

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“INFLUENCIA DEL BLANQUEAMIENTO SOBRE LOS
EFECTOS FARMACOLÓGICOS Y TOXICOLÓGICOS DEL
EXTRACTO ACUOSO DEL CORAL DE FUEGO *Millepora
alcicornis*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RONNA DELGADO ALTAMIRANO

DIRIGIDA POR

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“INFLUENCIA DEL BLANQUEAMIENTO SOBRE LOS EFECTOS FARMACOLÓGICOS Y TOXICOLÓGICOS DEL EXTRACTO ACUOSO DEL CORAL DE FUEGO *Millepora alcicornis*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RONNA DELGADO ALTAMIRANO

DIRIGIDA POR

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SINODALES

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA
DIRECTORA

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO
SINODAL

Dr. MOUSTAPHA BAH
SINODAL

Dr. ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por la comprensión, el tiempo, el soporte y todo lo que hizo falta para lograr culminar este largo y sinuoso camino de la licenciatura y del proceso de la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Alejandra Rojas por el apoyo, el tiempo, la paciencia y la confianza para abrirme un espacio en su laboratorio, en el desarrollo de uno de sus proyectos y en el camino profesional de la Química Medicinal, rama que me ha apasionado e inspirado a seguir trabajando en ella.

A mis sinodales: Dr. César Ibarra, Dr. Moustapha Bah y Dr. Alejandro García por su tiempo para leer este escrito y enriquecerlo.

Al Dr. Marco Alonso Gallegos Corona, por la sencillez, la paciencia y la experiencia que, como patólogo, compartió conmigo.

A mis amigas: Monse Santiago, Dani Murillo, Ana María Ibarra y Monserrat Landa que me escucharon en los momentos de frustración y siempre me tendieron la mano amiga y me alentaron a no detenerme.

A Gil por enseñarme a ver más allá de lo visible, a disfrutar de un buen libro, a reír y ver el lado positivo y bueno de la vida.

Al profe Ernesto Mora, por haberme orientado tan acertadamente en la difícil decisión de qué hacer al terminar la licenciatura y por hacerme entender que uno debe amar profundamente lo que hace para siempre disfrutar y estar satisfecho con el trabajo que se realiza.

A Regina Hernández Gama por ser la primera en mostrarme en qué consiste la investigación, proporcionarme esa primera oportunidad de incursión y con ello darme cuenta de que esto es lo que quiero.

A Alma, Alex, Rosy y Lety por haberme asesorado y guiado tan pacientemente en la parte experimental y teórica de esta tesis, por las charlas amenas en el laboratorio y por permitirme conocerlos como personas excepcionales.

A Chuy, Karla, David y Peyo por, prácticamente, adoptarme en su grupo de Química Biomolecular y por orientarme en el difícil proceso de los trámites administrativos; por animarme a salir de la rutina diaria y a disfrutar un poco más de las cosas simples de la vida.

A mis compañeritos QFB's de la generación 2009–2013 y a Felipe, Vane, Yuli, Joules, Napo, Campillo, Arely, Xingú, Turru y Ramón; que siempre me sacaron una sonrisa, me dieron ánimos cuando lo necesité y me dieron un cachito de sí. Que sepan que son muy importantes para mí y que agradezco haber compartido con ustedes esta maravillosa etapa de mi vida.

A la vida misma, por demostrarme que uno siempre está en el camino correcto; que todo pasa por una razón, que un fracaso sólo es una manera de verificar los errores para continuar siempre hacia delante de la mejor forma posible y que uno por sí solo es el constructor de límites, pero también de oportunidades.

*"...And in the end, the love you take,
is equal to the love you make..."*

..The End, The Beatles..

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 El phylum Cnidaria	1
1.2 Morfología de los cnidarios	1
1.3 Clasificación del phylum Cnidaria	2
1.4 Cnidocitos y cnidocistos	6
1.5 Compuestos bioactivos sintetizados por los cnidarios	8
1.5.1 Neurotoxinas	9
1.5.1.1 Neurotoxinas que actúan sobre canales de sodio dependientes de voltaje (Na _v)	10
1.5.1.2 Neurotoxinas que actúan sobre canales de potasio dependientes de voltaje (K _v)	11
1.5.2 Citolisinas	11
1.5.2.1 Citolisinas que degradan los lípidos de membrana	12
1.5.2.2 Actinoporinas	13
1.5.3 Metabolitos secundarios	14
1.5.3.1 Terpenoides	14
1.5.3.2 Prostanoides	17
1.5.3.3 Alcaloides	20
1.5.3.4 Esteroides	22
1.5.3.5 Poliéteres: La palitoxina	24
1.6 El género <i>Millepora</i>	25

1.7 Simbiosis <i>Millepora</i> – <i>Symbiodinium</i>	27
1.8 Clasificación taxonómica de <i>Millepora alcicornis</i>	28
1.9 Características morfológicas de las especies del género <i>Millepora</i>	29
1.10 Efectos locales y sistémicos provocados por las toxinas de las especies del género <i>Millepora</i> en los seres humanos	31
1.11 Estudios bioquímicos y toxicológicos realizados sobre especies del género <i>Millepora</i>	32
1.12 Blanqueamiento de las especies del género <i>Millepora</i>	35
2. JUSTIFICACIÓN	40
3. HIPÓTESIS	42
4. OBJETIVOS	43
4.1 General	43
4.2 Específicos	43
5. METODOLOGÍA	44
5.1 Materiales y métodos	44
5.1.1 Recolección y transporte de los especímenes de <i>M. alcicornis</i>	44
5.1.1.1 Especímenes de <i>M. alcicornis</i> normal	44
5.1.1.2 Inducción del blanqueamiento de los especímenes del hidrocoral	44
5.1.2 Preparación del extracto acuoso de especímenes normales y blanqueados de <i>M. alcicornis</i>	45
5.1.3 Bioensayos	45
5.1.3.1 Determinación de la actividad proteolítica de los extractos acuosos de <i>M. alcicornis</i> normal y blanqueada.	45
5.1.3.2 Evaluación de la toxicidad sistémica aguda inducida por los extractos acuosos del hidrocoral normal y blanqueado y determinación de la dosis	46

letal media (DL50).	
5.1.3.3 Determinación de la actividad hemolítica de los extractos acuosos de <i>M. alcicornis</i> normal y blanqueada.	47
5.1.3.4 Determinación del efecto de los extractos de <i>M. alcicornis</i> sobre la contractilidad del íleon aislado de cobayo	47
5.1.4 Electroforesis en gel	48
5.1.5 Secuenciación parcial de las proteínas seleccionadas, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas	48
5.1.6 Análisis de las secuencias obtenidas	49
5.1.7 Análisis estadísticos	50
6. RESULTADOS	51
6.1 Determinación de la actividad proteolítica de los extractos acuosos de <i>M. alcicornis</i> normal y blanqueada	51
6.2 Evaluación de la toxicidad sistémica aguda inducida por los extractos acuosos del hidrocoral normal y blanqueado y determinación de la dosis letal media (DL ₅₀)	53
6.3 Determinación de la actividad hemolítica de los extractos acuosos de <i>M. alcicornis</i> normal y blanqueada.	63
6.4 Determinación del efecto de los extractos de <i>M. alcicornis</i> sobre la contractilidad del íleon aislado de cobayo	63
6.5 Electroforesis en gel	64
6.5.1 Tinción de Plata	64
6.5.2 Tinción de Coomassie	65
6.6 Secuenciación parcial de las proteínas seleccionadas, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas	66
7. DISCUSION	70

8. CONCLUSIONES	78
9. REFERENCIAS	80

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Toxicidad sistémica aguda inducida por el extracto acuoso de <i>Millepora alcicornis</i> normal.	53
2	Toxicidad sistémica aguda inducida por el extracto acuoso de <i>Millepora alcicornis</i> blanqueada.	58
3	Simbología del alineamiento en Clustawl2®.	66
4	Secuenciación parcial de la proteína de ~19 kDa.	67
5	Secuenciación parcial de la proteína de ~24 kDa.	68
6	Secuenciación parcial de la proteína de ~36 kDa.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura del tejido coralino y anexos. (Rosenberg y col., 2007)	2
2	Ejemplo representativo de un organismo de la clase Scyphozoa.	3
3	Ejemplo representativo de un organismo de la clase Cubozoa.	3
4	Ejemplo representativo de un organismo de la clase Anthozoa.	4
5	Ejemplo representativo de un organismo de la clase Staurozoa.	5
6	Ejemplo representativo de un organismo de la clase Hydrozoa.	6
7	Morfodinámica de la descarga del nematocisto tipo estenóteles. A) Esquema de la descarga de un estenóteles. B) Eversión del nematocisto, resuelto con cámara Hamamatsu C4187 de alta velocidad (Özbek y col. 2009).	8
8	Estructura básica de los cembranoides.	15
9	Estructura de la eleuterobina.	16
10	Estructura de la pseudoterosina A.	17
11	Estructura del ácido clavirídico A.	18
12	Estructura de la norzoantamina.	21
13	Estructura de la estoloniferona J.	24
14	Estructura química de la palitoxina.	25
15	Ejemplos de especies saludables del género <i>Millepora</i> . A) <i>M. complanata</i> y B) <i>M. alcicornis</i> .	27
16	Nematocisto macrobásico mastigóforo. A) Diagrama y B) Microscopía electrónica de barrido del nematocisto descargado de <i>M. complanata</i> , que muestra la longitud del túbulo extendido (Rojas y col., 2012).	30
17	Nematocisto tipo estenóteles. A) Diagrama y B) Microscopía electrónica de barrido del nematocisto descargado de <i>M. complanata</i> (Rojas y col., 2012).	31

18	Imágenes subacuáticas de especies de <i>Millepora</i> blanqueadas naturalmente en arrecifes de coral en el Caribe Mexicano. A) <i>M. complanata</i> y B) <i>M. alcicornis</i> (Rojas y col., 2012).	35
19	Curva de calibración para la actividad proteolítica. MAN: <i>Millepora alcicornis</i> normal y MAB: <i>Millepora alcicornis</i> blanqueada.	51
20	Fotografías de tejido pulmonar. A) Normal (R47N), B) y C) Patológicos (R2B y R35N, respectivamente). 1) Espacio alveolar normal, 2) Alvéolos, 3) Bronquios, 4) Edema pulmonar no generalizado y 5) Espacio alveolar sobreexpandido.	60
21	Fotografías de tejido hepático. A) Normal (R10B), B) Patológico (R3N) y C) Reacción inflamatoria aguda (R3N). 1) Vena central normal, 2) Hepatocitos normales, 3) Espacios sinusoides normales, 4) Vena central congestionada, 5) Lesión hepática, 6) Distensión sinusoidal, 7) Respuesta inflamatoria aguda, 8) Hepatocitos necróticos, 9) Hepatocitos apoptóticos y 10) Respuesta inmune a lesión tóxica responsable de la inflamación.	61
22	Fotografías de tejido renal. A) Normal (R47N), B) y C) Patológicos (R3N y R8B, respectivamente) 1) Glomérulo normal, 2) Espacio de Bowman normal, 3) Túbulos renales normales, 4) Túbulos renales necróticos, 5) Lesión glomerular y 6) Fuga de proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina al espacio de Bowman.	62
23	Curva sigmoideal de Boltzmann para la actividad hemolítica.	63
24	Curva sigmoideal de Boltzmann para el porcentaje de contracción en íleon aislado de cobayo.	63
25	Gel de Electroforesis SDS–PAGE teñido con plata.	64
26	Gel de electroforesis SDS–PAGE teñido por Coomassie.	65

RESUMEN

Las especies del género *Millepora* (phylum Cnidaria, clase Hydrozoa) son los segundos organismos más importantes constructores de arrecifes coralinos en el mundo. En el Caribe Mexicano son abundantes las especies *M. alcicornis* y *M. complanata*. Ambas, entre otras del mismo género, son llamadas comúnmente “corales de fuego” ya que producen lesiones en la piel humana semejantes a quemaduras. Estos organismos viven en simbiosis con algas fotosintéticas del género *Symbiodinium* (zooxantelas), que les proveen de carbono y oxígeno. Cuando estos hidrocorales son sometidos a cambios bruscos de temperatura, radiación solar o pH, ocurre el fenómeno de blanqueamiento, que consiste en la pérdida de las zooxantelas y pigmentos fotosintéticos. Esto resulta en una disminución de la velocidad de crecimiento, de capacidad de supervivencia y un incremento de su susceptibilidad ante patógenos. Hasta ahora se desconocen las consecuencias de la ausencia de zooxantelas sobre la síntesis de toxinas por parte de los hidrocorales y su impacto sobre sus mecanismos de defensa y depredación. A fin de determinar la influencia de las zooxantelas sobre estos procesos, en la presente tesis se compararon los efectos tóxicos y farmacológicos inducidos por el extracto acuoso de fragmentos blanqueados y normales de *M. alcicornis*. Los resultados mostraron que el extracto obtenido a partir de fragmentos blanqueados presenta un menor contenido proteico. Asimismo, los efectos letales, proteolítico, de contractilidad y de daño orgánico se vieron afectados con el blanqueamiento, lo que no ocurrió con el efecto hemolítico. Concluyendo que no todos los compuestos bioactivos presentes en *M. alcicornis* se ven afectados por el blanqueamiento.

1. ANTECEDENTES

1.1 El phylum Cnidaria

Cnidaria es un phylum exclusivamente acuático que comprende más de 11 000 especies en todo el mundo (Häussermann, 2009). El nombre del phylum se deriva de la presencia de un organelo capsular con túbulos eversibles llamado cnida (del griego cnidae, que significa ortiga), cuya función es el almacenamiento de veneno para defensa o captura de presas (Daly y col., 2007). Dentro de otras características propias de los cnidarios se encuentran la simetría radial, una cavidad gastrovascular con una sola abertura, dieta carnívora y distribución en hábitats marinos tanto someros como profundos, bénticos y pelágicos, desde las regiones tropicales a las polares (Solomon y col., 1998; Curtis y col., 2007; Häussermann, 2009). Algunos de los miembros de este phylum son los corales, los hidrocorales, las medusas, las anémonas y los abanicos de mar (Daly y col., 2007).

