

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con
orientación en Biotecnología Marina**

***Anthopleura xanthogrammica* como fuente de péptidos moduladores
de la respuesta nociceptiva evaluada en un modelo murino**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Eduardo Alvarez López

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por
Eduardo Alvarez López

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dra. Mónica Elizabeth Tentori Espinosa

M en C. Samanta Mireya Jiménez Flores



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Eduardo Alvarez López© 2017

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Eduardo Alvarez López** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Anthopleura xanthogrammica como fuente de péptidos moduladores de la respuesta nociceptiva evaluada en un modelo murino

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

La síntesis de venenos es una estrategia animal que funciona como mecanismo de depredación y defensa. Estos compuestos se estudian, desde el punto de vista biomédico y biotecnológico, con el fin de encontrar moléculas con respuestas efectivas a diversos padecimientos crónicos y emergentes. En este trabajo se aisló Ax3.6.14.1, un componente de naturaleza peptídica en el veneno de *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt, 1835). Este componente modula la respuesta nociceptiva, mostrando un potente efecto analgésico en un modelo murino evaluado mediante la prueba de superficie caliente a 55 °C ([0.1 µg/g ratón] 15 segundos de latencia a 30 min y 27 segundos de latencia a 45 min) comparado con el efecto analgésico de Nalbufina® como control positivo ([4 µg/g ratón] 12 segundos de latencia a 30 min y 16 segundos de latencia a 45 min) y el control negativo PBS 1x ([200 µl] 6 segundos de latencia a 30 min y 9 segundos de latencia a 45 min). Debido a la dificultad de purificación de los componentes, se logró caracterizar parcialmente Ax3.6.14.1.1 (3433.42 Da) y Ax3.6.14.2 (3634.54 Da), ambos con cuatro residuos de cisteínas.

Palabras clave: toxinas, péptidos analgésicos, prueba de superficie caliente, cromatografía.

Abstract of the thesis presented by **Eduardo Alvarez López** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology

Anthopleura xanthogrammica as a source of modulating peptides of the nociceptive response evaluated in a mice model

Abstract approved by:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Thesis Director

Venom synthesis is an animal strategy working as a mechanism of predation and defense. These compounds are studied from a biomedical and biotechnological approach, in order to find molecules with effective responses to several chronic and emerging diseases. In this work, a peptidic component in the venom of *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt, 1835) called Ax3.6.14.1, was isolated. This component modulates nociceptive response, showing a strong analgesic effect in a murine model, evaluated using the hot plate test at 55°C ([0.1 µg / g mouse] 15 seconds of latency at 30 min and 27 seconds of latency at 45 min) compared to the analgesic effect of Nalbufina[®] used as a positive control ([4 µg / g mouse] 12 seconds latency at 30 min and 16 seconds latency at 45 min) and the PBS 1X used as a negative control ([200 µl] 6 seconds latency at 30 min and 9 seconds latency at 45 min). Due to some difficulties in the purification process of this component, we partially characterized in Ax3.6.14.1.1 (3433.42 Da) and Ax3.6.14.2 (3634.54 Da), both with four cysteine residues.

Keywords: toxins, analgesic peptides, hot plate test, chromatography.

Dedicatoria

Para mi compañera de vida

Layla

Agradecimientos

Principalmente al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por darme la oportunidad de realizar un posgrado y por el apoyo económico otorgado bajo el número 589065.

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE)** por brindarme un lugar en el posgrado con número de matrícula 15293802 y recibir cobijo intelectual de todos los investigadores y técnicos del plantel.

Al orquestador de este trabajo, el **Dr. Alexei Licea**, quien me adoctrinó, apoyó y alentó durante mi estancia en CICESE; quien me enseñó que la ciencia también es redituable, cooperativa y multidisciplinaria.

A mi comité sinodal por estar siempre pendiente de las necesidades del proyecto, así como de la orientación del escrito y de la presentación oral. **Dra. Rosa Mouríño, Dra. Monica Tentori y M en C. Samanta Jimenez** mil gracias.

A los jefes **Dra. Johana Bernáldez, Dr. Ricardo González y M en C. Samanta Jimenez**, disfruté mucho de su compañía, los incontables momentos de apoyo y dirección en el laboratorio, y las divertidas salidas de campo.

A los **Investigadores del Departamento de Innovación Biomédica** quienes también fueron parte del desarrollo de este trabajo, por sus valiosos comentarios y por tener siempre la puerta abierta para resolver dudas y propuestas.

A la mesa cinco: **Olivia, Jahaziel y Vanessa Millán** dispuestos a platicar, discutir y defender el desarrollo científico, siempre con una sonrisa. A todos mis compañeros de laboratorio por compartir tan buenos momentos.

A los chicos de estancia e intercambio, por apoyarme en el desarrollo de este trabajo: **Sara, Kevin Nick, Joshio e Isabel**, aprendí mucho a su lado.

A todos mis compañeros de generación que siempre estuvieron abiertos a un saludo, un café, un partido de futbol, a preparar comidas o pequeños viajes y de quienes aprendí diversas dinámicas de estudio y preparación. **Miranda**, gracias por tu amistad y el apoyo en los trámites administrativos. A esas personas divertidísimas, mis hermanos y amigos **Víctor, Tellechea, Iván y Arlette** que siempre tendrán un lugar especial en mi mente y corazón.

A **mi familia** entera y **amigos** de **CDMX**, muchas gracias por el empuje y todos los ánimos que me enviaron desde casa.

Tabla de contenido

| | Página |
|-------------------------|--------|
| Resumen en español..... | ii |
| Resumen en inglés..... | iii |
| Dedicatorias..... | iv |
| Agradecimientos..... | v |
| Lista de figuras..... | ix |
| Lista de tablas..... | xi |

Capítulo 1. Introducción

| | |
|---|----|
| 1.1 Introducción..... | 1 |
| 1.2 Antecedentes..... | 2 |
| 1.2.1 Mecanismo de acción del veneno..... | 3 |
| 1.2.2 El sistema nervioso..... | 4 |
| 1.2.3 El dolor..... | 7 |
| 1.2.4 La vía del dolor..... | 8 |
| 1.2.5 Analgesia..... | 13 |
| 1.2.6 Toxinas como nuevos tratamientos contra el dolor..... | 14 |
| 1.2.7 <i>Phylum Cnidaria</i> | 15 |
| 1.2.8 Clase Anthozoa..... | 19 |
| 1.2.9 La anémona gigante verde..... | 20 |
| 1.3 Justificación..... | 24 |
| 1.4 Hipótesis..... | 24 |
| 1.5 Objetivos..... | 24 |
| 1.5.1 Objetivo general..... | 24 |
| 1.5.2 Objetivos específico..... | 24 |

Capítulo 2. Metodología

| | |
|--|----|
| 2.1 Obtención y purificación de la muestra..... | 25 |
| 2.1.1 Colecta y extracción del veneno total..... | 25 |
| 2.1.2 Separación de toxinas mediante cromatografía de exclusión molecular..... | 25 |
| 2.1.3 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)..... | 27 |
| 2.1.4 RP-HPLC con búffer de fosfatos como solución A..... | 27 |

| | |
|--|----|
| 2.1.5 RP-HPLC con metanol como solvente orgánico..... | 28 |
| 2.1.6 Purificación de la fracción Ax3.6.14.1 reducida y alquilada mediante RP-HPLC..... | 28 |
| 2.2 Ensayos biológicos..... | 28 |
| 2.2.1 Hot plate test..... | 29 |
| 2.3 Análisis estadístico..... | 29 |
| 2.4 Caracterización bioquímica de la toxina de interés..... | 30 |
| 2.4.1 Determinación del peso molecular por espectrometría de masas..... | 30 |
| 2.4.2 Identificación de residuos de cisteínas..... | 30 |
| Capítulo 3. Resultados | |
| 3.1 Purificación del veneno y ensayos <i>in vivo</i> | 31 |
| 3.1.1 Colecta y extracción del veneno total..... | 31 |
| 3.1.2 Separación de las toxinas mediante cromatografía de exclusión molecular..... | 33 |
| 3.1.3 Hot plate test para cada fracción de exclusión molecular..... | 34 |
| 3.1.4 RP-HPLC de la fracción Ax3..... | 36 |
| 3.1.5 Hot plate test para cada sub-fracción de RP-HPLC..... | 36 |
| 3.1.6 Re-purificación de las fracciones Ax3.6, Ax3.9 y Ax3.10 mediante RP-HPLC..... | 38 |
| 3.1.7 Hot plate test para la fracción Ax3.6..... | 39 |
| 3.1.8 Hot plate test para la fracción Ax3.9 y Ax3.10..... | 41 |
| 3.1.9 Re-purificación de las fracciones de interés mediante RP-HPLC..... | 42 |
| 3.1.10 Hot plate test para las fracciones de interés..... | 43 |
| 3.1.11 Implementación de RP-HPLC con un buffer básico..... | 43 |
| 3.1.12 Implementación de RP-HPLC con cambio de solvente orgánico..... | 44 |
| 3.1.13 Purificación de la fracción Ax3.6.14.1 reducida y alquilada mediante RP-HPLC..... | 45 |
| 3.2 Caracterización bioquímica de la toxina de interés..... | 46 |
| 3.2.1 Determinación del peso molecular por espectrometría de masas..... | 46 |
| 3.4.2 Identificación de residuos de cisteínas..... | 48 |
| Capítulo 4. Discusión | |
| 4.1 Obtención y purificación de la muestra..... | 50 |
| 4.1.1 Colecta y extracción de veneno total..... | 50 |
| 4.1.2 Purificación por exclusión molecular..... | 51 |
| 4.1.3 Purificación por RP-HPLC..... | 53 |
| 4.1.4 Consideraciones para futuros trabajos de purificación..... | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2 Ensayos biológicos..... | 54 |
| 4.2.1 Hot plate test..... | 54 |
| 4.3 Caracterización bioquímica de la toxina de interés..... | 57 |
| 4.3.1 Determinación del peso molecular por espectrometría de masas..... | 57 |
| 4.3.2 Identificación de residuos de cisteínas..... | 57 |
| | |
| Capítulo 5. Conclusiones | |
| 5.1 Conclusiones..... | 59 |
| | |
| Literatura citada..... | 61 |
| | |
| Anexos..... | 74 |

Lista de figuras

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Diversidad animal..... | 2 |
| 2 | Blancos moleculares de las toxinas animales..... | 3 |
| 3 | Sistema nervioso..... | 4 |
| 4 | Neurona..... | 5 |
| 5 | Médula espinal..... | 7 |
| 6 | Transducción..... | 10 |
| 7 | Transmisión..... | 11 |
| 8 | Modulación..... | 12 |
| 9 | Escala analgésica..... | 13 |
| 10 | Clasificación del filo Cnidaria..... | 16 |
| 11 | Bauplan de Cnidarios..... | 17 |
| 12 | Morfogénesis del cnidocito..... | 18 |
| 13 | Estrategias de supervivencia del género <i>Anthopleura</i> | 20 |
| 14 | <i>Anthopleura xanthogrammica</i> | 21 |
| 15 | Cromatograma de exclusión molecular..... | 34 |
| 16 | Evaluación del efecto analgésico de las fracciones de exclusión molecular..... | 35 |
| 17 | Cromatograma de la fracción Ax3..... | 36 |
| 18 | Evaluación del efecto analgésico de las subfracciones de Ax3..... | 37 |
| 19 | Evaluación del efecto analgésico de las subfracciones de Ax3..... | 37 |
| 20 | Evaluación del efecto analgésico de las subfracciones de Ax3..... | 38 |
| 21 | Cromatograma de la fracción Ax3.6..... | 38 |
| 22 | Cromatograma de la fracción Ax3.9..... | 39 |
| 23 | Cromatograma de la fracción Ax3.10..... | 39 |

| | | |
|----|--|----|
| 24 | Evaluación del efecto analgésico de Ax3.6..... | 40 |
| 25 | Evaluación del efecto analgésico de Ax3.6..... | 40 |
| 26 | Evaluación analgésica de Ax3.9 y Ax3.10..... | 41 |
| 27 | Evaluación analgésica de Ax3.9 y Ax3.10..... | 41 |
| 28 | Cromatograma de repurificación de las fracciones de interés..... | 42 |
| 29 | Evaluación del efecto analgésico de las subfracciones obtenidas..... | 43 |
| 30 | Cromatograma de RP-HPLC con búffer de fosfatos..... | 44 |
| 31 | Cromatograma de RP-HPLC con metanol como solvente orgánico..... | 45 |
| 32 | Cromatograma de Ax3.6.14.1 reducida y alquilada..... | 46 |
| 33 | Espectrograma de muestras parcialmente purificadas..... | 47 |
| 34 | Espectrograma de Ax3.6.14.1..... | 47 |
| 35 | Espectrograma de Ax3.6.14.2..... | 48 |
| 36 | Mapa de América del Norte donde se señalan localidades con registros de anémonas del género <i>Anthopleura</i> | 50 |
| 37 | Comparación de cromatogramas de exclusión molecular..... | 52 |

Lista de tablas

| Tabla | | Página |
|-------|---|--------|
| 1 | Clasificación de las fibras nerviosas de mamíferos..... | 6 |
| 2 | Toxinas peptídicas con actividad analgésica..... | 15 |
| 3 | Clasificación actual de las toxinas de anémonas..... | 18 |
| 4 | Registro de diferencia de peso para cada tubo obtenido de la primer colecta..... | 32 |
| 5 | Registro de diferencia de peso para cada tubo obtenido de la segunda..... | 32 |
| 6 | Registro de cantidades obtenidas por exclusión molecular..... | 33 |
| 7 | Registro de latencias para las cuatro fracciones obtenidas por exclusión molecular... | 35 |
| 8 | Caracterización de los compuestos con actividad analgésica..... | 49 |

Capítulo 1. Introducción

1.1 Introducción

En México, como en otras partes del mundo, se han aprovechado los recursos naturales para beneficio humano. Un ejemplo es la herbolaria, disciplina que se encarga de preservar y utilizar los componentes de origen vegetal para fines terapéuticos; esta práctica ha sido heredada y mejorada por generaciones (Fleuriet, 2009). Además del uso de las plantas, también se han descrito el uso de animales para diversas necesidades humanas como alimenticias, medicinales, artesanales, indumentaria, así como en rituales religiosos (García-López *et al.*, 2017).

Con la institucionalización de la biotecnología en México, se han podido aprovechar los recursos cuya utilización es respetuosa, inteligente y sustentable (Bolívar, 1997). La aplicación de la biotecnología en diversas actividades humanas conlleva al mejoramiento de las aguas residuales, la implementación de bacterias para la producción de biomoléculas que implica una disminución en costo de dicha productividad, el mejoramiento genético de plantas para ampliar el rango de resistencia a temperaturas elevadas y sequías, el aumento en la esperanza de vida por el desarrollo de nuevos fármacos, entre muchas otras (Bolívar, 2002).

Un caso particular que ha mostrado interés por la industria farmacéutica es el aprovechamiento y uso de productos naturales, como venenos de animales, hongos, plantas y bacterias, para atacar múltiples enfermedades crónicas y emergentes. El primer caso de éxito es el desarrollo del fármaco Captopril®, un nonapéptido purificado del veneno de la serpiente jararaca, que bloquea a la enzima convertidora de angiotensina, evitando así la hipertensión arterial (Rebello-Horta *et al.*, 2016). Desde entonces se ha desarrollado un nuevo campo biotecnológico, abriendo un universo de biomoléculas potencialmente utilizables en el ámbito farmacéutico (Trapani *et al.*, 2016).

El estado de Baja California posee una riqueza de animales marinos por explorar, ya que cuenta con dos costas: el Pacífico Mexicano y el Golfo de California. En estas costas se distribuyen, entre muchos otros organismos, animales que sintetizan venenos para su defensa. Ya se han caracterizado diversas moléculas procedentes de estos animales en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de CICESE (Oroz-Parra *et al.*, 2016; De León-Nava *et al.*, 2016). El objetivo de este trabajo es caracterizar un componente de origen peptídico procedente del veneno de *Anthopleura xanthogrammica* como analgésico, aplicando diversas técnicas biotecnológicas disponibles.

1.2 Antecedentes

En el reino animal se han descrito diversos mecanismos de defensa y depredación. Un caso particular es la síntesis y liberación de sustancias tóxicas conocidas comúnmente como venenos (Fry, 2005). Los venenos son una mezcla de compuestos que incluyen moléculas orgánicas como aminos, alcaloides, minerales, aminoácidos, péptidos y proteínas, que son llamadas toxinas. La diversidad de animales venenosos es vasta, tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres, invertebrados y vertebrados, inclusive mamíferos (Fig. 1) (Zhang, 2011).

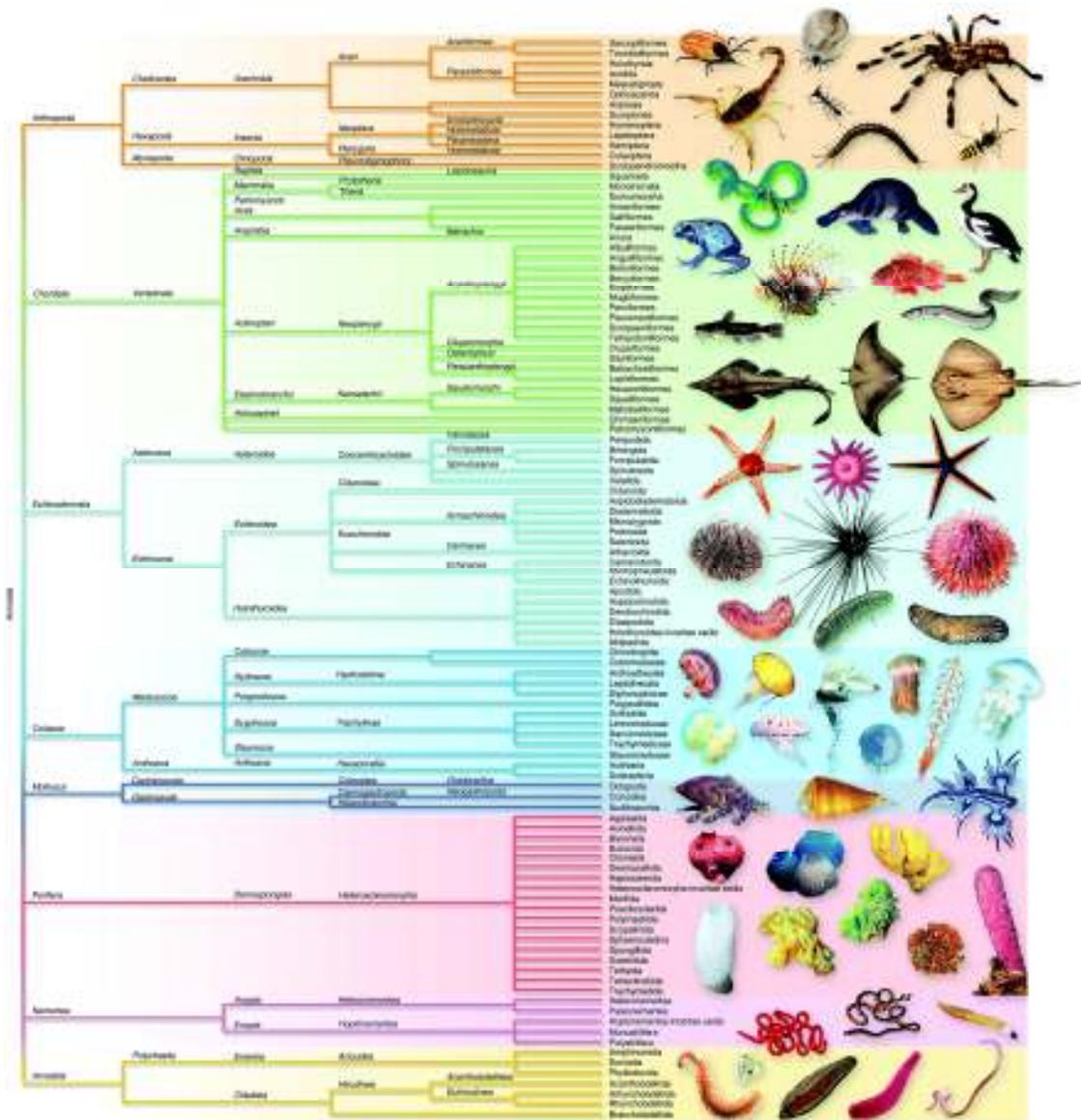


Figura 1. Diversidad animal. Representación de la biodiversidad animal venenosa. Tomado de Oldrati *et al.*, 2013.

1.2.1 Mecanismo de acción del veneno

El veneno se clasifica según su mecanismo de acción en la presa, el cual produce síntomas que se extienden a través del sistema nervioso, respiratorio, muscular, renal y gastrointestinal. Por lo tanto, el veneno es clasificado como hemotóxico cuando actúan sobre el sistema cardiovascular, neurotóxico cuando actúa sobre el sistema nervioso central y periférico, así como citotóxico cuando afecta a nivel celular (Borchania *et al.*, 2011). Al ocasionar envenenamiento o intoxicación, la presa puede experimentar dolor local, hinchazón, ampollas, erupciones, necrosis del tejido; además de efectos sistémicos que incluyen vómitos, parálisis, náuseas, diarrea, fiebre, dolor de cabeza, visión borrosa, ganglios linfáticos inflamados, mareos, debilidad muscular y una falta de coordinación muscular hasta producirse colapso súbito y finalmente la muerte (Ownby y Odell, 2013).

Estos síntomas se producen a través de una serie de interacciones moleculares. Se han descrito toxinas con actividad enzimática que pueden causar la lisis de la membrana celular mediante la formación de poros y la destrucción de otros componentes celulares. Otras toxinas son bloqueadoras o activadoras de receptores celulares, bloqueadoras o activadoras de canales iónicos y otro tipo receptores anclados a la membrana celular que desencadenan o bloquean la liberación de neurotransmisores, así como la inhibición o activación de cascadas de señalización celular (Fig. 2) (Simms y Zamponi, 2014).

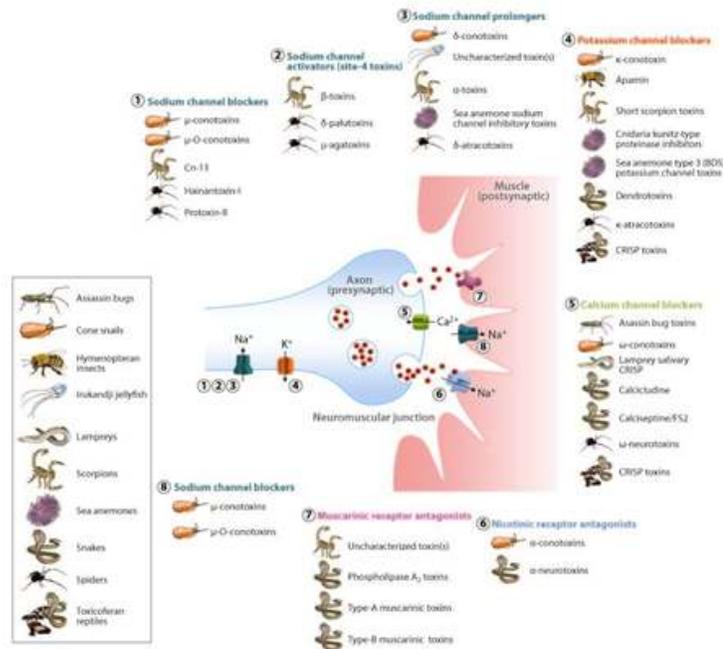


Figura 2.- Blancos moleculares de toxinas. Los tipos de canales iónicos activados por voltaje que se encuentran en la placa neuromuscular y algunas toxinas animales que interactúan con estos blancos moleculares. Tomado de Fry *et al.*, 2009.

La identificación de los blancos moleculares específicos de las toxinas, ha dado hincapié en la caracterización y uso de sus propiedades biomédicas en problemas de salud pública. Se han utilizado para tratar o reducir los síntomas asociados a enfermedades crónicas como canalopatías, cáncer, diabetes tipo II, VIH, dolor y en enfermedades emergentes con una alta tasa de mortandad (Desenclos *et al.*, 2005). También, se han utilizado en la identificación de los efectos sistémicos en el organismo, principalmente en el sistema nervioso (Harris y Goonetilleke, 2004).

1.2.2 El sistema nervioso

El sistema nervioso es el encargado de detectar, transmitir, analizar y utilizar información generada por los estímulos sensitivos representados por el calor, la luz, la energía mecánica y las modificaciones químicas del ambiente interno y externo (Benzon *et al.*, 2011). Este sistema está conformado por una red compleja de comunicación celular, distribuida por todo el organismo (Fig. 3). Se divide en sistema nervioso central (SNC), formado por el encéfalo y la médula espinal; y el sistema nervioso periférico (SNP), formado por los nervios y pequeños grupos de neuronas denominados ganglios nerviosos (Junqueira y Carneiro, 2010).

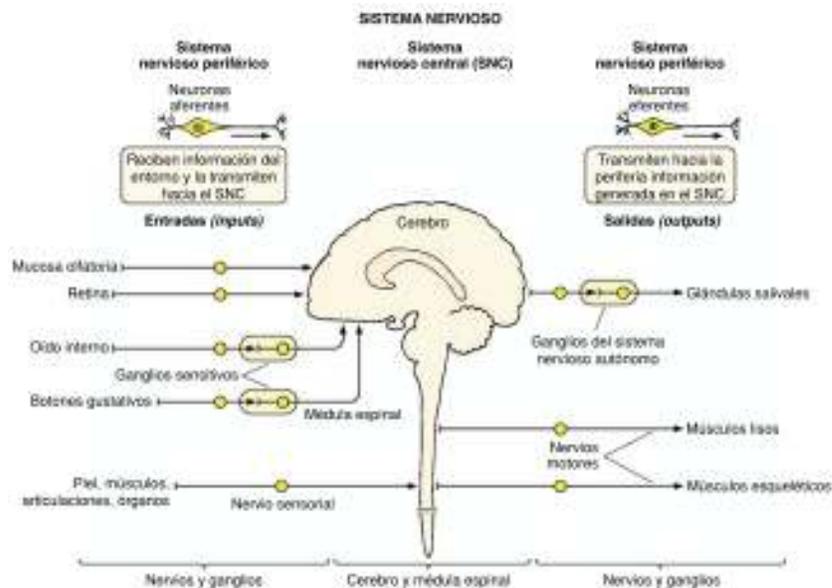


Figura 3.- Sistema nervioso. Representación del sistema nervioso central y periférico y los diversos tipos de percepción asociados a la codificación por el sistema nervioso. Modificado de Junqueira y Carneiro, 2010.

Las neuronas son células excitables que se encargan de transmitir señales eléctricas en todo el organismo con el fin de restablecer la homeostasis. Cada neurona tiene un cuerpo celular donde está contenido el núcleo. Del cuerpo celular se extiende el axón, el cuál conduce los impulsos eléctricos hasta las células blanco. También presentan extensiones cortas llamadas dendritas, cuya función es la de proveer suficiente superficie de contacto para recibir las señales eléctricas provenientes de otras neuronas, o bien, traducir las diversas señales externas en señales eléctricas (Fig. 4). En el SNP, los ganglios nerviosos están formados por un axón y pueden estar acompañadas por una vaina de mielina (fibras mielínicas) o no presentar dicho recubrimiento (fibras amielínicas) (Miller and Pereda, 2017).

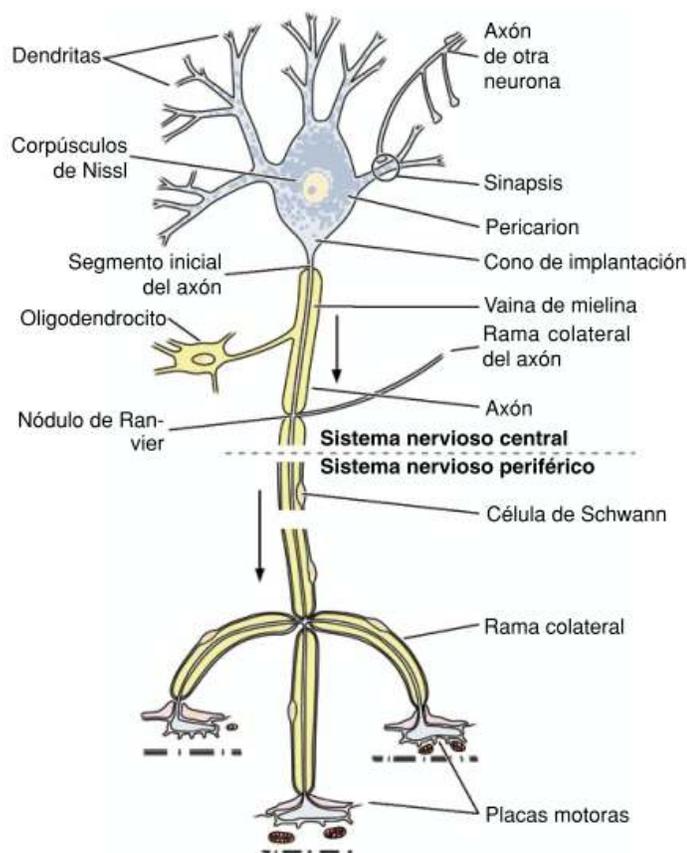


Figura 4.- Neurona. Esquema de una neurona mielinizada en sinapsis con la placa motora. Modificado de Junqueira y Carneiro, 2010.

