



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
QUÍMICA ACUÁTICA**

**EFFECTOS FARMACOLÓGICOS Y TOXINOLÓGICOS DEL EXTRACTO ACUOSO  
DE *Millepora alcicornis* Y PURIFICACIÓN PARCIAL E IDENTIFICACIÓN DE  
CITOLISINAS Y TOXINAS QUE MODULAN LA CONTRACTILIDAD INTESTINAL**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**PRESENTA:  
ROSALINA HERNÁNDEZ MATEHUALA**

**TUTOR PRINCIPAL  
DRA. ALEJANDRA ROJAS MOLINA  
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ. UNIDAD ACADÉMICA PUERTO MORELOS (UNAM)  
DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ. INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)  
DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES. UNIDAD ACADÉMICA SISAL (UNAM)  
DR. HÉCTOR S. SUMANO LÓPEZ. FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
(UNAM)**

**MÉXICO, D. F. JUNIO 2016**



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.



*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología*

Universidad Nacional Autónoma de México



**“EFECTOS FARMACOLÓGICOS Y TOXINOLÓGICOS DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Millepora alcicornis* Y PURIFICACIÓN PARCIAL E IDENTIFICACIÓN DE CITOLISINAS Y TOXINAS QUE MODULAN LA CONTRACTILIDAD INTESTINAL”**

**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**

**M. en C. ROSALINA HERNÁNDEZ MATEHUALA**

**Director de tesis: DRA. ALEJANDRA ROJAS MOLINA**

**Comité tutorial: DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ  
DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ  
DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES  
DR. HÉCTOR SUMANO LÓPEZ**

**México, D. F. 2016**

# ÍNDICE GENERAL

<b>Tema</b>	<b>Página</b>
Índice general	i
Índice de figuras	v
Índice de tablas	vii
Resumen	
1 Introducción	1
2 Antecedentes	3
2.1 Generalidades del Phylum Cnidaria	3
2.2 Ciclo de vida de los cnidarios	3
2.3 Simbiosis	4
2.4 Cnidocitos	5
2.5 Compuestos bioactivos de naturaleza no proteica producidos por organismos del Phylum Cnidaria	7
2.6 Toxinas peptídicas producidas por organismos del Phylum Cnidaria	9
2.6.1 Enzimas	9
2.6.1.1 Enzimas con actividad de fosfolipasa A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> )	9
2.6.1.2 Metaloproteasas	12
2.6.2 Toxinas formadoras de poros	12
2.6.2.1 Citolisinas de anémonas	12
2.6.2.2 Citolisinas de medusas y de otros cnidarios	13
2.6.2.2.1 Hidralisinas	14
2.6.2.2.2 Complejo de ataque a la membrana y perforina (MACPF)	14
2.6.3 Neurotoxinas de cnidarios	15
2.6.3.1 Toxinas que interaccionan con canales de sodio (NaTX)	15
2.6.3.2 Toxinas que interaccionan con canales de potasio (KTK) y péptidos de Kunitz	17
2.6.3.3 Toxinas que interaccionan con canales de calcio	18
2.6.3.4 Otras toxinas	18
2.7 Género <i>Millepora</i>	19

2.7.1	Generalidades del género <i>Millepora</i>	19
2.7.2	Efectos tóxicos y farmacológicos producidos por las especies del género <i>Millepora</i>	21
2.7.3	Estudios realizados en especies de <i>Millepora</i>	21
3	JUSTIFICACIÓN	25
4	HIPÓTESIS	26
5	OBJETIVOS	26
6	MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1	Recolección del hidrocoral, preparación del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i> y determinación de proteína	27
6.2	Efecto del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i> sobre el músculo liso intestinal y el sistema nervioso entérico	27
6.3	Caracterización toxinológica del extracto	28
6.3.1	Determinación de la dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) y análisis de la toxicidad sistémica <i>in vivo</i>	28
6.3.2	Estudios histopatológicos	28
6.3.3	Determinación de la letalidad en <i>Artemia salina</i>	29
6.4	Caracterización de la actividad hemolítica	29
6.4.1	Actividad hemolítica	29
6.4.2	Efecto de la temperatura en la actividad hemolítica	30
6.4.3	Efecto del pH en la actividad hemolítica	30
6.4.4	Efecto de diferentes cationes divalentes en la actividad hemolítica	30
6.4.5	Efecto de un inhibidor de la PLA <sub>2</sub> sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i>	30
6.5	Determinación de la actividad de PLA <sub>2</sub>	31
6.6	Determinación de la actividad proteolítica	31
6.7	Electroforesis en gel de poliacrilamida y zimografía	31
6.8	Análisis mediante microscopía de los efectos tóxicos que produce el extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i> sobre las membranas de eritrocitos de rata y tejidos de <i>A. salina</i>	32
6.9	Separación de toxinas que: i. Modulan la contracción del músculo liso intestinal y ii. Presentan actividad hemolítica	33
6.9.1	Análisis cromatográfico del extracto acuoso	33

6.10 Secuenciación parcial de las fracciones bioactivas	34
6.10.1 Análisis de la estructura primaria por degradación de Edman	34
6.10.2 Análisis de secuencias por espectrometría de masas	35
<b>7 RESULTADOS</b>	
7.1 Obtención del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i> y determinación de proteína	37
7.2 Efecto del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i> sobre el músculo liso intestinal y el sistema nervioso entérico	37
7.3 Caracterización toxinológica del extracto	38
7.3.1 Letalidad en ratones y toxicidad sistémica <i>in vivo</i>	38
7.3.2 Análisis histopatológico	39
7.3.3 Toxicidad en <i>Artemia salina</i>	41
7.4 Caracterización de la actividad hemolítica e identificación parcial de una hidralisina	41
7.4.1 Actividad hemolítica	41
7.4.2 Caracterización de la actividad hemolítica	42
7.5 Actividad de PLA <sub>2</sub>	45
7.6 Determinación del efecto proteolítico del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i>	45
7.7 Electroforesis SDS-PAGE, zimografía e identificación de una hidralisina de ~ 28 kDa	45
7.8 Análisis microscópico en <i>A. salina</i> y eritrocitos de rata	50
7.9 Separación parcial de toxinas que: i. Modulan la contracción del músculo liso intestinal y ii. Presentan actividad hemolítica	53
7.9.1 Fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso	53
7.9.2 Análisis electroforético de las fracciones MA1 y MA2	53
7.9.3 Evaluación biológica de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento del extracto acuoso	54
7.9.3.1 Evaluación de las fracciones MA1 y MA2 en el músculo liso intestinal	54
7.9.3.2 Evaluación de la actividad de PLA <sub>2</sub> y hemolítica de las fracciones MA1 y MA2	56
7.9.4 Análisis cromatográfico de las fracciones MA1 y MA2 por cromatografía de exclusión molecular	57
7.9.5 Evaluación farmacológica de las fracciones obtenidas a partir del	

análisis cromatográfico de las fracciones MA1 y MA2	59
7.9.5.1 Evaluación de las fracciones en el músculo liso intestinal	59
7.9.5.2 Evaluación de la actividad hemolítica de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico de las fracciones MA1 y MA2	60
7.9.6 Análisis cromatográfico en CLAR de las fracciones MA1-1 y MA2-1 que tienen un efecto excitatorio en el músculo liso intestinal	60
7.9.7 Evaluación biológica de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico en CLAR	64
7.9.7.1 Evaluación de las fracciones en el músculo liso intestinal	64
7.9.7.2 Actividad hemolítica de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico en CLAR	66
7.10 Transferencia electroquímica de las proteínas contenidas en las fracciones y análisis por degradación de Edman y espectrometría de masas	66
7.11 Secuenciación parcial de las fracciones bioactivas	68
7.11.1 Análisis de las fracciones MA2-2-6 y MA1-1-4 por degradación de Edman	68
7.11.2 Análisis de las fracciones MA1-1-7 y MA1-1-8 por espectrometría de masas	70
8 DISCUSIÓN	74
9 CONCLUSIONES	83
10 BIBLIOGRAFÍA	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	<i>M. alcicornis</i> mostrando los zooides extendidos	21
2	Efecto del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i> sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo	24
3	Efecto excitatorio producido por el extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i>	38
4	Micrografías de luz de secciones de tejidos después de la administración del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i> vía <i>i.v.</i>	40
5	Curvas concentración-respuesta de la actividad hemolítica producida por el extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i> sobre los eritrocitos de diferentes especies	41
6	Efecto del pH y la temperatura de incubación sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i>	43
7	Curvas concentración-respuesta, mostrando el efecto del inhibidor de PLA <sub>2</sub> <i>p</i> -BPB, sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i> y valores de UH <sub>50</sub> obtenidos al incubar el extracto acuoso en presencia del inhibidor <i>p</i> -BPB	45
8	Perfil electroforetico en condiciones no reductoras (mad) y reductoras (madr)	47
9	Alineamiento de secuencias de <i>M. alcicornis</i> que tienen homología con hidralisinas de <i>H. viridis</i> con el programa ClustalW2	50
10	Micrografía electrónica de barrido (SEM) mostrando el efecto del extracto sobre eritrocitos de rata	51
11	Micrografías mostrando el efecto del extracto sobre <i>A. salina</i>	52
12	Perfil cromatográfico obtenido a partir del fraccionamiento del extracto de <i>M. alcicornis</i> , al pasar por una columna de DEAE-celulosa	53
13	Gel de electroforesis del extracto de <i>M. alcicornis</i> y teñido con tinción de plata	54
14	Registro representativo del efecto de las fracciones a) MA1 y b) MA2 sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo a la	

	concentración de 2.98 µg/ml	55
15	Registro representativo del efecto de las fracciones desnaturalizadas a) MA1 y b) MA2 sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo	56
16	Perfil cromatográfico de la fracción MA1 en SEPHADEX G-15	57
17	Perfil cromatográfico de la fracción MA2 en SEPHADEX G-15	58
18	Efecto sobre las contracciones espontáneas del íleon, producido por las fracciones obtenidas en SEPHADEX a partir de la fracción MA1	60
19	Perfil cromatográfico de la fracción MA1-1 en C-4 y el efecto de las fracciones polar y menos polar sobre el íleon aislado de cobayo	61
20	Perfil cromatográfico de la fracción MA2-1 en C-4 y el efecto de las fracciones polar y menos polar sobre el íleon aislado de cobayo	62
21	Perfil cromatográfico de la fracción MA2-2 en C-4 y el efecto de las fracciones polar y menos polar sobre el íleon aislado de cobayo	63
22	Efecto sobre las contracciones espontáneas del íleon, en las fracciones obtenidas en la columna C-4, en CLAR a partir de la fracción MA1-1	64
23	Efecto inducido en el íleon por las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i>	65
24	Electransferencia 1	67
25	Electrotransferencia 2	67
26	Alineamiento múltiple de las secuencias 1 – 9 de <i>M. alcicornis</i> con la PCP de <i>M. dichotoma</i> y <i>S. pilosum</i>	72
27	Alineamiento de las secuencias 10 y 11 de <i>M. alcicornis</i> con <i>D. coronoides</i>	73

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Actividad hemolítica del extracto de <i>M. alcornis</i> en eritrocitos de varias especies	42
2	Efecto de cationes divalentes sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso de <i>M. alcornis</i> evaluado a la UH <sub>50</sub>	44
3	Efecto del EDTA sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso de <i>M. alcornis</i> evaluado a la UH <sub>50</sub>	44
4	Secuencias obtenidas del análisis por espectrometría de masas de bandas extraídas del gel de electroforesis y que por zimografía muestran actividad hemolítica	48
5	Concentración de proteína, rendimiento y peso del liofilizado de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico de las fracciones MA1 y MA2	58
6	Contenido de proteína determinado en las fracciones obtenidas al hacer pasar las fracciones por la columna C-4 en CLAR	63
7	Efecto hemolítico de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico de MA1-1 y MA2-1	66
8	Resultados obtenidos del análisis de los catorce ciclos de secuenciación por degradación de Edman y la secuencia obtenida en cada banda analizada	69
9	Resultados obtenidos del análisis de las secuencias consenso obtenidas de las bandas de MA1-1-4	70
10	Secuencias obtenidas del análisis por espectrometría de masas de la fracción MA1-1-8	71

## RESUMEN

*Millepora alcicornis* es un hidrocoral ramificado muy común en los arrecifes del Mar Caribe. Al igual que otros miembros de este género, esta especie es capaz de inducir lesiones semejantes a quemaduras que producen un severo dolor al contacto con la piel de los humanos.

En este estudio se determinó que las proteínas hemolíticas presentes en el extracto acuoso de *M. alcicornis* son citolisinas termolábiles, estables a cambios de pH, y esta actividad es dependiente de calcio. También encontramos que algunas de estas hemolisinas, detectadas en el extracto acuoso por zimografía, son proteínas que tienen pesos moleculares entre 28 y 30 kDa, con actividad de PLA<sub>2</sub>, y otras son proteínas de aproximadamente 200 kDa que no presentan actividad enzimática y posiblemente, actúan por un mecanismo de formación de poros en las membranas. Adicionalmente, se logró la identificación parcial de la estructura primaria de una hemolisina de aproximadamente 30 kDa que muestra homología con la familia de las hidralisinas. Además, se encontró que el extracto acuoso de este cnidario fue letal para los ratones (LD<sub>50</sub> = 17 µg proteína/g) e indujo daños en tejidos de pulmón, riñón e hígado, lo que resulta en una muerte lenta. Este efecto se pierde al incubar el extracto a una temperatura de ebullición. Las citolisinas de *M. alcicornis* también provocaron la disociación en los tejidos de *Artemia salina*, lo que probablemente es atribuido a los mecanismos de formación de poros de estas proteínas. Por otro lado, mediante un fraccionamiento cromatográfico biodirigido, utilizando cromatografía de intercambio iónico, exclusión y adsorción en fase reversa, se obtuvieron varias fracciones bioactivas: una de aproximadamente 40 kDa y otra con péptidos menores de 10 kDa, con actividad hemolítica y excitatoria en el íleon; así como una de aproximadamente 48 kDa con actividad excitatoria. Las proteínas de ~ 40 kDa mostraron homología con proteínas predichas de cnidarios con actividad desconocida. Algunos de los péptidos mostraron homología con la proteína PCP que se encuentra en el simbiote *Simbiodium pilosum*, y dos fragmentos mostraron homología con una toxina neurotóxica de *Drisdalya coronoides*. Estos resultados indican que en el extracto de este hidrocoral se encuentran presentes toxinas proteicas hemolíticas y moduladoras de la contractilidad intestinal que son termolábiles.

## ABSTRACT

*Millepora alcicornis* is a branching hydrocoral common throughout the Caribbean Sea. Like other members of this genus, this species is capable of inducing skin eruptions and blisters with severe pain after contact. In the present study, we found that the hemolytic proteins present in the aqueous extract of *M. alcicornis* are thermolabile cytolysins, stable to pH changes, and whose activity is calcium-dependent. We also found that some of these hemolysins detected in the aqueous extract by zymography, are proteins of approximately 28 – 30 kDa with PLA<sub>2</sub> activity and, proteins of approximately 200 kDa that do not elicit enzymatic activity and possibly act by a mechanism of membrane pore formation. Additionally, partial identification of the primary structure of a hemolysin of approximately 30 kDa showing homology with the family of hydralisins was achieved. It was also found that the aqueous extract of this cnidarian was lethal to mice (LD<sub>50</sub> = 17 µg protein/g), and induced kidney, liver, and lung damages, resulting in a slow death of mice. Under denaturing conditions, the aqueous extract completely lost its toxic activity. *M. alcicornis* cytolysins also provoked tissue dissociation in *Artemia salina* nauplii, which might be attributed to pore forming mechanisms. On the other hand, a bioassay-guided chromatographic analysis of the *M. alcicornis* aqueous extract, using ion exchange chromatography, exclusion, and reversed phase adsorption, led to the isolation of several bioactive fractions: one of them, of approximately 40 kDa and another with peptides with molecular weight less than 10 kDa, which induced hemolysis and excitatory activity in the guinea pig ileum. Another fraction, of approximately 48 kDa, only induced excitatory activity in the ileum. The ~ 40 kDa-proteins shared homology with cnidarian predicted proteins of unknown activity. Some peptides showed homology with the PCP protein found in *Simbiodium pilosum* and two fragments showed homology with a neurotoxic toxin of *Drisdalya coronoides*. These results indicate that the aqueous extract of *M. alcicornis* primarily contains thermolabile toxins with hemolytic activity, and some of them are able to modulate intestinal contractility.

# 1 INTRODUCCIÓN

Los hidrocorales del género *Millepora* son comúnmente conocidos como corales de fuego, debido a que al entrar en contacto con la piel de los humanos provocan lesiones parecidas a quemaduras (Camarasa *et al.* 1993; Tardent 1995; Lewis 2006); también se ha reportado que las toxinas de *Millepora* son capaces de producir efectos tóxicos sistémicos que incluyen daño renal y edema pulmonar (Prasad *et al.* 2006). Las especies de este género se encuentran entre los principales constructores de esqueletos de carbonato de calcio en los arrecifes de coral de todo el mundo y en el Caribe Mexicano abundan las especies *M. squarrosa*, *M. alcicornis* y *M. complanata* (Lewis 2006).

Las escasas investigaciones realizadas sobre especies del género *Millepora* han demostrado que sus toxinas presentan efectos letales en ratones y tienen actividad hemolítica y dermonecrótica (Middlebrook *et al.* 1971; Wittle *et al.* 1974; Wittle & Wheeler 1974; Radwan 2002; Radwan & Aboul-Dahab 2004). Una de las especies que ha sido estudiada por nuestro grupo de trabajo es *M. complanata*, cuyas toxinas producen un efecto excitatorio sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo y sobre el tono del músculo liso de aorta de rata (Rojas *et al.* 2002; Ibarra-Alvarado *et al.* 2007). El extracto acuoso preparado a partir de este hidrocoral también presenta actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y hemolítica (Ibarra-Alvarado *et al.* 2007). En estudios más recientes, llevados a cabo en nuestro laboratorio con *M. complanata* y *M. alcicornis*, en los que se evaluaron los efectos del blanqueamiento sobre las actividades hemolítica, vasoconstrictora y de PLA<sub>2</sub>, se encontró que las actividades hemolítica y de PLA<sub>2</sub> disminuyen, pero no desaparecen; de igual manera, la actividad vasoconstrictora tampoco se ve afectada, lo cual sugiere que la presencia y/o la ausencia de los simbiontes no afecta de manera significativa los efectos farmacológicos y toxicológicos inducidos por los extractos de estas especies (García-Arredondo *et al.* 2011).

En nuestro laboratorio también se han llevado a cabo otros estudios preliminares sobre *M. alcicornis*. Estos estudios han demostrado que el extracto acuoso de esta especie induce un efecto bifásico sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. La primera fase de este efecto comprende una inhibición inicial del tono y de la amplitud de las contracciones del músculo liso, mientras que la segunda fase incluye un aumento en el tono del íleon. También se encontró que al incubar el extracto a 50° C y 80° C el efecto inhibitorio se conservaba, pero el efecto excitatorio desaparecía. Estos resultados sugieren que *M. alcicornis* produce toxinas termolábiles, seguramente péptidos o proteínas, que provocan un efecto excitatorio en el íleon, así como también compuestos termoestables responsables del efecto inhibitorio.

Con el objeto de iniciar la separación de los compuestos responsables de los efectos farmacológicos observados, el extracto se sometió a un fraccionamiento cromatográfico, mediante FPLC, utilizando una columna de intercambio iónico, 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. Se obtuvieron dos fracciones y se evaluaron en el modelo de íleon. Los resultados mostraron que los compuestos contenidos en la fracción con menor tiempo de retención en la columna tenían un efecto inhibitorio sobre las contracciones espontáneas del íleon, y los compuestos presentes en la fracción con mayor tiempo de retención en la columna tenían un efecto excitatorio.

Con base en estos resultados, resulta evidente que es importante continuar con el estudio químico y farmacológico del hidrocoral *M. alcicornis*, el cual constituye una fuente potencial valiosa para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos con posibles aplicaciones en el área farmacéutica y biotecnológica. En este trabajo se evaluó la letalidad del extracto acuoso, la toxicidad sistémica y los efectos histopatológicos inducidos por el extracto acuoso de *M. alcicornis* colectado en el Caribe Mexicano. También evaluamos la toxicidad de este extracto en nauplios de *Artemia salina*. Los daños producidos por el extracto en los crustáceos y en membranas de eritrocitos de rata se analizaron por microscopía de escaneo electrónico (SEM) y microscopía de transmisión electrónica (TEM). Además, reportamos por primera vez los pesos moleculares de las toxinas responsables de las actividades hemolíticas y de PLA<sub>2</sub>. Adicionalmente, se logró la identificación parcial de la estructura primaria de una hemolisina de aproximadamente 30 kDa que muestra homología con la familia de las hidralisinas. Por otro lado, realizamos un análisis cromatográfico biodirigido, utilizando cromatografía de intercambio iónico, exclusión molecular por gel permeable y adsorción en fase reversa a partir del cual obtuvimos varias fracciones bioactivas que presentaron actividades hemolíticas y excitatorias. De estas fracciones se identificaron algunas proteínas y péptidos; una de estas proteínas mostró homología con proteínas predichas de cnidarios con actividad desconocida. Algunos de los péptidos mostraron homología con la proteína de unión a la clorofila (PCP) que se encuentra en el simbiote *S. pilosum*, y dos fragmentos mostraron homología con una toxina neurotóxica de *D. coronoides*. Para entender mejor sus actividades farmacológicas y toxicológicas, es importante continuar con la purificación de las citolisinas producidas por los organismos del género *Millepora*, así como con la caracterización de su mecanismo de acción.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades del phylum Cnidaria

El phylum Cnidaria incluye organismos que se encuentran entre los animales más venenosos; se han identificado a más de 11,000 especies, de las cuales 7,500 pertenecen a la clase Anthozoa (Rocha *et al.* 2011).

Este phylum está dividido en dos grupos taxonómicos, Anthozoa y Medusozoa. En el grupo Anthozoa se encuentran todos los miembros de la clase Anthozoa (anémonas, corales pétreos, corales blandos y otros), y en Medusozoa las cuatro clases restantes: Scyphozoa (medusas verdaderas), Cubozoa (cubomedusas), Staurozoa (clase recientemente definida que incluye la stauromedusa), e Hydrozoa (hidroides, la fragata portuguesa, la medusa vela, los corales de fuego y otros). Por secuenciación de DNA, filogenéticamente, se ha determinado a la clase Anthozoa como el grupo basal, que contiene DNA mitocondrial circular, mientras que las demás clases tienen una molécula lineal (Frazão *et al.* 2012).

Los cnidarios representan los niveles más primitivos de organización multicelular. Su arquitectura corporal tiene una simetría radial (aunque algunos son asimétricos y otros tienen una organización biradial o bilateral) y es diploblástica (consiste de dos capas germinales, ectodermo y endodermo, diferenciadas como epidermis y gastrodermis); estas capas se separan por una matriz no celular llamada mesoglea, que es sintetizada por ambas capas epiteliales y que consiste de al menos tres principales componentes: colágeno tipo I y IV, laminina y fibrolectina (Epp *et al.* 1986; Sarras *et al.* 1988). Contienen una cavidad gastrovascular o celenterón, que consiste en una sola abertura que funciona como boca y ano y está rodeada de un número variable de tentáculos cargados de nematocistos (Technau & Steele 2011). Los cnidarios tienen un número restringido de tipos celulares somáticos, incluyendo tipos celulares altamente especializados como células sensoriales y nerviosas, células intersticiales que son células auto reproductivas omnipresentes que originan nematoblastos, los que al madurar darán lugar a los cnidocitos; estos últimos son células urticantes de las más sofisticadas en el reino animal. Los cnidarios son principalmente predadores, aunque ciertas especies también pueden atrapar animales muertos u obtener compuestos de algas simbiotes.

### 2.2 Ciclo de vida de los cnidarios

En los organismos de ambos grupos, Medusozoa y Anthozoa, sus ciclos de vida comprenden una fase de gemación asexual y una de reproducción sexual. En las especies de Medusozoa, la medusa

adulto posee ambos sexos, y su huevo fertilizado o cigoto es retenido en la cavidad gástrica de la hembra (Freeman & Miller 1982; Galliot & Schmid 2002). Sin embargo, en los antozoos, las colonias de pólipos pueden ser de un solo sexo o ambos (Hand & Uhlinger 1992). Su ciclo de vida es principalmente de dos tipos: en los Anthozoa, el pólipo es la forma productora del gameto, y su ciclo de vida comprende las siguientes fases: embrión → larva → pólipo; en los Medusozoa, generalmente el ciclo incluye las fases: embrión → larva → pólipo → medusa, en donde la medusa es típicamente la forma sexual (Technau & Steele 2011). Aunque este es el esquema general de sus ciclos de vida, existen considerables variaciones entre los organismos.

El ciclo de vida de los Hidrozoos incluye un estado de pólipo, cuya reproducción puede ser asexual o sexual y un estado de medusa, cuya reproducción es sexual, aunque algunas veces sólo se presenta uno de los dos estados. Por otra parte, los miembros de las clases Scyphozoa y Cubozoa normalmente se presentan en estado de medusa y viven de manera independiente; todos son marinos, su reproducción es sexual cuando están en estado de medusa, y asexual cuando están en estado de pólipo; el pólipo subsecuentemente se transforma completamente en una medusa solitaria sexual (Collins 2002).

Los miembros de la clase Hydrozoa habitan en ambientes marinos y de agua dulce y pueden vivir de manera independiente. Cuando se encuentran en forma de pólipos, éstos pueden ser solitarios o coloniales; si son coloniales éstos pueden ser mono mórficos o polimórficos, y pueden o no formar un esqueleto calcáreo; también pueden ser bénticos o pelágicos, y pueden o no presentar tentáculos (Daly *et al.* 2007). Las especies de la clase Anthozoa son exclusivamente polipoides y pueden ser coloniales o solitarios, sin o con esqueleto mineralizado y/o proteínico y todos son marinos (Nevalainen *et al.* 2004; Fautin *et al.* 2005).

### **2.3 Simbiosis**

Casi todos los cnidarios forman una asociación mutualista con algas dinoflageladas simbiotas del género *Symbiodinium*, también conocidas como zooxantelas (Van Oppen 2007). Estas algas simbiotas se alojan en los tejidos de los corales en densidades de más de  $10^6$  por  $\text{cm}^2$  (Berkelmans & Van Oppen 2006). El género *Symbiodinium* es extremadamente diverso; los estudios genéticos que se han llevado a cabo para estudiar su variabilidad, entre ellos el uso de DNA ribosomal 18S y DNA de cloroplastos, han hecho que se adopte un sistema de clasificación que divide el género en varios grandes grupos filogenéticos (A-H), cada uno de los cuales comprende múltiples especies y cepas o tipos (Baker 2003; Coffroth & Santos 2005; Berkelmans & Van Oppen 2006). Los corales generalmente se asocian con un tipo de zooxantela, aunque se ha reportado que un cnidario puede

albergar a más de un simbiote (Baker 2003; Berkelmans & Van Oppen 2006; Van Oppen 2007), lo que parece proporcionarles ventajas ecológicas, como se ha reportado para holobiontes (hospedero y simbiote) con simbioses del grupo D, que son más resistentes a estrés térmico o que han sobrevivido a episodios repetidos de blanqueamiento (Glynn *et al.* 2001; Rowan 2004; Tchernov *et al.* 2004). En la clase Hydrozoa predomina el tipo C.

Las zooxantelas proveen el 90 - 95% del requerimiento nutricional de los cnidarios a través de la fotosíntesis, cuyos productos metabólicos ayudan a la calcificación y aportan oxígeno, carbono, compuestos de N y azúcares a sus hospederos (Baker 2003; Berkelmans & Van Oppen 2006; Van Oppen 2007). Además, los pigmentos que producen las zooxantelas protegen a los cnidarios de los rayos UV. A su vez, los simbioses utilizan los productos de desecho de los cnidarios, tales como el CO<sub>2</sub>, para la respiración y la fotosíntesis. De manera adicional, las zooxantelas utilizan vitaminas y otros compuestos orgánicos e inorgánicos producidos por los cnidarios. La presencia de estas algas simbioses en los cnidarios limita su existencia a aguas relativamente poco profundas y claras, donde hay suficiente luz para los requerimientos fotosintéticos del alga (Van Oppen 2007).

Por otro lado, es importante mencionar que las zooxantelas contienen compuestos bioactivos de interés terapéutico; algunos estudios bioquímicos han reportado la presencia de macrolactonas polihidroxiétilénicas (zooxantelatoxinas y zooxantelamidas) que tienen actividad farmacológica (Nakamura *et al.* 1993; Moriya *et al.* 1998; Moriya *et al.* 2001; Onodera *et al.* 2005), así como derivados de ácidos grasos con actividad citotóxica contra algunas líneas celulares (Onodera *et al.* 2004).

## **2.4 Cnidocitos**

El phylum Cnidaria se caracteriza por la presencia de células altamente especializadas llamadas cnidocitos, los cuales se producen en invaginaciones de las células ectodérmicas (Tardent 1995) y sintetizan en su citoplasma un orgánulo único llamado cnidocisto (o cnida) en forma de una diminuta cápsula con un filamento tubular enrollado en el interior. Al haber un estímulo químico o mecánico, la célula descarga su cápsula en una exocitosis explosiva y en este proceso, la cápsula evagina el filamento tubular. Dependiendo de su composición y morfología, los cnidocistos descritos a la fecha se han clasificado en tres principales tipos: nematocistos penetrantes, espirocistos envolventes y pticocistos aglutinantes (Daly *et al.* 2007; Sánchez-Rodríguez & Lucio-Martínez 2011). Estos orgánulos son utilizadas por los cnidarios para defensa, predación, adhesión, construcción estructural y locomoción (Tardent 1995; Özbek *et al.* 2009); en muchas revisiones, es común llamar nematocistos a cualquier tipo de cnidocisto.

Los espirocistos solo se encuentran en la clase Anthozoa, son envolventes y se utilizan para inmovilizar mecánicamente a la presa. Por otra parte, los pticocistos, encontrados solo en las anémonas (también de la clase Anthozoa) en especies de Actiniaria y Ceriantharia (Östman 2000; Jouiaei *et al.* 2015b), carecen de espinas y tienen función adhesiva y son utilizados para construir el túbulo en el que viven (Özbek *et al.* 2009). Los espirocistos pueden variar morfológicamente entre las especies. La pared de la cápsula del espirocisto es delgada y el túbulo evertido está elípticamente empacado; su túbulo no tiene espinas, contiene sustancias adherentes e higroscópicas que inmovilizan a su presa mecánicamente (Jouiaei *et al.* 2015b).

Los nematocistos, que contienen toxinas, se encuentran en todos los cnidarios y son los más variables en morfología y función. Son usados para capturar a sus presas o para funciones de defensa, como repeler predadores y competencia por el espacio intra e inter especies (Hidaka 1993; Tardent 1995; Özbek *et al.* 2009; Jouiaei *et al.* 2015b). La mayoría de las veces, los nematocistos se localizan en los tentáculos, aunque también se encuentran en la superficie externa de la campana de algunas especies, en los brazos orales o en el estómago para la digestión o parálisis, en el acorragio de los Actiniidae donde son usados para competencia y en los acotios para defensa o parálisis de la presa (Jouiaei *et al.* 2015b).

El nematocisto es una prolongación del aparato de Golgi; consiste de una cápsula proteica que puede diferir en tamaño (5-10  $\mu\text{m}$ ) y forma (redonda o cilíndrica) y un filamento tubular enrollado en el interior, que es una continuación del extremo estrechado de la cápsula, puede presentar espinas o apéndices (Teragawa & Bode 1995; Beckmann & Özbek 2012) y está cubierta por una pequeña tapa u opérculo (Teragawa & Bode 1995). Con excepción de las especies de la clase Anthozoa, los cnidocitos están provistos de un cnidocilio, el cual es un orgánulo sensorial que al ser estimulado apropiadamente produce la descarga del nematocisto (Tardent 1995). Aunque el cnidocilio reacciona principalmente ante un estímulo mecánico, su sensibilidad está influenciada por quimiorreceptores. De tal manera que se requiere de una combinación de estímulos mecánicos y químicos para el reconocimiento de la presa o depredador y la descarga de las toxinas (Watson & Hessinger 1989). El proceso de descarga de los nematocistos es uno de los eventos más rápidos conocidos en el reino animal y genera una aceleración de más de 5 millones de g ( $g = 9.81\text{m/s}^2$ ) (Beckmann & Özbek 2012). En los estenoteles de las hidras, que es el hidroide más estudiado, este proceso de eversión del túbulo toma menos de tres milisegundos. Las fuerzas involucradas son generadas en parte, por la tensión almacenada en el compartimento estructural colagenoso y por otro lado, por la presión intracapsular osmóticamente generada, la cual puede alcanzar los 150 bares ( $1.5 \times 10^7$  Pa). Esta presión osmótica se origina por la presencia de cationes inorgánicas como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y polianiones raros como poli-gama-

glutamatos, los cuales son adicionados durante la maduración ( Tardent 1995; Beckmann & Özbek 2012).

Debido a que los cnidocitos son incapaces de regenerar sus cnidocistos expulsados, tienen que ser remplazados por nuevas células derivadas por diferenciación de células madre pluripotentes (células intersticiales). Por lo tanto, los cnidarios invierten una gran fracción de su energía en el mantenimiento de su repertorio de cnidocistos, el cual es constantemente renovado (Beckmann & Özbek 2012).

La formación del cnidocisto tiene lugar en el citoplasma del cnidocito con la formación de una vesícula primordial que crece por adición de vesículas llenas de proteína provenientes del aparato de Golgi (Holstein 1981). En la hidra, los nematocistos se desarrollan en la columna del cuerpo y, cuando maduran, migran a su destino, que es principalmente los tentáculos y ahí se incorporan a células llamadas batería. En algunos cnidarios, los cnidocitos funcionales también pueden encontrarse en otras partes del cuerpo del animal.

Los diferentes tipos de cnidocistos no están igualmente distribuidos entre las diferentes especies, los hidrozooos poseen la mayor complejidad estructural (David *et al.* 2008). La hidra posee cuatro tipos diferentes de cápsulas, los estenoteles grandes que contienen grandes espinas en la parte basal del filamento, las atricos y holotricos isorriza que se usan para unión a superficies y atrapar organismos, y pequeños desmonemas, que se enrollan fuertemente alrededor de los apéndices de la presa después de la descarga.

Cuando los nematocistos tienen contacto con los humanos, penetran la piel de las víctimas e inyectan las toxinas que producen diversos síntomas que van desde una leve comezón hasta un gran dolor e incluso la muerte, según la especie. Por este motivo se le ha dado una gran importancia al estudio de las toxinas presentes en los nematocistos de las diferentes clases de cnidarios.

## **2.5 Compuestos bioactivos de naturaleza no proteica producidos por organismos del Phylum Cnidaria**

Además de producir toxinas, los cnidarios son una fuente importante de compuestos bioactivos. Muchos de éstos son considerados muy prometedores desde un punto de vista terapéutico, debido a que se les han demostrado diversas actividades farmacológicas: entre las que destacan actividad antitumoral, anti-inflamatoria, antibacteriana, entre otras (Rocha *et al.* 2011).

La clase Anthozoa comprende dos terceras partes del total de las especies de cnidarios, por lo que su aportación en el descubrimiento de compuestos bioactivos también es mayoritaria. En los órdenes Alcyonacea (en donde se encuentran los corales suaves), y Gorgonacea (que contempla a las

gorgonias), se han encontrado la mayor cantidad de compuestos bioactivos. Sin embargo, también en los ordenes Actiniaria (medusas) y Sclerotinia (corales duros), se han encontrado muchos compuestos con potencial terapéutico (Rocha *et al.* 2011).

