiz in the Chesapeake Bay. *The Biological Bulletin, 77*, 368-381.

Loman-Ramos, L., Ordóñez-López, U., y Segura-Puerta, L. (2007). Variación espacial de la comunidad de medusas (Cnidaria) del sur del Golfo de México, durante el otoño de 1999. *Hidrobiológica, 17*(3), 203-212.

Long, K. O., y Burnett, J. W. (1989). Isolation, characterization, and comparison of hemolytic peptides in nematocyst venoms of two species of jellyfish (*Chrysaora quinquecirrha* and *Cyanea capillata*). *Comp. Biochem. Physiol. , 94B*(4), 641-646.

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

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem, 193*(1), 265-275.

Luna, R., Martínez, Y., y Ramos, F. J. (1982). *Estudio Preliminar de algunos parámetros hidrológicos de las lagunas de Mandinga, Ver., México. Durante*

dos épocas climáticas diferentes., Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Macchi, G. J., Mianzan, H., Christiansen, H. E., y Ramirez, F. (1995). Hystology of the gonadal cycle of the stinging hydromedusa *Olindas sambaquiensis*, Muller (1961) at Blanca Bay, Argentina. *Bollettino Della Societá Adriatica Di Scienze, LXXVI*, 59-68.

Mackie, G. O. (2002). What´s new in cnidarian biology? *Can J Zool 80*, 1649-1653.

Marchini, B., De Nuccio, L., Mazzei, M., y Mariottini, G. L. (2004). A fast centrifuge method for nematocyst isolation from *Pelagia noctiluca* Forskal (Cnidaria: Scyphozoa). *Riv Biol, 97*(3), 505-515.

Marques, A. C., y Collins, A. G. (2004). Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology, 123*(1), 23-42. doi:10.1111/j.1744-7410.2004.tb00139.x

Mathews, C. K., Ahern, K. G., y Van Holde, K. E. (2002). *Bioquímica*: Addison Wesley.

Mayer, A. G. (1910). *The medusae of the world. The scyphomedusae.* (Vol. III). Washington, D.C.

McClounan, S., y Seymour, J. (2012). Venom and cnidome ontogeny of the cubomedusae *Chironex fleckeri*. *Toxicon, 60*(8), 1335-1341. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.020

Michaels, D. W. (1979). Membrane damage by a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*. I. Formation of transmembrane channels in lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta, 555*(1), 67-78.

Michell, D. (2016). ZBrush Atlantic Sea Nettle, white. *Michelle Davis.*

Morandini, A. C., y Marques, A. C. (2010). Revision of the genus *Chrysaora* Péron and Lesueur, 1810 (Cnidaria:Scyphozoa). *Zootaxa, 2464*, 97.

Morrison, J., Smith, C., Heidel, J., Mumford, S., Blazer, V., y MacConnell, E. (2007). *Fish Histology and Histopathology Manual*.

Muhvich, K. H., Sengottuvelu, S., Manson, P. N., Myers, R. A., Burnett, J. W., y Marzella, L. (1991). Pathophysiology of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*), envenomation in a rat model and the effects of hyperbaric oxygen and verapamil treatment. *Toxicon, 29*(7), 857-866.

Murakami, T. (2016). History and Introduction of the Kamo Aquarium. *Der Zoologische Garten, 85*(1–2), 64-73. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.zoolgart.2015.09.010

Nagai, H. (2003). Recent Progress in Jellyfish Toxin Study. *Journal of Health Science, 49*(5), 337-340. doi:10.1248/jhs.49.337

Nakar, N., Disegni, D., y Angel, D. (2011). *Economic evaluation of jellyfish effects on the fishery sector—Case study from the eastern Mediterranean.* Paper presented at the Proceedings of the Thirteenth Annual BIOECON Conference.

Nei, M., y Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New york: Oxford University Press.

Nevalainen, T. J., Peuravuori, H. J., Quinn, R. J., Llewellyn, L. E., Benzie, J. A., Fenner, P. J., y Winkel, K. D. (2004). Phospholipase A2 in cnidaria. *Comp*

Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 139(4), 731-735. doi:10.1016/j.cbpc.2004.09.006

Nikookar, K., Moradshahi, A., y Kharati, M. (2004). Influence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity of *Dunaliella salina* isolated from Maharlu Salt Lake in Shiraz. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A, 28*(A1), 117-125.

Ocaña-Luna, A., Sánchez-Ramírez, M., y Aguilar-Durán, R. (2010). First record of Phyllorhiza punctata von Lendenfeld, 1884 (Cnidaria: Scyphozoa, Mastigiidae) in Mexico. *Aquatic Invasions, 5*(1), S79-S84.

Orduña-Novoa, K., Segura-Puertas, L., Sánchez-Rodríguez, J., Meléndez, A., Nava-Ruíz, C., Rembao, D., . . . Galván-Arzate, S. (2003). Possible antitumoral effect of the crude venom of *Cassiopea xamachana* (Cnidaria: Scyphozoa) on tumors of the central nervous system induced by N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU) in rats. *Proc West Pharmacol Soc., 46*, 85-87.

Othman, I., y Burnett, J. W. (1990). Techniques applicable for purifying *Chironex fleckeri* (box-jellyfish) venom. *Toxicon, 28*(7), 821-835. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(09)80005-6

Ozbek, S., Pokidysheva, E., Schwager, M., Schulthess, T., Tariq, N., Barth, D., . . . Holstein, T. W. (2004). The glycoprotein NOWA and minicollagens are part of a disulfide-linked polymer that forms the cnidarian nematocyst wall. *J Biol Chem, 279*(50), 52016-52023. doi:M407613200 [pii] 10.1074/jbc.M407613200

Parry, G., y Holliday, F. G. T. (1960). An experimental analysis of the function of the pseudobranch in teleosts. *J Exp Biol, 37*, 344.

Pedroso, G. L., Hammes, T. O., Escobar, T. D., Fracasso, L. B., Forgiarini, L. F., y Da Silveira, T. R. (2012). Blood collection for biochemical analysis in adult zebrafish. *J Vis Exp*(63), e3865. doi:10.3791/3865

Péron, F., y Lesueur, C. (1810). Tableau des caractères génériques et spécifiques de toutes les espèces de méduses connues jusqu'à ce jour. *Annales Muséum national d´Histoire naturelle Paris, 14*, 325-366.

Pierce, J. (2005). A system for mass culture of Upside-down jellyfish *Cassiopea spp* as a potential food item for medusivores in captivity. *IZY 39*(1), 62-69. doi:10.1111/j.1748-1090.2005.tb00005.x

Pierce, J. (2009). Prediction, Location, Collection and Transport of Jellyfish (Cnidaria) and Their Polyps. *Zoo Biol, 28*, 163-176.

Ponce, D., Brinkman, D., Potriquet, J., y Mulvenna, J. (2016). Tentacle Transcriptome and Venom Proteome of the Pacific Sea Nettle, *Chrysaora fuscescens* (Cnidaria: Scyphozoa). *Toxins, 8*(4), 102.

Ponce, D., López-Vera, E., Aguilar, M., y Sánchez-Rodríguez, J. (2013). Preliminary Results of the *in Vivo* and *in Vitro* Characterization of a Tentacle Venom Fraction from the Jellyfish *Aurelia aurita*. *Toxins, 5*(12), 2420.

Purcell, J. E. (1992). Effects of predation by the scyphomedusan *Chrysaora quinquecirrha* on zooplankton populations in Chesapeake Bay, USA. *Marine Ecology Progress Series, 87*, 65-76.

Purcell, J. E. (1997). Pelagic cnidarians and ctenophores as predators: selective predation, feeding rates, and effects on prey populations. *Annales de l´Institut océanographique, 73*(2), 125-137.

Purcell, J. E., y Cowan Jr, J. H. (1995). Predation by the scyphomedusan *Chrysaora quinquecirrha* on *Mnemiopsis leidyi* ctenophores. *Marine Ecology Progress Series, 129*, 63-70.

Purcell, J. E., White, J. R., Nemaziel, D. A., y Wright, D. A. (1999). Temperature, salinity and food effects on asexual reproduction and abundance of the scyphozoan *Chrysaora quinquecirrha*. *Mar Ecol Prog Ser 80*, 187-196.

Pyati, U. J., Look, A. T., y Hammerschmidt, M. (2007). Zebrafish as a powerful vertebrate model system for *in vivo* studies of cell death. *Seminars in Cancer Biology, 17*(2), 154-165. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.11.007

Radwan, F. F., Gershwin, L., y Burnett, J. W. (2000). Toxinological studies on the nematocyst venom of *Chrysaora achlyos*. *Toxicon, 38*(11), 1581-1591.

Rahim, S. M., Mazlan, A. G., Simon, K. D., Delaunoy, J. P., y Laurent, P. (2014). Immunocytochemical localization of carbonic anhydrase in the pseudobranch tissue of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Zhejiang Univ Sci B, 15*(2), 194-200. doi:10.1631/jzus.B1200297

Ramasamy, S., Isbister, G. K., Seymour, J. E., y Hodgson, W. C. (2003). The in vitro effects of two chirodropid (*Chironex fleckeri* and *Chiropsalmus sp.*) venoms: efficacy of box jellyfish antivenom. *Toxicon, 41*(6), 703-711.

Rappuoli, R., y Montecucco, C. (1997). *Guidebook to protein toxins and their use in cell biology*. Oxford ; New York: Oxford University Press.

Raskoff, K. A., Sommer, F. A., Hamner, W. M., y Cross, K. M. (2003). Collection and culture techniques for gelatinous zooplankton. *Biol Bull, 204*(1), 68-80.

Richet, C. (1903). De la thalassine toxine cristallise e et pruritogene. *C R Soc Biol Paris 58*, 109-112.

Richet, C. (1903). Des poisons contenus dans les tentacules des Actinies (congestine et thalassine). *C R Soc Biol Paris 55*, 246-248.

Ruppert, E. E., Fox, R. S., y Barnes, R. D. (2004). *Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach*: Thomson-Brooks/Cole.

Russell, F. E., y Nagabhushanam, R. (1996). *The venomous and poisonous marine invertebrates of the Indian ocean*. New Delhi: Oxford & IBH Pub. Co.

Sánchez-Rodríguez, J., y Lucio-Martínez, N. (2011). Aislamiento y prepurificación de los compuestos activos presentes en el veneno de *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa: Pelagiidae) del Mar Caribe. *Cienc Mar, 37*, 369-377.

Sánchez-Rodríguez, J., Torrens, E., y Segura-Puertas, L. (2006). Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolysins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom. *Archives of Toxicology, 80*(3), 163-168. doi:10.1007/s00204-005-0023-7

Satterlie, R. A., Thomas, K. S., y Gray, G. C. (2005). Muscle Organization of the Cubozoan Jellyfish *Tripedalia cystophora* Conant 1897. *The Biological Bulletin, 209*(2), 154-163.

Segner, H. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C:*

Toxicology & Pharmacology, 149(2), 187-195. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.10.099

Segura-Puertas, L., Avila-Soria, G., Sánchez-Rodríguez, J., Ramos-Aguilar, M. E., y Burnett, J. W. (2002). Some toxinological aspects of *Aurelia aurita* (Linné) from the Mexican Caribbean. *Journal of Venomous Animals and Toxins, 8*, 269-282.

Segura-Puertas, L., Franco-Gordo, C., Suárez-Morales, E., Gasca, R., y Godínez-Domínguez, E. (2010). Summer composition and distribution of the jellyfish (Cnidaria: Medusozoa) in the shelf area off the central Mexican Pacific. *Revista Mexicana de Biodiversidad, 81*, 103-112.

Segura-Puertas, L., Suárez-Morales, E., y Celis, L. (2003). A checklist of the Medusae (Hydrozoa, Scyphozoa and Cubozoa) of Mexico. *Zootaxa, 194*, 1-15.

Serrato Díaz, A., Flores Rentería, L., Aportela Cortez, J., y Sierra Palacio, E. (2014). PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. In A. Cornejo Romero, A. Serrato Díaz, B. Rendón Aguilar, & M. G. Rocha Munive (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 274). México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Shao, Z., Graf, S., Chaga, O. Y., y Lavrov, D. V. (2006). Mitochondrial genome of the moon jelly *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa): A linear DNA molecule encoding a putative DNA-dependent DNA polymerase. *Gene, 381*, 92-101. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2006.06.021

Shaposhnikova, T., Matveev, I., Napara, T., y Podgornaya, O. (2005). Mesogleal cells of the jellyfish *Aurelia aurita* are involved in the formation of mesogleal fibres. *Cell Biology International, 29*(11), 952-958. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.08.008

Sket, D., Draslar, K., Ferlan, I., y Lebez, D. (1974). Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina* II. Pathophysiological action. *Toxicon, 12*, 63-68.

Stevens, S. M., Kem, W. R., y Prokai, L. (2002). Investigation of cytolysin variants by peptide mapping: an enhanced protein characterization using complementary ionization and mass spectrometric techniques. *Rapid Commun Mass Spectrom, 16*, 1-8.

Suganthi, K., y Bragadeeswaran, S. (2013). Antimicrobial and Immunomodulatory Activities of Jellyfish (*Chrysaora quinquecirrha*) Venom. In A. Sabu & A. Augustine (Eds.), *Prospects in Bioscience: Addressing the Issues* (pp. 283-292). India: Springer India.

Suganthi, K., Bragadeeswaran, S., Kumaran, N., Thenmozhi, C., y Thangaraj, S. (2012). *In vitro* antioxidant activities of jelly fish *Chrysaora quinquecirrha* venom from southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, S*(347-351).

Suput, D. (2009). *In vivo* effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon, 54*(8), 1190-1200. doi:S0041-0101(09)00148-2 [pii] 10.1016/j.toxicon.2009.03.001

Takeda, S., Takeya, H., y Iwanaga, S. (2012). Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family

proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 1824*(1), 164-176. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.04.009

Tamkun, M. M., y Hessinger, D. A. (1981). Isolation and partial characterization of a hemolytic and toxic protein from the nematocyst venom of the Portuguese Man-of-War, *Physalia physalis*. *Biochim Biophys Acta, 667*(1), 87-98.

Tiedeken, J. A., Ramsdell, J. S., y Ramsdell, A. F. (2005). Developmental toxicity of domoic acid in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol, 27*(5), 711-717. doi:10.1016/j.ntt.2005.06.013

Torres, M., Aguilar, M. B., Falcón, A., Sánchez, L., Radwan, F. F. Y., Burnett, J. W., . . . Arellano, R. O. (2001). Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon, 39*(9), 1297-1307. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00081-2

Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M. G., Macriz-Romero, N., Flores-García, A., y Ramos-Ibarra, M. L. (2013). Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *Residente, 8*(1), 4-11.

Turk, T., y Kem, W. R. (2009). The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon, 54*(8), 1031-1037. doi:S0041-0101(09)00340-7 [pii] 10.1016/j.toxicon.2009.06.031

Walker, M. J. (1977). Pharmacological and biochemical properties of a toxin containing material from the jellyfish, *Cyanea capillata*. *Toxicon, 15*(1), 3-14. doi:0041-0101(77)90064-2 [pii]

Walton, R. M., Brown, D. E., Hamar, D. W., Meador, V. P., Horn, J. W., y Thrall, M. A. (1997). Mechanisms of echinocytosis induced by *Crotalus atrox* venom. *Vet Pathol, 34*(5), 442-449.

Watkins, J. (2008). Properties and toxicities of animal venoms. In C. Klaassen (Ed.), *Casarett and Doull´s Toxicology. The Basic Science of Poisons.* (pp. 1083-1102). United States of America: MacGrawHill.

Weston, A. J., Chung, R., Dunlap, W. C., Morandini, A. C., Marques, A. C., Moura-da-Silva, A. M., . . . Long, P. F. (2013). Proteomic characterisation of toxins isolated from nematocysts of the South Atlantic jellyfish *Olindias sambaquiensis*. *Toxicon, 71*, 11-17. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.002

Widmer, C. L. (2008). *How to Keep Jellyfish in Aquariums: An Introductory Guide for Maintaining Healthy Jellies*: Wheatmark Incorporated.

Williamson, J. A., Fenner, P. J., Burnett, J. W., y Rifkin, J. F. (1996). *Venomous and poisonous marine animals: a medical and biological handbook*. Syndey, Australia: University of New South Wales Press.

Wiltshire, C. J., Sutherland, S. K., Fenner, P. J., y Young, A. R. (2000). Optimization and preliminary characterization of venom isolated from 3 medically important jellyfish: the box (*Chironex fleckeri*), Irukandji (*Carukia barnesi*), and blubber (*Catostylus mosaicus*) jellyfish. *Wilderness & Environmental Medicine, 11*(4), 241-250. doi:http://dx.doi.org/10.1580/1080-6032(2000)011%5B0241:OAPCOV%5D2.3.CO;2

Winter, K. L., Fernando, R., Ramasamy, S., Seymour, J. E., Isbister, G. K., y Hodgson, W. C. (2007). The *in vitro* vascular effects of two chirodropid (C*hironex fleckeri* and *Chiropsella bronzie*) venoms. *Toxicol Lett, 168*(1), 13-20. doi:10.1016/j.toxlet.2006.10.011

Wolfsberg, T. G., Primakoff, P., Myles, D. G., y White, J. M. (1995). ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell- matrix interactions. *The Journal of Cell Biology, 131*(2), 275-278.

Young, J. D., Leong, L. G., DiNome, M. A., y Cohn, Z. A. (1986). A semiautomated hemolysis microassay for membrane lytic proteins. *Anal Biochem, 154*(2), 649-654.

14 ANEXO HISTOLOGÍA

Tiempos y temperaturas utilizadas durante la deshidratación de medusas

Solvente	Primer corte		Segundo corte	
	Temperatura (ºC)	**Tiempo (min)**	**Temperatura (ºC)**	**Tiempo (min)**
Alcohol 70%	55	60	T. A	60
Alcohol 80%	55	60	T. A	60
Alcohol 96%	70	60	T. A	60
Alcohol 96%	75	60	T. A	60
Alcohol 96%	65	60	T. A	60
Alcohol 100%	65	60	T. A	60
Alcohol 100%	67	60	T. A	60
Alcohol 100%	67	60	T. A	60
Xilol	67	30	T. A	30
Xilol-Parafina	67	30	T. A	30
Parafina	67	60	T. A	60
Parafina	67	60	T. A	60

T. A= Temperatura ambiente

Tiempos de tinción con Hematoxilina-Eosina para medusas

Solvente	Tiempo (minutos)	Propósito	Observaciones
Desparafinar (60°C)	60	Eliminar rastros de parafina	
Xilol I	5	Hidratación	
Xilol II	5	Hidratación	
Alcohol abs.	3	Hidratación	
Alcohol abs.	3	Hidratación	
Alcohol 96%	3	Hidratación	
Alcohol 96%	3	Hidratación	
Agua destilada	5 enjuagues	Hidratación	Hasta que el tejido se vea hidratado
Hematoxilina	5	Reconocimiento de núcleos	Mediante una reacción redox en ácidos. Azul-morado
Alcohol ácido 1% (alcohol 96% 99ml-HCl concentrado 1ml)	Un enjuague rápido	Diferenciación	Que el tejido no se vea sobre teñido.
Agua corriente	Lavados hasta que no exista presencia de colorante.	Quitar exceso de colorante	
Agua amoniacal 1% (Agua destilada 99ml-hidroxido de amonio 1ml)	Enjuague	Cambio de color, morado-azul	
Agua destilada	Lavado		

Eosina	5	Distinción de citoplasma	Mediante una reacción redox en estructuras alcalinas (rosa).
Alcohol 80%	baño		
Alcohol 96%	3	Deshidratación	
Alcohol 96%	3	Deshidratación	
Alcohol abs.	3	Deshidratación	
Alcohol abs.	3	Deshidratación	
Xilol I	5	Deshidratación	
Xilol II	5	Deshidratación	
Montaje	----		Resina-xilol (1:1)
Secado (60ºC)	60	Evaporación de xilol	

15 ANEXO BIOLOGÍA MOLECULAR

Protocolo para extracción de ADN

1.- En un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml se colocó tejido (gónada, campana y brazos orales) hasta que se completó un volumen de 0.5 ml y se adicionó 600 µl de solución de lisis nuclear y se homogenizó con un homogenizador de plástico hasta que el tejido se degradó completamente o lo más posible.

2.- Se incubó el lisado a 65 ºC de 15-30 min.

3.- Se adicionó 3 µl de solución de RNasa al lisado nuclear y se mezcló volteando el tubo de 2 a 5 veces. Se incubó la mezcla por 15-30 min a 37 ºC y se dejó la muestra enfriar a temperatura ambiente por 5 min antes de proceder.

4.- La muestra a temperatura ambiente se añadió 200 µl de solución de precipitación de proteína y agitar vigorosamente a alta velocidad por 20 seg, se incubó la muestra en hielo por 5 min.

5.- Se centrifugó el tubo por 4 min a 13,000-16,000 x *g*, el precipitado de proteína formó un pellet blanco.

6.- Con cuidado se removió el sobrenadante que contiene el ADN y se transfirió a un tubo limpio de 1.5 ml con 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló suavemente por inversión hasta que aparezcan bandas de ADN como una masa visible.

7.- Se centrifugó a 13,000-16,000 x *g* por 2 min a temperatura ambiente, el ADN se observó como un pellet blanco, con cuidado se decantó el sobrenadante.

8.-Se añadió 600 µl de etanol 70% a temperatura ambiente y se invirtió el tubo varias veces para lavar el ADN, se centrifugó por 2 min a 13,000-16,000 x g a temperatura ambiente.

9.- Con cuidado se aspiró el etanol usando una pipeta Pasteur para no perder el ADN.

10.- Se invirtió el tubo sobre papel absorbente y secar el pellet de 10-15 min.

11.- Se adicionó 100 µl de solución rehidratante de ADN y se rehidrató el ADN incubando a 65 ºC por 1 hr, mezclando periódicamente volteando el tubo gentilmente o incubando toda la noche a temperatura ambiente o a 4 ºC.

12.- Se almacenó el ADN a 2-8 ºC.

Protocolo para limpieza de productos de PCR

1.- Se insertó una columna mini spin dentro de un tubo colector, se adicionó 0.5 ml de la solución de preparación de columna y se centrifugó a 12,000 x g por 1 min, descartando el eluído.

2.- Se añadió 5 volúmenes de solución de unión para 1 volumen de PCR y se mezcló, se adicionó a la columna y se centrifugó a 16,000 x g por 1 min; se descartó el eluido pero se retiene el tubo colector.

3.- Se reemplazó la columna dentro del tubo colector y se aplicó 0.5 ml de solución de lavado a la columna y se centrifugó a 16,000 x *g* por 1 min, se descartó el eluido pero se retiene el tubo colector.

4.- Se reemplazó la columna dentro del tubo colector y se centrifugó a 16,000 x g por 2 min, para remover el exceso de etanol, se descartó el eluído y el tubo colector.

5.-Se transfirió la columna a un tubo colector nuevo, se aplicó 50 µl de solución de

elución y se incubó a temperatura ambiente por 1 min.

6.-Para eluir el ADN se centrifugó la columna a 16,000 x *g* por 1 min; la amplificación producto de la PCR se almacena a -20 ºC para secuenciar.

Soluciones

Cantidad requerida de TAE 50X 10 ml para 500 ml de TAE 1X:

Componente y concentración final	Cantidad añadida
2 M Tris-base	2.42 g
1M de Acetato	571 µl de ácido acético glacial (17.4 M)
100 mM EDTA	2 ml de 0.5 M (pH 8)
H2O	Aforar a 10 ml

Cantidad requerida para Buffer de 0.5 M de EDTA 5 ml: 0.93 g de EDTA. 2H2O (peso molecular 372.2), 0.1 g de NaOH (peso molecular=40 g/mole) y con agua se lleva a un volumen final de 5 ml.

Cantidad de agua necesaria para resuspender cebadores

Primer	nmole	Concentración final µM	Cantidad de agua libre de nucleasas ml
PMGMT-23	91.4	10	9.1
PMGMT-24	86.4	10	8.6
KMBMT-69	86.4	10	8.6
KMBMT-70	92.6	10	9.3

>Secuencia consenso obtenida para *Chrysaora sp.* Mandinga, Veracruz, medusa 1 (689 pb).

GACCATATGTAACTGCTTGTGGGGCTTTTTTCTTAACTTTTGGAGGTGTTATATACTTTCACTATAG
CTTTTTATGAATTATGGTTCTAGGATTAAGCATGTTTACTATTACTTTTATTGTTTGATGCAGAGATG
TAATAAGAGAAGCTACTTTTCAAGGACATCATACAGAGTTAGTAAAGAAAGGTTTAAAATTAGGAAT
GATATTATTTATAATGTCAGAAATTTGTTTTTTTGTATCTTTTTTTTGGGCTTTTTTTCACAGTAGTTT
AGCTCCTGCTATAGAGTTAGGGGCCGTATGGCCCCCTATTGGAATACAGATATTAAACCCTTTCTC
AGTTCCTTTATTAAATACGGCAATTTTATTAAGTTCGGGTGCTACGGTAACTTGAGCACATCATGCT
ATTGTTAATGGTAACAGAGGGCAAGCTATAATAGGTTTAATGATGACTGTAATATTAGGGGTTTTAT
TTACAGCTTTACAAGGAATTGAATACTATGAGGCACCTTTTGCTATTTCCGATTCTGTTTATGGTTC
TACATTTTTTATGGCTACAGGATTTCATGGGTTTCATGTATTAATAGGAACAACATTTTTAACTGTTT
GTTTTGTGAGATTAGTGTTCCACCAATTTACAAGACACCATCATTTTGGTTTTGAAGCTGCTAGTTG
ATATTGGCATTTTGTA

>Secuencia consenso obtenida para *Chrysaora sp.* Mandinga, Veracruz, medusa 2 (695 pb).