Existe una clasificación de las fibras nerviosas de mamíferos, las cuáles se agrupan en A, B y C. El grupo A, se encuentra subdividido en α , β , γ y δ ; en cambio, los grupos B y C no tienen subtipos de fibras (tabla 1). Los axones de un diámetro grande transmiten los impulsos más rápido, en comparación de los de menor tamaño. Los axones de mayor tamaño transmiten la sensibilidad pro-nociceptiva, la función

motora somática, el tacto consiente y la presión. Y los axones pequeños transmiten la función autónoma, sensaciones de dolor y temperatura (Kai-Kai, 1989).

Tabla 1.- Clasificación de las fibras nerviosas de mamíferos.

| Tipo de fibra | Subtipo de fibra | Función | Diámetro (μm) | Velocidad de conducción (m/seg) | Mielina |
|----------------------|-------------------------|---|----------------------|--|-----------------|
| A | α | Propiocepción; motora somática | 12 – 20 | 70 – 120 | Presente |
| | β | Tacto, presión, motora | 5 – 12 | 30 – 70 | Gruesa |
| | μ | Motora en musculo esquelético | 3 – 6 | 15 – 30 | Presente |
| | δ | Dolor agudo, frio, tacto, localizado | 2 – 5 | 12 – 30 | Fina |
| B | NA | Transmiten información proveniente de mecanoreceptores cutáneos y subcutáneos y de fibras nerviosas pre-ganglionares autónomas | < 3 | 3 – 15 | Presente |
| C | NA | Dolor sordo quemante de fibras simpáticas post-ganglionares | 0.5 – 1.5 | 0.5 – 2 | Ausente |

Las neuronas sensoriales primarias inervan las seis láminas de Rexed en el asta dorsal de la médula espinal. El asta dorsal es el marcador principal para la integración de la entrada sensorial periférica y la modulación supra-espinal descendente (Saker *et al.*, 2016). La mayoría de los nociceptores aferentes C y

A δ (estimulación periférica nociva) forman contactos sinápticos en las láminas superficiales (I y II), mientras que los aferentes de bajo umbral A δ y A β (sensibles al tacto) generalmente se proyectan a láminas más profundas (III a V). El asta dorsal se compone de un gran número de poblaciones de interneuronas excitadoras (75%) e inhibitoras (25%), así como un número menor de neuronas de proyección localizadas en las láminas I, III, IV y V (Fig. 5). Las neuronas de proyección transmiten información a numerosos sitios supra-espinales para dar lugar a aspectos tanto cualitativos como afectivos de la sensación de dolor (Teichert *et al.*, 2015).

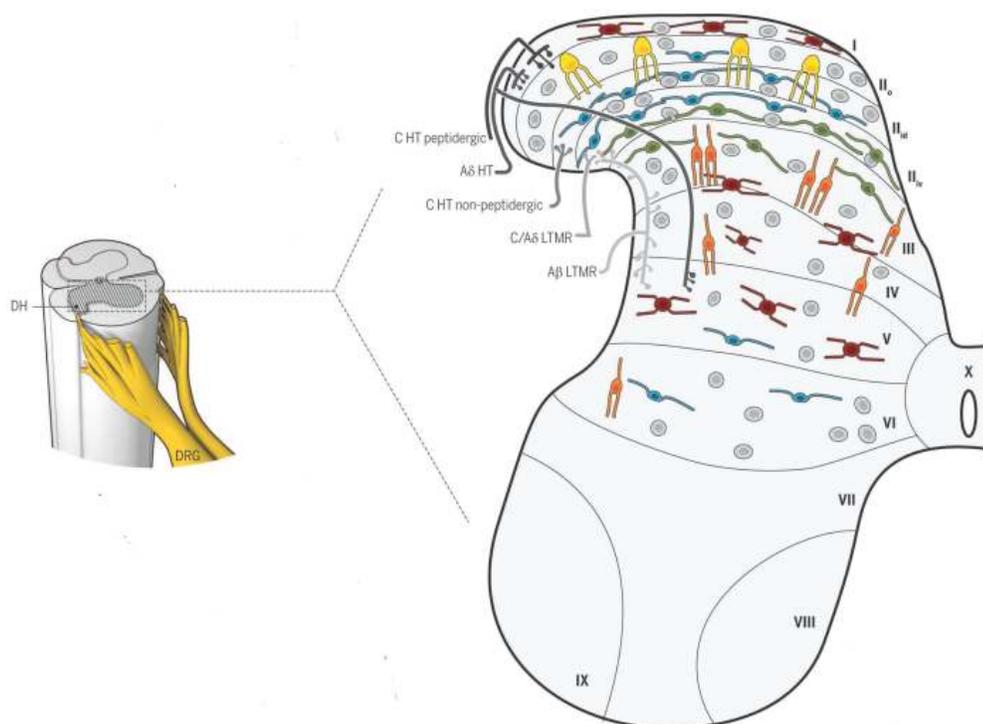


Figura 5.- Médula espinal. Izquierda: Corte transversal de la medula espinal. Derecha: Localización de las laminillas del asta dorsal. Modificado de Peirs y Seal, 2016.

1.2.3 El dolor

El dolor se considera un problema de salud pública mundial que afecta entre un 25% y un 29% de la población. Se define como una sensación somática que ocurre en respuesta a una lesión tisular real o posible (Bader *et al.*, 2010). Se considera como un mecanismo de defensa, es decir, una señal de alarma para proteger al organismo y aumentar la supervivencia del individuo (Romera *et al.*, 2000).

1.2.4 La vía del dolor

Los cambios bioquímicos que tienen lugar en la transmisión y/o modulación del dolor se agrupan en tres niveles: (1) Periférico: mecanismo por el cual una serie de estímulos son capaces de excitar los receptores periféricos; (2) medular: mecanismos de transmisión y modulación en el asta posterior y (3) central: aquellos neurotransmisores y mecanismos implicados en la percepción cerebral y medular del dolor, y los mecanismos inhibidores de dicha sensación. Además, la secuencia de eventos por la cual se percibe un estímulo implica cuatro procesos: (1) transducción, (2) transmisión, (3) modulación, y (4) percepción (Zhang *et al.*, 2017).

La **transducción** se produce en las terminales periféricas de las neuronas aferentes primarias, donde diferentes formas de energía, por ejemplo, mecánicas, térmicas, físicas o químicas, se convierten en una actividad eléctrica, mejor conocida como potenciales de acción (Fig. 6). La lesión del tejido resulta en la liberación local de numerosos productos químicos que inducen directamente la transducción del dolor activando nociceptores, o bien, facilitar la transducción del dolor aumentando la excitabilidad de los nociceptores (Colloca *et al.*, 2017). La lista de mediadores es extensa y como tal, se refiere frecuentemente como la “sopa inflamatoria”.

La bradiquinina desempeña un papel crítico en el dolor agudo en los seres humanos ya que activa nociceptores mielinizados y amielinizados. La bradiquinina también produce hiperalgesia de calor transitorio en seres humanos mediante la sensibilización de los nociceptores mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC), la proteína quinasa C (PKC), la producción de eicosanoides y la modulación del canal TRPV1 (VR1) (Cypriano, 2017).

Los niveles bajos de pH (exceso de H⁺ libre) que se encuentran en los tejidos inflamados también contribuyen al dolor y a la hiperalgesia asociados con la inflamación, ya que esto provoca selectivamente la activación y sensibilización de los nociceptores a estímulos mecánicos (Osmakov *et al.*, 2014). Estudios recientes sugieren que los efectos del pH están mediados por la apertura de un canal iónico de detección de ácido específico de la neurona ganglionar de la raíz dorsal (DRASIC/ASIC-3) (Baron y Lingueglia, 2015).

La serotonina, es liberada de las plaquetas en respuesta al factor activador de plaquetas derivado de la desgranulación de los mastocitos, lo que conlleva a la activación de nociceptores. La serotonina también potencia el dolor inducido por bradiquinina y la activación del nociceptor (Alcántara-Montero, 2017).

La histamina, liberada de los mastocitos por la sustancia P derivada de los reflejos del axón en los nociceptores activados, produce una variedad de respuestas incluyendo vasodilatación y edema (Csaba, 2014). La histamina exógena aplicada a la piel produce picazón y no dolor, pero la histamina excita nociceptores viscerales polimodales y aumenta las respuestas de los nociceptores a la bradiquinina y el calor (Kiss y Keseru, 2014).

Los eicosanoides son una gran familia de metabolitos del ácido araquidónico que incluyen prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Estas moléculas activan directamente los nervios aferentes articulares, los de la piel y las vísceras; los sensibilizan a los estímulos naturales y a otros productos químicos endógenos. Las prostaglandinas, sintetizadas por la enzima constitutiva COX-1, y por la COX-2, inducidas en los tejidos periféricos por la inflamación, reducen el umbral de activación de las corrientes Na^+ resistentes a la tetrodotoxina en los nociceptores, aumentan los niveles intracelulares de AMPc y aumentan la excitabilidad de las neuronas sensoriales. Los leucotrienos, metabolitos de la vía de la lipoxigenasa, contribuyen a la hiperalgesia y a la sensibilización a los estímulos mecánicos (Shapiro *et al.*, 2016).

La adenosina y sus derivados de mono y polifosfato (AMP, ADP, ATP) se liberan o filtran en el espacio extracelular con lesión e inflamación en los tejidos donde contribuyen al dolor y a la hiperalgesia. La adenosina induce dolor en los seres humanos mediante la activación directa de los nociceptores. El ATP también induce dolor en los seres humanos y activa los nociceptores C en la piel humana sana, pero no sensibiliza a las fibras C mecánicas o a los estímulos de calor. El ATP presumiblemente activa las neuronas nociceptivas en la piel normal a través del P2X3 y el receptor heteromérico P2X2 / P2X3.16 (Burnstock, 2016).

Las citocinas (por ejemplo: interleucina-1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interleucina-6 (IL-6)) son liberadas por una variedad de células (por ejemplo: macrófagos, astrocitos o células de Schwann). Sin embargo, las citocinas también promueven la señalización del dolor. Tanto IL-1 β como TNF α excitan directamente y sensibilizan a las fibras aferentes nociceptivas a estímulos térmicos y mecánicos. (Woda *et al.*, 2016).

Los receptores de aminoácidos excitatorios (EAA) están presentes en las células ganglionares de la raíz dorsal y en los terminales presinápticos de las neuronas aferentes primarias y juegan un papel en la modulación de los impulsos nociceptivos. La aplicación periférica de glutamato activa los nociceptores a través de la unión de receptores de glutamato, iGlu) y receptores metabotrópicos acoplados a proteína G

(mGlu) tipo 1 y tipo 5 (mGluR1, mGluR5) sobre axones no mielinizados en la piel y mejorar el dolor. Las neuronas en el DRG marcado para mGluR5 también expresan receptores VR1 característicos de neuronas nociceptivas (Hu *et al.*, 2009).

El factor de crecimiento nervioso (NGF) puede contribuir al dolor inflamatorio a través de mecanismos directos e indirectos. Los mediadores inflamatorios, como las citoquinas, aumentan la producción de NGF en tejidos inflamados. El NGF estimula a los mastocitos a liberar histamina y serotonina e induce hiperalgesia de calor actuando directamente en los terminales periféricos de las fibras aferentes primarias (Inserra y Lewis, 2011).

Todos estas biomoléculas que pueden presentarse en la “sopa inflamatoria”, activan cascadas de señalización mediante la vía de fosforilación de proteínas cinasas A y C, que regula la localización y el tráfico de los canales iónicos en los nervios nociceptores, o bien, la activación o inactivación de estos canales (Schulz *et al.*, 2008); así como la activación del proto-oncogen *c-fos* en las neuronas activadas por un estímulo nocivo (Hunt *et al.*, 1987).

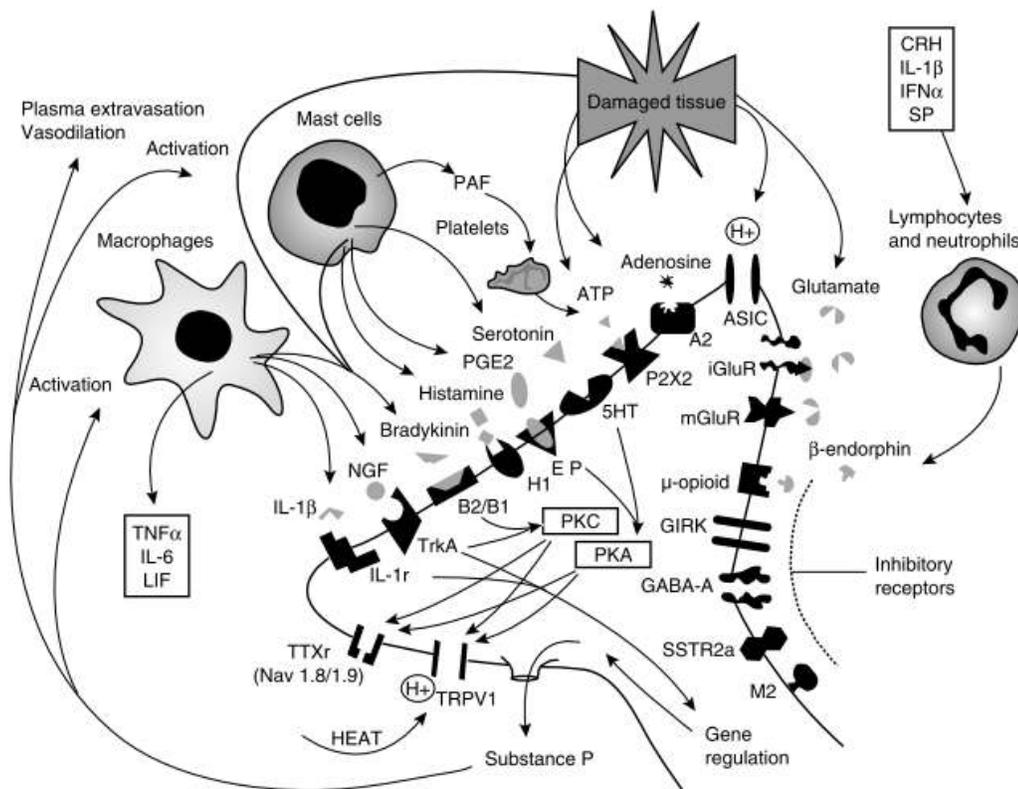


Figura 6.- Transducción. El estímulo o daño se traduce en potencial eléctrico, mediante la sopa inflamatoria. Inmediato al estímulo, se activan diversas cascadas de señalización para percibir el dolor y tener una acción que evite un daño prominente. Tomado de Romera *et al.*, 2000.

Las cascadas de señalización, mencionadas en el párrafo anterior, transduce o convierte las señales externas (físicas, químicas y/o mecánicas) en señales eléctricas, que serán dirigidas o transmitidas como potenciales de acción hacia el cerebro, para poder responder ante los estímulos. Existen tres componentes principales del sistema de **transmisión**. Las células sensoriales periféricas que transmiten impulsos del sitio de transducción hasta su terminal periférica localizada en la médula espinal (Fig. 7). Es en este sitio donde los nervios llevan a cabo una sinapsis con neuronas espinales quienes son el segundo componente en la red de transmisión. Estas células envían proyecciones a diversas estructuras cerebrales y diencefálicas, tercer componente de la transducción; donde se llevará a cabo la recepción del estímulo principal y se dirigen a varios sitios corticales para efectuar una reacción ante el estímulo presente (Elman *et al.*, 2013).

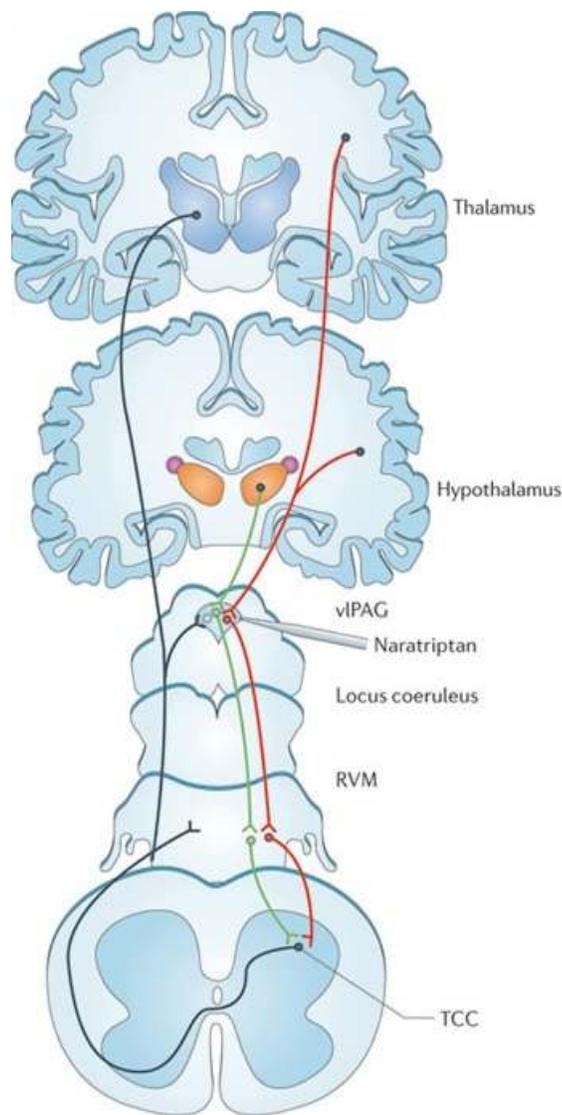


Figura 7.- Transmisión. La transmisión del estímulo mediante la despolarización de la membrana (potencial de acción) del nervio. El Tálamo e hipotálamo es donde se lleva a cabo la integración y codificación de señales del dolor.

La **modulación** es el proceso por el cual la actividad neuronal se puede alterar a lo largo de la vía de transmisión del dolor (Figura 8). El asta dorsal de la médula espinal es un sitio importante donde ocurre la modulación que implica una abundancia de sistemas de neurotransmisores. La activación de los sistemas de modulación del dolor generalmente se resuelve en una disminución o inactivación de la percepción del dolor. Estudios recientes de los circuitos nociceptivos del asta dorsal se han centrado en gran medida en el dolor persistente debido a su alta prevalencia y a la necesidad de mejores opciones de tratamiento (Miller y Pereda, 2017).

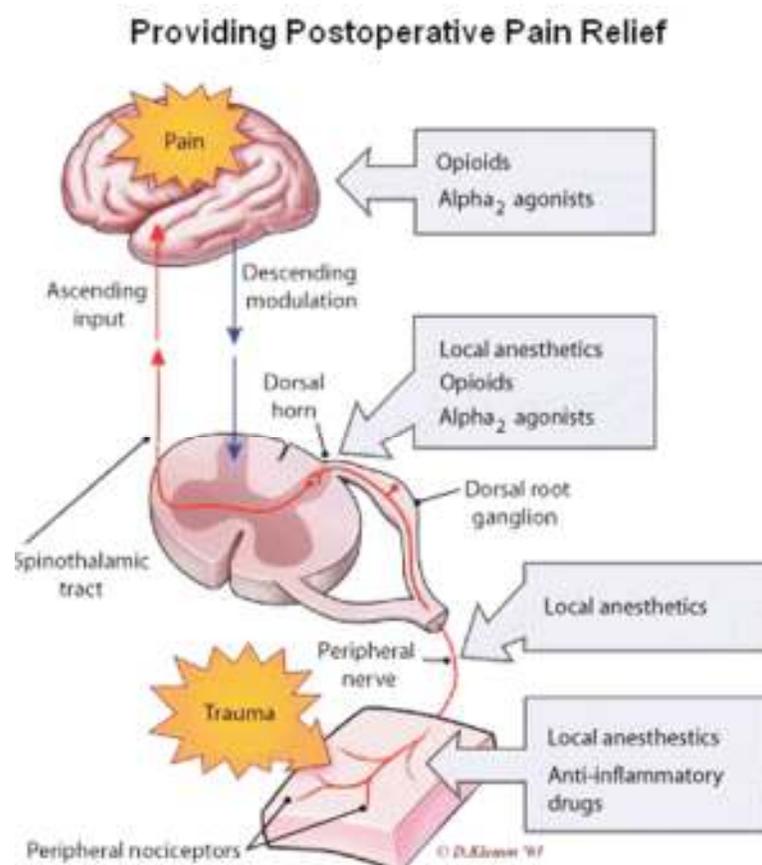


Figura 8.- Modulación. Este procedimiento se lleva a cabo en la médula espinal. Al entender este proceso es posible aplicar diversos métodos para aliviar el dolor, según el tipo y origen del dolor (AAFP, 2017).

Finalmente, la **percepción** es la etapa final del proceso de señalización del dolor por el cual la actividad neuronal en la vía de transmisión somatosensorial da como resultado una sensación subjetiva de dolor. Este proceso es resultado de la activación concertada de cortezas somatosensoriales y límbicas, tanto primarias como secundarias (Fig. 7) (Srinivasa *et al.*, 2005; Nghia, 2013).

1.2.5 Analgesia

Del griego *an-* ('carencia, negación') y *άλγος* (/álgos/, 'dolor') es la ausencia del dolor como resultado de la modulación nociceptiva. En otras palabras, es el fármaco cuya actividad es mitigar, reducir o eliminar el dolor (Ison *et al*, 2016). La organización mundial de la salud (OMS) diseñó una escalera analgésica, como método de selección de fármacos para el tratamiento del dolor (Fig. 9).



Figura 9.- Escalera analgésica. Selección de fármacos analgésicos como tratamientos del dolor (OMS, 2017).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), se utilizan como primer tratamiento en la escalera del dolor, y también actúan como analgésicos y antipiréticos (que disminuyen la fiebre). El mecanismo de acción es la inhibición de la enzima ciclooxygenasa, evitando la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos (Walters y Woessner, 2016). Los opiáceos actúan con diferentes receptores situados en el sistema nervioso central y periférico, cuya función es regular la transmisión nociceptiva (Plein y Rittner, 2017).

Los fármacos adyuvantes potencian los efectos analgésicos de opiáceos o AINEs, o bien contrarrestando su efecto. Entre estos se encuentran los antidepresivos tricíclicos, anticonvulsivos, neurolépticos, ansiolíticos, psicoestimulantes, antieméticos y corticoesteroides (López *et al.*, 2006).

1.2.6 Toxinas como nuevos tratamientos contra el dolor

Paradójicamente, las moléculas encargadas de envenenar a los organismos se pueden utilizar como nuevos tratamientos contra diversas enfermedades humanas y animales. El primer agente antihipertensivo, basado en una toxina del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca* es el Captopril®, inhibe a la enzima convertidora de angiotensina. Esta molécula evita la conversión de la angiotensina I en angiotensina II y obstaculiza el efecto vasoconstrictor de esta última molécula, regulando así la presión arterial (Rebello-Horta *et al.*, 2016). En la actualidad se comercializan diversos fármacos basados en toxinas y el estudio de los venenos brinda una nueva oportunidad para desarrollar nuevos tratamientos a numerosas enfermedades (Trapani *et al.*, 2016).

En el 2004 se aprobó Prial® (Ziconotide) que es la forma sintética de una toxina de origen peptídico, la ω -conotoxina MVIIA purificada de *Conus magus* (Pope *et al.*, 2017). El Ziconotide es un péptido hidrofílico soluble en agua, que actúa en los canales de calcio tipo N (Cav2.2) bloqueándolos selectivamente. Esta acción inhibe la liberación de neurotransmisores como el glutamato, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y la sustancia P, tanto en médula espinal como en cerebro, resultando en el alivio del dolor (Roca-Lapirot *et al.*, 2017). En la tabla 2 se resumen otras toxinas de alacranes, ranas, avispas, hormigas, anémonas, arañas y caracoles marinos reportados como posibles analgésicos.

Los fármacos peptídicos ofrecen oportunidades de diseño racional y especificidad ante el blanco molecular (Sula *et al.*, 2016). Aunado a esto tiene una producción relativamente barata (\$100/g) así como una tasa de éxito superior a la media en los ensayos clínicos (tasa de éxito del 26% para fármacos peptídicos frente al 10% para todas las clases de fármacos) (Otvos, 2014; Otvos y Wade, 2014), características que se deben tomar en cuenta para el desarrollo de fármacos en el presente siglo.

El presente trabajo ofrece un aporte a la búsqueda de una toxina proveniente de anémona que module la respuesta nociceptiva; con efecto analgésico frente al dolor y que muestra efectos secundarios mínimos o reducidos. A continuación se describen generalidades de la biología de las anémonas.

Tabla 2.- Toxinas peptídicas con actividad analgésica (Tomado y modificado de Rajendra *et al.*, 2004).

| Fuente | Péptido | Actividad |
|-----------------------------|----------------------------|--|
| Veneno de alacranes | Bmk ITAP | Insecticida y analgésico. |
| | Bmk dITAP3 | Depresor neurotóxico, antihiperalgnesia periférica, antinociceptivo. |
| | Bmk AS | Antihiperalgnesia periférica, antinociceptivo. |
| | Bmk AS1 | Antinociceptivo potente. |
| | Bmk AGAP | Péptido analgésico antitumoral |
| | Bmk Ang P1 | Analgésico |
| Secreción de piel de rana | Epibatidina | Antinociceptivo colinérgico |
| | Dermorfina | Agonista de receptores μ opioides |
| Veneno de arañas | ω -Agatoxina IVA | Antinociceptor bloqueador de canales de calcio tipo P |
| | Jorotoxina | Inhibidor de receptores no-NMDA |
| | Psalmotoxina 1 | Bloqueadores de canales ASIC |
| Veneno de caracoles marinos | ω -Conotoxina MVIIA | Inhibidor selectivo de canales de calcio tipo N |
| | ω -Conotoxina GVIA | |
| | Conantokina G | Inhibidor selectivo de N2RB |
| | Conantokina T | Inhibidor de N2RA y N2RB |
| | Mr10A | Antinociceptivo potente |
| | Contulankina G | Pertenece a la familia de las neurotensinas |

1.2.7 Phylum Cnidaria

Del griego κνίδη, *knide*-ortiga que denota a urticante; y del latín *arium*-que pertenece a; esta denominación se designa por poseer células urticantes denominadas cnidocitos. Los Cnidarios conforman un filo diverso con un estimado de 10, 000 especies acuáticas, predominantemente marinas (Collins *et al.*, 2006). La clasificación de estos organismos se determinó con base en la secuenciación del genoma

mitocondrial. El resultado es un clado ancestral con DNA mitocondrial circular: la clase Anthozoa; a diferencia del clado Medusozoa que presenta DNA mitocondrial lineal (Fig. 10) (Kayal *et al.*, 2013).

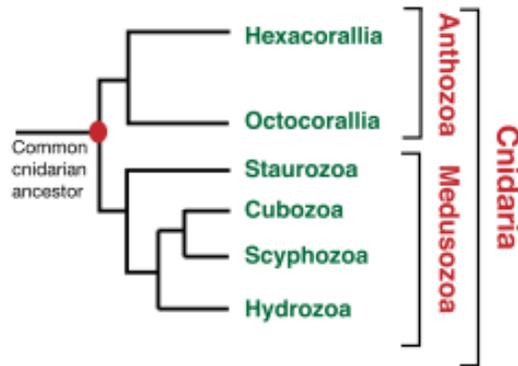


Figura 10. Clasificación del filo Cnidaria. Árbol filogenético del *Phylum* Cnidaria, donde se muestra el ancestro común del que derivan los clados recientes: Anthozoa (anémonas y corales) y Medusozoa (medusas). Tomado de Kayal *et al.*, 2013.

