

## Isolation and prepurification of active compounds in venom from *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa: Pelagiidae) from the Caribbean Sea

### Aislamiento y prepurificación de los compuestos activos presentes en el veneno de *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa: Pelagiidae) del Mar Caribe

J Sánchez-Rodríguez\*, NL Lucio-Martínez

Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Prolongación Niños Héroes s/n, Domicilio conocido, Puerto Morelos CP 77580, Quintana Roo, México.

\* Corresponding author. E-mail: judithsa@cmarl.unam.mx

**ABSTRACT.** Crude extract from *Pelagia noctiluca* was purified using liquid chromatography. The isolated fractions were tested in sea crabs (*Ocypode quadrata*) and neurotoxic activity was observed. The protein content of the crude extract, quantified by the Bradford method, was 0.25 mg mL<sup>-1</sup>. Polyacrylamide gel electrophoresis was used to determine the apparent molecular weight of the different fractions of the crude extract, and several bands were identified: 34, 48, and between 90 and 200 kDa. Haemolytic activity in human blood type A<sup>+</sup> was 100% with 1.1 µg mL<sup>-1</sup> and 50% with 0.98 µg mL<sup>-1</sup> of crude extract. The crude extract was observed under a microscope and three types of nematocysts were found: heterotrichous microbasic eurytele, heterotrichous isorhiza, and holotrichous isorhiza.

**Key words:** isolation, *Pelagia noctiluca*, venom, Caribbean Sea.

**RESUMEN.** El extracto crudo de *Pelagia noctiluca* fue purificado mediante cromatografía de líquidos. Las fracciones aisladas se probaron en cangrejos de mar (*Ocypode quadrata*) y se observó la presencia de actividad neurotóxica. El contenido de proteína, cuantificada mediante el método de Bradford, en el extracto crudo fue 0.25 mg mL<sup>-1</sup>. La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida se empleó para determinar el peso molecular aparente de las diferentes fracciones del extracto crudo, y se identificaron varias bandas: 34, 48 y de 90 a 200 kDa. La unidad hemolítica en eritrocitos humanos del tipo A<sup>+</sup> fue 100% con 1.1 µg mL<sup>-1</sup> y 50% con 0.98 µg mL<sup>-1</sup> del extracto crudo. El extracto crudo se observó bajo el microscopio y se encontraron tres tipos de nematocistos: heterotrico microbásico euritele, heterotrico isoriza y holotrico isoriza.

**Palabras clave:** aislamiento, *Pelagia noctiluca*, veneno, Mar Caribe.

## INTRODUCTION

Cnidarians are the largest phylum of generally toxic animals; however, their toxins and venoms have not received as much attention from scientists as those of terrestrial organisms (e.g., snakes, scorpions, spiders) or other marine organisms (e.g., cone snails) (Turk and Kem 2009).

This phylum provides a large number of natural products, including proteins and secondary metabolites with either toxic or biomedical properties (see Rojas *et al.* 2002 and references therein). Chemical, biochemical, and pharmacological investigations of this phylum have mainly focused on members of the classes Alcyonaria (soft corals and gorgonians), Zooantharia (anemones), and Cubozoa (jellyfishes) (Rojas *et al.* 2002). This phylum is characterized by the presence of nematocysts, which are the secretions of specialized cells that reside mainly in the tentacles of jellyfish, sea anemones, corals, and the polyps of hydroids. The main functions of nematocysts are to obtain food, to defend against predators, and to adhere to solid substrates during locomotion

## INTRODUCCIÓN

Los cnidarios son el filo más grande de animales tóxicos; sin embargo, sus toxinas y venenos no han llamado tanto la atención de los científicos como lo han hecho los de organismos terrestres (e.g., serpientes, escorpiones, arañas) u otros organismos marinos (e.g., *Conus* sp.) (Turk y Kem 2009).

Este filo provee un gran número de productos naturales, entre los que se incluyen proteínas y metabolitos secundarios con propiedades tóxicas o biomédicas (ver Rojas *et al.* 2002 y sus referencias). Las investigaciones químicas, bioquímicas y farmacológicas de este filo se han centrado, principalmente, en los miembros de las clases Alcyonaria (corales blandos y gorgonias), Zooantharia (anémonas) y Cubozoa (cubomedusas) (Rojas *et al.* 2002). Este filo se caracteriza por la presencia de nematocistos, que son la secreción de células especializadas que residen principalmente en los tentáculos de las medusas, anémonas, corales y los pólipos de los hidroides. Las funciones principales de los nematocistos son para obtención del alimento, para defensa contra los depredadores

in the case of the polyps (Kass-Simon and Scappaticci 2002). There are 28 known types of cnidae, which are divided into three subcategories: nematocysts (25 types), spirocysts (2), and ptychocysts (1) (Mariscal *et al.* 1977).

The venom is principally confined to the nematocysts (Kass-Simon and Scappaticci 2002), and the active substances of nematocyst venoms are mainly neurotoxic, cytolytic (Lotan *et al.* 1995 in Sánchez-Rodríguez *et al.* 2006), and antitumoral (Honda *et al.* 1985). Among the antitumoral compounds, prostanoids are capable of inhibiting cell growth in tumor lines by arresting the cells to G1-phase and decreasing the S-phase cells (Honda *et al.* 1985).

Among different jellyfish toxins, cytolytins are probably the most studied (see Torres *et al.* 2001 and references therein). It has been reported that some jellyfish venoms generate electrical activity in different cell models; for example, *Aurelia* sp. venom causes depolarization in frog muscle (Kihara *et al.* 1988 in Torres *et al.* 2001), *Carybdea rastoni* produces a calcium-dependent contractile response in arterial smooth muscle (Azuma *et al.* 1986 in Torres *et al.* 2001), and *Chrysaora* sp. toxins open cationic channels in myelinated frog nerve fibers (Dubois *et al.* 1983 in Torres *et al.* 2001).

Koyama *et al.* (2003) found that the venom from nematocysts isolated from tentacles of the box-jellyfish *Chiropsalmus quadrigatus* (Habu-kurage) produced hypotension followed by hypertension in anaesthetized rabbits. This indicates that the venom has both vasoconstrictor and cardiodepressive effects, and suggests that these thermolabile actions may be due partly to activation of voltage-dependent calcium channels and probably subsequent calcium overload.