GGCCTTGACCATATGTAACTGCTTGTGGGGCTTTTTTCTTAACTTTTGGAGGTGTTATATACTTTCA
CTATAGCTTTTTATGGATTATGGTTCTAGGATTAAGCATGTTTACTATTACTTTTATTGTTTGATGCA
GAGATGTAATAAGAGAAGCTACTTTTCAAGGACATCATACAGAGTTAGTAAAGAAAGGTTTAAAATT
AGGAATGATATTATTTATAGTGTCAGAAATTTGTTTTTTTGTATCTTTTTTTTGGGCTTTTTTTCACAG
TAGTTTAGCTCCTGCTATAGAGTTAGGGGCCGTATGGCCCCCTATTGGAATACAGATATTAAACCC
TTTCTCAGTTCCTTTATTAAATACGGCAATTTTATTAAGTTCGGGTGCTACGGTAACTTGAGCACAT
CATGCTATTGTTAACGGTAACAGAGGGCAAGCTATAATAGGTTTAATGATGACTGTAATATTAGGA
GTTTTATTTACAGCTTTACAAGGAATTGAATACTATGAGGCGCCTTTTGCTATATCCGATTCTGTTT
ATGGTTCTACATTTTTTATGGCTACAGGATTTCATGGGTTTCATGTATTAATAGGAACAACATTTTTA
ACTGTTTGTTTTGTGAGATTAGTGTTTCATCAATTTACAAGGCACCATCATTTTGGTTTTGAAGCTG
CTAGTTGATATTGGCATTTTGTA

Alineamiento entre secuencias concenso de medusa 1 y 2 con 99% de similitud CLUSTAL O (1.2.3)

```
1     ------ GACCATATGTAACTGCTTGTGGGGCTTTTTTCTTAACTTTTGGAGGTGTTATAT
2     GGCCTTGACCATATGTAACTGCTTGTGGGGCTTTTTTCTTAACTTTTGGAGGTGTTATAT
          ***************************************************

1     ACTTTCACTATAGCTTTTTATGAATTATGGTTCTAGGATTAAGCATGTTTACTATTACTT
2     ACTTTCACTATAGCTTTTTATGGATTATGGTTCTAGGATTAAGCATGTTTACTATTACTT
      *********************. ************************************

1     TTATTGTTTGATGCAGAGATGTAATAAGAGAAGCTACTTTTCAAGGACATCATACAGAGT
2     TTATTGTTTGATGCAGAGATGTAATAAGAGAAGCTACTTTTCAAGGACATCATACAGAGT
      ************************************************************

1     TAGTAAAGAAAGGTTTAAAATTAGGAATGATATTATTTATAATGTCAGAAATTTGTTTTT
2     TAGTAAAGAAAGGTTTAAAATTAGGAATGATATTATTTATAGTGTCAGAAATTTGTTTTT
      ****************************************. ******************

1     TTGTATCTTTTTTTTGGGCTTTTTTTCACAGTAGTTTAGCTCCTGCTATAGAGTTAGGGG
2     TTGTATCTTTTTTTTGGGCTTTTTTTCACAGTAGTTTAGCTCCTGCTATAGAGTTAGGGG
      ************************************************************

1     CCGTATGGCCCCCTATTGGAATACAGATATTAAACCCTTTCTCAGTTCCTTTATTAAATA
2     CCGTATGGCCCCCTATTGGAATACAGATATTAAACCCTTTCTCAGTTCCTTTATTAAATA
      ************************************************************

1     CGGCAATTTTATTAAGTTCGGGTGCTACGGTAACTTGAGCACATCATGCTATTGTTAATG
2     CGGCAATTTTATTAAGTTCGGGTGCTACGGTAACTTGAGCACATCATGCTATTGTTAACG
      ********************************************************** *

1     GTAACAGAGGGCAAGCTATAATAGGTTTAATGATGACTGTAATATTAGGGGTTTTATTTA
2     GTAACAGAGGGCAAGCTATAATAGGTTTAATGATGACTGTAATATTAGGAGTTTTATTTA
      ************************************************. **********

1     CAGCTTTACAAGGAATTGAATACTATGAGGCACCTTTTGCTATTTCCGATTCTGTTTATG
2     CAGCTTTACAAGGAATTGAATACTATGAGGCGCCTTTTGCTATATCCGATTCTGTTTATG
      ******************************. ***********: ****************

1     GTTCTACATTTTTTATGGCTACAGGATTTCATGGGTTTCATGTATTAATAGGAACAACAT
2     GTTCTACATTTTTTATGGCTACAGGATTTCATGGGTTTCATGTATTAATAGGAACAACAT
      ************************************************************

1     TTTTAACTGTTTGTTTTGTGAGATTAGTGTTCCACCAATTTACAAGACACCATCATTTTG
2     TTTTAACTGTTTGTTTTGTGAGATTAGTGTTTCATCAATTTACAAGGCACCATCATTTTG
```

```
                                ****************************** ** ***********.**************

1       GTTTTGAAGCTGCTAGTTGATATTGGCATTTTGTA
2       GTTTTGAAGCTGCTAGTTGATATTGGCATTTTGTA
                                   ***********************************
```

Alineamiento de secuencias de nucleótidos utilizadas para el análisis de distancias y topologías genéticas obtenidas de las bases de datos de NCBI se representa con las claves de acceso (CLUSTAL O (1.2.3)).

```
JN700937.1      --CCTTGGCCTTACGTAGCTGCTTGTGGTGCTTTTTTTTTGACTTTTGGAAGTGTAATAT
JN700944.1      ------------------------------------------------------------
Chysaora        GGCCTTGACCATATGTAACTGCTTGTGGGGCTTTTTTCTTAACTTTTGGAGGTGTTATAT
JN700941.1      --CCTTGACCATATGTAACTGCCTGCGGGGCTTTTTTCTTAACTTTTGGAGGTGTTATAT


JN700937.1      ATTTTCATTATAGTTTTATTTGGATAATGTTGATAGGACTGTCTATGTTTACAGTTACTT
JN700944.1      ---------------------------------------------TTACTGTCACTT
Chysaora        ACTTTCACTATAGCTTTTTATGGATTATGGTTCTAGGATTAAGCATGTTTACTATTACTT
JN700941.1      ACTTTCATTACAGCTTTTTATGGATTATGATTCTCGGGTTAAGCATGTTTATTATTACTT
                                                *** :.* ****

JN700937.1      TTATAGTATGATGTAGAGATATAATTAGAGAAGCTACCTTTCAAGGTCATCATACAGAAT
JN700944.1      TTATCTTCTGATGAAGAGATGTTATTAGAGAAGCTACTTTCCAAGGGCATCACACAGCCA
Chysaora        TTATTGTTTGATGCAGAGATGTAATAAGAGAAGCTACTTTTCAAGGACATCATACAGAGT
JN700941.1      TTATTGTTTGATGTAGAGATGTAATAAGAGAAGCTACTTTTCAAGGACATCACACAGAAT
                ****  * ***** ******.*:**:*********** ** ***** ***** ****. :

JN700937.1      ATGTAAAAAGAGGTTTAAAGATAGGAATGATATTATTTATAGTTTCCGAAATTTGTTTTT
JN700944.1      TTGTTCGTCAAGGATTAAAATACGGAATGTTACTTTTCATTCTTTCAGAAGTTTGTTTCT
Chysaora        TAGTAAAGAAAGGTTTAAAATTAGGAATGATATTATTTATAGTGTCAGAAATTTGTTTTT
JN700941.1      TAGTAAAGAAAGGCTTAAAATTAGGGATGGTATTATTTATAGTGTCAGAAATTTGTTTTT
                ::**:.. ..*** *****.:.:.**.*** ** *:** **: * **.***.******* *

JN700937.1      TTGTATCTTTTTTCTGGGCTTTTTTCCATAGCAGCTTAGCTCCTGCTATAGAATTAGGGG
JN700944.1      TTGTTTCTTTCTTTTGGGCTTTTTTTCACAGTAGTTTAGCTCCTGCTGTTGAATTAGGGG
Chysaora        TTGTATCTTTTTTTTGGGCTTTTTTTCACAGTAGTTTAGCTCCTGCTATAGAGTTAGGGG
JN700941.1      TTGTATCTTTTTTTTGGGCTTTTTTTCACAGTAGTTTAGCCCCTACTATAGAGTTAGGAG
                ****:***** ** *********** ** ** ** ***** ***.**.*:**.*****.*

JN700937.1      CTTTATGGCCTCCTGTAGGAATACAAATACTTAATCCCTTTTCTGTACCCCTCTTAAATA
JN700944.1      CTGTTTGACCTCCAACAGGAATTGATGTTTTAAACCCTTTTGCTGTTCCTTTACTGAATA
Chysaora        CCGTATGGCCCCCTATTGGAATACAGATATTAAACCCTTTCTCAGTTCCTTTATTAAATA
JN700941.1      CCGTATGGCCTCCTGTTGGAATACAGATATTAAACCCTTTTTCAGTTCCCCTGTTAAATA
                *  *:**.** **:. :*****: * .*: *:** ** **  *:**:**  *  *.****

JN700937.1      CTGCAATTTTGTTAAGTTCAGGAGCTACAGTTACTTGGGCCCACCACGCTATAGTAAATG
JN700944.1      CAGCAATTTTACTAAGTTCTGGGGCTACAGTAACTTGAGCCCATCATGCAATTATTAGTG
Chysaora        CGGCAATTTTATTAAGTTCGGGTGCTACGGTAACTTGAGCACATCATGCTATTGTTAACG
JN700941.1      CCGCAATTTTATTAAGTTCAGGTGCTACCGTAACTTGAGCACACCATGCTATTGTTAACG
                * ********. ******* ** ***** **:*****.**.** ** **:**:.*:*. *

JN700937.1      GTAATAGAAAACAAGCTATTCAAGGCTTATTGGTTACTGTTATTTTAGGGGTAATATTTA
JN700944.1      GGCAGCGCAAATCTGCTCTTTTAGGGCTTTTAGTCACAGTCTTTTTAGGGATGATTTTTT
Chysaora        GTAACAGAGGGCAAGCTATAATAGGTTTAATGATGACTGTAATATTAGGAGTTTTATTTA
```

```
JN700941.1      GTAATAGAGGGCAAGCTATTATAGGATTAATGATGACTGTGGTATTAGGAATTTTATTTA
                * .* .*.... .:***.*: :***  *::*..* **:**  *:*****..* :*:***:

JN700937.1      CAGCTCTTCAAGGAATGGAATACTACGAAGCTCCTTTTGCTATCTCAGATTCTGTATATG
JN700944.1      CAGCTTTACAAGGAATGGAATACTATGAGGCCCCTTTTGCTATTGCAGATTCTGTTTATG
Chysaora        CAGCTTTACAAGGAATTGAATACTATGAGGCGCCTTTTGCTATATCCGATTCTGTTTATG
JN700941.1      CAGCTTTACAAGGAATTGAATATTATGAAGCACCTTTTGCTATCTCTGACTCTGTTTATG
                ***** *:******** ***** ** **.** ***********  * ** *****:****

JN700937.1      GATCAACATTTTTTATGGCTACAGGATTTCATGGGTTTCATGTGTTGGTAGGAACTACTT
JN700944.1      GCTCTACTTTTTTTGTAGCTACAGGGTTTCATGGGTTTCACGTTCTTATTGGGACTACTT
Chysaora        GTTCTACATTTTTTATGGCTACAGGATTTCATGGGTTTCATGTATTAATAGGAACAACAT
JN700941.1      GCTCTACATTTTTTATGGCTACAGGATTTCATGGGTTTCATGTGTTAATAGGAACAACAT
                * **:**:******.*.********.************** **  * .*:**.**:**:*

JN700937.1      TTTTACTTGTTTGTTTATCAAGATTAGTATCCCATCAATTCACTAGACACCATCATTTTG
JN700944.1      TTTTAGCTGTTTGTTTAGTTCGGTTAATTAACCACCAATTTACTAAACACCATCATTTTG
Chysaora        TTTTAACTGTTTGTTTTGTGAGATTAGTGTTTCATCAATTTACAAGGCACCATCATTTTG
JN700941.1      TTTTAACTGTTTGTTTTGTAAGATTAGTGTTTCATCAATTTACAAGACATCACCATTTTG
                *****  *********:   .*.***.* :  ** ***** **:*..** ** *******

JN700937.1      GATTTGAAGCAGCAAGCTGATATTGACATTTTGTA
JN700944.1      GTTTTGAAGCTGCTAGTTGGTATTGACATTTTGT-
Chysaora        GTTTTGAAGCTGCTAGTTGATATTGGCATTTTGTA
JN700941.1      GGTTTGAAGCTGCTAGTTGATATTGACACTTTTGT-
                * ********:**:** **.*****.** *****
```

>Secuencia traducida a partir del gen de la medusa 2 en el programa NCBI

PWPYVTACGAFFLTFGGVMYFHYSFLWMMVLGLSMFTITFIVWCSDVMSEATFQGHHTELVkkglklgmmm

lFMMVSEIGffvsffwaffhssLAPAMELGAVWPPIGMQMLNPFSVPLLNTAILLSSGATVTWAHHAIVNGNSGQ

AmmmglmmmtvmhlgvlFTALQGIEYYEAPFAMSDSVYGSTFFMATGFHGFHVLMGTTFLTVCFVSLVFHQFT

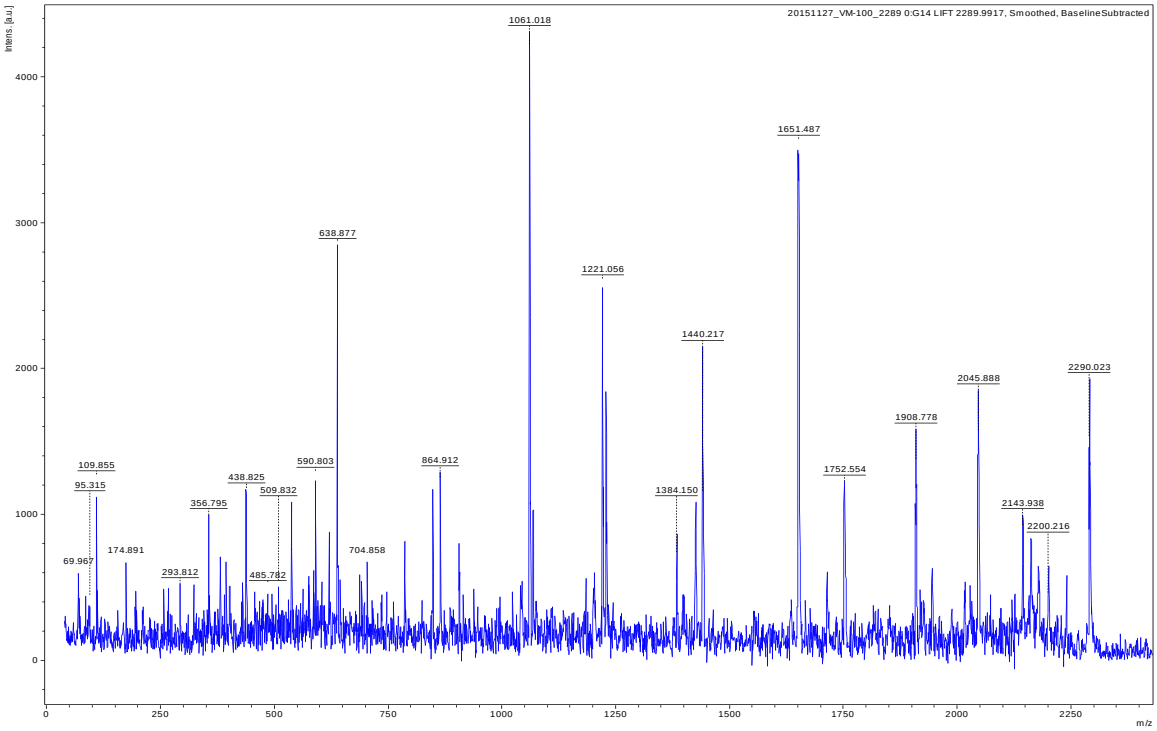
SHHHFGFEAASWYWHFV

Alineamientos de secuencias de proteínas obtenidas del blastx para el análisis de distancias y topologías genéticas CLUSTAL O(1.2.3)

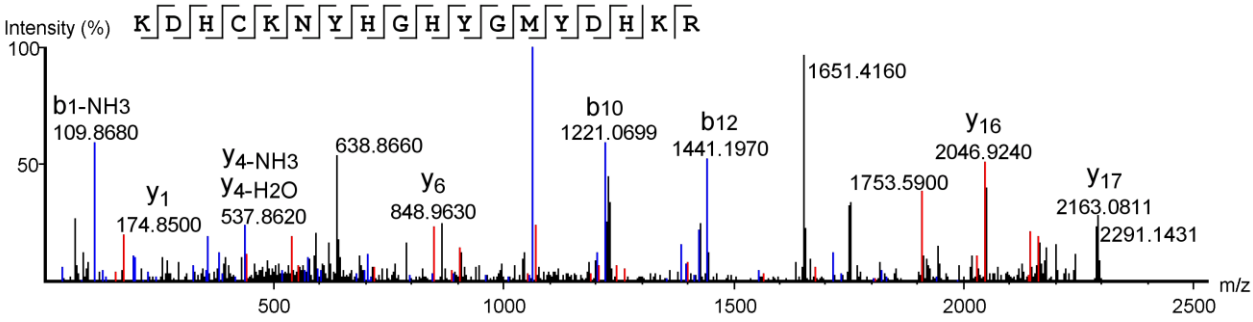
```
AER54629.1          PWPYLAACGAFLLTFGGVIYFHYSFMWLMIAGLAMFTLTFVVWCRDVVRESTFQGLHTDL
YP_004940466.1      PWPYTAACGVFLITLGGVIYFHYSFAWVLLLGFLVLSVTFVVWCRDVVREATFQGHHTEV
Chrysaora           PWPYVTACGAFFLTFGGVMYFHYSFLWMVLGLSMFTITFIVWCSDVMSEATFQGHHTEL
AER54516.1          PWPYVTACGAFFLTFGGVIYFHYSFLWMILGLSMFIITFIVWCRDVIREATFQGHHTEL
AMR36713.1          ---YVASCGTFLLTLGGVIYFHYSFAWVMLLGILILTTTFVVWCRDVIREATFQGHHTEV
AER54490.1          PWPYVAACGAFFLTFGSVIYFHYSFIWMLIGLSMFTVTFIVWCRDIIREATFQGHHTEY
YP_007516986.1      PWPYVTACGAFLLTFGGVIYFHYSFIWLMLIGLLMFAITFIVWCRDIVREATFQGHHTEL
AET13208.1          PWPYVASCGAFLLTLGSVIYFHYSFIWMLLGLLMFVMTFIVWCRDVVRESTFQGHHTEI
AET13222.1          PWPYVCSCGAFFLTLGSVIYFHYSFIWMALGFSIFTITFIVWCRDVIREATFQGHHTEI
ADY15477.1          PWPYVSACGAFFLTLGSVIYFHYSFIWMILGFLIFGTTFTVWCRDIIREXTFQGHHTEI
BAR46014.1          PWPYVCACGAFFLTLGSVIYFHYSFIWMILGFLIFGTTFVVWCRDIIREATFQGHHTEI
BAR45999.1          PWPYVCACGAFFLTLGSVIYFHYSFIWMVLGFLIFGTTFIVWCRDIIREATFQGHHTEI
                    * :**.*::*:*.*:****** *::  *: ::  ** *** *:: * **** **:
```

```
AER54629.1          VKKGLKLGMILFIVSEICFFVSFFWAFFHSSLAPAIELGALWPPRGIQILNPFSVPLLNT
YP_004940466.1      VKKGLKIGMITFILSEICFFVAFFWAFFHSSLAPAIELGALWPPIGVQILNPFSVPLLNT
Chrysaora           VkkgLkIgmmIFMVSEICffvsffwaffhssLAPAMELGAVWPPIGMQMLNPFSVPLLNT
AER54516.1          VKKGLKLGMVLFIVSEICFFVSFFWAFFHSSLAPTIELGAVWPPVGIQILNPFSVPLLNT
AMR36713.1          VKRGLKIGMLIFILSEVCFFVAFFWAFFHSSLAPAVELGALWPPIGIQILNPFSVPLLNT
AER54490.1          VKRGLKIGMILFIVSEICFFVSFFWAFFHSSLAPAIELGALWPPVGIQILNPFSVPLLNT
YP_007516986.1      VKRGLKVGMILFIVSEICFFVSFFWAFFHSSLAPAIELGAIWPPVGVQILNPFSVPLLNT
AET13208.1          VKRGLKIGMLLFIVSEVCFFVSFFWAFFHSSLAPAIELGALWPPIGIQILNPFSVPLLNT
AET13222.1          VRRGLKIGMLLFIISEVCFFVSFFWAFFHSSLAPAIELGTVWPPVGIQILNPFSVPLLNT
ADY15477.1          VKKGLKIGMLLFIVSEICFFVSFFWAFFHSSLAPAIELGALWPPIGIQILNPFSVPLLNT
BAR46014.1          VKKGLKIGMLLFIVSEVCFFVSFFWAFFHSSLAPAIELGALWPPIGVQILNPFSVPLLNT
BAR45999.1          VKKGLKIGMLLFIVSEVCFFVSFFWAFFHSSLAPAIELGALWPPIGIQILNPFSVPLLNT
                    *:.***:**: *:.**:****:************:.***:.*** *:*:***********

AER54629.1          AILLSSGATVTWAHHAIINGNRGQSVKGLLFTVALGVIFTGLQGAEYYEAPFAISDSVYG
YP_004940466.1      AILLSSGATVTWSHHAIINGKREQSLLSLLFTVVLGIIFTSLQVMEYHEAPFAISDSVYG
Chrysaora           AILLSSGATVTWAHHAIVNGNSGQAmmgLmmtvmlgvIFTALQGIEYYEAPFAMSDSVYG
AER54516.1          AILLSSGATVTWAHHAIVNGNRGQAIIGLMMTVVLGILFTALQGIEYYEAPFAISDSVYG
AMR36713.1          AILLSSGATVTWAHHAIINGRREQALTGLSLTVVLGVLFTSLQGMEYYEAPFAISDSVYG
AER54490.1          AILLSSGATVTWAHHAIVNGNRKQAIQGLLVTVILGVIFTALQGMEYYEAPFAISDSVYG
YP_007516986.1      AILLSSGATVTWAHHAIVNGSRKQAITGLIVTVVLGVIFTGLQAMEYYEAPFAISDSVYG
AET13208.1          AILLSSGATVTWAHHAIINGQREQAITGLMFTIFLGVIFTGLQGMEYYEAPFAISDSVYG
AET13222.1          AILLSSGATVTWAHHAIINGKREQAVAGLASTVLLGVIFTTLQGVEYYEAPFAISDSVYG
ADY15477.1          AILLSSGATVTWAHHAIINGQRKQAIAGLITTVLLGVIFTSLQGIEYIEAPFAISDSVYG
BAR46014.1          AILLSSGATVTWAHHAIINGQRGQAISGLVFTVLLGIVFTALQGIEYVEAPFAISDSVYG
BAR45999.1          AILLSSGATVTWAHHAIINGQRGQAITGLIFTVLLGIIFTGLQGIEYVEAPFAISDSVYG
                    ************:****:**   *:: .*  *: **::** **  ** *****:******

AER54629.1          STFFMATGFHGFHVLIGTTFLGVCLGRLAFHQFTRHHHFGFEAASWYWHFV
YP_004940466.1      SVFYMATGFHGFHVLVGTTFLLVCLIRLVYHQFTRHHHFGFEAASWYWHFV
Chrysaora           STFFMATGFHGFHVLMGTTFLTVCFVSLVFHQFTSHHHFGFEAASWYWHFV
AER54516.1          STFFMATGFHGFHVLIGTTFLTVCFVRLVFHQFTRHHHFGFEAASWYWHFV
AMR36713.1          SVFFMATGFHGFHVLIGTTFLTVCLFRLVSHQFTRHHHFGFEAASWYW---
AER54490.1          STFFMATGFHGFHVLVGTTFLLVCLSRLVSHQFTRHHHFGFEAASWYWHFV
YP_007516986.1      STFFMATGFHGFHVLVGTTFLLICLLRLTFHQFTRHHHFGFEAASWYWHFV
AET13208.1          STFFMATGFHGFHVLIGTTFLSVCILRLIFHQFTRHHHFGFEAASWYWHFV
AET13222.1          STFFMATGFHGFHVLIGTTFLFVCLFRLVFHQYTRHHHFGFEAASWYWHFV
ADY15477.1          STFFMATGFHGFHVLVGTTFLLVCLLRLMFHQYTRHHHFGFEAASWYWHFV
BAR46014.1          STFFMATGFHGFHVLIGTTFLLVCLMRLIFHQYTRHHHFGFEAASWYWHFV
BAR45999.1          STFFMATGFHGFHVLIGTTFLLVCLMRLVFHQYTRHHHFGFEAASWYWHFV
                    *.*:***********:***** .*:  *  **:* *************
```