El bauplan de estos animales se caracteriza por tener una simetría radial con un eje heteropolar, o dicho en otras palabras, que es distinto en sus dos extremos. Por una parte destaca el lado oral y en su contraparte el lado aboral. Son animales diblásticos, ya que durante su organogénesis se diferencian dos capas celulares: el ectodermo como la capa externa y el endodermo como formadora de órganos (Kohel, 1977), ambos tejidos separados por la matriz extracelular llamada mesoglea o mesohilo (Fig. 11) (Ruppert *et al.*, 2008). Son animales depredadores, empero, ciertas especies son necrófagas y una minoría está en simbiosis obligada con *Zoochlorelas* o algas verdes y *Zooxantelas*, un grupo de microorganismos amarillos (patrón de coloración marrón-dorado) de los cuales, destacan dinoflagelados, diatomeas y protistas (Bates *et al.*, 2010). Dicha simbiosis resulta en un sistema cromatóforo (Schlichter, Webber y Fricke, 1985) cuya función en la anémona es responder ante cambios de luz (Pearse, 1974) (Fig. 11).

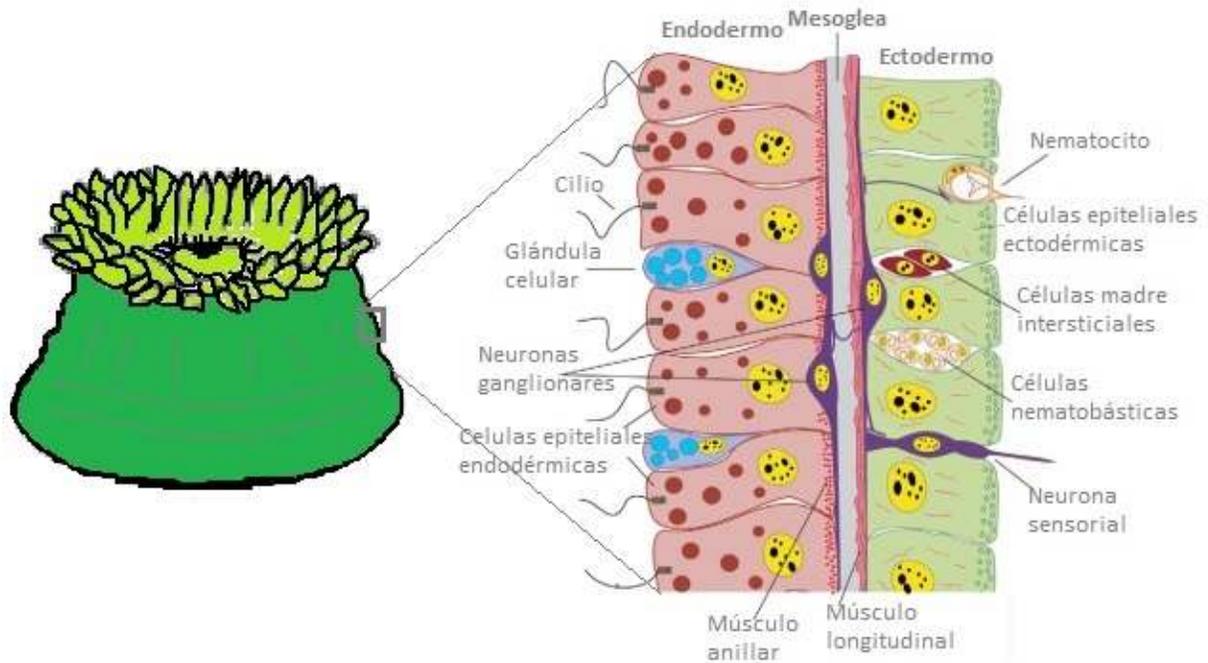


Figura 11. Bauplan de Cnidarios. Representación de las dos capas dérmicas y la mesoglea de una anémona del género *Anthopleura*. Imagen del autor.

El cnidocito o nematocito es una célula única, altamente especializada tanto para la depredación, como la locomoción o defensa. Está presente en todos los miembros del filo Cnidaria; y se encuentra localizada en los tentáculos de estos organismos. El nematocisto es el producto de un proceso complejo de secreción, contenido dentro de una vesícula post-Golgi en el citoplasma de los cnidocitos (Beckmann y Ozbek, 2012) (Fig. 12). En un organismo juvenil del género *Hydra* con 100,000 células totales, de las cuales 25,000 son cnidocitos y 40,000 se encuentran en proceso de diferenciación. Por esta razón, los cnidarios invierten una gran parte de su energía en el mantenimiento de su repertorio de cnidocitos, los cuales se renuevan constantemente (David, 2012).

Los cnidocitos derivan de las células madre intersticiales que sufren hasta cinco pasos de mitosis, resultando en nidos de desarrollo de cnidocitos llamados nematoblastos (David y Challoner, 1974). El desarrollo de los cnidocitos tiene lugar en el cuerpo columnar de la anémona. Cuando los cnidocitos maduran, migran hacia los tentáculos donde se incorporan entre las células ectodérmicas (Bode y David, 1978). Después de la maduración, el biopolímero poli- γ -glutamato y cationes asociados se incorporan en la cápsula; esta encapsulación se realiza bajo una presión osmótica extrema de 150 bares (1.5×10^7 Pa), lo que hace posible su descarga (Tardent, 1995; Weber, 1990).

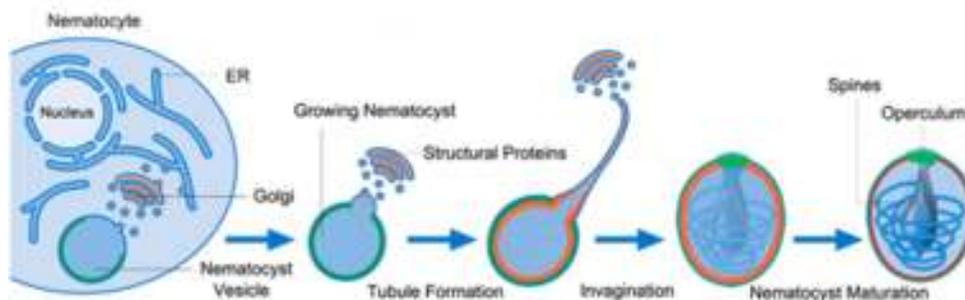


Figura 12.- Morfogénesis del cnidocito. Tomado de Beckmann y Özbek, 2012.

La cápsula del cnidocito es una barrera semipermeable, entre el citoplasma y el fluido del cnidocito. El fluido del cnidocito es rico en calcio (500-600 mM/kg peso seco de anémona) en contraste con el citoplasma celular que es rico en potasio y pobre en calcio (Lubbock *et al.*, 1981). La descarga coordinada de los cnidocitos es el resultado del contacto de las células sensoriales con el depredador o la presa, y es regulada por la luz, mediante el fotosistema mediado por opsina (Plachetzki *et al.*, 2012). Durante la descarga, el calcio se pierde rápidamente del fluido lo que aumenta la presión osmótica, al mismo tiempo el agua marina entra a la cápsula incrementando la presión hidrostática hasta que explota el cnidocito (Lubbock *et al.*, 1981). Este proceso de descarga es uno de los eventos más rápidos conocidos en el reino animal y genera una aceleración de más de 5×10^6 g (Nuchter *et al.*, 2006); además, este proceso va acompañado por la liberación de toxinas en el tejido de un organismo presa (Ozbek *et al.*, 2009).

Dependiendo del blanco molecular que tengan las toxinas de anémonas es como se clasifican dentro de las cuatro grandes familias que actualmente se reportan en la tabla 3.

Tabla 3.- Clasificación actual de las toxinas de anémonas.

| Tipo I | Tipo II | Tipo III | Tipo VI | PLA ₂ | Citolisinas |
|--|--|--|--|---|---|
| 46 – 51 aa 1 – 3 enlaces disulfuro Na _v ²⁺ | | 27 – 32 aa 3 S-S K _v ²⁺ | 79 aa 1 -4 S-S Na _v ²⁺ | | |
| ATX - I AETX - I Ae - I Antopleurina C APE - I AFT - I Hk - 16 Bc - III Cangitoxina Bg - II | Cp - I Ca - I Rm - I Rc - I Hhx Rp - II Rp - III Sh - I Gigantoxina II | BDS - II APET AXPI Bgk HC1 Metridina Hmk SHP - I Bcg - III Bc - V | Calitoxina - I Calitoxina - II | AcPLA2 UcPLA2 Proteína catiónica A2 | Equinatoxinas Esticolisinas Urticianotoxina Tenebrosina Bandaporina |

La función biológica de estas moléculas en la presa, es básicamente, la modulación de los canales de sodio neuronales, que retrasa el potencial de acción en la membrana, causa parálisis contráctil y la muerte en última instancia (Norton *et al.*, 1981; Woodward *et al.*, 1990; Robichaud *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 2014). Hasta el momento no hay trabajos que evalúen la actividad nociceptiva del veneno de la anémona.

1.2.8 Clase Anthozoa

Del griego *ανθος anthos*-flor y *ζωον zoon*-animal, que contiene a las subclases Octocoralia y Hexacoralia, con un total de 6, 000 especies descritas. De estructura tubular, un eje boral – aboral, unida al sustrato. La zona boral está rodeada de tentáculos (Frazão *et al.*, 2012). El ciclo de vida esta clase se resume en su fase adulta o pólipo que produce gametos y que consta en un tubo cerrado por el pedúnculo por el lado aboral y se encuentra sujeto al sustrato, mientras que el lado oral posee una boca rodeada de tentáculos. Los gametos se liberan hacia el medio marino y, por ende, ocurre una fecundación externa. El huevo fecundado se desarrolla en una tercera etapa, llamada plánula o estadio larvario. La plánula madura y se metamorfiza en un pólipo joven, que con el tiempo, se vuelve adulto cerrando así el ciclo de vida (Fig. 13) (Frazao *et al.*, 2012).

Otra forma de reproducción que presentan estos organismos es la asexual o partenogénica (Lively and Johnson, 1994), esto es debido a la alta tasa de regeneración epimórfica (restauración de órganos perdidos) o por embriogénesis somática, donde los órganos vuelven a desarrollarse (Tokin, 1959; Leclère y Röttinger, 2017). Esta regeneración ocurre por fisión transversal, fisión longitudinal o por laceración pedal (Fig. 12) (Bocharova y Kozevich, 2011).

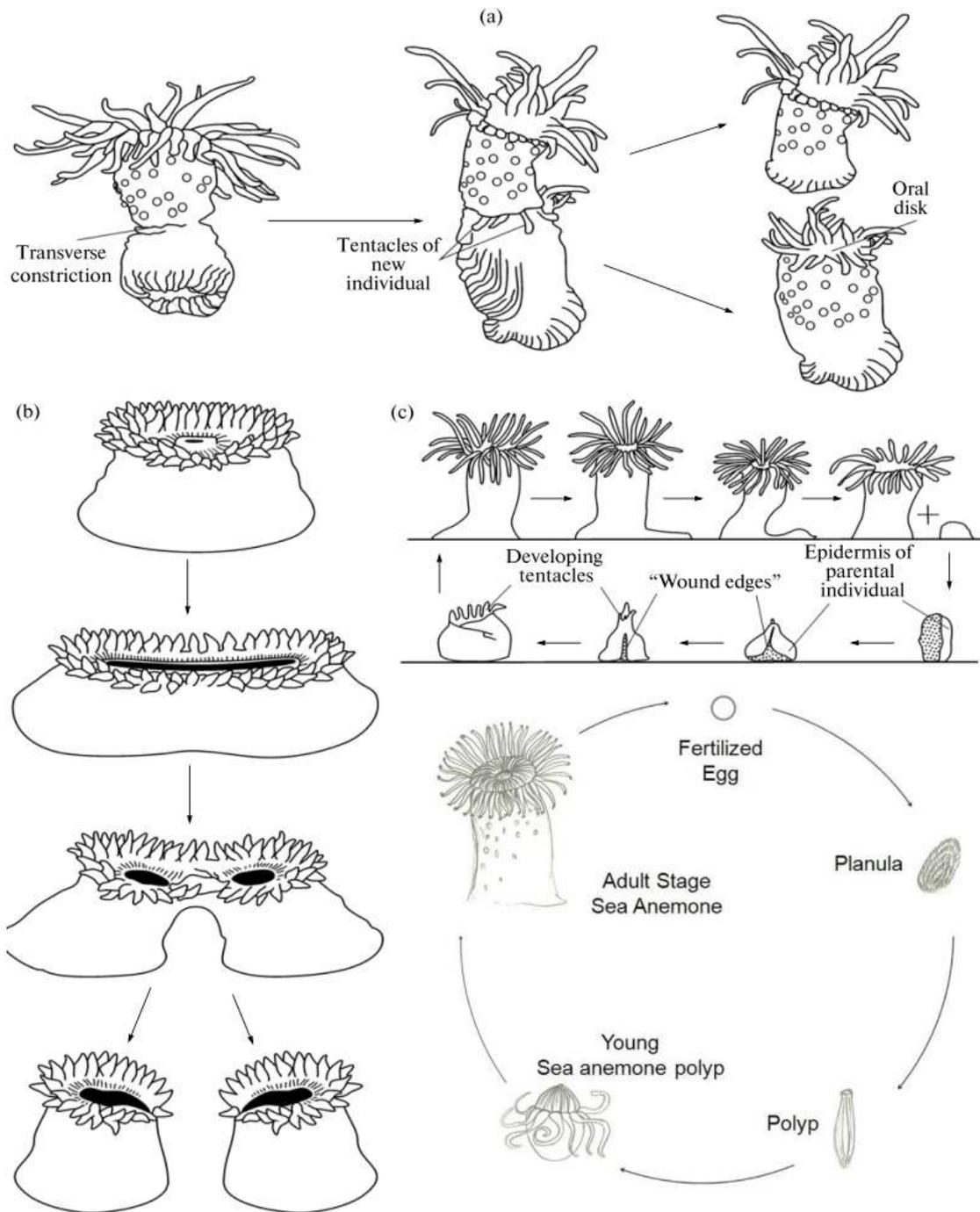


Figura 13.- Estrategias de supervivencia del género *Anthopleura*. Tipos de reproducción sexual y asexual en anémonas de la clase Anthozoa. A- C) Formas de reproducción asexual. D). Ciclo de vida que implica la reproducción sexual. Imagen del autor.

1.2.9 La anémona gigante verde

La anémona gigante verde o *Anthopleura xanthogrammica* (Brand, 1835) se encuentra distribuida principalmente a lo largo de la costa oeste de América del Norte y Central; desde Alaska hacia el sur hasta

Panamá. Sin embargo, también se han encontrado en la Bahía de Hudson, en Canadá, así como en la costa oriental de Rusia (Rodríguez *et al.*, 2014). Se encuentran en las marismas y zonas intermareales a lo largo de las costas rocosas, a profundidades de hasta 15 m. Por lo general se ven unidas al sustrato (incluyendo las estructuras hechas por el hombre, tales como pilotes de hormigón) en lugares con aguas frías y con alta actividad de olas (Sebens, 1984). En cautiverio, se sabe que prosperan a temperaturas del agua 15 – 22°C (Daly y den Hartog, 2004).

Presentan cuerpos columnares o en forma de tubo, cubierto con una tapa redonda que lleva una corona de numerosos tentáculos. El diámetro de la columna puede ser de hasta 17 cm (corona tentacular hasta 25 cm) y puede llegar a los 30 cm de longitud. La corona tentacular tiene al menos 6 anillos de tentáculos con una boca en el centro (Fig. 14) (Daly y den Hartog, 2004). Cada tentáculo contiene a los nematocistos. Existen otros tentáculos especializados alrededor de la corona llamados acrorhagi, quienes también poseen cnidocitos y responden principalmente a estímulos de agresión (Bigger, 1978; Macrander *et al.*, 2015).



Figura 14.- *Anthopleura xanthogrammica*. A) En condiciones normales; B) Con marea baja. Fotografías tomadas en la zona de muestreo en Ensenada, Baja California, México.

Las anémonas tienen un disco basal que se utiliza para fijarse al sustrato, que por lo general suele ser una roca o un coral. Una vez unido al sustrato, por lo general son sésiles; sin embargo, una anémona puede usar su pie para que se traslade a una nueva ubicación, si las condiciones no son aptas para la supervivencia (Rodríguez *et al.*, 2014). La columna es de color verde oscuro a marrón, con tubérculos

irregulares en la superficie. El disco y los tentáculos son de color verdeazul, dependiendo de la cantidad de luz solar que recibe la anémona; esto es debido a que la anémona tiene algas simbiotas que viven dentro de sus tejidos. Cuando la luz solar es abundante, las algas producen un color verde brillante (Schlichter *et al.*, 1985).

El desove de esta especie parece ser desencadenado por temperaturas cálidas, liberando los gametos por la noche. La reproducción se produce a través de la fertilización externa. Las hembras liberan miles de huevos a la vez. Los machos liberan el esperma, que se dispersa rápidamente. Una anémona comienza su vida cuando un óvulo se fertiliza externamente en el agua. Los óvulos son esféricos, 175- 225 micras de diámetro, de color púrpura, y cubierto de espinas, mientras que los espermatozoides son de 2- 3 micras de largo y 2 micras de diámetro, con colas de 50 micras de longitud (Siebert Jr, 1974; Sebens, 1981).

La división de la célula comienza tres horas después de la fertilización, el desarrollo continúa a una etapa plánula en el que las larvas flotan libremente. Tienen la capacidad para dispersarse por largas distancias y habitan nuevas ubicaciones lejos de sus organismos progenitores (Acuña *et al.*, 2012). Durante la etapa de plánulas comen zooplancton, fitoplancton, e incluso otras larvas. Cada plánula segrega un hilo de moco; las partículas de alimentos se adhieren a este hilo y son atraídos por la boca para su ingesta. Una vez que las larvas encuentran lugares adecuados, se fijan al sustrato y desarrollan su disco basal, completando la metamorfosis hasta convertirse en adultos (Sebens, 1981; Bates *et al.*, 2010). Su longevidad en la naturaleza se ha estimado en 150 años (Siebert, 1974). Hasta este momento no figuran como especies amenazadas o en peligro de extinción en cualquier agencia de conservación (Klinkenberg, 2017; CONANP-BC, 2017).

Estas anémonas son carnívoras. Se alimentan principalmente de erizos de mar, mejillones, cangrejos y pequeños peces. Preferentemente, se asientan en bancos de mejillones para aumentar la disponibilidad de alimentos (Russo, 1984). Una vez que la presa está a su alcance, una anémona extiende sus tentáculos y paraliza a su presa usando los nematocistos en sus tentáculos. A continuación, utiliza sus tentáculos para llevar comida a la boca (Leclère y Röttinger, 2017). Poseen un intestino incompleto, una vez que se traga la comida que entra en la cavidad gastrovascular, se digiere y a continuación los productos de desecho viajan de regreso. Debido a que esta es una anémona de agua fría, tiene un metabolismo relativamente lento, por lo que requiere alimentarse sólo una o dos veces al mes (Daly, 2004). Estas anémonas tienen algas fotosintéticas y dinoflagelados que viven en sus intestinos, de donde obtienen una nutrición adicional (Bates *et al.*, 2010); así como responder al estrés por luz (Dimond *et al.*, 2012).

Los depredadores comunes de esta anémona son arañas de mar que se alimentan de la columna central de una anémona; los caracoles de mar que se alimentan tanto de la columna como de los tentáculos. Otros depredadores naturales son cangrejos, estrellas de mar y nudibranchios (Frazao *et al.*, 2012).

La importancia económica positiva es el veneno de los nematocistos ya que ha demostrado ser muy útil en el desarrollo de fármacos como estimulantes cardíacos; estas toxinas fortalecen las contracciones del corazón, sin alterar su ritmo (Norton, 2006). No se han descrito efectos adversos en los seres humanos y otros vertebrados (Robitaille *et al.*, 1993).

Existen reportes de toxinas purificadas de *Anthopleura xanthogrammica*. El primer reporte, de Norton y colaboradores en 1976, describe el aislamiento de dos toxinas de origen peptídico cardiotónicas llamadas Antopleurina A y Antopleurina B. En la década siguiente, se aislaron y caracterizaron AX1 y AX2, también moléculas peptídicas, cuyo blanco molecular se asigna a los canales de sodio presentes en sinaptosomas (terminales nerviosas de neuronas) en cerebro de rata, así como en células de neuroblastoma; además se caracterizó su LD₅₀ tanto en ratón como en cangrejo (Schweitz *et al.*, 1981). En 1997 se aislaron AXPI-I y AXPI-II, dos inhibidores de proteasas (Minagawa *et al.*, 1997). A inicios del siglo XXI, se aisló Antopleurina-Q con efectos en canales de sodio, evaluado en axones gigantes de cangrejo de río (Li-Ying *et al.*, 2001). El último trabajo reportado sobre esta especie versa sobre el estudio de los tentáculos *acrorhagi*, de donde se aisló AXAPI-I nuevo miembro de la familia de inhibidores de proteasas tipo Kunitz (Minagawa *et al.*, 2008). Aunque las toxinas antes mencionadas actúan en canales de calcio, no se han probado en modelos de dolor.

1.3 Justificación

El dolor crónico es un problema a nivel mundial en salud pública. A pesar de los esfuerzos en investigación y desarrollo de fármacos contra el dolor crónico, no se ha podido resolver la deficiente eficacia, los efectos secundarios, ni las contraindicaciones medicamentosas que presentan.

Las toxinas de animales venenosos han dado buenos resultados en el diseño y desarrollo de fármacos. Tal es el éxito, que actualmente, se venden más de una decena de fármacos basados en toxinas de animales como tratamiento de diversas enfermedades.

Por lo tanto, el coadyuvar en el estudio, aislamiento y caracterización de toxinas con actividad analgésica es de suma importancia, ya que las moléculas aisladas hasta el momento son muy específicas, no causan adicción y los efectos secundarios son mínimos o reducidos.

1.4 Hipótesis

Existe al menos un componente de naturaleza peptídica en el veneno de *Anthopleura xanthogrammica* que modula la respuesta nociceptiva.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

- ✓ Contribuir en la caracterización bioquímica del veneno de *Anthopleura xanthogrammica*, identificando aquellas toxinas que modulen la respuesta nociceptiva.

1.5.2. Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar cromatográficamente las toxinas de *Anthopleura xanthogrammica*.
- ✓ Determinar el efecto analgésico de las toxinas en un modelo murino.
- ✓ Caracterizar bioquímicamente la toxina que resulte con un efecto analgésico significativo.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Obtención y purificación de la muestra

2.1.1 Colecta y extracción del veneno total

Se realizó una colecta de ejemplares de anémonas en la zona intermareal del kilómetro 100 de la Carretera Tijuana-Ensenada zona El Sauzal, en Baja California, comúnmente conocida como playa 3 M's (31°53'51.3"N, 116°42'47.5"W). Los organismos se transportaron al laboratorio vivos, sumergidos en agua de mar. En el laboratorio se enjuagaron con agua corriente para eliminar restos de conchas y sedimento.

Se registró el peso de los organismos que se colectaron (peso húmedo) en una balanza Metler E2000. Posteriormente, se colocaron en un matraz con un litro de etanol al 30% por cada kilogramo obtenido durante 24 horas a 4 °C. Transcurrido el tiempo, se recuperó el sobrenadante, se filtró y centrifugó a 4,500 xg a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó en tubos de 50 ml previamente pesados, obteniendo alícuotas para congelar a -80 °C. Estas alícuotas fueron liofilizadas y almacenadas a 4 °C. Después, las muestras se dializaron en una membrana *SnakeSkin Dialysis Tubing*® de 3500 MWCO (22mm x 35 feet dry diameter) (Thermo Scientific®) con tres litros de agua destilada para eliminar el exceso de sal; se realizaron tres cambios de agua cada tres horas. Como último paso se recuperó el contenido de la membrana, se liofilizó y almacenó a 4 °C hasta su uso posterior.

2.1.2 Separación de toxinas mediante cromatografía de exclusión molecular

La purificación de veneno total dializado se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión molecular. Se realizó el proceso de separación del veneno a 4 °C en cuarto frío con temperatura controlada. Se empleó una columna de exclusión molecular (50 x 1 cm de tamaño) empacada con Bio-Gel P-100 (45–90 μ m wet bead size; 5,000–100,000 MW) (Bio-Rad®) hidratada con acetato de amonio 20 mM a pH 4.7. Una vez hidratada, se vertió la resina en una columna detenida sobre un soporte universal con la llave de la columna abierta para dejar pasar la solución a un flujo de 3 ml/h a presión atmosférica, se dejó compactar la resina y se mantuvo el flujo, hasta dejar una distancia de 1% del total del tamaño de la columna entre la cama de resina y la cabeza de la columna; para este trabajo la distancia fue de 5 cm.

Posteriormente se equilibró el pH de la columna, haciendo pasar el flujo de acetato de amonio 20 mM a pH 4.7 el tiempo necesario para que el pH de entrada a la columna y el pH de salida de la columna fueran similares, en un tiempo estimado de 36 horas. Se pesaron 250 mg de veneno total y se re-suspendieron en 1.5 ml de acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Se centrifugó por cinco minutos a 4500 rpm a 4 °C; se recuperó el sobrenadante mismo que se aplicó directamente en la columna con ayuda de una pipeta de plástico. Se activó el flujo de acetato de amonio para que la muestra comenzara a fluir por la columna y comenzar la colecta.

Las fracciones obtenidas se colectaron en tubos de 15 ml cada 30 minutos a flujo de 3 ml/h. Al terminar la separación, a cada fracción obtenida se determinó la absorbancia A280 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop Lite®) para obtener la concentración total. Al término de la cuantificación, las muestras se congelaron a -80 °C para su liofilización posterior. Por último, las fracciones fueron almacenadas a 4 °C para ser sometidas a un ensayo *in vivo* para determinar la fracción de interés con actividad analgésica.

El procedimiento para nombrar las fracciones obtenidas fué el siguiente. Primero se da el ejemplo y con base en este se describe cada componente:

Ax3.6.14.1

Donde:

- Ax por la abreviación del nombre científico de la especie *Anthopleura xanthogrammica*
- El 3 corresponde a la fracción obtenida por exclusión molecular. Esta numeración es sucesiva y cada procedimiento de purificación se verá reflejado por un punto.
- El 6 es la fracción obtenida por la purificación de cromatografía líquida de la fracción tres obtenida en el primer paso de purificación.
- El 14 es la subfracción obtenida de la purificación de la fracción Ax3.6 mediante cromatografía líquida.
- El 1 de la izquierda es el pico obtenido por el proceso de cromatografía líquida de Ax3.6.14.

2.1.3 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Las fracciones que se obtuvieron por cromatografía de exclusión molecular y que presentaron actividad analgésica se sometieron a otra separación cromatográfica, utilizando un cromatógrafo LC System 1220 de Agilent Technologies. Para esta separación se empleó una columna Zorbax C18, la cual se equilibró con solución A (99.88% H₂O + 0.12% ácido trifluoroacético (TFA) (ver anexo 1) durante 30 min. Se utilizó un método de separación con gradiente de elución de 0 a 60% de solución B (99.9% acetonitrilo (ACN) + 0.1% TFA) (ver anexo 1) en 60 minutos. Se re-suspendió la mezcla liofilizada y previamente pesada (aproximadamente 5 mg), en un volumen de 5 ml de solución A, de modo que en cada aplicación se inyectaron 200 µg/200 µL de la solución.

El material purificado se colectó en fracciones de 5 minutos en tubos de 15 ml estériles. Al término de cada separación se lavó la columna con solución B al 100% por 15 minutos. Las fracciones de cinco minutos obtenidas de cada separación se congelaron a -80 °C para su liofilización posterior. Las corridas obtenidas se concentraron obteniendo un pool de la misma fracción en diferentes corridas. Cada pool se liofilizó y almacenó a 4°C hasta su nueva evaluación *in vivo*, siguiendo el protocolo descrito en el punto 2.2.1.

2.1.4 RP-HPLC con búffer de fosfatos como solución A

Se sustituyó el agua adicionada con 0.12% de ácido trifluoroacético (TFA) por un buffer de fosfatos de pH básico (ver anexo 1). Posterior a la preparación del buffer se utilizó un filtro para jeringa (20 g) CORNING® y se pasó el buffer, con el fin de eliminar cualquier partícula presente en el líquido. Se utilizó una columna Zorbax Bio-HPLC SB300 C18 óptima para pH básico. Este trabajo de purificación se realizó en el laboratorio de FICOTOX en CICESE, debido a que el laboratorio cuenta con un cromatógrafo con arreglo de diodos, útil en la identificación del rango de UV donde se detecta la mejor resolución en la separación de los componentes analizados.

2.1.5 RP-HPLC con metanol como solvente orgánico

Se sustituyó el solvente orgánico Acetonitrilo (ACN) por metanol. Para realizar este procedimiento se utilizó una columna Varian C18 en el equipo Agilent 1220 System®. Se realizó un método isocrático a 22.5 % de solución B para separar los componentes de Ax3.6.14 (Tabla 3).