*In vitro* haemolytic activity has been reported in a variety of jellyfish venoms (see Bailey *et al.* 2005 and references therein) and against erythrocytes of a number of different species, including humans. In three species of jellyfish, this activity has been attributed to a 43-kDa proteinaceous toxin, recently isolated and sequenced (Nagai *et al.* 2000a/b, Chung *et al.* 2001, Nagai *et al.* 2002 in Bailey *et al.* 2005). The haemolytic toxins isolated from the carybdeid jellyfish *Carybdea rastoni*, *Chiropsalmus quadrigatus*, and *Carybdea alata* showed significant homology with each other, but not with other known proteins, suggesting that these toxins represent a novel class of bioactive proteins (Bailey *et al.* 2005).

Mariottini *et al.* (2002) reported that crude extract from *Pelagia noctiluca* did not cause alteration in cell DNA (V79) but did show cytotoxic properties. The crude venom highly affected cultured fibroblasts and produced a severe decrease in survival at the highest concentration tested (150,000 nematocysts mL<sup>-1</sup>); however, it is well known that the *in vivo* irritating properties of *P. noctiluca* venom have less effects than *Rhizostonna pulmo*, *Anemonia sulcata*, and *Actinia equina* venoms.

*Pelagia noctiluca* is a small pelagic jellyfish, generally of a pink, mauve or light brown color, with a night phosphorescent bell measuring 3 to 12 cm diameter in adult specimens. Eight tentacles arise from the bell edge. It has a wide

y para adhesión al sustrato durante la locomoción en el caso de los pólipos (Kass-Simon y Scappaticci 2002). Existen 28 tipos de cnidos descubiertos hasta ahora, y se dividen en tres subcategorías: nematocistos (25 tipos), espirocistos (2) y ptycicistos (1) (Mariscal *et al.* 1977).

El veneno presente en este filo está confinado principalmente en los nematocistos (Kass-Simon and Scappaticci, 2002), y las sustancias activas del veneno son principalmente neurotóxicas, citolíticas (Lotan *et al.* 1995 en Sánchez-Rodríguez *et al.* 2006) y antitumorales (Honda *et al.* 1985). Entre los compuestos antitumorales, los prostanoides son capaces de inhibir el crecimiento celular en tumores mediante la detención de la fase G-I y la disminución de las células en la fase S (Honda *et al.* 1985).

Entre las diferentes toxinas encontradas en las medusas, las citolisinas son probablemente las más estudiadas (ver Torres *et al.* 2001 y sus referencias). Se ha documentado que algunas toxinas de las medusas generan actividad eléctrica en diferentes modelos celulares; por ejemplo, el veneno de *Aurelia* sp. provoca la despolarización de los músculos de rana (Kihara *et al.* 1988 en Torres *et al.* 2001), *Carybdea rastoni* produce una respuesta contráctil dependiente del canal de calcio en el músculo liso arterial (Azuma *et al.* 1986 en Torres *et al.* 2001) y las toxinas de *Chrysaora* sp. abren canales catiónicos en las fibras nerviosas mielinizadas de rana (Dubois *et al.* 1983 en Torres *et al.* 2001).

Koyama *et al.* (2003) encontraron que las sustancias tóxicas en los nematocistos aislados de los tentáculos de *Chiropsalmus quadrigatus* (Cubomedusae) produjeron hipotensión seguida de hipertensión en conejos anestesiados. Esto indica que el veneno tiene tanto efectos vasoconstrictores como cardiodepresivos, y sugiere que estas acciones pueden deberse, en parte, a la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje y probablemente a una posterior sobrecarga de calcio.

La actividad hemolítica *in vitro* se ha documentado en una variedad de venenos de medusas (ver Bailey *et al.* 2005 y sus referencias) y en contra de eritrocitos de diferentes especies, incluyendo los humanos. En tres especies de medusas, esta actividad ha sido atribuida a una toxina proteica aislada y secuenciada de aproximadamente 43 kDa (Nagai *et al.* 2000a/b, Chung *et al.* 2001, Nagai *et al.* 2002 en Bailey *et al.* 2005). Las toxinas hemolíticas aisladas de las cubomedusas *Carybdea rastoni*, *Chiropsalmus quadrigatus* y *Carybdea alata* mostraron una homología importante entre ellas, pero no con otras proteínas conocidas, lo que sugiere que estas toxinas representan una nueva clase de proteínas bioactivas (Bailey *et al.* 2005).

Mariottini *et al.* (2002) observaron que el extracto crudo de *Pelagia noctiluca* no causó alteración en el ADN celular (V79), pero que sí mostró propiedades citotóxicas. El veneno crudo afectó los fibroblastos cultivados y produjo una disminución severa en la supervivencia a la concentración máxima probada (150,000 nematocistos mL<sup>-1</sup>); sin embargo, es bien sabido que las propiedades irritantes *in vivo* del veneno de

distribution in the oceans of the world, including the North Atlantic and North Pacific (Tibballs 2006).

This species has not caused human fatalities, but accidental contact with the tentacles or bell can cause local pain or urticaria (Mansson *et al.* 1985 in Tibballs 2006). Trawlers and fishing boats have reported problems during epidemics as the jellyfish foul their screws and fishing gear, and fill their nets (Tibballs 2006). Marino *et al.* (2006) isolated nematocysts of *P. noctiluca*, showing the presence of neurotoxic activity and haemolytic power. Maretic *et al.* (1991) studied body homogenates by electrophoresis and observed that *P. noctiluca* venom is of a protein nature, antigenic, and composed of eight fractions, and a cardiotoxin was partly purified from the crude venom (Olson *et al.* 1985 in Mariottini *et al.* 2002).

Little is known about *P. noctiluca* venom except that it is cytotoxic (Mariottini *et al.* 2002) and that its calcium-dependant activation of nematocysts is blocked by treatment with gadolinium (Salleo *et al.* 1994 in Tibballs 2006). The venom is antigenic, and anaphylaxis and the Guillain-Barre syndrome may occur after possible contact (Togias *et al.* 1985, Pang and Schwartz 1993 in Tibballs 2006).

