



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO HEMOLÍTICO DEL  
VENENO DE *Millepora complanata*”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**LUIS JOSUÉ MURILLO ESQUIVEL**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO**

**SANTIAGO DE QUERETARO, QUERETARO, 2015.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO HEMOLÍTICO DEL  
VENENO DE *Millepora complanata*”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**LUIS JOSUÉ MURILLO ESQUIVEL**

**DIRIGIDA POR**

**DR. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO**

**SINODALES**

**DR. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO \_\_\_\_\_**

**DIRECTOR**

**DR. CÉSAR IBARRA ALVARADO \_\_\_\_\_**

**SINODAL**

**DRA. ALEJANDRA ROJAS MOLINA \_\_\_\_\_**

**SINODAL**

**DR. MAMADOU MOUSTAPHA BAH \_\_\_\_\_**

**SINODAL**

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.	i
ÍNDICE DE CUADROS.	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.	v
RESUMEN.	
1. ANTECEDENTES.	
1.1. Phylum Cnidaria.	1
1.1.1. Cnidocitos y nematocitos.	4
1.1.2 Características de las toxinas del phylum Cnidaria.	6
A. Citolisinas.	7
B. Neurotoxinas.	9
C. Metabolitos secundarios.	10
1.2. Género <i>Millepora</i> .	12
1.2.1. Corales de fuego.	12
1.2.2. Relación simbiótica entre especies del género <i>Millepora</i> y algunas micro-algas marinas.	14
1.2.3. Blanqueamiento de arrecifes de coral.	15
1.2.4. Toxicidad y estudios previos de especies del género <i>Millepora</i> .	18
2. HIPÓTESIS.	24
3. OBJETIVOS.	25
3.1. General.	25
3.2. Específicos.	25
4. METODOLOGÍA.	26
4.1. Materiales.	26
4.1.1. Material biológico.	26
4.1.2. Preparación y conservación de los extractos.	26

4.1.3. Evaluaciones farmacológicas.	26
4.2. Reactivos.	27
4.2.1. Preparación, conservación y tratamiento de los extractos.	27
4.2.2. Evaluaciones farmacológicas.	27
4.3. Métodos.	27
4.3.1. Recolección y transporte de los fragmentos de <i>M. complanata</i> .	27
4.3.2. Blanqueamiento artificial de fragmentos de <i>M. complanata</i> .	28
4.3.3. Preparación del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> .	28
4.3.4. Preparación de extractos de <i>M. complanata</i> con etanol.	28
4.3.5. Ensayo de hemólisis.	29
4.3.6. Caracterización de la actividad hemolítica del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> .	29
A. Actividad hemolítica sobre eritrocitos de diferentes especies.	29
B. Actividad hemolítica en presencia de cationes divalentes.	30
C. Efecto de la temperatura sobre la actividad hemolítica	30
D. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad hemolítica	30
4.3.7. Evaluación de la actividad hemolítica retardada de los extractos.	30
4.3.8. Ensayo de toxicidad de los extractos.	30
4.3.9. Análisis estadísticos	31
4.4 Diseño experimental.	32

5. RESULTADOS.	33
5.1. Recolección y transporte de los fragmentos de <i>M. complanata</i> .	33
5.2. Blanqueamiento artificial de fragmentos de <i>M. complanata</i> .	34
5.3. Obtención de los extractos.	34
5.4. Caracterización de la actividad hemolítica del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> .	36
5.4.1. Actividad hemolítica sobre eritrocitos de diferentes especies.	36
5.4.2. Evaluación de la actividad hemolítica en presencia de cationes divalentes.	38
5.4.3. Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad hemolítica.	39
5.4.4. Evaluación de la actividad hemolítica a diferentes tiempos de incubación.	41
5.5. Determinación de la actividad hemolítica retardada.	42
5.6. Ensayo de toxicidad de los extractos.	44
6. DISCUSIÓN.	46
7. CONCLUSIONES.	52
8. REFERENCIAS.	53
ANEXO	
Publicaciones derivadas de este trabajo.	

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Valores de las unidades hemolíticas medias (UH <sub>50</sub> ) y efectos máximos (E <sub>max</sub> ) de la actividad hemolítica del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> sobre eritrocitos de diferentes especies.	38
2	Valores de las unidades hemolíticas medias (UH <sub>50</sub> ) del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> en presencia de Ca <sup>++</sup> y Mg <sup>++</sup> .	39
3	Valores de las unidades hemolíticas medias (UH <sub>50</sub> ) del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> a diferentes temperaturas de incubación.	40
4	Valores de las unidades hemolíticas medias (UH <sub>50</sub> ) del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> a después de la preincubación a diferentes temperaturas.	40
5	Unidades hemolíticas medias (UH <sub>50</sub> ) de la actividad hemolítica del extracto de <i>M. complanata</i> a diferentes tiempos de incubación.	42
6	Unidades hemolíticas medias (UH <sub>50</sub> ) de la actividad hemolítica de los extractos con hemolisinas termoestables.	43
7	Valores de la dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) del extracto acuoso de <i>Millepora complanata</i> .	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fisionomía de los cnidarios.	1
2	Las distintas clases del phylum cnidaria.	4
3	Representación esquemática del cnidocito.	5
4	Estructura química de la lofotoxina, derivada del género <i>Lophogeorgia</i> .	11
5	Estructura química de la palitoxina.	12
6	Distintas especies y formas del género <i>Millepora</i> .	13
7	Arrecife de coral bajo efectos del blanqueamiento.	17
8	Lesiones locales causadas por el contacto con especies del género <i>Millepora</i> .	19
9	Fotografía subacuática de <i>Millepora complanata</i> en el Caribe Mexicano.	21
10	Fragmentos de <i>Millepora complanata</i> normales y blanqueados.	35
11	Curvas concentración-respuesta de la actividad hemolítica del extracto de <i>M. complanata</i> sobre eritrocitos de distintas especies.	37
12	Curvas concentración-respuesta de la actividad hemolítica del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> después de la incubación a diferentes temperaturas.	41
13	Curvas-concentración respuesta de la actividad hemolítica del veneno desnaturalizado y extractos etanólicos.	44

## RESUMEN

*Millepora complanata* es un cnidario de exoesqueleto calcáreo perteneciente a la clase Hydrozoa que se encuentra distribuido ampliamente en arrecifes de coral del Caribe Mexicano. Este organismo se conoce comúnmente como “coral de fuego” debido a su capacidad de causar lesiones dolorosas similares a quemaduras en la piel humana para las que no se conoce un tratamiento adecuado. En estudios previos se ha encontrado que el extracto acuoso de este cnidario contiene hemolisinas termolábiles de naturaleza proteica que actúan de manera rápida, y hemolisinas termoestables de naturaleza no proteica de acción lenta. La caracterización de la actividad de estas hemolisinas es importante para mantener los mecanismos de defensa de estos organismos, que además es importante para la aplicación de tratamientos y cuidados adecuados para las víctimas por contacto con especies del género *Millepora*. Es éste estudio, se evaluó la actividad de las hemolisinas termolábiles del extracto acuoso de *M. complanata* bajo diferentes condiciones. De este modo se encontró que dichas hemolisinas de acción rápida ejercen actividad de manera más potente sobre eritrocitos de roedores que sobre eritrocitos de pollo y humano. También se encontró que la actividad hemolítica de estas hemolisinas inicia desde los diez minutos de incubación y que en comparación con otras hemolisinas de cnidarios son relativamente más estables a la temperatura con un rango de 28 a 50°C. Por otra parte, el análisis de las hemolisinas termoestables mostró que estas inducen una actividad hemolítica lenta en comparación con el rápido efecto hemolítico inducido por las hemolisinas termolábiles. Así mismo, se encontraron evidencias que sugieren que las hemolisinas termoestables provienen de los tejidos de *M. complanata* y no de sus dinoflagelados simbioses ni de los nematocistos del hidrocoral. De manera adicional, se evaluó la actividad tóxica del extracto acuoso de *M. complanata* mediante dos modelos de insectos, así se encontró que los grillos (*Acheta domestica*) constituyen un buen modelo para evaluar la toxicidad del extracto de este hidrocoral.

**Palabras clave:** Hemolisinas, *Millepora complanata*, toxicidad en grillos.



# 1. ANTECEDENTES

## 1.1. Phylum Cnidaria.

Los cnidarios son organismos acuáticos que en su mayoría, se encuentran ampliamente distribuidos en ecosistemas marinos poco profundos, más comúnmente en zonas climáticas cálidas y regiones tropicales. Presentan cuerpos de simetría radial con una organización corporal relativamente simple que consta de un saco hueco con una cavidad gastrovascular que contiene una sola abertura que cumple con la función de boca y ano. Esta abertura está rodeada de tentáculos que son utilizados para conducir el alimento hacia la cavidad gastrovascular. Por otra parte, la forma de sus cuerpos se puede clasificar en dos tipos, los cuales se muestran en la Figura 1. La forma de pólipo, que se asemeja a un pequeño saco que en su extremo inferior posee una ventosa o disco pedal con la que se anclan a un sustrato, roca u objeto marino de una manera similar a como lo hacen los moluscos a las conchas; mientras que en su parte superior se encuentra la boca. La forma de medusa, que está adaptada para la flotación y, para desplazarse por el agua, crea contracciones rítmicas a lo largo de todo su cuerpo, absorbiendo agua desde su cavidad gastrovascular y expulsándola, de tal manera que la utiliza como "propulsor", además de poseer la boca en su parte inferior.

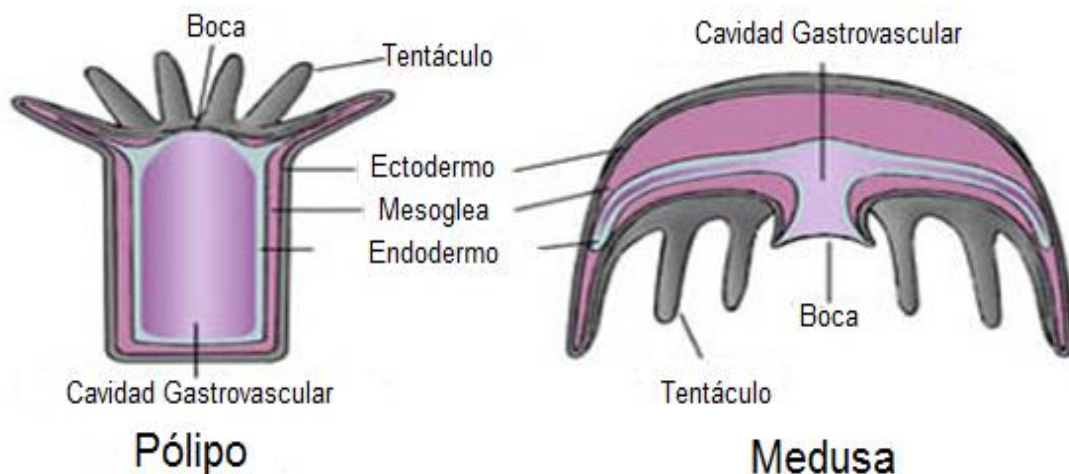


Figura 1. Fisionomía de los cnidarios. Formas de: a) pólipo y b) medusa.

Las paredes del cuerpo de los “cnidarios” constan de dos capas celulares: la epidermis externa (ectodermo) y la gastrodermis interna (endodermo) entre las cuales se encuentra un material gelatinoso llamado mesoglea (Özbek y col., 2009). Actualmente los cnidarios se encuentran agrupados en cinco clases taxonómicas principales de acuerdo a sus características morfológicas que son reconocidas por la mayoría de los sistemistas (Figura 2).

- **Clase Anthozoa:** una de sus características físicas particulares es que la cavidad gastrovascular se encuentra dividida en septos; esta clase se divide a su vez en dos subclases. La Hexacorallia (Zoantharia), que recibe este nombre debido a que presenta múltiples de seis tentáculos, incluye organismos del tipo anémonas (orden Actinaria y Ceriantharia) y distintos corales (orden Antipatharia, Scleractinia y Corallimorpharia) (Rojas-Molina y col., 2012). La subclase Octocorallia (Alcyonaria), que cuenta con múltiples de ocho tentáculos, incluye corales blandos (orden Alcyonacea) y las llamadas plumas de mar (orden Pannatulacea), además de otros organismos (NCBI, 2014).
- **Clase Cubozoa:** Fisionómicamente las especies de esta clase poseen un velario, que es una estructura semejante al velo de las hidromedusas, pero difiere de éstas en su desarrollo, ya que contiene divertículos digestivos. En los llamados ropalios es posible encontrar ojos con fotoreceptores y estatocistos sensibles a la orientación. La forma polipoide se conoce en pocas especies de esta clase (Brusca y Brusca, 2005). Son también llamadas “cubomedusas” gracias a que la forma de su cuerpo se asemeja a un cubo, al igual que “avispa de mar” (orden Carybdeida y Chirodropida) por el potente veneno con el que cuentan (NCBI, 2014). Debido a que presentan características similares a las medusas pertenecientes a la clase Scyphozoa, anteriormente se les consideraba dentro de ésta.
- **Clase Hydrozoa:** Algunas de las características físicas que comparten las especies de ésta clase son: 1) que su cavidad gastrovascular no se encuentra dividida, 2) la mesoglea se encuentra desprovista de células y 3)

que su cavidad gastrovascular no posee faringe ni mesenterios (Barnes, 1983). Dentro de ésta clase se encuentra el mayor número de especies de cnidarios conocidos hasta ahora, siendo de las más representativas las llamadas hidras (orden Hydroida), que son depredadores de agua dulce de escasos milímetros de longitud, estudiados principalmente por su asombrosa capacidad de regeneración (Gilbert y Singer, 2010). Ésta clase incluye una variedad de especies que presentan las formas tanto de medusas de agua salada (orden Trachylina), medusas de agua dulce (orden Hydroida, suborden Limnomedusae), colonias flotantes (orden Siphonophora), así como colonias fijas llamadas hidrocorales, los cuales secretan un esqueleto calcáreo, asemejándose así a los corales auténticos o escleractinios (Schuchert, 2012; NCBI, 2014). Los hidrocorales más abundantes, considerados como los constructores más importantes de arrecifes después de los corales pétreos, son los llamados “corales del fuego” (orden Anthoathecata) (Rojas-Molina y col, 2012).

- **Clase Polypodiozoa:** Aunque la introducción de esta clase es reciente, el Registro Mundial de especies Marinas (WRMS) por sus siglas en inglés, la establece como temporal, ya que además de conocerse una sola especie hasta ahora (*Polypodium hydriforme*), que es un parásito de los huevos de esturiones y peces afines (Acipenseridae y Polyodontidae), sus relaciones filogenéticas no están claras (Schuchert, 2012).
- **Clase Scyphozoa:** Ésta clase engloba a más de 200 especies de cnidarios, de los cuales la gran mayoría están en su forma libre, diferenciándose de las medusas de otras clases en que su tamaño es mayor, poseen una mayor movilidad y su cavidad gastrovascular está dividida por cuatro septos incompletos (Barnes, 1983). Un ejemplo de especies pertenecientes a esta clase puede ser la *Atolla wyvillei* o medusa de corona (orden Coronatae) y las medusas invertidas (familia Cassiopeidae, orden Rhizostomeae).

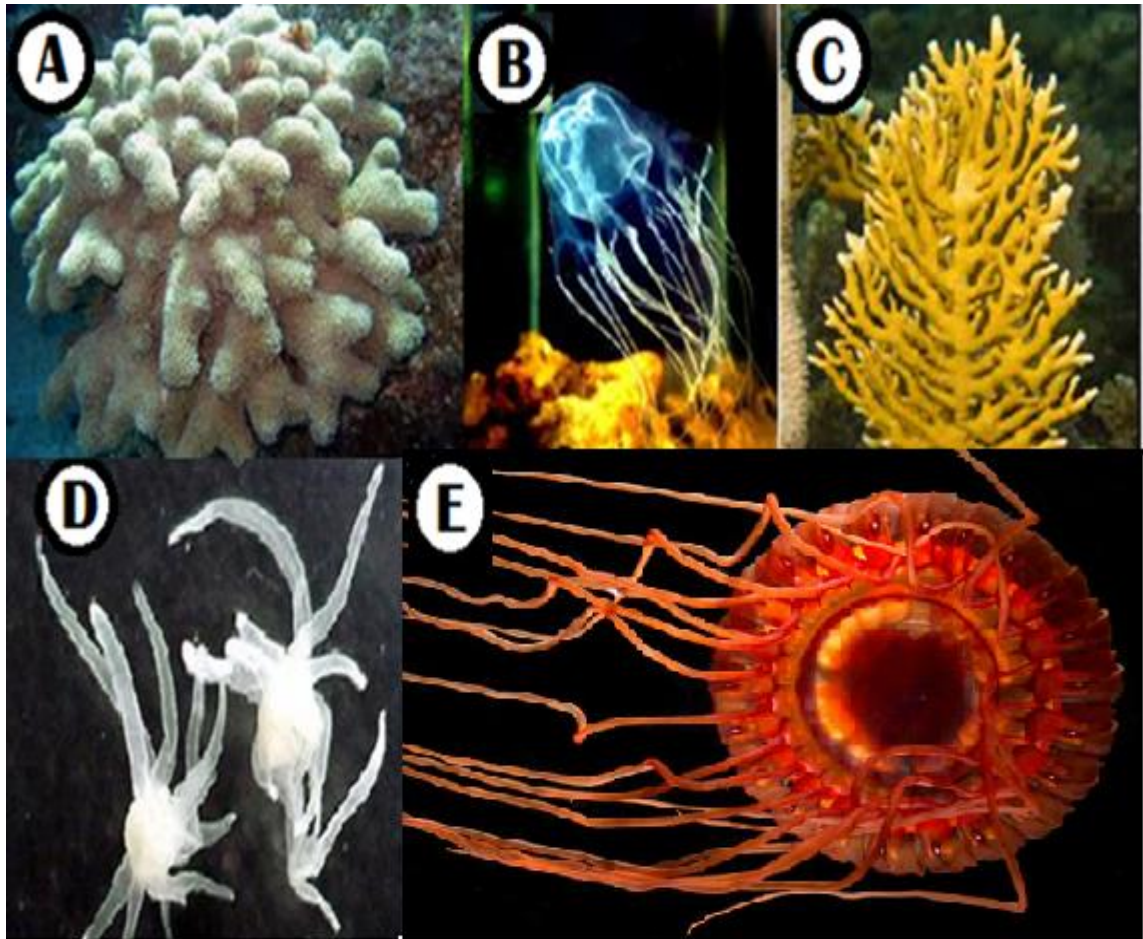


Figura 2. Las distintas clases del phylum cnidaria: A) *Porites porites* (Anthozoa); B) *Chironex fleckeri* (Cubozoa); C) *Millepora alcicornis* (Hydrozoa); D) *Polypodium hydriforme* (Polypodiozoa) y E) *Atolla wyvillei* (Scyphozoa).

### 1.1.1. Cnidocitos y nematocistos.

Una característica física especial que presentan todos los cnidarios, y por la cual el phylum recibe este nombre, es que en sus tejidos se desarrollan células eucariotas urticantes especializadas conocidas como cnidoblastos o cnidocitos. Cada célula urticante contiene en su interior un organelo grande y altamente complejo, producto secretorio del aparato de Golgi y que se conforma de una cápsula rígida con un túbulo invertido dentro de la misma; es en éste organelo donde se almacena el veneno específico que cada especie sintetiza, y al cual se le conoce como cnida (plural de cnidae), cnidocisto o nematocisto. Estructuralmente los nematocistos constan de una cápsula que puede ser de forma ovalada o esférica (Figura 3). En

la parte apical de esta cápsula se encuentra una abertura cerrada por una pequeña tapa que se conoce como opérculo. Dentro de la cápsula del nematocisto se encuentra el filamento tubular invertido enrollado. Las paredes de la cápsula están hechas principalmente de una glucoproteína denominada NOWA y de un material similar al colágeno denominado minicolágeno (García-Arredondo y col., 2011). La cápsula de los nematocistos es altamente resistente y soporta una presión intracapsular (150 bar) generada por una alta concentración del polianión poli- $\gamma$ -glutamato.

