



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTOS BIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LOS
EXTRACTOS ACUOSOS DE TRES CORALES
ESCLERACTINIOS DEL CARIBE MEXICANO:
Siderastreasiderea, Poritesastreoides Y Diploriastrigosa”**

TESIS

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

PRESENTA

VIZUETT OLVERA RANGEL

DIRIGIDA POR

Dr. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTOS BIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LOS
EXTRACTOS ACUOSOS DE TRES CORALES
ESCLERACTINIOS DEL CARIBE MEXICANO:
Siderastreasiderea, Poritesastreoides Y Diploriastrigosa”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICOBIOLOGO

PRESENTA

VIZUETT OLVERA RANGEL

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"EFECTOS BIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LOS
EXTRACTOS ACUOSOS DE TRES CORALES
ESCLERACTINIOS DEL CARIBE MEXICANO:
Siderastreasiderea, Poritesastreoides Y Diploriastrigosa"

PROTOCOLO DE TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

VIZUETT OLVERA RANGEL

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

RESUMEN

El orden *Scleractinia* (phylum Cnidaria, clase Anthozoa, subclase Hexacoralia) está constituido por corales marinos que tienen la característica de formar un exoesqueleto calcáreo, razón por la que se les conoce también como “corales pétreos o duros”. Estos corales son los principales organismos constructores de arrecifes coralinos a nivel mundial y por lo tanto están ampliamente distribuidos en las costas tropicales. Al igual que todos los cnidarios, estos corales también presentan nematocistos en sus tentáculos; los cuales son cápsulas cargadas de veneno que utilizan para capturar a sus presas y alimentarse. A pesar de que estas especies no representan peligro para los humanos, debido posiblemente a que sus nematocistos no tienen la capacidad de penetrar la piel humana, podrían representar una fuente novedosa de compuestos bioactivos útiles en el desarrollo de nuevos fármacos y herramientas de investigación farmacológica. Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con estudios sobre los efectos e identidad de las toxinas de estas especies. Tomando en cuenta lo anterior, y considerando el compromiso que tenemos en México de generar conocimiento sobre diversos aspectos biológicos de la flora y fauna marina de nuestro país, se plantea la presente propuesta que tiene como propósito evaluar diferentes actividades biológicas como, la actividad hemolítica, ensayo de aorta aislada de rata y toxicidad, además de pruebas enzimáticas significativas de fosfolipasa A₂(PLA₂), hialuronidasa y proteasa de los extractos acuosos de tres corales escleractinios del Caribe Mexicano: *Siderastrea siderea*, *Porites astreoides* y *Diploria strigosa*.

1. ANTECEDENTE

1.1 Importancia de los venenos en farmacología

El veneno ha evolucionado de forma independiente al menos 100 veces en 8 filos diferentes. Se ha estimado que hay 220 000 especies de venenos en el planeta, lo que representa un 15% de la biodiversidad animal existente que abarca anélidos, artrópodos, cnidarios, moluscos, nemátodos, erizos de mar, estrellas de mar y vertebrados como las serpientes, lagartijas, peces musarañas y ornitorrincos. La alta potencia, selectividad y estabilidad biológica de muchos péptidos derivados del veneno los ha hecho particularmente atractivos desde la perspectiva de descubrimiento de fármacos (Herzig y Col., 2020).

Los venenos son cócteles complejos que involucran una variedad de moléculas, como proteínas grandes, péptidos pequeños, poliaminas y sales, que alteran la fisiología de los animales de presa tras la inyección. Los péptidos y las proteínas del veneno se han perfeccionado durante millones de años de presión evolutiva para unir sus receptores con alta afinidad y, en muchos casos, una selectividad excepcional.

La mayoría de los fármacos derivados de péptidos de veneno actuales se estudiaron en varios linajes venenosos que son relativamente más jóvenes en evolución (Qiwen y Col., 2018).

Las nuevas tendencias en la búsqueda de nuevos compuestos farmacéuticos, se centran en la búsqueda de hábitats inexplorados. Los entornos marinos se consideran una fuente emergente para el descubrimiento de productos naturales. Los océanos constituyen más del 70% de la superficie de nuestro planeta, de los cuales 92 y 93% son de aguas profundas, mientras que la región costera representa solo 7-8%. Se ha estimado que el 60% de la región de aguas profundas está cubierta por agua de más de 2000 m de profundidad (Sarmiento y Col., 2016).

Las toxinas de los venenos de los animales corresponden a una mezcla compleja de compuestos, que han sido ampliamente investigados por muchos científicos en todo el mundo y han evolucionado durante siglos mejorando las acciones defensivas de

los animales. Estos venenos presentan una diversidad química, compuesta especialmente por sales inorgánicas, pequeñas moléculas orgánicas (<1 kDa), polipéptidos (2-9 kDa) y moléculas de alto peso molecular (>10 kDa). Las toxinas animales se han usado durante mucho tiempo como prototipos para el desarrollo de nuevas drogas terapéuticas debido a su alta selectividad y especificidad para los objetivos moleculares (Zambelli y col., 2016).

Los organismos venenosos están ampliamente extendidos en todo el reino animal, contando con un gran número de especies distribuidas entre todos los phylum, tales como cordados (reptiles, peces, anfibios, mamíferos), equinodermos (estrellas de mar, erizos de mar), moluscos (caracoles), anélidos (sanguijuelas), nemertinos (gusanos no segmentados), artrópodos (arácnidos, insectos, miriápodos) y cnidarios (anémonas de mar, medusas, corales). En cualquier hábitat hay una competencia por los recursos y cada ecosistema contiene venenos u organismos venenosos. Una de las técnicas más fascinantes para defenderse o para capturar presas es el uso de venenos. El veneno representa un rasgo adaptativo y un ejemplo de evolución convergente. Los venenos son cócteles mortales, cada uno compuesto principalmente por mezclas únicas de toxinas que generalmente son péptidos y proteínas naturalmente adaptadas por la selección natural para actuar sobre los sistemas vitales de la presa o la víctima. Las toxinas contenidas en un veneno suelen alterar la actividad de enzimas críticas, receptores o canales iónicos; desorganizando así los sistemas nerviosos central y periférico, los sistemas cardiovascular y neuromuscular, la coagulación sanguínea y la homeostasis (Hodgson, 2012; Takacs y Nathan, 2014; Lazcano y col., 2015). Debido a su alto grado de especificidad, las toxinas del veneno se han utilizado cada vez más como herramientas farmacológicas y como prototipos estructurales para el diseño racional de fármacos (Calvete y col., 2009).

Los venenos de animales han sido ampliamente utilizados en la búsqueda de compuestos bioactivos útiles para el desarrollo de nuevos prototipos de fármacos. Hasta el momento, alrededor de 15 fármacos (Tabla 1) que se encuentran a la venta,

se derivaron de toxinas y son utilizados para el tratamiento de enfermedades como hipertensión, diabetes y dolor crónico (Takacs y Nathan, 2014).

Tabla1. Diagnósticos clínicos derivados de toxinas de veneno de animal

Prueba/Nombre del reactivo	Origen de la especie	Mecanismo de acción	Hacer una prueba por
<i>Ensayo de anticuerpos anti-Cav2</i>	<i>Caracol de cono de geografía (Conus geographus) o caracol de cono de mago (Conus magus)</i>	<i>U-conotoxina GVIA radioyodada (Cg) o (Cm) u-conotoxina MVIIC que se unen a Cav2.2, 2.1 respectivamente</i>	<i>Síndrome miasténico de Lambert-Eaton</i>
<i>Ensayo de anticuerpos anti-nAChR</i>	<i>Krait de muchas bandas (Bungarus multicinctus) o "Cobras" (Naja spp.)</i>	<i>Unión de (Bm) a-bungarotoxina o (N) cobratoxina radioyodada a nAChR</i>	<i>Miastenia gravis</i>
<i>Anticuerpos anti-nAChR ensayo</i>	<i>Cobra monocelular (Naja kaouthia)</i>	<i>Unión de eu3p-a-cobratoxina a nAChR</i>	<i>Miastenia gravis</i>
<i>BOTROCETIN® von Willebrand (vWF)</i>	<i>Cabeza de lanza de Neuwied (Bothrops neuwiedi) o Jararaca (Bothrops jararaca)</i>	<i>Induce agregación plaquetaria dependiente del factor von Willebrand (vWF)</i>	<i>Nivel del factor von Willebrand (vWF)</i>
<i>Activador del factor V (RVV-V)</i>	<i>Víbora de Russell (Daboia russelii)</i>	<i>Activa el factor V</i>	<i>Determinación del factor V</i>
<i>PEFAKIT® PICT®</i>	<i>Víbora de Russell (Daboia russelii)</i>	<i>Activa el factor V</i>	<i>Actividad anticoagulante basada en la inhibición del factor Xa y / o del factor IIa</i>