1.2 Morfología de los cnidarios

La pared del cuerpo de los Cnidarios consta de dos capas celulares: la epidermis externa (ectodermo) y la gastrodermis interna (endodermo); que se encuentran separadas por una capa de tejido conectivo gelatinoso llamada mesoglea (Arai, 1997). La organización morfológica de los cnidarios es de simetría radial y relativamente simple, consta de un saco hueco con una cavidad gastrovascular que contiene una sola abertura, la cual 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, donde se liberan enzimas que digieren parcialmente el alimento. Las partículas más pequeñas son captadas luego por células de la gastrodermis que recubren la cavidad, que completan el proceso digestivo y ceden los productos a otras células del organismo. La circulación del agua a través del seno gastrovascular proporciona O_2 a la gastrodermis y conduce el CO_2 , otros productos de desecho y restos de partículas de alimento no digerido al exterior a través de la boca (Figura 1).

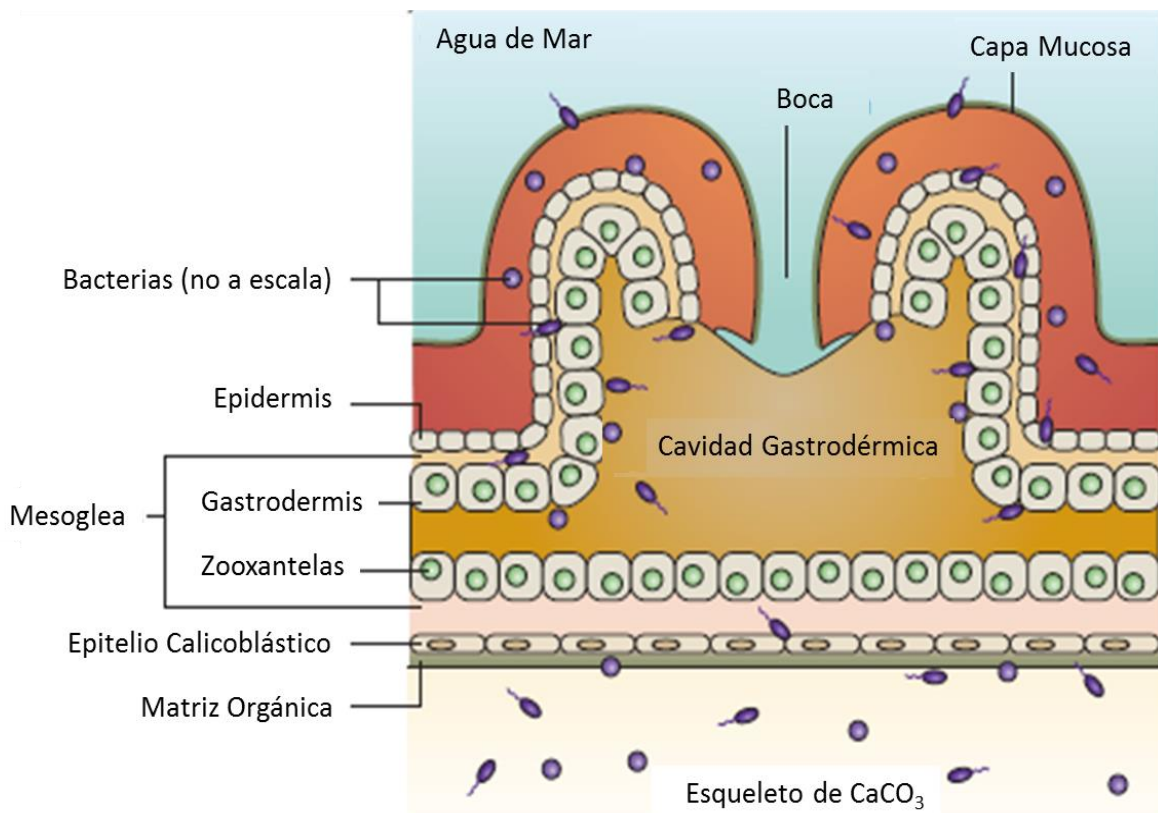


Figura 1. Estructura del tejido coralino y anexos (Rosenberg y col., 2007).

El ciclo de vida de los cnidarios inicia con una larva plánula, que es pequeña, ciliada y de vida libre. Después de la etapa larval, algunos cnidarios alternan la forma pólipo y medusa. En estas especies, la reproducción de los pólipos es asexual y la de las medusas, sexual (Solomon y col., 1998; Curtis y col., 2007; Daly y col., 2007).

1.3 Clasificación del phylum Cnidaria

Hasta 2004, se conocían sólo cuatro clases de Cnidarios: Anthozoa, Scyphozoa, Cubozoa e Hydrozoa (Nevalainen y col., 2004). En ese mismo año, gracias a estudios filogenéticos realizados por Marques y Collins, se incluyó a la Clase Staurozoa como parte del phylum Cnidaria, dando como resultado, las 5 clases de cnidarios que hoy en día se conocen (Marques y Collins, 2004; Steele y col., 2011).

- Clase Scyphozoa: Incluye a las medusas de diámetros grandes. Se caracterizan por su movilidad, de tipo propulsor; además de que poseen varias estructuras en múltiplos de cuatro (Figura 2). Ejemplos de especies características de esta clase son las medusas corona (orden Coronatae) y las medusas invertidas (familia Cassiopeidae, orden Rhizostomeae) (Solomon y col., 1998; Arai, 1997).



Phylum: Cnidaria
Clase: Scyphozoa
Orden: Semaestomae
Familia: Pelagiidae
Género: *Chrysaora*
Especie: *Chrysaora fuscescens*

Figura 2. Ejemplo representativo de un organismo de la clase Scyphozoa.

- Clase Cubozoa: Su nombre alude a la forma cúbica del cuerpo, que presenta una división tetramérica (Figura 3). Poseen un velo en forma de sombrilla que casi es transparente. Se les conoce comúnmente como “avispas de mar” (orden Carybdeida y Chirodripida) debido a sus venenos altamente tóxicos (Solomon y col., 1998; Fernández y Rivas, 2007).



Phylum: Cnidaria
Clase: Cubozoa
Orden: Carybdeida
Familia: Carybdeidae
Género: *Carybdea*
Especie: *Carybdea sivickisi*

Figura 3. Ejemplo representativo de un organismo de la clase Cubozoa.

- Clase Anthozoa: Carecen de una fase medusoide, predominando la fase polipoide béntica, sésil y generalmente modular. La clase recibe su nombre debido a que los pólipos tienen forma de flor (“*anthos*” flor, “*zoos*” animal) e incluye a los corales, las anémonas, los abanicos y las plumas de mar. La mayoría son especies coloniales (Figura 4), aunque también existen algunas especies solitarias. La mesoglea de los antozoos se caracteriza por tener mayor densidad celular, además de que la cavidad gastrovascular de estos organismos se encuentra dividida radialmente por septos llamados mesenterios. Esta clase comprende tres subclases, según la agrupación de Dunn (1982): Octocorallia (Alcyonaria), Hexacorallia (Zoantharia) y Ceriantipatharia (Solomon y col., 1998).



Phylum: Cnidaria
Clase: Anthozoa
Orden: Zoanthidea
Familia: Sphenopidae
Género: *Palythoa*
Especie: *Palythoa caribaeorum*

Figura 4. Ejemplo representativo de un organismo de la clase Anthozoa.

- Clase Staurozoa: Está conformada por un grupo reducido de medusas pequeñas sésiles de aspecto polipoide, que se encuentran fijas al sustrato por un disco aboral adhesivo en la base de un tallo de longitud variable (Figura 5). El cuerpo, también llamado cáliz, está dividido en cuatro pares de brazos; la boca es central ubicada al final de un manubrio corto y cuadrangular, con ocho tentáculos primarios simples y ocho grupos de tentáculos secundarios huecos, localizados en los extremos de cada uno de los brazos; la cavidad gástrica se divide en cuatro bolsas mediante septos longitudinales huecos; sus plánulas reptantes se desarrollan en pólipos y posteriormente en medusas. Tanto pólipos como plánulas se reproducen asexualmente por gemación (Fernández y Rivas, 2007).



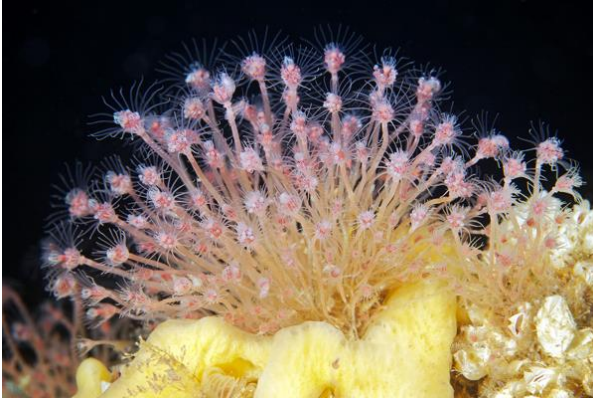
Phylum: Cnidaria
Clase: Staurozoa
Orden: Stauromedusae
Familia: Lucernariidae
Género: *Lucernaria*
Especie: *Lucernaria quadricornis*

Figura 5. Ejemplo representativo de un organismo de la clase Staurozoa.

- Clase Hydrozoa: Esta clase cuenta con la mayor diversidad de especies, no sólo porque comprenden organismos de aguas salobres y dulces, como es el caso de *Hydra* y *Craspedacusta*, sino porque también presentan una gran diversidad en su alimentación, ya que incluye cnidarios que son omnívoros, predadores y carroñeros (Fernández y Rivas, 2007; WoRMS, 2013). Una característica propia de esta clase, es que su cavidad gastrovascular no presenta divisiones. Las especies más representativas de esta clase son las hidras (orden Hydroida, Familia Hydridae); especies que presentan la forma de medusas marinas (orden Trachylina), siendo éstas más pequeñas que las de la clase Scyphozoa; medusas de agua dulce (orden Limnomedusae, familia Olindiidae); además de otras especies tubulares (Figura 6). Dentro de esta clase se encuentran también formas coloniales flotantes (orden Siphonophora) (Schuchert, 2009). Asimismo esta clase comprende a los hidrocorales, los cuales son hidrozoarios coloniales que secretan esqueletos calcáreos y se asemejan a los auténticos corales escleractinios.

Los hidrocorales incluyen dos grupos; el primero está constituido por las especies del orden Stylasterina, que habitan generalmente en cuevas y grietas a profundidades de 200 a 500 m y el segundo comprende a las especies del orden Anthoathecata, familia Milleporidae, también conocidos como “corales de fuego o corales punzantes”, debido a que al entrar en contacto con la piel de los humanos, producen lesiones semejantes a quemaduras. Los corales de fuego son los más abundantes de los dos tipos de hidrocorales, se encuentran distribuidos a lo largo de

todo el mundo en aguas someras, salobres y bálticas de entre 1 y 40 m de profundidad (Lewis, 2006).



Phylum: Cnidaria
Clase: Hydrozoa
Orden: Anthoathecata
Familia: Tubulariidae
Género: *Ectopleura*
Especie: *Ectopleura larynx*

Figura 6. Ejemplo representativo de un organismo de la clase Hydrozoa.

1.4 Cnidocitos y cnidocistos

Los cnidocitos son células eucarióticas altamente especializadas y complejas, que definen a los organismos pertenecientes al phylum Cnidaria, los cuales lo utilizan para capturar a sus presas, como defensa, como organelos de adhesión; para la construcción de túbulos y en la locomoción (Mariscal y col., 1977; Terrón y López, 2005). Los cnidocitos o cnidae (singular cnida) poseen cnidocistos, organelos a manera de cápsula cilíndrica, la cual libera un túbulo largo tras su activación. El desarrollo de este organelo se lleva a cabo dentro de una vesícula gigante que se encuentra próxima al aparato de Golgi, ya que ésta es el resultado de una acumulación secuencial de proteínas secretadas por él. Tradicionalmente, se distinguen tres tipos de cnidocistos: pticocistos, espirocistos y nematocistos (Özbek y col., 2009).

La clase Anthozoa se distingue de las otras cuatro clases por poseer los tres tipos de cnidocistos. Los espirocistos se encuentran solamente en la subclase Hexacorallia, que pertenece a la clase Anthozoa. Los pticocistos se encuentran exclusivamente en las anémonas tubo (clase Anthozoa, orden Ceriantharia). Por otro lado, los nematocistos se encuentran en todas las especies del phylum Cnidaria y son los más importantes, pues son utilizados principalmente para

capturar a sus presas y como defensa, debido a que almacenan una mezcla compleja de toxinas (Tardent, 1995; Fautin, 2009; Özbek y col., 2009).

Existen alrededor de 30 tipos morfológicos de nematocistos, sin embargo, se ha observado que su estructura no parece estar relacionada con su función, ya que se ha demostrado que la mayoría de los nematocistos cumplen con funciones tanto de ataque como de defensa. De la misma manera, no se ha establecido una relación entre la forma del nematocisto y su toxicidad. Hasta ahora, la gran diversidad de formas y tamaños en este tipo de cnidae, ha fungido como una valiosa herramienta para clasificar taxonómicamente a las especies pertenecientes al phylum Cnidaria (Fautin, 2009; Östman, 2000).

Asimismo, los nematocistos se conforman por una cápsula de doble capa, que puede ser de forma ovalada o esférica, en cuya parte apical se encuentra una abertura cerrada por una pequeña tapa. A esta abertura se le conoce como opérculo. En el interior del nematocisto se alberga un filamento tubular invertido enrollado que es evertido explosivamente cuando se estimula de manera apropiada (Mariscal, 1974; Tardent, 1995; Kass y Scappaticci, 2002). Las paredes de la cápsula, principalmente la capa exterior, están constituidas principalmente por una glucoproteína denominada NOWA, que presenta dominios ricos en cisteína de manera muy similar a la estructura del colágeno; por lo que a estos dominios se les ha denominado minicolágeno (Engel y col., 2002; Meier y col., 2007). Así, la cápsula es altamente resistente y soporta una presión intracapsular de 150 bar (Özbek y col., 2009). Tras un estímulo químico, físico o mecánico (Watson y Hessinger, 1989); una alta concentración del polianión poli- γ -glutamato (pG) dentro de la cápsula incrementa la presión osmótica, iniciando un proceso clásico de exocitosis que provoca la liberación de la cápsula y la descarga de las sustancias que se encuentran en el interior del organelo, principalmente, toxinas (Figura 7) (Weber, 1990; Szczepanek y col., 2002; Özbek y col., 2009).

