



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

*Universidad Nacional
Autónoma de México*



PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA
PRIMARIA Y ELUCIDACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN
DE TOXINAS PRESENTES EN EL VENENO DE
Millepora complanata

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Doctor en Ciencias

(Química Acuática)

p r e s e n t a

JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

Director de Tesis: Dra. Alejandra Rojas Molina

Comité Tutorial: Dr. Roberto Iglesias Prieto
Dr. Manuel Aguilar Ramírez
Dr. Sergio Rodríguez Morales

México, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Deo lo que es mejor y lo apruebo, pero sigo
haciendo lo peor: es decir, sigo queriendo lo que no
me gustaría querer...

Publio Ovidio Nasón

Para María Jesús y José Alfredo

Millepora coplanata



Taxonomía

Reino: Animalia

Phylum: Cnidaria

Clase: Hydrozoa

Subclase: Hydroidolina

Orden: Anthoathecata

Suborden: Capitata

Familia: Milleporidae

Género: *Millepora*

Descripción:

Colonias de pólipos que secretan esqueletos calcáreos con forma de láminas finas que se extienden verticalmente desde una base incrustada.

Hábitat:

Se encuentra a profundidades de 0.5 a 10 m en las crestas del arrecife, zonas de rompientes, arrecifes de mar adentro y zonas de surcos.

Distribución:

Mar Caribe

Referencias:

Lewis, 2006; Schuchert, 2009

SITIOS DE REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO

Departamento de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro.

Laboratorio de Neurofarmacología Marina, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro.

Laboratorio de Patología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro.

Unidad Académica de Puerto Morelos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Quintana Roo.

Departamento de Fisiología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.

Unidad de Microscopía, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.

Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.

Departamento de Química, CINVESTAV- Instituto Politécnico Nacional. Distrito Federal, México.

Este trabajo se realizó contando con el apoyo de una beca de tiempo completo otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), número de becario 161723.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. César Ibarra Alvarado, por su valiosa asesoría, sugerencias y aportaciones durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Manuel Aguilar Ramírez, por su colaboración y asesoría durante el fraccionamiento cromatográfico del extracto de *M. complanata* así como por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Edgar P. Heimer de la Cotería su apoyo y sugerencias.

Al Dr. Roberto Iglesias Prieto, por su valiosa colaboración y aportaciones que hicieron posible la realización de los experimentos de blanqueamiento artificial de *M. complanata* y *M. alcicornis*.

Al Dr. Martín García Servín, por su colaboración y asesoría para el manejo adecuado de los animales de experimentación.

Al Dr. Marco Antonio Gallegos, por su colaboración en la evaluación de los daños histopatológicos causados por el extracto de *M. complanata* en los animales de experimentación.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda, por su colaboración en la realización de los análisis espectroscópicos de las fracciones.

A la Dra. Mabel Fregoso, por su colaboración y asesoría durante el proceso de repurificación mediante el método de reciclaje y corte.

Al Dr. Manuel Soriano por su colaboración en la obtención de los análisis de espectrometría de masas de los compuestos purificados.

Al Dr. Moustapha Bah por su valiosa colaboración en la interpretación de los resultados espectroscópicos y espectrométricos.

A la Bióloga María Eugenia Ramos (q.e.p.d), por su colaboración en la primera recolecta de los fragmentos de *M. complanata*.

Al Biólogo Andrés Falcón Alcántara, por la asesoría brindada durante el proceso de fraccionamiento cromatográfico del extracto de *M. complanata* mediante FPLC.

A Claudia Moreira y Flor Colombo, por su colaboración en la segunda recolecta de los fragmentos de *M. complanata*, así como también por su asesoría y apoyo durante la inducción del blanqueamiento de los fragmentos del hidrocoral.

A la Bióloga Lourdes Palma Tirado, por su colaboración en la obtención de las imágenes de los nematocistos de *M. complanata* mediante Microscopía Electrónica de Transmisión.

Al Biólogo Armando Zepeda Rodríguez, por su colaboración en la obtención de las imágenes de los nematocistos de *M. complanata* mediante Microscopía Electrónica de Barrido.

A mis compañeras de laboratorio Rosalina Hernández y Alma Vuelvas por su apoyo durante la realización de algunos experimentos.

A los miembros de mi comité tutorial, integrado por los doctores Manuel Aguilar, Roberto Iglesias y Sergio Rodríguez por sus valiosas recomendaciones brindadas durante la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado designado para la revisión de este manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.

A la Coordinadora del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, la Dra. Gloria Vilaclara por sus valiosos consejos y su gran apoyo durante mi permanencia dentro de este posgrado.

De manera muy especial, agradezco a la Dra. Alejandra Rojas Molina por la dirección de esta tesis, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y sobre todo por creer en mí, haciendo aumentar mi autoconfianza y despertar mi gusto por la investigación.

RESUMEN

Millepora complanata es un cnidario que se encuentra habitualmente en arrecifes coralinos del Caribe Mexicano. Este organismo se conoce comúnmente como “coral de fuego” debido a su capacidad de causar lesiones dolorosas, similares a quemaduras, en la piel humana después del contacto. Recientemente, en experimentos realizados *in vitro*, nuestro grupo de trabajo detectó en el extracto acuoso preparado a partir de *M. complanata* la presencia de proteínas que poseen diversos efectos tóxicos y farmacológicos, que incluyen actividad hemolítica y excitación en la contractilidad del músculo liso arterial e intestinal. En el presente estudio, se evaluaron los efectos tóxicos sistémicos producidos por el extracto acuoso de este hidrocoral en ratones. Adicionalmente, con el objeto de purificar e identificar los principales componentes responsables de los efectos farmacológicos y toxicológicos inducidos por el extracto acuoso, éste se fraccionó cromatográficamente y, posteriormente, se realizó un análisis cromatográfico de las fracciones bioactivas.

Los resultados obtenidos en la presente investigación indicaron que el extracto acuoso de *M. complanata*, administrado por vía intravenosa, induce violentas convulsiones y la muerte en ratones en menos de un minuto, con una dosis letal media (DL₅₀) de 4.62 µg de proteína/g de peso corporal. Se encontró también que dosis menores a la DL₅₀ (1.33, 2.67 y 4.00 µg de proteína/g) produjeron daños histopatológicos asociados con la presencia de citolisinas en tejido pulmonar y renal. Cuando el extracto se sometió a condiciones desnaturalizantes, el efecto letal se conservó, en tanto que el daño histopatológico desapareció, lo cual sugirió que las toxinas responsables de la neurotoxicidad y la muerte en ratones eran compuestos termoestables, posiblemente metabolitos secundarios, mientras que las toxinas que provocaban el daño tisular eran de naturaleza peptídica.

A partir del análisis cromatográfico del extracto acuoso de *M. complanata* se purificó una proteína de 61 kDa con efecto vasoconstrictor. Adicionalmente, se detectó la presencia de diferentes compuestos vasoconstrictores de naturaleza no proteica. La fracción MC1-IIA, obtenida después de un proceso de análisis de tres pasos (cromatografía de intercambio aniónico, de exclusión y de adsorción en fase reversa), resultó ser particularmente interesante debido a que además de inducir contracción del músculo liso arterial, provocó una hemólisis retardada e indujo efectos neurotóxicos en ratones, ocasionándoles una muerte inmediata. Estos efectos resultaron ser idénticos a los provocados por la administración del extracto acuoso total de *M. complanata*. El posterior análisis cromatográfico de MC1-IIA indicó que ésta constaba de al menos 4 metabolitos secundarios que fueron nombrados: IIA-2-1, IIA-2-2, IIA-3-1 y IIA-3-2. El análisis espectroscópico y espectrométrico de dichos metabolitos indicó que se trata de compuestos hidrocarbonados polihidroxilados.

De manera adicional, un estudio realizado con el extracto acuoso preparado a partir de especímenes artificialmente blanqueados del hidrocoral, indicó que los componentes responsables de los efectos tóxicos y farmacológicos provienen del cnidario y no de sus zooxantelas simbiotes. Además, mediante un análisis

microscópico se encontró que *M. complanata* posee nematocistos de tipo macrobásico mastigóforo y estenoteles.

En el presente trabajo se encontraron por primera vez, toxinas letales de naturaleza no proteica en una especie de la clase Hydrozoa y se puso en evidencia la gran riqueza estructural que presentan las toxinas producidas por los organismos del género *Millepora*.

Palabras clave:

Millepora complanata, coral de fuego, toxicidad, daños histopatológicos, blanqueamiento, nematocistos.

ABSTRACT

M. complanata is a cnidarian widely distributed in the coral reefs of the Mexican Caribbean. This species is popularly known as “fire coral”, since contact with it causes severe pain, skin eruptions and blisters. Previous *in vitro* experiments, carried out by our research group, showed that the aqueous extract of this hydrocoral contained proteins that induced several pharmacological and toxic effects, which include hemolysis and stimulation of intestinal and arterial smooth muscle contractility. In the present study, the systemic toxicity of *M. complanata* aqueous extract was assessed in mice. Additionally, a bioactivity directed chromatographic fractionation of the extract was performed and the bioactive fractions were further analyzed in order to isolate the compounds responsible for the pharmacological and toxicological activities induced by the extract.

The results obtained in the present study indicated that intravenous administration of the extract induced violent convulsions and death in mice within 1 min ($LD_{50} = 4.62 \mu\text{g protein/g}$ of body weight). Doses less than the LD_{50} (1.33, 2.67 y $4.00 \mu\text{g protein/g}$) produced kidney and lung histopathological damage attributed to the presence of cytolytic toxins. Histopathological changes were completely eliminated after incubation of the extract in denaturing conditions. Unexpectedly, the denatured extract conserved its lethal effect. These findings suggested that the *M. complanata* extract contained hemolysins that might be responsible for the histopathological changes observed in kidney and lung. Additionally, this extract contained other unidentified thermostable toxins, likely secondary metabolites, that have lethal effects in mice.

Chromatographic analysis of the extract led to the isolation of a 61 kDa vasoconstrictor protein. Additionally, several non-peptidic vasoconstrictor compounds were detected. Particularly interesting, fraction MC1-IIA, obtained by a three-step process (ion exchange, gel filtration and reverse phase chromatography), induced vasoconstriction, delayed hemolysis, and lethal effects in mice. These effects resembled those produced by the crude extract. A subsequent chromatographic analysis of MC1-IIA showed that this fraction contained at least four secondary metabolites, which were named as IIA-2-1, IIA-2-2, IIA-3-1, and IIA-3-2. Analysis of mass spectrometric and NMR spectroscopic data indicated that these metabolites were poly-hydroxylated compounds.

In addition, the influence of bleaching on the pharmacological and toxic effects of the extract was explored. This study showed that the presence of the symbionts does not importantly influence the biological activities induced by *M. complanata* extract, and indicated that cnidarians are the main source of the bioactive compounds. Finally, structural characteristics of *M. complanata* nematocysts were examined using light microscopy, as well as scanning and transmission electron microscopy. Two types of nematocysts were observed, the most abundant type was identified as macrobasic mastigophore and the other one belonged to the stenotele type.

The present study constitutes the first report of the presence of a non-peptidic lethal toxin in an organism of the class Hydrozoa, and evidenced the great structural diversity of the toxins produced by *Millepora* species.

Key words: *Millepora complanata*, fire coral, toxins, histopathological damage, bleaching, nematocysts.

ÍNDICE GENERAL

| Contenido | Página |
|--|--------|
| RESUMEN | |
| ABSTRACT | |
| ÍNDICE GENERAL | i |
| ÍNDICE DE CUADROS | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vii |
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Antecedentes | 4 |
| 2.1. Phylum Cnidaria | 4 |
| 2.1.1. Clasificación del phylum Cnidaria | 4 |
| 2.1.2. Cnidocitos y cnidocistos (nematocistos, espirocistos y pticocistos) | 6 |
| 2.1.3. Venenos de cnidarios | 8 |
| A. Neurotoxinas | 8 |
| B. Citolisinas | 13 |
| C. Metabolitos secundarios | 17 |
| 2.2. Género <i>Millepora</i> | 23 |
| 2.2.1. Simbiosis <i>Millepora-Symbiodinium</i> | 23 |
| 2.2.2. Toxicidad | 28 |

| | |
|--|----|
| 3. Hipótesis | 33 |
| 4. Objetivos | 33 |
| 4.1. General | 33 |
| 4.2. Específicos | 33 |
| 5. Materiales y métodos | 34 |
| 5.1. Recolección y transporte de los especímenes de <i>M. complanata</i> | 34 |
| 5.2. Preparación del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> | 35 |
| 5.3. Bioensayos | 35 |
| 5.3.1. Análisis de letalidad en ratones y evaluación de los daños histopatológicos causados por el extracto acuoso | 35 |
| 5.3.2. Ensayo para evaluar la actividad dermonecrótica | 36 |
| 5.3.3. Modelo de aorta aislada de rata | 36 |
| 5.3.4. Ensayo de hemólisis | 37 |
| A. Hemólisis retardada para identificación de palitoxina | 38 |
| 5.3.5. Ensayo de actividad de PLA ₂ | 38 |
| 5.3.6. Ensayo para determinar actividad caseinolítica | 39 |
| 5.4. Fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> mediante FPLC | 39 |
| 5.5. Análisis de las fracciones mediante HPLC en fase reversa | 40 |
| 5.6. Electroforesis en gel | 41 |
| 5.7. Obtención de los compuestos no proteínicos mediante el método de reciclaje y corte | 41 |
| 5.8. Análisis espectroscópico y espectrométrico de los compuestos no proteínicos purificados | 42 |

| | |
|--|----|
| 5.9. Efecto del blanqueamiento sobre la actividad farmacológica del extracto de <i>M. complanata</i> | 42 |
| 5.10. Identificación de los nematocistos presentes en <i>M. complanata</i> | 43 |
| 5.10.1. Extracción de los nematocistos | 43 |
| 5.10.2. observación microscópica de los nematocistos | 44 |
| 5.11. Análisis estadísticos | 45 |
| 6. Resultados | 46 |
| 6.1. Preparación del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> | 46 |
| 6.2. Efectos farmacológicos del extracto de <i>M. complanata</i> | 46 |
| 6.2.1. Letalidad en ratones | 46 |
| 6.2.2. Efectos sistémicos | 47 |
| 6.2.3. Daños histopatológicos | 47 |
| 6.2.4. Efecto dermonecrótico | 49 |
| 6.2.5. Efecto vasoconstrictor | 49 |
| 6.2.6. Efecto hemolítico | 49 |
| 6.2.7. Actividad enzimática | 50 |
| 6.3. Fraccionamiento cromatográfico biodirigido | 56 |
| 6.3.1. Cromatografía de intercambio iónico mediante FPLC | 56 |
| 6.3.2. Cromatografía de exclusión mediante FPLC | 56 |
| 6.3.3. Análisis de la fracción MC1-I mediante HPLC | 61 |
| 6.3.4. Análisis de la fracción MC1-II mediante HPLC | 69 |
| 6.4. Efecto del blanqueamiento sobre la actividad farmacológica del extracto de <i>M. complanata</i> | 78 |
| 6.5. Identificación de microscópica de los nematocistos de <i>M. complanata</i> mediante microscopía | 83 |
| 7. Discusión | 89 |

| | |
|-----------------|-----|
| 8. Conclusiones | 104 |
| 9. Bibliografía | 106 |

ANEXO I

Análisis espectroscópicos y espectrométricos de IIA-2-2, IIA-3-1
y IIA-2-1

ANEXO II

Publicaciones derivadas de este trabajo

ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Secuencia de aminoácidos de algunas neurotoxinas de anémoma que actúan sobre canales de sodio dependientes de voltaje | 11 |
| 2 | Secuencia de aminoácidos de algunas neurotoxinas de anémoma que actúan sobre canales de potasio dependientes de voltaje | 12 |
| 3 | Secuencia de aminoácidos de algunas actinoporinas | 14 |
| 4 | Secuencia de aminoácidos de algunas sPLA ₂ de venenos de cnidarios | 17 |
| 5 | Metabolitos secundarios aislados de hidroides marinos | 21 |
| 6 | Secuencia de aminoácidos de MCTx-1 purificada a partir de <i>M. dichotoma</i> var. <i>tenera</i> | 32 |
| 7 | Tiempos de retención de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de MC1-I mediante HPLC en fase reversa | 62 |
| 8 | Evaluación de la actividad hemolítica de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de MC1-I mediante HPLC en fase reversa (n = 3) | 65 |

| Cuadro | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 9 | Evaluación de la actividad vasoconstrictora de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de MC1-I mediante HPLC en fase reversa (n = 2) | 66 |
| 10 | Tiempos de retención de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de MC1-II mediante HPLC en fase reversa | 70 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Compuestos cembranoides encontrados en cnidarios. | 18 |
| 2 | Estructura química de la palitoxina | 19 |
| 3 | Fotografías subacuáticas de algunas especies del género <i>Millepora</i> | 26 |
| 4 | Fotografías subacuáticas que muestran el blanqueamiento natural de algunas especies | 27 |
| 5 | Fotografías que muestran algunas de las lesiones en la piel humana causadas por el contacto con especies del género <i>Millepora</i> | 29 |
| 6 | Fotografías de microscopía de luz que muestran los cambios histológicos de los ratones que murieron después de administrar el extracto de <i>M. complanata</i> a una dosis de 4.00 µg de proteína por g de peso corporal por vía i.v. | 51 |
| 7 | Cambios en los niveles de actividad de ALT y AST en suero de ratones 1 hora después de inyectarles el extracto de <i>M. complanata</i> por vía i.v. a dos diferentes dosis | 52 |
| 8 | Cambios en la piel de los ratones causados 24 horas después de la administración i.d. del extracto de <i>M. complanata</i> (3.3 µg de proteína/g de peso corporal) | 53 |

| Figura | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 9 | Efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de <i>M. complanata</i> sobre segmentos de aorta aislados de rata | 54 |
| 10 | Efecto hemolítico inducido por el extracto de <i>M. complanata</i> sobre eritrocitos de rata | 55 |
| 11 | Perfil cromatográfico del extracto de <i>M. complanata</i> en DEAE-celulosa indicando las fracciones que se colectaron | 57 |
| 12 | Perfil cromatográfico de la fracción MC1 del extracto de <i>M. complanata</i> en Sephadex G-15 indicando las fracciones que se colectaron | 58 |
| 13 | Efecto hemolítico y vasoconstrictor de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico de MC1 en Sephadex G-15 | 60 |
| 14 | Perfil cromatográfico de la fracción MC1-I analizada mediante HPLC en fase reversa | 63 |
| 15 | Barrido que muestra el perfil cromatográfico de la fracción MC1-I analizada mediante HPLC en fase reversa a diferentes longitudes de onda (λ de 205 a 400 nm) | 64 |
| 16 | Efecto vasoconstrictor de las fracciones MC1-IA, MC1-IB y MC1-IC sobre el tono de la aorta de rata comparado con el efecto de la fenilefrina obtenido sobre el mismo tejido | 67 |

| Figura | Página | |
|---------------|---|----|
| 17 | (A) SDS-PAGE de la fracción MC1-IG obtenida a partir del análisis de la fracción MC1-I mediante HPLC en fase reversa. (B) Efecto vasoconstrictor de la fracción MC1-IG (0.4 µg de proteína/ml) comparado con el efecto de la fenilefrina (1 µM) sobre el mismo tejido | 68 |
| 18 | Perfil cromatográfico de la fracción MC1-II analizada mediante HPLC en fase reversa | 71 |
| 19 | Barrido que muestra el perfil cromatográfico de la fracción MC1-II analizada mediante HPLC en fase reversa a diferentes longitudes de onda (λ de 205 a 400 nm) | 72 |
| 20 | Efectos farmacológicos de la fracción MC1-IIA | 73 |
| 21 | Espectro de ^1H RMN de la fracción MC1-IIA | 75 |
| 22 | Proceso de repurificación de MC1-IIA mediante HPLC en fase reversa empleando el método de reciclaje y corte | 77 |
| 23 | Fotografías de fragmentos representativos de <i>M. complanata</i> después del periodo experimental para inducir su blanqueamiento con elevación de la temperatura | 80 |
| 24 | SDS-PAGE de los extractos obtenidos a partir de los fragmentos de <i>M. complanata</i> pertenecientes a los grupos control y blanqueado | 81 |

| Figura | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 25 | Curvas Concentración-respuesta que muestran la actividad vasoconstrictora y hemolítica de los extractos de <i>M. complanata</i> obtenidos a partir de los fragmentos blanqueados y controles | 82 |
| 26 | Esquema del nematocisto de tipo macrobásico mastigóforo | 84 |
| 27 | Fotomicrografías de nematocistos de tipo macrobásico mastigóforo encontrados en <i>M. complanata</i> | 85 |
| 28 | Esquema del nematocisto de tipo estenotele. | 87 |
| 29 | Fotomicrografías de nematocistos de tipo estenotele encontrados en <i>M. complanata</i> | 88 |
| 30 | Fotomicrografías de nematocistos de tipo estenotele encontrados en <i>M. complanata</i> | 87 |

1. Introducción

Millepora complanata es un cnidario de exoesqueleto calcáreo, perteneciente a la clase Hydrozoa, que se encuentra ampliamente distribuido en arrecifes de coral del Caribe Mexicano. Las especies pertenecientes al género *Millepora* se conocen comúnmente como “corales de fuego” debido a que producen lesiones dolorosas, similares a quemaduras, en la piel humana después del contacto. Estas lesiones generalmente incluyen escozor, eritema y formación de ampollas (Sagi et al., 1987; Bianchini et al., 1988). La capacidad de estos hidrocorales para inducir sus efectos dañinos se debe a la presencia de toxinas de estructura desconocida almacenadas en sus nematocistos, orgánulos urticantes característicos utilizados por todos los cnidarios para defensa y captura de presas (Tardent, 1995).

Aunque son comunes los casos de quemaduras causadas por el contacto accidental con los “corales de fuego”, debido a su amplia abundancia en los arrecifes, existen pocos reportes clínicos de estos casos. Esto se debe principalmente a que las lesiones, a pesar de ser dolorosas, suelen desaparecer en el transcurso de una semana aproximadamente. Una razón más que explica esta falta de casos documentados, es que hasta el momento no existe un tratamiento adecuado para las lesiones causadas por estos hidrocorales, por lo que las personas afectadas recurren generalmente al uso de remedios caseros. Sin embargo, existen reportes de complicaciones sistémicas severas en humanos tras el contacto con estos hidrocorales. Por ejemplo, una mujer de 52 años de edad presentó neuropatía del nervio torácico largo con parálisis del músculo serrato anterior (Moats, 1992), mientras que una mujer de 45 años presentó un cuadro de daño renal y edema pulmonar tras el contacto con un “coral de fuego” (Prasad et al. 2006).

Hasta el momento, son pocos los estudios que se han realizado sobre las toxinas producidas por los organismos del género *Millepora* y sus efectos, en comparación con la amplia gama de investigaciones toxicológicas que se han efectuado sobre otros cnidarios. Estos estudios revelan que, independientemente de su localización, los “corales de fuego” producen efectos tóxicos similares. Por

ejemplo, los venenos de las especies del Mar Rojo, *M. dichotoma* y *M. platyphylla*, inducen violentas convulsiones y muerte en menos de un minuto al ser administrados por vía intravenosa (i.v.) en ratones, además de inducir hemólisis y dermonecrosis (Radwan, 2002). Efectos similares se encontraron al evaluar los venenos de estas mismas dos especies colectadas en el Pacífico (Shiomi et al., 1989). Del mismo modo, las especies del Atlántico, *M. alcicornis* y *M. tenera*, también inducen efectos letales, hemólisis y dermonecrosis en ratones (Wittle et al., 1971; Middlebrook et al., 1971; Wittle et al., 1974; Wittle & Wheeler, 1974). Es posible que las especies del género *Millepora* produzcan toxinas homólogas, ya que el veneno de *M. tenera* presenta inmunorreactividad cruzada con el veneno de *M. alcicornis* (Wittle & Wheeler, 1974). Así mismo, los venenos de *M. dichotoma* y *M. platyphylla* también presentan inmunoreactividad cruzada (Radwan, 2002). Recientemente, en experimentos realizados *in vitro*, nuestro grupo de trabajo detectó en el extracto acuoso preparado a partir de *M. complanata* la presencia de proteínas que poseen diversos efectos tóxicos y farmacológicos, que incluyen actividad hemolítica y excitación en la contractilidad del músculo liso arterial (Ibarra-Alvarado et al, 2007) e intestinal (Rojas et al., 2002).

Considerando los efectos de los extractos de las especies del género *Millepora* en animales de experimentación y su toxicidad característica en humanos, resulta evidente que estas especies representan una rica fuente de nuevos compuestos bioactivos con potencial aplicación farmacológica que vale la pena explorar. Sobre todo si se considera que hasta el momento se han purificado muy pocas toxinas de estos organismos. Entre estas toxinas destaca la Milleporina-1, una proteína de 32.5 kDa con actividad de fosfolipasa A₂ (PLA₂) purificada del veneno de *M. platyphylla*. Esta toxina es responsable de gran parte de la hemólisis inducida por el veneno de ese hidrocoral (Radwan & Aboul-Dahab, 2004). Otra toxina importante es la proteína de 18 kDa, denominada MCTx-1, purificada a partir del extracto de *M. dichotoma* que presenta letalidad en cangrejos y citotoxicidad en células leucémicas de ratón L1210 (Iguchi et al., 2008). Esta es la única toxina proteínica obtenida de una especie del género *Millepora* de la que hasta el momento se conoce su secuencia de aminoácidos.

El género *Millepora* no solamente destaca por su potencial farmacológico, sino también por su importancia ecológica, ya que después de los corales escleractinios, estos hidrocorales son los principales constructores de arrecifes de coral (Lewis, 2006). Al igual que los corales escleractinios, los “corales de fuego” también viven en íntima simbiosis nutricional con microalgas fotosintéticas del género *Symbiodinium*, conocidas como zooxantelas (Banaszak et al., 2003). Esta simbiosis a menudo es afectada por múltiples factores que dan como resultado episodios globales de blanqueamiento, que consiste en la pérdida de las zooxantelas simbiotas y los pigmentos fotosintéticos (Brown, 1997; Douglas, 2003). Se ha visto que la principal causa del blanqueamiento es una elevación en la temperatura del agua asociada con el calentamiento global, en combinación con un aumento en la radiación solar (Hoegh-Gudberg et al., 2007). Como resultado de esto, en los corales afectados el blanqueamiento disminuye sus velocidades de crecimiento, incrementa la susceptibilidad ante diversas especies patógenas y disminuye su nivel de supervivencia (Weis, 2008). Existen reportes que indican que el fenómeno de blanqueamiento ha aumentado en los últimos años, lo cual ha dado origen a una serie de estudios enfocados a entender sus implicaciones sobre la fisiología de los cnidarios. Sin embargo, hasta ahora se desconoce el impacto del blanqueamiento sobre la producción de las toxinas en estos organismos.

Considerando los aspectos antes mencionados, el presente estudio tuvo como propósito determinar los efectos letales y sistémicos del extracto acuoso de *M. complanata* en ratones y evaluar los daños histopatológicos ocasionados después de su administración. Así mismo, se realizó un fraccionamiento biodirigido del extracto acuoso del hidrocoral *M. complanata* y se analizaron cromatográficamente las fracciones obtenidas con el objeto de aislar e identificar algunos de los principales componentes responsables de los efectos tóxicos y farmacológicos observados en los experimentos *in vivo* e *in vitro*. Adicionalmente, se exploró la influencia que tiene el fenómeno de blanqueamiento sobre algunos de los efectos tóxicos y farmacológicos inducidos por el extracto de este hidrocoral y se realizó un estudio microscópico a fin de identificar los nematocistos presentes en el hidrocoral y observar sus características estructurales.

2. Antecedentes

2.1. *Phylum Cnidaria*

El phylum Cnidaria, constituido por una gran diversidad de organismos acuáticos de simetría radial, se encuentra ampliamente distribuido en hábitats marinos poco profundos, especialmente en lugares con temperaturas cálidas y regiones tropicales. Los cnidarios junto con el phylum Ctenophora comprenden el grupo Coelenterata (Solomon et al., 1998). Sin embargo, la característica que distingue a los cnidarios de los ctenóforos es la presencia de células punzantes llamadas cnidocitos. De tal manera que solamente los cnidarios producen este tipo de células que son utilizadas principalmente para su defensa y obtención de alimento (Özbek et al., 2009).

La organización corporal de los cnidarios es relativamente simple, consta de un saco hueco con una cavidad gastrovascular que contiene una sola abertura y cumple con la función de boca y ano. Esta abertura está rodeada de tentáculos que son utilizados para conducir el alimento hacia la cavidad gastrovascular. Su forma corporal puede ser de dos tipos: la forma pólipo, generalmente fija a un substrato, posee la boca en la superficie superior; y la forma medusa, que tiene la boca en la superficie inferior y está adaptada para la flotación. Por su parte, las paredes del cuerpo de los cnidarios constan de dos capas celulares: la epidermis externa (ectodermo) y la gastrodermis interna (endodermo), entre las cuales se encuentra un material gelatinoso denominado mesoglea (Solomon et al., 1998).

2.1.1. *Clasificación del Phylum Cnidaria*

De acuerdo a sus características morfológicas, actualmente se conocen cuatro clases de cnidarios (Nevalainen et al., 2004; NCBI, 2010).

- **Clase Scyphozoa:** Incluye a las medusas de diámetros grandes, su cavidad gastrovascular está dividida por cuatro septos incompletos. Se caracterizan por su movilidad, atraen agua hacia la cavidad gastrovascular

y la expulsan mediante contracciones rítmicas lo cual genera un efecto propulsor. Ejemplos de especies características de esta clase son las medusas corona (orden Coronatae) y las medusas invertidas (familia Cassiopeidae, orden Rhizostomeae) (Solomon et al., 1998; NCBI, 2010).

- **Clase Cubozoa:** Anteriormente se le consideraba como un orden de la clase Scyphozoa debido a que presentan cierta semejanza con las medusas de la clase Scyphozoa. Su nombre alude a la forma cúbica del cuerpo, que presenta una división tetramérica. Se conocen comúnmente como “avispas de mar” (orden Carybdeida y Chirodropida) debido a sus venenos altamente tóxicos (Solomon et al., 1998; NCBI, 2010).
- **Clase Anthozoa:** La cavidad gastrovascular de estos organismos se encuentra dividida radialmente por septos. Esta clase comprende dos subclases, la subclase Hexacorallia (Zoantharia) – que recibe este nombre debido a que presenta múltiplos de seis tentáculos – incluye organismos como anémonas (orden Actinaria), corales negros (orden Antipatharia), anémonas tubo (orden Ceriantharia), corales pétreos (orden Scleractinia), corales falsos (orden Corallimorpharia) y zoantidos (orden Zoanthidea). Por su parte, la subclase Octocorallia (Alcyonaria) – con múltiplos de ocho tentáculos – incluye a los corales blandos (orden Alcyonacea) y a las plumas de mar (orden Pennatulacea), entre otros (Solomon et al., 1998; NCBI, 2010).
- **Clase Hydrozoa:** Es la clase de cnidarios que cuenta con una mayor diversidad de especies, las cuales tienen en común la característica de que su cavidad gastrovascular no se encuentra dividida. Las especies más representativas de esta clase son las hidras (orden Hydroida, familia Hydridae). Esta clase también incluye especies que presentan la forma de medusa (orden Trachylina), siendo generalmente más pequeñas que las de la clase Scyphozoa, y medusas de agua dulce (orden Hydroida, suborden Limnomedusae). También pertenecen a esta clase las formas coloniales flotantes (orden Siphonophora), que se caracterizan por presentar una

vejiga llena de gas que sirve como flotador, denominado pneumatóforo (Schuchert, 2009; NCBI, 2010). Así mismo, esta clase comprende a los hidrocorales, los cuales son hidrozoarios coloniales que secretan esqueletos calcáreos y se asemejan a los auténticos corales escleractinios. Los hidrocorales más abundantes son los “corales de fuego” (orden Anthoathecata, familia Milleporidae), considerados como los constructores de arrecifes más importantes después de los corales escleractinios. El otro grupo de hidrocorales (orden Stylasterina) habita generalmente en cuevas y grietas a profundidades de 200 a 500 m (Lewis, 2006).

2.1.2. *Cnidocitos y cnidocistos (nematocistos, espirocistos y pticocistos)*

Todas las especies del phylum Cnidaria se caracterizan por la presencia de cnidocitos, células eucariotas especializadas muy complejas. Cada una de estas células presenta un orgánulo altamente complejo, producto secretorio del aparato de Golgi, que consiste de una cápsula rígida con un túbulo invertido dentro de ésta (Özbek et al., 2009). Este orgánulo recibe el nombre de cnida (plural cnidae), o cnidocisto, y puede ser de tres tipos: nematocisto, espirocisto y pticocisto (Weill, 1934a, b; Mariscal, 1977).

Los espirocistos se encuentran solamente en la clase Anthozoa, la pared de su cápsula es delgada y el túbulo invertido está fuertemente enroscado y carece de espinas. Este tipo de cnidocisto secreta una sustancia higroscópica adherente y es utilizado para inmovilizar a las presas de manera mecánica (Özbek et al., 2009). Por otra parte, los pticocistos se encuentran exclusivamente en las anémonas tubo (clase Anthozoa, orden Ceriantharia). Los túbulos extendidos de los pticocistos se entrelazan para formar el tubo de los ceriantidos, cumpliendo con una función solamente estructural (Mariscal, 1977). A diferencia de los espirocistos y pticocistos, los nematocistos se encuentran en todas las especies del phylum Cnidaria y son utilizados principalmente para capturar a sus presas y como defensa debido a que almacenan una mezcla compleja de toxinas (Tardent, 1995; Özbek et al., 2009).

Los nematocistos constan de una cápsula que puede ser de forma ovalada o esférica. En la parte apical de esta cápsula se encuentra una abertura cerrada por una pequeña tapa que se conoce como opérculo. Dentro de la cápsula del nematocisto se encuentra un filamento tubular invertido enrollado (Tardent, 1995). Las paredes de la cápsula están hechas principalmente de una glucoproteína denominada NOWA y de un material similar al colágeno denominado minicolágeno (Meier et al., 2007). Así, la cápsula es altamente resistente y soporta una presión intracapsular de 150 bar, que se debe a una alta concentración del polianión poli- γ -glutamato (Weber 1990). Bajo un estímulo apropiado, que puede ser químico y/o mecánico (Watson & Hessinger, 1989), la presión osmótica interna se libera. Esto provoca la proyección hacia el exterior del túbulo que inicialmente estaba invertido. De este modo, las toxinas almacenadas dentro de los nematocistos son inyectadas a las presas a través del túbulo (Özbek et al., 2009). La descarga del nematocisto ocurre en un periodo de menos de 3 ms, considerándose como uno de los procesos celulares más rápidos (Holstein & Tardent 1984).

Debido a su morfología variable, los nematocistos constituyen el grupo de cnidocistos más diverso. Basándose principalmente en el patrón de espinas del túbulo extendido y en la forma de la cápsula, actualmente se han encontrado hasta 30 tipos de nematocistos (Mariscal 1974; Östman 2000). Mismos que se han clasificado basándose en los trabajos iniciales de Weill (1934a, b), en los que él realizó una descripción detallada de los nematocistos de diferentes cnidarios mediante observaciones hechas con el microscopio de luz. La descripción morfológica de los nematocistos presenta un valor taxonómico potencial, ya que esta información en algunas ocasiones puede ayudar en la clasificación de las especies. Por ejemplo, de los 25 tipos de nematocistos reconocidos por Mariscal (1974), 17 se han encontrado exclusivamente en la clase Hydrozoa, mientras que dos son exclusivos de la clase Anthozoa. Incluso, se ha llegado a considerar que la morfología y el tamaño de los nematocistos deben de ser esenciales en la descripción taxonómica de los cnidarios (Östman 2000).

2.1.3. Venenos de cnidarios

La producción de venenos por diversas especies del reino Animalia forma parte de un proceso de adaptación evolutiva ante los cambios constantes en sus ecosistemas. De esta manera, los venenos son utilizados por estas especies principalmente para la obtención de alimento y para defenderse de los depredadores, asegurando así su supervivencia. Para lograr su función, los venenos generalmente están constituidos por mezclas complejas de toxinas que inducen desequilibrios fisiológicos mediante la alteración de distintos blancos celulares como enzimas, receptores y canales iónicos. En la mayoría de los casos, la complejidad del veneno aumenta debido a la presencia de enzimas que ayudan a la digestión de las presas (Kem & Turk, 2009).

En los ecosistemas marinos se encuentra una gran cantidad de organismos venenosos, entre los cuales destacan las especies del phylum Cnidaria (Watters, 2005). Se ha encontrado que los cnidarios presentan una amplia variedad de sustancias biológicamente activas que pueden ser consideradas como toxinas. Los estudios dirigidos hacia la identificación de estas toxinas indican que la mayor parte de éstas son de naturaleza proteínica (Rogers et al., 1996; Anderluh & Maček, 2002; Nevalainen et al., 2002). Tomando en cuenta los conocimientos generales que se tienen respecto a sus efectos, estas toxinas se pueden clasificar en dos grupos principales: neurotoxinas y citolisinas. Por otra parte, también se han encontrado diversos metabolitos secundarios bioactivos en cnidarios (Blunt, et al., 2003-2011).

A. Neurotoxinas

En los venenos de cnidarios, principalmente en los de las anémonas (clase Anthozoa, subclase Hexacorallia, orden Actinaria), se ha encontrado una gran diversidad de neurotoxinas, las cuales presentan una alta afinidad por canales iónicos de membranas excitables, principalmente canales de Na^+ y de K^+ dependientes de voltaje. Los canales de sodio dependientes de voltaje son

indispensables para la conducción nerviosa, razón por la cual estos canales son uno de los principales blancos de toxinas provenientes de diferentes organismos (Rogers et al., 1996).

Generalmente, las neurotoxinas de anémonas tienen la capacidad de retrasar la inactivación de los canales de sodio dependientes de voltaje mediante su unión al sitio receptor 3, el cual se encuentra entre el asa que conecta los segmentos S3 y S4 del dominio IV de la subunidad α del canal (Rogers et al., 1996). Al igual que estas neurotoxinas de anémonas, las α -toxinas de escorpión (Gordon et al., 1996) y las δ -atracotoxinas de araña (Nicholson et al., 2004) también se unen al sitio receptor 3 de estos canales.

Hasta el momento se conoce la estructura primaria de una gran cantidad de toxinas de anémona que actúan sobre canales de sodio dependientes de voltaje. Basándose en su secuencia de aminoácidos, las neurotoxinas de anémonas que actúan sobre canales de sodio dependientes de voltaje se agrupan en tres tipos principales. Tanto el tipo 1, que representa el grupo más numeroso, como el tipo 2 están constituidos por péptidos de 47 a 49 aminoácidos con tres enlaces disulfuro. En cambio, el tipo 3 está constituido por péptidos más cortos, con 27 a 32 residuos de aminoácidos (Oliveira et al., 2004). En el Cuadro 1 se muestra la secuencia de aminoácidos de algunas de estas neurotoxinas características de cada tipo.

El otro grupo importante de neurotoxinas de anémonas está constituido por toxinas que actúan sobre canales de K^+ dependientes de voltaje. Estas toxinas también se agrupan en tres tipos principales basándose en diferencias funcionales y estructurales. El tipo 1 lo constituyen toxinas de 35 a 37 residuos de aminoácidos que bloquean los canales K_v1 , presentan dos hélices cercanas y tres puentes disulfuro. El tipo 2 está representado por toxinas de 58 a 59 residuos de aminoácidos que también bloquean a los canales K_v1 , aunque con menor potencia que las del tipo 1. Curiosamente, las toxinas de anémona del tipo 2 que actúan sobre canales de potasio presentan homología secuencial con las dendrotoxinas aisladas de venenos de serpiente (Schweitz et al., 1995). Finalmente, en el tipo 3 se encuentran diversas toxinas que bloquean

selectivamente los canales K_v3 (Messerli & Greenberg, 2006). En el Cuadro 2 se muestra la secuencia de aminoácidos de algunos ejemplos de neurotoxinas de anémona que actúan sobre canales de potasio dependientes de voltaje.

Cuadro 1. Secuencia de aminoácidos de algunas neurotoxinas de anémona que actúan sobre canales de sodio dependientes de voltaje.

| Toxina | Secuencia | Especie | Referencia |
|---------------|---|--|---|
| Tipo 1 | | | |
| ATX-II | ¹ GVPCLCDSGD ²¹ IIVLAGCPSG ⁴¹ IGWCCKQ | ¹¹ PSVRGNTLSG ³¹ WHNCKKHGPT | <i>Anemonia sulcata</i> Wunderer, 1978 |
| AFT-II | ¹ GGVPCLCDSG ²¹ GIWLAGCPS ⁴¹ TIGWCCKQ | ¹¹ GPSVRGNTLS ³¹ GWHNCKAHGP | <i>Anthopleura fuscoviridis</i> Sunahara et al., 1987 |
| Bg-II | ¹ GASCRCDSDG ²¹ TLWLIGRCPS ⁴¹ FIGYCCKQ | ¹¹ PTSRGNTLTG ³¹ GWHNCRGSGP | <i>Bunodosoma granulifera</i> Loret et al., 1994 |
| Tipo 2 | | | |
| Rp-II | ¹ ASCKCDDDGP ²¹ VDFWNCNEGW ⁴¹ ASCCRKKK | ¹¹ DVRSATFTGT ³¹ EKCTAVYTPV | <i>Radianthus paumotensis</i> Wemmer et al., 1986 |
| RTX-III | ¹ GNCKCDEGP ²¹ VDLGYCNEGW ⁴¹ AECRKKK | ¹¹ YVRTAPLTGY ³¹ EKCASYYSPI | <i>Radianthus macrodactylus</i> Zycova & Kozlovskaja, 1989 |
| Sh-I | ¹ AACKCDEGP ²¹ VDLGSCNAGW ⁴¹ ADCCRKKK | ¹¹ DIRTAPLTGT ³¹ EKCASYYTII | <i>Stichodactyla helianthus</i> Wilcox et al., 1993 |
| Tipo 3 | | | |
| PaTX | ¹ AGGKSTCCPC ²¹ WGQCAHHCGC | ¹¹ AMCKYTAGCP ³¹ S | <i>Parasicyonis actinostoloides</i> Nishida et al., 1985 |
| ATX-III | ¹ RSCPCYWGG ²¹ GCSGPKV | ¹¹ CPWGQNCYPE | <i>Anemonia sulcata</i> Manoleras & Norton, 1994 |

Cuadro 2. Secuencia de aminoácidos de algunas neurotoxinas de anémona que actúan sobre canales de potasio dependientes de voltaje.

| Toxina | Secuencia | | Especie | Referencia |
|---------------|--|--|----------------------------------|-----------------------|
| Tipo 1 | | | | |
| ShK | ¹ RSCIDTIPKS ²¹ MKYRLSFCRK | ¹¹ RCTAFQCKHS ³¹ TCGTC | <i>Stichodactyla helianthus</i> | Tudor et al., 1996 |
| BgK | ¹ VCRDWFKETA ²¹ RTSQKYRANC | ¹¹ CRHAKSLGNC ³¹ AKTCELC | <i>Bunodosoma granulifera</i> | Dauplais et al., 1997 |
| AeK | ¹ GCKDNFSANT ²¹ GSQKYANTCA | ¹¹ CKHVKANNNC ³¹ KTCGKC | <i>Actinia equina</i> | Minagawa et al., 1998 |
| Tipo 2 | | | | |
| AsKC1 | ¹ INKDCLLPMD ²¹ YYYNSSSKRC ⁴¹ NANFHTLEE | ¹¹ VGRCRASHPR ³¹ EKFIYGGCRG ⁵¹ CEKVCVGR | <i>Anemonia sulcata</i> | Schweitz et al., 1995 |
| AsKC2 | ¹ INKDCLLPMD ²¹ YYYNSSSRRC ⁴¹ NANFITKKE | ¹¹ VGRCRARHPR ³¹ EKFIYGGCRG ⁵¹ CEKVCVGR | | |
| AsKC 3 | ¹ INGDCELPKV ²¹ YYYNLSSRRC ⁴¹ NANFHTLEE | ¹¹ VGRCRARFPR ³¹ EKFIYGGCGG ⁵¹ CEKVCVRS | | |
| Tipo 3 | | | | |
| BDS-I | ¹ AAPCFCSGKP ²¹ TCPGGYGYTS ⁴¹ YPH | ¹¹ GRGDLWILRG ³¹ NCYKWPNICC | <i>Anemonia sulcata</i> | Diochot et al., 1998 |
| BDS-II | ¹ AAPCFCPGKP ²¹ TCPGGYGYTS ⁴¹ YPH | ¹¹ DRGDLWILRG ³¹ NCYKWPNICC | <i>Anemonia sulcata</i> | |
| APETx1 | ¹ GTTCYCGKTI ²¹ PSNRGYTGSC ⁴¹ VD | ¹¹ GIYWFGTKTC ³¹ GYFLGICCYP | <i>Anthopleura elegantissima</i> | Diochot et al., 2003 |

B. Citolisinas

Las citolisinas son un tipo importante de toxinas presentes en los venenos de diversos cnidarios. El objetivo principal de estas toxinas es la destrucción de determinados tipos celulares, esto lo hacen generalmente interaccionando con las membranas celulares. Muchas de las citolisinas que se han aislado de venenos de cnidarios actúan mediante la formación de poros en las membranas. Las anémonas representan un ejemplo claro de cnidarios que producen este tipo de toxinas, por ejemplo, en *Actinia equina* se han encontrado al menos 5 isoformas de proteínas formadoras de poro denominadas equinatoxinas (Anderluh et al., 1999). Además de las equinatoxinas, se encuentran las esticolisinas I a IV, aisladas de *Stichodactyla helianthus* (Kem & Dunn, 1988), y las magnificalisinas I a III, aisladas de *Heteractis magnifica* (Khoo et al., 1993).

Las equinatoxinas, esticolisinas y magnificalisinas constituyen la familia de las actinoporinas, las cuales son las toxinas de cnidarios que más se han estudiado y que mejor se han caracterizado. Todas las toxinas pertenecientes a esta familia de proteínas formadoras de poro son monoméricas, no poseen residuos de cisteína y presentan pesos moleculares de aproximadamente 20 kDa. Estas toxinas son hidrosolubles, en presencia de lípidos membranales oligomerizan de tres o cuatro moléculas para formar un poro selectivo a cationes de aproximadamente 2 nm de diámetro. De las actinoporinas a las que se les ha caracterizado su secuencia de aminoácidos, se puede deducir que presentan un grado de homología interna muy evidente, ya que todas presentan en su estructura una región α -hélice N-terminal anfifílica conservada, una región desplegada rica en triptofano y un motivo RGD (arginina – glicina – aspártico). En el cuadro 3 se muestra la secuencia de aminoácidos de algunas actinoporinas (Anderluh & Maček, 2002).

Cuadro 3. Secuencia de aminoácidos de algunas actinoporinas.

| Toxina | Secuencia | | Especie | Referencia |
|----------------|---|---|---------------------------------|--------------------------|
| Equinatoxina I | ¹ SADVAGAVID ²¹ TVLEALGNVK ⁴¹ SGKTWTALNT ⁶¹ LPHKVPHGKA ⁸¹ PVATGAVGVL ¹⁰¹ AVLFSVPYDY ¹²¹ IYKGRRADQ ¹⁴¹ SPFRGDNGWH ¹⁶¹ RGFMNSSGHA | ¹¹ GASLSFDILK ³¹ RKIAVGVDNE ⁵¹ YFRSGTSDIV ⁷¹ LLYNGQKDRG ⁹¹ AYLMSDGNTL ¹¹¹ NWYSNWWNVR ¹³¹ RMYEELYYNL ¹⁵¹ TRNLGYGLKS ¹⁷¹ ILEIHVTKA | <i>Actinia equina</i> | Zhang, et al., 2000 |
| Esticolisina I | ¹ SELAGTIIDG ²¹ VLGELGKVS ⁴¹ GGTWTALNAY ⁶¹ PEVVPNTKAL ⁸¹ VATGAVAAFA ¹⁰¹ VMFSVPPFDYN ¹²¹ YPGKRRADQG ¹⁴¹ YRGDNGWYQK ¹⁶¹ IMTSAGEAKM | ¹¹ ASLTFEVLDK ³¹ KIAVGIDNES ⁵¹ FRSGTTDVIL ⁷¹ LYSGRKSSGP ⁹¹ YYMSNGNTLG ¹¹¹ WYSNWWDVKI ¹³¹ MYEDMYGNGP ¹⁵¹ NLGYGLRMKG ¹⁷¹ QIKISR | <i>Stichodactyla helianthus</i> | Martinez et al., 2001 |
| RTX-S II | ¹ SAALAGTITL ²¹ KVLGELGKVS ⁴¹ SGGSWTALNA ⁶¹ LPEFVPNQKA ⁸¹ PVATGAVAAF ¹⁰¹ GVMFSVPPFDY ¹²¹ IYSGKRRADQ ¹⁴¹ PYRGDNG | ¹¹ GASLGFQILD ³¹ RKIAVGVDNE ⁵¹ YFRSGTTDVI ⁷¹ LLYSGRKDTG ⁹¹ AYYMSNGHTL ¹¹¹ NLYSNWWDVK ¹³¹ AMYEDMYGNG | <i>Radianthus macrodactylus</i> | Klyshko et al., 2004 |

Otro mecanismo importante mediante el cual las citolisinas de cnidarios pueden ejercer sus efectos es mediante la degradación enzimática de lípidos membranales específicos. Las principales toxinas de este tipo son aquellas con actividad de PLA₂. Estas enzimas hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos. Es importante diferenciar a las PLA₂ citosólicas (cPLA₂) de las de secreción (sPLA₂). Las primeras desempeñan un papel importante dentro de las células mediante la producción de diversos compuestos bioactivos endógenos, activando la vía del ácido araquidónico (Díaz & Arm, 2003). Por otro lado, las sPLA₂ se encuentran en venenos de diversos organismos, así como en otras secreciones como la saliva y el jugo pancreático (Nevalainen et al., 2004).

La actividad de PLA₂ fue inicialmente descubierta en jugo pancreático y en el veneno de cobra, por lo que al principio se pensaba que la principal función de estas enzimas estaba enfocada en la digestión. Sin embargo, actualmente se sabe que las sPLA₂ que se han encontrado en venenos pueden presentar un amplio espectro de efectos farmacológicos que difícilmente se pueden correlacionar con su actividad catalítica, entre estos efectos destaca la actividad neurotóxica, miotóxica, anticoagulante y hemolítica, entre otras (Kini, 2003). Debido a esto, el estudio de las sPLA₂ de venenos es importante para el conocimiento de procesos de señalización que aún no se han explorado. Ejemplo de esto, es la existencia de receptores tipo M presentes en membranas celulares de mamífero que responden específicamente a PLA₂ de serpiente, con lo cual queda en evidencia que las PLA₂ de secreción no son sólo enzimas digestivas, sino que presentan otros sitios activos que podrían ser importantes en diversos mecanismos celulares (Prijatelj et al., 2006).

En el phylum Cnidaria, se han encontrado altos niveles de actividad de sPLA₂ en los venenos de diversas especies (Nevalainen et al., 2004). Así mismo, se han llegado a clonar sPLA₂ de las anemonas marinas *Adamsia palliata* (Talvinen & Nevalainen, 2002) y *Urticina crassicornis* (Razpotnik et al., 2007). Muchas veces, este tipo de toxinas actúan en conjunto con otras citolisinas para inducir la lisis de las células. Por ejemplo, en el veneno de la anémona *Aiptasia*

pallida se han encontrado dos isoformas de PLA₂ (α y β), las cuales requieren la presencia de un tercer componente para ejercer un efecto hemolítico. Este tercer componente presenta actividad hemolítica al evaluarse en ausencia de las dos isoformas de PLA₂ (Grotendorst & Hessinger, 1999). Además, se ha encontrado que algunas de estas citolisinas requieren de cationes divalentes, como el Ca²⁺ y el Mg²⁺, para alcanzar su actividad óptima, tal es el caso de la β PLA₂ de *A. pallida* (Grotendorst & Hessinger, 2000). En el Cuadro 4, se muestran las secuencias de aminoácidos de algunas sPLA₂ que se han encontrado en venenos de cnidarios.