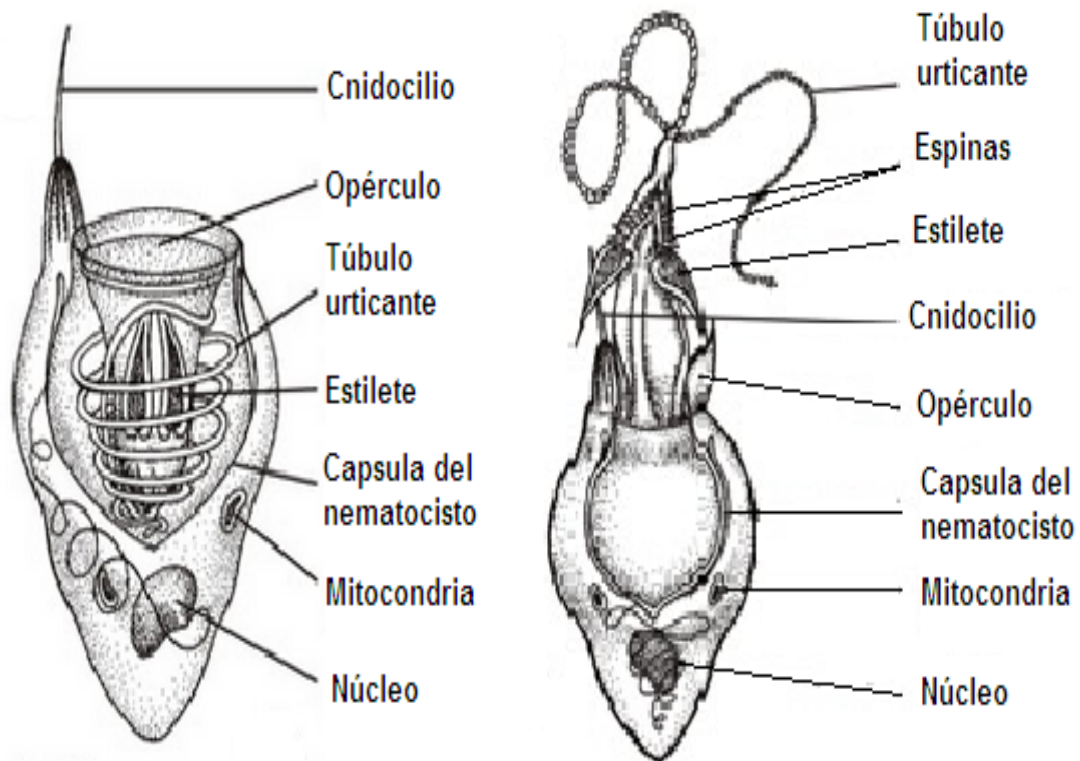


Figura 3. Representación esquemática del cnidocito.

Bajo un estímulo apropiado, que puede ser químico y/o mecánico, el opérculo se abre liberando la presión osmótica interna. Esto provoca la proyección hacia el exterior del túbulo urticante, que bajo la forma no descargada se encuentra invertido y enrollado en el interior de la cápsula. De este modo, las toxinas

almacenadas dentro de los nematocistos son inyectadas a las presas a través del túbulo (Özbek y col., 2009).

Basándose principalmente en el patrón de espinas del túbulo extendido y en la forma de la cápsula, actualmente se conocen alrededor de 25 a 30 tipos diferentes de nematocistos (Mariscal y col., 1974), cada uno con distintas variaciones en tamaño y forma, fácilmente perceptibles con la ayuda de un microscopio de luz. Cabe resaltar que la descripción morfológica de los nematocistos representa un valor taxonómico potencial y, como lo sugieren varios especialistas, debe incluirse para ayudar a la clasificación de los cnidarios en términos taxonómicos. Así mismo, se debe tener en cuenta que cada especie presenta o un tipo de nematocisto con la misma morfología y utilidad, o una mezcla específica de los mismos y los cuales generalmente son utilizados para la captura de presas, funciones defensivas y funciones locomotoras, ya que como se dijo, están armados con un fuerte filamento urticante que inyecta el veneno en las presas (García-Arredondo y col., 2012).

#### 1.1.2. Características de las toxinas del phylum Cnidaria.

A pesar de que solo una pequeña fracción (<1%) de las especies conocidas de cnidarios ha sido implicada en causar daños a humanos, es probable que casi todos los miembros no parasitarios de este phylum son tóxicos al menos para algunos animales. Por ejemplo, se han aislado toxinas de especies que se consideran inofensivas al contacto con la piel humana pero que son estudiadas por presentar actividades biológicas importantes (Frazao y col., 2012; Kem y Turk, 2009). Sin embargo, en el phylum cnidaria se encuentran algunos de los organismos más venenosos y con mayor toxicidad para el humano, como es el caso de la avispa de mar (*Chironex fleckeri*) que es considerada como de alto riesgo de salud pública en Australia (Frazao y col., 2012).

En los primeros años de investigación de venenos de cnidarios el principal enfoque fue en los nematocistos, los cuales fueron reconocidos como los aparatos venenosos en las anemonas y las medusas por varios zoólogos en la mitad del siglo XIX (Kem y Turk, 2009). Actualmente se sabe que los venenos son

secreciones complejas que están compuestas de muchos constituyentes activos, usualmente incluyen una variedad de toxinas y sustancias accesorias que facilitan el proceso de envenenamiento y/o la predigestión de las presas (Kem y Turk, 2009). La composición de los venenos de cnidarios no es conocida a detalle, sin embargo parecen contener una variedad de compuestos proteínicos, actualmente alrededor de 250 de estos compuestos han sido identificados, en donde se incluyen: péptidos, proteínas, enzimas e inhibidores de proteinasas, purinas, alcaloides y otros metabolitos secundarios. Generalmente los cnidarios utilizan estas sustancias como defensa y para la adquisición de presas, ya que muchos producen efectos citolíticos, neurotóxicos y en ocasiones cardiotoxicos (Frazao y col., 2012). Los venenos de cnidarios no son solo estudiados para entender sus procesos toxicológicos, sino también porque representan una fuente de compuestos novedosos con propiedades terapéuticas y otras aplicaciones comerciales como el desarrollo de insecticidas (Frazao y col., 2012).

Las anemonas son los cnidarios de los que se tiene un mayor conocimiento sobre la composición de sus venenos, en los que se han encontrado principalmente proteínas y péptidos con efectos citolíticos, así como péptidos neurotóxicos (Kem y Turk, 2009; Frazao y col., 2012).

#### A. Citolisinas.

Las toxinas citolíticas son sustancias elaboradas por microorganismos, plantas o animales y que tienen la función de romper diferentes tipos de células; son de gran importancia en los venenos de diversos animales ya que juegan un papel importante en su diseminación en los tejidos de las presas. Así mismo, ayudan a predigerir las presas para facilitar su ingestión, ya que estas actúan mediante la disrupción de la integridad de las membranas celulares. El estudio de las citolisinas es importante porque sirven como modelo para estudiar las interacciones proteína-lípido membrana. Desde el enfoque de las ciencias de la salud también son usadas para estudiar la erradicación de células tumorales, y para el desarrollo de nuevos

fármacos con propiedades cardiovasculares, antimicrobianas y antihistamínicas (Frazao y col., 2012).

Basados en la estructura primaria y propiedades funcionales de las citolisinas de anémonas se han clasificado cuatro grupos principales. El grupo I comprende péptidos de 5 a 8 kDa que forman poros en membranas que contienen fosfatidilcolina. El grupo II es más numeroso que el anterior y comprende proteínas de 20 kDa, capaces de formar poros selectivos a cationes en las membranas celulares, a este grupo se le conoce también como actinoporinas, como por ejemplo las equinatoxinas, de las cuales se conocen 5 diferentes formas y que fueron aisladas del veneno de *Actinia equina*; las esticolisinas, de las cuales se conocen cuatro tipos hasta ahora y que fueron encontradas en la *Stichodactyla helianthus*, además de las tres diferentes magnificalisinas aisladas de *Heteractis magnifica* (khoo et al., 1993). Se sabe que citolisinas de este grupo tienen mayor afinidad hacia membranas que contienen esfingomielina, de tal modo que una molécula se inserta en la membrana y facilita la inserción de la siguiente. Esto resulta en la oligomerización de tres a cuatro moléculas que forman un poro selectivo a cationes (Dusan, 2009).

Las toxinas del grupo III tienen de 30-40 kDa y están formados por citolisinas con o sin actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), un ejemplo de esto se puede observar en el veneno de *Urticina piscivora*, que posee una actividad hemolítica y citolítica en células cancerosas. Las toxinas del grupo IV son citolisinas tiol-activadas que tienen un peso molecular aproximado de 80 kDa, estas citolisinas se encontraron en el veneno de *Metridium senile*, una anémona situada en el noroeste de Europa, cuyo efecto hemolítico es inhibido por colesterol (Frazao y col., 2012).

Las citolisinas con actividad de PLA<sub>2</sub> se han encontrado en especies de cnidarios de todas las clases, éstas catalizan la hidrólisis de los enlaces 2-acil éster de los fosfolípidos 3-sn produciendo ácidos grasos y lisofosfolípidos (Nevalainen y col., 2009). Inicialmente la PLA<sub>2</sub> fue descubierta en el veneno de cobra, razón por la cual siempre se sostuvo que esta enzima estaba enfocada a la digestión; sin embargo ahora se sabe que se encuentra en venenos de una gran variedad de especies, además de presentar efectos farmacológicos diversos difícilmente relacionados con



la clásica actividad catalítica. Por ejemplo, uno de estos efectos producidos por las PLA<sub>2</sub> de secreción destaca la actividad neurotóxica, miotóxica, anticoagulante y hemolítica (Kini, 2003); además de que estas enzimas tienen muchos roles importantes en el catabolismo de lípidos de la dieta, en el metabolismo de la membrana celular y en enfermedades inflamatorias. Se asocian con la toxicidad de muchos grupos animales, como serpientes, insectos, moluscos, cnidarios y esponjas (Frazao y col., 2012).

## B. Neurotoxinas.

De entre la gran variedad de toxinas desarrolladas naturalmente por los distintos seres vivos, aquellas que ejercen su actividad tóxica sobre el tejido nervioso, afectando así a la estructura y correcta función de los elementos neuronales, reciben el nombre de neurotoxinas (Kiernan y col., 2005). En general, la mayor parte de éstos agentes actúan como ligandos altamente específicos de proteínas presentes en las células nerviosas. Debido a la complejidad estructural, química y homeostática del sistema nervioso; particularmente el de los vertebrados; no es extraño que las sustancias neurotóxicas sean tan numerosas. La actividad de este tipo de moléculas suele caracterizarse por la habilidad de inhibir el control neuronal sobre las concentraciones de iones a través de la membrana celular, la comunicación entre las neuronas a través de la sinapsis o incluso provocar la despolarización de las mismas.

El término de canales iónicos se aplica a ciertos elementos macrocelulares de naturaleza proteica insertos en las membranas de las células excitables; su función es producir y transducir señales eléctricas. Las neurotoxinas derivadas de cnidarios generalmente son péptidos que actúan sobre diversos canales iónicos de este tipo. Por ejemplo, algunas toxinas de anémonas actúan sobre canales de sodio dependientes de voltaje (Na<sub>v</sub>) bloqueando o retrasando la inactivación de los mismos y, por lo tanto, prolongando la duración del potencial de acción en el músculo y en las neuronas (Salceda y col., 2002). Este hecho se debe al enlace de la toxina con el receptor en el sitio 3 en la subunidad  $\alpha$  del canal (Kem y Turk,

2009). Éste mecanismo no es poco común, ya que las llamadas  $\alpha$ -toxinas del escorpión y las  $\delta$ -atracotoxinas encontradas en algunas especies de arañas, también se unen al sitio receptor 3 de este tipo de canales. Otro ejemplo puede ser la tetrodotoxina (TTX) del pez globo (familia Tetraodontidae), la cual también actúa inhibiendo los canales ( $\text{Na}_v$ ), con la diferencia de que esta actúa sobre el sitio 1 de la subunidad  $\alpha$ , conocido como el receptor de compuestos heterocíclicos (Marban y col., 1998).

Las toxinas de cnidarios que actúan sobre canales de potasio voltaje dependiente ( $\text{K}_v$ ), fueron descubiertas en la década de los noventas. Estas toxinas polipeptídicas de 3-5 kDa. pueden ser agrupadas en cuatro clases estructurales de acuerdo a sus residuos de aminoácidos: tipo I con 35-37 residuos aminoácidos y tres puentes disulfuro, los cuales bloquean a los canales  $\text{K}_v1$ ; tipo II con 58-59 residuos y tres puentes disulfuro, las cuales también bloquean al canal  $\text{K}_v1$ , sin embargo, con menor potencia en comparación con los anteriores; tipo III con 41-42 residuos y tres puentes disulfuro, por lo general este tipo de toxinas bloquean de manera selectiva los canales  $\text{K}_v3$ ; y tipo IV con 28 residuos y dos puentes disulfuro. Generalmente estas toxinas bloquean de manera reversible la corriente de potasio y pueden bloquear canales iónicos ácido-sensibles, que son permeables a varios cationes (Kem y Turk, 2009). Incluso dentro de la misma clase estructural, las toxinas pueden diferir en selectividad por diferentes subtipos de canales (Frazao y col., 2012).

### C. Metabolitos secundarios.

Un gran número de metabolitos secundarios con efectos biológicos importantes se han encontrado en organismos del phylum cnidaria, principalmente en la clase Anthozoa. La mayoría de los metabolitos hasta ahora encontrados son de naturaleza terpenoide o esteroidea; de los cuales, los más numerosos son los llamados cembranoides, que son moléculas diterpenoides que se componen por un anillo de 14 carbonos y distintos grados de átomos de oxígeno. Un ejemplo es la lofotoxina, una lactona diterpenada aislada originalmente de los corales blandos del

género *Lophogeorgia*, que provoca un bloqueo irreversible en los receptores neuromusculares de la acetilcolina (Figura 4).

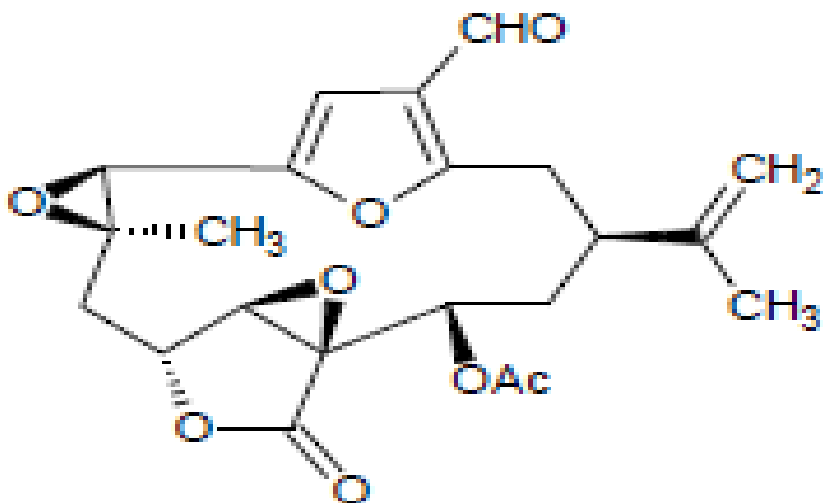


Figura 4. Estructura química de la lofotoxina, derivada del género *Lophogeorgia*.

Por otra parte, la toxina marina más potente en cuanto a sus efectos letales que hasta ahora se ha encontrado en el veneno de algún cnidario es la palitoxina (Figura 5), un complejo compuesto poliéter que fue aislado originalmente de zoantidos (Anthozoa) del género *Palythoa*, además de ser encontrada en especies de la subclase Octocorallia como en la *Radianthus macrodactylus* y en algunos dinoflagelados de forma libre. Ésta toxina ha afectado a todo tipo de células sobre las que se ha estudiado, por lo que se le han adjudicado diversos efectos farmacológicos; uno de los más estudiados es su afinidad específica a la bomba de Na, K-ATPasa, convirtiéndola en un canal iónico que a la postre despolariza la membrana celular (Hoffman et al., 2008).

Otra característica de la palitoxina es que al ser administrada de forma intravenosa en ratones, provoca convulsiones bastante violentas a dosis bajas, provocando la muerte instantánea en algunos casos, y daños histopatológicos en algunos otros (Kem y Turk, 2009). La determinación de la estructura de estas toxinas fue muy difícil ya que los protocolos de RMN no estaban disponibles cuando se empezaron a investigar. Más tarde la finura de la síntesis orgánica dio como resultado una palitoxina idéntica al compuesto natural, pero requiere de al menos 65 pasos.

Hasta ahora se han encontrado pocos metabolitos secundarios de la clase Hydrozoa, por lo tanto aún no se conocen a fondo sus propiedades. Algunos de ellos son las  $\beta$ -carbolicinas aisladas del hidroide *Aglaopheria pluma*; el hidralmanol A que fue aislado de la *Hydrallmania falcata* y las abietinarias A y B extraídas de las especies de *Abietinaria* (Pathirana y col., 1990).

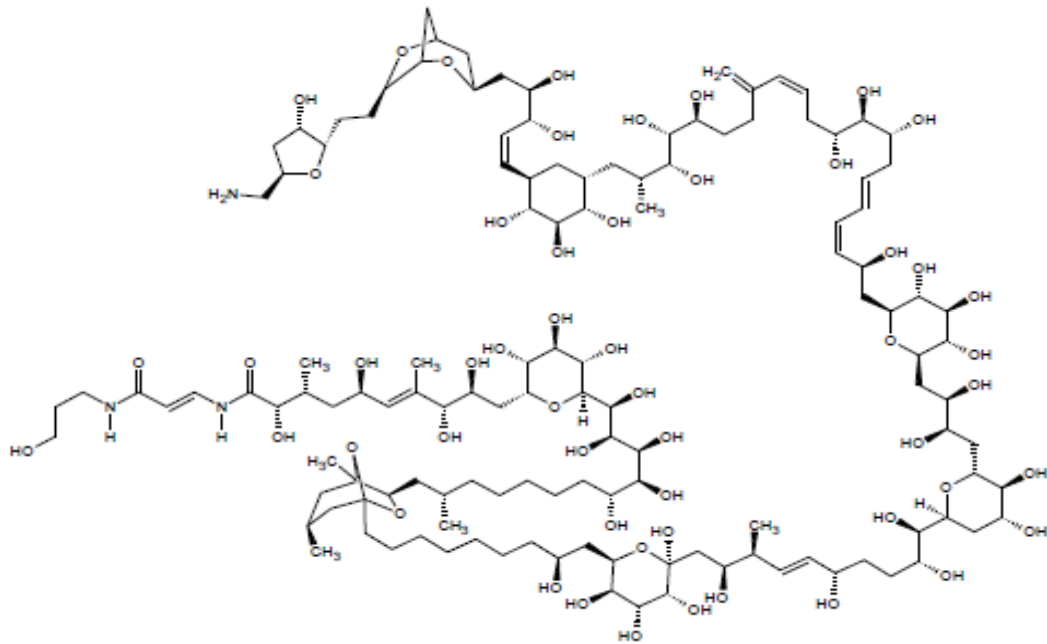


Figura 5. Estructura química de la palitoxina.

## 1.2. Genero *Millepora*.

### 1.2.1. Corales de fuego.

Los hidrocorales del genero *Millepora* (phylum Cnidaria; clase Hidrozoa) son los segundos organismos constructores de arrecifes más abundantes en todo el mundo, siendo los primeros los corales escleractínios. Sin embargo, a pesar de su amplia distribución en los arrecifes de coral alrededor del planeta, las especies del genero *Millepora* han recibido relativamente poca atención en estudios de arrecifes (Lewis, 2006).

Las “milleporas” secretan un esqueleto calcáreo que, dependiendo de la especie de la que se trate y el lugar donde crezca, desarrolla distintas formas, adaptándose así a su entorno. Por ejemplo, si se encuentran en un sitio donde la corriente no es muy rápida, el esqueleto calcáreo adopta una forma de red en la que sus ramas son delgadas. Si la corriente es más fuerte, desarrolla ramas gruesas como astas de ciervo y, si vive en lugares de corrientes muy intensas y/o de fuerte oleaje, lo que sucede es que desarrolla una delgada capa que se incrusta al lecho marino, garantizando su crecimiento (Veron, 2000). A menudo son de tamaño considerable, razón principal por la que reciben el nombre de hidrocorales, algunas de estas formas se muestran en la Figura 6.