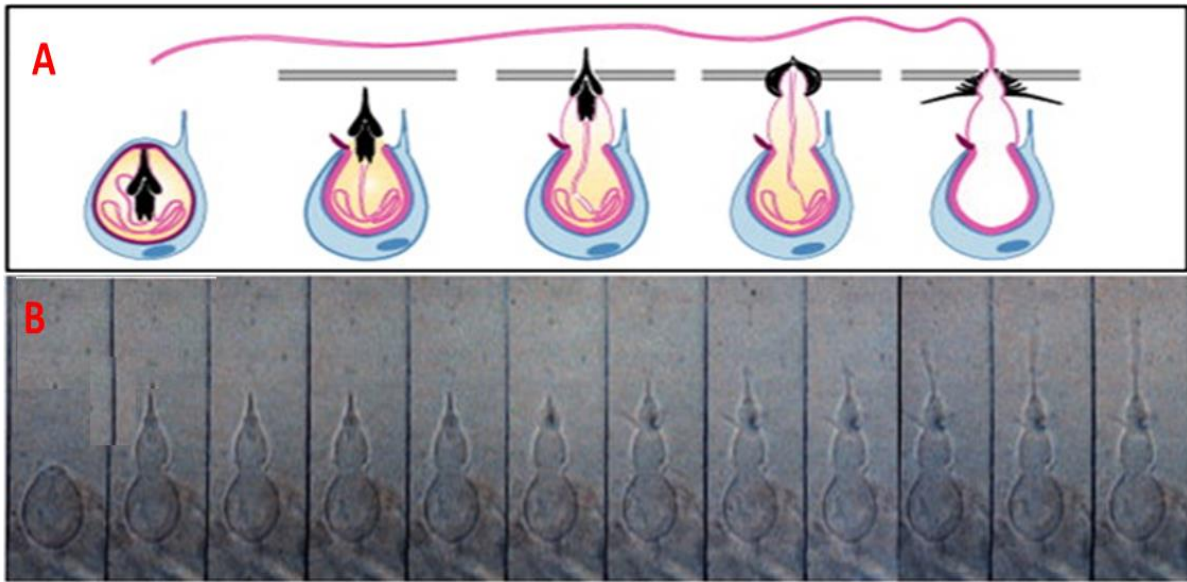


Figura 7. Morfodinámica de la descarga del nematocisto tipo estenóteles.
 A) Esquema de la descarga de un estenóteles. B) Eversión del nematocisto, resuelto con cámara Hamamatsu C4187 de alta velocidad (Özbek y col. 2009).

1.5 Compuestos bioactivos sintetizados por los cnidarios

Los cnidarios conforman el phylum más amplio de animales generalmente tóxicos (Watters, 2005) y a pesar de ello, sus toxinas y venenos no han recibido suficiente atención por parte de los científicos, en comparación con la que se le ha brindado a las toxinas y venenos de serpientes, escorpiones, arañas y, de inclusive, algunos organismos marinos como a los caracoles cónicos del género *Conus* (phylum Mollusca), entre otros. Un estudio toxinológico más amplio y profundo sobre los cnidarios permitiría, además de la elucidación de las estructuras de sus toxinas, un mejor tratamiento para las víctimas de envenenamiento por parte de estos organismos. Más aún, las toxinas de estos animales marinos pueden constituir herramientas moleculares altamente útiles para el estudio de canales iónicos implicados en la señalización eléctrica, la respuesta inmune y otros procesos de transducción de señales de interés biomédico (Turk y Kem, 2009). Un trabajo que reitera el gran valor del estudio de toxinas de cnidarios, es el realizado por Chi y col. (2012), en el cual se demuestra que la toxina de la anémona *Stichodactyla*

helianthus es capaz de inhibir potencialmente la proliferación de linfocitos T en ciertos modelos de enfermedades autoinmunes como lo son la artritis reumatoide y la psoriasis, entre otras (Chi y col., 2012).

Los venenos de los cnidarios están constituidos por una amplia gama de sustancias tales como péptidos, proteínas, fosfolípidos, fosfolipasas, glicoproteínas, esteroides, aminas bioactivas y carbohidratos (Watters, 2005); aunque la gran mayoría de los estudios dirigidos a la identificación de estas toxinas, indican que la mayor parte de éstas son de naturaleza proteínica (Rogers y col., 1996; Anderluh y col., 2002; Nevalainen y col., 2009). Tomando en cuenta los conocimientos generales que se tienen respecto a sus efectos, estas toxinas se pueden clasificar en dos grupos principales: neurotoxinas y citolisinas. Por otra parte, también se han encontrado diversos metabolitos secundarios bioactivos en cnidarios (Blunt y col., 2012). En el caso de la clase Anthozoa (anémonas marinas) y la clase Hydrozoa (hidras), el tipo de toxinas que más abundan, son neurotoxinas que bloquean canales de Na^+ y K^+ ; además de citolisinas, que afectan la integridad de la célula diana (Anderluh y col., 2011).

1.5.1 Neurotoxinas

Los canales iónicos dependientes de voltaje, generan actividad eléctrica en las células excitables. Los canales dependientes de voltaje se abren en respuesta a cambios en el potencial de membrana, permitiendo que los iones indicados fluyan a través del canal a favor de un gradiente de concentración. De esta manera, son componentes esenciales en los sistemas neuromusculares y neuronales, y constituyen los blancos moleculares de toxinas de una amplia variedad de phyla, incluidos los cnidarios.

En lo que respecta a las toxinas de organismos del phylum Cnidaria, las toxinas de las anémonas (clase Anthozoa, subclase Hexacorallia, orden Actinaria) son las mejor caracterizadas en términos de su mecanismo de acción. Se ha encontrado que una gran parte de las toxinas de los cnidarios actúan sobre canales de sodio (Na_V) y de potasio (K_V) dependientes de voltaje y han sido descritas a detalle

(Messerli y Greenberg, 2006). Adicionalmente, se ha encontrado que las toxinas contenidas en el veneno de *M. complanata* involucran canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Rojas y col., 2002), sin embargo, no se ha elucidado la estructura química de dichas toxinas, ni su mecanismo de acción a nivel molecular.

1.5.1.1 Neurotoxinas que actúan sobre canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v)

Algunas de las toxinas polipeptídicas que actúan sobre canales Na_v tienen efecto cardiovascular y neurotóxico, y provienen de más de 50 diferentes anémonas. Estas toxinas tienen un peso molecular de aproximadamente 5 kDa. Ejemplos de estas toxinas son la ATX II de *Anemonia sulcata*, Anthopleurina A y B (ApA y ApB) de *Anthopleura xanthogrammica* y la cangitoxina de *Bundusoma cangicum*, a la cual se le ha comprobado efecto epileptogénico *in vivo* (Honma y Shiomi, 2006).

Norton describe una clasificación de estas toxinas de anémonas en diferentes tipos, la cual está basada en las secuencias de sus aminoácidos: las toxinas tipo 1 y tipo 2 son polipéptidos de 46 a 49 aminoácidos (Norton, 1991). La similitud que existe entre ambas categorías es de cerca del 60%, sin embargo, la similitud entre los miembros de estos grupos es menor del 30% y contienen 6 residuos conservados de cisteína que se encuentran unidos por 3 puentes disulfuro, además ambos tienen secuencias de aminoácidos básicos (lisina) C-terminal que son más frecuentes en el tipo 2. Los péptidos tipo 3 pertenecen a organismos del género *Entacmaea* (familia Actiniidae) y son más cortos pues sólo constan de 27 a 32 aminoácidos. Al tipo 3 corresponden las calitoxinas I y II de *Calliactis parasitica*, que son péptidos largos que no se ajustan al tipo 1 ni al 2 (Cariello y col., 1989; Spagnuolo y col., 1994). Tanto el tipo 1 como el tipo 2 de estas toxinas pueden ser encontradas en la familia Stichodactylidae, como son la Gigantoxina II y III, pero la familia Actiniidae sólo produce toxinas del tipo 1 (Shiomi y col., 2003).

1.5.1.2 Neurotoxinas que actúan sobre canales de potasio dependientes de voltaje (K_V)

A la fecha se han reportado, por lo menos, 11 toxinas aisladas de anémonas, que actúan sobre canales de K_V . Estas toxinas se agrupan en 3 diferentes clases, de acuerdo a sus diferencias tanto estructurales como funcionales.

En el tipo 1 se encuentran las toxinas que bloquean con gran potencia los canales K_V . Contienen de 35–37 aminoácidos que forman 2 hélices casi perpendiculares que incluyen 3 puentes disulfuro. Se ha observado que para la toxina ShK de *Stichodactyla helianthus* (clase Anthozoa), el residuo de lisina 22 y el residuo de tirosina 23 son esenciales para la interacción con los canales K_V de cerebro de rata. Un resultado similar fue encontrado para la toxina BgK de *Bunodosoma granulifera* (clase Anthozoa) (Pennington y col., 1996).

El tipo 2 está representado por las kalicudinas de la 1 a la 3. Están conformadas por 58 o 59 residuos de aminoácidos que bloquean los canales K_{V1} aunque con menor potencia que las toxinas del tipo 1. Asimismo, presentan secuencias homólogas a las dendrotoxinas, que son toxinas que se encuentran en venenos de serpientes; y a inhibidores de proteasa tipo Kunitz, además de que exhiben actividad inhibitoria de proteasa (Schweitz y col., 1995).

Las toxinas del tipo 3 incluyen a la BDS–I y BDS–II de *Anemonia sulcata* y a la APETx1 de *Anthopleura elegantissima*. Ambas bloquean selectivamente los canales K_{V3} causando, predominantemente, la rápida inactivación de los canales $K_{V3.4}$. APETx1, por otro lado, es muy similar a las toxinas BDS (hasta un 54%), pese a esto, actúa modificando la dependencia del voltaje de los canales $K_{V11.1}$ (Diochot y col., 2003).

1.5.2 Citolisinas

La vida de una célula depende de la integridad de la membrana celular, que es responsable de controlar la distribución transmembranal de solutos. No es sorprendente que la permeabilización de la membrana, inducida por péptidos y

proteínas específicamente diseñadas hayan evolucionado como una estrategia para atacar a otros organismos vivos, causando a la célula una muerte necrótica o apoptótica. Inclusive, algunas de esas moléculas tan efectivas, son péptidos antimicrobianos que actúan como antibióticos naturales o como efectores cruciales de sistemas de inmunidad innata (Maróti y col., 2011; Wilmes y col., 2011).

El objetivo principal de este tipo de toxinas es provocar la destrucción de determinados tipos celulares, por medio de su interacción con las membranas celulares. El daño celular puede ser causado por vía enzimática, mediante la degradación de los lípidos de la membrana (mediante la acción de fosfolipasas citolíticas y esfingomielinasas) o, mediante la formación de poros en las membranas (toxinas formadoras de poro, actinoporinas o PFTs). Estas últimas suelen ser las más comunes en el veneno de los cnidarios, por lo que se cree que su efectividad al causar daño al organismo diana es evolucionadamente más ventajosa, pues a concentraciones nanomolares, estas proteínas son capaces de lisar eritrocitos y otras células, según lo reportado por Sher y col., en 2005. El mecanismo general de acción de las PFTs (Pore Forming Toxins) puede ser descrito en distintos pasos: 1) secreción de proteínas solubles que atacan la membrana de la célula diana por reconocimiento, más o menos específico, de lípidos y/o dominios de lípidos; 2) oligomerización en el plano de la membrana y, 3) proyección de segmentos de polipéptidos anfifílicos de estructuras α - o β - a través de la bicapa lipídica para construir poros hidrofílicos revestidos por conjuntos de α -hélices (α -PFTs) o varias horquillas β (β -PFTs) (Parker y Feil, 2005; Anderluh y Lakey, 2008; Sher y col., 2005).

1.5.2.1 Citolisinas que degradan los lípidos de membrana

Las toxinas cuyo mecanismo de acción involucra la degradación enzimática de lípidos membranales específicos, son aquellas con actividad de fosfolipasa A_2 (PLA₂). El papel que juegan en los cnidarios es ayudar a capturar y digerir presas, además de servir como mecanismo de defensa (Nevalainen y col., 2004). Estas enzimas hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos, liberando ácidos

grasos y lisofosfolípidos. Es importante diferenciar a las PLA₂ citosólicas (cPLA₂) de las de secreción (sPLA₂). Las primeras desempeñan un papel importante dentro de las células, mediante la producción de diversos compuestos bioactivos endógenos, activando la vía del ácido araquidónico (Diaz y Arm, 2003). Por otro lado, las sPLA₂ se encuentran en venenos de diversos organismos, así como en otras secreciones como la saliva y el jugo pancreático (Nevalainen y col., 2004). En el phylum Cnidaria, se han encontrado altos niveles de actividad de sPLA₂ en los venenos de diversas especies (Nevalainen y col., 2004). Asimismo, se han llegado a clonar sPLA₂ de las anémonas marinas *Adamsia palliata* (clase Anthozoa) (Talvinen y Nevalainen, 2002) y *Urticina crassicornis* (Razpotnik y col., 2009). Muchas veces, este tipo de toxinas actúan en conjunto con otras citolisinas para inducir la lisis de las células. Además, se ha encontrado que algunas de estas citolisinas requieren de cationes divalentes, como el Ca²⁺ y el Mg²⁺, para alcanzar su actividad óptima, tal es el caso de la β PLA₂ de *A. palliata* (Grotendorst y Hessinger, 2000). En el 2004, Nevalainen y col., reportaron que diversas especies de la familia Milleporidae presentaban altos niveles de actividad PLA₂ (735 U/g de proteína, en promedio), responsables de la irritación cutánea, e inclusive, del síndrome de envenenamiento sistémico, tras el contacto con dichos organismos (Nevalainen y col., 2004).

1.5.2.2 Actinoporinas

Las toxinas de cnidarios más estudiadas son las que constituyen la familia de las actinoporinas. De ellas se conoce su forma estructural 3D y su mecanismo molecular de la formación del poro, sin embargo, su rol biológico en anémonas no se ha elucidado aún. Éstas han sido descritas en diversas especies de anémonas, aunque las moléculas que han cobrado más importancia durante la última década son la equinatoxina II (EqtlI) aislada de *Actinia equina* (clase Anthozoa); las esticolisinas I y II (StI y StII, respectivamente) obtenidas del veneno de *Stichodactyla helianthus* y, las magnificalisinas (HMg) extraídas de *Heteractis magnifica* (clase Anthozoa). Estas actinoporinas poseen como características comunes el ser monoméricas, no poseer residuos de cisteína y presentar pesos moleculares de aproximadamente 20 kDa. Resulta interesante mencionar, que

incluso los miembros más lejanos de la familia contienen aún, más del 50 % de residuos de aminoácidos idénticos. Estas toxinas son hidrosolubles, en presencia de lípidos membranales (esfingomielina), oligomerizan de tres a cuatro moléculas para formar un poro de aproximadamente 2 nm de diámetro que es selectivo a cationes (Anderluh y col., 2002; Anderluh y Lakey, 2011).