En general, las sPLA₂ se agrupan en tres grupos principales y subgrupos basándose en sus secuencias de aminoácidos (grupos I, II y III), a excepción de la conodipina M del gasterópodo *Conus magus* (McIntosh et al., 1995). Las enzimas de los grupos I y II presentan un alto contenido de enlaces disulfuro, son de bajo peso molecular y requieren de calcio para la catálisis. La homología en la secuencia es el punto clave para asignar a las enzimas a cada grupo. Los grupos I y II se distinguen uno del otro por la ausencia o presencia de un propéptido señal, una extensión C-terminal y un grupo disulfuro específico. Indudablemente, las PLA₂ de veneno que más se han estudiado son las de serpientes. Por ejemplo, la mayoría de las PLA₂ del grupo I se han encontrado en serpientes elápidas e hidrófidas, mientras que la mayoría del grupo II se ha encontrado en serpientes crotálidas y vipéridas. Las PLA₂ del grupo III fueron inicialmente descubiertas en el veneno de abeja y después en venenos de otros invertebrados, como abejorros, alacranes y cnidarios. Estas enzimas del grupo III contienen solamente diez cisteínas y están compuestas de una o dos subunidades, están poco relacionadas estructuralmente a las PLA₂ de los grupos I y II aunque sí presentan homología en la secuencia de aminoácidos del sitio de unión a calcio y en los sitios activos (Kini, 1997).

Cuadro 4. Secuencia de aminoácidos de algunas sPLA₂ de venenos de cnidarios.

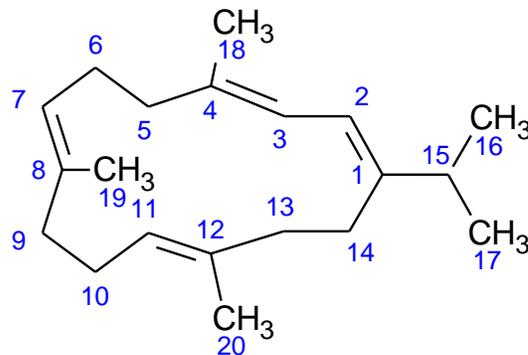
| Especie | Secuencia | | | Referencia |
|------------------------------|---|---|--|-----------------------------|
| <i>Adamsia palliata</i> | ¹ MQLYTYFFTF ³¹ EGGIAKRGAF ⁶¹ GCWCGLGGKG ⁹¹ TQGPRPTCSK ¹²¹ TSKCGRAICA ¹⁵¹ YKKNIC | ¹¹ SLVLILALAD ⁴¹ QFSYLIKKYT ⁷¹ TPVDGVDWCC ¹⁰¹ NAPYHKNYF ¹³¹ CDIAAVKCFM | ²¹ QENKSLDFTQ ⁵¹ GRNPLDYWGY ⁸¹ YHDMCFNSI ¹¹¹ SGLKCSTGWL ¹⁴¹ RNHFNNKYQN | Talvinen & Nevalainen, 2002 |
| <i>Urticina crassicornis</i> | ¹ MKNNILVIL ³¹ LNAQESEVSA ⁶¹ AWKYFNYGNW ⁹¹ DWCYKRHDSC ¹²¹ TCHSANNRCQ ¹⁵¹ PNNKH | ¹¹ LGISVFDCL ⁴¹ VQKRDILQFS ⁷¹ CGWGGSGTAV ¹⁰¹ YPKIIPYIAS ¹³¹ RDVCNCDKVA | ²¹ PLNDQEEDKS ⁵¹ GMIRCATGRS ⁸¹ DGVDSCCRSH ¹¹¹ TSGSHPSCSI ¹⁴¹ AECFARNTYH | Razpotnik et al., 2007 |

C. Metabolitos secundarios

Un gran número de metabolitos secundarios bioactivos se han encontrado en cnidarios, principalmente en especies de la clase Anthozoa. La mayoría de estos metabolitos son de naturaleza terpenoide o esteroidea (Blunt et al., 2003; Blunt et al., 2004; Blunt et al., 2005; Blunt et al., 2006; Blunt et al., 2007). El grupo más grande de estos metabolitos lo constituyen los cembranoides (Figura 1), compuestos diterpenos que contienen un anillo de 14 carbonos (grupo cembrano) con diferentes grados de oxigenación. Los cembranoides se han encontrado en diversos corales blandos (clase Athozoa, subclase Octocorallia, orden Alcyonacea) y presentan diversos efectos biológicos de importancia biomédica, ya que pueden afectar receptores nicotínicos musculares y neuronales (Ferchmin et al., 2009). Por ejemplo, la lofotoxina – aislada de algunos corales blandos del pacífico pertenecientes al género *Lophogeorgia* – bloquea receptores neuromusculares de acetilcolina de manera irreversible

mediante una unión covalente con el receptor (Fenical et al., 1981: Culver & Jacobs, 1981).

A



B

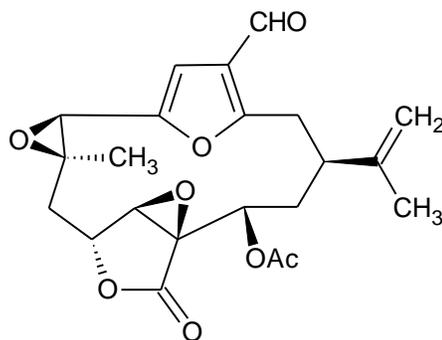


Figura 1. Compuestos cembranoides encontrados en cnidarios. (A) Estructura básica de los cembranoides, (B) estructura de la lofotoxina.

El metabolito secundario con efectos letales de mayor potencia que se ha encontrado en los cnidarios es la palitoxina, un poliéter de estructura compleja (Figura 2) que se une específicamente a la bomba Na,K-ATPasa. Esta toxina convierte a la bomba en un canal iónico, por lo que produce un eflujo de K^+ y un influjo de Na^+ , dando como resultado la despolarización de la membrana (Hoffman et al., 2008). La palitoxina afecta todas las células sobre las que se ha estudiado, por lo que se le han encontrado diversas actividades biológicas (Wu,

2009). Al ser administrada en ratones, produce violentas convulsiones a dosis muy bajas, se ha encontrado que es 200 veces más potente que la tetrodotoxina, lo cual la convierte en la toxina marina más potente que se ha encontrado hasta el momento (Ito & Yasumoto, 2009; Wu, 2009). Esta toxina se encuentra principalmente en corales blandos del género *Palythoa*. Se purificó por primera vez del coral *P. toxica* a partir de un extracto etanólico acuoso (7:3), utilizando cromatografía en fase reversa (Moore & Scheuer, 1971). También se ha encontrado en diversas especies de la subclase Octocorallia, en la anémona *Radianthus macrodactylus* (Mahnir et al., 1992). Además de los cnidarios, la palitoxina se ha encontrado en otras especies marinas, como en los dinoflagelados de forma libre pertenecientes al género *Ostreopsis*, en gusanos poliquetos, cangrejos y peces (Wu, 2009).

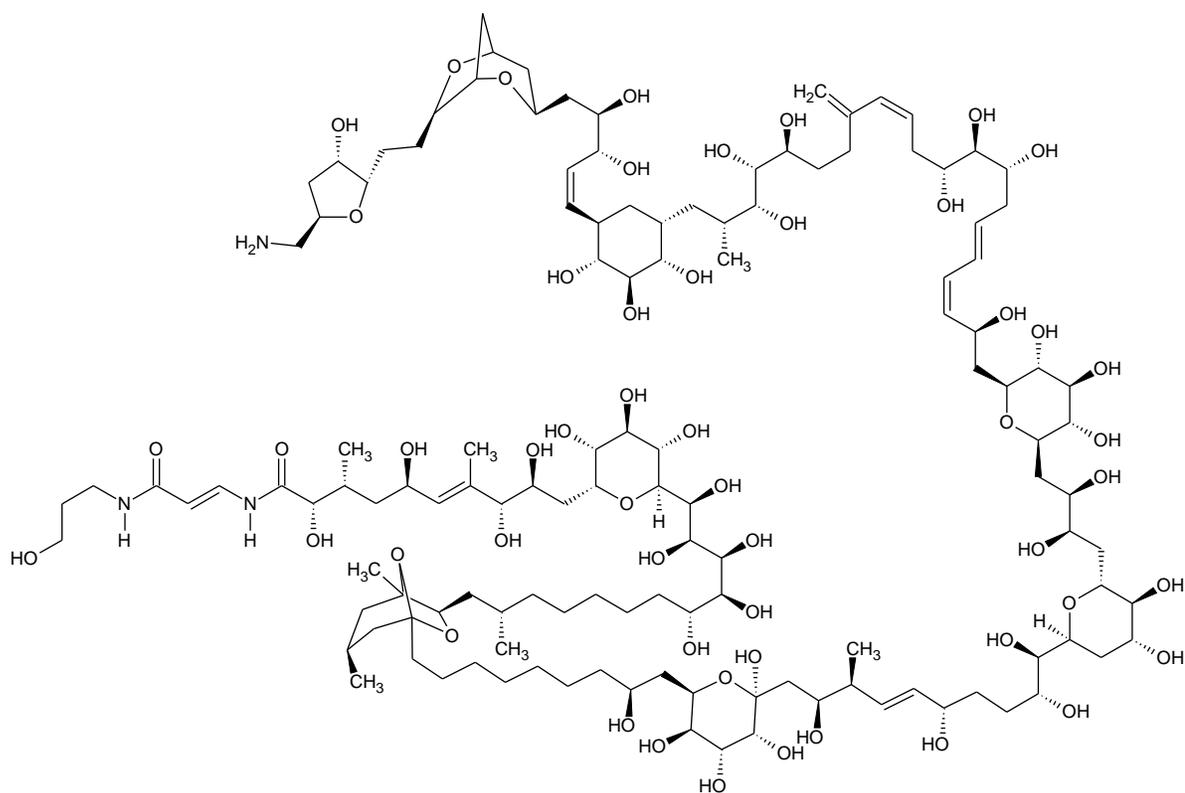
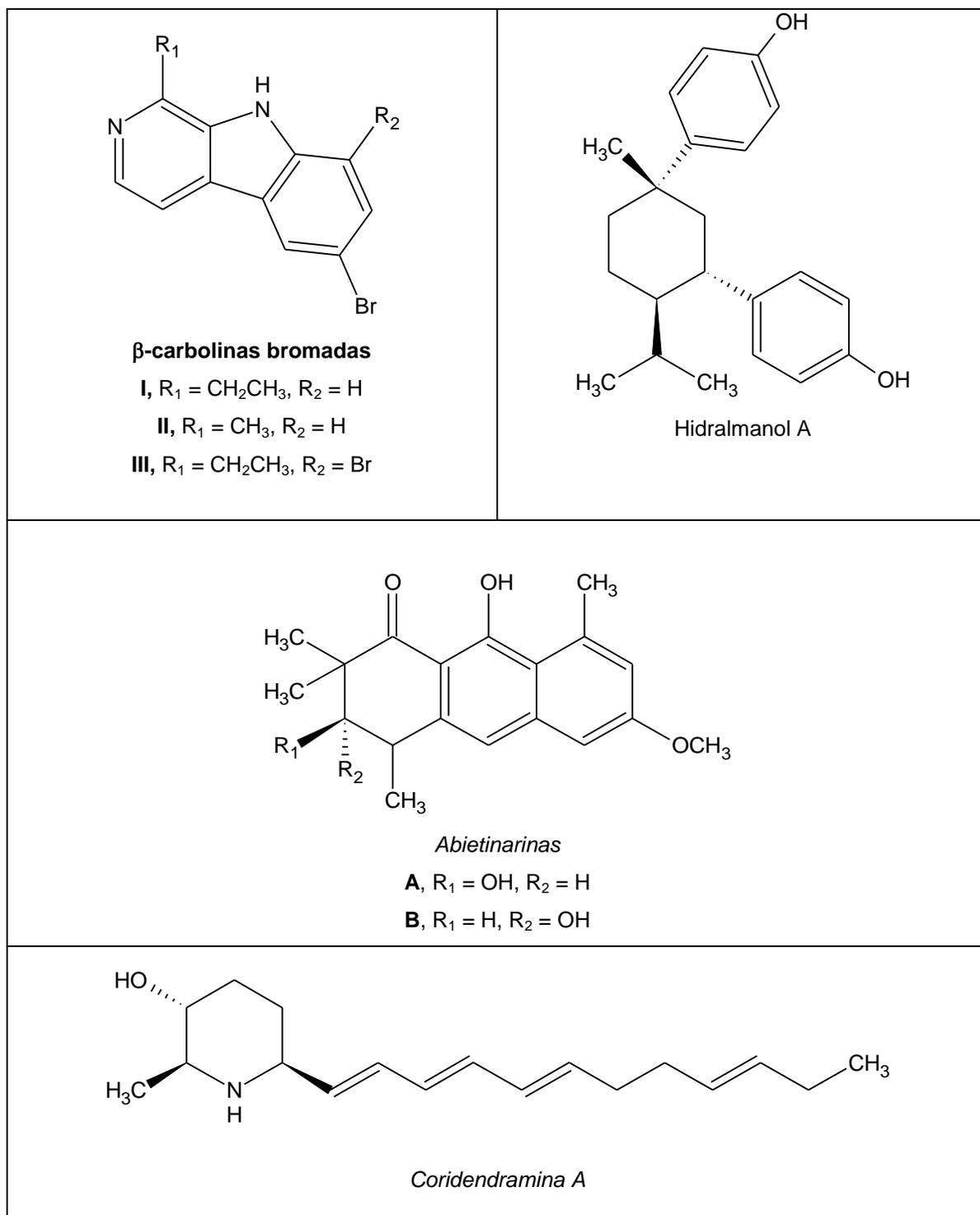


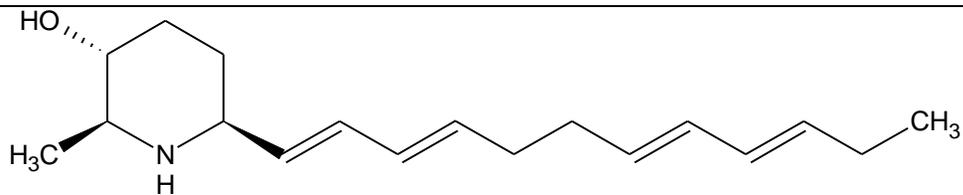
Figura 2. Estructura química de la palitoxina

Los metabolitos secundarios que se han encontrado en especies de la clase Hydrozoa son pocos, en comparación con el número de compuestos de esta naturaleza encontrados en la clase Anthozoa. En el Cuadro 5 se muestran las estructuras de algunos metabolitos secundarios que se han aislado de hidroides marinos. Tres β -carbolicinas bromadas fueron aisladas de un extracto lipofílico del hidroide marino *Aglaophenia pluma*; sus estructuras fueron deducidas por análisis espectroscópicos y confirmadas por síntesis (Aiello et al., 1987). El hidralmanol A fue aislado del hidroide marino *Hydrallmania falcata*; su estructura fue deducida por análisis espectroscópicos y confirmada por síntesis (Pathirana et al., 1989). Las abietinarinas A y B fueron aisladas del hidroide marino del pacífico nororiental *Abietinaria sp.*, las cuales muestran citotoxicidad *in vitro* contra células L1210; sus estructuras fueron determinadas con base en sus análisis espectroscópicos (Pathirana et al., 1990). Las coridendraminas A y B fueron aisladas del hidroide marino *Corydendrium parasiticum*, ambas poseen la capacidad de inhibir la depredación por peces; sus estructuras fueron determinadas por interpretación de sus datos espectroscópicos (Lindquist et al., 2000). Del hidroide marino *Tridentata marginata* fueron aislados tres inusuales alcaloides aromáticos, los tridentatoles A, B y C, solamente uno de ellos, el tridentatol A, destacó por ser un potente inhibidor de la depredación por peces (Lindquist et al., 1996). Posteriormente, fueron aislados cinco metabolitos secundarios adicionales de *T. marginata*, los tridentatoles D a H. Así mismo, los tridentatoles fueron identificados mediante análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia en nematocistos purificados de *T. marginata*, lo cual comprueba por primera vez la existencia de metabolitos no proteínicos en nematocistos de cnidarios (Lindquist, 2002).

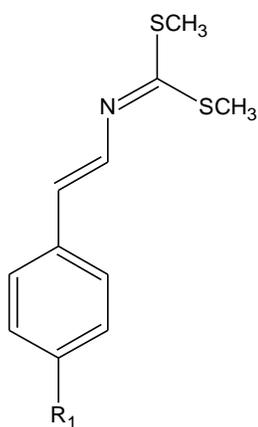
Cuadro 5. Metabolitos secundarios aislados de hidroides marinos.



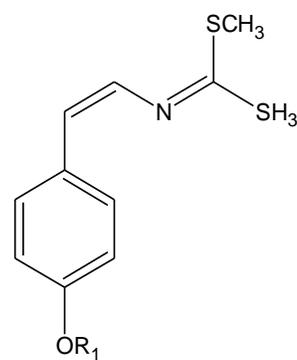
Continuación del Cuadro 5



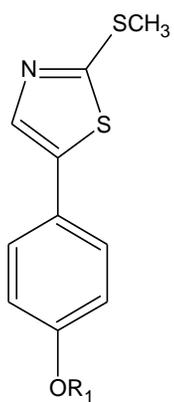
Coridendramina B



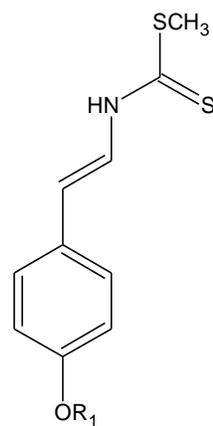
A, $R_1 = H$
E, $R_1 = SO_3Na$



B, $R_1 = H$
F, $R_1 = SO_3Na$



C, $R_1 = H$
H, $R_1 = SO_3Na$



D, $R_1 = H$
G, $R_1 = SO_3Na$

Tridentatoles

2.2. Género *Millepora*

Las especies del género *Millepora* (reino Animalia, phylum Cnidaria, clase Hydrozoa, familia Milleporidae) son pólipos coloniales que secretan esqueletos calcáreos, razón por la cual se denominan hidrocorales. Estas especies constituyen una de las formas coralinas más habituales en los arrecifes, encontrándose en mares tropicales de todo el mundo a profundidades que van desde menos de 1 m hasta cerca de 40 m. La forma de crecimiento de los hidrocorales es muy variable de una especie a otra. Por lo general, las formas robustas y de cuchillas se encuentran en aguas turbulentas, mientras que las formas ramificadas son más comunes en aguas tranquilas (Davies & Montaggioni, 1985). En la Figura 3 se presentan fotografías subacuáticas de algunas especies de este género, en las cuales se puede observar la variabilidad de formas que presentan.

2.2.1. Simbiosis *Millepora*-*Symbiodinium*

Al igual que los corales escleractinios de la clase *Anthozoa*, los hidrocorales del género *Millepora* albergan dinoflagelados simbiotes (microalgas fotosintéticas) del género *Symbiodinium* dentro de vacuolas intracelulares (simbiosomas) de su gastrodermis (Banaszak et al., 2003; Yellowlees et al., 2008). La relación simbiótica entre estos cnidarios y las especies del género *Symbiodinium*, también conocidas como zooxantelas, está centrada en un importante intercambio nutricional. Las zooxantelas proveen a sus huéspedes oxígeno molecular y la mayoría de su carbono fijado fotosintéticamente a cambio de nitrógeno inorgánico, fósforo y carbono, además de un medio ambiente iluminado que constituye un refugio contra la herbivoría (Venn et al., 2008; Yellowlees et al., 2008).

Las células de las zooxantelas presentan una coloración café dorada debido a la presencia de pigmentos fotosintéticos en sus cloroplastos. Dado que los corales e hidrocorales tienen la capacidad de almacenar millones de zooxantelas por

centímetro cuadrado en sus tejidos, ellos también presentan una coloración semejante. Un resultado común de la constante exposición ante diversos factores naturales y antropogénicos es el fenómeno de blanqueamiento, que puede definirse como la pérdida de las zooxantelas simbiotes y sus pigmentos fotosintéticos – es decir, una disfunción en esta simbiosis (Douglas, 2003). De este modo, durante el blanqueamiento se pierde la pigmentación normal de los tejidos de los corales e hidrocorales, resaltando el color blanco del exoesqueleto de carbonato de calcio (Figura 4).

Se ha reportado ampliamente que el blanqueamiento puede afectar a los corales e hidrocorales, ya que la pérdida de sus zooxantelas simbiotes incluso puede conducir a la muerte de estas especies (Banaszak et al., 2003; Lewis, 2006), afectando el equilibrio ecológico del arrecife completo. Se ha encontrado que algunas especies del género *Millepora* pueden sobrevivir hasta 4 semanas en ausencia de sus organismos simbiotes (Lewis, 2006). Sin embargo, se ha visto que los cnidarios que llegan a recuperarse tras un periodo de blanqueamiento muestran un decremento en la velocidad de crecimiento y calcificación (Coles & Brown, 2003), además de que son más susceptibles a padecer enfermedades (Rosenberg et al., 2007).

Se ha visto que el blanqueamiento puede desencadenarse por diversos factores (Douglas, 2003), entre los cuales destaca la elevación en la temperatura del agua – generalmente asociada con el calentamiento global – en combinación con niveles de radiación solar elevados (Hoegh-Guldberg et al., 2007). Algunos estudios con dinoflagelados simbiotes en cultivo (Iglesias-Prieto et al. 1992) y en huéspedes (Warner et al. 1996) sugieren que la combinación de estos dos factores produce fotoinhibición y daño en los cloroplastos y en el aparato fotosintético mediante diferentes mecanismos que actúan en conjunto para desencadenar el proceso de blanqueamiento. Uno de estos mecanismos involucra a la proteína D1 del fotosistema II. Durante la elevación de la temperatura en las zooxantelas se daña esta proteína, lo cual sobrepasa los mecanismos normales de reparación resultando en la disfunción del fotosistema II (Warner et al., 1999). Otro mecanismo involucra a la reacción oscura de la

fotosíntesis que se ve comprometida con el calentamiento y el aumento de luz, afectando posiblemente a la enzima ribulosa bisfosfato carboxilasa oxigenasa, conduciendo a una disminución en la fijación de carbono (Jones et al., 1998). Esto resulta en un consumo reducido de ATP y NADPH provenientes de las reacciones de luz que a su vez conducen a una disfunción del fotosistema II mediante una vía de retroalimentación negativa (Jones et al., 1998; Venn et al., 2008). Además, se ha visto que el aumento de temperatura y un exceso de luz también dañan las membranas tilacoides, causando un desacoplamiento del transporte de electrones en ambos fotosistemas (Tchernov et al., 2004).

La alta producción de electrones por cualquiera de los mecanismos antes mencionados reduce el O₂ mediante la reacción de Mehler en el fotosistema I para generar múltiples especies reactivas de oxígeno (ROS) en los simbioses. Las ROS producen daños celulares importantes como oxidación de las membranas, desnaturalización de proteínas y daño en ácidos nucleicos (Lesser, 2006). Por lo tanto, las ROS pueden dañar las membranas fotosintéticas, además de que pueden difundirse en los tejidos del huésped donde continúan haciendo daño, dando como resultado final el blanqueamiento. Hasta el momento los mecanismos mediante los cuales los huéspedes pueden eliminar sus zooxantelas simbioses no se conocen del todo bien. Se han propuesto varias hipótesis que involucran mecanismos como degradación de los simbiontes *In situ*, exocitosis y apoptosis (Weiss, 2008).

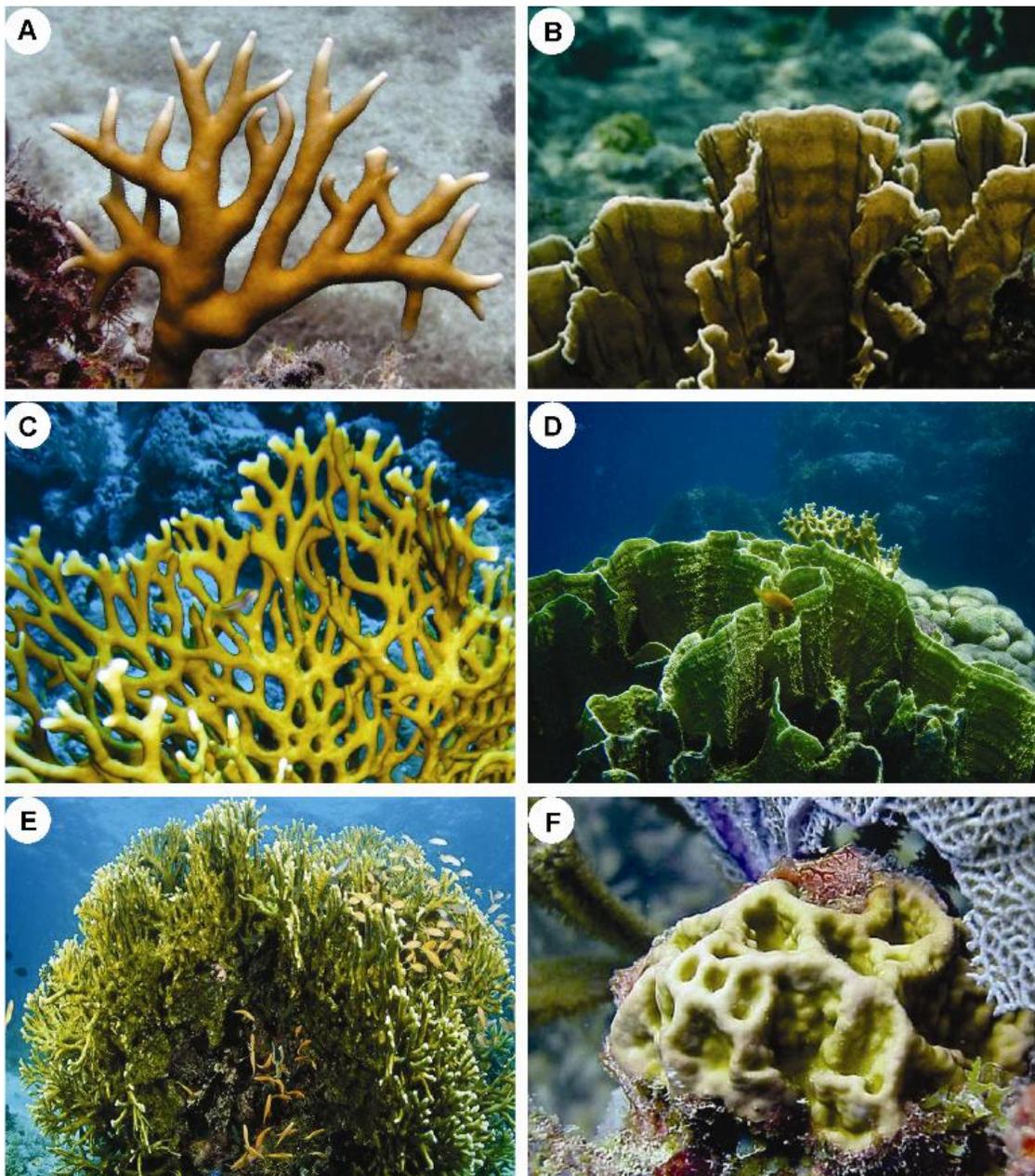


Figura 3. Fotografías subacuáticas de algunas especies del género *Millepora*. *M. alcicornis* (A) y *M. complanata* (B) son hidrocorales predominantes en el Caribe Mexicano. *M. dichotoma* (C) y *M. platyphylla* (D) se encuentran principalmente en arrecifes del Mar Rojo y el Indo-Pacífico. (D) *M. tenera*, habita comúnmente en arrecifes de las islas Maldivas y Taiwan. *M. squarrosa* (F) es un hidrocoral en forma de caja que habita comúnmente en el sur del Caribe (Lewis, 2006).

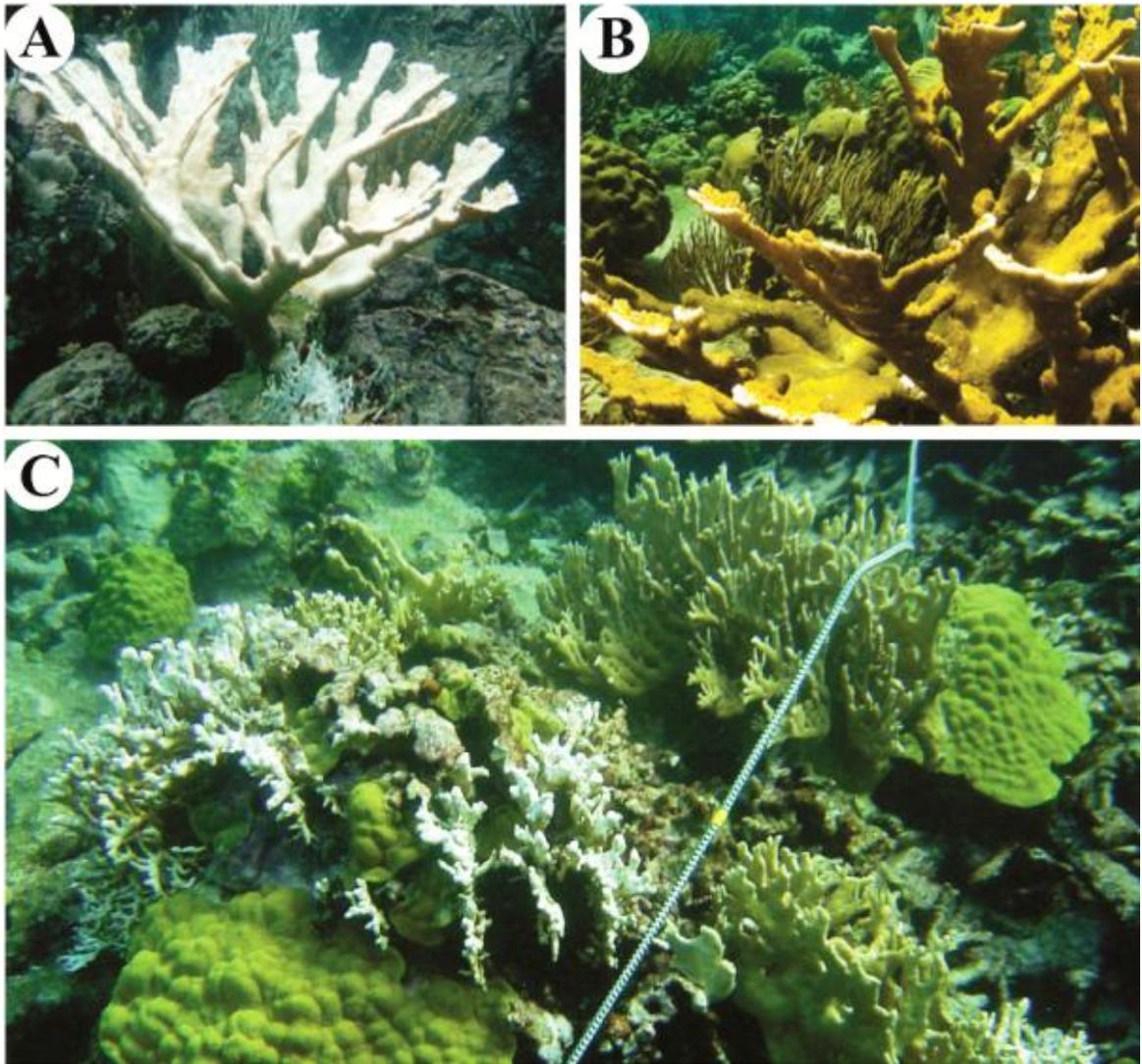


Figura 4. Fotografías subacuáticas que muestran el blanqueamiento natural de algunas especies. Imagen de un coral escleractinio (*Acropora palmata*) en un evento de blanqueamiento en las Islas Vírgenes (Estados Unidos) durante el 2005 (A) comparada con una imagen de la misma especie tomada antes de ese año (B). Imágenes que muestran partes blanqueadas del hidrocoral *M. alcicornis* (C).

2.2.2. Toxicidad

De un total de 10,000 especies de cnidarios que se conocen hasta el momento, solamente 70 especies tienen la capacidad de inducir efectos tóxicos en el humano, ya sea por contacto o por ingestión. Entre estas especies destacan los hidrocorales del género *Millepora* (Hashimoto, 1979), ya que al entrar en contacto con ellas causan intensas picaduras dolorosas con diferentes grados de intoxicación (Sagi et al., 1987; Bianchini et al., 1988). Las reacciones cutáneas incluyen: eritema, ronchas, lesiones ulceronecroticas y lesiones papulares que pueden volverse lesiones pustulares con descamación excesiva (Figura 5). Estas lesiones suelen presentarse junto con un dolor intenso o escozor, provocando una sensación de quemadura causada por calor. Es por esto que a las especies del género *Millepora* se les conoce comúnmente como “corales de fuego” (Sagi et al., 1987; Bianchini et al., 1988). En cuanto a la sintomatología general, puede presentarse malestar general, náusea, vómito, dolor abdominal, dificultad respiratoria y fiebre (Bianchini et al., 1988; Moats, 1992). Además, pueden presentarse complicaciones severas después de que las lesiones desaparecen. Por ejemplo, Moats (1992) reportó un caso de una mujer de 52 años de edad que después del contacto con un “coral de fuego” presentó neuropatía del nervio torácico largo con parálisis del músculo serrato anterior. Así mismo, Prasad y colaboradores (2006) reportaron el caso de una mujer de 45 años que presentó daño renal agudo y edema pulmonar tras el contacto accidental con “corales de fuego”.



Figura 5. Fotografías que muestran algunas de las lesiones en la piel humana causadas por el contacto con especies del género *Millepora*.

Los estudios que se han realizado sobre los efectos de los venenos de las especies del género *Millepora* sugieren la presencia de citolisinas de naturaleza proteínica. En el año 1971, se reportaron dos estudios sobre *M. tenera* y *M. alcicornis*, en los que se evaluó la letalidad de sus extractos (obtenidos por maceración en amortiguador de Sörensen a un pH de 7 y a una temperatura de 4 °C) en ratones al inyectarlos por vía i.v. En estos estudios, la DL₅₀ calculada para *M. alcicornis* fue de 0.55 µg de proteína/g de peso corporal, mientras que la DL₅₀ calculada para *M. tenera* fue de 0.303 µg de proteína/g de peso corporal, ambos extractos perdían su actividad al ser evaluados después de someterlos a ebullición (Middlebrook et al., 1971; Wittle et al., 1971). El extracto de *M. alcicornis* fue sometido a sucesivas cromatografías en DEAE-celulosa y Sephadex G-100, lo cual permitió purificar parcialmente una proteína con un peso molecular aproximado de 100,000 Da y una actividad tóxica 14 veces mayor que el extracto original (Wittle et al., 1971). Por otra parte, el fraccionamiento cromatográfico en DEAE-celulosa del extracto de *M. tenera* permitió purificar parcialmente una fracción proteica 8 veces más activa que el extracto original (Middlebrook et al., 1971). Unos años más tarde, se reportó un estudio en donde se encontró que las toxinas que se purificaron parcialmente a partir de los extractos de ambos hidrocorales también se encontraban presentes en sus nematocistos (Wittle et al., 1974). En otro estudio, se encontró que el extracto de *M. tenera* presentaba actividad hemolítica sobre eritrocitos de rata e inducía dermonecrosis en ratones y conejos inyectados por vía intradérmica (Wittle & Wheeler, 1974).

En un estudio realizado sobre *M. dichotoma* y *M. platyphylla*, hidrocorales comunes en las costas del Mar Rojo, se encontró que los extractos de los nematocistos de estos organismos presentaron toxicidad en ratones al inyectarlos por vía i.v. El extracto de *M. dichotoma* presentó una DL₅₀ de 0.51 µg de proteína/g de peso corporal, en tanto que la DL₅₀ del extracto de *M. platyphylla* fue de 0.21 µg de proteína/g de peso corporal. Además, se encontró que ambos extractos presentaron actividad dermonecrótica y vasopermeable cuando se inyectaron en ratones por vía subcutánea a dosis de 1 µg de proteína/g de peso corporal. También se encontró que los dos extractos presentaron actividad

hemolítica sobre eritrocitos humanos a concentraciones de 20 a 200 μg de proteína/ml. La actividad hemolítica de ambos extractos se inhibió parcialmente por la presencia de fostatidilcolina, fosfatidilserina o dihidrocolesterol, siendo más notable la actividad inhibitoria de este último. Además, en ambos extractos se encontró que las fracciones obtenidas mediante cromatografía de filtración en gel, en las que se concentró la actividad hemolítica, también presentaron letalidad en ratones (Radwan, 2002).

En otro estudio subsiguiente, se realizó un fraccionamiento del extracto de los nematocistos de *M. platyphylla* mediante cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. De esta manera, se encontró una fracción rica en proteínas, con pesos moleculares de 30 a 34 kDa, con actividad hemolítica sobre eritrocitos de humano y actividad de PLA₂. La purificación subsecuente de esta fracción mediante cromatografía de intercambio iónico permitió obtener una fracción, con una proteína de un peso molecular de 32.5 kDa como componente mayoritario, que se denominó Milleporina-1. Esta fracción presentó actividad de fosfolipasa A₂ y contribuyó, en parte, a la actividad hemolítica presentada por la fracción obtenida inicialmente (Radwan & Aboul-Dahab, 2004).

En un estudio reciente, se purificó una citotoxina de 18 kDa de un extracto de nematocistos de *M. dichotoma* var. *tenera*. Esta toxina, denominada MCTx-1, presenta toxicidad sobre células leucémicas de ratón L1210 (CE₅₀ = 79 ng/ml), induce hemaglutinación en una suspensión de 0.8 % de eritrocitos de oveja (0.2 μg de proteína/ml) y fue letal al administrarse en cangrejos (DL₅₀ = 106 $\mu\text{g}/\text{kg}$). En ese estudio, el extracto de los nematocistos se fraccionó mediante cromatografía de exclusión, usando una columna de Sephadex-200. De esta manera, se obtuvo una fracción citotóxica que no presentó actividad de PLA₂, a partir de la cual se purificó la MCTx-1. La estructura primaria de esta toxina se dedujo a partir de la secuencia del cDNA correspondiente (Cuadro 6) y se encontró que tiene homología con las dermatopontinas, las cuales son proteínas de la matriz extracelular de mamíferos (Iguchi et al., 2008).

Cuadro 6. Secuencia de aminoácidos de MCTx-1 purificada a partir de *M. dichotoma* var. *tenera*. Secuencia correspondiente a la toxina madura (Iguchi et al., 2008).

| | | | |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| ¹ SKVNQYDQPF | ¹¹ TFKCPLGETI | ²¹ KSIGSIHDNH | ³¹ YEDRQWDIDC |
| ⁴¹ KPAGYTMGIS | ⁵¹ TWSPYANDYD | ⁶¹ GSMNFECNEG | ⁷¹ SVVTGMSSIH |
| ⁸¹ DNYYEDRRYQ | ⁹¹ LMCSYLNNWK | ¹⁰¹ RGSCAWTSYT | ¹¹¹ TYDASFVELT |
| ¹²¹ PTGKFLVGMK | ¹³¹ SQHNNYYEDR | ¹⁴¹ KFKMLYC | |

En estudios previos sobre *M. complanata*, un hidrocoral que se encuentra comúnmente en los arrecifes del Caribe Mexicano, nosotros encontramos que el extracto de este hidrocoral produce una estimulación en las contracciones espontáneas del ileon de cobayo (Rojas et al., 2002) y en el tono del músculo liso arterial de rata, además de presentar actividad de PLA₂ y actividad hemolítica (Ibarra-Alvarado et al., 2007). A partir del fraccionamiento del extracto de *M. complanata*, mediante cromatografía en fase reversa, se obtuvieron dos fracciones cromatográficas con efecto vasoconstrictor significativo. Una de estas fracciones con actividad vasoconstrictora una contenía como componente mayoritario una proteína de aproximadamente 15 kDa, mientras que la otra fracción vasoconstrictora contenía una proteína de 17 kDa como componente mayoritario. Además, se obtuvo una fracción hemolítica, cuyo componente mayoritario era una proteína de 30 kDa (Ibarra-Alvarado et al., 2007). Este trabajo permitió identificar la presencia de proteínas vasoconstrictoras y, por lo menos, una citolisina en el veneno de *M. complanata*. Sin embargo, no fue posible realizar una purificación completa de dichas proteínas, ni tampoco realizar evaluaciones farmacológicas que permitieran conocer el mecanismo de acción mediante el cual estas proteínas ejercen sus efectos biológicos.

3. Hipótesis

El veneno del hidrocoral *Millepora complanata* contiene citolisinas con actividad de PLA₂ que producen daños en las membranas celulares de diversos tejidos y toxinas que provocan cambios en la fisiología de células excitables del sistema nervioso y del músculo liso arterial.

4. Objetivos

4.1 General

Determinar la toxicidad sistémica del veneno del hidrocoral *Millepora complanata* y realizar su análisis cromatográfico a fin de purificar las principales toxinas responsables de los efectos farmacológicos y tóxicos presentados por el veneno.

4.2 Específicos

- A. Evaluar los efectos sistémicos inducidos por el veneno de *M. complanata* en ratones al ser administrado por diferentes vías.
- B. Realizar el estudio químico biodirigido del veneno de *M. complanata* a fin de purificar las principales toxinas responsables de los efectos farmacológicos y tóxicos.
- C. Realizar un estudio toxinológico comparativo entre el veneno proveniente de especímenes de *M. complanata* normales y el veneno obtenido a partir de especímenes blanqueados con el objeto de determinar si las zooxantelas simbiotas contribuyen con los efectos farmacológicos y tóxicos producidos por el hidrocoral.
- D. Identificar los nematocistos presentes en los tejidos de *M. complanata* responsables de la administración de las toxinas a sus presas.

5. Materiales y métodos

*5.1. Recolección y transporte de los especímenes de *M. complanata**

Se recolectaron fragmentos del hidrocoral mediante inmersiones de buceo a profundidades de 4 a 10 m en arrecifes de coral situados en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos. Los trabajos de recolección se llevaron a cabo en mayo del 2003 por técnicos especializados de la Estación Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM. Una vez recolectado, el material se congeló, se almacenó en hielo seco y se transportó a nuestros laboratorios en Querétaro.

*5.2. Preparación del extracto acuoso de *M. complanata**

La descarga de los nematocistos del hidrocoral se indujo mediante agitación de los fragmentos en agua desionizada (pH 7) durante 18 h a 4 °C. El extracto resultante, se centrifugó a 3,000 rpm (2,060 x g) durante 15 min a 4 °C. Este sobrenadante, que contiene las toxinas provenientes de los nematocistos, se liofilizó y se almacenó a -20 °C. Cada vez que se requería para los diferentes estudios, el polvo liofilizado se preparó de la siguiente manera: el polvo se agitó en agua desionizada, a una concentración de 150 mg (liofilizado)/ml, durante 20 min a 4 °C. Posteriormente, el polvo se centrifugó a 3,000 rpm (2,060 x g) durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se separó y se filtró a través de acrodiscos de 0.45 µm de poro (Millipore). Se midió el volumen obtenido de filtrado y se le determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976). El filtrado obtenido se almacenó en alícuotas de 2 ml a -70 °C. Este filtrado se utilizó para la realización de los bioensayos y para efectuar el fraccionamiento cromatográfico.

5.3. Bioensayos

5.3.1. Análisis de letalidad en ratones y evaluación de los daños histopatológicos causados por el extracto acuoso

Se evaluó la actividad letal del extracto de *M. complanata* en ratones mediante inyección en la vena caudal y mediante administración por sonda gástrica a diferentes dosis de proteína (0.33, 0.67, 1.33, 2.67, 4.00 y 5.33 μg de proteína/g de peso corporal). Cada dosis de proteína se disolvió en 0.1 ml de solución salina fisiológica esterilizada (NaCl al 0.9 %). Las muertes que ocurrieron durante las primeras 24 horas después de la administración del extracto fueron registradas para calcular la dosis letal media (DL_{50}) utilizando el método de Lorke (1983). Los ratones sobrevivientes, incluyendo a los controles a los que se les administró solamente la solución salina, se observaron por un periodo de 24 horas antes de sacrificarlos por dislocación cervical.

Tanto a los animales que murieron por la administración del extracto, como a los que se sacrificaron por dislocación cervical a las 24 horas de la administración, se les extrajeron inmediatamente los siguientes órganos: pulmón, riñón, hígado y cerebro. Estos órganos, una vez extraídos, se fijaron en una solución de formol al 10 % durante 2 a 3 días a 4 °C. Las muestras de los diferentes tejidos se deshidrataron con alcohol etílico, utilizando concentraciones graduales de alcohol etílico en agua (70, 80, 90, 96 %), para después embeberlas en parafina. Se realizaron cortes de 5 a 6 μm mediante un microtomo, los cuales fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina-eosina para ser examinadas con un microscopio de luz.

En otros experimentos, se colectaron muestras de sangre por punción cardiaca (n= 3) de los ratones, una hora después de haberseles inyectado el extracto de *M. complanata* intacto y desnaturalizado a las dosis de 2.7 y 4 μg de proteína/g de peso corporal. Se obtuvo el suero de las muestras de sangre para la determinación de su actividad enzimática de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) mediante equipos comerciales (Sera-Pak). La

actividad de ALT y AST se expresó en unidades por litro. En el caso de la ALT, una unidad se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1.0 μmol de L-alanina en 2-oxoglutarato por minuto, mientras que para la AST una unidad se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1.0 μmol de L-aspartato en 2-oxoglutarato por minuto a las condiciones del ensayo.

5.3.2. Ensayo para evaluar la actividad dermonecrótica

A un grupo experimental de tres ratones se les inyectó por vía intradérmica (i.d.) el extracto de *M. complanata* a una dosis de 3.3 μg de proteína/ g de peso corporal disueltos en 100 μl de solución salina en la parte dorsal previamente afeitada. A otro grupo se les administró la misma dosis de extracto previamente desnaturalizado a ebullición durante 20 minutos. Todos los ratones se anestesiaron con ketamina antes de afeitarse y administrárseles el extracto. Se observaron los cambios en la piel durante un periodo de 24 horas, posteriormente los ratones se sacrificaron y se obtuvieron muestras de piel para realizar un análisis histológico del tejido.

5.3.3. Modelo de aorta aislada de rata

Para monitorear el efecto vasoconstrictor del extracto de *M. complanata* y sus fracciones se empleó el ensayo de anillos de aorta aislados de rata previamente descrito por Feelisch et al. (1999) con las siguientes modificaciones: se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, las cuales se anestesiaron con cloroformo y se sacrificaron por decapitación. Se extrajo la aorta torácica descendiente y se colocó en solución fisiológica de Krebs-Henseleit (pH 7.4; 126.8 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 30 mM NaHCO_3 y 5 mM D-glucosa) con baño de hielo y gasificada constantemente con una mezcla de 95 % O_2 y 5 % CO_2 . Inmediatamente después de extraerla, se limpió el interior de la aorta haciendo fluir solución de Krebs-Henseleit a través de ella para prevenir la formación de coágulo. La aorta se limpió de tejido conectivo y se

cortaron segmentos de 4 a 5 mm. Los anillos de la aorta se montaron entre ganchos de acero inoxidable suspendidos en cámaras de baño orgánico que contienen solución de Krebs-Henseleit oxigenada constantemente a 37 °C. Los tejidos se estabilizaron durante 60 min bajo una tensión de 1.5 g a 37 °C. Durante este período los tejidos se lavaron cada 15 min. Después del ajuste final a la tensión basal de 1.5 g, los segmentos de aorta se contrajeron primero con 100 mM KCl para sensibilizar el tejido. Una vez que se estabilizó la contracción con el KCl, los tejidos se lavaron con solución de Krebs-Henseleit para recuperar la tensión basal de 1.5 g. Después de restablecer la tensión basal, los tejidos se contrajeron con fenilefrina (1 μ M), se registró el grado de contracción a los 15 min y se tomó este valor como estándar. Una vez registrada la contracción con fenilefrina, los tejidos nuevamente se lavaron para recuperar la tensión basal y entonces se agregó el extracto. Los cambios en la tensión isométrica se midieron con transductores de fuerza, acoplados a un polígrafo Grass 7D de cuatro canales de registro. El efecto vasoconstrictor se expresó como el porcentaje de la contracción inicial inducida con fenilefrina.

5.3.4. Ensayo de hemólisis

El monitoreo de la actividad hemolítica se realizó de acuerdo con el método empleado por Torres et al. (2001), que brevemente se describe a continuación: se utilizaron eritrocitos de ratas machos (275 - 325 g) lavados en una solución de Alsever (pH 7.4; 120 mM D-glucosa, 30 mM citrato de sodio, 7 mM NaCl y 2 mM ácido cítrico). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 50 μ l de una suspensión de eritrocitos al 1 % en solución amortiguadora de Alsever más la muestra a evaluar disuelta en 50 μ l de la misma solución. Los tubos se llevaron a un volumen de 1 ml con solución de Alsever. Las muestras así preparadas se incubaron durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó a 2,500 rpm (1,430 x g) durante 4 min a 4 °C y el resultado de la hemólisis se evaluó mediante la liberación de hemoglobina haciendo lecturas en un espectrofotómetro (Lambda Bio, Perkin Elmer Co.) a una

longitud de onda (λ) de 415 nm. El efecto hemolítico se expresó como el porcentaje de hemoglobina liberada comparado con la hemoglobina presente en la hemólisis total producida por la suspensión de las muestras de eritrocitos en agua desionizada, en lugar de la solución de Alsever. Una unidad hemolítica media (UH_{50}) se define como la cantidad de proteína requerida para producir un 50 % de hemólisis.

A. Hemólisis retardada para identificación de palitoxina

Con la finalidad de observar si la actividad hemolítica del extracto de *M. complanata* está relacionada con la posible presencia de sustancias similares a la palitoxina, se desarrolló el ensayo hemolítico incubando los eritrocitos con el extracto desnaturalizado durante 4 horas a 37 °C en lugar del periodo de 30 min de incubación. De manera adicional, se realizó el ensayo hemolítico con el periodo de incubación de 4 horas empleando eritrocitos preincubados con 0.1 mM de ouabaína, un inhibidor específico de la palitoxina, a 37 °C durante 30 min. Se ha reportado que la inhibición de la actividad hemolítica con ouabaina indica la presencia de palitoxina (Hoffmann et al., 2008).

5.3.5. Ensayo de actividad de PLA₂

Se determinó la actividad de PLA₂ de los extractos mediante un equipo colorimétrico para determinar actividad de PLA₂ de secreción (Cayman Chemical, MI, USA). El ensayo utiliza el análogo 1,2-ditio-diheptanoil fosfatidilcolina como sustrato. Los tioles libres generados por la hidrólisis del tioéster en la posición sn-2 por las PLA₂ se detectó utilizando DTNB (5,5'-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzoico)). Los cambios en el color se monitorearon mediante un lector espectrofotométrico de microplacas Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) a 414 nm, registrando las lecturas cada min por 10 min. La actividad de PLA₂ se expresó en μ mol de sustrato hidrolizado por min por mg de proteína.