2.1.6 Purificación de la fracción Ax3.6.14.1 reducida y alquilada mediante RP-HPLC

La fracción Ax3.6.14.1 se redujo y alquiló de la siguiente manera: a 17 µg de muestra se re-suspendió en 17 µL de bicarbonato de amonio 250 mM, 6 µL de dithiothreitol (DTT) 100 mM y se incubó la muestra por una hora a 37 °C. Transcurrido el tiempo, la muestra se dejó a temperatura ambiente. Se le agregó 12 µL de iodoacetamida (IAA) 100 mM y se dejó incubar por una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Al finiquitar el procedimiento, la muestra se congeló y liofilizó.

Posteriormente se procedió a la purificación mediante RP-HPLC con un método de gradiente suave de 0-40% B en 60 minutos, a un flujo de 0.5 ml/min. Las fracciones que se obtuvieron se congelaron y liofilizaron. Finalmente estas muestras se analizaron por espectrometría de masas.

2.2 Ensayos biológicos

Se utilizaron ratones de cepa CD1 que se obtuvieron de *Harlan Laboratories*®. Se monitoreó el peso para no rebasar los 20 ± 2 gramos. Los ratones se colocaron en jaulas con alimento y agua *ad libitum*, además de cama de limadura de madera, con un número no mayor a cinco individuos por caja. Las cajas se almacenaron en un dispensador Opti-Mice®, todo en un cuarto a temperatura controlada a 23 °C y un periodo de luz-oscuridad de 12 horas.

2.2.1 Prueba de la superficie caliente (*Hot plate test*)

Los ratones se aclimataron en un cuarto de pruebas por 30 minutos. Se empleó un dispositivo de superficie caliente *Hot Plate* (Columbus Instruments) el cual se calentó a 55 °C. Se prepararon las dosis de las fracciones ya liofilizadas, obtenidas por exclusión molecular, así como Nalbufina® 4 µg/g de ratón como control positivo y 200 µL PBS 1X (Para el método de preparación ver Anexo 1) como control negativo. Para las fracciones a evaluar se utilizaron las siguientes tres dosis (0.1 µg/g ratón, 0.5 µg/g ratón y 1.5 µg/g ratón).

Al término del tiempo de aclimatación, se inyectaron 200 µL totales por vía intraperitoneal (IP) a cada ratón, según el tratamiento o control, dejando un lapso de un minuto entre cada individuo y marcando la cola de los mismos para tener un registro del experimento.

Se analizó la latencia sobre la superficie caliente, transcurridos 30 y 45 min post-inyección de cada ratón. Al finalizar el experimento, se analizó con la metodología estadística respectiva. Los estímulos visibles de dolor en el ratón que se evaluaron son:

- 1) lame una de sus patas,
- 2) sacude sus extremidades posteriores,
- 3) salta sobre la superficie caliente,
- 4) hasta que el tiempo límite fuera alcanzado (el tiempo de corte fué de 30 segundos, evitando así el riesgo de daño tisular en las extremidades) (Bannon, 1998).

2.3 Análisis estadístico

Para los resultados obtenidos, se calcularon los siguientes parámetros estadísticos: media, desviación estándar, error estándar, índice de confianza. Posteriormente, se realizó una ANOVA de una vía y posteriormente una prueba de menor diferencia significativa de Fisher (Fisher's LSD test) para

comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$ $n=4$). Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism® (versión 7).

2.4 Caracterización bioquímica de la toxina de interés

2.4.1 Determinación del peso molecular por espectrometría de masas

La concentración final analizada fue de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de agua ultra pura *milli-Q*. La columna se equilibró con una solución acuosa con 0.1 % de ácido fórmico (FA). Posteriormente se corrió el estándar de albúmina de origen humano (HSA), se inyectaron 2 μL [50 pmol/ μL] y se identificaron los péptidos correspondientes al estándar. Finalmente se inyectaron 2 μL de cada muestra en nanoHPLC (Ekspert nano LC 425) acoplado a un espectrómetro de masas (AB SCIEX Triple TOF 5600⁺). Se realizaron otros dos procedimientos, el primer procedimiento fue tratar las muestras con tripsina, mientras que el otro procedimiento fue la reducción y alquilación de los péptidos (RCAM) para poder determinar los enlaces disulfuro presentes en la secuencia de aminoácidos.

2.4.2 Identificación de residuos de cisteínas

Para RCAM se tomó 1 μL de la muestra y se diluyó en 9 μL de bicarbonato de amonio 50 mM. Se le adicionó 0.5 μL de Ditiotreitól (DTT) 100mM. La muestra se incubó a 37 °C durante una hora. Terminado el tiempo de incubación la muestra se acondicionó a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionó 1 μL de IAA 100 mM. Se dejó incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos. Finalmente se acidificó con 2 μL de solución de ácido fórmico (FA) al 10%. Posteriormente se inyectó al espectrómetro de masas.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Purificación del veneno y ensayos *in vivo*

En este capítulo se mezclaron los procedimientos realizados para facilitar la comprensión al lector. La estructura es la siguiente: se realizó un ensayo *in vivo* por cada purificación realizada para determinar que fracción era la correspondiente a un efecto analgésico significativo. Finalmente se caracterizó parcialmente el componente de interés.

3.1.1 Colecta y extracción del veneno total

Se realizaron dos colectas. La primera colecta se realizó el 2 de enero del 2015. Se colectaron 46 organismos con un peso total húmedo de 2.357 kg. Se procedió a la extracción etanólica por 24 horas. Después se filtró la solución y se recuperó el sobrenadante en tubos de 50 ml de capacidad; se obtuvieron 15.5607 gramos de veneno total, el cual se centrifugó y almacenó a -80 °C para su posterior liofilización. Se re-suspendieron cada uno de los tubos en 15 ml de agua destilada y se colocaron en membranas de diálisis para eliminar las sales. Se realizaron tres cambios de agua cada tres horas. Al finalizar, se vertió el contenido de las membranas en sus tubos correspondientes; se congelaron, liofilizaron y se almacenaron a 4°C. Se volvió a comparar los pesos, obteniendo un total de 2.2908 gramos de veneno total dializado (Tabla 4).

Tabla 4.- Registro de diferencia de peso para cada tubo obtenido de la primera colecta.

| Número de tubo | Cantidad obtenida de veneno total (g) | Cantidad obtenida de veneno total dializado (g) |
|----------------|---------------------------------------|---|
| 1 | 2.398 | 0.1216 |
| 2 | 1.7452 | 0.4679 |
| 3 | 2.2547 | 0.1187 |
| 4 | 2.2033 | 0.1439 |
| 5 | 1.4418 | 0.3165 |
| 6 | 2.904 | 0.2170 |
| 7 | 2.6354 | 0.9052 |
| Total | 15.5607 | 2.2908 |

En la segunda colecta realizada el 17 de octubre del 2016, se obtuvieron 58 organismos con un peso total húmedo de 1.494 kg. Se realizó el mismo protocolo y se obtuvieron 11.4182 gramos de veneno total y 1.9438 gramos de veneno total dializado (tabla 5).

Tabla 5.- Registro de diferencia de peso para cada tubo obtenido de la segunda colecta.

| Número de tubo | Cantidad obtenida de veneno total (g) | Cantidad obtenida de veneno total (g) |
|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 1.9901 | 0.2201 |
| 2 | 2.2111 | 0.5140 |
| 3 | 3.0158 | 0.6199 |
| 4 | 4.2003 | 0.5898 |
| Total | 11.4182 | 1.9438 |

3.1.2 Separación de las toxinas mediante cromatografía de exclusión molecular

Se realizaron 15 corridas de exclusión molecular a temperatura de 4 °C. Se inyectaron 250 miligramos de veneno total a cada columna y se recuperaron en tubos de 15 ml cada 30 minutos. Al finalizar la purificación, se leyó la absorbancia de cada tubo a 280 nm, con el propósito de obtener un cromatograma para cada corrida de exclusión molecular realizada. Por otra parte, se realizó el cálculo del porcentaje de recuperación con el fin de llevar un registro de la pérdida del material durante el procedimiento (Tabla 6).

Tabla 6.- Registro de cantidades obtenidas por exclusión molecular. Las unidades registradas son en miligramos (mg).

| Exclusión molecular | Ax1 | Ax2 | Ax3 | Ax4 | Total | [inyectada] | % de rendimiento |
|---------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|-------------|-------------------|
| 1 | 73.505 | 50.35 | 65.3 | 41.28 | 230.435 | 250 | 0.92174 |
| 2 | 46.945 | 46.425 | 15.585 | 100.8 | 209.755 | 250 | 0.83902 |
| 3 | 74.903 | 69.17 | 30.371 | 32.72 | 207.164 | 250 | 0.828656 |
| 4 | 55.78 | 74.34 | 31.3 | 42.258 | 203.678 | 250 | 0.814712 |
| 5 | 102.56 | 47.296 | 29.536 | 29.78 | 209.172 | 250 | 0.836688 |
| 6 | 67.802 | 50.421 | 30.71 | 69.802 | 218.735 | 250 | 0.87494 |
| 7 | 75.1625 | 90.05 | 25.97 | 48.209 | 239.3915 | 250 | 0.957566 |
| 8 | 63.765 | 60.42 | 38.783 | 70.458 | 233.426 | 250 | 0.933704 |
| 9 | 53.125 | 26.248 | 115.685 | 37.11 | 232.168 | 250 | 0.928672 |
| 10 | 155.274 | 3.423 | 75.453 | 5.25 | 239.4 | 250 | 0.9576 |
| 11 | 13.692 | 37.38 | 67.872 | 82.824 | 201.768 | 250 | 0.807072 |
| 12 | 98.67 | 74.954 | 25.157 | 37.499 | 236.28 | 250 | 0.94512 |
| 13 | 115.353 | 57.654 | 55.08 | 3.276 | 231.363 | 250 | 0.925452 |
| 14 | 61.633 | 57.783 | 19.459 | 81.851 | 220.726 | 250 | 0.882904 |
| 15 | 145.248 | 40.404 | 31.284 | 87.264 | 304.2 | 315 | 0.96571429 |
| Total | 1203.4175 | 786.318 | 657.545 | 770.381 | 3417.6615 | 3815 | 0.89584836 |

Al obtener el cromatograma se procedió a identificar y separar en cuatro fracciones, para poder nombrar a cada fracción (Ax1, Ax2, Ax3 y Ax4) como se puede observar en la figura 15 y tener una nomenclatura establecida para este trabajo. El nombre está compuesto de la siguiente manera: Ax por el nombre del organismo *Anthopleura xanthogrammica*, seguida de un número arábigo que corresponde a

la fracción de exclusión molecular, otro número arábigo que denota la sub-fracción de cinco minutos y finalmente otro número arábigo que denota la fracción individual colectada de RP-HPLC (Para mayor detalle revisar el apartado 2.1.2 de este trabajo escrito).

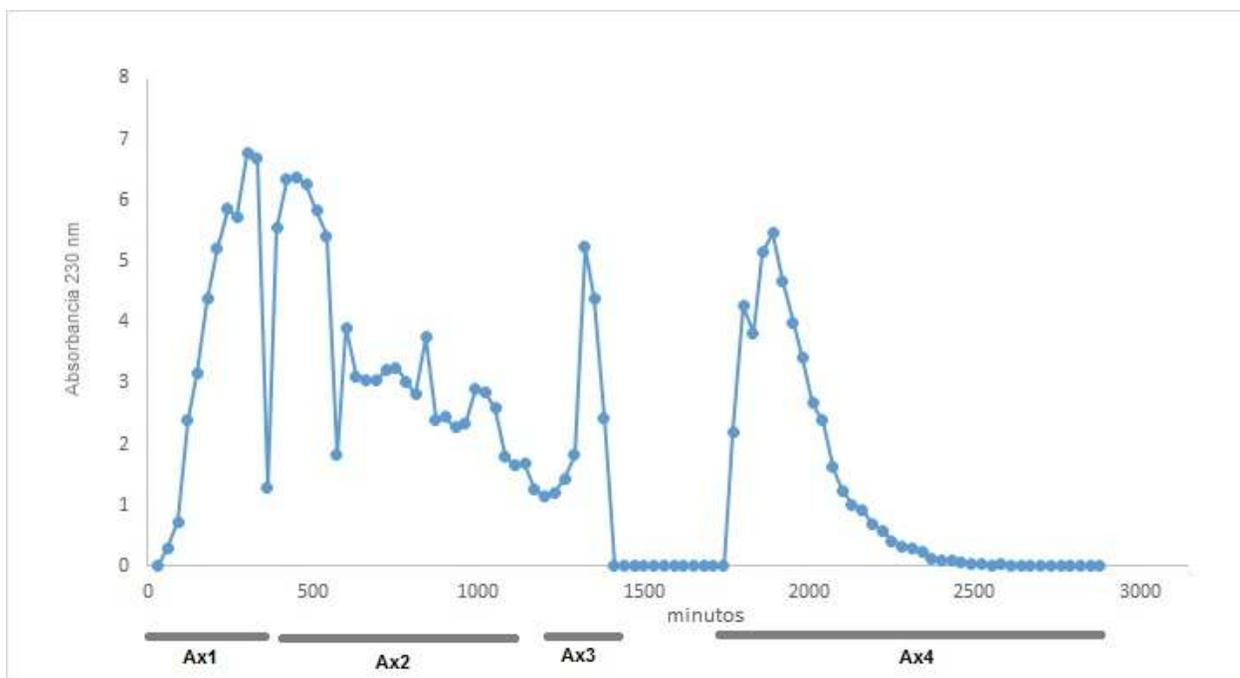


Figura 15.- Cromatograma de exclusión molecular. Se indican las cuatro fracciones obtenidas (Ax1-Ax4).

3.1.3 *Hot plate test* para cada fracción de exclusión molecular

La naturaleza de este ensayo fué de tipo exploratorio para identificar qué fracción de veneno total muestra un efecto analgésico y continuar con la purificación y caracterización de los componentes. Por lo tanto, se utilizó un ratón por fracción.

Las muestras se resuspendieron 1:1 en PBS 1X; se prepararon las dosis correspondientes a 4 $\mu\text{g/g}$ de ratón; todas las dosis se inyectaron en 200 μL de PBS 1X. Las latencias se registraron en una hoja de datos (Anexo 2) y posteriormente se realizó el análisis estadístico correspondiente. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7, así como el gráfico obtenido (Fig. 16). Se anotaron las observaciones en el comportamiento del ratón posterior al tratamiento. Estas observaciones son muy importantes al momento de la interpretación de los resultados.

Tabla 7.- Registro de latencias para las cuatro fracciones obtenidas por exclusión molecular. N.E: no evaluada. n=1.

| Muestra | Concentración inyectada | Latencia en segundos (30 min) | Latencia en segundos (45 min) | Observaciones |
|------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| Ax1 | 165 µg | 8.97 | 12.7 | Actividad normal |
| Ax2 | 165 µg | 10.2 | 18.6 | Actividad normal |
| Ax3 | 198 µg | 21.3 | N.E. | Hiperactividad (20-25 min) Sin coordinación (33-35 min) Convulsiones y parálisis de extremidades (35- 38 min) Muerte (39 min) |
| Ax4 | 165 µg | 10.9 | 16 | Normal |
| Nalbufina® | 160 µg | 10.9 | 16 | Ausencia de heces, pupilas dilatadas, inactivo |
| PBS 1X | 200 µL | 6 | 10 | Normal |

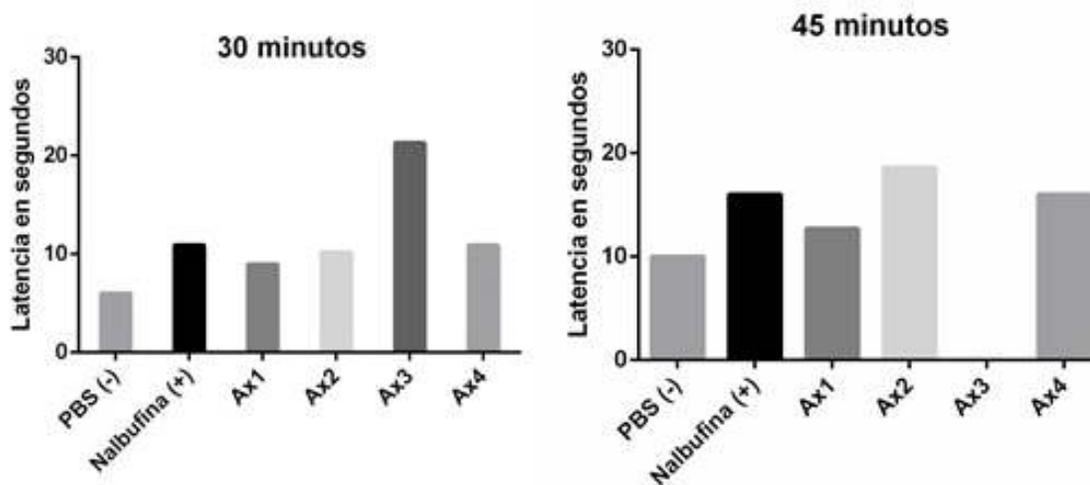


Figura 16.- Evaluación del efecto analgésico de las fracciones de exclusión molecular. n = 1. LA fracción Ax3 mostró una latencia mayor al de Nalbufina® a los 30 minutos, corroborando el resultado de Guevara (2015). Sin embargo los ratones sufrieron diversos efectos sistémicos, que concluyeron en una muerte antes de los 45 min. Por lo que no se pudo evaluar la latencia. Estos datos fueron considerados para la purificación de Ax3 para encontrar la molécula bioactiva.

3.1.4 RP-HPLC de la fracción Ax3

De acuerdo a los resultados anteriores se decidió trabajar con Ax3. Esta fracción se evaluó analíticamente por RP-HPLC. Se colectaron fracciones de 5 minutos en tubos de 15 ml. Se obtuvieron 14 fracciones. A cada fracción se le nombró como Ax3.1 para el tubo 1, Ax3.2 para el tubo 2 y así sucesivamente. En la figura 16 se muestra el cromatograma obtenido, donde se señalan las fracciones que se colectaron cada cinco minutos.

Se realizaron 19 corridas por exclusión molecular. Al final se realizó un *pool* de cada una de las fracciones para concentrar las muestras en un solo tubo, obteniendo un total de 11 sub-fracciones cuyas cantidades se muestran en el anexo 4. En el cromatograma (Fig. 17) se muestran las 14 sub-fracciones obtenidas de las cuales Ax3.12, Ax3.13 y Ax3.14 corresponden al lavado de la columna. Estas sub-fracciones no se consideraron para el análisis posterior.

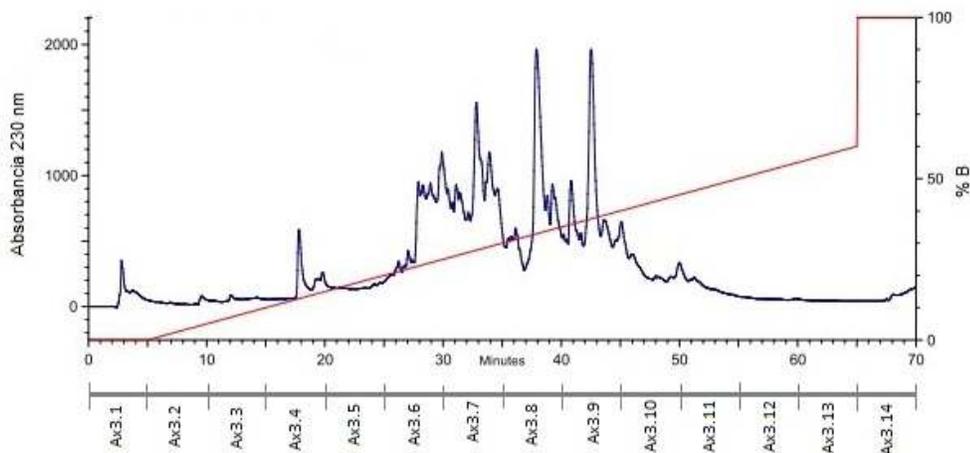


Figura 17. Cromatograma de la fracción Ax3. Se muestran las 14 sub-fracciones obtenidas cada cinco minutos.

3.1.5 Hot plate test para cada sub-fracción de RP-HPLC

Se evaluaron de la fracción Ax3.1 a la fracción Ax3.11 para determinar que sub-fracción promueve analgesia a una dosis de 1.5, 3 y 4 μ g por cada gramo de ratón. Las latencias se registraron a los 30 y 45

minutos posteriores a la inyección de cada fracción. Cada evaluación se cuadruplicó para tener una muestra representativa y cuya significancia considerada fue de $\alpha= 0.5$. Los datos se analizaron con el programa *GraphPad Prism*® (Versión 7) y los resultados gráficos se muestran en las figuras 18 al 20 y los datos numéricos se describen en el anexo 2.

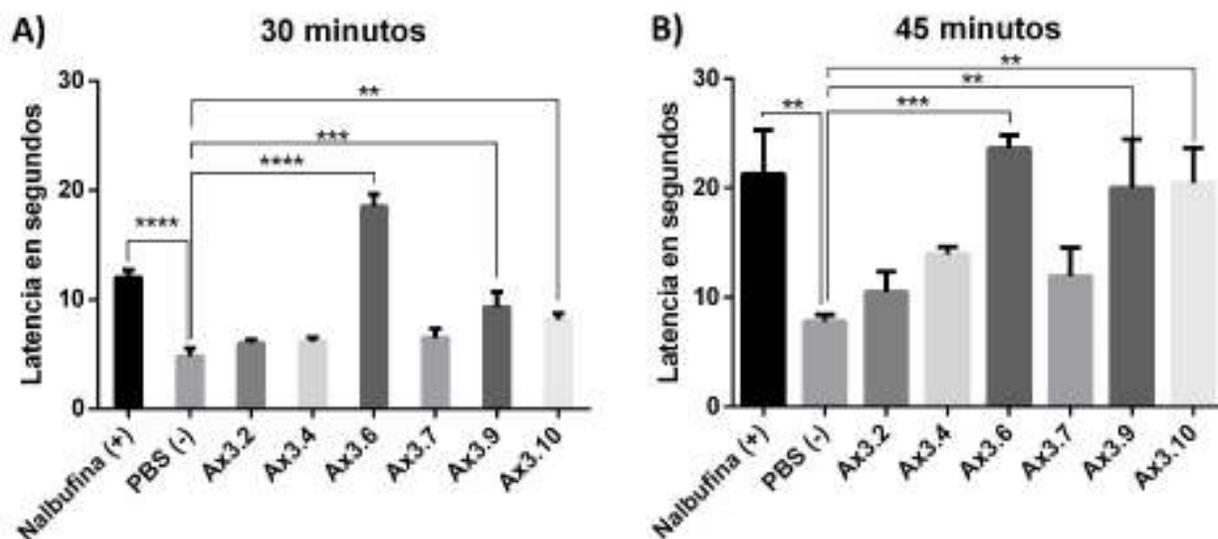


Figura 18.- Evaluación del efecto analgésico de las subfracciones de Ax3. Se evaluó la cantidad de 1.5 μ g A) 30 minutos. Se muestran la media \pm SEM; n= 4. **: P=0.0086; ***: P=0.0008; ****: P= < 0.0001. B) 45 minutos de latencia. Se muestran la media \pm SEM; n= 4. **: P=0.0018; ***: P=0.0004.

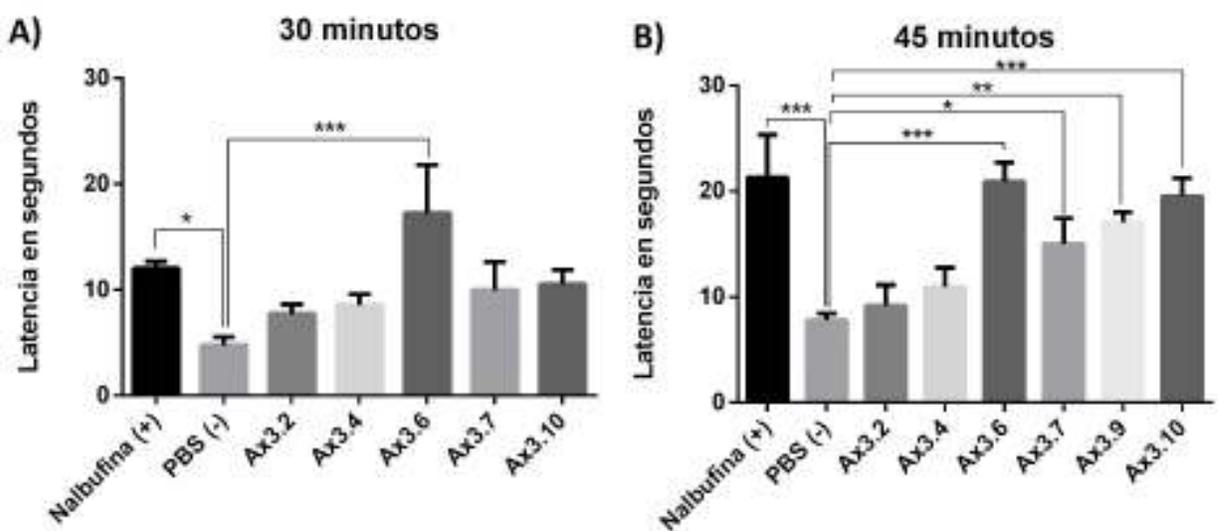


Figura 19.- Evaluación del efecto analgésico de las subfracciones de Ax3. Se evaluó la cantidad de 3 μ g. A) 30 minutos. Se muestran la media \pm SEM; n= 4. *: P=0.0270; ***: P=0.0005. B) 45 minutos de latencia. Se muestran la media \pm SEM; n= 4. *: P=0.0261; **: P=0.0053; ***: P=0.0002.

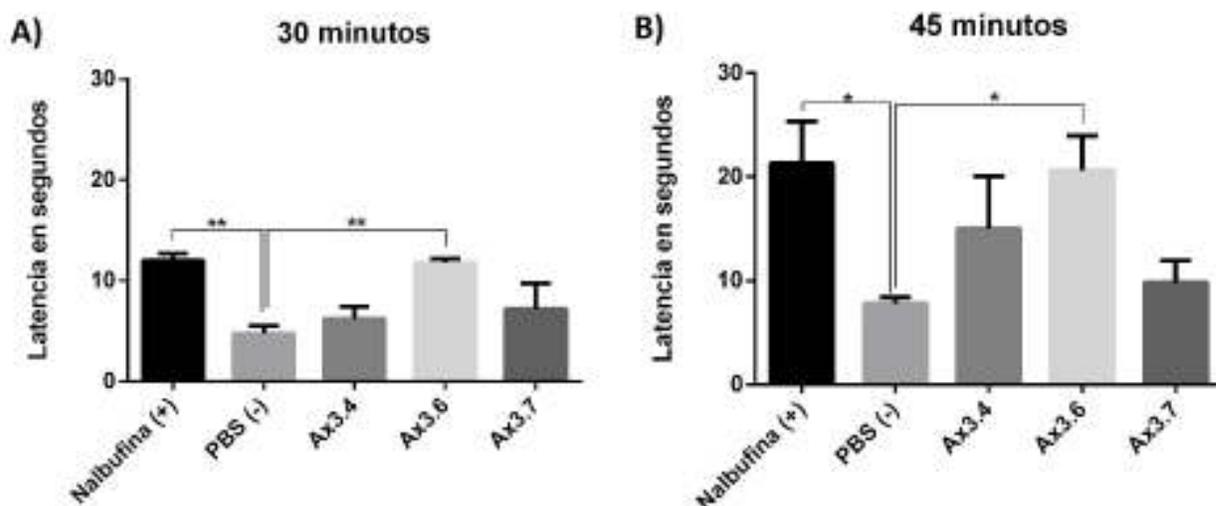


Figura 20.- Evaluación del efecto analgésico de las subfracciones de Ax3. Se evaluó la cantidad de 4 μ g. A) 30 minutos. Se muestran la media \pm SEM; n= 4. **: P=0.0017. B) 45 minutos de latencia. Se muestran la media \pm SEM; n= 4. *: P=0.0131.

3.1.6 Re-purificación de las fracciones Ax3.6, Ax3.9 y Ax3.10 mediante RP-HPLC

Se colectaron picos individuales para cada sub-fracción y se describen en la tabla siete. Para Ax3.6 se obtuvieron 15 picos individuales, para Ax3.9 se obtuvieron siete picos individuales y para Ax3.10 se obtuvieron 8 picos individuales (Figuras 21 - 23).