## MATERIAL AND METHODS

Specimens of *P. noctiluca* were collected by near-surface horizontal trawls of 10-min duration using plankton nets at Puerto Morelos reef lagoon (Quintana Roo, Mexico). They were transported to the toxinology laboratory and frozen at  $-60^{\circ}\text{C}$  for 24 h. The crude extract was prepared according to the method modified by Kem *et al.* (1989), frozen at  $-60^{\circ}\text{C}$ , and lyophilized (Labconco 4.5 L) at  $-45^{\circ}\text{C}$  under vacuum.

### Nematocyst identification

To discharge the nematocysts, 3 g of the lyophilized extract was dissolved using 10 mL of distilled water. The solution was centrifuged for 10 min at 4000 rpm at  $4^{\circ}\text{C}$ .

The nematocysts were identified according to Mariscal (1974), based on measures of the diameter of the dish and tubules, and the size, shape, and abundance of thorns on the surface of the tubules.

### Isolation and purification of *P. noctiluca* toxin

The total extract of 4.7 mL was passed through a gel filtration column ( $81 \times 2.3$  cm) packed with Sephadex G-50 M, equilibrated with 0.7 M acetic acid buffer; the elution was performed at a flow rate of  $2.0 \text{ mL min}^{-1}$ . The fractions were concentrated under reduced vacuum.

The active fraction II was passed through a QAE-Sephadex A-25 column ( $48 \times 0.5$  cm); the elution was processed with ammonium acetate buffer of pH 8.5 using a stepwise gradient of 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, and 1 M, at a

*P. noctiluca* muestran menores efectos que los venenos de *Rhizostoma pulmo*, *Anemonia sulcata* y *Actinia equina*.

*Pelagia noctiluca* es una medusa pelágica pequeña de coloración rosa, malva o marrón claro, y tiene una campana que es fosforescente en la oscuridad y mide entre 3 y 12 cm de diámetro en organismos adultos. Esta especie presenta ocho tentáculos que emergen del borde de la campana. Se distribuye ampliamente en los océanos del mundo, incluso en el norte del Atlántico y del Pacífico (Tibballs 2006).

Se sabe que esta especie no ha causado muertes humanas, pero el contacto accidental con sus tentáculos o campana puede causar dolor local o urticaria (Mansson *et al.* 1985 in Tibballs 2006). Se ha observado que, durante sus florecimientos, los barcos de pesca (de arrastre) han tenido problemas debido a que las medusas se adhieren a sus artes de pesca o las dañan (Tibballs 2006). Marino *et al.* (2006) aislaron los nematocistos de *P. noctiluca* y documentaron la presencia de actividad neurotóxica y poder hemolítico. Maretic *et al.* (1991) analizaron extractos homogeneizados mediante electroforesis y encontraron que el veneno de *P. noctiluca* es de naturaleza proteica, tiene propiedades antigénicas y está compuesto por ocho fracciones, y una cardiotoxina se purificó parcialmente del veneno crudo (Olson *et al.* 1985 in Mariottini *et al.* 2002).

Es poco lo que se sabe sobre el veneno de *P. noctiluca*, excepto que es citotóxico (Mariottini *et al.* 2002) y que su activación dependiente del calcio de los nematocistos es bloqueada por el tratamiento con gadolinio (Salleo *et al.* 1994 in Tibballs 2006). El veneno es antigénico y se puede presentar anafilaxia y el síndrome de Guillain-Barre después del contacto (Togias *et al.* 1985, Pang y Schwartz 1993 in Tibballs 2006).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Varios especímenes de *P. noctiluca* se recolectaron mediante arrastres superficiales horizontales de 10 min con redes de plancton en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (Quintana Roo, México). Los organismos se trasladaron al laboratorio de toxinología y se congelaron a  $-60^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. El extracto crudo se preparó de acuerdo con el método modificado por Kem *et al.* (1989), se congeló a  $-60^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó (Labconco 4.5 L) a  $-45^{\circ}\text{C}$  al vacío.

### Identificación de los nematocistos

Se disolvieron 3 g de extracto liofilizado en 10 mL de agua destilada para realizar la descarga de los nematocistos. La solución se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  y 4000 rpm durante 10 min.

Para identificar los nematocistos, se usó la clave de Mariscal (1974), que se basa en las medidas del diámetro de la cápsula y del filamento, y en el tamaño, la forma y la abundancia de las espinas que se encuentran en la superficie de los filamentos.

flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. The active fraction was concentrated under reduced vacuum.

Subsequently, the active fraction was passed through a Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> column (48 × 0.5 cm) equilibrated with 0.01 M ammonium acetate buffer of pH 5.4 using a stepwise gradient of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, and 1 M, at a flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup>. The sample was concentrated under vacuum and desalted in a Sephadex G-25 column (48 × 0.75 cm) with 0.3 M acetic acid at a flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup>. The resulting fractions were concentrated under vacuum.

The purity of the fraction was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a Varian ProStar 410 Autosampler using a Nucleosil C18 reversed-phase column (250 × 4.5 mm), and a linear gradient of 10–90% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid for 70 min at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. The protein concentration was determined according to the method described by Bradford (1976), using a bovine gamma globulin (Bio-Rad) standard.

### Polyacrylamide gel electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed following the method proposed by Laemmli (1970), using a concentration of 12.0% acrylamide at 25 V for 2 h with Tris-Glycine buffer (0.098M and 0.998 M). The gel was stained with Coomassie Blue. Molecular masses were determined by comparison with Bio-Rad Precision Plus Protein standards: 250, 150, 100, 75, 50, 37, and 25 kDa.

### Haemolytic activity

The haemolytic activity of the crude extract was determined according to the method described by Rottini *et al.* (1990) with some modifications. Human erythrocytes were placed in Alsever's solution, at pH 7.4, and on ice to avoid haemolysis. The haemolytic activity was tested using different concentrations of crude extract (0.275 to 1.1 µg mL<sup>-1</sup>). The samples were incubated at 37 °C for 30 min. After centrifugation, haemolysis was measured spectrophotometrically at 415 nm. The 50% haemolytic unit (HU<sub>50</sub>) was calculated.