1.5.3 Metabolitos secundarios

Un gran número de metabolitos secundarios bioactivos se han encontrado en cnidarios, principalmente en especies de la clase Anthozoa. La mayoría de estos metabolitos son de naturaleza terpenoide, prostanoide o esteroidea (Blunt y col., 2012).

1.5.3.1 Terpenoides

Los terpenoides constituyen el grupo más amplio de productos naturales bioactivos con un alto potencial farmacológico. Estos compuestos presentan importantes efectos terapéuticos tales como son efecto antineoplásico, anti-inflamatorio, antimalárico y actividad antibiótica. Durante las últimas dos décadas, han sido aislados cientos de terpenoides de origen marino con prometedores usos en el tratamiento de diversas enfermedades humanas. Una de las fuentes más productivas de este tipo de metabolitos secundarios son los organismos pertenecientes al phylum Cnidaria: anémonas, corales pétreos, hidrocorales y gorgonias (Berrue y Kerr, 2009).

El grupo más grande de estos metabolitos en cnidarios, lo constituyen los cembranoides, compuestos diterpénicos que contienen un anillo de 14 carbonos, un isopropil en el carbono 1 y tres grupos metilo acomodados simétricamente en los carbonos 4, 8 y 12. A este núcleo característico se le conoce como grupo cembrano (Figura 8). Existen numerosas variaciones estructurales sobre el núcleo cembranoide, tales como cambio en la posición de los dobles enlaces, epoxidación, ciclación de carbonos y oxidación alílica e isopropílica (Berrue y Kerr, 2009). Los cembranoides se han encontrado en diversos corales blandos (clase Anthozoa,

subclase Octocorallia, orden Alcyonacea) y presentan diversos efectos biológicos de importancia biomédica, ya que pueden interactuar con receptores nicotínicos musculares y neuronales (Ferchmin y col., 2009). Por ejemplo, la lofotoxina, aislada de algunos corales blandos del Pacífico pertenecientes al género *Lophogeorgia*, bloquea receptores neuromusculares de acetilcolina de manera irreversible mediante una unión covalente con el receptor (Fenical y col., 1981).

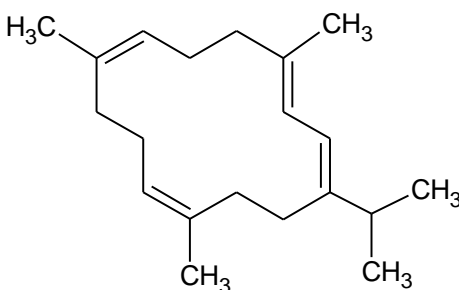


Figura 8. Estructura básica de los cembranoides.

Otro cembranoide importante es el sarcofitol A, aislado de *Sarcophyton glaucum* (clase Anthozoa), pues ha demostrado ser un potente agente antitumoral en modelos de cáncer de piel en ratones (Fujiki y col., 1989), inhibe el desarrollo de hepatomas sin vestigios de toxicidad (Yamauchi y col., 1991) y posee efectos preventivos contra el cáncer de páncreas (Yokomatsu y col., 1994).

La eleuterobina y las sarcodictinas son un grupo de cembranoides ciclados que poseen funciones estabilizantes de microtúbulos como lo hace el taxol, un fármaco antitumoral aprobado por la Food and Drug Administration (FDA). La eleuterobina fue aislada del coral blando *Eleutherobia aurea* (clase Anthozoa), que habita en el Océano Índico, mientras que las sarcodictinas A y B fueron aisladas del coral *Sarcodictyon roseum* (clase Anthozoa), del Mar Mediterráneo. Estos compuestos tienen actividad antitumoral a una concentración inhibitoria media (CI₅₀) entre 400 y 900 nM, a la cual inducen la polimerización de las tubulinas y la estabilización de los microtúbulos (Newmann y Cragg, 2004). La (Z)-sarcodictina A fue aislada del coral blando *Bellonella albiflora* (clase Anthozoa) y presenta fuerte actividad citotóxica contra las células HeLa de cáncer cervicouterino (Nakao y col., 2003). La

esclerofitina A, aislada del coral blando *Sclerophytum capitalis* (clase Anthozoa) presenta un potente efecto citotóxico *in vitro* en las células L1210 (células de leucemia linfocítica de ratón), con una $IC_{50} = 3$ nM (Sharma y Alam, 1988) y presenta actividad antimetastásica contra las células humanas PC-3 de cáncer de próstata (Hassan y col., 2010). Debido a su potencia y complejidad estructural, se han incrementado los esfuerzos para lograr sintetizarla, o en su defecto, crear nuevos derivados que puedan tener actividad sobre diferentes células cancerosas (Bateman y col., 2009).

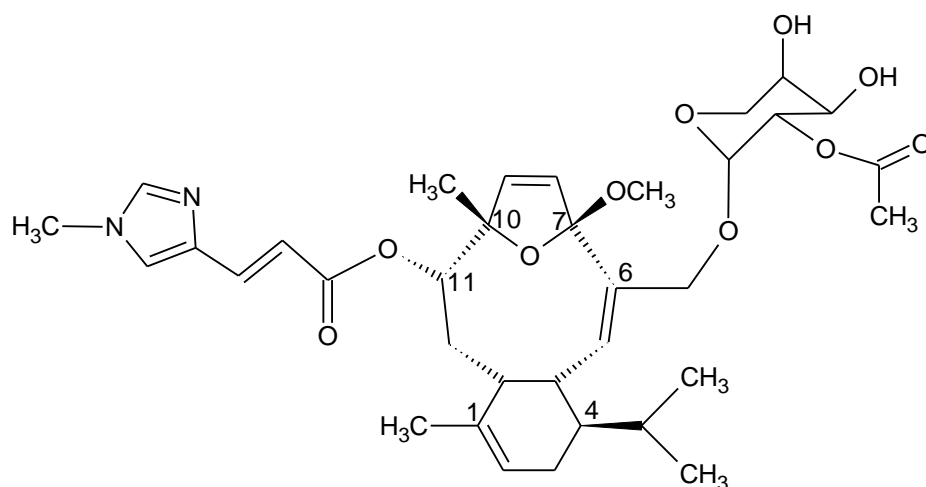


Figura 9. Estructura de la eleuterobina.

Las pseudopterosinas son una familia de diterpen-pentosaglicósidos, aislados de una de las cinco especies más prolíficas del género *Pseudoterogorgia*; *P. elisabethae*. Hasta el momento, más de 109 compuestos han sido aislados de esta especie, de los cuales, los terpenoides son el tipo más abundante. Estructuralmente, las pseudopterosinas consisten en un núcleo hidrocarbonado tricíclico que posee 4 estereocentros, y un azúcar unido a una subunidad catecol. A estos compuestos se les han demostrado propiedades anti-inflamatorias, antimicrobianas, desinfectantes y una baja citotoxicidad (Bandurraga y col., 1982; Look y col., 1985; Pawlik y col., 1987; McCulloch y col., 2012). De hecho, algunas pseudopterosinas son más potentes que fármacos como la indometacina en

modelos de ratón. El mecanismo anti-inflamatorio de estos compuestos no está completamente claro, sin embargo, algunos estudios muestran que la pseudopterosina A (Figura 10) induce una modificación de la cascada del ácido araquidónico (Look y col., 1986; Mayer y col., 1998).

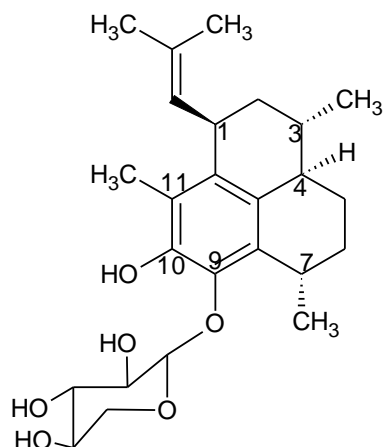


Figura 10. Estructura de la pseudopterosina A.

Otro grupo de terpenos que poseen propiedades anti-inflamatorias son los fucósidos A y B, diterpenos glicosilados con arabinosa, aislados del octocoral *Eunicea fusca*. Se cree que su efecto se debe a la inhibición selectiva de la 5-lipooxigenasa (Jacobson y Jacobs, 1992).

1.5.3.2 Prostanoides

Los prostanoides son derivados del ácido prostanóico, un ácido graso de 20 carbonos. Contienen un anillo ciclopentano, una cadena lateral de 7 carbonos con un grupo funcional carboxilo y, una cadena lateral de 8 carbonos con un metilo terminal. Este esqueleto básico es conocido como ácido prostanóico. (Hashimoto, 2003 y Dewick, 2007).

Sorprendentemente, la acumulación de estos prostanoides en corales es comparable con las hormonas de los mamíferos. Los roles fisiológicos y la necesidad de otros prostanoides como la prostaglandina A₂ son desconocidos (Hashimoto, 2003), sin embargo, Yun-Shen y col. (2008) propusieron que los

prostanoides constituyen, probablemente, una defensa química contra los depredadores (Yun–Sheng y col., 2008).

Actualmente, los prostanoides marinos han atraído la atención debido a sus estructuras novedosas y su actividad antitumoral (Iguchi y col., 1995; Iwashima y col., 1997; Iwashima y col., 1999; Rocha y col., 2011). Varios tipos de prostanoides, incluidas las prostaglandinas, clavulonas y punaglandinas, han sido detectadas en algunas especies de corales blandos del género *Clavularia* (Watanabe y col., 1996; Watanabe y col., 2001; Iwashima y col., 2002; Duh y col., 2002; Shen y col., 2004). Yun–Sheng y col. (2008) han analizado el octocoral *Clavularia viridis*, y encontraron cinco prostanoides a los que llamaron ácidos clavirídicos A al E. Para estudiar las actividades biológicas de estos prostanoides marinos, se evaluó el efecto inhibitor sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) inducida por fitohemaglutinina (PHA) y la actividad citotóxica contra células gástricas humanas cancerosas (AGS). Estos investigadores concluyeron que todas las moléculas presentaban actividad biológica, pero el ácido clavirídico A (Figura 11) fue el compuesto con los mejores resultados en ambos ensayos (Yun–Sheng y col., 2008).

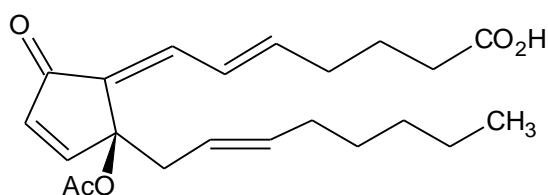


Figura 11. Estructura del ácido clavirídico A.

En 2010, Ya Ching y col., estudiaron la misma especie de octocoral y obtuvieron cuatro nuevos prostanoides, las clarividinas A a D. Ellos probaron la actividad citotóxica de estos cuatro compuestos en líneas celulares de hepatoma humano (Hep2), meduloblastoma (Doay), adenocarcinoma de colon (WiDr) y carcinoma epitelial cervical (HeLa); encontrando que todos los compuestos presentan una potente actividad citotóxica para las 4 líneas celulares humanas de cáncer, pero que las clarividinas A y B presentaban una citotoxicidad más potente contra la línea

celular Hep2 y la clarividina A era más potente que el quimioterapéutico estándar, la camptotecina (CPT) (Ya-Ching, 2010).

Las prostaglandinas son un grupo de ácidos grasos modificados de 20 carbonos: ácido $\Delta^{8,11,14}$ -eicosatrienóico (ácido dihomo- γ -linolénico), ácido $\Delta^{5,8,11,14}$ -eicosatetraenóico (ácido araquidónico) y ácido $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -eicosapentaenóico (Honda y col., 1987; Bader y col., 1991).

Como los prostanoides, diversas prostaglandinas han demostrado tener actividades farmacológicas antivirales, anti-inflamatorias y antitumorales. Hoy en día, es bien sabido que estos compuestos a concentraciones tipo hormona pueden regular la presión sanguínea, la contractilidad de músculo liso, la secreción gástrica, la lipólisis de ácidos grasos y la agregación plaquetaria. Su potencial como fármacos es extremadamente alto (Dewick, 2007); inclusive ya se usan como tratamiento de la infertilidad como agentes oxitócicos, en terapias gástricas y cardiovasculares y como broncodilatadores. Un ejemplo de ello, es el uso de la prostaciclina, en la prevención de la coagulación en operaciones de bypass cardiopulmonar; para proteger la mucosa estomacal contra úlceras en los casos de reflujo y como anti-inflamatorio no esteroideo en artritis (Rowley y col., 2005).

En los cnidarios, *Plexaura homomalla* (clase Anthozoa) es una fuente natural rica en prostaglandinas, en la cual se han encontrado la 15-R-PGA2, sus derivados metil-acetato y metil éster (Weinheimer y Spraggins, 1969), además de su enantiómero 15-S-PGA2; los cuales representan de un 0.2 a un 1.3 % del peso seco del organismo (Schneider y col., 1972). Estas moléculas han resultado ser de gran valor farmacéutico como agentes terapéuticos hipotensivos y como relajantes del sistema nervioso central (Valmsen y col., 2001).

En 2006, Han y col. aislaron dos prostaglandinas del zoántido *Palythoa kochii*: PGA2 y PGB2. Observaron que la actividad de la PGA2 aislada era similar a los agentes estabilizadores de microtúbulos, como lo son el taxol y la epotilona A. PGA2 estimula la polimerización de la tubulina, por lo que se sugiere que la

estructura y la orientación del momento dipolar del anillo ciclopentenona juegan un papel importante en esta actividad (Han, y col., 2001).

Como ya se ha mencionado, los venenos de los cnidarios son una mezcla compleja de sustancias. Algunos compuestos como son la congestina, talasina, equinatoxina, hipnotoxina y palitoxina, han sido detectados en ellos. El último compuesto, la palitoxina (obtenido de especies del género *Palythoa*), ha sido referido como un potente estimulador de la liberación de prostaglandinas. Algunos venenos de otras especies de cnidarios, tales como *Physalia physalis* (Loredo y col., 1985), *Carybdea rastonii* (Nagase y col., 1987) y *Actinia equina* (Ho y col., 1987), tienen el mismo efecto.