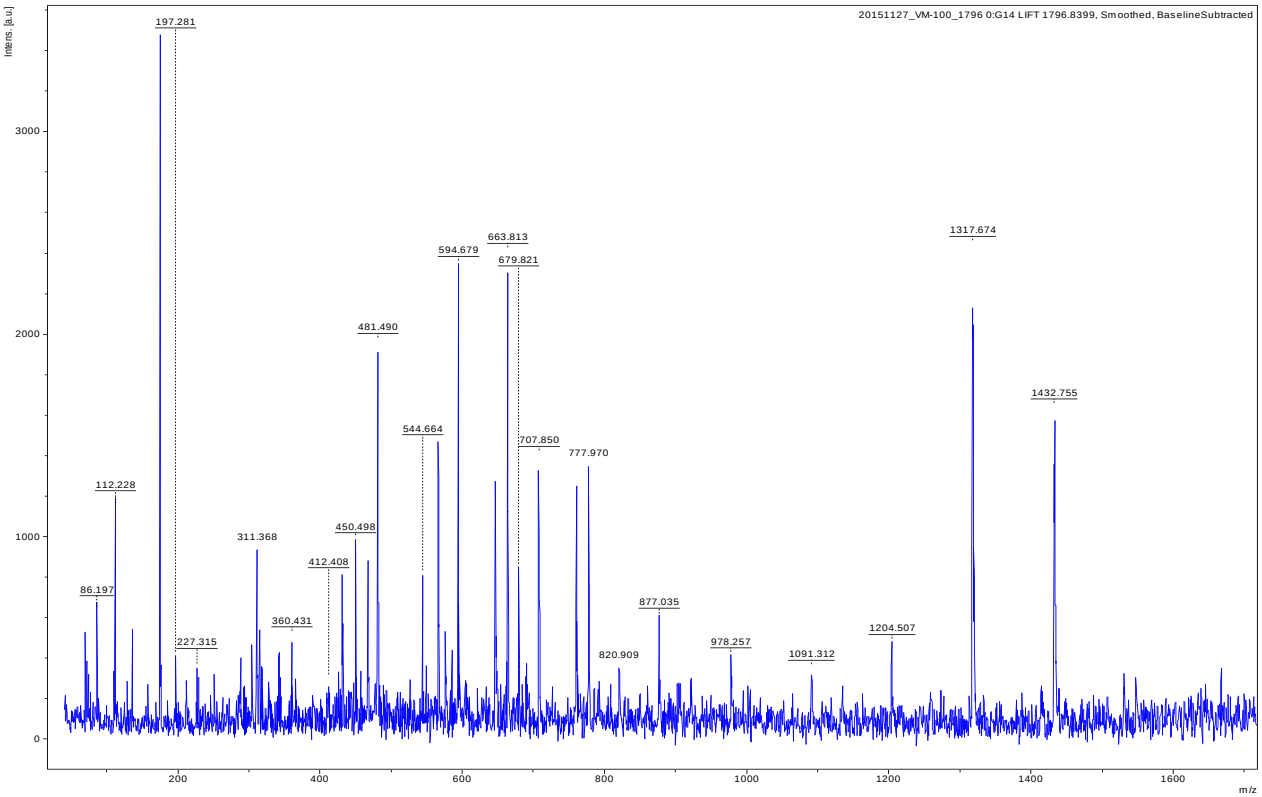
16 ANEXO PROTEÍNAS



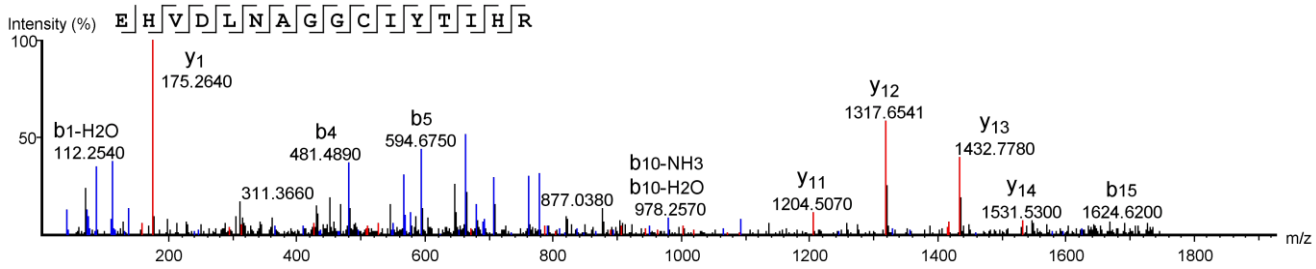
Espectro de fragmentación Proteína 100 kDa fragmento 2289.9917



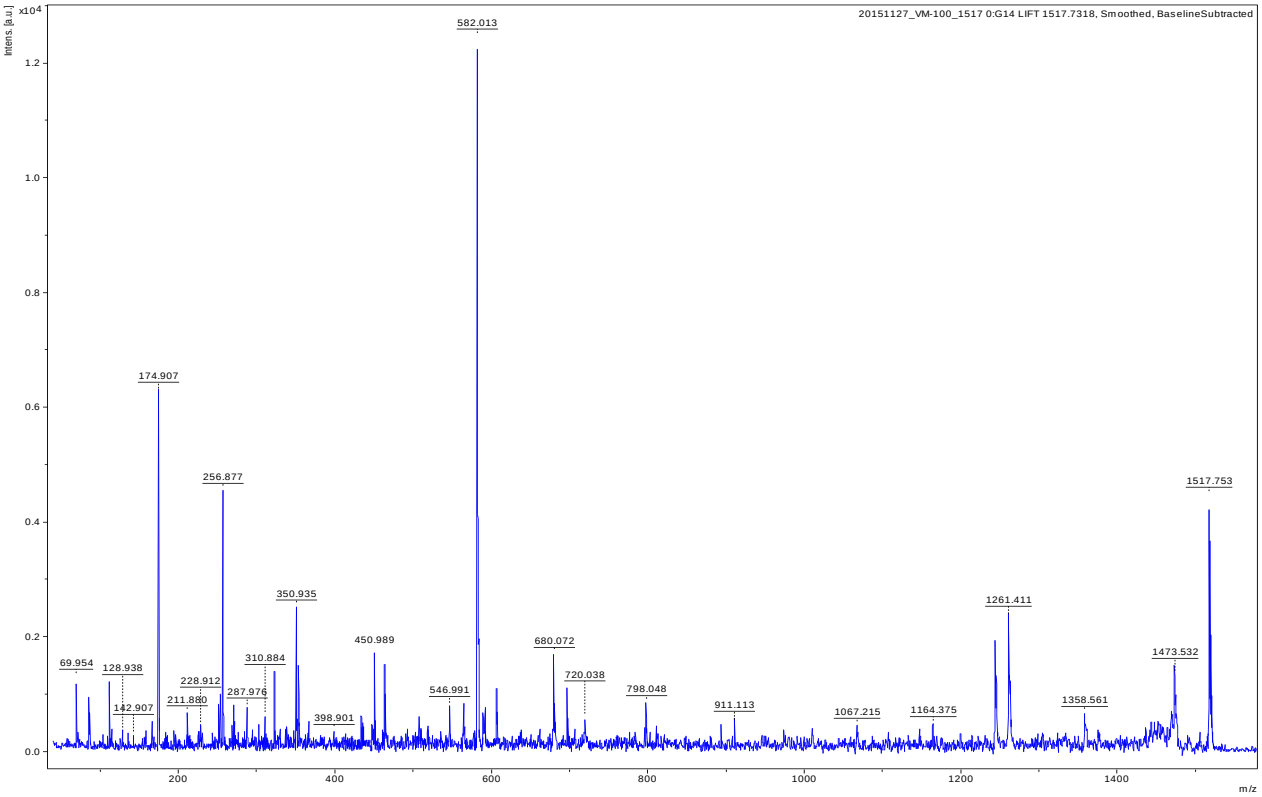
Secuencia fragmento 2289.9917



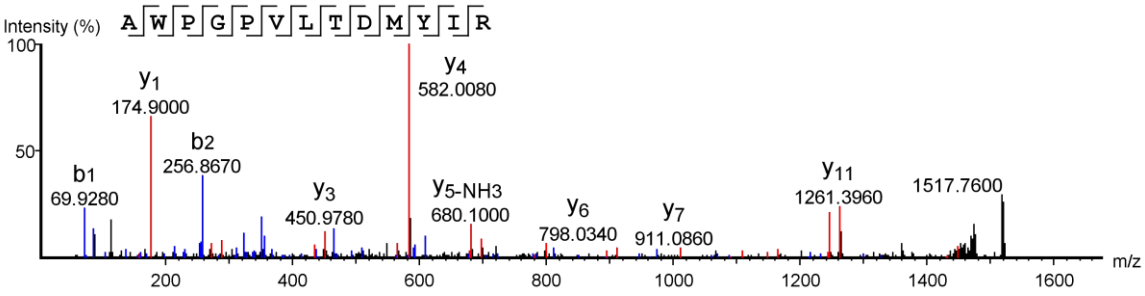
Espectro de fragmentación Proteína 100 kDa fragmento 1796.8399



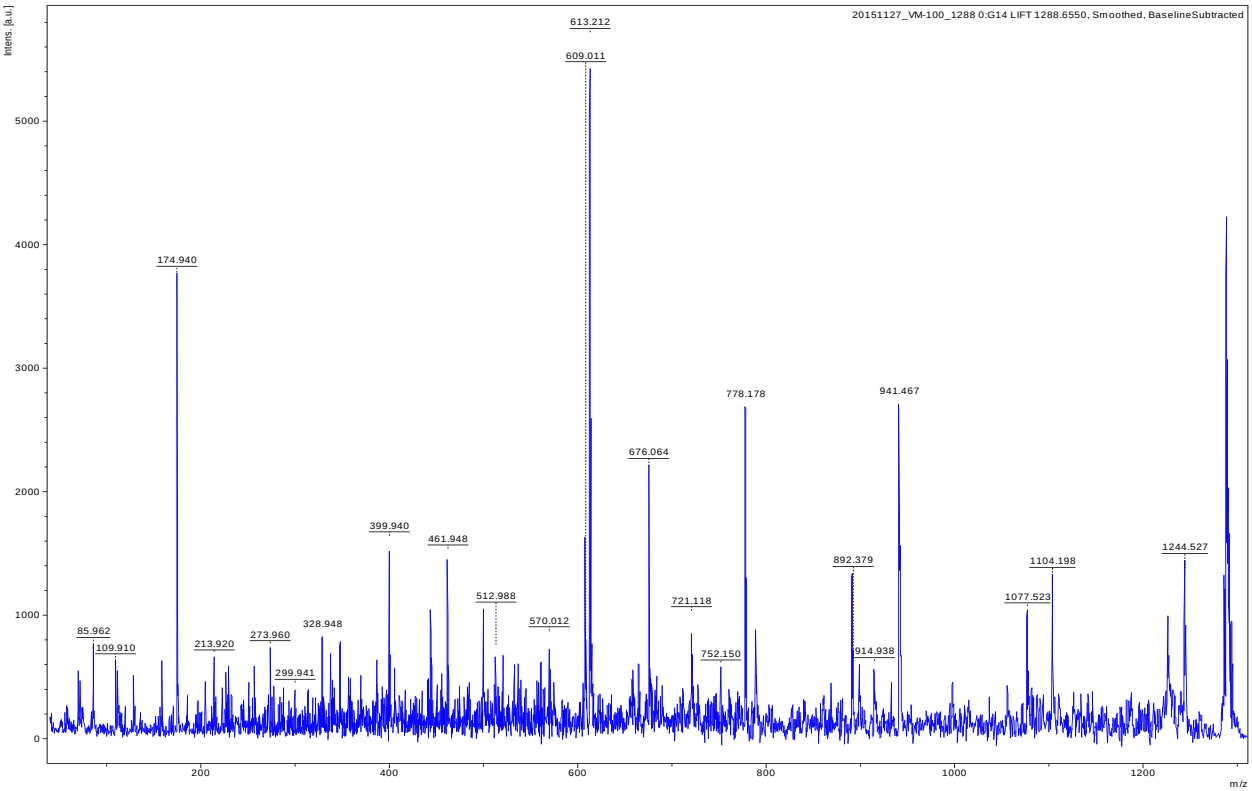
Secuencia fragmento 1796.8399



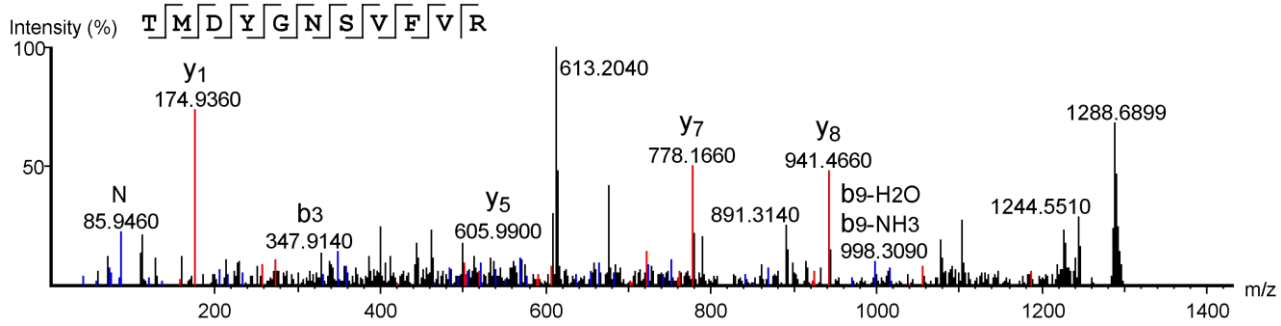
Espectro de fragmentación Proteína 100 kDa fragmento 1517.7318



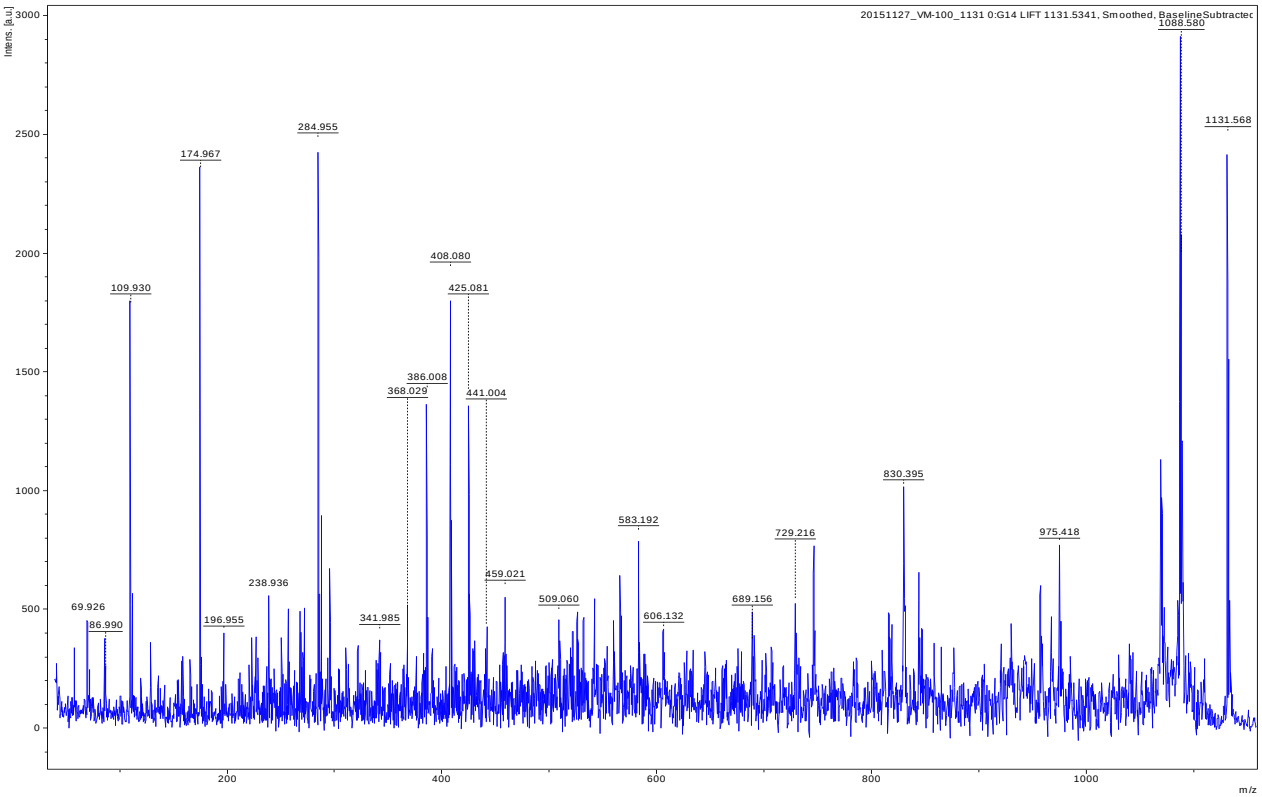
Secuencia fragmento 1517.7318



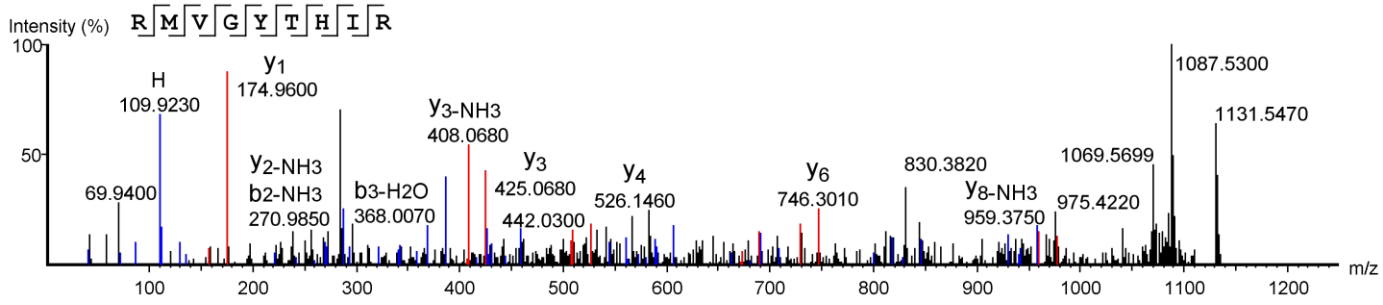
Espectro de fragmentación Proteína 100 kDa fragmento 1288.6550



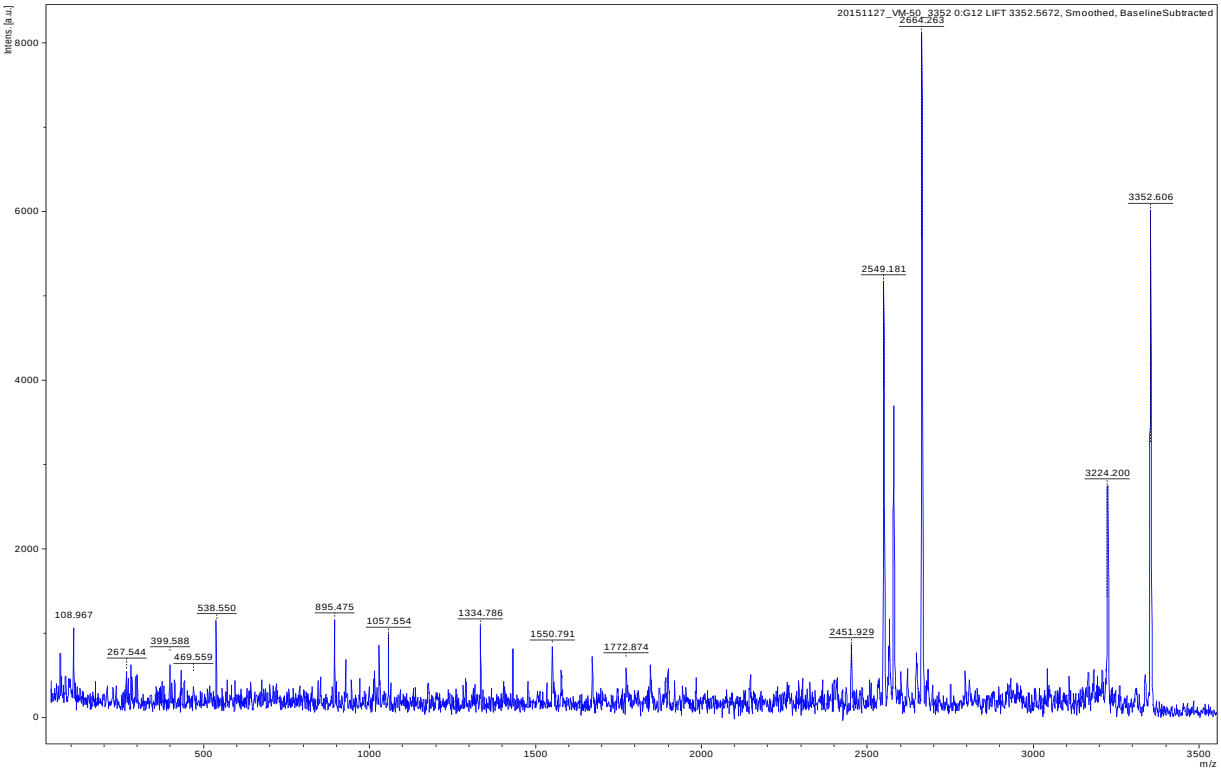
Secuencia fragmento 1288.6550



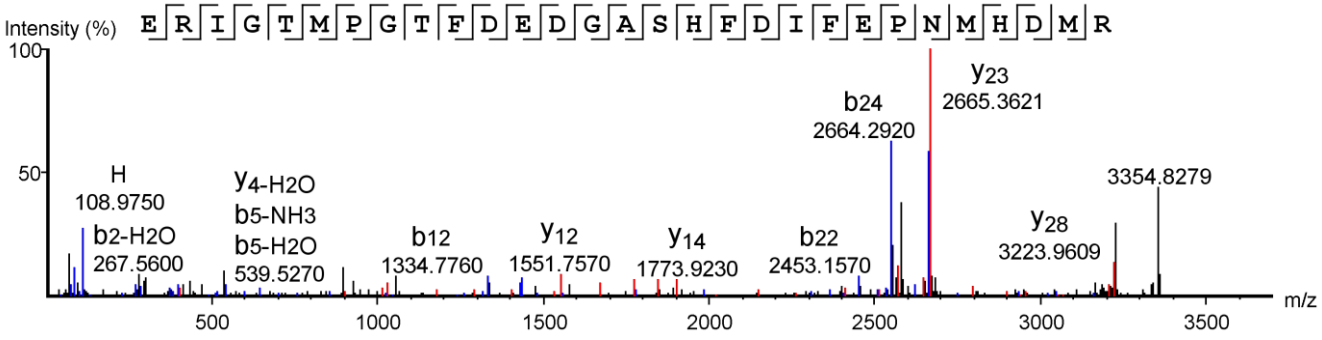
Espectro de fragmentación Proteína 100 kDa fragmento 1131.5341



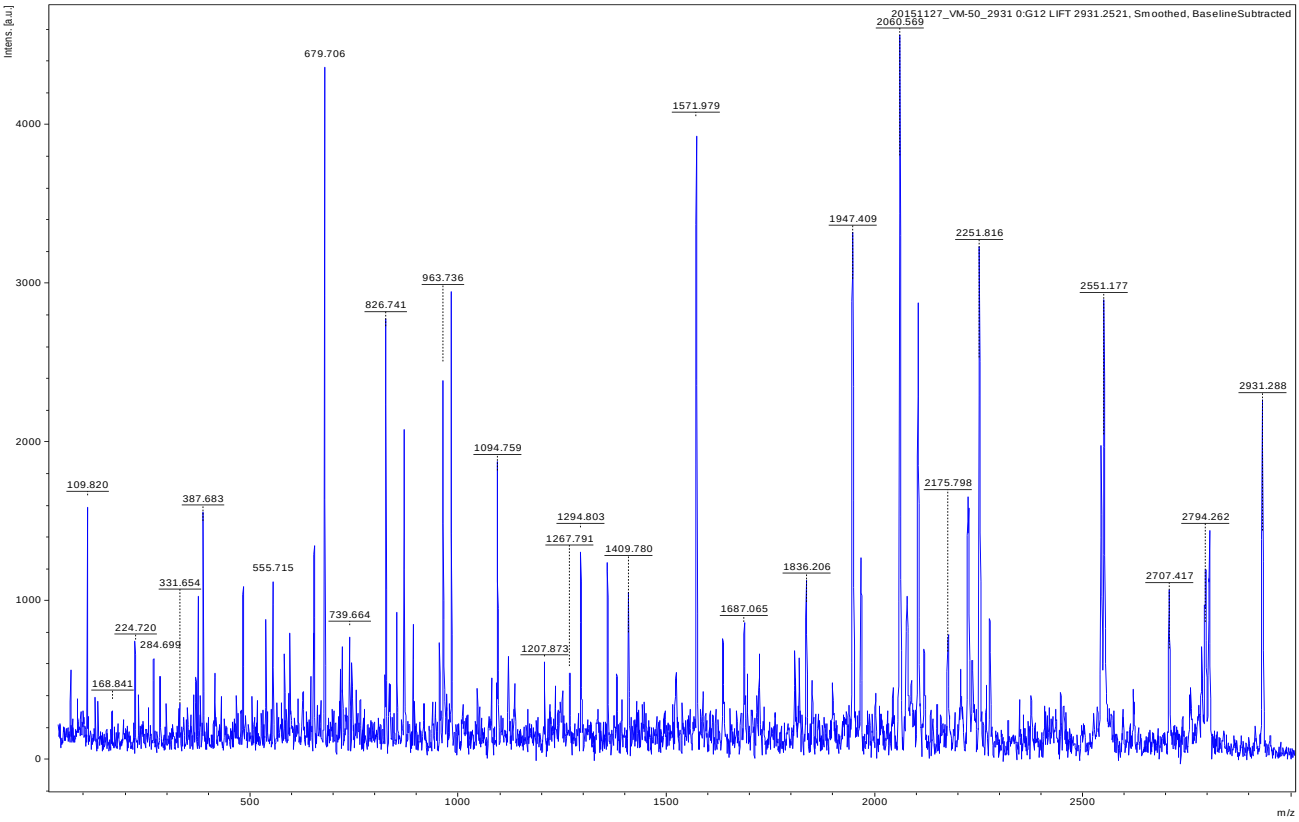
Secuencia fragmento 1131.5341



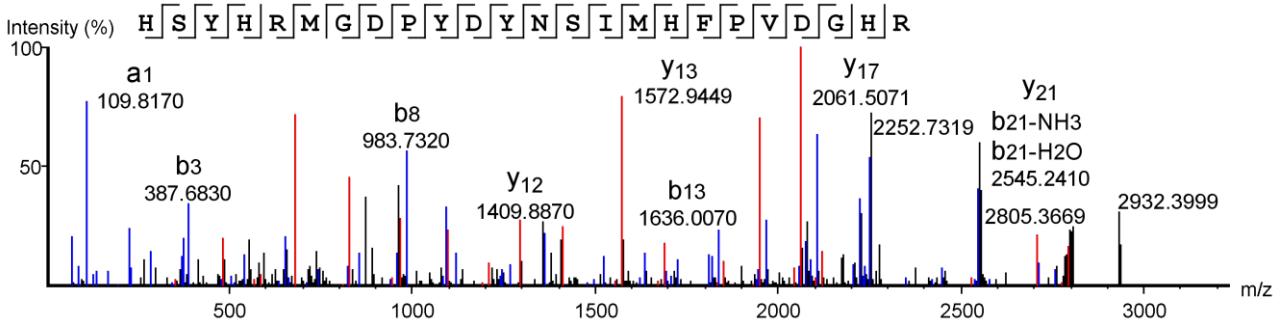
Espectro de fragmentación Proteína 50 kDa fragmento 3352.56