5.3.6. Ensayo para determinar actividad caseinolítica

Con la finalidad de observar si el extracto de *M. complanata* presenta enzimas con actividad de proteasa se determinó su actividad caseinolítica de acuerdo al método de Murata et al. (1963) de la siguiente manera: 0.4 ml de solución de caseína (2 % en 0.2 M de amortiguador Tris-HCl a un pH de 7.5) se incubaron con diferentes concentraciones del extracto (10 – 100 µg) a 37 °C por 30 min. La reacción se detuvo agregando 1.5 ml de ácido tricloroacético 0.44 M dejando así en reposo por 30 min. La mezcla se centrifugó a 1500 x g durante 15 min. Una alícuota de 1 ml del sobrenadante se mezcló con 2.5 ml de carbonato de sodio 0.4 M y 0.5 ml de reactivo de Folin diluido 1:2. El desarrollo de color se registró a 660 nm, una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para incrementar la absorbancia en 0.01 a 660 nm/h a 37 °C. La actividad caseinolítica se expresó unidades por min por mg de proteína.

5.4. Fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso de *M. complanata* mediante FPLC

El extracto de *M. complanata* se sometió a un fraccionamiento cromatográfico mediante FPLC (Pharmacia Biotech), utilizando una columna de intercambio iónico de 200 ml de capacidad, empaquetada con DEAE-celulosa y equilibrada con un amortiguador de acetato de amonio 10 mM, pH 7. La columna se eluyó con un gradiente escalonado de una solución amortiguadora de acetato de amonio 10 mM y NaCl 1 M, pH 7, a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La detección se realizó mediante un espectrofotómetro ajustado a 280 nm. Durante el fraccionamiento se realizaron varias inyecciones del extracto, cada inyección equivalente a 4 mg de proteína en un volumen total de 10 ml de agua desionizada. Se colectaron fracciones de 10 ml cada una, mismas que se reagruparon de acuerdo a los picos del cromatograma. Estas fracciones se concentraron por liofilización, se resuspendieron en agua desionizada y se les determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford.

Después del fraccionamiento inicial realizado por cromatografía de intercambio iónico, las fracciones con mayor rendimiento de proteína se sometieron a una separación mediante cromatografía de exclusión para eliminar el contenido de sales que se agregó en el primer fraccionamiento. Para este fin, se utilizó una columna de 200 ml empaquetada con Sephadex G-15, ya que su rango de fraccionamiento es de péptidos menores a 1.5 kDa. Esta columna se eluyó con ácido acético 1.6 mM a una velocidad de flujo de 3 ml/min, la absorción se registró a 280 nm. En cada inyección se aplicaron 1.5 a 3.5 mg de proteína en un volumen total de 10 ml de agua desionizada. Al igual que en el paso anterior, las fracciones obtenidas se concentraron por liofilización, se resuspendieron en agua desionizada y se les determinó la concentración de proteínas totales. A las fracciones obtenidas mediante este procedimiento se les determinó su actividad de PLA₂, así como su actividad hemolítica y vasoconstrictora.

5.5. Análisis de las fracciones mediante HPLC en fase reversa

Las fracciones obtenidas mediante el fraccionamiento por FPLC se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase reversa. Para esto, se utilizó un sistema cromatográfico de la marca Waters equipado con una bomba cuaternaria de entrega de disolventes modelo 600, un detector de arreglo de diodos Waters modelo 996, un inyector manual Rheodyne 7725i y un degasificador electrónico (Metachem Technologies Inc.). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Millennium 2000 (Waters). La columna de separación utilizada fue una semipreparativa C₄ (YMC-Pack, 10 X 250 mm; 5 µm de diámetro de partícula; 300 Å de tamaño de poro) equipada con una precolumna C₄ (YMC-Pack, 10 X 4.6 mm; 5 µm de diámetro de partícula; 300 Å de tamaño de poro). El flujo que se utilizó fue de 2.5 ml/min con un gradiente que va de 100 % de una solución A a un 100 % de solución B, donde: (A) 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA) en agua y (B) 90 % de acetonitrilo en agua con 0.085 % de TFA. La muestra, con una concentración de 200 µg de proteína/ml, previamente

filtrada con acrodiscos (Waters, 13 mm GHP 0.2 μm), se diluyó hasta obtener un volumen de 2.5 ml en solución A. Estos 2.5 ml se inyectaron utilizando un asa de 5 ml.

5.6. *Electroforesis en gel*

Durante el fraccionamiento cromatográfico del extracto de *M. complanata* se realizaron análisis electroforéticos en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE), utilizando los métodos convencionales previamente descritos (Schägger & Von-Jagow, 1987). Estos análisis se realizaron utilizando geles de poliacrilamida al 12 % con Tris-glicina como amortiguador de corrida, los cuales se corrieron a 120 V durante aproximadamente 2 h. Las bandas de proteína se visualizaron mediante la técnica de tinción de Coomassie. Para la determinación de los pesos moleculares relativos de las proteínas presentes en las muestras se utilizaron estándares preteñidos de amplio espectro (Bio-Rad Cat # 161-0318).

5.7. *Obtención de los compuestos no proteínicos mediante el método de reciclaje y corte.*

Los compuestos no proteínicos de una de las fracciones obtenidas mediante HPLC en fase reversa se obtuvieron mediante el método de reciclaje y corte en HPLC. Para este fin, se utilizó un equipo cromatográfico de la marca Waters equipado con un detector de índice de refracción Waters modelo 2410. El control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Millennium 2000. Se utilizó una columna cromatográfica semipreparativa C18 (Spherisorb, 10 X 250 mm; 5 μm de diámetro de partícula; 80 Å de tamaño de poro) que se eluyó isocráticamente con una solución de metanol-agua (1:1) a un flujo de 6 ml/min. La observación de los picos se realizó mediante un detector de índice de refracción.

5.8. Análisis espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos no proteínicos purificados.

Los espectros de resonancia magnética nuclear, en sus modalidades de una y dos dimensiones, se midieron en agua deuterada (D₂O) en espectrofotómetros Varian Mercury 300, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros de RMN de ¹H, así como los experimentos bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC, se determinaron a 300 MHz, mientras que los espectros de ¹³C se determinaron a 75.4 MHz. Los espectros de masas fueron registrados en un espectrómetro JEOL SX-102A, utilizando como método de ionización el impacto electrónico.

*5.9. Efecto del blanqueamiento sobre las actividades farmacológicas y tóxicas del extracto de *M. complanata**

Con la finalidad de observar si las zooxantelas simbiotes presentan alguna contribución en el grado de toxicidad y/o los efectos farmacológicos que presenta el extracto de *M. complanata*, se colectaron más fragmentos de este hidrocoral para inducir su blanqueamiento artificial y evaluar si el extracto obtenido a partir de estos fragmentos blanqueados presenta los mismos efectos tóxicos encontrados en el extracto obtenido a partir de fragmentos del hidrocoral bajo condiciones fisiológicas normales.

Las muestras se colectaron con cincel y martillo en la zona conocida como “La Bocana Chica” del Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos en Noviembre del 2008. Después de recolectarse, los fragmentos fueron transportados a un acuario con flujo de agua de mar y en la misma noche se anclaron individualmente a una base de acrílico con plastilina. Después de esto, los fragmentos se separaron en dos grupos, control y experimental, y se colocaron en dos estanques de 80 L montados al aire libre con un flujo de agua de mar a temperatura ambiente (27 °C). Los fragmentos se dejaron acondicionar en los estanques durante una semana.

Después del periodo de acondicionamiento, la temperatura del estanque con el grupo experimental se elevó a una temperatura de 31 °C durante 9 días y posteriormente se elevó a 33 °C durante 4 días más para inducir el blanqueamiento de los fragmentos. Por otro lado, el estanque con los grupos control se mantuvo a una temperatura de 27 °C durante el tiempo que tardaron en blanquearse los fragmentos del grupo experimental. Una vez que se observó el blanqueamiento del grupo experimental, los fragmentos de ambos grupos se desmontaron de sus bases y se almacenaron a -70 °C. Posteriormente se prepararon los extractos a partir de los fragmentos de ambos grupos de la misma forma en la que se preparó el extracto en la primera recolecta del hidrocoral.

*5.10. Identificación de los nematocistos presentes en *M. complanata**

Considerando la importancia de los nematocistos en la diferenciación taxonómica de los organismos del género *Millepora* con respecto a otros cnidarios, se preparó un extracto de nematocistos para su observación e identificación al microscopio.

5.10.1. Extracción de los nematocistos

Los nematocistos se extrajeron por el método previamente reportado por Radwan (2002) que se describe a continuación: los nematocistos se liberaron del exoesqueleto del hidrocoral al sumergir los fragmentos en solución salina ácida (HCl 0.02 M en NaCl 0.15 M, pH 5.5) con agitación suave durante 24 h a 4 °C. Después de este tiempo, los fragmentos del hidrocoral se removieron y la suspensión resultante se filtró usando una malla metálica (0.5 mm de poro) para retener la mayor parte de los tejidos del hidrocoral. El filtrado resultante se centrifugó por 1 a 2 min a 200 rpm arrojando precipitados con pequeñas partículas del exoesqueleto calcáreo, zooxantelas y nematocistos. El sobrenadante, que contiene células de los pólipos y zooxantelas principalmente, se removió con una pipeta. El precipitado que presenta los nematocistos y las zooxantelas se removió

con pipeta y se resuspendió en agua de mar filtrada para centrifugarse nuevamente durante 1 min a 200 rpm (5 x g). La capa superficial que contiene la mayor parte de zooxantelas se removió y el precipitado se resuspendió nuevamente en agua de mar filtrada. Este proceso se repitió dos veces más. El precipitado resultante, que consiste en una suspensión de nematocistos, se almacenó a -20 °C.

5.10.2. Observación microscópica de los nematocistos

La suspensión de nematocistos se observó directamente a través del microscopio de luz. Para un análisis más detallado, los nematocistos se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido (MET y MEB). Para ambos tipos de microscopía electrónica, los nematocistos se fijaron en una solución de agua de mar filtrada con un 3 % de glutaraldehído y 0.1 M de cacodilato. Posteriormente se fijaron en un amortiguador de cacodilato al 0.2 % de OsO₄ y se deshidrataron utilizando concentraciones graduales de alcohol etílico en agua (70, 80, 90, 96 %). Para los análisis mediante MET, los nematocistos fueron embebidos en resina epóxica, de los bloques obtenidos se realizaron cortes finos (60 nm) mediante un ultramicrotomo (Mtx RMC) y se contrastaron con uranilo y citrato de plomo. Las secciones se observaron mediante un microscopio electrónico (JEOL JEM 1010) operado a 80 kV. Para las observaciones de MEB, las muestras se secaron en un aparato de secado de punto crítico (Polaron E5000), se cubrieron con carbón y oro. Finalmente, se observaron con un microscopio electrónico de barrido (Zeiss DMS 950) a una aceleración de 20 a 25 kV. Los tamaños de las cápsulas de los nematocistos se midieron mediante las imágenes de MEB y se expresaron como la media ± S.E.M.

5.11. Análisis estadísticos

Los resultados están expresados como la media \pm S.E.M. de $n = 3$ a 4 experimentos, en el caso de la actividad hemolítica las curvas concentración-respuesta (CCR) se repitieron tres veces con una rata diferente cada una. Las CCR se graficaron y ajustaron a la ecuación de Boltzman mediante el programa de análisis de datos y gráficas Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Las comparaciones multiples se realizaron mediante un ANOVA de dos vías, seguido por una prueba post hoc de Bonferroni. Las comparaciones entre dos poblaciones se hicieron mediante un análisis t de Student. En todos los casos la significancia estadística está indicada por $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1. Preparación del extracto acuoso de *M. complanata*

Los fragmentos de *M. complanata* que se emplearon en la preparación del extracto crudo para este estudio fueron recolectados en mayo del 2003, el extracto se preparó ese mismo año. Para la preparación del extracto crudo se utilizaron 4.912 kg (peso húmedo) del hidrocoral, mismos que se sometieron a agitación en 6 L de agua desionizada durante 18 h a 4 °C. Con esto se obtuvieron 31 g de polvo liofilizado que se almacenó a -20 °C. Conforme se fue necesitando para los diversos experimentos, este polvo se resuspendió en agua desionizada y se sometió al procedimiento de centrifugación, filtración y determinación de proteína que se indica en la sección de materiales y métodos. De esta manera, por cada 3 g de polvo liofilizado de *M. complanata*, se obtuvieron aproximadamente 36 mg de proteínas totales, según el método de Bradford.

6.2. Efectos farmacológicos del extracto de *M. complanata*

6.2.1. Letalidad en ratones

El extracto de *M. complanata* se administró por dos vías a diferentes concentraciones (0.33, 0.67, 1.33, 2.67, 4.00 y 5.33 µg de proteína/g de peso corporal) en ratones con la finalidad de determinar su letalidad y sus efectos tóxicos sistémicos. De esta manera, se encontró que al administrar el extracto mediante sonda gástrica no se observó ningún síntoma en los ratones, todos sobrevivieron después del periodo de observación de 24 h. En contraste, la administración del extracto por vía i.v. produjo violentas convulsiones, ptialismo, dificultad respiratoria y muerte en menos de un minuto después de su administración a la dosis más alta. Esta muerte inmediata tras la administración i.v. del extracto se consideró para el análisis estadístico mediante el método de

Lorke (1983) y se encontró que la DL_{50} del extracto es de 4.62 μg de proteína/g de peso corporal.

6.2.2. Efectos sistémicos

Los ratones que sobrevivieron a la muerte inmediata causada por la administración i.v. del extracto (1.33, 2.67 y 4.00 μg de proteína/g de peso) presentaron un cuadro de hematuria, eritema en las orejas y una severa inflamación en los ojos aproximadamente una hora después de la administración. Bajo el efecto de estas dosis, los ratones además presentaron una reducción en la movilidad muy marcada con relación a los ratones a los que se les administraron las concentraciones más bajas (0.33 y 0.67 μg de proteína/g) y a los controles que se inyectaron con solución salina. Todos los ratones que presentaron este cuadro murieron en el transcurso de 24 h después de la administración.

El procedimiento anterior se repitió con el extracto de *M. complanata* sometido previamente a ebullición durante 20 min para inducir la desnaturalización de su contenido de proteína. De esta forma se observó que aún después de desnaturalizar su contenido de proteína el extracto conserva su capacidad para inducir la muerte inmediata en ratones, ya que no hay modificación del valor de la DL_{50} . Del mismo modo, bajo estas condiciones de desnaturalización, la muerte inmediata inducida por el extracto en los ratones viene precedida por fuertes convulsiones, ptialismo y dificultad respiratoria. Sin embargo, contrario a lo ocurrido con la muerte inmediata, se encontró que la capacidad del extracto para inducir la muerte tardía a dosis intermedias, que viene acompañada de hematuria; eritema e inflamación, se perdió después de la desnaturalización del contenido de proteína del extracto.

6.2.3. Daños histopatológicos

Mediante la observación al microscopio de luz de los cortes de tejidos de los ratones inyectados con las diferentes dosis del extracto de *M. complanata* por vía

i.v. no se observaron cambios histopatológicos visibles en los cortes de hígado y cerebro. Sin embargo, a partir de la dosis de 1.33 μg de proteína/g de peso si se observaron cambios histopatológicos severos en cortes de riñón y pulmón, de una manera dependiente de la dosis.

En los cortes de riñón, se observó al microscopio congestión vascular que aumentó conforme aumentaba la dosis del extracto administrada. En estos cortes, también se observó la presencia de material proteináceo intratubular. A una dosis de 4.00 μg de proteína por g de peso corporal se observó congestión vascular glomerular, edema endotelial y material proteináceo intratubular en una forma más densa (Figura 6A). Mediante la observación al microscopio de los cortes de tejido pulmonar se observó daño agudo alveolar, edema alveolar y hemorragia hipóxica, siendo estos cambios más severos a la dosis de 4.00 μg de proteína por g de peso corporal (Figura 6B). En el caso de los ratones a los que se les administró el extracto de *M. complanata* previamente desnaturalizado no se observaron cambios histopatológicos significativos con respecto a los controles en ninguno de los cortes de tejidos analizados.

Con el objeto de evaluar si el extracto de *M. complanata* induce daño hepático se evaluaron los niveles de actividad de las enzimas ALT y AST en los ratones 1 hora después de administrarles el extracto intacto y desnaturalizado por vía i.v. Sin embargo, es importante mencionar que las muestras de sangre de los ratones inyectados con el extracto intacto estaban hemolizadas, lo cual no ocurrió en la sangre de los ratones inyectados con el extracto desnaturalizado. A pesar de esto, se observó que el nivel de actividad de la AST aumentó significativamente tras la administración del extracto intacto pero no se observó aumento significativo en el nivel de la ALT (Figura 7). En el caso de los ratones inyectados con el extracto desnaturalizado no se observaron cambios significativos en los niveles de estas enzimas.

6.2.4. Efecto dermonecrótico

24 horas después de haber administrado el extracto intacto de *M. complanata* por vía i.d. (3.3 µg de proteína/g de peso corporal) se observó una lesión dermonecrótica con un diámetro aproximado de 2 mm localizada en el sitio de la inyección (Figura 8A y B). Las observaciones histológicas de cortes de piel revelaron rabiomiólisis de fibras musculoesqueléticas, edema, congestión vascular marcada con una densa infiltración de macrófagos y neutrófilos. Además, se observa una vesícula grande formada por edema y extravasación de eritrocitos (Figura 8D). Estos cambios no se observaron en los ratones a los que se les administró el extracto desnaturalizado.

6.2.5. Efecto vasoconstrictor

Al evaluar el efecto del extracto sobre el tono muscular de los segmentos de aorta aislados de rata (0.1 a 100 µg de proteína/ml) se encontró que éste produce un efecto vasoconstrictor sostenido que depende de la concentración ($CE_{50} = 16.14 \pm 1.19$ µg de proteína/ml). Este efecto vasoconstrictor presenta una potencia similar a la vasoconstricción inducida por la ionomicina ($CE_{50} = 8.00 \pm 1.13$ µg/ml) que se utilizó como control en este bioensayo. Después de desnaturalizar el contenido de proteína del extracto, incubándolo durante 20 min en un baño de agua en ebullición, se observó un desplazamiento significativo de la curva concentración-respuesta hacia la derecha ($CE_{50} = 41.97 \pm 1.067$ µg de proteína/ml). En la Figura 9, se muestran las curvas concentración-respuesta para estos efectos.

6.2.6. Efecto hemolítico

El extracto de *M. complanata* también presentó un efecto hemolítico dependiente de la concentración al ser evaluado sobre eritrocitos de rata (0.01 a 31.6 µg de proteína/ml). En este caso, el extracto ($UH_{50} = 2.30 \pm 1.02$ µg de

proteína/ml) resultó ser aproximadamente 25 veces más potente que la ionomicina ($UH_{50} = 59.43 \pm 1.09 \mu\text{g}$ de proteína/ml). A diferencia de lo ocurrido con el efecto vasoconstrictor, la actividad hemolítica del extracto se perdió completamente después de desnaturalizarlo en un baño de agua a ebullición. Las curvas concentración respuesta correspondientes a este efecto se muestran en la Figura 10.

6.2.7. Actividad enzimática

Con la finalidad de observar si alguno de los componentes presentes en el extracto de *M. complanata* pudieran ser proteínas con actividad enzimática se determinó la actividad de proteasa y la actividad de PLA_2 en el extracto. De esta manera, se encontró que el extracto de este hidrocoral no presenta actividad de proteasa. Sin embargo, el extracto sí presenta actividad de PLA_2 ($58.456 \pm 1.983 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$). Para la determinación de actividad de proteasa se utilizó como control una proteasa de *Streptomyces griseus* (Sigma), cuya actividad enzimática fue $980.4 \pm 5.2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Para la determinación de actividad de PLA_2 se utilizó como control una PLA_2 de secreción de veneno de abeja, cuya actividad enzimática fue $318.555 \pm 1.02 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Como era de esperarse, la actividad de PLA_2 del extracto se pierde por completo al desnaturalizar su contenido de proteína.

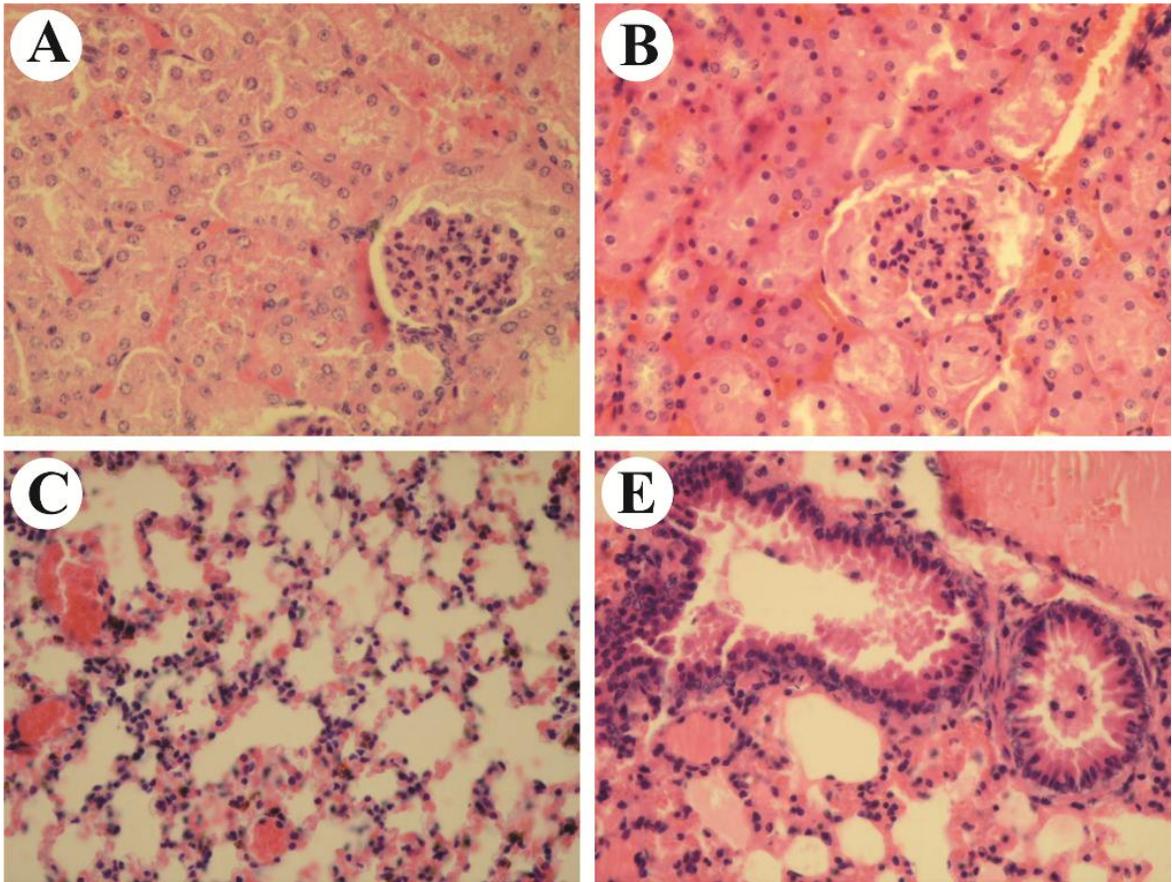


Figura 6. Fotografías de microscopía de luz que muestran los cambios histológicos observados en los ratones que murieron después de administrar el extracto de *M. complanata* a una dosis de 4.00 μg de proteína por g de peso corporal por vía i.v. Fotomicrografía de un corte de riñón de un ratón control al que se le administraron 200 μl de solución salina (A). Fotomicrografía de un corte de riñón de un ratón experimental, se observa una severa congestión capilar peritubular (B). Fotomicrografía de un corte de pulmón de un ratón control al que se le administraron 200 μl de solución salina (C). Fotomicrografía de un corte de pulmón de un ratón experimental, se observa daño alveolar difuso agudo, edema alveolar y hemorragia intralveolar (D). Cortes teñidos con hematoxilina-eosina, magnificación x400.

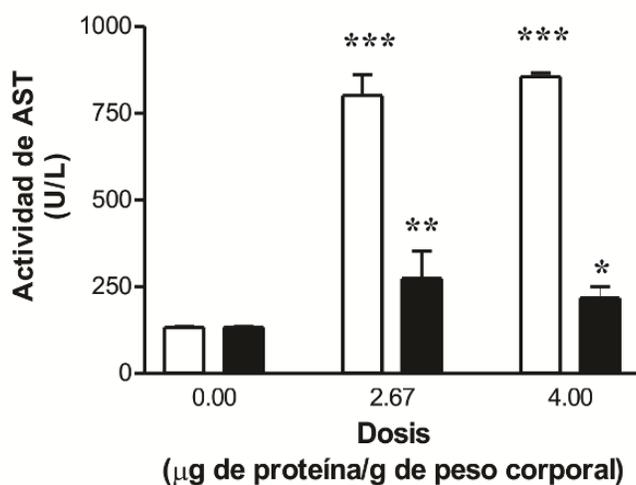
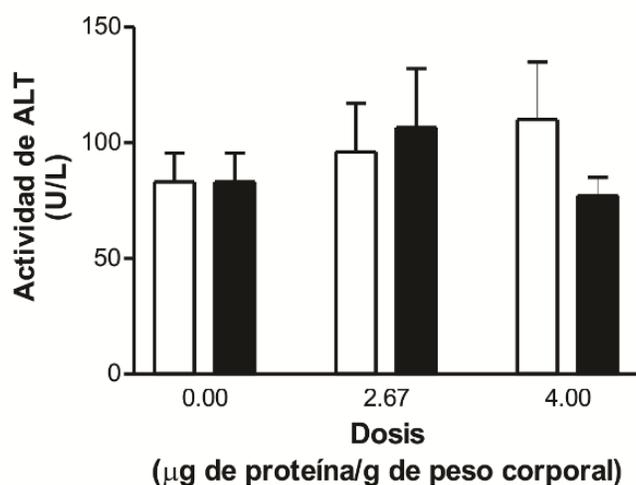


Figura 7. Cambios en los niveles de actividad de ALT y AST en suero de ratones 1 hora después de inyectarles el extracto de *M. complanata* por vía i.v. a dos diferentes dosis. Las barras blancas indican los niveles en el suero de los ratones a los que se les administró el extracto intacto. Las barras negras indican los niveles en el suero de los ratones a los que se les administró el extracto desnaturalizado. Los valores están expresados como la media \pm S.E.M. ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ indican las diferencias significativas al compararse con los valores de los ratones controles.

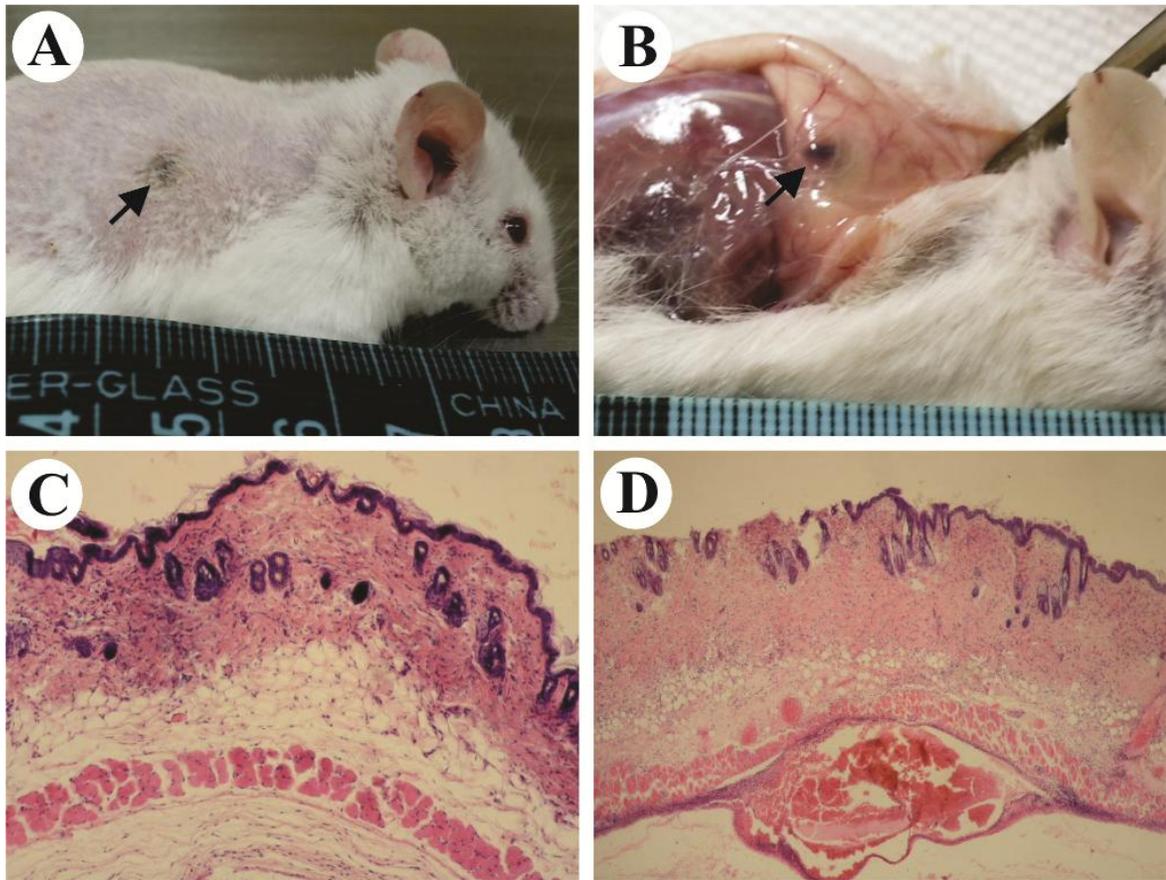


Figura 8. Cambios en la piel de los ratones causados 24 horas después de la administración i.d. del extracto de *M. complanata* (3.3 μg de proteína/g de peso corporal). Fotografías que muestran la lesión dermonecrotica formada en la zona de administración del extracto (A y B). Micrografía de luz de un corte de piel de la zona de administración de 100 μl de solución salina en un ratón control (C). Micrografía de luz de un corte de piel de un ratón experimental, se observa rbdomiólisis de fibras de músculoesqueléticas con una gran vesícula causada por edema y extravasación de eritrocitos (D). Cortes teñidos con hematoxilina-eosina, magnificación x400.

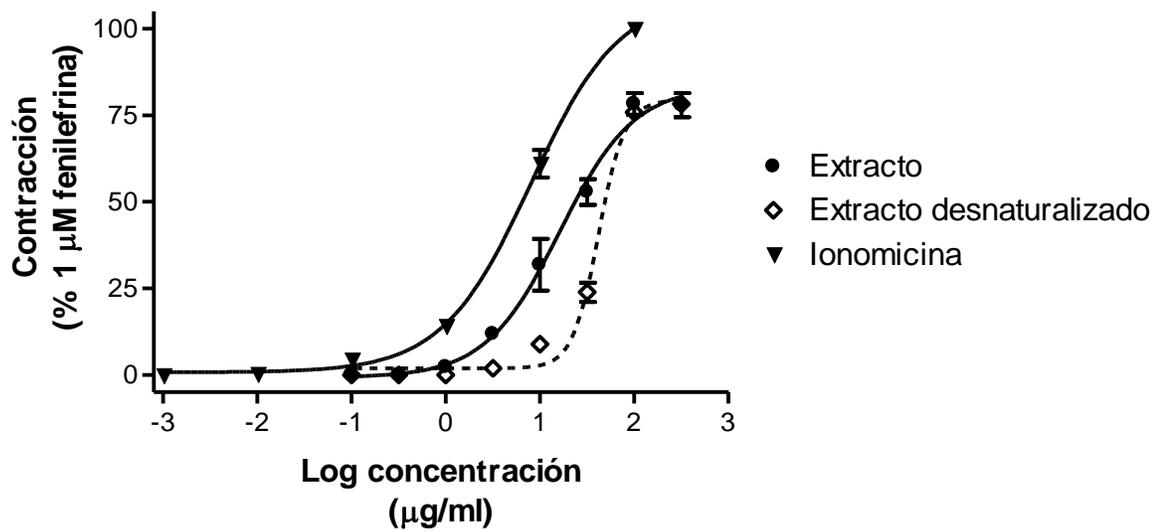


Figura 9. Efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de *M. complanata* sobre segmentos de aorta aislados de rata. En el caso del extracto, la concentración representa el contenido de proteína.

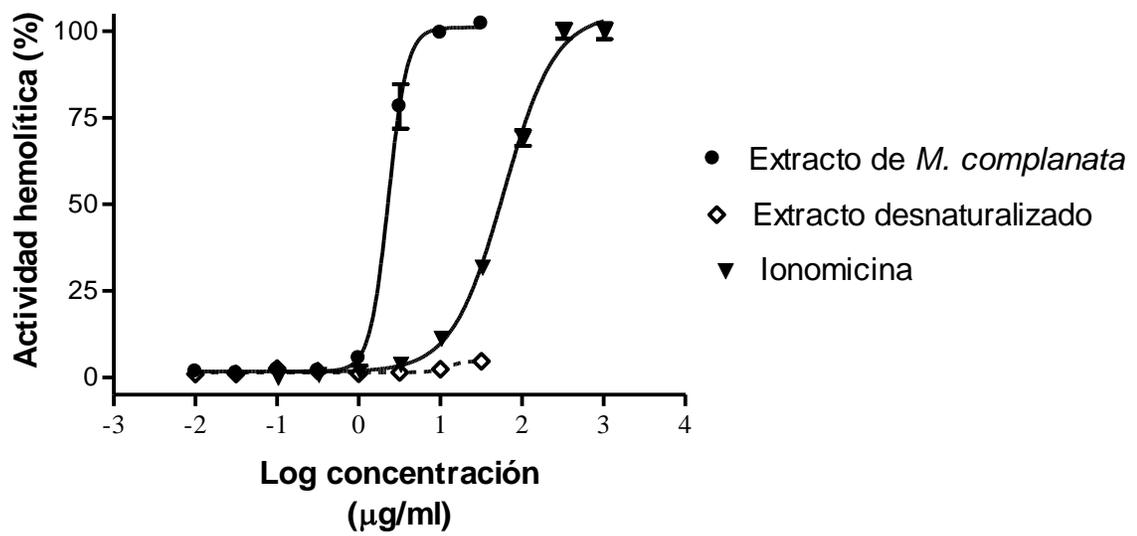


Figura 10. Efecto hemolítico inducido por el extracto de *M. complanata* sobre eritrocitos de rata. La concentración representa el contenido de proteína en el caso del extracto.

6.3. Fraccionamiento cromatográfico biodirigido

6.3.1. Cromatografía de intercambio iónico mediante FPLC

Como paso inicial para la obtención de los componentes bioactivos del extracto de *M. complanata*, éste se sometió a un fraccionamiento mediante cromatografía de intercambio iónico. De esta manera, se obtuvieron 6 fracciones cromatográficas (MC1 a MC6). En la Figura 11 se muestra el perfil cromatográfico obtenido para este fraccionamiento inicial, donde se muestran los rangos de volumen en los que se recolectó cada una de las fracciones. La determinación de proteína indicó que el rendimiento de proteína obtenido en el total de las fracciones correspondió al 69.717 % de 70 mg de proteína del extracto sometido al fraccionamiento. En la primera fracción (MC1) se concentró la mayor cantidad de proteína recuperada, la cual representó un 70.436 % del total de proteína obtenida en todas las fracciones, mientras que la fracción MC4 representó un 16.942 % del total de proteína recuperada.

6.3.2. Cromatografía de exclusión mediante FPLC

Considerando que la fracción MC1 fue la que presentó un mayor rendimiento de proteína, ésta se sometió a un segundo análisis cromatográfico, esta vez por cromatografía de exclusión. Este análisis cromatográfico condujo a la obtención de cinco nuevas fracciones (MC1-I a MC1-V). La determinación de proteínas totales de cada una de estas fracciones indicó que el rendimiento de proteína obtenido después de este fraccionamiento fue de 65.65 % del total de proteína de MC1 que se aplicó en este procedimiento cromatográfico. De estas fracciones, MC1-I fue la que presentó mayor rendimiento de proteína (88.639 % del total de proteína recuperada) seguido de MC1-II con un 10.95 % del total recuperado. En la Figura 12 se muestra el perfil cromatográfico para el fraccionamiento de MC1 en Sephadex G-15.

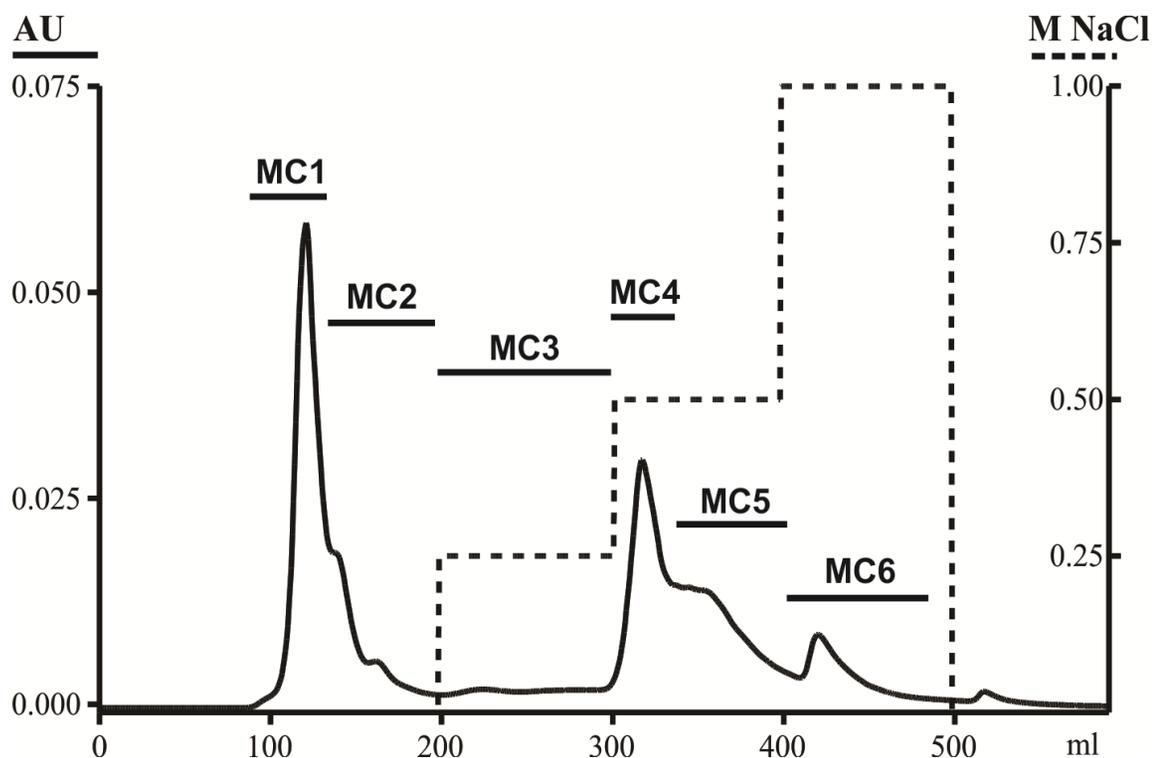


Figura 11. Perfil cromatográfico del extracto de *M. complanata* en DEAE-celulosa indicando las fracciones que se colectaron. Se utilizó un gradiente de elución escalonado de 100 % de acetato de amonio (10 mM, (pH 7) a un 100 % de acetato de amonio 10 mM + NaCl 1 M (pH 7), la línea punteada indica la concentración de NaCl. El flujo fue de 3 ml/min.

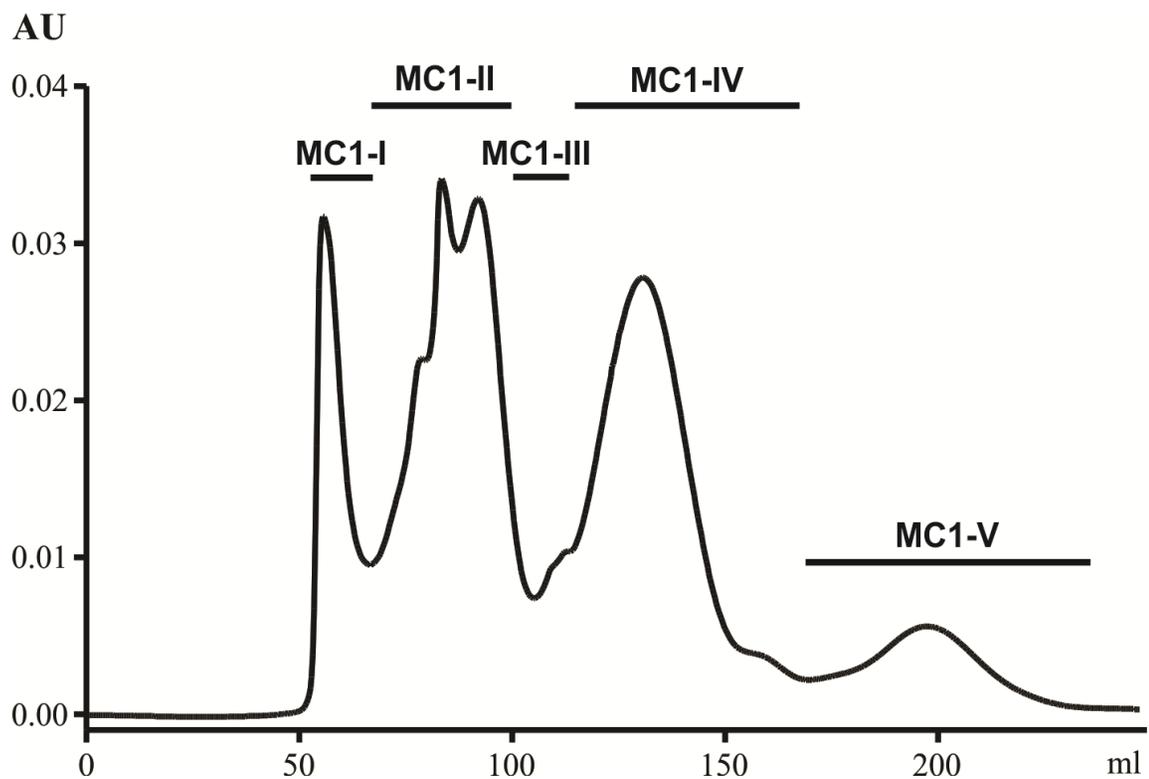


Figura 12. Perfil cromatográfico de la fracción MC1 del extracto de *M. complanata* en Sephadex G-15 indicando las fracciones que se colectaron. La columna se eluyó con ácido acético 1.6 mM a un flujo de 3 ml/min.

Se determinó la actividad hemolítica y el efecto vasoconstrictor de cada una de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico de MC1 (Figura 13). En el caso de la actividad hemolítica, todas las fracciones se evaluaron a una concentración de 1.8 μg de proteína/ml. Los resultados obtenidos a partir de las evaluaciones farmacológicas indicaron que la fracción MC1-I indujo un 99.450 ± 1.350 % de hemólisis en eritrocitos de rata. Esta misma fracción, también indujo una contracción de 88.285 ± 7.852 % sobre segmentos de aorta de rata intactos, a una concentración de 5 μg de proteína/ml. En el caso de las fracciones MC1-I y MC1-II se evaluó su efecto vasoconstrictor a una concentración de 5 μg de proteína/ml, mientras que las fracciones MC1-III y MC1-IV se evaluaron a la concentración de 1 μg de proteína/ml, debido a sus bajos rendimientos de proteína. La actividad hemolítica de cada una de las fracciones evaluadas se perdió al someterlas previamente a ebullición durante 20 min, indicando la alta probabilidad de que las toxinas responsables de la hemólisis son proteínas.

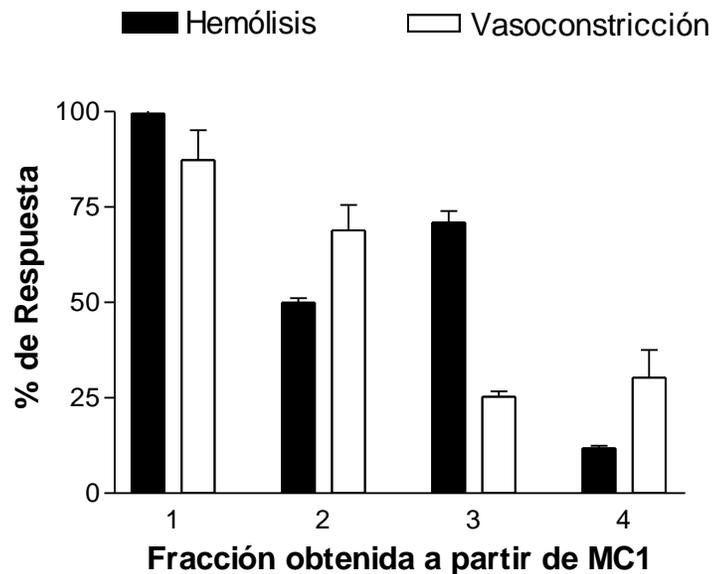


Figura 13. Efecto hemolítico y vasoconstrictor de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico de MC1 en Sephadex G-15. Para la actividad hemolítica se evaluaron las fracciones a una concentración de 1.8 μg de proteína/ml. Para el efecto vasoconstrictor, las fracciones MC1-I (1) y MC1-II (2) se evaluaron a una concentración de 5 μg de proteína/ml, mientras que las fracciones MC1-III (3) y MC1-IV (4) se evaluaron a una concentración de 1 μg de proteína/ml debido a sus bajos rendimientos. (n = 3)

6.3.3. Análisis de la fracción MC1-I mediante HPLC

La fracción MC1-I, obtenida a partir del fraccionamiento cromatográfico de MC1 en Sephadex G-15, se sometió a un análisis mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa. De esta manera, se obtuvieron 12 fracciones (MC1-IA a MC1-IL) que se recolectaron de acuerdo a los tiempos de retención indicados en el Cuadro 7, en dicho cuadro también se indican los porcentajes de proteína contenida en cada una de ellas. De las fracciones obtenidas, MC1-IK presentó un mayor rendimiento de proteínas totales, mientras que en las cuatro primeras fracciones no se presentó una cantidad detectable de proteína. En la Figura 14 se muestra el perfil cromatográfico obtenido del análisis de la fracción MC1-I mediante HPLC a una λ de 210 nm, mientras que la Figura 15 muestra un barrido a diferentes λ indicando los máximos de absorción de cada pico.

Mediante el ensayo de hemólisis se encontró que ninguna de estas fracciones presenta actividad hemolítica significativa. En este punto es importante aclarar que como en algunas de estas fracciones no se logró la detección de proteína se tomó en cuenta el peso de la muestra para su evaluación farmacológica. En el cuadro 8 se muestran los valores de actividad hemolítica de cada una de las fracciones, indicando la concentración a la cual fueron evaluadas.

Al evaluar el efecto de estas fracciones, sobre el tono de los segmentos de aorta aislados de rata, se observaron efectos vasoconstrictores significativos en las fracciones MC1-IA, MC1-IB y MC1-IC (Figura 16). Los valores obtenidos para el efecto vasoconstrictor de estas fracciones se resumen en el Cuadro 9.

A pesar de que la fracción MC1-IK presenta un alto rendimiento de proteína no se observó ningún tipo de actividad farmacológica en ésta. Esta fracción, presentó un alto grado de complejidad, similar al del perfil de MC1-I, al ser analizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones reductoras. Por otra parte, en la fracción MC1-IG si se detectó un bajo contenido de proteína. Esta fracción induce un efecto vasoconstrictor sostenido sobre los segmentos de aorta de rata (Figura 17 B) y al ser analizada mediante SDS-PAGE se observa la

presencia de una sola banda con un peso molecular de aproximadamente 61 kDa (Figura 17 A).

Cuadro 7. Tiempos de retención de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de MC1-I mediante HPLC en fase reversa.

| Fracción | Tiempo de recolección (min) | % de proteína |
|-----------------|------------------------------------|----------------------|
| MC1-IA | 6.02 – 9.52 | - |
| MC1-IB | 9.52 – 12.10 | - |
| MC1-IC | 12.10 – 15.75 | - |
| MC1-ID | 15.75 – 19.00 | - |
| MC1-IE | 19.00 – 21.60 | 0.170 |
| MC1-IF | 21.60 – 27.30 | - |
| MC1-IG | 27.30 – 30.00 | 0.145 |
| MC1-IH | 30.00 – 32.20 | - |
| MC1-II | 32.20 – 33.20 | 0.404 |
| MC1-IJ | 33.20 – 36.00 | 0.404 |
| MC1-IK | 36.00 – 39.30 | 96.062 |
| MC1-IL | 39.30 – 60.00 | 2.815 |

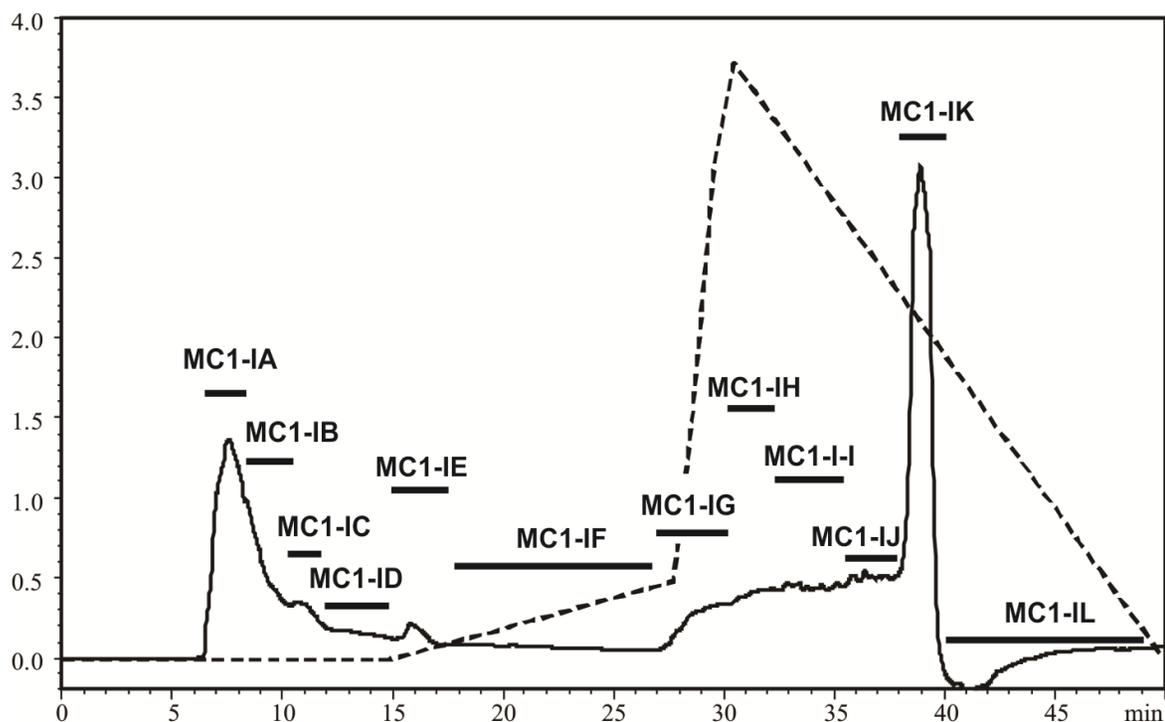


Figura 14. Perfil cromatográfico de la fracción MC1-I analizada mediante HPLC en fase reversa. Detección $\lambda = 210$ nm, columna C4. La columna se eluyó con un gradiente que va de 100 % de una solución A a un 100 % de solución B, indicado por la línea punteada del cromatograma, a un flujo de 2.5 ml/min. Solución A: 0.1 % de TFA en agua. Solución B: 90 % de acetonitrilo en agua con 0.085 % de TFA.

