



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DE TOXINAS  
PRODUCIDAS POR *Millepora complanata* (CORAL DE FUEGO)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA

JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

DIRIGIDA POR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

Dr. MANUEL AGUILAR RAMÍREZ

CAMPUS JURIQUILLA, QUERÉTARO, 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# Universidad Nacional Autónoma de México

## Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: **José Alejandro García Arredondo**, cuyo título es: **“Caracterización bioquímica y farmacológica de toxinas producidas por *Millepora complanata* (coral de fuego)”** se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Dr. Mauricio Díaz Muñoz  
Presidente

---

Dr. César Ibarra Alvarado  
Secretario

---

Dr. Rogelio Arellano Ostoa  
Vocal

---

Dra. Maricela Luna Muñoz  
Suplente

---

Dr. Manuel Aguilar Ramírez  
Suplente

---

Aprobado por el Comité Académico

Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero  
Coordinador del Programa

**Le agradezco a Dios por darme la  
oportunidad de estar en este mundo  
misterioso, palpable y visible; pero, al  
fin, originado a partir de lo que no se  
palpa ni se ve.**

## **DEDICATORIAS**

### ***A mis padres***

*José Alfredo y María de Jesús*

*Por su cariño y apoyo incondicional*

### ***A mi hermano y su esposa***

*Julio Alfredo y Jessica*

*Por su cariño y compañía*

### ***A mi sobrina***

*Yunuen*

*Por los momentos agradables que compartimos juntos*

### ***A mi familia***

*Los García y los Arredondo*

*Porque para mí es un orgullo ser parte de estas dos familias tan diferentes*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. César Ibarra y al Dr. Manuel B. Aguilar, por su asesoría, sugerencias y valiosas aportaciones que hicieron posible este trabajo.

Al Dr. Edgar Heimer de la Cotera, por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo y por proporcionar los especímenes de *Millepora complanata*.

A la Bióloga Ma. Eugenia Ramos, por su colaboración en la recolección de los especímenes de *Millepora complanata*.

Al Biólogo Andrés Falcón, por su colaboración en la preparación y el fraccionamiento del extracto acuoso de *Millepora complanata*, y por la asesoría técnica brindada durante la evaluación de su actividad hemolítica.

A la Dra. Alejandra Rojas, por su apoyo, confianza y valiosas aportaciones que han sido importantes para mi formación.

A Karen Luna, por su compañía durante mi estancia en el laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología (UNAM) y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A los miembros del comité tutorial, Dra. Maricela Luna y Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, por sus sugerencias y aportaciones que enriquecieron esta tesis.

A los miembros del jurado, Dr. Mauricio Díaz y Dr. Rogelio Arellano, por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar la calidad de el presente trabajo.

La presente tesis se realizó en el Departamento de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la tutoría del Dr. César Ibarra Alvarado, y en el Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la tutoría del Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez, con apoyo de una beca completa CONACYT y una beca complementaria otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
SUMMARY	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Organismos del phylum Cnidaria	3
2.1.1. Citolisinas presentes en cnidarios	5
2.1.2. Neurotoxinas presentes en cnidarios	6
2.1.3. Toxicidad de las especies del género <i>Millepora</i>	7
2.2. Generalidades sobre la fisiología de la pared arterial	11
2.2.1. Músculo liso vascular	12
A. Estructura funcional de las células de músculo liso	12
B. Generación de la fuerza durante la contracción muscular	14
C. Mecanismos de regulación de la contracción del músculo liso vascular	16
2.2.2. Endotelio vascular	22
A. Estructura y funciones del endotelio vascular	22

B. Factores vasodilatadores derivados del endotelio	22
C. Factores vasoconstrictores derivados del endotelio	25
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVOS	27
V. MATERIAL Y MÉTODOS	28
5.1. Recolección del hidrocoral y preparación del extracto crudo	28
5.2. Bioensayos	28
5.2.1. Ensayo de aorta aislada de rata	28
A. Caracterización preliminar del efecto vasoconstrictor del extracto	29
5.2.2. Ensayo hemolítico	30
A. Pruebas de inhibición del efecto hemolítico del extracto	30
B. Efecto hemolítico del extracto en presencia de cationes divalentes	31
5.2.3. Cálculos y análisis estadísticos	31
5.3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto crudo de <i>M. complanata</i>	32
5.4. Electroforesis en gel	32
5.5. Materiales	33
VI. RESULTADOS	34

6.1. Preparación del extracto crudo de <i>M. complanata</i>	34
6.2. Bioensayos	34
6.2.1. Efecto del extracto crudo de <i>M. complanata</i> sobre el tono del músculo liso arterial	34
A. Caracterización preliminar del efecto vasoconstrictor inducido por el extracto crudo de <i>M. complanata</i>	38
6.2.2. Efecto hemolítico del extracto crudo de <i>M. complanata</i>	41
A. Pruebas de Inhibición del efecto hemolítico del extracto	42
B. Efecto hemolítico del extracto en presencia de cationes divalentes	45
6.3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto crudo de <i>M. complanata</i>	47
6.4. Electroforesis en gel	53
VII. DISCUSIÓN	54
VIII. CONCLUSIONES	61
IX. BIBLIOGRAFÍA	62
ABREVIATURAS	

**ÍNDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	CE <sub>50</sub> calculada para el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto crudo de <i>M. complanata</i> y por la ionomicina sobre segmentos de aorta intactos y libres de endotelio	35
2	Tiempos de retención, cantidad de proteína y efecto hemolítico que presentan las fracciones cromatográficas obtenidas del extracto crudo de <i>M. complanata</i>	49
3	Efecto contráctil inducido por las fracciones cromatográficas obtenidas del extracto crudo de <i>M. complanata</i> sobre segmentos de aorta aislados de rata	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Representación esquemática del cnidocito	4
2	Fotografías subacuáticas de los hidrocorales predominantes en el Caribe mexicano	8
3	Esquematización del modelo brazo-palanca para la generación de la fuerza durante la contracción muscular	15
4	Representación esquemática de una célula de músculo liso con algunos canales iónicos implicados en la regulación de la contracción	18
5	Representación esquemática que muestra los principales mecanismos de relajación muscular dependiente de endotelio vascular	24
6	Curvas concentración-respuesta del efecto vasoconstrictor de la fenilefrina, la ionomicina y el extracto de <i>M. complanata</i>	36
7	Efecto del extracto crudo de <i>M. complanata</i> sobre el tono vascular, a una concentración de 31.6 µg de proteína/ml	37

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
8	Curvas concentración-respuesta del efecto vasoconstrictor del extracto crudo de <i>M. complanata</i> en presencia de bloqueadores de canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje tipo L y en un medio libre de calcio	39
9	Curva concentración-respuesta del efecto vasoconstrictor del extracto crudo de <i>M. complanata</i> en presencia de cafeína (10 mM) y ryanodina (10 $\mu\text{M}$ )	40
10	Curva concentración-respuesta que muestra el efecto hemolítico del extracto crudo de <i>M. complanata</i> sobre eritrocitos de rata	41
11	Actividad hemolítica del extracto crudo de <i>M. complanata</i> a una concentración de 1.8 $\mu\text{g}$ de proteína/ml, después de someterlo a incubación con colesterol por 30 min a 4°C	43
12	Efecto del bromuro de <i>p</i> -bromofenancilo, un inhibidor de fosfolipasa $\text{A}_2$ , sobre la actividad hemolítica del extracto crudo de <i>M. complanata</i> a una concentración de 1.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	44
13	Actividad hemolítica del extracto crudo de <i>M. complanata</i> a una concentración de 1.8 $\mu\text{g}$ de proteína/ml, en presencia de $\text{CaCl}_2$	45
14	Actividad hemolítica del extracto crudo de <i>M. complanata</i> a una concentración de 1.8 $\mu\text{g}$ de proteína/ml, en presencia de $\text{MgCl}_2$	46

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
15	Perfil cromatográfico del extracto crudo de <i>M. complanata</i>	48
16	Efecto hemolítico (0.2 µg/ml; barras negras) y vasoconstrictor (0.0286 µg/ml; barras grises) de las fracciones del extracto crudo de <i>M. complanata</i>	51
17	Efecto de F6, F8 y F11 sobre el tono vascular	52
18	Electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto crudo de <i>M. complanata</i> (Ext), F4, F8 y F11	53

## ABREVIATURAS

ADP	difosfato de adenosina
AMPC	3',5'-adenosina-monofosfato cíclico
ATP	trifosfato de adenosina
BPB	bromuro de <i>p</i> -bromofenancilo
°C	grados centígrados
CE <sub>50</sub>	concentración efectiva media
Da	daltones
DAG	1,2-diacilglicerol
DL <sub>50</sub>	dosis letal media
DMSO	dimetilsulfóxido
EDHF	factor hiperpolarizante derivado del endotelio
g	gramos
GMPc	3',5'-guanosina-monofosfato cíclico
GTP	trifosfato de guanosina
h	horas
HPLC	cromatografía de líquidos de alta eficiencia
IP <sub>3</sub>	1,4,5-trifosfato de inositol
L	litros
M	molar
m	metros
min	minutos
MLCK	cinasa de la cadena ligera reguladora de miosina
MLCP	fosfatasa de la cadena ligera reguladora de miosina
<i>n</i>	número de repeticiones por experimento
NOS	óxido nítrico sintetasa
PGI <sub>2</sub>	prostaciclina
PI	fosfatidilinositol
P <sub>i</sub>	fosfato inorgánico
PKA	proteínas cinasas A

PKC	proteínas cinasas C
PKG	proteínas cinasas G
PLC	fosfolipasa C
rpm	revoluciones por minuto
S.D.	desviación estándar
TFA	ácido trifluoroacético
UH <sub>50</sub>	unidad hemolítica media
UV/VIS	ultravioleta/visible
V	voltios
v/v	volumen sobre volumen

## RESUMEN

*Millepora complanata* es un cnidario que se encuentra habitualmente en arrecifes coralinos del Caribe mexicano. Este organismo se conoce como “coral de fuego” debido a su capacidad de causar lesiones dolorosas en la piel humana después del contacto. Hasta el momento, la información acerca de la naturaleza y el mecanismo de acción de las toxinas producidas por los organismos del género *Millepora* es muy escasa. En este estudio, se describe por primera vez el efecto hemolítico y vasoconstrictor del extracto crudo de *M. complanata*. El extracto crudo de este hidrocoral indujo una contracción, dependiente de la concentración, del músculo liso arterial de rata ( $CE_{50} = 22.38 \pm 1.14 \mu\text{g}$  de proteína/ml). Este efecto vasoconstrictor fue independiente del endotelio y disminuyó significativamente en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular y cuando se eliminó el  $Ca^{2+}$  de los almacenes intracelulares del músculo liso arterial, después del tratamiento con ryanodina ( $10 \mu\text{M}$ ) y cafeína ( $10 \text{mM}$ ). Por otro lado, el extracto crudo de *M. complanata* produjo hemólisis en eritrocitos de rata ( $UH_{50} = 1.64 \pm 1.04 \mu\text{g}$  de proteína/ml). Este efecto se amplificó en presencia de  $Ca^{2+}$  y disminuyó en presencia de colesterol. Además, al someter el extracto a incubación con bromuro de *p*-bromofenancilo, un inhibidor de fosfolipasa  $A_2$ , el efecto hemolítico disminuyó de manera significativa. Tanto el efecto hemolítico como el efecto vasoconstrictor se perdieron después de incubar el extracto en un baño de agua a ebullición durante 20 min. A partir del fraccionamiento del extracto de *M. complanata*, mediante cromatografía en fase reversa, se obtuvieron 19 fracciones (F1 a F19), de las cuales solamente F4 (cuyo componente mayoritario es una proteína de aproximadamente 30 kDa) indujo un efecto hemolítico. Esta proteína de 30 kDa es posiblemente una fosfolipasa  $A_2$ . Además, F8 y F11, cuyos componentes mayoritarios son proteínas de 15 y 17 kDa, respectivamente, presentaron un efecto vasoconstrictor importante. El efecto vasoconstrictor inducido por estas dos fracciones posiblemente se produce por mecanismos de acción diferentes.

## SUMMARY

*Millepora complanata* (phylum Cnidaria) is a regular component of coral reefs in the Mexican Caribbean. This organism is called “fire coral” because it causes painful lesions after human contact. At the moment, information about the identity of *Millepora*'s toxins and its mechanisms of action is very scarce. In this study, we describe for the first time the hemolytic and vasoconstrictor activity elicited by the crude extract obtained from *M. complanata*. This extract caused a concentration-dependent contraction on isolated rat aortic rings ( $EC_{50} = 22.38 \pm 1.14 \mu\text{g protein/ml}$ ). This effect was endothelium-independent and significantly reduced in the absence of extracellular  $Ca^{2+}$  and when the intracellular  $Ca^{2+}$  stores were depleted with ryanodine (10  $\mu\text{M}$ ) and caffeine (10 mM). In the other hand, the crude extract obtained from *M. complanata* showed hemolytic properties on rat erythrocytes ( $HU_{50} = 1.64 \pm 1.04 \mu\text{g protein/ml}$ ). This effect was amplified in presence of  $Ca^{2+}$  and reduced in presence of cholesterol. Furthermore, the hemolytic effect of the extract was significantly reduced after incubation with *p*-bromophenacyl bromide, an inhibitor of phospholipase  $A_2$  proteins. The hemolytic and vasoconstrictor effects were abolished after incubation in a boiling water bath for 20 min. Reverse phase chromatography of the *M. complanata* extract afforded 19 fractions (F1 to F11), of which only F4 (containing a protein with a molecular weight of 30 kDa) induced a hemolytic effect. This 30 kDa protein is probably a phospholipase  $A_2$ . In addition, F8 and F11, containing 15 and 17 kDa proteins, respectively, produced a vasoconstrictor effect. The smooth muscle excitatory effect elicited by both proteins was probably mediated by different mechanisms of action.

## I. INTRODUCCIÓN

Los hidrocorales del género *Millepora* (phylum Cnidaria, clase Hydrozoa) son organismos de exoesqueleto calcáreo que se encuentran ampliamente distribuidos en arrecifes de coral de todo el mundo y representan una de las principales formas coralinas que contribuyen a la formación de los arrecifes (Lewis, 1989). Estos organismos, al igual que todas las especies del phylum Cnidaria, poseen células urticantes que contienen cápsulas especializadas cargadas de veneno. Estas cápsulas se conocen como nematocistos y al ser estimulados por contacto inyectan su contenido a través de filamentos punzantes (Tardent, 1995).

Las especies del género *Millepora* se conocen comúnmente como “corales de fuego”, debido a que el contacto humano con estos organismos produce lesiones en la piel que incluyen escozor, eritema y una erupción que dura varios días (Sagi et al., 1987; Bianchini et al., 1988). Debido a su abundancia y localización, son comunes los casos de quemaduras causadas por el contacto accidental con estas especies. Sin embargo, no se conoce un tratamiento adecuado para las lesiones causadas por estos hidrocorales.

Los estudios que se han realizado sobre especies de este género indican que gran parte de las toxinas presentes en sus nematocistos son citolisinas de naturaleza proteica. Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado purificar y caracterizar alguna de estas toxinas. En ratones, los efectos letales que producen los extractos y fracciones de las especies del género *Millepora* se han asociado con su efecto hemolítico. Por ejemplo, se ha encontrado que los extractos crudos de *M. tenera*, *M. alcicornis*, *M. dichotoma* y *M. platyphylla* son letales en ratones y poseen actividad hemolítica y dermonecrótica. Estos efectos se encontraron en una misma fracción al momento de la purificación parcial de los extractos mediante métodos cromatográficos (Middlebrook et al., 1971; Wittle et al., 1971; Wittle et al., 1974; Radwan, 2002).

El mecanismo de acción de las toxinas producidas por los organismos del género *Millepora* no está bien determinado. Recientemente, se realizó un estudio sobre *M. platyphylla* en el que se purificó parcialmente una proteína de 32.5 kDa con actividad

enzimática de fosfolipasa A<sub>2</sub>. Los resultados de este estudio sugirieron que el mecanismo mediante el cual el extracto de este hidrocoral produce actividad hemolítica se debe, en parte, a una acción directa de la fosfolipasa A<sub>2</sub> sobre fosfolípidos membranales y que esta acción podría estar facilitada por otra parte de la toxina que no posee actividad enzimática (Radwan y Aboul-Dahab, 2004).

En un estudio realizado sobre *M. complanata*, un componente habitual de arrecifes coralinos del Caribe mexicano, se encontró que su extracto crudo induce un efecto excitador de las contracciones espontáneas de íleon aislado de cobayo, de una manera dependiente de la concentración. El fraccionamiento del extracto, mediante cromatografía de exclusión por FPLC, permitió obtener 12 fracciones primarias, de las cuales dos mostraron efecto contráctil cuando se evaluaron en el íleon aislado de cobayo. Estas fracciones se sometieron a varios experimentos dirigidos hacia la caracterización parcial de su mecanismo de acción, los resultados de éstos sugirieron que el efecto contráctil de ambas fracciones podría deberse a un incremento en la permeabilidad membranal al Ca<sup>2+</sup> de las células musculares lisas (Rojas et al., 2002).

Es evidente que las especies del género *Millepora* representan una fuente potencial de compuestos bioactivos que pueden ser útiles para el desarrollo de nuevos fármacos o de herramientas de investigación. Asimismo, es importante comprender el mecanismo mediante el cual las toxinas de *M. complanata* ejercen sus efectos tóxicos, a fin de poder diseñar una terapia racional para tratar las lesiones producidas por estos hidrocorales. Con base en estas consideraciones, se decidió continuar con el estudio bioquímico y farmacológico de *M. complanata*. Dado que estudios previos realizados sobre especies de este género, sugerían que *M. complanata* podría producir toxinas con efecto sobre el músculo liso y citolisinas con acción hemolítica, en el presente trabajo se evaluó por primera vez el efecto del extracto crudo de *M. complanata* sobre el tono vascular y su actividad hemolítica. Adicionalmente, se purificaron las proteínas responsables de los efectos observados mediante métodos cromatográficos, como un primer paso para su futura caracterización farmacológica.

## II. ANTECEDENTES

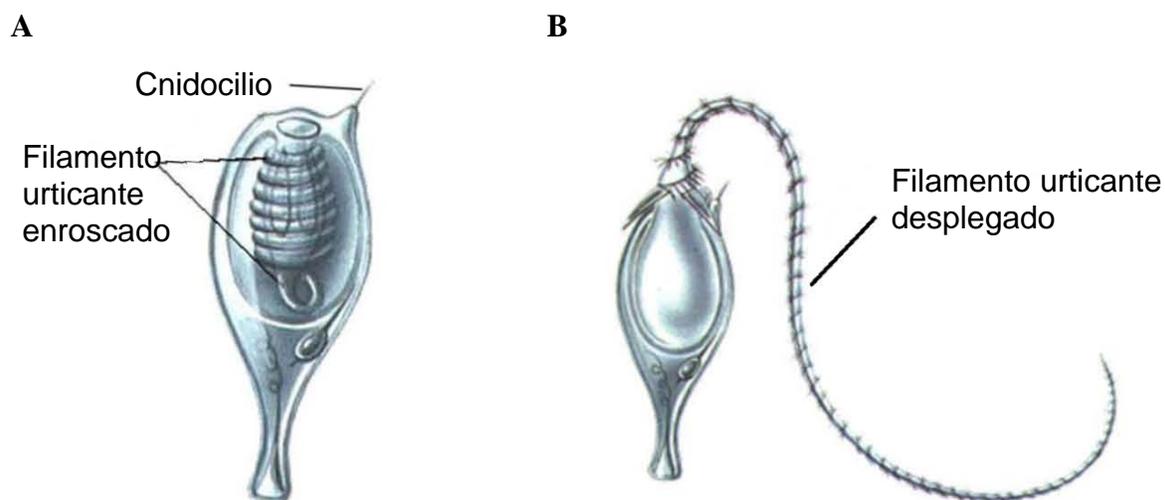
### 2.1. Organismos del phylum Cnidaria

Los organismos del phylum Cnidaria constituyen un grupo grande de organismos acuáticos, la mayor parte de los cuales son marinos. Estas especies se conocen como cnidarios y se encuentran ampliamente distribuidos en hábitats marinos poco profundos, especialmente en lugares con temperaturas cálidas y regiones tropicales. El cuerpo de los cnidarios es relativamente simple, tiene simetría radial y está organizado como un saco hueco que contiene una cavidad denominada “cavidad gastrovascular”. Esta cavidad contiene una sola abertura que tiene la función de boca y ano. Los cnidarios se ajustan a una o a dos formas corporales: la forma pólipo y la forma medusa. La forma pólipo, que puede vivir de manera solitaria o en colonias, generalmente está adaptada a una vida sésil y posee la boca en la superficie superior. Por el contrario, la forma medusa está adaptada para la flotación y tiene la boca en la superficie inferior. Tanto el pólipo como la medusa están formados por dos capas celulares: la epidermis externa (ectodermo) y la gastrodermis interna (endodermo). Entre estas dos capas, hay un material gelatinoso, denominado mesoglea (Solomon et al., 1998).