1.5.3.3 Alcaloides

Los alcaloides son raramente encontrados en cnidarios, sin embargo, se han encontrado de manera muy restringida en los organismos del orden Zoantharia. Estos organismos producen dos tipos de alcaloides: una clase única de aminas heteroatómicas conocidas colectivamente como zoantoxantinas, responsables de su brillante pigmentación; y los alcaloides tipo zoantamina, con un esqueleto original identificado principalmente en el género *Zoanthus* (Daranas y col., 2000).

Las zoantoxantinas son sustancias fluorescentes amarillas que emanan exclusivamente de colonias grandes de los géneros *Epizoanthus* y *Zoanthus*, del orden Zoantharia. Sus moléculas pueden contener alrededor de tres tipos de esqueletos básicos: 3H-zoantoxantina, 3H-pseudozoantoxantina y 4H-pseudozoantoxantina (Jiménez y Crews, 1993). En 1995, Turk y col., obtuvieron un extracto etanólico del coral *Parazoanthus axinellae*, el cual fue letal en ratones y cangrejos y exhibió actividad de anticolinesterasa. El aislamiento de varios inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE) fue hecho con ayuda de RP-HPLC. El más abundante de los inhibidores presentes en el extracto, fue identificado como pseudozoantoxantina o un compuesto casi idéntico que pertenece a las series químicamente bien caracterizadas de tetraciclopentazuleno, pigmentos naturales de los géneros *Parazoanthus*, *Epizoanthus*, *Zoanthus* y *Palythoa* (Turk y col.,

1995). A partir de este compuesto, se obtuvieron análogos estructurales por síntesis química y se encontró que la actividad anticolinesterasa prevalecía (Turk y col., 1995; Sepčić y col., 1998; Da Rocha, 2013).

El primer alcaloide tipo zoantamina en ser aislado fue la zoantamina 1, aislada por Faulkner y col., en 1984 de una colonia no identificada de zoántidos (*Zoanthus spp.*) colectados en la costa de Visakhapatnam, en India. Fue el primer miembro de esta nueva clase de alcaloides (Behenna y col., 2008).

En 1995, Uemura y col., identificaron 5 nuevos tipos de zoantaminas de especies de *Zoanthus* colectadas en las costa Ayamaru de las islas Amami en el sur de Japón: norzoantamina, norzoantaminona, oxizoantamina, cicloantamina y epinorzoantamina; los cuales presentaron actividad citotóxica contra células de leucemia murina P388, siendo la norzoantaminona y la oxizoantamina, las más potentes (Fukuzawa y col., 1995). Más tarde, se encontró que la norzoantamina era un candidato prometedor para la prevención de osteoporosis, debido a que es un inhibidor de la IL-6, que estimula la formación de osteoclastos y por lo tanto la resorción ósea. La inhibición de esta citoquina por la norzoantamina podría ofrecer un efectivo fármaco contra este padecimiento (Kuramoto y col., 2004).

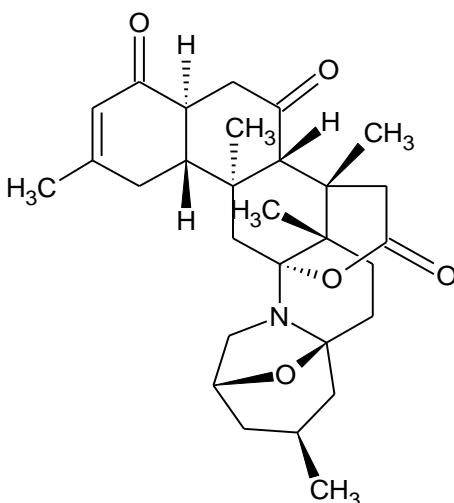


Figura 12. Estructura de la norzoantamina.

En 2003, se evaluaron 10 alcaloides tipo zoantamina obtenidos a partir de dos zoántidos marinos: *Zoanthus nymphaeus* y *Zoanthus sp.*, además de un derivado semisintético. Se encontró que la 11-hidroxisoantamina y el derivado sintético de la norzoantamina mostraron una potente inhibición de trombina, colágeno y de la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico; el zoantenol mostró una capacidad de inhibición selectiva inducida por colágeno, mientras que la zoantaminona se comportó con un potente agente agregante de plaquetas. Estas evaluaciones permitieron deducir diversas relaciones estructura-actividad e incluso sugerir algunos mecanismos de acción para este tipo de compuestos (Villar y col., 2003).

Más recientemente, se reportó el aislamiento y caracterización estructural de nuevas clases de alcaloides, las parazoantinas A a E, que se encuentran como constituyentes mayoritarios de la anémona *Parazoanthus axinellae*, procedente del Mar Mediterráneo. Esta familia de alcaloides representa el primer ejemplo de hidantoínas naturales 3,5-disustituidas que no exhiben un metilo en la posición N-3. Todos los compuestos presentaron actividad antitumoral contra las líneas celulares MDA-MB-231, HT-29 y A-549, así como actividad antimalárica FcB1 (Cachet y col., 2009).

1.5.3.4 Esteroides

Los esteroides son derivados del núcleo ciclopentano-perhidro-fenantreno o núcleo esterano. Están compuestos por carbono e hidrógeno formando 4 anillos unidos entre sí y, presentan modificaciones estructurales que consisten en la presencia de diferentes grupos funcionales tales como carbonilos, hidroxilos o cadenas hidrocarbonadas (Shin y col., 1996).

Los cnidarios poseen complejas mezclas de Δ^5 -esteroides, sin embargo, aparentemente, no son capaces de biosintetizar esteroides, por lo que el colesterol debe ser obtenido por acumulación específica de la dieta o por desalquilación de los 24-alquil-esteroides. Los octocorales (clase Anthozoa) tienen cantidades muy altas de 24-metil y 24-metilen esteroides, así como grupos CH_2OH - y CHO - en la

posición 28, que pueden ser intermediarios de la 24-desalquilación. El gorgosterol, descubierto en 1943 en *Plexaura flexuosa*, tiene una cadena con un ciclopropano a diferencia del colesterol, que tiene una cadena lineal ramificada; este es el esteroles predominante en corales blandos del orden Gorgonacea, pero sólo en aquellos cnidarios que albergan dinoflagelados simbioses de la familia Zooxanthellae. Sin embargo, los dinoflagelados aislados no producen gorgosterol, pero sí 4-metil esteroides; es posible que el 4 α -metil-5 α -gorgosterol sea un precursor del gorgosterol. Varios esteroides poli-hidroxiados han sido aislados de las especies de los órdenes Gorgonacea y Alcyonacea, además de otros cnidarios; algunos ejemplos de ello incluyen: la Hipurina I de *Isis hippuris*, el 24-metilcolestanpentol con el inusual grupo 22-hidroxilo de *Asterospicularia randalli*. Los 5 α , 8 α -epidioxi esteroides, conocidos por estar presentes en otros invertebrados, han sido encontrados en la anémona marina *Metridium snile*. Los esteroides con menos de 27 átomos de carbono han sido ocasionalmente encontrados en los cnidarios, ejemplo de estos es el ácido 20-epicolánico, que se encuentran en la pluma de mar *Ptilosarcus gurneyi*, los 3-cetopregnanos se encuentran en varios corales blandos y un polihidroxiandrostano, presente en *Sarcophyton glaucum*. Cinco pregnanos con arabinosa o xilosa han sido descritos en los corales blandos del género *Alcyonium* (Ulrich, 1994).

Algunos esteroides con propiedades farmacológicas han sido aislados de corales blandos, como es la hipurina aislada de *Alcyonium gracilum* (Shin y col., 1996), que es utilizada en el tratamiento de infecciones urinarias. En el coral blando *Clavularia viridis*, Duh y col. encontraron las estoloniferas H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q; estos 10 compuestos poseen actividad citotóxica en las líneas celulares P-388, de leucemia murina, y HT-29, de adenocarcinoma de colon humano grado II (Duh y col., 2007). Otros ejemplos son cuatro esteroides anti-inflamatorios obtenidos a partir del extracto de diclorometano del mismo coral: las estoloniferas R, S, T y el (25S)-24-metilcolestano-3 β ,5 α ,6 β -triol-26-acetato (Chin-Hsiang y col., 2008).

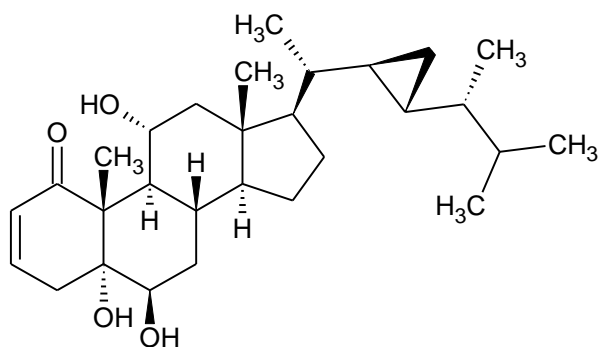


Figura 13. Estructura de la estoloniferona J.

Adicionalmente, otros esteroides con posible actividad farmacológica han sido aislados de especies de *Sinularia spp.*, los esteroides (22R,23R,24R)-5 α ,8 α -epidioxi-22,23-metilen-24-methylcholest-6-en-3 β -ol, el numersterol A y la pregnenolona, a los cuales se les ha demostrado una alta toxicidad para varios tipos tumorales (Jyh-Horng y col., 2000). Así también, se encontró que la 18-acetoxipregna-1,4,20-trien-3-ona obtenida por modificación de un aislado de *Carioja riisei*, mostró actividad antiprotozoaria contra *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi* (Quero y col., 2008).

1.5.3.5 Poliéteres: La palitoxina

El metabolito secundario con efectos letales de mayor potencia que se ha encontrado en los cnidarios es la palitoxina, un poliéter de estructura compleja con 64 centros quirales, que posee una parte hidrofílica y una lipofílica y un peso molecular de 2680 Da. Esta molécula tiene la capacidad de unirse selectivamente a la bomba Na,K-ATPasa. Esta toxina convierte a la bomba en un canal iónico, por lo que produce un eflujo de K⁺ y un influjo de Na⁺, dando como resultado la despolarización de la membrana. La palitoxina afecta todas las células sobre las que se ha estudiado, por lo que se le han encontrado diversas actividades biológicas (Wu, 2009). Esta molécula ha cobrado cada vez más importancia debido a que su presencia en alimentos de origen marino constituye un problema de salud pública, ya que es responsable de numerosos casos de intoxicación y muerte en humanos (Tubaro y col., 2011). Algunos de los síntomas que presentan las

personas intoxicadas por el consumo accidental de la palitoxina son: mareo, náuseas, cansancio, sabor metálico, diarrea y vómito. Dos horas después de la ingestión se observan mialgia, respiración entrecortada, convulsiones, fallo renal, mioglobinuria, elevación de la creatinín fosfoquinasa sérica (Alcala y col., 1988; Noguchi y col., 1987; Onuma y col., 1999). Esta toxina se encuentra principalmente en corales blandos del género *Palythoa*. Además de los cnidarios, la palitoxina se ha encontrado en otras especies marinas, como en los dinoflagelados de forma libre pertenecientes al género *Ostreopsis*, en gusanos poliquetos, cangrejos y peces (Wu, 2009).

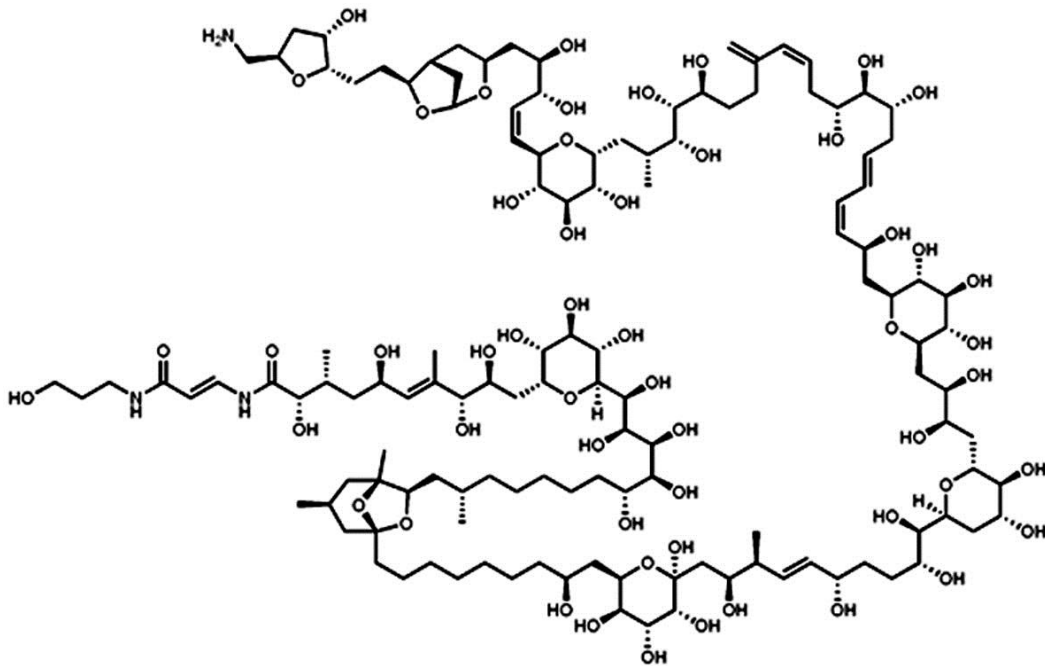


Figura 14. Estructura química de la palitoxina.

1.6 El género *Millepora*

Existen semejanzas biológicas importantes entre las especies del género *Millepora* (phylum Cnidaria, clase Hydrozoa) y los corales escleractinios. Ambos grupos presentan un tipo de alimentación heterotrófica, además de poseer nutrición autótrofa por su relación simbiótica con algas fotosintéticas del género

Symbiodinium. Adicionalmente, sus procesos de reproducción son similares, ya que pueden reproducirse asexual y sexualmente (Lewis, 2006).

Los hidrocorales del género *Millepora* son los segundos organismos formadores de arrecifes coralinos más abundantes de todo el mundo. Son comúnmente conocidos como “corales de fuego”, debido a su capacidad de provocar en los humanos lesiones dolorosas, al contacto con la piel, similares a quemaduras que incluyen escozor, eritema y formación de ampollas (Sagi y col., 1987; Bianchini y col., 1988).