### Neurotoxic screening

The fractions obtained after purification were tested by intra-muscular injection of 0.01 mL in the base of the third walking leg of the shore crab *Ocypode quadrata* (10–15 g total body weight). Positive reactions were observed as tetanic contractions of the extremities of the shore crabs.

## RESULTS

### Nematocyst identification

The modified method of Kem *et al.* (1989) used to isolate the nematocysts proved to be very efficient. Three different

### Aislamiento y purificación de la toxina de *P. noctiluca*

El extracto total de 4.7 mL se pasó a través de una columna en gel de filtración (81 × 2.3 cm) empacada con Sephadex G-50 M y equilibrada con una solución amortiguadora de ácido acético 0.7 M; la elución se realizó a un flujo de 2.0 mL min<sup>-1</sup>. Las fracciones se concentraron al vacío por medio de un rotavapor.

La fracción activa II se pasó a través de una columna de QAE Sephadex A-25 (48 × 0.5 cm); la elución se procesó con una solución amortiguadora de acetato de amonio con un pH de 8.5 mediante un gradiente escalonado de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1 M, a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La fracción activa se concentró a presión reducida.

Posteriormente, la fracción activa se pasó a través de una columna de Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (48 × 0.5 cm) equilibrada con una solución amortiguadora de acetato de amonio 0.01 M con pH de 5.4 mediante un gradiente escalonado de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 M, a un flujo de 1.5 mL min<sup>-1</sup>. La muestra se concentró al vacío y se desaló en una columna de Sephadex G-25 (48 × 0.75 cm) con una solución amortiguadora de ácido acético 0.3 M a un flujo de 1.5 mL min<sup>-1</sup>. Las fracciones resultantes se concentraron al vacío.

La pureza de la fracción activa se determinó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) en un cromatógrafo Varian ProStar 410 Autosampler mediante una columna de fase reversa Nucleosil C18 (250 × 4.5 mm) y un gradiente lineal de 10% a 90% de acetonitrilo en 0.1% de ácido trifluoroacético por 70 min a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. El contenido de proteínas se determinó según el método descrito por Bradford (1976), con gamma globulina de bovino (Bio-Rad) como estándar.

### Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) se realizó según el método de Laemmli (1970), usando una concentración de acrilamida de 12.0% a 25 V durante 2 h con amortiguador de Tris-Glicina (0.098M y 0.998 M). El gel se tiñó con azul de Coomassie. Las masas moleculares se determinaron mediante la comparación con estándares de proteína Precision Plus Protein (Bio-Rad): 250, 150, 100, 75, 50, 37 y 25 kDa.

### Actividad hemolítica

La actividad hemolítica del extracto crudo se determinó según el método descrito por Rottini *et al.* (1990), con algunas modificaciones. Los eritrocitos de humano se colocaron en una solución de Alsever, a un pH de 7.4 y sobre hielo para evitar la hemólisis. La actividad hemolítica fue probada con distintas concentraciones de extracto crudo (0.275 a 1.1 µg mL<sup>-1</sup>). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 min. Después de la centrifugación, la actividad

nematocysts were found in the crude extract of *P. noctiluca*: heterotrichous microbasic eurytele, heterotrichous isorhiza, and holotrichous isorhiza (fig. 1).

#### Purification of *P. noctiluca* toxin

After the first purification step, each separated fraction was tested in crabs in order to find the active fraction and continue the purification (fig. 2a–d). The active fraction II obtained had strong crab paralyzing activity. Fraction II was chromatographed on a QAE Sephadex A-25 column and an active fraction (B) was found. Fraction B was chromatographed on a Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$  column and an active fraction (C) was isolated. This fraction C was desalted using Sephadex G-25. The crude extract contained 0.25 mg of protein in 1 mL.

#### Polyacrylamide gel electrophoresis

The crude-extract proteins gave apparent molecular weights of 34, 48, and between 90 and 200 kDa (fig. 3).

#### Haemolytic activity

With  $1.1 \mu\text{g protein mL}^{-1}$  of crude extract, the haemolytic activity was 100%, and 50% was achieved with  $0.98 \mu\text{g protein mL}^{-1}$ , using human blood type A<sup>+</sup>. A dose-dependent effect of crude extract can be observed (fig. 4).

hemolítica se midió espectrofotométricamente a 415 nm. Se calculó la unidad hemolítica al 50% ( $\text{UH}_{50}$ ).

#### Monitoreo neurotóxico

En las fracciones obtenidas después de la purificación se llevaron a cabo las pruebas de neurotoxicidad por medio de la inyección intramuscular de 0.01 mL en la base del tercer pereiópodo del cangrejo *Ocypode quadrata* (entre 10 y 15 g de peso corporal). Se definió como reacción positiva la presencia de contracciones tetánicas en las extremidades de los cangrejos.