Entre los compuestos más promisorios que se han aislado a partir de organismos de la clase Anthozoa se encuentran: 1. Terpenos, que incluyen sesquiterpenos y diterpenos, entre los que destacan los cembranoides; 2. Esteroides y prostanoides y 3. Policétidos. Estos metabolitos presentan diversas actividades biológicas, tales como: anti-tumoral, anti-inflamatoria, anti-VIH, anti-ulcerosa, anti-microbiana, anti-incrustante y efecto sobre el sistema nervioso. Estos metabolitos se han identificado a partir de especies de corales suaves que incluyen los géneros *Klyxum*, *Lobophytum*, *Sinularia*, *Sarcophyton*, *Dendronephthya*, *Nephtea*, *Asterospicularia*, *Cespitularia*, *Xenia*, entre otros (Strukelj *et al.* 2000; Grote *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008; Chao *et al.* 2009; Cheng *et al.* 2009; Lin *et al.* 2009; Rocha *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012; Lin *et al.* 2013; Burhan *et al.* 2014; Chen *et al.* 2015; Zubair *et al.* 2015).

En las gorgonias, las especies de los géneros *Briareum*, *Junceella*, *Leptogorgia*, *Pseudopterogorgia*, *Isis*, *Eunicella* y *Euplexaura*, contienen metabolitos, tales como diterpenoides, piridinas, esteroides y lípidos, los cuales han mostrado poseer efectos anti-inflamatorio, anti-malárico, anti-incrustante, anti-tumoral, anti-tuberculoso y anti-microbiano (Gerhart *et al.* 1988; Garzón *et al.* 2005; Berrué *et al.* 2011; Chen *et al.* 2011; Sheu *et al.* 2014).

Por otra parte, en los corales duros *Tubastrea sp.* se han encontrado alcaloides con actividad anti-malárica (Fontana *et al.* 1998) y a partir de *Cladocora caespitosa* se han aislado sesterpenoides con potente actividad anti-inflamatoria (Miyaoaka *et al.* 2006).

En esta clase se encuentra también una de las toxinas más potentes encontradas en los organismos marinos, la palitoxina, que se identificó por primera vez en el coral *Palythoa toxica* (Moore & Scheuer 1971), y que posteriormente, se encontró en otros corales del género *Palythoa*, así como en algunas anémonas (Deeds & Schwartz 2010). La palitoxina es un polialcohol con 3 átomos de nitrógeno en su estructura, un peso molecular de 2680 Da y una DL<sub>50</sub> en conejos de 25 ng/Kg de peso. La palitoxina se une a la bomba ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y la convierte en un canal permeable a cationes monovalentes, resultando en una salida de K<sup>+</sup> y entrada de Na<sup>+</sup>, por lo que despolariza las membranas y produce una serie de efectos adversos (Patocka *et al.* 2015).

En lo que respecta a organismos de la clase Hydrozoa, en éstos se han encontrado compuestos de gran interés terapéutico, como los policétidos denominados anulinas A, B y C, aislados a partir del hidroide *Garveia annulata* y que mostraron un potente efecto inhibitor de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), implicada en la evasión del rechazo inmune mediado por células T (Muller *et al.*

2005; Pereira *et al.* 2006). En el hidroide *Solanderia secunda*, también se detectaron unos compuestos del tipo ciclopropil oxilipina, llamados solandelactonas C, D y G que mostraron moderada actividad inhibitoria de la farnesil transferasa, la cual esta asociada con la diferenciación y proliferación celular (Seo *et al.* 1996).

## **2.6 Toxinas peptídicas producidas por organismos del Phylum Cnidaria**

Una de las características distintivas de los organismos del Phylum Cnidaria es la síntesis de toxinas peptídicas que son almacenadas en los cnidocistos o bien, se encuentran fuera de estos. Los nematocistos contienen un coctel de toxinas además de otros componentes que incluyen lípidos, sales y otros compuestos orgánicos. Las toxinas de los cnidarios presentan actividades cardiotoxicas, neurotóxicas, miotóxicas, hemolíticas y dermonecroticas (Mariottini *et al.* 2015). Algunas de estas toxinas, como los péptidos Kunits, presentan similitud con otras que se han encontrado en otros animales marinos y terrestres (Jouiaei *et al.* 2015b).

A la fecha, la mayoría de los estudios relacionados con las toxinas de los cnidarios se han enfocado en las especies de la clase Anthozoa, especialmente en las anémonas, a partir de las cuales se han purificado dos grandes grupos de toxinas: las citolisinas y las neurotoxinas. Las citolisinas pueden tener actividad de formación de poros en las membranas citoplasmáticas o actividad enzimática (Anderluh & Maček 2002).

No todas las toxinas de los cnidarios se encuentran en los nematocistos; al parecer estas toxinas externas contienen una región señal común en la mayoría de éstas, que puede o no transportarlas y dirigirlas a los cnidocistos maduros. Entre el péptido señal y la región madura, existe una región, llamada pro parte, de 9-17 residuos que casi siempre termina en Lys-Arg que puede o no estar en tándem (Anderluh *et al.* 2000; Nagai *et al.* 2002a; Moran *et al.* 2008), y que está compuesta en su mayoría por aminoácidos ácidos.

### **2.6.1 Enzimas**

#### **2.6.1.1 Enzimas con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)**

Las enzimas con actividad de PLA<sub>2</sub> catalizan la hidrólisis de glicerofosfolípidos en la posición sn-3 para liberar ácidos grasos libres y lisofosfolípidos (Frazão *et al.* 2012). La importancia de las PLA<sub>2</sub> radica en su capacidad de estar siempre presentes en los tejidos de los mamíferos como parte de las funciones corporales vitales de los organismos, actuando en el catabolismo lipídico, proceso de inflamación, transducción de señales y remodelación de fosfolípidos (Six & Dennis 2000).

Las PLA<sub>2</sub> se clasifican en familias que incluyen a las fosfolipasas A<sub>2</sub>, cuya actividad depende de calcio y que a su vez se dividen en: a) fosfolipasas secretadas (sPLA<sub>2</sub>) y fosfolipasas A<sub>2</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), y b) las fosfolipasas A<sub>2</sub> que no requieren de calcio (iPLA<sub>2</sub>). Las sPLA<sub>2</sub> tienen bajos pesos moleculares (normalmente de 14-19 kDa), las cPLA<sub>2</sub> tienen mayores pesos moleculares (85 kDa) y las iPLA<sub>2</sub> también tienen pesos moleculares de aproximadamente 85 kDa (Dennis 1994; Murakami & Kudo 2002). Existe también un sistema de agrupación de las PLA<sub>2</sub> basado en cuatro criterios y que ha permitido la obtención de 11 grupos (I - XI): Primero, la enzima debe catalizar la hidrólisis del enlace éster *sn*-2 de un sustrato fosfolipídico natural. Segundo, se debe conocer la secuencia completa de aminoácidos de la proteína madura. Tercero, cada grupo debe incluir todas las enzimas que tienen una similitud en su secuencia fácilmente identificable. Cuarto, variantes en el sitio activo catalítico del mismo gen, se clasifican en el mismo grupo y subgrupo, pero se distinguen usando números arábigos (Six & Dennis 2000).

Las sPLA<sub>2</sub> secretadas por el páncreas funcionan como enzimas digestivas, y otras son componentes de venenos de animales de diferentes linajes como reptiles, centípedos, insectos, arácnidos, moluscos, cnidarios y cefalópodos. La razón por la cual se encuentran en los venenos de los cnidarios, es principalmente como defensa e inmovilización y para la digestión de sus presas (Talvinen & Nevalainen 2002; Nevalainen *et al.* 2004).

Las PLA<sub>2</sub> presentan una amplia variedad de efectos farmacológicos que incluyen acciones neurotóxicas (son neurotoxinas presinápticas que bloquean las terminales nerviosas uniéndose a las membranas nerviosas) y efectos enzimáticos, hidrolizando los lípidos estables de las membranas. Los productos que se generan por la hidrólisis ya no pueden formar bicapas, lo que lleva a cambios en la conformación de las membranas (Frazão *et al.* 2012). Otros efectos tóxicos de la PLA<sub>2</sub> incluyen actividad cardiotoxica, anti-plaquetaria, hemolítica, hemorrágica, mionecrótica, anti-coagulante, convulsiva, hipotensiva e inflamatoria (Ali *et al.* 1999; Zuliani *et al.* 2005; Kordiš 2011). Se ha propuesto que estos efectos tóxicos provocados por las PLA<sub>2</sub>, son independientes de la acción catalítica y se deben a la interacción de sitios en la toxina, que no involucran el sitio catalítico, con “receptores” localizados en las membranas de las células o tejidos blancos. Estos sitios no catalíticos se han denominado “sitios farmacológicos” de las PLA<sub>2</sub> (Kini 2005; Rouault *et al.* 2006; Kordiš 2011).

Son pocas las PLA<sub>2</sub> que se han reportado de cnidarios, y menos aún las que se han estudiado a profundidad. Grotendorst & Hessinger (2000) reportaron que el veneno de *Aiptasia pallida* poseía actividad hemolítica producida por al menos tres proteínas que actúan sinérgicamente; una de éstas es una PLA<sub>2</sub> que existe en dos formas  $\alpha$  y  $\beta$ , la forma  $\beta$  es la proteína que contribuye al 80% de la actividad enzimática. También se reportó actividad de PLA<sub>2</sub> en un extracto crudo de la anémona

*Urcinia piscivora* que mostró una potente actividad hemolítica en eritrocitos de rata, cobayo, perro y en humanos; esta actividad hemolítica fue inhibida por esfingomielina, pero no fue inhibida por colesterol. Esta toxina también produjo citotoxicidad sobre diferentes líneas celulares, así como un efecto inotrópico; además, causa hemorragia y necrosis por dilatación de los vasos sanguíneos en la piel y debilitamiento vascular de fluidos y ruptura de las paredes alveolares de los pulmones. Es interesante hacer notar que esta proteína estructuralmente es similar a la PLA<sub>2</sub> de la víbora *Bungarus multicinctus*, pero no tiene actividad enzimática (Cline 1997; Cline *et al.* 1995). Más recientemente, se han purificado y caracterizado varias PLA<sub>2</sub> de otras anémonas, como las PLA<sub>2</sub> purificadas de la anémona *Bunodosoma caissarum*, una de las cuales mostró un peso molecular de 14.7 kDa, en espectrometría de masas y presentó alta similitud con proteínas aisladas del lagarto Mexicano pertenecientes al grupo III, y con la PLA<sub>2</sub> del veneno de abeja; esta enzima mostró efectos en la función renal e indujo secreción de insulina en condiciones de altas concentraciones de glucosa (Martins *et al.* 2009). Las PLA<sub>2</sub> de ~14 kDa inductoras de edema (Anch TX1 y Anch TX-II) de la anémona *Anthothoe chilensis* mostraron alta similitud con PLA<sub>2</sub> de anémonas y de otros animales, de los grupos I, II y III (Landucci *et al.* 2012). En el estudio de las PLA<sub>2</sub> también se han reportado mejoras en su proceso de purificación, lo que conlleva a la obtención de mayores rendimientos de las enzimas, así como una mayor actividad. Tal es el caso de las isotoxinas StI y StII purificadas del extracto acuoso de la anémona *Stichodactyla helianthus* (del Monte-Martínez *et al.* 2014).

La primer PLA<sub>2</sub> secuenciada completamente es AcPLA<sub>2</sub> de *Adamsia carciniopados* que mostró poca similitud con otras PLA<sub>2</sub> conocidas (30-42%) y se definió como una nueva clase de PLA<sub>2</sub> (Talvinen & Nevalainen 2002). De *Urticina crassicornis* también se identificó una PLA<sub>2</sub> homóloga a la AcPLA<sub>2</sub> y similar a la sPLA<sub>2</sub> neurotóxica de serpientes de la familia Elapidae; esta PLA<sub>2</sub> tiene además algunas características muy particulares que también se han detectado en toxinas de *Nematostella vectensis* (Razpotnik *et al.* 2009) y de *Candilactis gigantea* de Cuba; se encontró que su PLA<sub>2</sub> básica tiene un 84% y un 61% de similitud con las PLAs de *A. carciopados* y *N. vectensis* respectivamente, así como 43 y 42% de similitud con las PLA<sub>2</sub> de *Vipera russelli russelli* y *Bothrops jararacussu* respectivamente (Romero *et al.* 2010).

En un estudio realizado en el 2004 con diferentes cnidarios se reportaron interesantes descubrimientos, como altos niveles de actividad de PLA<sub>2</sub> en los tejidos de organismos de *Millepora sp.* en comparación con los de otros cnidarios (Nevalainen *et al.* 2004).

### **2.6.1.2 Metaloproteasas**

Las metaloproteasas generalmente conocidas como componentes de venenos en animales terrestres, producen hemorragia y necrosis, degradando la matriz extracelular y evitando la coagulación de la sangre (Fox & Serrano 2005; Fry *et al.* 2009), lo que se ha asociado con varios de los síntomas que producen los cnidarios, como daño en la piel, edema, formación de ampulas, mionecrosis e inflamación (Fox & Serrano 2005; Jouiaei *et al.* 2015b). En los venenos de algunos cnidarios también se han detectado estas enzimas como en las medusas *Stomolophus meleagris* y *Chironex fleckeri*. Mediante análisis zimográficos, utilizando diferentes sustratos, también se han identificado otros efectos proteolíticos, como actividad gelatinolítica, caseinolítica y fibrinolítica en los venenos de cuatro medusas, incluyendo *Nemopilema nomurai*, *Rhopilema esculenta*, *Cyanea nozakii* y *Aurelia aurita*; estas enzimas tienen rangos de pesos moleculares entre 17 y 130 kDa. Cuando los venenos se trataron con 1,10-fenantrolina, la mayoría de estas actividades desaparecieron, sugiriendo que las enzimas pertenecen a las metaloproteinasas (Lee *et al.* 2011). En *N. vectensis* también se detectaron metaloproteasas dependientes de zinc, detectadas en el veneno de los nematocistos y en células glandulares (Moran *et al.* 2013).

### **2.6.2 Toxinas formadoras de poros**

Las toxinas formadoras de poros o porinas, son moléculas únicas por su capacidad de insertarse espontáneamente en las membranas plasmáticas, formando canales hidrofílicos. Las toxinas se encuentran en el veneno exhibiendo una estructura monomérica estable que es soluble en agua y que se une a los receptores en las células blanco; posteriormente adopta una estructura de unión a la membrana que consiste de moléculas oligoméricas que forman poros membranales (Anderluh *et al.* 2011). Dependiendo del tipo de estructura secundaria que adopten para penetrar la membrana y formar el poro, las porinas se identifican como  $\alpha$ -PFTs que son ricas en  $\alpha$ -hélices y forman estructuras en forma de barriles  $\alpha$  y las  $\beta$ -PFTs ricas en hojas  $\beta$ , éstas forman poros en forma de barriles  $\beta$ . Estas citolisinas tienen propiedades cardioestimulantes, dermonecróticas y actividad antihistamínica.

#### **2.6.2.1 Citolisinas de anémonas**

Las citolisinas de las anémonas se han clasificado, de manera general, en cuatro grupos dependiendo de su peso molecular y su mecanismo de acción. Los grupos I, II y IV comprenden citolisinas formadoras de poros, en tanto que el grupo III está formado por citolisinas con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>, que ya se mencionaron anteriormente (Bernheimer & Avigad 1976; Hessinger & Lenhoff 1976; Maček & Lebez 1988; Zykova *et al.* 1998).

Las citolisinas del grupo I son péptidos de 5-8 kDa y algunos ejemplos de estas citolisinas son las que se purificaron a partir de las anémonas *Tealia felina* y *Radianthus macrodactylus*, las cuales forman poros en membranas que contienen fosfatidilcolina y tienen actividad antihistamínica. Estas citolisinas son menos hemolíticas que las del tipo II.

El grupo II es el más numeroso y comprende proteínas básicas de aproximadamente 20 kDa, entre las que destacan las actinoporinas presentes en Anthozoa e Hydrozoa.

El mecanismo de penetración de las actinoporinas involucra varios pasos, primero, la toxina se une a la membrana por un sitio de reconocimiento de esfingomielina, para lo que utiliza una región rica en aminoácidos aromáticos y el adyacente sitio de unión a fosfolina. Posteriormente, la cara hidrofóbica N-terminal penetra en la interface de la membrana, esto acompañado del extendimiento del segmento N-terminal que se orienta en forma lateral a la membrana e incrementa la helicidad del extremo N-terminal. Finalmente, la toxina oligomeriza en la superficie de la membrana por la inserción de alfa hélices de tres o cuatro monómeros formando el poro iónico (Kristan *et al.* 2009; Monastyrnaya *et al.* 2010).

Este grupo incluye a las equinatoxinas, las esticolisinas y las magnificalisinas aisladas a partir de *Actinia equina*, *Stichodactyla helianthus* y *Heteractis magnifica*, respectivamente. Estas citolisinas forman poros selectivos a cationes con preferencia en membranas que contienen esfingomielina; los poros hidrofílicos de alrededor de 1 nm provocan la hemólisis. Estas también son llamadas actinoporinas y pertenecen a la única familia de las  $\alpha$ -PFTs; estas proteínas no tienen cisteínas y tienen altos puntos isoeléctricos ( $>9.5$ ) (Álvarez *et al.* 2009).

Las toxinas del grupo III como ya se mencionó, son formadas por proteínas con o sin actividad PLA<sub>2</sub> y tienen pesos moleculares entre 30 y 40 kDa, un ejemplo de este grupo son las proteínas citolíticas del género *Urticina* de un peso molecular de ~28 kDa y un pI  $>9.8$ .

Finalmente, el grupo IV incluye citolisinas activadas por tiol con un peso molecular de 80 kDa, incluye a la metridiolisina que tiene un peso molecular de 80 kDa y fue purificada de *Metridium senile*. Esta toxina forma poros en membranas que contienen colesterol y fosfolípidos (Anderluh *et al.* 1999; Anderluh & Maček 2002).

#### **2.6.2.2 Citolisinas de medusas y de otros cnidarios**

Las citolisinas de medusas son las toxinas más potentes y de muy rápida acción, estas toxinas se han reportado en todos los cubozoos, incluyendo, entre otras a las siguientes: a) CAH1 de *Carybdea alata* o como CaTX-A/B (Brinkman & Burnell 2007), b) CqTX-A de *Chiropsalmus quadrigatus* (Nagai *et al.* 2002b), c) CfTX-1/2 y d) CfTX-A/B/Bt de *Chironex flekeri*; estas últimas forman poros

en eritrocitos humanos de 12 nm en el interior y 25 nm en el exterior provocando colapso cardiovascular en un período de un minuto en ratas anestesiadas (Brinkman & Burnell 2007; Yanagihara & Shohet 2012; Brinkman *et al.* 2014) . También en otros cnidarios se han reportado citolisinas homólogas a las de los cubozoos, como en *Aurelia aurita*, *Hydra magnipapillata*, *Aiptasia pallida*, *Hydractinia symbiolongicarpus* e *Hydra vulgaris* (Jouiaei *et al.* 2015b). Este tipo de citolisinas son proteínas básicas con pesos moleculares de 40 – 46 kDa que contienen dominios  $\alpha$  y  $\beta$ . La formación hipotética del poro involucra la oligomerización de varias alfa hélices hidrofóbicas y anfifílicas en la región N-terminal de la toxina y se supone que ocurre una distorsión de la membrana plasmática, lo que produce la hemólisis y muerte (Nagai *et al.* 2000; Brinkman & Burnell 2007; Brinkman *et al.* 2014).

#### **2.6.2.2.1 Hidralisinas**

Recientemente se aislaron y caracterizaron las hidralisinas, una nueva familia de  $\beta$ -PFTs, a partir de la hidra verde, *Chlorohydra viridissima*, que no se encuentran en los nematocistos. Éstas son débilmente hemolíticas, y selectivamente citotóxicas contra células de insectos, con un peso molecular de aproximadamente 26 kDa (Zhang *et al.* 2003). Estructural y funcionalmente son parecidas a las PFTs de bacterias y hongos. Al parecer, estas toxinas no están involucradas en la captura de la presa, sino que son expresadas por las células digestivas y secretadas durante la digestión, lisando y desintegrando el tejido de la presa (Sher *et al.* 2005a). Estas toxinas no son activas en los fosfolípidos de las membranas o carbohidratos, pero si se unen a receptores de membrana específicos para formar los poros de un diámetro interno de aproximadamente 1.2 nm. (Sher *et al.* 2008). Su actividad hemolítica no se ve afectada por la pre-incubación de las proteínas con colesterol, esfingomielina, fosfatidilcolina, galactosa, manosa o lactosa, lo que indica que estos componentes no son los blancos primarios a los cuales se unen estas toxinas en las membranas (Anderluh *et al.* 2011). Otro tipo de hidralisina encontradas en cnidarios es una aerolisina que es secretada de las células ectodermales de la faringe de *N. vectensis* (Moran *et al.* 2012).

#### **2.6.2.2.2 Complejo de ataque a la membrana y perforinas (MACPF)**

Este grupo de  $\beta$ -PFT se ha detectado en los venenos de las anémonas *Phyllodiscus semoni* (PsTX-60A y PsTX-60B) y *Actinaria villosa* (AvTX-60) (Nagai *et al.* 2002a; Nagai *et al.* 2002b; Oshiro *et al.* 2004). Las proteínas del complejo de ataque a la membrana (MAC) han sido identificadas en el sistema complementario y perforina (PF) producido por las células T y las células asesinas NK. Estas proteínas crean un poro transmembranal en la célula blanco de más de 20 nm e inician varias

rutas de lisis celular y muerte (Voskoboinik *et al.* 2010). Al igual que la perforina, estas toxinas poseen un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Anderluh *et al.* 2011).

### **2.6.3 Neurotoxinas de cnidarios**

Las neurotoxinas son toxinas que actúan sobre canales iónicos dependientes de voltaje, los cuales son críticos para la transmisión neuromuscular y representan un excelente objetivo para las toxinas de una gran variedad de organismos vivos, incluyendo los cnidarios (Messerli & Greenberg 2006). Estas toxinas son un grupo de péptidos de bajo peso molecular, cuyo papel en los venenos es inmovilizar a la presa rápidamente y defenderse de sus predadores (Jouiaei *et al.* 2015b). Prolongan el potencial de acción de las membranas excitables y no excitables, en las neuronas sensoriales y células del músculo esquelético y cardíaco (Smith & Blumenthal 2007; Castañeda & Harvey 2009; Jouiaei *et al.* 2015b), modificando el funcionamiento normal de los canales de sodio, evitando su inactivación y prolongando el estado abierto (Catterall *et al.* 2007; Smith & Blumenthal 2007; Mariottini *et al.* 2015) o bloqueando la apertura de los canales de potasio, necesarios para la repolarización de las membranas (Castañeda & Harvey 2009), lo que provoca la liberación de neurotransmisores en forma excesiva en la sinapsis neuronal y en las uniones neuromusculares, dañando la transmisión neuromuscular, lo que produce espasmos seguidos de una flacidez parálitica y ocasionando la muerte (Jouiaei *et al.* 2015b). Algunas neurotoxinas también son capaces de inhibir los potenciales pos-sinápticos (Mariottini & Pane 2013). Varios polipéptidos neurotóxicos de cnidarios bloquean únicamente el receptor vaniloide 1 (TRPV1) y el canal iónico sensible a ácido tipo 3 (ASIC3), que está involucrado en la iniciación y transducción del dolor e hiperalgesia (Jouiaei *et al.* 2015b).

#### **2.6.3.1 Toxinas que interactúan con canales de sodio (NaTX)**

Estos canales son péptidos transmembranales compuestos de varias subunidades. La subunidad  $\alpha$ , altamente conservada, está compuesta de cuatro dominios homólogos (D1-D4), y cada uno de éstos contiene seis regiones transmembranales hidrofóbicas (S1-S6). Muchas toxinas de cnidarios, escorpiones y arañas interactúan con el sitio 3 del canal, que involucra el asa extracelular, entre los segmentos transmembranales S3 y S4 en el dominio 4 (Cestèle & Catterall 2000; Messerli & Greenberg 2006). Las toxinas, al parecer, se unen a este sitio, mediante interacciones electrostáticas entre un grupo de aminoácidos básicos de la toxina con aminoácidos ácidos del sitio 3 (Loret *et al.* 1994), bloqueando el segmento S4 e inhibiendo los cambios conformacionales necesarios para que el canal se inactive rápidamente (Catterall *et al.* 2007), lo que provoca la permanencia del estado abierto del canal, prolonga la despolarización, ocasionando que se liberen cantidades anormales de

neurotransmisor en la sinapsis. Estas toxinas se clasifican en tres grupos dependiendo de su secuencia de aminoácidos (Frazão *et al.* 2012; Jouiaei *et al.* 2015a; Jouiaei *et al.* 2015b).

Las toxinas del tipo I y II, son polipéptidos de 46-54 residuos, y hojas  $\beta$  antiparalelas con cuatro cadenas y un asa altamente flexible llamada asa Arg-14. Otra característica es que no poseen  $\alpha$ -hélices (Smith & Blumenthal 2007), son muy similares en sus secuencias y también comparten funciones similares; entre estos dos tipos, hay un grupo de NATx que tiene una similitud parcial a los dos tipos y además su mecanismo de acción es similar a estos dos grupos (Cariello *et al.* 1989; Nesher *et al.* 2013). Estos dos tipos de toxinas, tienen una localización similar en las seis cisteínas y algunos otros residuos que pudieran ser importantes en la actividad y estructura terciaria (Norton 2009), sus secuencias C-terminal son básicas (Messerli & Greenberg 2006).

Las del tipo III son más pequeñas y contienen de 27 - 32 aminoácidos y giros  $\beta$  y  $\gamma$ . Las toxinas de este tipo tienen en su superficie bioactiva principalmente residuos aromáticos que no se encuentran en otras toxinas que se unen al sitio 3 (Moran *et al.* 2007), y han sido identificadas sólo en algunos cnidarios (Messerli y Greenber, 2006). Tienen un mecanismo de acción similar al resto de las NaTx pero sin las secuencias compartidas con el resto de los grupos (Moran *et al.* 2009); este grupo es muy selectivo a canales de sodio de artrópodos (Moran *et al.* 2007; Jouiaei *et al.* 2015b).

Existe un cuarto grupo conocido solo como “otras toxinas” que tienen secuencias de aminoácidos que no son homólogas a las de los otros tipos.

Las neurotoxinas de anémonas que interaccionan con  $\text{Na}_v$  más abundantes son las del tipo I, entre las que se pueden mencionar los siguientes ejemplos: ATXI, ATXII y ATXV obtenidas de *Anemonia sulcata* (Wunderer *et al.* 1976; Wunderer & Eulitz 1978; Scheffler *et al.* 1982; Ständker *et al.* 2006); AftI y AftII purificadas de *Anthopleura fuscoviridis* (Sunahara *et al.* 1987); ApA y ApB obtenidas de *Anthopleura xanthogrammica* (anémona gigante verde) (Kelso & Blumenthal 1998), BgII and BgIII producidas por *Bunodosoma granulifera* (Salceda *et al.* 2002), ApC de *Anthopleura elegantissima* (anémona agregante) (Salceda *et al.* 2006) y CgNa de *Condylactis gigantea* (Salceda *et al.* 2007). Ejemplos de toxinas del tipo II son: Rp II y III de *Radianthus paumotensis* (Schweitz *et al.* 1985), gigantoxina III de *Stichodactyla gigantea* (Honma *et al.* 2003) y Sh I de *Stichodactyla helianthus* (Kem *et al.* 1989).

Algunos ejemplos de toxinas tipo III son ATX-III and PaTX, que tienen tres y cuatro puentes disulfuro respectivamente (Honma & Shiomi 2006). En el tipo IV se pueden mencionar a las Calitoxinas I y II de *Calliactis parasitica* que tienen 79 residuos (Cariello *et al.* 1989; Spagnuolo *et al.* 1994). También se han purificado otras neurotoxinas que aún no han sido clasificadas dentro de alguno

de los tipos; éstas incluyen a la Bc III y IV de *Bunodosoma caissarum* (Oliveira *et al.* 2006) y Av3 de *Anemonia viridis* (Moran *et al.* 2007).

### **2.6.3.2 Toxinas que interactúan con canales de potasio (KTX) y péptidos de Kunitz**

Las toxinas que actúan sobre los canales de potasio dependientes de voltaje (KTx) se clasifican en cinco grupos, dependiendo de su estructura y su afinidad de unión hacia diferentes familias de canales de potasio (Kv) (Jouiaei *et al.* 2015a; Jouiaei *et al.* 2015b). Las KTx del grupo I tienen un peso molecular de 4 kDa y tres puentes disulfuro. Interfieren con la unión de dendrotoxina radiomarcada de la serpiente mamba verde que se une a las subunidades Kv1.1, 1.2 y 1.3 (Castañeda & Harvey 2009), de las membranas sinaptosomales. Inhiben la corriente de potasio a través de los canales Kv1 y Kv3 y la conductancia intermedia de los canales de potasio activados por calcio (Frazão *et al.* 2012). Los residuos de Ser<sup>20</sup>, Lys<sup>25</sup> y Tyr<sup>23</sup> son los responsables de la unión de la toxina ShK a los canales de Kv en el cerebro de rata (Honma & Shiomi 2006). La diada Lys-Tyr también es considerada esencial en la unión de las toxinas a los canales de Kv. Incluso, se encontró que esta diada tiene la misma función en las toxinas de escorpión que bloquean estos canales de Kv (Honma & Shiomi 2006). Dentro del mismo grupo estructural, las toxinas pueden diferir en la selectividad para diferentes subtipos de canales. Algunos ejemplos de toxinas del grupo I son ShK de *Stichodactyla helianthus* y BgK de *Bunodosoma granulifera*, estas toxinas fueron las primeras en ser aisladas de fuentes marinas (Castañeda & Harvey 2009).

Las KTx del grupo II presentan homología con los péptidos inhibidores tipo Kunitz de proteasas de serina. Tienen un peso molecular de ~6 kDa y tres puentes disulfuro. Inhiben a las enzimas tripsina y quimotripsina para evitar la rápida degradación de la proteasa del veneno ocasionada por las enzimas endógenas o de sus presas (Delfin *et al.* 1996; Minagawa *et al.* 1997; Minagawa *et al.* 2008); también bloquean los canales Kv1.2 y hay varias toxinas de anémonas que poseen esta actividad dual (Schweitz *et al.* 1995; Peigneur *et al.* 2011). *Anemonia viridis* posee varias toxinas de este grupo (Wunderer *et al.* 1976; Schweitz *et al.* 1995; Diochot *et al.* 1998).

Las KTx del grupo III son péptidos de 3-4 kDa y tienen 3 puentes disulfuro, bloquean varios tipos de canales iónicos de potasio como el canal Kv3.4 que es responsable de la rápida inactivación del canal Kv (Diochot *et al.* 1998) y el canal hERG Kv 11.1 (el gen humano relacionado al gen eter ago-go) (Diochot *et al.* 2004; Jensen *et al.* 2014) que se encuentra en las células cardíacas y controla la duración de la fase "plateau" del potencial de acción. Varios tipos de toxinas de este grupo, bloquean los hERG y canales iónicos sensibles a ácido (ASIC3, y canales de sodio activados por H<sup>+</sup>) (Jensen *et al.* 2014). BDS-I y II modifican la apertura del canal y APETx1 bloquea los canales ERG (Castañeda &

Harvey 2009). APETx2 comparte del 36 al 64 % de identidad en su secuencia con BDS-I y II y APETx1, pero no bloquea los canales de potasio, su función es inactivar los canales iónicos sensibles a ácido ASIC3 en las neuronas sensoriales que están involucradas en la modulación de la sensación del dolor. Este tipo de canales están formados por la asociación monomérica o heteromérica de seis diferentes subunidades aunque sólo las subunidades ASIC3 son afectadas por esta toxina (Honma & Shiomi 2006). Esta toxina también afecta el canal de sodio Nav1.8 que también está involucrado en la sensación del dolor (Frazão *et al.* 2012).

Las KTx grupo IV tienen dos puentes disulfuro y han sido identificadas en la anémona *Stichodactyla haddoni* (Honma *et al.* 2008). *Anthopleura elegantissima*, *Bunodosoma caissarum*, y *B. cangicum* poseen toxinas de este grupo (Diochot *et al.* 2003; Diochot *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2006; Zaharenko *et al.* 2008). El grupo V se encuentra en la anémona *B. caissarum*, tiene cuatro puentes disulfuro y es activa en los canales IR Shaker de *Drosophila* (Orts *et al.* 2013).

### 2.6.3.3 Toxinas que interaccionan con canales de calcio

Se ha sugerido la existencia de otra clase de neurotoxinas de cnidarios que interaccionan con canales de calcio dependientes de voltaje (Salinas *et al.* 1997; Lin *et al.* 1988; Rojas *et al.* 2002), aunque aún no se han logrado purificar estas toxinas, su importancia en las células excitables y no excitables es innegable.

### 2.6.3.4 Otras toxinas

Existen otras toxinas que se han logrado obtener y aislar del acrorragio de las anémonas; estas toxinas no tienen homología estructural con otras toxinas de anémonas, y poca similitud con toxinas de otros animales como arañas y caracoles (Brinkman *et al.* 2014). Del acrorragio de *Actinia equina* también se encontraron toxinas que inducen necrosis en los tejidos por formación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS); estas toxinas no poseen actividad neurotóxica-paralítica (Gibaldi *et al.* 1976). La toxina Gigantoxina-1 tiene un 35% de identidad con los factores de crecimiento epidermal y además de esta actividad EGF, también tiene actividad tóxica (Brinkman *et al.* 2014).

Un nuevo grupo de neurotoxinas ricas en cisteínas y homólogas a los péptidos pequeños ricos en cisteínas (SCRiPs), se han obtenido del ectodermo de los corales *Acropora millepora* y han sido también encontrados en anémonas (Jouiaei *et al.* 2015b); las proteínas recombinantes de estos corales provocaron parálisis severa en larvas del pez cebra (Jouiaei *et al.* 2015a).

Se han purificado nuevos péptidos que tienen como blanco los canales iónicos ASIC, asociados con dolor ácido durante procesos de inflamación e isquemia. Los péptidos  $\pi$ -AnmTX Ugr 9a-1 del

veneno de la anémona *Urticina grebenyi* (Osmakov *et al.* 2013) y PhcrTx1 de *Phymanthus crucifer* (Rodríguez *et al.* 2014); tienen como blanco los canales iónicos sensibles a ácido. Estos péptidos tienen dos puentes disulfuro y no tienen homología a otros péptidos neurotóxicos de anémonas (Jouiaei *et al.* 2015b).

Los canales catiónicos no selectivos conocidos como receptores de potencial transitorio V1 (TRPV1) que están involucrados en la transmisión y modulación del dolor, e inician su respuesta neuronal durante el proceso de inflamación, son considerados como uno de los más importantes disparadores del estímulo del dolor. Estos canales son inhibidos por varias toxinas de cnidarios, el primer inhibidor de TRPV1 la toxina  $\tau$ -SHTX-Hcr2b (APHC1) se aisló del veneno de *Heteractis crispa* (Andreev *et al.* 2008). Posteriormente, también se aislaron dos péptidos homólogos ( $\tau$ -SHTX-Hcr2c (APHC2) y  $\tau$ -SHTX-Hcr2d (APHC3 (Kozlov *et al.* 2009) de la misma anémona. Su importancia radica en que pueden ser usados como modelos para el diseño de nuevos fármacos analgésicos (Kozlov *et al.* 2009).