Las especies de este género forman colonias de pólipos que producen esqueletos de carbonato de calcio. Actualmente se conocen 13 especies. Estos hidrocorales producen esqueletos morfológicamente complejos con diversas formas de crecimiento que varían de finas cúpulas de ramificación a robustas estructuras laminares, como se muestra en la Figura 15. Las características morfológicas de los organismos del género *Millepora* se ven directamente afectadas por el ambiente, de tal manera que las especies con formas sólidas son más comunes en zonas de arrecifes en donde existe movimiento turbulento del agua, mientras que las formas delgadas y ramificadas suelen habitar en aguas tranquilas (Davies y Montaggioni, 1985). Estos cambios morfológicos inducidos por el ambiente, son evidenciados en dos especies que son componentes regulares de los arrecifes coralinos del Caribe Mexicano: *Millepora alcicornis* y *Millepora complanata*, las cuales exhiben diferentes formas de crecimiento (Lewis, 2006). *M. alcicornis* presenta un patrón característico de crecimiento en ramas, que asemeja la cornamenta de un alce, mientras que *M. complanata* crece a manera de placas verticales.

Como se ha mencionado anteriormente, los corales saludables están compuestos de dos capas celulares, la epidermis y la gastrodermis, cubierta por una capa mucoide y conectadas a lo largo, por un esqueleto poroso de carbonato de calcio. Estas estructuras interactúan también con diversas formas de vida microbiana y el coral holobionte contiene formas representativas de los 3 dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya, así como también numerosos virus (Rosenberg y col., 2007).

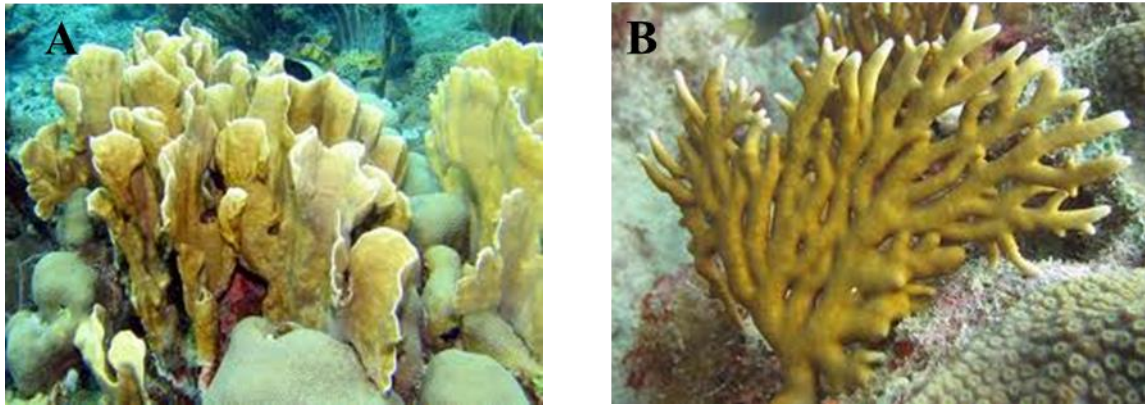


Figura 15. Ejemplos de especies saludables del género *Millepora*. A) *M. complanata* y B) *M. alcicornis*.

1.7 Simbiosis *Millepora*–*Symbiodinium*

En 1883 Karl Brandt reportó que algunos corales duros estaban asociados con algas microscópicas intracelulares, que subsecuentemente fueron identificadas como dinoflagelados (Rosenberg y col., 2007). Estas algas fueron cultivadas por primera vez en 1950, resultando de esto, el descubrimiento del nuevo género *Symbiodinium* (Taylor, 1974). Evidencias moleculares han demostrado que el género *Symbiodinium* es excepcionalmente diverso y contiene múltiples taxa (Pawlowski y col., 2001; Pochon y col., 2001; Baker, 2003; Baker, 2004). Al igual que muchos de los corales escleractinios, anémonas de mar y otros animales marinos bentónicos, los hidrocorales del género *Millepora* viven en simbiosis con algas fotosintéticas dinoflageladas del género *Symbiodinium*, conocidas comúnmente como zooxantelas (Banaszak y col., 2003). Se ha establecido que el momento en que inicia la simbiosis es en el estadio juvenil del pólipo, el cual puede adquirir a las algas del género *Symbiodinium* por aceptación o por transmisión horizontal. Cabe mencionar que esta simbiosis sólo se lleva a cabo en condiciones no estresantes de temperatura, luz, salinidad y pH adecuados; cualquier alteración de estas condiciones afecta la simbiosis de los dos organismos (Abrego y col., 2012).

La función más importante que llevan a cabo las zooxantelas, es que proveen a sus huéspedes de la mayor parte de la energía que requieren los cnidarios por la transferencia de la mayoría de su carbono fijado fotosintéticamente (Fallowski y col., 1984; Muscatine, 1990). Otras funciones de las algas, son la calcificación dependiente de la luz (Edmunds, 1999) y la producción de grandes cantidades de oxígeno molecular que permite una eficiente respiración por parte del hospedero. Además, la alta concentración de oxígeno (> 200% de saturación (Kühl y col., 1995)) resulta en la formación de radicales de oxígeno, los cuales proveen un sistema efectivo contra infecciones (Banin y col., 2003). Todos estos beneficios que les otorgan las zooxantelas a los cnidarios, los realizan a cambio de nitrógeno inorgánico, fósforo y carbono, además de un medio ambiente iluminado y un refugio contra la herbivoría (Rosenberg y col., 2007; Venn y col., 2008; Yellowless y col., 2008).

Las células de las zooxantelas presentan una coloración café dorada debido a la presencia de pigmentos fotosintéticos en sus cloroplastos: clorofila a y c, betacaroteno y diversos tipos de xantofilas. Dado que los corales e hidrocorales tienen la capacidad de almacenar millones de zooxantelas por centímetro cuadrado en sus tejidos, ellos también presentan una coloración semejante (Curtis y col., 2007).

1.8 Clasificación taxonómica de *Millepora alcicornis*

Las especies del género *Millepora* se encuentran clasificadas como hidrozoos polipoidales que habitan en colonias de hasta dos metros de diámetro. Poseen la capacidad de secretar un esqueleto calcáreo interno incrustante o vertical, cuyo tamaño suele ser considerable (Lewis, 2006). Dentro de este género se encuentran especies tales como *M. dichotoma*, *M. braziliensis*, *M. intricata*, *M. squarrosa*, *M. complanata* y *M. alcicornis*, entre otras (Schuchert, 2012). Las tres últimas especies cobran importancia para México, pues son las que se encuentran distribuidas a lo largo de los mares de Veracruz, Campeche y el Caribe; siendo *M. alcicornis*, la más

abundante de las tres (Beltrán y Carricat, 1999). La clasificación taxonómica de *M. alcicornis* es la siguiente:

Dominio: Eukarya
Reino: Animalia
Phylum: Cnidaria
Clase: Hydrozoa
Subclase: Hydroidolina
Orden: Anthoathecata
Suborden: Capitata
Familia: Milleporidae
Género: *Millepora*
Especie: *Millepora alcicornis*

(Schuchert, 2012)

1.9 Características morfológicas de las especies del género *Millepora*

Algunas características que justifican la clasificación de las especies del género *Millepora* dentro de la clase Hydrozoa, se enlistan a continuación.

- La superficie del esqueleto calcáreo de las especies de *Millepora* se encuentra perforada por múltiples poros microscópicos (0.1 a 0.3 mm de diámetro), de ahí la nomenclatura científica del género (*Millepora*, mil poros) (Daly y col., 2007).
- La morfología de los pólipos de las especies de *Millepora* está estrechamente relacionada con la de las hidras, en las que la cavidad gastrovascular no está dividida por septos internos. Los hidrocorales del género *Millepora* tienen un complejo nivel de organización de colonias formadas por zooides polimórficos, que incluyen: gastrozoides, dactylozooides y gonóforos. El primer grupo comprende pólipos cortos y robustos que llevan a cabo una función digestiva y poseen una cavidad bucal rodeada de cuatro a siete tentáculos cortos. Los dactylozooides, que desempeñan un papel defensivo, son pólipos largos y delgados que poseen tentáculos dispersos y carecen de cavidad oral. Por otro

lado, los gonóforos son pólipos reproductivos que surgen a partir de un sistema de canales internos de ramificación de una forma arborescente (Schuchert, 2009).

- Tanto los corales escleractinios, como los hidrocorales obtienen carbono a través de la alimentación heterótrofa a base de zooplancton. Sin embargo, las especies de *Millepora* tienen una tasa más lenta de digestión, tal vez debido al menor tamaño de sus pólipos (Lewis, 1992).
- Finalmente, dos tipos morfológicos de nematocistos se reconocen en los hidrocorales de este género: macrobásicos mastigóforos (Figura 16) y estenóteles (Figura 17). Los estenóteles se encuentran exclusivamente en la clase Hydrozoa (Chapman y Tilney, 1959; Östman, 2000) y los macrobásicos mastigóforos son un tipo de nematocistos característicos y únicos de los organismos del género *Millepora* (Weill, 1934; Schuchert, 2009).

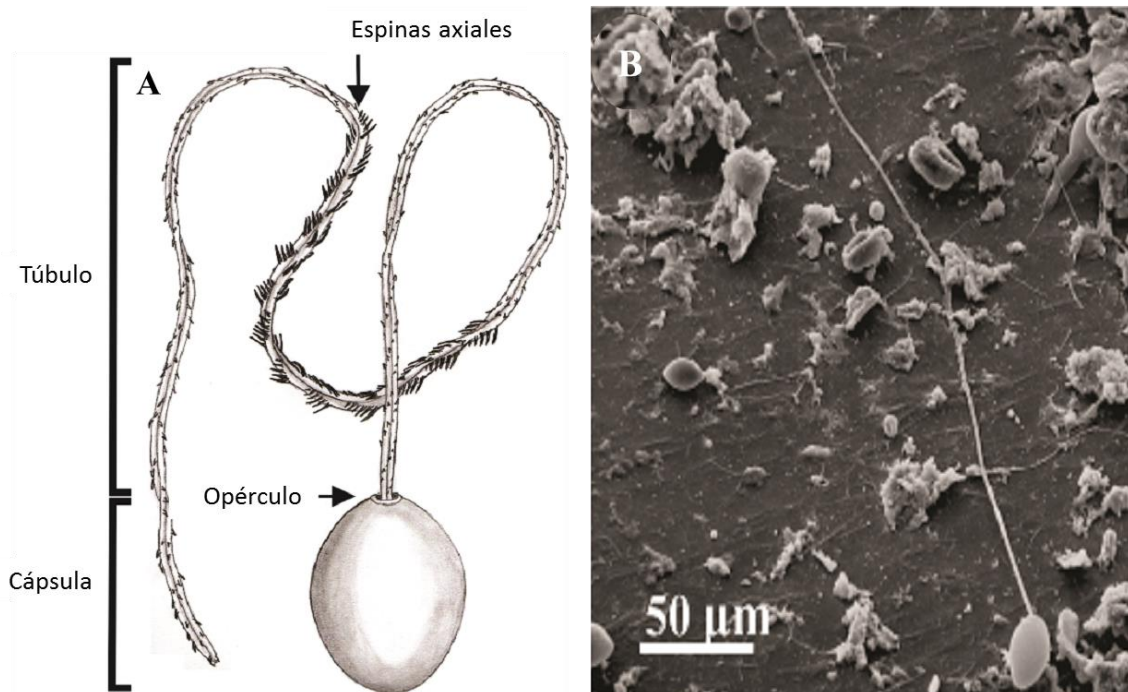


Figura 16. Nematocisto macrobásico mastigóforo. A) Diagrama y B) Microscopía electrónica de barrido del nematocisto descargado de *M. complanata*, que muestra la longitud del túbulo extendido (Rojas y col., 2012).

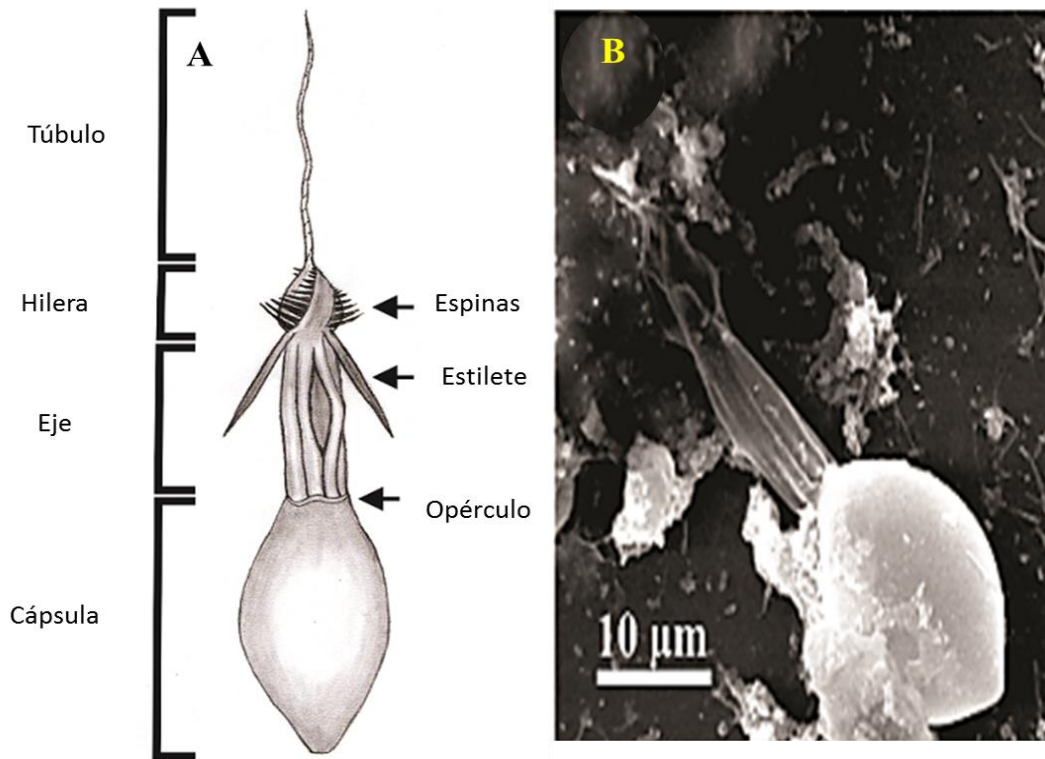


Figura 17. Nematocisto tipo estenóteles. A) Diagrama y B) Microscopía electrónica de barrido del nematocisto descargado de *M. complanata* (Rojas y col., 2012).