De acuerdo a sus características morfológicas, se conocen actualmente cuatro clases de cnidarios: la clase Hydrozoa, la cual es la más variable e incluye a las hidras, a los corales de fuego (género *Millepora*) y a la fragata portuguesa (*Physalia physalis*); la clase Scyphozoa, que incluye a las medusas reales de diámetros grandes; la clase Cubozoa, que incluye a las cubomedusas; y la clase Anthozoa, que incluye a las anémonas, corales pétreos, corales blandos y otros organismos (Nevalainen et al., 2004).

Una característica distintiva de las especies del phylum Cnidaria es que poseen células punzantes llamadas cnidocitos. Esta característica es la que le da el nombre a este phylum. Cada cnidocito contiene un orgánulo urticante, cargado de veneno, que recibe el nombre de nematocisto. El nematocisto es una cápsula diminuta de forma oval, constituida principalmente de glucoproteínas y un material similar al

colágeno denominado minicolágeno (Özbek et al., 2004). Hasta el momento, se han descrito cerca de 20 tipos de nematocistos. Todos contienen una abertura en la parte apical, cerrada por una pequeña tapa que se conoce como opérculo. Dentro del nematocisto se encuentra un filamento tubular enrollado que tiene la función de inyectar el veneno a las presas. 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 (Figura 1) (Tardent, 1995). Aunque el cnidocilio reacciona principalmente ante un estímulo mecánico, su sensibilidad está influenciada por quimiorreceptores localizados en células adyacentes. De tal manera que se requiere de una combinación entre estímulos mecánicos y químicos para el reconocimiento de la presa (Watson y Hessinger, 1989).



**Figura 1.** Representación esquemática del cnidocito. (A) Cnidocito con el nematocisto sin disparar. (B) Cnidocito con el nematocisto disparado.

Los cnidocitos se producen en invaginaciones de las células ectodérmicas y son especialmente abundantes en los tentáculos, los cuales generalmente forman un círculo alrededor de la boca. Cuando un nematocisto se descarga, el cnidocito se

absorbe y se reemplaza por uno nuevo. La descarga del nematocisto es facilitada por una presión osmótica muy alta que hay en su interior debido a una alta concentración de poli- $\gamma$ -glutamato, de tal manera que cuando se estimula su descarga, esta alta presión hace que el agua se precipite dentro de la cápsula, en consecuencia el opérculo se abre y el incremento en la presión hidrostática dentro de la cápsula hace que el filamento urticante se proyecte hacia el exterior (Tardent, 1995).

Los estudios que se han realizado sobre los venenos producidos por diferentes clases de cnidarios indican que las toxinas presentes son principalmente de naturaleza proteica. Se pueden clasificar estas toxinas, tomando en cuenta los conocimientos generales de los efectos que producen, en dos grupos principales: citolisinas y neurotoxinas.

### **2.1.1. Citolisinas presentes en cnidarios**

Las citolisinas son toxinas que se caracterizan por su capacidad de producir disgregación o disolución de determinados elementos celulares, principalmente afectan a las membranas celulares. Uno de los principales mecanismos por medio del cual actúan muchas citolisinas aisladas de cnidarios es mediante la formación de poros en las membranas celulares. De manera general, las toxinas formadoras de poro hacen que las membranas se vuelvan más permeables, provocando desestabilización del equilibrio osmótico, en consecuencia la célula absorbe más agua hasta que finalmente revienta (Parker, 2003). Las anémonas representan un ejemplo claro de cnidarios que producen este tipo de toxinas, por ejemplo, en *Actinia equina* se han encontrado al menos 5 isoformas de equinatoxinas, las cuales son proteínas formadoras de poro con un peso molecular de 20 kDa aproximadamente (Anderluh et al., 1999). Además de las equinatoxinas, se encuentran las esticolisinas I a IV, aisladas de *Stichodactyla helianthus* (Kem y Dunn, 1988), y las magnificalisinas I a III, aisladas de *Heteractis magnifica* (Khoo et al., 1993). Las equinatoxinas, esticolisinas y magnificalisinas constituyen la familia de las actinoporinas. También se ha sugerido la existencia del grupo de las hidralisinas,

constituido por proteínas formadoras de poro aisladas de la hidra *Chlorohydra viridissima* (Zhang, 2003).

Otro tipo de citolisinas actúan mediante degradación enzimática de lípidos membranales específicos. Las principales toxinas de este tipo que se han encontrado en cnidarios son aquellas que tienen actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>. Estas enzimas hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos. Los extractos de varias especies de las diferentes clases de cnidarios presentan altos niveles de actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (Nevalainen et al., 2004). Muchas veces, este tipo de toxinas actúan en conjunto con otras citolisinas para inducir la lisis de las células. Por ejemplo, en el veneno de la anémona *Aiptasia pallida*, se han encontrado dos isoformas de fosfolipasa A<sub>2</sub> ( $\alpha$  y  $\beta$ ), las cuales requieren la presencia de un tercer componente para ejercer un efecto hemolítico. Este tercer componente presenta actividad hemolítica al evaluarse en ausencia de las dos isoformas de fosfolipasa A<sub>2</sub> (Grotendorst y Hessinger, 1999). Además, se ha encontrado que algunas de estas citolisinas requieren de cationes divalentes, como el Ca<sup>2+</sup> y el Mg<sup>2+</sup>, para alcanzar su actividad óptima, tal es el caso de la  $\beta$  fosfolipasa A<sub>2</sub> de *A. pallida* (Grotendorst y Hessinger, 2000).

### 2.1.2. Neurotoxinas presentes en cnidarios

Las neurotoxinas son otro grupo importante de toxinas que se encuentran en las diferentes clases de cnidarios. Estas toxinas poseen una alta afinidad por canales iónicos de membranas excitables y han sido detectadas principalmente en anémonas, por ejemplo, las toxinas: ATX-II, aislada de *Anemonia sulfata*; AFT-II, aislada de *Anthopleura fuscoviridis*, y Bc-III, aislada de *Bunodosoma caissarum*, actúan activando diferentes tipos de canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Oliveira et al., 2004). Además, se ha demostrado la presencia de una toxina en *Hydra vulgaris* que induce espasmos en algunos animales debido a un incremento en la permeabilidad de los canales de calcio, provocando un aumento en los niveles de calcio citosólico (Klug y Weber, 1991). Algunos estudios sugieren la presencia de este tipo de toxinas en los venenos de algunas medusas, debido a que modifican la

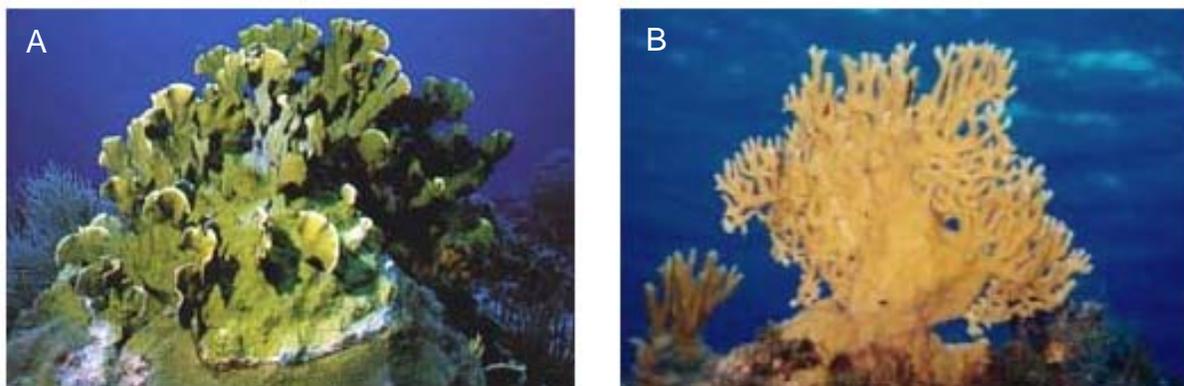
conductividad iónica membranal en diferentes modelos biológicos, por ejemplo: el veneno de *Aurelia sp.* produce despolarización en el músculo esquelético de rana (Kihara et al., 1988); *Carybdea rastonii* produce contracción, dependiente de calcio, del músculo liso arterial (Azuma et al., 1989); algunas toxinas de *Chrysaora sp.* abren canales catiónicos en fibras nerviosas desmielinizadas de rana (Dubois et al., 1983) y el extracto proteico de *Cassiopea xamachana* incrementa la conductancia iónica de la membrana del ovocito de *Xenopus laevis* (Torres et al., 2001).

### **2.1.3. Toxicidad de las especies del género *Millepora***

El género *Millepora* (Reino: *Animalia*; Phylum: *Cnidaria*; Clase: *Hydrozoa*; Orden: *Capitata*; Superfamilia: *Zanctioidea*; Familia: *Milleporidae*) comprende 17 especies reconocidas hasta el momento (Cairns, 1999). Los pólipos de estas especies tienen la capacidad de formar esqueletos calcáreos, razón por la cual se denominan hidrocorales. Estas especies constituyen una de las formas coralinas más habituales en los arrecifes, encontrándose en mares tropicales de todo el mundo a profundidades que van desde menos de 1 m hasta cerca de 40 m (Lewis, 1989). La forma de crecimiento de los hidrocorales es muy variable de una especie a otra. Por lo general, las formas robustas y de cuchillas se encuentran en aguas turbulentas, mientras que las formas ramificadas son más comunes en aguas tranquilas (Davies y Montaggioni, 1985). En los arrecifes del Caribe mexicano predominan las especies: *M. alcicornis*, que presenta una forma ramificada, y *M. complanata*, cuyas colonias tienen forma de cuchillas (Figura 2) (Lewis, 1989).

Los hidrocorales, al igual que los corales de la clase *Anthozoa*, presentan una íntima simbiosis nutricional con las microalgas fotosintéticas llamadas dinoflagelados, comúnmente conocidas como zooxantelas. Las zooxantelas producen oxígeno, compuestos de carbono y compuestos nitrogenados que son aprovechados por los corales e hidrocorales. Por su parte, los corales e hidrocorales proporcionan a las zooxantelas, productos de desecho como amoníaco, con el cual se generan los compuestos nitrogenados para ambos socios (Knowlton, 2001). Por esta razón, los hidrocorales también son afectados por el fenómeno de blanqueamiento, en el que

se pierden las zooxantelas simbiotas. En consecuencia, se reduce su crecimiento, calcificación y tiempo de supervivencia. Se ha encontrado que algunos hidrocorales pueden sobrevivir hasta 4 semanas en ausencia de zooxantelas simbiotas (Lewis, 1989).



**Figura 2.** Fotografías subacuáticas de los hidrocorales predominantes en el Caribe mexicano. (A) *Millepora complanata*. (B) *Millepora alcicornis*.

Entre los predadores de los hidrocorales se encuentran algunos percebes de la subfamilia *Pyrgomatinae*. A densidades elevadas, estos organismos pueden afectar el crecimiento de los hidrocorales. Los gusanos poliquetos *Hermodice carunculata* y algunos gusanos del género *Phylochaetopterus* tienen efectos similares sobre los hidrocorales. Las especies de peces: *Alutera scripta* y *Cantherines macrocerus* se alimentan de hidrocorales. Por otra parte, los hidrocorales se alimentan principalmente de zooplancton y especies de *Artemia* (Lewis, 1989).

Con relación a la toxicidad para el humano, se ha descrito que de las 10,000 especies de cnidarios que se conocen en la actualidad, solamente 70 son tóxicas para el hombre. De estas últimas, unas de las más sobresalientes son las especies del género *Millepora* (Hashimoto, 1979). Los nematocistos de algunas especies de este género pueden perforar la piel humana al ser estimulados por contacto y causar intensas picaduras dolorosas con diferentes grados de intoxicación (Sagi et al., 1987;

Bianchini et al., 1988). Las reacciones cutáneas incluyen: eritema, ronchas, lesiones ulceronecroticas y lesiones papulares que pueden volverse lesiones pustulares con descamación excesiva (Sagi et al., 1987; Bianchini et al., 1988). En cuanto a la sintomatología general, puede presentarse náusea, vómito, dolor abdominal, dificultad respiratoria y fiebre (Bianchini et al., 1988).

Debido a las lesiones que producen en los humanos, algunas de las especies del género *Millepora* son conocidas comúnmente como “corales de fuego”. Las personas que frecuentemente nadan o bucean cerca de los arrecifes de coral generalmente reconocen y evitan el contacto con estos organismos (Lewis, 1989). Sin embargo, en las clínicas situadas cerca de los mares tropicales se han reportado varios casos de quemaduras en humanos provocadas por contacto con los corales de fuego (Sagi et al., 1987).

Hasta el momento, se sabe poco sobre las estructuras y los mecanismos de acción de las toxinas producidas por los hidrocorales. Los estudios que se han realizado sobre estos organismos coinciden en que sus toxinas son de naturaleza proteica. En el año 1971, se reportaron dos estudios toxicológicos sobre *M. tenera* y *M. alcicornis*, en los que se evaluó la letalidad de sus extractos (obtenidos por maceración en amortiguador de Sørensen a un pH de 7 y a una temperatura de 4°C) en ratones al inyectarlos por vía intravenosa. En estos estudios, la DL<sub>50</sub> calculada para *M. alcicornis* fue de 0.55 µg de proteína/g de peso corporal, mientras que la DL<sub>50</sub> calculada para *M. tenera* fue de 0.303 µg de proteína/g de peso corporal, ambos extractos perdían su actividad al ser evaluados después de someterlos a ebullición (Middlebrook et al., 1971; Wittle et al., 1971). El extracto de *M. alcicornis* fue sometido a sucesivas cromatografías en DEAE-celulosa y Sephadex G-100, lo cual permitió purificar parcialmente una proteína con un peso molecular aproximado de 100,000 Da y una actividad tóxica 14 veces mayor que el extracto original (Wittle et al., 1971). Por otra parte, el fraccionamiento cromatográfico en DEAE-celulosa del extracto de *M. tenera* permitió purificar parcialmente una fracción proteica 8 veces más activa que el extracto original (Middlebrook et al., 1971).

Unos años más tarde, se demostró que las toxinas que se purificaron parcialmente a partir de ambos hidrocorales provenían de sus nematocistos. Sin embargo, no se

descartó la posibilidad de que existieran otras toxinas provenientes de otros tejidos del hidrocoral o de sus organismos simbioses (Wittle et al., 1974). Además, en otro estudio se encontró que el extracto de *M. tenera* presentó actividad hemolítica sobre eritrocitos de rata e indujo dermonecrosis en ratones al inyectarlos por vía intradérmica (Wittle y Wheeler, 1974).

En un estudio realizado sobre *M. dichotoma* y *M. platyphylla*, hidrocorales comunes en las costas del Mar Rojo, se encontró que los extractos de los nematocistos de estos organismos presentaron toxicidad en ratones al inyectarlos por vía intravenosa. El extracto de *M. dichotoma* presentó una  $DL_{50}$  de 0.51  $\mu\text{g}$  de proteína/g de peso corporal, en tanto que la  $DL_{50}$  del extracto de *M. platyphylla* fue de 0.21  $\mu\text{g}$  de proteína/g de peso corporal. Además, se encontró que ambos extractos presentaron actividad dermonecrotica y vasopermeable cuando se inyectaron en ratones por vía subcutánea a dosis de 1  $\mu\text{g}$  de proteína/g de peso corporal. También se encontró que los dos extractos presentaron actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos a concentraciones de 20 a 200  $\mu\text{g}$  de proteína/ml. La actividad hemolítica de ambos extractos se inhibió parcialmente por la presencia de fostatidilcolina, fostatidilserina o dihidrocolesterol, siendo más notable la actividad inhibitoria de este último. Además, en ambos extractos se encontró que las fracciones obtenidas mediante cromatografía de filtración en gel, en las que se concentró la actividad hemolítica también presentaron letalidad en ratones (Radwan, 2002).

Recientemente, se realizó un fraccionamiento del extracto de los nematocistos de *M. platyphylla* mediante cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. De esta manera, se encontró una fracción rica en proteínas, con pesos moleculares de 30 a 34 kDa, con actividad hemolítica sobre eritrocitos de humano y actividad de fosfolipasa  $A_2$ . La purificación subsecuente de esta fracción mediante cromatografía de intercambio iónico permitió obtener una fracción, con una proteína de un peso molecular de 32.5 kDa como componente mayoritario, que se denominó Milleporina-1. Esta fracción presentó actividad de fosfolipasa  $A_2$  y contribuyó, en parte, a la actividad hemolítica presentada por la fracción obtenida inicialmente (Radwan y Aboul-Dahab, 2004).

En un estudio bioquímico y farmacológico de *M. complanata*, se evaluó el efecto del extracto crudo de este organismo sobre las contracciones espontáneas de íleon aislado de cobayo, a concentraciones de 0.001 a 1,000  $\mu\text{g}$  de proteína/ml. El extracto causó una estimulación, dependiente de la concentración, de las contracciones espontáneas del íleon ( $\text{CE}_{50} = 11.55 \pm 2.36 \mu\text{g/ml}$ ), siendo aproximadamente 12 veces menos potente que la ionomicina ( $\text{CE}_{50} = 0.88 \pm 0.25 \mu\text{g/ml}$ ), que se empleó como control positivo. Este efecto se perdió cuando se incubó el extracto a 37 °C de 2 a 12 h. El fraccionamiento del extracto, mediante cromatografía de exclusión por FPLC, permitió obtener 12 fracciones primarias, de las cuales sólo las fracciones FV y FVIII mostraron efecto contráctil cuando se evaluaron en el íleon aislado de cobayo a la  $\text{CE}_{50}$  del extracto. Estas fracciones se sometieron a varios experimentos dirigidos hacia la caracterización parcial de su mecanismo de acción, mediante el modelo de íleon aislado de cobayo, encontrándose que el efecto contráctil de ambas fracciones podría deberse a un incremento en la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana de las células musculares lisas. De manera adicional, en este estudio se encontró el mismo tipo de actividad sobre el íleon al evaluar el extracto obtenido de un espécimen de *M. complanata* blanqueado (libre de zooxantelas simbiotes), lo cual apoya la idea de que los compuestos responsables de este tipo de actividad provienen del hidrocoral (Rojas et al., 2002).

## **2.2. Generalidades sobre la fisiología de la pared arterial**

La estructura general de la pared de las arterias consiste de tres capas concéntricas, denominadas también “túnicas”: la capa interna, llamada túnica íntima, está constituida por células endoteliales orientadas longitudinalmente; la capa media o túnica media está compuesta por elastina y células de músculo liso orientadas de manera circular; y la capa externa, también conocida como túnica adventicia, está constituida por fibroblastos y fibras de colágeno que están orientadas de manera longitudinal. Las arterias se clasifican en: arterias elásticas, arterias musculares, arterias pequeñas y arteriolas. Esta clasificación se hace de acuerdo al diámetro de

la luz, al grosor de la pared y al componente mayoritario de la túnica media. Por ejemplo, las arterias elásticas, como la arteria aorta, en la túnica media contienen una mayor proporción de elastina que las arterias musculares. Esto proporciona al vaso la elasticidad necesaria para adaptarse a los cambios de presión originados por el flujo pulsátil del corazón. Por otro lado, en las arterias musculares el principal componente de la túnica media es el músculo liso (Navarro-Cid et al., 1999).

La función principal de las células de músculo liso vascular es mantener y modificar el diámetro del lumen de los vasos. Esta función está ampliamente regulada por diversos factores endógenos que interaccionan, ya sea de manera directa o indirecta, con diversos componentes celulares para inducir vasoconstricción o vasodilatación. Por esta razón, el empleo de segmentos de aorta aislados constituye un modelo sencillo que permite evaluar el efecto de sustancias de prueba sobre el tono vasomotor (Nagase et al., 1987; Aceret et al., 1996). A continuación se presentan algunas de las principales características estructurales de las células musculares lisas y endoteliales. Además, se explican de manera general los mecanismos principales por medio de los cuales se puede controlar el tono vasomotor.

### **2.2.1. Músculo liso vascular**

#### **A. Estructura funcional de las células de músculo liso**

La organización de las células de músculo liso vascular es relativamente simple. Estas células son fusiformes y presentan un único núcleo en posición central. Su disposición es circular, formando varias capas alrededor de la circunferencia del vaso. Estas células poseen uniones comunicantes que proveen una continuidad del citoplasma entre las células acopladas, lo cual permite el flujo libre de iones de una célula a otra, de forma que los potenciales de acción pueden pasar de una fibra muscular a la siguiente y hacer que las fibras se contraigan simultáneamente (Christ y Brink, 2000). Las células de músculo liso vascular, al igual que las células de músculo liso de otros tejidos, contienen múltiples filamentos de actina y miosina, conocidos también como filamentos delgados y gruesos, respectivamente. La

interacción entre ambos filamentos genera la fuerza necesaria para desencadenar la contracción muscular (Huxley, 1969). Los filamentos de actina están agrupados en haces laxos adosados a cuerpos densos en el citosol, análogos a los discos Z del músculo esquelético. Los cuerpos densos son mantenidos en su posición por un almacén de proteínas estructurales que los mantienen unidos entre sí. El otro extremo de los filamentos de actina se conecta a placas de fijación, similares a los cuerpos densos, pero localizados en la membrana celular de la fibra muscular (Kargacin et al., 1989). Cada filamento de actina está compuesto por una doble hebra de actina-F, la cual es un polímero filamentoso constituido por múltiples monómeros de actina-G que están ordenados linealmente. Las hebras de actina-F están enrolladas en espiral con la tropomiosina, una proteína que se encuentra conectada de forma laxa con las hebras de actina-F (Beckerle, 1998).