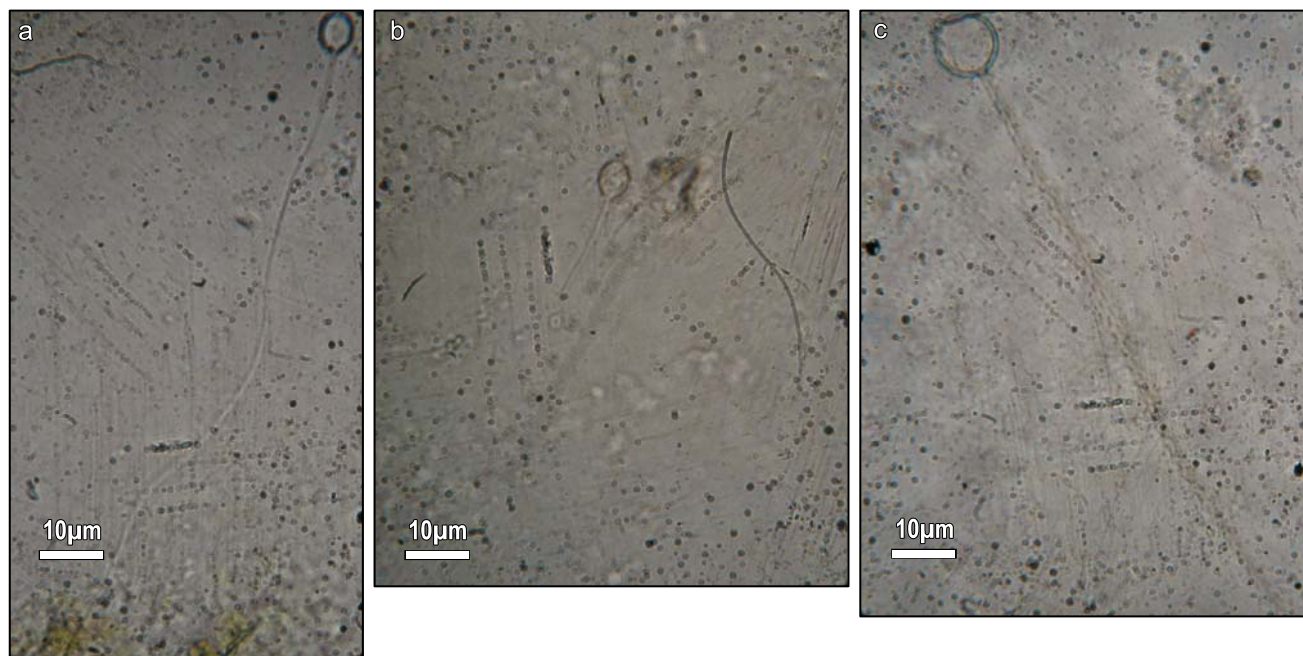
### RESULTADOS

#### Identificación de los nematocistos

El método modificado de Kem *et al.* (1989) empleado para el aislamiento de los nematocistos resultó ser muy eficiente. Se identificaron tres tipos de nematocistos: heterotrico microbásico euritele, heterotrico isorhiza y holotrico isorhiza (fig. 1).

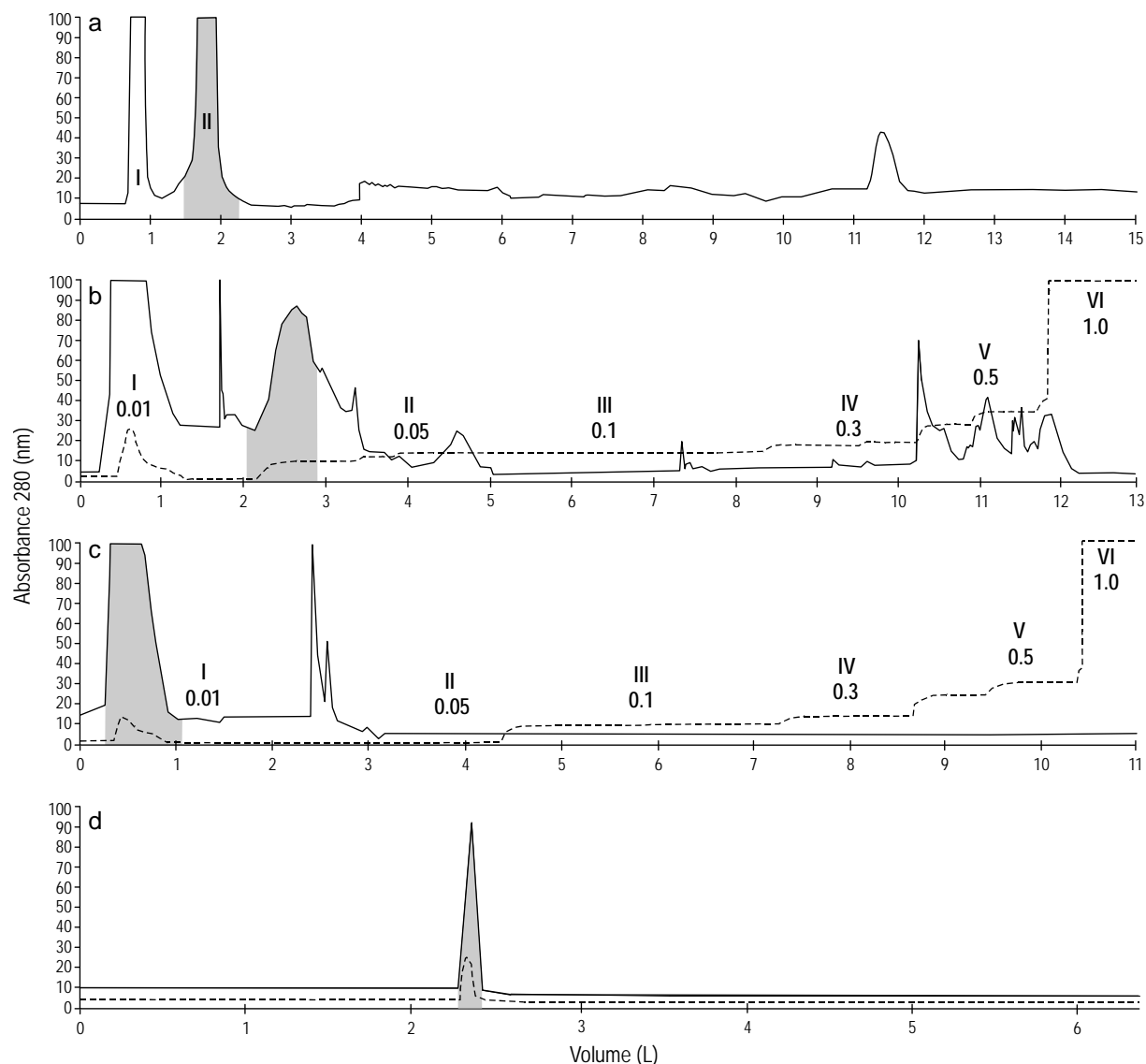
#### Purificación de la toxina de *P. noctiluca*

Después del primer paso de purificación, cada fracción separada fue probada en cangrejos para encontrar las fracciones activas y continuar la purificación (fig. 2a–d). La fracción activa II presentó una fuerte actividad paralizante.



**Figure 1.** Types of nematocysts in *Pelagia noctiluca*: (a) heterotrichous microbasic eurytele, (b) heterotrichous isorhiza, and (c) holotrichous isorhiza.