1.10 Efectos locales y sistémicos provocados por las toxinas de las especies del género *Millepora* en los seres humanos

Es un hecho bien documentado que los nematocistos de las especies del género *Millepora* pueden perforar la piel humana para inyectar sus toxinas y producir lesiones graves en la piel. Por esta razón, estos organismos se conocen comúnmente como "corales de fuego". Los síntomas locales habituales incluyen: dolor intenso, ardor, eritema, pápulas, vesículas pustulosas, hemorragias e incluso lesiones úlcero–necrotizantes (Bianchini y col., 1988; Sagi y col., 1987). Los síntomas sistémicos comprenden fiebre, náuseas, vómitos, dolor abdominal, dificultad respiratoria, falla renal, síndrome nefrítico y edema pulmonar (Bianchini y col., 1988; Moats, 1992; Prasad y col., 2006). En la actualidad, no existe un tratamiento adecuado para curar las lesiones graves de la piel humana causadas

por los "corales de fuego". Por lo general, cuando las lesiones son menores, éstas son tratadas con vinagre (para evitar la liberación del contenido de los nematocistos) y posteriormente con hielo, con lo que el dolor disminuye lentamente y la lesión local, que se mantiene durante un período de 1–2 semanas, se cura poco a poco (Coleman, 2008). Sin embargo, existen casos reportados de toxicidad sistémica provocada por especies de este género en humanos. Por ejemplo, se documentó un caso de neuropatía torácica asociada con el contacto con un "coral de fuego" (Moats, 1992). Asimismo, se han reportado casos de letalidad con hemólisis en ratones causados por *M. platyphylla* y *M. dichotoma* (Shiomi y col., 1989).

1.11 Estudios bioquímicos y toxicológicos realizados sobre especies del género *Millepora*

Los primeros estudios realizados sobre las toxinas sintetizadas por las especies del género *Millepora* datan de hace más de cuarenta años. En dichos estudios se encontró que los extractos crudos de *M. tenera* y *M. alcicornis* indujeron efectos hemolíticos y dermonecróticos y son muy tóxicos en ratones, cuando se administraron por vía intravenosa, causando disnea, convulsiones y muerte. Las dosis letales medias (DL₅₀) calculadas para los extractos de *M. alcicornis* y *M. tenera* fueron 550 y 330 mg proteína/kg de peso corporal, respectivamente (Middlebrook y col., 1971; Wittle y col., 1971; Wittle y col., 1974). Las actividades hemolíticas, dermonecróticas y letales de estos extractos se bloquearon completamente después de una incubación a 60 °C por 15 min, lo que sugirió que las toxinas responsables de los efectos tóxicos eran proteínas termolábiles. Posteriormente, el extracto de *M. alcicornis* fue sometido a sucesivas cromatografías en DEAE–celulosa y Sephadex G–100, lo cual permitió purificar parcialmente una proteína con un peso molecular aproximado de 100 kDa y una actividad tóxica 14 veces mayor que la del extracto original (Wittle y col., 1971). Por otra parte, el fraccionamiento cromatográfico en DEAE–celulosa del extracto de *M. tenera* permitió purificar parcialmente una fracción proteica 8 veces más activa que el extracto original (Middlebrook et al., 1971). Unos años más tarde, se reportó un

estudio en donde se encontró que las toxinas que se purificaron parcialmente a partir de los extractos de ambos hidrocorales también se encontraban presentes en sus nematocistos (Wittle y col., 1974). En otro estudio, se encontró que el extracto de *M. tenera* presentaba actividad hemolítica sobre eritrocitos de rata e inducía dermonecrosis en ratones y conejos inyectados con el extracto por vía intradérmica (Wittle y col., 1974).

En un estudio realizado sobre *M. dichotoma* y *M. platyphylla*, hidrocorales comunes en las costas del Mar Rojo, se encontró que los extractos de los nematocistos de estos organismos presentaron toxicidad en ratones al inyectarlos por vía intravenosa. Además, se encontró que ambos extractos presentaron actividad dermonecrótica y vasopermeable cuando se inyectaron en ratones, por vía subcutánea. También se encontró que los dos extractos presentaron actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos a concentraciones de 20 a 200 µg de proteína/ml. La actividad hemolítica de ambos extractos se inhibió parcialmente por la presencia de fostatidilcolina, fosfatidilserina o dihidrocolesterol, siendo más notable la actividad inhibitoria de este último (Radwan y Aboul-Dahab, 2004).

En un estudio reciente, se purificó una citotoxina de 18 kDa a partir de un extracto de nematocistos de *M. dichotoma*. Esta toxina, denominada MCTx-1, presentó toxicidad sobre células leucémicas de ratón L1210 ($CE_{50} = 79$ ng/ml), induce hemaglutinación en una suspensión de 0.8 % de eritrocitos de oveja (0.2 µg de proteína/ml) y fue letal al administrarse en cangrejos ($DL_{50} = 106$ µg/kg) (Iguchi y col., 2008).

Por otra parte, los primeros estudios realizados por Rojas y col. (2002) e Ibarra y col. (2007) sobre *M. complanata*, un hidrocoral que se encuentra comúnmente en los arrecifes del Caribe Mexicano, demostraron que el extracto acuoso de este cnidario produce una estimulación, dependiente de la concentración, en el tono del músculo liso arterial de rata y en las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo, además presenta actividad hemolítica y de PLA₂. A partir del fraccionamiento del extracto de *M. complanata*, mediante cromatografía en fase

reversa, se obtuvieron dos fracciones cromatográficas con efecto vasoconstrictor significativo. Una de estas fracciones con actividad vasoconstrictora contenía como componente mayoritario una proteína de aproximadamente 15 kDa, mientras que la otra fracción vasoconstrictora contenía una proteína de 17 kDa como componente mayoritario. Además, se obtuvo una fracción hemolítica, cuyo componente mayoritario era una proteína de 30 kDa. En este mismo estudio, se demostró que la vasoconstricción provocada por el extracto de *M. complanata* era causada por el aumento del influjo de Ca^{2+} extracelular y la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares (Ibarra y col., 2007). Más tarde, se evaluó el extracto de *M. complanata* incubado por 20 minutos en un baño de agua hirviendo, como era de esperarse para las toxinas proteináceas, tanto el efecto hemolítico como el de PLA_2 fueron abolidos, mientras que los efectos en arteria e íleon disminuyeron, pero no fueron completamente bloqueados, lo que indica que estos efectos no eran provocados exclusivamente por compuestos termolábiles, sino también por compuestos termoestables (García y col., 2011). En este mismo estudio se encontró que la administración intravenosa del extracto no desnaturalizado inducía violentas convulsiones y muerte en ratones en un minuto a una dosis de 4.62 μg de proteína/g de peso corporal. Dosis más pequeñas produjeron daño histológico en riñones y pulmones, atribuibles a la presencia de citolisinas. Los daños histológicos fueron completamente eliminados después de la incubación del extracto en condiciones desnaturalizantes. 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 en riñones y pulmones. Es probable que este tipo de citolisinas estén relacionadas con la toxicidad sistémica provocada por el envenenamiento con *Millepora spp.*, produciendo síntomas que incluyen síndrome nefrítico, falla renal aguda y edema pulmonar. Asimismo se puso en evidencia el hecho de que el veneno de *M. complanata* contiene otras toxinas termoestables no identificadas, posiblemente metabolitos secundarios que son los responsables de los efectos letales en ratones (Rojas y col., 2012).

1.12 Blanqueamiento de las especies del género *Millepora*

Las especies del género *Millepora* representan los segundos organismos formadores de arrecifes más importantes, después de los corales duros escleractinios de la clase Anthozoa, por lo que desempeñan un papel muy importante en la ecología marina (Lewis, 2006). Particularmente, las especies *M. complanata* y *M. alcicornis* se encuentran ampliamente distribuidas en arrecifes de coral del Caribe mexicano.

En las últimas décadas los arrecifes de coral han sufrido un grave deterioro debido a una serie de perturbaciones naturales y antropogénicas. Las especies de *Millepora* responden a estos eventos de una manera similar a los corales escleractinios (Banaszak y col., 2003). Una señal común de estas perturbaciones es el blanqueamiento, que puede ser definido como la pérdida de las zooxantelas simbiotas y sus pigmentos fotosintéticos, es decir, una disfunción en la simbiosis cnidario-*Symbiodinium* (Douglas, 2003). De este modo, durante el fenómeno del blanqueamiento se pierde la pigmentación normal de los tejidos de los corales e hidrocorales, resaltando el color blanco del exoesqueleto de carbonato de calcio (Figura 18) (Lesser, 2006).



Figura 18. Imágenes subacuáticas de especies de *Millepora* blanqueadas naturalmente en arrecifes de coral en el Caribe Mexicano. A) *M. complanata* y B) *M. alcicornis* (Rojas y col., 2012).

El blanqueamiento puede ser desencadenado por múltiples factores como son: 1) expulsión de las algas simbiotes del huésped, 2) pérdida de los pigmentos fotosintéticos de las algas o 3) daño directo al tejido del huésped. En gran medida, este fenómeno es el resultado del aumento de la temperatura en la superficie del mar, asociado con el calentamiento global, en combinación con la alta radiación solar. En cualquier caso, la pigmentación normal del tejido coralino se pierde, dejando expuesto el color blanquecino del esqueleto de carbonato de calcio (Banaszak y col., 2003). Los corales se desarrollan y viven a una temperatura determinada y estable y sólo son capaces de tolerar aumentos de temperatura a una razón de 0.2 a 1 °C por década. Con el incremento tan acelerado de la temperatura en los últimos años, se estima que se habrán perdido cerca de la mitad de los arrecifes de corales en los próximos 20 o 40 años (Donner y col., 2005; Bellantuono y col., 2012).

Se ha documentado ampliamente que el blanqueamiento es perjudicial para los arrecifes de coral y altera, de manera significativa, los procesos biológicos y ecológicos que mantienen las comunidades de arrecifes (Lesser, 2006). Desafortunadamente, este fenómeno ha afectado gravemente a las especies de *Millepora*. Se ha observado que la pérdida de sus zooxantelas simbiotes incluso puede conducir a la muerte de estas especies (Banaszak y col., 2003; Lewis, 2006), afectando el equilibrio ecológico del arrecife completo. En observaciones realizadas durante procesos de blanqueamiento, se ha encontrado que algunas especies del género *Millepora* pueden sobrevivir hasta 4 semanas en ausencia de sus zooxantelas simbiotes (Lewis 2006). Asimismo, se ha encontrado que los cnidarios que llegan a recuperarse tras un periodo de blanqueamiento, muestran un decremento en la velocidad de crecimiento y calcificación (Coles y Brown, 2003), además de que son más susceptibles a padecer enfermedades (Rosenberg y col., 2007).

Un fenómeno importante de blanqueamiento de hidrocorales fue observado por primera vez en 1982–1983 durante el fenómeno denominado “Oscilación del Sur–El Niño”, lo que provocó una alta mortalidad en las colonias de *M. platyphylla* de los

arrecifes de coral del Pacífico oriental (Weerdt y Glynn, 1991). Aparentemente, la recuperación de los hidrocorales es dependiente de la temperatura y la duración del evento de calentamiento del océano. En 1997, algunas colonias de *M. alcyon* ubicadas en la laguna del arrecife de Puerto Morelos (Caribe mexicano), que fueron blanqueados por un aumento de 1.5 °C en la temperatura promedio del agua de mar, se recuperaron completamente del blanqueamiento después de varias semanas. Sin embargo, las mismas colonias sufrieron un daño irreversible cuando la temperatura del agua de mar se elevó hasta 3 °C por encima de la media (Banaszak y col., 2003).

Algunos estudios realizados con dinoflagelados simbioses en cultivo (Iglesias y col., 1992) y en huéspedes (Warner y col., 1996) sugieren que la combinación de altas temperaturas y radiaciones produce fotoinhibición y daño en los cloroplastos y en el aparato fotosintético, mediante diferentes mecanismos que actúan en conjunto para desencadenar el proceso de blanqueamiento. Esto ocasiona un daño irreversible en la proteína D1 de las zooxantelas, lo cual sobrepasa los mecanismos normales de reparación celular. Otro mecanismo implicado es la disminución en la fijación de carbono (Jones y col., 1998). También se producen daños en los sistemas reductores, por lo que una alta producción de electrones, reduce el O₂ mediante la reacción de Mehler generando múltiples especies reactivas de oxígeno (ROS) en los simbioses.

Las ROS producen daños celulares importantes, tales como oxidación de las membranas, desnaturalización de proteínas y daño en ácidos nucleicos (Lesser, 2006), dañando las células y dando como resultado final el blanqueamiento. A la fecha, los mecanismos mediante los cuales los huéspedes eliminan a sus zooxantelas simbioses no se conocen completamente. Se han propuesto varias hipótesis que involucran mecanismos como degradación de los simbioses *in situ*, excitotoxicidad y apoptosis, entre otros (Weis, 2008).

Actualmente, la necesidad de encontrar las bases genéticas de la resistencia a los cambios al cambio climático, se ha hecho cada vez más importante. Existen

múltiples organismos capaces de llevar a cabo esta adaptación de mejor manera, uno de ellos es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que lleva a cabo una profusión de los agentes estresantes. Desafortunadamente, no sucede lo mismo con la mayoría de los corales formadores de arrecifes, que constituyen un grupo de especies excepcionalmente vulnerable al cambio climático (Hoe|gh–Guldberg, 1999); sin embargo, algunas especies de coral son capaces de resistir condiciones severas de blanqueamiento (Jokiel y Coles, 1990; Oliver y Palumbi, 2011). A nivel molecular, evidencias recientes sugieren que se lleva a cabo una regulación diferencial de la apoptosis, que puede ser esencial para la supervivencia post–blanqueamiento. Alternativamente, la termotolerancia mejorada en otros organismos marinos (por ejemplo, lapas intermareales, mejillones, pepinos de mar, y anfípodos) se ha relacionado con una mayor expresión constitutiva de proteínas de choque térmico (HSP) (Lesser et al, 2010; Bedulina y col., 2010; Dong y col., 2010; Dong y col., 2008). Un creciente número de estudios han demostrado que la respuesta básica al estrés por calor en los corales, implica una amplia serie de procesos celulares, similares a los de la levadura (Gasch y col., 2000). Estos incluyen la inducción de las moléculas chaperonas (por ejemplo, HSPs) y enzimas antioxidantes, así como interrupción de la homeostasis por Ca^{2+} , reorganización del citoesqueleto, y señalización de células alteradas y regulación de la transcripción. Como resultado, las diferencias en la resistencia fisiológica pueden ser causadas por la regulación de muchos procesos moleculares. De esta manera, la elucidación de los mecanismos por los cuales se recuperan estos corales será de suma importancia para ayudar a aquellos corales, que por medios naturales, no son capaces de sobrevivir (Barshis y col., 2013).