## **2.7 Género *Millepora***

### **2.7.1 Generalidades del género *Millepora***

Las especies del género *Millepora* (phylum Cnidaria; clase Hydrozoa), son hidrocorales coloniales en forma de pólipo, que secretan un esqueleto calcáreo que crece de forma incrustante o vertical; presentan dos tipos de pólipos especializados unos en defensa y otros en alimentación, que sobresalen a través de poros en el esqueleto. Estos pólipos son muy numerosos y varían en su toxicidad, produciendo lesiones semejantes a quemaduras, de ahí que estas especies son popularmente conocidas como corales de fuego. Las milleporas son los segundos organismos más abundantes constructores de arrecifes de coral (Lewis 2006; Rojas-Molina *et al.* 2012). Se desarrollan a profundidades entre 1 y 40 metros, y su distribución en los arrecifes depende en gran medida de factores ambientales (Lewis 2006). Actualmente, hay reconocidas diecisiete especies de *Millepora* con una marcada variación fenotípica en la forma y estructura de las colonias: erguida, en forma de placas, de hoja y estructuras ramificadas que pueden alcanzar de 30-60 cm de altura. También pueden presentar un crecimiento redondeado e incrustado sobre otros corales o superficies duras. Su coloración es generalmente amarilla o café. La forma de crecimiento de los hidrocorales, al igual que los corales verdaderos, presenta cierta plasticidad ante los movimientos de las aguas. Por lo general, las formas robustas y de cuchillas se encuentran en aguas turbulentas y las formas ramificadas son más comunes en aguas tranquilas (Davies & Montaggioni 1985). En los arrecifes del Mar Caribe mexicano predominan tres especies del género *Millepora*: *M. alcicornis*, que presenta una forma ramificada; *M.*

*complanata*, cuyas colonias tienen forma de cuchillas y *M. squarrosa*, que posee una forma de caja, semejante a un panal de abejas (Lewis 2006).

El esqueleto calcáreo de la colonia, llamado cenosteum tiene una cubierta con forma irregular que a menudo presenta ligeras elevaciones redondeadas. Esta cubierta ectodérmica consiste principalmente de células fusiformes con un núcleo oval. La superficie de la colonia se caracteriza por la presencia de finos poros de diferentes tamaños, dispersados a lo largo de la cubierta, excepto en las orillas y en las puntas de las ramificaciones donde tiene lugar el crecimiento del esqueleto. Los poros más grandes llamados gastróporos, alojan gastrozoides que son pólipos cilíndricos con una boca central. Los poros más pequeños llamados dactilóporos, contienen dactilozoides que son pólipos largos, más delgados y sin boca. Los gastróporos generalmente están rodeados de cinco a ocho dactilóporos. Los gastrozoides y dactilozoides de *M. complanata* y *M. alcornis* miden 2.5 mm de longitud. El disco oral de los gastrozoides está rodeado por tres a siete tentáculos en la cabeza que contienen nematocistos (Hyman 1940). Los dactilozoides están cubiertos con numerosos tentáculos en la cabeza, arreglados en círculos de tres a cuatro a lo largo del pólipo y también conteniendo numerosos nematocistos. Los gastrozoides y dactilozoides son capaces de expandirse y retraerse durante el día y la noche indistintamente (Figura 1) (Lewis 1989).

Los poros se interconectan por canales en el interior de la cubierta calcárea; estos canales y demás espacios están formados por material calcáreo fibrocristalino, con un arreglo laminar que se entrecruza en todas direcciones. Los canales tienen una red de tejido suave que se ramifica a través del esqueleto y une las cavidades corporales de los zooides (Lewis 2006). La delgada cubierta y la trabécula de canales forman el cenosarco. Estos canales están vivos solo cerca de la superficie y los pólipos se extienden solo en la punta de los poros del esqueleto. Los canales del cenosarco secretan el cenosteum que es el peridermo de los hidroides (Lewis 2006).

Entre los nematocistos que se encuentran en los zooides de las milleporas, hay estenoteles (que solo se encuentran en la clase Hydrozoa, en las hidras, milleporas y sifonóforos pero no en estilastéridos) que son de varios tamaños (Schuchert 2005), isorrizas en los pólipos y mastigóforos microbásicos y macrobásicos (los macrobásicos solo son encontrados en las milleporas) en los zooides y en el cenosarco (Lewis 2006).



**Figura 1.** *Millepora alcicornis* mostrando los zooides extendidos. (Tomado de página web por Mitchell Doctor).

### **2.7.2 Efectos tóxicos y farmacológicos producidos por las especies del género *Millepora***

Los nematocistos de los corales de fuego pueden penetrar la piel humana y producir lesiones semejantes a una quemadura; estas lesiones comprenden irritación, sensación quemante o dolor punzante, dermatitis eritematoso y edematoso, urticaria, prurito y necrosis. Los síntomas sistémicos consisten en malestar general, náuseas, vómito, dolor abdominal, espasmos musculares, diarrea, dificultad respiratoria, taquicardia, hipotensión y fiebre (Sagi *et al.* 1987; Moats 1992; Lewis 2006). También existe el reporte de un caso clínico con severa toxicidad sistémica debida a envenenamiento por una especie de *Millepora* el cual incluyó síndrome nefrótico, fallo renal agudo y edema pulmonar (Prasad *et al.* 2006).

### **2.7.3 Estudios realizados en especies de *Millepora***

Los estudios que se han llevado a cabo sobre las especies del género *Millepora*, iniciaron con investigaciones acerca de *M. alcicornis* y *M. tenera* (Middlebrook *et al.* 1971; Wittle *et al.* 1971; Wittle & Wheeler 1974). En esos trabajos preliminares se encontró que los extractos preparados con solución Sørensen a partir de estos hidrocorales tienen actividad hemolítica y dermonecrotica. Además, se determinó que ambos extractos eran altamente tóxicos, ya que el extracto de *M. tenera* a una concentración de 2.73 µg de proteína/20 g de peso induce violentas convulsiones y muerte en ratones en un lapso menor de 30 segundos (Wittle & Wheeler 1974). Por otro lado, Middlebrook y colaboradores (1971) llevaron a cabo un fraccionamiento cromatográfico del extracto de *M. tenera*

usando DEAE-celulosa, lo cual condujo a la obtención de una fracción proteica que era 8 veces más potente que el extracto original (Middlebrook *et al.* 1971).

Más recientemente se encontró que los extractos preparados a partir de los nematocistos de *M. platyphylla* y *M. dichotoma* eran letales para ratones y además tenían propiedades dermonecroticas, vasopermeables, hemolíticas y antigénicas (Shiomi *et al.* 1989; Radwan 2002). Los fraccionamientos cromatográficos de dichos extractos indicaron la presencia de proteínas con pesos moleculares de 35 y 31 kDa con actividad hemolítica (Radwan 2002). Posteriormente, en otro estudio realizado con *M. platyphylla* se detectó una proteína de 32.5 kDa con actividad de PLA<sub>2</sub> y hemolítica, a la cual se le denominó Milleporina-1 (Radwan & Aboul-Dahab 2004).

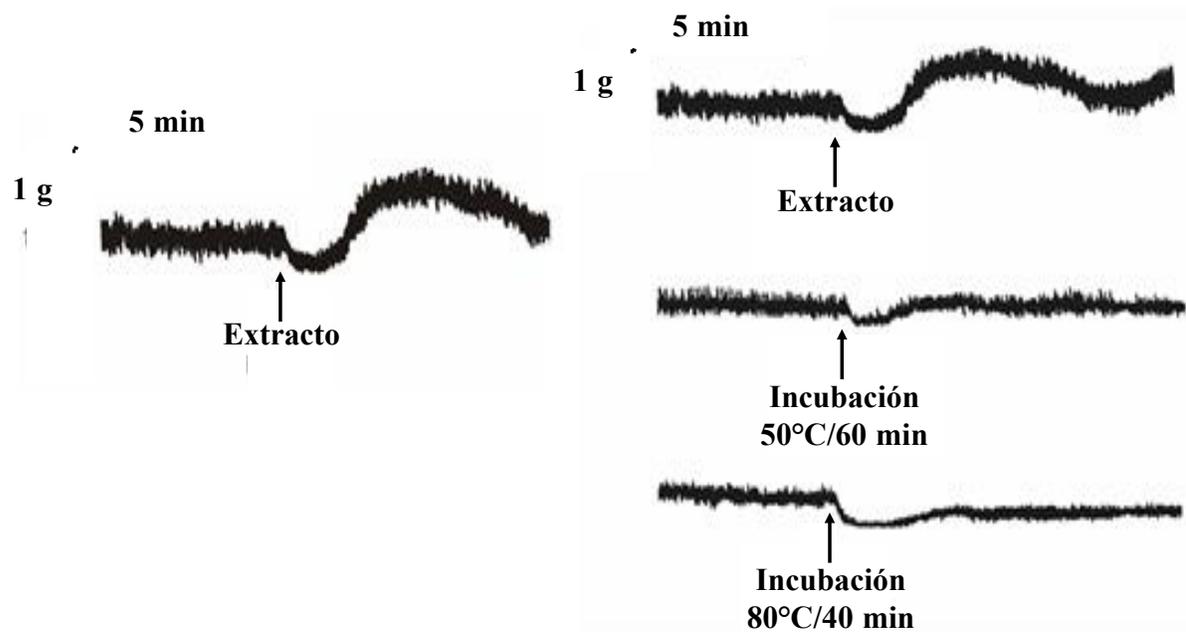
Por otra parte, en el Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), nuestro grupo de trabajo ha llevado a cabo estudios farmacológicos y bioquímicos sobre *M. complanata*. En primer término, se evaluó el efecto del extracto acuoso preparado a partir de este hidrocoral sobre el íleon aislado de cobayo. En ese trabajo se encontró que el extracto de *M. complanata* induce un efecto excitatorio en el íleon, mediante un mecanismo que involucra la entrada de Ca<sup>2+</sup> al interior de las células del músculo liso intestinal, provocado por la presencia de proteínas con un rango de peso molecular de 17-44 kDa y péptidos menores a 1.8 kDa (Rojas *et al.* 2002). En estudios más recientes llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo, se encontró que el extracto acuoso de *M. complanata* produce vasoconstricción de la aorta de rata, además de que posee actividad hemolítica y de PLA<sub>2</sub>. El extracto de *M. complanata* se sometió a un fraccionamiento cromatográfico en fase reversa, el cual condujo la obtención de una proteína de 30 kDa responsable del efecto hemolítico y dos proteínas de 15 y 20 kDa que poseen propiedades vasoconstrictoras (Ibarra-Alvarado *et al.* 2007). Las actividades hemolíticas y de PLA<sub>2</sub> fueron abolidas cuando el extracto crudo de *M. complanata* se incubó a la temperatura de ebullición del agua por 20 minutos. Sin embargo, aunque los efectos contráctiles en el músculo liso arterial e intestinal fueron reducidos, no fueron completamente bloqueados (García-Arredondo *et al.* 2011). El extracto de *M. complanata* induce violentas convulsiones y muerte en ratones en un período de un minuto (DL<sub>50</sub> = 4.62 µg proteína/g de peso corporal) y dosis menores de la DL<sub>50</sub> produjeron daños histopatológicos en riñones y pulmones; estos efectos, que se atribuyen a las citolisinas presentes en el extracto, desaparecieron cuando el extracto se incubó a temperatura de ebullición 20 minutos; sin embargo el efecto letal no se vio afectado. El análisis cromatográfico del extracto permitió el aislamiento de una proteína vasoconstrictora de 61 kDa y una fracción (MC-IIA) que inducía vasoconstricción de aorta y hemólisis retardada, así como letalidad en ratones; en esta fracción se encontraron al menos cuatro

compuestos no proteicos. El análisis de espectroscopía de masas y resonancia magnética nuclear, indicaron que estos metabolitos eran alquilbencenos polioxigenados (García-Arredondo *et al.* 2015).

Con respecto al estudio de *M. alcornis*, un extracto obtenido por agitación en amortiguador Sörensen de especímenes de Florida, provocó una extensa hemólisis y muerte en ratones después de varias horas cuando se administró por vía intraperitoneal a una concentración de 15-20 µg de proteína/20 g de peso (Wittle & Wheeler 1974).

El fraccionamiento cromatográfico con DEAE-celulosa y Sephadex G-100 del extracto de *M. alcornis* condujo a la purificación parcial de una proteína de aproximadamente 100 kDa, la cual incrementó su toxicidad 14 veces con respecto al extracto original (Wittle *et al.* 1971).

Nuestro grupo de trabajo también ha abordado el estudio de *M. alcornis*. En evaluaciones preliminares, se encontró que el extracto acuoso de este hidrocoral induce un efecto bifásico sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. Este efecto se caracteriza por una inhibición inicial del tono y de la amplitud de las contracciones del íleon, seguida de un efecto excitatorio (Figura 2). El extracto se sometió a dos condiciones de incubación (50°C durante 60 min y 80°C durante 40 min) y posteriormente, se evaluó en el modelo del íleon. En estos experimentos se observó que el efecto excitatorio disminuyó de manera considerable, en tanto que el efecto inhibitorio no se modificó de manera significativa (Figura 2B).



**Figura 2.** Efecto del extracto acuoso de *M. alcicornis* sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. A) Extracto acuoso a una concentración de 1.21 mg/ml; B) Extracto acuoso a una concentración de 1.21 mg/ml, y sometido a incubación a 50°C y 80°C.

Recientemente, nuestro grupo demostró que el extracto acuoso de *M. alcicornis* indujo hemólisis en eritrocitos de rata, exhibió actividad PLA<sub>2</sub> y ejerció un efecto contráctil, de anillos de aorta de rata, el cual es dependiente de la concentración (García-Arredondo et al. 2011).

### 3 JUSTIFICACIÓN

Los análisis preliminares efectuados con el extracto acuoso de *M. alcicornis* indicaron que este hidrocoral representa una fuente potencial valiosa de nuevas moléculas bioactivas, ya que produce compuestos con diferentes efectos farmacológicos, entre los que se incluyen compuestos termoestables que inhiben las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo y compuestos termolábiles que estimulan la contractilidad de este tejido. Actualmente, se desconoce la identidad de dichos compuestos, su mecanismo de acción y su grado de participación en la toxicidad inducida por este organismo. Por este motivo, resulta muy interesante profundizar en el estudio bioquímico y farmacológico de esta especie con el objeto de caracterizar la estructura primaria y elucidar el mecanismo de acción de los compuestos que modifican la contractilidad del íleon aislado de cobayo. Actualmente, sólo se tiene una idea con relación a su mecanismo de acción, ya que los estudios bioquímicos y farmacológicos realizados sobre estos hidrocorales solamente han permitido detectar la presencia de toxinas con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> y toxinas que modifican la conductividad iónica membranal del músculo liso intestinal y arterial. Más aún, se desconoce el tratamiento adecuado para tratar las lesiones originadas por estos organismos. De tal manera, que los resultados derivados del estudio bioquímico y farmacológico de esta especie permitirán la obtención de novedosas moléculas que podrían constituir prototipos estructurales de nuevos compuestos con aplicación farmacéutica y biotecnológica o que puedan servir como herramientas de investigación. Asimismo, los resultados de dicho estudio pueden contribuir al diseño de terapias adecuadas para tratar las lesiones ocasionadas por los hidrocorales del género *Millepora*. Finalmente, se podrá tener una mayor comprensión acerca de los mecanismos de defensa, predación, supervivencia y trascendencia ecológica de estas especies.

## 4 HIPÓTESIS

El extracto acuoso del hidrocoral *Millepora alcicornis* contiene citolisinas formadoras de poros y con actividad de PLA<sub>2</sub>, así como toxinas que modulan la contractilidad intestinal.

## 5 OBJETIVOS

### General

Caracterizar los efectos farmacológicos y toxicológicos inducidos por el extracto acuoso de *M. alcicornis* y realizar su análisis cromatográfico a fin de purificar las principales citolisinas y las toxinas que modulan la contractilidad intestinal.

### Específicos

- Analizar el efecto del extracto acuoso de *M. alcicornis* sobre la musculatura lisa intestinal, mediante el modelo de íleon aislado de cobayo, para detectar la presencia de compuestos que modifican la contractilidad intestinal.
- Determinar la toxicidad sistémica *in vivo* inducida por el extracto acuoso de *M. alcicornis*, empleando los modelos de toxicidad aguda en ratones y el ensayo de toxicidad en *Artemia salina*.
- Caracterizar la actividad hemolítica inducida por el extracto acuoso de *M. alcicornis* ante variaciones de pH y temperatura y en presencia de diferentes cationes divalentes.
- Determinar las actividades de PLA<sub>2</sub> y proteolítica del extracto acuoso de *M. alcicornis*, a fin de detectar enzimas implicadas en la actividad toxicológica.
- Detectar la presencia de citolisinas, con o sin actividad enzimática, en el extracto acuoso de *M. alcicornis* y determinar su peso molecular, mediante zimografía.
- Examinar, mediante técnicas de microscopía, los efectos tóxicos que produce el extracto acuoso de *M. alcicornis* sobre las membranas de eritrocitos y tejidos de *A. salina*.
- Analizar, mediante métodos cromatográficos, el extracto acuoso de *M. alcicornis* a fin de purificar las principales citolisinas y las toxinas que modulan la contractilidad intestinal.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Recolección del hidrocoral, preparación del extracto acuoso de *M. alcornis* y determinación de proteína

En noviembre del 2008 se realizó la colecta de los especímenes en las costas del estado de Quintana Roo, dentro del parque nacional Arrecifes de Puerto Morelos, en los lugares conocidos como “La Bocana Chica” y “Jardines” a profundidades de 4 – 10 m. Los fragmentos fueron inmediatamente transportados a las instalaciones del ICMYL en Puerto Morelos, se congelaron y almacenaron en hielo seco y se transportaron a las instalaciones del Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, donde se preparó el extracto.

Para la preparación del extracto, los fragmentos provenientes de los dos lugares se procesaron por separado. Los nematocistos de los hidrocorales se descargaron, sometiendo los fragmentos a agitación con agua desionizada (pH 7) durante 18 h a 4 °C. El extracto obtenido se centrifugó a 3,000 rpm (2,060 x g) y se recuperó el sobrenadante, el procedimiento se repitió una vez y el extracto resultante se liofilizó y resuspendió en agua desionizada en una relación de 150 mg (liofilizado)/ml. El extracto resuspendido se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró utilizando filtros con un tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore). El filtrado se liofilizó y se almacenó a -20 °C hasta su uso en los bioensayos. Se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford, usando una curva estándar preparada con albúmina de suero de bovino liofilizado (Bradford 1976).

### 6.2 Efecto del extracto acuoso de *M. alcornis* sobre el músculo liso intestinal y el sistema nervioso entérico

Con la finalidad de determinar y corroborar el efecto bifásico de las toxinas contenidas en el extracto normal y desnaturalizado, se empleó el ensayo de íleon aislado de cobayo. Se sacrificaron por decapitación, cobayos machos de entre 500 – 800 g, y se removió el íleon. Segmentos de íleon (1 cm) se montaron en celdas con solución de Krebs-Henseleit (D-glucosa 11 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM) a 37 °C gasificada constantemente con una mezcla de 95 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las contracciones espontáneas de los tejidos se registraron por medio de transductores de fuerza Grass FT03 acoplados a un polígrafo Grass 7D. Después del ajuste a la tensión basal de 1 g por un período de 10 minutos, se analizó el efecto del extracto normal y desnaturalizado, los cuales se adicionaron por separado a diferentes concentraciones

(0.01, 0.1, 1, 10 y 100 µg proteína/ml). El efecto excitatorio se expresó como el porcentaje de la contracción inducida por acetilcolina a una concentración 1 µM, que se utilizó como control positivo (Samuelsson 1991; Rojas *et al.* 2002).

### **6.3 Caracterización toxicológica del extracto**

#### **6.3.1 Determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) y análisis de la toxicidad sistémica *in vivo***

Para este ensayo, se utilizaron ratones macho CD1 con un peso de 20 ± 3 g, que fueron proporcionados por el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. El extracto se inyectó por vía intravenosa (*i.v.*) en la vena caudal de los ratones, utilizando diferentes dosis del extracto (0.16, 0.32, 1.5, 3.0, 6.0, 12, 24 y 48 µg de proteína/g de peso corporal) disuelto en 200 µl de solución salina. Adicionalmente, el extracto se incubó a la temperatura de ebullición por 20 min con la finalidad de desnaturalizar las proteínas presentes. El extracto desnaturalizado se administró vía *i.v.*, empleando el mismo rango de concentraciones que el extracto normal. Los ratones control se inyectaron con 200 µl de solución salina. Las muertes que ocurrieron durante las primeras 24 horas después de la administración del extracto fueron registradas para calcular la DL<sub>50</sub>, utilizando un análisis Probit (Finney 1971). Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los Estándares Oficiales Mexicanos NOM-062-Z00-1999 para la producción cuidado y uso de animales de laboratorio y los estándares de ética para experimentos en animales, recomendado por la Sociedad Internacional de Toxinología.

#### **6.3.2 Estudios histopatológicos**

Se analizaron los cambios histológicos causados por la administración del extracto de *M. alcicornis*, utilizando los ratones empleados para la determinación de la DL<sub>50</sub>. Los ratones control y los que sobrevivieron a la administración del extracto normal y desnaturalizado se sacrificaron por dislocación cervical a las 24 horas de la administración, se les realizó una incisión en el estómago y se fijaron en una solución buffer de formol (6.5 mg de fosfato de sodio dibásico, 4 g de fosfato de sodio monobásico, 900 ml de agua destilada y 100 ml de formol). Secciones de pulmón, riñón, hígado corazón, músculo esquelético y cerebro se deshidrataron en series crecientes de alcohol, se aclararon en series de xileno y posteriormente, fueron embebidas en bloques de parafina. Estos bloques fueron cortados en secciones gruesas (5-6 µm) usando un microtomo Ecoshel 335; éstas se prepararon y se tiñeron con eosina-hematoxilina para su observación microscópica por microscopía de luz (ML) con un microscopio DM500.

### 6.3.3 Determinación de la letalidad en *Artemia salina*

Este bioensayo se utilizó para determinar la toxicidad del extracto de *M. alcornis* normal y desnaturalizado sobre larvas del crustáceo *A. salina*. Se utilizaron 25 mg de huevos de *A. salina* y se colocaron en un medio salino sintético preparado según las instrucciones de la caja (Instant Ocean, USA) a una temperatura entre 20 y 30 °C con burbujeo constante de aire. Después de 48 h, los nauplios que eclosionaron y tenían un día de vida se extrajeron usando una pipeta Pasteur, se colocaron por triplicado en tubos de ensaye (10 por tubo) y se llevaron a un volumen de 5 ml con la solución salina sintética. Los extractos se evaluaron por triplicado a 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100 y 316 µg proteína/ml. Después de 24 h, se contó el número de las larvas muertas y se calculó el valor de la CL<sub>50</sub> por un análisis Probit. También se evaluó la toxicidad del extracto acuoso de *M. complanata* para comparar su toxicidad con la de *M. alcornis*. Como control positivo se usó Tritón X-100 al 0.1 %.

## 6.4 Caracterización de la actividad hemolítica

### 6.4.1 Actividad hemolítica

La determinación de la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. alcornis* se realizó de acuerdo a un método previamente descrito (Rottini *et al.* 1990), con algunas modificaciones. Se utilizaron aproximadamente 3 ml de eritrocitos de sangre fresca (obtenida de rata, conejo, humano, pollo, ratón y cobayo) que se colectó en 50 ml de solución de Alsever (D-glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) 120 mM, citrato de sodio (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O) 30 mM, NaCl 7 mM y ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) 2 mM; pH 7.4); la suspensión se centrifugó a 2,500 rpm (1,430 x g) durante 4 min a 4 °C, el sobrenadante se desechó y se reemplazó por nueva solución de Alsever; el lavado se repitió dos veces más. La suspensión de eritrocitos se calibró con la solución de Alsever a una concentración del 1 %. En la calibración, la hemoglobina liberada por la hemólisis total de 50 µl de eritrocitos disueltos en 950 µl de agua destilada tiene una absorbancia de 1 a una longitud de onda (λ) de 415 nm. Una vez calibrada la suspensión, diferentes concentraciones por triplicado (0.0001 – 100 µg/ml) del extracto, se incubaron junto con 50 µl de la suspensión calibrada de eritrocitos y se llevaron a un volumen de 1 ml con solución de Alsever. Estas muestras 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. Posteriormente, la actividad hemolítica se midió espectrofotométricamente (Lambda Bio, Perkin Elmer, USA) a 415 nm para analizar la hemoglobina liberada en el sobrenadante. Cada experimento fue normalizado con respecto a una hemólisis completa, la cuál se midió diluyendo 50 µl de la suspensión calibrada de eritrocitos en agua destilada. Para el 0 % de hemólisis se diluyeron 50 µl de la suspensión de eritrocitos en solución de Alsever. Ambos controles se incubaron a las mismas condiciones que las muestras. Una

unidad hemolítica media (UH<sub>50</sub>) se definió como la cantidad de sustancia requerida para producir un 50 % de hemólisis.

#### **6.4.2 Efecto de la temperatura en la actividad hemolítica**

Para analizar el efecto de la temperatura sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. alcicornis*, el ensayo hemolítico se llevó a cabo a varias temperaturas de incubación (10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 47, 55 y 60 °C) durante 30 min, tratando de abarcar un rango de temperaturas en el que se asegurara la actividad hemolítica. Por otra parte, con el objeto de analizar la estabilidad térmica de las muestras, éstas se pre-incubaron a diferentes temperaturas (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 °C) por 60 min.

#### **6.4.3 Efecto del pH en la actividad hemolítica**

Se determinó el efecto del pH sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso del hidrocoral. Para este fin, el extracto se incubó por 24 h a 4 °C con varios amortiguadores en un rango de pH de 0 - 13 (KCl-HCl 0.2 M (pH 1 - 2 y 12 - 13), Ácido acético-acetato 0.1 M y 0.02 M (pH 3 - 5.5), Tris-HCl 0.5 M (pH 7 - 9); Ácido bórico-borato de sodio 0.02 M (pH 6 - 7) y NaHCO<sub>3</sub>-NaOH 0.025 M (pH 10 - 11)). Después de la incubación, se evaluó el efecto hemolítico del extracto.

#### **6.4.4 Efecto de diferentes cationes divalentes en la actividad hemolítica**

Para evaluar el efecto que tienen diferentes cationes divalentes (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sobre la actividad hemolítica del extracto, éste (UH<sub>50</sub>) se incubó en presencia de cada uno de los cationes y el EDTA, (0.001 – 12 mM para los cationes divalentes y 0.00004 – 0.5 mM para el EDTA).

#### **6.4.5 Efecto de un inhibidor de la PLA<sub>2</sub> sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. alcicornis***

A fin de determinar el efecto de un inhibidor de la actividad de PLA<sub>2</sub> (*p*-bromofenacilo bromuro, *p*-BPB) sobre la hemólisis producida por el extracto acuoso de *M. alcicornis*, se incubó con el inhibidor a diferentes concentraciones (0.3, 1 y 3.3 mM *p*-BPB) en la solución de Alsever por 22 h a 4 °C.

### **6.5 Determinación de la actividad de PLA<sub>2</sub>**

Se determinó la actividad de PLA<sub>2</sub> del extracto normal y desnaturalizado. La actividad enzimática se llevó a cabo mediante el empleo de un kit para la determinación de la actividad de PLA<sub>2</sub> secretada (Cayman Chemical®, MI, U.S.A). La actividad de la PLA<sub>2</sub> se expresó como micromoles de fosfatidilcolina hidrolizada por minuto por gramo de proteína (Ibarra-Alvarado, *et al.* 2007).

### **6.6 Determinación de la actividad proteolítica**

Se evaluó la actividad proteolítica del extracto acuoso de *M. alcicornis* de acuerdo al método de Murata y col (1963). Se incubaron 0.4 ml de caseína (al 2 % en 0.2 M de amortiguador Tris-HCl a pH 8.5) en presencia del extracto a 20, 40, 60, 80 y 100 µg de proteína a 37 °C por 2 h. La reacción se detuvo, adicionando 1.5 ml de 0.44 M de ácido tricloroacético, el cual se dejó actuar por un período de 30 min y entonces, la mezcla de reacción se centrifugó a 1500 rpm por 15 min. A una alícuota de la mezcla de reacción (1.0 ml) se le adicionaron 2.5 ml de 0.4 M de carbonato de sodio y 0.5 ml del reactivo de Folín diluido 1:2. El color desarrollado se leyó a 660 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para aumentar la absorbancia de 0.01 a 600 nm/h a 37 °C. La actividad se expresó como µmol sustrato/min/mg proteína a 37 °C. Se utilizó como control positivo proteasa de *Streptomyces griseus* de Sigma-Aldrich® (Murata *et al.* 1963).

### **6.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida y zimografía**

Se realizó un análisis electroforético en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) como previamente describieron Schagger & Von Jagow (1987). Se analizaron muestras de 10 µg de proteína en geles discontinuos de poliacrilamida al 12 %, a 90 V durante 30 min y posteriormente a 120 V durante 2 h a 4 °C. Las bandas de proteína se visualizaron mediante las técnicas de tinción de Coomassie y tinción de plata. Para la determinación de los pesos moleculares relativos de las proteínas presentes en las muestras, los estándares de peso molecular que se utilizaron fueron: Miosina, β-galactosidasa, seroalbúmina bovina, ovalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina de soya, lisozima y aprotinina, con pesos moleculares de: 209, 124, 80, 49, 35, 29, 21 y 7 kDa respectivamente (no. cat. 161-0318 y 161-0309 obtenidos de Bio-Rad CA, USA).

A fin de establecer las concentraciones de proteína que se utilizarían en los geles de electroforesis para la realización de los zimogramas, se realizaron ensayos en cajas Petri con agarosa y los sustratos, a fin de detectar actividad hemolítica y de PLA<sub>2</sub>. Se evaluaron 40 y 80 µg de proteína proveniente del extracto, del control positivo (PLA<sub>2</sub> de abeja) se evaluaron 10 y 20 ng; como control

negativo se utilizó agua destilada. De cada muestra a evaluar se adicionaron 20 µl sobre un pozo de medio cm de diámetro realizado al medio contenido en las cajas Petri.

Se identificaron proteínas con actividad de PLA<sub>2</sub>, y se determinaron sus pesos moleculares usando una técnica de zimografía con algunas modificaciones (Campos *et al.* 2013). 80 µg de proteína proveniente del extracto acuoso, se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12 % solo en condiciones desnaturalizantes, a 90 Volts durante 30 min y posteriormente, a 120 V durante 2 h a 4 °C. Al finalizar la electroforesis, los geles se lavaron durante 1 h con Tris-HCl 100 mM pH 7.4 (con 1.0 % Tritón X-100) para remover trazas de dodecil sulfato de sodio (SDS), y se incubaron por 15 h a temperatura ambiente con Tris-HCl 50 mM pH 7.4 (con NaCl 140 mM y CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM) sobre un gel de agarosa al 2 % preparado con Tris-HCl 50 mM y 6 % de yema de huevo. Se usaron como un control positivo, 20 ng de la PLA<sub>2</sub> de veneno de abeja (*Apis mellifera*).

Se detectaron las proteínas que presentaron actividad hemolítica y se determinaron sus pesos moleculares usando la técnica modificada de zimografía. El gel de electroforesis se analizó con 80 µg de proteína proveniente del extracto, a 90 V a 4 °C bajo condiciones desnaturalizantes, pero no reductoras. Al terminar la corrida, el gel se lavó con Tris-HCl 100 mM durante 1 h. Posteriormente, el gel se incubó durante 4 h a temperatura ambiente sobre un gel de agar al 1.5 %, el cual fue preparado adicionando yema de huevo al 5 % a 60 °C y eritrocitos lavados al 3 % adicionados a 40 °C, en amortiguador fosfato salino (PBS) pH 7.4 adicionado con CaCl<sub>2</sub> 10 mM. La presencia de una banda clara en el gel de agar indicó la presencia de hemolisinas.

#### **6.8 Análisis mediante microscopía de los efectos tóxicos que produce el extracto acuoso de *M. alcicornis* sobre las membranas de eritrocitos de rata y tejidos de *A. salina***

Con el objetivo de observar las alteraciones morfológicas inducidas por el extracto acuoso de *M. alcicornis*, los nauplios de artemias empleadas en la prueba de letalidad y muestras de eritrocitos de rata obtenidos del ensayo hemolítico se sometieron a un análisis microscópico. Las larvas de artemia se observaron al microscopio de luz. Para observaciones en microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM), las células y tejidos fueron fijados en solución isotónica, conteniendo 3 % de glutaraldehído y 0.1 M de cacodilato de sodio, post-fijados en 2 % de OsO<sub>4</sub> en amortiguador de cacodilato, y deshidratados en series de etanol. Entonces, para observación en TEM, las muestras se embebieron en resina epóxica Epon, los bloques obtenidos fueron cortados (60 nm) en un ultramicrotomo (Mtx RMC®, Boeckler Instruments, USA) y contrastados con acetato de uranil y citrato. Estas secciones se observaron en un microscopio electrónico (JEM 1010, Jeol, USA) operado a 80 kV. Para el análisis por SEM, las muestras se secaron en un aparato secador de punto crítico

(Polaron E5000, Quorum Technologies, UK), cubiertas con carbón, en un evaporador (JEE4X, JEOL, USA) y con una delgada capa de oro en un recubridor iónico (Polaron 11-HD, Quorum Technologies, UK) y finalmente, fueron observadas con microscopio de escaneo electrónico (DSM 950, Zeiss International) a una aceleración de voltaje de 20-25 kV.

## **6.9 Separación de toxinas que: i. Modulan la contracción del músculo liso intestinal y ii. Presentan actividad hemolítica**

### **6.9.1 Análisis cromatográfico del extracto acuoso**

En una primera fase, se realizó un fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso de *M. alcornis*. En esta fase se utilizó cromatografía de intercambio aniónico, para cual se empleó una columna de DEAE celulosa. La celulosa se activó en una solución de HCl 0.5 M y se dejó reposar 1 h; posteriormente, se extrajo la solución de HCl con una bomba de vacío. La celulosa se lavó varias veces con agua desionizada hasta que la solución alcanzó un pH de 7. Posteriormente, se resuspendió en una solución de NaOH 0.5 M y se dejó reposar una hora; después se enjuagó con agua desionizada varias veces hasta alcanzar un pH de 7.

Una vez activada la celulosa, se dejó reposar en una solución amortiguadora de acetato de amonio 10 mM, se extrajo la solución y la celulosa se volvió a resuspender en el amortiguador. La celulosa resuspendida se colocó en una columna de plástico de 600 ml y se realizó el fraccionamiento preliminar del extracto mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), utilizando un equipo Pharmacia Biotech. Se realizó una inyección de 8.5 mg de proteína contenidos en 1 ml. El flujo de elución de la fase móvil fue de 6 ml/min, a una longitud de onda del detector de 280 nm. Las soluciones amortiguadoras con las que se realizó la elución fueron: solución de acetato de amonio 10 mM a un pH de 7.4 (solución A) y NaCl 1M en acetato de amonio 10 mM a un pH de 7.0 (solución B). El asa que se utilizó fue de 10 ml. La elución de las fracciones se llevó a cabo con un gradiente escalonado, haciendo pasar 100 % de solución A durante 150 min, al término de este período, el flujo cambió a 75 % de solución A y 25 % de solución B, y en el min 300, el flujo se cambió a 100 % de solución B.

Posteriormente, las fracciones obtenidas, se desalaron mediante cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna con Sephadex G-15 tamaño medio, de Sigma®, la cual se preparó colocando el Sephadex en agua destilada durante 24 h. Después, éste se resuspendió en ácido acético a una proporción 1:3 (Sephadex: ácido acético 1.6 mM). La solución sobrenadante se desechó y se repitió la operación dos veces más. Posteriormente, el Sephadex se colocó en una columna de un volumen de 66.36 ml. El flujo al que eluyó la fase móvil fue de 1 ml/min, la elución de las fracciones

se hizo con amortiguador de acetato de amonio 1.6 mM pH 7.4, a una longitud de onda del detector de 280 nm. El asa que se utilizó fue de 500  $\mu$ l.