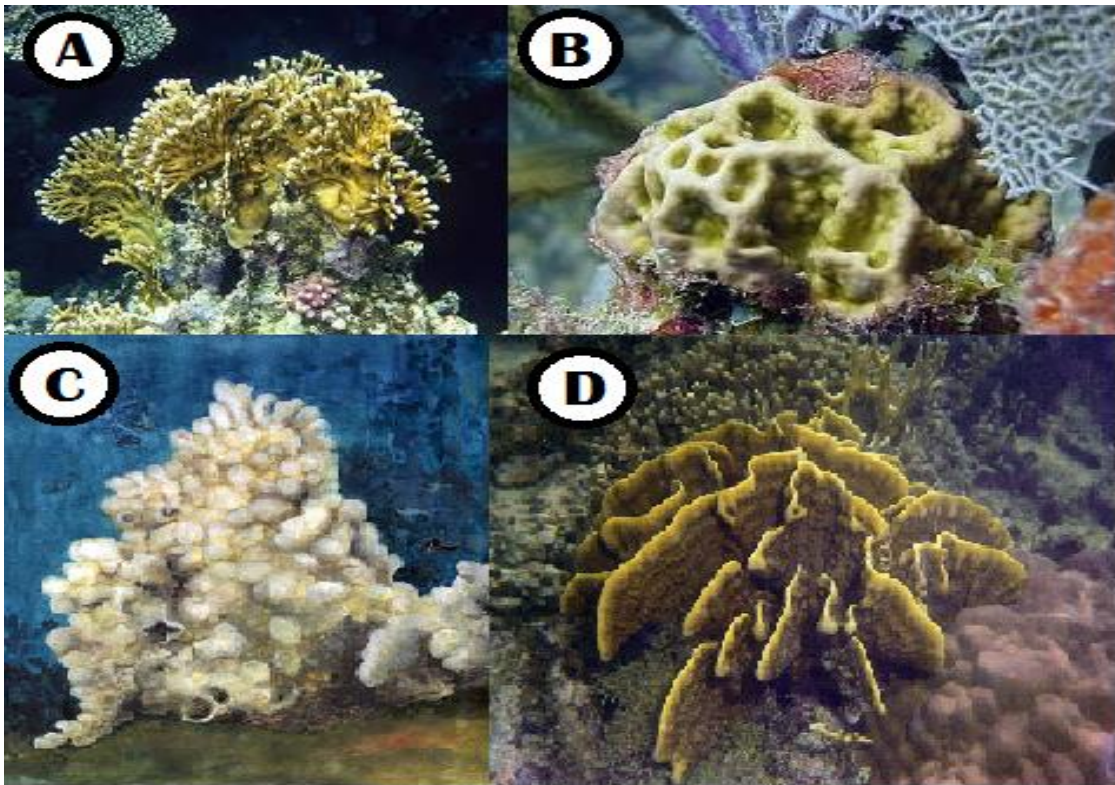


Figura 6. Distintas especies y formas del género *Millepora*: A) *Millepora dichotoma*; B) *Millepora squarrosa*; C) *Millepora boschmai* y D) *Millepora platyphylla*.

Los pólipos defensivos y de alimentación sobresalen a través de los “*miles de poros*” en el esqueleto, estos pólipos contienen un veneno tóxico poco estudiado

(Lewis, 2006). Cuando los pólipos de las especies de *Millepora* se ponen en contacto con la piel humana, pueden provocar dolor intenso, erupciones y ampollas, como resultado de la liberación de las toxinas no identificadas (Sagi y col., 1987; Bianchini y col., 1988), por lo que comúnmente reciben el nombre de “corales urticantes” o “corales de fuego”. La reacción usual al envenenamiento por coral de fuego esta generalmente limitada a irritación local y dolor punzante que se produce con una decoloración eritematosa de forma lineal (Figura 8). Esto puede ser seguido por urticaria y prurito. Estos síntomas desaparecen a través de un periodo de 1-2 semanas, ocasionalmente dejando áreas hiperpigmentadas. (Moats, 1992). No obstante, se ha reportado que estas toxinas son capaces de inducir efectos tóxicos sistémicos en humanos, incluyendo síndrome nefrótico, falla renal aguda, y edema pulmonar (Prasad y col., 2006).

#### 1.2.2. Relación simbiótica entre especies del género *Millepora* y algunas micro algas marinas.

Al igual que en los llamados “corales verdaderos” de la clase Anthozoa, en los tejidos de los hidrocorales se desarrollan algas microscópicas mejor conocidas como zooxantelas, que están mayormente representadas por los géneros: *Zooxantella* o *Symbiodinium*. Las zooxantelas son algas fotosintéticas que necesitan luz solar y que tienen una relación simbiótica con la colonia (Venn y col., 2008). Su concentración puede ser de hasta 1 millón de células por centímetro cuadrado, motivo por el cual los arrecifes se encuentran de 25 a 70 m de profundidad en aguas claras, ya que a mayor profundidad, la capacidad fotosintética del alga se ve disminuida. En esta simbiosis mutualista, tanto el hidrocoral como las zooxantelas se benefician, ya que el primero le provee a las segundas un ambiente seguro, además de nutrientes tales como dióxido de carbono, fósforo, nitrógeno y componentes del desecho de la respiración celular del hidrocoral. A cambio, sus simbioses le proveen productos fotosintéticos como oxígeno y moléculas orgánicas provenientes de la fijación de dióxido de carbono, aumentando la capacidad de la colonia para depositar carbonato de calcio. A su

vez, y como ya se ha dicho, estos utilizan sus pólipos para atrapar el plancton que está asociado a los arrecifes; sin embargo un dato importante es que la contribución energética total de las zooxantelas es mucho mayor que la obtenida por parte del consumo del plancton (Sumich, 1999). Es muy importante tener en cuenta que sin esta asociación simbiótica, la riqueza en biodiversidad de diversos grupos de invertebrados y peces que vemos en los arrecifes no sería posible. Un ejemplo muy claro es que las aguas tropicales son relativamente pobres en nutrientes, sin embargo es aquí donde los arrecifes se desarrollan con más facilidad. Por otra parte en las altas latitudes, donde existen grandes cantidades de nutrientes, el crecimiento de las algas se ve estimulado; lo que ocasiona que crezcan más rápido que el coral, compitiendo así por el espacio en el arrecife (Castro y Huber, 2000).

### 1.2.3. Blanqueamiento de arrecifes de coral.

Como se mencionó anteriormente, los corales e hidrocorales tienen la capacidad de almacenar millones de zooxantelas y, dado que éstas presentan un color café dorado necesario para sus procesos fotosintéticos, el cnidario presenta una coloración semejante en condiciones normales. Sin embargo existe un fenómeno que atañe a la relación simbiótica entre ambos organismos y que incluso la pone en peligro, al cual se le conoce comúnmente como “blanqueamiento” o “blanqueamiento coralino”. Éste cambio puede entenderse como la pérdida o expulsión de las zooxantelas por parte del coral, ocasionando que sus procesos fotosintéticos y su alimentación se vean interrumpidos; hablando en otras palabras, disfunción simbiótica (Hoegh-Guldberg, 1999). Por lo tanto, durante éste proceso se pierde la pigmentación normal de los tejidos de los hidrocorales, dejando al descubierto el blancuzco exoesqueleto de carbonato de calcio (Figura 7).

El proceso de blanqueamiento ocurre cuando las condiciones necesarias para mantener a las zooxantelas de los corales no se mantienen. Cualquier desencadenante ambiental que afecta la habilidad del coral a suplir de nutrientes para la fotosíntesis (dióxido de carbono, amonio) dará lugar a la expulsión de

dichas algas. Este proceso se desencadena poco a poco, por lo cual el coral tendrá un fracaso en prevenir la división celular de zooxantelas, provocando que una mayor cantidad de carbón derivado de la fotosíntesis se desvíe hacia el alga en lugar de ir al hidrocoral. Esto provoca que el balance de energía requerido por el coral no sea el suficiente, imposibilitando que continúe manteniendo al alga, por lo tanto el coral pierde la habilidad para mantener el control sobre sus simbioses (Sutherland y col, 2004). Se ha reportado que en ocasiones, el blanqueamiento puede conducir a la muerte de algunas especies que lo llegan a padecer; sin embargo, esto depende de la velocidad de adaptación por parte del cnidario y la especie de la que se trate. Por ejemplo, se ha encontrado que algunas especies del género *Millepora* pueden sobrevivir hasta cuatro semanas en ausencia de sus zooxantelas, mientras que ciertas especies como *Acropora cervicornis*, conocido como tarro de venado, no duran más de una semana (Lewis, 2006). Además de esto, aquellos cnidarios que llegan a recuperarse del blanqueamiento, nunca llegan a hacerlo del todo, ya que muestran un decremento en su crecimiento y calcificación, así como mayor riesgo a padecer enfermedades. Lo más grave de esto es que no solo los corales e hidrocorales son afectados, sino que también todo el ecosistema marino donde ocurre el blanqueamiento, ya que existen innumerables organismos que viven y dependen de los arrecifes de coral (Banaszak y col., 2003; Lewis, 2006).

Se ha demostrado que el blanqueamiento es desencadenado por diversos factores, de los cuales los más importantes son la elevación de la temperatura del océano en combinación con niveles elevados de radiación ultravioleta en días muy soleados (Hoegh-Guldberg, 2007). Por ejemplo, hay datos del siglo XX donde se observó el fenómeno en el momento en que las temperaturas de los océanos aumentaron en promedio 0.74°C (1.33°F) y sus niveles subieron 17 cm (6.7 in). Cuando las temperaturas de los océanos llegan a encontrarse más altas que de costumbre - incluso a veces tan solo 1°C (1.8°F) por encima de la máxima normal de verano - parte de la maquinaria fotosintética de las zooxantelas se daña y se forman radicales de oxígeno peligrosos, como consecuencia, el coral comienza a expulsarlas, desencadenando el blanqueamiento (Alcolado, 1999). Algunos



estudios con dinoflagelados simbiontes (Warner et al. 1996) sugieren que la combinación de estos dos factores produce una llamada fotoinhibición y daño en los cloroplastos de las algas. Un ejemplo de esto es el mecanismo que involucra a la proteína D1 del fotosistema II. Esta proteína llega a dañarse durante la elevación en la temperatura, lo cual sobrepasa los mecanismos normales de reparación, resultando en la disfunción completa del mencionado fotosistema II. Además también tienden a dañarse las membranas que se ocupan de la fotofosforilación, causando alteraciones en la cadena respiratoria.



Figura 7. Arrecife de coral bajo efectos del blanqueamiento. Cuando las zooxantelas mueren, el coral sufre un proceso de estrés y expulsa al protozoo, por lo que pierde la pigmentación y se blanquea.

Otros mecanismos que favorecen el blanqueamiento, aunque en menor medida, son los cambios en la salinidad y en la química del agua. Por ejemplo, un causante del incremento de acidez en los océanos es el aumento del CO<sub>2</sub> en la atmósfera,

pues este gas no sólo es un problema atmosférico, también se disuelve en las aguas marinas, provocando que se obstaculice la formación de carbonato de calcio imprescindible para la formación del esqueleto de los corales y otros organismos marinos como moluscos y crustáceos (Carrodeaguas y col., 1995).

#### 1.2.4. Toxicidad y estudios previos de especies del género *Millepora*

En estudios toxicológicos iniciales sobre organismos de este género se encontró que los venenos de las especies *M. alcicornis*, *M. tenera*, *M. dichotoma* y *M. platyphylla* producen efectos letales, hemólisis y dermonecrosis en ratones (Wittle y col., 1971; Middlebrook y col., 1971; Wittle y col., 1974; Wittle y Wheeler, 1974; Radwan, 2002). En esos estudios se encontraron evidencias que sugieren que los efectos inducidos por esos venenos son toxinas proteínicas.

En otro estudio, se detectó una proteína hemolítica de 31.5 kDa con actividad de PLA<sub>2</sub> en el veneno de *M. plantiphyla* colectada en el Mar Rojo. Esta proteína se nombró milleporina-1 y muestra una alta recuperación de actividad de PLA<sub>2</sub> así como una actividad hemolítica 13 veces mayor que la del extracto completo.

En este estudio, los autores sugirieron que el efecto hemolítico producido por el veneno de este hidrocoral se debe en parte a una acción enzimática de PLA<sub>2</sub> sobre los lípidos membranales, la cual es facilitada por un posible enlace con una parte no enzimática de la toxina. (Radwan y Aboul-Dahab, 2004).



Figura 8. Lesiones locales causadas por el contacto con especies del género *Millepora*.

Estudios llevados a cabo por el equipo de investigadores del Departamento de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de la Facultad de Química de la UAQ mostraron que el veneno de *M. complanata*, una especie ampliamente distribuida en el Caribe Mexicano (Figura 9), provoca una estimulación dependiente de concentración de contracciones espontáneas en segmentos de íleon aislados de cobayo (Rojas y col., 2002).

En otros estudios realizados por este mismo grupo se demostró que el veneno de este hidrocoral induce hemólisis sobre eritrocitos de rata y exhibe actividad de PLA<sub>2</sub>. Cuando se incubó previamente el extracto en presencia de 2,4-dibromoacetofenona, un inhibidor del sitio catalítico de PLA<sub>2</sub>, se observó una disminución significativa del efecto hemolítico, lo cual muestra una relación entre la actividad de PLA<sub>2</sub> con la actividad hemolítica. Por otra parte, se encontró que el extracto de *M.*

*complanata* también provoca una contracción dependiente de la concentración en aorta aislada de rata. Después de eso, se llevó a cabo una serie de experimentos para investigar el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y extracelular en el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de *M. complanata*. De este modo se mostró que cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular está ausente, la respuesta contráctil del extracto se reduce significativamente, pero no es anulada por completo. Adicionalmente, el agotamiento del retículo sarcoplásmico, vía tratamiento combinado de rianodina/cafeína, disminuye significativamente la vasoconstricción. Estos resultados sugieren que el extracto de *M. complanata* induce vasoconstricción no solo por el incremento del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, sino también por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de reservas intracelulares (Ibarra- Alvarado y col., 2007).

En otra serie de experimentos, se encontró que al desnaturalizar el contenido de proteínas en el extracto de *M. complanata*, incubado en baño de agua hirviendo por 20 minutos, las actividades hemolítica y de  $\text{PLA}_2$  se inhibieron completamente. Por otra parte, el efecto vasoconstrictor del extracto se redujo significativamente tras la desnaturalización de su contenido de proteína, pero no se inhibió completamente. Este efecto vasoconstrictor no se afectó de manera significativa por el blanqueamiento. Los resultados de estos estudios indicaron que *M. complanata* produce proteínas citolíticas con propiedades que incluyen actividad de  $\text{PLA}_2$  y actividad hemolítica, así como compuestos termoestables y termolábiles que inducen en conjunto efectos contráctiles en células de músculo liso vascular e intestinal (García-Arredondo y col., 2011).



Figura 9. Fotografía subacuática de *Millepora complanata* en el Caribe Mexicano.

Continuando con el estudio toxicológico de *M. complanata*, se realizaron experimentos para evaluar la toxicidad sistémica inducida por el extracto acuoso de *M. complanata* en ratones. Los resultados obtenidos de estas evaluaciones indicaron que la administración intravenosa del extracto induce convulsiones violentas y muerte en ratones en menos de un minuto a dosis de 4.62  $\mu\text{g}$  de proteína/ g de peso corporal. Dosis más pequeñas producen una muerte lenta acompañada de hemoglobinuria, inflamación ocular y daños histopatológicos en pulmón y riñón atribuidos a la presencia de citolisinas. Los cambios histopatológicos fueron completamente eliminados después de la incubación del extracto en condiciones de desnaturalización. Inesperadamente, el extracto desnaturalizado conservó su efecto letal. Estos resultados sugieren que el extracto de *M. complanata* contiene hemolisinas que pueden ser responsables de los cambios histopatológicos observados en riñón y pulmón (García, 2013). Es



probable que este tipo de citolisinas estén relacionadas a la toxicidad sistémica en humanos debido al contacto con *Millepora spp.*, ya que, como se dijo antes, existen reportes de síntomas que incluyen síndrome nefrótico, falla renal aguda, y edema pulmonar (Prasad y col., 2006). Estos estudios, también muestran que el veneno de este hidrocoral contiene otras toxinas termoestables indefinidas, probablemente metabolitos secundarios que tienen efectos letales en ratones (Rojas-Molina et al., 2012). En un análisis cromatográfico preliminar del extracto de este hidrocoral, por cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa (HPLC), se obtuvieron 19 fracciones (F1 a F19). La fracción F4 indujo hemólisis y contuvo principalmente una proteína de 30 kDa, probablemente una enzima PLA<sub>2</sub>, mientras las fracciones F8 y F11 contuvo principalmente proteínas de 15 y 17 kDa respectivamente que producen efectos vasoconstrictores (Ibarra-Alvarado y col., 2007).

Con la finalidad de identificar algunos de los principales componentes bioactivos presentes en el extracto de *M. complanata*, se realizó un análisis cromatográfico biodirigido empleando inicialmente una cromatografía de intercambio iónico. La fracción MC1 obtenida de este análisis se sometió a un segundo análisis cromatográfico por exclusión. Dos de las fracciones obtenidas a partir de este segundo análisis cromatográfico MC1-I y MC1-II, se sometieron a un análisis mediante HPLC en fase reversa. Las tres primeras fracciones obtenidas del fraccionamiento de MC1-I por HPLC indujeron vasoconstricción significativa sobre los segmentos de aorta aislados de rata. En estas fracciones no se logró detectar cantidad de proteína ni se observaron bandas en los análisis por electroforesis, indicando que estas fracciones son compuestos no proteínicos. Dado que los efectos contráctiles inducidos por estas fracciones son claramente diferentes uno del otro, es posible que los compuestos responsables de estos efectos estén actuando mediante mecanismos de acción diferentes, es probable que en la fracción MC1-IC, que presenta un efecto vasoconstrictor transitorio, se encuentre presente algún componente que induce la liberación de calcio de los almacenes intracelulares. Por otro lado, las fracciones MC1-IA y MC1-IB posiblemente producen vasoconstricción mediante un mecanismo que involucra la entrada de calcio intracelular (García, 2013).

Por otra parte, el análisis y purificación de MC1-II arrojó varias fracciones, de las cuales la más importante fue MC1-IIA ya que al administrarse en ratones por vía intravenosa produjo una muerte inmediata similar a la observada con el extracto completo. Mediante los métodos de Bradford y Lowri no se logró la detección de proteínas en esta fracción. El análisis mediante electroforesis con tinciones de plata y Coomassie tampoco indicó la presencia de bandas de proteína. Sorpresivamente, esta fracción presentó actividad hemolítica cuando se incubó durante 4 horas en presencia de los eritrocitos, indicando que en el veneno de *M. complanata* se encuentran presentes metabolitos secundarios con efectos citolíticos lentos que además inducen efectos letales inmediatos en ratones (García, 2013).

Considerando que el hidrocoral *M. complanata* está ampliamente distribuido en arrecifes de coral de zonas turísticas del Caribe Mexicano y que son comunes los casos de quemaduras causadas por el contacto con esta especie, causando lesiones locales para las que no se conoce un tratamiento adecuado. En la presente propuesta de investigación se planteó realizar un estudio dirigido a la caracterización del efecto y naturaleza química de las hemolisinas presentes en el veneno de *M. complanata*. Ya que esta información es importante para desarrollar terapias adecuadas para tratar las lesiones. Así mismo, los resultados derivados de este estudio también ayudarán al entendimiento del mecanismo involucrado en la toxicidad del veneno de esta y otras especies del mismo género, ya que los antecedentes muestran que en algunos casos puede haber complicaciones sistémicas además del desarrollo de lesiones locales.

## **2. HIPÓTESIS**

En el veneno de *M. complanata* se encuentran presentes metabolitos secundarios capaces de desencadenar un efecto hemolítico lento y hemolisinas proteínicas termolábiles que actúan de una forma más rápida y efectiva.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. General

Evaluar la actividad hemolítica *in vitro* del veneno de *M. complanata*, bajo diferentes condiciones experimentales.