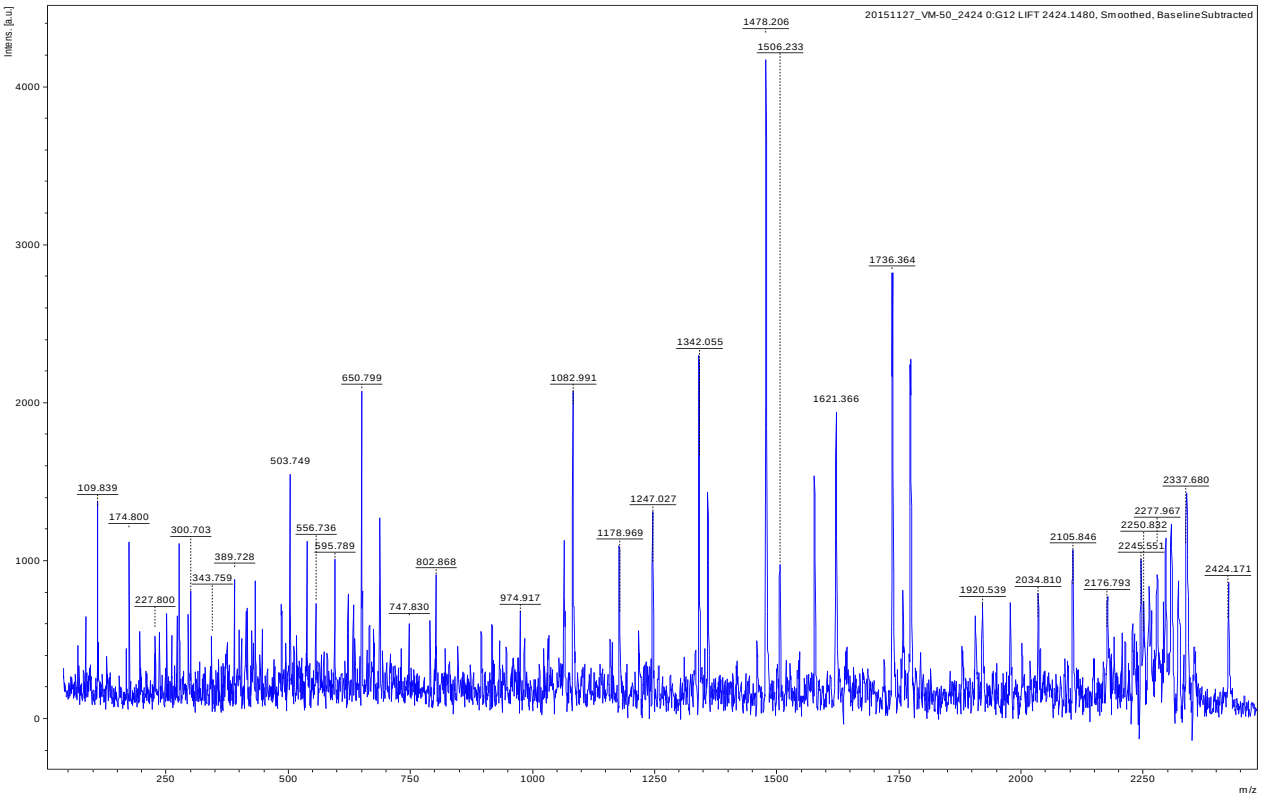
Secuencia fragmento 3352.56



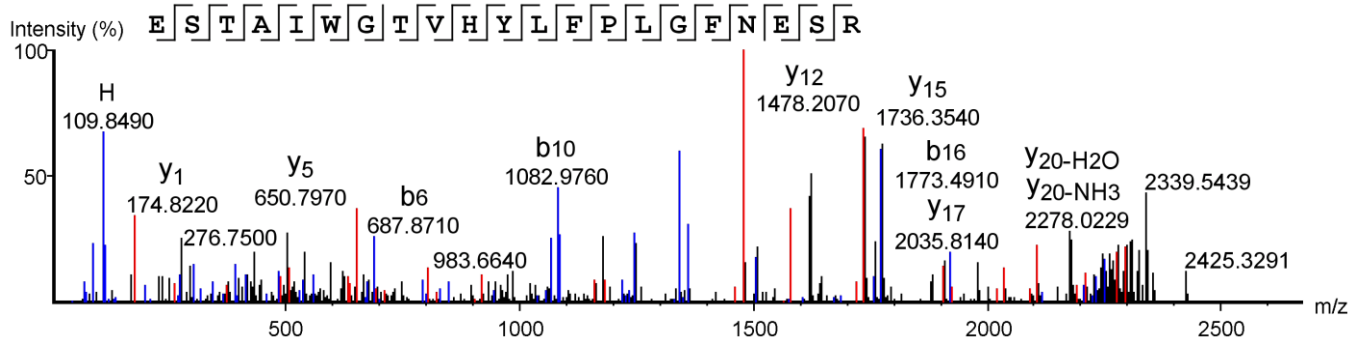
Espectro de fragmentación Proteína 50 kDa fragmento 2931.25



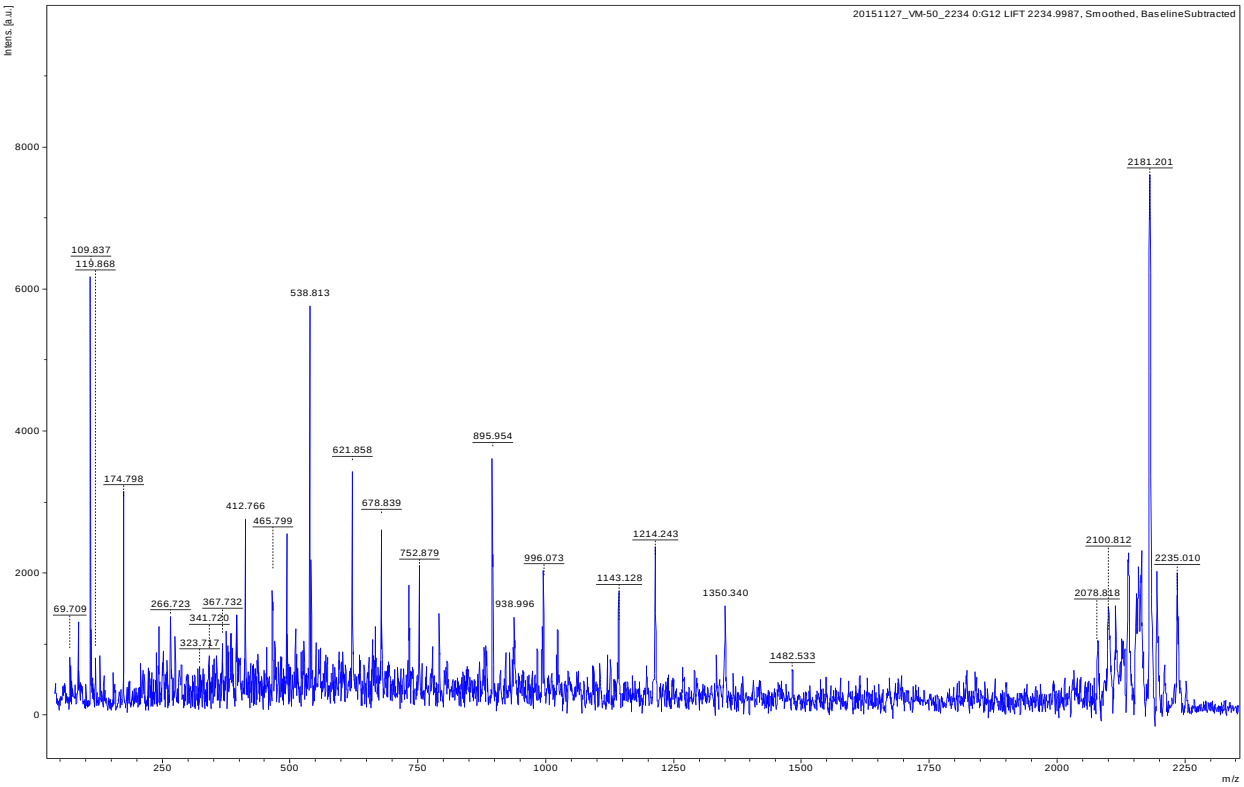
Secuencia fragmento 2931.25



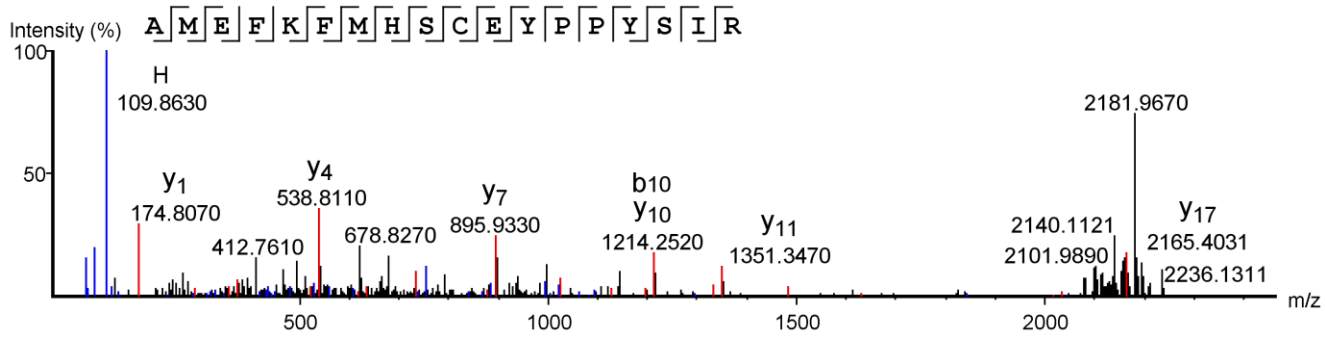
Espectro de fragmentación Proteína 50 kDa fragmento 2424.1480



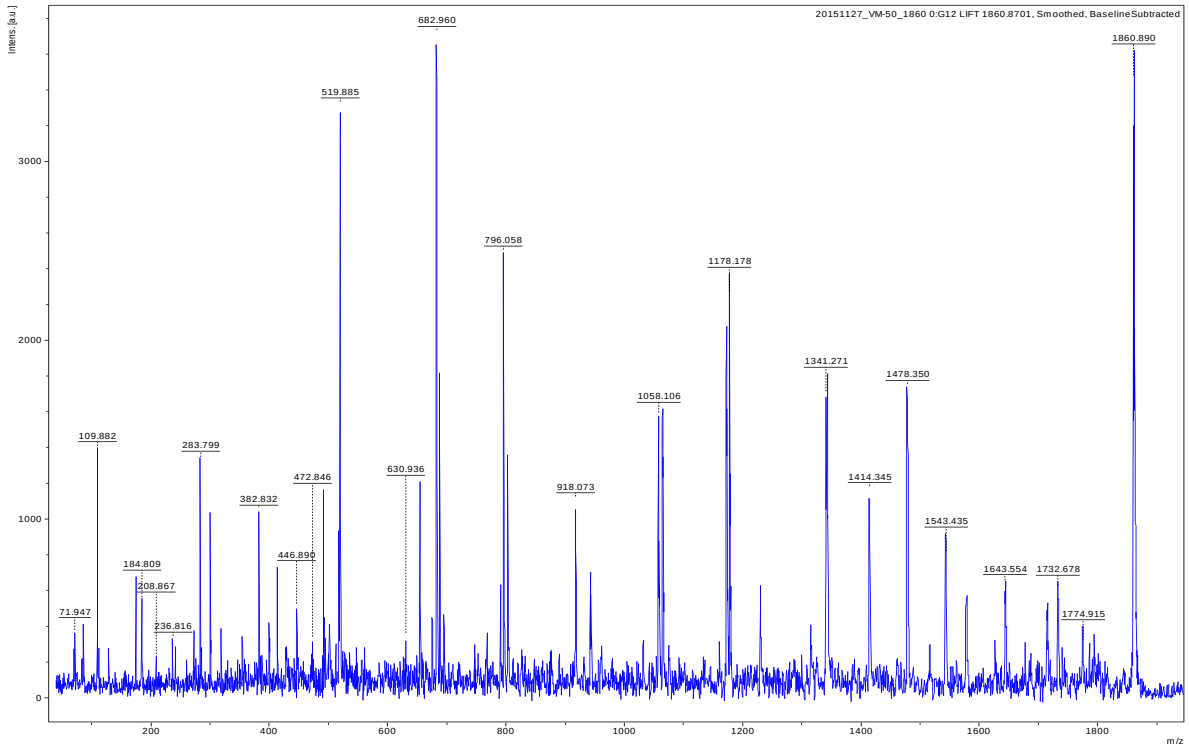
Secuencia fragmento 2424.1480



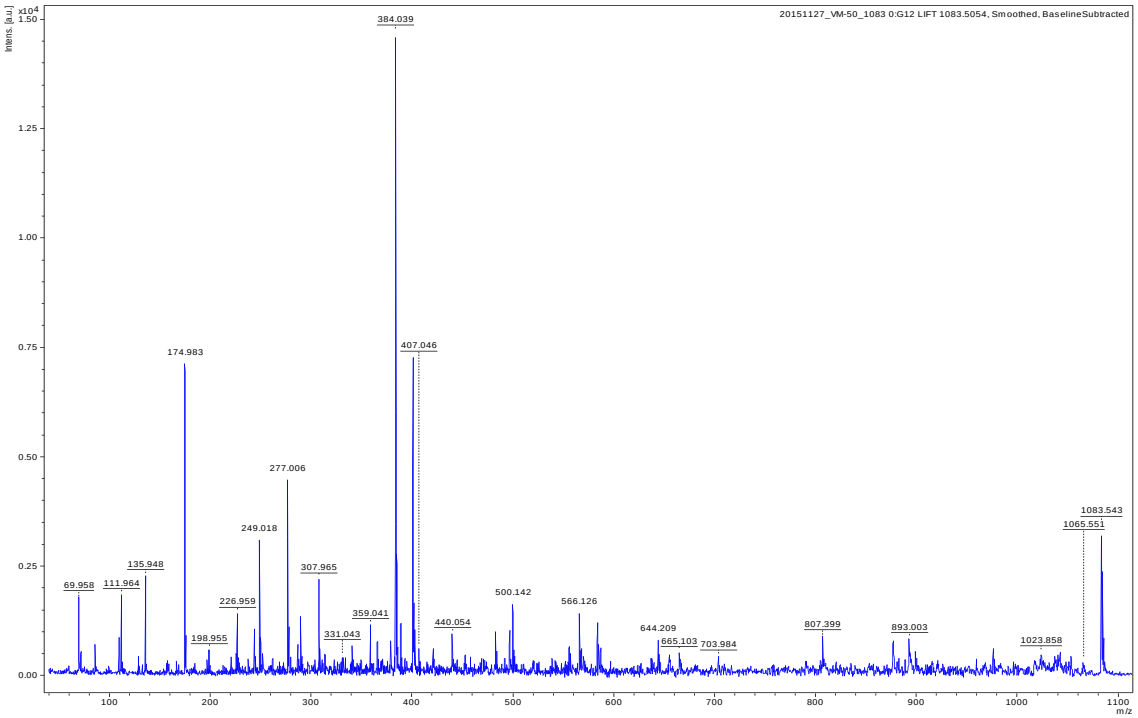
Espectro de fragmentación Proteína 50 kDa fragmento 2234.9987



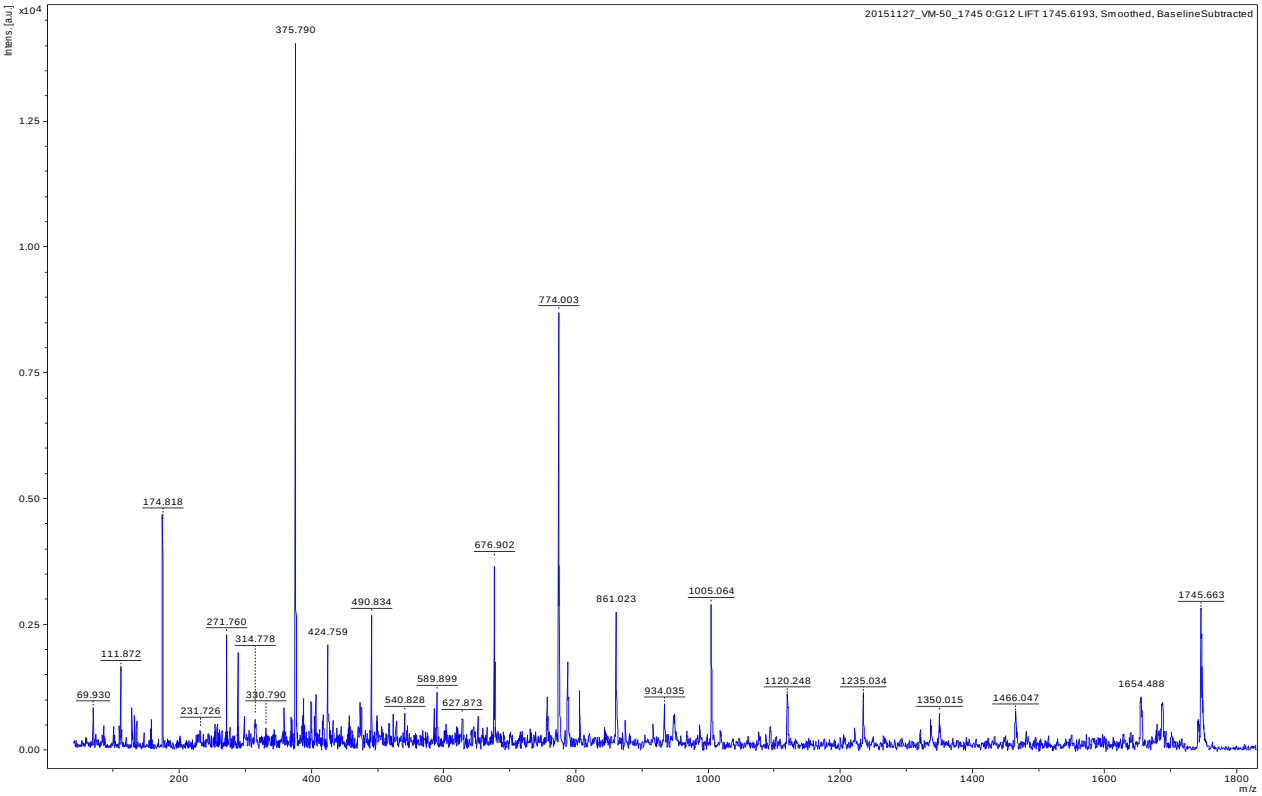
Secuencia fragmento 2234.9987



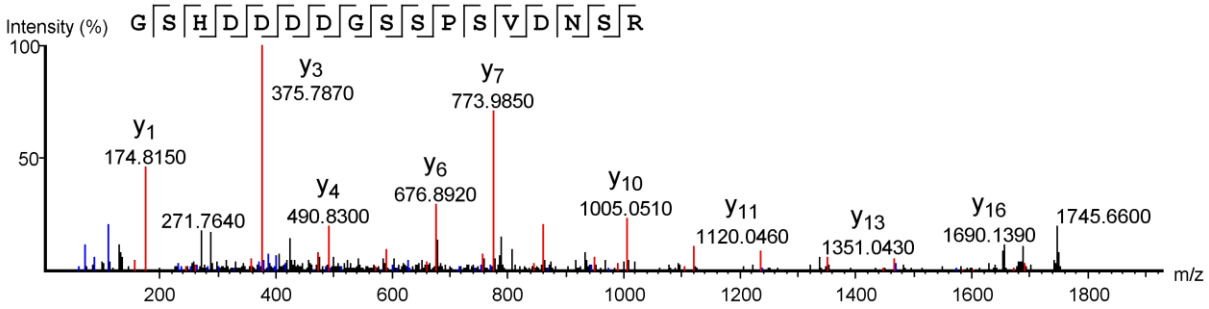
Espectro de fragmentación Proteína 50 kDa fragmento 1860.8701



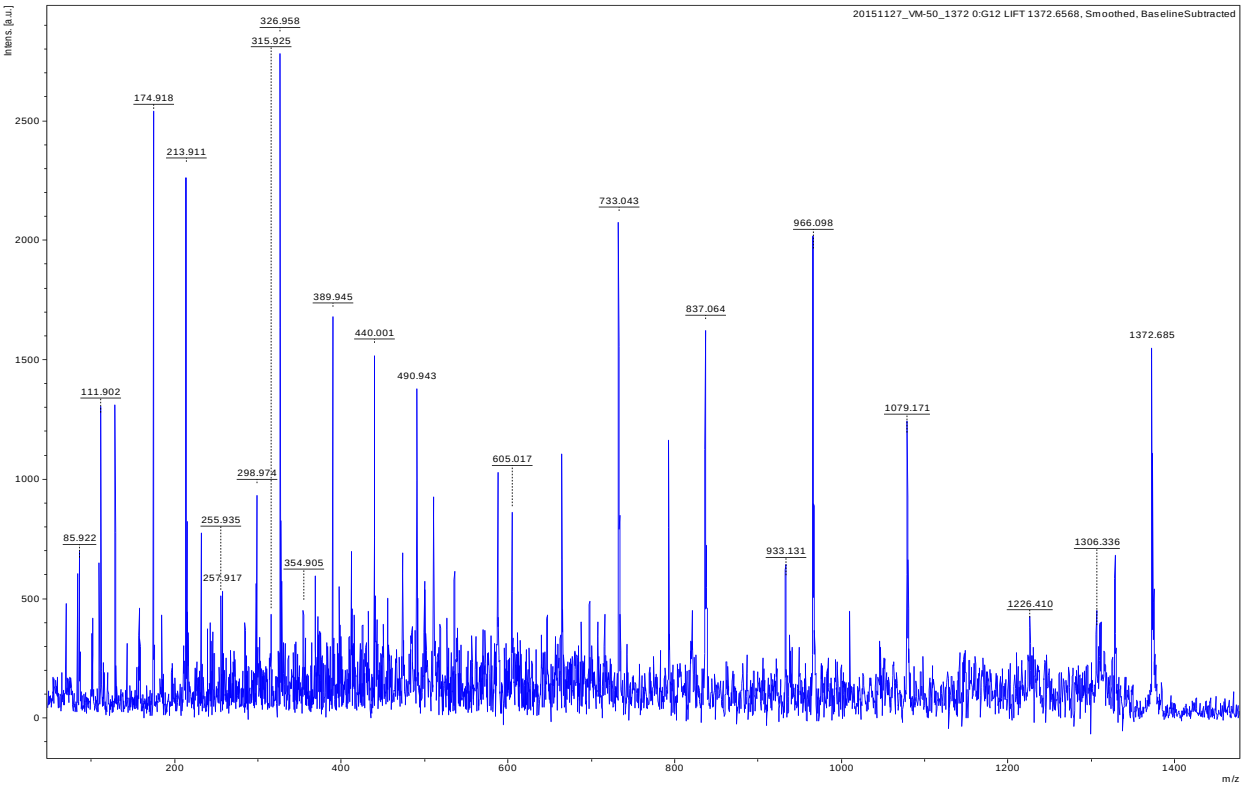
Espectro de fragmentación Proteína 50 kDa fragmento 1083.5054



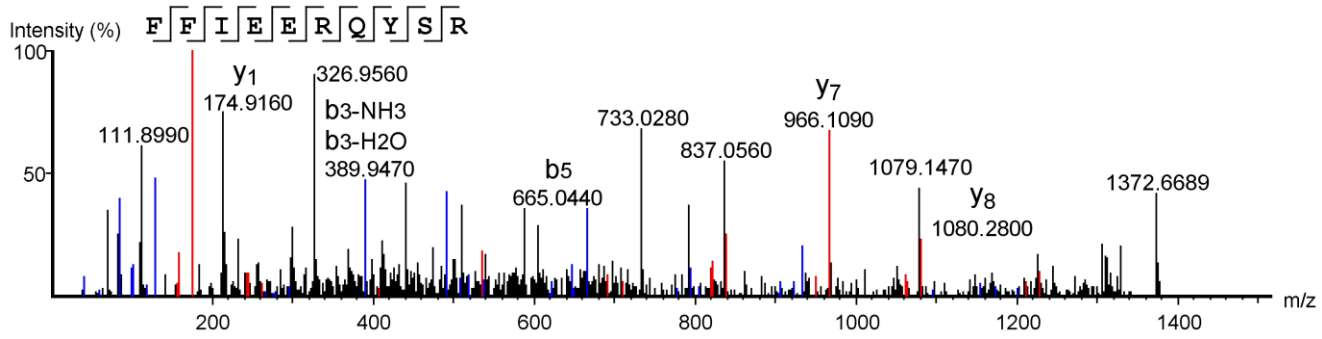
Espectro de fragmentación Proteína 50 kDa fragmento 1745.6193