Las principales toxinas presentes en las fracciones bioactivas obtenidas a partir del análisis cromatográfico se aislaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAR) en fase reversa, utilizando un equipo Waters 600, con una columna analítica C-4 (YMC-Pack, 10 X 250 mm; 5  $\mu$ m de diámetro de partícula; 300 Å de tamaño de poro) equipada con una precolumna C-4 (YMC-Pack, 10 X 4.6 mm; 5  $\mu$ m de diámetro de partícula; 300 Å de tamaño de poro) y un asa de 20  $\mu$ l. El flujo que se utilizó fue de 1.5 ml/min, empleando un detector Waters 2998 (Photodiode array detector), a una longitud de onda de detección de 280 nm. Como fase móvil se usó agua con TFA al 0.1 % (solución A) y acetonitrilo en agua al 90 % con TFA al 0.085 % (solución B). Se usó un análisis isocrático, haciendo pasar 100% de solución A durante 15 min, posteriormente, se cambió a 100% de solución B en un período de 30 min. Por último, el gradiente se cambió a 100% de solución A en un período de 5 min.

Para el monitoreo de la actividad biológica durante el proceso de separación de las toxinas, se emplearon el modelo de ileon aislado de cobayo, la determinación de la actividad hemolítica y la cuantificación de la actividad de PLA<sub>2</sub>.

## **6.10 Secuenciación parcial de las fracciones bioactivas**

### **6.10.1 Análisis de la estructura primaria por degradación de Edman**

Para determinar las secuencias parciales de las proteínas de interés, una alícuota de las fracciones fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante; las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Sequi-Blot PVDF Membrane for Protein Sequencing, Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo a 100 V durante 2 h en amortiguador de corrida. Al término de este tiempo, se retiraron las membranas y se colocaron otras nuevas para repetir la transferencia durante 1 h. Las membranas se tiñeron con azul de Coomassie R - 250 (al 0.025 % en metanol al 40 %) durante 30 min, se destiñeron con metanol al 50 % y se dejaron secar. Posteriormente, las bandas de interés fueron cortadas y almacenadas a -20 °C para su posterior análisis. Se realizó una segunda transferencia, con el objeto de garantizar que toda la proteína se pasara del gel a las membranas.

El análisis de las secuencias se llevó a cabo mediante degradación de Edman en el sistema de Procise 491 Protein Sequencing System (Applied Biosystems, Foster City CA), usando el método "pulsed Liquid PVDF" y los patrones 20 Amino Acid PTH Standard de Perkin Elmer Applied Biosystems (Part number 400879)".

### 6.10.2 Análisis de las secuencias por espectrometría de masas

Algunas toxinas se analizaron por espectrometría de masas. Las bandas provenientes del análisis cromatográfico se enviaron a la unidad de Proteómica, del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca Morelos. Ahí, las muestras fueron previamente reducidas con DTT, alquiladas con iodoacetamida (Sigma Aldrich) y digeridas “in gel” con tripsina (Tripsina modificada grado secuenciación de Promega). Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema CL-EM constituido de un cromatógrafo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fisher Co. San José, CA) con “splitter” (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San José, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un gradiente de 10 – 100 % de disolvente B (acetonitrilo/ácido acético 0.1 %) durante 120 min en una columna capilar PicoFrit Proteopep 2 C18 75  $\mu\text{m}$  DI  $\times$  50 mm (New Objective Inc., Woburn, MA). El flujo del sistema de CL fue de 400 nl/min. Para la fragmentación de los péptidos, se utilizaron los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HECD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 2<sup>+</sup> y 3<sup>+</sup> fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. No se consideraron los iones con cargas 1<sup>+</sup>, superiores a 4<sup>+</sup> o con cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positiva. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones, siguiendo las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 ( $m/z$ ); la energía de colisión normalizada fue de 35 unidades arbitrarias; activación Q de 0.250; tiempo de activación de 40 ms y tiempo máximo de inyección de 10 ms por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos, se utilizó la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 15 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 60 s. Los datos espectrométricos fueron analizados de forma manual y automática. La búsqueda de forma automática se realizó contra la base de datos del NCBI a través del programa Matrix Science (Mascot Search Result) y Protein Prospector. Las secuencias también se alinearon con CLUSTALW2 en línea (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Los péptidos obtenidos de la digestión con tripsina de las bandas activas por zimografía, fueron analizados por un sistema CL-EM de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fisher Co. San Jose, CA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA) con un sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621. En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizaron el mismo sistema de gradiente y tiempo de análisis que las descritas en el análisis de las bandas provenientes del análisis cromatográfico, pero utilizando una columna capilar empacada manualmente (DI 0.75  $\mu\text{m}$  y 10 cm de largo RP-C18). El

flujo del sistema de CL fue de 300 nanolitros/minuto. Para la fragmentación de los péptidos se utilizaron los métodos anteriormente descritos, donde solamente los iones con carga  $2^+$ ,  $3^+$  y  $4^+$  fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. No se consideraron los iones con cargas  $1^+$ , superiores a  $5^+$  y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 ( $m/z$ ), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizada la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos. Los datos espectrométricos fueron analizados de forma manual y automática. La búsqueda de forma automática se realizó contra la base de datos del NBCInr a través del programa Protein Prospector, y contra PDB de UniProt de *Millepora* a través del programa Proteome Discoverer 1.4. Las secuencias obtenidas se sometieron al programa BLAST para observar si tiene homología con algún otro organismo. Las secuencias también se alinearon con CLUSTALW2 en línea (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

## 7 RESULTADOS

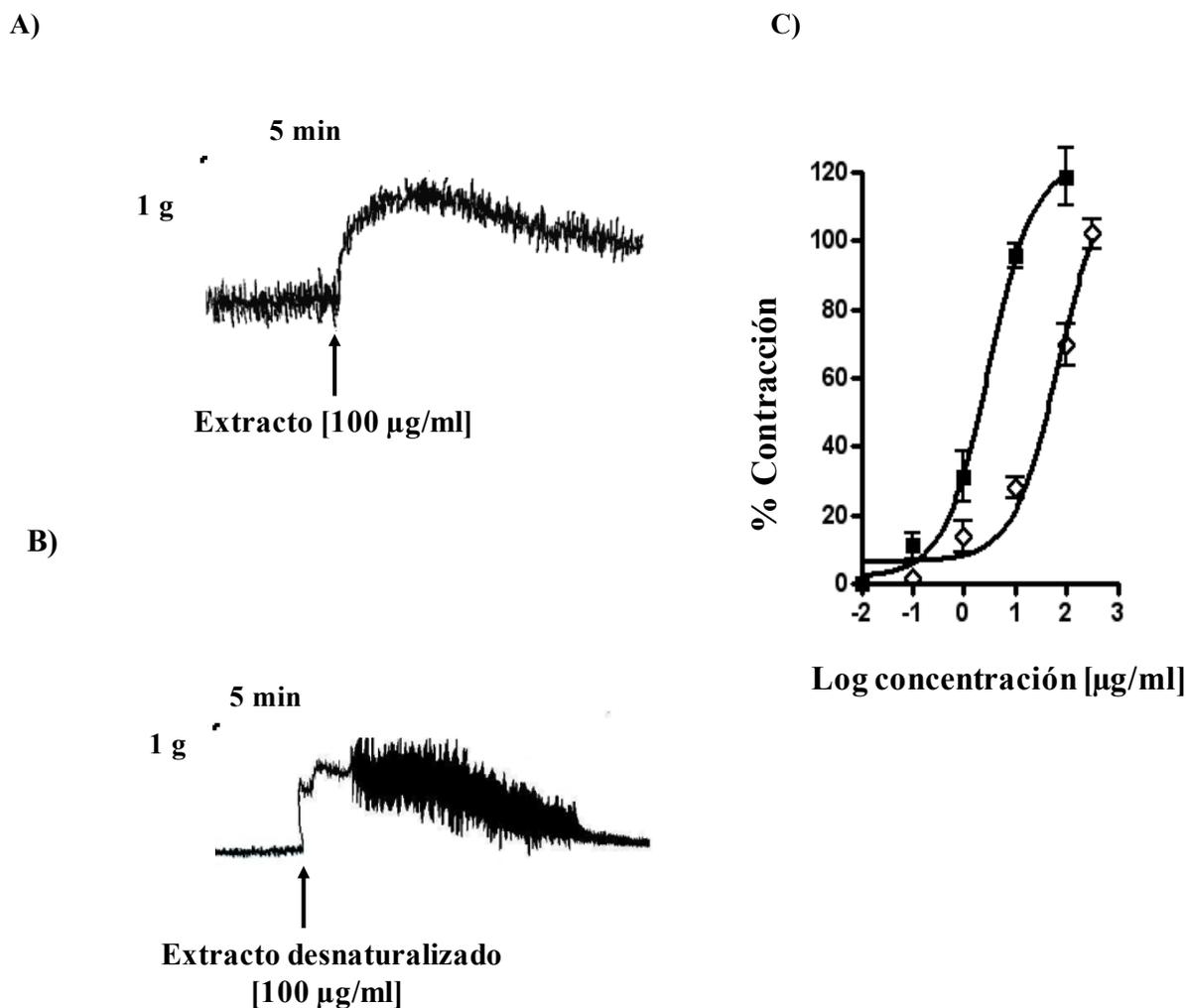
### 7.1 Obtención del extracto acuoso de *M. alcicornis* y determinación de proteína

Se obtuvo el extracto acuoso de *M. alcicornis* de acuerdo a la metodología descrita en materiales y métodos. Para lo cual se utilizaron 1.440 kg del hidrocoral recolectado en La Bocana Chica y 0.52 kg del recolectado en Jardines, los extractos de los dos lugares se obtuvieron por separado, realizando para cada uno de ellos dos extracciones.

Se elaboró una curva estándar en la que se utilizó albúmina de suero bovino a diferentes concentraciones (0 – 20  $\mu\text{g/ml}$ ), la absorbancia se midió a 595 nm. Posteriormente, estos extractos se liofilizaron y a cada extracto se le determinó la cantidad de proteína total mediante el método de Bradford (1976). De los extractos provenientes de la colecta de la Bocana se obtuvieron 676.8 mg de proteína (40  $\mu\text{g}$  de proteína/mg de liofilizado) y de los extractos provenientes de la colecta de Jardines se obtuvieron 331.8 mg de proteína (42  $\mu\text{g}$  de proteína/mg de liofilizado). Considerando que del extracto proveniente de la Bocana se obtuvo una mayor cantidad de proteína, se decidió trabajar con éste para continuar con el estudio farmacológico, toxinológico y químico.

### 7.2 Efecto del extracto acuoso de *M. alcicornis* sobre el músculo liso intestinal y el sistema nervioso entérico

Se evaluó el efecto del extracto acuoso normal y desnaturalizado (incubado a temperatura de ebullición 20 min) en el íleon aislado de cobayo, utilizando diferentes concentraciones de proteína (0.01, 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$ ). El extracto acuoso de *M. alcicornis* indujo un efecto excitatorio, el cual es dependiente de la concentración ( $\text{CE}_{50} = 2.98 \pm 1.06 \mu\text{g/ml}$ ). El extracto desnaturalizado también presentó un efecto contráctil, aunque este efecto fue significativamente menor al del extracto normal ( $\text{CE}_{50} = 66.47 \pm 1.18 \mu\text{g/ml}$ ) (Figuras 3A y B), lo que provocó el desplazamiento a la derecha, de la curva concentración respuesta (CCR) (Figura 3C).



**Figura 3.** Efecto excitatorio producido por el extracto acuoso de *M. alcornis*. A) antes y B) después de la incubación C) CCR mostrando el efecto excitatorio del extracto de *M. alcornis* antes (símbolos cerrados) y después de la incubación (símbolos abiertos).

### 7.3 Caracterización toxicológica del extracto

#### 7.3.1 Letalidad en ratones y toxicidad sistémica *in vivo*

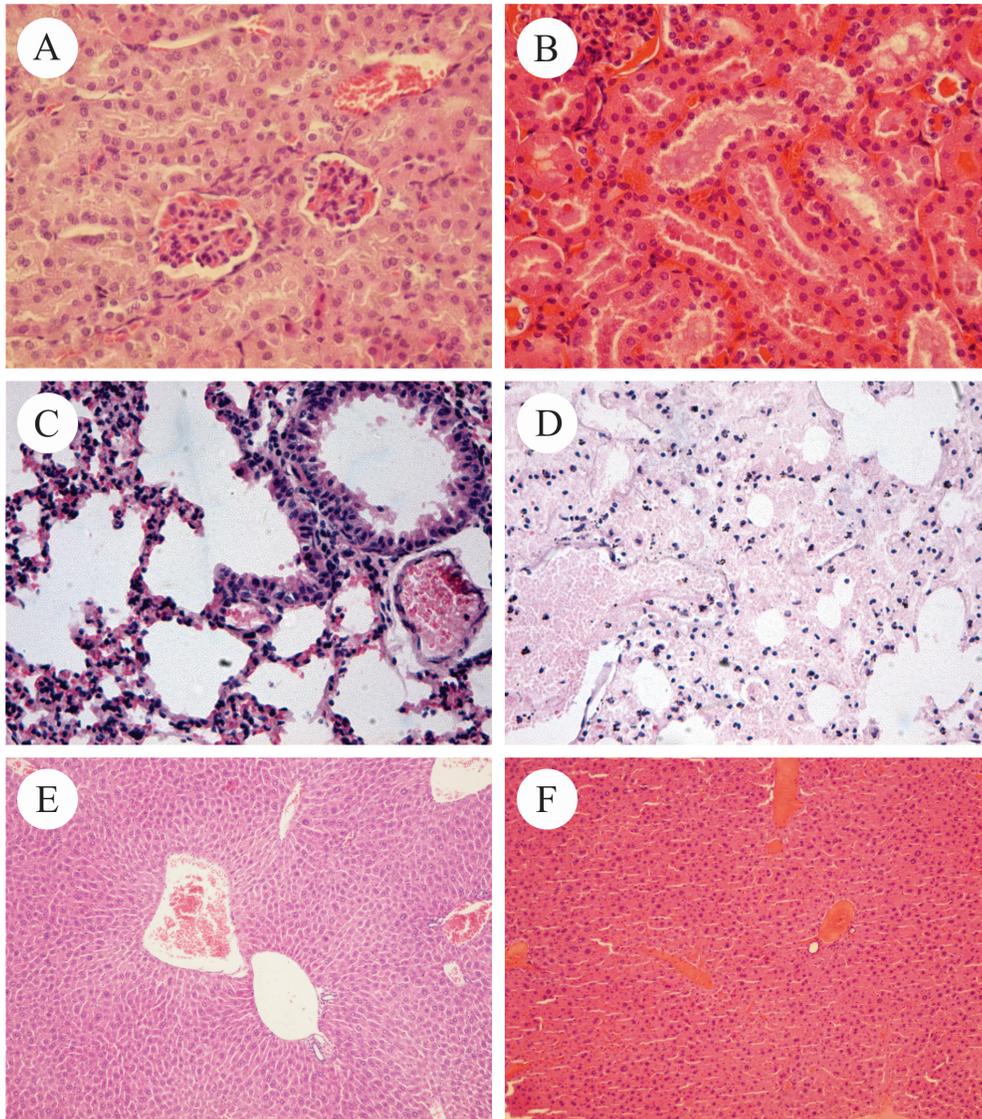
El extracto de *M. alcornis* se administró en ratones vía *i.v.* a diferentes concentraciones (0.16, 0.32, 1.5, 3.0, 6.0, 12, 24 y 48 µg de proteína/g de peso corporal) con la finalidad de determinar su letalidad y sus efectos tóxicos sistémicos.

El extracto acuoso de *M. alcornis* indujo letalidad en los ratones, con una  $DL_{50}$  de 17 µg proteína/g de peso corporal. A dosis menores que la  $DL_{50}$  (1.5 y 3.0 µg proteína/g), el extracto indujo una respiración forzada inmediatamente después de la administración, pero los ratones se recuperaron

en pocos minutos. Estos ratones también presentaron una pérdida progresiva de respuestas después de la administración del extracto, lo cual usualmente se relaciona con dolor. Sin embargo, gradualmente recuperaron su comportamiento normal. A las dosis de 6 y 12  $\mu\text{g}$  proteína/g, el extracto acuoso también indujo dificultad respiratoria, hipoactividad y otros síntomas como parálisis de las extremidades traseras, hemoglobinuria, inflamación intestinal, y parálisis completa. En algunos casos se presentó fallo respiratorio y convulsiones que precedieron a la muerte. Dosis superiores a la  $DL_{50}$  (24 and 48  $\mu\text{g}$  proteína/g) indujeron síntomas similares a los producidos por las dosis más bajas, aunque en algunos casos, las muertes ocurrieron en un período de tiempo más corto. El extracto acuoso desnaturalizado no mostró ningún efecto en los ratones.

### **7.3.2 Análisis histopatológico**

Las imágenes obtenidas mediante micrografías de luz (ML) mostraron cambios histopatológicos en tejidos de riñón, pulmón e hígado, pero no se observaron alteraciones en corazón, cerebro o músculo esquelético. En las secciones de riñón, los capilares del aparato glomerular se observaron congestionados con material proteináceo en el interior de los túbulos y en algunos casos, se observó necrosis tubular aguda (Figuras 4A y 4B). En las secciones de pulmón, se observó una severa degeneración de las células epiteliales alveolares y descamación, daño a los capilares y una marcada infiltración de eritrocitos y material proteináceo en los alveolos (Figuras 4C y D). Las secciones de hígado mostraron diferentes grados de lesiones patológicas, con congestión aguda vascular y áreas con material fibrinoide mezclado con neutrófilos y apoptosis celular, lo que indicó el desarrollo de reacciones inflamatorias (Figuras 4E y F). Se tomaron algunas muestras de sangre de los ratones, cuatro horas después de la administración del extracto, para la cuantificación de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa, sin embargo, estos experimentos no dieron resultados confiables, ya que las muestras de sangre estaban completamente hemolizadas. La inyección del extracto desnaturalizado no provocó ningún cambio histopatológico en los tejidos examinados.



**Figura 4.** Micrografías de luz de secciones de tejidos después de la administración del extracto acuoso de *M. alcicornis* vía *i.v.* (A) Sección de riñón control, comparado con una (B) sección de riñón de ratón al que previamente se le había administrado el extracto; nótese la severa congestión capilar peritubular. (C) Sección de pulmón de ratón control comparado con una (D) sección de pulmón de un ratón tratado con el extracto, nótese el grosor de la membrana alveolar y las zonas hemorrágicas. (E) Sección de hígado de un ratón control comparado con una (F) sección de hígado de un ratón previamente tratado con el extracto, nótese la aguda congestión vascular y áreas con material fibrinoide. Magnificación de A, B, C y D: 400x, Magnificación de E y F:100x, tinción de hematoxilina-eosina.

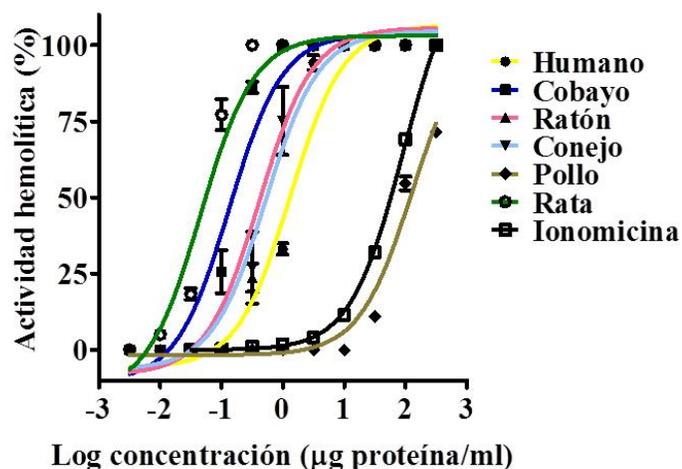
### 7.3.3 Toxicidad en *A. salina*

En el ensayo de toxicidad para *A. salina* se encontró que el extracto acuoso de *M. alvicornis* presenta una significativa toxicidad ( $CL_{50} = 70.71 \mu\text{g/ml}$ ), si se considera que extractos crudos son activos en este ensayo a concentraciones menores de  $1000 \mu\text{g}$  de proteína/ml (Meyer *et al.* 1982). Este extracto resultó ser ligeramente menos tóxico que el de *M. complanata* ( $CL_{50} = 52.08 \mu\text{g/ml}$ ). Cuando el extracto de *M. alvicornis* se desnaturalizó, su toxicidad disminuyó drásticamente ( $CL_{50} = 960.28 \mu\text{g/ml}$ ), y para *M. complanata* el efecto tóxico se mantuvo con el extracto desnaturalizado.

## 7.4 Caracterización de la actividad hemolítica e identificación parcial de una hidralisina

### 7.4.1 Actividad hemolítica

Considerando que las toxinas producidas por otras especies del género *Millepora* presentan actividad hemolítica, se determinó el efecto hemolítico del extracto de *M. alvicornis*, normal y desnaturalizado, a diferentes concentraciones ( $0.0001 - 150 \mu\text{g/ml}$ ). En esta evaluación se encontró que el extracto de *M. alvicornis* produjo una hemólisis dependiente de la concentración (Figura 5), en el caso del extracto desnaturalizado, el efecto hemolítico desapareció, lo cual sugiere que los compuestos responsables de la hemólisis son termolábiles. Los eritrocitos de pollo mostraron mayor resistencia al efecto hemolítico del extracto que los eritrocitos de otras especies (Figura 5 y Tabla 1). En este trabajo, se utilizaron los eritrocitos de rata para caracterizar la actividad hemolítica del extracto. El extracto acuoso de *M. alvicornis* ( $UH_{50} = 0.04 \pm 0.005 \mu\text{g/ml}$ ) fue aproximadamente 2200 veces más potente que la ionomicina ( $UH_{50} = 92.57 \pm 1.01 \mu\text{g/ml}$ ).



**Figura 5.** Curvas concentración-respuesta de la actividad hemolítica producida por el extracto acuoso de *M. alvicornis* sobre los eritrocitos de diferentes especies.

**Tabla 1.** Actividad hemolítica del extracto de *M. alcornis* en eritrocitos de varias especies

<b>Tipo de eritrocitos</b>	<b>Actividad hemolítica (UH<sub>50</sub>)</b>
Rata	0.042 ± 0.005
Cobayo	0.29 ± 0.15
Ratón	0.41 ± 0.015
Conejo	0.63 ± 0.35
Humano	1.0 ± 0.31
Pollo	129 ± 8.2*

Cada valor esta expresado como el promedio ± S.E.M. (n=3).

\* $p < .05$  vs eritrocitos de rata.

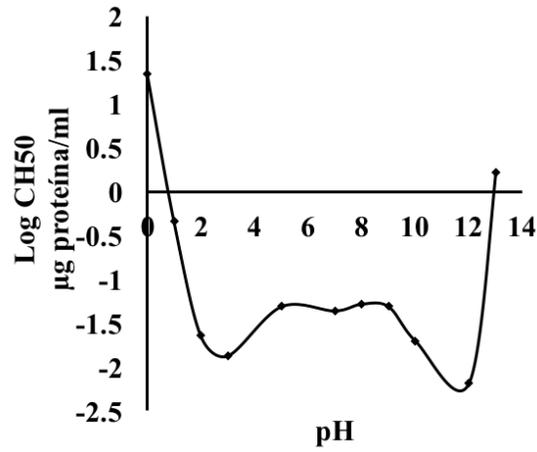
#### 7.4.2 Caracterización de la actividad hemolítica

La actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. alcornis* fue muy estable a los cambios de pH (Figura 6A). Respecto al efecto de la temperatura, se encontró que la mayor actividad hemolítica se presenta entre 40 y 43 °C. Temperaturas menores a 20 °C producen una disminución en la potencia y la eficacia de la hemólisis (Figura 6B). Temperaturas superiores a 55 °C provocaron lisis de los eritrocitos (Figuras 6B y C). El análisis de la estabilidad térmica mostró que la actividad hemolítica se inactivó a temperaturas superiores a 60 °C, mientras que a temperaturas de preincubación menores a 45 °C, la actividad hemolítica del extracto se conservó (Figura 6C).

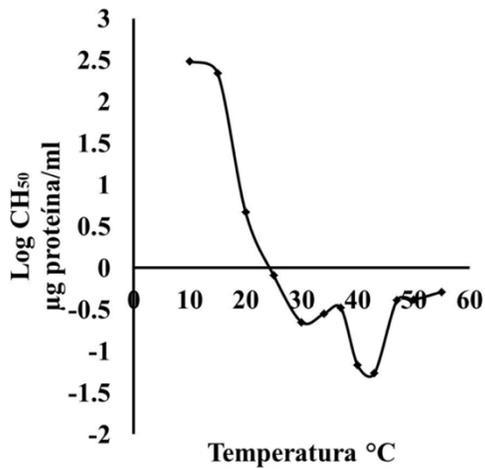
También se evaluó la actividad hemolítica del extracto acuoso, en presencia de cationes divalentes tales como Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Ba<sup>2+</sup>. En estos experimentos, se encontró que la actividad hemolítica era suprimida por Cu<sup>2+</sup> 0.1 mM y Zn<sup>2+</sup> 6 mM. Sin embargo, esta actividad aumentó con la adición de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. En el caso de Ba<sup>2+</sup>, concentraciones menores a 6 mM incrementaron la actividad hemolítica del extracto, mientras que concentraciones superiores a 8 mM provocaron la inhibición de esta actividad (Tabla 2). La actividad hemolítica se redujo al incubar el extracto con EDTA 0.34 mM y rápidamente desapareció con EDTA 0.43 mM (Tabla 3).

La actividad hemolítica del extracto se redujo significativamente después de la incubación con el inhibidor de PLA<sub>2</sub> (*p*-BPB). En estos ensayos, las CCR se desplazaron a la derecha, dependiendo de la concentración del inhibidor (Figura 7A). Los valores obtenidos de las UH<sub>50</sub> del extracto acuoso de *M. alcornis* en presencia del inhibidor se muestran en la Figura 7B.

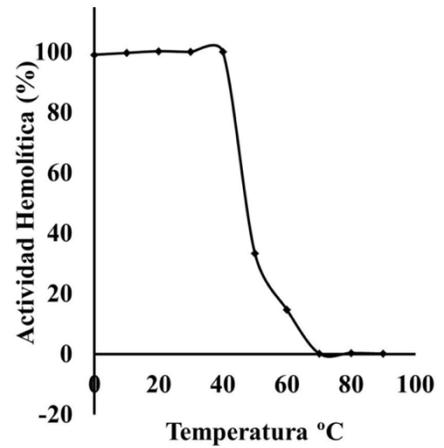
A)



B)



C)



**Figura 6.** Efecto del (A) pH y (B) la temperatura de incubación sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. alcornis*. (C) Estabilidad de la actividad hemolítica del extracto después de su incubación a diferentes temperaturas.

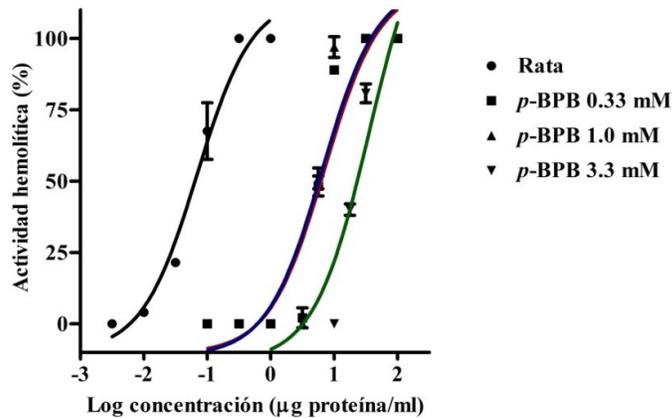
**Tabla 2.** Efecto de cationes divalentes sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. alcornis* evaluado a la UH<sub>50</sub>.

Concentración (mM)	Actividad hemolítica (%)				
	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup>
0.001	48 ± 9	54 ± 4	49 ± 4	66 ± 2	51 ± 6
0.01	49 ± 05	55 ± 1	40 ± 2	68 ± 2	54 ± 5
0.1	52 ± 1	48 ± 3	26 ± 3	65 ± 1	59 ± 6
1	51 ± 4	54 ± 4	29 ± 3	62 ± 0.0	79 ± 2
2	65 ± 4	61 ± 3	7 ± 4	46 ± 1	84 ± 4
4	76 ± 1	57 ± 6	0 ± 0	36 ± 1	81 ± 4
6	98 ± 2	63 ± 3		2 ± 6	83 ± 2
8	100 ± 0.0	73 ± 3		0 ± 0	1 ± 0.0
10	100 ± 0.0	87 ± 2		0 ± 0	0 ± 0.0
12		100 ± 0.00			

**Tabla 3.** Efecto del EDTA sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. alcornis* evaluado a la UH<sub>50</sub>.

Concentración (mM)	Actividad hemolítica (%)
4.3E-05	50 ± 2.0
0.0004	55 ± 7
0.0043	60 ± 3
0.043	58 ± 6
0.086	59 ± 5
0.172	59 ± 1
0.258	57 ± 3
0.344	45 ± 0.00
0.43	0.00 ± 0
0.5	0.00 ± 0

A)



B)

<i>p</i> -BPB (mM)	Actividad Hemolítica UH <sub>50</sub>
- - - -	0.069 ± 0.081
0.33	7.42 ± 0.13
1.0	6.51 ± 0.14
3.3	35.89 ± 0.16

**Figura 7.** A) Curvas concentración-respuesta, mostrando el efecto del inhibidor de PLA<sub>2</sub> *p*-BPB, sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. alcornis*. B) valores de UH<sub>50</sub> obtenidos al incubar el extracto acuoso en presencia del inhibidor *p*-BPB.

### 7.5 Actividad de PLA<sub>2</sub>

Se evaluó la actividad de PLA<sub>2</sub> del extracto acuoso de *M. alcornis* y se comparó con la actividad del extracto acuoso de *M. complanata*, también recolectada en el Caribe mexicano. Los resultados mostraron, como ya se había reportado (García-Arredondo *et al.* 2011), que ambos extractos presentan actividad de PLA<sub>2</sub> (*M. alcornis* = 44.32 µmol/min/g y *M. complanata* = 55.34 ± 1.38 µmol/min/g), la cuál fue significativamente menor que la actividad presentada por la PLA<sub>2</sub> purificada a partir del veneno de abeja (414.96 µmol/min/mg).

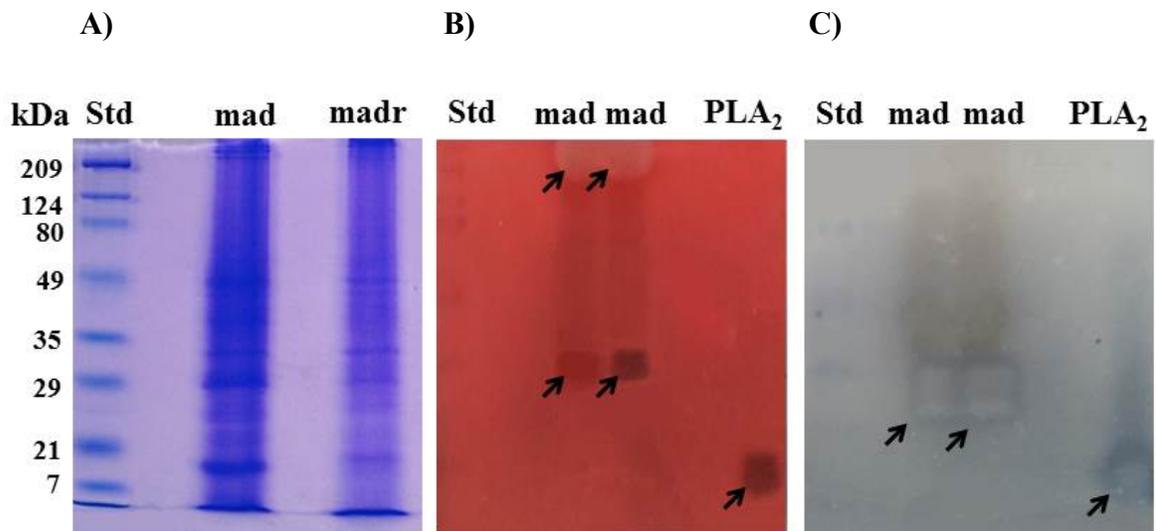
### 7.6 Deteminación del efecto proteolítico del extracto acuoso de *M. alcornis*

El extracto acuoso no mostró actividad proteolítica, lo cual indica que éste no contiene toxinas con actividad de proteasa. El control positivo (*Streptomyces griseus*) mostró un efecto de 980.4 ± 5.2 µmol/min/mg.

### 7.7 Electroforesis SDS-PAGE, zimografía e identificación de una hidralisina de ~ 28 kDa

El extracto acuoso de *M. alcornis* contiene proteínas que abarcan un amplio rango de pesos moleculares comprendidos entre 8 y 200 kDa. En condiciones reductoras, el perfil electroforético cambió (Figura 8A). Por zimografía se identificaron dos principales zonas hemolíticas, una de las cuáles corresponde a una banda de aproximadamente 28 - 30 kDa, y la otra a una banda de

aproximadamente 200 kDa (Figura 8B). En condiciones reductoras, la banda de 200 kDa desapareció, lo que sugiere que ésta consiste de dos o más subunidades. El análisis zimográfico mostró que hay bandas de entre 28 y 30 kDa que poseen actividad hemolítica y de PLA<sub>2</sub>, mientras que la de 200 kDa no mostró actividad enzimática (Figura 8C). Las bandas de entre 28 y 30 kDa se extrajeron del gel de electroforesis, fueron alquiladas y digeridas con tripsina y posteriormente, se analizaron en un sistema CL-SM para su análisis, como se describió en la metodología. Las secuencias numeradas desde 1a hasta 6a, pertenecen a la banda que tiene un peso molecular aproximado de 30 kDa, mientras que las secuencias numeradas de 1b – 8b proceden de la banda de peso molecular intermedio de aproximadamente 29 kDa y las secuencias numeradas de 1c - 7c son de la banda de menor peso molecular. Los resultados derivados del análisis por espectrometría de masas se analizaron mediante BLASTp y se encontraron similitudes con secuencias de diferentes proteínas; sin embargo, algunas secuencias no mostraron similitud con ninguna proteína (Tabla 4). Las secuencias 1a - 3a mostraron homología con la proteína tipo hidralisina de *Hydra viridis*. Estas secuencias también se analizaron con el programa ClustalW2. Es importante mencionar que este programa permite alinear secuencias de proteínas y de esta manera, se pueden observar identidades, similitudes y diferencias entre éstas. Al realizar la alineación, se confirmó que tres de las secuencias (1a, 2a y 3a) presentaban homología con secuencias de hidralisinas de *H. viridis* (Tabla 4 y Figura 9).



**Figura 8.** Perfil electroforetico en condiciones no reductoras (mad) y reductoras (madr). Las bandas se visualizaron mediante tinción de coomassie. B) Zimograma de hemólisis en gel de agar al 1.5% suplementado con 5% de yema de huevo y 3% de eritrocitos lavados. Se observan dos zonas hemolíticas correspondientes a bandas con pesos moleculares de aproximadamente (28-30 kDa) y ~ 200 kDa. C) Zimograma de fosfolipasa A2 en gel de agarosa al 2% suplementado con 6% de yema de huevo. Se observa solamente una zona con actividad enzimática correspondiente a bandas con pesos moleculares entre 28 y 30 kDa.