Entre los numerosos filamentos de actina, se intercalan algunos filamentos de miosina. Cada filamento de miosina está compuesto por 200 ó más moléculas individuales de miosina II, cada una con un peso molecular de aproximadamente 480 kDa. Una molécula de miosina II está compuesta por seis cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas con un peso molecular de aproximadamente 200 kDa cada una y cuatro cadenas ligeras con pesos moleculares de aproximadamente 20 kDa cada una. Las cadenas pesadas están organizadas en tres dominios diferentes: el dominio de la cabeza, el del cuello y el de la cola (Wendt et al., 2001).

El dominio globular de la cabeza posee actividad ATPasa y contiene un sitio de unión a actina y un sitio de unión a trifosfato de adenosina (ATP). Por esta razón, se le conoce a esta porción como dominio catalítico (Rayment, 1996). Adyacente al dominio catalítico se encuentra la región del cuello alfa helicoidal que se asocia con las cadenas ligeras. El dominio de la cola es una porción elongada de la hélice que se enrolla con la cola de la otra cadena pesada para formar una doble hélice. Cada cadena pesada de la miosina II contiene dos cadenas ligeras diferentes, denominadas cadenas ligeras esencial y reguladora, ambas son proteínas fijadoras de calcio. Las colas de todas las moléculas de miosina II están agrupadas para formar el cuerpo del filamento de miosina, mientras que muchas cabezas de miosina cuelgan hacia el exterior a los dos lados del cuerpo (Wendt et al., 2001).

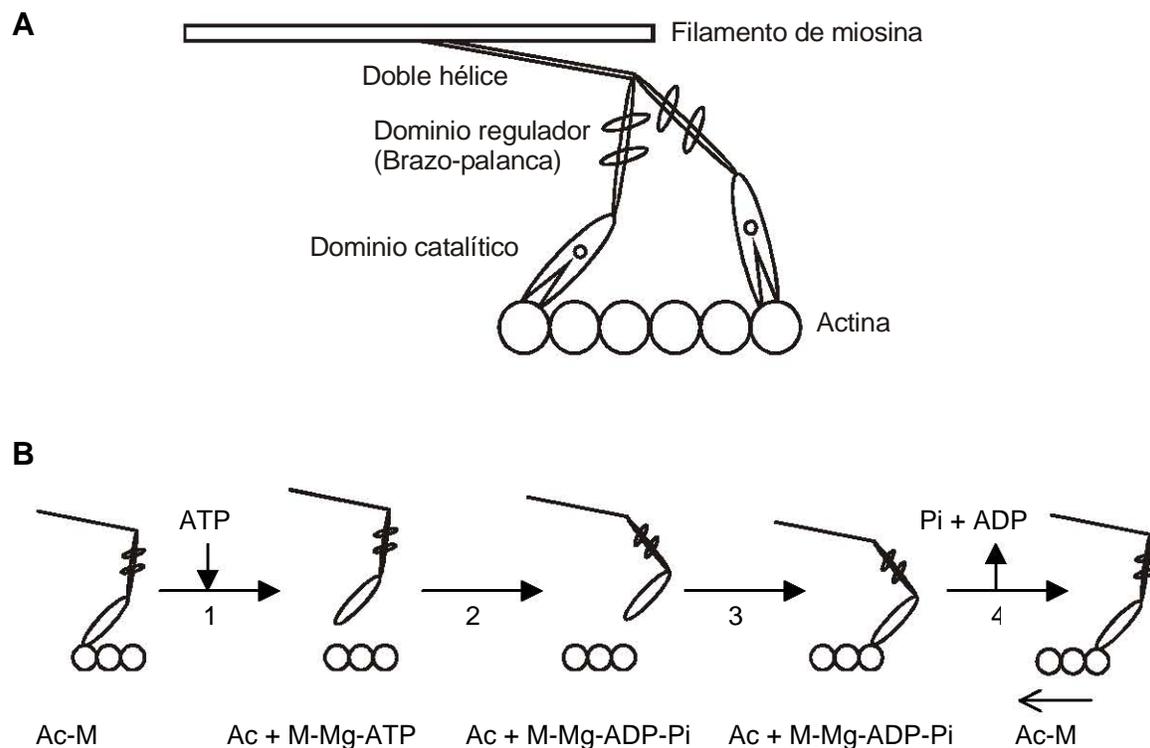
## **B. Generación de la fuerza durante la contracción muscular**

Existen varios modelos teóricos que intentan explicar el proceso de la generación de la fuerza necesaria para la contracción muscular. Uno de los modelos más aceptados en la actualidad es el de brazo-palanca (lever-arm model). Este modelo supone que la hidrólisis de una sola molécula de ATP se acopla en cada paso a una molécula de miosina a lo largo del filamento de actina (Holmes, 1997; Geeves y Holmes, 1999; Highsmith, 1999).

El brazo-palanca, también conocido como dominio regulador, es el alargamiento de aproximadamente 8 nm de la cadena pesada de la miosina II correspondiente a la región del cuello en donde se encuentran las cadenas ligeras esencial y reguladora. El dominio regulador, junto con el dominio catalítico, constituyen el dominio motor, por lo que cada molécula de miosina II posee dos dominios motores (Figura 3 A). Sin embargo, sólo un dominio motor es capaz de generar el golpe de fuerza para desplazar a la actina de 5 a 12 nm a través del filamento de miosina (Highsmith, 1999).

En la Figura 3 B se muestra un esquema que representa el acoplamiento de la hidrólisis del ATP a la interacción entre actina y miosina para la generación de la contracción muscular. En ausencia de ATP, la cabeza de miosina se une estrechamente a la actina (Ac-M) (Figura 3 B). A este complejo se le conoce comúnmente como “estado de rigor”. Cuando el ATP se une al dominio catalítico, en presencia de  $Mg^{2+}$ , se produce una alteración en la conformación de la cabeza de miosina que debilita la unión de la actina, esto provoca la disociación entre el dominio motor de la miosina y el filamento de actina, formándose así un complejo entre el dominio motor,  $Mg^{2+}$  y ATP (M-Mg-ATP) (paso 1, Figura 3 B). Mientras el dominio motor está disociado de la actina se produce la hidrólisis de ATP, esto induce una rotación hipotética del brazo-palanca y produce un complejo más compacto entre el dominio motor, el  $Mg^{2+}$  y los productos de la degradación del ATP: el difosfato de adenosina (ADP) y el fosfato inorgánico ( $P_i$ ) (paso 2). Este complejo se une a actina para formar un nuevo complejo entre la actina, el dominio motor, el  $Mg^{2+}$ , el ADP y el  $P_i$ , en el cual el dominio motor se encuentra débilmente unido a la actina (paso 3). De acuerdo con este modelo, el golpe de fuerza para la contracción muscular se

produce por una rotación reversa del brazo-palanca cuando los productos de la hidrólisis de ATP se liberan. Dado que en ese momento la miosina se encuentra unida a la actina, la rotación reversa del brazo-palanca ejerce una fuerza que desplaza junto con él al filamento de actina (paso 4), quedando así el dominio motor en estado de rigor listo para una nueva interacción con otra molécula de ATP y generar otro golpe de fuerza para seguir desplazando al filamento de actina a través del filamento de miosina. Las cabezas de miosina de las dos mitades de un filamento grueso tienen polaridades opuestas, de esta manera los filamentos de actina se deslizan hacia la parte media del filamento grueso, mientras que éste permanece inmóvil (Highsmith, 1999).



**Figura 3.** Esquemización del modelo brazo-palanca para la generación de la fuerza durante la contracción muscular. A) Representación esquemática de una molécula de miosina II con sus dos dominios motores. B) Ciclo mecano-químico de la contracción muscular en el cual la miosina está representada con sólo un dominio motor. Tomado de Highsmith, 1999.

### **C. Mecanismos de regulación de la contracción del músculo liso vascular**

El  $\text{Ca}^{2+}$  es el principal mensajero intracelular que regula el proceso de contracción muscular. Bajo condiciones normales, la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma de la célula de músculo liso se encuentra relativamente baja, aproximadamente 140 nM. Un incremento de la concentración citoplasmática de este ión, de 500 a 700 nM, desencadena el proceso de contracción muscular por diferentes mecanismos (Williams y Fay, 1986). Este incremento en la concentración puede deberse al influjo del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática o a la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes intracelulares. En todos los tipos de células musculares el principal almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  es el retículo sarcoplásmico (Tognarini y Moulds, 1997; Long et al., 2000).

El  $\text{Ca}^{2+}$  puede regular la contracción del músculo liso a través de una vía compleja que involucra a las cadenas ligeras reguladoras de la miosina. Uno de los dos pares de cadenas ligeras de la miosina inhibe la interacción entre las cabezas de miosina y los filamentos de actina, cuando las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  son bajas. Esta inhibición se elimina, y el músculo liso se contrae, cuando la cadena ligera reguladora es fosforilada por una enzima denominada cinasa de la cadena ligera reguladora de miosina (MLCK) (Kamm y Stull, 1985; Somlyo y Somlyo, 1994). La MLCK es activada por  $\text{Ca}^{2+}$  de manera indirecta, ya que para su activación se requiere de calmodulina, la cual es una proteína fijadora de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumentan, cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$  se unen a la calmodulina, entonces el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina se fija a la MLCK para activarla (Somlyo y Somlyo, 1994; Heller et al., 2003).

En otra vía de regulación de la contracción del músculo liso en la que participa el  $\text{Ca}^{2+}$ , interviene también la caldesmona, una proteína que forma un complejo con tropomiosina y actina, restringiendo la capacidad de la miosina para unirse al filamento de actina, lo cual impide la contracción (Szpacenko et al., 1985). Esta inhibición se revierte cuando el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina se fija a la caldesmona (Smith et al., 1987). Además, la fijación de la caldesmona a la actina no sólo es afectada por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, ya que la forma fosforilada de la caldesmona no se fija bien a los filamentos de actina y es incapaz de inhibir la

interacción entre actina y miosina. La caldesmona es fosforilada por diversas cinasas, entre las cuales se encuentra una proteína cinasa activada por mitógenos (Huang et al., 2003).

El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula de músculo liso vascular se da principalmente a través de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Figura 4). La despolarización de la célula de músculo liso induce la apertura de estos canales y en consecuencia el  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la célula a través de ellos (Mironneau y Macrez-Leprêtre, 1995). La liberación del calcio intracelular almacenado, también puede estimular la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a las células a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por almacenamiento. Estos canales también permiten el influjo de  $\text{Na}^+$ , lo cual induce la despolarización de la membrana y ayuda a la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje para potenciar su efecto (Trepakova et al., 2001). También se ha encontrado, en las células de músculo liso vascular, la existencia de un tipo de canales que se conocen como canales catiónicos no selectivos, los cuales son permeables a iones monovalentes como el  $\text{Na}^+$ , el  $\text{K}^+$  y probablemente el  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos canales de cationes no selectivos se activan por efecto de la endotelina-1, a través de los receptores  $\text{ET}_A$  (Minowa et al., 1997).

Además de la presencia de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L y de los canales catiónicos no selectivos, existe una gran variedad de otros canales iónicos, localizados en la membrana plasmática, que contribuyen a regular el tono de las células del músculo liso vascular mediante el control del potencial de membrana (Figura 4). Entre estos canales iónicos se encuentran diversos tipos de canales de potasio, tales como: canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , canales de  $\text{K}^+$  de rectificación tardía, canales de  $\text{K}^+$  dependientes de ATP y canales de  $\text{K}^+$  de rectificación entrante. Se ha encontrado que la activación de estos canales produce hiperpolarización de las células de músculo liso arterial, lo cual dificulta la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de los canales dependientes de voltaje, induciendo vasodilatación (Silva et al., 1994; Ren et al., 2003). Por otro lado, la apertura de los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  despolariza la membrana de las células de músculo liso vascular, esto a su vez induce el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales dependientes de voltaje tipo L, favoreciendo la contracción (Pacaud et al., 1991).

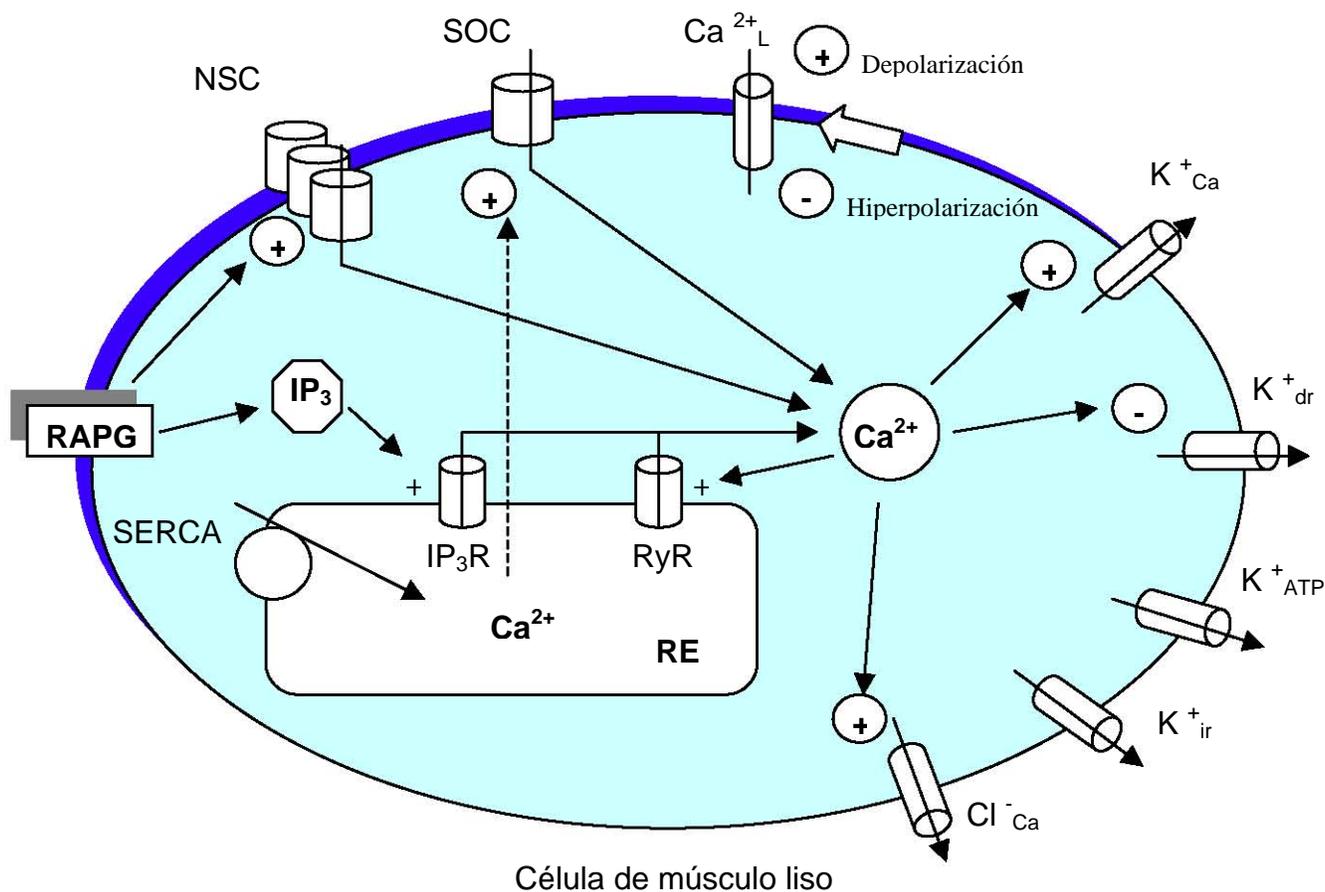


Figura 4. Representación esquemática de una célula de músculo liso con algunos canales iónicos implicados en la regulación de la contracción. Ver detalles en el texto. RAPG = receptores acoplados a proteínas G, NSC = canales catiónicos no selectivos, SOC = canales operados por almacenamiento.  $\text{Ca}^{2+}_L$  = canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L,  $\text{K}^+_{\text{Ca}}$  = canales de  $\text{K}^+$  dependientes de calcio,  $\text{K}^+_{\text{dr}}$  = canales de  $\text{K}^+$  de rectificación tardía,  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  = canales de  $\text{K}^+$  dependientes de ATP,  $\text{K}^+_{\text{ir}}$  = canales de  $\text{K}^+$  de rectificación entrante,  $\text{Cl}^-_{\text{Ca}}$  = canales de  $\text{Cl}^-$  dependientes de calcio,  $\text{IP}_3\text{R}$  = receptores de inositol trifosfato,  $\text{RyR}$  = receptores de ryanodina, SERCA =  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo sarcoplásmico-endoplásmico, RE = retículo endoplásmico. Modificado de Bolotina, 2000.

Para poder explicar los mecanismos por medio de los cuales se da la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$ , almacenado en el retículo sarcoplásmico, es necesario explicar el papel que tienen los segundos mensajeros en la regulación de la contracción del músculo liso vascular. La unión de los diferentes ligandos a sus receptores de superficie celular causa un incremento, o disminución, de corta duración en las concentraciones de las moléculas señal intracelulares que reciben el nombre de segundos mensajeros. Estas moléculas tienen un bajo peso molecular e incluyen: 3',5'-adenosina-monofosfato cíclico (AMPC); 3',5'-guanosina-monofosfato cíclico (GMPc); 1,2-diacilglicerol (DAG); 1,4,5-trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) y distintos fosfolípidos de inositol. Todos estos segundos mensajeros juegan un papel importante en la regulación de la contracción muscular (Kamm y Stull, 1989).

El  $\text{IP}_3$  y el DAG derivan del fosfatidilinositol (PI), un fosfolípido localizado en la membrana celular. El grupo inositol del PI, que se extiende hacia el interior del citosol adyacente a la membrana, se fosforila en distintas posiciones por acción de diversas cinasas, para producir distintos fosfoinosítidos anclados a la membrana. Éstos pueden escindirse por acción de la enzima asociada a la membrana denominada fosfolipasa C (PLC) para generar DAG, que permanece en la membrana, e inositoles fosforilados libres capaces de difundirse hacia el citosol (Berridge e Irvine, 1989). En las células de músculo liso vascular existen varios receptores que activan a la PLC, los cuales pertenecen a la familia de receptores de membrana acoplados a proteínas G. Ejemplos de estos receptores son: los receptores histaminérgicos  $\text{H}_1$  (Göthert et al., 1995), los receptores de vasopresina  $\text{V}_1$  (László et al., 1991), los receptores de endotelina  $\text{ET}_A$  (Sokolovsky, 1995) y los receptores  $\alpha$  adrenérgicos (Mironneau y Macrez-Leprêtre, 1995; Tognarini y Moulds, 1997). Gran parte de los receptores que activan a la PLC también activan a la enzima Rho cinasa, la cual puede fosforilar a la fosfatasa de la cadena ligera reguladora de miosina (MLCP) e inhibir su actividad (Kitazawa et al., 1991; Kimura et al., 1996). La Rho cinasa también activa de forma indirecta a la miosina, al fosforilar la cadena ligera reguladora (Noda et al., 1995).

El DAG que se produce por acción de la PLC puede activar a la proteína cinasa C (PKC). La PKC se encuentra en el citosol bajo condiciones normales, pero bajo la influencia del calcio, ésta es trasladada a la membrana plasmática, en donde

interacciona con el DAG y se activa. La activación de la PKC en distintas células produce un amplio espectro de respuestas celulares (Nishizuka, 1988). Por ejemplo, se ha identificado una nueva proteína en el músculo liso vascular, denominada CPI-17, la cual al ser fosforilada por acción de la PKC inhibe a la MLCP, lo cual hace que la cadena ligera reguladora se mantenga fosforilada y no pueda ejercer su inhibición de la interacción entre actina y miosina (Li et al., 1998). También se ha encontrado que la PKC puede contribuir al mantenimiento de la contracción muscular a través de un mecanismo que involucra a la proteína cinasa activada por mitógenos, la cual fosforila a la caldesmona para inhibir su interacción con los filamentos de actina (Throckmorton et al., 1998; Huang et al., 2003).

Uno de los inosítoles fosforilados que se liberan por acción de la PLC es el IP<sub>3</sub>, el cual tiene sus receptores en el retículo sarcoplásmico. Los receptores de IP<sub>3</sub> funcionan como canales de Ca<sup>2+</sup> y constituyen uno de los principales mecanismos para la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular. El acoplamiento entre el IP<sub>3</sub> y sus receptores induce la apertura del canal, permitiendo la salida del calcio del retículo al citosol (Ehrlich y Watras, 1988). Hasta el momento se reconocen tres subtipos de receptores de IP<sub>3</sub>, predominando el subtipo 1 en el músculo liso vascular de ratas adultas (Tasker et al., 1999). Por otra parte, otro mecanismo para la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular está constituido por los receptores de ryanodina, que al igual que los receptores IP<sub>3</sub>, también funcionan como canales de Ca<sup>2+</sup>. Estos receptores reciben su nombre por su alta afinidad a la ryanodina, un alcaloide que tiene un efecto complejo sobre estos receptores. La ryanodina a dosis bajas (aproximadamente 1 μM) induce la apertura de estos canales, mientras que a dosis altas (de 10 a 100 μM) bloquea los canales (Rohra et al., 2003). Al parecer, los receptores de ryanodina son modulados por el mensajero intracelular ADP-ribosa cíclico, el cual promueve la apertura de estos canales (Wang et al., 2004).

El GMPc es un segundo mensajero sintetizado a partir de trifosfato de guanósina (GTP) por acción de la enzima guanilato ciclasa soluble, la cual es activada por el óxido nítrico que se sintetiza en las células endoteliales. El GMPc es capaz de inducir relajación del músculo liso debido a la activación de la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) (Lohmann et al., 1997). La PKG bloquea o impide la contracción del

músculo liso mediante la fosforilación de residuos de serina o treonina de diversas proteínas (Lohmann et al., 1997). Además, la PKG puede reducir la concentración de calcio intracelular inhibiendo los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Liu et al., 1997) y puede activar a otras dos proteínas, la bomba  $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$  (Yoshida et al., 1992) y el intercambiador  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  (Furukawa et al., 1991), ambos situados en la membrana celular. El control de la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula a través del intercambiador  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ , a su vez, depende de dos efectos mediados por GMPc: depleción de  $\text{Na}^+$  intracelular por la activación de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  (Tamaoki et al., 1997) e hiperpolarización de la membrana celular a través de la activación de los canales de potasio dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Carrier et al., 1997). La PKG también reduce la concentración de calcio intracelular mediante el incremento en el almacenamiento de este ión en el retículo sarcoplásmico; esto lo hace activando la bomba de calcio localizada en la membrana del retículo sarcoplásmico (Andriantsitohaina et al., 1995), inhibiendo la producción de  $\text{IP}_3$  (Ruth et al., 1993) y bloqueando los receptores de éste, también localizados en la membrana del retículo sarcoplásmico (Komalavilas y Lincoln, 1996). Adicionalmente, la PKG también puede activar a la MLCP, mediante fosforilación (Lee y Kitazawa, 1997).

El AMPc es un segundo mensajero que se sintetiza a partir de ATP por acción de la enzima adenilato ciclasa y ejerce sus efectos mediante la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) (Krebs, 1972). La adenilato ciclasa es activada por receptores acoplados a proteínas G. Algunos de estos receptores que se encuentran en las células de músculo liso vascular son: los receptores histaminérgicos  $\text{H}_2$  (Göthert et al., 1995), los receptores de prostaciclina (Coleman et al., 1994) y los receptores  $\beta$  adrenérgicos (Nelson et al., 1990). El AMPc induce la relajación de las células de músculo liso a través de un decremento en la concentración de calcio intracelular mediante los mismos mecanismos que se mencionaron para el GMPc (Kamm y Stull, 1989; Nelson et al., 1990; Murthy y Markhlouf, 1995; Ruiz-Velasco et al., 1998). Además, varios estudios han demostrado que la PKA inactiva a la MLCK mediante fosforilación (Silver y Disalvo, 1979; DeLanerolle et al., 1984).

## **2.2.2. Endotelio vascular**

### **A. Estructura y funciones del endotelio vascular**

El endotelio vascular está situado en una posición anatómica estratégica entre la sangre y el músculo liso vascular, formando una superficie transdutora de señales con diferentes funciones que dependen del tipo de vaso en el que se encuentre. Una característica estructural de las células endoteliales es que también presentan uniones comunicantes. Estas uniones constituyen una comunicación metabólica y eléctrica directa entre las mismas células endoteliales y entre células endoteliales con células de músculo liso (Dejana et al., 1995).

Entre las funciones del endotelio vascular se encuentran: la regulación de la proliferación de las células de músculo liso, la expresión de moléculas de adhesión para las células del sistema inmune y el mantenimiento del balance entre coagulación y fibrinólisis. Otra función importante del endotelio vascular es la regulación del tono de las células de músculo liso vascular. Las células endoteliales tienen la capacidad de liberar sustancias que actúan directamente sobre las células de músculo liso vascular, induciendo vasoconstricción o vasodilatación (Moncada y Higgs, 1991). Para llevar a cabo estas funciones, las células de endotelio vascular cuentan con diversos canales iónicos a través de los cuales el  $\text{Ca}^{2+}$  puede entrar y desencadenar diferentes vías de señalización. Ejemplos de estos tipos de canales son: los canales catiónicos no selectivos y los canales operados por almacenamiento (Nilius y Droogmans, 2001).

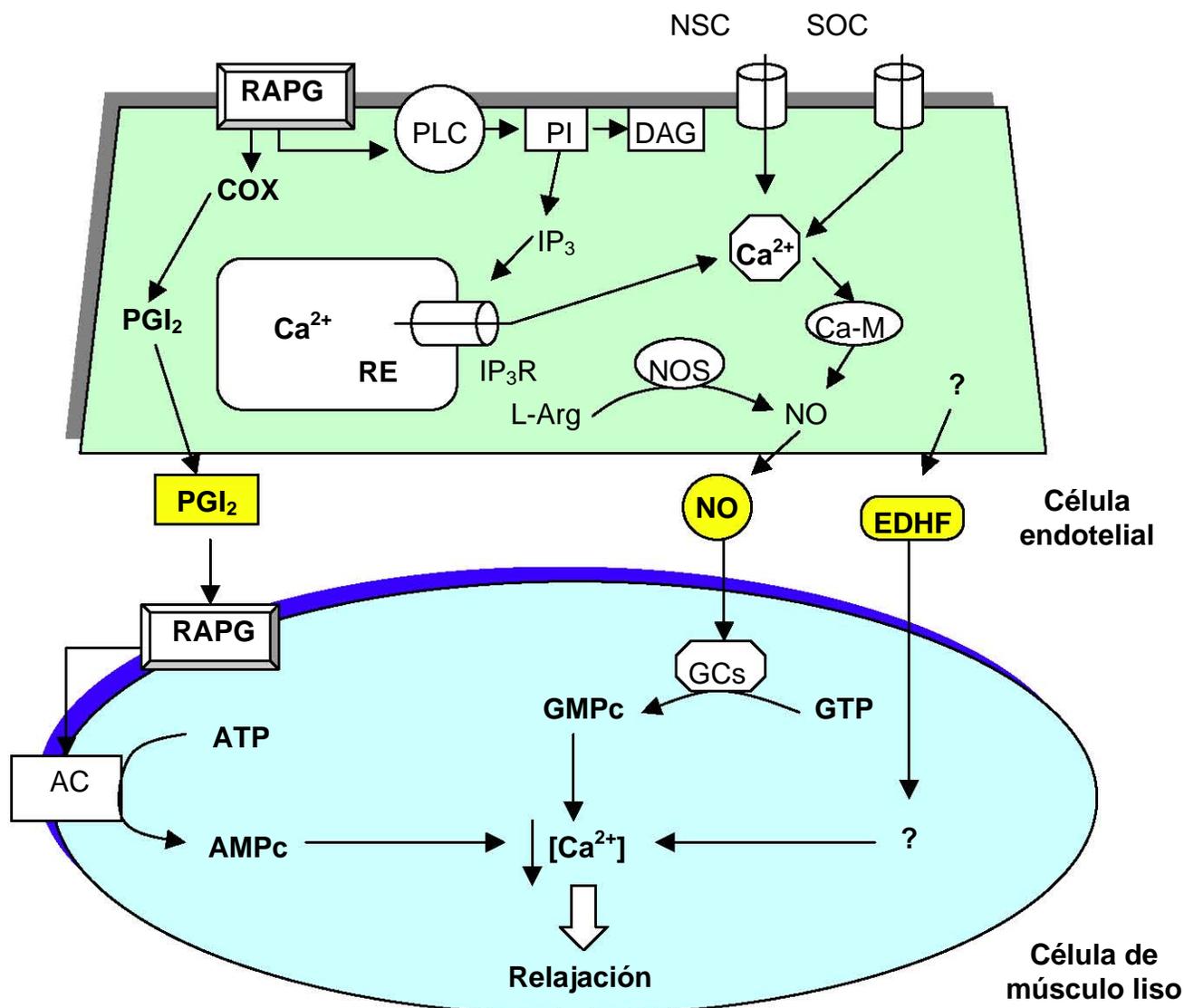
### **B. Factores vasodilatadores derivados del endotelio**

El óxido nítrico es un mensajero bioquímico que juega un papel importante en diversos procesos fisiológicos, tales como la neurotransmisión, la inhibición de la agregación de plaquetas, la respuesta inmune y la relajación del músculo liso (Murad, 1996). En las células de endotelio vascular, el óxido nítrico se produce por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) endotelial (Figura 5). Esta enzima cataliza la conversión del aminoácido L-arginina en óxido nítrico y L-citrulina (Griffith y Stuehr, 1995). La NOS endotelial incrementa su actividad en respuesta a la unión

con el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (Ca-M), de tal manera que un incremento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático induce un aumento en la producción de óxido nítrico. El óxido nítrico se difunde libremente a la célula de músculo liso e induce vasodilatación por activación de la enzima guanilato ciclasa soluble, que cataliza la conversión de GTP en GMPc (Stankevičius et al., 2003).

La prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) y la prostaglandina  $\text{E}_2$  son otras sustancias vasodilatadoras que se producen en las células de endotelio vascular. El efecto vasodilatador de estas sustancias se debe a su interacción con receptores específicos situados en la membrana de la célula de músculo liso vascular. Estos receptores están acoplados a proteínas G que activan a la adenilato ciclasa. Todas las prostaglandinas se sintetizan a partir del ácido araquidónico mediante la acción del complejo enzimático ciclooxigenasa- $\text{PGI}_2$  sintetasa. El ácido araquidónico es un ácido graso que se produce a partir de lípidos membranales por acción de la fosfolipasa  $\text{A}_2$ . Un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico moviliza a la fosfolipasa  $\text{A}_2$  desde el citosol hasta los fosfolípidos membranales. Algunas sustancias activan a la fosfolipasa  $\text{A}_2$  al interactuar con receptores acoplados a proteínas G (Coleman et al., 1994). Los receptores histaminérgicos  $\text{H}_1$  son un ejemplo de este tipo de receptores, cuya proteína G activa tanto a la fosfolipasa  $\text{A}_2$  como a la PLC (Göthert et al., 1995).

El factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) produce una acción relajante muy importante sobre las células de músculo liso vascular. A pesar de que hasta el momento no se conoce con certeza su identidad, se sabe que el EDHF induce relajación de las células de músculo liso por acción de concentraciones elevadas de acetilcolina y bradicinina (Stankevičius et al., 2003).



**Figura 5.** Representación esquemática que muestra los principales mecanismos de relajación muscular dependiente de endotelio vascular. Ver detalles en el texto. RAPG = receptores acoplados a proteínas G, COX = ciclooxigenasa, PGI<sub>2</sub> = prostaciclina, AC = adenilato ciclasa, PLC = fosfolipasa C, PI = fosfatidil inositol, DAG = diacilglicerol, IP<sub>3</sub> = inositol trifosfato, IP<sub>3</sub>R = receptores de inositol trifosfato, NSC = canales catiónicos no selectivos, SOC = canales operados por almacenamiento, Ca-M = complejo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina, NOS = óxido nítrico sintetasa, NO = óxido nítrico, GCs = guanilato ciclasa soluble, EDHF = factor hiperpolarizante derivado del endotelio. Modificado de Stankevičius et al., 2003.

### **C. Factores vasoconstrictores derivados del endotelio**

La endotelina-1 que se produce en las células de endotelio vascular es uno de los agentes vasoconstrictores más potentes. Su síntesis puede ser iniciada por efecto de la trombina, la interleucina-1, algunos factores liberados por trombocitos y la vasopresina. Se conocen solamente dos tipos de receptores para la endotelina-1:  $ET_A$  y  $ET_B$ , los cuales están acoplados a proteínas G. En la célula de músculo liso vascular, la endotelina-1 actúa sobre los receptores  $ET_A$ . Los mecanismos por medio de los cuales operan estos receptores bajo la estimulación con endotelina-1 aún no son claros, hasta el momento se sabe que activan a la PLC y a los canales de cationes no selectivos (Miwa et al., 1999). Por otro lado, los receptores  $ET_B$  presentes en las células de endotelio vascular inducen la producción de óxido nítrico (Liu et al., 2003).

Además de la endotelina, las células de endotelio vascular producen otros agentes vasoconstrictores. Bajo situaciones de hipoxia se induce vasoconstricción debido a un aumento de los radicales libres (tanto aniones  $O_2^-$  como hidroxilo). Estos radicales inducen de manera indirecta la vasoconstricción mediante la inactivación por oxidación del óxido nítrico (Shimizu et al., 1994). Las células de endotelio vascular producen también algunas prostaglandinas con efecto vasoconstrictor. Por ejemplo, la prostaglandina  $H_2$  y el tromboxano  $A_2$  se unen a sus respectivos receptores en las células de músculo liso vascular e inducen vasoconstricción mediante mecanismos que involucran a la PLC (Coleman et al., 1994).

### III. HIPÓTESIS

El extracto crudo de *Millepora complanata* contiene toxinas de naturaleza proteica capaces de modificar el tono del músculo liso arterial y hemolisinas.

## IV. OBJETIVOS

### General

Purificar las principales toxinas presentes en el extracto crudo de *M. complanata*, mediante métodos cromatográficos y caracterizar, de manera preliminar, sus mecanismos de acción.

### Particulares

1. Evaluar la actividad del extracto crudo de *M. complanata* sobre el tono del músculo liso arterial y caracterizar su mecanismo de acción de manera preliminar.
2. Evaluar la actividad hemolítica del extracto crudo de *M. complanata* con la finalidad de encontrar citolisinas.
3. Realizar un fraccionamiento biodirigido del extracto crudo de *M. complanata*, con el objeto de aislar las toxinas responsables de la actividad hemolítica y la actividad sobre el tono del músculo liso arterial.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Recolección del hidrocoral y preparación del extracto crudo

Se recolectaron fragmentos de *M. complanata* mediante inmersiones de buceo, a profundidades de 1 a 10 m, en arrecifes de coral situados a lo largo de las costas de Cancún y Cozumel, Quintana Roo, México. Los fragmentos recolectados se congelaron y almacenaron en hielo seco para ser transportados al laboratorio donde se preparó el extracto.

La descarga de los nematocistos del hidrocoral se indujo mediante agitación en agua desionizada (pH 7) durante 18 h a 4°C. El extracto resultante, se centrifugó a 3,000 rpm (2,060 x g) durante 15 min a 4°C y al sobrenadante obtenido se le determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976). Posteriormente, el sobrenadante se liofilizó y se almacenó a -20°C. Este sobrenadante se consideró como el extracto crudo.

### 5.2. Bioensayos

#### 5.2.1. Ensayo de aorta aislada de rata

Se emplearon ratas machos de la cepa Wistar con un peso comprendido entre 275 y 325 g, las cuales se anestesiaron con cloroformo y posteriormente se sacrificaron por decapitación. Se extrajo la aorta torácica descendiente y se colocó en una caja de Petri que contenía una solución oxigenada de Krebs-Henseleit, en baño de hielo, con la siguiente composición: 126.8 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM NaHCO<sub>3</sub> y 5 mM D-glucosa (pH 7.4). Inmediatamente después, se lavó el interior de la aorta con solución de Krebs-Henseleit para evitar coagulación intravascular. La aorta aislada se limpió cuidadosamente para eliminar los tejidos adiposo y conectivo y se cortaron segmentos de 4 a 5 mm de longitud. Los segmentos de aorta se montaron entre ganchos de acero inoxidable que se suspendieron en cámaras de tejido aislado de 7

ml que contenían solución de Krebs-Henseleit gasificada constantemente con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Los tejidos se estabilizaron durante 60 min bajo una tensión de 1.5 g a 37°C. Durante este período el medio del baño se cambió cada 15 min. Después del ajuste final a la tensión basal de 1.5 g, los segmentos de aorta se contrajeron con 100 mM KCl para sensibilizar el tejido. Una vez estable la contracción con el KCl, el medio del baño se cambió hasta recuperar la tensión basal de 1.5 g. Después de reestablecer la tensión basal, los tejidos se contrajeron con 1 µM fenilefrina, se registró el grado de contracción a los 15 min y se tomó este valor como estándar. Una vez registrada la contracción con fenilefrina, el medio del baño se lavó nuevamente para recuperar la tensión basal y entonces se agregó la sustancia a evaluar. Los cambios en la tensión isométrica se midieron con transductores de fuerza (Grass, Modelo FT03) acoplados a un polígrafo de cuatro canales de registro (Grass, Modelo 7D). El efecto vasoconstrictor se expresó como el porcentaje de la contracción inicial inducida por la fenilefrina.

#### **A. Caracterización preliminar del efecto vasoconstrictor del extracto**

Se realizaron experimentos, mediante el ensayo de aorta aislada de rata, para obtener información acerca del mecanismo por el cual el extracto crudo de *M. complanata* podría estar ejerciendo su efecto vasoconstrictor. Los experimentos con segmentos de aorta libres de endotelio se realizaron haciendo fluir previamente por el interior de la aorta 1 ml de solución salina con 0.2% de ácido desoxicólico para eliminar la capa de células endoteliales. La ausencia de endotelio se comprobó rutinariamente mediante la aplicación de 1 µM de acetilcolina. La obtención de una respuesta relajante menor al 5% sobre la contracción inducida por fenilefrina (1 µM) se consideró como ausencia de endotelio.

La influencia del calcio extracelular sobre el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto crudo de *M. complanata* se evaluó mediante dos tipos diferentes de experimentos. En el primer caso, se evaluó la susceptibilidad del efecto vasoconstrictor del extracto a dos bloqueadores de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L: nifedipina (1 µM) y verapamil (1 µM). En este caso, los segmentos de aorta se incubaron durante 5 min en presencia de los bloqueadores antes de

adicionar el extracto. En el segundo caso, se evaluó el efecto del extracto en un medio libre de calcio. La influencia del calcio intracelular sobre el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto crudo de *M. complanata*, se determinó mediante la evaluación de este efecto sobre segmentos de aorta tratados durante 5 min con cafeína (10 mM) y ryanodina (10  $\mu$ M).

### **5.2.2. Ensayo hemolítico**

El efecto hemolítico del extracto crudo de *M. complanata* y sus fracciones se evaluó de la siguiente manera: se lavaron eritrocitos de sangre fresca de rata (275 - 325 g) varias veces en una solución de Alsever (pH de 6 a 6.5; 120 mM D-glucosa, 30 mM citrato de sodio, 7 mM NaCl y 2 mM ácido cítrico). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ l de una suspensión de eritrocitos al 1% en solución amortiguadora de Alsever y la cantidad requerida de muestra a evaluar. Los tubos se llevaron a un volumen de 1 ml con solución de Alsever. Las muestras así preparadas se incubaron durante 30 min a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó a 2,500 rpm (1,430 x g) durante 4 min a 4°C y el resultado de la hemólisis se evaluó mediante la liberación de hemoglobina, haciendo lecturas en un espectrofotómetro (Lambda Bio, Perkin Elmer Co.) a una longitud de onda de 415 nm. El efecto hemolítico se expresó como el porcentaje de hemoglobina liberada comparado con la hemoglobina presente en la hemólisis total producida por la suspensión de las muestras de eritrocitos en agua desionizada en lugar de la solución de Alsever. Una unidad hemolítica media (UH<sub>50</sub>) se definió como la cantidad de proteína requerida para producir un 50% de hemólisis.

#### **A. Pruebas de inhibición del efecto hemolítico del extracto**

Las pruebas de inhibición de la hemólisis inducida por el extracto crudo de *M. complanata* se realizaron determinando la actividad hemolítica del extracto, a una concentración similar a la UH<sub>50</sub>, después de incubarlo en presencia de algunos agentes capaces de inhibir este tipo de actividad.

Se determinó la inhibición de la hemólisis inducida por el extracto en presencia de colesterol. Esta determinación se realizó después de incubar el extracto con el colesterol a concentraciones de 50 y 100 µg/ml en la solución de Alsever durante 30 min a 4°C. También, se determinó la inhibición del efecto hemolítico del extracto en presencia del compuesto bromuro de *p*-bromofenancilo (BPB), un inhibidor de fosfolipasa A<sub>2</sub>. Esta determinación se realizó después de incubar el extracto con el inhibidor a concentraciones de 0.3, 1.0 y 3.3 mM en la solución de Alsever durante 22 h a 4°C. Tanto el colesterol como el inhibidor de fosfolipasa A<sub>2</sub> se disolvieron en etanol, de manera que la concentración final de éste en la solución de Alsever fue de 5%, concentración a la cual el etanol no produce hemólisis. Además, se evaluó como control el efecto del extracto solo, bajo las mismas condiciones de incubación, en presencia de etanol a esa concentración.