#### 3.2. Específicos

- Evaluar la sensibilidad de eritrocitos de diferentes especies a las hemolisinas presentes en el extracto acuoso de *M. complanata*.
- Evaluar el efecto de cationes divalentes sobre la actividad hemolítica del veneno.
- Evaluar la actividad hemolítica del veneno de *M. complanata* en diferentes tiempos de incubación.
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad hemolítica del veneno de *M. complanata*.
- Preparar extractos etanólicos a partir de fragmentos blanqueados (sin dinoflagelados) y normales de *M. complanata* para evaluar su actividad hemolítica.
- Evaluar la toxicidad de los diferentes extractos mediante inyección abdominal en grillos (*Acheta domestica*) y en zofobas (*Zophoba morio*)

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Material biológico

- Fragmentos del hidrocoral *Millepora complanata*.
- Grillos (*Acheta domestica*)
- Zofobas (*Zophoba morio*)
- Sangre de ratas machos de la cepa Wistar.
- Sangre de cobayo macho (*Cavia porcellus*)
- Sangre de ratón ( CD1)
- Sangre de pollo (*Gallus gallus domesticus*)
- Sangre de humano

#### 4.1.2. Preparación y conservación de los extractos

- Cristalería: embudos matraces Erlenmeyer, matraces bola, probetas y vasos de diferentes capacidades.
- Gradillas
- Celdas desechables para espectrofotómetro.
- Puntas desechables para micropipetas de diferentes capacidades.
- Papel filtro.
- Micropipetas de diferentes capacidades.

#### 4.1.3. Evaluaciones farmacológicas

- Jaulas de acrílico con tapa y recipiente para alimento.
- Tubos Eppendorf diferentes capacidades.

- Puntas desechables para micropipetas de diferentes capacidades.
- Guillotina.
- Jeringas de diferentes capacidades.

## 4.2. Reactivos

### 4.2.1. Preparación, conservación y tratamiento de los extractos

- Solución estándar de proteína (albumina sérica bovina 1.0 mg/mL).
- Solución azul de coomassie (Reactivo de Bradford Bio-Rad).
- Etanol absoluto

### 4.2.2. Evaluaciones farmacológicas

- Cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), D-glucosa, citrato de sodio y ácido cítrico de J.T. Barker.
- Ouabaína de Sigma-Aldrich

## 4.3. Métodos

### 4.3.1. Recolección y transporte de los fragmentos de *M. complanata*.

Se recolectaron fragmentos del hidrocoral mediante inmersiones de buceo a profundidades de 4 a 10 m en arrecifes de coral situados en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos. Posteriormente, el material se congeló, se almacenó en hielo seco y se transportó a nuestros laboratorios en Querétaro para preparar los distintos extractos.

#### 4.3.2. Blanqueamiento artificial de fragmentos de *M. complanata*.

Algunos de los fragmentos recolectados se sometieron a un procedimiento para eliminar a sus dinoflagelados simbioses. Este procedimiento consistió en colocar los fragmentos sobre bases de plastilina en un estanque con agua de mar a una temperatura de 32 °C durante 5 días. Una vez observado el blanqueamiento los fragmentos se almacenaron a -70 °C. Como control, algunos fragmentos se colocaron en estanques con temperatura controlada de 25 °C durante el mismo tiempo que los fragmentos blanqueados estuvieron en el estanque.

#### 4.3.3. Preparación del extracto acuoso de *M. complanata*.

La extracción del veneno contenido en los nematocistos del cnidario fue inducida mediante agitación de los fragmentos en agua desionizada durante 24 horas a 4 °C. El extracto acuoso resultante se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró y se liofilizó, por cada gramo de este polvo liofilizado se agregaron 1.5 ml de agua desionizada, esta nueva mezcla se agitó durante 2 min y se centrifugó nuevamente a 3,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Al sobrenadante obtenido se le determinó la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford (1979) y se almacenó a -70° C.

#### 4.3.4. Preparación de extractos de *M. complanata* con etanol.

Se realizaron extracciones por maceración con etanol absoluto a partir de fragmentos del hidrocoral intacto a fin de comprobar la presencia de hemolisinas no proteínicas altamente polares. Considerando que los hidrocerales, al igual que los corales verdaderos, presentan dinoflagelados simbioses en sus tejidos que les proveen de ciertos nutrientes (Rojas-Molina et al., 2012) se elaboró un extracto etanólico a partir de fragmentos blanqueados (libres de dinoflagelados) y sus controles sin blanquear. Esto para comprobar si los compuestos hemolíticos tienen

su origen en estos simbioses. El tiempo de maceración para ambos extractos fue de 48 horas, los extractos obtenidos se concentraron utilizando un rota-evaporador.

#### 4.3.5. Ensayo de hemólisis.

Para el monitoreo de la actividad hemolítica se utilizaron eritrocitos de ratas machos de la cepa Wistar lavados en una solución de Alsever. Posteriormente se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ l de una suspensión de eritrocitos al 1 % en solución amortiguadora de Alsever y se les agregó la muestra a evaluar disuelta en 50  $\mu$ l de la misma solución. Estas mezclas 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 durante 4 min a 4 °C y el resultado de la hemólisis se evaluó mediante la liberación de hemoglobina haciendo lecturas con un espectrofotómetro ( $\lambda = 415$  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 define como la cantidad de proteína requerida para producir un 50 % de hemólisis.

#### 4.3.6. Caracterización de la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. complanata*.

##### *A. Actividad hemolítica sobre eritrocitos de diferentes especies*

Se determinó el efecto hemolítico del extracto acuoso sobre eritrocitos de humano (hombres jóvenes de 70 kg de peso), Pollo (*Gallus gallus domesticus* machos de 600 g de peso), cobayos (Machos cepa Harley de 450 g de peso), rata (machos cepa Wistar de 250 g) y ratones (machos cepa CD1 de 30 g de peso). El resto de los experimentos sobre actividad hemolítica se realizaron empleando eritrocitos de ratas Wistar machos.

### *B. Actividad hemolítica en presencia de cationes divalentes*

Con el objeto de observar si la presencia de  $\text{Ca}^{++}$  o  $\text{Mg}^{++}$  incrementan la potencia de las hemolisinas presentes en el veneno de *M. complanata* se evaluó su actividad hemolítica en presencia de cationes divalentes a concentraciones de 5 y 10 mM.

### *C. Efecto de la temperatura sobre la actividad hemolítica*

Se determinó la actividad hemolítica del extracto acuoso después de incubar previamente el veneno a diferentes temperaturas (4, 25, 37, 45, 60 y 100°C) durante 30 minutos. Por otra parte, se evaluó la capacidad del extracto para inducir hemólisis a diferentes temperaturas de incubación (20, 25, 28, 30, 34, 37, 40, 43, 46 y 50°C) con los eritrocitos durante 30 min.

### *D. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad hemolítica*

Se determinó la actividad hemolítica del extracto acuoso a diferentes tiempos de incubación (10, 20, 30 y 60 min), a fin de determinar el tiempo óptimo a partir del cual actúan las hemolisinas proteínicas del extracto acuoso.

#### 4.3.7. Evaluación de la actividad hemolítica retardada de los extractos.

Dado que la fracción hemolítica no proteínica, previamente encontrada a partir del extracto acuoso de *M. complanata* (García, 2013), ejerce una actividad hemolítica lenta, se modificó el tiempo de incubación del ensayo de hemólisis de 30 a 4 horas a 37 °C. Este ensayo de hemólisis retardada se empleó para evaluar la actividad de los extractos etanólicos y del extracto acuoso desnaturalizado por calor (20 min a 96 °C).

#### 4.3.8. Ensayo de toxicidad de los extractos.

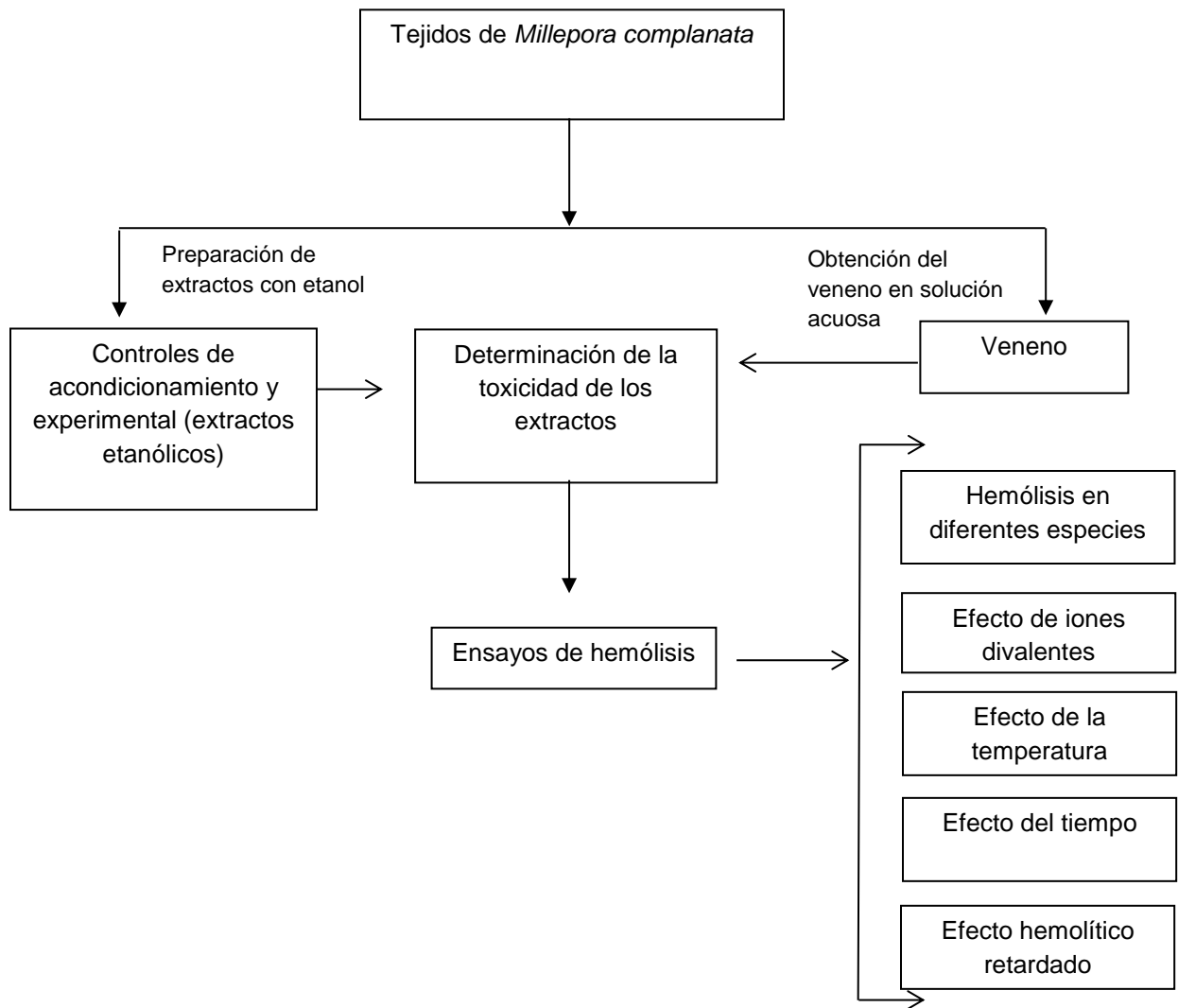
Se evaluó la actividad letal de cada uno de los extractos en grillos (*Acheta doméstica*) y larvas de zofobas (*Zophoba morio*) mediante administración de diferentes dosis (0.1 – 1000 µg / g de peso) en la tercera sección torácica con ayuda de una jeringa de insulina ultra-fina, el volumen de inyección fue siempre menor a 5 µl y se utilizó solución salina para insectos como diluyente y control negativo (pH 7.2; NaCl 200 mM., KCl 3.1 mM., 2 mM. NaHCO<sub>3</sub>, 4 mM. MgCl<sub>2</sub>, 5.4 mM. CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). El procedimiento se repitió dos veces con 6 repeticiones cada uno. Se registraron las muertes a las 24 y 48 horas después de la administración, se estimó la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) mediante el método de Lorke (1983) y mediante un ajuste no lineal.

#### 4.3.9. Análisis estadísticos.

Para la caracterización del efecto hemolítico del extracto de *M. complanata* se realizaron lecturas por triplicado con la sangre de un animal y se construyeron las curvas concentración-respuesta mediante un ajuste no lineal utilizando la ecuación de logaritmo de la concentración contra respuesta. Las UH<sub>50</sub> estimadas con la sangre de tres animales se promediaron y reportaron como la media ± S.E.M. Las comparaciones entre los valores de UH<sub>50</sub> se compararon mediante un ANOVA de una vía (p = 0.05) utilizando el método de Tukey.

Para la evaluación de la actividad insecticida se estimaron los valores de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) mediante en ajuste no lineal utilizando la ecuación de logaritmo del agonista contra respuesta. Los valores se expresaron como la media ± S.E.M. de dos repeticiones. Además, también se calculó el valor de la DL<sub>50</sub> mediante el método de Lorke (1983).

#### 4.4 Diseño experimental





## 5. RESULTADOS

### 5.1. Recolección y transporte de los fragmentos de *M. complanata*.

Los fragmentos de *M. complanata* se recolectaron la zona del arrecife conocida como “Jardines”, situada a no más de tres kilómetros de la costa de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. Las inmersiones de buceo fueron efectuadas por personal calificado del Instituto de Limnología y Ciencias del Mar de la UNAM, bajo la supervisión de la Dra. Judith Sánchez Rodríguez profesora e investigadora de la institución.

Debido a que las normas mexicanas restringen la explotación y venta de las especies pertenecientes al arrecife, así como su extracción del mar bajo cualquier circunstancia, se obtuvo la aprobación para la recolección por parte de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) con permiso de pesca de fomento No. PPF/DGOPA-071/13 con No. De folio 071/13, mismo que fue aprobada *in situ* por parte del Biólogo Óscar Álvarez Gil, director de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos.

El procedimiento de extracción de los especímenes se llevó a cabo mediante fragmentación del hidrocoral con martillo y cincel, esto para facilitar el desprendimiento del mismo, ya que el hidrocoral cuenta con una capa calcárea resistente. Dado que las condiciones bajo el agua no son las más idóneas para calcular un peso determinado, el equipo optó por recolectar una medida aproximada a medio metro cuadrado del material biológico, éstos fragmentos se almacenaron en bolsas de plástico herméticas que contenían agua de mar para no alterar las condiciones originales. Inmediatamente después de la colecta se transportaron las muestras al laboratorio para su posterior tratamiento y almacenamiento final.

## 5.2. Blanqueamiento artificial de fragmentos de *M. complanata*.

El total de fragmentos recolectados fueron divididos en tres partes equitativas, de las cuales una fue almacenada inmediatamente después del muestreo a condiciones de temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , a ésta parte se le denominó “control directo”; otro tercio de los fragmentos fue sometido al proceso de desprendimiento de dinoflagelados también llamado blanqueamiento artificial o inducido, denominado “control experimental”. La última parte se denominó como “control de acondicionamiento”, ya que sus fragmentos fueron igualmente sumergidos en un tanque artificial, pero sin la elevación de temperatura que provoca el desprendimiento de los dinoflagelados simbiotes.

Como resultado del blanqueamiento (Figura 10), se observó que el control experimental comenzó a cambiar ligeramente al tercer día después de ser sumergido en el tanque, sin ser muy evidente el proceso de desprendimiento. Sin embargo, entre el cuarto y quinto día de ser expuestos a las condiciones mencionadas, se observó notablemente el cambio de coloración del amarillo característico de *M. complanata* a un tono más blanquecino, indicando más a simple vista el blanqueamiento esperado.

## 5.3. Obtención de los extractos.

Para la obtención del extracto acuoso a partir de los fragmentos del “control directo” se emplearon 1.6 kg (peso húmedo) de fragmentos. Por cada 100 g de estos fragmentos se obtuvieron 0.625 g de polvo liofilizado (3.077 % de proteína). De este polvo liofilizado se procesaron 2.34 g para la obtención del extracto etanólico, obteniéndose un total de 0.253 g de extracto seco (0.000 % de proteína).

En cuanto a la preparación de los extractos etanólicos por maceración directa de los fragmentos de *M. complanata* se obtuvieron 0.743 g de extracto seco (0.067 % de proteína) por cada 100 g (peso húmedo) de fragmentos blanqueados del control experimental y 0.279 g de extracto seco (0.699 % de proteína) por cada 100 g de fragmentos de control de acondicionamiento.



Figura 10. Fragmentos de *Millepora complanata* normales y blanqueados.

#### 5.4. Caracterización de la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. complanata*.

##### 5.4.1. Actividad hemolítica sobre eritrocitos de diferentes especies.

Para éste experimento se determinó la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. complanata* sobre eritrocitos de diversas especies. Estos resultados mostraron que el extracto indujo actividad hemolítica, de manera dependiente de la concentración, en todas las especies en las que se evaluó (Figura 11). Se realizaron comparaciones entre los valores de las  $UH_{50}$  y no se observaron diferencias significativas entre las actividades hemolíticas sobre muestras de cobayo, rata y ratón. Se observó una ligera diferencia, no significativa estadísticamente, entre las actividades sobre humano y roedores. Indudablemente, los eritrocitos de pollo fueron menos susceptibles a la lisis inducida por el extracto acuoso de *M. complanata*, ya que éste mostró actividad hemolítica menos potente y menos eficiente. En el Cuadro 1 se muestran los valores promedio de las  $UH_{50}$  y sus efectos máximos ( $E_{max}$ ) obtenidos para la actividad hemolítica del extracto sobre los distintos tipos de eritrocitos.

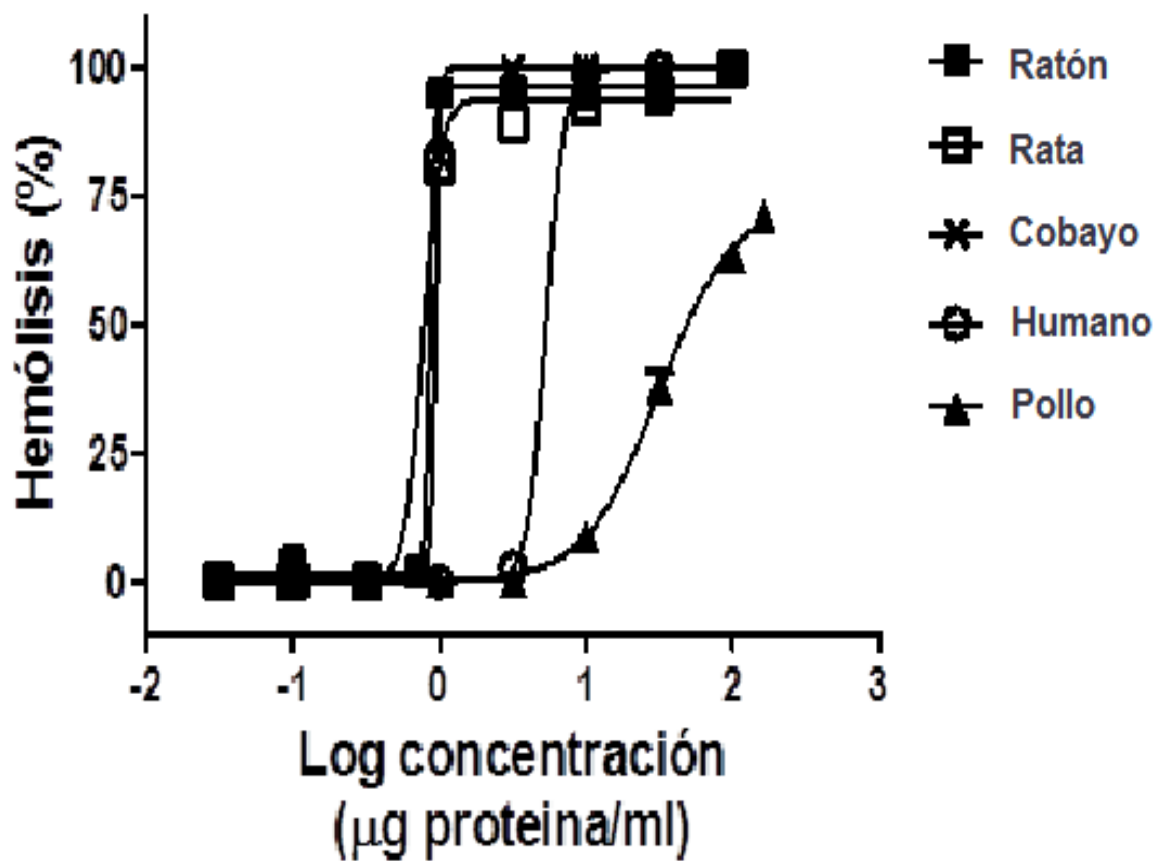


Figura 11. Curvas concentración-respuesta de la actividad hemolítica del extracto de *M. complanata* sobre eritrocitos de distintas especies.

Cuadro 1. Valores de las unidades hemolíticas medias ( $UH_{50}$ ) y efectos máximos ( $E_{max}$ ) de la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. complanata* sobre eritrocitos de diferentes especies.