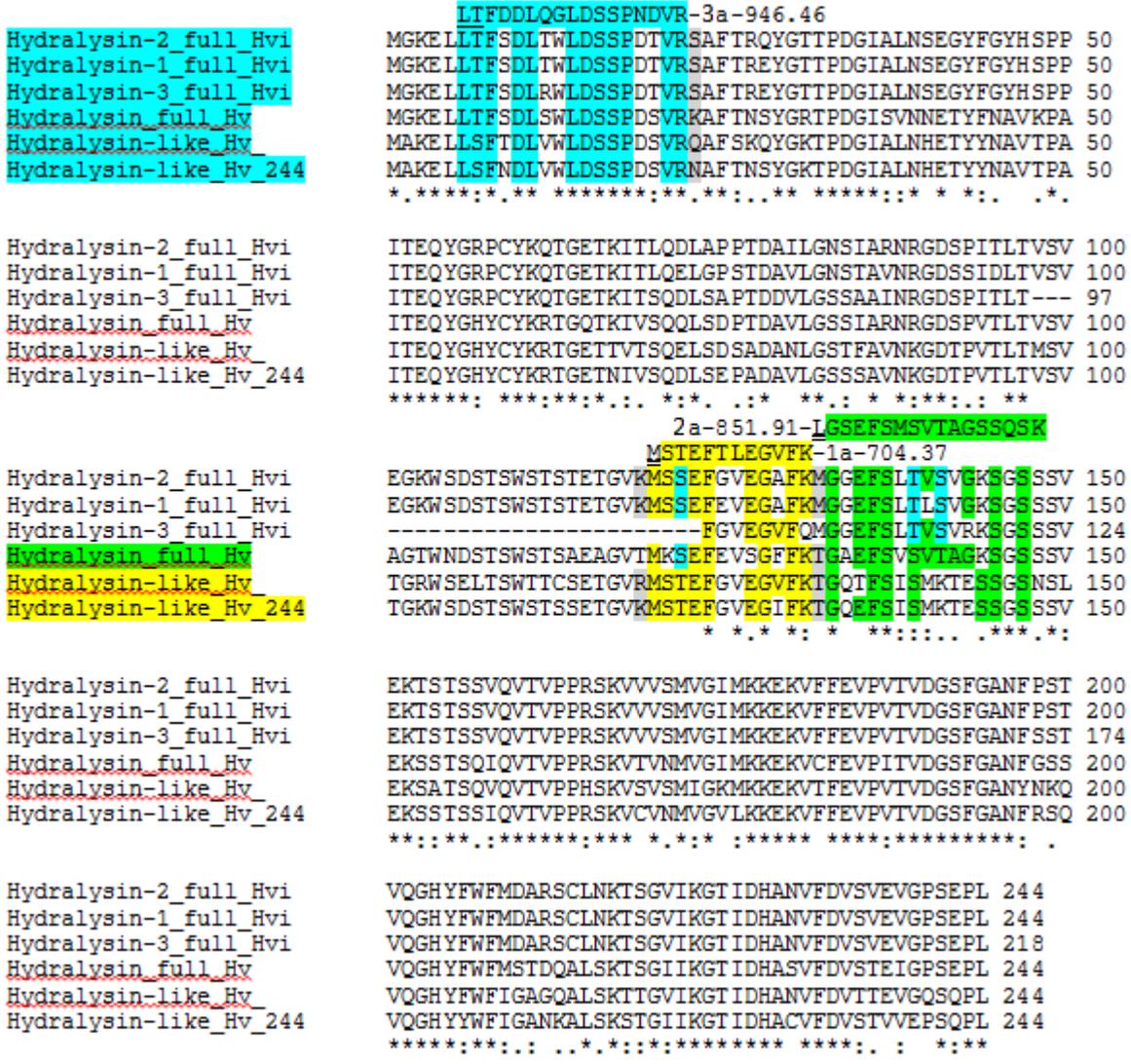
**Tabla 4.** Secuencias obtenidas del análisis por espectrometría de masas de bandas extraídas del gel de electroforesis y que por zimografía muestran actividad hemolítica.

No	Ion	Secuencia	Homología
1 a	704.37	STEF <del>T</del> LEGVFK	*Hidralisina [ <i>Hydra vulgaris</i> ] Longitud proteína: 244 residuos Query 1 STEF <del>T</del> LEGVFK Sbjct 121 STEFG <del>V</del> EGVFK
2 a	854.91	GSEFSMSVTAGSSQSK	*Hidralisina [ <i>Hydra vulgaris</i> ] Longitud proteína: 244 residuos Query 1 GSEFSMSVTAGSSQSK Sbjct 134 GA <del>E</del> FSVSVTAGKSGS
3 a	946.46	FDDLQGLDSSPNDVR	*Hidralisina [ <i>Hydra vulgaris</i> ] Longitud proteínas: 244 y 218 residuos Query 1 FDDLQGLDSSPNDVR Sbjct 6 LTFSDLTWLDSSPDTVR
4 a	1200.61	LGGSTDPNLLTLLAGAYGPK	Proteína cordina [ <i>Nematostella vectensis</i> ] Longitud proteína 856 residuos Query 1 LGGSTDPNLLTLLAGAYGPK Sbjct 150 YEGDQKPKLLTLL- - - -GPK
5 a	1171.04	SVWETENLPNYS GK	Proteína asociada a microtúbulos [ <i>Aplysia californica</i> ] Longitud proteína: 1672 residuos Query 1 SVWETENLPNYS Sbjct 655 SVWETELLPDYS
6 a	1143.08	ADNQPGVLLQVFEWR	Proteína de choque térmico [ <i>Ectocarpus siliculosus</i> ] Longitud proteína: 455 residuos Query 1 ADNQPGVLIQVFE Sbjct 239 ADNQPGVLIQVFE
1 b	637.87	LVVYPQPAFK	No se encontró homología
2 b	854.46	VGDLSQLGTYWDLK	No se encontró homología
3 b	895.96	DPDNYWLELLSAK	Glioxalasa/bliomicina proteína/dioxigenasa [ <i>Acidaminococcus fermentans</i> DSM 20731] Longitud proteína: 121 Query 1 DPDNYWLEILSAK Sbjct 108 DPDNYWLEILPPK
4 b	1143.08	ADNQPGVLIQVFEGER	Proteína de choque térmico 70 [ <i>Leucocryptos marina</i> ] Longitud proteína: 129 residuos Query 1 ADNQPGVLIQVFE Sbjct 239 ADNQPGVLIQVFE
5 b	902.01	LEQVLTGETLVNK	Proteína hipotética [ <i>Volvox carteri f. nagariensis</i> ] Longitud proteína: 395 residuos Query 2 EQVLTGETLVNK Sbjct 156 EQMLTGEALVNK
6 b	962.46	EENPNASKDEYEAK	Hidractinia_e Longitud proteína: 653 residuos Query 1 EENPNASKDEYEAK Sbjct DEHQNAEKDEYESQ
7 b	980.20	EFENGELLVESHALLR	No se encontró homología
8 b	1171.59	DNQGPVLLQVQPNYS GK	No se encontró homología

1 c	614.88	LQAYQFTDK	Peroxiredoxina 2 [ <i>Crassostrea gigas</i> ] Longitud proteína: 48 residuos Query 2 QAYQFTDK Sbjct 10 QAFQFTDK
2c	606.85	LTVNDLPVGR	Proteína hipotética Helrodraft_154361 [ <i>Helobdella robusta</i> ] Longitud proteína: 223 residuos Query 1 LTVNDLPVGR Sbjct 166 LTVNDLPVGR Proteína peroxiredoxina 4 [ <i>Cyanea capyllata</i> ] Longitud proteína: 238 residuos Query 1 LTVNDLPVGR Sbjct 166 ITMNDLPVGR
3c	511.27	AGVEFTER	Proteína hipotética [ <i>Plesiocystis pacifica</i> ] Longitud proteína: 339 Query 1 AGVEFTER Sbjct 213 AGVEFTER
4c	987.49	VATGSHNSPSEEFR	No se encontró homología
5c	1016.01	NPESDSSALVHQPYK	No se encontró homología
6c	1172.55	VGQETENLPNYSYGK	No se encontró homología
7c	1199.56	TDLSVGQETENLPNYSYGK	Proteína hipotética desintegrina [ <i>Hydra vulgaris</i> ] Longitud proteína: 1080 residuos Query 1 DLSVGQETEN--LPNYSYGK Sbjct 280 GFSIGDETELAISLPSYSTT

Las bandas numeradas como 1a – 6a pertenecen a la banda de mayor peso molecular de aproximadamente 30 kDa y las bandas numeradas como 1b – 8b pertenecen a la banda de intermedio peso molecular de aproximadamente 29 kDa y las bandas numeradas como 1c - 7c pertenecen a la banda de menor peso molecular de aproximadamente 28 kDa. Los residuos resaltados con amarillo indican las diferencias entre las secuencias que se están comparando \*análisis de las secuencias por CLUSTALW2.

□

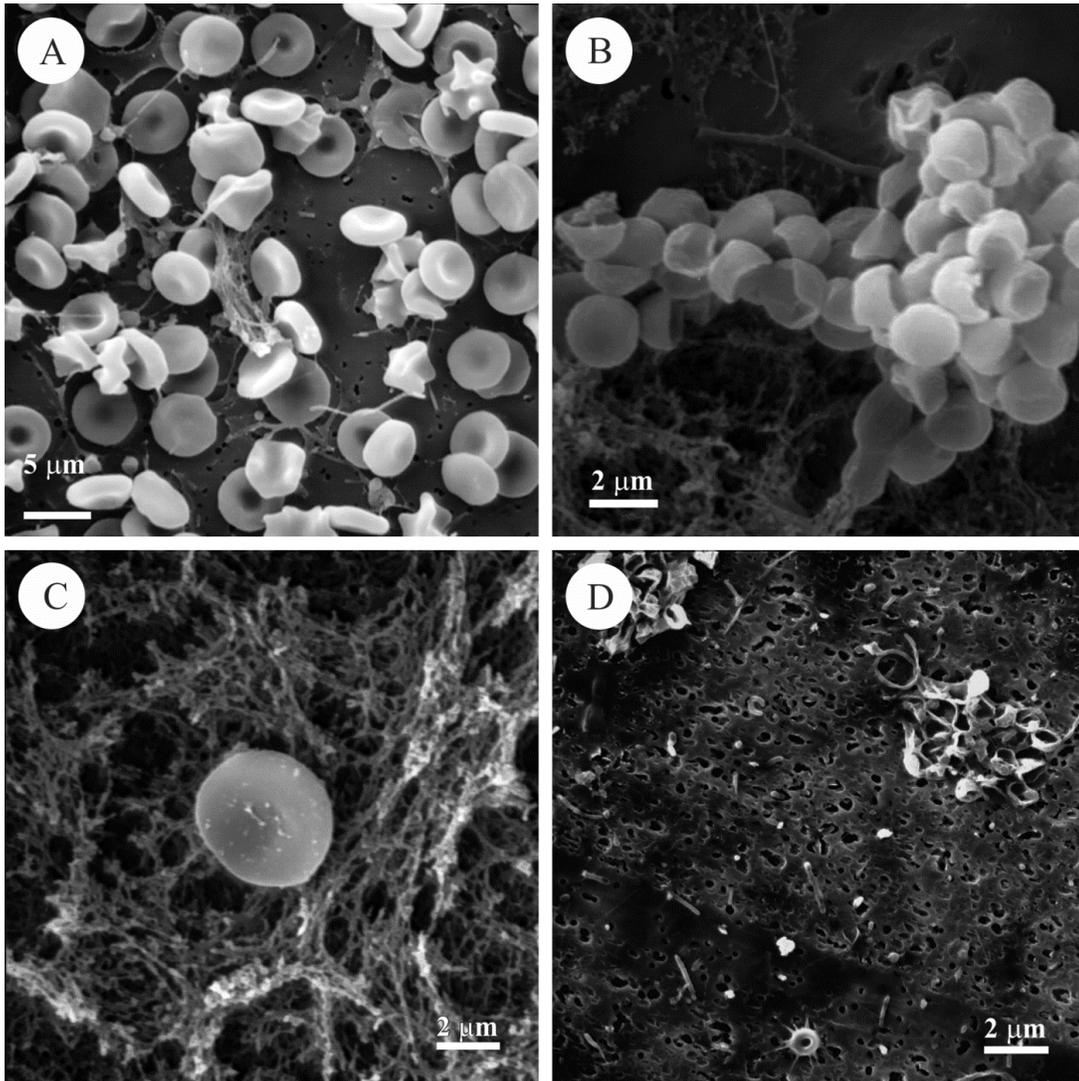


**Figura 9.** Alineamiento de secuencias de *M. alcicornis* que tienen homología con hidralisinas de *H. viridis* con el programa ClustalW2. Cada secuencia está resaltada con diferente color.

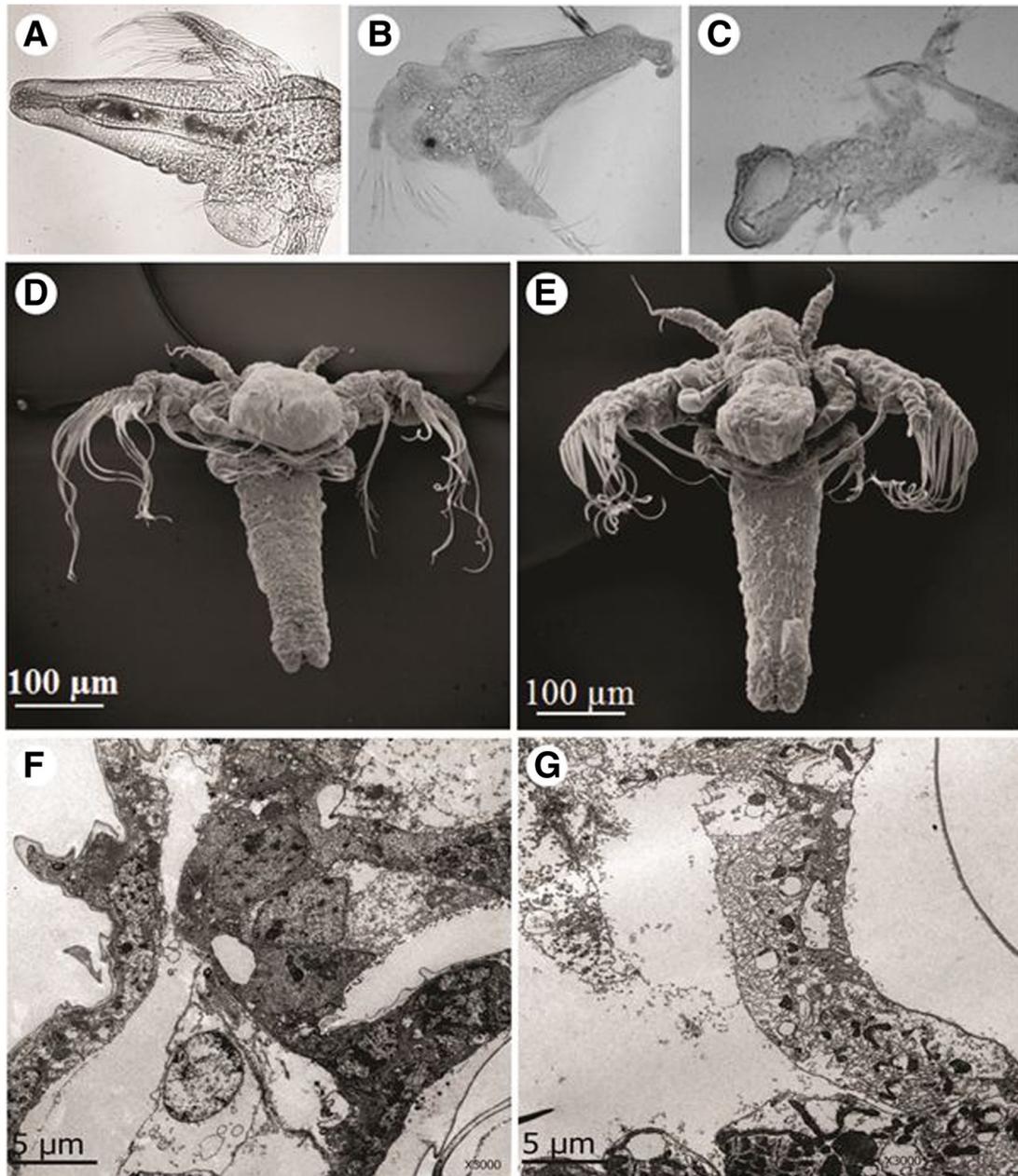
### 7.8 Análisis microscópico en *A. salina* y eritrocitos de rata

El análisis por microscopía reveló que el extracto acuoso de *M. alcicornis* lisó las membranas de los eritrocitos, lo que provocó la liberación del material intracelular de las células (Figura 10). Sin embargo, los eritrocitos control permanecieron viables e intactos durante el tiempo de incubación. El análisis microscópico evidenció que fue alterada la masa visceral de la cavidad primaria del cuerpo de las artemias, su cutícula también mostró daño (Figuras 11B, C y E). En contraste, los nauplios control mostraron una cutícula normal (Figuras 11A y D), y su masa visceral lució bien definida.

Las secciones longitudinales ultrafinas (TEM) de los nauplios, expuestos al extracto acuoso de *M. alcornis*, mostraron desorganización celular (Figura 11F), en contraste con el control que no mostró alteraciones (Figura 11G).



**Figura 10.** Micrografía electrónica de barrido (SEM) mostrando el efecto del extracto sobre eritrocitos de rata. A) Eritrocitos control pre-incubados con solución de Asever. (B y C) Eritrocitos pre-incubados con la  $CH_{50}$  del extracto acuoso de *M. alcornis*, nótese el material amorfo de las membranas rotas en el fondo de la imagen. (D) Remanente de las membranas de los eritrocitos completamente destruidos, después de la incubación en presencia de 10 veces la  $CH_{50}$  del extracto acuoso de *M. alcornis*.

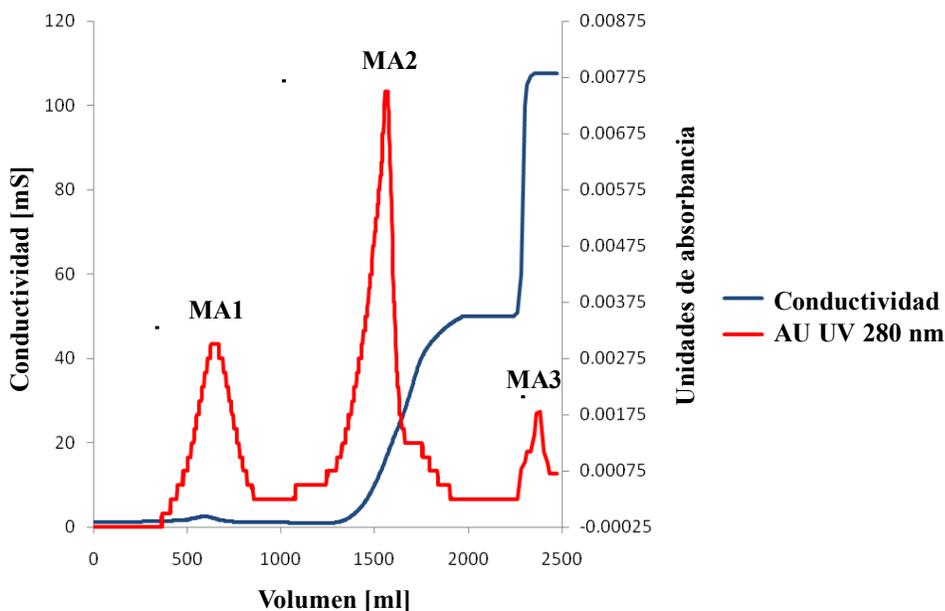


**Figura 11.** Micrografías mostrando el efecto del extracto sobre *A. salina*. (A) Nauplio de *A. salina* usada como control. (B y C) Nauplios después de 24 horas de incubación en agua de mar con 10 veces la  $DL_{50}$  del extracto acuoso de *M. alcornis*; se observa que las membranas están parcialmente desintegradas. ML, 400 x. (D) SEM nauplios control y (E) nauplios tratados, no se observan modificaciones externas significativas. TEM (F) corte longitudinal de intestino de artemia control y (G) artemia tratada; se observan alteraciones en la estructura.

## 7.9 Separación parcial de toxinas que: i. Modulan la contracción del músculo liso intestinal y ii. Presentan actividad hemolítica

### 7.9.1 Fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso

Se llevó a cabo el fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso de *M. alcicornis*, comenzando con la columna de intercambio iónico (DEAE celulosa) en la que se fraccionaron 203.15 mg de proteína en inyecciones de 3.5 ml que contenían 30 mg de proteína cada uno. Se obtuvieron tres fracciones: una fracción no retenida que se eluyó con acetato de amonio 10 mM, denominada MA1; la segunda fracción, eluida con acetato de amonio 10 mM y NaCl 1 M al 25 %, denominada MA2 y una tercer fracción obtenida al hacer pasar 100 % de NaCl 1 M (Figura 12). Las fracciones se liofilizaron y resuspendieron en agua desionizada.



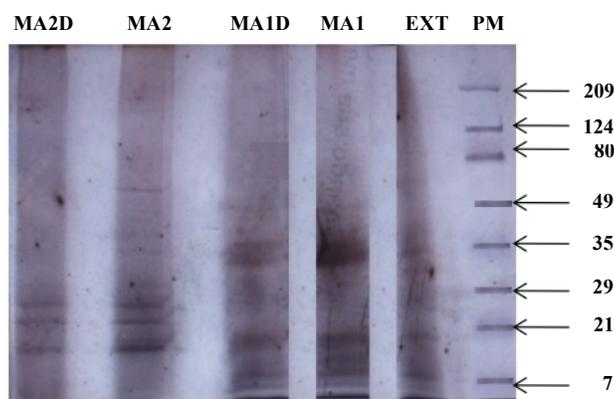
**Figura 12.** Perfil cromatográfico obtenido a partir del fraccionamiento del extracto de *M. alcicornis*, al pasar por una columna de DEAE-celulosa.

De la fracción MA1 se obtuvieron 29.23 mg de proteína (rendimiento = 14.38 %), de la fracción MA2 se obtuvieron 15.36 mg de proteína (rendimiento = 7.56 %) y de la fracción MA3 se obtuvieron 3.16 mg de proteína (rendimiento = 1.56 %).

### 7.9.2 Análisis electroforético de las fracciones MA1 y MA2

Se realizó el análisis electroforético de las fracciones MA1 y MA2 normales y desnaturalizadas. En la Figura 13 se observa el perfil obtenido. En MA1, se pueden apreciar dos bandas

intensas de aproximadamente 35 kDa y que podrían ser las responsables de la actividad hemolítica presentada por el extracto, debido a que se ha reportado la presencia de enzimas con actividad de PLA<sub>2</sub>, con pesos moleculares entre 30 y 40 kDa en extractos provenientes de otras especies del género *Millepora* (Radwan & Aboul-Dahab 2004; Ibarra-Alvarado *et al.* 2007). En MA1 también se observa la presencia de bandas con pesos de menos de 20 kDa que no se observan en la fracción MA2, estas bandas podrían corresponder a proteínas formadoras de poros que tienen pesos moleculares de entre 5-8 kDa. Ambas fracciones comparten unas bandas de aproximadamente 20 kDa. Los componentes que presentan este peso molecular, podrían ser las responsables del efecto vasoconstrictor producido por el extracto en la aorta de rata, según evidencias encontradas en *M. complanata* con compuestos purificados de pesos similares (Ibarra-Alvarado *et al.* 2007). Respecto al perfil de MA2, se observa la presencia de dos bandas de aproximadamente 25 kDa que no parecen estar presentes en MA1.



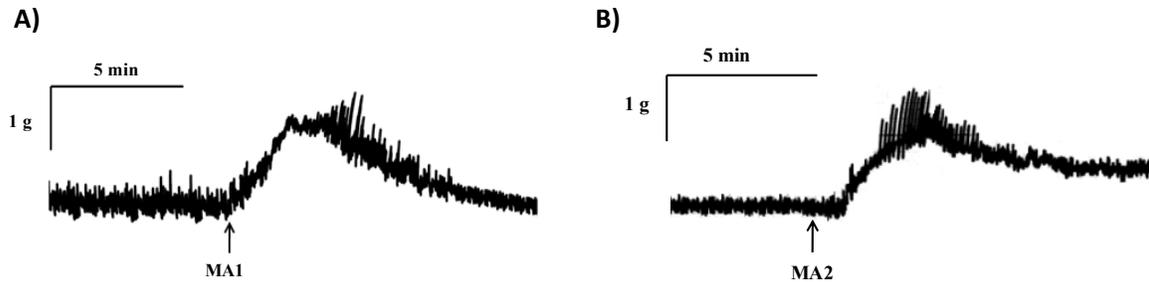
**Figura 13.** Gel de electroforesis del extracto acuoso de *M. alvicornis* y teñido con tinción de plata. MA1 y MA2 normal y desnaturalizadas (MA1D y MA2D = Fracciones desnaturalizadas; EXT = Extracto; PM = Marcador de peso molecular).

### 7.9.3 Evaluación biológica de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento del extracto acuoso

#### 7.9.3.1 Evaluación de las fracciones MA1 y MA2 en el músculo liso intestinal

Las fracciones MA1 y MA2, obtenidas a partir del análisis cromatográfico a gran escala del extracto, se evaluaron en el modelo de íleon aislado de cobayo a la CE<sub>50</sub> del extracto normal (2.98 µg/ml). Ambas fracciones produjeron una respuesta excitatoria en el íleon (MA1 = 96.78 % ± 12.89 y MA2 = 88.75 % ± 17.09). El efecto máximo excitatorio inducido por MA1 se observó a los 4.1 ± 0.76 min, en tanto que el efecto máximo producido por MA2 se presentó a los 4.76 ± 1.078 min. El efecto

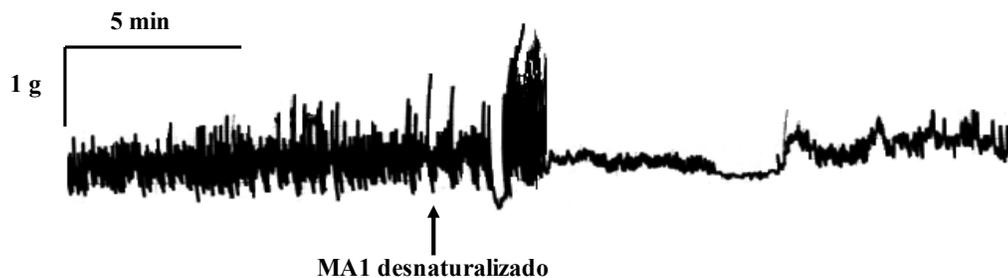
excitatorio producido por ambas fracciones fue significativamente mayor al efecto del extracto (Figura 14).



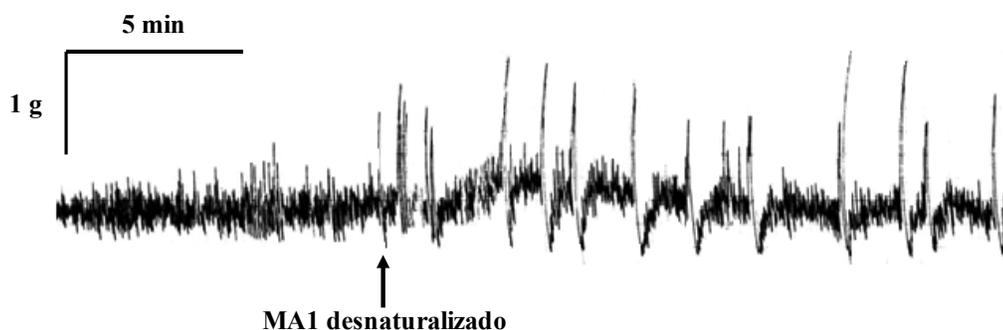
**Figura 14.** Registro representativo del efecto de las fracciones a) MA1 y b) MA2 sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo a la concentración de 2.98  $\mu\text{g/ml}$ .

Se evaluó también el efecto de MA1 y MA2 sometidas al proceso de desnaturalización en el íleon. Sin embargo debido a que el valor de la  $CE_{50}$  calculado para el extracto desnaturalizado era demasiado alto ( $66.47 \pm 1.18 \mu\text{g/ml}$ ), no fue posible realizar los experimentos por triplicado, pues se necesitaría una gran cantidad de proteína de la fracción. De tal manera que sólo fue posible hacer una evaluación de cada una de las fracciones (MA1 =  $66.47 \mu\text{g/ml}$  y MA2 =  $33.23 \mu\text{g/ml}$ ). En estos experimentos se observó que MA1 indujo un aumento transitorio en la amplitud de las contracciones del íleon, seguido de un efecto inhibitorio que no se había observado al evaluar el extracto total. Esta respuesta puede atribuirse a la presencia de sustancias termoestables inhibitorias, cuyo efecto se encontraba “enmascarado” por el efecto de compuestos termolábiles excitatorios. Por otra parte, la fracción MA2 produjo una serie de contracciones arrítmicas, en las que se observaban pulsos de mayor amplitud que la de las contracciones presentadas por el íleon antes de la aplicación de la fracción (Figura 15).

A)



B)



**Figura 15.** Registro representativo del efecto de las fracciones desnaturalizadas a) MA1 y b) MA2 sobre las contracciones espontáneas del ileón aislado de cobayo.

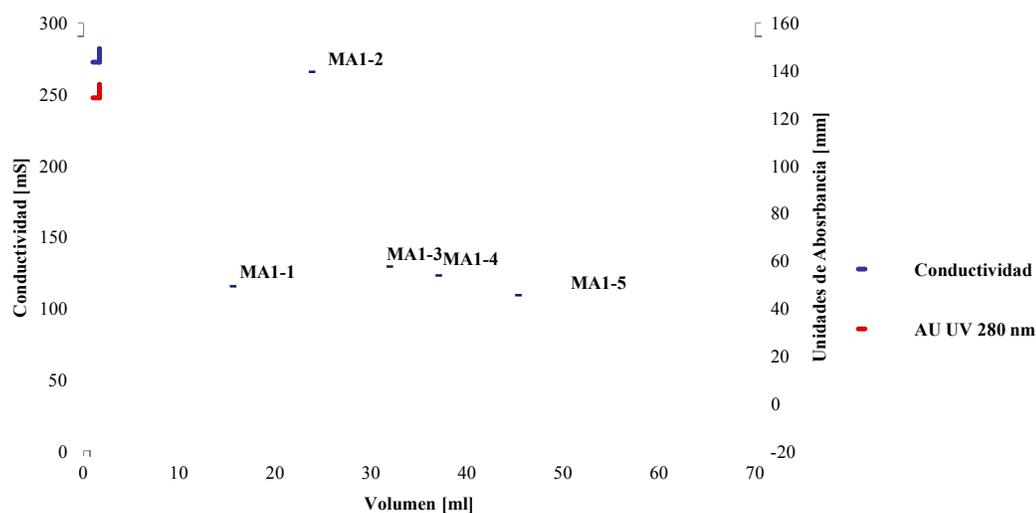
### 7.9.3.2 Evaluación de la actividad de PLA<sub>2</sub> y hemolítica de las fracciones MA1 y MA2

Se evaluó también el efecto hemolítico y actividad de PLA<sub>2</sub> de las fracciones MA1 y MA2 normal y desnaturalizadas. La actividad hemolítica se evaluó a la CH<sub>50</sub> del extracto ( $0.17 \pm 1.01$  µg/ml). En este ensayo, MA1 y MA2 mostraron una actividad hemolítica similar (86.97 % de MA1 y 89.29 % de MA2). A la concentración evaluada, ambas fracciones perdieron su efecto hemolítico cuando se sometieron a ebullición.

Posteriormente, se determinó la actividad de PLA<sub>2</sub> y se observó que ambas fracciones aumentaron su actividad con respecto a la del extracto (91.068 µmol/min/g de MA1 y 123.21 µmol/min/g de MA2), concentrándose este efecto en la fracción MA2. Al igual que con el extracto desnaturalizado, el efecto desapareció en las dos fracciones desnaturalizadas.

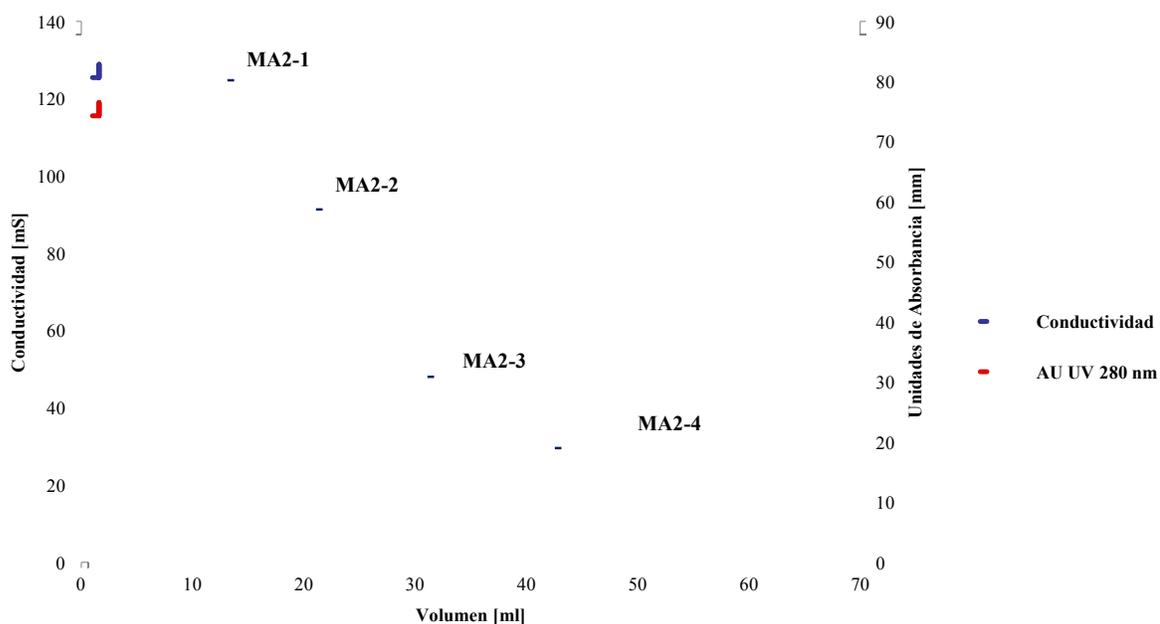
#### 7.9.4 Análisis cromatográfico de las fracciones MA1 y MA2 por cromatografía de exclusión molecular

La fracción MA1 se sometió a un análisis cromatográfico para iniciar con la separación de los compuestos bioactivos por cromatografía de exclusión molecular. Se utilizó una columna de Sephadex G-15 y se realizaron inyecciones de 500  $\mu$ l de la fracción MA1, cada inyección contenía 134  $\mu$ g de proteína. Se obtuvieron cinco fracciones (MA1-1 a MA1-5) (Figura 16).



**Figura 16.** Perfil cromatográfico de la fracción MA1 en Sephadex G-15.

La fracción MA2 se dializó en una membrana MWCO de 1000 Da, se obtuvieron 15.36 mg de proteína, lo que representa un rendimiento de 7.56 %. La fracción se sometió a un análisis cromatográfico para iniciar con la separación de los compuestos bioactivos, por cromatografía de exclusión molecular. Se realizaron inyecciones de 500  $\mu$ l de la fracción MA2 (160  $\mu$ g de proteína/inyección). De esta separación se obtuvieron cuatro fracciones (MA2-1 a MA2-4) (Figura 17), y se determinó la cantidad de proteína de todas las fracciones (Tabla 5). Aquellas fracciones en las que no se detectó proteína, se liofilizaron nuevamente y se determinó el peso seco de la fracción obtenida (Tabla 5).



**Figura 17.** Perfil cromatográfico de la fracción MA2 en Sephadex G-15

**Tabla 5.** Concentración de proteína, rendimiento y peso del liofilizado de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico de las fracciones MA1 y MA2.