Tabla 1. Diagnósticos clínicos derivados de toxinas de veneno animal

Prueba/Nombre del reactivo	Origen de la especie	Mecanismo de acción	Hacer una prueba por
<i>PEFAKIT APC-R</i> <i>Factor V Leiden</i>	<i>Víbora de Russell (Daboia russelii); y serpiente tigre (Notechis scutatus)</i>	<i>(Dr) activa el factor V; y (Ns) activa la protrombina</i>	<i>Mutación del factor V Leiden (FV: Q506)</i>
<i>PROTAC</i>	<i>Cabeza de cobre (Agkistrodon contortrix)</i>	<i>Activa la proteína C</i>	<i>Niveles de proteína C y proteína S</i>
<i>PROC GLOBAL</i>	<i>Cabeza de cobre (Agkistrodon contortrix)</i>	<i>Activa la proteína C</i>	<i>Anomalías en las vías de la proteína C y la proteína S</i>
<i>CRYOCHECK CLOT C</i>	<i>Cabeza de cobre (Agkistrodon contortrix); y la víbora de Russell (Daboia russelii)</i>	<i>(Ac) activa la proteína C; y (Dr) activa el factor X</i>	<i>Actividad de la proteína C</i>
<i>CRYOCHECK CLOT S</i>	<i>Cabeza de cobre (Agkistrodon contortrix); y la víbora de Russell (Daboia russelii)</i>	<i>(Ac) activa la proteína C; y (Dr) activa el factor X</i>	<i>Actividad de la proteína S</i>
<i>REPTILASE</i>	<i>Tiempo punta de lanza común (Bothrops atrox) o punta de lanza brasileña (Bothrops moojeni)</i>	<i>Escinde la cadena Aa del fibrinógeno</i>	<i>Nivel y función de fibrinógeno; contaminación por heparina</i>
<i>Tiempo textarin</i>	<i>Serpiente marrón oriental (Pseudonaja textilis)</i>	<i>Activador de protrombina dependiente de PL</i>	<i>Resistencia a la proteína C activada; anticoagulantes lúpicos</i>
<i>Relación textarina / ecarina</i>	<i>Serpiente marrón oriental (Pseudonaja textilis); y víbora de escamas de sierra (Echis carinatus)</i>	<i>Activador de protrombina dependiente de (Pt) PL; y (Ec) activa protrombina a meizotrombina en ausencia de PL</i>	<i>Confirmación de anticoagulantes lúpicos</i>

Tabla 1. Diagnósticos clínicos derivados de toxinas de veneno de animal

Prueba/Nombre del reactivo	Origen de la especie	Mecanismo de acción	Hacer una prueba por
<i>Tiempo de coagulación de la ecarina</i>	<i>Víbora de escamas de sierra (Echis carinatus)</i>	<i>Activa protrombina a meizotrombina en ausencia de PL</i>	<i>Inhibidores directos de la trombina; cuantificación de protrombina; anticoagulantes lúpicos</i>
<i>Activador del factor X (RVV-X)</i>	<i>Víbora de Russell (Daboia russelii)</i>	<i>Activa el factor X</i>	<i>Anticoagulantes del lupus; distinguir entre factor VII y factor X deficiencia</i>
<i>ESPECTROZIMO</i>	<i>Víbora de FXa Russell (Daboia russelii)</i>	<i>Activa el factor X</i>	<i>Actividad del factor X</i>
<i>STACLOT</i>	<i>APC-R Serpiente de cascabel occidental (Crotalus oreganus)</i>	<i>Activa el factor X</i>	<i>Resistencia a la proteína C activada</i>
<i>Stypven time (tiempo del veneno de víbora de Russell)</i>	<i>Víbora de Russell (Daboia russelii)</i>	<i>Activa el factor X</i>	<i>Deficiencia de factor VII o X</i>
<i>Diluir el tiempo del veneno de víbora de Russell (dRVVT)</i>	<i>Víbora de Russell (Daboia russelii)</i>	<i>Activa el factor X</i>	<i>Anticoagulantes del lupus</i>
<i>Diluir el veneno de la víbora de Russell confirmar DVVCONFIRM</i>	<i>Víbora de Russell (Daboia russelii)</i>	<i>Activa el factor X; PL extra corrige dRVVT</i>	<i>Confirmación de anticoagulantes lúpicos.</i>
<i>Hora del veneno de serpiente taipán</i>	<i>Taipan (Oxyuranus scutellatus)</i>	<i>Activador de protrombina, estimulado por PL</i>	<i>Anticoagulantes del lupus</i>

Además, los venenos también son explorados exhaustivamente con fines biotecnológicos para el desarrollo de fármacos biodirigidos, bioinsecticidas, cosméticos y aditivos que faciliten la distribución de fármacos (Calvete y col., 2009; Hodgson, 2012; Takacs y Nathan, 2014; Lazcano y col., 2015). Se estima que el veneno de cada especie puede contener más de 100 compuestos bioactivos, cada uno de los cuales podría actuar específicamente sobre un blanco molecular determinado. Se cree que en la actualidad existen más de 100,000 venenos de animales que aún no se han explorado (Takacs y Nathan, 2014). Es por esto que existe un gran interés científico por explorar la composición y efectos farmacológicos de los venenos.

Debido a la especificidad y potencia inherentes de la mayoría de las moléculas de veneno, éstos se han convertido en una fuente invaluable de moduladores para estudiar una amplia gama de objetivos moleculares, especialmente los canales iónicos activados por ligandos y activados por voltaje. Si bien la investigación sobre muchas dianas farmacológicas potenciales se ve obstaculizada por la falta de moduladores selectivos, nuestro creciente conocimiento de la farmacología del veneno está empezando a arrojar luz sobre algunas de estas dianas poco estudiadas.

1.2 Phylum cnidaria

La evidencia molecular y los datos fósiles ubican el origen de los cnidarios antes de periodo de Ediacárico hace unos 750 millones de años y la importante diversificación de taxones de los metazoos restantes antes del Cámbrico hace unos 550 millones de años. A pesar de la variedad en el tamaño, toxicidad, hábitat y morfología varios caracteres celulares son comunes en los miembros del phylum cnidaria como dos capas unicelulares (ectodermo y endodermo) separadas por una matriz extracelular (mesoglea), sistemas neuromusculares y sistemas sensoriales múltiples (Jouiaei y Col., 2015).

Cnidaria constituye un grupo de alrededor de 11000 a 13000 especies vivientes y está representado por un gran número de formas corporales muy diferentes, desde hermosas medusas hasta delicados pólipos (Deserti M, 2020).

Cnidaria es un filo diverso que comprende más de 13500 especies marinas de vida libre o especies parasitarias marinas de agua dulce y terrestre (Jaimes y Col. 2017).

Este phylum está constituido por organismos acuáticos de simetría radial, la mayor parte de los cuales son marinos. Un ciclo de vida cnidario dado puede incluir dos etapas caracterizadas por una forma corporal particular: el pólipo y la medusa. El pólipo es típicamente sésil mientras que la medusa es móvil y comúnmente se conoce como medusa. Una característica única de los miembros metazoarios de este phylum es que el cuerpo es diploblástico (que consta de dos capas de tejido) y, en consecuencia, carece de sistemas de órganos bien desarrollados. Entre estas dos capas de tejido se encuentra la mesoglea, una matriz gelatinosa. La capa interna es el endodermo, a menudo referido como la gastrodermis, cuya función principal es la digestión. La capa externa de tejido es llamada ectodermo o epidermis (Folino-Rorem, 2015).

El phylum Cnidaria se divide principalmente en dos grupos (Anthozoa y Medusozoa) en función de la estructura de los pólipos y la existencia de una etapa de medusa en los ciclos de vida. La Medusozoa es una clase que consiste en cuatro subclases: Scyphozoa, Cubozoa, Hydrozoa y Staurozoa. El subfilo Anthozoa comprende dos subclases, Hexacorallia y Octacorallia (Technau, U., 2011).

La Scyphozoa incluye a las medusas de diámetros grandes, ejemplos de especies características de esta clase son las medusas corona (orden Coronatae) y las medusas invertidas (familia Cassiopeidae, orden Rhizostomeae). A la Cubozoa anteriormente se le consideraba como un orden de la Scyphozoa debido a que presenta cierta semejanza con las medusas grandes; su nombre alude a la forma cúbica del cuerpo y se conocen comúnmente como “avispas de mar” (orden Carybdeida y Chirodripida) debido a sus venenos altamente tóxicos. La Hydrozoa cuenta con una mayor diversidad. Las especies más representativas son las hidras (orden Hydroida, familia Hydridae); también incluye especies que presentan la forma de medusa (orden Trachylina), medusas de agua dulce (orden Hydroida, suborden

Limnomedusae), formas coloniales flotantes (orden Siphonophora), e hidrocorales que consisten en colonias de pólipos que secretan esqueletos calcáreos (orden Anthoathecata, familia Milleporidae y orden Stylasterina). Finalmente, la clase Anthozoa comprende dos subclases, la subclase Hexacorallia (Zoantharia) – que recibe este nombre debido a que presenta múltiplos de seis tentáculos – incluye organismos como anémonas (orden Actinaria), corales negros (orden Antipatharia), anémonas tubo (orden Ceriantharia), corales scleractinios o pétreos (orden Scleractinia), corales falsos (orden Corallimorpharia) y zoantidos (orden Zoanthidea). Por su parte, la subclase Octocorallia (Alcyonaria) – con múltiplos de ocho tentáculos – incluye a los corales blandos (orden Alcyonacea) y a las plumas de mar (orden Pennatulacea) (Folino-Rorem, 2015). Recientes análisis filogenéticos moleculares han corroborado la naturaleza cnidaria de Myxozoa como un fuerte apoyo como hermano de Medusozoa (Jaimes y Col., 2017).