<b>Especies</b>	<b><math>UH_{50}</math> (<math>\mu\text{g}</math> proteína/ml)</b>	<b><math>E_{max}</math> (% de hemólisis)</b>
Humano	$5.36 \pm 0.88$	$99.78 \pm 0.98$
Pollo	$24.55 \pm 6.93^*$	$80.85 \pm 6.82$
Cobayo	$0.56 \pm 0.01$	$105.45 \pm 2.15$
Rata	$0.49 \pm 0.09$	$98.87 \pm 3.34$
Ratón	$0.80 \pm 0.03$	$107.15 \pm 1.65$

#### 5.4.2. Evaluación de la actividad hemolítica en presencia de cationes divalentes.

En el Cuadro 2 se muestran los valores de las  $UH_{50}$  de las actividades hemolíticas del extracto acuoso de *M. complanata* sobre eritrocitos de rata en presencia de los iones catiónicos  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Estos resultados mostraron que no hubo cambios significativos en la actividad hemolítica del extracto en presencia de los cationes divalentes.

Cuadro 2. Valores de las unidades hemolíticas medias ( $UH_{50}$ ) del extracto acuoso de *M. complanata* en presencia de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ .

Control	Cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ) ( $\mu g$ de proteína/ml)		Cloruro magnesio ( $MgCl_2$ ) ( $\mu g$ de proteína/ml)	
	5 mM	10 mM	5 mM	10 mM
$0.48 \pm 0.12$	$0.45 \pm 0.04$	$0.35 \pm 0.19$	$0.68 \pm 0.37$	$0.39 \pm 0.19$

#### 5.4.3. Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad hemolítica.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. complanata* se realizaron dos ensayos, en uno de ellos se evaluó el efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad hemolítica del extracto (Cuadro 3). En estos resultados se observó que las citolisinas proteínicas presentes en el extracto presentan un amplio rango de temperatura a la cual pueden inducir hemólisis.

El otro ensayo para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad hemolítica del extracto acuoso consistió en incubar previamente el extracto a diferentes temperaturas para después evaluar su actividad (Cuadro 4). Estos resultados indicaron que las citolisinas proteínicas presentes en el extracto comenzaron a perder actividad hemolítica al preincubarlo a 60 °C. Después de la incubación a 100 °C ya no se observó actividad hemolítica (Figura 12).

Cuadro 3. Valores de las unidades hemolíticas medias (UH<sub>50</sub>) del extracto acuoso de *M. complanata* a diferentes temperaturas de incubación.

Temperatura (°C)	UH <sub>50</sub> (µg proteína/ml)
20	1.63 ± 1.14
25	1.18 ± 0.06
28	0.85 ± 0.43
30	0.94 ± 0.02
34	0.62 ± 0.02
37	0.31 ± 0.35
40	0.31 ± 0.06
43	0.32 ± 0.03
46	0.30 ± 0.02
50	0.35 ± 0.01

Cuadro 4. Valores de las unidades hemolíticas medias (UH<sub>50</sub>) del extracto acuoso de *M. complanata* a después de la preincubación a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	HU <sub>50</sub> (µg proteína/ml)
4	0.41 ± 0.12
25	0.35 ± 0.2
37	0.17 ± 0.03
45	0.50 ± 0.07
60	12.97 ± 2.06
100	-



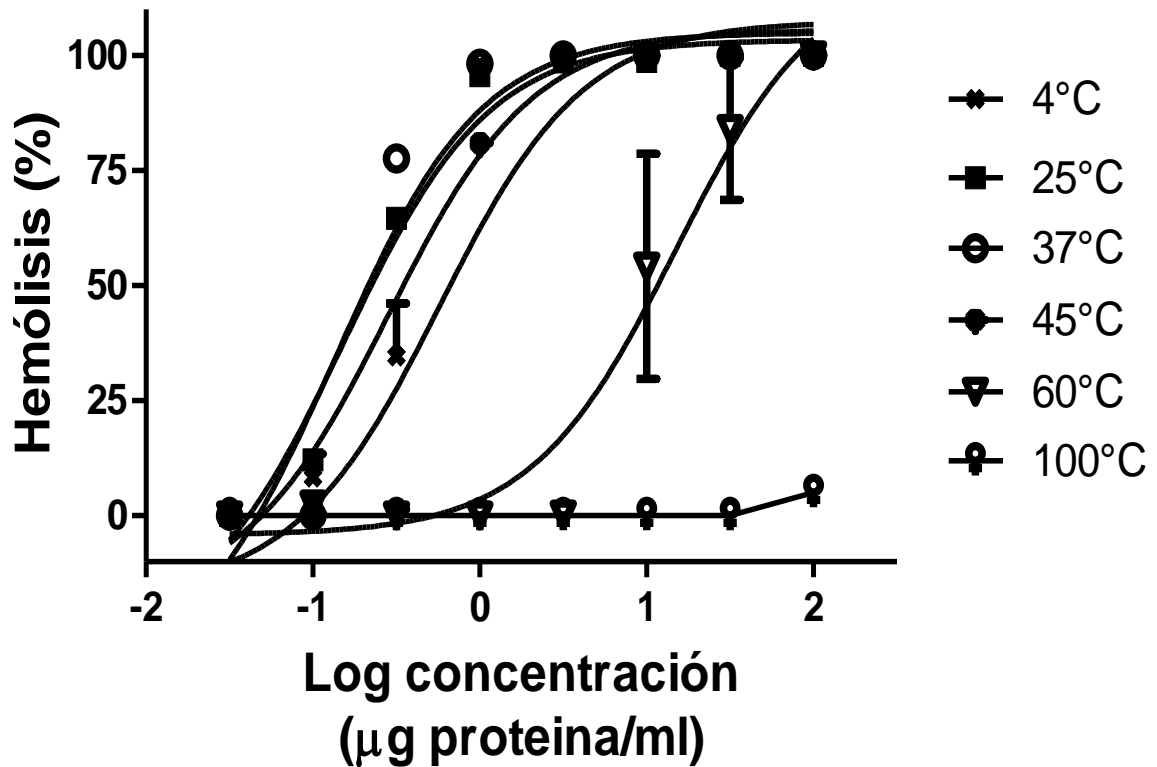


Figura 12. Curvas concentración-respuesta de la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. complanata* después de la incubación a diferentes temperaturas.

#### 5.4.4. Evaluación de la actividad hemolítica a diferentes tiempos de incubación.

Se debe tener en cuenta que todas las especies que segregan algún tipo de toxina desarrollaron esta cualidad por dos razones principales: 1) Para defenderse de sus depredadores y 2) para cazar y alimentarse, convirtiéndose en un mecanismo ambivalente para su supervivencia. Como los cnidarios habitan en un ambiente acuático, donde las presas son más rápidas y escurridizas, se dispuso a determinar la rapidez de la acción hemolítica del veneno variando los tiempos de incubación. Como resultado (Cuadro 5), se observó que el efecto hemolítico se hizo presente a

partir de los diez minutos de incubación sin mostrar diferencias significativas entre los tiempos de mayor duración.

Cuadro 5. Unidades hemolíticas medias (UH<sub>50</sub>) de la actividad hemolítica del extracto de *M. complanata* a diferentes tiempos de incubación.

Tiempo (min)	UH <sub>50</sub> (µg proteína/ml)
10	0.58 ± 0.11
20	0.52 ± 0.14
30	0.41 ± 0.05
60	0.20 ± 0.03

#### 5.5. Determinación de la actividad hemolítica retardada.

Tras evaluar la actividad hemolítica retardada del extracto acuoso desnaturalizado, empleando un tiempo de incubación de 4 horas, se encontró que éste induce actividad dependiente de la concentración (UH<sub>50</sub> = 1,050 ± 45.85 µg/ml). Al evaluar de este mismo modo el efecto hemolítico del extracto etanólico preparado a partir del extracto acuoso se observó un efecto similar (UH<sub>50</sub> = 1,167 ± 54.95 µg/ml). Esto está indicando que efectivamente, los componentes solubles en etanol que se encuentran presentes en el extracto acuoso son termoestables y completamente solubles en este solvente. Al evaluar el efecto de los extractos etanólicos obtenidos por maceración directa de los fragmentos blanqueados y normales se observó un aumento significativo de la potencia (Cuadro 6). La UH<sub>50</sub> calculada para el extracto etanólico de los fragmentos normales (control de acondicionamiento) fue 55.48 ±

14.36, mientras que la del extracto etanólico proveniente de los fragmentos blanqueados fue de  $17.35 \pm 2.77$   $\mu\text{g/ml}$ . Las curvas concentración-respuesta de estos efectos se muestran en la Figura 13. Estos resultados mostraron que los componentes termoestables provienen del hidrocoral y no de los dinoflagelados simbiotes, ya que a pesar de no haber dinoflagelados (responsables de dar el color al hidrocoral) el efecto hemolítico retardado se conservó.

Cuadro 6. Unidades hemolíticas medias ( $\text{UH}_{50}$ ) de la actividad hemolítica de los extractos con hemolisinas termoestables.

Extracto	Unidad Hemolítica media ( $\text{UH}_{50}$ ) ( $\mu\text{g /ml}$ )
Control directo desnaturalizado	$1,050 \pm 45.85$
Etanólico a partir del polvo liofilizado (0% de proteína)	$1,167 \pm 54.95$
Etanólico a partir de fragmentos no blanqueados (0.699% de proteína)	$55.48 \pm 14.36$
Etanólico a partir de fragmentos blanqueados (0.067% de proteína)	$17.35 \pm 2.77$

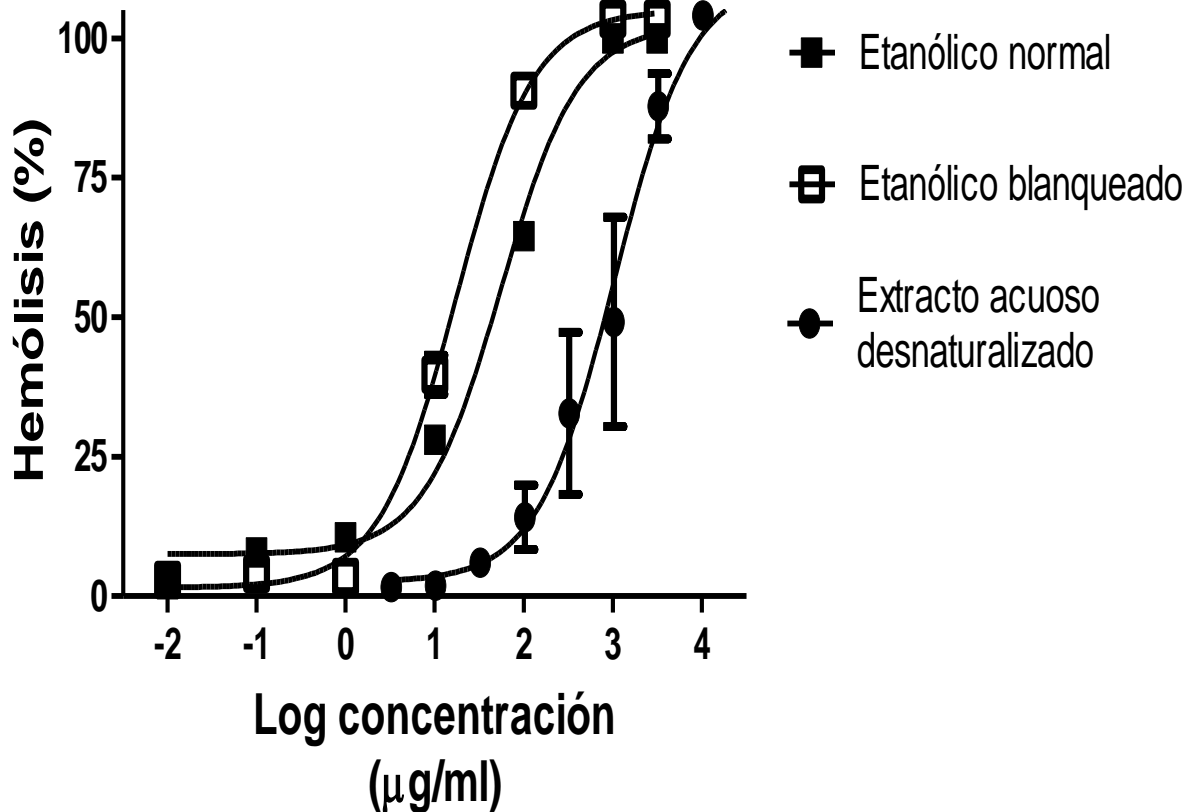


Figura 13. Curvas-concentración respuesta de la actividad hemolítica del veneno desnaturalizado y extractos etanólicos.

#### 5.6. Ensayo de toxicidad de los extractos.

De manera adicional, se determinó el efecto tóxico del extracto acuoso de *M. complanata* en dos diferentes especies de insectos a fin de determinar un modelo de toxicidad que no implique mayor gasto de muestra como en el caso de modelos con roedores. Los resultados mostraron que el extracto acuoso fue tóxico en zofobas y grillos (Cuadro 2), siendo estos últimos los más sensibles al extracto. Al evaluar los extractos etanólicos en estos insectos no se observó dicha letalidad.

Cuadro 7. Valores de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) del extracto acuoso de *Millepora complanata*.

<b>Cálculo mediante ajuste no lineal</b>		
	<b>DL<sub>50</sub> (µg proteína/g)</b>	
	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Grillos ( <i>Acheta domestica</i> )	51.6 ± 6.59	16.75 ± 3.69
Zofobas ( <i>Zophoba morio</i> )	761 ± 105.40	784 ± 82.40
<b>Cálculo mediante el método de Lorke</b>		
	<b>DL<sub>50</sub> (µg proteína/g)</b>	
	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Grillos ( <i>Acheta domestica</i> )	31.78	17.78
Zofobas ( <i>Zophoba morio</i> )	100	100

## 6. DISCUSIÓN

Gracias a diversas investigaciones, en su mayoría enfocadas en especies de la clase Anthozoa, se sabe que los venenos de los cnidarios están constituidos por mezclas complejas que varían en composición y actividad biológica. Entre sus constituyentes, los venenos de cnidarios presentan dos tipos principales de componentes potencialmente tóxicos: las neurotoxinas y las citolisinas (Kem y Turk, 2009). Por lo general, las neurotoxinas son péptidos de bajo peso molecular que actúan sobre algunos canales iónicos ocasionando un efecto de parálisis en la presa (Kem y Turk, 2009; Norton, 2009) o desencadenando respuestas de dolor (Bohlen y Julius, 2012). Por otra parte, las citolisinas de los cnidarios son un numeroso grupo de proteínas y péptidos que ayudan en la predigestión de las presas y en la diseminación de los venenos en los tejidos mediante la inducción de daño local de los tejidos y el rompimiento de las células, principalmente los eritrocitos (Kem y Turk, 2009; Norton, 2009; Anderluh y Macek, 2002).

Tanto las neurotoxinas como las citolisinas han atraído el interés de diversos grupos de investigación debido a sus posibles aplicaciones en investigaciones farmacológicas. Las citolisinas en particular, se han utilizado en el estudio de diversos procesos biológicos de las membranas celulares y se les buscan posibles aplicaciones terapéuticas, tales como antiparasitarias y anticancerígenas (Anderluh y Macek, 2002; Kristan y col., 2009). Además de esto, el estudio de las citolisinas de cnidarios ha incrementado recientemente debido a que a estos componentes se les han atribuido los daños locales provocados por el contacto con estos organismos (Brinkman y Burnell, 2009; Sher y Zlotkin, 2009; Mariottini y Pane, 2014). De este modo, la caracterización de las citolisinas de cnidarios es importante ya que esto puede conducir al desarrollo de cuidados adecuados para las víctimas de envenenamiento por cnidarios.

En diversos estudios se ha encontrado que las citolisinas de cnidarios inducen hemólisis contra eritrocitos de diferentes especies (Mariottini y Pane, 2014). Con algunas excepciones, estas citolisinas están contenidas en los nematocistos (Ozbek y col., 2009). Algunos cnidarios tienen nematocistos capaces de penetrar la

piel humana, de tal modo que al inyectar su contenido generan síntomas locales y sistémicos que pueden llegar a ser un problema serio de salud (Burnett, 2009; Ward y col., 2012; Cegolon y col., 2013). En el Caribe Mexicano, las especies del género *Millepora* destacan por su capacidad de inducir reacciones locales similares a quemaduras en la piel humana después del contacto. De hecho, se sabe que los nematocistos de estas especies son capaces de penetrar la piel humana (García-Arredondo y col., 2012). En estudios previos, se reportaron las curvas concentración-respuesta de la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. complanata* sobre eritrocitos de rata (Ibarra-Alvarado y col., 2007; García-Arredondo y col., 2011). En uno de esos estudios se encontró que la actividad hemolítica se perdió cuando el extracto se incubó durante 30 min en un baño de agua a ebullición, sugiriendo que los componentes responsables de esa actividad son proteínas termolábiles (Ibarra-Alvarado y col., 2007). En este estudio, se encontró que el extracto acuoso de *M. complanata* indujo hemólisis en eritrocitos de diferentes especies, incluyendo humano, pollo, cobayo, ratón y rata. Estos resultados mostraron que los eritrocitos de los roedores fueron más susceptibles a la lisis inducida por el extracto los eritrocitos de humano y de pollo, este efecto podría deberse a las diferencias en la proporción de los lípidos que presentan las membranas de los eritrocitos de cada una de las especies, lo cual influye en la especificidad de las citolisinas de los cnidarios (Anderluh y Macek, 2002).

Algunos estudios enfocados en la actividad de las proteínas hemolíticas de cnidarios, incluyendo especies del género *Millepora*, han mostrado que éstas comienzan a inducir el efecto hemolítico al poco tiempo de entrar en contacto con los eritrocitos (Torres, 2001; Anderluh y Macek, 2002; Yu et al., 2007; Kang et al., 2009; Klyshco et. al, 2004; Shiomi y col., 1989). En éste estudio, se demostró que el extracto acuoso de *M. complanata* induce su actividad hemolítica tan solo a los 10 min de entrar en contacto con los eritrocitos a una temperatura de 37°C, algo muy similar a lo observado cuando se incubaba durante 30 minutos.

Como ya se ha dicho, el efecto hemolítico que presenta el extracto acuoso de *M. complanata* es sensible a la temperatura. Después de incubar el extracto a 60°C durante 30 min, provocó un decaimiento de su actividad hemolítica, misma que

desaparece cuando el extracto se preincuba a una temperatura de 100°C por 30 min. Esto puede deberse a dos principales motivos: que la temperatura favorece la desnaturalización de algunas citolisinas y que las posibles proteasas presentes en el extracto descomponen a las citolisinas como respuesta a la elevación de la temperatura. Sin embargo, estudios efectuados sobre el extracto acuoso de *M. complanata* han demostrado que en éste no existe actividad de proteasa (García-Arredondo y col., 2015). En cambio, las actividades hemolíticas de los venenos de las medusas *Rhopilema esculentum* (Yu et al., 2007) y *Carybdea alata* (Chung y col., 2001), que si presentan actividad de proteasa, se reducen significativamente después de la incubación a 45°C por 30 minutos. Es posible que la mayor resistencia del extracto acuoso de *M. complanata* se deba a la ausencia de proteasas. Indudablemente, el hecho de que la actividad hemolítica del extracto se pierda cuando este se incuba a 100°C se debe a la desnaturalización de las proteínas citolíticas.

Por otra parte, al evaluar la actividad hemolítica del extracto acuoso a diferentes temperaturas de incubación, no se observaron cambios significativos, mostrando que las hemolisinas presentes en el extracto son relativamente estables en un rango de temperatura que oscila entre los 20°C y 50°C. Como punto de comparación, algunos estudios con venenos de medusas han mostrado que éstos usualmente inducen su actividad óptima a temperaturas por debajo de 45°C. Por ejemplo, la temperatura óptima de incubación para la actividad hemolítica del veneno de *Stomolophus meleagris* fue de 37°C, pero se pierde a partir de los 45°C (Li et al., 2013). Es por esta razón que una de las recomendaciones más frecuentes en el tratamiento de lesiones por contacto con medusas es la aplicación de agua caliente, de 42 a 45°C (Ward, 2012); sin embargo, en el caso de las lesiones causadas por el contacto con *M. complanata* esta recomendación podría ser no tan efectiva.