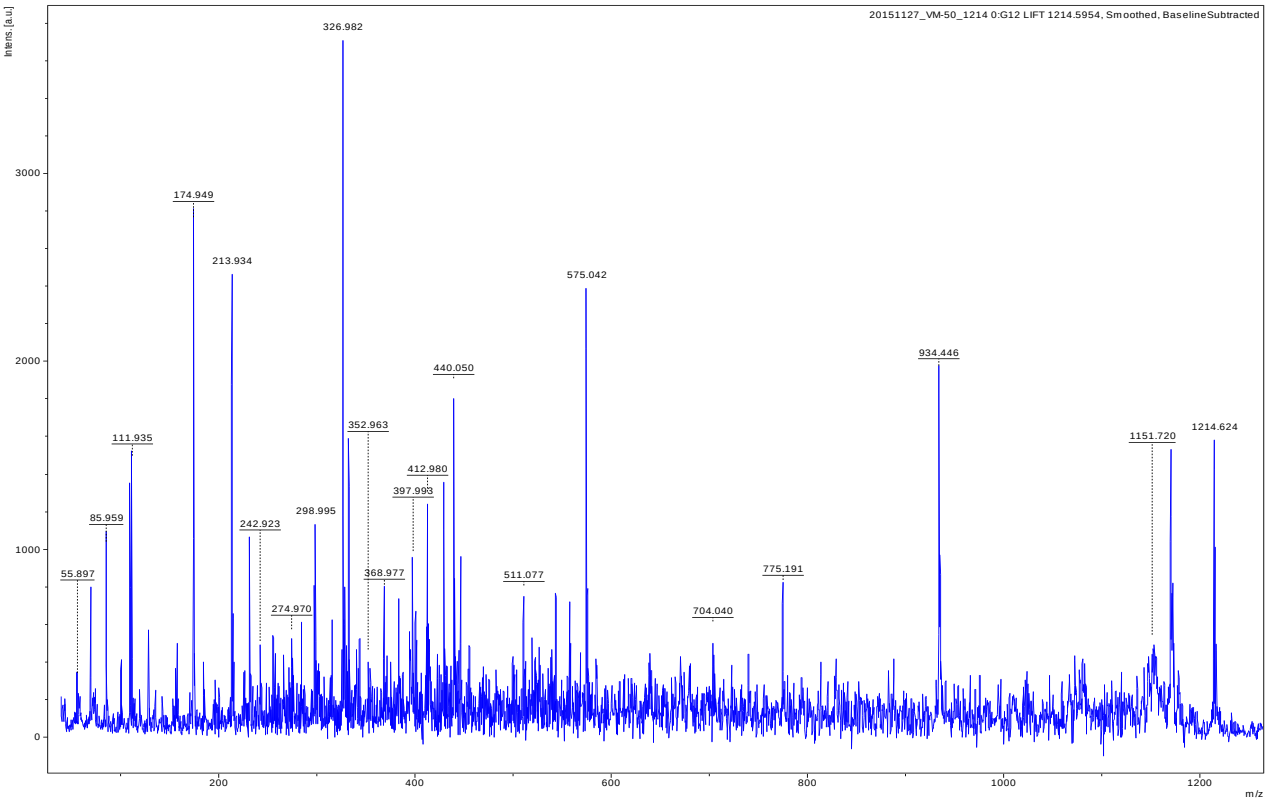
Secuencia fragmento 1745.6193



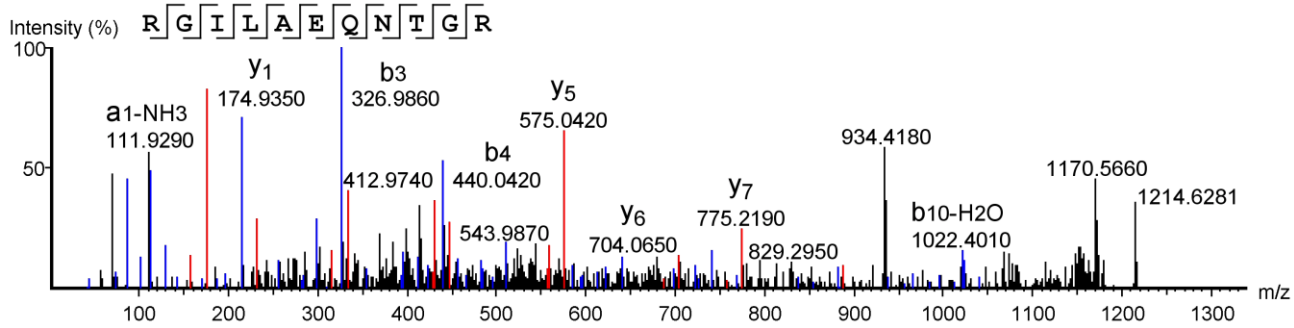
Espectro de fragmentación Proteína 50 kDa fragmento 1372.6568



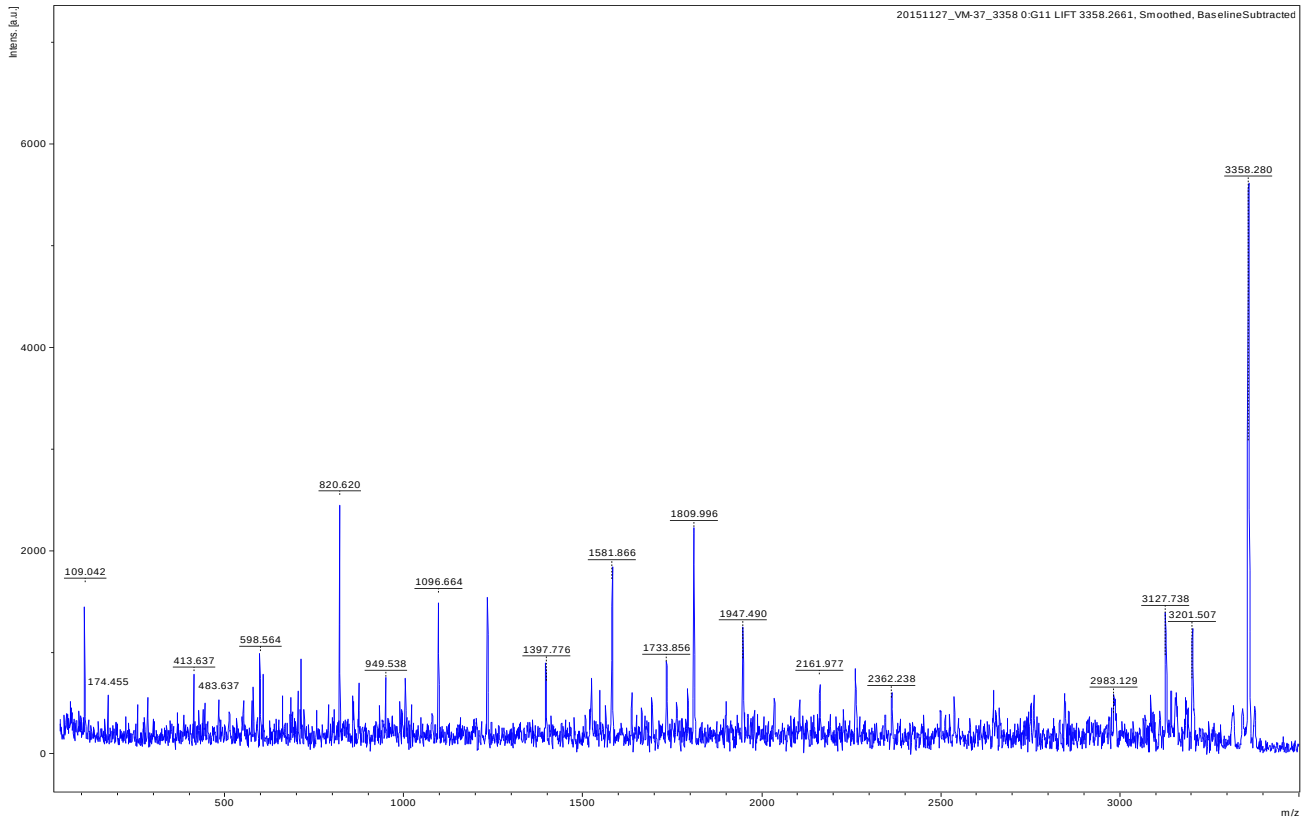
Secuencia fragmento 1372.6568



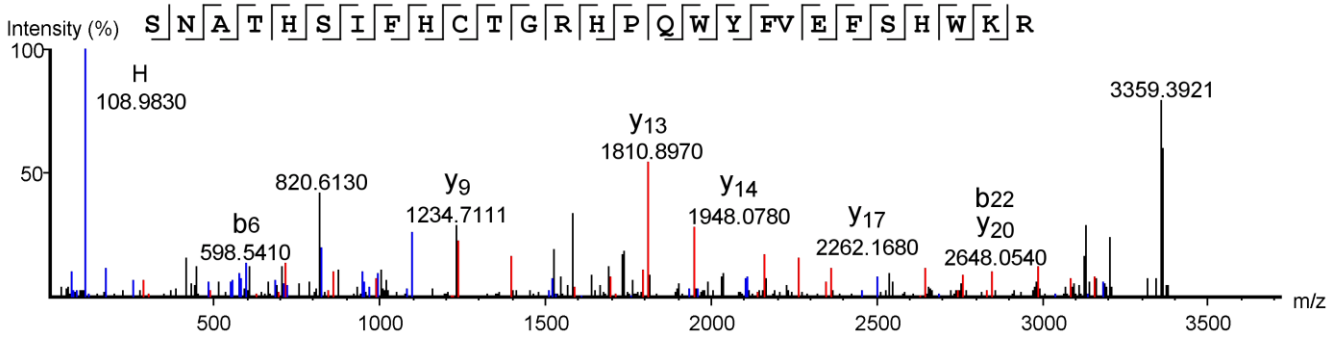
Espectro de fragmentación Proteína 50 kDa fragmento 1214.5954



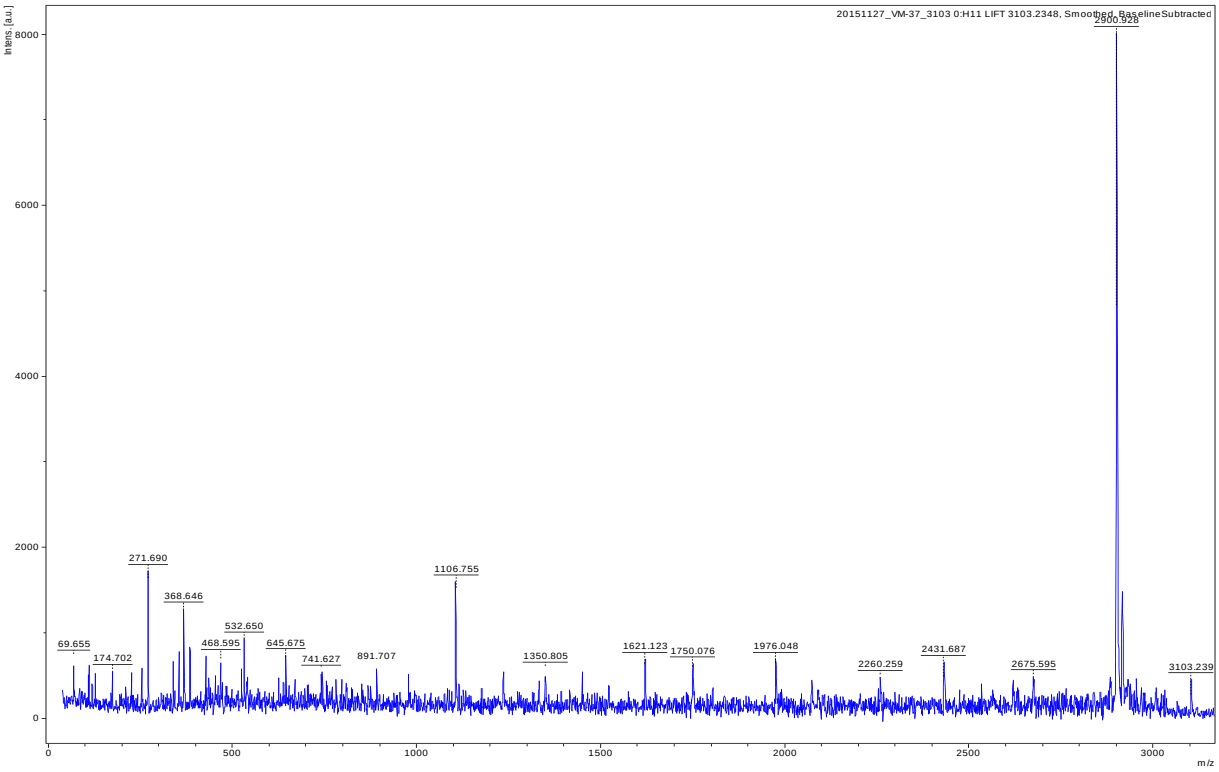
Secuencia fragmento 1214.5954



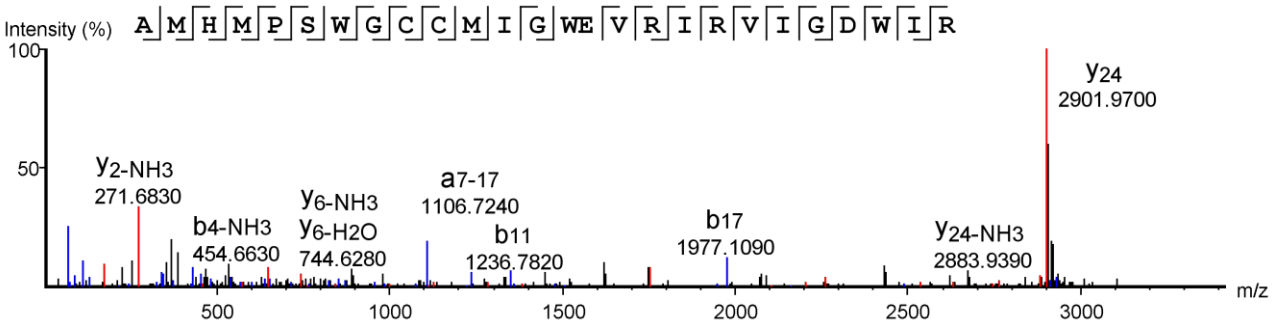
Espectro de fragmentación Proteína 37 kDa fragmento 3358.2661



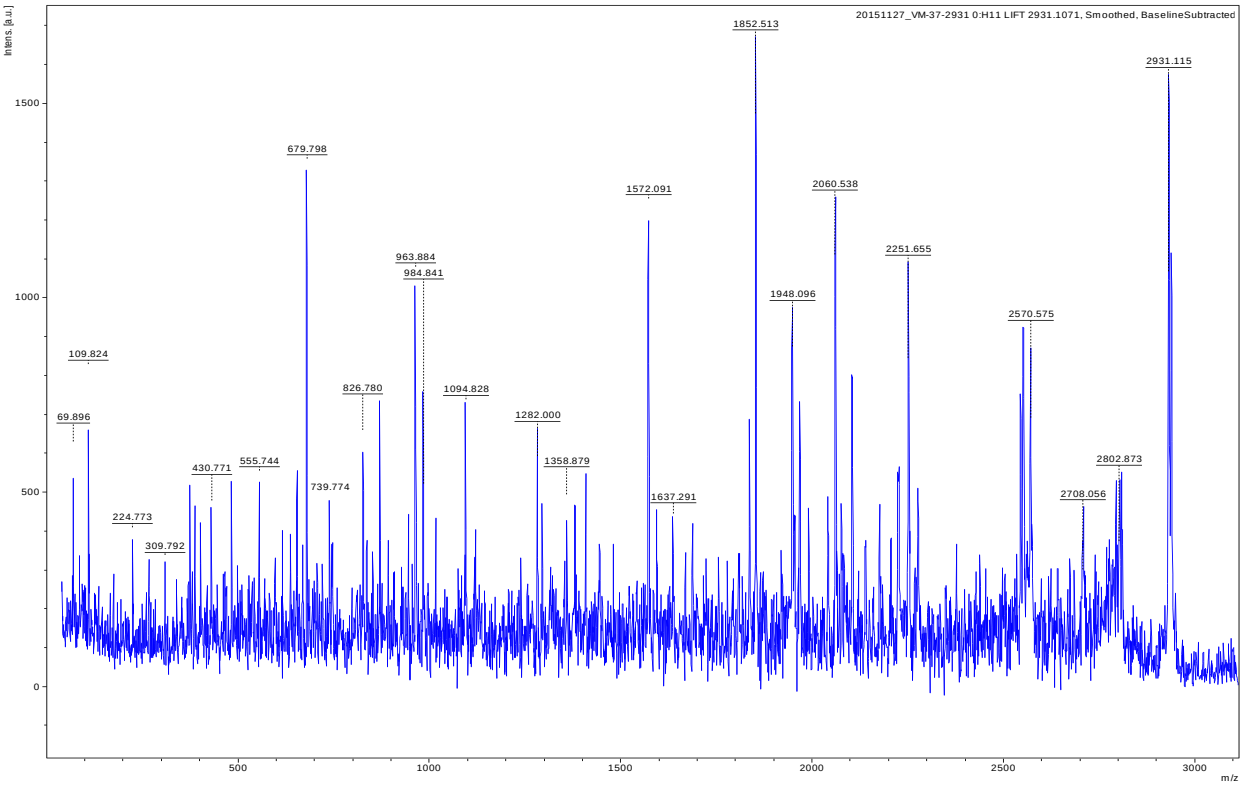
Secuencia fragmento 3358.2661



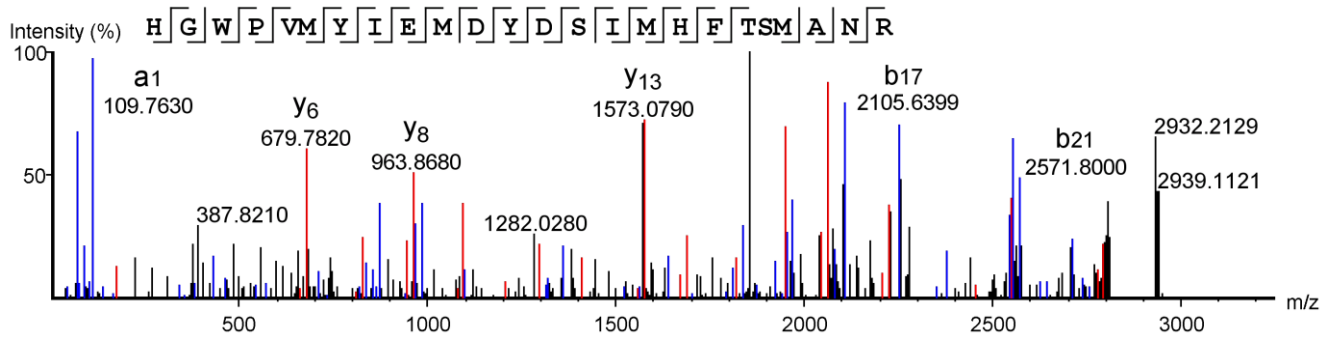
Espectro de fragmentación Proteína 37 kDa fragmento 3103.2348



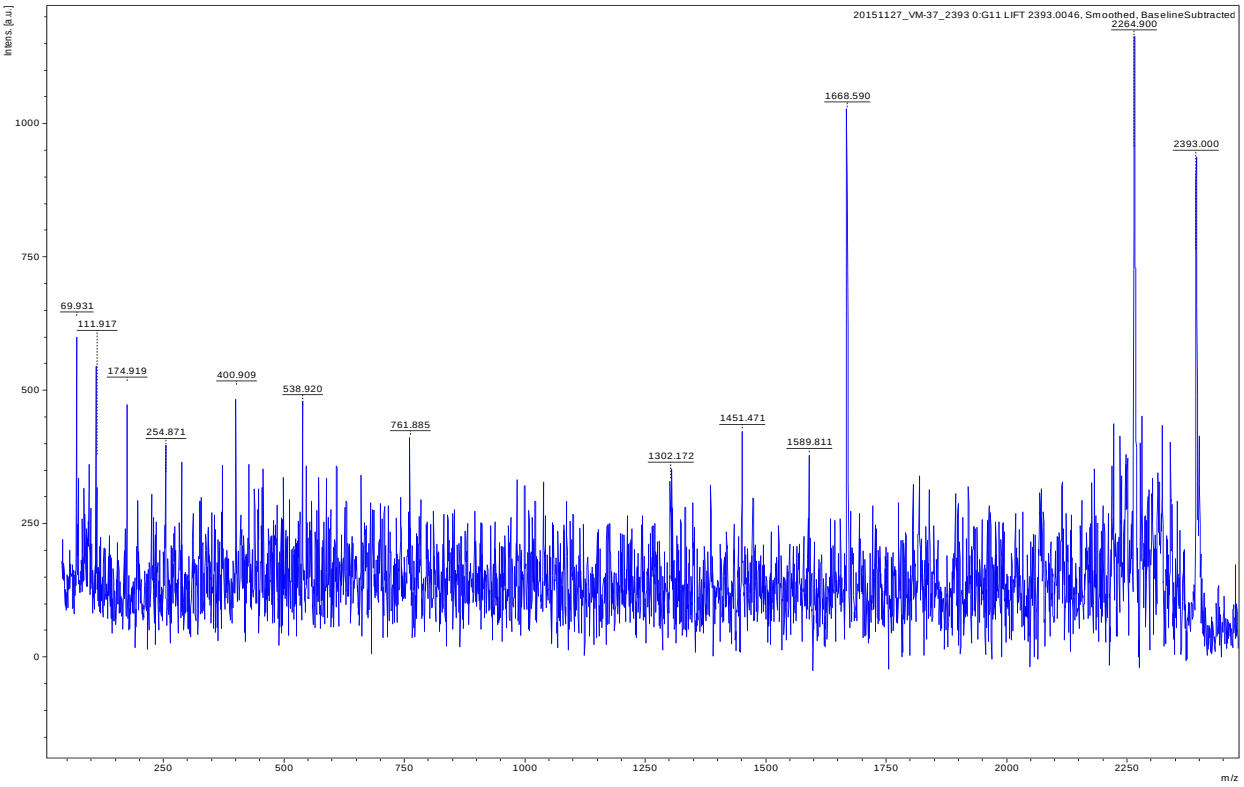
Secuencia fragmento 3103.2348



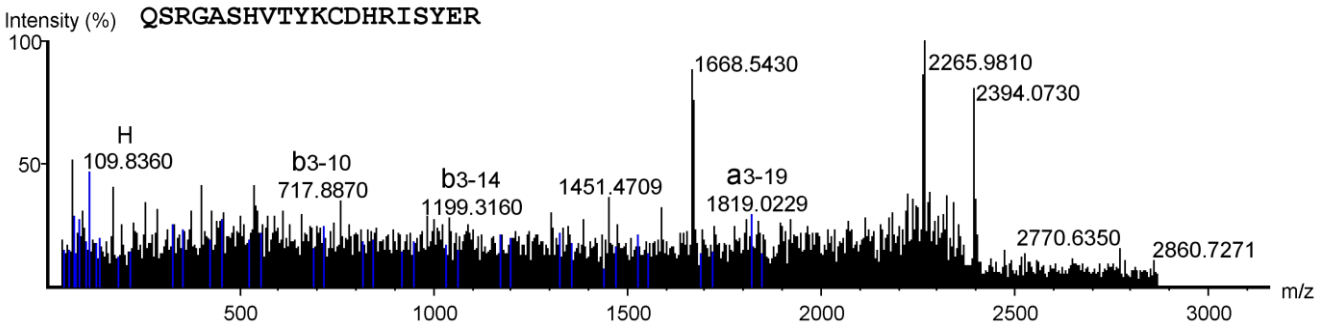
Espectro de fragmentación Proteína 37 kDa fragmento 2931.1071



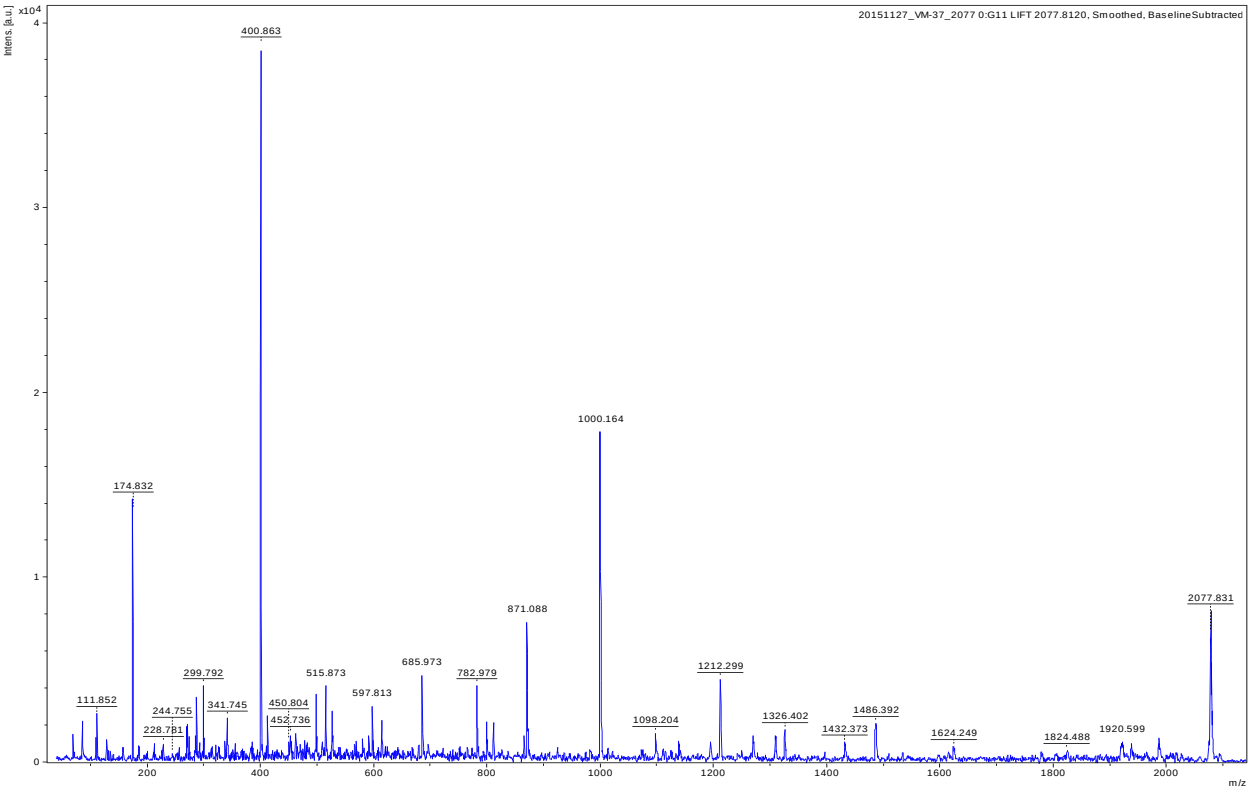
Secuencia fragmento 2931.1071



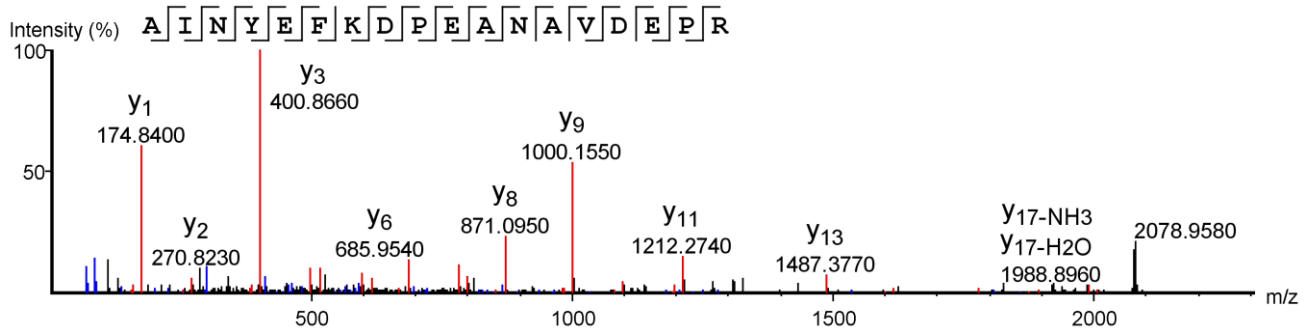
Espectro de fragmentación Proteína 37 kDa fragmento 2393.0046