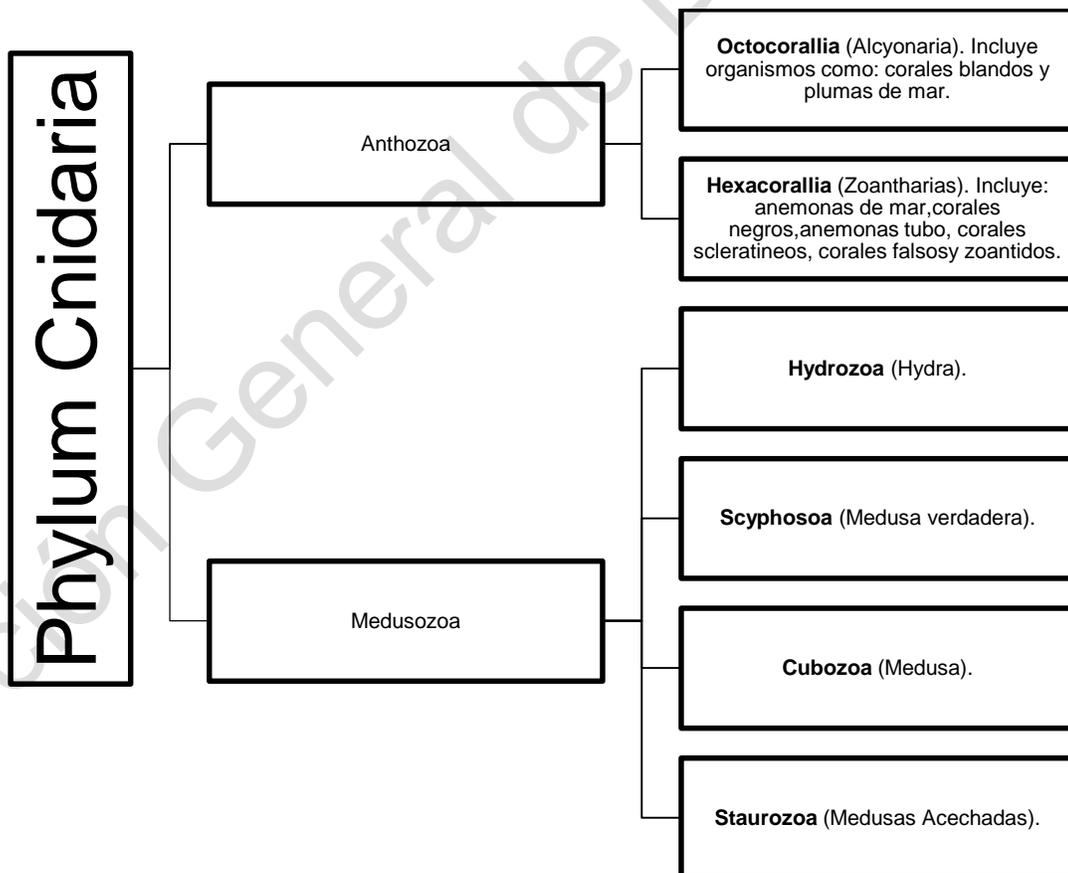


Figura 1. Esquema de la división del Phylum Cnidaria.

1.2.2 Toxicidad

El veneno de cnidario es una mezcla compleja de compuestos tóxicos y, por lo general, se descarga de forma explosiva tras la activación de células punzantes especializadas, llamadas nematocistos. Un avance significativo en la comprensión de la complejidad de los venenos de cnidarios se ha logrado recientemente por abundancia de estudios genómicos, transcriptómicos y proteómicos de organismos cnidarios y sus venenos. El arsenal tóxico del veneno incluye aminas biogénicas de bajo peso molecular (p. ej., serotonina, histamina, bunodosina, caissarona), neurotoxinas peptídicas (moduladores y toxinas del canal iónico, pequeños péptidos ricos en cisteína y otros), así como moléculas más grandes como enzimas (fosfolipasas y metaloproteasas) y péptidos y proteínas formadores de poros. Dado que muchas proteínas formadoras de poros (PFT) cnidarios son citolíticas y claramente tóxicas para las células y los organismos diana (Podobnik y Col., 2017).

Los cnidarios evolucionaron hace más de 600 millones de años, formando uno de los grupos más diversos de especies predominantemente marinas. Organismos, que abarcan alrededor de 13,300 especies. Su característica diagnóstica es la presencia de nematocistos, la única de tres categorías de cnidae (nematocistos, espiroquistes y pticocistos) exclusivo de todos los cnidarios. El nematocisto es la cápsula que contiene las células urticantes. Responsable de la producción, inoculación y descarga de toxinas mediante las cuales los cnidarios capturan a sus presas y se defienden. Los cnidarios también se han relacionado con potentes toxinas no proteínicas como las palitoxinas, o eventualmente con cianotoxinas, aparentemente adquiridas al alimentar a los productores primarios correspondientes. En conjunto, estas características hacen de este filo uno de los animales generalmente tóxicos más grandes (Rodrigues T, 2020).

Los venenos de los cnidarios son mezclas complejas de compuestos tóxicos, principalmente péptidos y proteínas, que se almacenan en organelos especializados denominados nematocistos. Estos nematocistos son orgánulos que miden alrededor

de 100 μm . La estructura de estos organelos consisten en una pared compuesta se una sustancia parecida a la quitina que se invagina en el ápex dando lugar a un filamento tubular enroscado. En el punto de inicio del filamento la cápsula presenta una tapa que cierra un opérculo. Junto al borde de éste hay un flajelo modificado llamado cnidocilo con un cintosoma en su base y que actúa a modo de gatillo. Cada nematocisto está contenido en una célula urticante que recibe el nombre de cnidocito, estas células especializadas están distribuidas principalmente en la epidermis de los tentáculos, de tal manera que cuando la presa entra en contacto con ellos, los nematocistos se disparan e inyectan su contenido a través del filamento urticante (Özbek y col., 2009).

Además de los nematocistos, existen otras estructuras similares, que junto con los nematocistos reciben el nombre de cnidae o cnidocistos. De este modo, los cnidocistos en general son utilizados para la captura de presas, la defensa y, en algunos casos, la adherencia a un sustrato. Los cnidocistos existen como tres tipos: nematocistos, cargados de veneno; espirocistos, que cumplen una función estructural actuando como barrera física; y los pticocistos, que producen un material pegajoso utilizado para fijarse a un sustrato (Turk y col., 2009).

La toxicidad de los cnidarios es variable y se han realizado numerosos estudios toxinológicos sobre sus venenos, principalmente en anémonas, medusas e hidras (Jouiaei y col., 2015). En general, los venenos de cnidarios contienen una gran variedad de péptidos tal como neurotoxinas, citolisinas, fosfolipasas A_2 (PLA₂) y otras toxinas (Rosa y col., 2015). Además, se han encontrado metabolitos secundarios con potentes actividades tóxicas; entre los que destaca la palitoxina y la lofotoxina (Turk y Kem, 2009).

Al contar con propiedades neurotóxicas, los venenos de cnidarios son una fuente interesante y vasta de moléculas con una actividad notable en el sistema nervioso central (Lazcano y col., 2015). Las neurotoxinas se caracterizan por interaccionar selectivamente sobre proteínas membranales de células musculares y nerviosas. Entre las cuales se encuentran neurotoxinas dirigidas a canales de Na⁽⁺⁾ dependientes de votaje y canales de K⁽⁺⁾ (NaTxS y KTxS respectivamente), (Jouiaei

y col., 2015). Generalmente, el resultado de esta interacción es la parálisis de la presa (Bosmans y Tytgat, 2007). Las toxinas de los corales escleractinios y coralimorfarios, como las anémonas de mar, no han sido investigadas exhaustivamente. (Turk y Kem, 2009).

Por otro lado, las citolisinas tienen la capacidad de romper las membranas celulares de tal manera ayudan a destruir órganos internos para hacer a la presa más fácil de digerir. Algunas citolisinas actúan formando poros en las membranas, produciendo una desestabilización en la concentración de iones que conduce al rompimiento de la célula. Las anémonas representan un ejemplo claro de organismos cuyos venenos presentan este tipo de citolisinas. En la anémona *Actinia equina* se han encontrado al menos 5 isoformas de proteínas formadoras de poro denominadas en conjunto equinatoxinas (Anderluh y col., 2002). Además de las equinatoxinas, se han encontrado otras isoformas en otras especies de anémonas; como las esticolisinas (Kem y Dunn, 1988) y las magnificalisinas (Khoo y col., 1993). Todas estas toxinas formadoras de poro constituyen la familia de las actinoporinas. Otro tipo de citolisinas que son comunes en los venenos cnidarios son las enzimas con actividad de fosfolipasa A_2 (PLA₂). Estas enzimas hidrolizan fosfolípidos de membrana produciendo la liberación de ácidos grasos (Nevalainen y col., 2004). Éstas enzimas están muy extendidas en la naturaleza. Las PLA₂ de diversos venenos pueden llegar a presentar actividad neurotóxica, miotóxica, anticoagulante y hemolítica (Kini, 2003). La relación entre la capacidad de alteración de las membranas por parte de proteínas citolíticas y la actividad de la PLA₂ se ha revisado ampliamente; los fosfolípidos son uno de los principales componentes químicos de la membrana celular, por lo que las enzimas como las PLA₂ que son capaces de hidrolizar estas moléculas están involucrados en procesos de alteración de la membrana (Del Monte y col., 2013).