Hasta ahora, el mecanismo mediante el cual los venenos de las especies del género *Millepora* inducen su actividad hemolítica no ha sido definido. Algunos estudios con venenos de cnidarios ligan la actividad hemolítica a la presencia



enzimas con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y a las toxinas formadoras de poro tipo actinoporinas (Sher y col., 2005).

La actividad hemolítica de las actinoporinas se debe a una desestabilización de las membranas de los eritrocitos a causa de la formación de poros selectivos a cationes (Kem y Turk, 2009). En cambio, la actividad hemolítica de las proteínas con actividad de PLA<sub>2</sub> puede deberse a la misma actividad enzimática, resultando en hidrólisis de los fosfolípidos membranales; o indirectamente a través de la generación de ácidos grasos tóxicos y lisofosfolípidos (Nevalainen y col., 2009).

Algunos estudios han mostrado que la actividad hemolítica de los extractos de las especies del género *Millepora* podría estar relacionada con la presencia de proteínas con actividad de PLA<sub>2</sub>. Por ejemplo, se han reportado que las especies de *Millepora* presentan una mayor actividad de PLA<sub>2</sub> en comparación con otros cnidarios (Nevalainen y col., 2009). En otro estudio se reportó que los venenos de *M. dichotoma* y *M. platyphylla* presentan actividad de PLA<sub>2</sub> pero no presentan actividad de proteasa ni de hialuronidasa (Shiomi y col., 1989). Estudios dirigidos por Radwan y Aboul-Dahab reportaron la presencia de una hemolisina derivada del veneno de *M. platyphylla* de 32.5 kDa de peso y con actividad PLA<sub>2</sub>, a la cual llamaron milleporina-1 (Radwan y Aboul-Dahab, 2004). El extracto acuoso de *M. complanata* no es la excepción, ya que estudios previos han demostrado que éste presenta dicha actividad y que además, ésta se ve significativamente afectada al incubarse en presencia de bromuro de p-bromofenasilo; un inhibidor de la actividad PLA<sub>2</sub> (Ibarra-Alvarado y col., 2007). En un estudio cromatográfico preliminar se detectó la presencia de una hemolisina con un peso molecular relativo muy similar al de la milleporina-1 en el extracto de *M. complanata* (Ibarra-Alvarado y col., 2007). Una característica común de las PLA<sub>2</sub> de secreción es que presentan un sitio de unión a Ca<sup>2+</sup>, muchas de estas enzimas requieren la presencia de concentraciones milimolares de este ión para inducir su actividad catalítica. En este estudio, se observó que la actividad hemolítica del extracto de *M. complanata* es independiente a la presencia de cationes divalentes como el Ca<sup>2+</sup> y el Mg<sup>2+</sup>. El efecto de estos cationes sobre la actividad hemolítica de los venenos de cnidarios es variable, lo cual se debe posiblemente a diferencias estructurales entre las hemolisinas que

contribuyen a su actividad catalítica (Anderluh y Macek, 2002; Yu y col., 2007; Kang y col., 2009; Feng y col., 2010; Li y col., 2013).

Además de las proteínas hemolíticas existe la posibilidad de la presencia de hemolisinas de naturaleza no proteínica en los venenos de cnidarios. Un buen ejemplo es la palitoxina, un compuesto poli-hidroxilado aislado de microalgas marinas y posteriormente encontrado en el cnidario de la clase Anthozoa, *Palythoa toxica*. Esta toxina, además de ser altamente tóxica posee actividad hemolítica retardada, es decir; induce hemólisis cuando se incuba por 4 horas en presencia de los eritrocitos (Bellocci y col., 2011).

Un hallazgo interesante, en un estudio previo sobre el extracto acuoso de *M. complanata*, fue que éste contiene citolisinas no proteínicas que inducen actividad hemolítica retardada (García-Arredondo y col., 2015). En ese estudio se detectó una fracción cromatográfica no proteínica, altamente soluble en agua y etanol, que indujo hemólisis retardada. Considerando lo anterior, en el presente estudio se evaluó dicha actividad después de desnaturalizar las proteínas contenidas en el extracto. Asumiendo que la fracción hemolítica no proteínica es completamente soluble en agua y alcohol, se evaluó la actividad hemolítica retardada de un extracto etanólico derivado del extracto acuoso liofilizado, observándose resultados muy similares a los obtenidos por parte del extracto acuoso desnaturalizado. No se detectó un contenido de proteína en el extracto etanólico, lo que sugiere que éstas hemolisinas no proteicas fueron extraídas por medio del disolvente.

Con la finalidad de conocer la fuente de las hemolisinas no proteínicas en el extracto acuoso, se prepararon extractos etanólicos derivados de fragmentos del hidrocoral blanqueado y de su respectivo control de acondicionamiento. Al evaluar los extractos etanólicos, se observó que el de los fragmentos blanqueados presentó una mayor potencia que el extracto del control de acondicionamiento, y que estos dos a su vez, presentan mayor potencia que la del extracto acuoso desnaturalizado y el extracto etanólico obtenido a partir del polvo liofilizado. Estas diferencias en la potencia se deben a que el extracto de los fragmentos blanqueados está más concentrado en cuanto al contenido de hemolisinas no proteínicas. Estos

resultados constituyen una evidencia de que las hemolisinas no proteínicas provienen del hidrocoral y no de sus algas simbiotes.

En un estudio sobre la medusa *Pelagia noctiluca* se encontró que el etanol al 70% no indujo la descarga del contenido de los nematocistos y que además deterioró drásticamente la respuesta de descarga inducida por quimiorreceptores (Morabito y col., 2014). Ese estudio sugería la posibilidad de que los extractos etanólicos preparados en este estudio no contenían las toxinas de los nematocistos. Para confirmar esta posibilidad, se realizó un extracto de nematocistos de *M. complanata* mediante un método previamente descrito (García-Arredondo y col., 2012). Estos nematocistos se resuspendieron en etanol y se observaron al microscopio, encontrándose que más del 90% de los nematocistos estaban sin descargar (García-Arredondo y col., 2014). Este hallazgo confirma que efectivamente, las hemolisinas no proteínicas no provienen de los nematocistos. La presencia de toxinas, tanto metabolitos secundarios bioactivos como proteínas citolíticas, en los tejidos de los organismos de la clase hydrozoa es muy común y constituye un mecanismo de protección adicional a sus nematocistos (Sher y Zlotkin, 2009).

De manera adicional, en este estudio se evaluó la actividad insecticida del extracto acuoso de *M. complanata*, esto con la finalidad de establecer un modelo adecuado para evaluar toxicidad en futuras investigaciones. Es común que muchas toxinas de cnidarios presentan actividad tóxica en insectos. Esto se debe a que los insectos y los crustáceos, que son presas de los cnidarios, tienen ancestros en común (Yan y col., 2014). De este modo se encontró que los grillos *Acheta domestica* constituyen un buen modelo para evaluar dicha actividad de este extracto.

## 7. CONCLUSIONES

En este estudio se encontraron evidencias que muestran que el extracto acuoso de *M. complanata* contiene una o varias proteínas hemolíticas termolábiles que actúan de manera rápida y con mayor resistencia a la temperatura que otras hemolisinas de cnidarios. Estas hemolisinas termolábiles no actúan de manera dependiente de la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

Por otro lado, también se encontraron evidencias que muestran que el extracto acuoso de este hidrocoral contiene hemolisinas termoestables, altamente solubles en etanol, que actúan de manera lenta. Estas hemolisinas termoestables no provienen de los nematocistos pero sí de los tejidos del hidrocoral.

Finalmente, se encontró que los grillos (*Acheta domestica*) constituyen un buen modelo para evaluar la toxicidad de las proteínas presentes en el extracto acuoso de *M. complanata*, pero no para evaluar la toxicidad de los componentes termoestables.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

**Alcolado, P.** Arrecifes coralinos y ecosistemas amenazados. Estado general de los arrecifes coralinos de Cuba y propuestas de manejo ambiental. *Rev. Flora y Fauna* **1999**; 5:8-13.

**Anderluh G**, Maček P: Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* **2002**; 40:111-124.

**Banaszak**, A.T., Ayala-Schiaffino, B.N., Rodríguez-Román, A., Enríquez, S., Iglesias-Prieto, R. Response of *Millepora alcicornis* (Milleporina: Milleporidae) to two bleaching events at Puerto Morelos reef, Mexican Caribbean. *Rev. Biol. Trop.* **2003**; 58:1211-1221.

**Barnes**, R. D., *Zoología de los invertebrados*, 3ª edición. Interamericana, México, D. F. **1983**; 826-840.

**Bellocci M**, Sala GL, Prandi S. The cytolytic and cytotoxic activities of palytoxin. *Toxicon* **2011**; 57:449-459.

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

**Bohlen C.J.**, Julius D. Receptor-targeting mechanisms of pain-causing toxins. *Toxicon* **2012**; 60:254-264.

**Brusca**, R. C. & Brusca, G. J., *Invertebrados*, 2ª edición., Madrid, McGraw-Hill-Interamericana: **2005**; 1005.

**Brinkman DL**, Burnell JN. Biochemical and molecular characterization of cubozoan protein toxins. *Toxicon* **2009**; 54:1162-1172.

**Burnett JW.** Treatment of Atlantic cnidarian envenomations. *Toxicon* **2009**; 54:1201-1205.

**Carrodegus**, C., G. Arencibia; N. Capetillo y M. E. García. Aparición de decoloración de corales en el archipiélago cubano. *Rev. Geocuba de Geomática y Ciencias afines* **1995**; 50: 55-64.

**Castro P.**, M.E. Huber. *Marine Biology* 3rd. Edition. McGraw Hill. **2000**; 530-545.

**Cegolon L**, Heymann WC, Lange JH, Mastrangelo G. Jellyfish stings and their management. *Sea Drugs* **2013**; 11:523-550.

**Chung** JJ, Ratnapala LA, Cooke IM, Yanagihara AA: Partial purification and characterization of a hemolysin CAH1 from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. *Toxicon* **2001**, 39:981-990.

**Dusan** Suput. In vivo effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon* **2009**; 56:1190-120.

**Feng** J, Yu H, Xing R, Liu S, Wang L, Cai S, Li P. Partial characterization of the hemolytic activity of the nematocysts venom from the jellyfish *Cyanea nozakii* kishinouye. *Toxicol. in vitro* **2010**; 24:1750-1756.

**Frazao** B, Vasconcelos V, Antunes A. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actinaria) toxins: An overview. *Sea Drugs* **2012**; 10: 1812-1851.

**García-Arredondo** A, Murillo-Esquivel LJ, Rojas A, Sánchez-Rodríguez J. Characteristics of the hemolytic activity induced by the aqueous extract of the Mexican fire coral *Millepora complanata*. *Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* **2014**; 20:49.

**García-Arredondo** A, Rojas A, Ibarra-Alvarado C, Iglesias-Prieto R. Effects of bleaching on the pharmacological and toxicological activities elicited by the aqueous extracts prepared from two “fire corals” collected in the Mexican Caribbean. *Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2011**; 396: 171-176.

**García-Arredondo** A, Rojas A, Iglesias-Prieto R, Zepeda-Rodríguez A, Palma-Tirado L. Structure of nematocysts isolated from the fire corals *Millepora alcicornis* and *Millepora complanata* (Cnidaria: Hydrozoa). *Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* **2012**; 18: 109-115.

**García-Arredondo** A, Rojas-Molina A, Bah M, Ibarra-Alvarado C, Gallegos-Corona MA, García-Servín M. Systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora complanata* and partial purification of thermoestable neurotoxins with lethal effects in mice. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **2015**; 169:55-64.

**Gilbert**, S. F., & Singer, S. R. *Developmental Biology*. Massachusetts: Sinauer Associates **2010**; 28-36.

**Hoegh-Guldberg** Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Freshwater Res.* **1999**; 50:839–66.

**Hoegh-Guldberg**, O., Mumby, P.J., Hooten, A.J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, A.J., Caldeira, K.. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Freshwater Res.* **2007**; 318:1737-1742.

**Hoffmann**, K., Hermanns-Clausen, M., Buhl, C., Büchler, M.W., Schemmer, P., Mebs, D., Kaufenstein, S. A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury. *Toxicon* **2008**; 51:1535-1537.

**Ibarra-Alvarado** C, García JA, Aguilar MB, Rojas A, Falcón A, Heimer de la Cotera EP. Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol. Pharmacol.* **2007**; 146: 511-518.

**Kang** C, Munawir A, Cha M, Sohn E, Lee H, Kim J, Yoon WD, Lim D, Kim E: Citotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **2009**; 150: 85-90.

**Kem** WR, Turk T, The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon* **2009**; 54:1031-1037.

**Kem** WR, Turk T. Cnidarian toxins and venoms. Preface. *Toxicon* **2009**, 54:1029.

**Khoo** KS, Kam wK, Khoo HE, Gopalakrishnakone P, Chung MCM. Purification and partial characterization of two cytolisins from a tropical sea anemone *Heteractis magnifica*. *Toxicon* **1993**; 31:1567-1579.

**Kiernan**, Matthew C., Geoffrey K. Isbister, Cindy S.-Y. Lin, David Burke, and Hugh Bostock. "Acute Tetrodotoxin-induced Neurotoxicity after Ingestion of Puffer Fish." *Annals of Neurology* **2005**; 57:339–48.

**Kini** R.M.. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* **2003**; 42:827-840.

**Klyshko** EV, Issaeva MP, Monastyrnaya MM, Il'yna A, Guzev KV, Vakorina TI, Dmitrenok PS, Zykova TA, Kozlovskaya EP. Isolation, properties and partial aminoacid sequence of a new actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon* **2004**; 44:315-324.

**Kristan** KC, Viero G, Dalla Serra M, Macek P, Anderluh G. Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon* **2009**, 54:1125-1134.

**Lewis** JB. Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Adv Mar Biol* **2006**; 50: 1-55.

**Li** R, Yu H, Xing R, Liu S, Qing Y, Li K, Li B, Meng X, Cui J, Li P: Isolation and in vitro partial characterization of hemolytic proteins from the nematocysts venom of the jellyfish *Stomolophus meleagris*. *Toxicol In Vitro* **2013**; 27:1620-1625.

**Lorke**, EP. A new approach to partial acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **1989**; 54: 275-287.

**Marban** E, Yamagishi T, Tomacelli GF. Structure and function of voltage-gated sodium channels, *J. Physiol.* **1998**; 508:647-657.

**Mariottini** GL, Pane L: Cytotoxic and cytolytic cnidarian venoms: a review on health implications and possible therapeutic applications. *Toxins* **2014**; 54:1190-1200.

**Mariscal** RN. Nematocysts. In: Muscatine L, Lenhoff HM, editors. *Coelenterate biology: reviews and new perspectives*. Academic press, New York and other cities **1974**; 129-178.

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

**Moats** WE. Fire coral envenomation. *J wilderness med.* **1992**; 3:284-287.

**Morabito** R, Marino A, Dossena S, La Spata G. Nematocyst discharge in *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphozoa) oral arms can be affected by lidocaine, ethanol, ammonia and acetic acid. *Toxicon* **2014**; 83:52-58.

**NCBI**. National Center of Biotechnology Information. **2014**. [Consulta: 01/05/2014.] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6073>

**Nevalainen** TJ, Peuravuori HJ, Quinn RJ, Llewellyn LE, Benzie JA, Fenner PJ, Winkel KD. Phospholipase A2 in cnidaria. *Comp Biochem physiol. Biochem. Mol. boil.* **2009**; 139: 731-735.

**Norton** RS: Structures of sea anemone toxins. *Toxicon* **2009**; 54:1075-1088.

**Özbek** S, Balasubramanian PG, Holstein TW. Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon* **2009**; 54:1038-1045.



**Pathirana**, C., Andersen, R.J., Wright, J.C.L. Abietinarins A and B, cytotoxic metabolites of the marine hydroid Abietinaria sp. Can. J. Chem. **1990**; 68: 394-396.

**Prasad** GV, Vicent L, Hamilton R, Lim K. Minimal change disease in association with fire coral (*Millepora* species) exposure. Am. J. kidney dis. **2006**; 47:15-16.

**Radwan** FFY. Comparative toxicological and immunological studies on the nematocyst venoms of the Red Sea fire corals *Millepora dichotoma* and *M. platyphylla*. Comp. Biochem. Physiol. C. **2002**; 131: 323-334.

**Radwan** FFY, Aboul-Dahab HM. Millepirin-1, a new phospholipase A2 active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocyst. Comp. Biochem. Physiol. C. **2004**; 139: 267-272.

**Rojas** A, Torres M, Rojas JI, Feregrino A, Heimer-de la Coteria EP. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. Toxicon **2002**; 40: 777-785.

**Rojas-Molina** A, García-Arredondo A, Ibarra-Alvarado C, Bah M. Millepora ("fire corals") species: toxicological studies until 2011. Advances in environmental research **2012**; 26.

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

**Salceda** E, Garateix A and Soto E. The sea anemone toxins BgII and BgIII prolong the inactivation time course of the tetrodotoxin-sensitive sodium current in rat dorsal root ganglion neurons. Toxicon **2002**; 303:1067-1074.

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

**Schuchert**, P. Polypodium hydriforme. **2012**. Consulta: 01/05/2014. Disponible en: <http://www.marinespecies.org/hydrozoa>.

**Sher** D, Zlotkin E. A hydra with many heads: protein and polypeptide toxins from hydra and their biological roles. Toxicon **2009**, 54:1148-1161.

**Shiomi K, Hosaka M, Yanaike N, Yamanaka H, Kikuchi T:** Partial characterization of venoms from two species of fire corals *Millepora platyphylla* and *Millepora dichotoma*. Nippon Suisan Gakkaishi **1989**; 55:357-362.

**Sumich, J. L.** An Introduction to the Biology of Marine Life 7th Ed. McGraw-Hill **1999**; 11:228-233.

**Sutherland KP, Porter J, Torres.** Disease and Immunity in Caribbean and Indo-pacific Zooxanthellate Corals. Marine Ecology Progress Series **2004**; 266:273–302.

**Venn, A.A., Loram J.E., Douglas A.E.** Photosynthetic symbioses in animals. J. Exp. Bot. 2008; 59:1069 - 1080.

**Veron J.** Corals of the world. Volume 3. Townsville, Australia. Australian Institute of Marine Science **2000**; 490.

**Ward NT, Darracq MA, Tomaszewski Clark RF:** Evidence-based treatment of jellyfish stings in North America and Hawaii. Ann. Emerg. Med. **2012**; 60:399-414.

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

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

**Yan F, Cheng X, Ding X, Yao T, Chen H, Li W, Hu S, Yu Z, Sun Y, Zhang Y, Xia L.** Improved insecticidal toxicity by fusing Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* with Av3 of *Anemonia viridis*. Curr. Microbiol. **2014**; 68:604-609.

**Yu H, Li C, Li R, Xing R, Liu S, Li P:** Factors influencing hemolytic activity of venom from *Rhopilema esculentum* Kishinouye. Food Chem. Toxicol. **2007**; 45:1173-1178.

RESEARCH

Open Access

# Characteristics of hemolytic activity induced by the aqueous extract of the Mexican fire coral *Millepora complanata*

Alejandro García-Arredondo<sup>1\*</sup>, Luis J Murillo-Esquivel<sup>1</sup>, Alejandra Rojas<sup>1</sup> and Judith Sanchez-Rodriguez<sup>2</sup>

## Abstract

**Background:** *Millepora complanata* is a plate-like fire coral common throughout the Caribbean. Contact with this species usually provokes burning pain, erythema and urticariform lesions. Our previous study suggested that the aqueous extract of *M. complanata* contains non-protein hemolysins that are soluble in water and ethanol. In general, the local damage induced by cnidarian venoms has been associated with hemolysins. The characterization of the effects of these components is important for the understanding of the defense mechanisms of fire corals. In addition, this information could lead to better care for victims of envenomation accidents.

**Methods:** An ethanolic extract from the lyophilized aqueous extract was prepared and its hemolytic activity was compared with the hemolysis induced by the denatured aqueous extract. Based on the finding that ethanol failed to induce nematocyst discharge, ethanolic extracts were prepared from artificially bleached and normal *M. complanata* fragments and their hemolytic activity was tested in order to obtain information about the source of the heat-stable hemolysins.