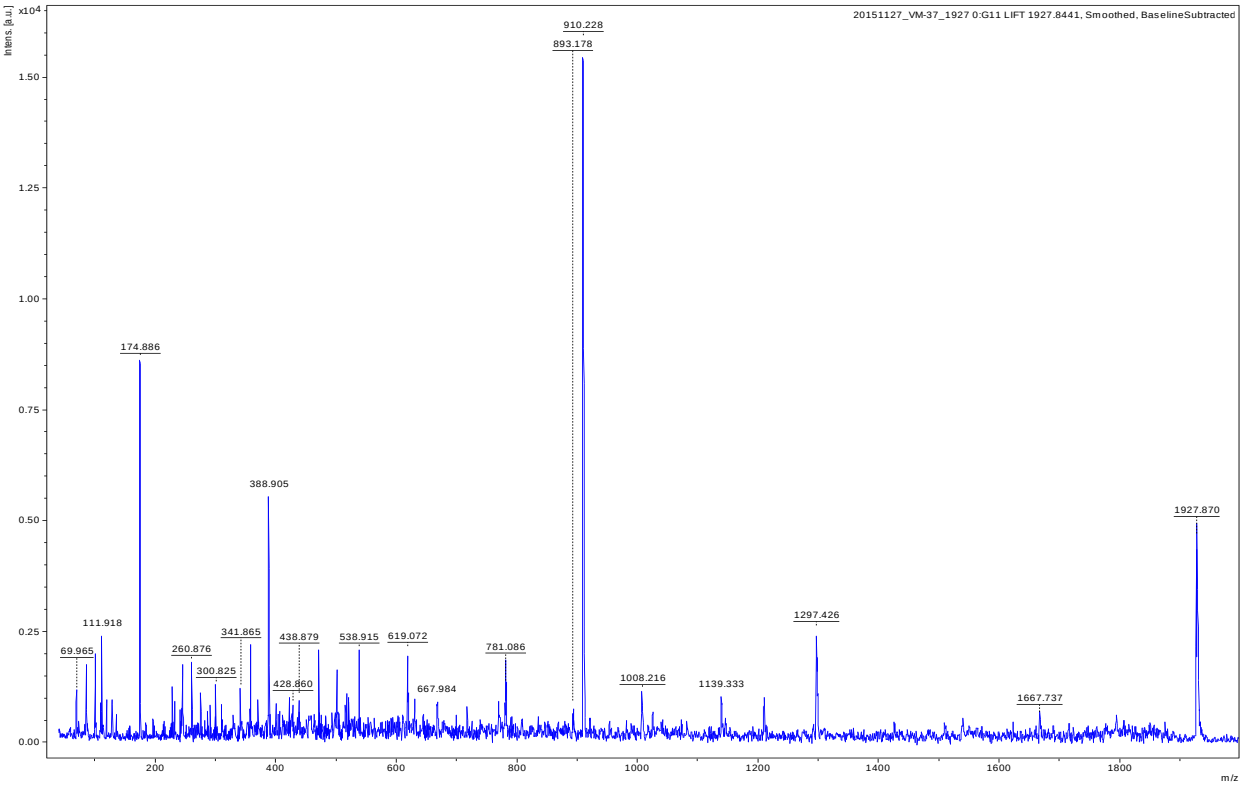
Secuencia fragmento 2393.0046



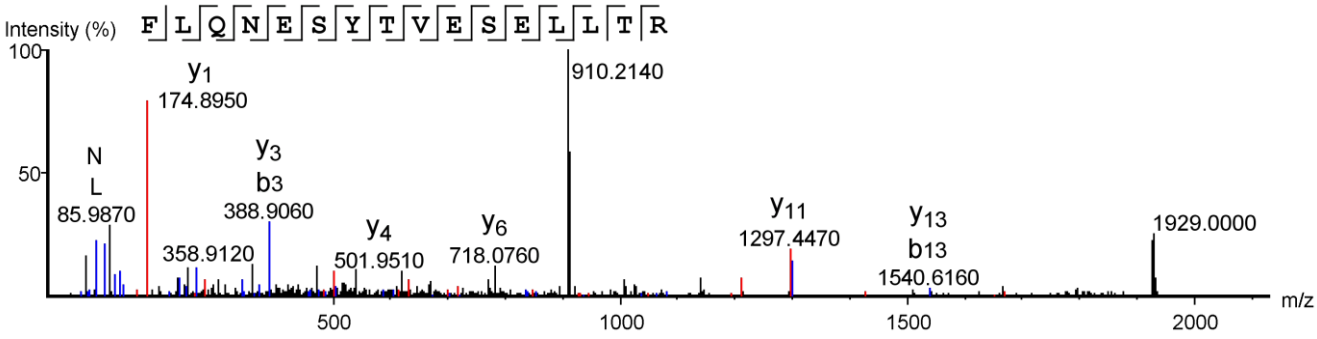
Espectro de fragmentación Proteína 37 kDa fragmento 2077.8120



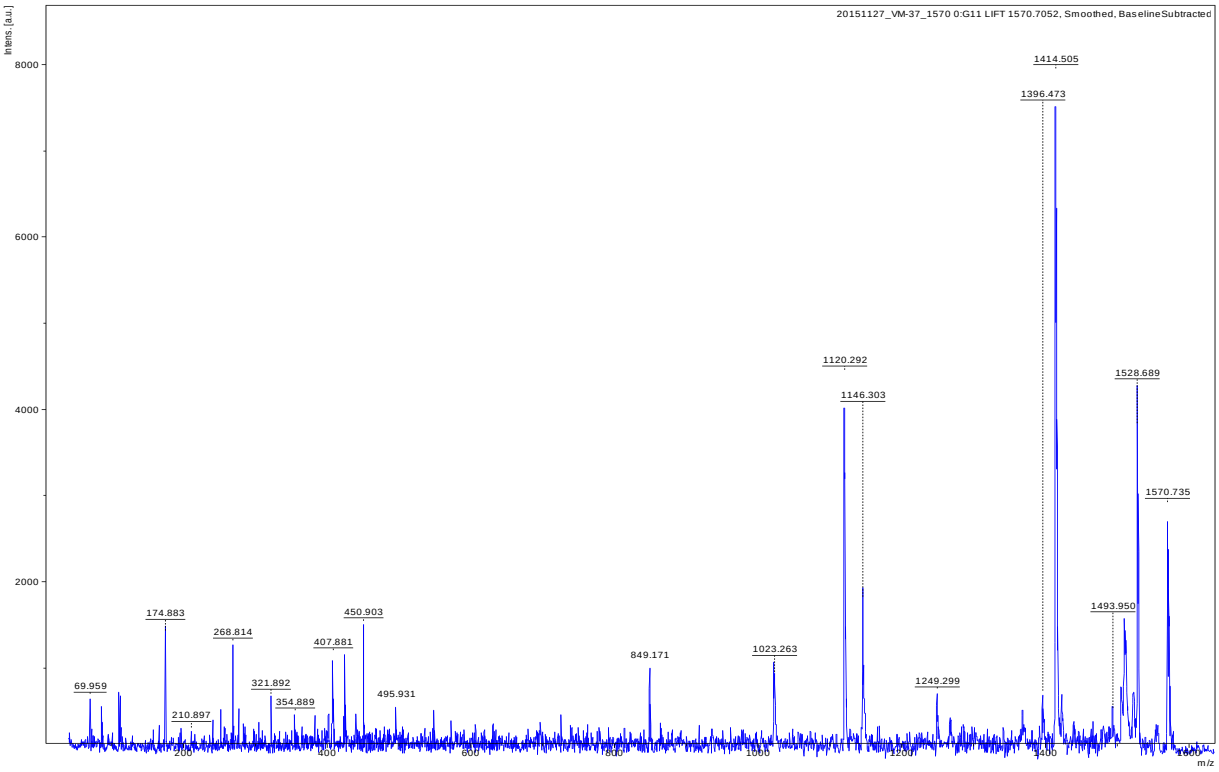
Secuencia fragmento 2077.8120



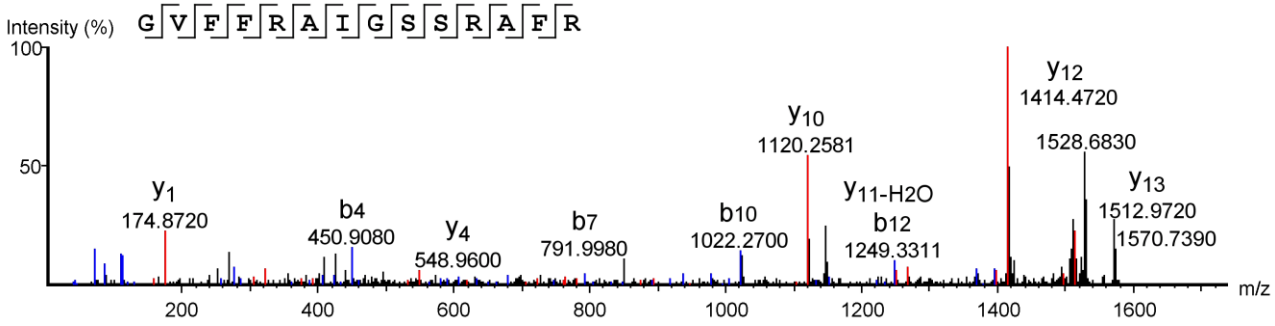
Espectro de fragmentación Proteína 37 kDa fragmento 1927.8441



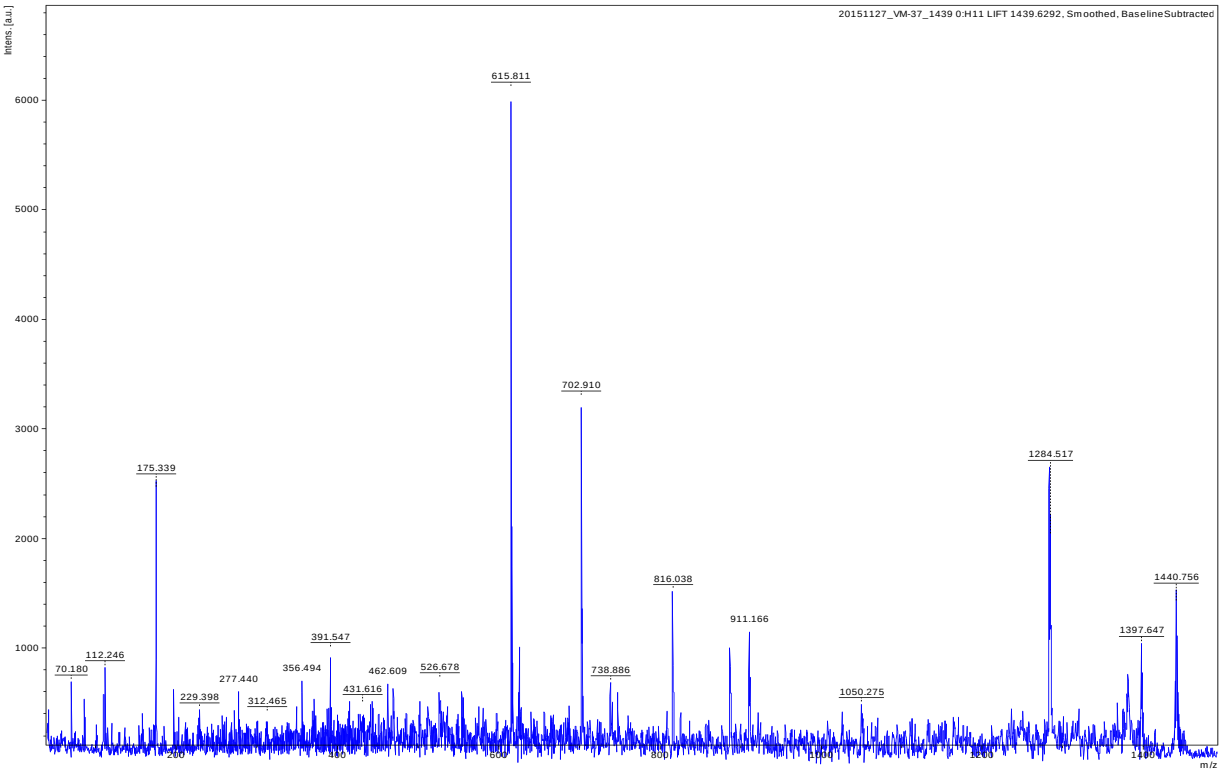
Secuencia fragmento 1927.8441



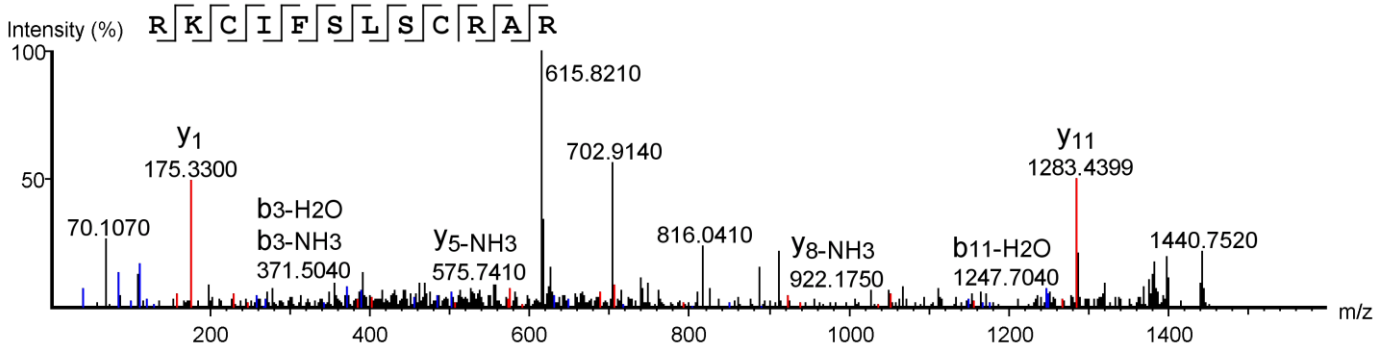
Espectro de fragmentación Proteína 37 kDa fragmento 1570.7052



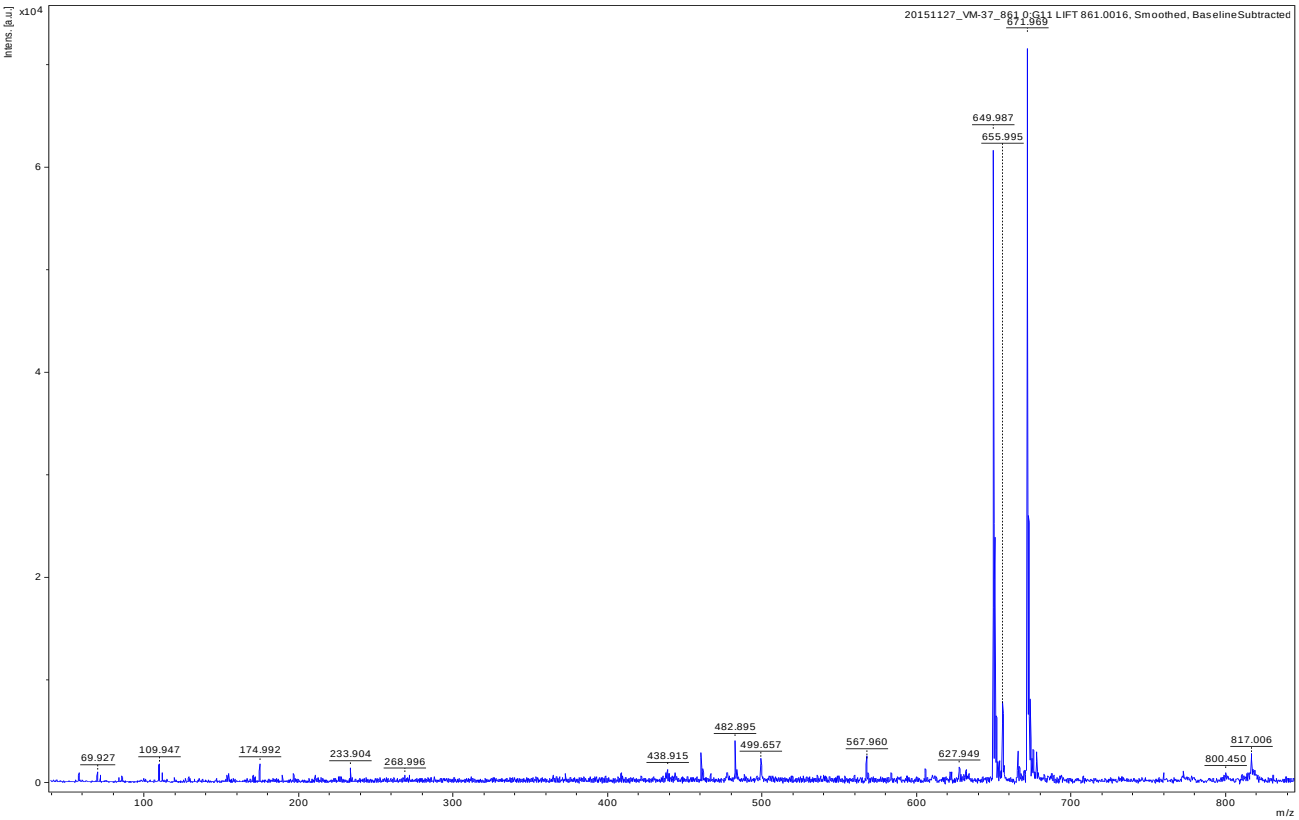
Secuencia fragmento 1570.7052



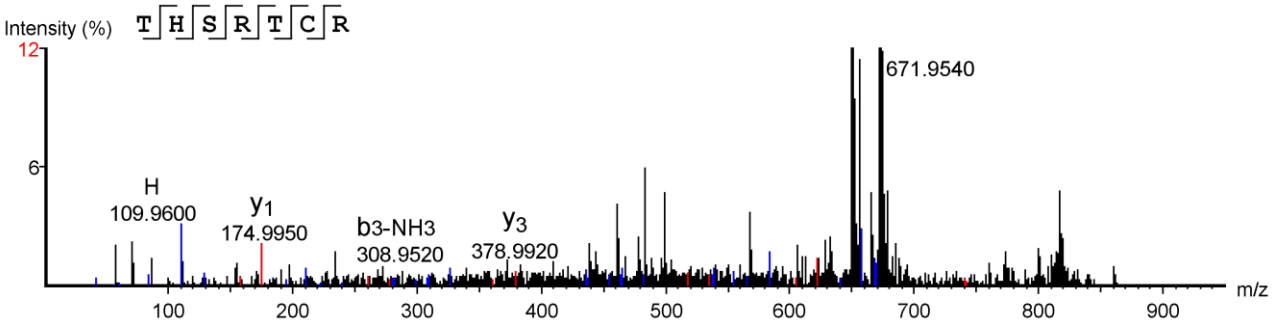
Espectro de fragmentación Proteína 37 kDa fragmento 1439.6292



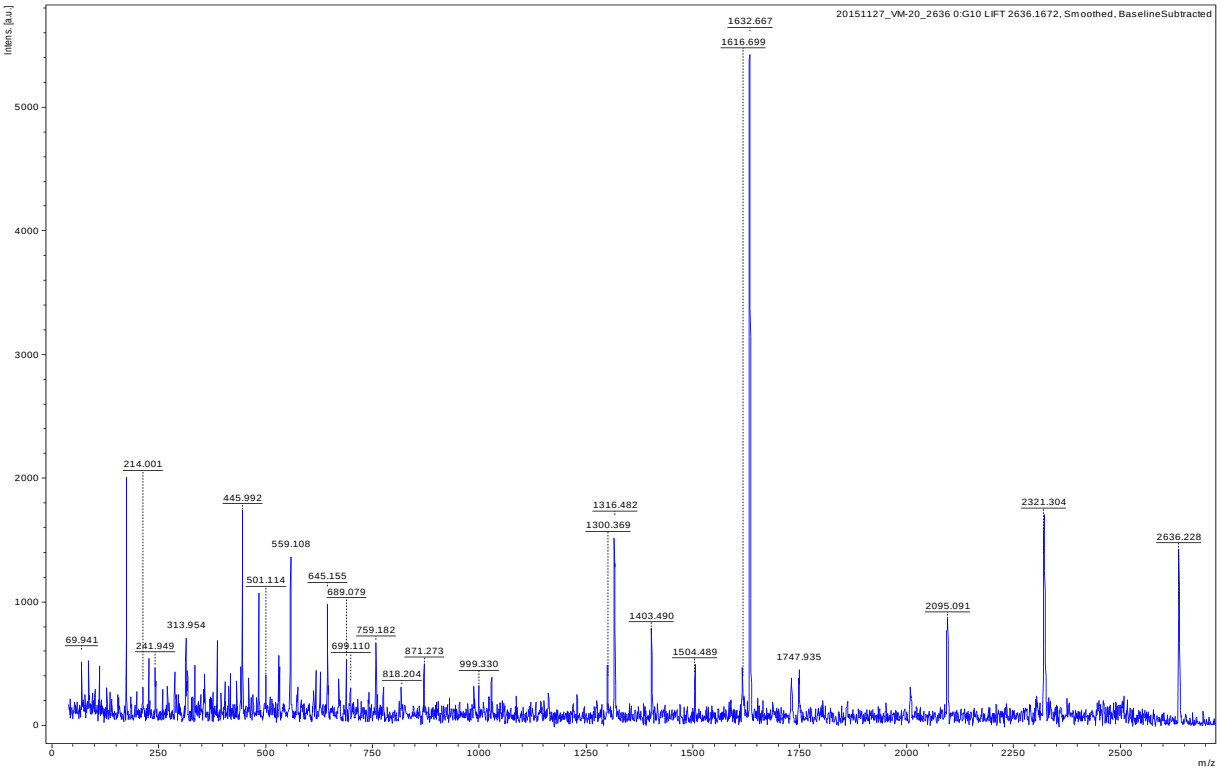
Secuencia fragmento 1439.6292



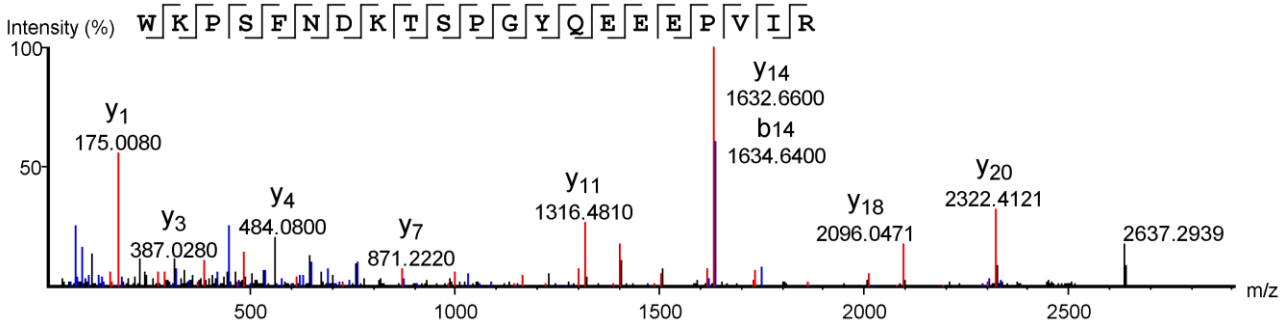
Espectro de fragmentación Proteína 37 kDa fragmento 861.0016



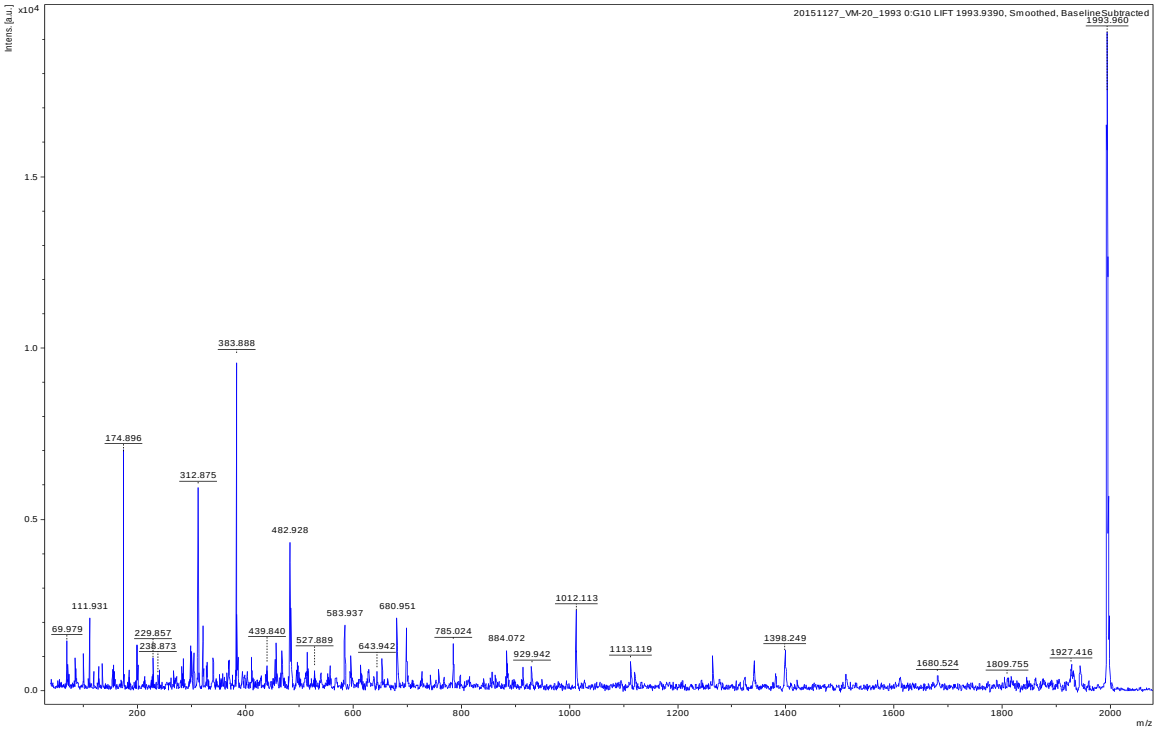
Secuencia fragmento 861.0016



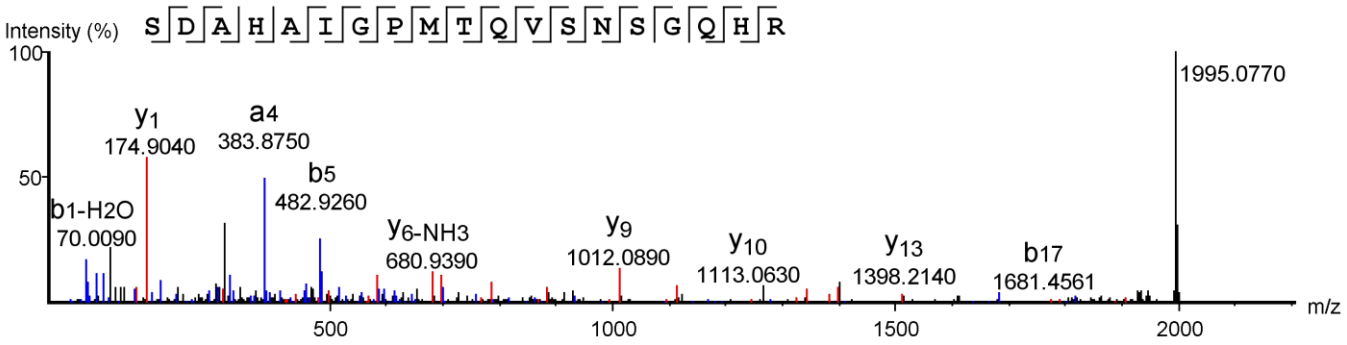
Espectro de fragmentación Proteína 20 kDa fragmento 2636.1672