**Figura 1.** Tipos de nematocistos identificados en *Pelagia noctiluca*: (a) heterotrico microbásico euritele, (b) heterotrico isorhiza y (c) holotrico isorhiza.



**Figure 2.** (a) Shepadex G-50 M elution profile of crude extract from *Pelagia noctiluca*. The column ( $81 \times 2.3$  cm) was equilibrated with 0.7 M acetic acid at a flow rate of  $2 \text{ mL min}^{-1}$  and two active fractions were obtained. (b) Fraction II was processed in a QAE Sephadex A-25 column ( $48 \times 0.5$  cm) at a flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$  with ammonium acetate buffer at pH 8.5, using a stepwise gradient of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, and 1 M. (c) Fractogel column ( $48 \times 0.5$  cm) equilibrated with 0.01 M ammonium acetate at pH 5.4, using a stepwise gradient from 0.01 to 1 M at a flow rate of  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ . (d) The fraction was desalted using a Sephadex G-25 column ( $48 \times 0.75$  cm) with 0.3 M acetic acid at a flow rate of  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ .

**Figura 2.** (a) Perfil de elución Shepadex G-50 M del extracto crudo de *Pelagia noctiluca*. La columna ( $81 \times 2.3$  cm) se equilibró con ácido acético 0.7 M a un flujo de  $2 \text{ mL min}^{-1}$  y se obtuvieron dos fracciones activas. (b) La fracción II se procesó en la columna QAE Sephadex A-25 ( $48 \times 0.5$  cm) a un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  y un amortiguador de acetato de amonio con un pH de 8.5; se usó un gradiente escalonado de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 M. (c) La columna Fractogel ( $48 \times 0.5$  cm) equilibrada con acetato de amonio 0.01 M con un pH de 5.4; se usó un gradiente escalonado a partir de 0.01 hasta 1 M con flujo de  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ . (d) La fracción fue desalada con una columna Sephadex G-25 ( $48 \times 0.75$  cm) y equilibrada con ácido acético 0.3 M a un flujo de  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ .

### Neurotoxic screening

In the neurotoxic assay using  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  of crude extract, death occurred 3 min after injection of 0.10 mL in the base of the third walking leg of the sea crab *O. quadrata*; in the assay using  $8 \text{ mg mL}^{-1}$ , death occurred in the first 60 s.

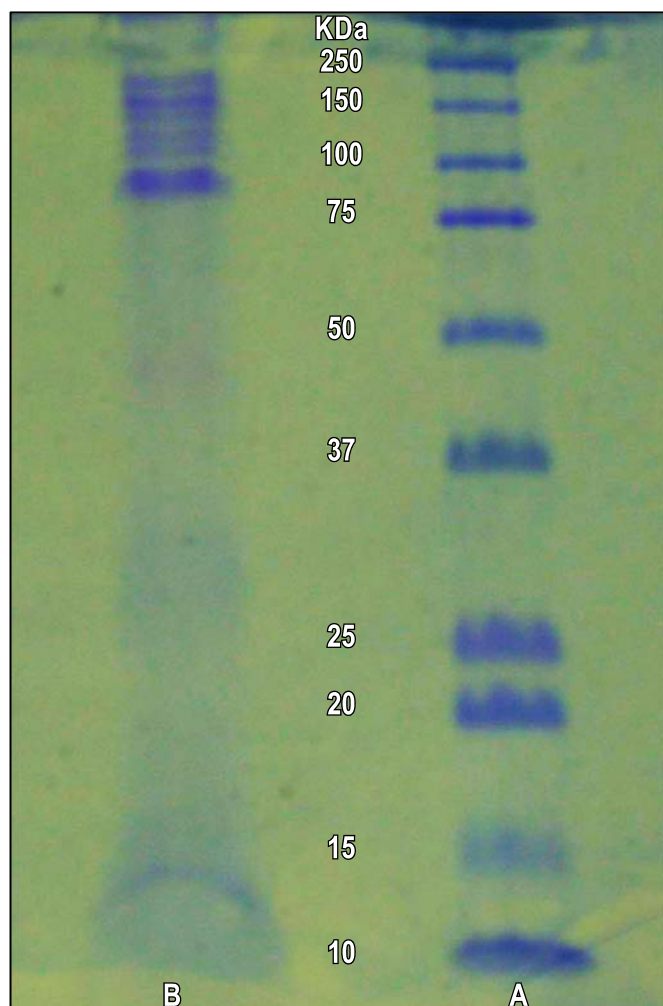
La fracción II se cromatografió en la columna de QAE Sephadex A-25 y se obtuvo una fracción (B) activa. La fracción B se cromatografió en Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$  y se aisló una fracción (C) activa. Esta fracción C se desaló con Sephadex G-25. El extracto crudo contenía  $0.25 \text{ mg}$  de proteína en 1 mL.



## DISCUSSION

Three types of nematocysts were found in *P. noctiluca*: heterotrichous microbasic eurytele, heterotrichous isorhiza, and holotrichous isorhiza. These organelles are considered one of the most complex cellular secretions (Anderluh and Maček 2000). Avian *et al.* (1991) found the same types of nematocysts in this jellyfish.

In relation to the electrophoretic analysis of the crude extract, the separated fractions showed apparent molecular weights of 34, 48, and between 90 and 200 kDa. Similar results have been reported for *Cassiopea andromeda* (5 to 250 kDa), *Cassiopea xamachana* (approximately 10 bands



**Figure 3.** Polyacrylamide mini-slab gel (12%) electrophoresis (performed according to Laemmli 1970): 10  $\mu$ L of crude extract from *Pelagia noctiluca* were injected into band B, while band A was used for comparison with Bio-Rad Precision Plus Protein standards.

**Figura 3.** Electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) (preparado según el método de Laemmli 1970): 10  $\mu$ L de extracto crudo de *Pelagia noctiluca* se inyectaron en la banda B, mientras que la banda A se utilizó para la comparación con los estándares de proteína Precision Plus Protein de Bio-Rad.

## Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas del extracto crudo de *P. noctiluca* presentaron pesos moleculares aparentes de 34, 48 y entre 90 y 200 kDa (fig. 3).