Fracción	Cantidad de proteína (mg)	Rendimiento %	Peso Liofilizado (g)
<b>Fracción inicial</b>			1.01129
MA1-1	2.82546	1.39	
MA1-2	1.6551	0.8142	
MA1-3	-	-	-
MA1-4	-	-	0.296
MA1-5	0.027	0.013	
<b>Fracción inicial</b>			0.00412
MA2-1	0.2537	0.124	
MA2-2	-	-	0.32017
MA2-3	-	-	0.03026
MA2-4	-	-	0.0194

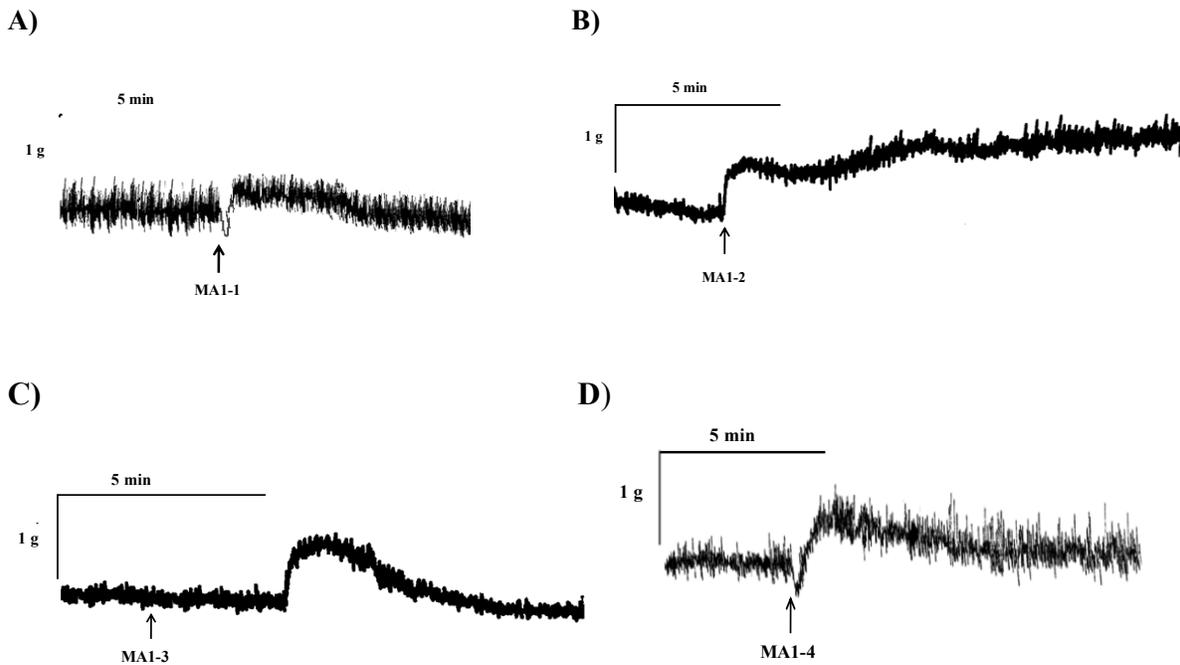
## 7.9.5 Evaluación farmacológica de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico de MA1 y MA2

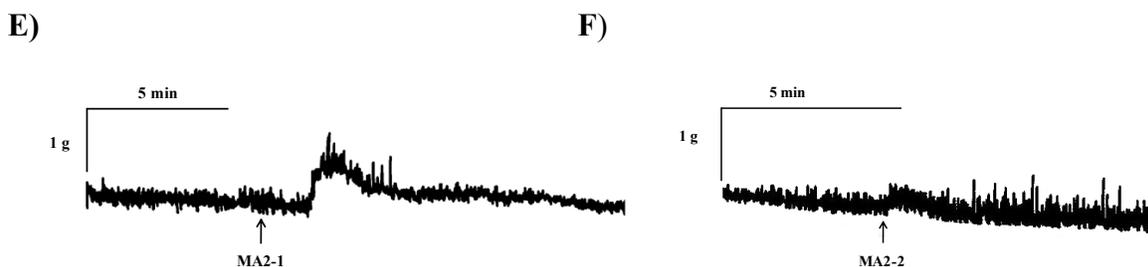
### 7.9.5.1 Evaluación de las fracciones en el músculo liso intestinal

Cada una de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico de MA1 y MA2 se evaluó en el modelo de íleon aislado de cobayo a diferentes concentraciones, con la finalidad de detectar la mínima concentración a la cual éstas presentaban un efecto excitatorio. La concentración a la que este efecto se observó en algunas fracciones fue de 1 µg/ml.

Se observó nuevamente que las fracciones provenientes de MA1 inducían un efecto excitatorio sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. La fracción MA1-1 presentó un efecto excitatorio retardado y la fracción MA1-2 presentó un efecto excitatorio inmediato. En ambas fracciones el efecto se mantiene. En la fracción MA1-3 se concentró la sal, por lo que el efecto excitatorio probablemente se debe a su presencia en la fracción y la fracción MA1-4 mostró un efecto bifásico (Figuras 18A-18D).

Con respecto al efecto farmacológico inducido por las fracciones obtenidas a partir de MA2, se observó un efecto excitatorio en las fracciones MA2-1 y MA2-2; el efecto más significativo se observó en la fracción MA2-1. Las fracciones MA2-3 y MA2-4 no tuvieron efecto (Figuras 18E y F).





**Figura 18.** Efecto sobre las contracciones espontáneas del íleon, producido por las fracciones obtenidas en Sephadex a partir de las fracciones obtenidas de: (A) MA1-1; (B) MA1-2; (C) MA1-3; (D) MA1-4; (E) MA2-1; y (F) MA2-2. Concentración evaluada: 1 µg/ml de proteína.

Las fracciones restantes obtenidas del análisis de MA1 y MA2 que no se evaluaron en base a su concentración de proteína, se evaluaron en base al peso de la fracción liofilizada, sin embargo no se observó algún efecto en el íleon, aún a concentraciones más altas. Por otro lado, las fracciones que mostraron actividad sobre el íleon, se desnaturalizaron y se evaluaron nuevamente, el efecto excitatorio solo se mantuvo a la misma intensidad en la fracción MA1-3 que es la fracción que contiene las sales (resultados no mostrados), las demás fracciones no mostraron actividad.

#### 7.9.5.2 Evaluación de la actividad hemolítica de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico de las fracciones MA1 y MA2

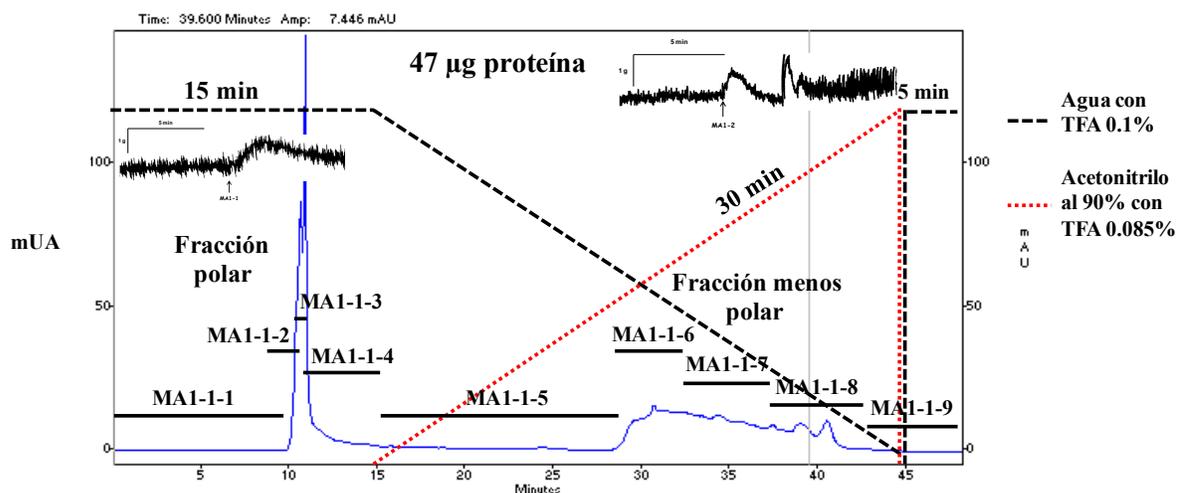
Las fracciones que mostraron un efecto hemolítico fueron MA1-1, MA1-2 y MA2-1 cuando se evaluaron a la  $UH_{50}$  del extracto normal; las demás fracciones no mostraron ningún efecto. Las fracciones MA1-1 y MA1-2 mantuvieron prácticamente el 50 % del efecto hemolítico, mientras que la fracción MA2-1 indujo una hemólisis del 93 %, lo cuál significa que el efecto hemolítico aumentó en esta fracción con respecto al efecto del extracto total.

#### 7.9.6 Análisis cromatográfico en CLAR de las fracciones MA1-1 y MA2-1 que tienen un efecto excitatorio en el músculo liso intestinal

Se procedió a realizar el análisis cromatográfico de las fracciones que presentaron efecto hemolítico y excitatorio en íleon (MA1-1 y MA2-1) utilizando un CLAR y una columna de adsorción en fase reversa C-4. Para llevar a cabo el análisis, se inyectaron 20 µl de volumen de la fracción MA1-1 que representan 45.5 µg de proteína y se colectaron las fracciones, de mayor a menor polaridad. En la Figura 19 se muestra el cromatograma obtenido a partir del análisis de la fracción MA1-1, en el que se observa que la fracción más polar eluye a un tiempo de 10 minutos y la fracción menos polar a los 28

minutos, aproximadamente. Estas dos fracciones se evaluaron nuevamente en el íleon y, se encontró que ambas tienen un efecto excitatorio (Figura 19).

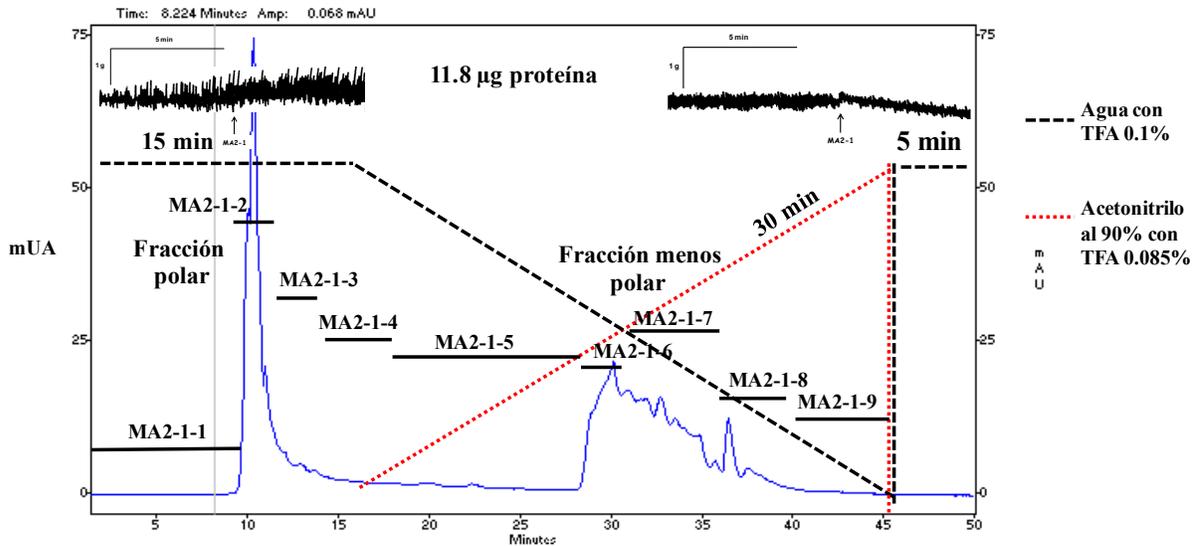
Cabe señalar que el objetivo del presente trabajo involucraba la búsqueda de compuestos que tienen un efecto excitatorio en el íleon, producen hemólisis y son termolábiles, por lo que las fracciones completas: MA1-1, MA2-1 y MA2-2 (la fracción MA2-2 no presenta actividad hemolítica sin embargo también se sometió al siguiente paso de purificación) se recromatografiaron a las mismas condiciones anteriormente descritas, con la finalidad de lograr otro paso de purificación para obtener fracciones más puras. Se hicieron 60 inyecciones de la fracción MA1-1 de 200  $\mu$ l, conteniendo cada una 47  $\mu$ g de proteína. A partir de este análisis, se obtuvieron nueve fracciones, las cuáles se denominaron MA1-1-1 hasta MA1-1-9 (Figura 19).



**Figura 19.** Perfil cromatográfico de la fracción MA1-1 en C-4 y el efecto de las fracciones polar y menos polar sobre el íleon aislado de cobayo. Líneas rojas = Acetonitrilo al 90 % con TFA al 0.085 % y líneas negras = Agua con TFA al 0.1 % y efecto sobre las contracciones espontáneas del íleon, producido por las fracciones polar y menos polar.

Posteriormente, se realizó el análisis de la fracción MA2-1 a las mismas condiciones a las que se realizó el análisis de la fracción MA1-1. Para llevar a cabo este análisis se inyectaron 20  $\mu$ l de la fracción MA2-1 que representan 11.8  $\mu$ g de proteína. De igual manera, se evaluaron las dos fracciones obtenidas polar y menos polar en el íleon y se observó que la fracción más polar presentaba un efecto excitatorio muy pequeño y la fracción menos polar prácticamente perdió este efecto. El perfil obtenido de la fracción MA2-1 y sus efectos sobre el íleon se muestran en la Figura 20, en la que se observa que la fracción más polar eluye a un tiempo de 10 minutos y la fracción menos polar a los 28 minutos

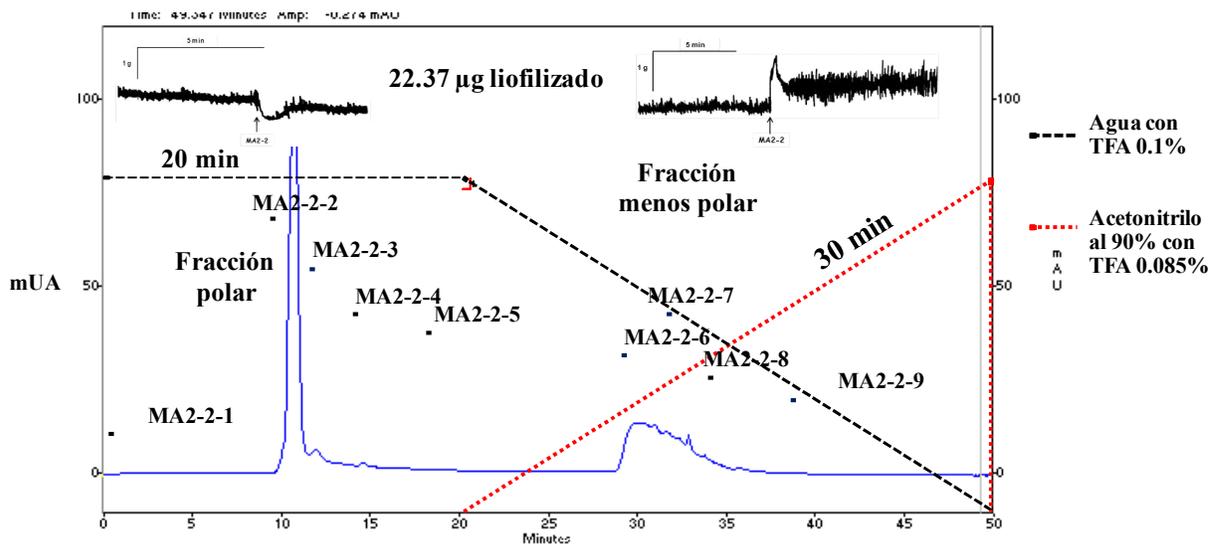
aproximadamente. A pesar del poco efecto excitatorio que se observó al evaluar las fracciones polar y menos polar obtenidas a partir del análisis de MA2-1, éstas se analizaon por CLAR. Se hicieron 50 inyecciones de 200  $\mu$ l que contenían 11.8  $\mu$ g de proteína cada una. A partir de esta purificación se obtuvieron nueve fracciones cromatográficas las cuales se denominaron MA2-1-1 hasta MA2-1-9 (Figura 20).



**Figura 20.** Perfil cromatográfico de la fracción MA2-1 en C-4 y el efecto de las fracciones polar y menos polar sobre el íleon aislado de cobayo. Líneas rojas = Acetonitrilo al 90 % con TFA al 0.085 % y líneas negras = Agua con TFA al 0.1 % y efecto sobre las contracciones espontáneas del íleon, producido por las fracciones polar y menos polar.

Por otra parte, se analizó por CLAR la fracción MA2-2 a las mismas condiciones que las dos fracciones anteriores, se hicieron 31 inyecciones de 20  $\mu$ l que contenían 22.37  $\mu$ g de peso de liofilizado debido a que en esta fracción no fue posible detectar proteína, y se colectaron de igual manera dos fracciones, polar y menos polar, que también se evaluaron en el íleon. Se observó que la fracción más polar mostraba un efecto inhibitorio y la fracción menos polar un marcado efecto excitatorio, efectos que no se habían observado anteriormente con la fracción MA2-2, ya que el efecto excitatorio es mínimo. Estos resultados sugieren que esta fracción contiene compuestos con efectos antagónicos (inhibitorio y excitatorio), que quedaron evidenciados al separar los compuestos mediante el análisis cromatográfico.

La fracción MA2-2, se recromatografió por CLAR y se obtuvieron nueve fracciones (Figura 21).



**Figura 21.** Perfil cromatográfico de la fracción MA2-2 en C-4 y el efecto de las fracciones polar y menos polar sobre el íleon aislado de cobayo. Líneas rojas = Acetonitrilo al 90 % con TFA al 0.085 % y líneas negras = Agua con TFA al 0.1 % y efecto sobre las contracciones espontáneas del íleon, producido por las fracciones polar y menos polar.

Posteriormente se llevó a cabo la eliminación del solvente de las fracciones por rota- evaporación, Las fracciones MA1-1-2 y MA1-1-3, se juntaron en una sola fracción llamada MA1-1-2, quedando como fracciones de interés: MA1-1-2, MA1-1-4, MA1-1-6, MA1-1-7 y MA1-1-8, también otras fracciones se evaluaron y se les determinó proteína (MA1-1-9 y MA2-1-6) o peso de liofilizado (MA2-2-6) con la finalidad de tener más opciones para su análisis (Tabla 6).

**Tabla 6.** Contenido de proteína determinado en las fracciones obtenidas al hacer pasar las fracciones por la columna C-4 en CLAR.

FRACCIÓN	CONTENIDO DE PROTEÍNA O LIOFILIZADO (µg)
MA1-1-2	53
MA1-1-4	42.83
MA1-1-6	494
MA1-1-7	448.42
MA1-1-8	457.5
MA1-1-9	6.16
MA2-1-6	17.1
MA2-2-6	33.45 (liofilizado)

## 7.9.7 Evaluación biológica de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico en CLAR

### 7.9.7.1 Evaluación de las fracciones en el músculo liso intestinal

Se realizó la evaluación biológica de todas las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico de MA1-1, MA2-1 y MA2-2. Las fracciones que presentaban mayor cantidad de proteína, se evaluaron en el íleon a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , a pesar de la baja cantidad de proteína obtenida. También se evaluó la fracción MA2-2-6, tomando en cuenta que esta fracción provenía de la fracción menos polar de MA2-2 y que tenía un marcado efecto excitatorio en el íleon. Las fracciones MA1-1-7 y MA1-1-8 indujeron un efecto excitatorio en el íleon (Figura 22), las fracciones MA1-1-6 y MA2-2-6 no tuvieron efecto. La Figura 23 muestra un resumen de los efectos en íleon inducidos por las fracciones obtenidas.



**Figura 22.** Efecto sobre las contracciones espontáneas del íleon en las fracciones obtenidas en la columna C-4, en CLAR a partir de la fracción MA1-1. Concentración evaluada: 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína.



**Figura 23.** Efecto inducido en el íleon por las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico del extracto acuoso de *M. alcornis*.

### 7.9.7.2 Actividad hemolítica de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico en CLAR

También se evaluó la actividad hemolítica de las fracciones provenientes de MA1-1, MA1-2-1 y MA2-1. Los resultados mostraron que sólo las fracciones MA1-1-2, MA1-1-8 y MA1-1-9 tenían actividad hemolítica, la cuál resultó ser mucho menor que la que presentaba el extracto completo ( $CH_{50} = 0.17 \mu\text{g/ml}$ ), ya que se requirieron mayores concentraciones de proteína para que se presentara el efecto hemolítico (Tabla 7).

**Tabla 7.** Efecto hemolítico de las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico de MA1-1 y MA2-1

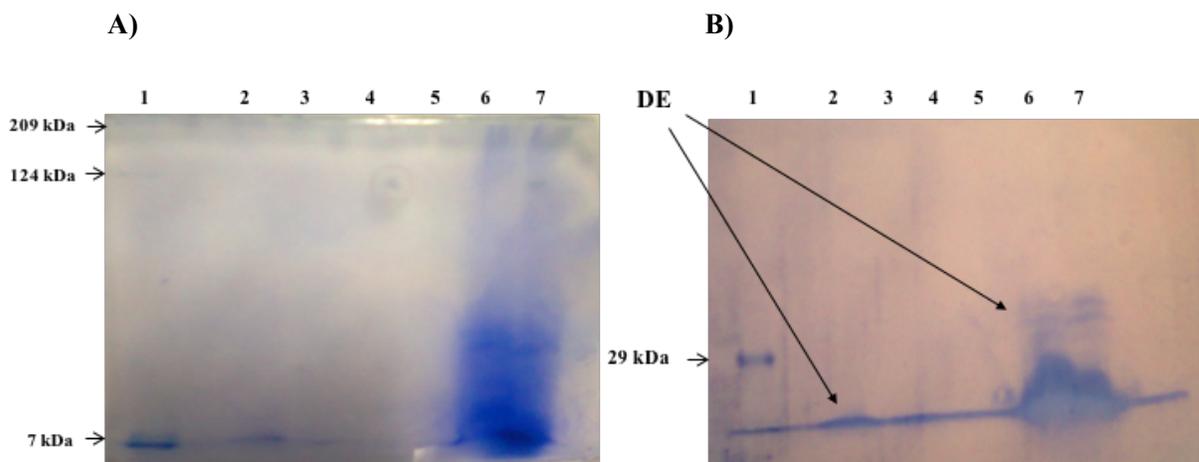
FRACCIÓN	CONC. PROTEÍNA $\mu\text{g/ml}$	% ACTIVIDAD
MA1-1-2	20.67	10
MA1-1-4	11.0	15
MA1-1-8	9.27	76.8
MA1-1-9	0.92	67.8
MA1-1-7	3.62	SIN ACTIVIDAD HEMOLÍTICA
MA1-1-6	29.64	
MA2-1-6	1.71	

### 7.10 Transferencia electroquímica de las proteínas contenidas en las fracciones y análisis por degradación de Edman y espectrometría de masas

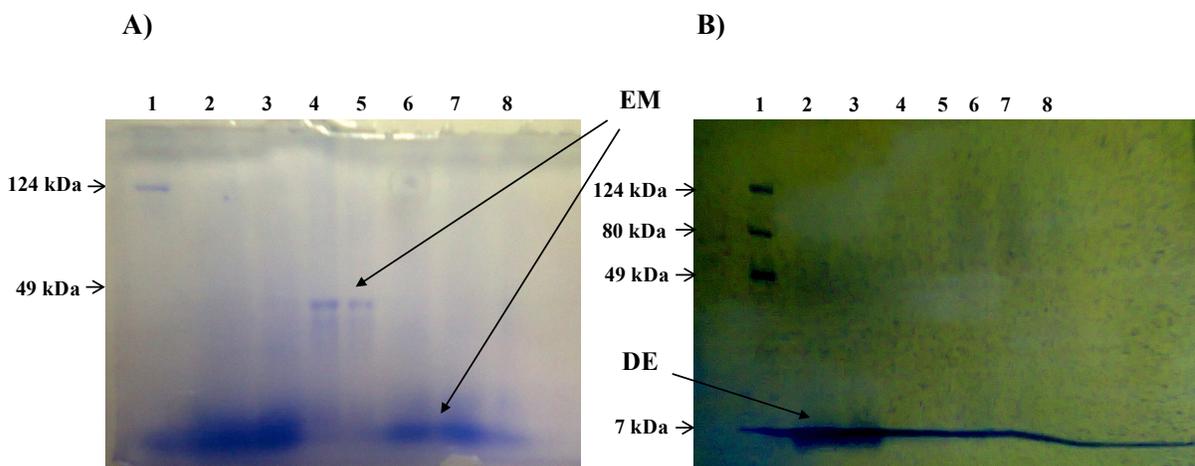
En la Figura 24 se observan el gel de electroforesis (Figura 24A) con las siguientes fracciones: MA2-2-6 (carriles 2 y 3), MA-1-1-2 (carriles 4 y 5); MA-1-1-4 (carriles 6 y 7) y las bandas obtenidas a partir de las transferencias (Figura 24B). Las fracciones MA2-2-6 (carriles 2 y 3) y MA-1-1-4 (carriles 6 y 7) se cortaron de la membrana y se mandaron secuenciar por degradación de Edman. La única fracción a partir de la cual se pudo obtener una secuencia fue MA1-1-4 de las bandas de aproximadamente 40 kDa (ver sección 7.11.1).

Un segundo gel se cargó con las fracciones restantes: MA1-1-6 (carriles 2 y 3), MA1-1-7 (carriles 4 y 5) y MA1-1-8 (carriles 6 y 7). En la Figura 25A se observa el gel de electroforesis después de la transferencia, debido a que la electrotransferencia fué incompleta (Figura 25B), las bandas presentes en los carriles 4 y 5, de aproximadamente 48 kDa y las bandas de los carriles 6 y 7, de aproximadamente 7 kDa contenidas en este segundo gel de electroforesis, se cortaron y se analizaron

por espectrometría de masas (ver sección 7.11.2). En la Figura 25B se muestran las bandas transferidas correspondientes a la fracción MA 1-1-6 (carriles 2 y 3). Estas bandas también se cortaron de la membrana y se analizaron por degradación de Edman (ver sección 7.11.1).



**Figura 24.** Electrotransferencia 1. A) Gel de electroforesis después de la transferencia a la membrana. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 fracción MA2-2-6 con 7  $\mu\text{g}$  de proteína; carril 3 MA-2-2-6 con 7  $\mu\text{g}$ ; carril 4 MA-1-1-2 con 15  $\mu\text{g}$ ; carril 5 MA-1-1-2 con 15  $\mu\text{g}$ ; carril 6 MA-1-1-4 con 111  $\mu\text{g}$ ; carril 7 MA-1-1-4 con 111  $\mu\text{g}$ . B) Membrana de transferencia mostrando las proteínas que se lograron transferir del gel de electroforesis. DE: Degradación de Edman.



**Figura 25.** Electrotransferencia 2. A) Segundo gel de electroforesis después de la transferencia a la membrana. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 fracción MA1-1-6 con 208  $\mu\text{g}$  de proteína; carril 3 fracción MA1-1-6 con 208  $\mu\text{g}$  de proteína; carril 4 MA-1-1-7 con 16  $\mu\text{g}$  de proteína; carril 5 MA-1-1-7 con 16  $\mu\text{g}$  de proteína; carril 6 MA-1-1-8 con 130  $\mu\text{g}$  de proteína y carril 7 MA-1-1-8 con

130 µg de proteína. B) Membrana de transferencia mostrando las proteínas que se lograron transferir del gel de electroforesis. EM: espectrometría de masas, DE: degradación de Edman.

## 7.11 Secuenciación parcial de las fracciones bioactivas

### 7.11.1 Análisis de las fracciones MA2-2-6 y MA1-1-4 por degradación de Edman

El análisis de la banda analizada correspondiente a la fracción MA2-2-6, no proporcionó ninguna secuencia. Sin embargo, el análisis de las 4 bandas obtenidas de la fracción MA1-1-4 indicó que esta fracción contiene isoformas de varias proteínas. Éstas se observan en la membrana de la Figura 24B (carriles 6 y 7) como bandas con pesos moleculares muy cercanos entre ellos, las cuales presentan una gran similitud en su secuencia de aminoácidos (Tabla 8).

Por otro lado, los resultados del análisis de la secuenciación indicaron que cada una de estas bandas está compuesta de al menos, dos cadenas polipeptídicas principales que se denominaron A y B. En los cuatro casos, la cadena (secuencia) A fue más abundante. Adicionalmente, se detectó la presencia de una tercera cadena mucho menos abundante (C).

En la Tabla 8 se resume la secuenciación de cada cadena, en donde se observa la presencia de residuos muy parecidos en cada una de las bandas, los cuales se seleccionaron en base a la abundancia obtenida de cada uno en cada ciclo. Los valores que están indicados en gris aparecieron sobreestimados y no fueron bien integrados por el software del equipo. El residuo seleccionado en cada ciclo de cada banda se indica en cada columna diferenciada como banda 1 – 4; las dos columnas de la derecha indican los residuos de aminoácidos identificados en cada ciclo, y se seleccionaron según su frecuencia de aparición en las cuatro bandas. La secuencia A (HPAAHMAAVIVTXX) fue la secuencia más abundante y la secuencia B (XHPPXXIVAXXXX) la menos abundante. Este fenómeno se observó al analizar cada uno de los catorce ciclos en donde se observaron incrementos en la secuencia A. Nótese también la presencia de la tercera secuencia de aminoácidos, obtenida en la secuenciación de cada banda (Tabla 8); esta tercera secuencia está presente en cada secuenciación, sólo que en cantidades muy menores a las otras dos, por lo que no se tomó en cuenta para su identificación.

Las secuencias consenso obtenidas se analizaron en el BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para buscar en la base de datos alguna identidad con alguna proteína de cnidarios. A partir de este análisis, se encontró identidad con proteínas predichas de la anemona *Nematostella Vectensis* y del hidroide *Hydra magnipapillata* con actividad desconocida (Tabla 9).

**Tabla 8.** Resultados obtenidos del análisis de los catorce ciclos de secuenciación por degradación de Edman y la secuencia obtenida en cada banda analizada. Los números representan los incrementos (en picomoles) con respecto al ciclo anterior.

	Banda 1			Banda 2			Banda 3			Banda 4			Sec. A	Sec. B
1	A 4.08	H 3.62	Q 3.28	H 8.20	P 1.80	A 1.51	H 16.25	F 8.34	I 8.20	H 12.6	A 7.56	P 1.62	AHHH H	HPFA X
2	P 1.12	H 0.30	Y 0.15	P 1.78	H 0.24	Y 0.01	P 4.25	Q 0.25	Y -0.02	P 4.14	Q 0.45	Y 0.07	PPPP P	HHQQ H?
3	A 1.41	P 1.03	N 0.07	P 0.91	A 0.69		A 3.98	P 3.79	T 0.88	A 4.45	P 1.13	R 0.44	APAA A	PAPP P
4	A 4.44	P 1.26	Y 0.43	A 1.52	P 1.45	E 0.10	A 9.15	P 2.34	S 0.43	A 6.59	P 0.79	T 0.40	AAAA A	PPPP P
5	H 0.10			H 0.81	D 0.60	N 0.52	V 1.39	H 1.34	D 0.82	D 1.77	H 1.31	T 0.01	HHVH H	XDHT X
6	M 0.33	D 0.32	L 0.31	M 0.34	E 0.25		M 1.07	I 0.74	N 0.53	D 1.54	I 1.17	M 0.79	MMMI M	DEIM X
7	A 0.30	I 0.02		D 0.39	A 0.32	I 0.12	A 1.87	I 1.09	D 0.44	A 4.05	I 2.05	W 0.52	ADAA A	IAII I
8	A 2.54	D 2.51	V 1.03	A 1.39	V 0.60	W 0.52	A 4.25	V 3.40	I 1.51	V 4.98	A 3.19	I 1.25	AAAV A	VVVA V
9	V 2.47	I 0.43	A 0.12	A 1.86	P 1.63	W 0.06	A 10.56	W 0.48	I 0.33	A 9.24	P 2.11	Q 1.22	VPVV V	IVWP A?
10	A 1.74	I 1.46	T 0.40	I 0.82	A 0.74	D 0.58	I 4.94	A 1.99	V 1.87	I 2.13	T 0.89	Q 0.59	AIII I	IAAT A
11	I 0.94	Q 0.70	T 0.60	T 1.40	V 1.16	P 0.77	V 5.25	I 2.88	P 2.74	V 2.47	T 1.81	Q 1.21	IPVV V	QXIT X
12	T 0.82	L 0.14		T 0.44	D 0.25	Y -0.33	Q 4.77	T 4.45	G 1.23	T 2.14	Q 0.96	E 0.30	TTTT T	LDGQ X
13	N 3.28	T 2.37	Q 1.81	P 0.14			P 1.95	G 0.56	E -0.02	T 1.05	D 0.79	Q 0.26	TPPT X	QXGD X
14	Y 0.18									E 0.26	Q 0.20	N 0.09	YXXE X	XXXQ X

**Tabla 9.** Resultados obtenidos del análisis de las secuencias consenso obtenidas de las bandas de MA1-1-4

Secuencia	Organismo con identidad	Identities	No. a.a. proteína parecida	Comentarios
<b>XHPPXXIVAAXXXX</b>	Proteína predicha de la <i>Hydra magnipapillata</i>	<b>6/8 (75%)</b> Query 3 PPXXIVAA 10 PP IVAA Sbjct 76 PPRWIVAA 83	<b>294</b>	Actividad desconocida
<b>HPAAHMAAVIVTXX</b>	Proteína predicha de la anémona <i>Nematostella vectensis</i>	<b>6/8 (75%)</b> Query 2 PAAHMAAV 9 PA HMA V Sbjct 379 PAEHMAQV 386	<b>576</b>	Actividad desconocida

### 7.11.2 Análisis de las fracciones MA1-1-7 y MA1-1-8 por espectrometría de masas

Después de la transferencia a las membranas, las bandas provenientes de las fracciones MA1-1-7 (carriles 4 y 5) y MA1-1-8 (carriles 6 y 7), se extrajeron del gel (cortándolas) y se analizaron por espectrometría de masas. De las bandas analizadas de la fracción MA1-1-7 no se obtuvieron resultados. Por otra parte, de la banda proveniente de la fracción MA1-1-8 se identificaron varias secuencias de aminoácidos que mostraron identidad con dos proteínas provenientes de diferentes organismos (Tabla 10). Las secuencias numeradas del 1 – 9 se analizaron en el BLASTp y se encontraron similitudes con secuencias que se encuentran en la proteína de unión a la clorofila (PCP) en el dinoflagelado *Symbiodinium pilosum* y en el hidrocoral *M. dichotoma*. Estas secuencias también se analizaron con el programa ClustaIW2, utilizando las secuencias de PCP de ambos organismos encontradas en la base de datos del BLASTp y las secuencias obtenidas de *M. alcicornis* (secuencias 1 – 9). Los resultados de este análisis se pueden observar en la Figura 26 en donde los aminoácidos que están resaltados en verde indican las diferencias que presentan las secuencias de *M. alcicornis* con respecto al organismo con el que se están alineando. Se puede observar que las secuencias tienen solo 8 diferencias con respecto a *Millepora dichotoma* y 11 diferencias con respecto a *Simbiodinium pilosum*.

Adicionalmente, el análisis de las secuencias 10 y 11 (Tabla 10) en el BLASTp, indicó que estas secuencias muestran similitudes con un péptido neurotóxico de 92 aminoácidos contenido en el veneno de la serpiente *Drysdalia coronoides* cuya secuencia fué predicha a partir del análisis del genoma. También se realizó un análisis de estas secuencias utilizando el programa ClustaIW2. Debido a que se obtuvieron dos secuencias con grados distintos de identidad con este péptido, el análisis se realizó, tanto con cada secuencia por separado (Figura 27, primeros dos alineamientos), como considerándolos como 1 sólo péptido (en el orden definido por los alineamientos individuales). Los aminoácidos que están señalados con un asterisco indican, que éstos son iguales; dos puntos indican

que los aminoácidos son muy similares y el espacio, que los aminoácidos son diferentes. En este análisis, se obtuvo una puntuación de 52 al analizar la identidad de la secuencia 11 con el péptido de *D. coronoides*, la secuencia 12 muestra una puntuación más baja (21).