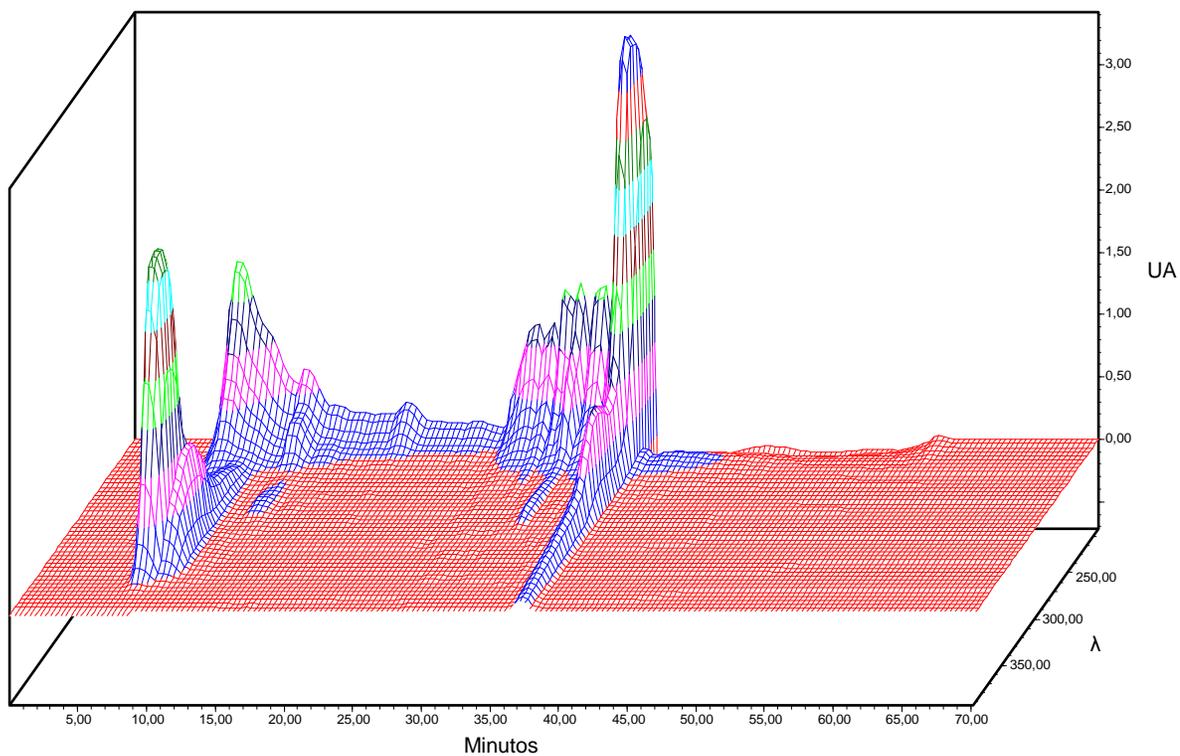


Figura 15. Barrido que muestra el perfil cromatográfico de la fracción MC1-I analizada mediante HPLC en fase reversa a diferentes longitudes de onda (λ de 205 a 400 nm).

Cuadro 8. Evaluación de la actividad hemolítica de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de MC1-I mediante HPLC en fase reversa (n = 3).

| Fracción | % de hemólisis | Concentración evaluada |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|
| MC1-IA | 4.58 ± 0.030 | 200 µg de muestra/ml |
| MC1-IB | 2.81 ± 0.006 | 275 µg de muestra/ml |
| MC1-IC | 0.00 ± 0.000 | 200 µg de muestra/ml |
| MC1-ID | 0.00 ± 0.000 | 158.3 µg de muestra/ml |
| MC1-IE | 2.08 ± 0.000 | 1.8 µg de proteína/ml |
| MC1-IF | 1.98 ± 0.009 | 150 µg de muestra/ml |
| MC1-IG | 3.34 ± 0.002 | 1.8 µg de proteína/ml |
| MC1-IH | 5.63 ± 0.018 | 186.66 µg de muestra/ml |
| MC1-II | 7.50 ± 0.0165 | 1.8 µg de proteína/ml |
| MC1-IJ | 5.42 ± 0.015 | 1.8 µg de proteína/ml |
| MC1-IK | 0.00 ± 0.00 | 1.8 y 10 µg de proteína/ml |
| MC1-IL | 0.00 ± 0.00 | 1.8 µg de proteína/ml |

Cuadro 9. Evaluación de la actividad vasoconstrictora de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de MC1-I mediante HPLC en fase reversa (n = 2).

| Fracción | % de vasoconstricción | Concentración evaluada |
|-----------------|------------------------------|-------------------------------|
| MC1-IA | 88.46 ± 2.23 | 1.55 mg de muestra/ml |
| MC1-IB | 91.26 ± 3.12 | 117.85 µg de muestra/ml |
| MC1-IC | 42.30 ± 1.56 | 85.71 µg de muestra/ml |
| MC1-ID | 0.00 ± 0.00 | 67.85 µg de muestra/ml |
| MC1-IE | 15.79 ± 0.01 | 0.40 µg de proteína/ml |
| MC1-IF | 21.05 ± 01.89 | 64.28 µg de muestra/ml |
| MC1-IG | 18.18 ± 3.34 | 0.40 µg de proteína/ml |
| MC1-IH | 4.17 ± 0.23 | 80.00 µg de muestra/ml |
| MC1-II | 0.00 ± 0.00 | 0.40 µg de proteína/ml |
| MC1-IJ | 0.00 ± 0.00 | 0.40 µg de proteína/ml |
| MC1-IK | 0.00 ± 0.00 | 10.00 µg de proteína/ml |
| MC1-IL | 0.00 ± 0.00 | 3.25 µg de proteína/ml |

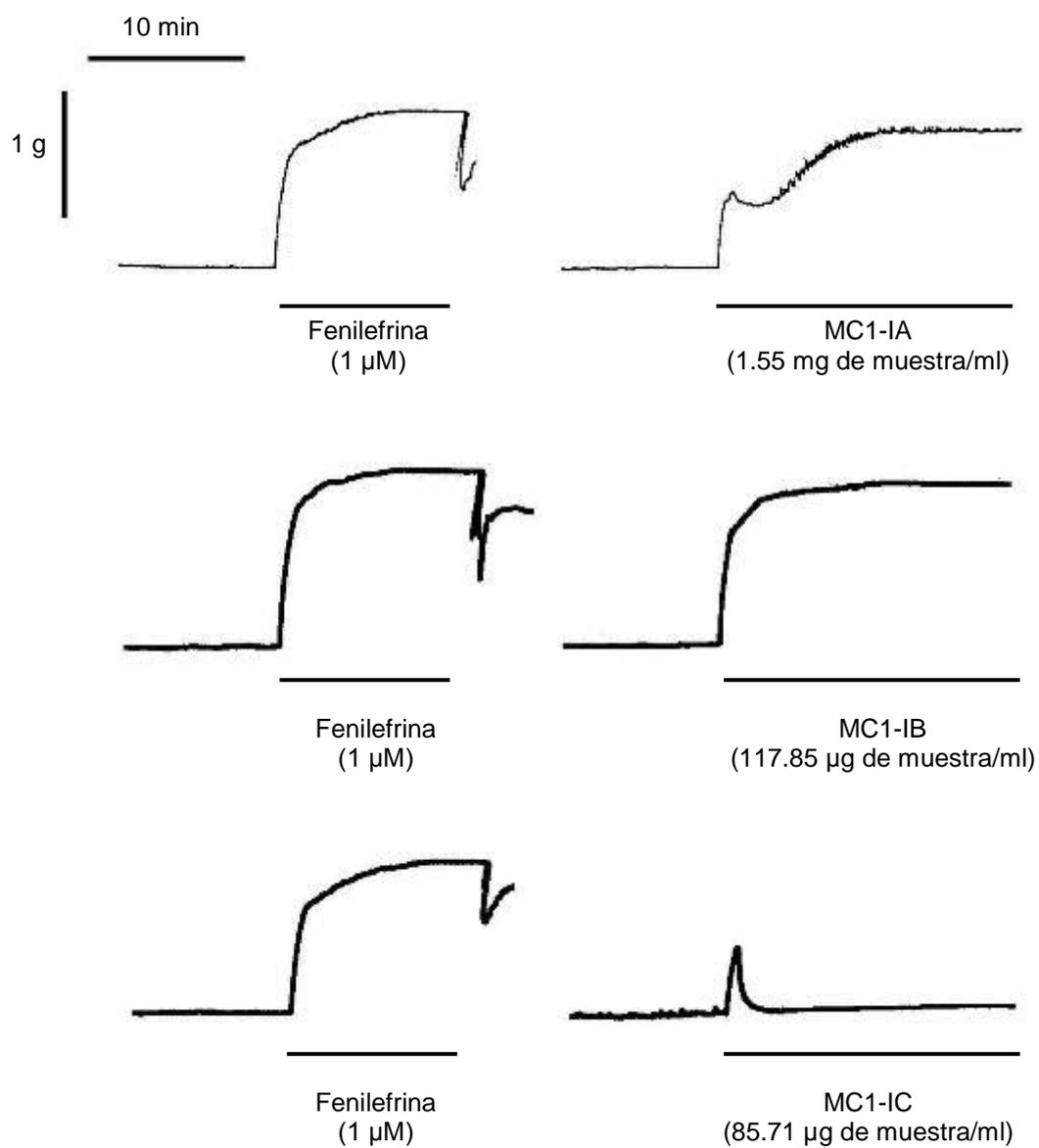


Figura 16. Efecto vasoconstrictor de las fracciones MC1-IA, MC1-IB y MC1-IC sobre el tono de la aorta de rata comparado con el efecto de la fenilefrina obtenido sobre el mismo tejido.

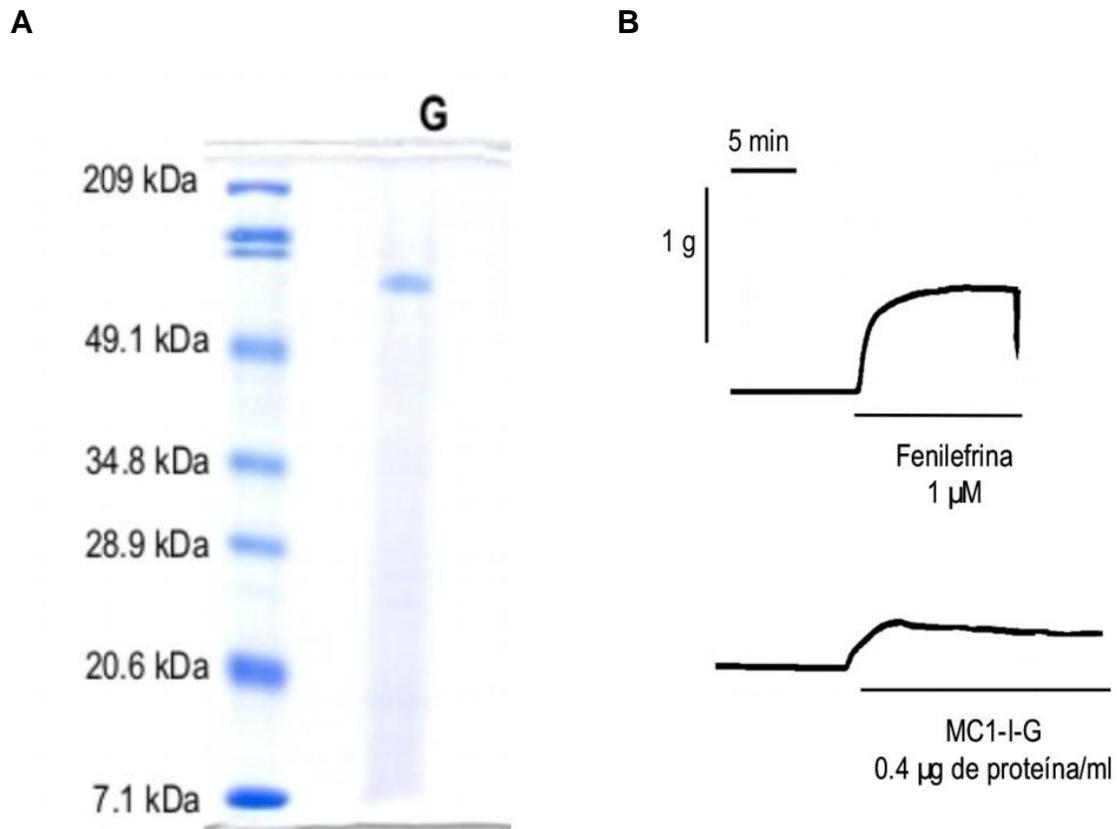


Figura 17. (A) SDS-PAGE de la fracción MC1-IG obtenida a partir del análisis de la fracción MC1-I mediante HPLC en fase reversa que indica la presencia de una banda de aproximadamente 61 kDa. (B) Efecto vasoconstrictor de la fracción MC1-IG (0.4 μg de proteína/ml) comparado con el efecto de la fenilefrina (1 μM) sobre el mismo tejido. Las bandas de proteína fueron visualizadas con tinción de Coomassie. Los pesos moleculares se determinaron mediante el uso de un marcador estándar de amplio espectro (Bio-Rad, Cat #161-0318).

6.3.4. Análisis de la fracción MC1-II mediante HPLC

La fracción MC1-II, segunda fracción que se obtuvo a partir del análisis de MC1 en Sephadex G-15, también se sometió a un análisis mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa. Mediante este análisis se colectaron 6 fracciones (MC1-IIA a MC1-IIF). Estas fracciones se recolectaron de acuerdo a los tiempos de retención indicados en el cuadro 10, en este mismo cuadro se indican los porcentajes de proteína contenida en cada una de las fracciones. En la Figura 18 se muestra el perfil cromatográfico de este análisis a una λ de 210 nm y en la Figura 19 se muestra el barrido correspondiente a diferentes λ .

Mediante la evaluación de la actividad vasoconstrictora de estas fracciones sobre segmentos de aorta de rata, se observó que la fracción MC1-IIA presentó un efecto contráctil transitorio (40.26 ± 16.85 % de la contracción inducida por fenilefrina $1\mu\text{M}$) al ser evaluado a una concentración de $0.6 \mu\text{g}$ de proteína/ml (6 mg de muestra/ml) (Figura 20A). Al realizar un gel de electroforesis de esta fracción no se detectó ninguna banda proteínica, incluso al realizar una doble tinción con plata y Coomassie.

Por otra parte, mediante el ensayo de hemólisis no se encontró actividad hemolítica en ninguna de estas fracciones al incubarse durante 30 min en presencia de los eritrocitos. Sin embargo, en el caso de la fracción MC1-IIA se encontró que tras incubarla durante 4 horas a 37°C ($12.6 \mu\text{g}$ de muestra/ml) en presencia de los eritrocitos indujo un 37.28 ± 1.07 % de hemólisis (Figura 20B). Al utilizar eritrocitos preincubados con ouabaina el efecto hemolítico de la fracción aumenta significativamente hasta un 58.26 ± 2.39 % de hemólisis al incubar con los eritrocitos durante 4 horas.

Al igual que con el extracto de *M. complanata*, la administración i.v. de MC1-IIA en ratones a una dosis de 3 mg de muestra/g de peso corporal también produjo violentas convulsiones, dificultad respiratoria y muerte en menos de un minuto. La dosis letal media para el extracto fue de $4.62 \mu\text{g}$ de proteína/g de peso corporal, equivalentes a 0.4 mg de muestra/g de peso corporal.

Cuadro 10. Tiempos de retención de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de MC1-II mediante HPLC en fase reversa.

| Fracción | Tiempo de recolección (min) | % de proteína |
|-----------------|--|----------------------|
| MC1-IIA | 6.10 – 8.40 | 51.42 |
| MC1-IIB | 8.40 – 10.74 | 11.85 |
| MC1-IIC | 10.74 – 13.46 | 10.95 |
| MC1-IID | 13.46 – 17.40 | 9.34 |
| MC1-IIE | 17.40 – 25.80 | 8.91 |
| MC1-IIF | 25.80 – 45.00 | 7.53 |

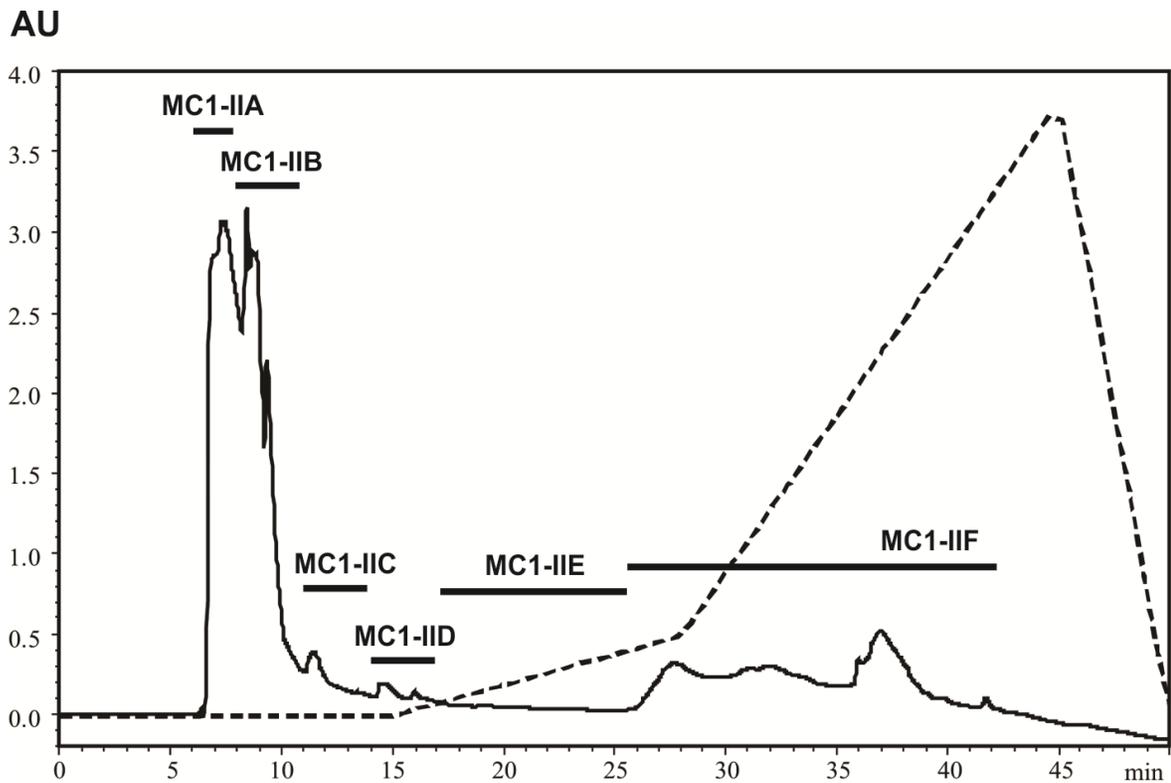


Figura 18. Perfil cromatográfico de la fracción MC1-II analizada mediante HPLC en fase reversa. Detección $\lambda = 210$ nm, columna C4. La columna se eluyó con un gradiente que va de 100 % de una solución A a un 100 % de solución B, indicado por la línea punteada del cromatograma, a un flujo de 2.5 ml/min. Solución A: 0.1 % de TFA en agua. Solución B: 90 % de acetonitrilo en agua con 0.085 % de TFA.

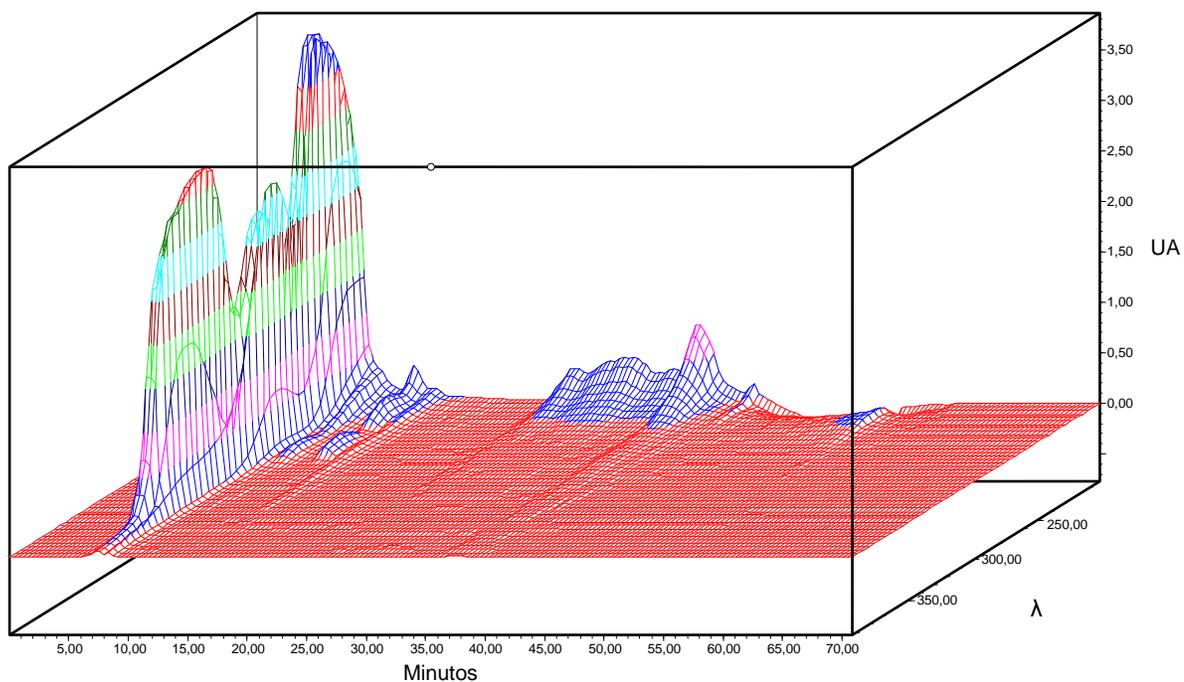


Figura 19. Barrido que muestra el perfil cromatográfico de la fracción MC1-II analizada mediante HPLC en fase reversa a diferentes longitudes de onda (λ de 205 a 400 nm)

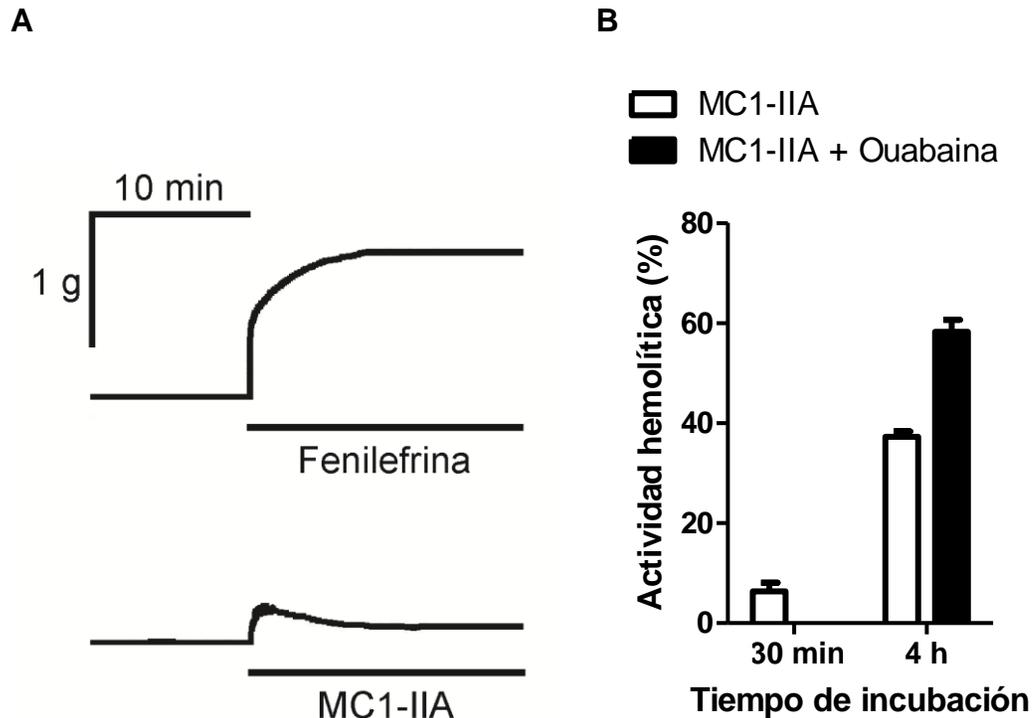


Figura 20. Efectos farmacológicos de la fracción MC1-IIA. A) Efecto vasoconstrictor inducido por MC1-IIA a una concentración de $0.6 \mu\text{g}$ de proteína/ml (6 mg de muestra/ml) comparado con el efecto de la fenilefrina ($1 \mu\text{M}$) sobre el mismo tejido. B) Efecto hemolítico inducido por MC1-IIA a una concentración de $12.6 \mu\text{g}$ de muestra/ml, puede observarse que al utilizar eritrocitos preincubados con ouabaina (0.1 mM) no disminuyó el efecto hemolítico.

Con la finalidad de obtener información preliminar sobre la estructura química del componente mayoritario de la fracción MC1-IIA se decidió realizar un análisis espectroscópico de esta fracción. Para poder realizar los análisis correspondientes se realizaron pruebas de solubilidad. De esta manera, se encontró que esta fracción es altamente polar, ya que es completamente soluble en agua y muy poco soluble en metanol.

Debido a las características físicas y a la alta polaridad de la muestra, no se logró realizar el análisis de espectroscopía infrarroja que aportaría información sobre los grupos funcionales presentes en el compuesto mayoritario. Considerando esto, se realizó un estudio de resonancia magnética nuclear protónica (^1H RMN) de manera preliminar para obtener datos sobre la estructura química de dicho compuesto. En la Figura 21 se muestra el espectro de ^1H RMN obtenido para MC1-IIA. Al realizar ampliaciones de este espectro se observó que la fracción no estaba pura por lo que se decidió hacer una re-purificación de esta fracción para continuar con un análisis espectroscópico más completo.

1H
freq = -1.7662 inten. = -117.684

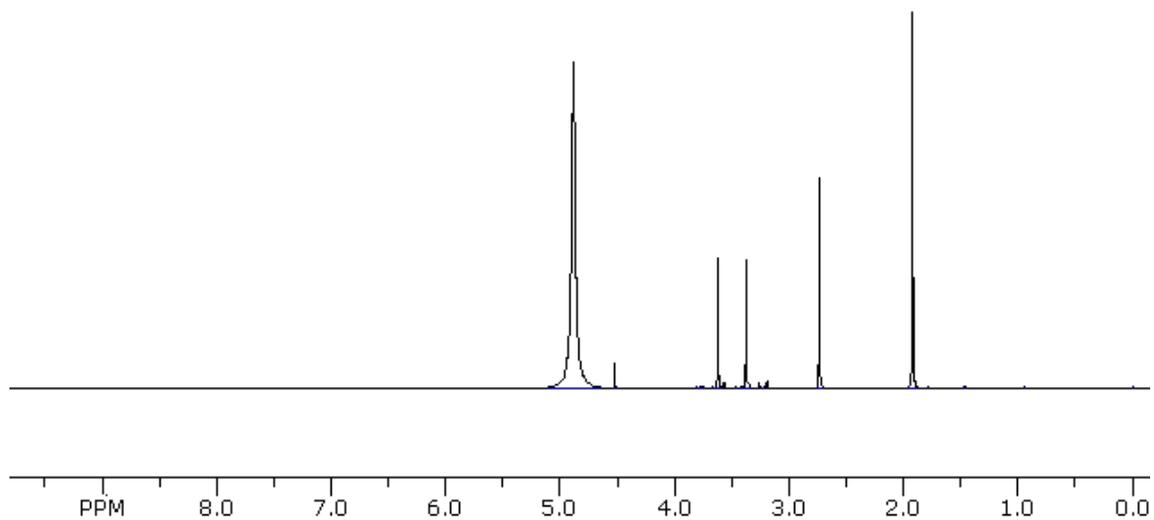


Figura 21. Espectro de ¹H RMN de la fracción MC1-IIA.

Para poder realizar los estudios espectroscópicos completos, la muestra se repurificó mediante un método de reciclaje y corte en HPLC en fase reversa, utilizando una columna cromatográfica C18 Spherisorb que se eluyó isocráticamente con una solución de metanol-agua (1:1) a un flujo de 6 ml/min. La observación de los picos se realizó mediante un detector de índice de refracción (Figura 22). De esta manera se encontraron al menos cuatro compuestos químicos en la fracción MC1-IIA. En la Figura 22 se muestra el cromatograma correspondiente a este análisis en el que se observa cómo la fracción MC1-IIA se resolvió en tres picos (IIA-1, IIA-2 y IIA-3) que se recircularon nuevamente en el sistema. De estos tres picos, IIA-1 constituye el frente de disolvente. El pico IIA-2 se desdobló en los picos IIA-2-1 y IIA-2-2, mientras que el pico IIA-3 se desdobló en los picos IIA-3-1 y IIA-3-2. En el Cuadro 11 se muestran las cantidades obtenidas de cada compuesto obtenido a partir de la fracción bioactiva MC1-IIA. Las muestras IIA-2-1, IIA-2-2 y IIA-3-1 se emplearon en su totalidad para realizar análisis espectroscópicos y espectrométricos con la finalidad de elucidar su estructura química, los resultados de estos análisis se muestran en el Anexo I.

Cuadro 11. Compuestos encontrados en la fracción MC1-IIA

| Nombre del compuesto | Cantidad (mg) |
|-----------------------------|--------------------------|
| IIA-2-1 | 11.1 |
| IIA-2-2 | 4.3 |
| IIA-3-1 | 4.1 |
| IIA-3-2 | 2.4 |

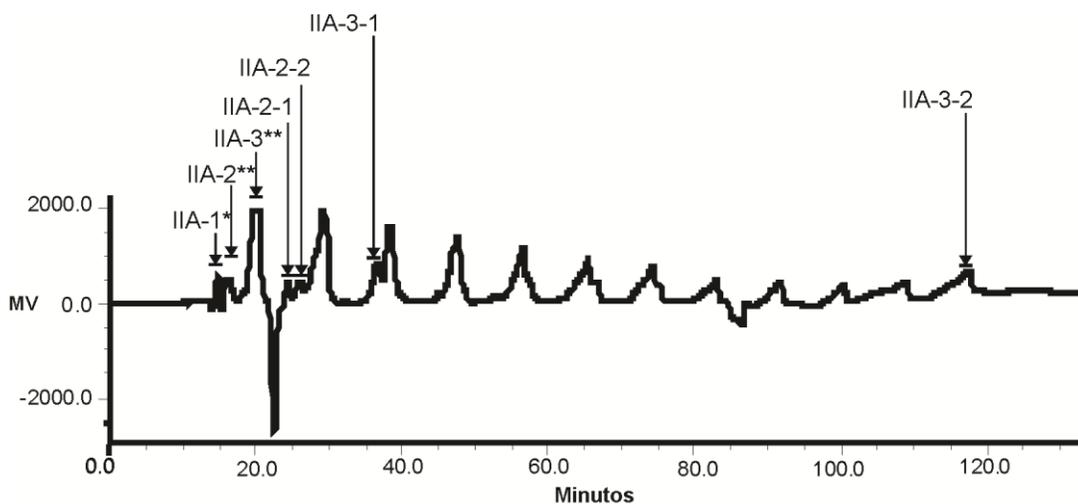


Figura 22. Proceso de repurificación de MC1-IIA mediante HPLC en fase reversa empleando el método de reciclaje y corte. Se empleó una columna C18 Spherisorb eluida con una solución de metanol-agua (1:1) a un flujo de 6 ml/min. Los picos se detectaron mediante un equipo de índice de refracción. *Frente de disolvente. **Se recircularon en el sistema y se desdoblaron en más picos.

6.4. Efecto del blanqueamiento sobre la actividad farmacológica del extracto de *M. complanata*

La elevación de la temperatura del agua a 31 °C no indujo cambios visibles en los fragmentos de *M. complanata* (días 8 a 16). Sin embargo, al elevar la temperatura del agua a 33 °C (días 17 a 20) se logró el blanqueamiento de los fragmentos del hidrocoral. En la Figura 23 se muestran fotografías en donde se compara el aspecto de los fragmentos del grupo control y los del grupo blanqueado.

El extracto obtenido a partir de los fragmentos blanqueados presentó un menor rendimiento de proteína (9.78 mg de proteína por g de sobrenadante liofilizado) que el extracto obtenido a partir de los fragmentos del grupo control (12.46 mg de proteína por g de sobrenadante liofilizado). Este último, presentó una coloración naranja más oscura que el extracto de los fragmentos blanqueados. Como era de esperarse, el análisis mediante electroforético reveló que ambos extractos presentaron diferencias en sus perfiles de proteínas (Figura 24). Se observó la presencia de una banda intensa de 25 kDa en el extracto control que no se observa con la misma intensidad en el perfil del extracto de los fragmentos blanqueados.

Tanto el extracto obtenido a partir de los fragmentos controles, como el extracto de los fragmentos blanqueados, indujeron vasoconstricción de los segmentos de aorta aislados de rata de una manera dependiente de la concentración (0.001 a 100 µg de proteína/ml). Mediante el ajuste no lineal de las curvas concentración-respuesta se encontró que la CE_{50} del extracto obtenido a partir de los fragmentos control fue 2.678 ± 1.125 de proteína/ml con un E_{max} de 64.631 ± 2.645 %, mientras que para el extracto obtenido de los fragmentos blanqueados la CE_{50} fue de 6.416 ± 1.081 µg de proteína/ml con un E_{max} de 72.495 ± 1.901 %. La comparación de las curvas mediante un ANOVA de dos vías ($p < 0.05$) indicó que no existen diferencias significativas entre ellas (Figura 25A).

Al evaluar la actividad hemolítica de ambos extractos, se observó que los dos indujeron hemólisis de los eritrocitos de rata de una manera dependiente de la concentración (0.001 a 10 μg de proteína/ml). En este caso, si se observaron diferencias significativas entre los efectos de ambos extractos ($p < 0.001$), la curva concentración-respuesta del extracto de los fragmentos blanqueados se observa significativamente más hacia la derecha que la curva obtenida para el extracto de los fragmentos control (Figura 25B). De esta forma, se encontró que el extracto obtenido a partir de los fragmentos blanqueados ($\text{UH}_{50} = 1.288 \pm 0.009$ μg de proteína/ml) fue aproximadamente tres veces menos potente que el extracto control ($\text{UH}_{50} = 0.447 \pm 0.017$ μg de proteína/ml).

Al evaluar la actividad de PLA_2 de ambos extractos, se encontró que el extracto obtenido a partir de los fragmentos blanqueados presentó una actividad de PLA_2 significativamente menor (35.105 ± 0.952 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) a la actividad del extracto de los fragmentos controles (55.345 ± 1.389 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) al compararlas mediante un análisis de t de Student ($p < 0.001$).

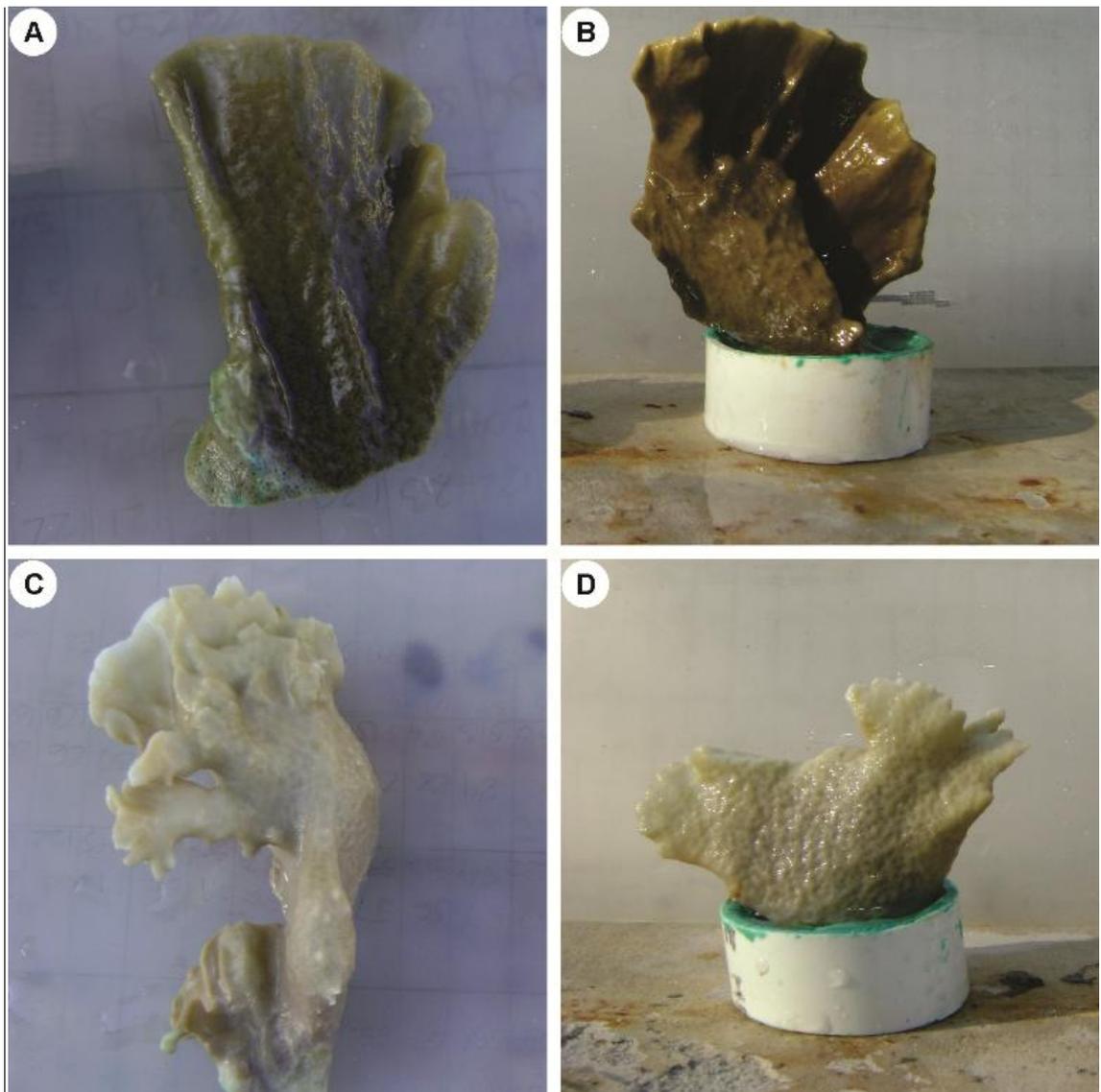


Figura 23. Fotografías de fragmentos representativos de *M. complanata* después del periodo experimental para inducir su blanqueamiento con elevación de la temperatura. Los fragmentos del grupo control (A y B) mantuvieron su coloración característica, mientras que los fragmentos del grupo blanqueado (C y D) perdieron su coloración.

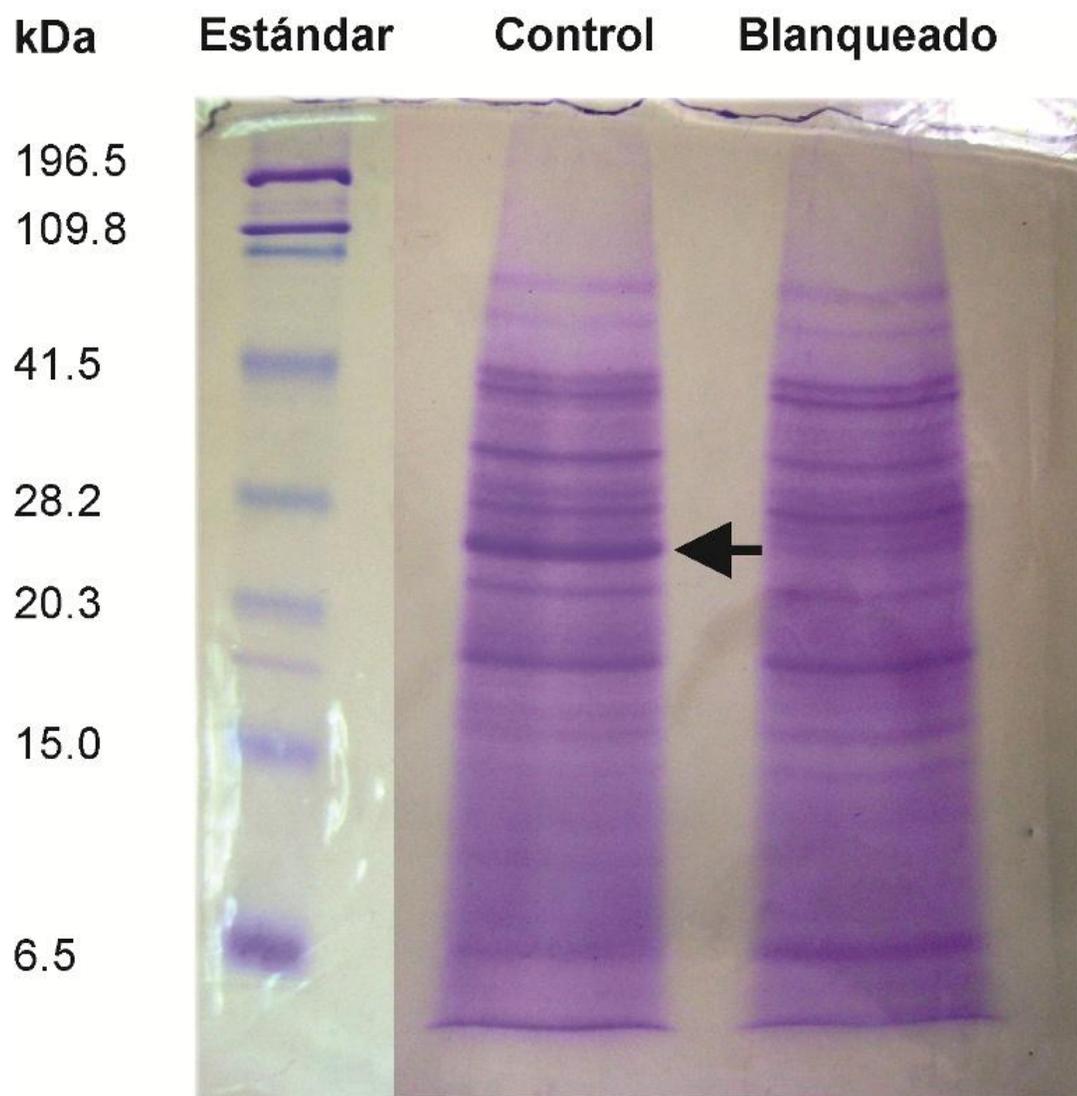


Figura 24. SDS-PAGE de los extractos obtenidos a partir de los fragmentos de *M. complanata* pertenecientes a los grupos control y blanqueado. La flecha indica la presencia de una banda de 25 kDa en el perfil del extracto control que no se observa en el perfil del grupo blanqueado. Las bandas proteínicas se visualizaron con azul de Coomasie.

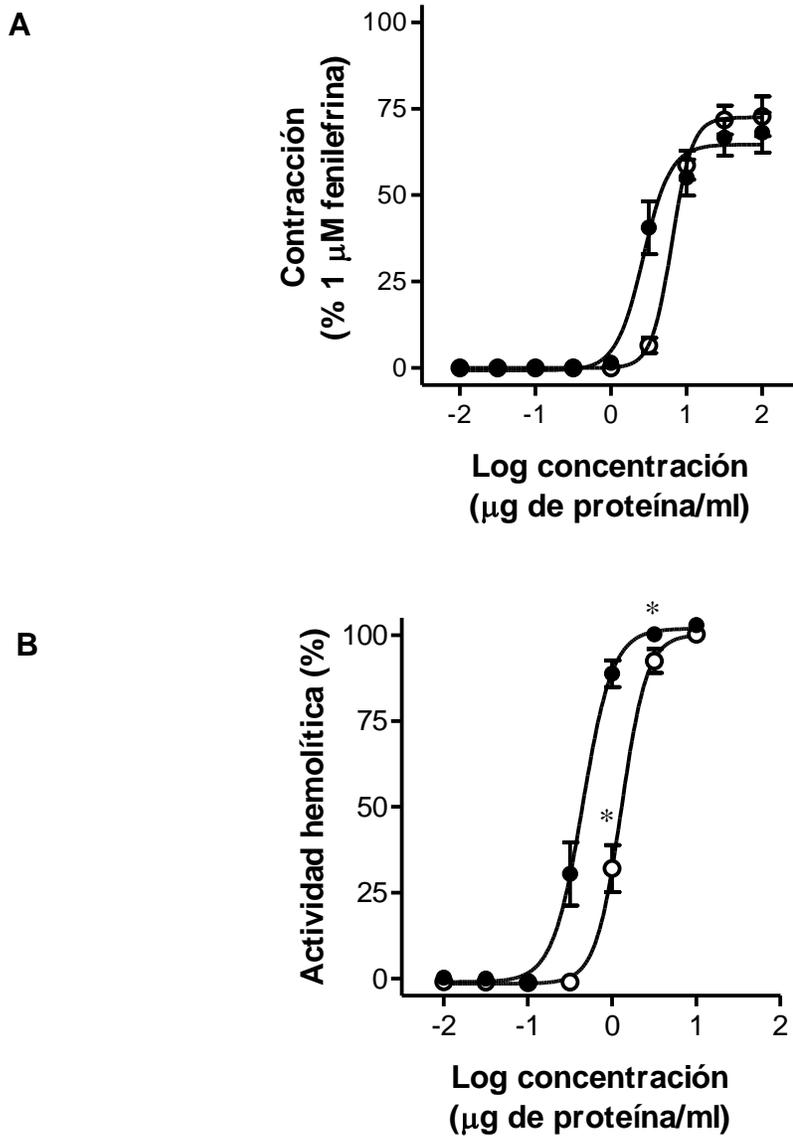


Figura 25. Curvas Concentración-respuesta que muestran la actividad vasoconstrictora (A) y hemolítica (B) de los extractos de *M. complanata* obtenidos a partir de los fragmentos blanqueados (○) y controles (●). *Significativamente diferentes, $p < 0.001$.

6.5. Identificación de los nematocistos de *M. complanata* mediante microscopía

Al analizar mediante diferentes técnicas de microscopía los nematocistos aislados del hidrocoral *M. complanata* se identificaron dos tipos de acuerdo a la clasificación de Weill (1934 a, b). Los nematocistos identificados como macrobásicos mastigóforos (Figura 26 y 27) fueron los más abundantes, mientras que los identificados como estenoteles (Figura 28 y 29) fueron relativamente escasos en comparación con los anteriores.

La estructura de los nematocistos de tipo macrobásico mastigóforo se esquematiza en la Figura 26. Este tipo de nematocistos presenta una cápsula ovalada (Figura 27A) y en la parte apical presenta una abertura cerrada conocida como opérculo (Figura 27B), que tiene un diámetro de 2.5 μm aproximadamente. Una característica importante de este tipo de nematocistos es que el dardo (shaft) – que consiste en una parte engrosada del túbulo – se encuentra en el centro del túbulo, la longitud es cuatro veces mayor que la longitud de la cápsula y presenta espinas más largas y gruesas que el resto del túbulo. En la Figura 27C se muestra la imagen de MET de un corte transversal de este tipo de nematocisto sin descargar (tomado de *M. alicornis*), en donde puede apreciarse que el túbulo se encuentra enrollado en el interior de la cápsula sin un arreglo aparente. En la imagen de MET de este nematocisto, también puede observarse que el ancho de la pared de la cápsula es aproximadamente de 1.5 μm y consta de dos capas principales. Así mismo, en esta misma imagen puede observarse el patrón de espinas del dardo invertido (DI) y fragmentos del túbulo invertido (TI). Las imágenes del nematocisto descargado muestran que el túbulo es extremadamente largo (Figuras 27D y E) y consiste de una hélice enroscada de tres hebras armadas con una fila de espinas finas cada una (Figura 27F). Las mediciones de las cápsulas de estos nematocistos, hechas a través de las fotografías de MEB, indicaron que estos nematocistos se encuentran presentes en dos tamaños principales. Los más chicos se encuentran en rangos de medida que van desde 10.6 – 13.0 μm ancho x 18.1 – 21.6 μm de largo, mientras que los más grandes presentan medidas de 17.5 – 21.8 μm de ancho x 25.0 – 33.1 μm de largo.

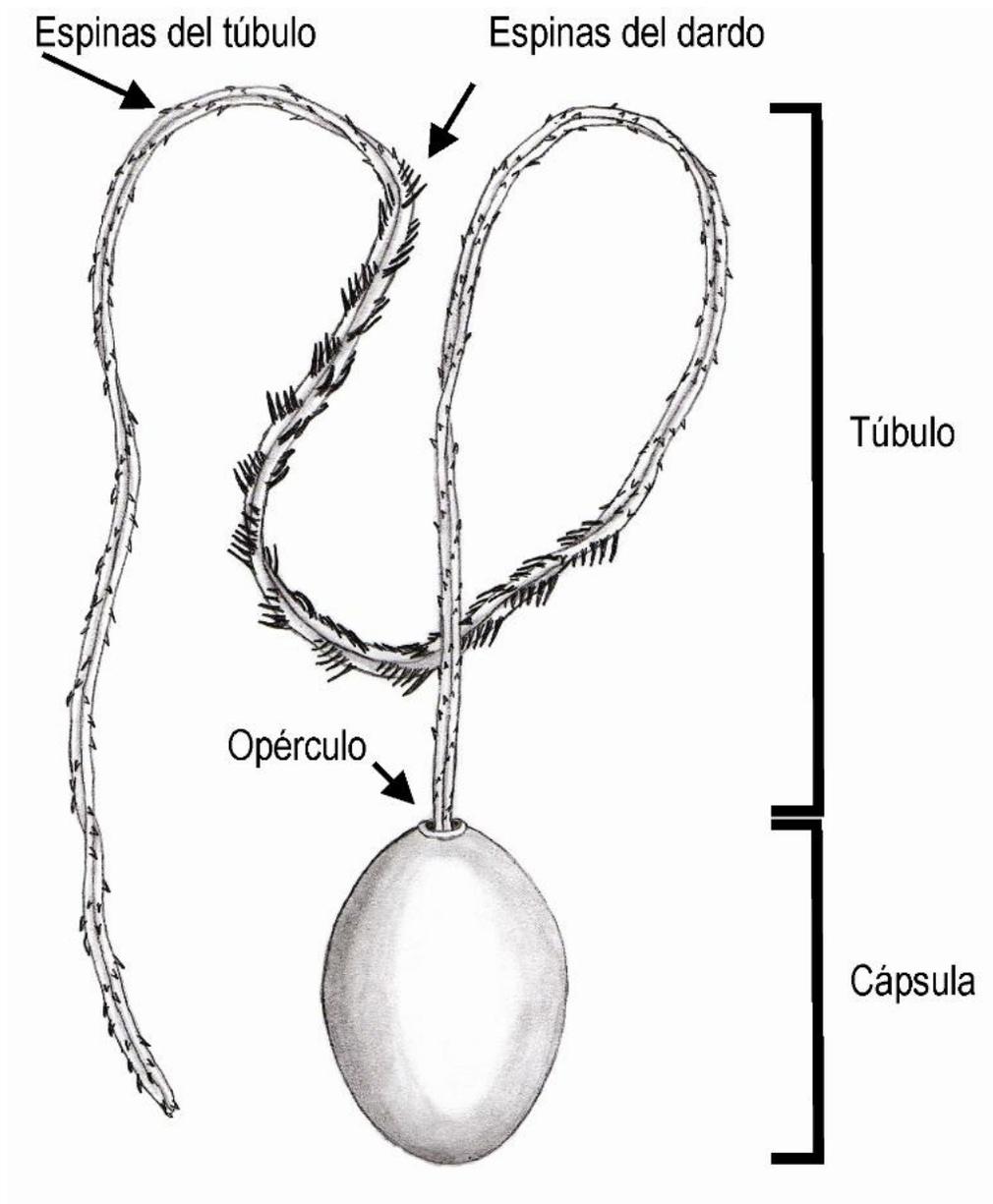


Figura 26. Esquema del nematocisto de tipo macrobásico mastigóforo.