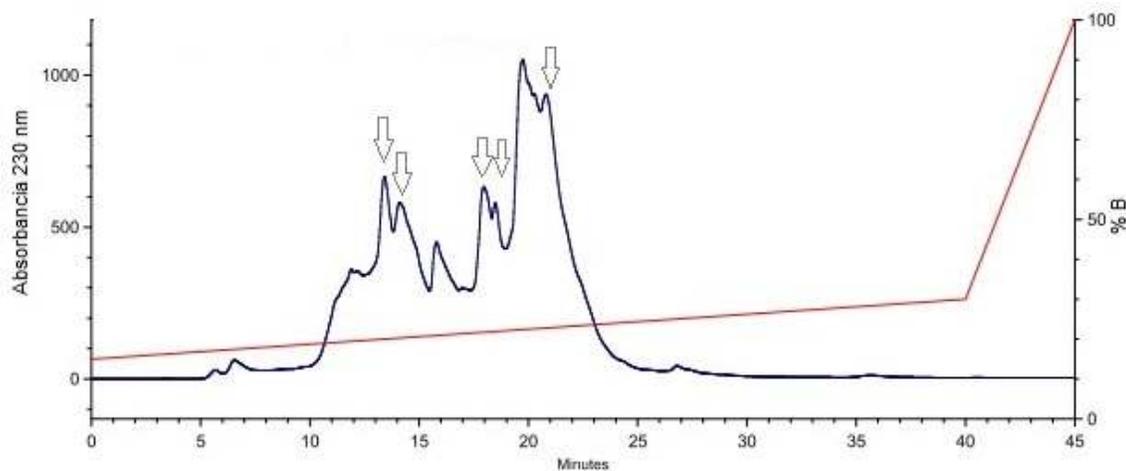


Figura 21.- Cromatograma de la fracción Ax3.6. Se consideraron las fracciones señaladas con una flecha para su evaluación por *hot plate test*.

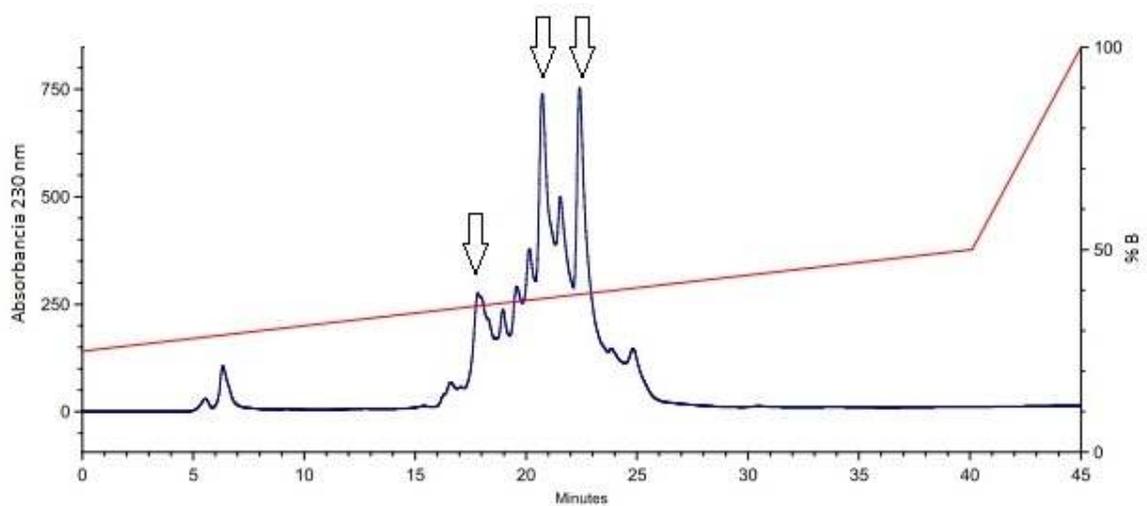


Figura 22.- Cromatograma de la fracción Ax3.9. Se consideraron las fracciones señaladas con una flecha para su evaluación por *hot plate test*.

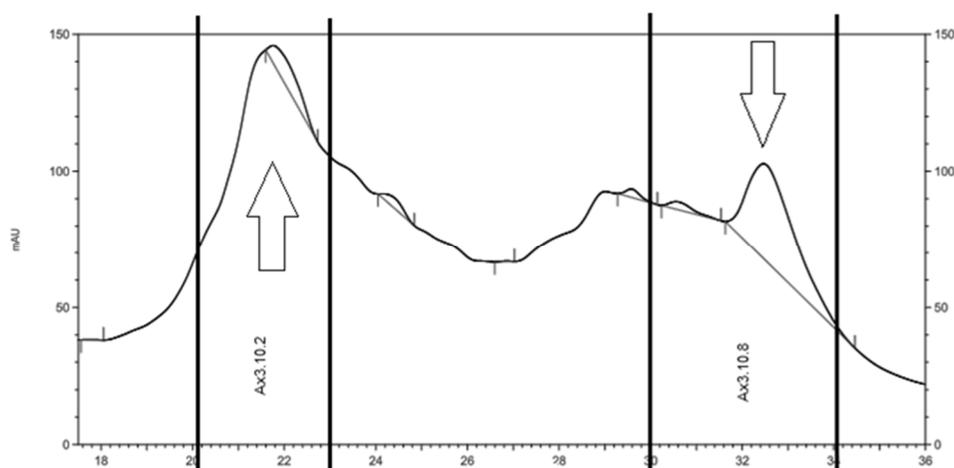


Figura 23.- Cromatograma de la fracción Ax3.10. Se consideraron las fracciones señaladas con una flecha para su evaluación por *hot plate test*.

3.1.7 *Hot plate test* para la fracción Ax3.6

Se evaluaron las subfracciones indicadas en anexo 4 para determinar cuál pico individual tiene un efecto analgésico. Las latencias se registraron a los 30 y 45 minutos posteriores a la inyección de cada fracción. Se decidió evaluar a 0.1 y 0.5 μg por gramo de ratón, es decir, una cantidad de un logaritmo menor que en los resultados anteriores (3 y 4 μg por gramo de ratón). Cada evaluación se cuadruplicó para

tener una estadística significativa. Los datos se analizaron con el programa *GraphPad Prism*® (Versión 7) y los resultados se muestran en las figuras 24 y 25.

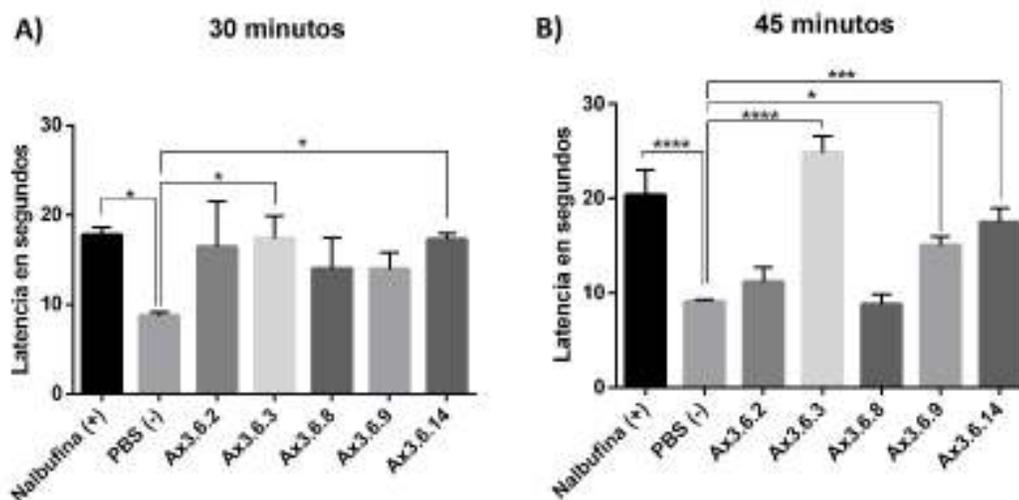


Figura 24. Evaluación del efecto analgésico de Ax3.6. La concentración evaluada fue de 0.5 µg por gramo de ratón. A) Latencia evaluada a los 30 minutos. Se muestra la media ± SEM. *: P=0.0242. B) Latencia evaluada a los 45 minutos. Se muestran la media ± SEM. *: P=0.0135; ***: P=0.0010; ****: P<0.0001.

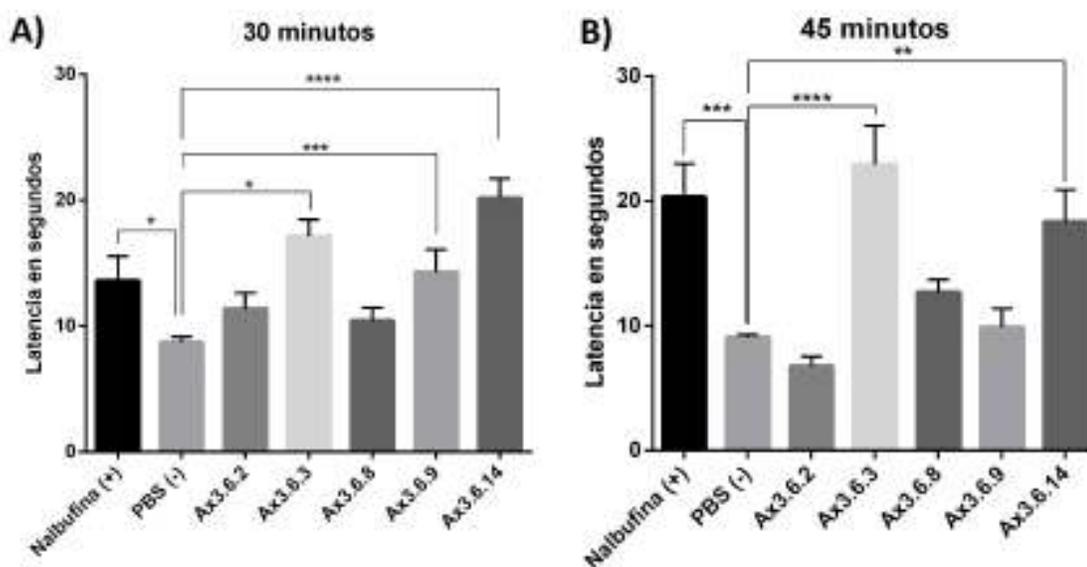


Figura 25. Evaluación del efecto analgésico de Ax3.6. La concentración evaluada fue de 0.1 µg por gramo de ratón. A) latencia evaluada a los 30 minutos. Se muestra la media ± SEM. *: P=0.0109; ***: P=0.0004; ****: P<0.0001 B) Latencia evaluada a los 45 minutos. Se muestran la media ± SEM. **: P=0.0032; ***: P=0.0006; ****: P<0.0001.

3.1.8 Hot plate test para la fracción Ax3.9 y Ax3.10

Se evaluaron las subfracciones que se indican en el anexo 4 para determinar cuál pico individual tiene un efecto analgésico. Las latencias se registraron a los 30 y 45 minutos posteriores a la inyección de cada fracción. Se decidió evaluar a 0.1 y 0.5 μg por gramo de ratón, es decir, una cantidad de un logaritmo menor que en los resultados anteriores (3 y 4 μg por gramo de ratón). Cada evaluación se cuadruplicó para tener una estadística significativa. Los datos se analizaron con el programa *GraphPad Prism*[®] (Versión 7) y los resultados se muestran en las figuras 26 y 27.

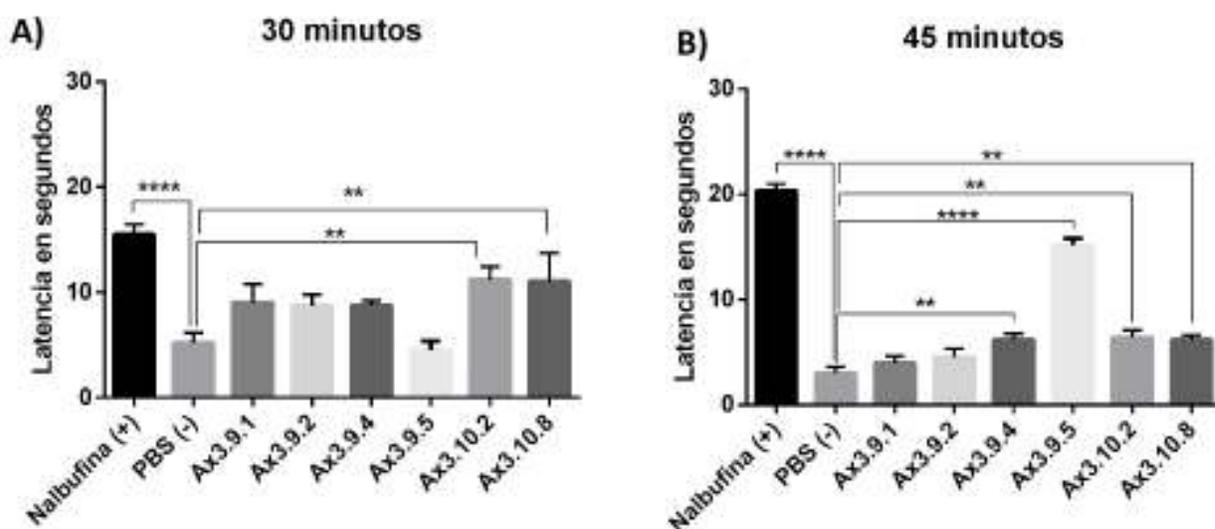


Figura 26. Evaluación del efecto analgésico de Ax3.9 y Ax3.10. La concentración evaluada fue de 0.5 μg por gramo de ratón. A) latencia evaluada a los 30 minutos. Se muestra la media \pm SEM. **: P=0.0050; ****: P<0.0001. B) Latencia evaluada a los 45 minutos. Se muestran la media \pm SEM. **: P=0.0011; ****: P<0.0001.

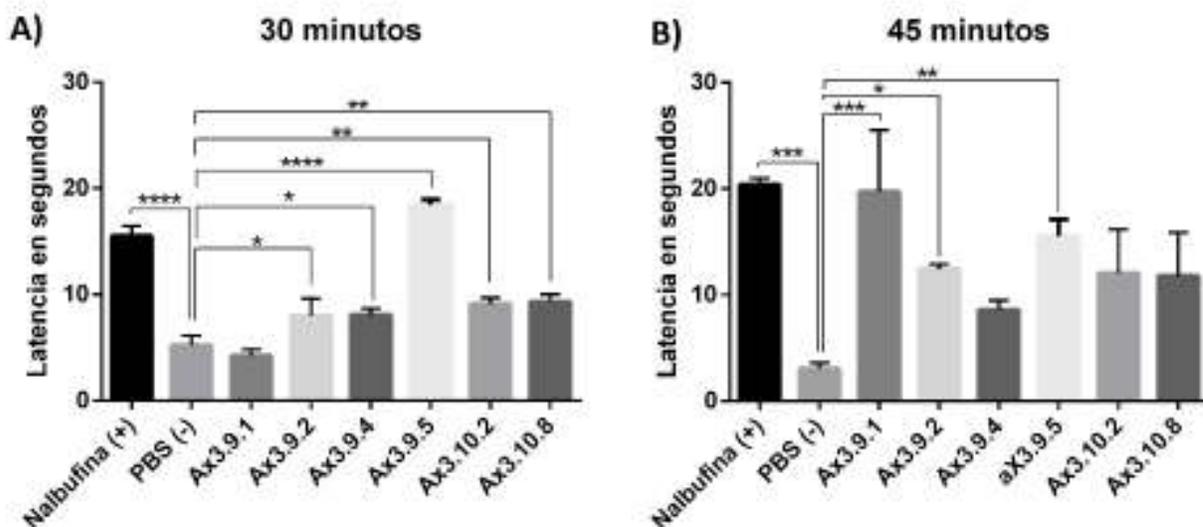


Figura 27. Evaluación del efecto analgésico de Ax3.9 y Ax3.10. La concentración evaluada fue de 0.1 μg por gramo de ratón. A) latencia evaluada a los 30 minutos. Se muestra la media \pm SEM. *: P=0.0051; **: P=0.0034; ****: P<0.0001. B) Latencia evaluada a los 45 minutos. Se muestran la media \pm SEM. *: P=0.0215; **: P=0.0032; ***: P=0.0005.

3.1.9 Re-purificación de las fracciones de interés mediante RP-HPLC

Se decidió re-purificar mediante RP-HPLC las fracciones con mejor actividad para Ax3.6 que fueron Ax3.6.2, Ax3.6.3 y Ax3.6.14 (Fig. 28). Las fracciones Ax3.9.9. y Ax3.9.11 se evaluaron directamente sin re-purificarse, por solo observarse un solo componente.

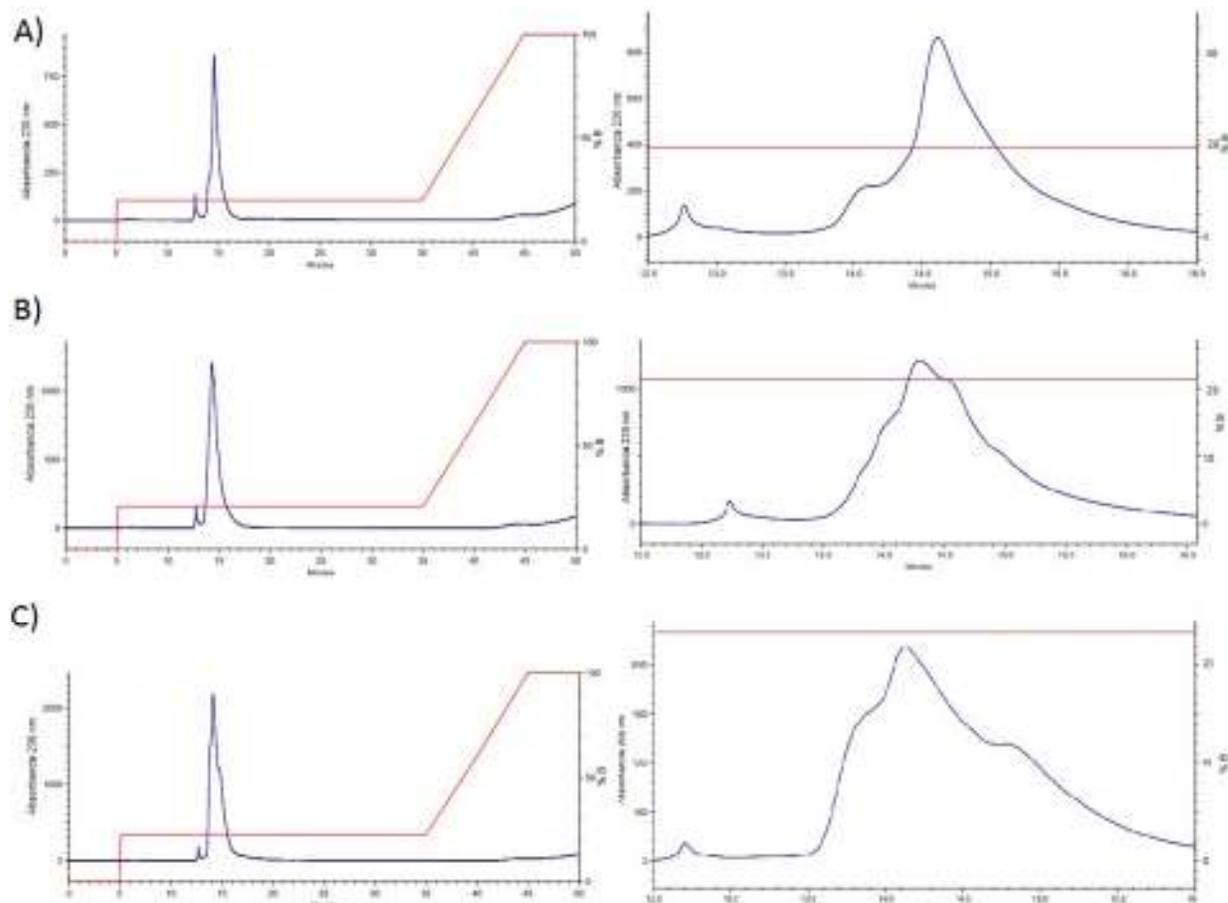


Figura 28.- Cromatogramas de repurificación de las fracciones de interés. Del lado derecho el acercamiento para observar cada sub-fracción o pico obtenido. A) Ax3.6.2 con dos picos obtenidos B) Ax3.6.3 son tres sub-fracciones obtenidas, C) Ax3.6.14 con tres sub-fracciones obtenidas. Lo que demuestra que hay contaminación de otras fracciones y no se ha obtenido una toxina pura.

3.1.10 Hot plate test para las fracciones de interés biológico

Se analizaron estas nuevas fracciones ultra-purificadas por el ensayo de *hot plate* inyectando 0.1 μg por gramo de ratón. Se realizó un ensayo de cuatro ratones por fracción (Fig. 29).

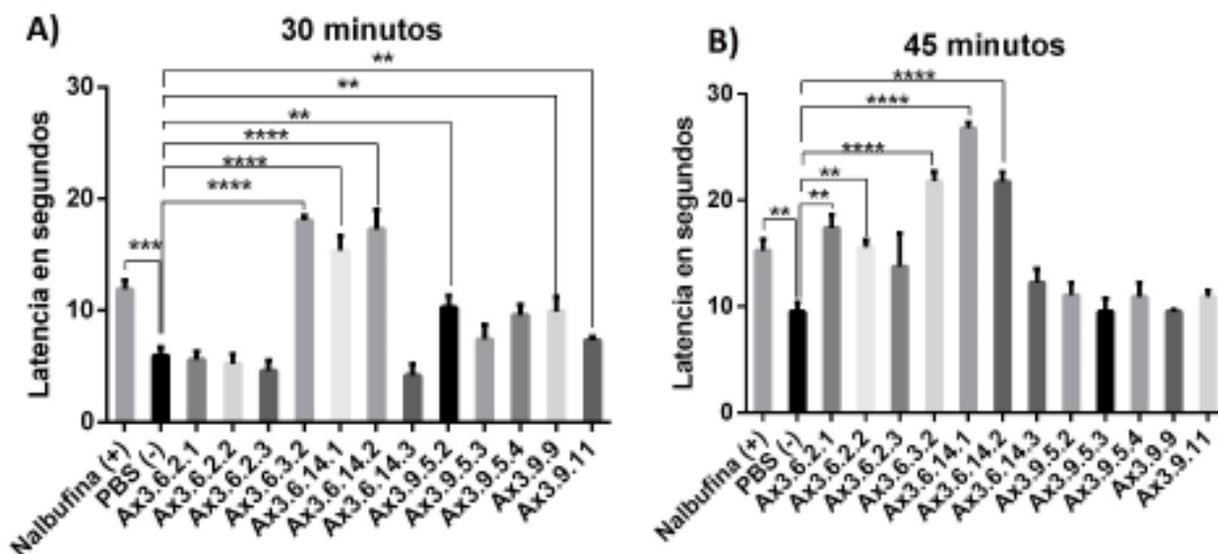


Figura 29. Evaluación del efecto analgésico de las sub-fracciones obtenidas. . La concentración evaluada fue de 0.1 μg por gramo de ratón. A) latencia evaluada a los 30 minutos. Se muestra la media \pm SEM. **: P=0.0051; ***: P=0.002; ****: P<0.0001. B) Latencia evaluada a los 45 minutos. Se muestran la media \pm SEM. *: P=0.0231; **: P=0.0015; ****: P= <0.0001.

3.1.11 Implementación de RP-HPLC con un buffer básico

Se realizó una ultra-purificación de Ax3.6.3.2 mediante la implementación por RP-HPLC utilizando solventes básicos. Se sustituyó la solución A por un buffer de fosfatos (20 mM, pH=5) y la solución B se modificó, de tal forma que tuviera un 60% de buffer de fosfatos (20 mM, pH=5) y un 40% de acetonitrilo. Se implementó la técnica en el laboratorio de FICOTOX del CICESE.

Se empleó una columna Zorbax Bio-HPLC SB300 C18, se activó y equilibró la columna con 100% de acetonitrilo por 10 minutos (o 10 veces el volumen de la columna), después 50% agua / 50% acetonitrilo por 10 minutos y finalmente 50% agua / 50% Solución A por 10 minutos. Paralelamente, se diseñó el método purificación: 0-5 min: 0% B; 5-65 min 60%B. Las lecturas se realizaron a 230 y 280 nm, además se controló la temperatura de inyección a 5°C y en la columna a 20°C. Se corrió un blanco con buffer de

fosfatos. Se re-suspendió la muestra 53.0199 μg en 50 μL de buffer de fosfatos y se inyectó la muestra (Fig. 30).

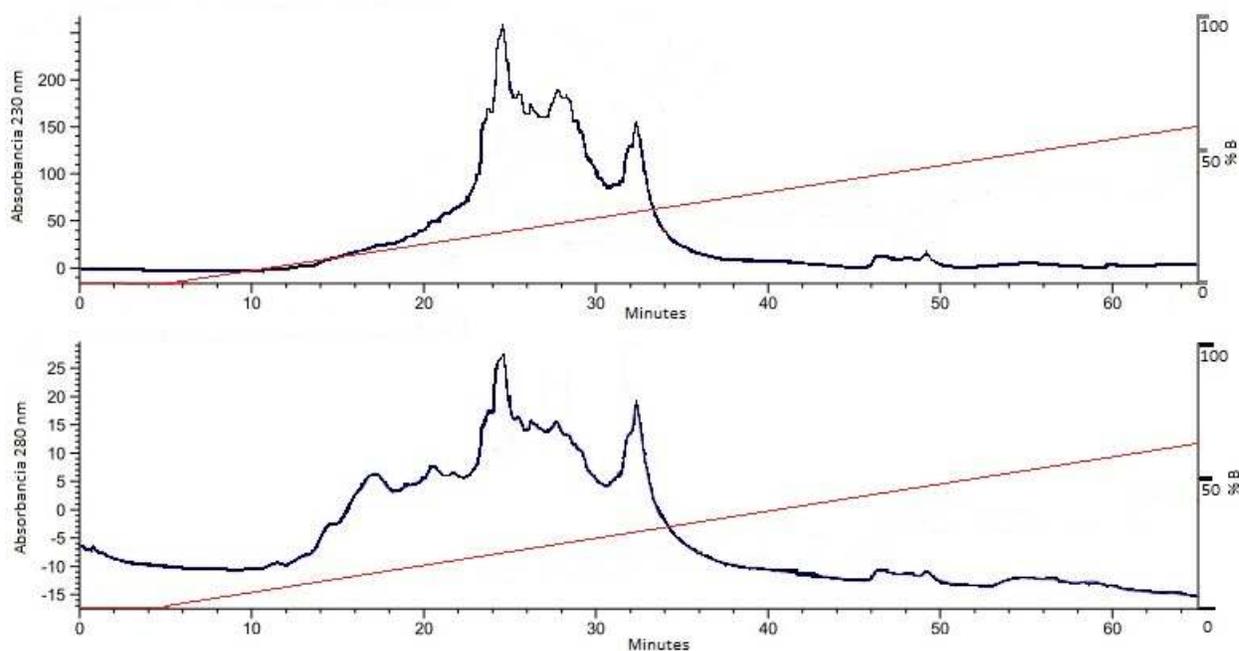


Figura 30.- Cromatograma de RP-HPLC con buffer de fosfatos. Arriba lectura a 230 nm, abajo lectura a 280 nm. Gradiente 0-60% buffer de fosfatos 20 mM. Se observa una saturación de componentes, lo que indica que no hay una buena resolución en la purificación mediante este procedimiento.

3.1.12 Implementación de RP-HPLC con cambio de solvente orgánico

También se realizó una sustitución del solvente orgánico para determinar su eficiencia en la separación de los componentes presentes en Ax3.6.14.1. En las purificaciones anteriores se empleó acetonitrilo grado HPLC como solvente orgánico y se decidió sustituirlo por metanol grado HPLC. El solvente orgánico cambió la separación de los componentes, sin embargo, no mostro una eficiencia en la separación del analito (Fig. 31).