**Tabla 10.** Secuencias obtenidas a partir del análisis por espectrometría de masas de la fracción MA1-1-8.

No. SEC.	IÓN m/z	SECUENCIA	ESPECIE / IDENTIDAD
1	1657.82	TGVLAHSQAIANMDSK	PCP [ <i>Symbiodinium pilosum</i> ]
2	2574.28	YTAINAAIGHMISSVPASK	PCP [ <i>Millepora dichotoma</i> ]
3	2573.34	GVATLADYTAINSAIGHMISSVPASK	PCP [ <i>Symbiodinium pilosum</i> ]
4	3713.79	SVPASKTMDVYNAFAK	PCP [ <i>Symbiodinium pilosum</i> ]
5	1325.60	EIDWTSDVYAK	PCP [ <i>Symbiodinium pilosum</i> ]
6	1112.48	MGASMDSAALK	PCP [ <i>Millepora dichotoma</i> ]
7	1122.50	MGASMDPAALK	PCP [ <i>Symbiodinium pilosum</i> ]
8	1597.80	AAYQALMDFKDVVK	PCP [ <i>Millepora dichotoma</i> ]
9	1233.74	LPTQPPLEVLK	PCP [ <i>Millepora dichotoma</i> ]
10	2176.98	CLAPNTCQPGLLPYTK	<i>D. coronoides</i>
11	2056.88	CGQALTVFCTEDCR	<i>D. coronoides</i>



**Figura 26.** Alineamiento múltiple de las secuencias 1 – 9 de *M. alcicornis* con la PCP de *M. dichotoma* y *S. pilosum*. Los aminoácidos resaltados en verde indican las diferencias de la secuencia con respecto al organismo.

□

```

Drysdalia coronoides MKTLLLTIVVVTIVCLDLGDSLICYQAYNTPQTCAPGENLCYTKTWCDAFCSIRGRRVDL 60
M. alcicornis -----CL-----APNTCQPGGLPYTK----- 17
                **                :*: ** * * ***
                                   |----Ma10-----|

Drysdalia coronoides GCAATCPTAKPGVDITCCSTDKCNPHPAHQSR 92
M. alcicornis -----

Score
52.0

Drysdalia coronoides MKTLLLTIVVVTIVCLDLGDSLICYQAYNTPQTCAPGENLCYTKTWCDAFCSIRGRRVDL 60
M. alcicornis -----C---GQALTV 7
                                   * * : : :
                                   |--Ma11--|

Drysdalia coronoides GCAATCPTAKPGVDITCCSTDKCNPHPAHQSR 92
M. alcicornis FCTEDCR----- 14
                * : *

Score
-- Ma11-|
21.0

Drysdalia coronoides MKTLLLTIVVVTIVCLDLGDSLICYQAYNTPQTCAPGENLCYTKTWCDAFCSIRGRRVDL 60
M. alcicornis -----CL-----APNTCQPGGLPYTK-----C----- 18
                **                :*: ** * * ***                *
                                   |----Ma10-----|

Drysdalia coronoides GCAATCPTAKPGVDITCCSTDKCNPHPAHQSR 92
M. alcicornis -----GQALTVFCTEDCR----- 31
                * : * . * : . * .
                                   |----Ma11--|

Score
38.0

```

**Figura 27.** Alineamiento de las secuencias 10 y 11 de *M. alcicornis* con *D. coronoides*.

## 8 DISCUSIÓN

Las especies del género *Millepora* son llamadas “corales de fuego”, ya que el contacto con ellas provoca un severo dolor y lesiones en la piel semejantes a quemaduras. Hasta la fecha, el mecanismo de envenenamiento provocado por estas especies no ha sido completamente establecido. En los estudios realizados con los extractos de diferentes hidrocorales se ha reportado actividad hemolítica provocada por proteínas citolíticas con o sin actividad enzimática (PLA<sub>2</sub>) y letalidad en ratones; también se ha encontrado que tienen la capacidad de afectar otros tipos celulares y provocar daños como inflamación y dermonecrosis (Mariottini & Pane 2013a), así como toxicidad sistémica, daño renal, síndrome nefrítico y edema pulmonar (Prasad *et al.* 2006). Estos efectos tóxicos producidos generalmente por proteínas, desaparecen cuando los extractos son sometidos a altas temperaturas (Wittle & Wheeler 1974; Ibarra-Alvarado *et al.* 2007; García-Arredondo *et al.* 2011), pero se han reportado fracciones proteicas de estas especies, que mantienen e incluso aumentan su actividad biológica con este tratamiento (Radwan 2002; Ibarra-Alvarado *et al.* 2007) y son pocas las proteínas que se han logrado purificar e identificar como responsables de estos efectos (Radwan & Aboul-Dahab 2004; Iguchi *et al.* 2008).

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar la toxicidad en ratones, de las toxinas contenidas en el extracto acuoso de *M. alcicornis*, así como caracterizar la actividad hemolítica del mismo. Adicionalmente, se analizó el extracto acuoso obtenido a partir de este hidrocoral, con el objeto de aislar e identificar en la medida de lo posible, los compuestos termolábiles responsables de la actividad hemolítica y el efecto excitatorio en el íleon aislado de cobayo.

En una serie de experimentos, la toxicidad sistémica del extracto fue evaluada en ratones por administración *i.v.* Estudios previos realizados sobre *M. alcicornis* indicaron que las toxinas de este organismo provocaron una hemólisis extensiva y la muerte en ratones, varias horas después de su administración *i.v.* (Wittle *et al.* 1971). En el caso del presente estudio, se observaron síntomas similares, que dependiendo de la dosis, consistieron de hemólisis general, respiración forzada, convulsiones y muerte. Sin embargo, la letalidad del extracto preparado de especímenes de *M. alcicornis* recientemente colectados en el Caribe Mexicano fue menor (LD<sub>50</sub> = 17 µg proteína/g) que el producido por los especímenes previamente estudiados en 1971 (LD<sub>50</sub> = 0.55 and 1.136 µg proteína/g). Estas diferencias pueden atribuirse a cambios fenotípicos provocados por las diferentes condiciones ambientales, ya que los especímenes fueron colectados en diferentes zonas y tiempos, lo que seguramente resulta en variaciones en la producción de toxinas. Resulta interesante el hecho de que se encontraron diferencias entre la toxicidad inducida por el extracto acuoso de *M. alcicornis* y la

toxicidad producida por el extracto acuoso de otra especie recolectada en el Mar Caribe mexicano, *M. complanata*. En nuestros estudios previos, observamos que el extracto de *M. complanata* inducía dos tipos de muerte en ratones después de la administración *i.v.*: a dosis superiores a la DL<sub>50</sub> (DL<sub>50</sub> = 4.62 µg proteína/g) el extracto produjo violentas convulsiones y muerte en el lapso de un minuto. Sin embargo, dosis menores indujeron una muerte lenta, similar a la provocada por el extracto de *M. alcicornis*. Después de la desnaturalización por calentamiento, el extracto de *M. complanata* perdió completamente su capacidad de inducir la muerte lenta, pero conservó sus efectos letales inmediatos (García-Arredondo *et al.* 2015). En contraste, el extracto desnaturalizado de *M. alcicornis* no indujo ninguna respuesta en ratones, lo que sugiere que los compuestos responsables de la toxicidad sistémica inducida por el extracto acuoso de *M. alcicornis* son proteínas termolábiles, mientras que el extracto de *M. complanata* adicionalmente contiene toxinas termoestables que son capaces de inducir una muerte rápida en ratones.

El análisis histopatológico de tejidos disectados de ratones administrados con el extracto acuoso de *M. alcicornis* reveló daños importantes a pulmones, hígado y riñones. Se han observado efectos similares en ratones después de la administración intravenosa de un extracto de tentáculos de la medusa *Cyanea capillata* (Wang *et al.* 2013). En este estudio, se encontró que dosis altas del extracto acuoso de *M. alcicornis* produjeron la muerte de los ratones, en un lapso menor de 2 h, probablemente debido a la toxicidad aguda relacionada con daños en el sistema nervioso y corazón. Por otra parte, dosis bajas del extracto del hidrocoral produjeron mortalidad en un lapso de tiempo entre las 2 y 48 h, la cual se encontró asociada con falla renal y hepática aguda. Es importante mencionar que el daño inducido por una toxina a múltiples órganos ha sido definido como “síndrome de envenenamiento retardado ocasionado por medusa”, este síndrome no ha sido completamente elucidado, sino que se ha relacionado con el efecto sinérgico de varios mecanismos tóxicos, causados por una variedad de toxinas contenidas en el veneno de medusas (Wang *et al.* 2013). En este trabajo, se encontró que el extracto acuoso de *M. alcicornis* indujo un síndrome de envenenamiento retardado similar al ejercido por el veneno de *C. capillata* y el extracto acuoso de *M. complanata* (García-Arredondo *et al.* 2015). Es muy probable que estos efectos tóxicos sean causados principalmente por citolisinas que alteran varios tipos celulares, incluyendo los de los tejidos epiteliales. Se ha observado que las células epiteliales de las nefronas pueden ser marcadamente afectadas por las citolisinas (Ali *et al.* 2000), ya que los riñones representan la principal ruta de eliminación de las toxinas. Por lo tanto, la hemoglobulinuria provocada por el extracto de *M. alcicornis* en ratones podría ser una consecuencia de daño renal y hemólisis. Además, previamente, nuestro grupo de trabajo ha encontrado que los extractos acuosos de *M. alcicornis* y *M. complanata* provocan vasoconstricción en anillos aislados de aorta

(García-Arredondo et al. 2011). Este efecto vasoconstrictor podría también ocasionar daños a múltiples órganos como consecuencia de respuestas compensatorias debido a isquemia o hipoxia. Estos efectos tóxicos sistémicos observados en ratones podrían explicar que el contacto de los humanos con estos hidrocorales puede resultar en daño renal (Moats 1992).

Se llevó a cabo el análisis de citotoxicidad empleando como modelo los nauplios de *A. salina* para analizar la toxicidad del extracto acuoso de *M. alcicornis*. Este extracto fue letal para *A. salina* ( $LD_{50} = 70.71 \mu\text{g proteína/ml}$ ), lo cual no es de sorprender, ya que pequeños crustáceos son parte de la dieta de los hidrocorales de *Millepora* (Lewis 2006).

El extracto desnaturalizado fue significativamente menos letal para los crustáceos ( $LD_{50} = 960.28 \mu\text{g proteína/ml}$ ), indicando que los compuestos citotóxicos son principalmente proteínas termolábiles. El análisis microscópico de las artemias incubadas en presencia del extracto mostró disociación de los tejidos. Este efecto usualmente es atribuido a las citolisinas formadoras de poros, las cuales forman poros en las membranas de estos crustáceos, lisando las células y desintegrando los tejidos para facilitar la fagocitosis y la subsecuente digestión de la presa (Sher et al. 2008).

Hasta la fecha, los mecanismos hemolíticos de los venenos de *Millepora* no han sido completamente caracterizados, pero estudios previos sugieren que las proteínas con actividad de  $PLA_2$  contribuyen de manera muy significativa a este efecto. En este contexto, se ha reportado que las especies de *Millepora* poseen mayores niveles de actividad de  $PLA_2$  que otros cnidarios (Nevalainen et al. 2004). En un estudio previo, realizado por nuestro grupo de trabajo (Ibarra-Alvarado et al. 2007), se encontró que la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. complanata* disminuyó significativamente después de incubarlo con el inhibidor de la  $PLA_2$ , *p*-BPB, y se detectó una hemolisina con un peso molecular similar al de la Milleporina-1, una  $PLA_2$  detectada en el veneno de *M. platyphylla* (Radwan & Aboul-Dahab 2004). También se encontró que el extracto acuoso de *M. complanata* tiene actividad de  $PLA_2$ , pero no actividad de proteasa (García-Arredondo et al. 2015). Acorde a esto, los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la hemólisis producida por el extracto acuoso de *M. alcicornis*, sobre eritrocitos de rata, fue inhibida de manera significativa, aunque no fue completamente bloqueada por *p*-BPB, y no contiene proteasas. Estos resultados indican que las toxinas con actividad de  $PLA_2$  contribuyen significativamente a la hemólisis general inducida por el veneno de este hidrocoral. Sin embargo, es de esperarse que este extracto también contenga toxinas formadoras de poros, ya que la actividad hemolítica del extracto no se inhibió completamente con el inhibidor de  $PLA_2$ .

En otra serie de experimentos, la hemólisis causada por el extracto acuoso del coral de fuego *M. alcicornis* se evaluó en eritrocitos de rata, humano, ratón, pollo, cobayo y conejo. Los resultados de

este estudio indicaron que los eritrocitos de rata fueron los más sensibles al efecto hemolítico del extracto acuoso del hidrocoral, mientras que los eritrocitos de pollo fueron los menos susceptibles. Es muy probable que estas diferencias en la susceptibilidad de los eritrocitos a la lisis, dependan de la composición de sus lípidos membranales. A este respecto, se han reportado estudios relacionados con el mecanismo de inserción de citolisinas formadoras de poros de cnidarios (actinoporinas). Estas toxinas (proteínas de 28 kDa) se unen de manera irreversible con alta afinidad a membranas que contienen esfingomielina, mientras que otros tipos de péptidos citolíticos (5-8kDa) muestran una preferencia por membranas que contienen fosfatidilcolina (Anderluh & Maček 2002). Una variedad de nuevas citolisinas formadoras de poros han sido aisladas de cnidarios y su actividad depende fuertemente de la composición de los lípidos de membrana (Brinkman & Burnell 2009; Razpotnik *et al.* 2009; Mariottini & Pane 2013b). Respecto a las citolisinas con actividad de PLA<sub>2</sub>, estudios cinéticos han revelado que estas enzimas pueden desplegar diferentes afinidades por las membranas, dependiendo de la composición de fosfolípidos (Saikia *et al.* 2012). En un estudio previo, en cuanto a la caracterización de la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. complanata* colectado en el Mar Caribe mexicano, nuestro grupo de trabajo encontró un comportamiento similar en la susceptibilidad de los eritrocitos a la lisis (García-Arredondo *et al.* 2014), lo que sugiere que las citolisinas producidas por ambos hidrocorales del Caribe tienen una alta similitud en los dominios de unión a la membrana. Estos resultados contrastan con los encontrados por Shiomi y col. (1989), quienes evaluaron la actividad hemolítica de los venenos de *M. dichotoma* y *M. platyphyla* en eritrocitos de vaca, caballo, oveja, conejo, cobayo, ratón y pollo. Estos investigadores observaron que los eritrocitos de caballo eran altamente sensibles al veneno de *M. dichotoma*, pero fueron mucho menos sensibles al veneno de *M. platyphyla*. Contrariamente, los eritrocitos de pollo fueron más sensibles al veneno de *M. platyphyla* que al de *M. dichotoma*.

En este estudio también encontramos que la actividad hemolítica inducida por el extracto de *M. alcornis* se redujo progresivamente cuando fue pre-incubado a temperaturas arriba de 45 °C, y se perdió completamente después de pre-incubar el extracto a temperaturas superiores a los 70 °C. Estos resultados indican que las hemolisinas contenidas en este extracto son principalmente proteínas termolábiles. Estas hemolisinas son relativamente estables en un rango de temperaturas de incubación de 30 - 43 °C. A temperaturas inferiores a 30 °C, la actividad hemolítica del extracto acuoso se redujo, lo cual indica que temperaturas cálidas estimulan la reacción hemolítica. Además, las hemolisinas de *M. alcornis* también mostraron alta estabilidad a variaciones de pH, ya que su actividad se conservó en el rango de 2 a 12. Estos resultados difieren de los observados en un estudio llevado a cabo con un extracto preparado de *M. alcornis* colectado en las playas de Miami (Wittle *et al.* 1971). En ese

estudio, el extracto conservó su actividad en un rango de pH de 5.5-8.7, pero la perdió a un pH de 4.8. Estas diferencias confirman que la síntesis y la actividad de toxinas dependen en gran medida de las condiciones ambientales. También se ha reportado que la actividad hemolítica de los venenos de cnidarios exhibe una dependencia diferenciada a los cationes divalentes; particularmente, las PLA<sub>2</sub> de cnidarios, las cuales tienen un asa de unión a Ca<sup>2+</sup> altamente conservada (Sher *et al.* 2005a). Con respecto a las toxinas formadoras de poros de los cnidarios, se ha demostrado que el Ca<sup>2+</sup> es necesario para la dimerización de la toxina dentro de la membrana (Gusmani *et al.* 1997), mientras que otras toxinas formadoras de poros en los cnidarios pueden ser inhibidas por Zn<sup>2+</sup> (Yanagihara & Shohet 2012). En este estudio, encontramos que la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. alcicornis* aumentó en presencia de  $\geq 0.01$  mM (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> o Ba<sup>2+</sup>) y se redujo en presencia de Cu<sup>2+</sup> ( $\geq 0.1$  mM), Zn<sup>2+</sup> ( $\geq 6$  mM) y EDTA ( $\geq 0.43$  mM). Estos resultados indican que los cationes divalentes modifican la actividad hemolítica inducida por el extracto acuoso de este hidrocoral. En el caso de la inhibición por EDTA, este efecto puede ser atribuido a la quelación del Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Estos descubrimientos difieren de los obtenidos en nuestros estudios previos, en donde examinamos el efecto del Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> en la actividad hemolítica inducida por el extracto acuoso de *M. complanata* (García-Arredondo *et al.* 2014), lo que sugiere diferencias estructurales entre el asa de unión a Ca<sup>2+</sup> de las citolisinas producidas por estas especies de *Millepora*. Es importante mencionar que la inhibición de la actividad citolítica por Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y EDTA podría ser útil para el desarrollo de tratamientos adecuados para las lesiones causadas por los corales de fuego. Estudios previos han reportado que el gluconato de zinc inhibe la salida de potasio de los eritrocitos expuestos al veneno o hemolisinas purificadas de *Chironex fleckeri* y prolonga el tiempo de sobrevivencia en ratones inyectados con el veneno. Por lo que, la administración de este ion ha sido considerada útil en el tratamiento de víctimas en las lesiones por *C. fleckeri* (Yanagihara & Shohet 2012).

El análisis electroforético reveló que el extracto de *M. alcicornis* contiene proteínas con un amplio rango de pesos moleculares. El análisis por zimografía indicó la presencia de tres bandas que mostraron actividad hemolítica: dos bandas muy cercanas, de pesos moleculares aproximados entre 28 y 30 kDa y una banda de más de 200 kDa. Las bandas entre 28 y 30 kDa presentaron actividad de PLA<sub>2</sub>, mientras que la banda de 200 kDa no tuvo actividad enzimática, lo cual sugiere la presencia de citolisinas poliméricas formadoras de poros. Este tipo de toxinas han sido descritas en venenos de cnidarios de la clase Hydrozoa. Por ejemplo, la physalitoxina es una potente hemolisina de 240 kDa detectada en el veneno de *Physalia physalis* (Tamkun & Hessinger 1981). Los resultados del análisis por espectrometría de masas de las bandas entre 28 y 30 kDa, mostraron que la banda de aproximadamente 30 kDa contiene tres secuencias que muestran homología con proteínas de la clase

de las hidralisinas, las cuáles son toxinas de entre 218 y 244 a.a. que han sido encontradas en el hidrocoral *Hydra viridis*. Al parecer, estas nuevas proteínas formadoras de poros son necesarias para los cnidarios, por lo que es de esperarse que estén presentes en *M. alcicornis*, ya que este tipo de toxinas, que no se encuentran en los nematocistos, son importantes para la digestión de la presa, debido a que su función es lisar y desintegrar tejidos (Sher *et al.* 2008).

Con respecto al efecto sobre la musculatura lisa inducido por las toxinas producidas por las especies del género *Millepora*, estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo sobre *M. complanata*, indicaron que el extracto acuoso de este hidrocoral produce un efecto excitatorio dependiente de la concentración, en el íleon aislado de cobayo (Rojas *et al.* 2002). En el caso del presente estudio, se encontró que el extracto acuoso de *M. alcicornis* también induce un efecto excitatorio sostenido en íleon. Este efecto disminuyó cuando el extracto se incubó veinte minutos a temperatura de ebullición, pero no desapareció, lo que sugiere que el extracto acuoso de *M. alcicornis* contiene compuestos termolábiles y termoestables capaces de inducir un efecto excitatorio en el íleon.

El análisis cromatográfico del extracto acuoso de *M. alcicornis*, permitió la identificación de varias fracciones activas con efecto excitatorio en íleon y actividad hemolítica. Se encontró evidencia de que algunos de los compuestos bioactivos contenidos en estas fracciones son termolábiles, ya que cuando las fracciones primarias MA1 y MA2 se incubaron a temperatura de ebullición durante veinte minutos, perdieron su actividad hemolítica y el efecto excitatorio de la musculatura lisa intestinal se modificó. Las fracciones cromatográficas activas más importantes se obtuvieron después de realizar diferentes análisis cromatográficos consecutivos que involucraron: cromatografía de intercambio aniónico con DEAE celulosa; cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-15 y cromatografía de adsorción en fase reversa, utilizando una columna C-4. Las fracciones denominadas MA1-1-7 y MA1-1-8 conservaron el efecto excitatorio y las fracciones MA1-1-2, MA1-1-4, MA1-1-8 y MA1-1-9 mantuvieron la actividad hemolítica.

El análisis cromatográfico de algunas fracciones que presentaron efecto excitatorio de la musculatura lisa intestinal y actividad hemolítica (MA1-1-4 y MA1-1-8), indicó que éstas contienen péptidos de pesos moleculares menores a 10 kDa y proteínas de aproximadamente 40 kDa. Adicionalmente, dicho análisis mostró que, al menos una fracción excitatoria en íleon, contiene proteínas que tienen un peso molecular de aproximadamente 48 kDa (MA 1-1-7). Al parecer, en el extracto acuoso de los venenos de las especies de *Millepora* hay una diversidad de proteínas excitatorias y hemolíticas con un rango amplio de pesos moleculares. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los encontrados en el análisis cromatográfico del extracto acuoso de *M. complanata*, realizado previamente por nuestro grupo de trabajo (Rojas *et al.* 2002). En dicho estudio

se reportó que el extracto de este hidrocoral contenía péptidos de 1.8 kDa que inducían un efecto excitatorio en el íleon. Ese estudio mostró también que el efecto excitatorio puede deberse a un aumento parcial en la permeabilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L (Rojas *et al.* 2002), por lo que es posible que este mecanismo de acción esté involucrado en el efecto contráctil inducido por el extracto acuoso de *M. alcicornis* y las fracciones bioactivas obtenidas a partir de éste sobre el músculo liso del íleon.

Las fracciones MA1-1-4 y MA1-1-8 con actividades hemolítica y excitatoria, respectivamente pueden ser proteínas básicas o débilmente negativas que no logran ser retenidas, ya que provienen de la fracción primaria MA1 que eluyó al inicio de la separación por intercambio aniónico. En este sentido, resulta interesante que varias de las fracciones que presentaron actividad hemolítica (MA1-2, MA1-1-2, MA1-1-8 y MA1-1-9), también contienen proteínas con carácter básico o débilmente negativo. Desafortunadamente, algunas de las fracciones bioactivas que presentaban efecto excitatorio en el íleon aislado de cobayo, así como hemolítico, perdieron su actividad farmacológica durante el proceso de separación, esto debido posiblemente a la pérdida de un cofactor, o a la separación de proteínas que sólo unidas presentan actividad biológica, debido a un efecto sinérgico, como es el caso de las proteínas aisladas de *Aiptasia pallida* que presentaban un efecto hemolítico sinérgico (Grotendorst & Hessinger 2000). En ese estudio, se reportó que una de ellas presentaba actividad de  $\text{PLA}_2$  con dos formas isozímicas, una forma  $\alpha$  con un peso molecular de 45 kDa y un pI de 8.8 que contribuía al 80% de la actividad de  $\text{PLA}_2$ , y una forma  $\beta$  de 43kDa. Además se encontró un factor co-lítico no enzimático con un peso molecular de 98kDa, indispensable para la actividad hemolítica del veneno. En este trabajo, en donde se identificó la actividad de  $\text{PLA}_2$ , podríamos tener la presencia de compuestos con efectos sinérgicos, por lo que la pérdida de actividad de los compuestos bioactivos es una posibilidad que debe tomarse en cuenta en las estrategias de separación.

El análisis de la banda analizada correspondiente a la fracción MA1-1-4 indicó que esta fracción contiene proteínas muy similares o que podrían representar varias isoformas, debido a un aumento, depleción o cambio en algunos de sus aminoácidos, lo que pudiera estar modificando sus características de carga neta, peso y tamaño. Estas diferencias se pueden observar por electroforesis; como en el caso del presente trabajo, en donde las isoformas se observan en la membrana como diferentes bandas muy cercanas. La presencia de isoformas es común en las toxinas de venenos, así como en las toxinas hemolíticas de cnidarios (Grotendorst & Hessinger 2000). Su presencia parece proporcionarles a estos organismos ciertas ventajas, tales como actividad sinérgica y/o diversificación de sus presas.

La secuenciación por degradación de Edman de las bandas de la fracción MA1-1-4 indicó la presencia de 3 secuencias denominadas A, B y C. La secuencia A fue la más abundante, la secuencia B fue menos abundante y la C la menos abundante de las tres. Esta tercera secuencia está presente en cada secuenciación, sólo que en cantidades muy menores a las otras dos, por lo que, su presencia podría deberse a que en realidad no se trata de un trímero, sino de monómeros o dímeros con o sin isoformas de diferente tamaño. Además, al parecer, ocurre una ruptura en un enlace peptídico sensible al ácido, lo que da como resultado la presencia de las tres secuencias: la de las cadenas que no se rompen, y dos secuencias de las cadenas que se generaron debido a la sensibilidad al ácido.

Las secuencias consenso analizadas en el BLASTp mostraron identidad con proteínas predichas de la anemona *Nematostella vectensis* y del hidroide *Hydra magnipapillata*. Estos resultados indican que las secuencias identificadas pertenecen a una proteína encontrada en los cnidarios, con actividad desconocida. Vale la pena mencionar que a la fecha, las bases de datos que contienen información con relación a las secuencias de aminoácidos de péptidos y proteínas de cnidarios, ya sea identificadas experimentalmente o predichas a partir del genoma, contienen poca información al respecto, debido a que son escasos los estudios genómicos o proteómicos sobre organismos de este Phylum.

El análisis, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, reveló la presencia de 11 secuencias internas presentes en la fracción MA1-1-8. Nueve de estas secuencias presentaron homología con una proteína de unión a clorofila. Esta proteína se une a la clorofila, que es necesaria para la captación de electrones en el ciclo de la fotosíntesis, y ya había sido encontrada en *M. dichotoma* y en el dinoflagelado *Symbiodinium pilosum*. Esta proteína conocida como PCP pertenece a este dinoflagelado simbiote, también encontrado en *Zooanthus sociatus* que es un hexacoral de la clase Anthozoa (Sadler *et al.* 1992).

En esta fracción también se identificaron dos secuencias adicionales (10 y 11). El análisis con BLASTp, indicó una similitud entre estos dos fragmentos y el péptido neurotóxico de *D. coronoides*. El análisis con Clustal W2 reveló que estos fragmentos se localizan dentro de la secuencia de aminoácidos del péptido de *D. coronoides* que es identificada como el sitio de unión al receptor (Chatrath *et al.* 2011). *D. coronoides* contiene otras proteínas con efecto tóxico que varían en algunos aminoácidos, pero la identidad con la secuencia 11 se mantiene.

Los resultados derivados del presente estudio indicaron que el extracto acuoso del hidrocoral *M. alcicornis*, contiene compuestos termolábiles que presentan efectos letales en ratones y *A. salina*; estos efectos letales pueden ser atribuidos a las citolisinas presentes en estos organismos, que muestran actividad hemolítica, con y sin actividad enzimática y actividad excitatoria en el íleon. Estas toxinas

además, tienen un amplio rango de pesos moleculares. Continuar con la purificación de las citolisinas producidas por los organismos del género *Millepora*, así como con la caracterización de su mecanismo de acción, es fundamental para entender mejor sus actividades farmacológicas y toxicológicas.

## 9 CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo demostraron que el extracto acuoso de *M. alcornis* contiene proteínas hemolíticas termolábiles, estables a cambios de pH, y cuya actividad es dependiente de calcio. Algunas de estas hemolisinas detectadas en el extracto por zimografía, son proteínas de aproximadamente 28 kDa con actividad de PLA<sub>2</sub>. También se logró la identificación parcial de la estructura primaria de una hemolisina de aproximadamente 30 kDa que muestra homología con la familia de las hidralisinas. Otras de las hemolisinas detectadas por zimografía tienen un peso molecular aproximado de 200 kDa. Estas toxinas no poseen actividad de PLA<sub>2</sub> y posiblemente, actúan por un mecanismo de formación de poros en las membranas. Además, se encontró que el extracto de este hidrocoral induce daño en tejidos de pulmón, riñón e hígado, lo que resulta en una muerte lenta en ratones. El análisis cromatográfico permitió detectar varias fracciones: una de aproximadamente 40 kDa y otra con péptidos menores de 10 kDa, con actividad hemolítica y excitatoria en el íleon; así como una de aproximadamente 48 kDa con actividad excitatoria en íleon. Las proteínas de 40 kDa mostraron homología con proteínas predichas de cnidarios con actividad desconocida. Algunos de los péptidos mostraron homología con la proteína PCP que se encuentra en el simbiote *S. pilosum*, y dos fragmentos mostraron homología con una toxina neurotóxica de *D. coronoides*. Actualmente, se está llevando a cabo un análisis proteómico de las toxinas producidas por *M. alcornis*, con el objeto de caracterizar las citolisinas y las toxinas que modifican la contractilidad del músculo liso intestinal.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

- Ali, S.A., Alam, J.M., Abbasi, A., Zaidi, Z.H., Stoeva, S., Voelter, W., 2000. Sea snake *Hydrophis cyanocinctus* venom. II. Histopathological changes, induced by a myotoxic phospholipase A2 (PLA2-H1). *Toxicon* 38, 687–705. doi:10.1016/S0041-0101(99)00184-1
- Ali, S.A., Alam, J.M., Stoeva, S., Schütz, J., Abbasi, A., Zaidi, Z.H., Voelter, W., 1999. Sea snake *Hydrophis cyanocinctus* venom. I. Purification, characterization and N-terminal sequence of two phospholipases A 2. *Toxicon* 37, 1505–1520.
- Álvarez, C., Mancheño, J.M., Martínez, D., Tejuca, M., Pazos, F., Lanio, M.E., 2009. Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon* 54, 1135–1147.
- Anderluh, G., Barlič, A., Podlesek, Z., Maček, P., Pungerčar, J., Gubenšek, F., Zecchini, M.L., Serra, M.D., Menestrina, G., 1999. Cysteine-scanning mutagenesis of an eukaryotic 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: Actiniaria). *Toxicon* 40, 111–124. doi:10.1016/S0041-0101(01)00191-X
- Anderluh, G., Podlesek, Z., Maček, P., 2000. A common motif in propeptides of Cnidarian toxins and nematocyst collagens and its putative role. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1476, 372–376.
- Anderluh, G., Sepčić, K., Turk, T., Maček, P., 2011. Cytolytic proteins from cnidarians-an overview. *Acta Chim. Slov.* 58, 724–729.
- Andreev, Y.A., Kozlov, S.A., Koshelev, S.G., Ivanova, E.A., Monastyrnaya, M.M., Kozlovskaya, E.P., Grishin, E.V., 2008. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J. Biol. Chem.* 283, 23914–23921. doi:10.1074/jbc.M800776200
- Baker, A.C., 2003. Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 661–689.
- Beckmann, A., Özbek, S., 2012. The nematocyst: a molecular map of the cnidarian stinging organelle. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 577–582.
- Berkelmans, R., Van Oppen, M.J., 2006. The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a “nugget of hope” for coral reefs in an era of climate change. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 273, 2305–2312.
- Bernheimer, A.W., Avigad, L.S., 1976. Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichacis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 467–471.
- Berrué, F., McCulloch, M.W., Kerr, R.G., 2011. Marine diterpene glycosides. *Bioorg Med Chem.* 19, 6702-19. doi: 10.1016/j.bmc.2011.06.083. PubMed PMID: 21783368
- 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. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brinkman, D., Burnell, J., 2007. Identification, cloning and sequencing of two major venom proteins from box jellyfish, *Chironex fleckeri*. *Toxicon* 50, 850–860. doi:10.1016/j.toxicon.2007.12.017
- Brinkman, D.L., Burnell, J.N., 2009. Biochemical and molecular characterisation of cubozoan protein toxins. *Toxicon* 54, 1162–1173. doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.006
- Brinkman, D.L., Konstantakopoulos, N., McInerney, B.V., Mulvenna, J., Seymour, J.E., Isbister, G.K., Hodgson, W.C., 2014. *Chironex fleckeri* (box jellyfish) venom proteins: Expansion of a cnidarian toxin family that elicits variable cytolytic and cardiovascular effects. *J. Biol. Chem.* 289, 4798–4812. doi:10.1074/jbc.M113.534149

- Burhan, R.Y.P., Marhaeni, P.E.M., Zetra, Y., Herdhiansyah, R., Putra, M.Y., 2014. Terpenes from soft corals of the genus *Lobophytum* (Alcyoniidae): Chemistry and biological activities J. Chem. Pharm. Res. 6, 585-595.
- Camarasa, J.G., Nogues Antich, E., Serra-Baldrich, E., 1993. Red Sea coral contact dermatitis. Contact Dermatitis 29, 285–286.
- Campos, L.B., Pucca, M.B., Roncolato, E.C., Bertolini, T.B., Netto, J.C., Barbosa, J.E., 2013. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian *Bothrops spp.* venoms. Toxicon 76, 1–10. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.063
- Cariello, L., de Santis, A., Fiore, F., Piccoli, R., Spagnuolo, A., Zanetti, L., Parente, A., 1989. Calitoxin, a neurotoxic peptide from the sea anemone *Calliactis parasitica*: amino acid sequence and electrophysiological properties. Biochemistry (Mosc.) 28, 2484–9.
- Castañeda, O., Harvey, A.L., 2009. Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology 54, 1119–24. doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.032
- Catterall, W.A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F.H., Konoki, K., Scheuer, T., 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology 49, 124–41. doi:10.1016/j.toxicon.2006.09.022
- Cestèle, S., Catterall, W.A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. Biochimie 82, 883–892. doi:10.1016/S0300-9084(00)01174-3
- Chatrath, S.T., Chapeaurouge, A., Lin, Q., Lim, T.K., Dunstan, N., Mirtschin, P., Kumar, P.P., Kini, R.M., 2011. Identification of novel proteins from the venom of a cryptic snake *Drysdalia coronoides* by a combined transcriptomics and proteomics approach. J. Proteome Res. 10, 739–750. doi:10.1021/pr1008916
- Chao, C., Kuo, Y., Sheu, J., 2009. Crassocolides G-M, Cembranoids from the Formosan Soft Coral *Sarcophyton crassocaule*. Chem. Biodivers. 6, 1232-1242.
- Chen, W.H., Wang, S.K., Duh, C.Y., 2011. Polyhydroxylated steroids from the bamboo coral *Isis hippuris*. Mar Drugs. 9, 1829-39. doi: 10.3390/md910182910. PubMed PMID: 22072998; PubMed Central PMCID: PMC3210607
- Chen, W., Li, Y., Guo, Y., 2012. Terpenoids of Sinularia soft corals: chemistry and bioactivity. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2, 227-237.
- Chen, W.F., Yin, C.T., Cheng, C.H., Lu, M.C., Fang, L.S., Wang, W.H., Wen, Z.H., Chen, J.J., Wu, Y.C., Sung, P.J., 2015. Norcembranoidal diterpenes from the cultured-type octocoral *Sinularia numerosa*. Int. J. Mol. Sci. 16, 3298-306. doi: 10.3390/ijms16023298. PubMed PMID: 25654226; PubMed Central PMCID: PMC4346896
- Cheng, S.Y., Wen, Z.H., Wang, S.K., Chiang, M.Y., El-Gamal, A.A., Dai, C.F., Duh, C.Y., 2009. Revision of the absolute configuration at C(23) of lanostanoids and isolation of secondary metabolites from formosan soft coral *Nephthea erecta*. Chem. Biodivers. 6, 86-95. doi: 10.1002/cbdv.200800015
- Cline, E.I., 1997. UpI: In vivo studies involving the potent cardiac stimulant and haemolysin from the sea anemone *Urticina piscivora*. Phytother. Res. 11, 348–353.
- Cline, E.I., Wiebe, L.I., Young, J.D., Samuel, J., 1995. Toxic effects of the novel protein UpI from the sea anemone *Urticina piscivora*. Pharmacol. Res. 32, 309–314.
- Coffroth, M.A., Santos, S.R., 2005. Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. Protist 156, 19–34.
- Collins, A.G., 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. J. Evol. Biol. 15, 418–432.
- Daly, M., Brugler, M.R., Cartwright, P., Collins, A.G., Dawson, M.N., Fautin, D.G., France, S.C., McFadden, C.S., Opresko, D.M., Rodriguez, E., Romano, S.L., Stake, J.L., 2007. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. Zootaxa 182, 127–182. doi:10.1016/j.biopysch.2005.09.016