La amplia gama de estudios toxicológicos sobre los venenos de algunos cnidarios se debe su toxicidad en humanos; que puede ser severa, como el caso de las “avispa de mar” que genera colapso cardiovascular inmediato y muerte en pocos minutos (Yanagihara y Shohet, 2012); o puede ser leve, como los “corales de fuego” que generan irritaciones locales dolorosas al contacto (García-Arredondo y col., 2015). A

pesar de esto, muchas toxinas de cnidarios han destacado por su uso potencial para el desarrollo de nuevos fármacos prototipo dirigidos al tratamiento de diversas enfermedades, mientras otras han destacado por su uso como herramientas de investigación para el estudio de diversos procesos fisiológicos (Jouiaei y col., 2015). Durante las últimas décadas, el interés por la biología y la utilización de los cnidarios ha crecido y una serie de metabolitos anticancerígenos y compuestos antioxidantes se han aislado en el interés de la salud humana y se ha visto que tienen actividad a nivel celular (Luigi, 2013).

1.2.3 Arrecifes de coral

Algunos cnidarios de la clase Anthozoa e Hydrozoa forman estructuras esqueléticas de carbonato de calcio, se distribuyen en zonas tropicales y subtropicales contribuyendo a la formación de la base de los arrecifes de coral (Watanabe, 2007). Los arrecifes de coral se encuentran entre los ecosistemas marinos más productivos, y se estima que la diversidad biológica en estos ecosistemas es más alta que en los bosques lluviosos tropicales. Los arrecifes de coral son la fuente de un gran grupo de productos naturales estructuralmente únicos con relevancia biomédica (Sarmiento y Col, 2016).

Juegan un papel ecológico y económico vital, ya que participan en los ciclos biogeoquímicos globales, proveen zonas de crianza para peces e invertebrados, dan protección a la línea de costa y abastecen a muchas poblaciones con bienes y servicios tales como alimento, posibilidades recreacionales y beneficios culturales

El arrecife de coral es la más diversa de todas las comunidades marinas. La estructura del arrecife mismo está formada por cnidarios que viven en colonias. Cada pólipo de la colonia secreta su propio esqueleto rico en calcio, que luego pasa a formar parte del arrecife. Alrededor de la mitad de la sustancia viva de un arrecife de coral puede consistir en algas verdes que viven dentro de él.

Los arrecifes de coral pueden ser considerados como ecosistemas relativamente raros. Ellos ocupan menos del 1% del ambiente bentónico global, que se traduce como aproximadamente 250000 km² del fondo marino. A pesar de su pequeña proporción, los arrecifes de coral son responsables de numerosos servicios ecosistémicos, que son esenciales para el bienestar humano y para la forma en que actualmente vivimos nuestras vidas por la costa (Ellif y col., 2017).

Los arrecifes coralinos son ecosistemas marinos que destacan por la riqueza y abundancia de especies de invertebrados y peces asociados a ellos que los pueden ocupar como refugio, crianza o área de alimentación. (Landa y col., 2013)

Los arrecifes de coral se encuentran entre los ecosistemas más notables del planeta, Estos arrecifes de coral son el hogar de 25% de todas las especies de peces marinos, el 70% de todos los arrecifes tropicales pueden ser destruidos en 2050.

A pesar de ocupar menos del 1% del fondo marino, se considera que son los ecosistemas más diversos y productivos de los océanos (Martínez y col., 2007).

Los arrecifes de coral constituyen el ecosistema más productivo y diverso desde el punto de vista biológico y proporcionan diversos bienes y servicios, incluidos los relacionados con la pesca, el turismo marino, la protección costera y la medicina. (William y col., 2015).

Los arrecifes de coral son una fuente de alimento y sustento para al menos 100 millones de personas en todo el mundo, apoyan a las principales industrias (pesca y turismo), juegan un papel clave en la estabilización de las costas y su alta diversidad genética y rivaliza con la de los bosques lluviosos tropicales. Esta biodiversidad está empezando a ser explotada en la búsqueda de compuestos bioactivos que podrían beneficiar a la humanidad (Leser M, 2004).

1.2.4 Corales escleractinios.

Un tipo de cnidarios particularmente abundantes en todos los arrecifes de coral a nivel mundial son los corales escleractinios. Estos organismos son considerados como los primeros en orden de importancia de los organismos formadores de arrecifes (Dumont, 2009). Los arrecifes de coral son algunos de los ecosistemas

marinos más biológicamente complejos y amenazados en la Tierra. Los corales escleractinios crean arrecifes mediante la deposición de carbonato de calcio y su supervivencia enmarca el mantenimiento de un hábitat que proteja la costa y albergue altos niveles de biodiversidad (Hedouin, 2016). En las aguas territoriales de México se cuenta con gran parte de la segunda barrera coralina más grande del mundo, el Gran Cinturón de Arrecifes del Atlántico Occidental. En esos arrecifes, son abundantes los corales escleractinios, como *Siderastrea siderea*, *Porites astreoides* y *Diploria strigosa* (Figura 2), que a pesar de no ser considerados tóxicos para los humanos podrían ser una fuente considerable de nuevos prototipos de fármacos. Aunque estas especies son abundantes, hasta el momento no se tienen registros toxicológicos sobre los venenos de estas especies. Los estudios sobre estas especies están enfocados en aspectos ecológicos. Sin embargo, también es importante conocer los mecanismos de defensa que les permite alimentarse y defenderse de sus depredadores.



Figura 2. Fotografías de corales escleractinios: A) *Diploria strigosa*, B) *Porites astreoides* y C) *Siderastrea siderea*

Los corales escleractinianos son los principales constructores de hábitat de los arrecifes de coral modernos. Como tales, son componentes críticos de uno de los ecosistemas más diversos de la tierra, albergando 32 de los 34 phyla animales reconocidos, incluyendo 800 especies de corales duros y más de 4000 especies de peces (Birkeland, 1997; Spalding et al., 2001).

JUSTIFICACIÓN

Los cnidarios son considerados como el phylum más grande de animales generalmente tóxicos y sin duda son una fuente novedosa de productos naturales bioactivos útiles en la generación de nuevos compuestos principalmente fármacos o herramientas farmacológicas para el estudio de fisiología celular. En este sentido, la evaluación de la bioactividad de los extractos de cnidarios proporciona una visión general de las propiedades de sus compuestos y sus posibles aplicaciones farmacológicas. Además, estas evaluaciones son importantes, ya que permiten obtener información sobre la toxicidad y los mecanismos de defensa de los cnidarios.

A pesar de que la mayoría de los estudios toxicológicos de cnidarios se han centrado en la clase Anthozoa, el orden Scleractinia permanece relativamente inexplorado. Los corales escleractinios, también llamados corales pétreos, son los cnidarios formadores de arrecifes más abundantes que se encuentran en los arrecifes de coral de todo el mundo. En un estudio anterior, se encontró toxicidad variable en varios corales escleractinios de la Gran Barrera de Coral.

2. HIPÓTESIS

Los corales escleractinios *Siderastrea siderea*, *Porites astreoides* y *Diploria strigosa* producen toxinas con diferentes efectos farmacológicos con igual o mayor potencia que otros cnidarios previamente estudiados.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Determinar el potencial farmacológico de los corales escleractinios *Siderastrea siderea*, *Porites astreoides* y *Diploria strigosa* mediante la evaluación de los efectos biológicos y bioquímicos de sus extractos acuosos.

3.2. Específicos

- Determinar la presencia de citolisinas en los extractos acuosos de los corales mediante la evaluación de la actividad hemolítica en eritrocitos de rata y humano.
- Determinar el efecto de los extractos sobre el tono del músculo liso vascular mediante el ensayo de aorta aislada de rata.
- Evaluación de la capacidad tóxica de los extractos mediante la determinación de los valores de dosis letal media (DL₅₀) en grillos.
- Identificar la presencia de enzimas comunes en venenos mediante la evaluación de actividad de PLA₂, proteasas y hialuronidasas.

4. METODOLOGÍA

4.1. Materiales

D-glucosa, NaCl, MgCl₂, CaCl₂ y etanol absoluto de grado HPLC se obtuvieron de J. T, Baker (USA). El ácido cítrico y citrato de sodio fueron obtenidos de Sigma (USA). Los reactivos utilizados en la determinación de la concentración de proteínas fueron adquiridos de Bio-Rad (USA).

4.2. Métodos

4.2.1. Recolección y preparación de los extractos acuosos

Se recolectaron fragmentos de los cnidarios 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 almacenará en hielo seco y se transportó a nuestros laboratorios en Querétaro.

Se prepararon los extractos de cada especie mediante agitación de los fragmentos en agua desionizada durante 24 h a 4 °C. De este modo se induce la descarga del contenido de los nematocistos. Los extractos resultantes se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 min a 4 °C y los sobrenadantes se liofilizaron. Los polvos liofilizados se agitaron en agua desionizada durante 20 min a 4 °C y se centrifugaron nuevamente para eliminar material insoluble. Estos extractos acuosos se almacenaron a -70 °C.

4.2.2. Concentración de proteínas totales

Las proteínas se determinaron por el ensayo de Bradford (1976), usando un estándar para la curva de calibración preparado con albúmina de suero bovino liofilizado.

4.2.3. Actividad hemolítica

Se evaluó la actividad hemolítica de los extractos acuosos bajo condiciones previamente descritas (Torres y col., 2008). Para esto se utilizaron eritrocitos de ratas machos (275 - 325 g) lavados en una solución de Alsever (pH 7.4; 120 mM D-glucosa, 30 mM citrato de sodio, 7 mM NaCl y 2 mM ácido cítrico). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 50 μ l de una suspensión de eritrocitos al 1 % en solución amortiguadora de Alsever más la muestra a evaluar disuelta en 50 μ l de la misma solución. Los tubos se llevaron a un volumen de 1 ml con solución de Alsever. Las muestras así preparadas se incubaron durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó a 2,500 rpm (1,430 x g) durante 4 min a 4 °C y el resultado de la hemólisis se evaluarón mediante la liberación de hemoglobina haciendo lecturas en un espectrofotómetro (Lambda Bio, Perkin Elmer Co.) a una longitud de onda (λ) de 415 nm. El efecto hemolítico se expresa 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. Una unidad hemolítica media (UH₅₀) se define como la cantidad de proteína requerida para producir un 50 % de hemólisis.