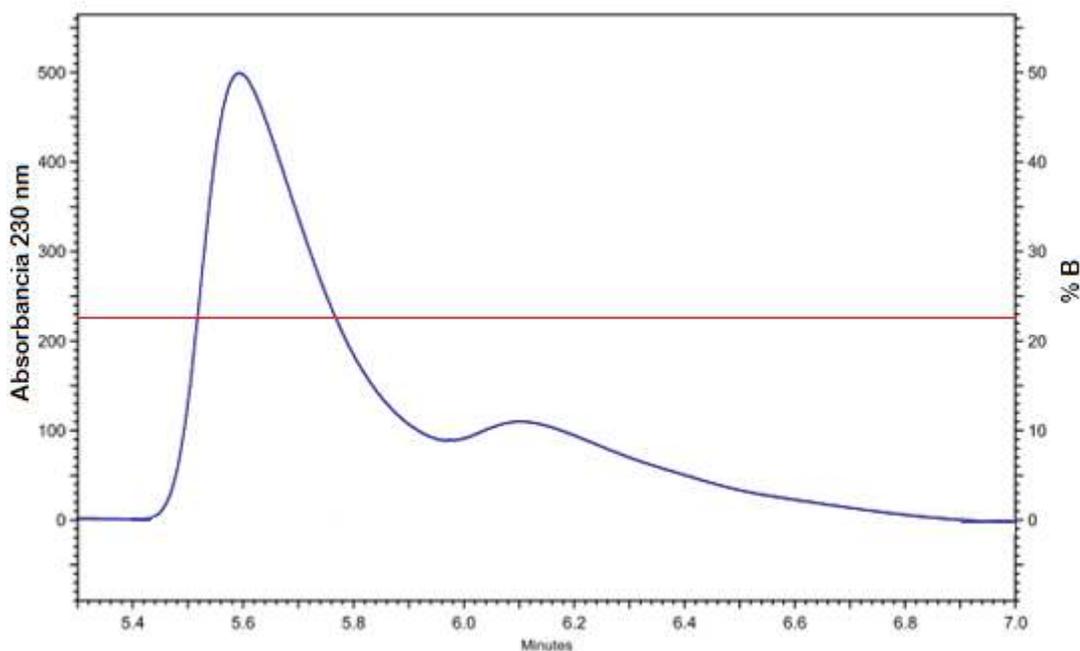


Figura 31.- Cromatograma de RP-HPLC con metanol como solvente orgánico. Se inyectaron 50 μg de muestra y se realizó la lectura a 230 nm. El método empleado fue un isocrático a 22.5% B en 40 min a un flujo de 0.5 ml/min.

3.1.13 Purificación de la fracción Ax3.6.14.1 reducida y alquilada mediante RP-HPLC

Se redujo y alquiló el péptido para obtener sus componentes linealizados, para determinar si esta contribuye en la purificación de los componentes de interés. Al obtener el cromatograma se observaron dos picos (Fig. 32), que fueron recuperados, congelados, liofilizados y posteriormente analizados por espectrometría de masas.

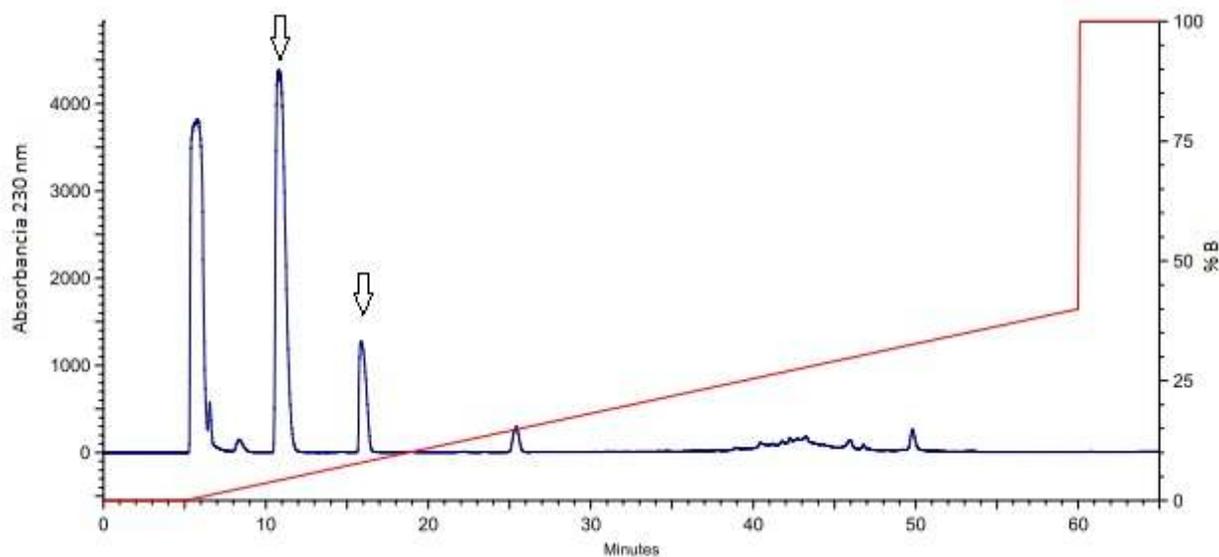


Figura 32.- Cromatograma de Ax3.6.14.1 reducida y alquilada. Se inyectaron 190 μg de muestra y se realizó la lectura a 230 nm. El método empleado fue un gradiente suave de 0% a 40% B en 60 min a un flujo de 0.5 ml/min. Se muestran con flechas los picos obtenidos.

Al observar que la muestra no tuvo una separación adecuada mediante el proceso de purificación con el buffer de fosfatos ni con el metanol como solvente orgánico, se decidió utilizar los picos que se observaron puros o con la menor contaminación posible en RP-HPLC. Estas fracciones fueron Ax3.6.2.1, Ax3.6.2.2, Ax3.6.14.1 y Ax3.6.14.2, las cuales se prepararon para su posterior caracterización por espectrometría de masas. Se realizó una cuantificación por NanoDrop® para registrar la cantidad que se analizó, se realizaron tres alícuotas con 8 μg de cada muestra y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

3.2 Caracterización bioquímica de la toxina de interés

3.2.1 Determinación del peso molecular por espectrometría de masas

Se trabajó en la determinación del peso molecular por espectrometría de masas de Ax3.6.2.1, Ax3.6.2.2, Ax3.6.14.1 y Ax3.6.14.2. Para las muestras Ax3.6.2.1 y Ax3.6.2.2, el cromatograma demostró que las secuencias no estaban puras (Fig. 33).

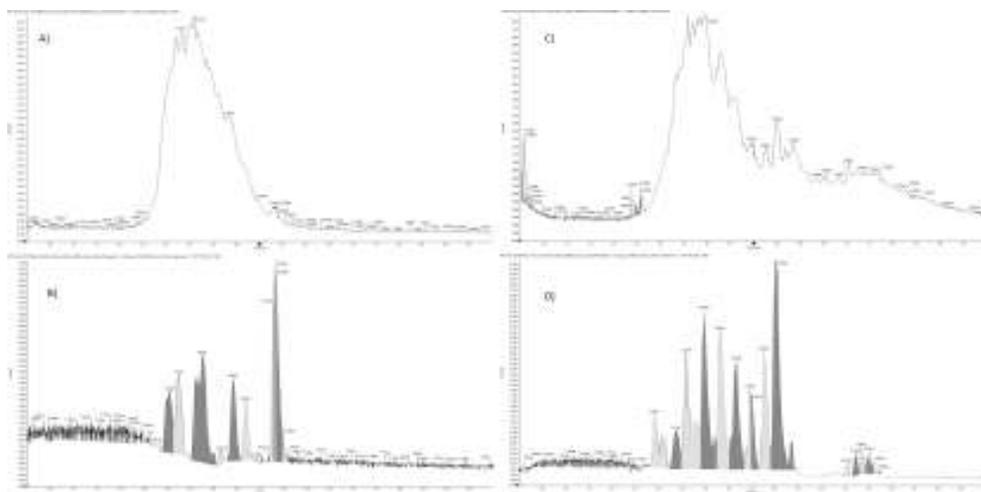


Figura 33.- Espectrograma de muestras parcialmente purificadas. Izquierda Ax3.6.2.1. A) TIC que muestra las masas totales y B) BPC que muestra las siete intensidades registradas por el programa. Derecha Ax3.6.2.2. C) TIC que muestra las masas totales y D) BPC que muestra las 16 intensidades registradas por el programa. Se aprecia en ambas muestras la contaminación de la muestra, indica que no ha sido purificada en su totalidad.

Para la muestra Ax3.6.14.1, el *Total Ion Chromatogram* (TIC) muestra una purificación parcial. Al analizar el *Base Peak Chromatogram* (BPC) se muestran dos intensidades, la mayoritaria con una masa de 3433.42 Da y la de menor intensidad, con una masa de 3634.54 Da (Fig. 34).

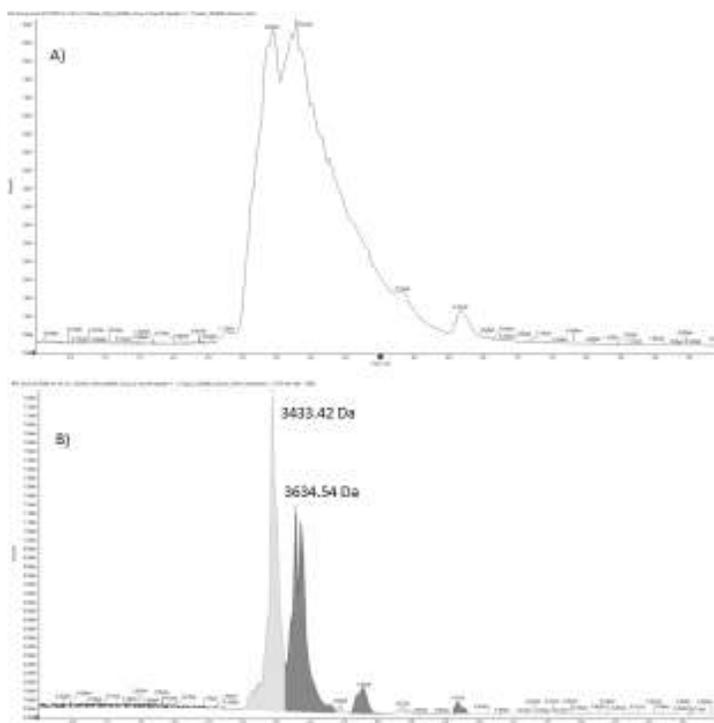


Figura 34.- Espectrograma de Ax3.6.14.1 A) TIC que muestra las masas totales y B) BPC que muestra las dos intensidades registradas por el programa. Se aprecia una muestra parcialmente purificada. Se indican las masas de cada intensidad.

Para la muestra Ax3.6.14.2, el *Total Ion Chromatogram* (TIC) muestra una purificación parcial. Al analizar el *Base Peak Chromatogram* (BPC) se muestran cinco intensidades, la mayoritaria con una masa de 3919 Da, la segunda de 3433.42 Da, la tercera 3488.50 Da, la cuarta 3546.51 Da y la quinta o de menor intensidad, con una masa de 932.45 Da (Fig. 35).

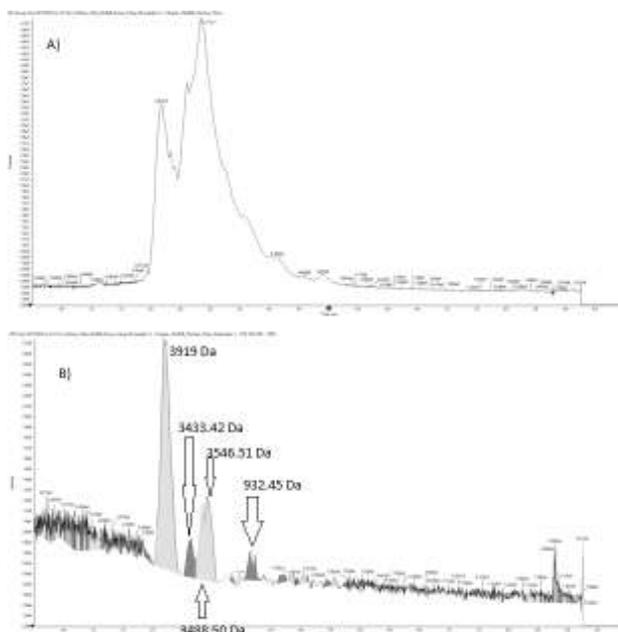


Figura 35.- Espectrograma de A3.6.14.2 A) TIC que muestra las masas totales y B) BPC que muestra las cinco intensidades registradas por el programa. Se aprecia una muestra parcialmente purificada. Se indican las masas de cada intensidad.

3.2.2 Identificación de residuos de cisteínas

Se determinó el número de residuos de cisteínas presentes en la cadena peptídica para la fracción Ax3.6.14.1, que mostró dos componentes en el espectrograma. Se determinó la masa molecular con los péptidos lineales (sin enlaces disulfuro). A esta masa molecular se le restó la masa obtenida del péptido nativo y a dicha diferencia de peso se dividió entre 58, esto es debido a un aumento en el peso por el agente alquilante (Calvete, 2007). Como resultado se obtienen el número de residuos de cisteínas presentes en la estructura primaria (tabla 8).

Tabla 8. Caracterización de los compuestos con actividad analgésica.

| Fracción | Peso molecular del péptido reducido y alquilado (Da) | Peso molecular del péptido nativo (Da) | Diferencia de peso (Da) | Número de residuos de cisteínas |
|-------------------|--|--|-------------------------|---------------------------------|
| Ax3.6.14.1 | 3665 | 3433.92 | 232 | 4 |
| | 3875 | 3634.54 | 232 | 4 |
| Ax3.6.14.2 | 4267 | 3919.4 | 348 | 6 |
| | N.A | 3546.51 | N.A | N.A |
| | N.A | 3488.50 | N.A | N.A |
| | N.A | 3433.42 | N.A | N.A |
| | N.A | 932.45 | N.A | N.A |

Capítulo 4. Discusión

4.1 Obtención y purificación de la muestra

4.1.1 Colecta y extracción de veneno total

La península de Baja California cuenta con dos litorales, al oeste se encuentra el océano Pacífico y al este el Golfo de California y cuya extensión aproximada es de 1250 km (León-Portilla, 2001). En ambos litorales se reporta la presencia de anémonas del género *Anthopleura* (Fig. 36) (Acuña *et al.*, 2012; Bates *et al.*, 2010; Daly, 2004; Garese *et al.*, 2009; González-Muños *et al.*, 2013, Russo, 1984). Para este género es difícil la identificación de especie, ya que son especies crípticas; es decir, especies extremadamente similares en morfo-fisiología, pero reproductivamente aisladas (Douek *et al.*, 2002; Grajales y Rodríguez, 2016; Pereira *et al.*, 2014). Dada esta información es necesario realizar estudios ecológicos, de sucesión poblacional, de caracterización de hábitat y de especies presentes en estas localidades, para aportar este conocimiento a la región.



Figura 36. Mapa de America del Norte donde se señalan localidades con registros de anémonas del género *Anthopleura*. En rojo se muestran las regiones con aguas frías, en azul se muestran las localidades en aguas subtropicales y en verde en aguas tropicales. Imagen del autor.

En el laboratorio de Inmunología molecular y biotoxinas se ha trabajado con el veneno de anémonas del genero *Anthopleura*. Cada esfuerzo de los antecesores ha dejado un paso importante para

que se pudiera desarrollar este trabajo. El último esfuerzo es el de Guevara (2015) donde purificó veneno de la misma especie *A. xanthogrammica*, trabajo con el cuál se discutió parte de los resultados. Los organismos se colectaron en la misma zona que los trabajos previos que se realizaron en el laboratorio.

El muestreo se realizó en meses diferentes a lo largo de dos años, obteniendo muestras homogéneas en composición. Con esto se descartó algún cambio en los cromatogramas debido a variaciones estacionales o tipos de alimentos disponibles por temporadas, tal como se ha reportado para otras especies de anémonas y otros invertebrados marinos (Dutertre *et al.*, 2014; Jouiaei *et al.*, 2015).

Los cambios de temperaturas no repercuten de manera directa en la síntesis de venenos (Kohel, 1977) debido a que habitan en ambientes contrastantes; es decir, en zonas intermareales donde el cambio de temperatura suele ser de hasta 5 °C (Cervino *et al.*, 2004; Vázquez-Botello, 2008).

También se consideró un tamaño de 2.5 cm de diámetro aboral, estimando que son adultos que han madurado y no tienen cambios en la síntesis de venenos. Si el organismo tenía un tamaño menor a 2.5 cm se regresó a su lugar de origen, o bien, no se consideraba retirar del sustrato. Esto es debido a que durante la fase de juvenil (cuando comienza a fijarse al sustrato) (Sebens, 1981), los organismos sufren una metamorfosis y una diferenciación de cnidocitos especializados llamados *acrorhagi*, por los cuales en ausencia de estos cnidocitos el patrón de toxinas secretadas es diferente (Bigger, 1978; Columbus-Shenkar *et al.*, 2017; Macrander *et al.*, 2016). Por lo tanto, se trabajó con una muestra homogénea de la misma especie asegurando la obtención de las mismas fracciones con el mínimo error de variación durante el procedimiento experimental de purificación.

4.1.2 Purificación por exclusión molecular

Después de dializar y obtener el extracto crudo de veneno se anotó el total de las cantidades que se obtuvieron (ver tabla 6). Se obtuvo un 89% de rendimiento durante el primer paso de purificación experimental comparado con el 69% de rendimiento obtenido por Guevara (2015). En ambos trabajos se comenzó por un método de purificación de veneno total mediante cromatografía de exclusión molecular, paso inicial en el trabajo de purificación de proteínas de acuerdo al consenso *what to try first?* (Structural Genomics Consortium *et al.*, 2008).

En el procedimiento que Guevara realizó de purificación por exclusión molecular, se utilizó el mismo Bio-Gel P-100; sin embargo, el utilizó ácido acético 1 M como eluyente a un flujo de 2.5 ml por hora. Como resultado, Guevara obtuvo un total de tres fracciones en 32 horas de colecta.

Al sobreponer el cromatograma obtenido por Guevara (2015) y el cromatograma de este trabajo se observa que hay una ligera correspondencia en las fracciones obtenidas Ax1, Ax2 y Ax3 (Fig. 37). Sin embargo, también se puede observar que utilizando acetato de amonio 20 mM la resolución de los picos que se obtuvieron es mejor, inclusive se obtuvo una cuarta fracción (Ax4) mediante este procedimiento, con un tiempo total de purificación de 60 horas por corrida. La simetría homogénea que presentaron los picos que se obtuvieron confirma un buen perfil de purificación, según lo descrito en la literatura (Structural Genomics Consortium *et al.*, 2008; Rossomando, 1998). La implementación de acetato de amonio como eluyente se ha utilizado en otros trabajos de purificación de venenos de cnidarios y otros animales (Lassen *et al.*, 2011; Flores *et al.*, 2016; Brazón *et al.*, 2016).

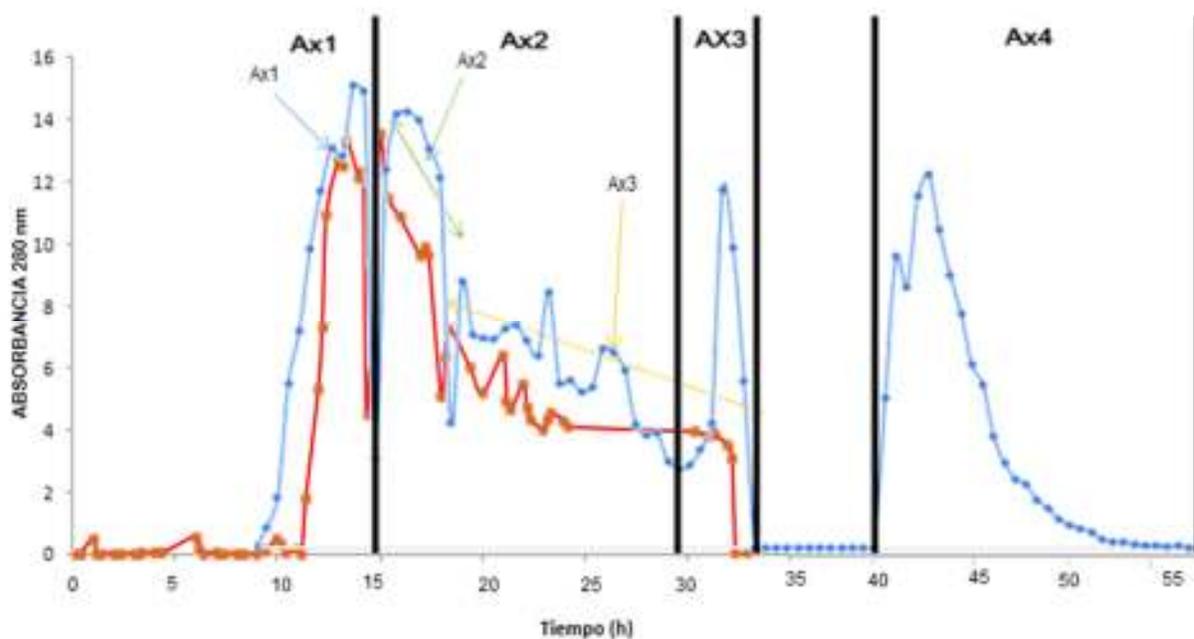


Figura 37.- Comparación de cromatogramas de exclusión molecular. Sobreposición de cromatogramas para observar las similitudes al utilizar dos eluyentes diferentes. En rojo ácido acético 1M, en azul acetato de amonio 20 mM.

4.1.3 Purificación por RP-HPLC

En este procedimiento de purificación se utiliza una solución A [agua adicionada con ácido trifluoroacético (TFA)] lo que permite la separación óptima de los péptidos que se encuentren en solución y cuya carga es parcialmente negativa (Kazakevich y LoBrutto, 2007). También, se utiliza una solución B (ACN + TFA) disolvente orgánico de polaridad media y miscible en agua, cuyas propiedades ayudan en la resolución de compuestos iónicos y no polares (Kazakevich y LoBrutto, 2007).

En el procedimiento de re-purificación de las toxinas de interés, particularmente la fracción Ax3.6.14.1, resultó extremadamente complicada la separación por RP-HPLC. Sin embargo, para muestras de difícil resolución se recomienda que el porcentaje de TFA sea de 0.2-0.25%, para alcanzar una óptima resolución (Chen *et al.*, 2004) esta modificación al procedimiento no se realizó en este trabajo.

Debido a esto, se realizaron dos modificaciones al protocolo de extracción. Por un lado se realizó un cambio de solución A, se utilizó un búffer de fosfatos en vez del agua con TFA. Al igual que el aumento en el porcentaje de TFA, un cambio de buffer y pH resuelve la separación de péptidos en una solución (Naidu *et al.*, 2005; Gilar *et al.*, 2005). Empero, en el caso de la separación de Ax3.6.14.1 no resultó ser efectiva.

La segunda modificación que se realizó fue el cambio de solvente orgánico, en donde se utilizó metanol (MetOH) en lugar de ACN. Este cambio maximiza la selectividad de las separaciones de péptidos complejos (Mant *et al.*, 2010; Moldoveanu y David, 2002); sin embargo, los resultados demostraron que el cambio fue ineficiente. Esto pudiera ser por no tener las columnas necesarias para llevar a cabo el experimento, o bien, que faltó estandarizar el porcentaje del MetOH para mejorar la resolución.

4.1.4 Consideraciones para futuros trabajos de purificación

Aunque el porcentaje de rendimiento registrado fué muy alto (89% en el primer procedimiento), el proceso de purificación se puede mejorar. Se puede implementar una purificación por cromatografía de intercambio iónico, FPLC, LC/MS u otro método de purificación que acelere el proceso de obtención de muestra y así disminuir el tiempo implementado en la obtención de las fracciones (Barnett *et al.*, 2015;

Oldrati *et al.*, 2016). Esto es debido al tiempo empleado a cada corrida de exclusión molecular (60 horas estimadas por cada muestra fraccionada por exclusión molecular).

Para evitar la pérdida de material durante la concentración de la muestra, así como en el proceso de caracterización bioquímica, se recomienda la implementación de las puntas de pipeta ZipTip®, las cuales contienen 0.6 µL de resina C18, lo que ayuda en el proceso de purificación, así como en la preparación del material antes de analizarse por espectrometría de masas (Breitkopf y Asara, 2012; Rhoads *et al.*, 2013; Breitkopf *et al.*, 2016).

Otra perspectiva en el estudio de toxinas de anémonas es la convergencia de técnicas como la proteómica y transcriptómica que aceleran el proceso de identificar el arsenal de biomoléculas presentes en el organismo, que la purificación clásica de toxinas no es posible identificarlas (Madio *et al.*, 2017).

4.2 Ensayos biológicos

4.2.1 Hot plate test

Las fracciones que se obtuvieron por exclusión molecular se evaluaron mediante un estímulo térmico a 55 °C. Se utilizó un ratón por fracción debido a que Guevara también evaluó las fracciones y reporta que la fracción 3 es la que muestra un efecto analgésico. Después de la evaluación de latencia, se corroboró su resultado. Aunado a esto, al ratón que se le aplicó la fracción Ax3 tuvo los siguientes desordenes fisiológicos durante la evaluación:

Entre los 20-25 minutos posteriores a la inyección el ratón se mostró hiperactivo.

Entre los 33-35 minutos posteriores a la inyección, el ratón no tuvo coordinación de sus extremidades.

Entre los 35-38 minutos posteriores a la inyección, el ratón sufrió de convulsiones y parálisis total.

Al minuto 38 posterior a la inyección el ratón se murió.

Estas manifestaciones fisiológicas se han descrito en diversos trabajos donde se inyecta veneno total, sub-fracciones de venenos o bien toxinas puras en ratones y otros modelos biológicos, concluyendo que hay péptidos y otras moléculas pequeñas que atraviesan la barrera hemato-encefálica, interactuando en canales iónicos del sistema nervioso central y periférico, cuya interacción muestra el efecto neurotóxico (Chen *et al.*, 2006; Mortari *et al.*, 2007; Green y Olivera, 2016). Otro posible blanco molecular de esta fracción pudiera ser el sistema glutamatérgico dado que se ha demostrado su papel en extractos de veneno que causan convulsiones (Gondram *et al.*, 2002).

Por el principio de purificación por exclusión molecular este resultado es congruente, debido a que las fracciones Ax3 y Ax4 corresponden a las moléculas de menor tamaño, considerando que la resina Bio-Gel P-100 separa las moléculas con un rango entre los 5 – 100 kDa y se reporta en la literatura que las toxinas peptídicas cuyos blancos moleculares son los canales iónicos tienen pesos menores a 5 kDa (Frazao *et al.*, 2012), reforzando así el resultado obtenido. Los síntomas descritos anteriormente también se mostraron en la fracción Ax3.8 evaluadas a una cantidad de 1.5, 3 y 4 µg por gramo de ratón. Esta fracción fue letal en el ratón. No obstante, la picadura de anémoma en humanos es tóxica solamente si el cnidocito logra atravesar el tejido epitelial de revestimiento o piel (Watters, 2005). Es de particular interés la purificación de esta fracción y caracterizar las moléculas que desaten el efecto tóxico-sistémico. Se realizaron ensayos de las otras sub-fracciones que se obtuvieron por RP-HPLC a 0.5 y 0.1 µg por gramo de ratón, considerando los resultados de latencia de la sección 3.2.1, se tiene un rango terapéutico amplio, debido a que los organismos no mostraron un comportamiento anormal, ni síntomas de intoxicación.

Se utilizó Nalbufina® un opioide semi-sintético como modulador de la respuesta nociceptiva, como control positivo. Posterior a la inyección del control positivo se observó en todos los ratones un estado de inactividad, pupilas dilatadas y ausencia de heces y orina. Estos signos también se han observado en pacientes bajo tratamiento con opioides, así como en otros modelos biológicos que han sido evaluados con Nalbufina® (van Niel *et al.*, 2016; Jannuzzi, 2016).

Las toxinas que se analizaron en este trabajo se re-suspendieron en solución tampón de fosfatos (PBS) 1X, debido a que es una solución comúnmente utilizada en la investigación biológica. Esta solución mantiene un pH fisiológico constante 7.3-7.4, es isotónico y no es tóxico para las células o los organismos que se evaluaron (Andersson y Dahlgren, 2010; Kang *et al.*, 2009). Las características bioquímicas de la fracción Ax3.6.14.1 permiten que sean solubles en una solución acuosa como PBS y mediante los enlaces disulfuro ser una molécula estable (Wang y Craik, 2016). Sin embargo, se deben hacer ensayos de farmacocinética y farmacodinamia *in vitro* e *in vivo* para entender los procesos de liberación, factores

asociados a la absorción y las limitaciones de la molécula; con esto aprovechar y mejorar el potencial terapéutico de la molécula peptídica (Norton, 2017).

El dolor es un síntoma causado por un estímulo, a enfermedad o disfunción del sistema nervioso. La sintomatología incluye hipersensibilidad a estímulos procesados por el sistema somatosensorial. La detección de estos estímulos depende de las familias de los canales potenciales de receptores transitorios (TRP), que se activan mediante estímulos mecánicos, térmicos, pH o reacciones químicas (Basso y Altier, 2017, Labuz *et al.*, 2016). Al realizar la prueba de la superficie caliente el efecto analgésico pudiera corresponder al antagonismo de los receptores TRP de piel; debido a que se ha caracterizado el antagonismo de estos receptores por toxinas de anemonas (Andreev *et al.*, 2008; Kozlov *et al.*, 2009; Philyppov *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha demostrado que si se bloquea a los TRP y a los canales de sodio activados por voltaje, se obtiene un efecto sinérgico antinociceptivo (Palhares *et al.*, 2017). Otros receptores localizados en piel son los canales iónicos sensores de ácido (ASIC's) y los canales de sodio epiteliales (ENaC); ambos canales están implicados en mecanopercepción, quimiopercepción, nocicepción, así como en la regulación de la presión y volumen de sangre que pudieran estar involucrados en la modulación de la nocicepción local y periférica (Cristofori-Amstrong y Rash, 2017; Hanukoglu, 2017; Jensen *et al.*, 2012; Trapani *et al.*, 2016). Un último receptor que ha sido poco explorado en la modulación del dolor son los receptores de serotonina (5-HT), no obstante existe un trabajo de una toxina no peptídica de anemonas en donde evaluaron la interacción con el receptor y su efecto analgésico (Zaharenko *et al.*, 2011).