## Actividad hemolítica

El 100% de la actividad hemolítica se alcanzó con 1.1  $\mu$ g de proteína  $\text{mL}^{-1}$  del extracto crudo, mientras que el 50% se alcanzó con 0.98 mg proteína  $\text{mL}^{-1}$ , usando sangre humana del tipo A<sup>+</sup>. Se observó un efecto dependiente de la concentración de extracto crudo (fig. 4).

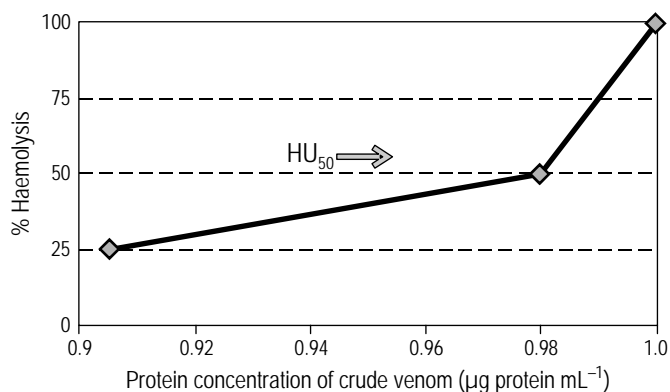
## Monitoreo neurotóxico

En el monitoreo neurotóxico con 5 mg  $\text{mL}^{-1}$  de extracto crudo, los organismos murieron a los 3 min después de la inyección de 0.10 mL en la base del tercer pereiópodo de *O. quadrata*; en el monitoreo con 8 mg  $\text{mL}^{-1}$ , la muerte ocurrió en los primeros 60 s.

## DISCUSIÓN

Se identificaron tres tipos de nematocistos en *P. noctiluca*: heterotrico microbásico euritele, heterotrico isoriza y holotrico isoriza. Estos organelos se consideran como una de las secreciones celulares más complejas (Anderluh y Maček 2000). Avian *et al.* (1991) encontraron resultados similares para la misma especie.

En relación al análisis electroforético del extracto crudo, las fracciones separadas presentaron un peso molecular



**Figure 4.** Haemolytic assay was performed with *Pelagia noctiluca* crude extract on human type A<sup>+</sup> erythrocytes. Cells were suspended in Alsever's solution at pH 7.4. Arrow indicates 50% haemolysis; the corresponding protein concentration is the HU<sub>50</sub>.

**Figura 4.** La cuantificación de la actividad hemolítica se realizó para el extracto crudo de *Pelagia noctiluca* en eritrocitos humanos del tipo A<sup>+</sup>. Las muestras se suspendieron en solución de Alsever a un pH de 7.4. La flecha indica el 50% de hemólisis; la concentración de proteína correspondiente es la HU<sub>50</sub>.

with distinct lines at 90, 150, and 250 kDa), and *Aurelia aurita* (5 to 210 kDa) (Radwan *et al.* 2001). On the other hand, nematocyst venom of mesenteric tentacles of *Chrysaora achlyos* appeared near molecular weights of 35, 50, 55, and 100 kDa (Radwan *et al.* 2000).

In crude extract from *P. noctiluca*, Marino *et al.* (2006) observed that a population of 90 nematocysts per 1  $\mu\text{L}$  with 1.6  $\mu\text{g}$  protein  $\mu\text{L}^{-1}$  on average induces 100% haemolysis in a 0.05% human erythrocyte suspension, after 1 h of incubation. A much lower degree of haemolysis was induced by the crude extract from collapsed capsules, with pH-collapsed nematocysts being less active than spontaneously collapsed capsules. In *Carybdea marsupialis*, the haemolysis to 10 mL of a 0.05% sheep erythrocyte suspension was  $\geq 80\%$  after 11 min at 37 °C and 15 min at 20 °C (Rottini *et al.* 1995), very similar to that of *P. noctiluca*. Compared with the jellyfish *Rhopilema nomadica*, the haemolytic activity is less stable (Gusmani *et al.* 1997).

The biological activity of the cytotoxine was determined in the haemolytic bioassay using fresh human blood, while the neurotoxicity was determined using sea crabs (*O. quadrata*). The  $\text{HU}_{50}$  determined for *P. noctiluca* was 0.98  $\mu\text{g}$  protein  $\text{mL}^{-1}$  of human blood type A<sup>+</sup>. In comparison, in *Chrysaora achlyos*  $\text{HU}_{50}$  was higher in tentacles and lower in the mesentery, similar to the results obtained for *Chrysaora quinquecirrha* (Radwan *et al.* 2000).

Neurotoxic activity was tested in crabs (*O. quadrata*) to determine the biological activity according to Béress and Zwick (1980). Convulsions, paralysis, and even death were the reactions observed in the purified fractions. The toxin proved to be neurotoxic and active in the voltage-dependent ion channels, as described by Béress and Zwick (1980).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to L Celis for helpful comments on the manuscript.

## REFERENCES

- Anderluh G, Maček P. 2000. Review: Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria). *Toxicon* 40: 111–124.
- Avian M, Del Negro P, Rottini L. 1991. A comparative analysis of nematocysts in *Pelagia noctiluca* and *Rhizostoma pulmo* from the North Adriatic Sea. In: Williams R, Cornelius P, Hughes G, Robson E (eds.), *Coelenterate Biology*. Kluwer Academic Publishers, Belgium, pp. 615–621.
- Bailey PA, Bakker AJ, Seymour JE, Wilce JA. 2005. A functional comparison of the venom of three Australian jellyfish—*Chironex fleckeri*, *Chiropsalmus* sp., and *Carybdea xamachana*—on cytolytic  $\text{Ca}^{2+}$ , haemolysis and *Artemia* sp. lethality. *Toxicon* 45: 233–242.
- Béress L, Zwick J. 1980. Purification of two crab-paralyzing polypeptides from the sea anemone *Bolocera tuediae*. *Mar. Chem.* 8: 333–338.

aparente de 34, 48 y entre 90 y 200 kDa. Se han registrado resultados similares para las medusas *Cassiopea andromeda* (5 a 250 kDa), *Cassiopea xamachana* (aproximadamente 10 bandas con líneas distintas a 90, 150 y 250 kDa) y *Aurelia aurita* (5 a 210 kDa) (Radwan *et al.* 2001). Por otro lado, el veneno de los nematocistos en los tentáculos de *Chrysaora achlyos* se ha documentado con un peso molecular de 35, 50, 55 y 100 kDa (Radwan *et al.* 2000).