4.2.4. Ensayo de aorta aislada de rata

Se evaluó la actividad vasoconstrictora de los extractos sobre segmentos de aorta aislados de rata (García-Arredondo y col., 2015). Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (peso aproximado de 200 g) que se sacrificaron por decapitación con una guillotina. Posteriormente, se extrajo la aorta torácica descendiente y se colocó en solución fisiológica de Krebs-Henseleit sobre un baño de hielo y se gasificó constantemente con 95 % O₂ y 5 % CO₂. Inmediatamente después de extraer el tejido, se limpió su interior con la misma solución de Krebs-Henseleit. Se eliminó el tejido conectivo de la aorta y se cortaron segmentos de 4 a 5 mm de longitud. Los segmentos se montaron entre ganchos de acero inoxidable suspendidos en cámaras de baño orgánico que contenía solución de Krebs-Henseleit (pH 7.4; 126.8 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 30 mM NaHCO₃, 5 mM dextrosa) oxigenada constantemente a 37 °C. Todos los tejidos se estabilizaron

durante 60 min a una tensión de 1.5 g a 37 °C. Durante este período los tejidos se lavaron cada 15 min. Después del ajuste final a la tensión basal de 1.5 g, los segmentos de aorta se contrajeron primero con KCl (100 mM) para sensibilizar el tejido. Posteriormente, los tejidos se lavaron y se restablece la tensión basal para contraer con fenilefrina (1 μ M), se registró el grado de contracción a los 15 min, este valor se tomó como referencia del 100% de contracción. Los tejidos nuevamente se lavaron, se recuperó su tensión basal y se evaluaron los extractos a diferentes concentraciones (n = 3). Los cambios en la tensión isométrica se midieron con transductores de fuerza acoplados a un polígrafo Grass 7D de cuatro canales de registro.

4.2.5. Toxicidad en grillos (*Acheta doméstica*)

Se evaluó la toxicidad de los extractos acuosos en grillos (*Acheta doméstica*) de aproximadamente 400 mg de peso, siguiendo un método previamente reportado (Herzig y col., 2008). Para esto, se les inyectó los extractos a diferentes concentraciones (0.1, 0.32, 1.0, 3.2, 10, 31.6 y 100 μ g de proteína/grillo) en la zona metatorácica disuelto en 20 μ l de solución salina para insectos (pH 7.2; NaCl 200 mM, KCl 3.1 mM, 2 mM NaHCO₃, 4 mM MgCl₂, 5.4 mM CaCl₂, 0.1 mM Na₂HPO₄) con una jeringa de insulina ultrafina de 1 ml. Se realizaron 5 repeticiones para cada concentración de extracto. Se contó el número de muertes en cada concentración después de 24 y 48 horas de la administración del veneno. La DL₅₀ se determinará mediante un ajuste no lineal. Después del ensayo, todos los grillos sobrevivientes se sacrificaron en una cámara de eutanasia con cloroformo.

4.2.6. Ensayos bioquímicos

A. Actividad de fosfolipasa A₂ (PLA₂)

Se evaluó la actividad de PLA₂ de los extractos mediante un ensayo colorimétrico (Cayman Chemical, USA). Este ensayo utiliza como sustrato al análogo 1,2-ditio diheptanoil fosfatidilcolina. Los tioles libres generados por hidrólisis del enlace tioéster en la posición sn-2 son detectados utilizando el reactivo DTNB [(5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico)]. Los cambios de color se monitorearon con un lector de placas a

414 nm cada minuto por al menos 5 minutos. Se utilizó como control positivo una PLA₂ de veneno de abeja. La actividad enzimática se expresa en μmol de sustrato hidrolizado/min/mg de proteína.

B. Actividad de proteasa

Se evaluó la actividad de proteasa de los extractos mediante el método de actividad caseinolítica (Murata y col., 1963). Se utilizaron 100 μl de muestra a diferentes concentraciones y se mezclaron con 400 μl de caseína al 2% en amortiguador (0.2 M Tris-HCl a pH de 7.5). Las mezclas se incubaron a 37°C durante 30 min. Posterior al periodo de incubación, se detuvo la reacción adicionando 1.5 ml de 0.44 M de ácido tricloroacético y dejando reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces la mezcla se centrifugo a 2,500 rpm durante 15 minutos. De cada mezcla se tomó una alícuota de 1 ml y se mezcló con 2.5 ml de 0.4 M de carbonato de sodio y 0.5 ml de reactivo de Folin diluido 1:2. El desarrollo de color se detectó con un espectrofotómetro a 600 nm. Como control positivo se utilizó una proteasa de *Streptomyces griseus*. La actividad enzimática se expresó en μmol de sustrato degradado/min/mg de proteína.

C. Actividad de hialuronidasa

La actividad de hialuronidasa se determinó mediante un método turbidimétrico. (Di Ferrante, 1956). Este método se basa en la interacción entre el ácido hialurónico y el hexadecil-trimetil-amonio. Para esto, se utilizaron diferentes concentraciones de los extractos diluidos en 150 μl de amortiguador (0.2 M de acetato de sodio con 0.15 M de cloruro de sodio, pH 6), mismas que se incubaron en presencia de 100 μl de sustrato (1 mg de sal de sodio de ácido hialurónico de *Streptococcus equi* en un ml de amortiguador) durante 15 minutos a 37°C. Después del periodo de incubación, se agregó a cada muestra 1 ml de hexadecil-trimetil-amonio al 2.5% en NaOH al 2%. Después de un periodo de reposo de 30 min a temperatura ambiente se midió la turbidez resultante en un espectrofotómetro a 400 nm. Como control positivo se utilizó una hialuronidasa bovina tipo IV-S a las mismas concentraciones y condiciones que el veneno. La actividad enzimática se expresó en unidades

reductoras de la turbidez (TRU)/mg. Una unidad de actividad corresponde a la cantidad de enzima que produce una reducción del 50% de la turbidez producida por 0.1 mg de sustrato bajo las condiciones antes descritas.

4.2.7. El análisis estadístico

El programa Prism versión 5.00 (GraphPad Software, EE.UU.) se utilizó para todos los análisis de datos y estadísticas. Cada curva de concentración-respuesta se representa por triplicado utilizando eritrocitos de un animal. Para cada curva, el HU₅₀ se estima mediante el registro apropiado (agonista) contra la respuesta usando un análisis de regresión no lineal. El HU₅₀ de cada condición experimental se expresa como media \pm SEM (n = 3) y se realizarán múltiples comparaciones mediante el análisis unidireccional de varianza seguido por el test de Tukey. Todas las pruebas se considerarán valores estadísticamente significativos de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Concentración de proteína

Los extractos acuosos de los tres corales presentaron concentraciones similares de proteínas totales. El extracto de *P. strigosa* presentó una concentración de proteína de 10.8 mg/g del polvo liofilizado, el extracto de *P. astreoides* mostró una concentración de proteína de 12.9 mg/g y el extracto de *S. siderea* presentó una concentración de proteína de 10.8 mg/g.

3.2. Actividad hemolítica

Todos los extractos presentaron actividad hemolítica, de manera dependiente de la concentración, en eritrocitos de rata y humano (Figura 1). La Tabla 1 muestra los valores de UH_{50} calculados para los extractos sobre ambos tipos de eritrocitos. Los resultados obtenidos de las evaluaciones con eritrocitos de rata mostraron que el extracto de *P. strigosa* fue significativamente más potente que los otros dos extractos. Cuando los extractos fueron evaluados en eritrocitos humanos, se observó que la actividad hemolítica de los tres extractos fue similar. Puede observarse que los eritrocitos de humano fueron significativamente más sensibles al extracto de *P. astreoides* que los eritrocitos de rata.

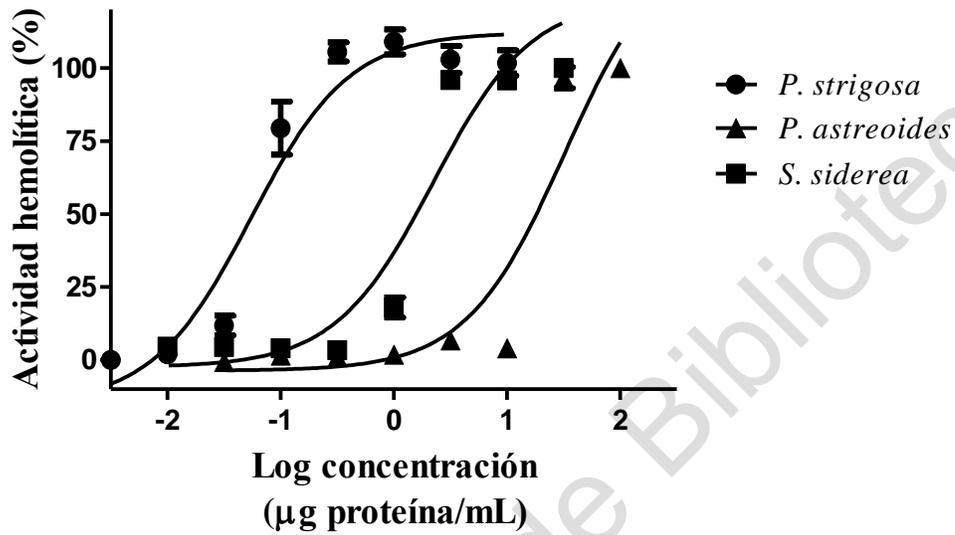
Tabla 2. Actividad hemolítica de los extractos acuosos en eritrocitos de rata y humanos expresada en UH_{50} (μg proteína/mL).

	Eritrocitos de rata	Eritrocitos de humano
<i>P. strigosa</i>	0.059 ± 0.015	0.107 ± 0.042
<i>P. astreoides</i>	$32.43 \pm 0.955^*$	$3.373 \pm 1.445^\dagger$
<i>S. siderea</i>	2.476 ± 0.337	3.602 ± 0.987

*Diferencia significativa ($P < 0.05$) comparando la actividad entre los extractos.

†Diferencia significativa ($P < 0.001$) comparando la actividad de cada extracto sobre ambos tipos de eritrocitos.

A



B

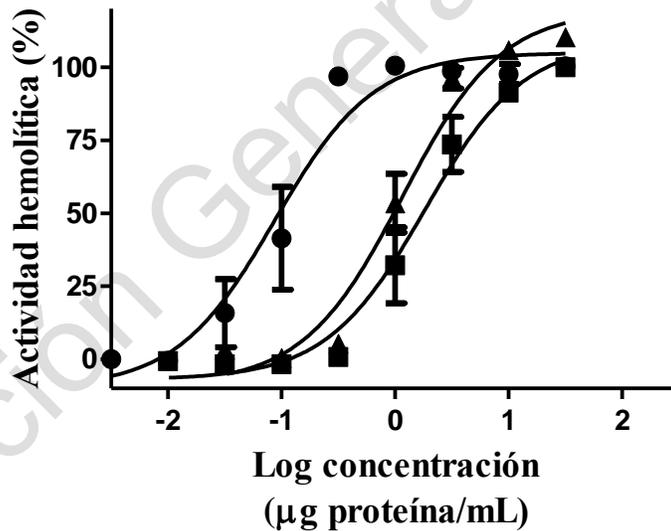


Figura 1. Curvas concentración-respuesta que muestran la actividad hemolítica de los extractos acuosos en eritrocitos de rata (A) y humano (B).

3.3 Actividad vasoconstrictora

Los tres extractos acuosos indujeron un efecto vasoconstrictor sobre los segmentos de aorta aislada de rata (Figura 2). La Tabla 2 muestra los valores de CE_{50} y E_{max} calculados para los extractos. Es importante mencionar que la actividad de los extractos fue irregular, a concentraciones menores a 10 μg de proteína/mL la vasoconstricción fue sostenida; pero a concentraciones altas (100 μg de proteína/mL) la vasoconstricción fue transitoria. A una concentración de 316 μg de proteína/mL la vasoconstricción inducida por los extractos disminuyó considerablemente. Estas irregularidades pueden deberse a la presencia de componentes vasodilatadores y vasoconstrictores en los extractos. Las comparaciones entre las actividades de los extractos mostraron que el extracto acuoso de *D. strigosa* fue significativamente más potente y efectivo.

Tabla 2. Actividad vasoconstrictora de los extractos acuosos en aorta aislada de rata.

	CE_{50} (μg proteína/mL)	E_{max} (% Respuesta)
<i>P. strigosa</i>	$0.983 \pm 0.17^*$	$102.8 \pm 5.63^*$
<i>P. astreoides</i>	16.97 ± 5.91	58.37 ± 15.94
<i>S. siderea</i>	28.22 ± 9.17	36.91 ± 11.00

*Diferencia significativa ($P < 0.05$) comparando la actividad entre los extractos.

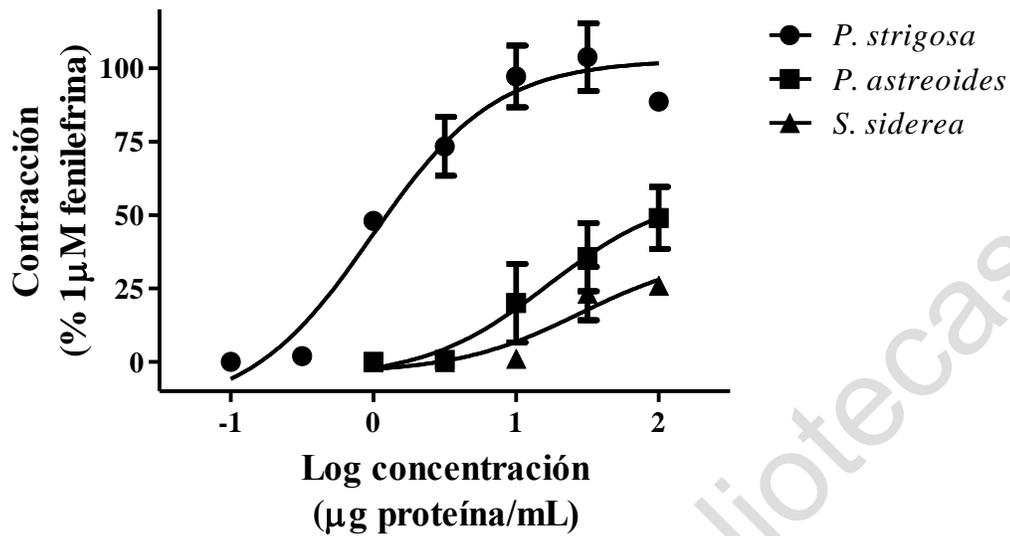


Figura 2. Curvas concentración-respuesta que muestran la actividad vasoconstrictora de los extractos acuosos.

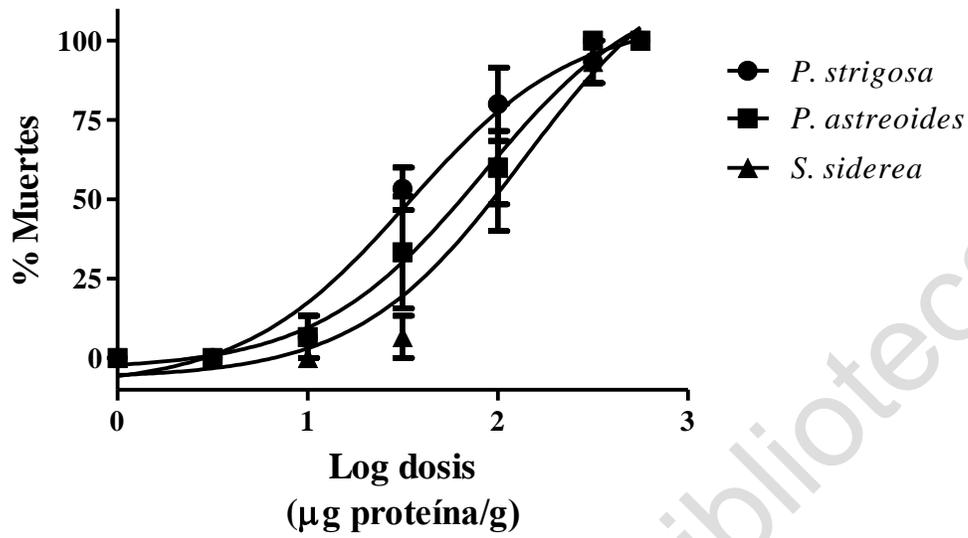
3.3. Toxicidad en grillos

Los resultados de la actividad insecticida mostraron que todos los extractos fueron letales a grillos con una potencia similar, su letalidad no aumentó significativamente con el tiempo. La Figura 3 muestra las curvas de dosis-respuesta y la Tabla 3 muestra los valores de la DL₅₀. Los extractos no inducen una parálisis inmediata, pero en concentraciones más altas la motilidad se redujo gradualmente.

Tabla 3. Toxicidad de los extractos acuosos en grillos expresada en valores de DL₅₀ (µg proteína/mL).

	24 h post-inyección	48 h post-inyección
<i>P. strigosa</i>	33.99 ± 0.64	21.13 ± 2.54
<i>P. astreoides</i>	37.91 ± 12.03	33.25 ± 8.29
<i>S. siderea</i>	156.7 ± 49.07	37.35 ± 2.18

A



B

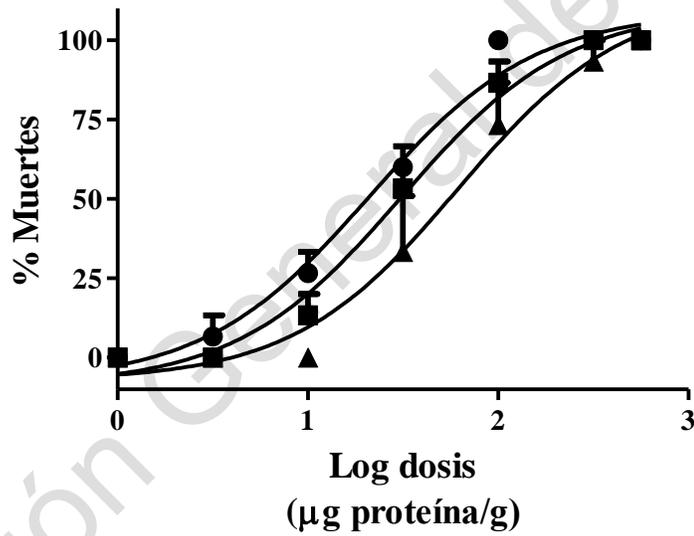


Figura 3. Toxicidad de los extractos en grillos (*A. domestica*). Curvas dosis-respuesta a las 24 h (A) y 48 h (B) después de la administración de los extractos.