Los blancos moleculares descritos detalladamente para toxinas de anémonas son los canales de sodio activados por voltaje (Blanchard *et al.*, 2012; Lazcano-Pérez *et al.*, 2016; Moran *et al.*, 2009) y canales de potasio activados por voltaje (Diochot y Lazdunski, 2009). Otras toxinas actúan como enzimas, formadoras de poros en la membrana y son hemolíticas (Frazao *et al.*, 2012). Se ha reportado la implicación de los canales de potasio en la modulación del dolor (Tsantoulas y McMahon, 2014; Diochot y Lazdunski, 2009) sin embargo, no se ha desarrollado un trabajo con toxinas de anémonas que sean agonistas o antagonistas de estos receptores.

En la actualidad no se encuentra ningún trabajo publicado de toxinas de anémonas del género *Anthopleura* como posibles analgésicos. Esto abre una oportunidad a trabajos posteriores en la caracterización de toxinas de anémonas y otros organismos venenosos, para aprovechar sus propiedades biomédicas para futuros tratamientos médicos y como herramientas moleculares.

Debido a la complejidad de la molécula, no se pudo obtener una secuencia de aminoácidos que ayude a la caracterización de su blanco molecular por similitud a otras toxinas que se encuentren en una base de datos y que cuente con la descripción de la selectividad y afinidad al blanco molecular.

4.3 Caracterización bioquímica de la toxina de interés

4.3.1 Determinación del peso molecular por espectrometría de masas

Debido a la imposible separación de los péptidos de Ax3.6.14.1, se decidió analizar por espectrometría de masas la fracción con la mezcla de compuestos y determinar el peso molecular. Claramente reflejó la separación incorrecta del analito, sin embargo fue posible obtener dos pesos moleculares (ver tabla 7). Para la fracción Ax3.6.14.2 solamente fue posible detectar una masa molecular y mostró una mayor contaminación (ver tabla 7). Estos pesos coinciden con los reportados en la literatura para toxinas peptídicas, que son menores a 7 KDa y pudiera ser que sus posibles blancos moleculares sean los canales iónicos de sodio o potasio (Frazao *et al.*, 2012).

Para la muestra Ax3.6.14.1 que se redujo y alquiló, se analizó por espectrometría y desafortunadamente no se detectó nada. Pudiera ser que se perdió la muestra en algún procedimiento o que la muestra no se retuvo en la columna del espectrómetro de masas.

4.3.2 Identificación de residuos de cisteínas

Existen diversas formas de estimar los residuos de cisteínas presentes en una secuencia de aminoácidos, depende del tipo de equipo donde se analiza la muestra y la metodología que se emplea en la reducción y alquilación de muestras (Henschen, 1986). El protocolo que se utilizó para determinar los residuos de cisteínas fué dividir la muestra en tres alícuotas. La primera solamente se desnaturalizó con calor para medir la masa molecular de la proteína nativa. A la segunda alícuota se añadió un reactivo alquilante (iodoacetamida) y en esta muestra se determina la presencia de grupos sulfidrilos reactivos. A alícuota número tres, se añadió DTT más el reactivo alquilante (Calvete, 2007). De esta manera se obtuvo el número de grupos sulfidriilo reactivos, el número total de cisteínas y el número total de enlaces disulfuro.

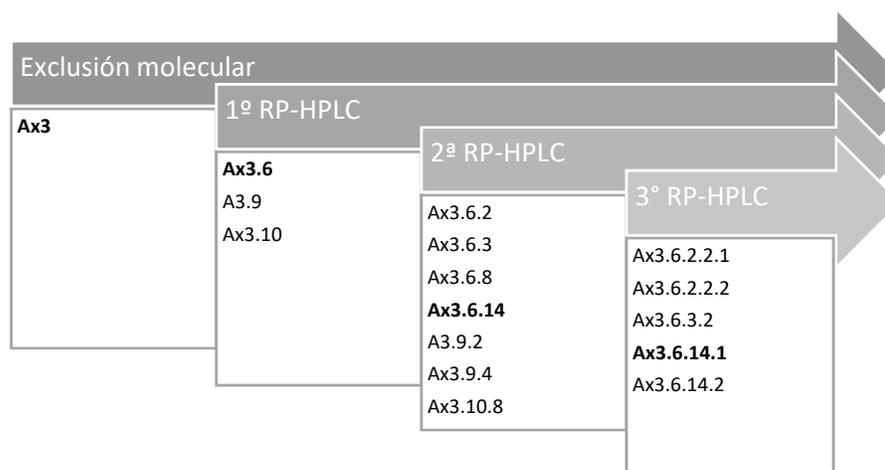
El resultado de este procedimiento experimental es la presencia de 4 residuos de cisteínas para las subfracciones contenidas en Ax3.6.14.1. Con estos cuatro residuos de cisteínas, la formación de dos enlaces disulfuro estarán presentes en las moléculas. Según la clasificación de Frazao (2012), estos analitos pudieran estar englobados en las toxinas de tipo 1 y tipo 2 por el número de enlaces disulfuro que forman; empero, el tamaño es menor al reportado, lo que sugiere las siguientes hipótesis: 1) que pudieran ser dos toxinas muy pequeñas nuevas reportadas para el tipo 1 y 2 cuyo blanco molecular sean los canales de sodio; 2) que correspondan a las tipo 3, de lo cual se reporte que solo formen dos enlaces disulfuro y que su blanco molecular sean los canales de potasio (Tsantoulas y McMahon, 2014), o 3) que tengan otro blanco molecular, distinto a los ya reportados en la literatura. Estas hipótesis se resolverán cuando se hagan los estudios pertinentes para la caracterización del blanco molecular.

Al analizar la diferencia de peso entre los componentes de Ax3.6.14.1 se observó una diferencia de 200 Da. Esta diferencia pudiera corresponder a una modificación postraduccional (Mann y Jensen, 2003; Jensen 2004), o bien a un cambio de dos aminoácidos (Scanlon and Norton, 1994; Linter, 2010).

La dificultad en la purificación final de toxinas animales ya se ha descrito. Este fenómeno corresponde a la presencia de isopéptidos o isotoxinas (Bèress *et al.*, 2000). Cuando una fracción peptídica presenta el mismo tiempo de retención mediante RP-HPLC pero resultan ser diferentes en peso mediante un análisis por espectrometría de masas se denominan isopéptidos (Winter *et al.*, 2009). Estos fenómenos se aprecian en los resultados de este trabajo, por lo que se concluye que son isotoxinas o isopéptidos los que conforman la fracción Ax3.6.14.1, lo que dificulta su separación por los métodos descritos.

Capítulo 5. Conclusiones

- Se trabajó con una muestra homogénea, asegurando la obtención de las mismas fracciones en cada procedimiento de purificación por cada muestreo independiente.
- Se evaluó la fracción Ax3 de exclusión molecular y se identificaron aquellas toxinas nativas que se desempeñan como analgésicos, demostrando que existen más de un compuesto con esta actividad. En el siguiente diagrama se muestran las fracciones que presentaron una actividad analgésica significativa.



- La fracción Ax3.8 es letal en todas las concentraciones evaluadas en este trabajo (1.5, 3 y 4 µg). La letalidad de la fracción pudiera corresponder a un efecto neurotóxico potente, en el que algún componente actúe en el sistema nervioso.
- La implementación de RP-HPLC con buffer de fosfatos como solución A y cambio de solvente orgánico MetOH no mostraron una eficiencia en la separación de los componentes de interés.
- Se logró caracterizar parcialmente **Ax3.6.14.1** que presenta dos componentes (isotoxinas) con los siguientes pesos moleculares
 - **Ax3.6.14.1.1** con un peso de 3433.42 Da y que contiene cuatro residuos de cisteínas.
 - **Ax3.6.14.1.2** con un peso de 3634.54 Da y que contiene cuatro residuos de cisteínas.
- Para la fracción **Ax3.6.14.2** se logró caracterizar parcialmente los siguientes pesos moleculares
 - **Ax3.6.14.2.1** con un peso de 3433.42 Da y que contiene seis residuos de cisteínas.

- **Ax3.6.14.2.1** con un peso de 932.45 Da.
- **Ax3.6.14.2.3** con un peso de 932.45 Da.
- **Ax3.6.14.2.4** con un peso de 932.45 Da.
- **Ax3.6.14.2.5** con un peso de 932.45 Da.

Literatura citada

- AAFP. (2017). American Academy of Family Physicians. Fecha de revisión 7/3/2017.
- Alcántara-Montero A. (2017). Desvenlafaxina y dolor neuropático: beneficios clínicos adicionales de un inhibidor de la recaptación de serotonina-noradrenalina de segunda generación. *Revista de neurología*, 64: 219 - 226.
- Acuña FH, Alvarado J, Garese A, Cortés J. (2012). First record of the sea anemone *Anthopleura nigrescens* (Cnidaria: Actiniaria: Actiniidae) on the Pacific coast of Central America. *Marine Biodiversity Records*, 5: e24. Doi: 10.1017/S175526721200022X.
- Andersson J, Dahlgren U. (2010). HEMA enhances IgG1 production by human B-cells in vitro. *Journal of Dental Research*, 89 (12): 1461 - 1464.
- Andreev YA, Kozlov SA, Koshelev SG, Ivanova EA, Monastyrnaya MIM, Kozlovkaya EP, Grishin EV. (2008). Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *The Journal of Biological Chemistry*, 283(35): 23914 - 23921
- Ariza-Pérez FI. (2015). Evaluación del efecto analgésico de seis α 2-conotoxinas provenientes de *Conus californicus* en respuesta a estímulos nociceptivos. Tesis de licenciatura. UABC.
- Bader P, Ehtle D, Fonteyne V, Livadas K, Meerleer GDB, Paez A, Vranken JH. (2010). Guía clínica sobre el tratamiento del dolor. *European Association of Urology*.
- Basso L, Altier C. (2017). Transient Receptor Potential Channels in neuropathic pain. *Current Opinion in Pharmacology*, 32: 9 – 15.
- Bates AE, Mclean L, Laing P, Raeburn LA, Hare C. (2010). Distribution patterns of *Zoochlorellae* and *Zooxanthellae* hosted by two pacific northeast anemones, *Anthopleura elegantissima* y *A. xanthogrammica*. *The Biological Bulletin*, 218: 237 - 247.
- Barnett CF, Moreno-Ulloa A, Shiva S, Ramirez-Sanchez I, Taub PR, Su Y, Ceballos G, Dugar S, Schreiner G, Villarreal F. (2015). Pharmacokinetic, partial pharmacodynamic and initial safety analysis of (-)-epicatechin in healthy volunteers. *Food and Function*, 6 (3): 824 – 833.
- Baron A, Lingueglia E. (2015). Pharmacology of acid-sensing ion channels- physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology*, 94: 19 - 35.
- Beckmann A, Ozbek S. (2012). The nematocyst: a molecular map of the Cnidarian stinging organelle. *The International Journal of Developmental Biology*, 56: 577-582.
- Benson H, Raja NS, Fishman SM, Liu S, Cohen SP. (2011). Essentials of pain medicine. 3rd edición. Elsevier. Canada. ISBN: 978-1-4377-2242-0.

- Béress L, Bruhn T, Sánchez-Rodríguez J, Wachter E, Schweitz H. (2000). Sea anemone toxins, acting on Na⁺ channels and k⁺ channels: isolation and characterization. En *Animal Toxins, Facts and Protocols*. Rochat H, Martin-Eauclaire MF (Eds.). Birkhäuser BioSciences. ISBN 978-3-0348-8466-2.
- Bigger CH. (1978). *Actinian acrorhagi: their form and function in aggression*. *Dissertation Abstracts International B Sciences and Engineering*, 39 (6): 2617.
- Blanchard MG, Rash LD, Kellenberger S. (2012). Inhibition of voltage-gated Na(+) currents in sensory neurones by the sea anemone toxin APETx2. *British Journal of Pharmacology*, 165 (7): 2167 – 2177.
- Bocharova ES y Kozevich IA. (2011). Modes of reproduction in sea anemones (Cnidaria, Anthozoa). *Biology bulletin*, 38 (9): 849-860.
- Bode HR, David CN. (1978). Regulation of a multipotent stem cell, the interstitial cell of *Hydra*. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 33: 189-206.
- Bolívar F. (1997). Biotechnology in Mexico: Planning for the future. *Nature Biotechnology*, 15: 742 – 743.
- Bolívar F. (2002). *Biología Moderna para el Desarrollo de México en el Siglo XXI: Retos y Oportunidades*, Fondo de Cultura Económica-CONACyT, ISBN 968-16-6537-6, México, D.F.
- Borchania L, Sassib A, Shahbazzadehc D, Strubd JM, Haifa Tounsi-Guettetie M, Boubakere SA, Dorsseleard A, El M. (2011). Heminecrolysin, the first hemolytic dermonecrotic toxin purified from scorpion venom. *Toxicon*, 58 (1): 130–139.
- Brand JF. (1835). *Prodromus descriptionis animalium ab H. Mertensio in orbis terrarum circumnavigatione observatorum*, 75 pp. Sumptibus Academiae, Petropoli, Saint Petersburg.
- Breitkopf SB, Asara JM. (2012). Determining in vivo phosphorylation sites using mass spectrometry. *Current Protocols in Molecular Biology*, 18 (19): 1 - 27.
- Breitkopf SB, Yang X, Begley MJ, Kulkarni M, Chiu YH, Turke AB, Lauriol J, Yuan M, Qi J, Engelman JA, Hong P, Kontaridis MI, Cantley LC, Perrimon N, Asara JM. (2016). A Cross-Species Study of PI3K Protein-Protein Interactions Reveals the Direct Interaction of P85 and SHP2. *Scientific Reports*, 6: 20471.
- Burnstock G. (2016). P2X ion channel receptors and inflammation. *Purinergic Signaling*, 12 (1): 59 – 67.
- Calvete JJ. (2007). Determinación del número de grupos sulfidrilos y de enlaces disulfuro mediante espectrometría de masas. *Proteómica*, 0: 21 - 28.
- Cervino, J.M, R.L. Hayes, S.W. Polson, S.C. Polson, T.J. Goreau, R.J. Martinez y G. W. Smith. (2004). Relationship of *Vibrio* Species Infection and Elevated Temperatures to Yellow Blotch/Band Disease in Caribbean Corals. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (11): 6855-6864.
- Chen Y, Mehok AR, Mant, CT, Hodges RS. (2004). Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited. *Journal of Chromatography A*, 1043 (1): 9 – 18.

- Chen Z, Zhang H, Gu Z, Chen B, Han R, Reid PF, Raymond L, Quin Z. (2006). A long form α -neurotoxin from cobra venom produces potent opioid-independent analgesia. *Acta Pharmacologica Sinica* 27 (4): 402 - 408.
- Csaba G. (2014). Hormones in the immune system and their possible role. A critical review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 61 (3); 241-260.
- Collins AG, Bentlage B, Matsumoto GI, Haddock SHD, Osborn KJ, Schierwater B. (2006). Solution to the phylogenetic enigma of *Tetraplatia*, a worm-shaped cnidarian. *Biology letters*, 2: 120-124.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnistky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH, Raja SN. (2017). Neurophatic pain. *Nat Rev Dis Primers*. Doi: 10.1038/nrdp.2017.2.
- Columbus-Shenkar YY, Sachkova MY, Fridrich A, Modepalli V, Sunagar K, Moran Y. (2017). Dynamics of venom composition across a complex life cycle. *BioRxiv* 159889; <https://doi.org/10.1101/159889>.
- CONANP-BC. (2015). Especies de Animales Protegidas en Baja California. Fecha de revisión 7/3/2017.
- Cristofori-Armstrong B, Rash LD. (2017). Acid-sensing ion channel (ASIC) structure and function: Insights from spider, snake and sea anemone venoms. *Neuropharmacology*, S0028-3908 (17): 30192-2.
- Cypriano DR. (2017). Kinin receptors: Key regulators of autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 16 (2): 192-207.
- David CN. (2012). Interstitial/stem cell in hydra: multipotency and decision-making. *The International Journal of Developmental Biology*, 56: 489 - 497.
- David CN, Challoner D. (1974). Distribution of interstitial cells and differentiating nematocyst in nests in *Hydra attenuata*. *American Zoologist*, 14: 537-542.
- Daly M. (2004). Anatomy and Taxonomy of Three Species of Sea Anemones (Cnidaria: Anthozoa: Actiniidae) from the Gulf of California, Including *Isoaulactinia hespervolita* Daly, n. Sp.l. *Pacific Science*, 58 (3): 377 – 390.
- Daly M, den Hartog JC. (2004). Taxonomy, circumscription, and usage in Anthopleura (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria) from the Gulf of Mexico and Caribbean. *Bulletin of Marine Science*, 74 (2): 401–421,
- De León-Nava MA, Romero-Núñez E, Luna-Nophal A, Bernáldez-Sarabia J, Sánchez-Campos LN, Licea-Navarro AF, Morales-Montor J, Muñiz-Hernández S. (2016). In Vitro Effect of the Synthetic cal14.1a Conotoxin, Derived from *Conus californicus*, on the Human Parasite *Toxoplasma gondii*. *Marine Drugs*, 14 (4): 66.
- Desenclos JC, De Valk H. (2005). Emergent infectious diseases: importance for public health, epidemiology, promoting factors, and prevention. *Médecine et maladies infectieuses*, 35: 49-61.

- Dimond JL, Holzman BJ, Bingham BL. (2012). Thicker host tissues moderate light stress in a cnidarian endosymbiont. *Journal of Experimental Biology*, 215 (Pt 13): 2247 – 2254.
- Diochot S., Lazdunski M. (2009) Sea Anemone Toxins Affecting Potassium Channels. In: Fusetani N., Kem W. (Eds.) *Marine Toxins as Research Tools. Progress in Molecular and Subcellular Biology*, vol 46. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Dixon WJ. (1965). The up-and-down method for small samples. *Journal of the American Statistical Association*, 60 (312): 967–978.
- Douek J, Barki Y, Gateño D, Rinkevich B. (2002). Possible cryptic speciation within the sea anemone *Actinia equina* complex detected by AFLP markers. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 136 (3): 315–320.
- Dutertre S, Jin AH, Vetter I, Hamilton B, Sunagar K, Lavergne V, Dutertre V, Fry BG, Antunes A, Venter DJ, Alewood PF, Lewis RJ. (2014). Evolution of separate predation- and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nature Communications*, 5: 3521. Doi: 10.1038/ncomms4521.
- Elman I, Borsook D, Volkow ND. (2013). Pain and suicidality: insights from reward and addiction neuroscience. *Progress in neurobiology*, 109: 1 - 27.
- Fleuriet K. (2009). Health Care among the Kumiai Indians of Baja California, Mexico: Structural and Social Barriers. *American Indian Culture and Research Journal*, 33 (1): 47 - 63.
- Frazão B, Vasconcelos V, Antunes A. (2012). Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Marine Drugs*, 10: 1812-1851.
- Fry BG. (2005). From genome to venom: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Research*, 15 (3): 403–420.
- Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ, Scheib H, Ramjan SFR, Kochva E. (2006). Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*, 439 (7076): 584–588.
- Fry BG, Roelants K, Champagne DE, Scheib H, Tyndall JD, King GF, Nevalainen TJ, Norman JA, Lewis RJ, Norton RS, Renjifo C, de la Vega RC. (2009). The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 10: 483 - 511.
- Garese A, Guzmán HM, Acuña FH. (2009). Sea Anemones (Cnidaria: *Actiniaria* and *Corallimorpharia*) from Panamá. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44 (3): 791 – 802.
- García-López R, Villegas A, Pacheco-Coronel N, Gómez-Álvarez G. (2017). Traditional use and perception of snakes by the Nahuas from Cuetzalan del Progreso, Puebla, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13: 6.

- Grajales A, Rodríguez E. (2016). Elucidating the evolutionary relationships of the *Aiptasiidae*, a widespread cnidarian–dinoflagellate model system (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria: *Metridioidea*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94 A: 252 – 263.
- Green BR, Olivera BM. (2016). Chapter Three - Venom Peptides from Cone Snails: Pharmacological Probes for Voltage-Gated Sodium Channels. *Current Topics in Membranes*, 78: 65 - 86.
- Gondran M, Eckeli AL, Miguez PV, Gabilan NH, Rodrigues AL. (2002). The crude extract from the sea anemone, *Bunodosoma caissarum* elicits convulsions in mice: possible involvement of the glutamatergic system. *Toxicon*, 40 (12): 1667 - 1674.
- Guilar M, Olivova P, Daly AE, Gebler JC. (2005). Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. *Journal of Separation Science*, 28: 1694–1703.
- González-Muñoz R, Simoes N, Tello-Musi JL, Rodríguez E. (2013). Sea anemones (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) from coral reefs in the southern Gulf of Mexico. *ZooKeys*, 341: 77 – 106.
- Hanukoglu I. (2017). ASIC and ENaC type sodium channels: conformational states and the structures of the ion selectivity filters. *The FEBS Journal*, 284 (4): 525 – 545.
- Harris JB, Goonetilleke A. (2004). ANIMAL POISONS AND THE NERVOUS SYSTEM: WHAT THE NEUROLOGIST NEEDS TO KNOW. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 75 (3): 40 – 46.
- Henschen A. 1986. Analysis of cyst(e)ine residues, disulfide bridges, and sulfhydryl groups in proteins. *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis* (Wittmann-Liebold *et al.*, eds.), Springer Verlag, Berlin, pp.244-255.
- Hu Y, Dong L, Sun B, Guillon MA, Burbach LR, Nunn PA, Liu X, Vilenski O, Ford AP, Zhong Y, Rong W. (2009). The role of metabotropic glutamate receptor mGlu5 in control of micturition and bladder nociception. *Neuroscience Letters*, 450 (1): 12 – 17.
- Hunt SP, Pini A, Evan G. (1987). Induction of *c-fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328: 632 – 634.
- Inserra MC, Lewis RJ. (2011). Venom peptide modulators of the immune system. *Inflammation Allergy Drug Targets*, 10 (5): 399 – 410.
- Ison SH, Clutton RE, Di Giminiani P, Rutherford KMD. (2016). A review of pain assessment in pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, 28 (3): 108 – 116.
- Jannuzzi RG. (2016). Nalbuphine for Treatment of Opioid-induced Pruritus: A Systematic Review of Literature. *The Clinical Journal of Pain*, 32 (1): 87 – 93.
- Jensen ON. (2004). Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8 (1): 33 – 41.

- Jensen JE, Mobli M, Brust A, Alewood PF, King GF, Rash LD. (2012). Cyclisation increases the stability of the sea anemone peptide APETx2 but decreases its activity at acid-sensing ion channel 3. *Marine Drugs*, 10 (7): 1511 – 1527.
- Jouiaei M, Yanagihara AA, Madio B, Nevalainen TJ, Alewood PF, Fry BG. (2015). Ancient venom systems: a review on cnidarian toxin. *Toxins*, 7: 2551 – 2271.
- Junqueira LC y Carneiro J. (2010). *Histología Básica*. 12ª edición. Editorial Panamericana. 556 páginas.
- Kai/Kai Ma. (1989). Cytochemistry of the trigeminal and dorsal root ganglia and spinal cord of the rat. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 93 (1): 183-193.
- Kang J, Ramu S, Lee S, Aguilar B, Ganesan SK, Yoo J, Kaira VK, Koh CJ, Hong YK. (2009). Phosphate-buffered saline-based nucleofection of primary endothelial cells. *Analytical Biochemistry*, 386 (2): 251 – 255.
- Kayal E, Roure B, Philippe H, Collins AG, Lavrov DV. Cnidarian phylogenetics relationships as revealed by mitogenomics. *BMC Evolutionary Biology*, 13: 5-23.
- Kazakevich Y, LoBrutto R. (2007). *HPLC for pharmaceutical scientists*. Wiley-Interscience, USA. ISBN: 0-471-68162-8. 1108 pp.
- Kittredge JS, Isbell AF, Hughes RR. (1967). Isolation and Characterization of the N-Methyl Derivatives of 2-Aminoethylphosphonic Acid from the Sea Anemone, *Anthopleura xanthogrammica*. *Biochemistry*, 6 (1): 289 – 295.
- Kiss R, Keseru GM. (2014). Novel histamine H4 receptor ligands and their potential therapeutic applications: an update. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24 (11): 1185- 1197.
- Klinkenberg B. (2017). E-Fauna BC: Electronic Atlas of the Fauna of British Columbia [www.efauna.bc.ca]. Lab for Advanced Spatial Analysis, Department of Geography, University of British Columbia, Vancouver. [Acceso 3 de marzo de 2017].
- Kohel MAR. (1977). Mechanical diversity of connective tissue of the body wall of sea anemones. *Journal of Experimental Biology*, 69: 107-125.
- Kozlov SA, Andreev IaA, Murashev AN, Skobtsov DI, D'iachenko IA, Grishin EV. (2009). New polypeptide components from the *Heteractis crispa* sea anemone with analgesic activity. *Bioorganicheskaja Khimiia*, 35(6): 789 – 798.
- Labuz D, Spahn V, Özgür CM, Machelska H. (2016). Opioids and TRPV1 in the peripheral control of neuropathic pain – Defining a target site in the injured nerve. *Neuropharmacology*, 101: 330 – 340.

- Lazcano-Pérez F, Hernández-Guzmán U, Sánchez-Rodríguez J, Arrequín-Espinosa R. (2017). Cnidarian Neurotoxic Peptides Affecting Central Nervous System Targets. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 16 (3): 173 – 182.
- Leclère L, Röttinger E. (2017). Diversity of cnidarian muscles: function, anatomy, development and regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Doi.org/10.3389/fcell.2016.00157.
- León-Portilla, M. (2001). Cartografía y crónicas de la antigua California. UNAM. ISBN: 9683689698. 207 p.
- Linter K. (2010). Chapter 36: Peptides and proteins. En: *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*. Edited by Z.D. Draelos© 2010 Blackwell Publishing. ISBN 978-1-4051-8635-3.
- Lively CM y Johnson SG. (1994). Brooding and the evolution of parthenogenesis: strategy models and evidence from aquatic invertebrates. *Proceedings of the Royal Society. London Biological Sciences*, 256: 89 – 95.
- Fu LY, Li Y, Cheng L, Zhou HY, Yao WX, Xia GJ, Jiang MX. (2001). Effect of the sea anemone toxin anthopleurin-Q on sodium current in guinea pig ventricular myocytes. *Acta Pharmacologica Sinica*, 22 (12): 1107 – 1112.
- López FA, García DFI, Clerencia SM, Ortiz LJG. (2006). Dolor. Capítulo 71 En: *Tratado de geriatría para residentes*. Sociedad Española de Geriatría y Gerontología. 816 páginas.
- Lubbock R, Gupta BL, Hall TA. (1981). Novel role of calcium in exocytosis: mechanism of nematocyst discharge as shown by x-ray microanalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78 (6): 3624 - 3628.
- Madio B, Undheim EAB, King GF. (2017). Revisiting venom of the sea anemone *Stichodactyla haddoni*: Omics techniques reveal the complete toxin arsenal of a well-studied sea anemone genus. *Journal of Proteomics*, S 1874-3919 (17): 30241 – 30245.
- Macrander J, Brugler MR, Daly M. (2015). A RNA-seq approach to identify putative toxins from acrorhagi in aggressive and non-aggressive *Anthopleura elegantissima* polyps. *BMC Genomics*, 16: 221.
- Macrander J, Broe M, Daly Marymegan. (2016). Tissue-Specific Venom Composition and Differential Gene Expression in Sea Anemones. *Genome Biology and Evolution*, 8 (8): 2358 – 2375.
- Mann M, Jensen ON. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*, 21; 255 – 261.
- Mant CT, Cepeniene D, Hodges RS. (2010). Reversed-phase HPLC of peptides: Assessing column and solvent selectivity on standard, polar-embedded and polar endcapped columns. *Journal of Separation Science*, 33 (19): 3005 – 3021.
- Miller AC, Pereda AE. (2017). The electrical synapse: molecular complexities at the gap and beyond. *Developmental neurobiology*. Doi: 10.1002/dneu.22484.