En el extracto crudo de *P. noctiluca*, Marino *et al.* (2006) mencionan que una muestra de 90 nematocistos por 1  $\mu\text{L}$  con 1.6  $\mu\text{g}$  proteína  $\mu\text{L}^{-1}$  en promedio induce 100% de hemólisis en una suspensión de 0.05% de eritrocitos humanos, después de 1 h de incubación. Un menor grado de hemólisis fue inducido por el extracto crudo de las cápsulas disparadas, ya que los nematocistos de menor pH fueron menos activos que las cápsulas que se dispararon espontáneamente. En *Carybdea marsupialis*, la hemólisis para una solución de 10 mL de eritrocitos de ovino al 0.05% fue  $\geq 80\%$  después de 11 min a 37 °C y 15 min a 20 °C (Rottini *et al.* 1995), muy similar a la de *P. noctiluca*. Comparado con lo observado para *Rhopilema nomadica*, la actividad hemolítica es menos estable (Gusmani *et al.* 1997).

La actividad biológica de la citotoxina se determinó en el bioensayo hemolítico con sangre humana fresca, mientras que la neurotoxicidad se determinó con cangrejos de mar (*O. quadrata*). La  $\text{UH}_{50}$  para *P. noctiluca* se determinó en 0.98  $\mu\text{g}$  proteína  $\text{mL}^{-1}$  de sangre humana tipo A<sup>+</sup>. En comparación con esta actividad, en *Chrysaora achlyos* se ha observado que la  $\text{UH}_{50}$  fue mayor en los tentáculos y menor en el mesenterio, pero con resultados muy próximos a los observados para *Chrysaora quinquecirrha* (Radwan *et al.* 2000).

La actividad neurotóxica se probó en los cangrejos (*O. quadrata*) para determinar la actividad biológica de acuerdo con Béress y Zwick (1980). Las convulsiones, la parálisis e incluso la muerte fueron las reacciones observadas en las fracciones purificadas. La toxina demostró ser una sustancia neurotóxica y activa en los canales iónicos dependientes del voltaje, como lo descrito por Béress y Zwick (1980).

## AGRADECIMIENTOS

Se agradecen a L Celis los valiosos comentarios al manuscrito.

- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Gusmani L, Avian M, Galil B, Patriarca P, Rottini G. 1997. Biologically active polypeptides in the venom of the jellyfish *Rhopilema nomadica*. *Toxicon* 35: 637–648.
- Honda A, Yamamoto Y, Mori Y, Yamada Y, Kikuchi H. 1985. Antileukemic effects of coral-prostanoids clavulones from the



- stolonifer *Clavularia viridis* on human myeloid leukemia (HL-60) cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130: 515–523.
- Kass-Simon G, Scappaticci A. 2002. The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Can. J. Zool.* 80: 1772–1794.
- Kem WR, Paten B, Pennington MW, Dunn BM, Price D. 1989. Isolation and characterization, and amino acid sequence of polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 28: 3483–3489.
- Koyama T, Noguchi K, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Miyagi K, Sakanashi M, Sakanashi M. 2003. Haemodynamic effects of the crude venom from nematocysts of the box-jellyfish *Chiropsalmus quadrigatus* (Habu-kurage) in anaesthetized rabbits. *Toxicon* 41: 621–631.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Maretic Z, Matic-Piantanida D, Ladavac J. 1991. The bloom of the jellyfish *Pelagia noctiluca* in the Mediterranean and Adriatic and its impact on human health. Proceedings of the II Workshop on Jellyfish in the Mediterranean Sea. MAP Technical Reports Series, No. 47 UNEP, Athens, pp. 260–267.
- Marino A, Crupi R, Musci G, La Spada G. 2006. Morphological integrity and toxicological properties of *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa) nematocysts. *Chem. Ecol.* 2: S127–S131.
- Mariottini LG, Sottofattori E, Mazzei M, Robbiano L, Carli A. 2002. Cytotoxicity of the venom of *Pelagia noctiluca forskal* (Cnidaria: Scyphozoa). *Toxicon* 40: 695–698.
- Mariscal R. 1974. Nematocysts. In: Muscatine L, Lenhoff HM (eds.), *Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives*. Academic Press, New York, pp. 132–153.
- Mariscal RN, Conklin EJ, Bigger CH. 1977. The ptychocyst, a major new category of cnida used in tube construction by a cerianthid anemone. *Biol. Bull.* 152: 392–405.
- Radwan FFY, Gershwin LA, Burnett JW. 2000. Toxinological studies on the nematocyst venom of *Chrysaora achlyos*. *Toxicon* 38: 1581–1591.
- Radwan FFY, Burnett JW, Bloom DA, Coliano T, Eldefrawi ME, Erderly H, Aurelian L, Torres M, Heimer-de la Cotera EP. 2001. A comparison of the toxinological characteristics of two *Cassiopea* and *Aurelia* species. *Toxicon* 39: 245–257.
- Rojas A, Torres M, Rojas J, Peregrino A, Heimer-de la Cotera EP. 2002. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon* 40: 777–785.
- Rottini G, Dobrina A, Forgiarini O, Nardon E, Almirante G, Patriarca P. 1990. Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. *Infect. Immun.* 58: 3751–3758.
- Rottini G, Gusmani L, Parovel E, Avian M, Patriarca P. 1995. Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Toxicon* 33: 315–326.
- Sánchez-Rodríguez J, Torrens E, Segura-Puertas L. 2006. Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolytins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom. *Arch. Toxicol.* 80: 163–168.
- Tibballs J. 2006. Australian venomous jellyfish, envenomation syndromes, toxins and therapy. *Toxicon* 48: 830–859.
- Torres M, Aguilar M, Falcón A, Sánchez L, Radwan F, Burnett J, Heimer de la Cotera E, Arellano R. 2001. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon* 39: 1297–1307.
- Turk T, Kem WR. 2009. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon* 54: 1031–1037.

Received October 2010;  
accepted May 2011.