**Results:** Rodent erythrocytes were more susceptible to the aqueous extract than chicken and human erythrocytes. Hemolytic activity started at ten minutes of incubation and was relatively stable within the range of 28-50°C. When the aqueous extract was preincubated at temperatures over 60°C, hemolytic activity was significantly reduced. The denatured extract induced a slow hemolytic activity ( $HU_{50} = 1,050.00 \pm 45.85 \mu\text{g/mL}$ ), detectable four hours after incubation, which was similar to that induced by the ethanolic extract prepared from the aqueous extract ( $HU_{50} = 1,167.00 \pm 54.95 \mu\text{g/mL}$ ). No significant differences were observed between hemolysis induced by ethanolic extracts from bleached and normal fragments, although both activities were more potent than hemolysis induced by the denatured extract.

**Conclusions:** The results showed that the aqueous extract of *M. complanata* possesses one or more powerful heat-labile hemolytic proteins that are slightly more resistant to temperature than jellyfish venoms. This extract also contains slow thermostable hemolysins highly soluble in ethanol that are probably derived from the body tissues of the hydrozoan.

**Keywords:** Cytolysins, Hemolysins, Fire coral, *Millepora complanata*

## Background

The genus *Millepora* comprise calcareous cnidarians that are found on coral reefs worldwide, except on the Hawaiian coast, and constitute one of the most important contributors to reef structures [1]. The nematocysts of these hydrozoans can penetrate the human skin and it is well known that contact with them results in burning

pain followed by local erythema, urticariform lesions, and pruritus with regression over a 1- to 2-week period [1-4]. Because of their significant toxicity, *Millepora* species are commonly known as “fire corals”. However, although superficially they resemble scleractinian stony corals, they are not true corals. Based on morphological and biological characteristics, *Millepora* species are classified as members of the class Hydrozoa, and not of the class Anthozoa to which scleractinian corals belong [1]. In addition, *Millepora* species are capable of inducing systemic toxicity in humans, which includes nausea,

\* Correspondence: alejandro.gr@uaq.mx

<sup>1</sup>Laboratory of Chemical and Pharmacological Natural Products Research, School of Chemistry, Autonomous University of Querétaro, Querétaro 76010, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article

vomiting, respiratory difficulty, fever, and even nephritic syndrome, acute renal failure, and pulmonary edema [3,4].

Several toxicological studies have shown that the venom contained in the nematocysts of *Millepora* species is mainly composed of thermolabile protein toxins that display lethal, hemolytic, dermonecrotic, and antigenic properties [5-9]. Conversely, we have found evidence of the presence of important non-protein bioactive compounds in the aqueous extract of *M. complanata*, a plate-like fire coral commonly found along the Mexican Caribbean coast. Previously, we observed that the aqueous extract of this hydrozoan provoked contractile effects on isolated guinea pig ileum segments and rat aortic rings, and also induced hemolysis of rat erythrocytes [10,11]. By means of a chromatographic analysis of this extract, we detected the presence of a hemolytic protein of approximately 30 kDa and vasoconstrictor proteins of 15, 20, and 61 kDa. In order to evaluate the systemic toxicity of this extract on mice, we previously found that it induced two characteristic types of death depending on the dose administered by intravenous route [12]. Doses equal to or higher than LD<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub> = 4.62 µg protein/g of body weight) provoked convulsions and death within one minute, whereas doses lower than LD<sub>50</sub> generally caused death many hours after injection and tissue samples from these animals revealed histological damage to the kidneys and lungs. Denaturation of the proteins contained in the extract, by incubation in a boiling bath for 30 minutes, resulted in the deactivation of their capacity to induce delayed death and histological damage. Surprisingly, the denaturation of the extract did not affect its capacity to induce convulsions and rapid death. Through a three-step chromatographic fractionation, we found a non-protein fraction, called MC1-IIA, which induces vasoconstriction, delayed hemolysis (incubation for four hours at 37°C), and lethal effects on mice. A subsequent analysis showed that this fraction contains polyoxygenated alkylbenzenes that are highly soluble in water and ethanol [12].

The hemolytic activities of several cnidarian venoms are well documented [13]. The importance or implications of *in vivo* erythrocyte lysis by venom hemolysins is not completely understood, but these venom hemolysins are not specific and may affect other cell types [14]. In fact, local damage induced by cnidarians, such as inflammation and dermonecrosis, is attributed to hemolysins injected by the nematocysts [13,15,16]. For this reason, it is important to study the hemolytic properties of cnidarian venoms, which could lead to better care for the victims. For example, first aid treatment of accidental contact with jellyfish includes rinsing the site of the sting with some chemical substances. It was found that lidocaine, ethanol, and diluted acetic acid are highly effective in reducing *in situ* nematocyst discharge [17-20]. In addition, it is proposed that thermal treatment (immersion

of the sting site in 45°C water or the application of ice packs) may aid in one or two ways: via the deactivation of heat labile proteins in the venom, or via modulation of pain receptors [17,21]. However, it could present variations in the sensitivity of cnidarian hemolysins to temperature.

At present, the most common recommendations for treatment of injuries caused by contact with fire corals are the same as those for stings provoked by jellyfish. Although information about the hemolytic properties of these hydrozoans is scarce, it is important for the understanding of the defense mechanisms of these organisms. The aim of the present study was to obtain basic data on the hemolytic activity of the aqueous extract of *M. complanata*, not only by investigating the hemolytic properties of the protein compounds, but also by analyzing the hemolysis induced by the non-protein compounds.

## Methods

### Materials

D-glucose, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, and ethanol absolute (HPLC grade) were purchased from J.T. Baker (USA). Citric acid and sodium citrate were obtained from Sigma (USA). The reagents used in the determination of protein concentration were obtained from Bio-Rad (USA).

### Sample collection and aqueous extract preparation

Fragments of *M. complanata* were collected from the coast of Puerto Morelos, Quintana Roo, Mexico, at a site known as "La Bocana Chica", in December 2012. The fragments were kept wet with sea water for their transportation to the Reef Systems Academic Unit (in Spanish, Unidad Académica de Sistemas Arrecifales) and then were frozen and stored at -70°C. Then, all fragments were transported in dry ice to our laboratory in Querétaro, Mexico, where extraction was performed.

Nematocyst discharge was induced by stirring the calcareous fragments in deionized water at 4°C for 24 hours. The extract obtained was centrifuged at 3,000 rpm (2,060 × g) for 15 minutes at 4°C. This procedure was repeated twice, and the supernatant was freeze-dried and stored at -70°C. The lyophilized product was dissolved in deionized water at a concentration of 150 mg/mL and centrifuged at 3,000 rpm (2,060 × g) for 15 minutes at 4°C. Then, the supernatant was filtered through a 0.45 µm pore filter (Millipore, Germany). The filtered solution was stored at -20°C and used to determine the biological effects.

### Protein concentration determination

Protein was determined by the Bradford assay [22], using a standard curve prepared with lyophilized bovine serum albumin.

### Hemolytic activity test

The hemolytic activity was monitored as described for the jellyfish venom *Cassiopea xamachana* [23]. Briefly, for each experiment an aliquot of blood was washed three times with Alsever's solution composed of 120 mM D-glucose, 30 mM sodium citrate, 7 mM NaCl, and 2 mM citric acid, pH 7.4. Washing was done by low-speed centrifugation ( $1,000 \times g$ , four minutes) of blood at 4°C (Hermle Z 323 K centrifuge, Lab-Tech Instrumentation, Germany). Washed erythrocytes were diluted in 1% Alsever's solution (v/v) and combined with different amounts of the aqueous extract (0.03, 0.10, 0.32, 1.00, 3.16, 10.00, 31.60, 100.00, and 316.00  $\mu\text{g}$  protein/mL). Then the samples were incubated at 37°C for 30 minutes (Eppendorf AG 22331 Thermomixer, Brinkmann Instruments, Germany). Subsequently, the reaction was stopped by centrifuging for four minutes at  $1,000 \times g$ . The  $A_{415}$  of the supernatant fluid containing the hemoglobin released from lysed erythrocytes was measured in a spectrophotometer (Lambda Bio, Perkin Elmer Co., USA). Each experiment was normalized with respect to complete hemolysis, which was measured by diluting the erythrocyte sample in deionized water instead of Alsever's solution. One hemolytic unit ( $HU_{50}$ ) was defined as the amount of protein sample required to cause 50% hemolysis.

### Hemolytic properties of the aqueous extract

The hemolytic activity of the aqueous extract of *M. complanata* was tested by using blood samples from humans (young males, weighing approximately 70 kg), chicken (males, weighing 600 g), Harley guinea pigs (males, weighing 450 g), Wistar rats (males, weighing 250 g) and CD1 mice (males, weighing 30 g). Subsequent experiments were conducted using samples of rat blood. Drug-free human blood samples were supplied by the Unit of Chemical Services, School of Chemistry, UAQ (Unidad de Servicios Químicos, Facultad de Química, UAQ). Animal blood samples were supplied by the Animal House of the Institute of Neurobiology, UNAM (Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM). The hemolytic activity rate of the aqueous extract was tested by using different incubation times (10, 20, 30, and 60 minutes).

In order to evaluate the thermal stability of the hemolytic activity induced by the aqueous extract, it was tested after preincubation at different temperatures (4, 25, 37, 45, 60, and 100°C) for 30 minutes. In addition, the optimum temperature of the aqueous extract was tested by utilizing different incubation temperatures (20, 25, 28, 30, 34, 37, 40, 43, 46, and 50°C) for 30 minutes.

The effects of  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$  on the hemolytic activity induced by the aqueous extract were evaluated by adding 5 and 10 mM of  $\text{CaCl}_2$  or  $\text{MgCl}_2$  to Alsever's solution.

### Analysis of the non-protein hemolysins

In a previous study, we found a non-protein fraction in the aqueous extract of *M. complanata* that was highly soluble in water and ethanol, which induced slow hemolytic activity [12]. Hence, in this study the hemolytic activity of the denatured aqueous extract (induced by preincubation at 100°C for 30 minutes) was tested by incubating erythrocytes (0.10, 0.32, 1.00, 3.16, 10.00, 31.60, 100.00, 316.00, and 1000.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for four hours at 37°C. The ethanolic extract was prepared by maceration of the lyophilized aqueous extract with ethanol for 48 hours. Then the organic extract was filtered (Whatman filter paper n. 1, General Electric Company, USA) and concentrated to solvent free by evaporation in a rotating evaporator (Büchi, V-850, R-114, B-480, Switzerland) at 40°C.

In order to determine the source of the non-protein cytotoxins in *M. complanata* aqueous extract, the ethanolic extracts were prepared in the same way, from artificially bleached and normal hydrozoan fragments. It was found that 70% ethanol failed to induce nematocyst discharge and dramatically impaired chemosensitizer-induced discharge response [19]. It was thus assumed that ethanolic extracts from *M. complanata* fragments contain mainly extra-nematocyst material. In order to test this assumption, *M. complanata* nematocysts were isolated by the method described by Radwan [9] and suspended in ethanol to observe their possible discharge. Bleaching induction was performed according to a method described elsewhere [24]. Briefly, immediately after collection, the calcareous hydrozoan fragments were anchored individually onto modeling clay (Plasticine, Flair Leisure Products plc, UK) on acrylic sheets, divided in two groups, and each group was put into an 80-liter acrylic aquarium tank with filtered flowing seawater at 27°C for five days. Then, the temperature of the tank that contained the experimental group was raised to 33°C until bleaching of the fragments was observed (five days). The temperature of the other tank was maintained at 27°C during this period, and these fragments were used as a normal control fragments. All fragments were subsequently frozen and stored at -70°C.

### Statistical analysis

The program Prism version 5.00 (GraphPad Software, USA) was used for all analysis of data and statistics. Each concentration-response curve was plotted in triplicate using erythrocytes from one animal. For each curve, the  $HU_{50}$  was estimated by fitting  $\log(\text{agonist})$  vs. response using non-linear regression analysis. The  $HU_{50}$  of each experimental condition was expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) and multiple comparisons were made by one-way analysis of variance followed by Tukey's test. All tests were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .



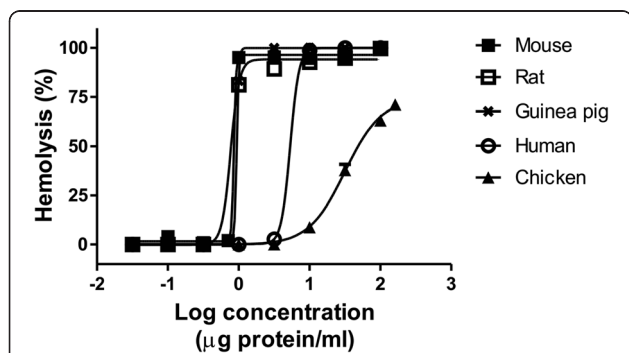
## Results

### Properties of the hemolytic activity of the aqueous extract

*M. complanata* aqueous extract was tested for its hemolytic activity on erythrocytes of various species. These results showed that the extract induces concentration-dependent hemolytic activity in all species used in this study (Figure 1). Comparisons between HU<sub>50</sub> values did not show differences between guinea pig, rat and mouse. A slight difference, statistically insignificant, was observed among hemolysis induced on human erythrocytes and other red blood cells. Undoubtedly, chicken erythrocytes were less susceptible to lysis, resulting in a hemolytic effect with lower potency and less efficacy. Table 1 shows the HU<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> values estimated by non-linear regression analysis.

When the hemolytic activity of the aqueous extract was tested by using different incubation times (10, 20, 30, and 60 minutes), no significant differences were observed (Table 2). These results indicate that the extract induces a rapid hemolytic activity and after ten minutes its potency is similar to that observed after 30 minutes of incubation.

The hemolytic activity induced by the aqueous extract exhibited thermal instability. Figure 2 shows representative hemolytic concentration-response curves of the extract after preincubation at different temperatures and Table 3 shows the corresponding HU<sub>50</sub> values. The hemolytic activity of the extract was not significantly affected when it was preincubated at temperatures below 45°C for 30 minutes. The hemolytic potency of the extract was significantly reduced after incubation at 60°C and was destroyed at 100°C. However, when the hemolytic activity of the extract was assayed by using different temperatures of incubation with rat erythrocytes for 30 minutes, no significant differences were observed at temperatures over 28°C (Table 4). However, at temperatures lower than 28°C, hemolytic activity was significantly reduced. Temperatures of incubation above 50°C



**Figure 1** Representative concentration-response curves of hemolysis induced by *M. complanata* aqueous extract on erythrocytes of various species.

**Table 1** Values of hemolytic activity (HU<sub>50</sub> and E<sub>max</sub>) of the *M. complanata* aqueous extract on erythrocytes of various species

Species	HU <sub>50</sub> (µg protein/mL)	E <sub>max</sub>
Human	5.36 ± 0.88	99.78 ± 0.98
Chicken	24.55 ± 6.93*	80.85 ± 6.82
Guinea pig	0.56 ± 0.01	105.45 ± 2.15
Rat	0.49 ± 0.09	98.87 ± 3.34
Mouse	0.80 ± 0.03	107.15 ± 1.65

\*Significantly different from all HU<sub>50</sub> values (p < 0.05).

were not reported since the erythrocytes were lysed as a result of the high temperature.

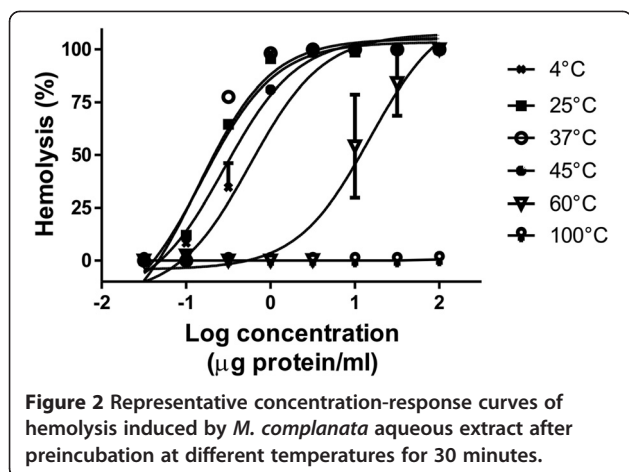
When the hemolytic activity of the aqueous extract was assayed by using Alsever's solution with Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> at two concentrations (5 and 10 mM), it was observed that this activity was independent of the presence of these divalent cations. Table 5 shows the HU<sub>50</sub> obtained in the presence of these ions.

### Analysis of the non-protein hemolysins

To evaluate the hemolytic activity induced by non-protein compounds contained in the aqueous extract of *M. complanata*, the hemolytic test was performed by incubating the denatured extracts with the erythrocytes for four hours at 37°C. As a result, the denatured aqueous extract (protein content of 3.077% w/w) induced a delayed concentration-dependent hemolysis (HU<sub>50</sub> = 1,050.00 ± 45.85 µg/mL). The ethanolic extract prepared by maceration of the lyophilized aqueous extract (protein content of 0% w/w) induced a hemolytic effect (HU<sub>50</sub> = 1,167.00 ± 54.95 µg/mL) with a potency similar to that induced by the denatured aqueous extract. Ethanolic extracts, obtained by maceration of bleached and normal fragments (Figure 3), also induced a concentration-dependent hemolytic activity. The hemolysis induced by the ethanolic extract (protein content of 0.699% w/w) from control fragments (HU<sub>50</sub> = 55.48 ± 14.36 µg/mL) was similar to that induced by the ethanolic extract (protein content of 0.067% w/w) from bleached fragments (HU<sub>50</sub> = 17.35 ± 2.77 µg/mL). These organic extracts were significantly more potent than the denatured aqueous extract. Figure 4 shows representative concentration-response

**Table 2** HU<sub>50</sub> values of the *M. complanata* aqueous extract obtained by using different incubation times with rat erythrocytes

Time (min)	HU <sub>50</sub> (µg protein/mL)
10	0.58 ± 0.11
20	0.52 ± 0.14
30	0.41 ± 0.05
60	0.20 ± 0.03



**Figure 2** Representative concentration-response curves of hemolysis induced by *M. complanata* aqueous extract after preincubation at different temperatures for 30 minutes.

### Discussion

Cnidarian venoms are complex mixtures of natural toxins that vary in activity and composition. To date, research on these venoms has shown that they contain two main types of toxins, namely: neurotoxins and cytolytins [25]. Cnidarian neurotoxins are generally low-molecular-weight peptides and clearly have an aggressive purpose as they induce paralysis in the prey [25,26]. However, there are also peptide neurotoxins that have a defensive role as they induce intense pain [27]. Cnidarian cytolytins are a diverse group of peptides and proteins that help in the pre-digestion of prey as well as in the dissemination of the venom by inducing local tissue destruction [14,15]. These toxins attract considerable interest due to their possible application as models for the study of many membrane processes, and due to their possible use in biotherapeutic applications such as the selective killing of parasites and cancer cells [28,29]. Moreover, the local damage induced by cnidarian venom has been attributed to cytolytins [13,15,16]. Therefore, characterization of these cytolytins

**Table 3** HU<sub>50</sub> values of the *M. complanata* aqueous extract obtained after preincubation at different temperatures for 30 minutes with rat erythrocytes

Temperature (°C)	HU <sub>50</sub> (µg protein/mL)
4	0.41 ± 0.12
25	0.35 ± 0.2
37	0.17 ± 0.03
45	0.50 ± 0.07
60	12.97 ± 2.06*
100	–

\*Significantly different from all HU<sub>50</sub> values (p < 0.05).

**Table 4** HU<sub>50</sub> values of the *M. complanata* aqueous extract obtained by using different incubation temperatures for 30 minutes with rat erythrocytes

Temperature (°C)	HU <sub>50</sub> (µg protein/mL)
20	60.25 ± 3.88*
25	15.06 ± 4.53*
28	7.07 ± 1.45
30	8.69 ± 0.82
34	4.15 ± 0.29
37	2.03 ± 0.35
40	2.06 ± 0.66
43	2.07 ± 0.33
46	2.00 ± 0.15
50	2.25 ± 0.14

\*Significantly different from all HU<sub>50</sub> values (p < 0.05).

may lead to better care for the victims of envenomation accidents.