### **B. Efecto hemolítico del extracto en presencia de cationes divalentes**

El efecto hemolítico inducido por el extracto crudo de *M. complanata* en presencia de Ca<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup> se determinó evaluando la actividad hemolítica de una concentración constante de extracto, similar a la UH<sub>50</sub>, en presencia de diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub> o de MgCl<sub>2</sub> (2.5, 5.0, 7.5 y 10 mM) en la solución de Alsever. De manera adicional, se evaluó como control la posible actividad hemolítica de estas concentraciones de CaCl<sub>2</sub> y de MgCl<sub>2</sub> en ausencia del extracto.

### **5.2.3. Cálculos y análisis estadísticos**

Los resultados fueron expresados como la media ± S.D. con *n* de 4 a 7 experimentos. Las comparaciones entre dos poblaciones se realizaron mediante un análisis *t* de *student* no pareado de dos colas. Las comparaciones entre las diferentes concentraciones de las curvas concentración-respuesta se realizaron mediante un análisis de varianza de dos vías seguidas (un valor de *p* < 0.05 fue tomado como indicador de significancia). Para calcular la CE<sub>50</sub> se realizó un ajuste no lineal mediante la ecuación de Boltzmann.

### 5.3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto crudo de *M. complanata*

El fraccionamiento inicial del extracto se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa. Utilizando un equipo Varian Prostar con una columna semipreparativa C<sub>4</sub> (YMC-Pack, 10 X 250 mm; 5 µm de diámetro de partícula; 300 Å de tamaño de poro) equipada con una precolumna C<sub>4</sub> (YMC-Pack, 10 X 4.6 mm; 5 µm de diámetro de partícula; 300 Å de tamaño de poro) y un filtro (Alltech; 28689; 4 m, 2 µm de tamaño de poro). El volumen de cada inyección fue de 5 ml a una concentración de 200 µg de proteína/ml. El flujo fue de 2.5 ml/min con un gradiente de 100 % de A a 100 % de B en 40 min, donde: (A) 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua y (B) 0.085% TFA en 90% de acetonitrilo. Se registró la absorción a 206 nm mediante un detector de UV/Vis. Se determinó la concentración de proteína de cada una de las fracciones obtenidas mediante el método de Bradford.

### 5.4. Electroforesis en gel

Se realizaron análisis electroforéticos en gel de poliacrilamina-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras, utilizando métodos convencionales previamente descritos (Schägger y Von-Jagow, 1987), para determinar la complejidad de las fracciones bioactivas del extracto de *M. complanata* y determinar el peso molecular de los principales componentes de las fracciones bioactivas. Se corrieron las muestras en cantidades de 0.3 a 0.4 µg de proteína en geles discontinuos de 10-16% a 90 V durante 3 h a 4°C, utilizando tris-glicina como amortiguador. Las bandas de proteína se observaron mediante una doble tinción de plata y Coomassie. Los pesos moleculares relativos se determinaron comparando las bandas con estándares de amplio espectro (Bio-Rad, catálogo # 161-0373) y estándares de polipéptidos (Bio-Rad, catálogo # 161-0326).

## 5.5. Materiales

La fenilefrina, la nifedipina, el verapamil, la cafeína, la ryanodina, la acetilcolina, el BPB y la ionomicina se obtuvieron de Sigma. Todas las sales y otros reactivos y solventes se obtuvieron de J.T. Baker o Sigma. Para el ensayo de aorta aislada de rata, la nifedipina y la ionomicina se prepararon inicialmente como una solución concentrada en dimetilsulfóxido (DMSO), posteriormente se diluyeron en agua desionizada. El DMSO se utilizó a una concentración no mayor a 0.2% en este bioensayo. Tanto la fenilefrina, la acetilcolina, el verapamil y la ryanodina se disolvieron en agua desionizada. La solución de Krebs-Henseleit libre de calcio se preparó sustituyendo el  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$  en presencia de 1.2 mM de EDTA. La solución de cafeína (10 mM) se realizó disolviendo la cantidad requerida de cafeína en solución de Krebs-Henseleit precalentada (37°C) antes de usarse. Los tejidos se trataron con cafeína mediante un cambio de la solución de Krebs-Henseleit. Para el ensayo hemolítico, el BPB y la ionomicina se disolvieron en etanol. La concentración de etanol utilizada en el ensayo hemolítico fue de 5% (v/v).

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Preparación del extracto crudo de *M. complanata*

Los fragmentos de *M. complanata* que se emplearon en la preparación del extracto crudo para este estudio fueron recolectados en mayo del 2003. Para la preparación del extracto crudo se utilizaron 4.912 kg (peso húmedo) del hidrocoral, mismos que se sometieron a agitación en 6 L de agua desionizada durante 18 h a 4°C. Con esto se obtuvieron 31 g de extracto crudo liofilizado, la determinación de proteínas totales mediante el método de Bradford indicó que cada gramo de extracto crudo equivale a 21.53 mg de proteína.

### 6.2. Bioensayos

#### 6.2.1. Efecto del extracto crudo de *M. complanata* sobre el tono del músculo liso arterial

Se evaluó el efecto del extracto crudo de *M. complanata* sobre segmentos de aorta de rata a concentraciones de 0.1, 0.316, 1, 3.16, 10, 31.6, 100 y 316 µg de proteína/ml. Se construyó la curva concentración-respuesta y se encontró que el extracto indujo una contracción sostenida, dependiente de la concentración, de los segmentos de aorta de rata. El efecto del extracto se comparó con el de otros compuestos vasoconstrictores: la cantidad de proteína, presente en el extracto de *M. complanata*, necesaria para inducir el 50 % de su efecto máximo ( $CE_{50} = 22.4 \pm 1.14$  µg de proteína/ml) fue similar a la  $CE_{50}$  de la ionomicina ( $CE_{50} = 22.2 \pm 1.2$  µg/ml) y fue aproximadamente 1,700 veces menor que la  $CE_{50}$  de la fenilefrina ( $CE_{50} = 0.0126 \pm 1.4$  µg/ml).

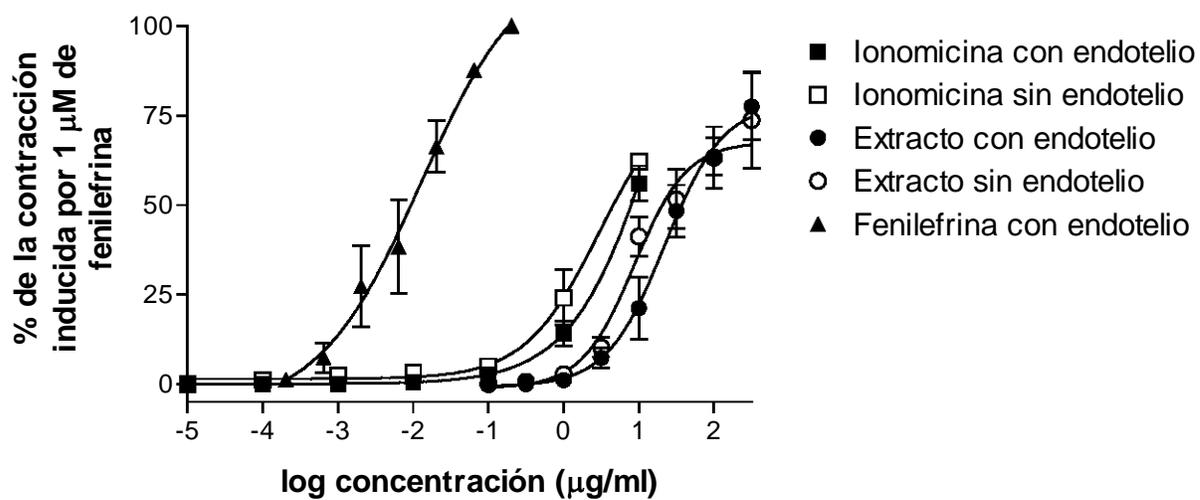
Al evaluar el extracto de *M. complanata* en segmentos de aorta libres de endotelio, se observó un ligero desplazamiento de la curva concentración-respuesta del extracto hacia la izquierda que no fue significativo ( $CE_{50} = 8.7 \pm 1.3$  µg/ml). Un comportamiento similar se observó en el caso de la ionomicina ( $CE_{50} = 3.0 \pm 1.7$

µg/ml). Estos resultados sugieren que los compuestos responsables del efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de *M. complanata* están actuando directamente sobre las células de músculo liso vascular. Las gráficas de estos resultados se muestran en la Figura 6. Todos los siguientes experimentos se realizaron sobre segmentos de aorta intactos.

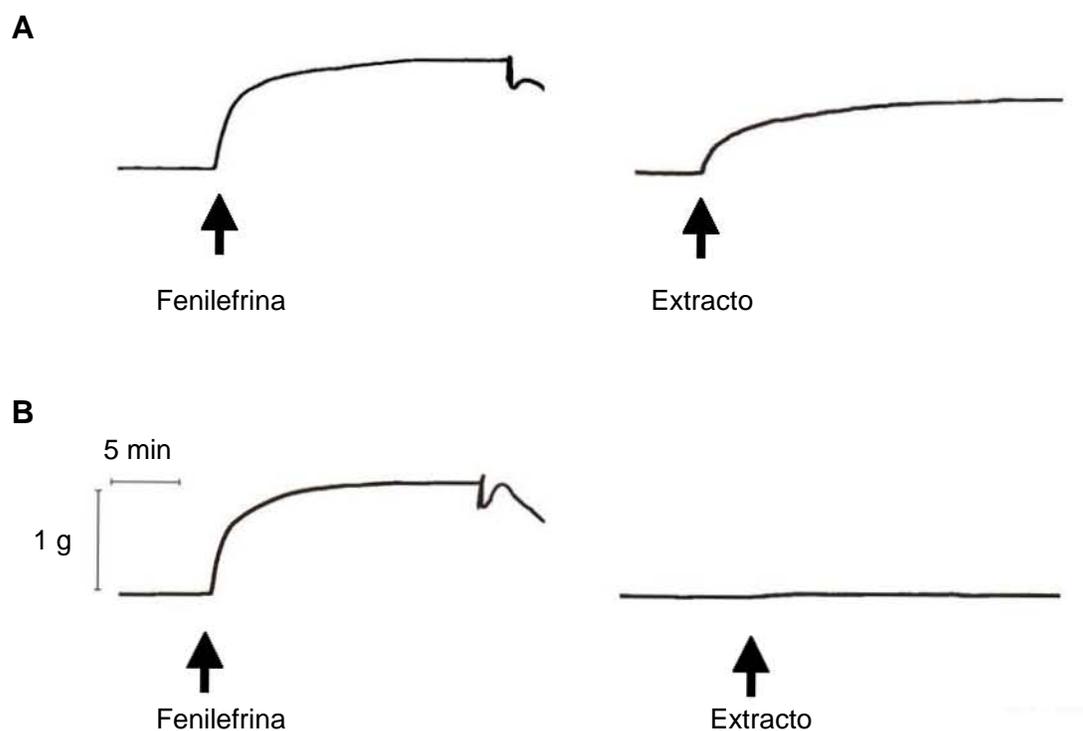
**Cuadro 1.** CE<sub>50</sub> calculada para el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto crudo de *M. complanata* y por la ionomicina sobre segmentos de aorta intactos y libres de endotelio. \*La concentración del extracto está expresada en µg de proteína/ml.

	CE <sub>50</sub> (µg/ml)	
	Con endotelio	Sin endotelio
<i>M. complanata</i> *	22.38 ± 1.14	8.76 ± 1.28
<b>Ionomicina</b>	22.18 ± 1.20	2.98 ± 1.71

Con la finalidad de obtener información sobre la naturaleza de las sustancias responsables del efecto del extracto sobre el tono del músculo liso arterial, se comparó el porcentaje de respuesta del extracto a una concentración de 31.6 µg de proteína/ml con la respuesta obtenida con la misma concentración de extracto después de incubarlo en un baño de agua a ebullición durante 20 min. Los resultados de este experimento indicaron que el efecto vasoconstrictor del extracto se elimina después de someterlo a ebullición (Figura 7), lo cual sugiere que los compuestos responsables de este efecto son de naturaleza proteica.



**Figura 6.** Curvas concentración-respuesta del efecto vasoconstrictor de la fenilefrina, la ionomicina y el extracto crudo de *M. complanata*. Los símbolos blancos indican la ausencia del endotelio para la ionomicina y el extracto.



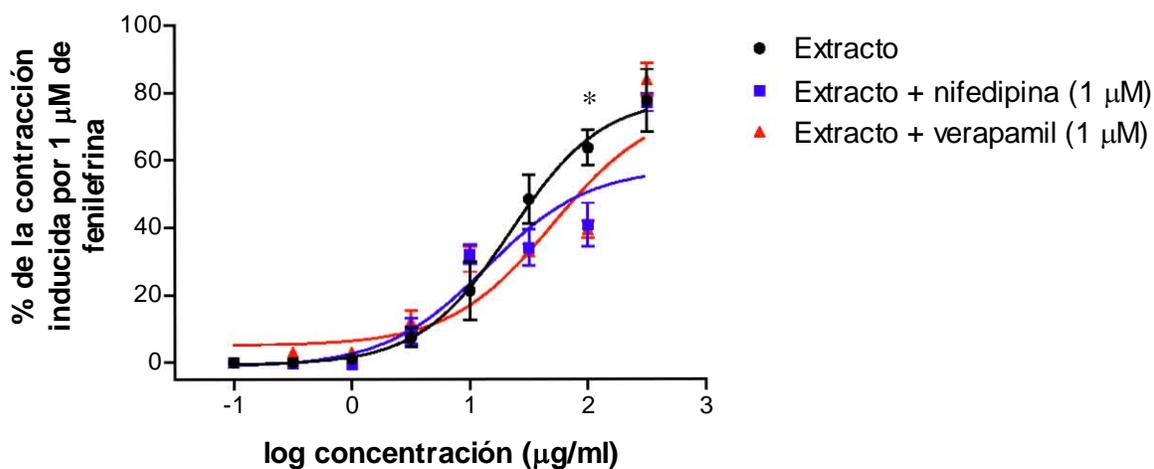
**Figura 7.** Efecto del extracto de *M. complanata* sobre el tono vascular, a una concentración de 31.6  $\mu\text{g}$  de proteína/ml. A. Efecto del extracto intacto comparado con el efecto de la fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) sobre el mismo tejido. B. Efecto del extracto sometido a ebullición comparado con el efecto de la fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) sobre el mismo tejido.

### **A. Caracterización preliminar del efecto vasoconstrictor inducido por el extracto crudo de *M. complanata***

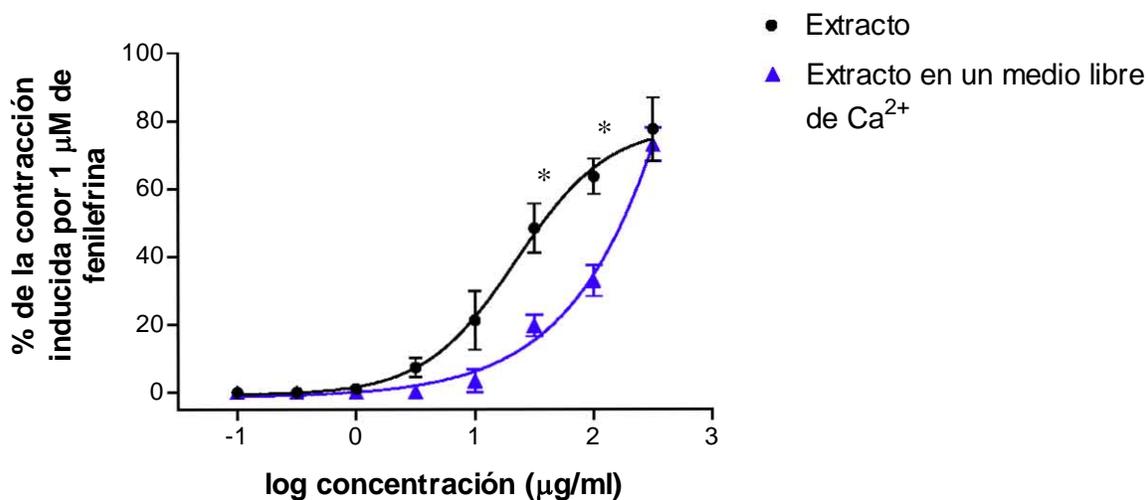
Con la finalidad de conocer si el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto depende del calcio extracelular, se realizaron experimentos en los que se incubaron los tejidos durante 5 min con nifedipina (1  $\mu$ M) o verapamil (1  $\mu$ M), bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L, antes de agregar el extracto crudo de *M. complanata*. En estos experimentos no se observó ninguna disminución significativa en el efecto vasoconstrictor del extracto, excepto a la concentración de 100  $\mu$ g de proteína/ml, en la que sí fue observada una disminución significativa del efecto vasoconstrictor (Figura 8 A). Cuando se evaluó el efecto del extracto de *M. complanata* en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular la curva concentración-respuesta del extracto se desplazó hacia la derecha, presentando una disminución significativa de la respuesta a las concentraciones de 31.6 y 100  $\mu$ g de proteína/ml (Figura 8 B). Estos resultados indican que el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de *M. complanata* no depende exclusivamente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Para determinar la contribución de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes intracelulares sensibles a ryanodina sobre el efecto vasoconstrictor producido por *M. complanata*, se realizó un experimento en el que se bloqueó la función de liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico siguiendo el método empleado por Rohra et al. (2003). De acuerdo con el método empleado por estos investigadores, se evaluó el efecto del extracto de *M. complanata* sobre segmentos de aorta previamente incubados durante 5 min con ryanodina (10  $\mu$ M) y cafeína (10 mM). En este experimento se observó una disminución significativa del efecto vasoconstrictor del extracto de *M. complanata* a las concentraciones de 31.6, 100 y 316  $\mu$ g de proteína/ml (Figura 9), lo cual indicó que el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de *M. complanata* involucra tanto la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a la célula como la liberación de este ión de los almacenes intracelulares.

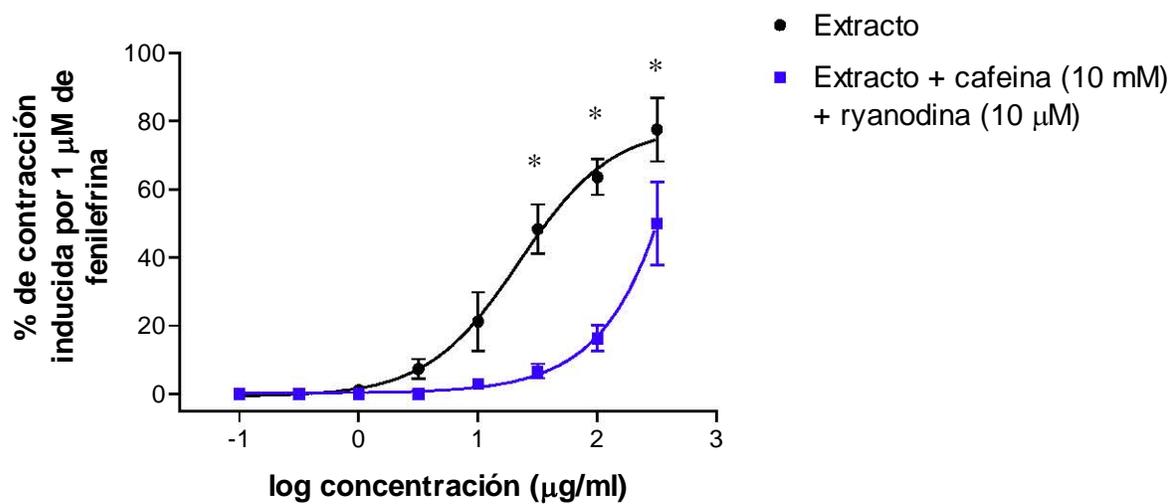
A



B



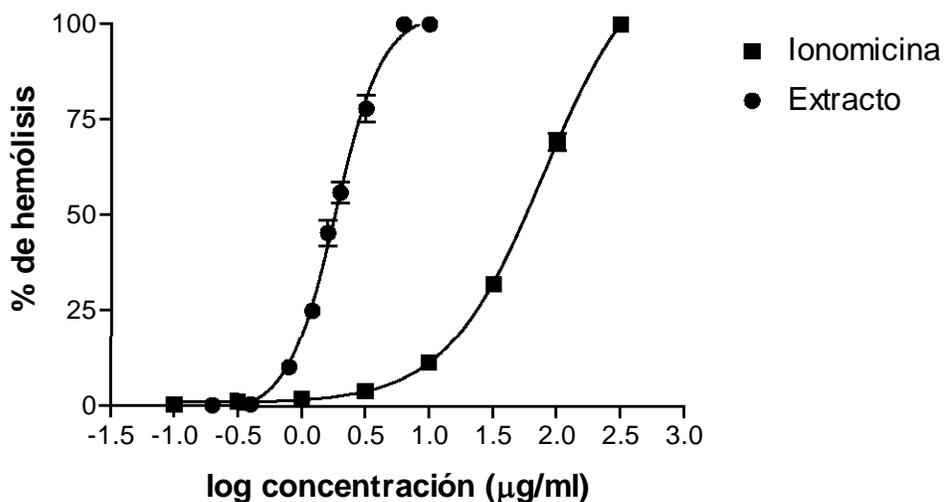
**Figura 8.** Curvas concentración-respuesta del efecto vasoconstrictor del extracto crudo de *M. complanata* en presencia de bloqueadores de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje tipo L y en un medio libre de calcio. A. Efecto del extracto en presencia de nifedipina y de verapamil. B. Efecto del extracto en medio libre de Ca<sup>2+</sup>. \*Presentaron diferencias significativas a esa concentración mediante un análisis de varianza de dos vías ( $p < 0.05$ ).



**Figura 9.** Curva concentración-respuesta del efecto vasoconstrictor del extracto crudo de *M. complanata* en presencia de cafeína (10 mM) y ryanodina (10 μM). \*Presentaron diferencias significativas a esa concentración mediante un análisis de varianza de dos vías ( $p < 0.05$ ).

### 6.2.2. Efecto hemolítico del extracto crudo de *M. complanata*

Se evaluó el efecto hemolítico del extracto crudo de *M. complanata* sobre eritrocitos de rata a concentraciones de 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 3.2, 6.4 y 10  $\mu\text{g}$  de proteína/ml. Se construyó la curva concentración-respuesta y se encontró que el extracto indujo un efecto hemolítico dependiente de la concentración. El extracto presentó un 100% de hemólisis a la concentración de 6.4  $\mu\text{g}$  de proteína/ml. El efecto hemolítico del extracto se comparó con el efecto hemolítico de la ionomicina y se encontró que el extracto crudo de *M. complanata* es aproximadamente 47 veces más potente que la ionomicina. La  $UH_{50}$  del extracto fue de  $1.64 \pm 1.04$   $\mu\text{g}$  de proteína/ml, mientras que la  $UH_{50}$  de la ionomicina fue de  $77.8 \pm 1.03$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Figura 10). Además, la incubación del extracto crudo de *M. complanata* en un baño de agua a ebullición durante 20 min inhibió completamente la actividad hemolítica del extracto. Esto sugiere que los compuestos responsables del efecto hemolítico inducido por el extracto de *M. complanata* también son de naturaleza proteica.

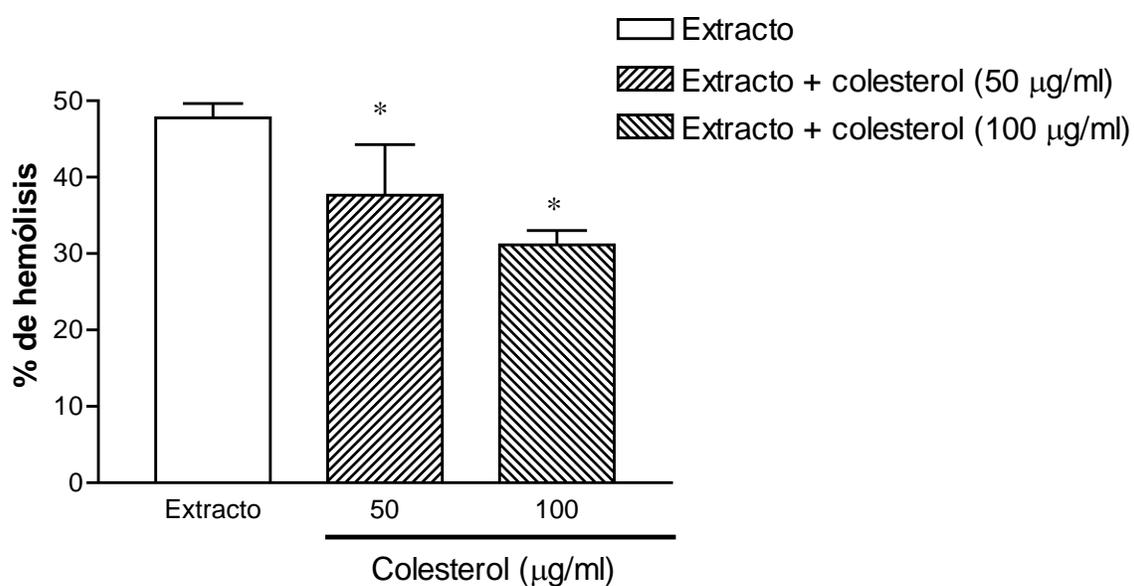


**Figura 10.** Curva concentración-respuesta que muestra el efecto hemolítico del extracto crudo de *M. complanata* sobre eritrocitos de rata.

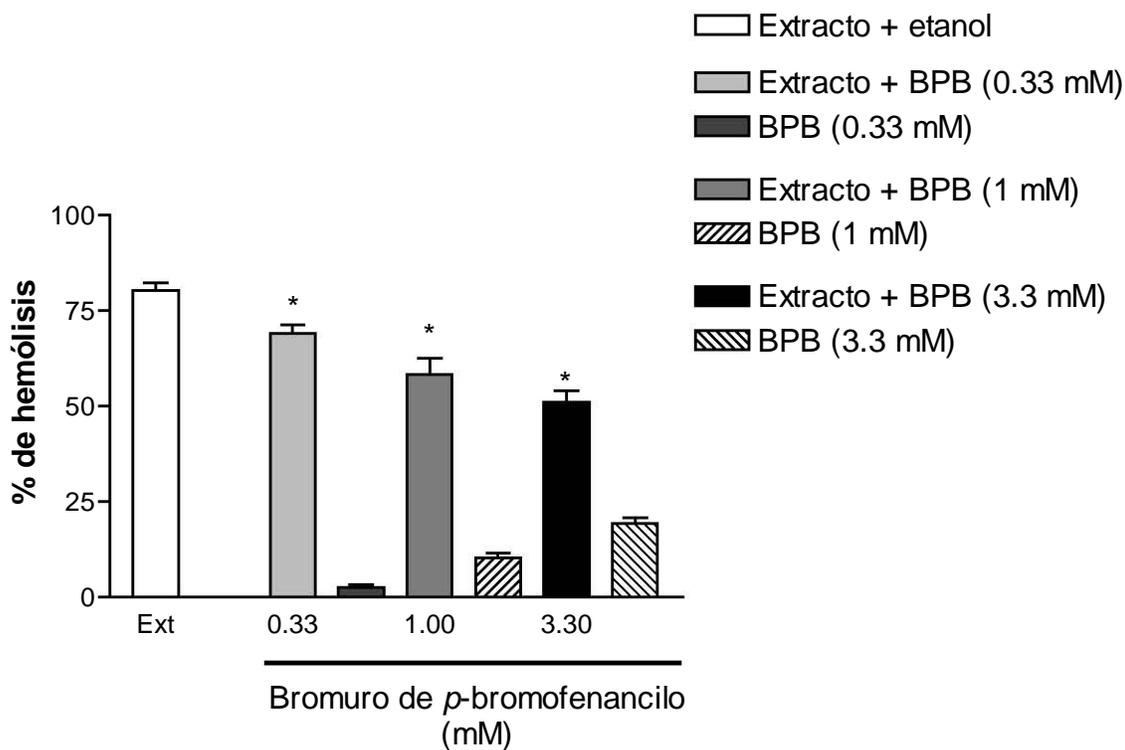
### **A. Pruebas de Inhibición del efecto hemolítico del extracto**

Considerando que la actividad hemolítica de los extractos de otras especies del género *Millepora* disminuye significativamente en presencia de lípidos membranales, principalmente el colesterol (Radwan, 2002), se evaluó el efecto hemolítico del extracto de *M. complanata* a una concentración de 1.8 µg de proteína/ml, después de incubarlo durante 30 min a 4°C en presencia de colesterol. Los resultados de este experimento indicaron que la actividad hemolítica del extracto disminuyó alrededor de un 22%, cuando se incubó en presencia de colesterol a una concentración de 50 µg/ml, mientras que después de incubarlo a una concentración de 100 µg/ml el efecto hemolítico del extracto se redujo alrededor de un 35% (Figura 11). El colesterol por sí solo, a estas concentraciones, no presentó actividad hemolítica.

Para determinar si el efecto hemolítico del extracto es producido por una enzima con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> presente en el extracto de *M. complanata*, se evaluó el efecto hemolítico del extracto, a una concentración de 1.8 µg de proteína/ml, después de incubarlo durante 22 h a 4°C en presencia de BPB, un inhibidor de fosfolipasas A<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos con este experimento indicaron que la actividad hemolítica del extracto disminuyó significativamente, después de incubarlo en presencia de BPB, a concentraciones de 0.33, 1.0 y 3.3 mM (Figura 12). Es importante mencionar que el BPB a la concentración de 3.3 mM no se disolvió completamente, ya que una fracción del BPB se precipitó en la solución de Alsever al ser agregado disuelto en los 50 µl de etanol. Estos resultados sugieren que las hemolisinas presentes en el extracto de *M. complanata* pudieran ser enzimas con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>, similares a las hemolisinas producidas por otros hidrocorales.



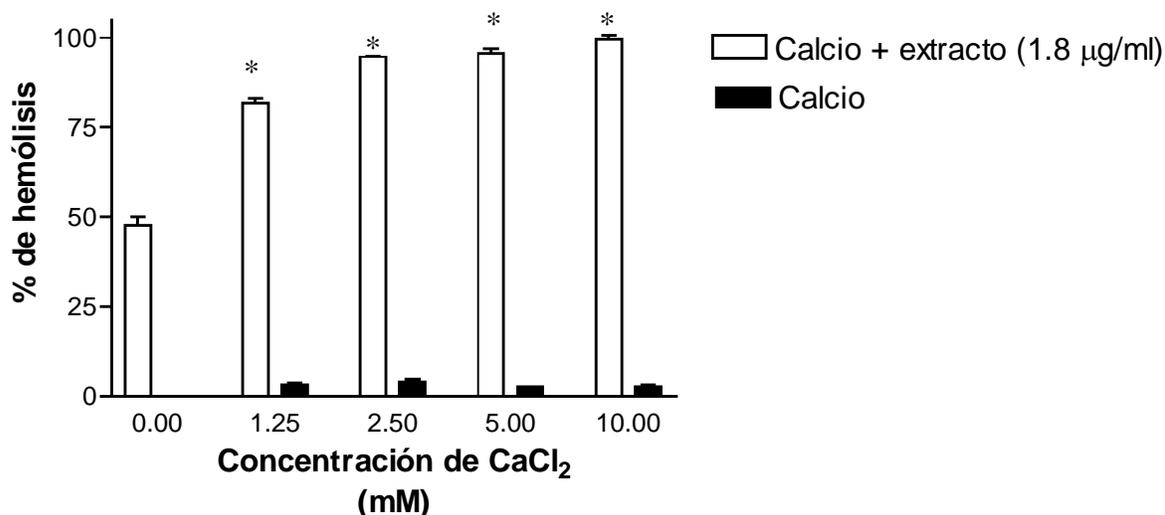
**Figura 11.** Actividad hemolítica del extracto crudo de *M. complanata* a una concentración de 1.8 µg de proteína/ml, después de someterlo a incubación con coolesterol por 30 min a 4°C. \*Presentaron diferencias significativas al compararlo con el extracto solo (p < 0.05).



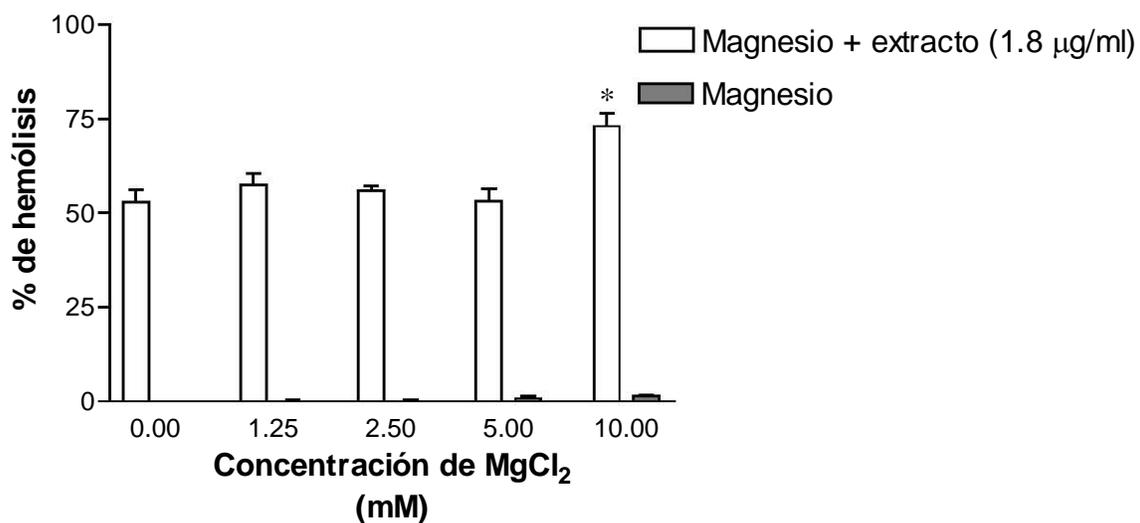
**Figura 12.** Efecto del bromuro de *p*-bromofenancilo, un inhibidor de fosfolipasa  $A_2$ , sobre la actividad hemolítica del extracto crudo de *M. complanata* a una concentración de 1.8  $\mu\text{g/ml}$ . El extracto se incubó a 4°C durante 22 h antes de realizar el ensayo hemolítico. \*Presentaron diferencias significativas al compararlo con el efecto del extracto con etanol ( $p < 0.05$ ).

### B. Efecto hemolítico del extracto en presencia de cationes divalentes

Al evaluar el efecto hemolítico del extracto crudo de *M. complanata*, a una concentración de 1.8  $\mu\text{g}$  de proteína/ml, en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ , se observó un aumento significativo de la actividad hemolítica del extracto en todas las concentraciones (Figura 13). Por otra parte, al evaluar el efecto hemolítico del extracto en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  se observó un aumento significativo sólo a la concentración de 10 mM (Figura 14). Estos resultados indican que en el extracto de *M. complanata* se encuentran presentes hemolisinas, posiblemente proteínas con actividad de fosfolipasa  $A_2$ , que requieren de cationes divalentes para presentar su actividad óptima.



**Figura 13.** Actividad hemolítica del extracto crudo de *M. complanata* a una concentración de 1.8  $\mu\text{g}$  de proteína/ml, en presencia de  $\text{CaCl}_2$ . Las barras negras indican el efecto del  $\text{CaCl}_2$  sobre los eritrocitos en ausencia del extracto. \*Presentaron diferencias significativas al compararlo con el extracto en ausencia de calcio ( $p < 0.05$ ).



**Figura 14.** Actividad hemolítica del extracto crudo de *M. complanata* a una concentración de 1.8 µg de proteína/ml, en presencia de MgCl<sub>2</sub>. Las barras grises indican el efecto del MgCl<sub>2</sub> sobre los eritrocitos en ausencia del extracto. \*Presentaron diferencias significativas al compararlo con el extracto en ausencia de magnesio (p <0.05).

### 6.3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto crudo de *M. complanata*

A partir del fraccionamiento primario del extracto de *M. complanata*, mediante cromatografía en fase reversa, se obtuvieron 19 fracciones (F1-F19). El perfil cromatográfico se muestra en la Figura 15; los tiempos de retención en los que se recolectó cada fracción se muestran en el Cuadro 2.

La determinación del efecto hemolítico de cada una de estas fracciones (0.2 µg/ml), excepto las fracciones 6 y 9 cuyos rendimientos fueron muy bajos, mostró que solamente la fracción 4 presentaba un alto porcentaje de actividad hemolítica sobre los eritrocitos de rata (Figura 16). De manera adicional, la determinación de la actividad vasoconstrictora de las 19 fracciones (0.0286 µg/ml) sobre segmentos de aorta aislados de rata, indicó que las fracciones 6, 8, 9 y 11 (F6, F8, F9 y F11) presentaron un efecto vasoconstrictor importante (Figura 16). La actividad vasoconstrictora de las fracciones presentes en mayor cantidad fue evaluada a concentraciones mayores (Cuadro 3). F6, F8 y F9 indujeron una contracción transitoria en los segmentos de aorta de rata, mientras que F11 presentó una contracción permanente (Figura 17). Estos resultados sugieren que los compuestos responsables de la actividad hemolítica del extracto de *M. complanata* son diferentes a los compuestos responsables del efecto vasoconstrictor del mismo extracto.



**Cuadro 2.** Tiempos de retención, cantidad de proteína\* y efecto hemolítico que presentan las fracciones cromatográficas obtenidas del extracto crudo de *M. complanta*.

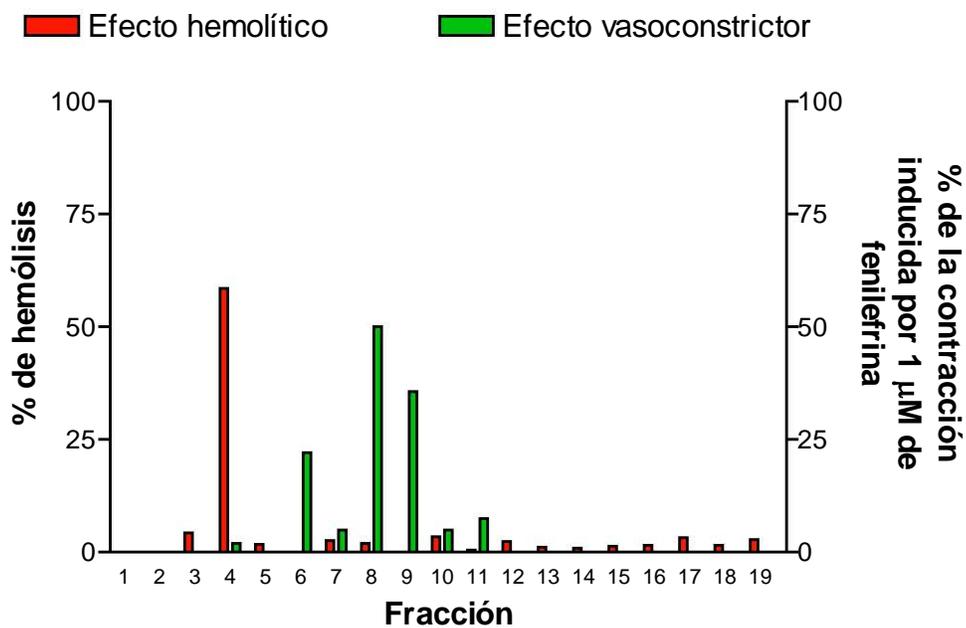
<b>Fracción</b>	<b>Tiempos de retención (min)</b>	<b>Cantidad de proteína (µg)</b>	<b>% de hemólisis (0.2 µg/ml)</b>
<b>F1</b>	5.63 – 7.04	0.00	0.00
<b>F2</b>	7.05 – 8.16	0.00	0.00
<b>F3</b>	8.17 – 8.70	3.14	4.42
<b>F4</b>	9.75 – 10.86	0.78	58.49
<b>F5</b>	10.87 – 12.28	2.52	1.83
<b>F6</b>	12.29 – 13.00	0.46	-
<b>F7</b>	13.01 – 13.78	0.91	2.62
<b>F8</b>	13.79 – 15.08	4.12	2.05
<b>F9</b>	15.09 – 16.60	0.58	-
<b>F10</b>	16.61 – 17.99	1.46	3.43
<b>F11</b>	18.00 – 19.77	4.15	0.51
<b>F12</b>	20.58 – 21.81	3.60	2.45
<b>F13</b>	24.41 – 26.42	8.25	1.16
<b>F14</b>	26.43 – 27.92	2.63	0.95
<b>F15</b>	29.48 – 30.01	5.97	1.43
<b>F16</b>	30.67 – 31.68	7.16	1.60
<b>F17</b>	32.40 – 34.55	99.36	3.20
<b>F18</b>	35.00 – 35.46	37.65	1.63
<b>F19</b>	37.50 – 38.73	69.44	2.85
<b>Resto</b>	39.00 – 65.00	6324.67	0.00
<b>TOTAL</b>		6576.85	

\* La cantidad inicial de proteína contenida en el extracto crudo fue de 8849 µg.