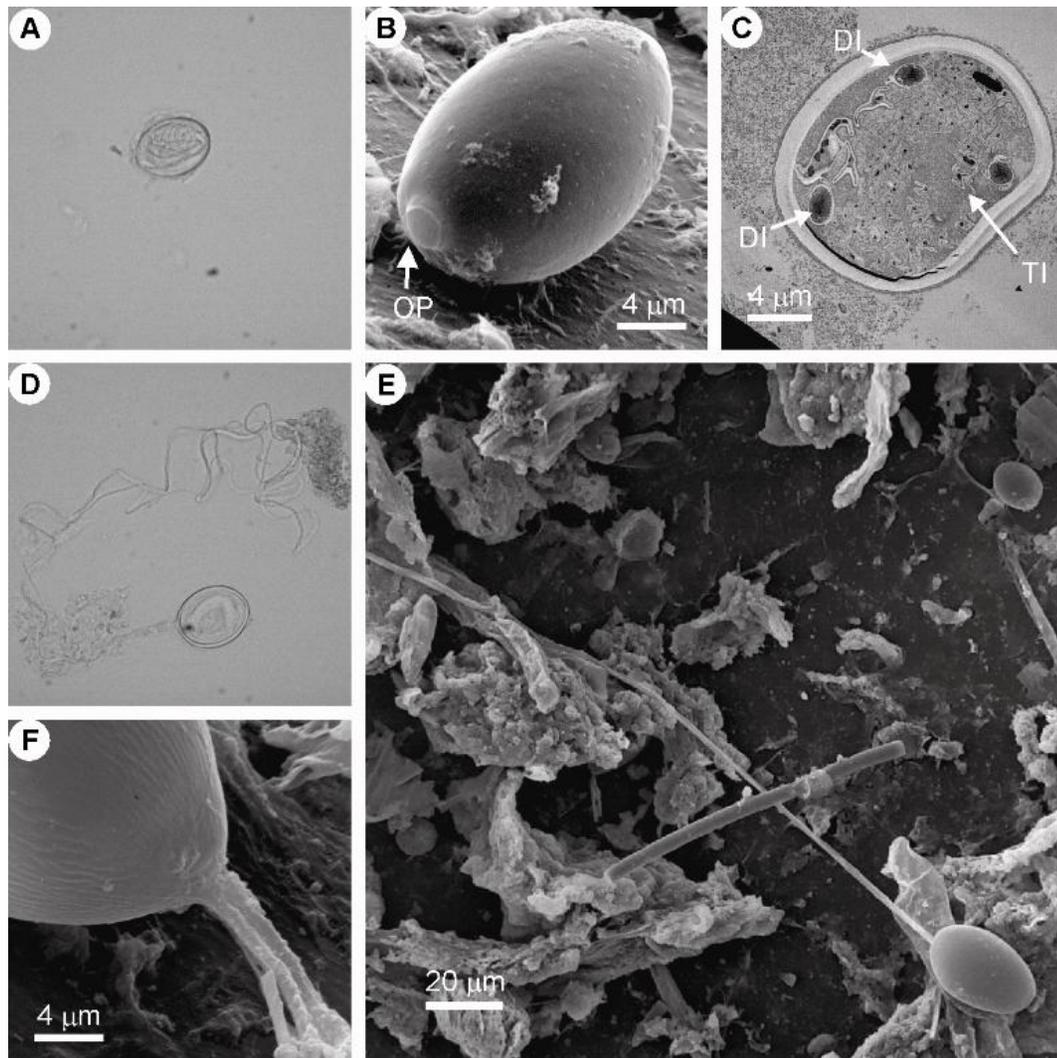


Figura 27. Fotomicrografías de nematocistos de tipo macrobásico mastigóforo encontrados en *M. complanata*. Imagen de ML que muestra el nematocisto sin descargar, aumento de 400 x (A). Imagen de MEB del nematocisto sin descargar (B). Imagen de MET que muestra un corte transversal del nematocisto sin descargar (C). Imagen de ML en donde se observa el nematocisto descargado, aumento de 400 x (D). Imagen de MEB del nematocisto descargado (E). Imagen de MEB que muestra un aumento del túbulo de un nematocisto descargado (F). OP: Opérculo. DI: Dardo invertido. TI: Túbulo invertido.

Estructuralmente, los nematocistos de tipo estenoteles son muy diferentes a los descritos anteriormente. En la Figura 28 se muestra el esquema de este tipo de nematocisto con cada una de sus partes. La forma descargada de este nematocisto presenta el dardo dilatado en la base, tres espinas largas denominadas estiletos al final del dardo y un túbulo relativamente corto. La cápsula de estos nematocistos presenta una forma de lima muy característica con los extremos en punta. En imágenes de ML del nematocisto sin descargar puede observarse el dardo invertido a través del eje central de la cápsula con sus espinas y estiletos que apuntan en dirección contraria al opérculo (Figura 29A). El diámetro del opérculo es de 4.5 μm aproximadamente, mientras que el extremo de la cápsula contrario al opérculo presenta un diámetro de 2 μm aproximadamente. Mediante imágenes de MET de un corte transversal del nematocisto sin descargar puede observarse el dardo invertido en el eje central de la cápsula (Figura 29B). En un acercamiento de esta imagen (Figura 29C) puede apreciarse la membrana del dardo invertido, así como fragmentos del túbulo invertido alrededor, que se encuentra enrollado dentro sin ningún arreglo. Así mismo, mediante esta misma imagen se observa que la pared de la cápsula presenta un grosor de 1 μm aproximadamente y consiste de dos capas. En las imágenes del nematocisto descargado (Figura 29D y E) se observa que el dardo presenta una longitud de aproximadamente el largo de la cápsula y un diámetro de 5.5 μm aproximadamente. Por su parte, las mediciones de las cápsulas en las imágenes de MEB indicaron la presencia de un solo rango de tamaño, 10.5 – 15.6 μm de ancho x 18.7 – 25.0 μm de largo.

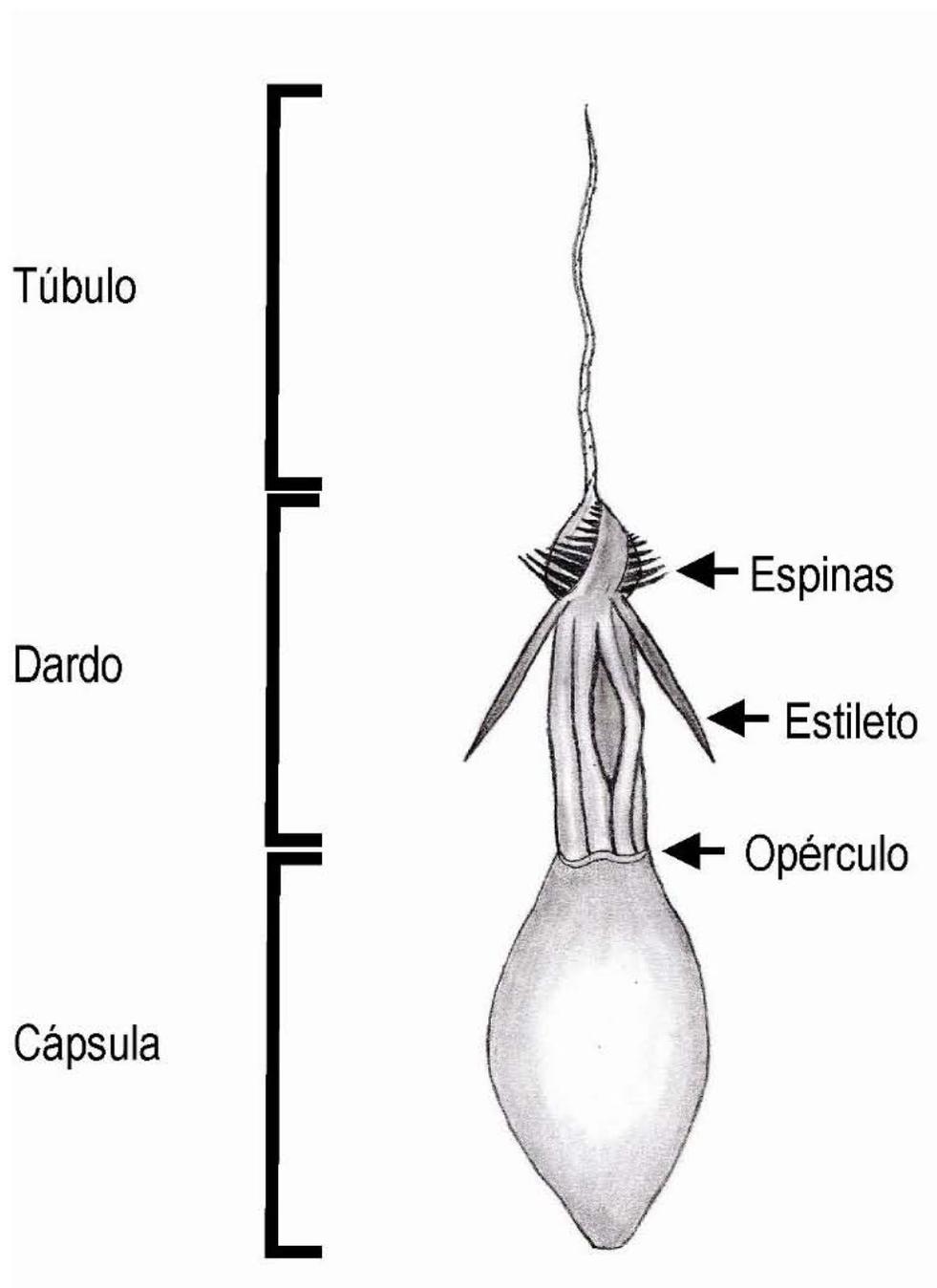


Figura 28. Esquema del nematocisto de tipo estenotele.

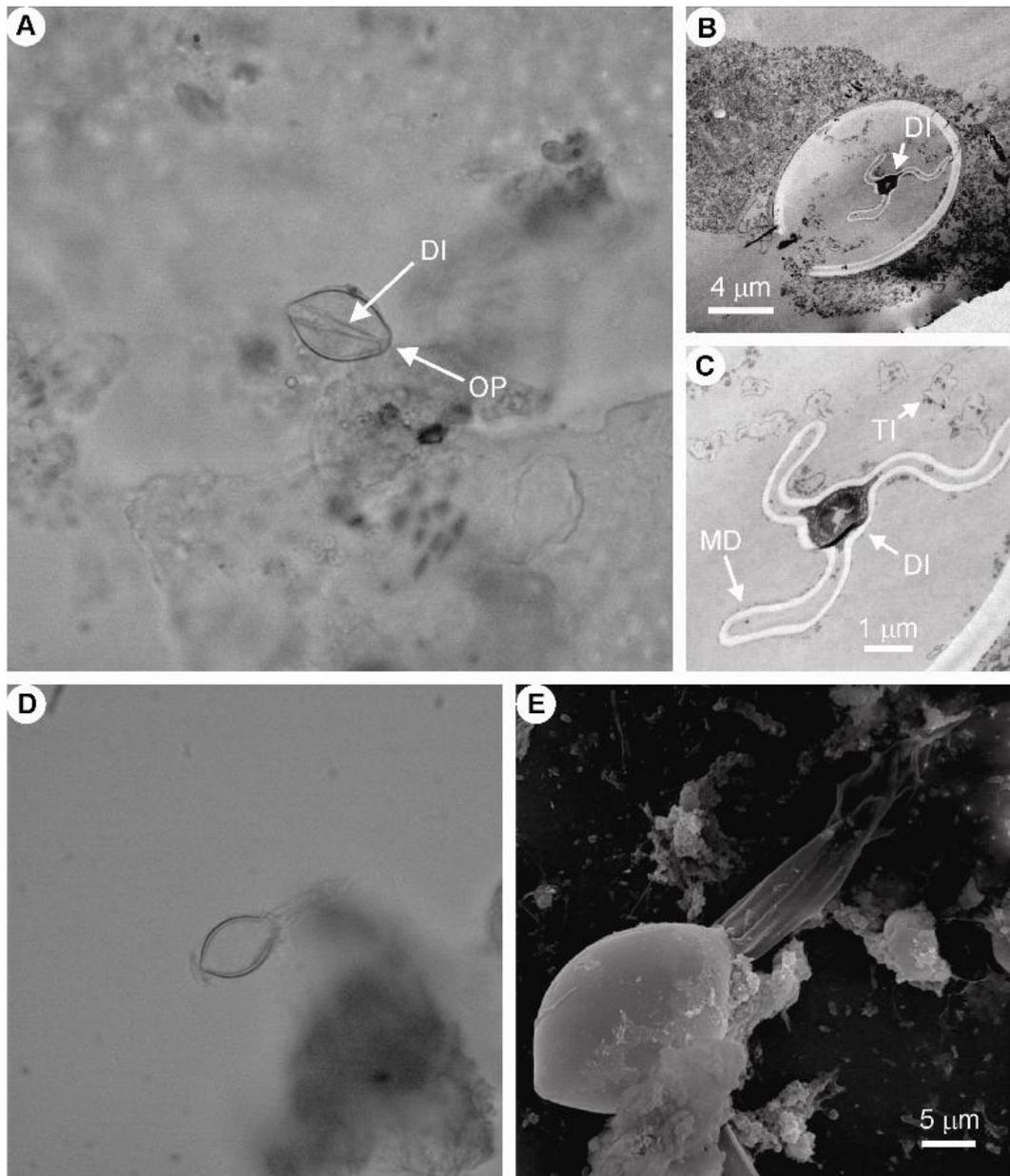


Figura 29. Fotomicrografías de nematocistos de tipo estenotele encontrados en *M. complanata*. Imagen de ML que muestra el nematocisto sin descargar, aumento de 400 x (A). Imagen de MET que muestra un corte transversal del nematocisto sin descargar (B). Detalle de la imagen de MET del nematocisto sin descargar (C). Imagen de ML en donde se observa el nematocisto descargado, aumento de 400 x (D). Imagen de MEB del nematocisto descargado (E). DI: Dardo invertido. OP: Opérculo. TI: Túbulo invertido. MD: Membrana del dardo.

7. Discusión

Las especies del género *Millepora* son conocidas comúnmente como “corales de fuego” debido a su capacidad de producir lesiones en la piel de humanos que entran en contacto con ellos. Las lesiones producidas por estos hidrocorales, similares a quemaduras, son el resultado de la inyección del contenido de sus nematocistos en la piel (Sagi et al., 1987; Bianchini et al., 1988). En algunos estudios se ha encontrado que los extractos de las especies *tenera*, *alcicornis*, *dichotoma* y *platyphylla* son letales en ratones además de presentar actividad hemolítica (Middlebrook et al., 1971; Wittle et al., 1971; Wittle & Wheeler, 1974; Shiomi et al., 1989; Radwan, 2002). En esos estudios se ha visto que la administración i.v. de los extractos de estas especies en ratones les produce violentas convulsiones, dificultad respiratoria y muerte en menos de un minuto a dosis elevadas. En el Caribe Mexicano, el hidrocoral *M. complanata* es un habitante común en los arrecifes coralinos (Lewis, 1989). En un estudio realizado con anterioridad, nosotros encontramos que el extracto acuoso de este hidrocoral tiene la capacidad de inducir vasoconstricción en segmentos de aorta aislados de rata y producir hemólisis en eritrocitos de rata (Ibarra-Alvarado et al., 2007).

Considerando la importancia de conocer los efectos sistémicos que induce un veneno *in vivo*, en el presente estudio se evaluó la letalidad del extracto acuoso de *M. complanata* en ratones por diferentes vías. De esta manera, se observó que este extracto no indujo ningún efecto letal, al menos durante el periodo de observación de 24 horas, al ser administrado mediante sonda gástrica. Contrario a esto, se observó que al administrar este extracto por vía i.v. produce efectos muy similares a los que producen los extractos obtenidos a partir de otras especies del mismo género cuando se administran por la misma vía (Middlebrook et al., 1971; Wittle et al., 1971; Wittle & Wheeler, 1974; Radwan, 2002). A la dosis más alta (5.33 µg de proteína/g) el extracto induce convulsiones, dificultad respiratoria y muerte en menos de un minuto, mientras que a dosis intermedias (1.33, 2.67 y 4.00 µg de proteína/g) los ratones desarrollaron un cuadro progresivo de hematuria, inflamación en los ojos y pérdida de la movilidad. Al cabo de 24 horas

todos los ratones inyectados con estas dosis habían muerto y presentaron daños severos en tejido pulmonar y renal. Un gran número de estudios dirigidos hacia la identificación de toxinas de cnidarios indican que la mayor parte de éstas son proteínas termolábiles (Rogers et al., 1996; Anderluh & Maček, 2002; Nevalainen et al., 2002). Inesperadamente, se encontró que después de desnaturalizar su contenido de proteína el extracto conservó sus efectos letales a la dosis más alta pero perdió su capacidad para inducir la muerte tardía y los daños histopatológicos. Estos resultados indicaron que el extracto acuoso de *M. complanata* contiene toxinas termoestables que inducen la muerte inmediata en ratones y toxinas termolábiles que inducen la muerte tardía causada por los daños histopatológicos.

La presencia de compuestos bioactivos termoestables en el extracto acuoso de *M. complanata* no solamente se evidenció con los resultados de los ensayos de letalidad, ya que se encontró que una parte importante del efecto vasoconstrictor del extracto se conservó aún después de desnaturalizarlo. En este punto, es importante mencionar que se han encontrado toxinas de venenos de serpiente que conservan sus efectos tóxicos después de calentarse a una temperatura de 100 °C durante 5 minutos (Ownby et al., 1994), por lo que no era posible descartar completamente la presencia de proteínas bioactivas termoestables en el extracto acuoso de *M. complanata*. Sin embargo, también era muy factible que los compuestos bioactivos termoestables fueran metabolitos secundarios.

Por otra parte, resulta muy probable que la muerte tardía inducida en los ratones tras la administración i.v. del extracto de *M. complanata* sea causada por el efecto de citolisinas sobre algunos tejidos. En extractos acuosos preparados a partir de diferentes especies del Phylum Cnidaria es común encontrar citolisinas de naturaleza proteínica. Algunas de estas citolisinas actúan mediante la formación de poros en las membranas celulares (Anderluh & Maček, 2002; Sher et al., 2005a; Sher et al., 2005b), mientras que otras actúan mediante mecanismos que aún no están del todo claros pero que involucran la actividad de PLA₂ por parte de las toxinas (Nevalainen et al., 2004). Generalmente, el primer blanco celular de las citolisinas de diversos venenos al entrar en el torrente sanguíneo

son los eritrocitos. Sin embargo, evidentemente las citolisinas también tienen la capacidad de causar daños en diferentes tipos celulares, afectando diversos tejidos (Peichoto et al., 2006). En este estudio, se observó que el extracto acuoso de *M. complanata* además de presentar actividad hemolítica, causa daños histopatológicos importantes en riñón y pulmón. Los cambios histopatológicos observados en estos tejidos pueden ser generados por una degradación de las membranas basales de las células endoteliales. Esto explica la pérdida aguda de la permeabilidad endotelial y extravasación de eritrocitos que se observa en los tejidos dañados. Un daño semejante se ha demostrado que ocasionan otros venenos como los de las serpientes *Philodryas patagoniensis* (Peichoto et al., 2006) y *Trimeresurus malabaricus* (Gowda et al., 2006). El edema agudo pulmonar y la hemorragia alveolar pueden condicionar una insuficiencia respiratoria progresiva que explica la muerte de los ratones dentro de las primeras 24 horas, mientras que los daños sobre el tejido renal explican la hematuria.

Se sabe que muchos venenos, principalmente los producidos por serpientes (Yamazaki & Morita, 2007), además de poseer toxinas con actividad de PLA₂ (Teixeira et al., 2003) también contienen proteasas que actúan como citolisinas al degradar a las membranas celulares (Gowda et al., 2006). En este estudio se encontró que el extracto acuoso de *M. complanata* no presenta actividad de proteasa, pero sí presenta actividad de PLA₂, lo cual sugiere que los efectos citolíticos del extracto en los ratones son causados principalmente por toxinas con actividad de PLA₂. Además, en algunos reportes previos se ha sugerido que la capacidad hemolítica de los venenos de especies del género *Millepora* se debe, al menos en parte, a la presencia de PLA₂ de secreción (Radwan & Aboul-Dahab, 2004; Ibarra-Alvarado, 2007). Una evidencia más de que los daños histopatológicos y la actividad hemolítica causados por el extracto de este hidrocoral están relacionados con su actividad de PLA₂ es el hecho que todos estos efectos se pierden tras la desnaturalización de su contenido de proteínas.

Con la finalidad de evaluar si la administración i.v. del extracto acuoso de *M. complanata* en los ratones produce daños en tejido hepático, los cuales pudieron no haberse observado en el análisis histopatológico, se evaluaron los niveles de

las enzimas ALT y AST en el suero. La ALT es una enzima que se encuentra principalmente en el hígado, por lo que un ligero incremento en los niveles sanguíneos de esta enzima es un indicio de daño hepático. En tanto que la AST es una enzima que no sólo se encuentra en células hepáticas, sino que también se encuentra en células cardíacas, células de músculo estriado y eritrocitos (Peichoto et al., 2006). En estos experimentos, no se observaron cambios significativos en los niveles de la ALT después de la administración del extracto, pero si se observó un incremento significativo en los niveles de la AST. Esto indica, que el extracto de *M. complanata* no induce daños a nivel hepático y que evidentemente el aumento en los niveles de la AST se debe a la lisis de otro tipo de células, principalmente de eritrocitos. Es importante mencionar que las muestras de sangre de los ratones a los que se les administró el extracto intacto estaban completamente hemolisadas, por lo que no se descarta la posibilidad de algún tipo de interferencia en la determinación de los niveles enzimáticos.

Mediante la administración i.d. del extracto acuoso de *M. complanata* en los ratones se observó que, al igual que los extractos de las otras especies del mismo género, éste también tiene la capacidad de inducir lesiones dermonecroticas. Histológicamente, se observó rhabdomiólisis en las fibras musculares esqueléticas, edema intersticial, congestión vascular acentuada y un denso infiltrado de neutrófilos y macrófagos. Estos cambios pueden ser explicados por un efecto citolítico directo o por activación del complemento y lesión tisular mediada por sus efectores.

Con la finalidad de identificar algunos de los principales componentes bioactivos presentes en el extracto de *M. complanata*, se realizó un análisis cromatográfico biodirigido empleando inicialmente una cromatografía de intercambio iónico. La fracción MC1 obtenida de este análisis se sometió a un segundo análisis cromatográfico, empleando una columna empaquetada con Sephadex G-15. Posteriormente las fracciones obtenidas a partir de este segundo análisis, MC1-I y MC1-II, se sometieron a un análisis mediante HPLC en fase reversa.

Las tres primeras fracciones obtenidas del fraccionamiento de MC1-I, en las cuales no se detectaron proteínas, indujeron vasoconstricción significativa sobre

los segmentos de aorta aislados de rata. Dado que los efectos contráctiles inducidos por estas fracciones son claramente diferentes uno del otro, es posible que las toxinas responsables de estos efectos estén actuando mediante mecanismos de acción diferentes. Por ejemplo, existen evidencias de que una contracción sostenida en el músculo liso vascular está asociada a un influjo de Ca^{2+} extracelular, mientras una contracción transitoria generalmente se asocia a la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares (Rohra et al., 2003). Considerando esta observación, es probable que en la fracción MC1-IC, que presenta un efecto vasoconstrictor transitorio, se encuentre presente algún componente que induce la liberación de calcio de los almacenes intracelulares. Por otro lado, las fracciones MC1-IA y MC1-IB posiblemente producen vasoconstricción mediante un mecanismo que involucra la entrada de calcio extracelular. El hecho de que no se haya detectado proteína en estas fracciones sugiere la posibilidad de que los compuestos responsables de los efectos farmacológicos observados sean metabolitos secundarios. Además de estas tres primeras fracciones, la fracción MC1-IG, en la que si se detectó la presencia de proteína, también presentó un efecto vasoconstrictor significativo. El análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones reductoras indicó que esta fracción contenía solamente un compuesto de naturaleza proteica con un peso molecular aproximado de 61 kDa. De tal manera que, como resultado del análisis cromatográfico de MC1-I, se pudo lograr la purificación de una proteína de aproximadamente 61 kDa que induce un efecto vasoconstrictor. Desafortunadamente, no fue posible contar con una cantidad suficiente de esta proteína vasoconstrictora para realizar un análisis de secuenciación que permitiera realizar la caracterización de su estructura primaria.

Con respecto a las fracciones MC1-IA, MC1-IB y MC1-IC, debido a la poca cantidad con que se contaba, no fue posible continuar con su análisis con el objeto de purificar sus componentes e identificar sus estructuras químicas. Sin embargo, el presente trabajo indicó la existencia de compuestos vasoconstrictores, posiblemente metabolitos secundarios, que modifican la contractilidad de la musculatura lisa arterial mediante diversos mecanismos de acción. Ninguna de

estas fracciones presentó actividad hemolítica al incubar durante 30 min o 4 horas en presencia de los eritrocitos. Con relación a esto, es posible pensar que, por algún motivo, la actividad de las citolisinas – específicamente de las PLA₂ – se perdió durante el proceso de purificación, ya sea porque durante el procedimiento se desnaturalizaron las enzimas o por la pérdida de algún cofactor esencial para que se lleve a cabo la actividad enzimática.

Por otra parte, el análisis cromatográfico de MC1-II (MC1-IIA a MC1-IIF) permitió obtener solamente una fracción con efecto vasoconstrictor, MC1-IIA. Más aún cuando se evaluó el efecto hemolítico de las fracciones provenientes de MC1-II en las condiciones normales del ensayo (30 min), ninguna fracción indujo hemólisis. Sin embargo, inesperadamente la fracción MC1-IIA produjo hemólisis cuando se incubó durante 4 horas en presencia de los eritrocitos a 37 °C. En este punto es importante mencionar que la palitoxina, un metabolito secundario comúnmente encontrado en dinoflagelados y en algunos corales de la clase Anthozoa (Hoffman et al., 2008), produce efectos letales muy similares a los producidos por el extracto acuoso de *M. complanata* en ratones (Ito & Yasumoto, 2009). Además, la palitoxina también presenta una actividad hemolítica retardada, que tiene la capacidad de formar poros en las membranas celulares mediante una interacción con la ATPasa Na⁺/K⁺ (Hoffman et al., 2008). De tal manera que para descartar la posible presencia de esta toxina en MC1-IIA se evaluó su hemólisis retardada empleando eritrocitos previamente incubados con ouabaina, un inhibidor específico de la palitoxina debido a que se une al mismo epítipo en la ATPasa Na⁺/K⁺ (Scheiner-Bobis et al., 1994). De este modo, no se observó bloqueo de la actividad hemolítica inducida por esta fracción, de tal forma que se descartó la presencia de palitoxina o alguno de sus análogos en MC1-IIA. Considerando que se contaba con una cantidad suficiente de MC1-IIA y considerando sus efectos vasoconstrictor y de hemólisis retardada, se decidió probar el efecto de su administración por vía intravenosa en ratones. Sorpresivamente, se encontró que esta fracción produce los mismos efectos que el extracto de *M. complanata* previamente desnaturalizado, es decir, convulsiones, dificultad respiratoria y muerte en menos de un minuto. Este hallazgo indicó que MC1-IIA contenía alguno

o algunos de los compuestos responsables de los efectos neurotóxicos y letales producidos por el extracto acuoso de *M. complanata*.

El siguiente paso en la secuencia metodológica consistió evidentemente en realizar el análisis de MC1-IIA con el objeto de purificar e identificar, en lo posible, el o los compuestos bioactivos. En primer término, se decidió hacer un análisis espectroscópico preliminar con el objeto de identificar el tipo de compuestos contenidos en la fracción, considerando además la posibilidad de que se tratara de metabolitos secundarios y no proteínas. De esta manera, se obtuvo el espectro de ^1H RMN de MC1-IIA (Figura 21), el cual indicó que esta fracción no contiene compuestos de naturaleza proteica, sino compuestos hidrocarbonados. En este espectro se aprecian mayoritariamente singuletes que indican la presencia de protones que no se encuentran acoplados con otros protones adyacentes.

Con la finalidad de obtener una muestra más pura que permitiera la realización de análisis espectroscópicos más completos, MC1-IIA se sometió a un proceso de purificación mediante HPLC en fase reversa, empleando el método de reciclaje y corte. Este método consiste en ir recirculando la muestra varias veces en la columna de fraccionamiento y conforme aparecen picos minoritarios, éstos se van desechando para seguir recirculando sólo el pico mayoritario hasta obtenerlo puro. De este modo el análisis de la fracción MC1-IIA (Figura 22) mostró que ésta contiene al menos 4 metabolitos que fueron etiquetados como IIA-2-1, IIA-2-2, IIA-3-1 y IIA-3-2. El análisis de los espectros de ^1H RMN unidimensional indicó que no se logró la separación completa de cada uno de estos compuestos. Aún así, considerando que los metabolitos se encontraban en poca cantidad y dada la importancia de contar con información que permitiera hacer una propuesta acerca de su estructura química, se tomó la decisión de hacer análisis espectroscópicos y espectrométricos más completos de los compuestos presentes en MC1-IIA. A continuación se discuten algunos aspectos relacionados con la estructura química de los compuestos IIA-2-2, IIA-3-1 y IIA-2-1 derivados de los análisis espectroscópicos y espectrométricos.

Compuesto IIA-2-2

En el espectro de masas obtenido por impacto electrónico puede observarse que el ión molecular par y prácticamente todos los fragmentos no descartan la presencia de nitrógeno en esta molécula (Espectro 1, Anexo I). El pico que aparentemente corresponde al ión molecular indicó que el compuesto tiene un peso molecular de 432. El primer fragmento de m/z 417 [$M^+ - 15$] corresponde a la pérdida de un metilo, mientras que los fragmentos sucesivos de m/z 403 y 389 indican pérdidas sucesivas de grupos CH_2 . Esas evidencias sugieren la presencia de una cadena carbonada en la molécula. En el espectro, también se aprecian los dos fragmentos de m/z 341 ($M^+ - 91$) y 91 ($M^+ - 341$, o $119 - 28$). Este último ión de m/z 91 y el subsecuente de m/z 65 corresponden respectivamente a los iones $C_7H_7^+$ (tropilio) y $[C_7H_7^+ - HC\equiv CH]^+$; ambos provenientes de alquilbencenos. Finalmente, el fragmento de m/z 119 cuya fórmula corresponde en este caso a C_9H_{11} ($C_6H_5CH_2CH_2CH_2^+$) confirma la presencia del anillo aromático.

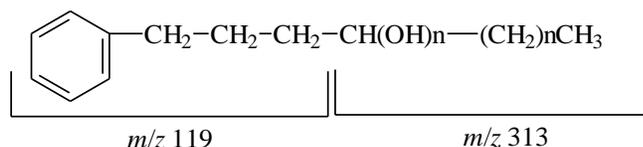
Resumen de fragmentos: $M^+ = 432$; fragmentos principales: 417 ($M^+ - 15$), 403 ($417 - 14$), 389 ($403 - 14$), 341 ($432 - 91$), 313 ($341 - 28$, o $432 - 119$), 285 ($313 - 28$), 265, 136, 119 (100 %, C_9H_{11}), 91 (30 %, $119 - 28$), 65 (7 %, $91 - 26$).

El espectro de 1H RMN (Espectro 2, Anexo I) no mostró señales que permitieran definir de manera clara algunos grupos funcionales. Únicamente se distinguen cuatro singuletes a campo alto en 622 Hz (δ 2.07 ppm), 663 Hz (δ 2.21 ppm), 814 Hz (δ 2.71 ppm) y 819 Hz (δ 2.73 ppm) que corresponden a metilenos (CH_2) de una cadena carbonada y señales anchas entre δ 8.15 y 8.32 ppm que pueden atribuirse a grupos OH. Además, debido a la presencia de algunas impurezas, no fue posible deducir interacciones $^1H-^1H$ a partir de sus espectros COSY y NOESY.

El espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 3, Anexo I) muestra señales en δ 167.2 y 157.1 ppm que pueden atribuirse a carbonilos de éster o a $C=C$ portadores de OH. Otras señales se encuentran a $\delta = 72.7, 63.1, 61.0, 60.0$ ppm, todos, carbonos sp^3 bases de oxígeno ($CH-OH$). La baja intensidad de las demás señales marcadas en el espectro no garantiza una discriminación entre el compuesto mayoritario, las

impurezas y el ruido. De manera adicional, no se define interacción alguna $^2J_{CH}$ en los espectros gHSQC, ni $^3J_{CH}$ o $^4J_{CH}$ en los espectros HMBC.

Con base en las pocas evidencias espectroscópicas y espectrométricas que se tienen hasta el momento, se propone que el compuesto IIA-2-2 tiene la siguiente estructura genérica:



Compuesto IIA-3-1

Al igual que el compuesto IIA-2-2, el compuesto IIA-3-1 está constituido por carbonos bases de oxígeno. De acuerdo al espectro HSQC (Cuadro A, Anexo I), el carbono en δ 104.5 ppm es cuaternario y porta dos oxígenos, mientras que el carbono en δ 38.8 ppm también es cuaternario pero no tiene oxígenos. Como puede verse en sus espectros COSY (Espectro 6, Anexo I) y HSQC (Espectro 7, Anexo I), no fue posible determinar las correlaciones $^1H-^1H$ o $^1H-^{13}C$. Sin embargo, a partir del espectro DEPT (Cuadro A, Anexo I) fue posible proponer para este compuesto la fórmula molecular $C_9H_{12}O_9$, que corresponde a un PM de 264.

Compuesto IIA-2-1

Con relación al compuesto IIA-2-1, debido a la impureza de la muestra, solamente fue posible obtener algunos datos preliminares con respecto a su estructura química. Los datos más relevantes se obtuvieron a partir de los espectros de ^{13}C RMN (Espectro 8 y 9, Anexo I) y en las correlaciones $^1H-^{13}C$ modalidad HSQC (Espectro 10). Se estableció que IIA-2-1 es un compuesto que consta de 16 carbonos, doce de los cuales (δ desde 60 hasta 179.9 ppm) son

bases de oxígeno, quedando como carbonos no oxigenados los que se encuentran en δ 22.5 (CH₃), 33.2 (CH₂), 51.4 (CH) y 55.1 (CH). El experimento DEPT establece la presencia en la molécula de siete CH₂, tres CH, un CH₃ y dos carbonos cuaternarios portadores de oxígeno (Cuadro B, Anexo I). Por lo tanto, con esos datos se pudo proponer la fórmula molecular C₁₆H₂₀O₁₂ (PM = 404). Desafortunadamente, debido a la complejidad de los espectros unidimensionales (Espectro 11, Anexo I) y bidimensionales de ¹H RMN, dada la presencia de impurezas, no fue posible obtener más detalles acerca de la estructura de la molécula, ya que no fue posible deducir las multiplicidades de las señales. Tampoco se pudieron establecer correlaciones en los espectros de correlación homonuclear ¹H-¹H COSY (Espectros 12, 13 y 14, Anexo I) y NOESY (Espectro 15, Anexo I).

Finalmente, en el espectro de correlación heteronuclear ¹H-¹³C a larga distancia, modalidad HMBC (Espectros 16, 17 y 18, Anexo I) sólo se establecieron correlaciones de fragmentos de la molécula. No se señalaron las correlaciones para las señales en δ 74.2 (CH), 73.0 (C), 63.1 (CH₂) y 60.0 (CH₂), y del carbono cuaternario en δ_C 73.0. Vale la pena recordar que en HMBC, suelen aparecer correlaciones ⁴J_{C-H}, así como faltar algunas ³J_{CH} como ocurre al parecer en este caso (Silverstein et al., 2005). El conjunto de esos factores impidió armar la estructura primaria del compuesto.

Recapitulando, en el presente trabajo se logró identificar en el extracto de *M. complanata* la presencia de toxinas termoestables no proteicas que poseen efectos neurotóxicos y letales en ratones. Estas toxinas son metabolitos secundarios hidrocarbonados poli-oxigenados. A partir de los resultados obtenidos no fue posible determinar si la toxicidad presentada por la fracción MC1-IIA se atribuye a uno o más de los componentes, o incluso a la mezcla de ellos. De tal manera que resulta indispensable retomar el estudio químico y farmacológico del veneno de *M. complanata* a fin de purificar mayor cantidad de estos metabolitos y poder realizar los correspondientes análisis espectroscópicos, espectrométricos y farmacológicos que conducirán a la identificación inequívoca de sus estructuras químicas y sus mecanismos de acción.

Los resultados derivados del presente estudio toxicológico mostraron que el extracto acuoso preparado a partir del hidrocoral *M. complanata* contiene toxinas termoestables de naturaleza no proteica que producen cambios en la excitabilidad del músculo liso arterial y que son capaces de inducir convulsiones y muerte inmediata en ratones. Estos últimos efectos podrían asociarse a una actividad neurotóxica, la cual había quedado evidenciada en un caso reportado de una mujer de 52 años que, después de seis semanas de haber tenido contacto con un “coral de fuego”, presentó debilidad y adormecimiento en el brazo derecho y tras una serie de estudios se le diagnosticó una neuropatía del nervio torácico largo con parálisis del músculo serrato anterior (Moats, 1992).

Este cnidario también produce citolisinas termolábiles, entre las que se encuentran enzimas con actividad de PLA₂, las cuales inducen severos efectos tóxicos sistémicos afectando principalmente a los eritrocitos y a los tejidos pulmonar y renal. Estos resultados concuerdan con datos reportados en la literatura con relación a los efectos tóxicos generales producidos por el contacto con las especies del género *Millepora*, ya que existe un caso documentado de una mujer de 45 años de edad que presentó un cuadro de daño renal y edema pulmonar, tras el contacto con una especie de coral de fuego (Prasad et al. 2006).

Por otra parte, las especies del género *Millepora* además de ser importantes desde el punto de vista toxicológico, poseen una gran relevancia ecológica, ya que constituyen el segundo grupo más abundante de organismos constructores de arrecifes, después de los corales escleractinios (Lewis, 2006). Al igual que estos corales, las especies de *Millepora* también son afectadas por diversos factores medioambientales y una consecuencia nociva de la constante exposición ante estos factores es el fenómeno de blanqueamiento, que puede definirse como la pérdida de las zooxantelas simbiotas y/o sus pigmentos (Douglas, 2003).

Existen diversos reportes que indican que el blanqueamiento induce una gran variedad de efectos negativos específicos sobre los cnidarios y sobre el ecosistema arrecifal completo (Weis, 2008). Así mismo, se ha reportado extensivamente la mortalidad de las especies del género *Millepora* durante eventos de blanqueamiento masivo (Banaszak et al., 2003; Lewis, 2006). Sin

embargo, hasta el momento no se ha reportado la influencia de este fenómeno sobre la producción de toxinas por parte de estos cnidarios.

En este contexto, una parte del presente trabajo se enfocó en el análisis de los efectos que presenta el fenómeno de blanqueamiento sobre la toxicidad del hidrocoral *M. complanata*. De esta manera, se observó que el extracto obtenido a partir de fragmentos blanqueados artificialmente presentó un menor rendimiento de proteína que el extracto obtenido a partir de los fragmentos utilizados como control. Esto indicó una pérdida de componentes proteínicos provenientes de las zooxantelas simbiotes que se evidenció mediante un análisis electroforético (Figura 25), el cual mostró la ausencia de una banda de aproximadamente 25 kDa en el extracto de los fragmentos blanqueados (García-Arredondo et al., 2011).

Una evidencia indirecta de que los compuestos vasoconstrictores presentes en el extracto crudo de *M. complanata* provienen de los tejidos del hidrocoral y no de sus zooxantelas simbiotes se obtuvo al observarse que el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto obtenido a partir de los fragmentos blanqueados no presentó diferencias significativas con respecto al efecto del extracto control (Figura 26A). De esta manera, puede descartarse la posibilidad de que algunos compuestos tales como las zooxantelatoxinas (Asari et al., 1993; Nakamura et al., 1993) y las zooxantelamidas (Onodera et al., 2004a,b; Onodera et al., 2005; Fukatsu et al., 2007) pudieran ser los responsables de la vasoconstricción inducida por el extracto de *M. complanata* (García-Arredondo et al., 2011). Estos dos tipos de compuestos vasoactivos son metabolitos secundarios poli-hidroxilados de cadena larga que se han encontrado en cultivos de especies de *Symbiodinium* de forma libre y que hasta el momento no se han detectado en especies simbióticas. En este sentido, resulta interesante la observación del hallazgo hecho en el presente trabajo en el que se encontró que los compuestos contenidos en la fracción MC1-IIA, que posee un efecto vasoconstrictor e induce letalidad en ratones, también son metabolitos secundarios poli-hidroxilados, los cuales como quedó demostrado en nuestros experimentos, en este caso indudablemente provienen de los cnidarios.

Adicionalmente, se observó que el blanqueamiento provocó una disminución significativa de las actividades hemolítica y de PLA₂ inducidas por el extracto de *M. complanata*. Sin embargo, destaca el hecho de que estos efectos no se suprimieron por completo tras el blanqueamiento, sugiriendo que la principal fuente de los compuestos responsables de estos efectos son los tejidos del hidrocoral (García-Arredondo et al., 2011). Se pueden proponer dos hipótesis para explicar la disminución significativa de las actividades enzimática y hemolítica encontrada en los especímenes blanqueados. Una de ellas es que al carecer de los nutrientes proporcionados por los simbioses, disminuye en los cnidarios la capacidad para biosintetizar las citolisinas. La otra posibilidad es que existan algunas citolisinas provenientes de los simbioses. La primera hipótesis resulta ser la más factible, si se considera que aunque se han encontrado una gran cantidad de compuestos bioactivos en especies del género *Symbiodinium* (Suzuki et al., 2003; Kobayashi and Tsuda, 2004; Onodera et al., 2004a,b; Sommaruga et al., 2006; Tsunematsu et al., 2009), hasta el momento ninguno de estos compuestos presenta actividad citolítica termolábil.

Se ha reportado que las especies del género *Millepora* poseen varios de los diferentes tipos de nematocistos descritos por Weill (1934a,b), entre los que se encuentran estenoteles, isorhizas, macrobásicos mastigóforos y microbásicos mastigóforos (Hyman, 1940). En este estudio, se encontró que el hidrocoral *M. complanata* presenta dos tipos principales de nematocistos. El tipo más abundante encontrado fue el macrobásico mastigóforo. Este nematocisto se encuentra exclusivamente en especies del género *Millepora*, lo cual constituye una de las razones por las que estos organismos se han clasificado en un suborden separado (Lewis, 2006). En menor proporción, se encontraron nematocistos de tipo estenotele. Estos nematocistos penetrantes se han encontrado solamente en especies de la clase Hydrozoa (Lewis, 2006). Nuestros resultados coinciden con los reportados por Radwan (2002), quien encontró en los hidrocorales del Mar Rojo, *M. platyphylla* y *M. dichotoma*, solamente estos dos tipos de nematocistos, siendo también los más abundantes los macrobásicos mastigóforos.

Vale la pena señalar que a fin de identificar los nematocistos y observar sus características estructurales de una manera más completa, en este trabajo se emplearon diferentes técnicas de microscopía. De este modo, mediante microscopía de luz se observó e identificó de manera global el tipo de nematocistos presentes y su proporción. La técnica de MEB permitió la observación de detalles estructurales externos de los nematocistos y la obtención de sus medidas. En tanto que, mediante el empleo de la técnica de MET, fue posible observar las características estructurales internas de los nematocistos. Por ejemplo, mediante las imágenes de MET se obtuvieron las medidas del grosor de la pared de la cápsula de ambos tipos de nematocistos, observándose también que está constituida por dos capas: la capa externa se observa más delgada y con coloración oscura, mientras que la capa interna es más gruesa y de coloración clara. En algunos estudios con microscopía de fuerza atómica se ha observado que la capa externa está compuesta principalmente por la glicoproteína NOWA, mientras que la capa interna está compuesta principalmente de minicolágeno (Özbek et al., 2004).

Debido a que se han encontrado diferencias estructurales significativas entre los diferentes tipos de nematocistos provenientes de las distintas clases de cnidarios, se ha propuesto que estas estructuras también pueden diferir en su contenido de toxinas (Edean & Rifkin, 1975), lo cual justificaría de algún modo, el hecho de que la toxicidad de los cnidarios varía de una especie a otra. Tomando esto en cuenta y considerando que las especies del género *Millepora* poseen principalmente nematocistos de tipo macrobásicos mastigóforos y estenoteles, resulta factible suponer que los nematocistos macrobásicos mastigóforos son los responsables de la toxicidad causada por estas especies en humanos, ya que otros cnidarios de la clase Hydrozoa, que también poseen nematocistos de tipo estenotele, no presentan toxicidad. A fin de comprobar esto, sería necesario separar los diferentes grupos de nematocistos y obtener un extracto de sus toxinas para hacer una comparación. Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado una separación adecuada de los nematocistos debido a su similitud en tamaño. Se han propuesto algunos métodos de separación que requieren

perfeccionarse, ya que resultan ser muy tardados, complejos y poco eficaces (Endean & Rifkin, 1975; Wiebring et al., 2010). Aún así, esto constituye un campo muy interesante de investigación, que en un futuro podría proporcionar información muy valiosa acerca de la compleja estructuración de los mecanismos de defensa que presentan los cnidarios.

8. Conclusiones

Los resultados obtenidos a partir de la determinación de los efectos tóxicos sistémicos inducidos por el veneno de *M. complanata* indican que este hidrocoral produce citolisinas de naturaleza proteica que inducen daños en las membranas de diferentes tejidos y provocan una muerte lenta al ser administradas en ratones por vía intravenosa. Este organismo también produce toxinas termoestables, las cuales son metabolitos secundarios que inducen neurotoxicidad y la muerte inmediata en los ratones.

El análisis cromatográfico biodirigido del extracto acuoso preparado a partir de *M. complanata* permitió la detección de diferentes compuestos vasoconstrictores de naturaleza no proteica contenidos en las fracciones MC1-IA, MC1-IB, MC1-IC y MC1-IIA. Resultó relevante el análisis de la fracción MC1-IIA, la cual además de inducir contracción del músculo liso arterial, provoca una hemólisis retardada y más notablemente, induce efectos neurotóxicos en ratones, ocasionándoles una muerte inmediata. Estos efectos, que resultaron ser idénticos a los provocados por la administración del extracto acuoso total de *M. complanata*, proporcionan una evidencia sólida de que los componentes presentes en MC1-IIA: IIA-2-1, IIA-2-2, IIA-3-1 y IIA-3-2 son, en gran parte, responsables de la neurotoxicidad y la muerte inmediata de los animales de experimentación. Aunque no se logró realizar la elucidación estructural completa de los compuestos IIA-2-1, IIA-2-2, IIA-3-1 y IIA-3-2, sí fue posible determinar que son compuestos hidrocarbonados poli-hidroxilados.

Adicionalmente, se encontró que *M. complanata* contiene proteínas que inducen vasoconstricción, entre las que se encuentra una proteína de 61 kDa purificada a partir de la fracción MC1-IG.

Se encontraron evidencias de que los compuestos responsables de las actividades farmacológicas y toxicológicas inducidas por el extracto acuoso de *M. complanata* provienen del hidrocoral y no de sus zooxantelas simbiotes, lo cual sugiere que, de alguna manera, *M. complanata* mantiene su capacidad de

biosintetizar toxinas para su defensa y alimentación, incluso en ausencia de los importantes nutrientes que le proveen sus algas simbiotes.

Mediante diversas técnicas de microscopía, se identificaron dos tipos de nematocistos en el hidrocoral *M. complanata*: macrobásicos mastigóforos y estenoteles. De éstos, los primeros fueron los más abundantes, apoyando la idea de que este tipo de nematocisto es el responsable de la toxicidad característica que presentan las especies del género *Millepora*.

Finalmente, en el presente trabajo se evidenció la gran riqueza estructural que presentan las toxinas producidas por los organismos del género *Millepora*. Encontrándose por primera vez, toxinas letales de naturaleza no proteica en una especie de la clase Hydrozoa. Evidentemente, el presente trabajo constituye un punto de partida para continuar con el estudio de las especies de este género con el objetivo de purificar mayor cantidad de estas toxinas y lograr la completa elucidación de su estructura química.

9. Bibliografía

- Aiello, A., Fattorusso, E., Magno, S., Mayol, L. 1987. Brominated β -carboline from the marine hydroid *Aglaophenia pluma* linnaeus. *Tetrahedron*: 43: 5929-5932
- Anderluh, G., Barlič, A., Podlesek, Z., Maček, P., Pungerčar, J., Gubenšek, F., Zecchini, M., Dalla Sera, M., Menestrita, G. 1999. Cysteine-scanning mutagenesis of an eucaryotic pore-forming toxin from sea anemone. *Eur. J. Biochem.* 263, 128-136.
- Anderluh, G., Maček, P. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria). *Toxicon* 40, 111-124.
- Asari, T., Nakamura, H., Murai, A., Kan, Y. 1993. Structures of periodate oxidation products with a conjugated diene or an exomethylene from zooxanthellatoxin-A. *Tetrahedron Lett.* 34, 4059-4062.
- Banaszak, A.T., Ayala-Schiaffino, B.N., Rodríguez-Román, A., Enríquez, S., Iglesias-Prieto, R. 2003. Response of *Millepora alcicornis* (Milleporina: Milleporidae) to two bleaching events at Puerto Morelos reef, Mexican Caribbean. *Rev. Biol. Trop.* 58, 1211-1221.
- Bianchini, G., Lotti, T., Campolmi, P., Casigliani, R. and Panconesi, E. 1988. Coral ulcer as a vasculitis. *Int. J. Dermatol.* 27, 506-507.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2003. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 20, 1-48.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2004. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 21, 1-49.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2005. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 22, 15-61.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2006. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 23, 26-78.
- Blunt, J. W., Copp, B., R., Hu, W.P., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2007. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 24, 31-86.
- Blunt, J. W., Copp, B., R., Hu, W.P., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2008. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 25, 35-94.

- Blunt, J. W., Copp, B., R., Hu, W.P., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2009. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 26, 170-224.
- Blunt, J. W., Copp, B., R., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2010. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 27, 165-237.
- Blunt, J. W., Copp, B., R., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2011. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 28, 196-268.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown, B.E. 1997. Coral bleaching, causes and consequences. *Coral Reefs* 16, 129-138.
- Coles, S.L. and Brown, B.E. 2003. Coral bleaching-capacity for acclimatization and adaptation. *Adv Mar Biol* 46, 183-223.
- Culver, P., Jacobs, RS. 1981. Lophotoxin: a neuromuscular acting toxin from the sea whip (*Lophogorgia rigida*). *Toxicon* 19, 825-830.
- Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., de Medeiros, C.L., Rowan, E.G., Harvey, A.L., Menez, A. 1997. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *J. Biol. Chem.* 272, 4302-4309.
- Davies, P.J., Montaggioni, L. 1985. Reef growth and sea-level change: the environmental signature. *Proc. 5th Int. Coral Reef Symp.* 3, 477-511.
- Diaz, B.L., Arm, J.P. 2003. Phospholipase A2. Prostaglandins Leukot. *Essent. Fatty Acids* 69, 87-97.
- Diochot, S., Loret, E., Bruhn, T., Beress, L., Lazdunski, M. 2003. APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *Mol. Pharmacol.* 64, 59-69.
- Diochot, S., Schweitz, H., Beress, L., Lazdunski, M. 1998. Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. *J. Biol. Chem.* 273, 6744-6749.

- Douglas, A.E. 2003. Coral bleaching-how and why? *Mar. Pollut. Bull.* 46, 385-392.
- Endean, R., Rifkin J. 1975. Isolation of different types of nematocysts from the cubomedusan *Chironex fleckeri*. *Toxicon* 13, 375-376.
- Feelisch, M., Kotsonis, P., Siebe, J., Clement, B., Schmidt, H.H.H. 1999. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3,-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Mol. Pharmacol.* 56, 243-253.
- Fenical, W., Okuda, R.K. Bandurraga, M.M., Culver, V., Jacobs, R.S. 1981. Lophotoxin: a novel neuromuscular toxin from Pacific sea whips of the genus *Lophogorgia*. *Science* 212, 1512-1514.
- Ferchmin, P.A., Pagán, O.R., Ulrich, H., Szeto, A.C., Hann, R.M., Eterović, V.A. 2009. Actions of octocoral and tobacco cembranoids on nicotinic receptors. *Toxicon* 54, 1174-1182.
- Fukatsu, T., Onodera, K., Ohta, Y., Oba, Y., Nakamura, H., Shintani, T., Yoshioka, Y., Okamoto, T., ten Lohuis, M., Miller, D.J., Kawachi, M., Ojika, M. 2007. Zootaxanthellamide D, a polyhydroxy polyene amide from a marine dinoflagellate, and chemotaxonomic perspective of the Symbiodinium polyols. *J. Nat. Prod.* 3, 407-411.
- García-Arredondo, A., Rojas, A., Ibarra-Alvarado, C., Iglesias-Prieto, R. 2011. Effects of bleaching on the pharmacological and toxicological activities elicited by the aqueous extracts prepared from two "fire corals" collected in the Mexican Caribbean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 396, 171-176.
- Gordon, D., Martin-Eauclaire, M-F., Cestèle, S., Kopeyan, C., Carlier, E., Khalifa, R.B., Pelhate, M., Rochat, H., 1996. Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J. Biol. Chem.* 271, 8034-8045.
- Gowda, C.D., Rajesh, R., Nataraju, A., Dhananjaya, B.L., Raghupathi, A.R., Gowda, T.V., Sharath, B.K., Vishwanath, B.S. 2006. Strong myotoxic activity of *Trimeresurus malabaricus* venom: Role of metalloproteases. *Mol. Cell. Biochem.* 282, 147-155.

- Grotendorst, G.R., Hessinger, D.A. 1999. Purification and partial characterization of the phospholipase A₂ and co-lytic factor from sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon* 37, 1779-1796.
- Grotendorst, G.R., Hessinger, D.A. 2000. Enzymatic characterization of the major phospholipase A₂ component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon* 38, 931-943.
- Hashimoto, Y. 1979. Marine toxins and other bioactive marine metabolites. Japan Scientific Societies Press, Tokyo: 1-115.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, A.J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, A.J., Caldeira, K. 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* 318, 1737 - 1742.
- Hoffmann, K., Hermanns-Clausen, M., Buhl, C., Büchler, M.W., Schemmer, P., Mebs, D., Kaufenstein, S. 2008. A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury. *Toxicon* 51, 1535-1537.
- Holstein, T., Tardent, P. 1984. An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. *Science* 223, 830-833.
- Hyman, L.H. 1940. The invertebrates: Protozoa through Ctenophora. McGraw-Hill Book Company, New York and London.
- Ibarra-Alvarado, C., García, J.A., Aguilar, M.B., Rojas, A., Falcón, A., Heimer de la Cotera, E.P. 2007. Biochemical and pharmacological characterizations obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 511-518.
- Iglesias-Prieto, R., Matta, J.L., Robins, W.A. Trench, R.K. 1992. Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10302-10305.
- Iguchi, A., Iwanaga, S., Nagai, H. 2008. Isolation and characterization of a novel protein toxin from fire coral. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 107-112.
- Ito, E., Yasumoto, T. 2009. Toxicological studies on palytoxin and ostreosin-D administered to mice by three different routes. *Toxicon* 54, 244-251.

- Jones, R.J., Hoegh-Guldberg, O., Larkum, A.W.D., Schreiber, U. 1998. Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO₂ fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant Cell Environ* 21, 1219-1230.
- Kem, W.R., Dunn, B.M. 1988. Separation and characterization of four different amino acid sequence variants of a sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolysin. *Toxicon* 26, 997-1008.
- Kem, W.R., Turk, T. 2009. Cnidarian toxins and venoms. Preface. *Toxicon* 15, 1029.
- Kini, R.M. 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 42, 827-840.
- Kini, R.M. in: R.M. Kini (Ed.), *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, John Wiley and Sons, Chichester, 1997, pp. 1-28.
- Khoo, K.S., Kam, W.K., Khoo, H.E., Gopalakrishnakone, P., Chung, M.C.M. 1993. Purification and partial characterization of two cytolysins from a tropical sea anemone *Heteractis magnifica*. *Toxicon* 31, 1567-1579.
- Klyshko, E.V., Issaeva, M.P., Monastyrnaya, M.M., Il'yna, A.P., Guzev, K.V., Vakorina, T.I., Dmitrenok, P.S., Zykova, T.A., Kozlovskaya, E.P. 2004. Isolation, properties and partial amino acid sequence of a new actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon* 44, 315-324.
- Kobayashi, J., Tsuda, M. 2004. Amphidinolides, bioactive macrolides from symbiotic marine dinoflagellates. *Nat. Prod. Rep.* 21, 77-93.
- Lesser, M.P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68, 253-278.
- Lewis, J.B. 2006. Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Adv. Mar Biol.* 50, 1-55.
- Lindquist, N. 2002. Tridentatols D-H, Nematocyst metabolites and precursors of the activated chemical defense in the marine hydroid *Tridentata marginata* (Kirchenpauer 1864). *J Nat Prod*: 65: 681-684.
- Lindquist, N., Lobkovsky, E., Clardy, J. 1996. Tridentatols A-C, novel natural products of the marine hydroid *Tridentata marginata*. *Tetrahedron Lett.* 37: 9131-9134.

- Lindquist, N., Shigematsu, N., Pannell, L. 2000. Corydendramines A and B, defensive natural products of the marine hydroid *Coridendrium parasiticum*. *J Nat Prod*: 63: 1290-1291.
- Loret, E.P., del Valle, R.M., Mansuelle, P., Sampieri, F., Rochat, H. 1994. Positively charged amino acid residues located similarly in sea anemone and scorpion toxins. *J Biol Chem*. 269,16785-16788.
- Lorke, D. 1983. A new approach to partial acute toxicity testing. *Arch. Toxicol*. 54, 275-287.
- Mahnir, V.M. Kozlobskaya, E.P., Kalinovskiy, A.I. 1992. Sea anemone *Radianthus macrodactylus* – a new source of palytoxin. *Toxicon* 30, 1449-1456.
- Manoleras, N., Norton, R.S. 1994. Three-dimensional structure in solution of neurotoxin III from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Biochemistry* 33, 11051-11061.
- Mariscal, R.N. 1974. Nematocysts. In: Muscatine L, Lenhoff HM (eds) *Coelenterate biology: Reviews and new perspectives*. Academic Press, New York and other cities, pp 129-178.
- Mariscal, R.N., Conklin, E.J., Bigger, C.H. 1977. The ptychocyst, a major new category of cnidae used in the tube construction by cerianthid anemone. *Biol. Bull*. 152, 392-405.
- Martinez, D., Campos, A.M., Pazos, F., Alvarez, C., Lanio, M.E., Casallanovo, F., Schreier, S., Salinas, R.K., Vergara, C., Lissi, E. 2001. Properties of St I and St II, two isotoxins isolated from *Stichodactyla helianthus*: a comparison. *Toxicon* 39,1547-1560.
- McIntosh, J.M., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Dooley, D.J., Stoehr, S.J., Giordani, A.B., Naisbitt, S.R., Olivera, B.M. 1995. Conodipine-M, a novel phospholipase A2 isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J. Biol. Chem*. 270, 3518-3526.
- Meier, S., Jensen, P. R. Adamczyk, P., Bächinger, H.P., Holstein, T. W., Engel, J., Ozbek, S., Grzesiek, S. 2007. Sequence-structure and structure-function analysis in cysteine-rich domains forming the ultrastable nematocyst wall. *J. Mol. Biol*. 368, 718-728.

- Messerli, S.M., Greenberg, R.M. 2006. Cnidarian toxins acting on voltage-gated ion channels. *Mar. Drugs* 4, 70-81.
- Middlebrook, R., Wittle, L., Scura, E., Lane, C. 1971. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. *Toxicon* 9, 333-336.
- Minagawa, S., Ishida, M., Nagashima, Y., Shiomi, K. 1998. Primary structure of a potassium channel toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *FEBS Lett.* 427, 149-151.
- Moats, W.E. 1992. Fire coral envenomation. *J. Wilderness Med.* 3, 284-287.
- Moore, R.E., Scheuer, P.J. 1971. Palytoxin: a new marine toxin from Coelenterate. *Science* 172, 495.
- Murata, J., Stake, M., Suzuki, T. 1963. Studies on snake venom XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venoms. *J. Biochem.* 53, 431-443.
- Nakamura H, Asari T, Ohizumi Y, Kobayashi J, Yamasu T, Murai A. 1993. Isolation of zooxanthellatoxins, novel vasoconstrictive substances from the zooxanthella *Symbiodinium* sp. *Toxicon* 31, 371-376.
- NCBI. 2010. National Center of Biotechnology Information. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6073>].
Consulta: 30/05/2010.
- Nevalainen, T.J., Peuravuori, H.J., Quinn, R.J., Llewellyn, L.E., Benzie, J.A.H., Fenner, P. J., Winkel, K. D. 2004. Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol.* 139, 731-735.
- Nicholson, G.M., Little, M.J. Biriny-Strachan, L.C. 2004. Structure and function of delta-atracotoxins: lethal neurotoxins targeting the voltage-gated sodium channel. *Toxicon* 43, 587-599.
- Nishida, S., Fujita, S., Huarasina, A., Satake, M., Tamiya, N. 1985. Amino acid sequence of a sea anemone toxin from *Parasicyonis actinostoloides*. *Eur. J. Biochem.* 150, 171-173.
- Oliveira, J.S., Redaelli, E., Zaharenko, A.J., Cassulini, R.R., Konno, S., Pimenta, D.C., Freitas, J.C., Clare, J.J., Wanke, E. 2004. Binding specificity of sea

- anemone toxins to Na_v 1.1-1.6 sodium channels. *J. Biol. Chem.* 279, 33323-33335.
- Onodera, K., Fukatsu, T., Kawai, N., Yoshioka, Y., Okamoto, T., Nakamura, H., Ojika, M. 2004a. Zooxanthellactone, a novel gamma-lactone-type oxylipine from dinoflagellates of *Symbiodinium* sp.: structure, distribution, and biological activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 848-852.
- Onodera, K., Nakamura, H., Oba, Y., Ojika, M. 2004b. Zooxanthellamide B, a novel large polyhydroxy metabolite from a marine dinoflagellate of *Symbiodinium* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 955-958.
- Onodera, K., Nakamura, H., Oba, Y., Ohizumi, Y., Ojika, M. 2005. Zooxanthellamide Cs: vasoconstrictive polyhydroxylated macrolides with the largest lactone ring size from a marine dinoflagellate of *Symbiodinium* sp. *J. Am. Chem. Soc.* 29,10406-10411.
- Östman, C. 2000. A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Sci. Mar.* 64, 31-46.
- Ownby, C.L., Colberg, T.R., Li, Q. 1994. Presence of heat-stable hemorrhagic toxins in snake venoms. *Toxicon* 32, 945-954.
- Özbek, S., Balasubramanian, P. G., Holstein, T. W. 2009. Cnidocysts structure and biomechanics of discharge. *Toxicon* 54, 1038-1045.
- Özbek, S., Pokidysheva, E., Schwager, M., Schulthess, T., Tariq, N., Barth, D., Milbradt, A. G., Moroder, L., Engel, J., Holstein, T. W. 2004. The glycoprotein NOWA and minicollagens are part of a disulfidelinked polymer that forms the cnidarian nematocyst Wall. *J. Biol. Chem.* 279, 52016-52023.
- Pathirana, C., Andersen, R.J., Wright, J.C.L. 1989. Hydrallmanol A, an interesting diphenyl-methane derivative of mixed biogenetic origin from hydroid *Hydrallmania falcata*. *Tetrahedron Lett.* 30: 1487-1490.
- Pathirana, C., Andersen, R.J., Wright, J.C.L. 1990. Abietinarins A and B, cytotoxic metabolites of the marine hydroid *Abietinaria* sp. *Can J Chem*: 68: 394-396.
- Peichoto, M.E., Teibler, P., Ruiz, R., Leiva, L., Acosta, O. 2006. Systemic pathological alterations caused by *Phylidrias patagonensis* culebrid snake venom in rats. *Toxicon* 49. 220-228.

- Prasad, G.V., Vincent, L., Hamilton, R., Lim, K. 2006. Minimal change disease in association with fire coral (*Millepora* species) exposure. *Am J Kidney Dis.* 47, 15-6.
- Prijatelj, P. Vardjan, N., Rowan, E.G., Križaj, I., Pungerčar, J. 2006. Binding to the high-affinity M-type receptor for secreted phospholipases A2 is not obligatory for the presynaptic neurotoxicity of ammodytoxin A. *Biochimie* 88,1425-1433.
- Radwan, F.F.Y. 2002. Comparative toxinological and immunological studies on the nematocyst venoms of the Red Sea fire corals *Millepora dichotoma* and *M. platyphylla*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 131, 323-334.
- Radwan, F.F.Y., Aboul-Dahab, H. M. 2004. Milleporin-1, a new phospholipase A₂ active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocysts. *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 267-272.
- Razpotnik, A., Križaj, I., Šribar, J., Maček, P., Turk, T. 2007. Cloning, expression and purification of a novel phospholipase A2 from the Northern Pacific sea anemone *Urticina crassicornis*. Program, 3rd International Conference on Phospholipases A2 and Lipid Mediators. Sorrento, Italy, May 9-12, 2007, p197.
- Rogers, J.C., Qu, Y., Tanada, T.N., Scheuer, T., Catterall, W.A. 1996. Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 15950-15962.
- Rohra, D.K., Saito, S.Y., Ohizumi, Y. 2003. Mechanism of acidic pH-induced contraction in spontaneously hypertensive rat aorta: role of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum. *Acta Physiol. Scand.* 179, 273-280.
- Rojas, A., Torres, M., Rojas, J.I., Feregrino, A., Heimer-de la Coteria, E.P. 2002. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon* 40, 777-785.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., Zilber-Rosenberg, I. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol* 5, 355-362.

- Sagi, A., Rosenberg, L., Ben-Meir, P., Hauben, D.J. 1987. The "fire coral" (*Millepora dichotoma*) as a cause of burns: a case report. *Burns Incl. Therm. Inj.* 13, 325-326.
- Schägger, H., Von-Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Scheiner-Bobis, G., Meyer zu Heringdorf, D., Christ, M., Habermann, E. 1994. Palytoxin induces K⁺ efflux from yeast cells expressing the mammalian sodium pump. *Mol. Pharmacol.* 45 1132-1136.
- Schuchert, P. 2009. World hydrozoa data base. [<http://www.marinespecies.org/hydrozoa>]. Consulta: 30/05/2010.
- Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J.-M., Baress, L., Lazdunski, M. 1995. Kaliclutidines and kaliseptine: two different classes of sea anemone toxins for voltage-sensitive K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 270, 25121-25126.
- Sher, D., Fishman, Y., Zhang, M., Lebendiker, M., Gaathon, A., Mancheño, J.M., Zlotkin, E. 2005a. Hydralysins, a new category of beta-pore-forming toxins in cnidaria. *J. Biol. Chem.* 280, 22847-22855.
- Sher, D., Knebel, A., Bsor, T., Nesher, N., Tal, T., Morgenstern, D., Cohen, E., Fishman, Y., Zlotkin, E. 2005b. Toxic polypeptides of the hydra--a bioinformatic approach to cnidarian allomones. *Toxicon* 45, 865-879.
- Shiomi, K., Hosaka, M., Yanaike, N., Yamanaka, H., Kikuchi, T., 1989. Partial characterization of venoms from two species of fire corals *Millepora Platyphylla* and *Millepora dichotoma*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 357-362.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. 1991. Spectrometric identification of organic compounds. 5th ed. Jhon Wiley & Sons, Inc. U.S.A.: 165-207.
- Solomon, E.P., Berg, L.R., Martín, D.W., Villee, C. 1998. Biología de Villee. 4^a ed. McGraw-Hill Interamericana, México D.F.: 598-602.
- Sommaruga, R., Whitehead, K., Shick, J.M., Lobban, C.S. 2006. Mycosporine-like amino acids in the zooxanthella-ciliate symbiosis *Maristentor dinoferus*. *Protist.* 157, 185-191.

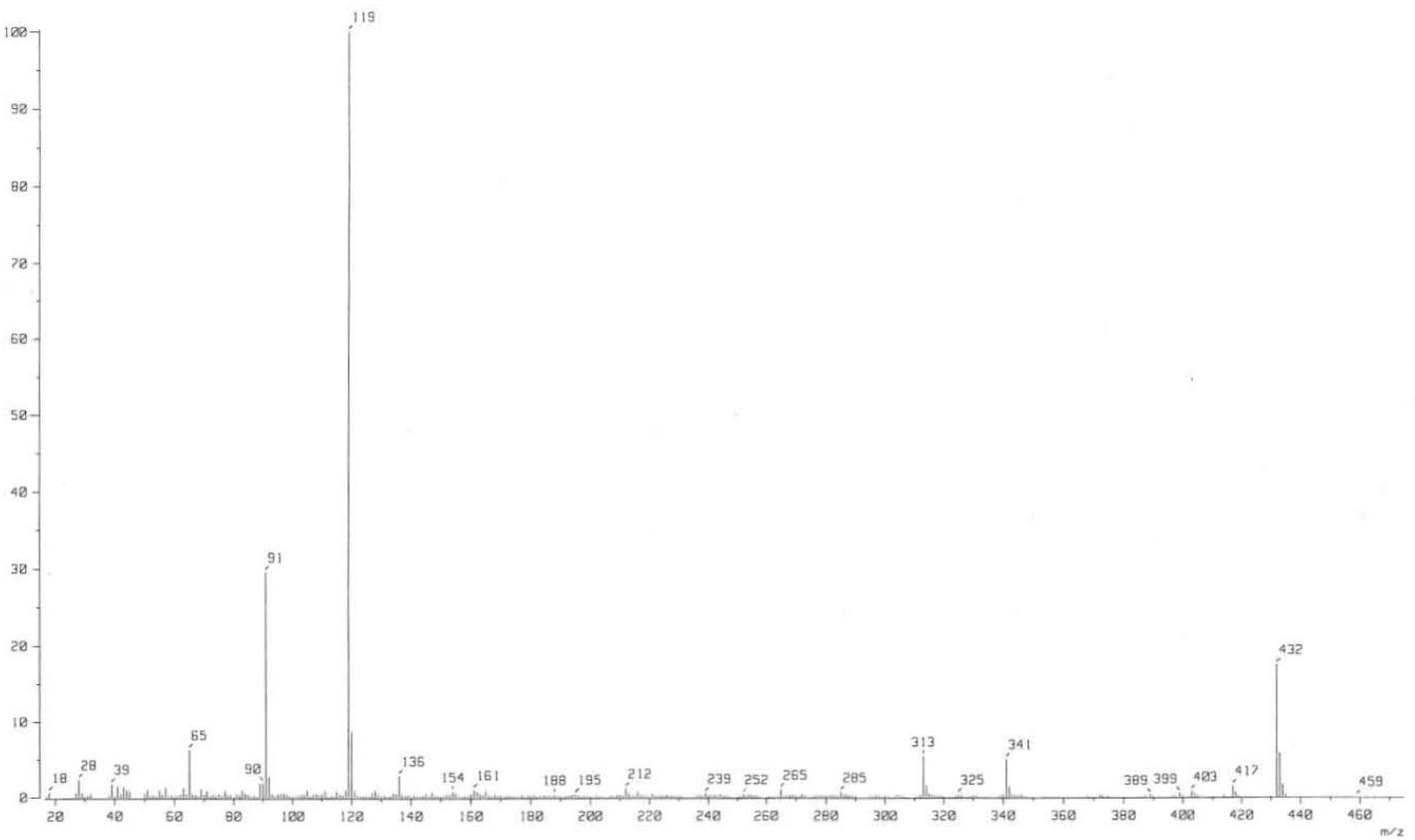
- Sunahara, S., Muramoto, K., Tenma, K., Kamiya, H. 1987. Amino acid sequence of two sea anemone toxins from *Anthopleura fuscoviridis*. *Toxicon* 25, 211-219.
- Suzuki, M., Watanabe, K., Fujiwara, S., Kurasawa, T., Wakabayashi, T., Tsuzuki, M., Iguchi, K., Yamori, T. 2003. Isolation of peridinin-related norcarotenoids with cell growth-inhibitory activity from the cultured dinoflagellate of *Symbiodinium* sp., a symbiont of the Okinawan soft coral *Clavularia viridis*, and analysis of fatty acids of the dinoflagellate. *Chem. Pharm. Bull.* 51, 724-727.
- Talvinen, K.A., Nevalainen, T.J. 2002. Cloning of a novel phospholipase A2 from the cnidarian *Adamsia carciniopados*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 132, 571-578.
- Tardent, P. 1995. The cnidarian cnidocyte, a high-tech cellular weaponry. *BioEssays* 17, 351-362.
- Tchernov, D., Gorbunov, M.Y., de Vargas, C., Narayan Yadav, S., Milligan, A.J., Haggblom, M., Falkowski, P.G. 2004. Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 13531-13535.
- Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. 2003. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon* 15, 947-962.
- Torres, M., Aguilar, M. B., Falcón, A., Sánchez, L., Radwan, F. F. Y., Burnett, J. W., Heimer-de la Cotera, E., Arellano, R.O. 2001. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon* 39, 1297-1307.
- Tsunematsu, Y., Ohno, O., Konishi, K., Yamada, K., Suganuma, M., Uemura, D. 2009. Symbiospirols: novel long carbon-chain compounds isolated from symbiotic marine dinoflagellate *Symbiodinium* sp. *Org. Lett.* 11, 2153-2156.
- Tudor, J.E., Pallaghy, P.K., Pennington, M.W., Norton, R.S. 1996. Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Nat. Struct. Biol.* 3, 317-320.
- Venn, A.A., Loram J.E., Douglas A.E. 2008. Photosynthetic symbioses in animals. *J. Exp. Bot.* 59, 1069 - 1080.

- Warner, M.E., Fitt, W.K., Schmidt, G.W. 1996. The effect of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae in hospite from four different species of reef coral: A novel approach. *Plant Cell Environ* 19, 291-299.
- Warner, M.E., Fitt, W.K., Schmidt, G.W. 1999. Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: a determinant of coral bleaching. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 8007-8012.
- Watson, G.M., Hessinger, S.A. 1989. Cnidocyte mechanoreceptors are tuned to the movement of swimming prey by chemoreceptors. *Science* 243, 1589-1591.
- Watters, M.R. 2005. Tropical marine neurotoxins: venoms to drugs. *Semin. Neurol.* 25, 278-289.
- Weber, J. 1990, Poly(γ -glutamic acid)s are the major constituents of nematocysts in hydra (Hydrozoa, Cnidaria). *J. Biol. Chem.* 265, 9664-9669.
- Weill, R. 1934a. Contribution a l'étude des cnidaires et de leurs nématocystes I. Recherches sur les nématocystes. *Travaux de la Station Zoologique de Wimereux* 10, 1-347.
- Weill, R. 1934b. Contribution a l'étude des cnidaires et de leurs nématocystes II. Valeur taxonomique du cnidome. *Travaux de la Station Zoologique de Wimereux* 11, 348-700.
- Weis, V.M. 2008. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J. Exp. Biol.* 211, 3059-3066.
- Wemmer, D.E., Kumar, N.V., Metrione, R.M., Lazdunski, M., Drobny, G., Kallenbach, N.R. 1986. NMR analysis and sequence of toxin II from the sea anemone *Radianthus paumotensis*. *Biochemistry* 25, 6842-6849.
- Wiebring, A., Helmholz, H., Sötje, I., Lassen, S., Prange, A., Tiemann, H. 2010. A new method for separation of different types of nematocysts from Scyphozoa and investigation of proteinaceous toxins utilizing laser catapulting and subsequent mass spectrometry. *Mar Biotechnol* 12, 308-318.
- Wilcox, G.R., Fogh, R.H., Norton, R.S. 1993. Refined structure in solution of the sea anemone neurotoxin ShI. *J. Biol. Chem.* 268, 24707-24719.
- Wittle, L.W., Middlebrook, R., Lane, C. 1971. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicornis*. *Toxicon* 9, 327-331.

- Wittle, L.W., Scura, E.D., Middlebrook, R.E., 1974. Singing coral (*Millepora tenera*) toxin: a comparison of crude extracts with isolated nematocyst extracts. *Toxicon* 12, 481-486.
- Wittle, L.W., Wheeler C.A. 1974. Toxic and immunological properties of stinging coral toxin. *Toxicon* 12, 487-493.
- Wu, C.H. 2009. Palytoxin: Membrane mechanisms of action. *Toxicon* 54, 1183-1189.
- Wunderer, G. 1978. The disulfide bridges of toxin II from *Anemonia sulcata*. *Hoppe Seylers. Z. Physiol. Chem.* 359,1193-1201.
- Yamazaki, Y., Morita, T. 2007. Snake venom components affecting blood coagulation and the vascular system: structural similarities and marked diversity. *Curr. Pharm. Des.* 13, 2872-2886.
- Yellowless, D., Rees, T.A., Leggat, W. 2008. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant Cell Environ* 31, 679 - 694.
- Zhang, W., Hinds, M.G., Anderluh, G., Hanse, P.E., Norton, R.S. 2000. Letter to the editor: Sequence-specific resonance assignments of the potent cytolytic equinatoxin II. *J. Biomol. NMR* 18, 281-282.
- Zykova, T.A., Kozlovskaja, E.P. 1989. Disulfide bonds in neurotoxin-III from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg Khim.* 15, 904-907.

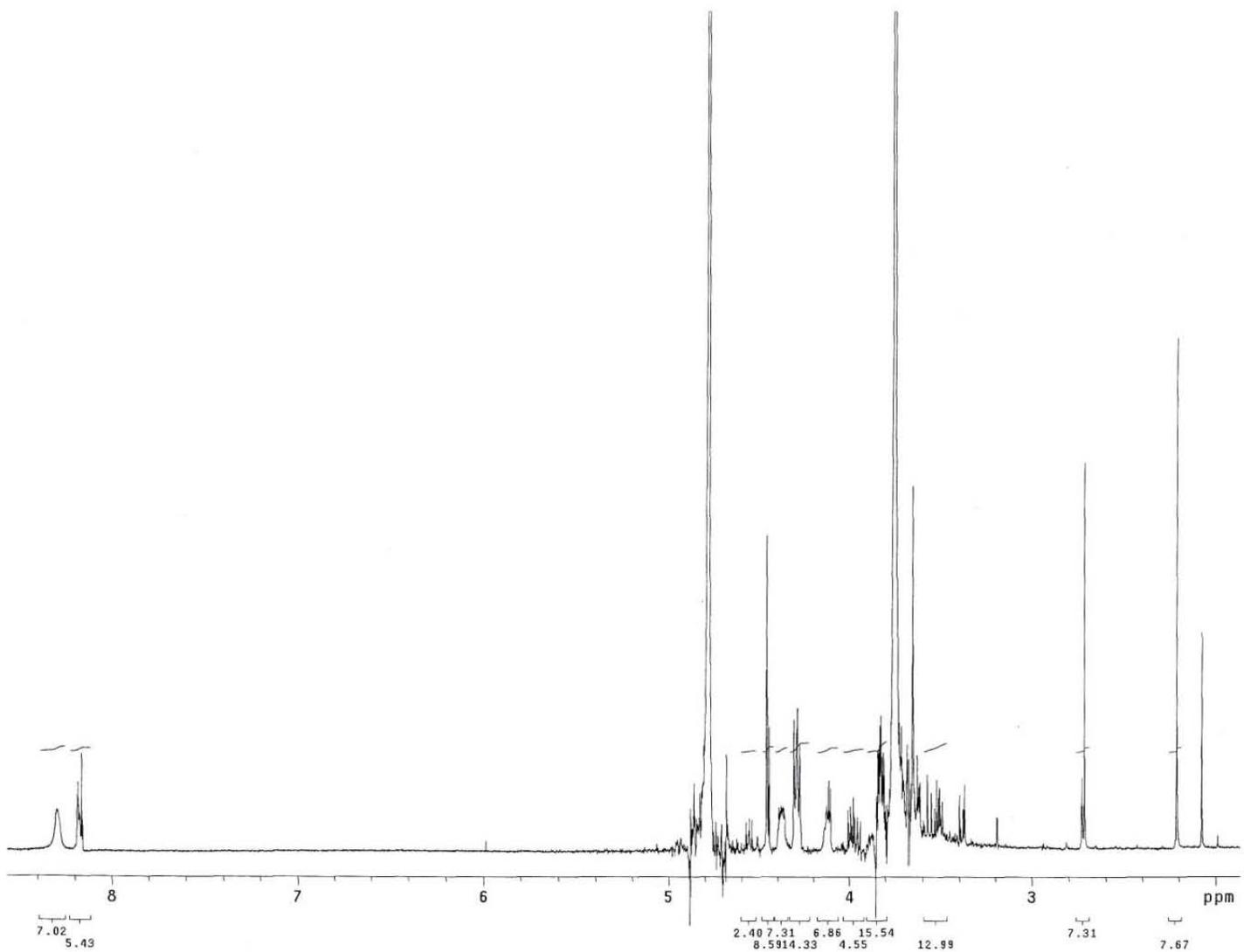
ANEXO I

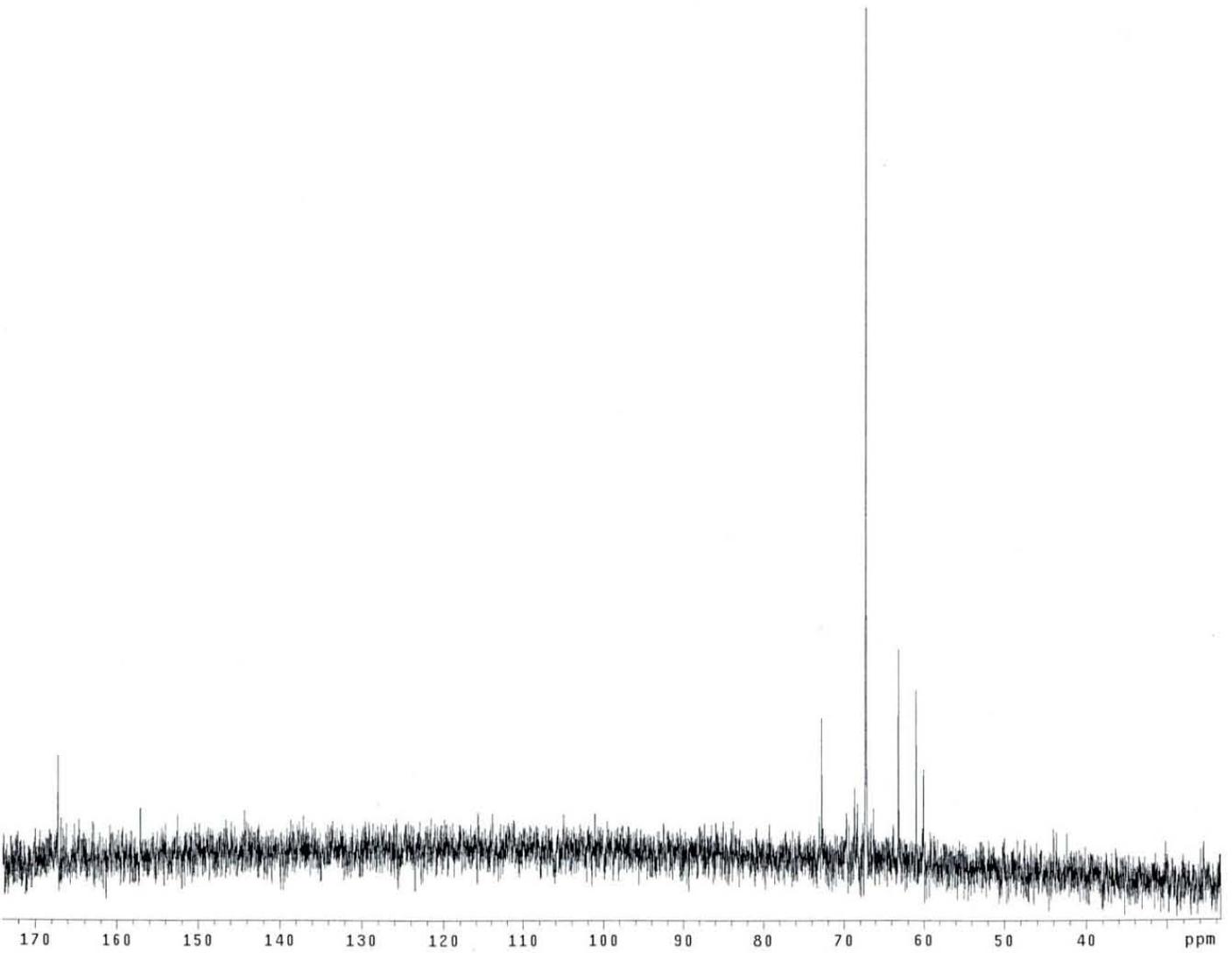
**ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS Y ESPECTROMÉTRICOS DE LOS
COMPUESTOS IIA-2-2, IIA-3-1 Y IIA-2-1**



Espectro 1. Espectrometría de masas mediante impacto electrónico del compuesto
IIA-2-2.

Espectro 2. ^1H RMN del compuesto IIA-2-2.



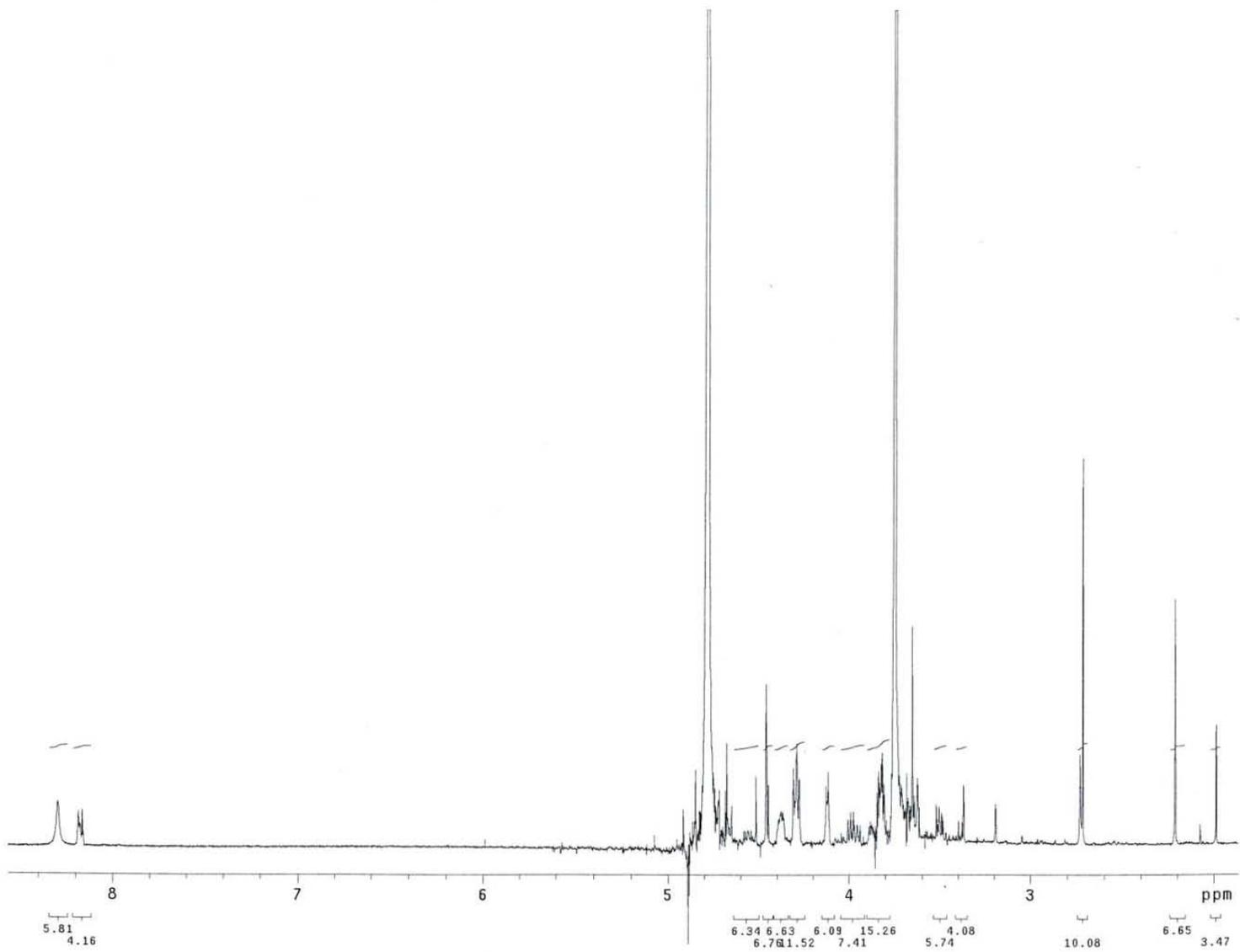


Espectro 3. ^{13}C RMN del compuesto IIA-2-2.

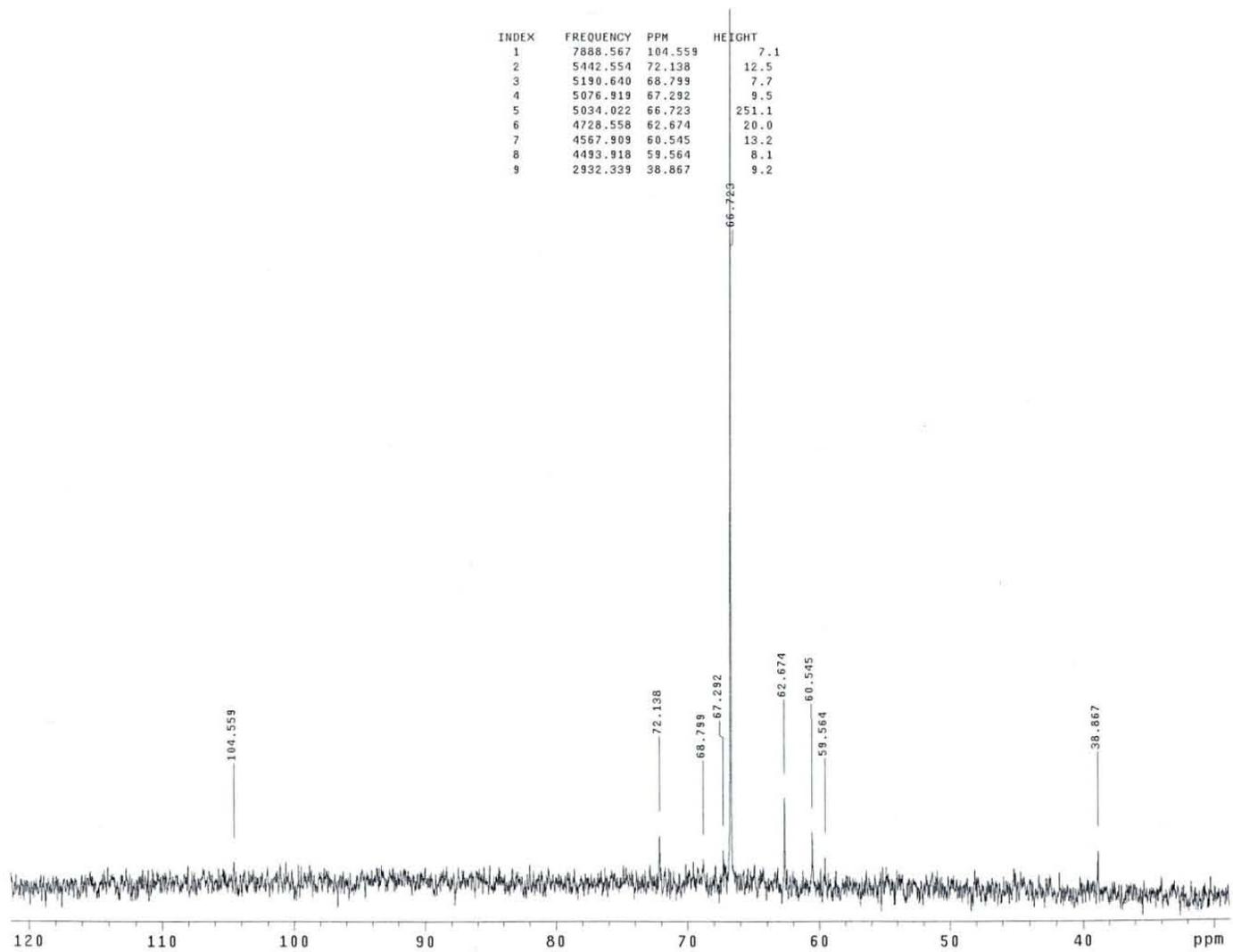
Cuadro A. Desplazamientos químicos de IIA-3-1.

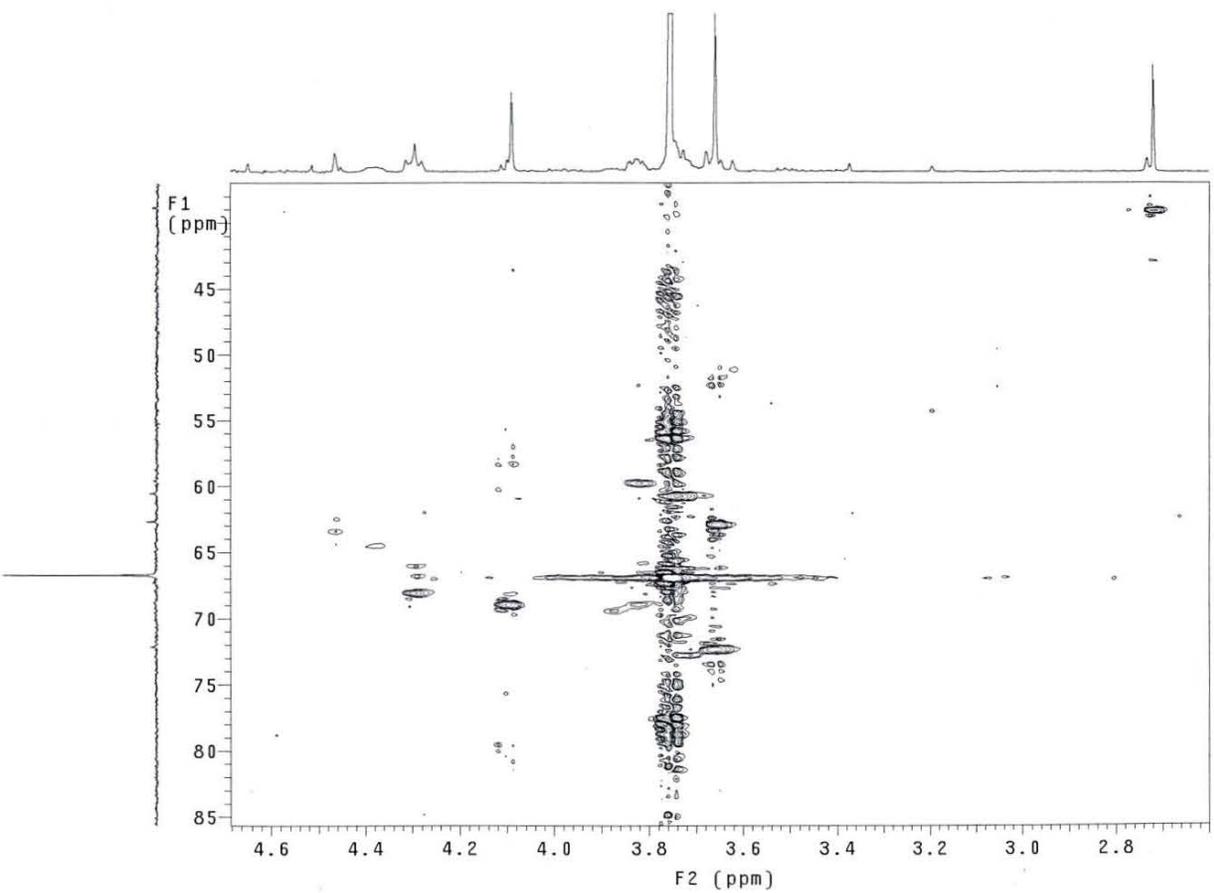
| | $\delta^{13}\text{C}$ | gHSQC |
|-----------------|-----------------------|-------|
| C | 104.5 | / |
| CH ₂ | 72.1 | 3.66 |
| CH ₂ | 68.7 | 4.10 |
| CH ₂ | 67.9 | 4.29 |
| C | 67.2 | / |
| CH ₂ | 62.6 | 3.66 |
| CH ₂ | 60.5 | 3.73 |
| CH ₂ | 59.5 | 3.82 |
| | 38.8 | 2.72 |

Espectro 4. ^1H RMN del compuesto IIA-3-1.



Espectro 5. ^{13}C RMN del compuesto IIA-3-1.

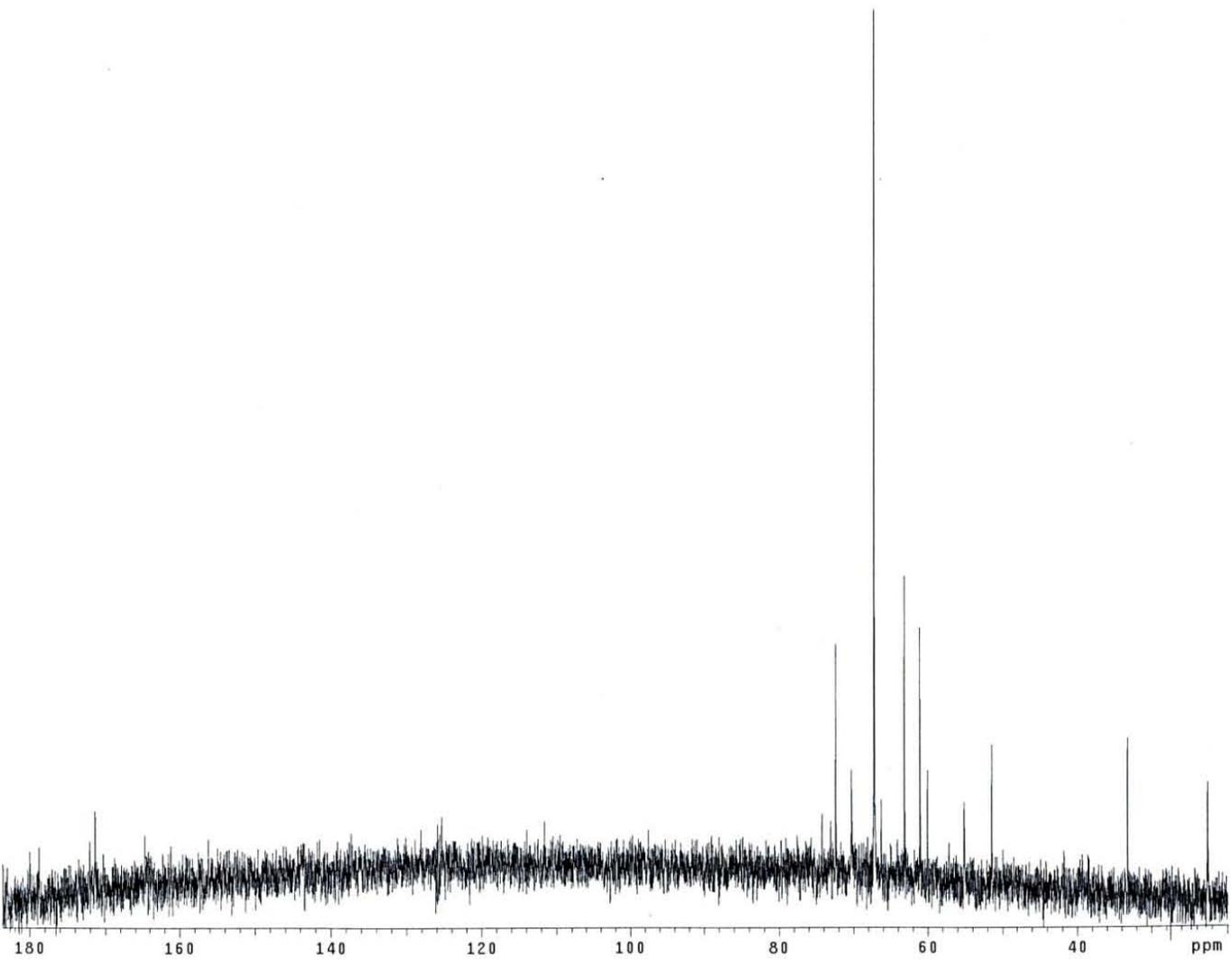




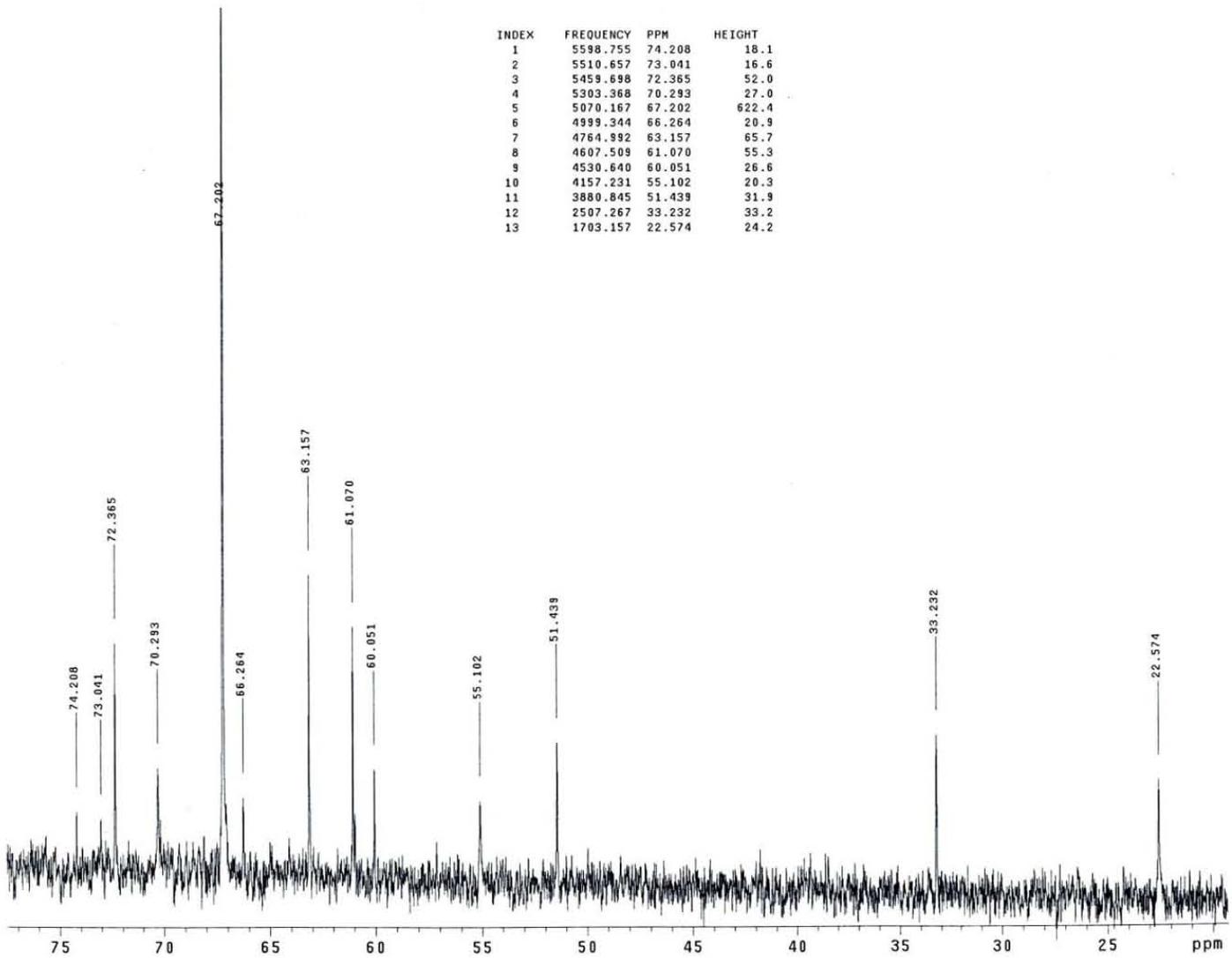
Espectro 7. Detalle parcial de gHSQC del compuesto IIA-3-1.