- David, C.N., Özbek, S., Adamczyk, P., Meier, S., Pauly, B., Chapman, J., Hwang, J.S., Gojobori, T., Holstein, T.W., 2008. Evolution of complex structures: minicollagens shape the cnidarian nematocyst. *Trends Genet.* 24, 431–438.
- Davies, P.J., Montaggioni, L.F., 1985. Reef Growth and Sea-level: The Environmental Signature. *Proceedings of the Fifth International Coral Reef Symposium*. Tahiti 477-515.
- Deeds, J.R., Schwartz, M.D., 2010. Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon*. 56, 150-62. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.05.035 PubMed PMID: 19505494
- Delfin, J., Martínez, I., Antuch, W., Morera, V., González, Y., Rodríguez, R., Marquez, M., Saroyan, A., Larionova, N., Diaz, J., others, 1996. Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 34, 1367–1376.
- del Monte-Martínez, A., González-Bacerio, J., Romero, L., Aragón, C., Martínez, D., Chávez, M. de los Á., Álvarez, C., Lanio, M.E., Guisán, J.M., Díaz, J., 2014. Improved purification and enzymatic properties of a mixture of Sticholysin I and II: Isotoxins with hemolytic and phospholipase A2 activities from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Protein Expr. Purif.* 95, 57–66.
- Dennis, E.A., 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 269, 13057–13057.
- Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., Lazdunski, M., 2004. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* 23, 1516–25. doi:10.1038/sj.emboj.7600177
- Diochot, S., Loret, E., Bruhn, T., Béress, 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., Béress, 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. doi:10.1074/jbc.273.12.6744
- Epp, L., Smid, I., Tardent, P., 1986. Synthesis of the mesoglea by ectoderm and endoderm in reassembled hydra. *J. Morphol.* 189, 271–279.
- Fautin, D.G., Westfall, J.A., Cartwright, P., Daly, M., Wytenbach, C.R., 2005. *Coelenterate Biology 2003: Trends in Research on Cnidaria and Ctenophora*. Springer Science & Business Media.
- Fernández, A. María; Rivas, G., 2007. Niveles de organización en animales. UNAM, Distrito Federal.
- Finney, D.J., 1971. Probit Analysis. *J. Pharm. Sci.* 60, 1432. doi:10.1002/jps.2600600940
- Fontana, A., Ciavatta, M.L., Cimino, G., 1998. Cladocoran A and B: Two novel gamma-hydroxybutenolide sesterterpenes from the Mediterranean coral *Cladocora cespitosa*. *J. Org. Chem.* 63, 2845-2849.
- Fox, J.W., Serrano, S.M., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969–985.
- Frazão, B., Vasconcelos, V., Antunes, A., 2012. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Mar. Drugs* 10, 1812–1851. doi:10.3390/md10081812
- Freeman, G., Miller, R.L., 1982. Hydrozoan eggs can only be fertilized at the site of polar body formation. *Dev. Biol.* 94, 142–152.
- Fry, B.G., Roelants, K., Champagne, D.E., Scheib, H., Tyndall, J.D.A., King, G.F., Nevalainen, T.J., Norman, J.A., Lewis, R.J., Norton, R.S., others, 2009. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10, 483–511.
- Galliot, B., Schmid, V., 2002. Cnidarians as a model system for understanding evolution and regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 39–48.
- García-Arredondo, A., Murillo-Esquivel, L.J., Rojas, A., Sanchez-Rodríguez, J., 2014. Characteristics of hemolytic activity induced by the aqueous extract of the Mexican fire coral *Millepora complanata*. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 20, 49. doi:10.1186/1678-9199-20-49

- García-Arredondo, A., Rojas-Molina, A., Bah, M., Ibarra-Alvarado, C., Gallegos-Corona, M.A., García-Servín, M., 2015. Systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora complanata* and partial purification of thermostable neurotoxins with lethal effects in mice. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 169, 55–64.
- García-Arredondo, A., Rojas-Molina, 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. doi:10.1016/j.jembe.2010.10.021
- Garzón, S.P., Rodríguez, A.D., Sánchez, J.A., Ortega-Barria, E., 2005. Sesquiterpenoid metabolites with antiplasmodial activity from a Caribbean gorgonian coral, *Eunicea* sp. *J Nat Prod.* 68, 1354-9. PubMed PMID: 16180813
- Gerhart, D.J., Rittschof, D., Mayo, S.W., 1988. Chemical ecology and the search for marine antifoulants : Studies of a predator-prey symbiosis. *J Chem Ecol.* 14, 1905-1917. doi: 10.1007/BF01013485. PubMed PMID: 24277102
- Giraldi, T., Ferlan, I., Romeo, D., 1976. Antitumour activity of equinatoxin. *Chem. Biol. Interact.* 13, 199–203.
- Glynn, P.W., Maté, J.L., Baker, A.C., Calderón, M.O., 2001. Coral bleaching and mortality in Panama and Ecuador during the 1997–1998 El Niño–Southern Oscillation event: spatial/temporal patterns and comparisons with the 1982–1983 event. *Bull. Mar. Sci.* 69, 79–109.
- Grote, D., Hänel, F., Dahse, H.M., Seifert, K., 2008. Capnellenes from the soft coral *Dendronephthya rubeola*. *Chem. Biodivers.* 5, 1683-1693.
- Grotendorst, G.R., Hessinger, D.A., 2000. Enzymatic characterization of the major phospholipase A 2 component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon* 38, 931–943.
- Gusmani, L., Avian, M., Galil, B., Patriarca, P., Rottini, G., 1997. Biologically active polypeptides in the venom of the jellyfish *Rhopilema nomadica*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology.* doi:10.1016/S0041-0101(96)00182-1
- Hand, C., Uhlinger, K.R., 1992. The culture, sexual and asexual reproduction, and growth of the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Biol. Bull.* 182, 169–176.
- Hessinger, D.A., Lenhoff, H.M., 1976. Mechanism of hemolysis induced by nematocyst venom: roles of phospholipase A and direct lytic factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 603–613.
- Hidaka, M., 1993. Mechanism of Nematocyst Discharge and Its Cellular Control, in: *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 45–76.
- Holstein, T., 1981. The morphogenesis of nematocytes in *Hydra* and *Forskliia*: An ultrastructural study. *J. Ultrastruct. Res.* 75, 276–290.
- Honma, T., Kawahata, S., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y., Shiomi, K., 2008. Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*. *Peptides* 29, 536–44. doi:10.1016/j.peptides.2007.12.010
- Honma, T., Nagai, H., Nagashima, Y., Shiomi, K., 2003. Molecular cloning of an epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1652, 103–106. doi:10.1016/j.bbapap.2003.08.007
- Honma, T., Shiomi, K., 2006. Peptide toxins in sea anemones: Structural and functional aspects. *Mar. Biotechnol.* 8, 1–10. doi:10.1007/s10126-005-5093-2
- Hyman, L., 1940. *The invertebrates: Protozoa through Ctenophora.*, New York: McGraw-Hill. doi:10.2307/2420952
- Ibarra-Alvarado, C., Alejandro García, J., Aguilar, M.B., Rojas, A., Falcón, A., Heimer de la Cotera, E.P., 2007. Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 146, 511–8. doi:10.1016/j.cbpc.2007.06.002

- 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. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.153
- Jensen, J.E., Cristofori-Armstrong, B., Anangi, R., Rosengren, K.J., Lau, C.H.Y., Mobli, M., Brust, A., Alewood, P.F., King, G.F., Rash, L.D., 2014. Understanding the molecular basis of toxin promiscuity: the analgesic sea anemone peptide APETx2 interacts with acid-sensing ion channel 3 and hERG channels via overlapping pharmacophores. *J. Med. Chem.* 57, 9195–203. doi:10.1021/jm501400p
- Jouiaei, M., Sunagar, K., Gross, A.F., Scheib, H., Alewood, P.F., Moran, Y., Fry, B.G., 2015a. Evolution of an ancient venom: recognition of a novel family of cnidarian toxins and the common evolutionary origin of sodium and potassium neurotoxins in sea anemone. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1598–1610.
- Jouiaei, M., Yanagihara, A., Madio, B., Nevalainen, T., Alewood, P., Fry, B., 2015b. Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins* 7, 2251–2271. doi:10.3390/toxins7062251
- Kelso, G.J., Blumenthal, K.M., 1998. Identification and characterization of novel sodium channel toxins from the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 36, 41–51. doi:10.1016/S0041-0101(97)00064-0
- Kem, W.R., Parten, B., Pennington, M.W., Price, D.A., Dunn, B.M., 1989. Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry (Mosc.)* 28, 3483–9. doi:10.1021/bi00434a050
- Kini, R.M., 2005. Structure–function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. *Toxicon* 45, 1147–1161.
- Kordiš, D., 2011. Evolution of phospholipase A2 toxins in venomous animals. *Acta Chim. Slov.* 58, 638–646.
- Kozlov, S.A., Andreev, I.A., Murashev, A.N., Skobtsov, D.I., D'iachenko, I.A., Grishin, E.V., 2009. New polypeptide components from the *Heteractis crispa* sea anemone with analgesic activity. *Bioorg. Khim.* 35, 789–798. doi:10.1134/S1068162009060065
- Kristan, K.Č., Viero, G., Dalla Serra, M., Maček, P., Anderluh, G., 2009. Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon* 54, 1125–1134.
- Shiomi, K. M. Hosaka, N. Yanaike, H. Yamanaka, and T., Kikuchi, 1989. Partial characterization of venoms from two species of fire corals *Millepora platyphylla* and *Millepora dichotoma* 55, 357–362.
- Landucci, E.C.T., Dias, Q.C., Marangoni, F.A., Vilca-Quispe, A., Valeriano-Zapana, J.A., Torres-Huaco, F.D., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S., Ponce-Soto, L.A., 2012. Purification and inflammatory edema induced by two PLA2 (Anch TX-I and Anch TX-II) from sea anemone *Anthothoe chilensis* (Actiniaria: Sagartiidae). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 161, 170–177.
- Lee, H., Jung, E., Kang, C., Yoon, W.D., Kim, J.S., Kim, E., 2011. Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity. *Toxicon* 58, 277–284.
- Lewis, J.B., 2006. Biology and Ecology of the Hydrocoral *Millepora* on Coral Reefs 50, 1–55. doi:10.1016/S0065-2881(05)50001-4.
- Lewis, J.B., 1989. The ecology of *Millepora*. *Coral Reefs* 8, 99–107. doi:10.1007/BF00338264
- Lin, W.W., Lee, C.Y., Burnett, J.W., 1988. Effect of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) venom on isolated rat aorta. *Toxicon* 26, 1209–1212.
- Lin, Y.C., Abd El-Razek, M.H., Hwang, T.L., Chiang, M.Y., Kuo, Y.H., Dai, C.F., Shen, Y.C., 2009. Asterolaurins A-F, xenicane diterpenoids from the Taiwanese soft coral *Asterospicularia laurae*. *J. Nat. Prod.* 72, 1911–6. doi:10.1021/np900231e. PubMed PMID: 19863101
- Lin, M.C., Chen, B.W., Huang, C.Y., Dai, C.F., Hwang, T.L., Sheu, J.H., 2013. Eunicellin-baseddit diterpenoids from the Formosan soft coral *Klyxum molle* with inhibitory activity on superoxide generation and elastase release by neutrophils. *J Nat Prod.* 76, 1661–7. doi: 10.1021/np400372v. PubMed PMID: 24020806

- Loret, E.P., Soto 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.
- Maček, P., Lebez, D., 1988. Isolation and characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia equina* L. *Toxicon* 26, 441–451.
- Mariottini, G.L., Bonello, G., Giacco, E., Pane, L., 2015. Neurotoxic and neuroactive compounds from Cnidaria: Five decades of research and more. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 74–80.
- Mariottini, G.L., Pane, L., 2013a. The role of Cnidaria in drug discovery. A review on CNS implications and new perspectives. *Recent Patents CNS Drug Discov.* 8, 110–122.
- Mariottini, G., Pane, L., 2013b. Cytotoxic and cytolytic cnidarian venoms. A review on health implications and possible therapeutic applications. *Toxins* 6, 108–151. doi:10.3390/toxins6010108
- Martins, R.D., Alves, R.S., Martins, A.M., Barbosa, P.S.F., Evangelista, J.S., Evangelista, J.J.F., Ximenes, R.M., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Souza, A.J.F., others, 2009. Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A2 from sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon* 54, 413–420.
- Messerli, S.M., Greenberg, R.M., 2006. Cnidarian toxins acting on voltage-gated ion channels. *Mar. Drugs* 4, 70–81. doi:10.3390/md403070
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* doi:10.1055/s-2007-971236
- Middlebrook, R.E., Wittle, L.W., Scura, E.D., Lane, C.E., 1971. Isolation and purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. *Toxicon* 9, 333–336. doi:10.1016/0041-0101(71)90130-9
- Minagawa, S., Ishida, M., Shimakura, K., Nagashima, Y., Shiomi, K., 1997. Isolation and amino acid sequences of two Kunitz-type protease inhibitors from the sea anemone *Anthopleura aff. xanthogrammica*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 118, 381–386.
- Minagawa, S., Sugiyama, M., Ishida, M., Nagashima, Y., Shiomi, K., 2008. Kunitz-type protease inhibitors from acrorhagi of three species of sea anemones. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 150, 240–245. doi:10.1016/j.cbpb.2008.03.010
- Miyaoka, H., Yamanishi, M., Mitome, H., 2006. PLA<sub>2</sub> inhibitory activity of marine sesterterpenoids cladocorans, their diastereomers and analogues. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 268–70. PubMed PMID: 16462082
- Moats, W.E., 1992. Fire coral envenomation. *J. Wilderness Med.* 3, 284–287. doi:10.1580/0953-9859-3.3.284
- Monastyrnaya, M., Leychenko, E., Isaeva, M., Likhatskaya, G., Zelepuga, E., Kostina, E., Trifonov, E., Nurminski, E., Kozlovskaya, E., 2010. Actinoporins from the sea anemones, tropical *Radianthus macrodactylus* and northern *Oulactis orientalis*: Comparative analysis of structure–function relationships. *Toxicon* 56, 1299–1314.
- Moore, R.E., Scheuer, P.J., 1971. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science.* 172, 495–8. PubMed PMID: 4396320
- Moran, Y., Fredman, D., Szczesny, P., Grynberg, M., Technau, U., 2012. Recurrent horizontal transfer of bacterial toxin genes to eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 29, 2223–30. doi:10.1093/molbev/mss089
- Moran, Y., Gordon, D., Gurevitz, M., 2009. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels – molecular and evolutionary features. *Toxicon* 54, 1089–1101. doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.028
- Moran, Y., Kahn, R., Cohen, L., Gur, M., Karbat, I., Gordon, D., Gurevitz, M., 2007. Molecular analysis of the sea anemone toxin Av3 reveals selectivity to insects and demonstrates the heterogeneity of receptor site-3 on voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Biochem. J.* 406, 41–8. doi:10.1042/BJ20070233

- Moran, Y., Praher, D., Schlesinger, A., Ayalon, A., Tal, Y., Technau, U., 2013. Analysis of soluble protein contents from the nematocysts of a model sea anemone sheds light on venom evolution. *Mar. Biotechnol.* 15, 329–339.
- Moran, Y., Weinberger, H., Sullivan, J.C., Reitzel, A.M., Finnerty, J.R., Gurevitz, M., 2008. Concerted evolution of sea anemone neurotoxin genes is revealed through analysis of the *Nematostella vectensis* genome. *Mol. Biol. Evol.* 25, 737–747.
- Moriya, T., Furukawa, K.I., Nakamura, H., Murai, A., Ohizumi, Y., 2001. The vaso-contractile action of zooxanthellatoxin-B from a marine dinoflagellate is mediated via Ca<sup>2+</sup> influx in the rabbit aorta. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79, 1030–1035.
- Moriya, T., Ishida, Y., Nakamura, H., Asari, T., Murai, A., Ohizumi, Y., 1998. Vasoconstriction induced by zooxanthellatoxin-B, a polyoxygenated long-chain product from a marine alga. *Eur. J. Pharmacol.* 350, 59–65.
- Muller, A.J., DuHadaway, J.B., Donover, P.S., Sutanto-Ward, E., Prendergast, G.C., 2005. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med.* 11, 312–9. Epub 2005 Feb 13. PubMed PMID: 15711557
- Murakami, M., Kudo, I., 2002. Phospholipase A2. *J. Biochem. (Tokyo)* 131, 285–292.
- Murata., Yorijiko., Satake., Masatoshi., Suzuki., Tomoji., 1963. Studies on snake venom. *J Biochem* 53, 431–437.
- Nagai, H., Oshiro, N., Takuwa-Kuroda, K., Iwanaga, S., Nozaki, M., Nakajima, T., 2002a. A new polypeptide toxin from the nematocyst venom of an Okinawan sea anemone *Phyllodiscus semoni* (Japanese name “unbachi-isoginchaku”). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2621–2625.
- Nagai, H., Takuwa, K., Nakao, M., Sakamoto, B., Crow, G.L., Nakajima, T., 2000. Isolation and characterization of a novel protein toxin from the Hawaiian box jellyfish (sea wasp) *Carybdea alata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 589–94. doi:10.1006/bbrc.2000.3352
- Nagai, H., Takuwa-Kuroda, K., Nakao, M., Oshiro, N., Iwanaga, S., Nakajima, T., 2002b. A novel protein toxin from the deadly box jellyfish (Sea Wasp, Habu-kurage) *Chiropsalmus quadrigatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 97–102. doi:10.1271/bbb.66.97
- 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.
- Nesher, N., Shapira, E., Sher, D., Moran, Y., Tsveyer, L., Turchetti-Maia, A.L., Horowitz, M., Hochner, B., Zlotkin, E., 2013. AdE-1, a new inotropic Na(+) channel toxin from *Aiptasia diaphana*, is similar to, yet distinct from, known anemone Na(+) channel toxins. *Biochem. J.* 451, 81–90. doi:10.1042/BJ20121623
- Nevalainen, T.J., Peuravuori, H.J., Quinn, R.J., Llewellyn, L.E., Benzie, J.A., Fenner, P.J., Winkel, K.D., 2004. Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 139, 731–735. doi:10.1016/j.cbpc.2004.09.006
- Norton, R.S., 2009. Toxicon Structures of sea anemone toxins. *Toxicon* 54, 1075–1088. doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.035
- Oliveira, J.S., Zaharenko, A.J., Ferreira, W.A., Konno, K., Shida, C.S., Richardson, M., Lúcio, A.D., Beirão, P.S.L., de Freitas, J.C., 2006. BcIV, a new paralyzing peptide obtained from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. A comparison with the Na<sup>+</sup> channel toxin BcIII. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1764, 1592–1600. doi:10.1016/j.bbapap.2006.08.010
- Onodera, K., Fukatsu, T., Kawai, N., Yoshioka, Y., Okamoto, T., Nakamura, H., Ojika, M., 2004. Zooxanthellactone, a novel gamma-lactone-type oxylipine from dinoflagellates of *Symbiodinium sp.*: Structure, distribution, and biological activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 848–852. doi:10.1271/bbb.68.848

- 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.* 127, 10406–10411.
- Orts, D.J.B., Moran, Y., Cologna, C.T., Peigneur, S., Madio, B., Praher, D., Quinton, L., De Pauw, E., Bicudo, J.E.P.W., Tytgat, J., De Freitas, J.C., 2013. BcsTx3 is a founder of a novel sea anemone toxin family of potassium channel blocker. *FEBS J.* 280, 4839–4852. doi:10.1111/febs.12456
- Oshiro, N., Kobayashi, C., Iwanaga, S., Nozaki, M., Namikoshi, M., Spring, J., Nagai, H., 2004. A new membrane-attack complex/perforin (MACPF) domain lethal toxin from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *ActinERIA villosa*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* 43, 225–8. doi:10.1016/j.toxicon.2003.11.017
- Osmakov, D.I., Kozlov, S.A., Andreev, Y.A., Koshelev, S.G., Sanamyan, N.P., Sanamyan, K.E., Dyachenko, I.A., Bondarenko, D.A., Murashev, A.N., Mineev, K.S., Arseniev, A.S., Grishin, E.V., 2013. Sea anemone peptide with uncommon Beta-Hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity. *J. Biol. Chem.* 288, 23116–23127. doi:10.1074/jbc.M113.485516
- Östman, C., 2000. A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Sci. Mar.* 64, 31–46. doi:10.3989/scimar.2000.64s131
- Özbek, S., Balasubramanian, P.G., Holstein, T.W., 2009. Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon* 54, 1038–1045.
- Patocka, J., Gupta, R.C., Wu, Q.H., Kuca, K., 2015. Toxic potential of palytoxin. *J. Huazhong. Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 35, 773–80. doi:10.1007/s11596-015-1506-3. PubMed PMID: 26489638
- Peigneur, S., Billen, B., Derua, R., Waelkens, E., Debaveye, S., Béress, L., Tytgat, J., 2011. A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochem. Pharmacol.* 82, 81–90. doi:10.1016/j.bcp.2011.03.023
- Pereira, A., Vottero, E., Roberge, M., Mauk, A.G., Andersen, R.J., 2006. Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors from the Northeastern Pacific Marine Hydroid *Garveia annulata*. *J. Nat. Prod.* 69, 1496–1509. PubMed PMID: 17067170
- 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, e15–6. doi:S0272-6386(05)01496-4 [pii]r10.1053/j.ajkd.2005.09.025
- Radwan, F.F.Y., 2002. Comparative toxicological and immunological studies on the nematocyst venoms of the Red Sea fire corals *Millepora dichotoma* and *M. platyphylla*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 131, 323–334. doi:10.1016/S1532-0456(02)00017-0
- 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. Toxicol. Pharmacol. CBP* 139, 267–72. doi:10.1016/j.cca.2004.12.002
- Razpotnik, A., Križaj, I., Kem, W.R., Maček, P., Turk, T., 2009. A new cytolytic protein from the sea anemone *Urticina crassicornis* that binds to cholesterol-and sphingomyelin-rich membranes. *Toxicon* 53, 762–769.
- Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N., Calado, R., 2011. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds—An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Mar. Drugs* 9, 1860–1886.
- Rodríguez, A.A., Salceda, E., Garateix, A.G., Zaharenko, A.J., Peigneur, S., López, O., Pons, T., Richardson, M., Díaz, M., Hernández, Y., others, 2014. A novel sea anemone peptide that inhibits acid-sensing ion channels. *Peptides* 53, 3–12.
- Rojas, A., Torres, M., Rojas, J.I., Feregrino, A., Heimer-De La Cotera, E.P., 2002. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon* 40, 777–785. doi:10.1016/S0041-0101(01)00281-1

- Rojas-Molina, A., García-Arredondo, A., Ibarra-Alvarado, C., Bah, M., 2012. *Millepora* ("fire corals") species: toxinological studies until 2011. *Adv. Environ. Res.* Vol. 26, 133–148.
- Romero, L., Marcussi, S., Marchi-Salvador, D.P., Silva, F.P., Fuly, A.L., Stábeli, R.G., da Silva, S.L., González, J., del Monte, A., Soares, A.M., 2010. Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A2 from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Biochimie* 92, 1063–1071.
- 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.
- Rouault, M., Rash, L.D., Escoubas, P., Boilard, E., Bollinger, J., Lomonte, B., Maurin, T., Guillaume, C., Canaan, S., Deregnacourt, C., others, 2006. Neurotoxicity and other pharmacological activities of the snake venom phospholipase A2 OS2: the N-terminal region is more important than enzymatic activity. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 5800–5816.
- Rowan, R., 2004. Coral bleaching: thermal adaptation in reef coral symbionts. *Nature* 430, 742–742.
- Sadler, L.A., McNally, K.L., Govind, N.S., Brunk, C.E., Trench, R.K., 1992. The nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RNA gene from *Symbiodinium pilosum*, a symbiotic dinoflagellate. *Curr. Genet.* 21, 409–416.
- 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.
- Saikia, D., Bordoloi, N.K., Chattopadhyay, P., Choklingam, S., Ghosh, S.S., Mukherjee, A.K., 2012. Differential mode of attack on membrane phospholipids by an acidic phospholipase A2 (RVVA-PLA<sub>2</sub>-I) from *Daboia russelli* venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 3149–57. doi:10.1016/j.bbame.2012.08.005
- Salceda, E., Garateix, A., Aneiros, A., Salazar, H., López, O., Soto, E., 2006. Effects of ApC, a sea anemone toxin, on sodium currents of mammalian neurons. *Brain Res.* 1110, 136–43. doi:10.1016/j.brainres.2006.06.113
- Salceda, E., Garateix, A., Soto, E., 2002. The sea anemone toxins BgII and BgIII prolong the inactivation time course of the tetrodotoxin-sensitive sodium current in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 1067–1074.
- Salceda, E., Pérez-Castells, J., López-Méndez, B., Garateix, A., Salazar, H., López, O., Aneiros, A., Standker, L., Béress, L., Forssmann, W.G., Soto, E., Jiménez-Barbero, J., Giménez-Gallego, G., 2007. CgNa, a type I toxin from the giant Caribbean sea anemone *Condylactis gigantea* shows structural similarities to both type I and II toxins, as well as distinctive structural and functional properties I. *Biochem J* 406, 67–76.
- Salinas, E.M., Cebada, J., Valdés, A., Garateix, A., Aneiros, A., Alvarez, J.L., 1997. Effects of a toxin from the mucus of the Caribbean sea anemone (*Bunodosoma granulifera*) on the ionic currents of single ventricular mammalian cardiomyocytes. *Toxicon* 35, 1699–1709.
- Samuelsson, G., 1991. Assays for pharmacological activity: Non-specific assays. *Methods in plant biochemistry*, 1ra ed. ed. Academic Press, Nortfolk.
- Sánchez-Rodríguez, J., Lucio-Martínez, N.L., 2011. Isolation and prepurification of active compounds in venom from *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa: Pelagiidae) from the Caribbean Sea. Aislamiento y prepurificación de los compuestos activos presentes en el veneno de *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa: Pelagiidae) de. *Cienc. Mar.* 37, 369–377.
- Sarras, M.P., Madden, M.E., Meador, D.T., Hudson, B.G., 1988. Isolation, characterization, and functional analysis of Hydra basement membrane (mesoglea). *J Cell Biol* 107, 597a.
- 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. doi:10.1016/0003-2697(87)90587-2
- Scheffler, J.J., Tsugita, A., Linden, G., Schweitz, H., Lazdunski, M., 1982. The amino acid sequence of toxin V from *Anemonia sulcata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 272–278.

- Schuchert, P., 2005. The Hydrozoa Directory [WWW Document]. URL <http://www.ville-ge.ch/musinfomhng/hydrozoa/classification.htm>
- Schweitz, H., Bidard, J.N., Frelin, C., Pauron, D., Vijverberg, H.P., Mahasneh, D.M., Lazdunski, M., Vilbois, F., Tsugita, A., 1985. Purification, sequence, and pharmacological properties of sea anemone toxins from *Radianthus paumotensis*. A new class of sea anemone toxins acting on the sodium channel. *Biochemistry (Mosc.)* 24, 3554–3561.
- Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J.M., Béress, L., Lazdunski, M., 1995. Kalicludines and kaliseptine two different classes of sea anemone toxins for sensitive voltage-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 270, 25121–25126.
- Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J.M., Beress, L., Lazdunski, M., 1995. Kalicludines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 270, 25121–25126. doi:10.1074/jbc.270.42.25121
- Seo, Y., Cho, K.W., Rho, Jung.R., Shin, J., Kwon, B.M., Bok, S.H., Song, J.I., 1996. Solandelactones A-I, lactonized cyclopropyl oxylipins isolated from the hydroid *Solanderia secunda*. *Tetrahedron.* 52, 10583-10593.
- Sher, D., Fishman, Y., Melamed-Book, N., Zhang, M., Zlotkin, E., 2008. Osmotically driven prey disintegration in the gastrovascular cavity of the green hydra by a pore-forming protein. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 207–14. doi:10.1096/fj.07-9133com
- 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. doi:10.1074/jbc.M503242200
- Sher, D., Knebel, A., Bsoor, 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. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.004
- Sheu, J.H., Chen, Y.H., Chen, Y.H., Su, Y.D., Chang, Y.C., Su, J.H., Weng, C.F., Lee, C.H., Fang, L.S., Wang, W.H., Wen, Z.H., Wu, Y.C., Sung, P.J., 2014. Briarane diterpenoids isolated from gorgonian corals between 2011 and 2013. *Mar Drugs.* 12, 2164-2181. doi: 10.3390/md12042164. Review. PubMed PMID: 24727390; PubMed Central PMCID: PMC4012436
- 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.
- Six, D.A., Dennis, E.A., 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Biol. Lipids* 1488, 1–19.
- Smith, J.J., Blumenthal, K.M., 2007. Site-3 sea anemone toxins: Molecular probes of gating mechanisms in voltage-dependent sodium channels. *Toxicon* 49, 159–170. doi:10.1016/j.toxicon.2006.09.020
- Spagnuolo, A., Zanetti, L., Cariello, L., Piccoli, R., 1994. Isolation and characterization of two genes encoding calitoxins, neurotoxic peptides from *Calliactis parasitica* (Cnidaria). *Gene* 138, 187–91. doi:10.1016/0378-1119(94)90805-2
- Ständker, L., Béress, L., Garateix, A., Christ, T., Ravens, U., Salceda, E., Soto, E., John, H., Forssmann, W.G., Aneiros, A., 2006. A new toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation. *Toxicon* 48, 211–220.
- Strukelj, B., Lenarcic, B., Gruden, K., Pungercar, J., Rogelj, B., Turk, V., Bosch, D., Jongsma, M.A., 2000. Equistatin, a protease inhibitor from the sea anemone *Actinia equina*, is composed of three structural and functional domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 732-6.
- Sunahara, S., Muramoto, K., Tenma, K., Kamiya, H., 1987. Amino acid sequence of two sea anemone toxins from *Anthopleura fuscoviridis*. *Toxicon* 25, 211–219. doi:0041-0101(87)90243-1

- Talvinen, K.A., Nevalainen, T.J., 2002. Cloning of a novel phospholipase A2 from the cnidarian *Adamsia carciniopados*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 132, 571–578.
- Tamkun, M.M., Hessinger, D.A., 1981. Isolation and partial characterization of a hemolytic and toxic protein from the nematocyst venom of the Portuguese Man-of-War, *Physalia physalis*. *Biochim. Biophys. Acta* 667, 87–98. doi:10.1016/0005-2795(81)90069-6
- Tardent, P., 1995. The cnidarian cnidocyte, a hightech cellular weaponry. *BioEssays* 17, 351–362.
- Tchernov, D., Gorbunov, M.Y., de Vargas, C., Yadav, S.N., Milligan, A.J., Häggblom, M., Falkowski, P.G., 2004. Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13531–13535.
- Technau, U., Steele, R.E., 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. *Development* 138, 1447–1458.
- Teragawa, C.K., Bode, H.R., 1995. Migrating interstitial cells differentiate into neurons in hydra. *Dev. Biol.* 171, 286–293.
- Van Oppen, M.J., 2007. Perspective: hidden diversity in coral endosymbionts unveiled. *Mol. Ecol.* 16, 1125–1126.
- Voskoboinik, I., Dunstone, M.A., Baran, K., Whisstock, J.C., Trapani, J.A., 2010. Perforin: Structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol. Rev.* 235, 35–54. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00896.x
- Wang, C.Y., Liu, H.Y., Shao, C.L., Wang, Y.N., Li, L., Guan, H.S., 2008. Research progress on chemical defensive substances from soft corals and Gorgonians. *Acta Ecologica Sinica*. 8, 2320-2328.
- Wang, B., Zhang, L., Zheng, J., Wang, Q., Wang, T., Lu, J., Wen, X., Zhang, B., Liu, G., Zhang, W., Xiao, L., Zhang, L., 2013. Multiple organ dysfunction: A delayed envenomation syndrome caused by tentacle extract from the jellyfish *Cyanea capillata*. *Toxicon* 61, 54–61. doi:10.1016/j.toxicon.2012.11.003
- Watson, G.M., Hessinger, D.A., 1989. Cnidocyte mechanoreceptors are tuned to the movements of swimming prey by chemoreceptors. *Science* 243, 1589–1591.
- Wittle, L.W., Middlebrook, R.E., Lane, C.E., 1971. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicornis*. *Toxicon* 9, 327–331. doi:10.1016/0041-0101(71)90129-2
- Wittle, L.W., Scura, E.D., Middlebrook, R.E., 1974. Stinging coral (*Millepora tenera*) toxin: a comparison of crude extracts with isolated nematocyst extracts. *Toxicon* 12, 481–482.
- Wittle, L.W., Wheeler, C.A., 1974. Toxic and immunological properties of stinging coral toxin. *Toxicon* 12, 487–493.
- Wunderer, G., Eulitz, M., 1978. Amino-acid sequence of toxin I from *Anemonia sulcata*. *Eur. J. Biochem.* FEBS 89, 11–7.
- Wunderer, G., Fritz, H., Elmar, W., Machter, E., Machleidt, W., 1976. Amino-acid sequence of a coelenterate toxin: Toxin II from *Anomonionia sulcata*. *Eur. J. Biochem.* 68, 193–198.
- Yanagihara, A.A., Shohet, R.V., 2012. Cubozoan venom-induced cardiovascular collapse is caused by hyperkalemia and prevented by zinc gluconate in mice. *PloS One* 7, e51368. doi:10.1371/journal.pone.0051368
- Zaharenko, A.J., Ferreira, W.A., Oliveira, J.S., Richardson, M., Pimenta, D.C., Konno, K., Portaro, F.C.V., de Freitas, J.C., 2008. Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins. *Comp. Biochem. Physiol. - Part Genomics Proteomics* 3, 219–225. doi:10.1016/j.cbd.2008.04.002
- Zhang, M., Fishman, Y., Sher, D., Zlotkin, E., 2003. Hydralysin, a novel animal group-selective paralytic and cytolytic protein from a noncnidocystic origin in hydra. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 8939–44. doi:10.1021/bi0343929
- Zubair, M.S., Al-Footy, K.O., Ayyad, S.N., Al-Lihaibi, S.S., Alarif, W.M., 2015. A review of steroids from *Sarcophyton* species. *Nat Prod Res.* 24, 1-10. PubMed PMID: 26299957

- Zuliani, J.P., Fernandes, C.M., Zamuner, S.R., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F., 2005. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. *Toxicon* 45, 335–346.
- Zykova, T.A., Monastyrnaia, M.M., Apalikova, O. V., Shvets, T. V., Kozlovskaiia, E.P., 1998. Low-molecular cytolysins and trypsin inhibitors from sea anemone *Radianthus macrodactylus*. Isolation and partial characterization. *Bioorg. Khim.* 24, 509–516.