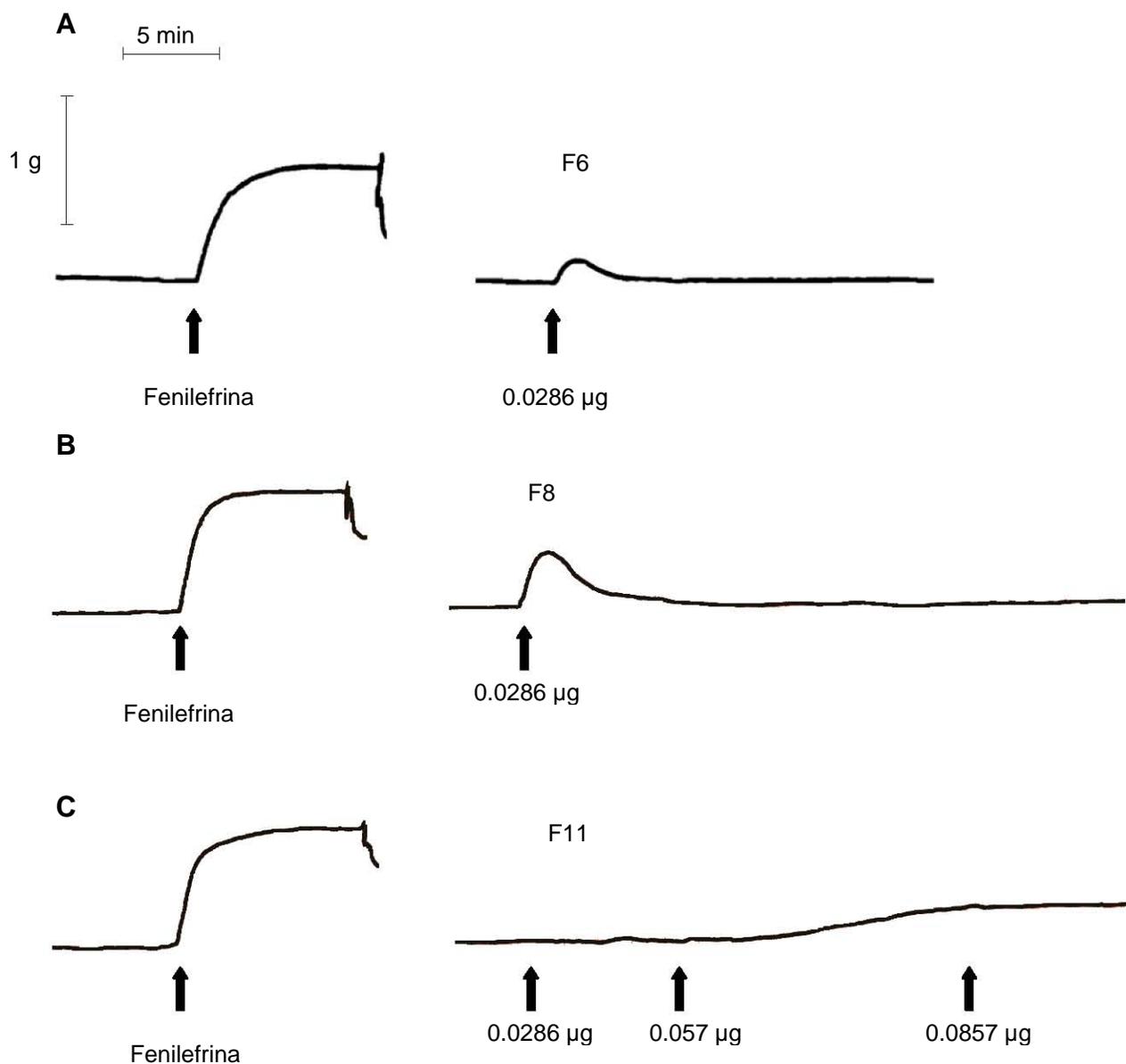
**Cuadro 3.** Efecto contráctil\* inducido por las fracciones cromatográficas obtenidas del extrato crudo de *M. complanata* sobre segmentos de aorta aislados de rata.

Fracción	Concentración (µg/ml)					
	0.0286	0.0571	0.0857	0.1141	0.1428	0.7714
<b>F1</b>	0%	-				
<b>F2</b>	0%					
<b>F3</b>	0%	0%	0%	-	-	-
<b>F4</b>	2%	-	-	-	-	-
<b>F5</b>	0%	0%	0%	-	-	-
<b>F6</b>	22.2%	-	-	-	-	-
<b>F7</b>	5%	6%	-	-	-	-
<b>F8</b>	50%	-	-	-	-	-
<b>F9</b>	35.7%	-	-	-	-	-
<b>F10</b>	5%	6%	6%	-	-	-
<b>F11</b>	7.6%	30.8%	30.1%	-	-	-
<b>F12</b>	0%	0%	0%	-	-	-
<b>F13</b>	0%	0%	0%	0%	0%	-
<b>F14</b>	0%	0%	0%	-	-	-
<b>F15</b>	0%	0%	8.3%	8.3%	-	-
<b>F16</b>	0%	0%	0%	0%	-	-
<b>F17</b>	0%	0%	-	-	-	0%
<b>F18</b>	0%	0%	0%	0%	-	-
<b>F19</b>	0%	0%	-	-	-	0%
<b>Resto</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%

\* El efecto contráctil está expresado como el porcentaje de la contracción inducida por 1 µM de fenilefrina.



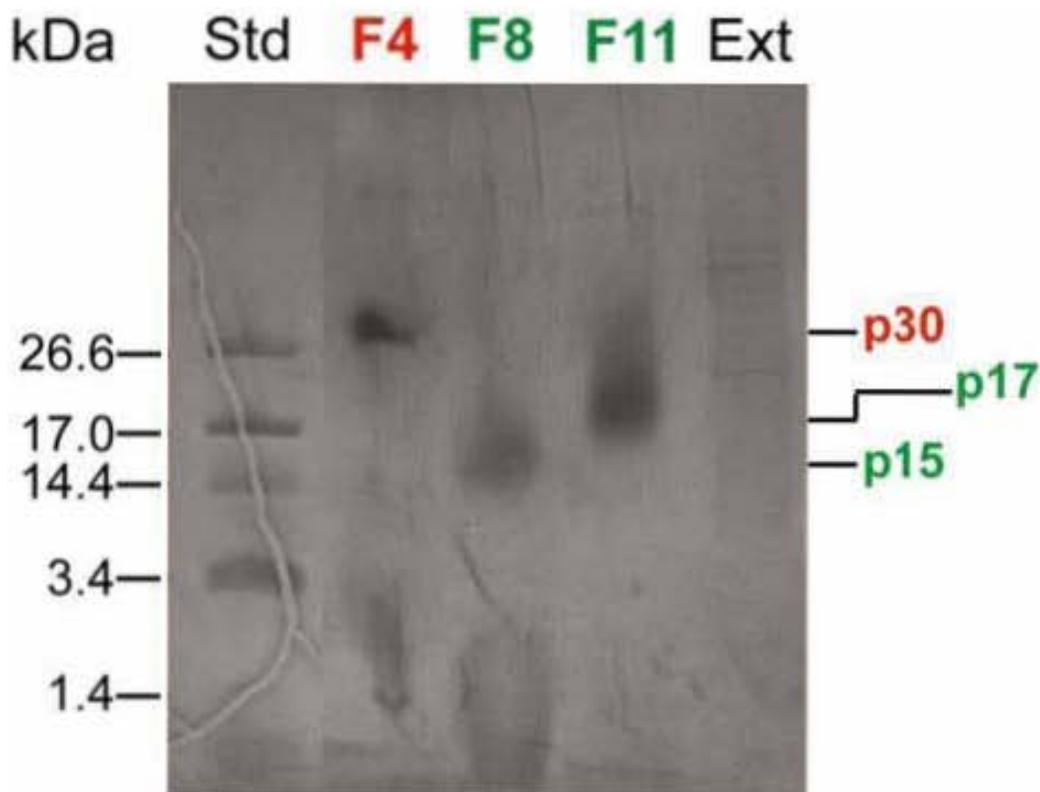
**Figura 16.** Efecto hemolítico (0.2 µg/ml) y vasoconstrictor (0.0286 µg/ml) de las fracciones del extracto crudo de *M. complanata*. Debido al bajo rendimiento de las fracciones 6 y 9 no fue posible determinar su actividad hemolítica.



**Figura 17.** Efecto de F6, F8 y F11 sobre el tono vascular. A. Efecto de F6 a una concentración de 0.0286  $\mu\text{g}$  de proteína/ml, comparado con el efecto de la fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) sobre el mismo tejido. B. Efecto de F8 a una concentración de 0.0286  $\mu\text{g}$  de proteína/ml, comparado con el efecto de la fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) sobre el mismo tejido. C. Efecto de F11 a concentraciones acumulativas de 0.0286, 0.057 y 0.0857  $\mu\text{g}$  de proteína/ml, comparado con el efecto de la fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) sobre el mismo tejido.

#### 6.4. Electroforesis en gel

La separación de F4, F8 y F11, a concentraciones de 0.3 a 0.4  $\mu\text{g}$  de proteína, por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostró que en la fracción hemolítica F4 se encuentra una banda mayoritaria de aproximadamente 30 kDa. Además, la SDS-PAGE de las fracciones vasoconstrictoras F8 y F11 indicó la presencia de una banda mayoritaria de alrededor de 15 kDa en F8 y de una banda mayoritaria de aproximadamente 17 kDa en F11 (Figura 18). En el caso de F6 y F9, no se realizó el análisis por electroforesis debido a su escaso rendimiento.



**Figura 18.** Electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto crudo de *M. complanata* (Ext), F4, F8 y F11. Las bandas se observaron con doble tinción:  $\text{AgNO}_3$  y azul de Coomassie.

## VII. DISCUSIÓN

Los hidrocerales del género *Millepora* son ampliamente conocidos por su capacidad de producir quemaduras en la piel de humanos que entran en contacto con ellos. En estudios previos dirigidos al aislamiento y purificación de los componentes tóxicos de estos organismos, se ha reportado que sus extractos son letales en ratones y que además, presentan actividad hemolítica y dermonecrotica. En esos estudios se sugirió que posiblemente una sola hemolisina era la encargada de inducir estos efectos, ya que éstos se concentraban en una fracción proteica al momento de su purificación mediante métodos cromatográficos (Middlebrook et al., 1971; Wittle et al., 1971; Wittle et al., 1974; Radwan, 2002). En un estudio posterior se reportó la presencia de una proteína de 32.5 kDa con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> en un extracto de *M. platyphylla*. Esta proteína, que se denominó Milleporina-1, mostró una contribución significativa al efecto hemolítico inducido por el extracto total (Radwan y Aboul-Dahab, 2004). También se reportó que el extracto crudo de *M. complanata* contiene proteínas que estimulan la contractilidad del músculo liso de íleon aislado de cobayo (Rojas et al., 2002). Los estudios que hasta el momento se han realizado sobre organismos del género *Millepora* sugieren que estos organismos tienen la capacidad de producir hemolisinas y compuestos bioactivos que actúan sobre células de músculo liso. Considerando estas evidencias, se planteó el presente estudio que tuvo como finalidad obtener los principales componentes tóxicos del extracto crudo de *M. complanata*. En primer término, se evaluó el efecto hemolítico de este extracto y su actividad sobre el tono del músculo liso arterial y en segundo término, se realizó la purificación de las toxinas responsables de los efectos observados.

En este estudio, se encontró que el extracto crudo de *M. complanata* indujo una contracción sostenida, dependiente de la concentración, sobre segmentos de aorta aislados de rata. Considerando que gran parte de las toxinas que se han encontrado en organismos pertenecientes a las diferentes clases del phylum Cnidaria son proteínas termolábiles, cuya actividad biológica no resiste temperaturas arriba de 60°C (Grotendorst y Hessinger, 2000; Oliveira et al., 2004), se decidió realizar un

experimento para comprobar si los compuestos responsables del efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de *M. complanata* son de naturaleza proteica. En este experimento, se incubó el extracto en un baño de agua a ebullición para inducir la desnaturalización de su contenido proteico. Una vez incubado el extracto, se evaluó su actividad sobre el tono del músculo liso arterial. De esta manera, se observó que el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto se pierde después de someterlo a este tratamiento. Estos resultados apoyan la idea de que los compuestos responsables del efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de *M. complanata* son de naturaleza proteica.

Al evaluar el efecto vasoconstrictor del extracto de *M. complanata* sobre segmentos de aorta libres de endotelio se observó que la curva concentración-respuesta del extracto no se modificó de manera significativa. Esto indicó que el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de *M. complanata* se debe principalmente a un efecto directo de las toxinas sobre las células de músculo liso vascular. El ligero desplazamiento de la curva puede deberse a la eliminación del endotelio, el cual libera constantemente una cantidad basal de factores que regulan el tono del músculo liso vascular. Este ligero desplazamiento pudiera ser causado también por algún efecto menor de las toxinas presentes en el extracto sobre células endoteliales. Una vez que se observó que el efecto vasoconstrictor del extracto de *M. complanata* se debe a una acción directa sobre las células musculares, se realizaron algunos experimentos para obtener información acerca de su mecanismo de acción.

Se sabe que un incremento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es indispensable para desencadenar el proceso de contracción muscular (Williams y Fay, 1986). Este incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede deberse al influjo del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática, principalmente mediante los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L (Mironneau y Macrez-Leprêtre, 1995) o a la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (Tognarini y Moulds, 1997; Long et al., 2000). En un estudio previo, realizado sobre *M. complanata*, se sometió el extracto crudo de este hidrocoral a un fraccionamiento mediante cromatografía de exclusión. De esta manera se obtuvieron 12 fracciones, de las cuales sólo dos incrementaban la contractilidad del íleon aislado de cobayo. Al evaluar el efecto

sobre el íleon de estas dos fracciones en presencia de la nifedipina, un bloqueador específico de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L, se observó una disminución significativa de sus efectos (Rojas et al., 2002). Tomando en cuenta esos resultados, en el presente estudio se realizaron algunos experimentos para comprobar si el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto dependía de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de este tipo de canales.

En la evaluación del efecto del extracto crudo de *M. complanata* sobre segmentos de aorta previamente incubados con nifedipina (1  $\mu\text{M}$ ), no se observó una inhibición del efecto contráctil del extracto, excepto a la concentración 100  $\mu\text{g}$  de proteína/ml. Resultados similares se obtuvieron en presencia de verapamil, otro bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L. Los resultados de estos experimentos sugieren que el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de *M. complanata* no es estrictamente dependiente de la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L.

Estos resultados no descartan la posibilidad de que el extracto de *M. complanata* esté ejerciendo su efecto vasoconstrictor de una manera dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, ya que el  $\text{Ca}^{2+}$  puede entrar a la célula a través de otros canales, como por ejemplo los canales catiónicos no selectivos (Minowa et al., 1997). Para evaluar esta posibilidad, se determinó el efecto vasoconstrictor del extracto en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Los resultados de este experimento mostraron un desplazamiento significativo de la curva concentración-respuesta del extracto hacia la derecha sin disminución del efecto máximo, lo cual sugirió que el efecto vasoconstrictor del extracto de *M. complanata* involucra tanto la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, como la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes intracelulares.

La liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes intracelulares se lleva a cabo a través de dos mecanismos principales: la activación del receptor de  $\text{IP}_3$  y del receptor de ryanodina. Como se ha reportado en varios estudios, una manera de eliminar la capacidad del retículo sarcoplásmico sensible a ryanodina de almacenar  $\text{Ca}^{2+}$  es sometiendo los tejidos a un tratamiento simultáneo con cafeína y ryanodina. De esta manera, los receptores de ryanodina permanecen abiertos y el retículo pierde su capacidad de almacenar  $\text{Ca}^{2+}$  (Rohra et al., 2003). En este trabajo, al evaluar el

efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de *M. complanata* sobre segmentos de aorta sometidos a este tratamiento, se observó un desplazamiento significativo de la curva concentración-respuesta del extracto hacia la derecha. Estos resultados sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  que se libera de los almacenes intracelulares sensibles a ryanodina participa de manera importante en el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto. Existen evidencias que sugieren la presencia de dos tipos diferentes de almacenes de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico de las células de músculo liso vascular: un retículo sarcoplásmico que contiene receptores de ryanodina y de  $\text{IP}_3$ , denominado  $\text{S}_\alpha$ ; y un retículo sarcoplásmico que contiene solamente receptores de ryanodina, denominado  $\text{S}_\gamma$  (Rohra et al., 2003). Por lo tanto, también existe la posibilidad de que el extracto de *M. complanata* induce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un mecanismo que involucra a los receptores de  $\text{IP}_3$ .

Mediante el fraccionamiento cromatográfico del extracto crudo de *M. complanata* se obtuvieron 19 fracciones, de las cuales solamente F6, F8, F9 y F11 presentaron un efecto vasoconstrictor importante; F8 presentó el mayor efecto vasoconstrictor, seguida de F9. El efecto vasoconstrictor que presentaron estas dos fracciones pudiera deberse a un mismo compuesto, debido a la proximidad de los picos en el cromatograma. F6, F8 y F9 indujeron una contracción transitoria en la aorta de rata, mientras que F11 indujo una contracción sostenida. Existen evidencias de que una contracción sostenida en el músculo liso vascular está asociada a un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, mientras una contracción transitoria generalmente se asocia a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes intracelulares (Rohra et al., 2003). Estas observaciones y el análisis electroforético de algunas de las fracciones, sugieren que en el extracto de *M. complanata* se encuentran presentes al menos dos proteínas que inducen una vasoconstricción que probablemente depende de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular: una proteína presente en F6 (datos no mostrados) y una proteína de 15 kDa que se encuentra en F8. Por otro lado, en F11 se encuentra una proteína de 17 kDa que induce un efecto vasoconstrictor probablemente mediado por un mecanismo que depende de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos en los experimentos realizados con el extracto crudo de este hidrocoral, en

los que se encontró que el extracto requiere tanto de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular como de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para inducir su efecto vasoconstrictor.

Por otro lado, el extracto crudo de *M. complanata* presentó actividad hemolítica sobre eritrocitos de rata, de una manera dependiente de la concentración. Al igual que con la actividad vasoconstrictora, el efecto hemolítico también se perdió completamente al incubar el extracto en un baño de agua a ebullición. Esto sugiere que esta actividad también depende de compuestos de naturaleza proteica. Se ha reportado que la adición de lípidos puede bloquear el efecto hemolítico de varias hemolisinas. Esto se debe posiblemente a que las hemolisinas interaccionan de manera específica con ciertos lípidos de la membrana del eritrocito, de tal manera que la incubación previa de las toxinas con los lípidos permite su unión y al momento de agregar los eritrocitos al sistema, las toxinas ya unidas a los lípidos quedan incapacitadas para interaccionar con la membrana del eritrocito y ejercer su efecto. Por ejemplo, la incubación de extractos de medusas de los géneros *Aurelia* y *Cassiopea* en presencia de fosfatidilcolina inhibe su actividad hemolítica (Radwan et al., 2001), mientras que los efectos hemolíticos de los extractos de los corales blandos: *Nephthea sp.*, *Dendronephthya sp.* y *Heteroxenia fuscescens* se inhiben cuando éstos se incuban en presencia de dihidrocolesterol (Radwan et al., 2002). De manera similar, el dihidrocolesterol muestra un efecto inhibitorio muy marcado sobre las fracciones hemolíticas de *M. platyphylla* y *M. dichotoma* (Radwan, 2002). En este estudio se observó que la incubación previa del extracto crudo de *M. complanata* en presencia de colesterol indujo una inhibición significativa sobre el efecto hemolítico del extracto. Esto sugiere que las hemolisinas presentes en el extracto de *M. complanata* se comportan de manera similar a las hemolisinas presentes tanto en los extractos de los corales blandos antes mencionados como en los extractos de los hidrocorales: *M. platyphylla* y *M. dichotoma*, a diferencia de las hemolisinas presentes en los extractos de las medusas.

Tomando en cuenta que en el caso de *M. platyphylla* se encontró que gran parte del efecto hemolítico inducido por el extracto de este hidrocoral se debe a una proteína con actividad de fosfolipasa  $\text{A}_2$  (Radwan y Aboul-Dahab, 2004), se evaluó el efecto hemolítico del extracto de *M. complanata* después de incubarlo en presencia

de BPB, un inhibidor de enzimas con actividad de fosfolipasa  $A_2$ . En este experimento se observó que el efecto hemolítico del extracto crudo de *M. complanata* se inhibió de manera significativa cuando se incubó previamente en presencia de BPB, lo cual sugiere que parte de la hemólisis inducida por el extracto de *M. complanata* puede deberse a una fosfolipasa  $A_2$ . La mayoría de los venenos de distintas especies de animales presentan actividad de fosfolipasa  $A_2$ , incluyendo todas las clases del phylum Cnidaria (Nevalainen et al., 2004). Las fosfolipasas  $A_2$  que más se han estudiado son las que están presentes en los venenos de serpientes. Muchas de estas enzimas son tóxicas y difieren unas de otras en el tipo de toxicidad, entre los distintos efectos farmacológicos que presentan se incluyen diversos efectos: neurotóxicos, cardiotoxicos, miotóxicos, hemolíticos, convulsivos y anticoagulantes (Kini, 2005). La modificación química de la histidina-48 por alquilación, usando BPB, conduce a la pérdida de la actividad enzimática en todas las fosfolipasas  $A_2$  de venenos de serpientes (Kini, 2005; Kuruppu et al., 2005), ya que a pesar de las diferencias en sus propiedades farmacológicas, la secuencia de aminoácidos del sitio activo responsable de la actividad enzimática de fosfolipasa  $A_2$  está altamente conservada. Además, se ha determinado la estructura tridimensional de más de 20 fosfolipasas  $A_2$  de venenos de serpientes y todas muestran mucha similitud en su plegamiento tridimensional (Kini, 2005).

Al evaluar el efecto hemolítico de cada una de las 19 fracciones del extracto crudo de *M. complanata*, con excepción de las fracciones 6 y 9, se encontró que solamente F4 presentó este tipo de actividad. El análisis mediante electroforesis en gel indicó que esta fracción presentaba una banda mayoritaria con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa. Este peso molecular es cercano al peso molecular de la Milleporina-1 (32.5 kDa), una toxina con actividad de fosfolipasa  $A_2$  que se encontró en *M. platyphylla* y que es la toxina responsable de la mayor parte del efecto hemolítico inducido por el extracto de este organismo (Radwan y Aboul-Dahab, 2004). Estas observaciones sugieren que el principal componente responsable del efecto hemolítico del extracto crudo de *M. complanata* es una proteína de 30 kDa (F4) que pudiera ser una enzima con actividad de fosfolipasa  $A_2$ .

Finalmente, se realizaron experimentos para observar el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre la actividad hemolítica inducida por el extracto crudo de *M. complanata*. Estos experimentos se llevaron a cabo tomando en cuenta que muchas de las fosfolipasas  $\text{A}_2$ , que se han encontrado en los venenos de diversos organismos, requieren de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  para alcanzar su actividad óptima (Nevalainen et al., 2004). Por ejemplo, la  $\beta$  fosfolipasa  $\text{A}_2$  que se encontró en la anémona *Aiptasia pallida* es más eficiente en presencia de cationes divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . Esa fosfolipasa  $\text{A}_2$  presentó mayor actividad en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  que en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  (Grotendorst y Hessinger, 2000). En este estudio se encontró que la actividad hemolítica del extracto crudo de *M. complanata*, a una concentración de 1.8  $\mu\text{g}$  de proteína/ml, se incrementó significativamente en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Al evaluar la actividad hemolítica del extracto, a esa misma concentración, en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  se observó un aumento significativo de la actividad sólo a la concentración más alta de este ión (10 mM). Estos resultados apoyan la idea de que el extracto de este hidrocoral contiene hemolisinas con actividad de fosfolipasa  $\text{A}_2$  que requieren de cationes divalentes para optimizar su efecto hemolítico.

## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados derivados de este estudio indicaron que el extracto crudo de *M. complanata* presentó dos efectos biológicos importantes:

- 1) Un efecto contráctil sobre segmentos de aorta aislados de rata, que depende de la concentración y es independiente de endotelio. Este efecto es producido por tres proteínas: los componentes mayoritarios de la fracción 6 y de la fracción 8 (15 kDa) que inducen una vasoconstricción transitoria y el componente mayoritario de la fracción 11 (17 kDa) que induce una vasoconstricción sostenida.
- 2) Un efecto hemolítico sobre eritrocitos de rata, dependiente de la concentración, producido por una proteína de 30 kDa (F4), la cual posiblemente posee actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

Aceret, T. L., Brown, L., Miller, J., Coll, J. C., Sammarco, P. W. 1996. Cardiac and vascular responses of isolated rat tissues treated with diterpenes from *Sinularia flexibilis* (coelenterata: octocorallia). *Toxicon* 34, 1165-1171.

Anderluh, G., Barlič, A., Podlesek, Z., Maček, P., Pungerčar, J., Gubenšek, F., Zecchini, M., Dalla Sera, M., Menestrita, G. 1999. Cysteine-scanning mutagenesis of an eucaryotic pore-forming toxin from sea anemone. *Eur. J. Biochem.* 263, 128-136.

Andriantsitohaina, R., Lagaud, G. J., Andre, A., Muller, B., Stoclet, J. C. 1995. Effects of cGMP on calcium handling in ATP-stimulated rat resistance arteries. *Am. J. Physiol.* 268, H1223–H1231.

Azuma, H., Ishikawa, M., Nakajima, T., Satoh, A., Sekizaki, S. 1989. Calcium-dependent contractile response of arterial smooth muscle to a jellyfish toxin. *Eur. J. Pharmac.* 88, 549-559.

Beckerle, M. C. 1998. Spatial control of actin filament assembly: lessons from *Listeria*. *Cell* 95, 741-748.

Berridge, M. J., Irvine, R. F. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.

Bianchini, G., Lotti, T., Campolmi, P., Casigliani, R. and Panconesi, E. 1988. Coral ulcer as a vasculitis. *Int. J. Dermatol.* 27, 506-507.

Bolotina, V. M. 2000. Nitric oxide and ion channels. En: Loscalzo, J., Vita, J.A. (Eds.). Nitric oxide and the cardiovascular system. Humana Press, New Jersey: 85-103.

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.

Cairns, M. D. 1999. Species richness of recent Scleractinia. *Atoll Res. Bull.* 59, 1-46.

Carrier, G. O., Fuchs, L. C., Winecoff, A. P., Giulumian, A. D., White, R. E. 1997. Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels. *Am. J. Physiol.* 273, H76–H84.

Christ, J. G., Brink, P. R. 2000. Gap junctions in isolated rat aorta: evidence for contractile responses that exhibit a differential dependence on intercellular communication. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 423-429.

Coleman, R. A., Smith, W. L., Naruiya, S. 1994. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46, 205-229.

Davies, P. J., Montaggioni, L. 1985. Reef growth and sea-level change: the environmental signature. *Proc. 5ht Int. Coral Reef Symp.* 3, 477-511.

Dejana, E., Corada, M., Lampugnani, M. G. 1995. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.* 9, 910-918.

DeLanerolle, P., Nishikawa, M., Yost, D. A., Adelstein, R. S. 1984. Increased phosphorylation of myosin light chain kinase after an increase in cyclic AMP in intact smooth muscle. *Science.* 223, 1415-1417.

Dubois, J. M., Tanguy, J., Burnett, J. W. 1983. Ionic channels induced by sea nettle toxin in the nodal membrane. *Biophys. J.* 42, 199-202.

Ehrlich, B. E., Watras, J. 1988. Inositol 1,4,5-triphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature* 336, 583-586.

Furukawa, K., Ohshima, N., Tawada-Iwata, Y., Shigekawa, M. 1991. Cyclic GMP stimulates  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* 266, 12337–12341.

Geeves, M. A., Holmes, K. C. 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 687-728.

Göthert, M., Garbarg, M., Hey, J. A., Schlicker, E., Schwartz, J. C., Levi, R. 1995. New aspects of the role of histamine in cardiovascular function: identification, characterization, and potential pathophysiological importance of H3 receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73, 558-564.

Griffith, O. W. and Stuehr, D. J. 1995. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 707-736.

Grotendorst, G. R., Hessinger, D. A. 1999. Purification and partial characterization of the phospholipase  $A_2$  and co-lytic factor from sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon* 37, 1779-1796.

Grotendorst, G. R., Hessinger, D. A. 2000. Enzymatic characterization of the major phospholipase  $A_2$  component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon* 38, 931-943.

Hashimoto, Y. 1979. Marine toxins and other bioactive marine metabolites. Japan Scientific Societies Press, Tokyo: 1-115.

Heller, W. T., Krueger, J. K., Trewella, J. 2003. Further insights into calmodulin-myosin light chain kinase interaction from solution scattering and shape restoration. *Biochemistry* 42, 10579-10588.

Highsmith, S. 1999. Lever arm model of force generation by actin-myosin-ATP. *Biochemistry* 38, 9791-9797.

Holmes, K. C. 1997. The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. *Curr. Biol.* 7, 112-118.

Huang, R., Li, L., Guo, H., Wang, C. L. 2003. Caldesmon binding to actin is regulated by calmodulin and phosphorylation via different mechanisms. *Biochemistry* 42, 2513-2523.

Huxley, H. E. 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1366.

Kamm, K. E., Stull, J. T. 1985. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25, 593-620.

Kamm, K. E., Stull, J. T. 1989. Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu. Rev. Physiol.* 51, 299-313.

Kargacin, G. J., Cooke, P. H., Abramson, S. B., Fay, F. S. 1989. Periodic organization of the contractile apparatus in smooth muscle revealed by the motion of dense bodies in single cells. *J. Cell Biol.* 108: 1465-1475.

Kem, W. R., Dunn, B. M. 1988. Separation and characterization of four different amino acid sequence variants of a sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolysin. *Toxicon* 26, 997-1008.

Khoo, K. S., Kam, W. K., Khoo, H. E., Gopalakrishnakone, P., Chung, M. C. M. 1993. Purification and partial characterization of two cytolysins from a tropical sea anemone *Heteractis magnifica*. *Toxicon* 31, 1567-1579.

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

Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-Kinase). *Science* 273, 245-248.

Kini, R. M. 2005. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. *Toxicon* 45, 1147-1161.

Kitazawa T, Masuo M, Somlyo A. P. 1991. G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9307-9310.

Klug, M., Weber, J. 1991. An extract from *Hydra vulgaris* (cnidaria) nematocysts increases cytoplasmic  $Ca^{2+}$  levels in fibroblasts. *Toxicon* 29, 129-133.

Knowlton, N. 2001. The future of coral reefs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 10, 5419-5425.

Komalavilas, P., Lincoln, T. M. 1996. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J. Biol. Chem.* 271, 21933-21938.

Krebs, E. G. 1972. Protein kinases. *Curr. Top. Cell. Regul.* 5, 99-133.

Kuruppu, S., Fry, B. G., Hodgson, W. C. 2005. Presynaptic neuromuscular activity of venom from the brown-headed snake (*Glyphodon tristis*). *Toxicon* 45, 383-388.

László, F. A., László, F., De Wied, D. 1991. Pharmacology and clinical perspectives of vasopressin antagonists. *Pharmacol. Rev.* 43, 73-108.

Lee, M. R., Li, L., Kitazawa, T. 1997. Cyclic GMP causes Ca<sup>2+</sup> desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J. Biol. Chem.* 272, 5063-5068.

Lewis, J. 1989. The ecology of *Millepora*. *Coral Reefs* 8, 99-107.

Li, L., Eto, M., Lee, M., Morita, R., Yazawa, M., Kitazawa, T. 1998. Possible involvement of the novel CPI-C17 protein in protein kinase C signal transduction of rabbit arterial smooth muscle. *J. Physiol.* 508, 871-881.

Liu, S., Premont, R. T., Kontos, C. D., Huang, J., Rockey, D. C. 2003. Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein  $\beta\gamma$  subunit signaling to protein kinase B/Akt. *J. Biol. Chem.* 278, 49929-49935.

Liu, H., Xiong, Z., Sperelakis, N. 1997. Cyclic nucleotides regulate the activity of L-type calcium channels in smooth muscle cells from rat portal vein. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29, 1411-1421.

Lohmann, S. M., Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Walter, U., De Jonge, H.R. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem. Sci.* 22, 307-312.

Long, W., Zhang, L., Longo, L. D. 2000. Cerebral artery sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  stores and contractility: changes with development. *Am. J. Physiol.* 279, R860-R873.

Middlebrook, R., Wittle, L., Scura, E., Lane, C. 1971. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. *Toxicon* 9, 333-336.

Minowa, T., Miwa, S., Kobayashi, S., Enoki, T., Zhang, X. F., Komuro, T., Iwamuro, Y., Masaki, T. 1997. Inhibitory effect of nitrovasodilators and cyclic GMP on ET-1-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable nonselective cation channel in rat aortic smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 120, 1536-1544.

Mironneau, J., Macrez-Leprêtre, N. 1995. Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors in vascular myocytes: involvement of different transduction pathways. *Cell Signalling* 7, 471-479.

Miwa, S., Iwamuro, Y., Zhang, X. F., Enoki, T., Okamoto, Y., Okazawa, M., Masaki, T. 1999.  $\text{Ca}^{2+}$  entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Jpn. J. Pharmacol.* 80, 281-288.

Moncada, S., Higgs, E. A. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.* 21, 361-374.

Murad, F. 1996. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *J. Am. Med. Assoc.* 276, 1189-1192.

Murthy, K. S., Makhlof, G. M. 1995. Interaction of cA-kinase and cG-kinase in mediating relaxation of dispersed smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 268, C171-C180.

Nagase, H., Karaki, H., Urakawa, N. 1987. Palytoxin-induced endothelium-dependent relaxation in the isolated rat aorta. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 335, 575-579.

Navarro-Cid, J., Cachofeiro, V., Maeso, R., Lahera, V. 1999. Fisiología de la pared vascular. En: Tresguerras, J. A. F., Aguilar, E., Cachofeiro, M.U. (Eds.), Fisiología humana. McGraw-Hill-Interamericana, México D.F.: 531-539.

Nelson, M. T., Patlak, J. B., Worley, J. F., Standen, N. B. 1990. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. Physiol.* 259, C3-C18.

Nevalainen, T. J., Peuravuori, H. J., Quinn, R. J., Llewellyn, L. E., Benzie, J. A. H., Fenner, P. J., Winkel, K. D. 2004. Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol.* 139, 731-735.

Nilius, B., Droogmans, G. 2001. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* 81, 1415-1459.

Nishizuka, Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its applications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.

Noda, M., Yasuda-Fukazawa, C., Moriishi, K., Kato, T., Okuda, T., Kurukawa, K. 1995. Involvement of rho in GTP $\gamma$ S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett.* 367, 246-250.

Oliveira, J. S., Redaelli, E., Zaharenko, A. J., Cassulini, R. R., Konno, S., Pimenta, D. C., Freitas, J. C., Clare, J. J., Wanke, E. 2004. Binding specificity of sea anemone toxins to Na<sub>v</sub> 1.1-1.6 sodium channels. *J. Biol. Chem.* 279, 33323-33335.

Özbek, S., Pokidysheva, E., Schwager, M., Schulthess, T., Tariq, N., Barth, D., Milbradt, A. G., Moroder, L., Engel, J., Holstein, T. W. 2004. The glycoprotein NOWA and minicollagens are part of a disulfidelinked polymer that forms the cnidarian nematocyst Wall. *J. Biol. Chem.* 279, 52016-52023.

Pacaud, P., Loirand, G., Baron, A., Mironneau, C., Mironneau, J. 1991. Ca<sup>2+</sup> channel activation and membrane depolarization mediated by Cl<sup>-</sup> channels in response to noradrenaline in vascular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 104, 1000-1006.

Parker, M. W. 2003. Cryptic clues as to how water-soluble protein toxins form pores in membranes. *Toxicon* 42, 1-6.

Radwan, F. F. Y. 2002. Comparative toxinological and immunological studies on the nematocyst venoms of the Red Sea fire corals *Millepora dichotoma* and *M. platyphylla*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 131, 323-334.

Radwan, F. F. Y., Aboul-Dahab, H. M. 2004. Milleporin-1, a new phospholipase A<sub>2</sub> active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocysts. *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 267-272.

Radwan, F. F. Y., Aboul-Dahab, H. M., Burnett, J. W. 2002. Some toxicological characteristics of three venomous soft corals from the Red Sea. *Comp. Biochem. Physiol. C* 132, 25-35.

Radwan, F. F. Y., Burnett, J. W., Bloom, D. A. 2001. A comparison of the toxinological characteristics of two *Cassiopea* and *Aurelia* species. *Toxicon* 39, 245-254.

Rayment, I. 1996. The structural basis of the myosin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 271, 15850-15853.

Ren, Y., Xu, X., Wang, X. 2003. Altered mRNA expression of ATP-sensitive and inward rectifier potassium channel subunits in streptozotocin-induced diabetic rat heart and aorta. *J. Pharmacol. Sci.* 93, 478-483.

Rohra, D. K., Saito, S. Y., Ohizumi, Y. 2003. Mechanism of acidic pH-induced contraction in spontaneously hypertensive rat aorta: role of  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum. *Acta Physiol. Scand.* 179, 273-280.

Rojas, A., Torres, M., Rojas, J. I., Feregrino, A., Heimer-de la Cotera, E. 2002. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon* 40, 777-785.

Ruiz-Velasco, V., Zhong, J., Hume, J. R., Keef, K. D. 1998. Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ. Res.* 82, 557-565.

Ruth, P., Wang, G. X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H., Hofmann, F. 1993. Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2623-2627.

Sagi, A., Rosenberg, L., Ben-Meir, P., Hauben, D. J. 1987. The "fire coral" (*Millepora dichotoma*) as a cause of burns: a case report. *Burns Incl. Therm. Inj.* 13, 325-326.

Schägger, H., Von-Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.

Shimizu, S., Ishii, M., Yamamoto, T., Kawanishi, T., Momose, K. 1994. Bradykinin induces generation of reactive oxygen species in bovine aortic endothelial cells. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 84, 301-314.

Silva, E. G., Frediani-Neto, E., Ferreira, A. T., Paiva, A. C. M., Paiva, T. B. 1994. Role of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$ -channels in the membrane potential and contractility of aorta from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 113, 1022-1028.

Silver, P., Disalvo, J. 1979. Adenosine 3',5'-monophosphate-mediated inhibition of myosin light chain phosphorylation in bovine aortic actomyosin. *J. Biol. Chem.* 254, 9951-9954.

Smith, C. W., Pritchard, K., Martson, S. B. 1987. The mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  regulation of vascular smooth muscle thin filaments by caldesmon and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 262, 116-122.

Sokolovsky, M. 1995. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 68, 435-471.

Solomon, E. P., Berg, L. R., Martín, D. W., Vilee, C. 1998. Biología de Vilee. 4<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Interamericana, México D.F.: 598-602.

Somlyo, A. P., Somlyo, A. V. 1994. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372, 231-236.

Stankevičius, E., Kévelaitis, E., Vainorius, E., Simonsen, U. 2003. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina (Kaunas)* 39, 333-341.

Szpacenko, A., Wagner, J., Dabrowska, R., Ruegg, J. C. 1985. Caldesmon-induced inhibition of ATPase activity of actomyosin and contraction of skinned fibres of chicken gizzard smooth muscle. *FEBS Lett.* 192, 9-12.

Tamaoki, J., Tagaya, E., Nishimura, K., Isono, K., Nagai, A. 1997. Role of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase in cyclic GMP-mediated relaxation of canine pulmonary artery smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 122, 112-116.

Tardent, P. 1995. The cnidarian cnidocyte, a high-tech cellular weaponry. *BioEssays* 17, 351-362.

Tasker, P. N., Michelangeli, F., Nixon, G. F. 1999. Expression and distribution of the type 1 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in developing vascular smooth muscle. *Circ. Res.* 84, 536-542.

Throckmorton, D. C., Packer, C. S., Brophy, C. M. 1998. Protein kinase C activation during  $\text{Ca}^{2+}$ -independent vascular smooth contraction. *J. Surg. Res.* 78, 43-53.

Tognarini, D. P., Moulds, R. F. W. 1997. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and contractile responses to  $\alpha 1$ -adrenoreceptor subtype activation in rat aortic vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 322, 31-36.

Torres, M., Aguilar, M. B., Falcón, A., Sánchez, L., Radwan, F. F. Y., Burnett, J. W., Heimer-de la Cotera, E., Arellano, R.O. 2001. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon* 39, 1297-1307.

Trepakova, E. S., Gericke, M., Hirakawa, Y., Weisbrod, R. M., Cohen, R. A., Bolotina, V.M. 2001. Properties of a native cation channel activated by  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276, 7782–7790.

Wang, Y. X., Zheng, Y. M., Mey, Q. B., Wang, Q. S., Collier, M. L., Fleischer, S., Xin, H. B., Kotlikoff, M. 2004. FKBP12.6 and cADPR regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  release in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286, C538-C546.

Watson, G. M., Hessinger, S. A. 1989. Cnidocyte mechanoreceptors are tuned to the movement of swimming prey by chemoreceptors. *Science* 243, 1589-1591.

Wendt, T., Taylor, D., Trybus, K. M., Taylor, K. 2001. Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2. *Biochemistry* 98, 4361-4366.

Williams, D. A., Fay, F. S. 1986. Calcium transients and resting levels in isolated smooth muscle cells as monitored with quin-2. *Am. J. Physiol.* 250, C779-C791.

Wittle, L. W., Middlebrook, R., Lane, C. 1971. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicornis*. *Toxicon* 9, 327-331.

Wittle, L. W., Scura, E. D., Middlebrook, R. E., 1974. Singing coral (*Millepora tenera*) toxin: a comparison of crude extracts with isolated nematocyst extracts. *Toxicon* 12, 481-486.

Wittle, L. W., Wheeler, C. A. 1974. Toxic and immunological properties of stinging coral toxin. *Toxicon* 12, 487-493.

Yoshida, Y., Cai, J. Q., Imai, S. 1992. Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -pump ATPase is not a substrate for cGMP-dependent protein kinase. *J. Biochem. (Tokyo)* 111, 559-562.

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* 42, 8939-8944.