3.4. Actividad enzimática

Los resultados de las evaluaciones de la actividad enzimática indicaron que todos los extractos acuosos presentaron actividades de la PLA₂ y de serina proteasa, pero no presentan actividad de hialuronidasa. Estos resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Actividad enzimática de los extractos acuosos.

	Actividad de PLA ₂ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Actividad de serina proteasa (U/mg)	Actividad de hialuronidasa (TRU/mg)
<i>P. strigose</i>	0.03 \pm 0.001	10.27 \pm 1.99	-
<i>P. astreoides</i>	0.048 \pm 0.002	11.81 \pm 2.69	-
<i>S. sidereal</i>	0.043 \pm 0.001	3.95 \pm 0.385	-
Control	21.268 \pm 1.965	21.08 \pm 1.857	149.51 \pm 1.405

4. Discusión

En general, los cnidarios se consideran una fuente importante de compuestos bioactivos, ya que este phylum ha proporcionado un gran número de productos naturales con diversas propiedades estructurales. Muchos de estos compuestos podrían ser utilizados para el desarrollo de nuevos fármacos (Turk y Kem, 2009; Tejuca y col., 2009; Wei y col., 2013; Mariottini y Pane, 2014; Jouiaei y col., 2015; Mariottini y Grice, 2016), herramientas farmacológicas para investigar los mecanismos moleculares básicos de la inserción de proteínas lipídicas e interacciones de proteínas (Álvarez y col., 2009a) y bioinsecticidas (Bosmans y Tytgat, 2007; Yan y col., 2014). Muchos de los estudios toxicológicos de los cnidarios se han enfocado principalmente en el análisis electrofisiológico y en las propiedades citolíticas de las toxinas anémonas (Orden Actiniaria, clase Anthozoa). Otros cnidarios han sido ampliamente estudiados debido a su toxicidad para los seres humanos (Clase Cubozoa, Hydrozoa y Scyphozoa), ya que es importante conocer sus mecanismos de envenenamiento con el fin de establecer tratamientos adecuados. Sin embargo, a pesar de su amplia distribución en los arrecifes de coral, los corales escleractinios han sido poco estudiados. Esto es probablemente debido a la dificultad de separar los tejidos blandos del esqueleto calcáreo (Gunthorpe y Cameron, 1990) y al hecho de que son inofensivos para los seres humanos.

En este estudio, se evaluaron por primera vez las propiedades bioactivas de los extractos acuosos de tres corales escleractinios colectados en el Caribe Mexicano. Teniendo en cuenta que los venenos de los cnidarios están compuestos principalmente por péptidos y proteínas (Jouiaei y col., 2015), todos los resultados que se presentan aquí se expresan en cantidad de proteína. Sin embargo, se reporta también el rendimiento de proteína de cada gramo de polvo liofilizado para cada extracto.

Las citolisinas han sido ampliamente reportadas en varios venenos de cnidarios, mismas que inducen hemólisis contra eritrocitos de diferentes especies (Mariottini y el panel, 2014). La mayoría de las citolisinas provenientes de cnidarios se han aislado

de anémonas y actúan mediante la formación de poros en las membranas celulares, una serie de publicaciones han descrito sus características estructurales y funcionales (Anderluh y Macek, 2002; Norton, 2009; Álvarez y col, 2009b; Kristan y col., 2009; Rojko y col., 2016). Anteriormente se ha reportado la actividad hemolítica en eritrocitos de oveja de 57 extractos acuosos de corales escleractinios recogidos en La Gran Barrera Coralina, en Australia. En ese estudio, se encontró que la mayoría de los extractos son potentes en actividad hemolítica, causando más de 90% de hemólisis (Gunthorpe y Cameron, 1990). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que los eritrocitos de rata fueron más sensibles para los extractos de *P. strigosa* y *S. siderea*, mientras que el extracto de *P. astreoides* fue más potente en los eritrocitos humanos. En un estudio previo, se reportaron las propiedades hemolíticas de *M. complanata* (García-Arredondo y col., 2014), un hidrocoral (clase Hydrozoa) que habita comúnmente en los arrecifes de coral del Caribe Mexicano que se caracterizan por su capacidad de inducir efectos tóxicos locales a los seres humanos; entre los que se incluye: dolor severo, erupciones y ampollas en la piel humana (Rojas-Molina y col., 2012). En comparación con *M. complanata*, en este estudio se encontró que la actividad hemolítica del extracto acuoso de *P. strigosa* fue incluso más potente en ambos tipos de eritrocitos. Estos resultados sugieren importantes diferencias entre los mecanismos hemolíticos que presenta cada especie.

En algunos estudios, se ha encontrado que el alto grado de toxicidad de los cnidarios se debe principalmente a las complicaciones cardiovasculares que provocan, por lo que algunas investigaciones se han enfocado en la obtención de información sobre sus efectos sobre el sistema cardiovascular; encontrándose que los efectos varían dependiendo de la especie (Suput, 2009; Seymour y col., 2015). Por ejemplo, el veneno de la medusa gigante *Nemopilema nomurai*, administrado por vía intravenosa en ratas, indujo hipotensión dependiente de la dosis y bradicardia. Este veneno también produjo contracción de segmentos de aorta aislados de rata (Kim y col., 2006). El extracto de tentáculos de la medusa *Cyanea capillata* indujo contracción tanto en segmentos de aorta aislados de rata de una manera independiente de endotelio (Wang y col., 2013). Los extractos acuosos de los hidrocorales *M. alcornis*

y *M. complanata* también indujeron vasoconstricción en segmentos de aorta aislados de rata (Ibarra-Alvarado et al., 2007; García-Arredondo y col., 2011). Por el contrario, el veneno del sifonóforo comúnmente conocido como fragata portuguesa (*Physalia physalis*) produjo vasodilatación, dependiente de la dosis, en segmentos de aorta aislada de conejo (Loredo y col., 1986).

Hasta el momento, no se conocen los mecanismos de acción involucrados en los efectos de los cnidarios sobre el sistema cardiovascular (Seymour y col., 2015). La toxina formadora de poro EqT III, aislada de la anémona de mar *Actinia equina*, se une a las membranas del músculo liso vascular causando un ligero aumento en la tensión de los segmentos de arterias coronarias porcinas (Suput, y col., 2001). Esto muestra que las citolisinas contribuyen en cierta manera en la generación de un efecto vasoconstrictor; sin embargo, se sabe que las citolisinas no son las principales toxinas responsables de dicho efecto (Seymour y col., 2015). En este estudio, se encontró que los extractos acuosos de los tres corales escleractinios también indujeron vasoconstricción en los segmentos de aorta aislados de rata. El extracto de *P. strigosa* fue el más potente, mostrando un valor de CE₅₀ similar a los valores calculados con los extractos de *M. alcicornis* y *M. complanata* (García-Arredondo y col., 2011), ambos considerados tóxicos para los seres humanos (Rojas-Molina y col., 2012). Es importante mencionar que los efectos de estos corales escleractinios, sobre el tono vascular, fueron irregulares. A concentraciones altas parece predominar un efecto vasodilatador, principalmente en el caso de *P. astreoides* y *S. sidérea*; lo que sugiere la presencia de compuestos vasodilatadores en los extractos. La toxicidad de los extractos en grillos fue determinada con el fin de proponer un bioensayo sencillo que permita obtener datos toxicológicos comparativos. Este ensayo es ampliamente utilizado para evaluar la actividad toxicológica de venenos de arañas y escorpiones, debido a que se alimentan de insectos (Herzig y col., 2008). Las presas naturales de los cnidarios por lo general son peces y crustáceos; en particular, los corales escleractinios se alimentan de crustáceos pequeños y zooplancton (Houlbrèque y Ferrier-Pagès, 2009). Sin embargo, se ha reportado desde un punto de vista evolutivo la presencia de toxinas selectivas contra insectos en venenos cnidarios; principalmente péptidos que afectan a los canales Na⁺ y K⁺.

Dicha explicación se basa en que los insectos y los crustáceos derivan de un ancestro en común (Bosmans y Tytgat, 2007). En este estudio, se encontró que los extractos de los tres corales escleractinios fueron letales para los grillos con valores similares de DL₅₀. Incluso, estos valores son similares a los de las DL₅₀ encontradas para tarántulas (García-Arredondo y col., 2015). Esto indica que la toxicidad en grillos representa un buen modelo para evaluar actividad biológica de cnidarios.

En éste estudio se evaluaron también algunas de las actividades enzimáticas más comunes reportadas para venenos de animales, estableciendo que los extractos de los corales escleractinios inducen PLA₂ y actividad de serina proteasa. La presencia de actividad PLA₂ ha sido ampliamente reportada en venenos de varias especies de cnidarios (Nevalainen y col., 2004; Mariottini y Pane, 2014), siendo las especies del género *Millepora* las más activas. En este estudio, se encontró que los tres corales escleractinios presentaron niveles de actividad similares a los extractos de *M. complanata* y *M. alcicornis* (García-Arredondo, y col., 2011). Se ha propuesto que la presencia de enzimas PLA₂ en los venenos de cnidarios tiene un papel importante en la defensa, inmovilización y digestión de las presas (Nevalainen y col., 2004; Mariottini y Pane, 2014). Además, algunos estudios han relacionado la actividad de la PLA₂ con la hemólisis (Ibarra y col., 2007; Radwan y Aboul-Dahab, 2004).