Cnidarian cytolytins induce hemolysis against erythrocytes of many different species [13]. With some exceptions, these cytolytins are contained in stinging capsules called nematocysts that inject their content into prey through a harpoon-like structure after an appropriate stimulus [30]. Some cnidarians possess nematocysts capable of penetrating the human skin and inducing local and systemic symptoms, which comprises a serious threat to human health [17,20,31]. In the Mexican Caribbean, *Millepora* species are noted for their ability to induce burning pain and local reactions on human skin after contact. In fact, these species possess penetrating nematocysts [2]. In a previous study, we reported the concentration-dependent hemolytic activity of the aqueous extract of *M. complanata* on rat erythrocytes and found that this activity was heat-labile, which suggested that the hemolysins responsible for this activity were proteins [11]. In the present study, we found that this extract also induced hemolysis on human, chicken, guinea pig and mouse erythrocytes under the same conditions as those of the previous study. These results showed that rodent erythrocytes were more susceptible to lysis induced by the extract than human and chicken

**Table 5** HU<sub>50</sub> values of the *M. complanata* aqueous extract obtained by using two different concentrations of Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> in Alsever's solution

	HU <sub>50</sub> (µg protein/mL)
Control	0.48 ± 0.12
5 mM Ca <sup>++</sup>	0.45 ± 0.04
10 mM Ca <sup>++</sup>	0.35 ± 0.19
5 mM Mg <sup>++</sup>	0.68 ± 0.37
10 mM Mg <sup>++</sup>	0.39 ± 0.19



**Figure 3** Photograph of treated *M. complanata* fragments that were employed to induce bleaching. A control fragment is shown on the left and a bleached fragment is shown on the right.

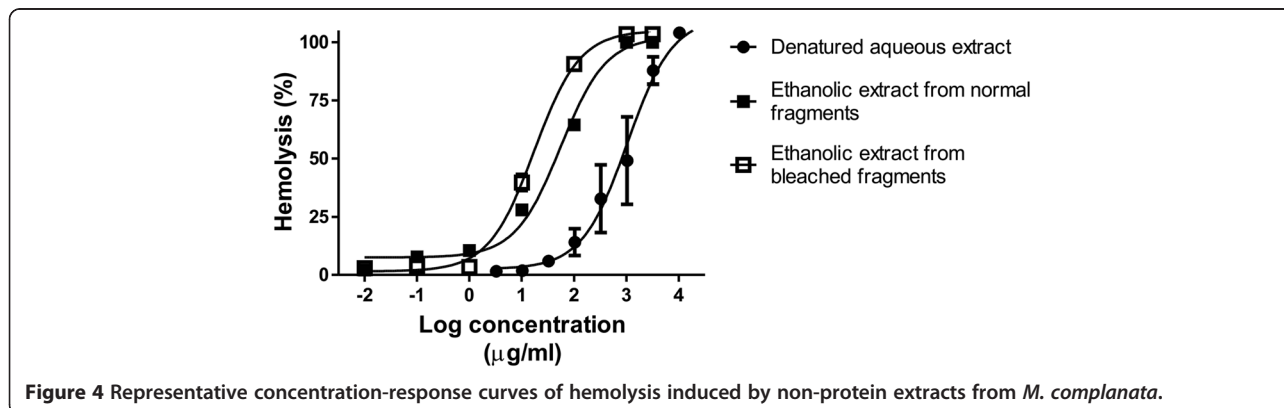
erythrocytes, which could be due to differences in the composition of membrane lipids, since several cnidarian cytolytins preferably inserts in membranes that have a specific lipid in a greater proportion [28].

Studies on the hemolytic properties of protein cytolytins from cnidarian venoms, including the *Millepora* species, have shown that they induce rapid hemolysis [23,32-35]. In this study, hemolytic reaction tests revealed that after incubation with the erythrocytes for ten minutes at 37°C, the aqueous extract of *M. complanata* induces a concentration-dependent hemolysis similar to

that previously reported after incubation for 30 minutes. As previously observed, the hemolytic activity of this aqueous extract was temperature-sensitive. Preincubation at 60°C significantly reduced the hemolytic activity of the extract and this activity was almost completely abolished when the extract was preincubated at 100°C for 30 minutes. Loss of hemolytic activity might be due to heat denaturation and presence of protease. However, in a previous study we found that the aqueous extract of this hydrozoan does not exhibit protease activity [12].

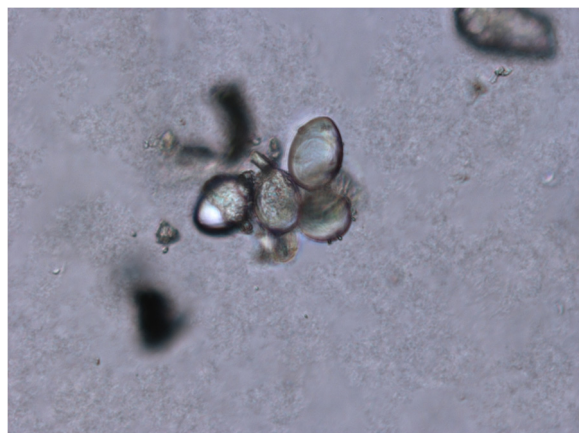
Protease activity has been identified in the venoms of other cnidarians such as the jellyfish *Rhopilema esculentum* and *Carybdea alata* [32,36]. The hemolytic potency of these venoms was greatly reduced after preincubation at 45°C for 30 minutes. Apparently, the aqueous extract of *M. complanata* is slightly more resistant to temperature than jellyfish venoms and this could be due to the absence of proteases. Undoubtedly, the complete abolishment of activity by heating at 100°C is attributed to denaturation of hemolytic proteins. Moreover, when the hemolytic activity of the extract was assayed at different incubation temperatures, no significant differences were observed at temperatures over 28°C, which indicates that hemolysins of the extract are relatively stable in a range of temperatures from 28 to 50°C. At temperatures lower than 28°C, the hemolytic activity of the aqueous extract was significantly reduced, which shows that warm temperatures stimulate the hemolytic reaction. Hemolysins from jellyfish venoms usually have their optimum activity at temperatures below 45°C. For example, the optimum temperature for incubation of *Stomolophus meleagris* venom was 37°C relatively to its hemolytic activity [37]. The heat sensitivity of jellyfish cytolytins is one of the reasons for applying hot water (42-45°C) to sting sites [17,21]. However, it should be considered that this first aid might not be the most suitable care to inactivate the proteins that induce local reactions caused by contact with *M. complanata*.

To date, the hemolytic mechanism of *Millepora* venoms has not yet been defined. Despite the variability in the



**Figure 4** Representative concentration-response curves of hemolysis induced by non-protein extracts from *M. complanata*.





**Figure 5** Light microscopy image showing isolated nematocysts that remained undischarged when suspended in ethanol. Magnification 400 x.

composition of cnidarian venoms, there is evidence that supports the idea that actinoporin-like toxins and phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) toxins are the basic components of the cnidarian venom system [38]. Some studies have shown that the hemolytic activity induced by *Millepora* venoms might be associated with the presence of PLA<sub>2</sub> proteins. For instance, it was reported that *Millepora* species present higher PLA<sub>2</sub> activity levels than other cnidarians [39]. Shiomi *et al.* [35] reported that the venoms of *M. dichotoma* and *M. platyphylla* exhibit PLA<sub>2</sub> activity, but other enzymatic activity such as hyaluronidase and protease were not detected. Radwan and Aboul-Dahab [40] isolated a 32.5 kDa PLA<sub>2</sub> protein, named milleporin-1, in the venom of *M. platyphylla* that showed a significant contribution to the overall hemolysis of human erythrocytes. As concerns *M. complanata*, we found in a previous study that the aqueous extract of this species presents PLA<sub>2</sub> activity, and its hemolytic activity was significantly decreased after incubation with the PLA<sub>2</sub> inhibitor *p*-bromophenacyl bromide. In a preliminary fractionation by HPLC of this extract we detected a hemolysin with a relative molecular weight similar to that of milleporin-1 [11].

The hemolytic activity of PLA<sub>2</sub> proteins may be due to their enzymatic activity resulting in hydrolysis of cellular membrane phospholipids, or indirectly through the generation of toxic free fatty acids and lysophospholipids [41]. A common characteristic of most secreted PLA<sub>2</sub> proteins is that the presence of a millimolar concentration of Ca<sup>++</sup> is required for catalytic activity. In this study, we observed that the hemolytic activity of the aqueous extract of *M. complanata* was independent of the presence of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. The effect of these cations on the hemolytic activity of cnidarian venoms is variable, which may be due to structural differences that contribute to their cytolytic activity [28,32,33,37,42]. It is known that PLA<sub>2</sub> from venoms

induce other toxic effects that are either dependent or independent on catalytic activity, such as neurotoxicity, cardiotoxicity, myotoxicity or even digestive activity [15,41].

An interesting feature of the aqueous extract of *M. complanata* is that it contains non-protein cytolysins that induce slow hemolytic activity. The hemolytic activity of this extract was evaluated after denaturation of its protein content and we found that after four hours of incubation with erythrocytes concentration-dependent hemolysis had been induced. Based on the previous detection of a hemolytic non-protein fraction that was highly soluble in water and ethanol [12], we also evaluated the hemolytic activity of an ethanolic extract from the lyophilized aqueous extract and observed a very similar hemolytic activity with that of denatured aqueous extract. Protein content was not detectable in this ethanolic extract, which suggested that these non-protein slow hemolysins were completely extracted by ethanol from the aqueous extract.

The presence of non-protein toxins in other cnidarians is common [13,25]. The most interesting example is palytoxin, a complex polyether compound that was first isolated with ethanol from the zoanthid *Palythoa toxica* (class Anthozoa). This hemolysin, although potent, acts slowly on erythrocytes from several species and induces cytotoxic activity on cultured cells [43]. In order to determine the source of the non-protein hemolysins of the aqueous extract of *M. complanata*, we prepared ethanolic extracts from bleached (without symbiotic zooxanthellae) and control fragments of the hydrozoan. These extracts were prepared based on a study that showed that 70% ethanol failed to induce nematocyst discharge and dramatically impaired chemosensitizer-induced discharge response [19]. When isolated, nematocysts from *M. complanata* that were suspended in ethanol were observed by microscopy, and it was found that they were undischarged. In consideration of this fact, the extra-nematocyst material may be extracted with ethanol from the fragments of the hydrozoan.

The results of the evaluation of these ethanolic extracts showed that the extract from bleached fragments was slightly more potent than the extract from control fragments, while both were much more potent than the denatured aqueous extract. The reason for the higher potency of these extracts is that they present these thermostable slow hemolysins in a higher concentration than the denatured aqueous extract. These results indicate that the source of these non-protein hemolysins is the extra-nematocyst tissue of *M. complanata* and not the nematocysts or the symbiotic zooxanthellae. The presence of bioactive secondary metabolites in the body tissue of hydrozoans is very common and it is believed that these organisms are protected from predation not only by their nematocysts but also by their non-nematocystic toxins, such as secondary metabolites and pore forming proteins

[15]. Therefore, further research on the toxins contained in the aqueous extract of *M. complanata* is essential to determine their identity and mechanisms of action, and to establish similarities with other hydrozoans and differences with other cnidarians.

## Conclusions

The present results show that the *M. complanata* aqueous extract possesses one or more powerful heat-labile hemolytic proteins that are slightly more resistant to temperature than jellyfish venoms. These hemolysins do not require a long incubation time and are  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$  independent. This aqueous extract also contains slow thermostable hemolysins that are highly soluble in ethanol. We inferred that these possible cytolytic secondary metabolites are derived from the body tissues of the hydrozoan. This hypothesis requires further research in future studies.

## Ethics committee approval

The present study was conducted according to and approval of the National Commission of Aquaculture and Fishing, the Secretary and Agriculture, Livestock, Rural Development, Fishing and Feeding of Mexican Federal Government (permission number PFP/DGOPA-071/13).

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

AGA and LJME performed experiments. AR and JSR made substantial contributions to perform the experiments. AGA conceived, designed, coordinate the study and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

This work was supported by grant FOFI-UAQ-2012/20103038 to A. García-Arredondo from UAQ and by grants CB-2009-01/133785 and CONACYT FOMIX-QRO 2012-01 (project: QRO-2012-C01-192954) from the National Council on Science and Technology (CONACYT) to A. Rojas and I. Rojas. The authors acknowledge María de Jesús Villafuerte, Juan Pablo Moctezuma, Esmeralda Romo and Arameli Robles for their assistance on some bioassays, Martín García (Animal House of the Institute of Neurobiology, UNAM) for supplying the animal blood samples, and Christian J. Valencia (Unit of Chemical Services, School of Chemistry, UAQ) for supplying the human blood samples.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratory of Chemical and Pharmacological Natural Products Research, School of Chemistry, Autonomous University of Querétaro, Querétaro 76010, Mexico. <sup>2</sup>Reef System Unit, Puerto Morelos, Institute of Marine Sciences and Limnology, National Autonomous University of Mexico, Puerto Morelos, Quintana Roo 77500, Mexico.

Received: 4 June 2014 Accepted: 28 October 2014

Published: 12 November 2014

## References

1. Rojas-Molina A, García-Arredondo A, Ibarra-Alvarado C, Bah M: *Millepora* ("fire corals") species: toxinological studies until 2011. In *Advances in Environmental Research*, Volume 26. Edited by Daniels JA. New York: Nova; 2012:133–148.

2. García-Arredondo A, Rojas-Molina A, Iglesias-Prieto R, Zepeda-Rodríguez A, Palma-Tirado L: Structure of nematocysts isolated from the fire corals *Millepora alicornis* and *Millepora complanata* (Cnidaria: Hydrozoa). *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2012, **18**(1):109–115. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1678-91992012000100014&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1678-91992012000100014&script=sci_arttext).
3. Moats WE: Fire coral envenomation. *J Wilderness Med* 1992, **3**(3):284–287.
4. Prasad R, Vincent L, Hamilton R, Lim K: Minimal change disease in association with fire coral (*Millepora* species) exposure. *Am J Kidney Dis* 2005, **47**(1):e15–e16.
5. Wittle LW, Middlebrook RE, Lane CE: Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alicornis*. *Toxicon* 1971, **9**(4):327–331.
6. Middlebrook RE, Wittle LW, Scura ED, Lane CE: Isolation and purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. *Toxicon* 1971, **9**(4):333–336.
7. Wittle LW, Scura ED, Middlebrook RE: Stinging coral (*Millepora tenera*) toxin: a comparison of crude extracts with isolated nematocyst extracts. *Toxicon* 1974, **12**(5):481–486.
8. Wittle LW, Wheeler CA: Toxic and immunological properties of stinging coral toxin. *Toxicon* 1974, **12**(5):487–490.
9. Radwan FF: Comparative toxinological and immunological studies on the nematocyst venoms of the Red Sea fire corals *Millepora dichotoma* and *M. platyphylla*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002, **131**(3):323–334.
10. Rojas-Molina A, Torres M, Rojas JI, Feregrino A, Heimer-de la Cotera EP: Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon* 2002, **40**(6):777–785.
11. Ibarra-Alvarado C, García-Arredondo A, Aguilar MB, Rojas-Molina A, Falcón A, Heimer de la Cotera EP: Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2007, **146**(4):511–518.
12. García-Arredondo JA: *Caracterización del veneno del "coral de fuego" Millepora complanata: efectos tóxicos y farmacológicos del veneno e identificación de sus componentes*. Saarbrücken: Publicia; 2013.
13. Mariottini GL, Pane L: Cytotoxic and cytolytic cnidarian venoms: a review on health implications and possible therapeutic applications. *Toxins* 2014, **6**(1):108–151.
14. Šuput D: *In vivo* effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon* 2009, **54**(8):1190–1200.
15. Sher D, Zlotkin E: A hydra with many heads: protein and polypeptide toxins from hydra and their biological roles. *Toxicon* 2009, **54**(8):1148–1161.
16. Brinkman DL, Burnell JN: Biochemical and molecular characterisation of cubozoan protein toxins. *Toxicon* 2009, **54**(8):1162–1172.
17. Ward NT, Darracq MA, Tomaszewski C, Clark RF: Evidence-based treatment of jellyfish stings in North America and Hawaii. *Ann Emerg Med* 2012, **60**(4):399–414.
18. Auerbach PS: In reply to evidence-based treatment of jellyfish stings in North America and Hawaii. *Ann Emerg Med* 2013, **61**(2):254.
19. Morabito R, Marino A, Dossena S, La Spada G: Nematocyst discharge in *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphozoa) oral arms can be affected by lidocaine, ethanol, ammonia and acetic acid. *Toxicon* 2014, **83**:52–58.
20. Cegolon L, Heymann WC, Lange JH, Mastrangelo G: Jellyfish stings and their management: a review. *Mar Drugs* 2013, **11**(2):523–550.
21. Handbook of Non Drug Intervention (HANDI) Project team: Hot water immersion for bluebottle stings. *Aust Fam Physician* 2013, **42**(6):401–402.
22. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, **72**(1–2):248–254.
23. Torres M, Aguilar MB, Falcón A, Sánchez L, Radwan FF, Burnett JW, Heimer-de la Cotera EP, Arellano RO: Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon* 2001, **39**(9):1297–1307.
24. García-Arredondo A, Rojas-Molina A, Ibarra-Alvarado C, Iglesias-Prieto R: Effects of bleaching on the pharmacological and toxicological activities elicited by the aqueous extracts prepared from two "fire corals" collected in the Mexican Caribbean. *J Exp Mar Biol Ecol* 2011, **396**(2):171–176.
25. Turk T, Kem WR: The phylum cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon* 2009, **54**(8):1031–1037.
26. Norton RS: Structures of sea anemone toxins. *Toxicon* 2009, **54**(8):1075–1088.
27. Bohlen CJ, Julius D: Receptor-targeting mechanisms of pain-causing toxins: how ow? *Toxicon* 2012, **60**(3):254–264.

28. Anderluh G, Macek P: Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 2002, **40**(2):111–124.
29. Kristan KC, Viero G, Dalla Serra M, Macek P, Anderluh G: Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon* 2009, **54**(8):1125–1134.
30. Ozbek S, Balasubramanian PG, Holstein TW: Cnidocysts structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon* 2009, **54**(8):1038–1045.
31. Burnett JW: Treatment of Atlantic cnidarian envenomations. *Toxicon* 2009, **54**(8):1201–1205.
32. Yu H, Li C, Li R, Xing R, Liu S, Li P: Factors influencing hemolytic activity of venom from the jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye. *Food Chem Toxicol* 2007, **45**(7):1173–1178.
33. Feng J, Yu H, Xing R, Liu S, Wang L, Cai S, Li P: Partial characterization of the hemolytic activity of the nematocysts venom from the jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye. *Toxicol Vitro* 2010, **24**(6):1750–1756.
34. Klyshko EV, Issaeva MP, Monastyrnaya MM, Il'yna A, Guzev KV, Vakorina TI, Dmitrenok PS, Zykova TA, Kozlovskaya EP: Isolation, properties and partial amino acid sequence of a new actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon* 2004, **44**(3):315–324.
35. Shiomi K, Hosaka M, Yanaike N, Yamanaka H, Kikuchi T: Partial characterization of venoms from two species of fire corals *Millepora platyphylla* and *Millepora dichotoma*. *Nippon Suisan Gakk* 1989, **55**(2):357–362.
36. Chung JJ, Ratnapala LA, Cooke IM, Yanagihara AA: Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. *Toxicon* 2001, **39**(7):981–990.
37. Li R, Yu H, Xing R, Liu S, Qing Y, Li K, Li B, Meng X, Cui J, Li P: Isolation and *in vitro* partial characterization of hemolytic proteins from the nematocysts venom of the jellyfish *Stomolophus meleagris*. *Toxicol Vitro* 2013, **27**(6):1620–1625.
38. Sher D, Knebel A, Bsoir T, Neshier N, Tal T, Morgenstern D, Cohen E, Fishman Y, Zlotkin E: Toxic polypeptides of the hydra – a bioinformatic approach to cnidarian allomones. *Toxicon* 2005, **45**(7):865–879.
39. Nevalainen TJ, Peuravuori HJ, Quinn RJ, Llewellyn LE, Benzie JA, Fenner PJ, Winkel KD: Phospholipase A<sub>2</sub> in cnidaria. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004, **139**(4):731–735.
40. Radwan FF, Aboul-Dahab HM: Milleporin 1, a new phospholipase A<sub>2</sub> active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocysts. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2004, **139**(4):267–272.
41. Nevalainen TJ: Phospholipases A<sub>2</sub> in the genome of the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Comp Biochem Physiol D Gen Proteom* 2008, **3**(3):226–233.
42. Kang C, Munawir A, Cha M, Sohn ET, Lee H, Kim JS, Yoon WD, Lim D, Kim E: Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2009, **150**(1):85–90.
43. Riobó P, Franco JM: Palytoxins: biological and chemical determination. *Toxicon* 2011, **57**(3):368–375.

doi:10.1186/1678-9199-20-49

Cite this article as: García-Arredondo *et al.*: Characteristics of hemolytic activity induced by the aqueous extract of the Mexican fire coral *Millepora complanata*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2014 **20**:49.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit