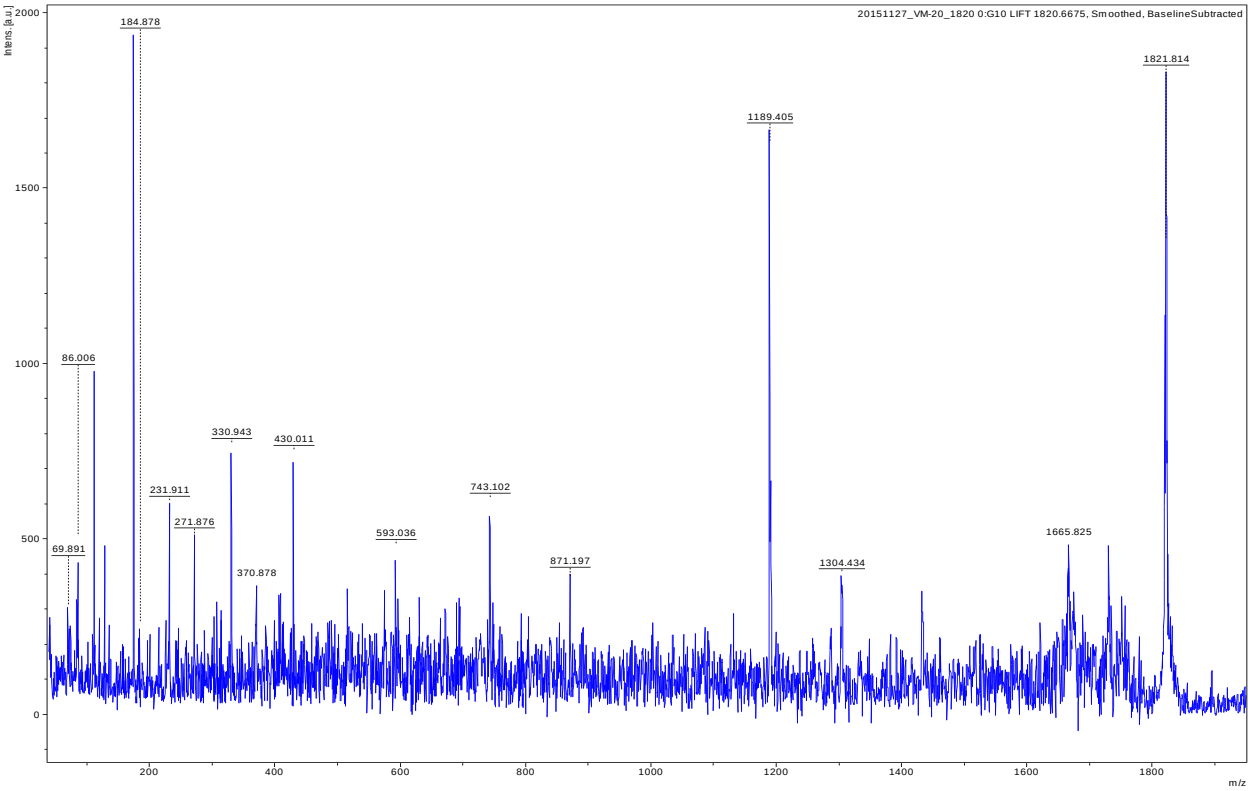
Secuencia fragmento 2636.1672



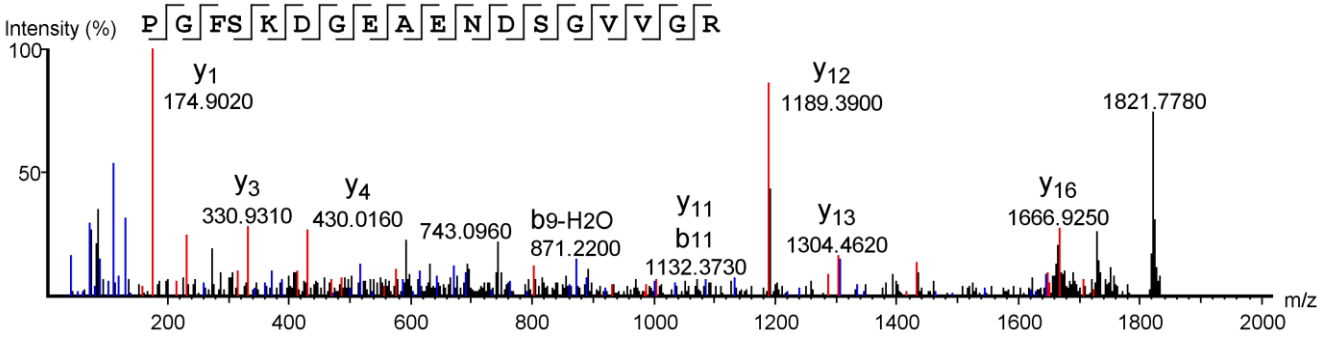
Espectro de fragmentación Proteína 20 kDa fragmento 1993.9390



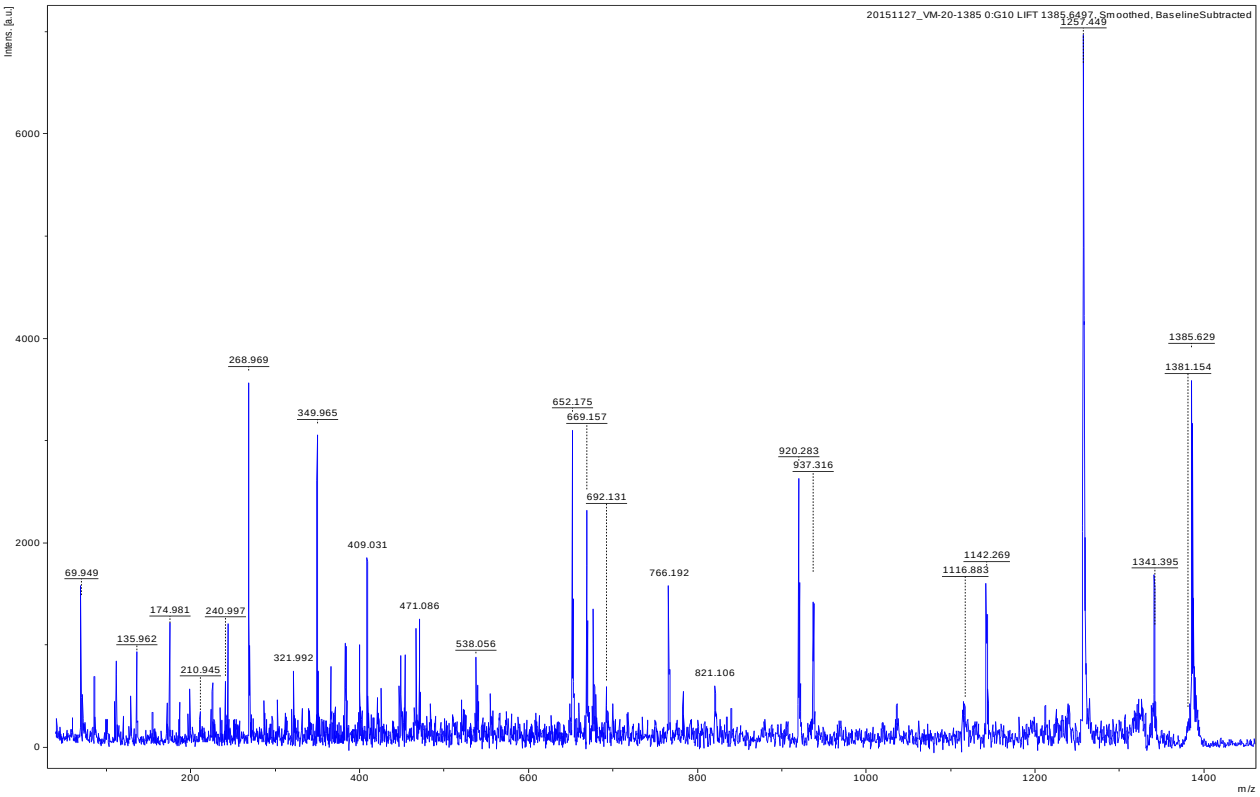
Secuencia fragmento 1993.9390



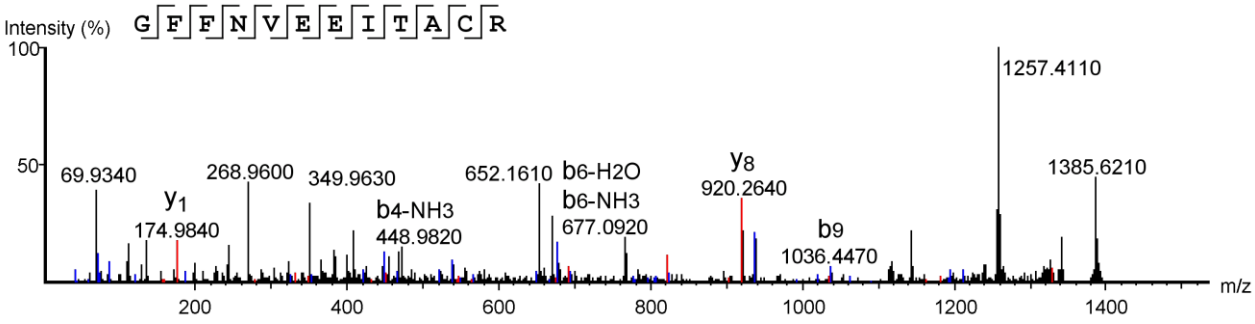
Espectro de fragmentación Proteína 20 kDa fragmento 1820.6675



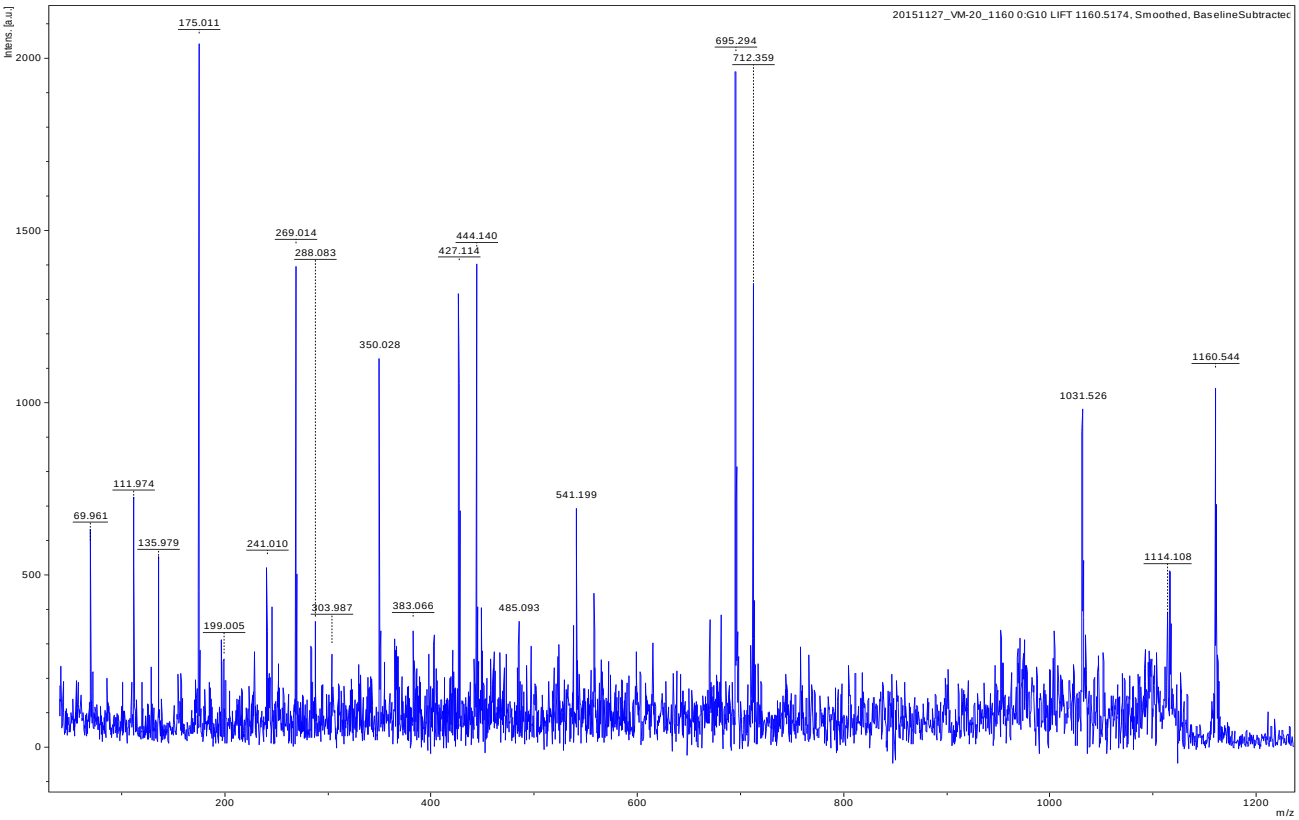
Secuencia fragmento 1820.6675



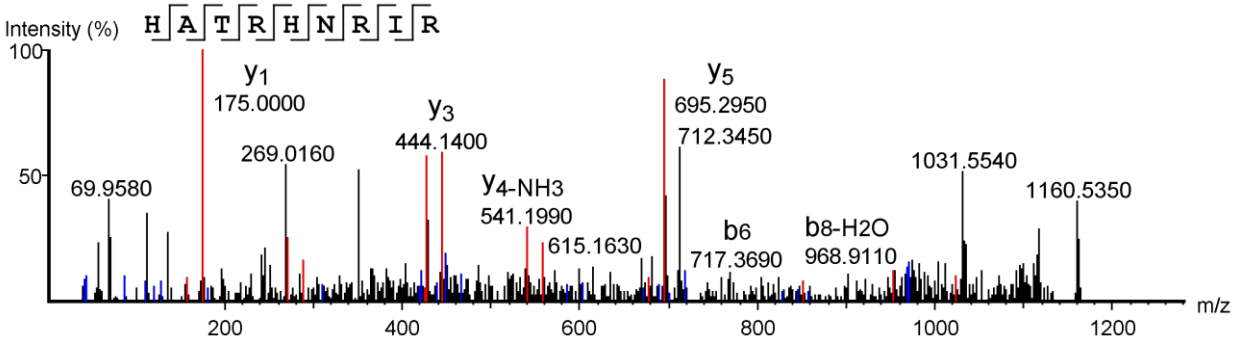
Espectro de fragmentación Proteína 20 kDa fragmento 1385.6497



Secuencia fragmento 1385.6497



Espectro de fragmentación Proteína 20 kDa fragmento 1160.5174



Secuencia fragmento 1160.5174

17 ABREVIATURAS

mm: milímetros
m: metros
PLA_2: Fosfolipasa A_2
$cPLA_2$: Fosfolipasa A_2 citosólica
$sPLA_2$: Fosfolipasa A_2 secretora
$iPLA_2$: Fosfolipasa A_2 intracelular
‰: partes por mil
kDa: kilo Daltones
L/H: Litros por hora
V: Volts
ml: mililitros
ºC: grados centígrados
hrs: horas
L: Litros
g: gramos
W: watts
aprox.: aproximadamente
cm: centímetro
n: número de organismos
µm: micras
cm: centímetro
COI: Citocromo c oxidasa subunidad I
ITS-I: transcrito interno de la región I nuclear
COIII: Citocromo c oxidasa subunidad III
ADN: Ácido desoxirribonucleico
TAE: Tris Acetato EDTA
µl: microlitro
pb: pares de bases
ng: nanogramos
mm^3: milímetros cúbicos
Da: Daltones
GS/s: Gigasamples per second
kV: kilo Volts
P: Probabilidad
3D: Tercera dimensión
2D: Segunda dimensión
nmoles: nanomoles
µM: micro mol
mM: milimolar
M: molar
rpm: revoluciones por minuto
mg: miligramos
x g: veces gravedad
nm: nanómetros
µg: microgramos
PBS: Phosphate Buffer Solution
TRIS: tris(hidroximetil)aminometano
HCl: ácido clorhídrico
pH: Potencial de Hidrógeno
pI: Punto Isoeléctrico
DL-PC: Dilinoleoyl Fosfatodilcolina
min: minuto
log: logaritmo
UF: Unidad de actividad de fosfolipasa
U: unidades
NaCl: Cloruro de Sodio
SDS: sodium dodecyl sulfate
PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis
DTT: Dithiothreitol
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
NaOH: Hidróxido de Sodio
$AgNO_3$: Nitrato de Plata
CH_3CN: Acetolnitrilo
NH_4HCO_3: Bicarbonato de Amonio
TFA: Ácido triflouroacético

UEF: Unidad de actividad específica de fosfolipasa
HPLC: High Performance liquid chromatography
PCR: Polymerase Chain Reaction
ADNm: Ácido desoxirribonucleico mitocontrial
ADNt: Ácido desoxirribonucleico total
seg: segundo
NCBI: National Center for Biotechnology Information
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
GTR: Generalised time reversible
JTT: Jones-Taylor – Thornton
MS: Mass Spectrometry
MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight
MALDI-MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry
ADAM: A Desintegrin and Metalloprotease

18 PUBLICACIÓN

Toxicon 113 (2016) 49–54

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

In vivo analysis of effects of venom from the jellyfish *Chrysaora sp*. in zebrafish (*Danio rerio*)

Mayra P. Becerra-Amezcua [a], Isabel Guerrero-Legarreta [d], Humberto González-Márquez [b], Xochitl Guzmán-García [c, *]

[a] Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, Iztapalapa, D.F., Mexico
[b] Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, Iztapalapa, D.F., Mexico
[c] Departmento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, Iztapalapa, D.F., Mexico
[d] Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, Iztapalapa, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 September 2015
Received in revised form
27 January 2016
Accepted 9 February 2016
Available online 11 February 2016

Keywords:
Chrysaora sp.
Danio rerio
Hemolysis
Phospholipase A_2
Echinocytes
Sublethal

ABSTRACT

The jellyfishes of the genus *Chrysaora* are present in all of the world's oceans, but the toxicity of their venoms has not yet been thoroughly characterized. The zebrafish as a toxicology model can be used for general toxicity testing of drugs and the investigation of toxicological mechanisms. The aim of this study was to evaluate the effect of crude venom from jellyfish *Chrysaora sp.*, a species of jellyfish observed in the tropical lagoons of the Gulf of Mexico, on the zebrafish *Danio rerio*. Juvenile zebrafish were injected with different concentrations of venom from *Chrysaora sp.* via intraperitoneal and subcutaneous injections. The effects of the venom were determined by histopathological analysis and through the measurement of hemolytic and phospholipase A_2 activities. The crude venom was examined by SDS-PAGE. The effect of sublethal concentrations of crude venom from *Chrysaora sp.* on *D. rerio* was hemorrhaging in the eyes, while the histopathological analysis demonstrated that the primary organs targeted were the pseudobranch, which displayed hyperemia, and the gill, which displayed hyperplasia and hypertrophy. The blood analysis exhibited hemolysis, nuclear abnormalities, and echinocytes by the action of phospholipase A_2, which was determined to have 596 units of activity/mg of protein in the venom. The crude venom has proteins with molecular weights ranging from 250 to 6 kDa, with more density in the bands corresponding to 70, 20 and 15 kDa. The venom of *Chysaora sp.* caused disturbances in circulation associated with vascular dilation due to the localized release of inflammatory mediators. The hemolysis of erythrocytes was caused by the action of phospholipase A_2. These findings not only provide an excellent study model but also have a great pharmacological potential for designing new drugs and for the elucidation of the mechanisms of action of and treatment against stings.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Overfishing, eutrophication, climate change and habitat modification are the principal causes that promote jellyfish bloom formation in the ocean (Richardson et al., 2009). Jellyfish are the most common invertebrates that envenomate through toxins found in their nematocysts (Singletary et al., 2005). Nematocysts are stinging organelles that contain venom and are located in epithelial cells known as cnidocytes, and they consist of a collagenous wall and an eversible, arrow-like delivery tubule (Turk and Kem, 2009).

Species of the genus *Chrysaora* are present in all oceans, but the toxicity of their venoms has not been thoroughly characterized to date. This finding may be observed due to differences between species, as well as to the different procedures used to isolate the active constituents (Suput, 2009). A symptom of the sting of this jellyfish is pain immediately after contact with a tentacle. Within minutes, the sting site may initially be a blanched and itching line on the skin. Then, the line becomes red and swollen. Contact with the eye produces corneal ulcerations and swelling of the eyelid that usually disappears within an hour but may persist in sensitive individuals (Nellis, 1997).

A report stated that the venom of *Chrysaora quinquecirrha,* has hyaluronidase activity, similar to snake venoms, that promotes the

* Corresponding author. Current Address: PEXPA, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, Iztapalapa, D.F., Mexico.
E-mail address: xgg@xanum.uam.mx (X. Guzmán-García).

http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.02.008
0041-0101/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

diffusion of toxins to other tissues. The venom also has hemolytic activity (Long-Rowe and Burnett, 1989, 1994) and provokes a humoral and cell-mediated immunological response. Also, it is necessary to have a large volume of venom to characterize its toxicity (Bloom et al., 2001). The zebrafish model is advantageous because a lower quantity of toxin is needed per assay compared to the amount required to use in rodents. Moreover, zebrafish are easy to maintain, have a shorter generation time, and are more fertile than mice (Pyati et al., 2007; Segner, 2009). Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of crude venom from the jellyfish *Chrysaora sp.* in the zebrafish *Danio rerio*.

2. Materials and methods

2.1. Animal maintenance

Juvenile zebrafish (*D. rerio*) were acclimated to laboratory conditions for 8 weeks before the experiment (total length, 2.6 ± 0.09 cm, weight, 0.3 ± 0.07 g). The mean density of the zebrafish was one per liter in tanks. The water tanks had a mechanical air-bubbling and biological filtration system (Power Filter DoPhin H300 (430 L/h)). Water was also manually renewed by changing 50% of the total volume every two weeks. The tank was kept in a photoperiod of 12-h light, 12-h dark and at a temperature of 27 °C. The fish were fed dry, flaky Wardley food three times a day by an automated food supplier.

2.2. Sample collection and venom preparation

Chrysaora sp. jellyfish were collected in March and July 2014 from Mandinga Lagoon (Veracruz, Mexico). Jellyfish were detected on the surface of the water and captured using long-handled beams with nets of 0.05 mm mesh. Nematocysts were isolated from excised jellyfish tentacles immediately after collection and purified from tentacle debris (Bloom et al., 2001, 1998) using a discontinuous gradient of Percoll as described by Brinkman and Burnell (2008). The isolation buffer used was 20 mM sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 6.7 (Brinkman et al., 2014). Tissue was homogenized in a Sartorius Mikro-Dismembrator U using glass beads of 0.5 mm (Sigma–Aldrich X250465).

2.3. Toxicity assay

Juvenile zebrafish were injected with five concentrations of venom (2, 20, 200, 400 and 500 μg/g) by intraperitoneal injection, based on Kinkel et al. (2010) and subcutaneous injection with 0.5 μg/g based on Cheung et al. (2014). The control group was injected with extraction buffer. After injection, the symptoms and mortality were carefully observed and recorded every 6 h for 24 h.

2.4. Pathological and erythrocyte morphology analysis

The effects of *Chrysaora sp.* venom on tissues were determined after the 24 h exposure period and in the case of the high concentration conditions (400 and 500 μg/g) immediately after injection. The fish were captured and anesthetized in water at 4 °C for blood collection (Pedroso et al., 2012). They were immediately sacrificed according to the ethical guidelines used by the NIH intramural research program (http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/zebrafish.pdf). Tissue samples were incubated in Davidson's Fixative at room temperature for at least 9 days before embedding into paraffin in a tissue processor (TP 1020, Leica Microsystems). Embedding into paraffin blocks was performed with a heated paraffin embedding module (EG 1140h, Leica Microsystem). Longitudinal sections of the total fish with a thickness of 5 μm were cut with a microtome (Microtom HM 315) coupled to a tissue transfer system with a water bath at 50 °C. The sections were mounted on glass slides and then stained with hematoxylin-eosin stain (Guzmán-García et al., 2009). All pathological sections were examined by light microscopy. Blood samples were collected in heparinized tubes (Pedroso et al., 2012). Blood smears, one slide per individual, were prepared from fresh blood. They were fixed in 100% ethanol and stained using Giemsa. Blood cells were examined under immersion oil and photographed.

2.5. Hemolytic activity assay

Hemolytic activity was assayed using *Cyprinus carpio* and human erythrocytes. Approximately 1 ml of fish blood was collected from each fish (4 fish, weight 80 g ± 22), which had been anesthetized with benzocaine 0.001% by caudal venous puncture. 3 ml of human blood (type B, Rh^+) was collected into a heparinized plastic tube by venous puncture using a heparinized needle. The hemolytic activity assay was performed according to previously reported methodology (Young et al., 1986). Aliquots of cells (200 μl) were placed into each well, followed by the addition of 0, 10, 20, 30, 40 and 60 μg *Chrysaora sp.* crude venom per well. Detergent was used as a positive control, and extraction buffer was used as a negative control. To generate a calibration curve, the changes in A_{630} were plotted as a function of the percentage of hemolysis. The red blood cell suspension was divided into two aliquots, one of which was sonicated for 2 min by using a cell disruptor (Branson 350) with a power of 70 W. The red blood cells were then mixed in wells at different ratios, and the change in A_{630} was determined as before.

2.6. Phospholipase A_2 (PLA2) activity assay

Phospholipase A_2 (PLA2) activity was determined by a coupled assay using dilinoleoyl phosphatidylcholine (P0537, Sigma) as the substrate and 0.23 μg/ml lipoxygenase (*Glycine max* soybean, L6632, type V, Sigma) as the coupling enzyme, as described by Jiménez et al. (2003). The reaction was started by adding *Chrysaora sp.* crude venom (5 μg/ml) to the reaction mixture. *Borthrops asper* venom (143 μg/ml) donated by Birmex S.A. de C.V and 0.25 μg/ml phospholipase A_2 (bovine pancreas, P8913, Sigma) were used as positives controls. Controls without either phospholipase or lipoxygenase were also used. To determine the activity of PLA2, the difference between the final and initial absorbance was multiplied by the amount of substrate used in 1 ml and divided by the reaction time, and then the value obtained was divided by the amount of protein used, in accordance with Bonilla and Zavaleta (1997).

2.7. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

The protein concentration was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951) using bovine serum albumin as the standard. A sample of the protein (15 μg) was examined by denaturing PAGE (SDS-PAGE) according to Laemmli (1970). SDS-PAGE was carried out under reducing conditions (4% beta-mercaptoethanol) using 12% gels. Protein bands were detected by silver staining.

2.8. Data analysis

All assays were performed in triplicate. The mean and standard deviation values were determined for all parameters, and the results were expressed as the mean ± SD. The data were analyzed employing normality tests of one-way variance (ANOVA). Fisher's least significant difference (LSD) multiple comparisons were then

used to compare the means among the treatments for the same tissue. All statistical analyses were performed using NCSS software. P-values below 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Effects of sublethal concentrations of Chrysaora sp. crude venom on Danio rerio

The most notable effect of the venom of the jellyfish *Chrysaora sp.* on *D. rerio* is the appearance of hemorrhage in the eyes after applying 200, 400, and 500 μg/g by intraperitoneal injection and subcutaneous injection (0.5 μg/g) (Fig. 1B and C). In the case of the 200 μg/g application, the hemorrhage disappeared completely 24 h after injection. Subcutaneous injection also showed convulsions and paralysis in the pectoral, anal, dorsal and caudal fins, and the fish did not swim normally, the fishes no oxygenate their gills and died (66%), in the case of the fishes that did not die, the paralysis disappeared after a few seconds. The other doses (2 and 20 μg/g) did not show an apparent effect, and the fish had normal swimming patterns.

3.2. Pathological and erythrocyte morphology analysis

Histopathological analysis showed that the damage caused by the venom of this jellyfish by intraperitoneal injection is mainly disturbances of circulation (Fig. 2). The pseudobranch is a gill-like structure derived from the first gill arch and is located at the dorsal part of the operculum. The pseudobranch is composed of gill lamellae, connective tissue, and parallel rows of blood vessels (Fig. 2A). This structure displayed hyperemia (an excess of blood being delivered to a site) in many areas in all doses applied intraperitoneal and subcutaneous (Fig. 2B).

The gills were also affected. The gill filaments or primary lamellae have a central cartilaginous support, and in numerous secondary lamellae (Fig. 2C), the tissues displayed hyperplasia (an increase in cell number) and hypertrophy (an increase in cell size) of gill epithelium. The gill epithelium showed fusing of the secondary lamellae, an effect observed only at the highest doses in this study (200, 400, and 500 μg/g). With the other doses, there was no apparent damage (Fig. 2D).

The control liver showed polygonal hepatocytes with prominent nuclei sinusoid containing erythrocytes, and the main vein (Fig. 2E). The only effect on the liver tissue with the dose 500 μg/g was hyperemia.

In the blood smear, it was observed that the erythrocytes had scalloped borders due to echinocytosis (Fig. 3B). This effect was observed in all the erythrocytes at all doses applied intraperitoneally. Erythrocyte hemolysis (an increase in nuclear size) was also present at all doses. It occurred in 1.4% of cells in low doses (2 and 20 μg/g) and 15.6% in high doses (200, 400 and 500 μg/g) (Fig. 3C). In the case of analysis of fish blood, after 24 h, it also showed poikilocytosis (the presence abnormally shaped erythrocytes) (Fig. 3D), binucleated cell (cells containing two primary nuclei) and condensed chromatin (cells exhibit a speckled nuclear pattern) (Fig. 3E). Subcutaneous injection did not show effect on erythrocytes.

3.3. Hemolytic activity assay

Hemolysis assays were performed to compare the hemolytic activity of crude venom on fish and human erythrocytes. The concentration–response curve (Fig. 4) showed that the fish erythrocytes were more sensitive than human erythrocytes to the crude venom, which is confirmed with Fisher's least significant difference (LSD) multiple comparisons (Fig. 5). Fish erythrocytes showed hemolytic activity at 10 μg/ml of venom, whereas human erythrocyte required 22 μg/ml of venom to show the same activity.

3.4. Phospholipase A_2 (PLA2) activity assays

The phospholipase A_2 activity of *Chrysaora sp.* venom was 596 ± 0.03 U/mg of protein, while *Bothrops asper* venom showed a PLA2 activity 62 ± 0.34 U/mg of protein.

3.5. Characterization of crude venom

SDS-PAGE analyses under reducing conditions revealed that the crude venom from *Chrysaora sp.* has both high and low molecular weight bands (Fig. 6). It was shown fifteen bands, with denser bands corresponding 70, 20 and 15 kDa and other bands with less density corresponding to approximately 220, 120, 90, 35, 26, 24 and three between 15 and 10 kDa.

4. Discussion

The understanding of mechanisms underlying the *in vivo* toxic effects will facilitate the development of more effective treatments for the cnidarian envenomation. Additionally, the recent literature searches for the effects of cnidarian toxins *in vivo* and on isolated organs revealed a striking lack of data compared to the large body of data from studies at molecular and cellular levels (Suput, 2009). Although there are reports of hemolytic activity related to poisonings with the jellyfish *Chrysaora sp.,* this is the first study describing these effects on an *in vivo* model, which has recently become a very useful tool to understand different mechanisms of toxicity.

The study conducted by Li et al. (2014) is an in depth analysis of *in vivo* toxicity in mice of the venom from the jellyfish *Stomolophus meleagris*. The median lethal dose (LD_{50}) was 2.92 μg/g, and the venom caused renal glomerular swelling, renal vesicle stricture, renal tubules dilatation, hepatic blood sinusoid dilatation, pulmonary edema, and malignant pleural effusion. The pathological sections analysis showed that the kidney and liver were significantly damaged, but the heart, spleen, and stomach had no observable changes. The mice also showed convulsions, bleeding of the mouth,

Fig. 1. A) Negative control. B) Hemorrhage in the eye of fish, after of the injection with 200, 400 and 500 μg/g of venom *Chrysaora sp* by intraperitoneal injection (photography of 500 μg/g). C) Hemorrhage in the eye with 0.5 μg/g by subcutaneous injection.

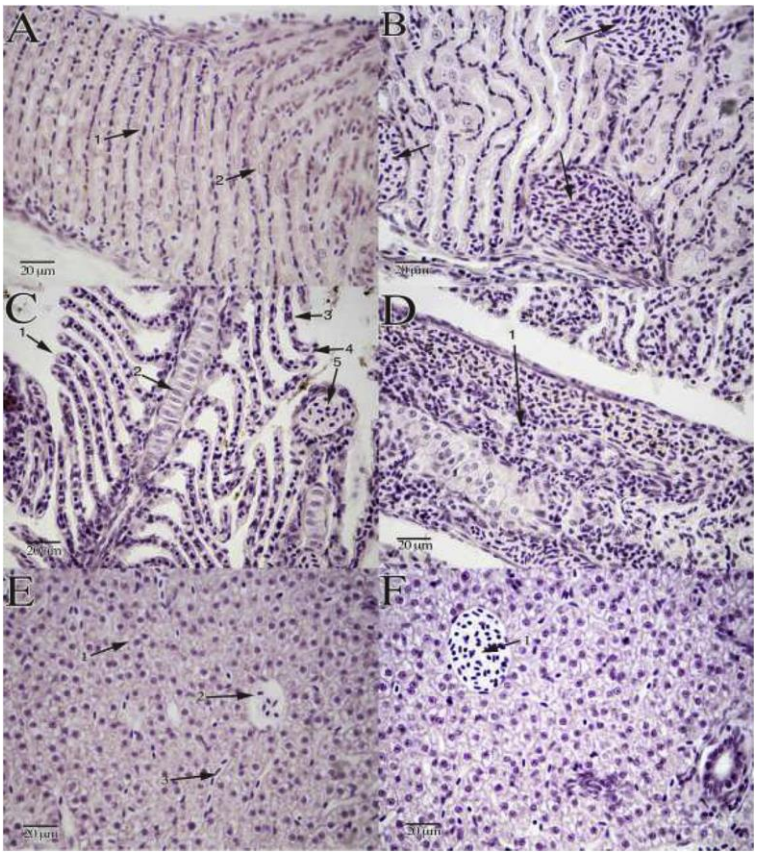


Fig. 2. Histological effects of venom from *Chrysaora sp.* on *Danio rerio*. A) Pseudobranch control composed of gill lamellae, blood vessels (1), and epithelial cells (2). B) Hyperemia (arrows) found in the pseudobranch with all doses (microphotography of 500 µg/g). C) Gill control with secondary lamellae (1) cartilaginous tissue (2), pillar cells (3), erythrocytes within capillary lumens (4) and arterial vessels (5). D) Hyperplasia and hypertrophy (1) of gill epithelium (microphotography of 400 µg/g). E) Liver control with hepatocytes (1), the main vein (2), and sinusoids containing erythrocytes (3). F) Hyperemia (1) only with the dose of 500 µg/g.

Fig. 3. A) Control erythrocytes B) Echinocytes C) Hemolysis D) Poiquilocytosis and E) Nuclear abnormalities.

and piloerection, dyspnea and died after the injection of the venom (Li et al., 2014). This is contrary to the results found in this study, in which there was no other symptom besides the occurrence of bleeding in the eye of the fish at the highest doses (200, 400 and 500 µg/g) by intraperitoneal and subcutaneous injections. The main difference between subcutaneous and intraperitoneal injection is the death even injecting a low dose (0.5 µg/g), this is mainly due to paralysis produced in this way, the venom entered faster in contact with the nervous system and caused that the fishes can not swim therefore the gills was not oxygenated causing the death fish; this gives us important information about the toxins present in the venom, as these effects (convulsions and paralysis) indicate the presence of neurotoxins, observed in this model of research with another neurotoxins (Baraban et al., 2005; Tiedeken et al., 2005), however intraperitoneal injection also gives us important information as to the different molecular targets (branch and liver cells).

The function of the pseudobranch has yet to be elucidated several studies have suggested that it has several functions such as respiratory, osmoregulatory, and sensory functions (Rahim et al., 2014). The main theory is that it is an ocular regulator that controls blood pressure in the eye inasmuch as a blood supply by arterial circulation (Parry and Holliday, 1960). This explains the effect of hemorrhage in the eyes related with the hyperemia in the pseudobranch.

Histopathological analysis demonstrated that the venom of the jellyfish *Chrysaora sp.* caused disturbances in circulation as shown by the presence of hyperemia in the pseudobranch and liver as well as hyperplasia and hypertrophy in the gill. Hyperemia is caused in

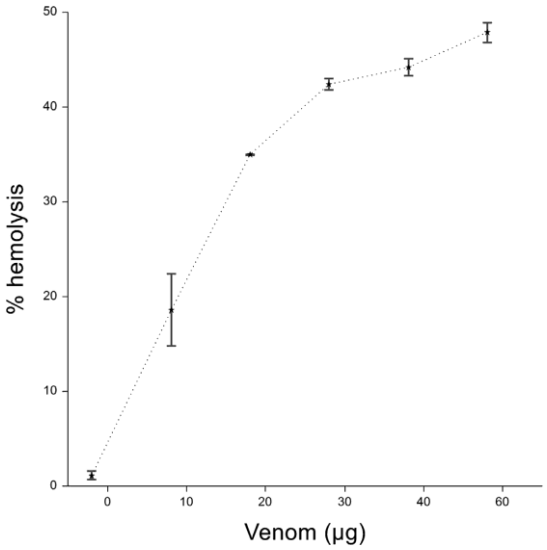


Fig. 4. Concentration-response curve of hemolytic activity on fish erythrocytes.

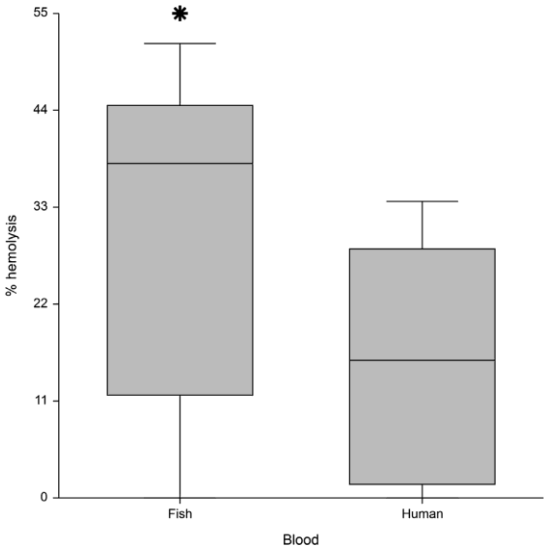


Fig. 5. Hemolytic activity of venom from *Chrysaora sp.* on human and fish erythrocytes in accordance with Fisher's least significant difference, the fish erythrocytes are more sensitive to the crude venom.

response to a vasodilator chemical, and hyperplasia and hypertrophy are caused by chemical irritation (Morrison et al., 2007) which, as reported by Flores-Lopes and Thomaz (2011), are the stages I and II of the classification of the progressive stages of damage in the tissues. This indicates normal functioning of the organ, meaning that the changes are completely reversible with these doses (2, 20, 200, 400 and 500 µg/g). These results differ with the report by Muhvich et al. (1991) in which the main organs affected were the liver and kidney and presented necrosis. However, in this study, it

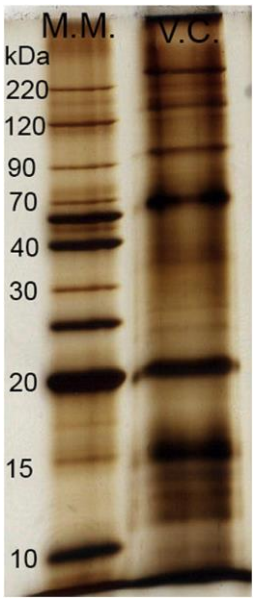


Fig. 6. SDS-PAGE analyses under reducing condition of venom crude (V.C.) from Chrysaora sp. left Molecular Marker (M.M.).

was observed that sublethal effects and the immediate reaction of the body in contact with the venom could produce the same effects as increasing the dose until death.

There are few studies examining the effect of jellyfish venom on fish. In a study conducted by Kintner et al. (2005), mortality was reported, but the study did not analyze the mechanism of toxicity. In this work, the lethal doses were 60.37 µg/g of the venom from *Chiropsalmus sp.* and 2.2 µg/g of that from *Chironex fleckeri,* this demonstrates that *Chrysaora sp.* is less poisonous than the other two species because the doses used in this work did not produced death. However, another studies reported the lethal dose of *Chrysaora* venom in mice was 0.2 µg/g (Suganthi et al., 2012) and 0.37 µg/g (Radwan et al., 2000), these differences may be because they are cryptic species, i. e. other species of jellyfish (Dawson and Jacobs, 2001), or the taxonomic classification is not correct. The taxonomic histories of some of the most important scyphozoans are still controversial (Bayha et al., 2010).

The echinocytosis found can be related to the action of PLA2 present in venom, as in other snake venoms (Walton et al., 1997); activity that had not been reported for this jellyfish, where is even greater than venom from *Borthrops asper.* This effect, observed in all erythrocytes, showed that the hemolysis is by the indirect action of PLA2. Echinocytes have been classified into three main types according to progressive stages in formation and maturation: type I with irregular or undulating edges without the presence of definitive spicules; type II with multiple blunt projections; and type III with many fine, uniformly spaced membrane projections (Walton et al., 1997). With these doses (2–500 µg/g), only echinocytosis type I and II were observed.

Moreover, the presence of poikilocytosis speaks of damage of the liver (Harvey, 2012) which was observed in the histopathological analysis. However, as this damage is reversible, it is possible that the effect of poikilocytosis disappears, leaving the animal after recovery. The binucleated cell is associated with interference in the final process of cell division, and condensed chromatin is present

when the cells are in early stages of apoptosis, although this is not conclusive (Torres-Bugarín et al., 2013).

It was also observed that the erythrocytes of fish are more sensitive than the erythrocytes of humans and other animals. As observed in other studies, the erythrocytes of pigs are the most sensitive, with 150 μg/ml causing 50% hemolysis (Long-Rowe and Burnett, 1994). While those of fish only need 60 μg/ml for the same hemolysis, the hemolysis produced in the *in vivo* and *in vitro* assays differ considerably because *in vitro* models may not mimic the complex *in vivo* interactions of absorption, distribution, metabolism, and excretion of a compound, and the toxic effects may not be observed in both. The toxicity observed *in vitro* may be due to higher compound concentrations than those achieved in *in vivo* studies (Evans, 2008).

The analysis of the proteins present in the venom in the work by Suganthi and Bragadeeswaran (2013) and Suganthi and Perumal (2012) demonstrated that jellyfish venom has cytolytic actinoporins (28 kDa) and cytolysin with or without phospholipase (40 kDa) and the hemolysin has mass weight of 6–10 kDa (Long-Rowe and Burnett, 1994). However, it is still necessary to purify, characterize, and confirm the identity of the compounds and the proteins obtained in this work.

5. Conclusions

In *D. rerio,* the venom of *Chrysaora sp*., a jellyfish species present in Mexico, caused convulsions, paralysis, hemorrhagic in the eyes and disturbances in circulation, affected the gill, and caused hyperemia in the pseudobranch and liver, which is associated with vascular dilatation. The venom also affected erythrocytes, possibly by the action of phospholipase A_2 with 596 units of activity per mg of protein in the crude venom.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was partially financed by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT grant 105961-M, Indicadores de Integridad Ecológica y Salud Ambiental 2014-2018 Universidad Autónoma Metropolitana and PhD fellowship.

References

Baraban, S.C., Taylor, M.R., Castro, P.A., Baier, H., 2005. Pentylenetetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. Neuroscience 131, 759–768.
Bayha, K.M., Dawson, M.N., Collins, A.G., Barbeitos, M.S., Haddock, S.H.D., 2010. Evolutionary relationships among Scyphozoan Jellyfish families based on complete taxon sampling and phylogenetic analyses of 18S and 28S Ribosomal DNA. Integr. Comp. Biol. 50, 436–455.
Bloom, D.A., Burnett, J.W., Alderslade, P., 1998. Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beachside. Toxicon 36, 1075–1085.
Bloom, D.A., Radwan, F.F., Burnett, J.W., 2001. Toxinological and immunological studies of capillary electrophoresis fractionated *Chrysaora quinquecirrha* (Desor) fishing tentacle and *Chironex fleckeri* Southcott nematocyst venoms. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 128, 75–90.
Bonilla, C., Zavaleta, A., 1997. Estudio Bioquímico del veneno de la serpiente *Bothrops hyoprorus*. Rev. Med. Exp. 14, 18–32.
Brinkman, D., Burnell, J., 2008. Partial purification of cytolytic venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. Toxicon 51, 853–863.
Brinkman, D.L., Konstantakopoulos, N., McInerney, B.V., Mulvenna, J., Seymour, J.E., Isbister, G.K., Hodgson, W.C., 2014. *Chironex fleckeri* (box jellyfish) venom proteins: expansion of a cnidarian toxin family that elicits variable cytolytic and cardiovascular effects. J. Biol. Chem. 289, 4798–4812.
Cheung, E., Chatterjee, D., Gerlai, R., 2014. Subcutaneous dye injection for marking and identification of individual adult zebrafish (*Danio rerio*) in behavioral studies. Behav. Res. Methods 46, 619–624.
Dawson, M.N., Jacobs, D.K., 2001. Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). Biol. Bull. 200, 92–96.
Evans, G.O., 2008. Animal Hematotoxicology: a Practical Guide for Toxicologists and Biomedical Researchers. CRC Press, Boca Raton, FL.
Flores-Lopes, F., Thomaz, A., 2011. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. Braz. J. Biol. 71, 179–188.
Guzmán-García, X., Ramírez-Romero, P., López-Vite, S., 2009. Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos, México.
Harvey, J.W., 2012. Chapter 4-Evaluation of erythrocytes. In: Harvey, John W. (Ed.), Veterinary Hematology, pp. 49–121. Saint Louis.
Jiménez, M., Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F., Pérez-Gilabert, M., 2003. A continuous spectrophotometric assay for phospholipase A(2) activity. Anal. Biochem. 319, 131–137.
Kinkel, M.D., Eames, S.C., Philipson, L.H., Prince, V.E., 2010. Intraperitoneal injection into adult zebrafish. J. Vis. Exp. 42.
Kintner, A.H., Seymour, J.E., Edwards, S.L., 2005. Variation in lethality and effects of two Australian chirodropid jellyfish venoms in fish. Toxicon 46, 699–708.
Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
Li, R., Yu, H., Yue, Y., Liu, S., Xing, R., Chen, X., Wang, X., Li, P., 2014. In depth analysis of the *in vivo* toxicity of venom from the jellyfish *Stomolophus meleagris*. Toxicon 92, 60–65.
Long-Rowe, K.O., Burnett, J.W., 1989. Isolation, characterization, and comparison of hemolytic peptides in nematocyst venoms of two species of jellyfish (*Chrysaora quinquecirrha* and *Cyanea capillata*). Comp. Biochem. Physiol. 94B, 641–646.
Long-Rowe, K.O., Burnett, J.W., 1994. Characteristics of hyaluronidase and hemolitic activity in fishing tentacle nematocyst venom of *Chrysaora quinquecirrha*. Toxicon 32, 165–174.
Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.
Morrison, J., Smith, C., Heidel, J., Mumford, S., Blazer, V., MacConnell, E., 2007. Fish Histology and Histopathology Manual.
Muhvich, K.H., Sengottuvelu, S., Manson, P.N., Myers, R.A., Burnett, J.W., Marzella, L., 1991. Pathophysiology of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*), envenomation in a rat model and the effects of hyperbaric oxygen and verapamil treatment. Toxicon 29, 857–866.
Nellis, D.W., 1997. Poisonous Plants and Animals of Florida and the Caribbean, first ed. Pineapple Press Inc, Sarasota, Florida.
Parry, G., Holliday, F.G.T., 1960. An experimental analysis of the function of the pseudobranch in teleosts. J. Exp. Biol. 37, 344.
Pedroso, G.L., Hammes, T.O., Escobar, T.D., Fracasso, L.B., Forgiarini, L.F., Da Silveira, T.R., 2012. Blood collection for biochemical analysis in adult zebrafish. J. Vis. Exp. e3865.
Pyati, U.J., Look, A.T., Hammerschmidt, M., 2007. Zebrafish as a powerful vertebrate model system for *in vivo* studies of cell death. Semin. Cancer Biol. 17, 154–165.
Radwan, F.F., Gershwin, L., Burnett, J.W., 2000. Toxinological studies on the nematocyst venom of *Chrysaora achlyos*. Toxicon 38, 1581–1591.
Rahim, S.M., Mazlan, A.G., Simon, K.D., Delaunoy, J.P., Laurent, P., 2014. Immunocytochemical localization of carbonic anhydrase in the pseudobranch tissue of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Zhejiang Univ. Sci. B 15, 194–200.
Richardson, A.J., Bakun, A., Hays, G.C., Gibbons, M.J., 2009. The jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future. Trends Ecol. Evol. 24, 312–322.
Segner, H., 2009. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 149, 187–195.
Singletary, E.M., Rochman, A.S., Bodmer, J.C., Holstege, C.P., 2005. Envenomations. Med. Clin. North Am. 89, 1195–1224.
Suganthi, K., Bragadeeswaran, S., 2013. Antimicrobial and immunomodulatory activities of Jellyfish (*Chrysaora quinquecirrha*) Venom. In: Sabu, Abdulhameed, Augustine, Anu (Eds.), Prospects in Bioscience: Addressing the Issues, pp. 283–292.
Suganthi, K., Perumal, P., 2012. Biological activities of nematocysts extract of jellyfish *Chrysaora quinquecirrha* (Desor1848) from Vellar estuary, Southeast coast of India. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 4, 300–304.
Suganthi, K., Bragadeeswaran, S., Kumaran, N., Thenmozhi, C., Thangaraj, S., 2012. *In vitro* antioxidant activities of jelly fish *Chrysaora quinquecirrha* venom from southeast coast of India. Asian Pac. J. Trop. Biomed.
Suput, D., 2009. *In vivo* effects of cnidarian toxins and venoms. Toxicon 54, 1190–1200.
Tiedeken, J.A., Ramsdell, J.S., Ramsdell, A.F., 2005. Developmental toxicity of domoic acid in zebrafish (*Danio rerio*). Neurotoxicol Teratol. 27, 711–717.
Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M.G., Macriz-Romero, N., Flores-García, A., Ramos-Ibarra, M.L., 2013. Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. Residente 8, 4–11.
Turk, T., Kem, W.R., 2009. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. Toxicon 54, 1031–1037.
Walton, R.M., Brown, D.E., Hamar, D.W., Meador, V.P., Horn, J.W., Thrall, M.A., 1997. Mechanisms of echinocytosis induced by *Crotalus atrox* venom. Vet. Pathol. 34, 442–449.
Young, J.D., Leong, L.G., DiNome, M.A., Cohn, Z.A., 1986. A semiautomated hemolysis microassay for membrane lytic proteins. Anal. Biochem. 154, 649–654.