En un estudio transcriptómico, se realizó la identificación de toxinas putativas en el coral escleractinio *Acropora digitifera*. Ese estudio reveló la posible presencia de toxinas con actividad enzimática de PLA₂, serina proteasa y hialuronidasa en dicho coral (Gacesa y col., 2015). En otro estudio similar, se detectó la presencia de enzimas serina proteasa en el veneno de la medusa *Cyanea capillata* (Liu y col., 2015). Las enzimas serina proteasas se han detectado en varios venenos de animales, tienen relación con funciones fisiológicas como: agregación plaquetaria, actividad fibrinolítica, propagación de otras toxinas e inducción de modificaciones post-traduccionales de otras toxinas (Casewell y col., 2009; Serrano y Maroun, 2005; Ma y col., 2009).

5. Conclusiones

Los resultados de este estudio mostraron que los extractos acuosos de los tres corales escleractinios *P. strigosa*, *P. astroides*, y *S. sidérea*; inducen actividades biológicas similares a las observadas con otros cnidarios potencialmente tóxicos para los seres humanos. Evidentemente, los corales escleractinios, al igual que otros cnidarios, contienen una serie de potentes toxinas; representando una importante fuente de nuevos compuestos bioactivos. Está claro que una mezcla compleja de toxinas potentes no sólo les sirve a estos corales para capturar a sus presas, sino que también podrían desempeñar un papel importante para disuadir a sus depredadores. El hecho de que estos corales no se consideran tóxicos para los seres humanos puede deberse a la falta de nematocistos capaces de penetrar en la piel humana.

5. BIBLIOGRAFÍA

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

Bonsmans F, Tytgat J. Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na⁺ channels. *Toxicon*. **2007**;49:550-560.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **1976**;72:248-254.

Birkeland, C. Symbiosis, fisheries and economic development on coral reefs. *Trends Ecol. Evol.* **1997**;12:364–367

Calvete J, Sanz L, Ângulo Y, Lomonte B, Gutierrez J. venoms, venomics, antivenomics. *Federation of European Biochemical Societies*. **2009**;583:1736-1743.

Del Monte Martínez A, González Bacerio J, Romero L, Aragón C, Martínez D, Chávez M de los Á, Álvarez C, Lanio M E, Guisán J M, Díaz J. Improved purification and enzymatic properties of a mixture of Sticholysin I and II: Isotoxins with hemolytic and phospholipase A₂ activities from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Protein Expression and Purification*. **2013**;95:57-66.

Di Ferrante N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *J Biol Chem*. **1956**;220:303-306.

Dumont H J. Cnidaria (Cooelenterata). En: *Likens GE, Ed. Encyclopedia of inland waters*. Elsevier Inc. **2013**;260-270.

Ellif C, Silva I. Coral reefs as the first line of defense: Shoreline protection in face of climate change. *Marine Environmental Research*. **2017**;

Folino-Rorem N C. Phylum Cnidaria. En: Throp and Covich's freshwaters invertebrates: Ecology and general biology. Elsevier Inc. **2015**;159-179.

Galliot Brigitte, Quiquand Manon, Ghila Luiza, De Rosa Renaud, Miljkovic-Licina Mrijina, Chera Simona. Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Developmental Biology*. 2009;332:2-24.

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 thermostable neurotoxins with lethal effects in mice. *Comp Biochem Physiol C*. **2015**;169:55-64.

Hédouin Letitia S, Wolf Ruth E, Jeff Phillips, Gates Ruth D. Improving the ecological relevance of toxicity tests on scleratinian corals: influence of season, life stage, and seawater temperature. *Environmental Pollution*. **2016**;213:240-253.

Herzig V, Cristofori-Armstrong B, Israel M, Nixon S, Vetter I, Glenn F. Animal toxins — Nature's evolutionary-refined toolkit for basic research and drug discovery. *Biochemical Pharmacology*. **2020**;181:3

Herzig V, Khalife AA, Chong Y, Isbister GK, Currie B, Churchill TB. Intersexual variations in northern (*Missulena pruinosa*) and eastern (*M. bradleyi*) mouse spider. *Toxicon*. **2008**;51:1167-1177.

Hodgson E. Toxins and Venoms. En: Hejtmancik F, Nickerson JM, Eds. *Progress in molecular biology and translational science*. Elsevier Inc. **2012**;373-415.

Jaimes A, Chung R, Morandini A, Weston A, Padilla G, Gacesa R, Ward M, Long P, Marques A. Comparative proteomics reveals recruitment patterns of some protein families in the venoms of Cnidaria. *Toxicon*. **2017**;137:19-26.

Jouiaei M, Yanagihara AA, Madio B, Nevalainen TJ, Alewood PF, Fry BG. Ancient venom systems: A review of cnidarian toxins. *Toxins*. **2015**;7:2251-2271.

Jouiaei M, Sunagar K, Federman Gross A, Scheib H, Alewood PF, Moran Y, Fry BG. Evolution of an ancient venom: recognition of a novel family of cnidarian toxins and the common evolutionary origin of sodium and potassium neurotoxins in sea anemone. *Molecular Biology Evolution*. **2015**;32:1598-610.

Kem WR, Dunn BM. Separation and characterization of four different amino acid sequence variants of a sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolysin. *Toxicon*. **1988**;26:997-1008.

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

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

Landa J, Martin E, Arciniega F, Castillo M, Saucedo M. Moluscos asociados al arrecife coralino de Tenacatita, Jalisco, en el Pacífico central mexicano. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. **2013**;84:1121-1136.

Lesser M. experimental biology of coral reef ecosystems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **2004**;300:217-252.

Luigi G, Luigi P. Cytotoxic and Cytolytic Cnidarian Venoms. A Review on Health Implications and Possible Therapeutic Applications. *Toxins*. **2013**;6:108-151.

Lazcano Perez F, Hernandez Guzman U, Sanchez Rodriguez J, Arreguin Espinosa R. Cnidarian neurotoxic peptides affecting central nervous system targets. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. **2015**; Epub ahead of print.

Martínez, M L, Intralawan A, Vázquez G, Perez M O, Sutton P, Landgrave. The coast of our world: Ecological economic and social importance. *Ecological economics*. **2007**;63: 254-272.

Murata J, Satake M, Szuki T. Studies on snake venom XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venoms. *J Biochem* **1963**;53:431-443.

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

Özbek S, Balasubramanian P G, Holstein T W. Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon*. **2009**;54:1038-1045.

Podobnik M, Anderluh G. Pore-forming toxins in Cnidaria. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2017;72:134

Qiwen L, Yu F, Binrui Y, Simon M. Cnidarian peptide neurotoxins: a new source of various ion channel modulators or blockers against central nervous systems disease. *Drug Discovery Today*. **2018**; :1-33.

Rodrigues T, Domínguez-Pérez D, Almeida D, Matos A, Antunes A. Medusozoans reported in Portugal and its ecological and economical relevance. *Regional Studies in Marine Science*. **2020**;35:1-11.

Rosa T M, Giovanna P M, Maria M, Angela M, Matteo C. Old weapons for new wars: bioactive molecules from cnidarian internal defense systems. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. **2015**; Epub ahead of print.

Russell F E. Marine toxins and venomous and poisonous marine plants and animals (invertebrates). En: *Advances in marine biology*. Arizona: Academic press London. **1984**:59-217.

Sarmiento V A, Gonzále V, Braña A, Palacios J, Otero L, Fernández J, Molina A, Kulik A, Vázquez F, Acuña J, García L, Blanco G. Pharmacological Potential of Phylogenetically Diverse Actinobacteria Isolated from Deep-Sea Coral Ecosystems

of the Submarine Avilés Canyon in the Cantabrian Sea. *Environmental Microbiology*. **2016**;1-15.

Seymour B, Andreosso A, Seymour J. Cardiovascular Toxicity from Marine Envenomation. Elsevier. **2015**; 202-223.

Spalding M, Ravilious C, Green EP. World Atlas of Coral Reefs. University of California Press. **2001**

Steele R E, David C N, Technau U. A genomic view of 500 million years of cnidarian evolution. *Trends in Genetic*. **2011**;27:7-13.

Takacs Z, Nathan S. Animal venoms in medicine. En: Wexler P, Ed. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier Inc. **2014**;252-259.

Torres M, Aguilar M B, Falcón A, Sánchez L, Radwan F F Y. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon*. **2008**;39:1297-1307.

Turk K, Kem R W. The phylum cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*. **2009**;54:1031-1037.

Watanabe T, Utsunomiya Y, Yuyama I. Long-term laboratory culture of symbiotic coral juveniles and there use in eco-toxicological study. *Journal of experimental marine biology and ecology*. **2007**;352:177-186.

William W T, Shu H H, Chi C C. Estimating the willingness top ay to protect coral reefs from potential damage caused by climate change- the evidence from taiwan. *Marine pollution bulletin*. **2015**;101:556-565.

Yanagihara A A, Shohet R V. Cubozoan venom-induced cardiovascular collapse is caused by hyperkalemia and prevented by zinc gluconate in mice. *PLoS ONE*. **2012**;7:e51368.

Technau U, Steele R E. Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. *Development*. **2011**;138:1447-1458.

Zambelli O V, Chioato L, Gutierrez P V, Ward R J, Cury Y. Structural determinants of the hyperalgesic activity of myotoxic Lys49-phospholipase A2. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. **2017**;23:1-9.

Dirección General de Bibliotecas UAQ