Cuadro B. Desplazamientos químicos de IIA-2-1

| | | <i>gHSQC</i> | <i>gHMBC</i> |
|-----------------|-------|--------------|-------------------|
| C=O | 179.9 | / | / |
| C=O | 178.7 | / | / |
| C=O | 171.3 | / | / |
| CH | 74.2 | 3.33 | / |
| C | 73.0 | / | / |
| CH ₂ | 72.3 | 3.63 | / |
| CH ₂ | 70.2 | 3.97 | 178.7, 72.3, 61.0 |
| C | 66.2 | / | / |
| CH ₂ | 63.1 | 3.65 | / |
| CH ₂ | 61.0 | 3.73 | / |
| CH ₂ | 60.0 | 3.82 | / |
| CH | 55.1 | 3.37 | 66.2 |
| CH | 51.4 | 3.60 | 33.2, 171.3 |
| CH ₂ | 33.2 | 2.73 | 51.4 |
| Me | 22.5 | 1.98 | 179.9 |
| CH ₂ | 75.05 | 4.51 | 55.0 |

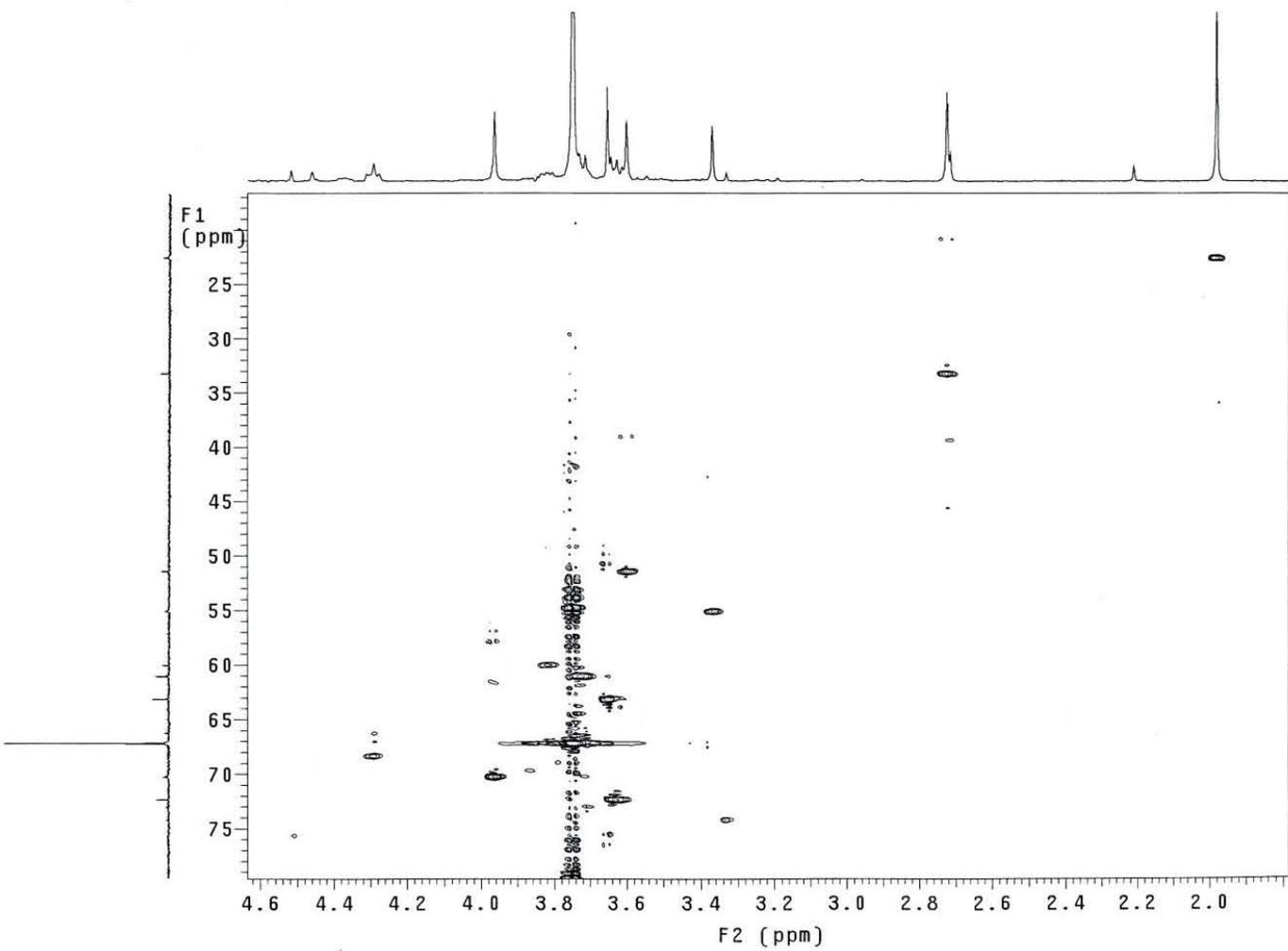


Espectro 8. ^{13}C RMN del compuesto IIA-2-1

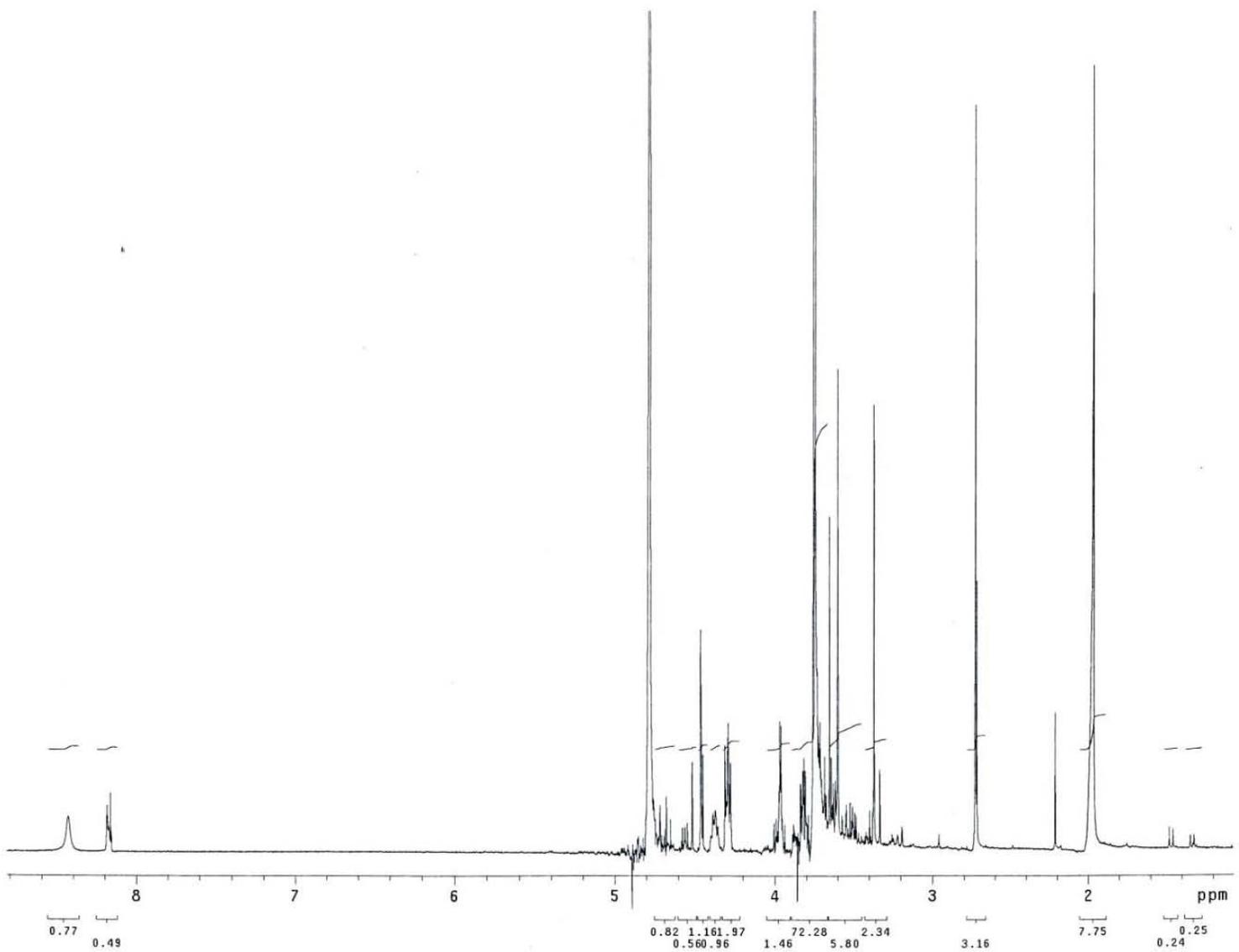


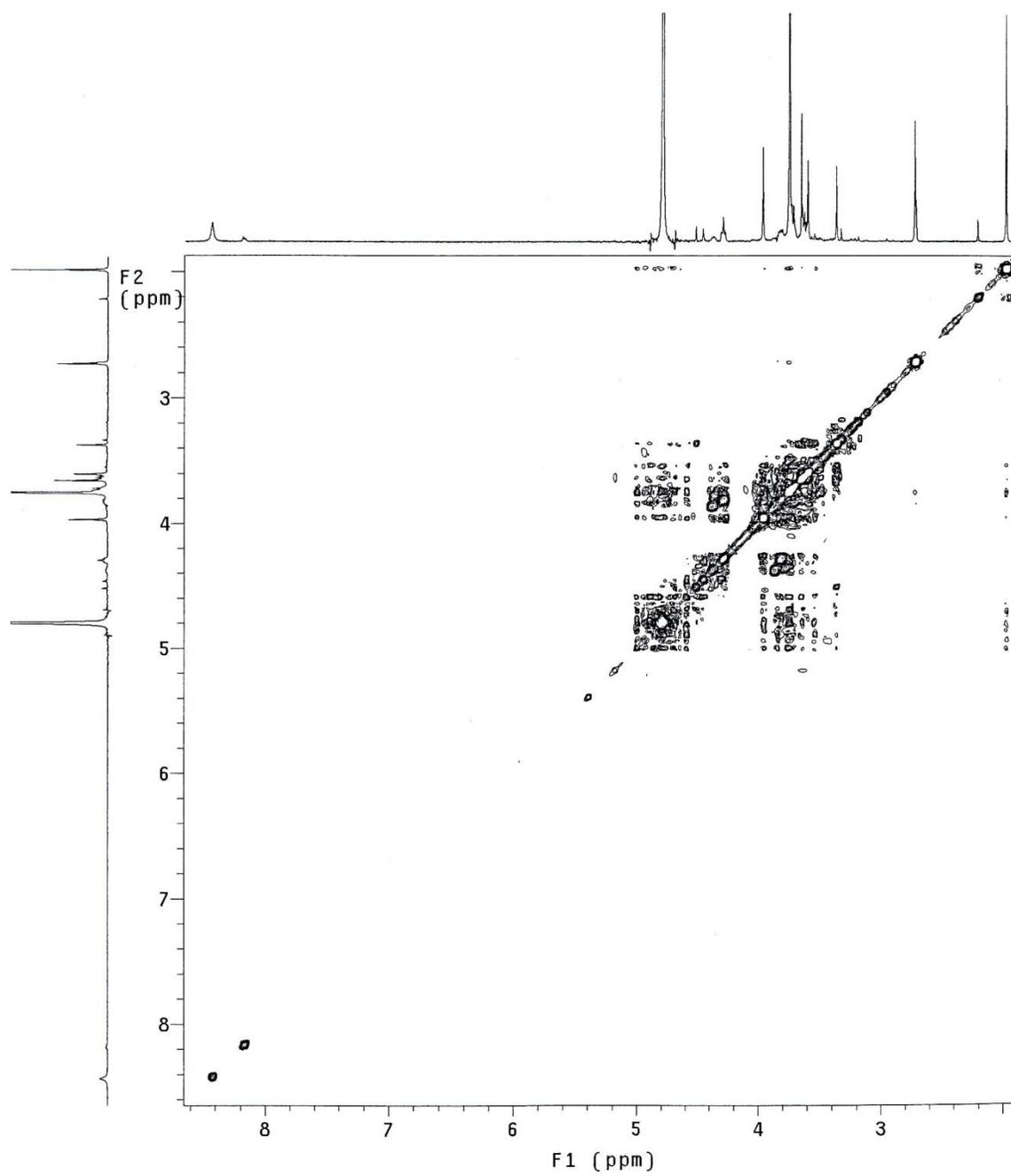
Espectro 9. Detalle parcial de ^{13}C RMN del compuesto IIA-2-1

Espectro 10. gHSQC del compuesto IIA-2-1

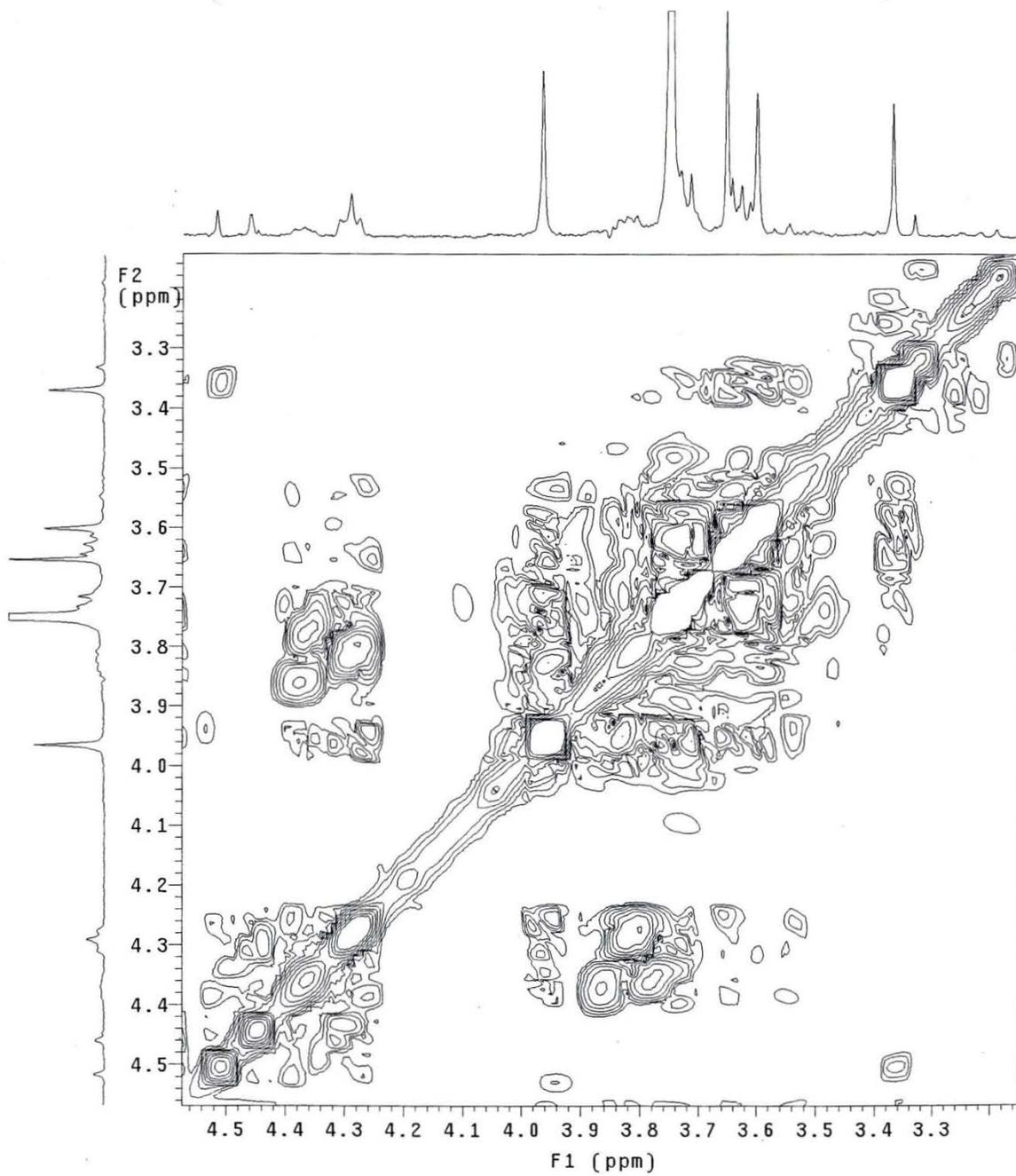


Espectro 11. ^1H RMN del compuesto IIA-2-1

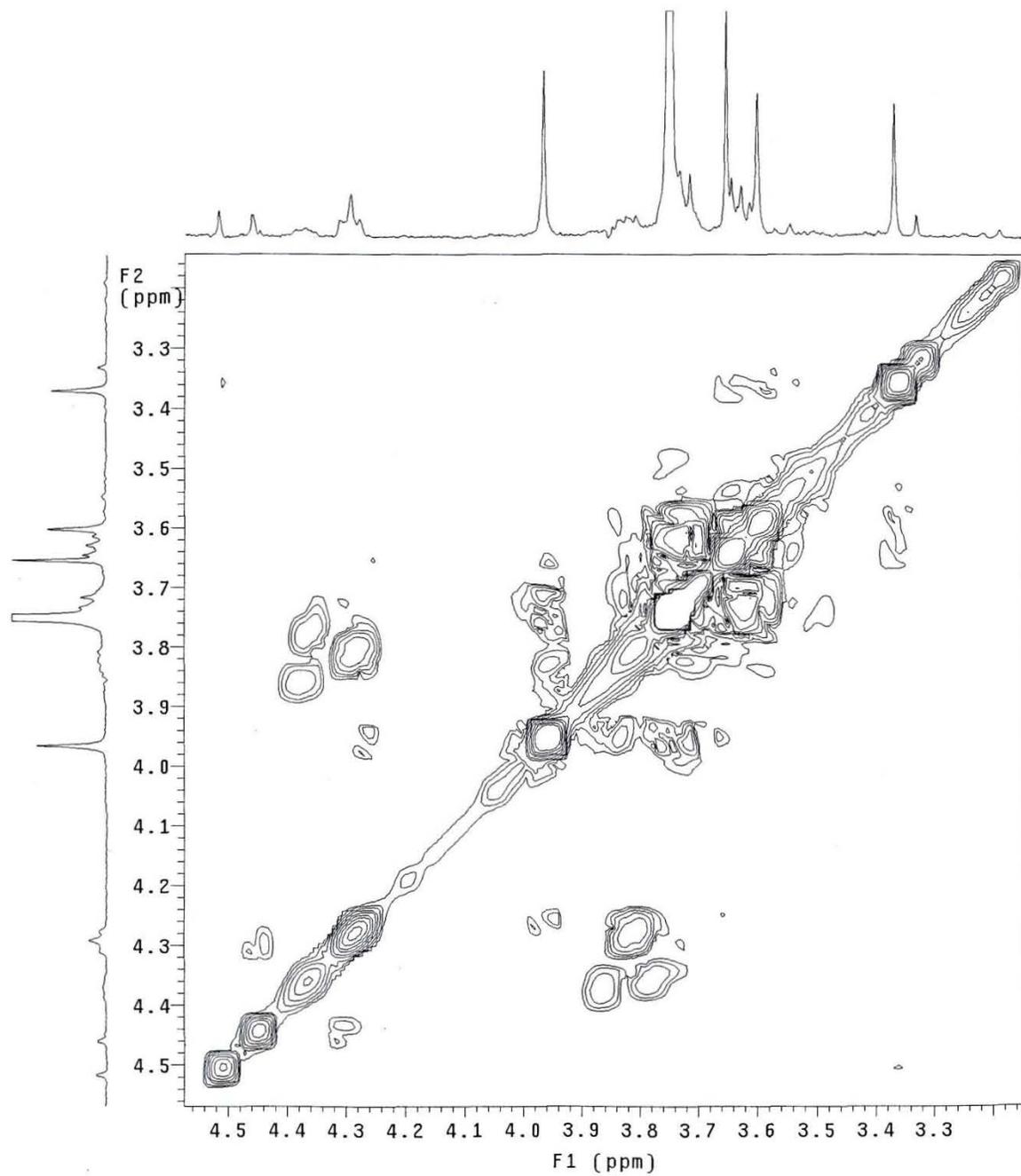




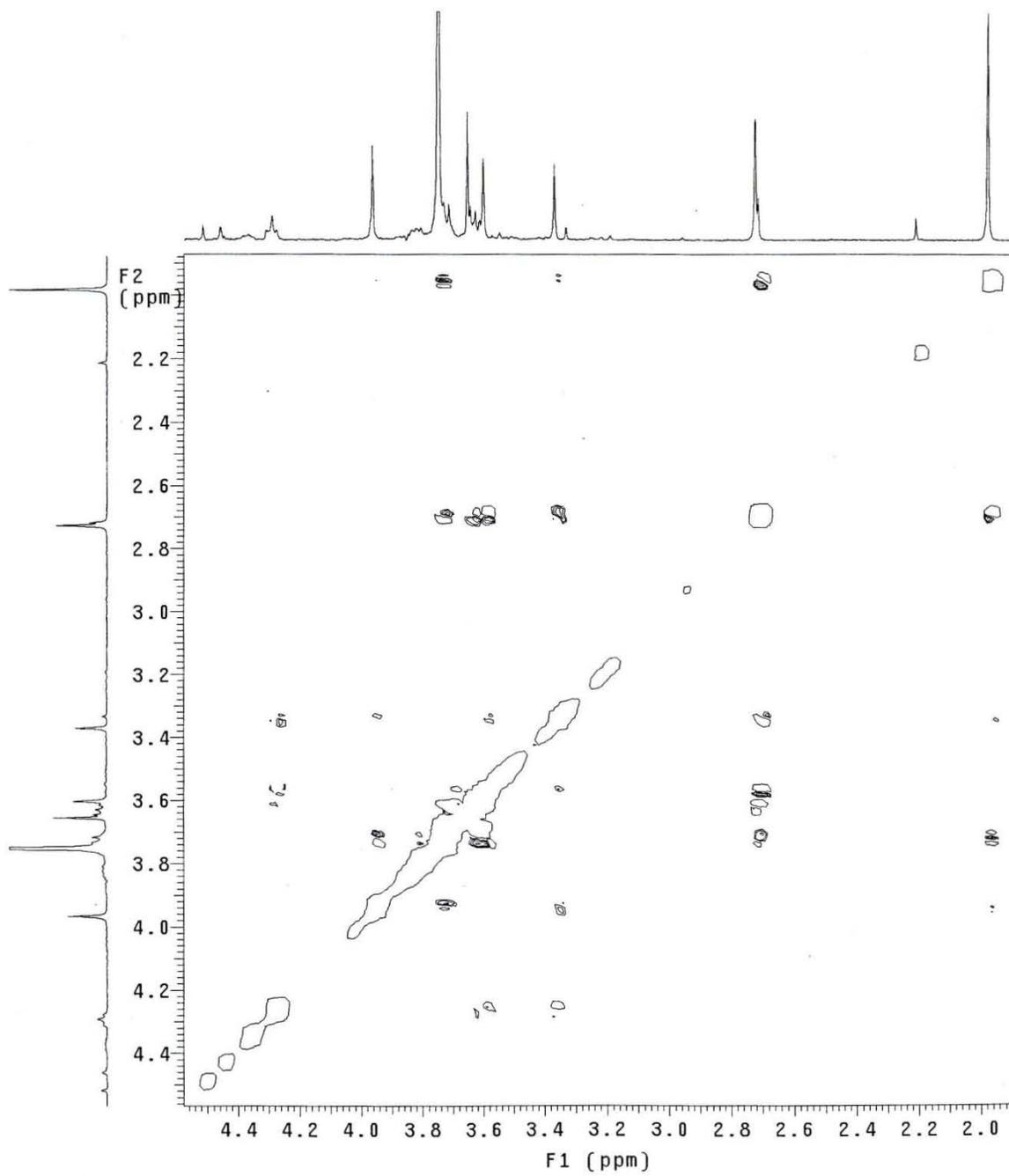
Espectro 12. COSY del compuesto IIA-2-1.



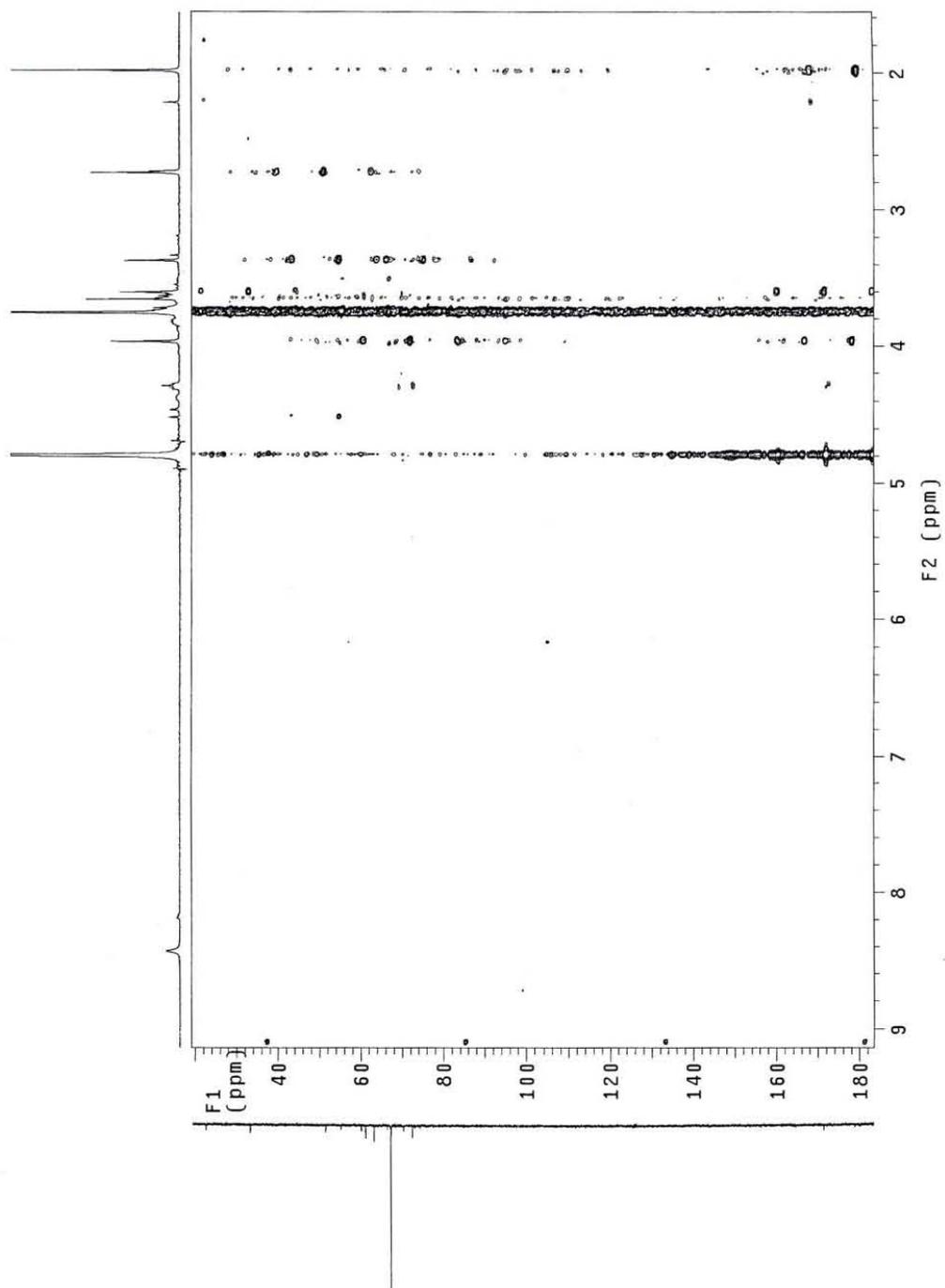
Espectro 13. Detalle parcial de COSY del compuesto IIA-2-1.



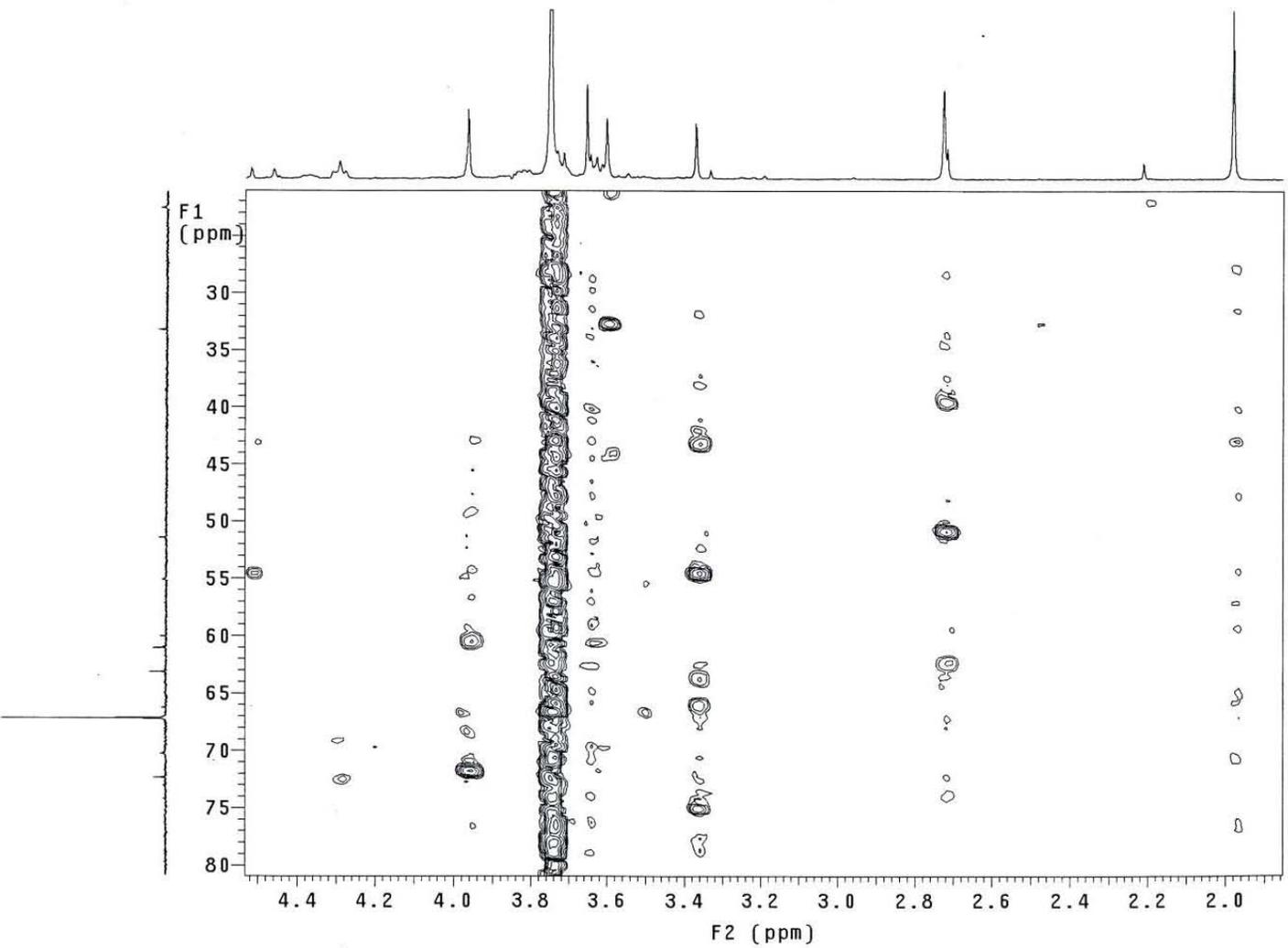
Espectro 14. Detalle parcial de COSY del compuesto IIA-2-1.



Espectro 15. NOESY del compuesto IIA-2-1.

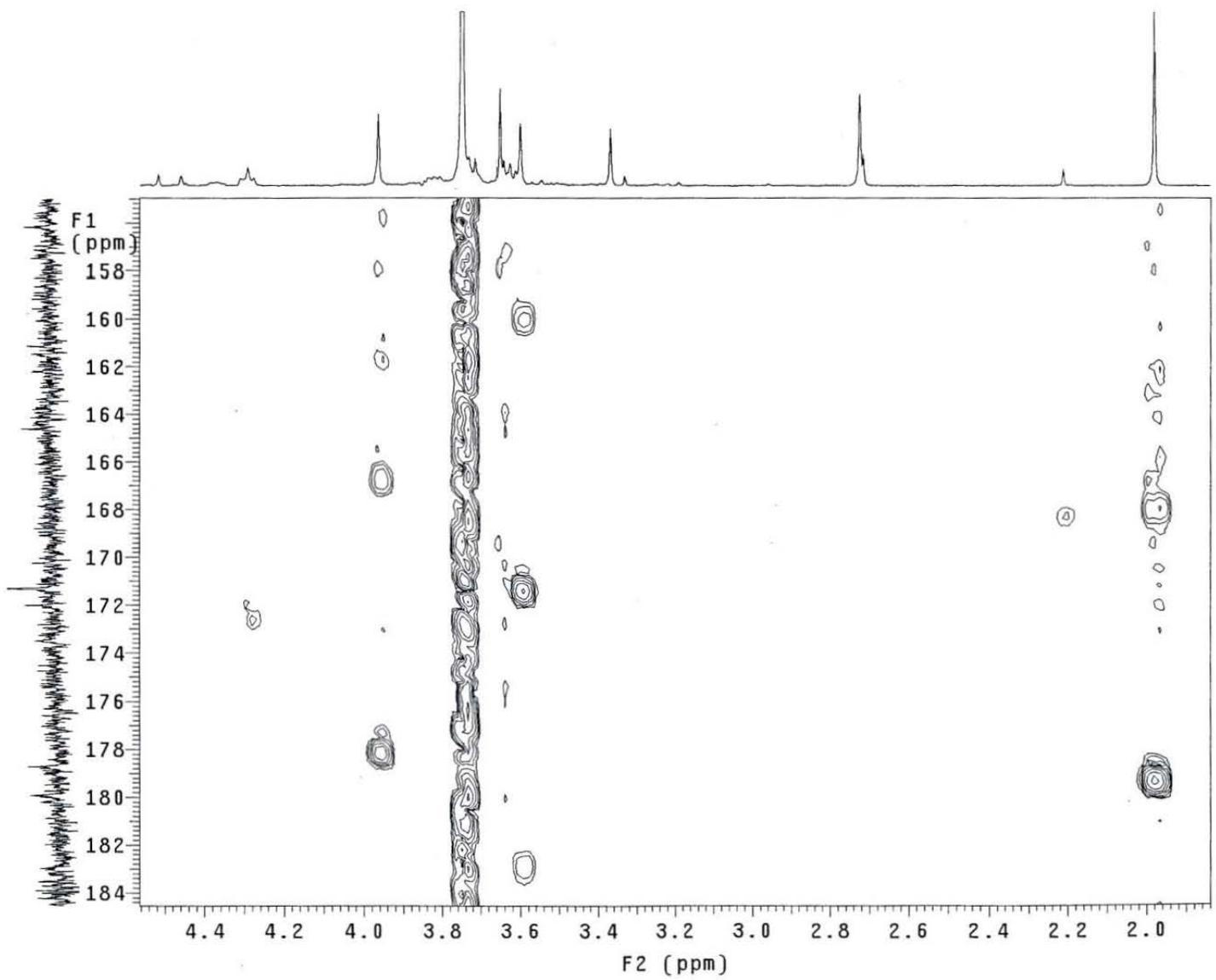


Espectro 16. gHMBC del compuesto IIA-2-1



Espectro 17. Detalle parcial de gHMBC del compuesto IIA-2-1

Espectro 18. Detalle parcial de gHMBC del compuesto II-A-2-1



ANEXO II

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO



Effects of bleaching on the pharmacological and toxicological activities elicited by the aqueous extracts prepared from two “fire corals” collected in the Mexican Caribbean

Alejandro García-Arredondo^{a,1}, Alejandra Rojas-Molina^{a,*}, César Ibarra-Alvarado^a, Roberto Iglesias-Prieto^b

^a Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Querétaro 76010, Mexico

^b Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Puerto Morelos, Universidad Nacional Autónoma de México, Cancún 77500, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2010

Received in revised form 22 September 2010

Accepted 16 October 2010

Keywords:

Bleaching

Hemolysis

Millepora alcicornis

Millepora complanata

Phospholipase A₂

Vasoconstriction

ABSTRACT

Hydrocorals of the genus *Millepora* are abundant skeleton-forming inhabitants of coral reefs around the world. These species are popularly known as “fire corals” since contact with them causes severe pain, skin eruptions and blisters as a result of the release of unidentified toxins. *Millepora* species associate with photosynthetic dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* (“zooxanthellae”), and up to now the role of these symbionts in the toxic effects induced by the “fire corals” is unknown. In this study, we compared the hemolytic, vasoconstrictor, and phospholipase A₂ (PLA₂) activities of the crude aqueous extracts prepared from normal and bleached specimens of two hydrocorals collected in the Mexican Caribbean, *Millepora alcicornis* and *Millepora complanata*. Electrophoretic analysis revealed some differences between the protein profiles of the extracts prepared from normal and bleached specimens. Bleaching decreased, but not abolished, the hemolytic effect induced by the hydrocorals extracts and the phospholipase A₂ activity of *M. complanata* extract. Furthermore, it did not modify the enzymatic activity of *M. alcicornis* extract and vasoconstriction elicited by both extracts. Our results suggest that the presence of the symbionts does not importantly influence the pharmacological and toxic effects induced by *Millepora* ssp. extracts, and indicate that cnidarians are the main source of the bioactive compounds.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hydrocorals of the genus *Millepora* are abundant reef-forming cnidarians found in coral reefs around the world. Particularly, the reefs of the Mexican Caribbean support large populations of *Millepora alcicornis* and *Millepora complanata* (Lewis, 2006). When they come into contact with human skin, these species, commonly known as “fire corals”, can cause severe pain, eruptions, and blisters as a result of the release of unidentified toxins (Sagi et al., 1987; Bianchini et al., 1988). These toxins are also capable of inducing systemic toxic effects in humans, including nephrotic syndrome, acute renal failure, and pulmonary edema (Prasad et al., 2006). Several studies have demonstrated that venoms from *Millepora tenera*, *M. alcicornis*, *Millepora dichotoma*, and *Millepora platyphylla* display lethal, hemolytic, dermo-necrotic, and antigenic properties (Wittle et al., 1971, 1974; Middlebrook et al., 1971; Wittle and Wheeler, 1974; Radwan, 2002).

Our previous studies showed that the venom of *M. complanata* contains proteins that induce calcium-dependent contractions on guinea pig ileum (Rojas et al., 2002) and on rat aorta (Ibarra-Alvarado et al., 2007). Vasoconstriction is caused primarily by 15 and 20 kDa

proteins. In addition, we found that the venom displays PLA₂ activity, and it contains a 30 kDa hemolysin (Ibarra-Alvarado et al., 2007).

Like many scleractinian corals and other cnidarians, *Millepora* hydrocorals bear symbiotic dinoflagellate algae of the genus *Symbiodinium*, also known as zooxanthellae (Banaszak et al., 2003). The symbionts translocate molecular oxygen and a majority of their photosynthetically fixed carbon to the host in exchange for inorganic nitrogen, phosphorus and carbon from the host, in addition to a high-light environment and refuge from herbivory (Rosenberg et al., 2007; Venn et al., 2008; Yellowless et al., 2008). The symbiosis is also closely tied to the ability of the cnidarians to deposit their calcium carbonate skeletons that form the reef structure.

Unfortunately, *Millepora*-algal symbiosis is under threat due to global episodes of coral bleaching that affect coral reefs throughout the world. Bleaching, which is caused by elimination of algal cells from the symbiosis or by loss of algal pigments (Brown, 1997), can be triggered by multiple factors (Douglas, 2003; Jones, 2004), but most bleaching observed in the field is a result of elevated sea surface temperature associated with global warming in combination with high solar radiation (Hoegh-Guldberg et al., 2007). It has been widely documented that bleaching is deleterious to coral reefs as bleached organisms display depressed growth rates, increased susceptibility to pathogens and mechanical damage, and reduced survivorship (Szmant and Gassman, 1990; Baird and Marshall, 2002). However, up to now the impact of bleaching on the production of toxins by the

* Corresponding author. Tel.: +52 442 1 92 12 00 ext. 5527.

E-mail address: rojas@uaq.mx (A. Rojas-Molina).

¹ Partly taken from the Ph.D. thesis of A. García-Arredondo at Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

cnidarians is unknown since our understanding of the relevance of the symbiosis to the synthesis of these toxins is very limited.

The purpose of the present study was to explore the influence of bleaching on the vasoconstrictor, hemolytic, and PLA₂ activities displayed by the crude aqueous extracts prepared from specimens of two hydrocorals collected in the Mexican Caribbean, *M. complanata* and *M. alcicornis*.

2. Material and methods

2.1. Specimen collection and bleaching induction

Fragments of *M. complanata* and *M. alcicornis* were collected by scuba diving from depths of 4–10 m in the area known as “La Bocana Chica” that belongs to the Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos (Quintana Roo, México) in November 2008. All fragments were transferred to an aquarium with flowing seawater, and on the same evening were anchored individually into Plasticine on acrylic sheets. Thereafter, fragments of each hydrocoral were separated into two groups, control and experimental, and put into 80-l acrylic tanks, which were placed outdoors and swept with flowing seawater at ambient temperature. Fragments were held under these conditions during one week until their acclimatization.

After the acclimatization period, the temperature of the tank containing the experimental groups of both hydrocorals was elevated to 31 °C for 9 days, and then to 33 °C for 4 days until their bleaching. On the other hand, the tank containing the control groups was maintained at ambient temperature during the bleaching period of the experimental groups. Once the experimental groups reached bleaching, fragments of the hydrocorals (experimental and control) were disassembled from their bases and stored at –70 °C.

2.2. Crude extracts preparation

Nematocyst discharge was accomplished by stirring the hydrocoral fragments in deionized water (pH 7) at 4 °C for 24 h. The extracts obtained were centrifuged at 3000 rpm (2060 ×g) for 15 min at 4 °C. This procedure was repeated twice and the supernatants were lyophilized and stored at –70 °C. The lyophilized supernatants were dissolved in deionized water at concentrations of 150 mg (lyophilized)/ml, and centrifuged at 3000 rpm (2060 ×g) for 15 min at 4 °C. The supernatants were then filtered through a 0.2-µm pore filter (Millipore). The filtered solutions of each sample were stored at –20 °C until their use to determine their biological effects. Protein content was measured using the Bradford method (Bradford, 1976).

2.3. Electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out as previously described (Schägger and Von-Jagow, 1987). Samples of 10 µg protein were run in 12% polyacrylamide gels at 120 V for 2 h at 4 °C, using tris-glycine as buffer. Protein bands were visualized with Coomassie blue. Molecular masses were determined using broad-range polypeptide standards (Bio-Rad, CA, USA).

2.4. Bioassays

2.4.1. Isolated rat aortic ring assay

Male Wistar rats (275–325 g) were anesthetized with chloroform and sacrificed by decapitation. The descending thoracic aorta was removed and placed in ice-cold, oxygenated Krebs–Henseleit solution (pH 7.4; 126.8 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 30 mM NaHCO₃ and 5 mM D-glucose) and immediately flushed with Krebs–Henseleit solution to prevent intravascular clot formation. The aorta was dissected free of connective tissue and cut into rings at 4 to 5 mm intervals. The aortic rings were mounted between

stainless steel hooks and suspended in water-jacketed 7-ml organ baths containing oxygenated (95% O₂ and 5% CO₂) Krebs–Henseleit solution at 37 °C. The tissues were allowed to equilibrate for 60 min under a resting tension of 1.5 g. During this period, the bathing medium was exchanged every 15 min. After final adjustment of the passive resting tension to 1.5 g, aortic segments were contracted with 100 mM KCl. Once a stable contractile tone was reached, the bathing medium was exchanged to restore a resting tension of 1.5 g. After that, the tissues were contracted with 1 µM L-phenylephrine, the force of contraction was recorded and this contraction was set as 100%. The bathing medium was exchanged again to restore a resting tension, and then the extracts were independently added to the organ bath. The isometric tension was measured by Grass FT03 Force-displacement transducers attached to a Grass 7D polygraph. The responses were expressed as a percentage of the initial contraction achieved with phenylephrine.

2.4.2. Hemolysis assay

The hemolytic effects of the extracts were monitored according to the method previously described (Rottini et al., 1990) with some modifications. Briefly, samples for the assay contained a mixture (1 ml) of Alsever's solution (pH 7.4; 120 mM D-glucose, 30 mM sodium citrate, 7 mM NaCl, and 2 mM citric acid) with 50 µl of a 1% suspension of rat erythrocytes and the required volume of the extracts. These samples were incubated at 37 °C for 30 min. After centrifugation at 2500 rpm (1430 ×g) for 4 min at 4 °C, the A₄₁₅ of the supernatant fluid containing the hemoglobin released from lysed erythrocytes was measured in a spectrophotometer (Lambda Bio, Perkin Elmer Co.). Each experiment was normalized with respect to complete hemolysis, which was measured by diluting the erythrocyte sample in deionized water instead of Alsever's buffer. One hemolytic unit (HU₅₀) was defined as the amount of protein sample required to cause 50% hemolysis.

2.4.3. Phospholipase A₂ activity assay

PLA₂ activity of the extracts was determined using a secretory PLA₂ colorimetric assay kit (Cayman Chemical, MI, USA). The assay uses the 1,2-dithio analogue of diheptanoyl phosphatidylcholine as substrate. Free thiols generated upon hydrolysis of the thioester bond at the sn-2 position by PLA₂ were detected using DTNB (5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)). Color changes were monitored by a Benchmark Plus microplate spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) at 414 nm, sampling every minute for 10 min. PLA₂ activity was expressed as micromoles of hydrolyzed substrate per minute per milligram of protein.

2.4.4. Data analysis and statistics

Results are expressed as mean ± S.E.M. from *n* = 4 experiments. In the case of the hemolytic activity, concentration–response curves (CRC) were repeated three times employing different rats. CRC were plotted and fitted to the Boltzmann equation, using the data analysis and graphics program Prism (GraphPad Software, CA, USA). The values of the mean effective concentrations (EC₅₀) and maximum vasoconstrictor effects (E_{max}) were obtained from the CRC. Statistical evaluation of the data was performed using two-way ANOVA, followed by a post hoc Bonferroni test for multiple comparisons or Student's *t*-test for unpaired observations. In all cases statistical significance is indicated by *p* < 0.05.

2.5. Materials

Phenylephrine, ionomycin, citric acid, and sodium citrate were obtained from Sigma (Sigma-Aldrich Co., MO, USA). All salts and other reagents were obtained from J.T. Baker (Mallinckrodt Baker, NJ, USA) or Sigma. For experiments in the isolated rat aorta assay, ionomycin was initially prepared as a stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO) and further diluted in deionized water. The highest concentration of DMSO

used was 0.2% v/v. In the case of the hemolysis assay, ionomycin was dissolved in ethanol. The highest concentration of ethanol used was 5% v/v.

3. Results

3.1. Induction of bleaching and electrophoretic analysis

For the period during which hydrocoral specimens were maintained at an ambient temperature of 25 °C (days 1–7), the two species, *M. alcicornis* and *M. complanata* remained viable and stable. Elevating the temperature up to 31 °C (days 8–16) did not induce any visible change in the experimental specimens. However, a further temperature elevation to 33 °C (days 17–20) led to bleaching of the experimental groups of both species. Fig. 1 shows photographs of *M. alcicornis* and *M. complanata* control and experimental specimens subjected to the thermal treatment.

The crude extract prepared from the *M. alcicornis* control group (Ma-Control) showed a protein concentration of 23.0 mg/g of lyophilized supernatant, while the extract obtained from bleached specimens (Ma-Bleached) showed a protein concentration of 17.3 mg/g. On the other hand, the extract prepared from the *M. complanata* control group (Mc-Control) had a protein concentration of 12.5 mg/g, whereas the extract prepared from bleached specimens (Mc-Bleached) showed a protein concentration of 9.8 mg/g. In both cases, the orange colored extracts obtained from control fragments appeared much darker than extracts obtained from bleached fragments.

As expected, electrophoretic analysis revealed that extracts prepared from both species have different protein profiles (Fig. 2). Prominent protein bands A (38 kDa), B (19 kDa) and C (11 kDa) that were observed

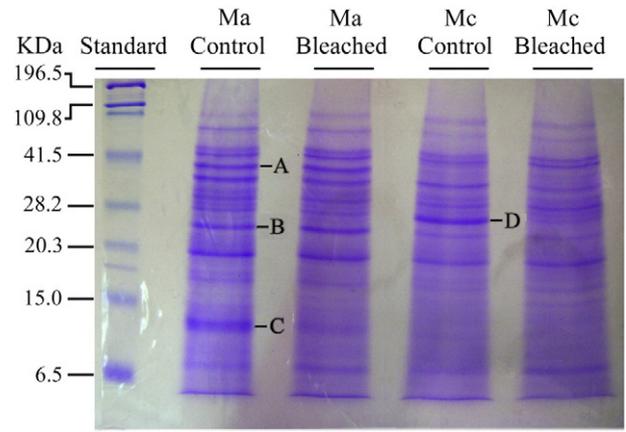


Fig. 2. SDS-PAGE of the extracts prepared from control and bleached specimens of *M. alcicornis* (Ma) and *M. complanata* (Mc). Prominent protein bands A (38 kDa), B (19 kDa), C (11 kDa), and D (25 kDa) are indicated with arrows. Protein bands were visualized with Coomassie blue.

in Ma-Control were not observed in Mc-Control. Furthermore, electrophoretic profiles of the extracts obtained from bleached specimens also exhibited some differences with respect to those of the controls. For example, a prominent band C found in the Ma-Control profile was not observed in the Ma-Bleached profile; and a prominent band D (25 kDa) that appears in the Mc-Control profile was absent in the Mc-Bleached profile.

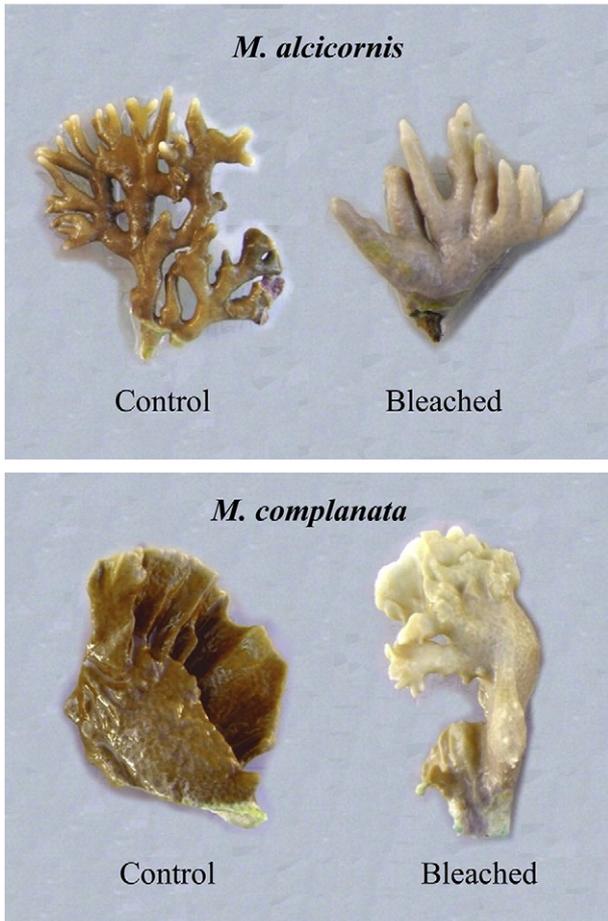


Fig. 1. Photographs of representative fragments of *M. alcicornis* and *M. complanata* after the thermal treatment employed to induce their bleaching.