- Minagawa S, Ishida M, Shimakura K, Nagashima Y, Shiomi K. (1997). Isolation and amino acid sequences of two Kunitz-type protease inhibitors from the sea anemone *Anthopleura aff. Xanthogrammica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 118B (2): 381 – 386.
- Minagawa S, Sugiyama M, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K. (2008). Kunitz-type protease inhibitors from acrorhagi of three species of sea anemones. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 150: 240 – 245.
- Moldoveanu SC, David V. (2002). *Sample Preparation in Chromatography*, Volume 65, 1st Edition. ISBN: 9780444503947. Elsevier Science. 942 pp.
- Molony V, Kent JE. (1997). Assessment of acute pain in farm animals using behavioural and physiological measurements. *Journal of Animal Science*, 75: 266-272.
- Moran Y, Gordon D, Gurevitz M. (2009). Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels--molecular and evolutionary features. *Toxicon*, 54 (8): 1009–1101.
- Mortari MR, Siqueira Cunha AO, Brandao Ferreira L, Ferreira dos Santos W. (2007). Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: From basic research to therapeutic application. *Pharmacology and Therapeutics*, 114: 171 – 183.
- Naidu KR, Kale UN, Shingare MS. (2005). Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of amlodipine and benazepril hydrochloride from their combination drug product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39: 147–155.
- Nghia ND. (2013). Conotoxins: a source of biomaterial for pharmacology and neuroscience. In *Marine Biomaterials: Characterization, Isolation and Applications* (p. 840). Korea: CRC Press.
- Norton RS. (2006). Sea Anemone Venom Peptides. In *Handbook of Biologically Active Peptides* (p. 1640). Academic Press.
- Norton T, Ohizumi Y, Shibata S. (1981). Excitatory effect of a new polypeptide (anthopleurin-B) from sea anemone on the guinea-pig vas deferens. *British Journal of Pharmacology*, 74 (1): 23–28.
- Norton TR, Shibata M, Kashiwagi M, Bentley J. (1976). Isolation and Characterization of the Cardiotonic Polypeptide Anthopleurin-A from the Sea Anemone *Anthopleura xanthogrammica*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65 (9): 1368 – 1374.
- Norton RS. (2017). Enhancing the therapeutic potential of peptide toxins. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12 (6): 611 – 623.
- Nuchter T, Benoit M, Engel U, Ozbek S, Holstein TW. (2006). Nanosecond-scale kinetics of nematocyst discharge. *Current Biology*, 16 (9): R316-318.
- Oldrati V, Arrell M, Violette A, Perret F, Sprüngli X, Wolfender JL, Stöcklin R. (2016). Advances in venomics. *Molecular BioSystems*, 12 (12): 3530 – 3543.

- OMS. (2017). Organización Mundial de la Salud. Fecha de revisión 7/3/2017.
- Oroz-Parra I, Navarro M, Cervantes-Luevano KE, Álvarez-Delgado C, Salvesen G, Sanchez-Campos LN, Licea-Navarro AF. (2016). Apoptosis Activation in Human Lung Cancer Cell Lines by a Novel Synthetic Peptide Derived from *Conus californicus* Venom. *Toxins*, 8 (2): 38.
- Osmakov DI, Andreev YA, Kozirov SA. (2014) Acid-sensing ion channels and their modulators. *Biochemistry*, 79 (13): 1528-1545.
- Otvos LJ. (2014). Peptide-based drug research and development: relative costs, comparative value. *Pharmaceutical outsourcing*, 15: 16-20.
- Otvos LJ, Wade JD. (2014). Current challenges in peptide-based drugs discovery. *Frontiers in chemistry*, 2: 62. Doi: 10.3389/fchem.2014.00062.
- Ownby CL, Odell GV. (2013). Natural Toxins: Characterization, Pharmacology and Therapeutics. (Elsevier, Ed.) (Revised).
- Ozbek S, Balasubramanian PG, Holstein PW. (2009). Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon*, 54: 1038-1045.
- Palhares MR, Silva JF, Rezende MJS, Santos DC, Silva-Junior CA, Borges M, Ferreira J, Gomez MV, Castro-Junior CJ. (2017). Synergistic antinociceptive effect of a calcium channel blocker and a TRPV1 blocker in an acute pain model in mice. *Life Sciences*, 182: 122 – 128.
- Paniagua MJJ. (2009). In José de Jesús Paniagua Michel (Eds.), *Biología Marina*. AGT Editores. (ID: 13495).
- Peirs C, Seal RP. (2016). Neural circuits for pain: recent advances and current views. *Science* 354 (6312): 578 – 584.
- Pearse VB. (1974). Modification of sea anemone behavior by symbiotic Zooxanthellae: expansion and contraction. *The Biological Bulletin*, 147: 641-651.
- Pereira AM, Brito C, Sanches J, Sousa-Santos C, Robalo JI. (2014). Absence of consistent genetic differentiation among several morphs of *Actinia* (Actiniaria: Actiniidae) occurring in the Portuguese coast. *Zootaxa*, 3893 (4): 595 – 600.
- Philyppov IB, Paduraru ON, Andreev YA, Grishin EV, Shuba YM. (2012). Modulation of TRPV1-dependent contractility of normal and diabetic bladder smooth muscle by analgesic toxins from sea anemone *Heteractis crispa*. *Life Sciences*, 91 (19-20): 912 - 920.
- Plachetzki DC, Fong CR, Oakley TH. (2012). Cnidocyte discharge is regulated by light and opsin-mediated phototransduction. *BMC Biology*, 10 (17): 1-9.
- Plein LM, Rittner HL. (2017). Opioids and the immune system – friend or foe. *British Journal of Pharmacology*. Doi: 10.1111/bph.13750.

- Pope JE, Deer TR, Amirdelfan K, McRoberts WP, Azeem N. (2017). The Pharmacology of Spinal Opioids and Ziconotide for the Treatment of Non-Cancer Pain. *Current Neuropharmacology*, 15 (2): 206 - 216.
- Rajendra W, Armugam A, Jeyaseelan K. (2004). Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon*, 44: 1-17.
- Rebello-Horta CC, Chatzaki M, Rezende BA, Magalhaes BF, Duarte CG, Felicori LF, Ribeiro OMBB, do Carmo AO, Chávez-Olórtegui C, Kalapothakis E. (2016). Cardiovascular-Active Venom Toxins: An Overview. *Current Medicinal Chemistry*, 23(6): 603 - 622.
- Rhoads TW, Williams JR, Lopez NI, Morré JT, Bradford CS, Beckman JS. (2013). Using theoretical protein isotopic distributions to parse small-mass-difference post-translational modifications via mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24 (1): 115 – 124.
- Robichaud LJ, Wurster S, Boxer PA. (1994). The voltage-sensitive Ca²⁺ channel (VSCC) antagonist's ω -Aga-IVA and ω -CTX-MVIIC inhibit spontaneous epileptiform discharges in the rat cortical wedge. *Brain Research*, 643 (1-2): 352–356.
- Robitaille R, Adler EM, Charlton MP. (1993). Calcium channels and calcium-gated potassium channels at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology-Paris*, 87 (1): 15–24.
- Roca-Lapirot O, Radwani H, Aby F, Nagy F, Landry M, Fossat P. (2017). Calcium signaling through L-type calcium channels: role in pathophysiology of spinal nociceptive transmission. *British Journal of Pharmacology*. DOI: 10.1111/bph.13747.
- Rodríguez E, Barbeito MS, Brugler MR, Crowley LM, Grajales A, Gusmão L, Daly M. (2014). Hidden among Sea Anemones: The First Comprehensive Phylogenetic Reconstruction of the Order Actiniaria (Cnidaria, Anthozoa, and Hexacoralia) Reveals a Novel Group of Hexacorals. *PLoS ONE*, 9 (5): e96998. Doi:10.1371/journal.pone.0096998
- Romera E, Perena MJ, Perena MF, Rodrigo MD. (2000). Neurofisiología del dolor. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 7 (2): 11 – 17.
- Rossomando EF. (1998). HPLC in enzymatic analysis. 2nd edition. WILEY Canada. ISBN: 978-0-471-10340-0. 480 pp.
- Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD. (2008). Anthozoa: coral polyps in: *Invertebrate Zoology: Functional and Evolutionary Aspects. Protists and Lower Multicellular Organisms*, Moscow: Akademiya, 2008, vol. 1, pp. 230–243.
- Russo AR. (1984). Space Partitioning within Populations of Sea Anemones (Genus: Anthopleura) in the California Rocky Inter tidal Zone. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 69 (4): 521 – 528.

- Saker E, Henry BM, Tomaszewski KA, Loukas M, Iwanaga J, Oskouian RJ, Tubbs RS. (2016). The human central canal of the spinal cord: a comprehensive review of its anatomy, embryology, molecular development, variants, and pathology. *Cureus*, 8 (12):e927. Doi: 10.7759/cureus.927.
- Schlichter D, Weber W, Fricke HW. (1985). A chromatophore system in the hermatypic, deep-water coral *Leptosersis fragilis* (Anthozoa: Hexacorallia). *Marine Biology*, 89: 143 – 147.
- Schmauss C, Yaksh T. (1984). In vivo studies on spinal opiate receptor system mediating antinociception. II. Pharmacological profiles suggesting a differential association of mu, delta and kappa receptors with visceral chemical and cutaneous thermal stimuli in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 228: 2–12.
- Schulz DJ, Temporal S, Barry DM, Garcia LM. (2008). Mechanisms of voltage-gated ion channel regulation: from gene expression to localization. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (14): 2215-2231.
- Schweitz H, Vincent JP, Barhanin J, Frelin C, Linden G, Hugues M, Lazdunski M. (1981). Purification and Pharmacological Properties of Eight Sea Anemone Toxins from *Anemonia sulcata*, *Anthopleura xanthogrammica*, *Stoichactis giganteus* and *Actinodendron plumosumi*. *Biochemistry*, 20: 5245 – 5252.
- Sebens KP. (1981). Reproductive ecology of the intertidal sea anemones *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt) and *A. elegantissima* (Brandt): Body size, habitat, and sexual reproduction. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 54 (3): 225 – 250.
- Sebens KP. (1981). Recruitment in a Sea Anemone Population: Juvenile Substrate Becomes Adult Prey. *Science*, 213 (4509): 785 – 787.
- Sebens KP. (1984). Agonistic behavior in the intertidal sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. *Biological Bulletin*, 166: 457 – 472.
- Shapiro H, Singer P, Ariel A. (2016). Beyond the classic eicosanoids: Peripherally-acting oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids mediate pain associated with tissue injury and inflammation. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*, 111: 45-61.
- Siebert JAE. (1974). A description of the embryology, larval development, and feeding of the sea anemones *Anthopleura elegantissima* and *A. xanthogrammica*. *Canadian Journal of Zoology*, 52: 1383 – 1388.
- Simms BA, Zamponi GW. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 82 (1): 24–45.
- Stringenz T. (2014). Ziconotide. *Journal of Pain and Palliative Care Pharmacotherapy*, 28: 73–74.
- Structural Genomics Consortium, Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, Berkeley Structural Genomics Center, China Structural Genomics Consortium, Integrated Center for Structure and Function Innovation, Israel Structural Proteomics Center, Joint Center for Structural Genomics, Midwest Center for Structural Genomics, New York Structural GenomiX Research Center for Structural Genomics, Northeast Structural Genomics Consortium, Oxford Protein Production Facility,

- Protein Sample Production Facility, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative, and SPINE2-Complexes. (2008). Protein production and purification. *Nature Methods*, 5 (2): 135–146.
- Sula A, DeCaen P, Naylor C, Zanatta G, Bagneris C, Claphan DE, Pryde D, Wallace BA. (2016). Sodium Channel/Ligand Complex Structures as a Guide for Rational Drug Design. *Biophysical Journal*, 110 (3): 33a.
- Tardent P. (1995). The cnidarian cnidocyte, a high-tech cellular weaponry. *BioEssays*, 17 (4): 351-362.
- Teichert RW, Schmidt EW, Olivera BM (2015). Constellation pharmacology: a new paradigm for drug discovery. *Annual Review of pharmacology and toxicology*, 55: 573-589.
- Tokin BP. (1959). Regeneration and somatic embryogenesis. Leningrad: Leningr. Gros. Univ. 1959.
- Trapani MR, Parisi MG, Maisano M, Mauceri A, Cammarata M. (2016). Old weapons for new war: bioactive molecules from *Cnidarian* internal defense system. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 16 (3): 183 – 196.
- Tsantoulas C, McMahon SB. (2014). Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends in Neurosciences*, 37 (3): 146 - 158.
- Vázquez Botello A. (2008). Evaluación regional de la vulnerabilidad actual y futura de la zona costera mexicana y los deltas más impactados ante el incremento del nivel del mar debido al cambio climático y fenómenos hidro-meteorológicos extremos. Informe final. INE/A1-051/2008. Consultado en: http://www.inecc.gob.mx/descargas/cclimatico/e2008_ev_regional_zcm.pdf
- van Niel JCG, Schneider J, Tzschentke TM. (2016). Efficacy of Full μ -Opioid Receptor Agonists is not Impaired by Concomitant Buprenorphine or Mixed Opioid Agonists/Antagonists – Preclinical and Clinical Evidence. *Drug Research*, 66 (11): 562 – 570.
- Vink S, Alewood PF. (2012). Targeting voltage-gated calcium channels: developments in peptide and small-molecule inhibitors for the treatment of neuropathic pain. *British Journal of Pharmacology*, 167: 970–989.
- Walters KM, Woessner KM. (2016). An Overview of Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Reactions. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 36 (4): 625 - 641.
- Wang CK, Craik DJ. (2016). Cyclic peptide oral bioavailability: Lessons from the past. *Biopolymers: Peptide Science*, 106 (6): 901 – 909.
- Watters MR. (2005). Tropical marine neurotoxins: venoms to drugs. *Seminars in Neurology*, 25 (3): 278 - 289.
- Weber J. (1990). Poly (gamma-glutamic acid) are the major constituents of nematocyst in *Hydra*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 9664-9669.

- Winter D, Pipkorn R, Lehmann WD. (2009). Separation of peptide isomers and conformers by ultra-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 32: 1111 – 1119.
- Woda A, Picard P, Dutheil F. (2016). Dysfunctional stress responses in chronic pain. *Psychoneuroendocrinology*, 71: 127 – 135.
- Woodward SR, Cruz LJ, Olivera BM, Hillyard DR. (1990). Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *The EMBO Journal*, 9 (4): 1015–20.
- Zaharenko AJ, Picolo G, Ferreira WA Jr, Murakami T, Kazuma K, Hashimoto M, Cury Y, de Freitas JC, Satake M, Konno K. (2011). Bunodosine 391: an analgesic acylamino acid from the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Journal of Natural Products*, 74 (3): 378 – 382.
- Zhang ZQ. (2011). Animal biodiversity: An introduction to higher-level classification and taxonomic richness. *Zootaxa*, 3148: 7–12.
- Zhang F, Wu L, Zhao J, Lv T, Hu Z, Weng Z, Wang S, Wu H, Liu H. (2017). Neurobiological Mechanism of Acupuncture for Relieving Visceral Pain of Gastrointestinal Origin. *Gastroenterology Research and Practice*. Doi: 10.1155/2017/5687496.

Anexos

Anexo 1. Soluciones

Acetato de amonio 20 mM (1 litro)

1.5416 g de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

1 litro de agua destilada

PBS 1X (1 litro)

137 mM Cloruro de sodio NaCl,

2.7 mM Cloruro de potasio KCL,

10 mM Bifosfato de sodio Na_2HPO_4 ,

1.5 mM Fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 ,

Ajustar pH = 7.4

Solución A

99.88% Agua ultra pura *MilliQ*

0.12% ácido trifluoroacético TFA

Solución B

99.9% acetonitrilo ACN

0.1% TFA

Anexo 2.- Datos estadísticos numéricos

Ax3 [1.5 µg/g ratón] 30 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|----------|
| F | 29.21 |
| P value | < 0.0001 |
| P value summary | **** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.8950 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------|------------|--------------|---------|--------------------|
| Nalbufina (+) vs. PBS (-) | 7.250 | Yes | **** | < 0.0001 |
| Ax3.2 vs. PBS (-) | 1.250 | No | Ns | 0.2996 |
| Ax3.4 vs. PBS (-) | 1.375 | No | Ns | 0.2549 |
| Ax3.6 vs. PBS (-) | 13.78 | Yes | **** | < 0.0001 |
| Ax3.7 vs. PBS (-) | 1.750 | No | Ns | 0.1507 |
| Ax3.9 vs. PBS (-) | 4.550 | Yes | *** | 0.0008 |
| Ax3.10 vs. PBS (-) | 3.375 | Yes | ** | 0.0086 |

Ax3 [1.5 µg/g ratón] 45 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|--------|
| F | 4.638 |
| P value | 0.0021 |
| P value summary | ** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.5750 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------|------------|--------------|---------|--------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -13.53 | Yes | ** | 0.0018 |
| PBS (-) vs. Ax3.2 | -2.750 | No | Ns | 0.4820 |
| PBS (-) vs. Ax3.4 | -6.150 | No | Ns | 0.1233 |
| PBS (-) vs. Ax3.6 | -15.88 | Yes | *** | 0.0004 |
| PBS (-) vs. Ax3.7 | -4.175 | No | Ns | 0.2890 |
| PBS (-) vs. Ax3.9 | -12.25 | Yes | ** | 0.0018 |
| PBS (-) vs. Ax3.10 | -12.68 | Yes | ** | 0.0018 |

Ax3 [3 µg/g ratón] 30 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|--------|
| F | 3.292 |
| P value | 0.0192 |
| P value summary | * |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.4847 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------|------------|--------------|---------|--------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -7.250 | Yes | * | 0.0270 |
| PBS (-) vs. Ax3.2 | -2.975 | No | ns | 0.3405 |
| PBS (-) vs. Ax3.4 | -3.825 | No | ns | 0.2236 |
| PBS (-) vs. Ax3.6 | -12.53 | Yes | *** | 0.0005 |
| PBS (-) vs. Ax3.7 | -5.225 | No | ns | 0.1014 |
| PBS (-) vs. Ax3.10 | -5.775 | No | ns | 0.0722 |

Ax3 [3 µg/g ratón] 45 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|--------|
| F | 6.253 |
| P value | 0.0003 |
| P value summary | *** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.6459 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|----------------|---------------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -13.53 | Yes | *** | 0.0002 |
| PBS (-) vs. Ax3.2 | -1.400 | No | ns | 0.6489 |
| PBS (-) vs. Ax3.4 | -3.175 | No | ns | 0.3061 |
| PBS (-) vs. Ax3.6 | -13.15 | Yes | *** | 0.0002 |
| PBS (-) vs. Ax3.7 | -7.200 | Yes | * | 0.0261 |
| PBS (-) vs. Ax3.10 | -11.75 | Yes | *** | 0.0002 |
| PBS (-) vs. Ax3.9 | -9.300 | Yes | ** | 0.0053 |

Ax3 [4 µg/g ratón] 30 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|--------|
| F | 6.025 |
| P value | 0.0043 |
| P value summary | ** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.6164 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------|------------|--------------|---------|--------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -7.250 | Yes | ** | 0.0017 |
| PBS (-) vs. Ax3.4 | -1.475 | No | ns | 0.4502 |
| PBS (-) vs. Ax3.6 | -7.000 | Yes | ** | 0.0017 |
| PBS (-) vs. Ax3.7 | -2.475 | No | ns | 0.2129 |

Ax3 [4 µg/g ratón] 45 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|--------|
| F | 3.245 |
| P value | 0.0418 |
| P value summary | * |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.4639 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------|------------|--------------|---------|--------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -13.53 | Yes | * | 0.0131 |
| PBS (-) vs. Ax3.4 | -7.250 | No | ns | 0.1523 |
| PBS (-) vs. Ax3.6 | -12.83 | Yes | * | 0.0131 |
| PBS (-) vs. Ax3.7 | -2.050 | No | ns | 0.6759 |

Ax3.6 [0.1 µg/g ratón] 30 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|--------|
| F | 7.949 |
| P value | 0.0001 |
| P value summary | *** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.6943 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|----------------|---------------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -4.875 | Yes | * | 0.0109 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.2 | -2.650 | No | ns | 0.1987 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.3 | -8.425 | Yes | *** | 0.0004 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.8 | -1.700 | No | ns | 0.4042 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.9 | -5.575 | Yes | * | 0.0109 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.14 | -11.45 | Yes | **** | < 0.0001 |

Ax3.6 [0.1 µg/g ratón] 45 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|----------|
| F | 10.02 |
| P value | < 0.0001 |
| P value summary | **** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.7411 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|----------------|---------------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -11.25 | Yes | *** | 0.0006 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.2 | 2.300 | No | ns | 0.4183 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.3 | -13.85 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.8 | -3.600 | No | ns | 0.2103 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.9 | -0.8000 | No | ns | 0.7768 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.14 | -9.275 | Yes | ** | 0.0032 |

Ax3.6 [0.5 µg/g ratón] 30 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|--------|
| F | 1.489 |
| P value | 0.2300 |
| P value summary | ns |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | No |
| R square | 0.2985 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|----------------|---------------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -9.025 | Yes | * | 0.0242 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.2 | -7.725 | No | ns | 0.0501 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.3 | -8.625 | Yes | * | 0.0242 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.8 | -5.275 | No | ns | 0.1704 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.9 | -5.225 | No | ns | 0.1743 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.14 | -8.525 | Yes | * | 0.0242 |

Ax3.6 [0.5 µg/g ratón] 45 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|----------|
| F | 15.13 |
| P value | < 0.0001 |
| P value summary | **** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.8121 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------|------------|--------------|---------|--------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -11.25 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.2 | -2.075 | No | ns | 0.3557 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.3 | -15.78 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.8 | 0.2500 | No | ns | 0.9105 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.9 | -5.925 | Yes | * | 0.0135 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.14 | -8.400 | Yes | *** | 0.0010 |

Ax3.9 y Ax3.10 [0.5 µg/g ratón] 30 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|--------|
| F | 6.523 |
| P value | 0.0003 |
| P value summary | *** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.6650 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------|------------|--------------|---------|--------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -10.30 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.1 | -3.858 | No | ns | 0.0777 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.2 | -3.550 | No | ns | 0.0794 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.4 | -3.575 | No | ns | 0.0775 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.5 | 0.6750 | No | ns | 0.7303 |
| PBS (-) vs. Ax3.10.2 | -6.000 | Yes | ** | 0.0050 |
| PBS (-) vs. Ax3.10.8 | -5.875 | Yes | ** | 0.0050 |

Ax3.9 y Ax3.10 [0.5 µg/g ratón] 45 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|----------|
| F | 90.61 |
| P value | < 0.0001 |
| P value summary | **** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.9635 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|----------------|---------------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -17.33 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.1 | -0.9750 | No | ns | 0.2966 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.2 | -1.525 | No | ns | 0.1081 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.4 | -3.200 | Yes | ** | 0.0018 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.5 | -12.13 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.10.2 | -3.400 | Yes | ** | 0.0011 |
| PBS (-) vs. Ax3.10.8 | -3.150 | Yes | ** | 0.0011 |

Ax3.9 y Ax3.10 [0.1 µg/g ratón] 30 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|----------|
| F | 29.30 |
| P value | < 0.0001 |
| P value summary | **** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.8952 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------|------------|--------------|---------|--------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -10.30 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.1 | 0.9750 | No | ns | 0.4523 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.2 | -2.800 | Yes | * | 0.0351 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.4 | -2.850 | Yes | * | 0.0351 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.5 | -13.28 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.10.2 | -3.900 | Yes | ** | 0.0034 |
| PBS (-) vs. Ax3.10.8 | -4.150 | Yes | ** | 0.0034 |

Ax3.9 y Ax3.10 [0.1 µg/g ratón] 45 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|--------|
| F | 4.262 |
| P value | 0.0038 |
| P value summary | ** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.5647 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------|------------|--------------|---------|--------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -17.33 | Yes | *** | 0.0005 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.1 | -16.70 | Yes | *** | 0.0005 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.2 | -9.375 | Yes | * | 0.0215 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.4 | -5.575 | No | ns | 0.1559 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.5 | -12.53 | Yes | ** | 0.0032 |
| PBS (-) vs. Ax3.10.2 | -8.975 | Yes | * | 0.0215 |
| PBS (-) vs. Ax3.10.8 | -8.775 | Yes | * | 0.0215 |

Fracciones de interés [0.1 µg/g ratón] 30 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|----------|
| F | 20.48 |
| P value | < 0.0001 |
| P value summary | **** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.8637 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------|------------|--------------|---------|--------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -5.950 | Yes | *** | 0.0002 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.2.1 | 0.3500 | No | ns | 0.8112 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.2.2 | 0.7250 | No | ns | 0.6212 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.2.3 | 1.375 | No | ns | 0.3504 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.3.2 | -12.10 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.14.3 | 1.800 | No | ns | 0.2233 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.14.1 | -9.400 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.14.2 | -11.33 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.5.2 | -4.300 | Yes | ** | 0.0051 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.5.3 | -1.450 | No | ns | 0.3251 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.5.4 | -3.650 | Yes | ns | 0.0161 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.9 | -3.950 | Yes | ** | 0.0051 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.11 | -1.400 | No | ns | 0.3418 |

Fracciones de interés [0.1 µg/g ratón] 45 minutos de latencia

| ANOVA summary | |
|---|----------|
| F | 18.39 |
| P value | < 0.0001 |
| P value summary | **** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0.8506 |

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff. | Significant? | Summary | Individual P Value |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|----------------|---------------------------|
| PBS (-) vs. Nalbufina (+) | -5.725 | Yes | ** | 0.0015 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.2.1 | -7.850 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.3.2 | -12.23 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.14.2 | -12.21 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.14.1 | -17.28 | Yes | **** | < 0.0001 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.9 | -0.02500 | No | ns | 0.9889 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.2.2 | -6.075 | Yes | ** | 0.0015 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.5.2 | -1.525 | No | ns | 0.3994 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.5.3 | 0.02500 | No | ns | 0.9889 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.5.4 | -1.350 | No | ns | 0.4552 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.2.3 | -4.225 | Yes | ns | 0.0231 |
| PBS (-) vs. Ax3.9.11 | -1.350 | No | ns | 0.4552 |
| PBS (-) vs. Ax3.6.14.3 | -2.750 | No | ns | 0.1322 |

Anexo 4.- Cuantificación de las sub-fracciones de cinco minutos obtenidas por RP-HPLC.

| Fracción | Tiempo de colecta | Concentración en μg |
|----------|-------------------|--------------------------------|
| Ax3.1 | 0.00 – 5.56 | 1655 |
| Ax3.2 | 5.62 – 10.06 | 417 |
| Ax3.3 | 10.09 – 15.02 | 398 |
| Ax3.4 | 15.06 – 20.02 | 867 |
| Ax3.5 | 20.06 – 25.02 | 988 |
| Ax3.6 | 25.06 – 30.06 | 2474 |
| Ax3.7 | 30.12 – 15.02 | 3301 |
| Ax3.8 | 35.06 – 40.42 | 2191 |
| Ax3.9 | 40.46 – 45.02 | 2330 |
| Ax3.10 | 45.06 – 50.02 | 1129 |
| Ax3.11 | 50.06 – 55.02 | 423 |
| Ax3.12 | 55.06 – 60.02 | N.A |
| Ax3.13 | 60.06 – 65.16 | N.A |
| Ax3.14 | 65.19 – 70.06 | N.A |

Anexo 5.- Cuantificación de los picos individuales obtenidos por RP-HPLC.

| Fracción | Concentración en μg | Se consideró para análisis <i>in vivo</i> |
|----------|--------------------------------|---|
| Ax3.6.1 | 101.5 | No |
| Ax3.6.2 | 89.5 | Sí |
| Ax3.6.3 | 69 | Sí |
| Ax3.6.4 | 89 | No |
| Ax3.6.5 | 91 | No |
| Ax3.6.6 | 93.5 | No |
| Ax3.6.7 | 78.5 | No |
| Ax3.6.8 | 805 | Sí |
| Ax3.6.9 | 3753.5 | Sí |
| Ax3.6.12 | 10 | No |
| Ax3.6.13 | 125.5 | No |
| Ax3.6.14 | 89 | Sí |
| Ax3.6.15 | 68 | No |
| Ax3.9.1 | 57.5 | Sí |
| Ax3.9.2 | 161 | Sí |
| Ax3.9.4 | 154 | Sí |
| Ax3.9.6 | 36.5 | No |
| Ax3.9.7 | 37.5 | No |
| Ax3.10.1 | 167.5 | No |
| Ax3.10.2 | 116.5 | Sí |
| Ax3.10.4 | 237 | No |
| Ax3.10.6 | 95 | No |
| Ax3.10.7 | 121.5 | No |
| Ax3.10.8 | 92 | Sí |