3.2. Vasoconstrictor activity

M. alcicornis and *M. complanata* extracts (0.001 to 100 µg protein/ml) prepared from control and bleached specimens produced a concentration-dependent contraction of rat aortic rings. Ma-Control was approximately 2-fold more potent than Mc-Control and displayed a higher maximum vasoconstrictor effect ($p < 0.01$) (Table 1). In these experiments, the vasoconstriction induced by extracts of both species was similar to that of ionomycin ($EC_{50} = 8.0 \pm 1.1$ µg/ml; $E_{max} = 109.8 \pm 6.2\%$), the positive control. EC_{50} and E_{max} values obtained for the vasoconstriction elicited by the extracts prepared from bleached fragments did not show any statistical difference from the respective values of the control specimens (Table 1). In contrast, CRC for Ma-Control and Mc-Control were significantly rightward shifted (Fig. 3A and B), and the corresponding EC_{50} values were significantly reduced when the extracts were pre-incubated in a boiling water bath before their evaluation (Table 1).

Table 1

Vasoconstrictor activity of the crude extracts prepared from *M. alcicornis* and *M. complanata*.

| | <i>M. alcicornis</i> | | <i>M. complanata</i> | |
|---|--------------------------|--------------|---------------------------|-------------|
| | Control | Bleached | Control | Bleached |
| EC_{50} (µg/ml) ^a | 1.4 ± 1.3 | 1.0 ± 1.1 | 2.7 ± 1.1 | 6.4 ± 1.1 |
| E_{max} (%) ^b | 90.1 ± 5.6 | 79.3 ± 2.3 | 64.6 ± 2.7 ^{##} | 72.5 ± 1.9 |
| Denatured extracts (After incubation in boiling bath for 20 min) | | | | |
| EC_{50} (µg/ml) ^a | 11.8 ± 1.5 ^{**} | 9.0 ± 2.4 | 18.7 ± 1.2 ^{***} | 19.1 ± 1.3 |
| E_{max} (%) ^b | 122.3 ± 16.1 | 121.2 ± 27.5 | 80.3 ± 5.9 | 92.2 ± 11.2 |

Each value is expressed as the mean ± S.E.M. ($n = 4$).

^{##} $p < 0.01$ as compared to *M. alcicornis* control.

^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ as compared to control before incubation in boiling bath.

^a Concentration represents protein contents in the extract.

^b Maximum effect expressed as % of the contraction induced by 1 µM phenylephrine.

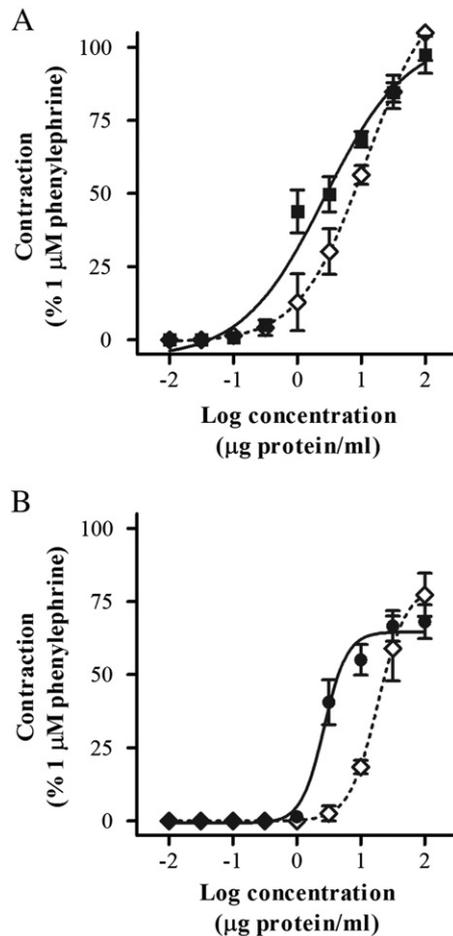


Fig. 3. Concentration–response curves showing the vasoconstrictor effect of *M. alcicornis* (A) and *M. complanata* (B) extracts (circles) after their incubation in a boiling bath for 20 min (diamonds).

3.3. Hemolytic activity

Extracts obtained from control and bleached specimens of both hydrocorals exhibited concentration-dependent hemolytic activities. Ma-Control was approximately 10-fold more potent than Mc-Control. In this assay, Ma-Control and Mc-Control were considerably more potent than the positive control, ionomycin ($HU_{50} = 59.4 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$). CRC for the hemolysis induced by the hydrocorals extracts were shifted to the right when extracts prepared from bleached organisms were evaluated (Fig. 4). Table 2 shows HU_{50} values calculated for the extracts.

In contrast to the results obtained in the isolated rat aorta assay, hemolytic activity of Ma-Control and Mc-Control was completely abolished after incubation in a boiling water bath for 20 min.

3.4. Phospholipase A_2 activity

Extracts of both hydrocoral species displayed PLA_2 activity, which in the case of *M. alcicornis*, was not significantly affected by bleaching. However, a significant decrease was observed in the enzymatic activity of bleached *M. complanata* specimens (Table 2). As was the case for hemolysis, PLA_2 activity was completely lost when extracts were incubated in a boiling water bath.

4. Discussion

In the past few decades coral reefs have suffered a severe decline due to a variety of anthropogenic stresses. A common sign of these disturbances is bleaching (Banaszak et al., 2003). At present the

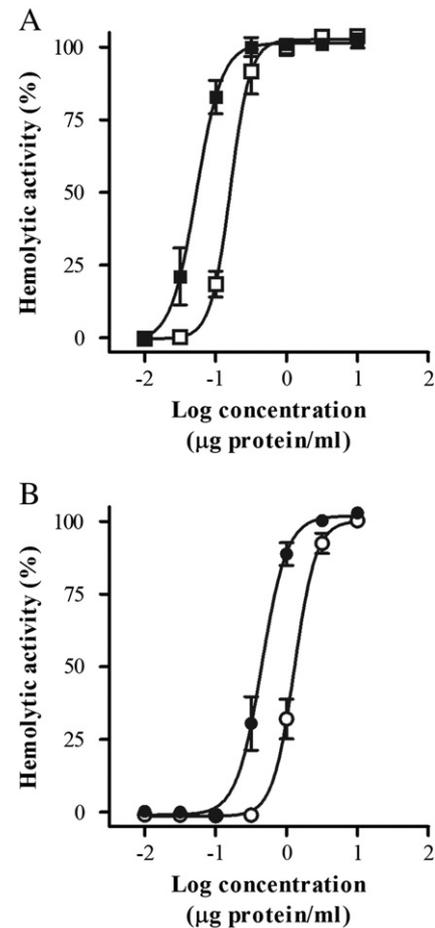


Fig. 4. Concentration–response curves showing the hemolytic effect of *M. alcicornis* (A) and *M. complanata* (B) extracts on rat erythrocytes (closed symbols) compared with the effects of the extracts obtained from bleached fragments (open symbols). Hemolytic activities of all extracts were abolished after incubation in a boiling water bath for 20 min.

influence of this phenomenon on the hydrocorals production of toxins for defense and feeding is unknown. Therefore, the present study was undertaken to assess the effects of bleaching on pharmacological and toxicological activities elicited by extracts of *M. complanata* and *M. alcicornis* collected in the Mexican Caribbean.

Lesser protein yields in extracts prepared from bleached specimens of both species indicated the loss of protein components coming from zooxanthellae. Some of these components were evidenced by SDS-PAGE: a protein with a molecular mass of approximately 11 kDa and a 25 kDa protein, which were absent in the extracts obtained from *M. alcicornis* and *M. complanata* bleached specimens, respectively.

The extracts prepared from both *Millepora* species stimulated contraction of the rat aorta. Indirect evidence that the hydrocorals, not

Table 2

Hemolytic and phospholipase A_2 activities of the crude extracts prepared from *M. alcicornis* and *M. complanata*.

| Crude extract | Control | Bleached |
|--|------------------|----------------------|
| <i>Hemolytic activity</i> (HU_{50} , $\mu\text{g protein/ml}$) | | |
| <i>M. alcicornis</i> | 0.05 ± 0.005 | $0.2 \pm 0.02^{***}$ |
| <i>M. complanata</i> | 0.5 ± 0.02 | $1.3 \pm 0.01^{***}$ |
| <i>Phospholipase A₂ activity</i> ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) | | |
| <i>M. alcicornis</i> | 31.0 ± 1.0 | 28.2 ± 0.2 |
| <i>M. complanata</i> | 55.4 ± 1.4 | $35.1 \pm 1.0^{***}$ |

Each value is expressed as the mean \pm S.E.M. ($n = 3$).

$***p < 0.001$ as compared to control.

the symbiotic zooxanthellae, are the source of the vasoactive compounds was obtained when it was found that extracts prepared from bleached specimens displayed concentration-dependent vasoconstrictor effects that were not significantly different from those induced by extracts obtained from control specimens. These findings rule out the possibility that compounds such as zooxanthellatoxins (Asari et al., 1993; Nakamura et al., 1993) and zooxanthellamides (Onodera et al., 2004, 2005; Fukatsu et al., 2007) could be responsible for the vasoconstriction induced by *Millepora* extracts. Both types of vasoconstrictive polyhydroxylated long chain secondary metabolites have been isolated from cultured *Symbiodinium* strains, but to our knowledge they have not been obtained from algal cells in the intact symbiosis.

Vasoconstriction was reduced, but not completely blocked when Ma-Control and Mc-Control were pre-incubated in a boiling water bath. These results support the hypothesis that the excitatory effect elicited by the aqueous extracts of *M. complanata* and *M. alcicornis* is caused by both heat-stable and heat-labile compounds. In this respect it is worth mentioning that toxins that have been isolated from cnidarians are primarily proteins or polypeptides with biological activities labile at temperatures above 60 °C (Anderluh and Macek, 2002; Messerli and Greenberg, 2006). On the other hand, several studies have demonstrated that the phylum Cnidaria is a rich source of bioactive secondary metabolites (Fenical, 2003; Blunt et al., 2004, 2005, 2006, 2007). Therefore, it is very likely that the heat-stable vasoconstrictor compounds contained in the hydrocorals extracts are secondary metabolites. Nevertheless, considering that some thermostable peptidic toxins have been found in venoms from snakes and scorpions (Ali et al., 1998; Doley and Mukherjee, 2003), the presence of this kind of toxins in *Millepora* species cannot be discounted.

In agreement with the results obtained in previous studies (Wittle et al., 1971; Ibarra-Alvarado et al., 2007) we found that the extracts obtained from *M. alcicornis* and *M. complanata* caused concentration-dependent hemolytic effects on rat erythrocytes. In addition, these extracts exhibited PLA₂ activity. Both hemolytic and enzymatic activities were abolished when the extracts were incubated in a boiling water bath for 20 min. It has been widely recognized that cnidarians produce cytolytic toxins, which either form pores or hydrolyze membrane phospholipids (Anderluh and Macek, 2002; Nevalainen et al., 2004). Thus, it is quite probable that the thermolabile toxins responsible for the hemolysis produced by *Millepora* extracts are mainly cytolytic toxins with PLA₂ activity. In fact, this kind of enzymes has been previously detected in *M. platyphylla* and *M. complanata* venoms (Radwan and Aboul-Dahab, 2004; Ibarra-Alvarado et al., 2007).

Bleaching provoked a decrease in the hemolysis induced by the extracts, suggesting either the decline in the biosynthesis of *Millepora* spp. hemolysins or the presence of hemolysins of zooxanthellae origin. This last possibility is very interesting, considering that although several bioactive compounds have been isolated from cultured strains of *Symbiodinium* (Suzuki et al., 2003; Kobayashi and Tsuda, 2004; Onodera et al., 2004; Sommaruga et al., 2006; Tsunematsu et al., 2009), at present no hemolysins have been obtained from these microalgae.

On the other hand, bleaching significantly reduced, but not completely suppressed, *M. complanata* PLA₂ activity. Moreover, it did not significantly modify enzymatic activity displayed by *M. alcicornis*. This behavior suggests that cnidarians are the main source of this sort of toxins.

In conclusion, the results derived from the present study provide evidence to support that hydrocorals, not their microalgal symbionts, synthesize the compounds responsible for the pharmacological and toxicological activities elicited by *M. alcicornis* and *M. complanata* aqueous extracts. Although the biochemical bases of the interaction between zooxanthellae and their hydrocoral hosts remain to be elucidated, our results suggest that, in some way, *Millepora* species maintain the ability to produce their toxins for defense and feeding, even in the absence of the

important nutrients provided by the symbiotic algae. Evidently, further investigations are required to fully understand the significance of symbiotic algae to the cnidarian host beyond the nutritional role of photosynthesis.

Acknowledgements

This work was supported by Grant SEP-2004-C01-47432 to A. Rojas from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). A. García-Arredondo acknowledges a scholarship from CONACYT. The authors thank Claudia Morera and Florencia Colombo (Unidad Académica Puerto Morelos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM) for the collection of *M. complanata* and *M. alcicornis* specimens, and Reynaldo Pless, Ph.D. for proof reading the paper. [ST]

References

- Ali, S.A., Stoeva, S., Schütz, J., Rakez, K., Abassi, A., Zaidi, Z.H., Voelter, W., 1998. Purification and primary structure of low molecular mass peptides from scorpion (*Buthus indicus*) venom. *Comp. Biochem. Physiol. C* 121, 323–332.
- Anderluh, G., Macek, P., 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria). *Toxicon* 40, 111–124.
- Asari, T., Nakamura, H., Murai, A., Kan, Y., 1993. Structures of periodate oxidation products with a conjugated diene or an exomethylene from zooxanthellatoxin-A. *Tetrahedron Lett.* 34, 4059–4062.
- Baird, A.H., Marshall, P.A., 2002. Mortality, growth and reproduction in scleractinian corals following bleaching on the Great Barrier Reef. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 237, 133–141.
- Banaszak, A.T., Ayala-Schiaffino, N., Rodríguez-Román, A., Enríquez, S., Iglesias-Prieto, R., 2003. Response of *Millepora alcicornis* (Milleporina: Milleporidae) to two bleaching events at Puerto Morelos reef, Mexican Caribbean. *Rev. Biol. Trop.* 51, 57–66.
- Bianchini, G., Lotti, T., Campolmi, P., Casigliani, R., Panconesi, E., 1988. Coral ulcer as a vasculitis. *Int. J. Dermatol.* 27, 506–507.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R., 2004. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 21, 1–49.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R., 2005. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 22, 15–61.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R., 2006. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 23, 26–78.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.P., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R., 2007. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 24, 31–86.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brown, B.E., 1997. Coral bleaching, causes and consequences. *Coral Reefs* 16, 129–138.
- Doley, R., Mukherjee, K., 2003. Purification and characterization of an anticoagulant phospholipase A₂ from Indian monocled cobra (*Naja kaouthia*) venom. *Toxicon* 41, 81–91.
- Douglas, A.E., 2003. Coral bleaching: how and why? *Mar. Pollut. Bull.* 46, 385–392.
- Fenical, W., 2003. D. John Faulkner (1942–2002): marine natural products chemistry and marine chemical ecology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42, 1438–1439.
- Fukatsu, T., Onodera, K., Ohta, Y., Oba, Y., Nakamura, H., Shintani, T., Yoshioka, Y., Okamoto, T., Ten Lohuis, M., Miller, D.J., Kawachi, M., Ojika, M., 2007. Zooxanthellamide D, a polyhydroxy polyene amide from a marine dinoflagellate, and chemotaxonomic perspective of the *Symbiodinium* polyols. *J. Nat. Prod.* 3, 407–411.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, A.J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, A.J., Caldeira, K., 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* 318, 1737–1742.
- Ibarra-Alvarado, C., García, J.A., Aguilar, M.B., Rojas, A., Falcón, A., Heimer de la Cotera, E.P., 2007. Biochemical and pharmacological characterizations obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 511–518.
- Jones, R., 2004. Testing the 'photoinhibition' model of coral bleaching using chemical inhibitors. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 284, 133–145.
- Kobayashi, J., Tsuda, M., 2004. Amphidinolides, bioactive macrolides from symbiotic marine dinoflagellates. *Nat. Prod. Rep.* 21, 77–93.
- Lewis, J.B., 2006. Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Adv. Mar. Biol.* 50, 1–55.
- Messerli, S.M., Greenberg, R.M., 2006. Cnidarian toxins acting on voltage-gated ion channels. *Mar. Drugs* 4, 70–81.
- Middlebrook, R., Wittle, L., Scura, E., Lane, C., 1971. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. *Toxicon* 9, 333–336.
- Nakamura, H., Asari, T., Ohizumi, Y., Kobayashi, J., Yamasu, T., Murai, A., 1993. Isolation of zooxanthellatoxins, novel vasoconstrictive substances from the zooxanthella *Symbiodinium* sp. *Toxicon* 31, 371–376.
- Nevalainen, T.J., Peuravuori, H.J., Quinn, R.J., Llewellyn, L.E., Benzie, J.A.H., Fenner, P.J., Winkel, K.D., 2004. Phospholipase A₂ in Cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 731–735.
- Onodera, K., Nakamura, H., Oba, Y., Ojika, M., 2004. Zooxanthellamide B, a novel large polyhydroxy metabolite from a marine dinoflagellate of *Symbiodinium* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 955–958.

- Onodera, K., Nakamura, H., Oba, Y., Ohizumi, Y., Ojika, M., 2005. Zootoxanthellamide Cs: vasoconstrictive polyhydroxylated macrolides with the largest lactone ring size from a marine dinoflagellate of *Symbiodinium* sp. J. Am. Chem. Soc. 127, 10406–10411.
- Prasad, G.V., Vincent, L., Hamilton, R., Lim, K., 2006. Minimal change disease in association with fire coral (*Millepora* species) exposure. Am. J. Kidney Dis. 47, 15–16.
- Radwan, F.F.Y., 2002. Comparative toxinological and immunological studies on the nematocyst venoms of the Red Sea fire corals *Millepora dichotoma* and *M. platyphylla*. Comp. Biochem. Physiol. C 131, 323–334.
- Radwan, F.F., Aboul-Dahab, H.M., 2004. Milleporin-1, a new phospholipase A2 active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocysts. Comp. Biochem. Physiol. C 139, 267–272.
- Rojas, A., Torres, M., Rojas, J.I., Feregrino, A., Heimer de la Cotera, E., 2002. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. Toxicon 40, 777–785.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., Zilber-Rosenberg, I., 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. Nat. Rev. Microbiol. 5, 355–362.
- Rottini, G., Dobrina, A., Forgiarini, O., Nardon, E., Amirante, G.A., Patriarca, P., 1990. Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. Infect. Immun. 58, 3751–3758.
- Sagi, A., Rosenberg, L., Ben-Meir, P., Hauben, D.J., 1987. The “fire coral” (*Millepora dichotoma*) as a cause of burns: a case report. Burns Incl. Therm. Inj. 13, 325–326.
- Schägger, H., Von-Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166, 368–379.
- Sommaruga, R., Whitehead, K., Shick, J.M., Lobban, C.S., 2006. Mycosporine-like amino acids in the zooxanthella-ciliate symbiosis *Maristentor dinoflerus*. Protist 157, 185–191.
- Suzuki, M., Watanabe, K., Fujiwara, S., Kurasawa, T., Wakabayashi, T., Tsuzuki, M., Iguchi, K., Yamori, T., 2003. Isolation of peridinin-related norcarotenoids with cell growth-inhibitory activity from the cultured dinoflagellate of *Symbiodinium* sp., a symbiont of the Okinawan soft coral *Clavularia viridis*, and analysis of fatty acids of the dinoflagellate. Chem. Pharm. Bull. 51, 724–727.
- Szmant, A.M., Gassman, N.J., 1990. The effects of prolonged ‘bleaching’ on the tissue biomass and reproduction of the reef coral *Montastrea annularis*. Coral Reefs 8, 217–224.
- Tsunematsu, Y., Ohno, O., Konishi, K., Yamada, K., Suganuma, M., Uemura, D., 2009. Symbiospirols: novel long carbon-chain compounds isolated from symbiotic marine dinoflagellate *Symbiodinium* sp. Org. Lett. 11, 2153–2156.
- Venn, A.A., Loram, J.E., Douglas, A.E., 2008. Photosynthetic symbioses in animals. J. Exp. Bot. 59, 1069–1080.
- Wittle, L.W., Wheeler, C.A., 1974. Toxic and immunological properties of stinging coral toxin. Toxicon 12, 487–493.
- Wittle, L.W., Middlebrook, R., Lane, C., 1971. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicornis*. Toxicon 9, 327–331.
- Wittle, L.W., Scura, E.D., Middlebrook, R.E., 1974. Stinging coral (*Millepora tenera*) toxin: a comparison of the crude extracts with isolated nematocyst extracts. Toxicon 12, 481–486.
- Yellowless, D., Rees, T.A., Leggat, W., 2008. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. Plant Cell Environ. 31, 679–694.

**Structure of nematocysts isolated from the “fire corals” *Millepora
alcicornis* and *Millepora complanata* (Cnidaria: Hydrozoa)**

*Alejandro García-Arredondo^{1,2}, Alejandra Rojas¹, Roberto Iglesias-Prieto³,
Armando Zepeda-Rodríguez⁴, Lourdes Palma-Tirado⁵.*

¹*Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales,
Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario,
Querétaro 76010, Mexico*

²*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de
México, Mexico City, D.F. 04510, Mexico*

³*Unidad Académica Puerto Morelos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Cancún 77500, Mexico*

⁴*Departamento de Fisiología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad
Nacional Autónoma de México, Mexico City, D.F. 04510, Mexico*

⁵*Unidad de Microscopía, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional
Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro 76230, Mexico*

Abstract

Structural characteristics of discharged and undischarged nematocysts from the hydrozoans *Millepora alcicornis* and *Millepora complanata*, two “fire corals” collected in the Mexican Caribbean, were examined using light microscopy, as well as scanning and transmission electron microscopy. In this study, we report for the first time images of the nematocysts found in these Mexican Caribbean venomous species. Two types of nematocysts were observed in both species, the most abundant type was identified as macrobasic mastigophore and the other one belonged to the stenotele type. Macrobasic mastigophores were present in medium and large size classes and stenoteles were present in only one size.

Key words

Hydrocoral, Nematocysts, Microscopy images, Macrobasic mastigophore, Stenotele.

Conflicts of interest

There is no conflict

Financial source

This work was supported by Grant CB-2009-01 (Project 133785) to A. Rojas from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Correspondence to

Alejandro García Arredondo, Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Cerro de las Campanas, Col.

Centro, C.P. 76010, Querétaro, Qro., México. Phone: +52 442 1921200, ext. 5527.
Email: alejandro44g@prodigy.net.mx.

Introduction

Hydrozoan cnidarians of the genus *Millepora* are commonly named “fire corals” since contact with them immediately causes burning pain, erythema and pustule formation on human skin (1, 2, 3). The capacity of these hydrocorals to induce their damaging effects is due to the presence of nematocysts, the characteristic stinging organelles used by all cnidarians for capturing prey and defense (4). Several studies have shown that the venom contained in the nematocysts from *Millepora* species display lethal, hemolytic, dermonecrotic, and antigenic properties (5, 6, 7, 8, 9, 10).

Each nematocyst is contained in a cnidocyte (nematocyte), the specialized cnidarian cell that gave its name to the phylum Cnidaria. The nematocyst structure consists of a globular or egg-shape capsule, made up mainly of mini-collagens and the glycoprotein NOWA, which has an apical aperture closed by a cover (operculum) and an inverted long spiny tubule inside (11). The nematocyst capsule wall resists an extreme intra-capsular pressure of 150 bar (12), and upon receipt of an appropriate mechanical and/or chemical stimulus (13) the internal pressure is released. This causes the eversion of the spiny tubule through the operculum and injects the venom into the prey. The mechanism of discharge of the nematocyst is a very fast explosive event, that occurs over a period of less than 3 milliseconds. For this reason, this mechanism is considered one of the fastest processes in biology (14). Moreover, on account of their intricate structure, nematocysts were considered by Mariscal (15) as one of the most complex intracellular secretion products known.

Nematocysts are of varying morphology, the most widely-used classification is derived from the work of Weill (16,17). To date, more than 30 particular types of nematocysts have been identified based on Weill's work (15, 18), which consisted in observations under the light microscope, primarily of the discharged tubule and

its spine pattern. Nematocyst morphology is potentially of taxonomic importance. For example, of the 25 types recognized by Mariscal (15), 17 occur exclusively in Hydrozoa, and two occur exclusively in Anthozoa. The morphology and dimensions of the nematocysts are now considered essential to any taxonomic description or redescription of a cnidarian species (18). Furthermore, the appearance of the inverted tubule, coiled inside the capsule, also constitutes a distinct diagnostic characteristic (19). At present, very little is known about the nematocysts found in the Caribbean *Millepora* species. Therefore, using different techniques of microscopy, the present study was undertaken to identify, examine and compare the structure of the nematocysts isolated from two hydrocorals collected in the Mexican Caribbean: *Millepora complanata*, plate-like fire coral (Fig 1a); and *Millepora alcicornis*, branching fire coral (Fig 1b).

2. Material and methods

2.1. Specimen collection and isolation of nematocysts

Fragments of *M. complanata* and *M. alcicornis* were collected by SCUBA diving from depths of 4 - 10 m in the area known as “La Bocana Chica”, located within the Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos (Quintana Roo, México), in November 2008. Fragments were frozen immediately after collection and stored at -70 °C.

Nematocysts were released from the calcareous exoskeleton as described by Radwan (9) as follows: hydrocoral fragments were stirred in acidic saline solution (0.02 M HCl in 0.15 M NaCl; pH 7) for 24 h at 4 °C. Afterward, exoskeletons fragments were removed and the resultant suspension was filtered using a metal screen (0.5 mm pore size). The filtrate was centrifuged for 2 min at 200 rpm (5 x g), and the supernatant obtained was removed by pipette and discarded. The pellet, containing a mixture of nematocysts and zooxanthellae, was placed in fresh filtered sea water and re-centrifuged for 2 min at 200 rpm. The supernatant obtained was removed and discarded. This process was repeated one more time and the resulting pellet was used for microscopic examination.

2.2. Microscopic examination

Pellets containing nematocysts were first observed directly through light microscopy (LM). For more detailed observations, pellets were studied by scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM). For TEM and SEM examinations, pellets containing nematocysts were fixed in filtered sea water containing 3% glutaraldehyde and 0.1 M of sodium cacodylate, postfixed in 2% OsO₄ in cacodylate buffer, and dehydrated in a series of ethanols. For TEM examinations, pellets were embedded in Epon (epoxic resin), the blocks obtained were thin sectioned (60 nm) in an ultramicrotome (Mtx RMC) and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. These sections were observed in an electron microscope (JEOL JEM 1010) operated at 80 kV. For SEM examination, the nematocysts were dried in a critical-point-dryer apparatus (Polaron E5000), covered with carbon in an evaporator (JEOLI JEE4X) and with a thin sheet of gold in an ion sputterer (Polaron 11-HD), and finally observed with a scanning electron microscope (Zeiss DMS 950) at an accelerating voltage of 20–25 kV.

3. Results and discussion

In this study, two types of nematocysts were observed in both Caribbean *Millepora* species. These nematocysts were identified as stenoteles and macrobasic mastigosphores according to Weill's classification (16, 17). Measurements of the capsule size of the nematocysts, made from the SEM photographs, showed that in both species the macrobasic mastigosphores were present in medium (10.6 – 13.0 x 18.1 – 21.6 µm) and large (17.5 – 21.8 x 25.0 – 33.1 µm) size classes, while stenoteles were present in only one size (10.5 – 15.6 x 18.7 – 25.0 µm).

Stenoteles are penetrating nematocysts limited to the class Hydrozoa and are especially found in hydras (20, 21). In this study, we found the presence of few stenoteles in both *Millepora* species. Calder (22) reported that the gastrozooids of *M. alcicornis*, collected in Bermuda, contained stenoteles of small (5.7 – 6.6 x 8.3 –

8.9 μm), medium (12.9 – 14.2 x 15.9 – 17.6 μm) and large (15.9 – 18.7 x 21.6 – 24.7 μm) sizes, whereas the dactylozooids only contained small sizes (5.9 – 6.5 x 8.3 – 8.6 μm). The capsule of the undischarged form of this nematocyst type has a characteristic lime-shape with pointed ends (Fig 1a,b), one of this ends consists of an aperture closed by a cover named operculum, the operculum diameter is of approximately 4.5 μm and the other extreme has a diameter of 2 μm approximately (Fig 1b). The structure of the discharged form of the stenoteles presents an everted broad shaft with a diameter of about 5.5 μm , and slightly wider at its base. The basal part of the shaft is unarmed, but at the distal part there are three large spines (named stylets) followed by a short contracted section armed with three helically coiled bands of spines and a thin tubule posterior to the shaft (Fig 2c-e). The LM image of the undischarged form of this nematocyst type showed the inverted shaft as a straight shape, folded back within the capsule, with the styletes and the small spines pointing away from the operculum (Fig 2a). Fig 2f is a TEM image of an undischarged stenotele at the level of the stylets, close to the operculum, showing the inverted shaft in the center of the capsule.

The most abundant nematocyst type found in both *Millepora* species was the macrobasic mastigophore. The structure of the undischarged form consists of an egg-shape capsule with an inverted tubule coiled without an orderly arrangement, which can be observed in the LM photographs (Fig 3a). The operculum, located in the apical part of the capsule, has a diameter of approximately 2.5 μm in both large and medium size classes (Fig 3b). In the discharged form of this nematocyst type one observes that the everted tubule is armed with three helically-coiled bands of spines extended throughout the length of the tubule (Fig 3c-f). Fig 3e shows a macrobasic mastigophore with the everted tubule completely extended; this tubule has a diameter of 1.6 μm while the shaft, an enlarged portion in the middle of the tubule, has a diameter of 2.3 μm . Interestingly, Grajales and Sánchez (23) found in SEM images a discharged macrobasic mastigophore of *M. alcicornis* from the Colombian Caribbean with a bifurcated end of the tubule. However, in the present study we did not find any nematocysts with this characteristic. In TEM images of the undischarged form (Fig 4), the arrangement of spines on the inverted shaft

shows a threefold symmetry; portions of the inverted tubule are seen in these images.

Measurements on TEM photographs show that the thickness of the stenotele capsule wall is about 1 μm , whereas the macrobasic mastigophores has a thickness of 1.5 μm approximately. In these TEM images one can distinguish two layers in the capsule wall of both nematocyst types, a darker inner layer and an outer layer. It has been described previously that the nematocyst capsule wall is composed of two distinct layers, glycoprotein NOWA is associated with the outer layer whereas the inner layer is thought to be a dense and elastic layer composed mainly of mini-collagen (24).

The macrobasic mastigophore is a nematocyst type found exclusively in *Millepora* species and actually constitutes one reason for placing them in a separate suborder (21). In this study, we found that this type of nematocyst is the most abundant in the Caribbean species *M. alcicornis* and *M. complanata*. Radwan (9) observed that *M. dichotoma* and *M. platyphylla*, both species collected in the Red Sea, also present this type of nematocyst in a greater proportion than stenoteles. Although it has been reported that macrobasic mastigophores as well as stenoteles are capable of penetrating the human skin (7, 1), the results obtained in this study suggest that the characteristic toxicity of the “fire corals” is mainly caused by the toxins contained in the macrobasic mastigophores, especially if one considers that other hydroids that contain stenoteles are not toxic to humans.

Acknowledgements

A. *García-Arredondo* acknowledges a scholarship from CONACYT. The authors thank: Claudia Moreira and Florencia Colombo (Unidad Académica Puerto Morelos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM) for collection of *M. complanata* and *M. alcicornis* specimens; Francisco Pasos Nájera (Departamento de Fisiología Celular y Tisular, UNAM) for his assistance in the SEM studies; Reynaldo Pless, Ph.D. for valuable suggestions during the writing process of the

paper; and Edgar P. Heimer de la Cotera (Instituto de Neurobiología, UNAM) for his valuable comments and ideas.

References

1. Sagi A, Rosenberg L, Ben-Meir P, Hauben DJ. The "fire coral" (*Millepora dichotoma*) as a cause of burns: a case report. *Burns Incl. Therm. Inj.* 1987; 13:325-326.
2. Bianchini G, Lotti T, Campolmi P, Casigliani R, Panconesi E. Coral ulcer as a vasculitis. *Int. J. Dermatol.* 1988; 27:506-507.
3. Prasad R, Vincent L, Hamilton R, Lim K. Minimal change disease in association with fire coral (*Millepora* species) exposure. *Am. J. Kidney Dis.* 2005; 47:E15-E16.
4. Tardent P. The cnidarian cnidocyte, a high-tech cellular weaponry. *Bioessays* 1995; 17:351-362.
5. Wittle LW, Middlebrook R, Lane C. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicornis*. *Toxicon* 1971; 9:327-331.
6. Middlebrook RE, Wittle LW, Scura ED, Lane CE. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. *Toxicon* 1971; 9:333-336.
7. Wittle LW, Scura ED, Middlebrook RE. Stinging coral (*Millepora tenera*) toxin: a comparison of the crude extracts with isolated nematocyst extracts. *Toxicon* 1974; 12:481-486.
8. Wittle LW, Wheeler CA. Toxic and immunological properties of stinging coral toxin. *Toxicon* 1974; 12:1487-493.
9. Radwan FFY. Comparative toxinological and immunological studies on the nematocyst venoms of the Red Sea fire corals *Millepora dichotoma* and *M. platyphylla*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 2002; 131:323-334.
10. Ibarra-Alvarado C, García JA, Aguilar MB, Rojas A, Falcón A, Heimer de la Cotera EP. Biochemical and pharmacological characterizations obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007; C146:511-518.

11. Meier S, Jensen PR, Adamczyk P, Bächinger HP, Holstein TW, Engel J, et al. Sequence-structure and structure-function analysis in cysteine-rich domains forming the ultrastable nematocyst wall. *J. Mol. Biol.* 2007; 368:718-728.
12. Weber J. Poly(γ -glutamic acid)s are the major constituents of nematocysts in hydra (Hydrozoa, Cnidaria). *J. Biol. Chem.* 1990; 265:9664-9669.
13. Anderson PAV, Bouchard C. Regulation of cnidocyte discharge. *Toxicon* 2009; 54:1046-1053.
14. Holstein T, Tardent P. An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. *Science* 1984; 223:830-833.
15. Mariscal RN. Nematocysts. In: Muscatine L, Lenhoff HM, editors. *Coelenterate biology: Reviews and new perspectives*. Academic Press, New York and other cities; 1974. pp 129-178.
16. Weill, R. Contribution a l'étude des cnidaires et de leurs nématocystes I. Recherches sur les nématocystes. *Travaux de la Station Zoologique de Wimereux* 1934; 10:1-347.
17. Weill, R. Contribution a l'étude des cnidaires et de leurs nématocystes II. Valeur taxonomique du cnidome. *Travaux de la Station Zoologique de Wimereux* 1934; 11:348-700.
18. Östman C. A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Sci. Mar.* 2000; 64:31-46.
19. Cutress CE. An interpretation of the structure and distribution of Cnidaria in Anthozoa. *Syst. Zool.* 1955; 4:120-137.
20. Östman C, Aquirre A, Mydral M, Nyvall P, Lindström J, Bjöklund M. Nematocysts in *Tubularia larynx* (Cnidaria, Hydrozoa) from Scandinavia and the northern coast of Spain. *Sci. Mar.* 1995; 59:165-179.
21. Lewis JB. Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Adv. Mar. Biol.* 2006; 50:1-55.
22. Calder DR. Shallow-water hydroids of Bermuda: The Athecate. *Royal Ontario Museum Life Sciences Contributions* 1988; 148:1-107.
23. Grajales A, Sánchez JA. Discharged nematocysts of *Millepora alcicornis*. *Coral Reefs* 2006; 25:671.

24. Özbek S, Pokidysheva E, Schwager M, Schulthess T, Tariq N, Barth D, et al. The glycoprotein NOWA and minicollagens are part of a disulfide-linked polymer that forms the cnidarian nematocyst wall. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:52016-52023.

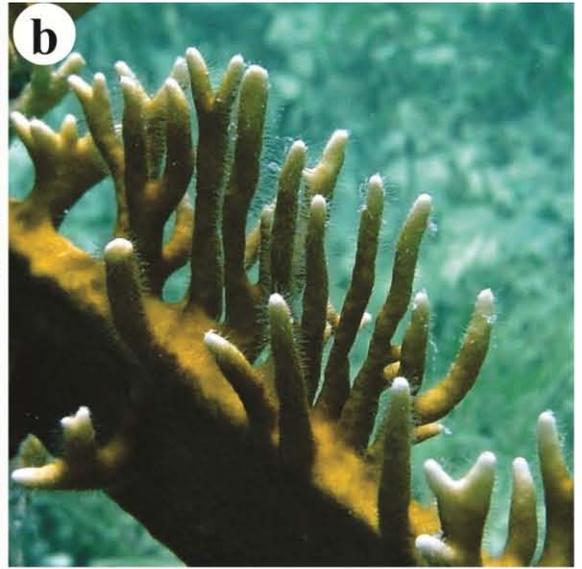
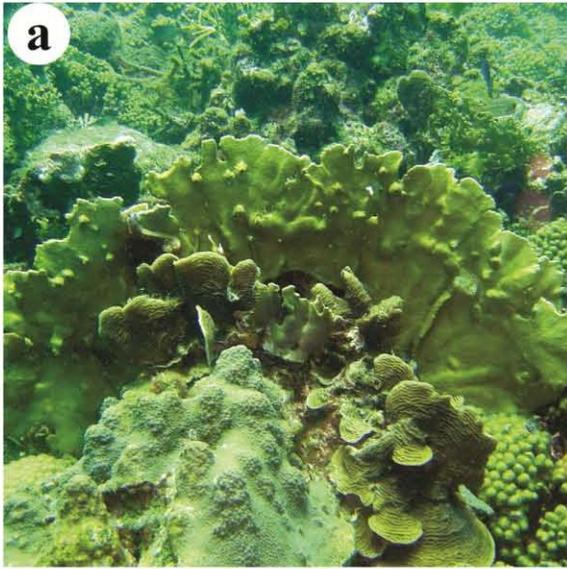
Figure captions

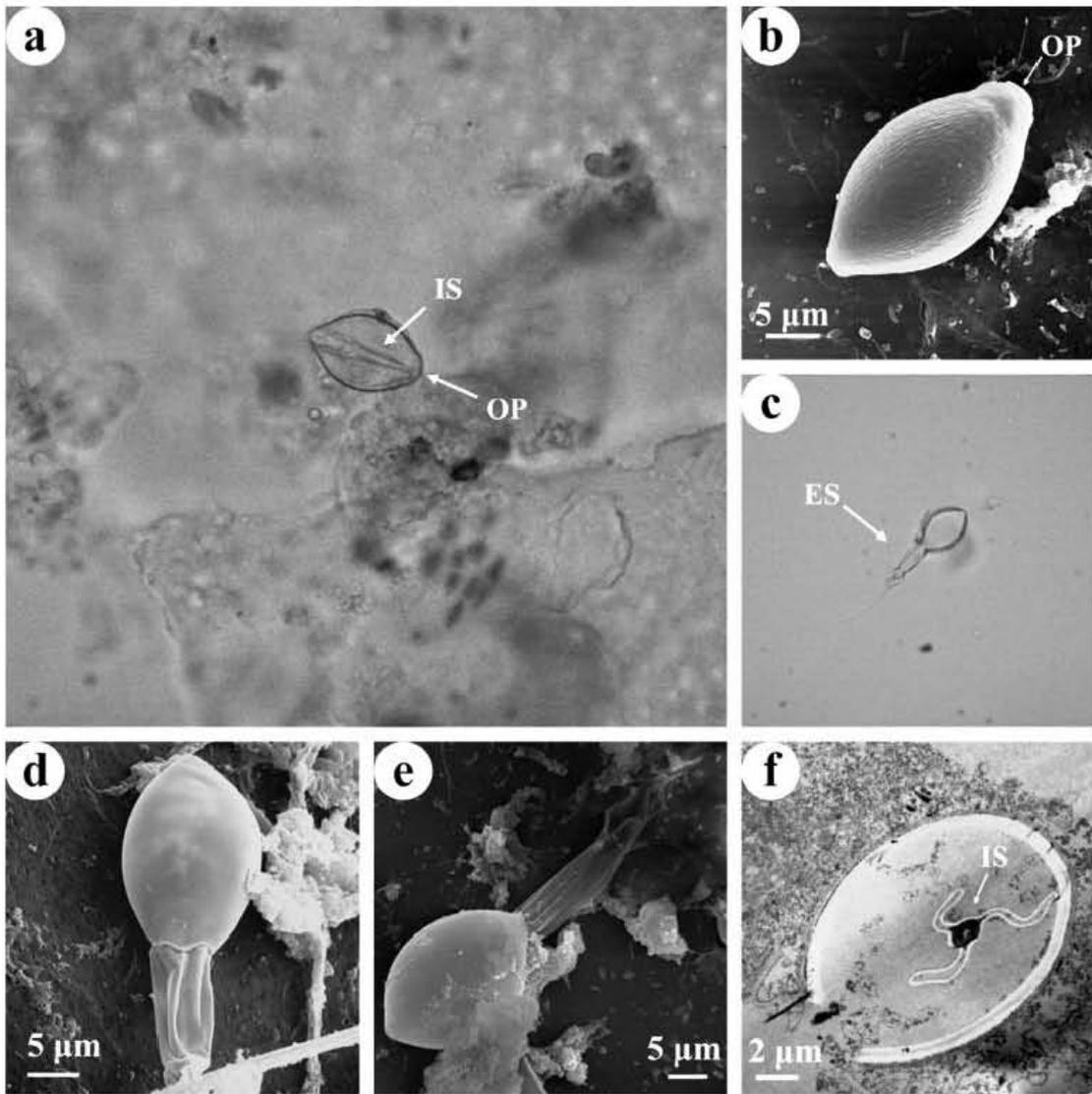
Fig. 1 Underwater images of the two Mexican Caribbean “fire corals”: a) *Millepora complanata* and b) *Millepora alcicornis*.

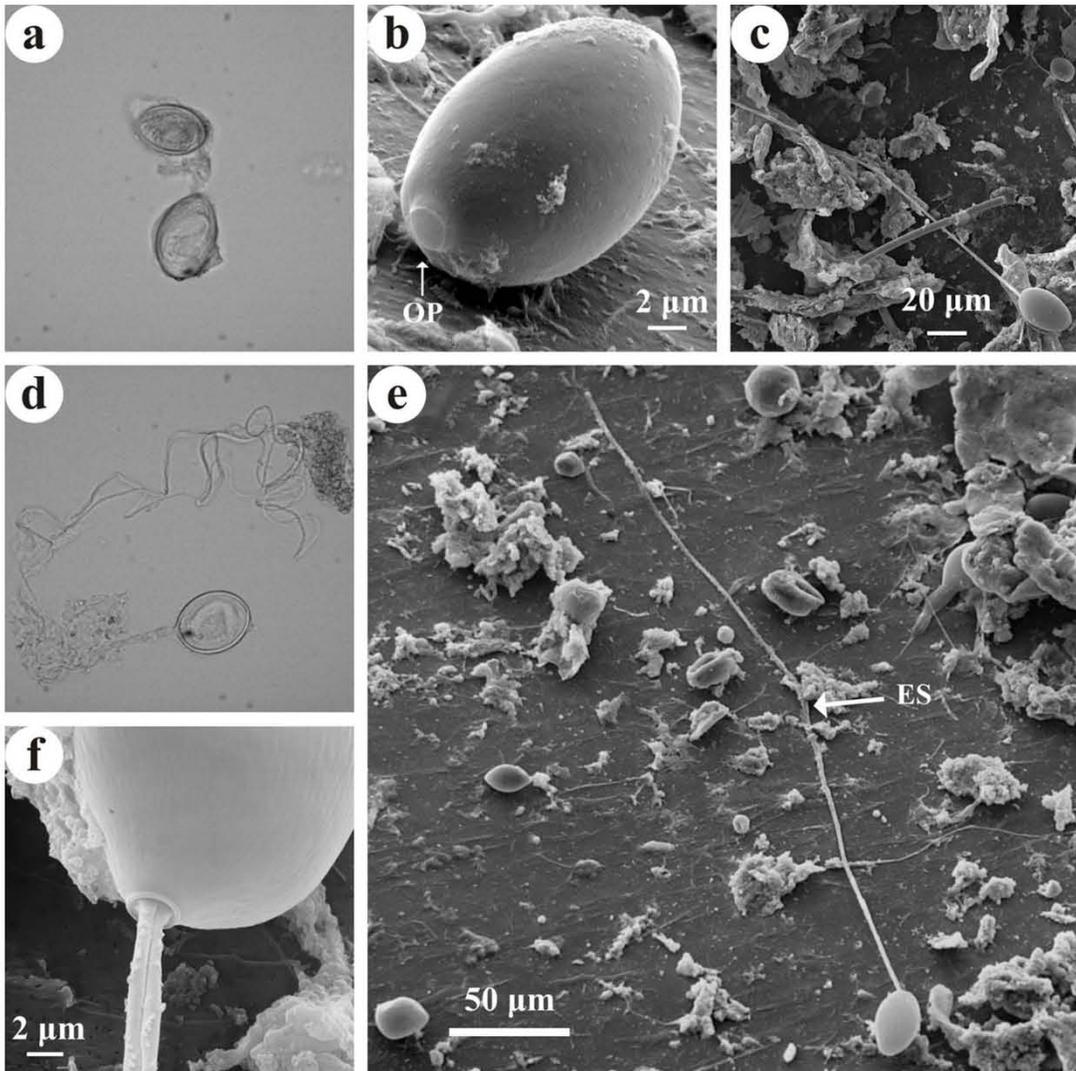
Fig. 2 a) LM image of an undischarged stenotele isolated from *Millepora complanata* showing the operculum (OP) and the inverted shaft (IS), magnification 400 x. b) SEM image of an undischarged stenotele isolated from *M. alcicornis*. c) LM image of a discharged stenotele isolated from *M. complanata*, showing the everted shaft (ES), magnification 400 x. d) SEM image of a discharged stenotele isolated from *M. alcicornis*. e) SEM image of a discharged stenotele isolated from *M. complanata*. f) TEM image of an undischarged stenotele isolated from *M. complanata* through the stylets section of the IS.

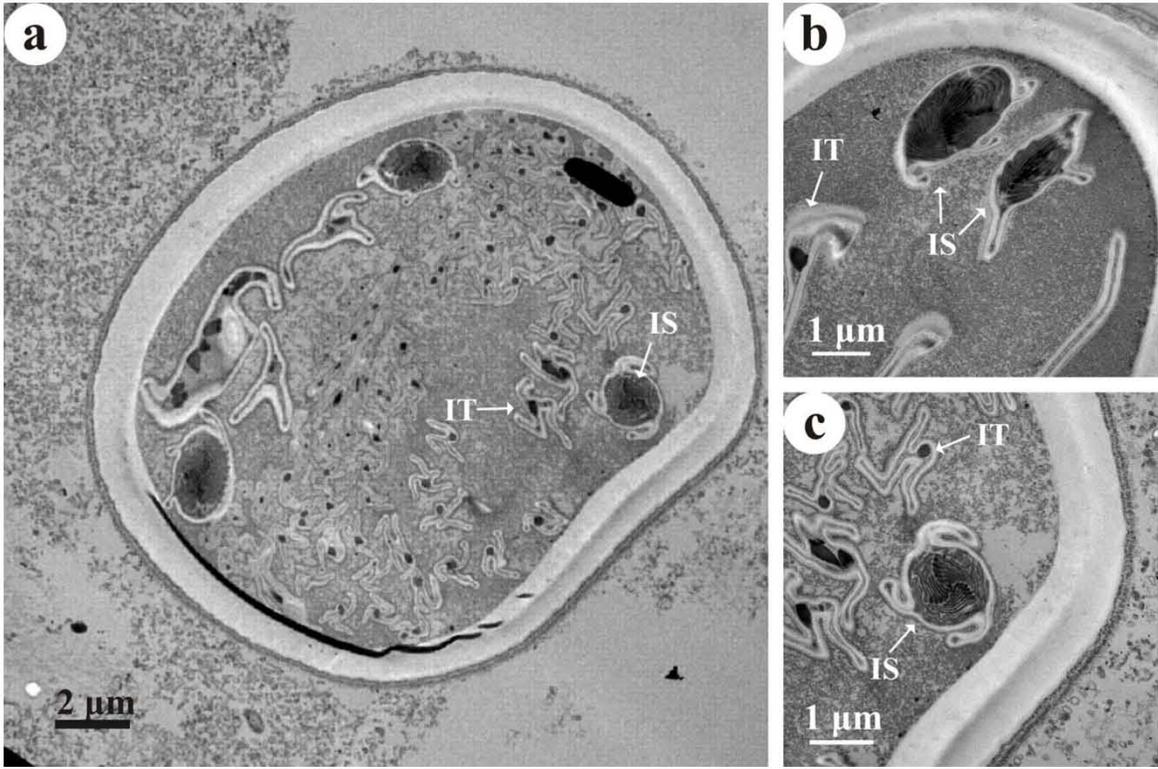
Fig. 3 a) LM image showing two undischarged macrobasic mastigophores isolated from *Millepora alcicornis*, magnification 400 x. b) SEM image of an undischarged macrobasic mastigophore isolated from *M. complanata*, showing the operculum (OP). c) SEM image of a discharged macrobasic mastigophore isolated from *M. complanata*. d) LM image of a discharged macrobasic mastigophore of *M. complanata*, magnification 400 x. e) SEM image of a discharged macrobasic mastigophore isolated from *M. alcicornis* showing the everted tubule completely extended, the everted shaft (ES) is located at the middle of the tubule. F) SEM image of a discharged macrobasic mastigophore of *M. alcicornis* showing the spines of the everted tubule.

Fig. 4 TEM images of undischarged macrobasic mastigophores isolated from *Millepora alcicornis*. a) Transversal section showing portions of the inverted shaft (IS) and the inverted tubule (IT). b) Detail of the inverted shaft showing the threefold symmetry. c) Detail showing the thickness of capsule.









ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------|---|
| ALT | Alanina aminotransferasa |
| AST | Aspartato aminotransferasa |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| CE₅₀ | Concentración efectiva media |
| COSY | Espectro de resonancia magnética bidimensional homonuclear |
| ¹³C RMN | Resonancia magnética nuclear de carbono 13 |
| DEPT | Incremento sin distorsión por transferencia de polarización |
| DL₅₀ | Dosis letal media |
| E_{max} | Efecto máximo |
| FPLC | Fast protein liquid chromatography |
| HMBC | Correlación de múltiple enlace heteronuclear |
| HMQC | Correlación cuántica múltiple heteronuclear |
| HPLC | Cromatografía de líquidos de alta |
| ¹H RMN | Resonancia magnética nuclear protónica |
| HSQC | Correlación cuántica simple heteronuclear |
| i.d. | Intradérmica |
| i.v. | Intravenosa |
| NADPH | Nicotina adenina difosfato reducido |
| NOESY | Espectroscopía nuclear efecto Overhauser de dos dimensiones |
| MEB | Microscopía electrónica de barrido |
| MET | Microscopía electrónica de transmisión |
| ML | Microscopía de luz |
| PLA₂ | Fosfolipasa A ₂ |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SDS-PAGE | Poliuacrilamida-dodecilsulfato de sodio bajo condiciones reductoras |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| TMS | Tetrametilsilano |
| UH₅₀ | Unidad hemolítica media |