Aunado a esto, el interés por descubrir el impacto de la ausencia de zooxantelas en la síntesis de compuestos biológicamente activos sigue en incremento, pues además de lo que ya se sabe de la influencia del blanqueamiento en cuestión bioquímica o biológica, se pretende establecer las bases de esta simbiosis y su importancia para la síntesis de toxinas. Un estudio sobre las dos especies del género *Millepora* más abundantes en el Caribe Mexicano, realizado por García–

Arredondo y col., en 2011, revela que el blanqueamiento disminuye la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. alcicornis* y *M. complanata*, sin embargo, no lo elimina. Lo mismo sucede en la actividad de PLA₂ y efecto vasoconstrictor para el extracto de *M. complanata*, mas no para el de *M. alcicornis*. De esto, García–Arredondo y col., concluyen que son los hidrocorales, y no las microalgas simbiontes, las responsables de la síntesis de compuestos que presentan actividad farmacológica y toxicológica; sin embargo, no existen otros estudios complementarios que confirmen lo encontrado por nuestro grupo de investigación.

2. JUSTIFICACIÓN

Los estudios toxicológicos, farmacológicos y químicos realizados a la fecha sobre las especies del género *Millepora*, indican que estos hidrocorales representan una fuente potencial valiosa de nuevas moléculas bioactivas, ya que produce compuestos con diferentes efectos tóxicos y farmacológicos, entre los que se incluyen moléculas termoestables. Actualmente, se desconoce, en gran medida, la identidad de los compuestos responsables de estos efectos biológicos. Más aún, se desconoce la estructura primaria de las toxinas producidas por las especies del género *Millepora*, y sólo se tiene una idea con relación a su mecanismo de acción, ya que los estudios bioquímicos y farmacológicos realizados sobre estos hidrocorales solamente han permitido detectar la presencia de toxinas que inducen letalidad en ratones, citolisinas que producen daño en las membranas de eritrocitos, células renales y pulmonares y toxinas que modifican la conductividad iónica membranal del músculo liso intestinal y arterial. A pesar de la alta incidencia de lesiones tipo quemadura, causadas por especies del género *Millepora*, aún se desconoce el procedimiento adecuado para tratarlas. De manera adicional, algunos estudios han demostrado que las especies de *Millepora*, al igual que otros cnidarios formadores de arrecifes, son muy vulnerables frente al fenómeno de blanqueamiento originado por el calentamiento global de la Tierra. Existen evidencias que indican que la pérdida de algas fotosintéticas simbiotes produce varios efectos dañinos en el desarrollo y supervivencia de los hidrocorales. Sin embargo, a la fecha se desconoce el impacto que la ausencia de los simbiotes tiene sobre la producción de toxinas por parte de los cnidarios, ya que el conocimiento actual sobre la participación de la simbiosis en la síntesis de estas toxinas es muy limitado.

Con base en estos antecedentes resulta cierto que es de suma importancia continuar con el estudio bioquímico, farmacológico y toxicológico de *M. alcicornis* y analizar la influencia de las algas fotosintéticas simbiotes sobre la síntesis de toxinas. No sólo porque este organismo representa una fuente valiosa de compuestos bioactivos que pueden constituir prototipos estructurales de

compuestos útiles para el desarrollo de fármacos o de herramientas de investigación, sino también porque el conocimiento de la estructura primaria de sus toxinas y sus mecanismos de acción puede contribuir al diseño de terapias adecuadas para tratar las lesiones ocasionadas por los hidrocorales del género *Millepora*. Finalmente, los resultados derivados del estudio interdisciplinario de las especies del género *Millepora*, unos de los organismos más abundantes en los arrecifes coralinos del Caribe Mexicano, ayudarán a tener una mayor comprensión de sus mecanismos de defensa, predación, supervivencia y trascendencia ecológica y seguramente, estos resultados serán de utilidad para diseñar programas que faciliten su conservación.

3. HIPÓTESIS

La ausencia de algas fotosintéticas simbiotes del género *Symbiodinium* no afecta la síntesis de compuestos bioactivos en *Millepora alcicornis* (“coral de fuego”)

4. OBJETIVOS

4.1 General

- Determinar el efecto del blanqueamiento provocado por el incremento térmico sobre los efectos toxicológicos y farmacológicos inducidos por el extracto acuoso de *Millepora alcicornis* (“coral de fuego”).

4.2 Específicos

- Obtener especímenes de *M. alcicornis* e inducir su blanqueamiento de manera experimental.
- Obtener el extracto acuoso de los especímenes blanqueados y normales de *M. alcicornis* y determinar su concentración de proteína.
- Determinar el efecto proteolítico de los extractos acuosos de *M. alcicornis* blanqueada y normal.
- Evaluar la toxicidad sistémica del extracto acuoso de *M. alcicornis* blanqueada y compararla con la del extracto acuoso de *M. alcicornis* normal.
- Determinar el efecto hemolítico de los extractos acuosos de *M. alcicornis* blanqueada y normal.
- Determinar el efecto de los extractos acuosos de *M. alcicornis* normal y blanqueada sobre la contractilidad del íleon aislado de cobayo.
- Determinar el perfil electroforético de los extractos acuosos de *M. alcicornis* en condiciones normales y de blanqueamiento y de esta manera, seleccionar de las proteínas características de cada extracto.
- Obtener la secuencia parcial de las proteínas seleccionadas mediante un análisis de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.
- Comparar las secuencias obtenidas experimentalmente con las secuencias contenidas en la base de datos del NCBI usando el algoritmo Blastp.

5. METODOLOGÍA

5.1 Materiales y Métodos

5.1.1. Recolección y transporte de los especímenes de *M. alcicornis*

5.1.1.1 Especímenes de *M. alcicornis* normal

Se recolectaron fragmentos del hidrocoral mediante inmersiones de buceo a profundidades de 4 a 10 m en arrecifes de coral situados en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos. Los trabajos de recolección se llevaron a cabo por técnicos especializados de la Estación Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM. Una vez recolectado, el material se congeló, se almacenó en hielo seco y se transportó al Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.1.1.2 Inducción del blanqueamiento de los especímenes del hidrocoral

Las muestras se colectaron con cincel y martillo en la zona conocida como “La Bocana Chica” del Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos en mayo de 2013. Después de recolectarse, los fragmentos se transportaron a un acuario con flujo de agua de mar y en la misma noche se anclarán individualmente a una base de acrílico con plastilina. Después de esto, los fragmentos se separaron en dos grupos, control y experimental, y se colocarán en dos estanques de 80 L montados al aire libre con un flujo de agua de mar a temperatura ambiente (27 °C). Los fragmentos se dejaron acondicionados en los estanques durante una semana.

Después del periodo de acondicionamiento, la temperatura del estanque con el grupo experimental se elevó a una temperatura de 31 °C durante 9 días y posteriormente se elevó a 33 °C durante 4 días más para inducir el blanqueamiento de los fragmentos. Por otro lado, el estanque con los grupos control se mantuvo a una temperatura de 27 °C durante el tiempo que tardaron en blanquearse los fragmentos del grupo experimental. Una vez que se observó el blanqueamiento del

grupo experimental, los fragmentos de ambos grupos se desmontaron de sus bases y se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se prepararon los extractos acuosos a partir de los fragmentos de ambos grupos.

5.1.2 Preparación de los extractos acuosos de especímenes normales y blanqueados de *M. alcicornis*

La descarga de los nematocistos del hidrocoral se indujo mediante agitación de los fragmentos en agua desionizada (pH 7) durante 18 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El extracto resultante, se liofilizó y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se preparó una solución de extracto de 60 mg de extracto/mL y se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976). Cada vez que se requirió extracto para los diferentes estudios, los liofilizados se prepararon de la siguiente manera: cada liofilizado se agitó en agua desionizada, a la concentración deseada para cada ensayo (mg proteína/ml) y antes de los mismos se homogeneizó el extracto con ayuda de vórtex.

5.1.3 Bioensayos

5.1.3.1 Determinación de la actividad proteolítica de los extractos acuosos de *M. alcicornis* normal y blanqueada.

Con la finalidad de observar si los extractos de *M. alcicornis* presentan enzimas con actividad de proteasa se determinaron su actividad caseinolítica de acuerdo al método de Murata y col. (1963) de la siguiente manera: 0.4 ml de solución de caseína (2% en 0.2 M de amortiguador Tris-HCl a un pH de 7.5) se incubaron con diferentes concentraciones del extracto (10–100 μg) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. La reacción se detuvo agregando 1.5 ml de ácido tricloroacético 0.44 M dejando así en reposo por 30 min. La mezcla se centrifugó a 1500 x g durante 15 min. Una alícuota de 1 ml del sobrenadante se mezcló con 2.5 ml de carbonato de sodio 0.4 M y 0.5 ml de reactivo de Folin diluido 1:2. El desarrollo de color se registró a 660 nm, una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida

para incrementar la absorbancia en 0.01 a 660 nm/h a 37 °C. La actividad caseinolítica se expresó en unidades por min por mg de proteína.

5.1.3.2 Evaluación de la toxicidad sistémica aguda inducida por los extractos acuosos del hidrocoral normal y blanqueado y determinación de la dosis letal media (DL50).

Se evaluó la actividad letal del extracto de *M. alcicornis* normal en ratones mediante inyección en la vena caudal a diferentes dosis de proteína (0, 3, 6, 12, 17, 24 y 48 µg de proteína/g de peso corporal) y de *M. alcicornis* blanqueada a las dosis de proteína: 0, 6, 17 y 48 µg de proteína/g de peso corporal. Cada dosis de proteína se disolvió en 200 µl de solución salina fisiológica esterilizada (NaCl al 0.9%). Las muertes que ocurrieron durante las primeras 24 horas después de la administración del extracto fueron registradas para calcular la dosis letal media (DL₅₀) utilizando el método de Lorke (1983). Los ratones sobrevivientes, incluyendo a los controles a los que se les administró solamente la solución salina, se observaron por un periodo de 24 horas antes de ser sacrificados por dislocación cervical.

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

5.1.3.3 Determinación de la actividad hemolítica de los extractos acuosos de *M. alcicornis* normal y blanqueada.

El monitoreo de la actividad hemolítica se realizó de acuerdo con el método empleado por Torres y col. (2001), que brevemente se describe a continuación: se utilizaron eritrocitos de ratas machos (275–325 g) lavados en una solución de Alsever (pH 7.4; 120 mM D–glucosa, 30 mM citrato de sodio, 7 mM NaCl y 2 mM ácido cítrico). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 50 µl de una suspensión de eritrocitos al 1 % en solución amortiguadora de Alsever más los extractos a evaluar disueltos en 50 µl de la misma solución, cada uno por separado. Los tubos se llevarán a un volumen de 1 ml con solución de Alsever. Las muestras así preparadas se incubaron durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó a 2,500 rpm (1,430 x g) durante 4 min a 4 °C y el resultado de la hemólisis se evaluó mediante la liberación de hemoglobina haciendo lecturas en un espectrofotómetro (Lambda Bio, Perkin Elmer Co.) a una longitud de onda (λ) de 415 nm. El efecto hemolítico se expresó como el porcentaje de hemoglobina liberada comparado con la hemoglobina presente en la hemólisis total producida por la suspensión de las muestras de eritrocitos en agua desionizada, en lugar de la solución de Alsever. Una unidad hemolítica media (UH50) se define como la cantidad de proteína requerida para producir un 50% de hemólisis.

5.1.3.4 Determinación del efecto de los extractos de *M. alcicornis* sobre la contractilidad del íleon aislado de cobayo

Para determinar el efecto de los extractos sobre la musculatura lisa intestinal y/o el Sistema Nervioso Entérico se empleó el ensayo de íleon aislado de cobayo. Se emplearon cobayos machos de la cepa Harley, con un peso comprendido entre 500 y 800 g. Los cobayos se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se realizó una incisión abdominal para extraer el íleon, el cual se colocó en un recipiente con solución de Krebs–Henseleit a 37 °C, gasificada constantemente con 95% de O₂ y 5% de CO₂. El íleon se cortó en fracciones de 5 cm aproximadamente. Cada

porción se lavó haciendo pasar por su interior un poco de la solución de Krebs–Henseleit con la ayuda de una jeringa con aguja sin punta. Después, se cortaron segmentos de 1 cm aproximadamente y éstos se montaron en celdas que contenían solución de Krebs–Henseleit gasificada constantemente. Las contracciones espontáneas de los tejidos se registraron por medio de transductores de fuerza acoplados a un polígrafo Grass de 4 canales. Todos los tejidos montados se ajustaron a una tensión basal de 1 g, después de un tiempo de estabilización de 30 min. Se registró un periodo control de 10 minutos y se aplicaron los extractos de prueba. El efecto excitatorio se expresó como el % de la contracción inducida por acetilcolina a una concentración 1 μ M (Samuelsson, 1991 y Rojas y col., 2002).

5.1.4 Electroforesis en gel

Se realizó un análisis electroforético en geles de poliacrilamida–dodecilsulfato de sodio (SDS–PAGE), utilizando geles de poliacrilamida al 16%, los cuales se corrieron a 90 Volts durante 30 minutos y posteriormente a 120 Volts durante dos horas. Las bandas de proteína se visualizaron mediante las técnicas de tinción de Coomassie y tinción de plata. Para la determinación de los pesos moleculares relativos de las proteínas presentes en las muestras se utilizaron estándares preteñidos de amplio espectro (Bio–Rad) para obtener una aproximación de los pesos moleculares relativos de las principales bandas observadas en el gel. Para este análisis se utilizaron 35 μ g de proteína por muestra.

5.1.5 Secuenciación parcial de las proteínas seleccionadas, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

Las proteínas seleccionadas fueron extraídas del gel, se almacenaron en agua inyectable y se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, México.

Para la secuenciación parcial, las muestras fueron previamente reducidas con ditiotreitól (DTT), alquiladas con yodoacetamida y digerida “in gel” con tripsina. Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS constituido de un

cromatógrafo de líquidos de micro-flujo Accela (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) con “splitter” (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizado con una solución (Calmix) de 10 moléculas calibrantes, que permite determinaciones con exactitudes mejores que 5 ppm (partes/millón). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-100% de solvente B (acetonitrilo/ácido acético 0.1%) en 120 minutos sobre una columna capilar PicoFrit Proteopep 2 C18 75 μm ID \times 50 mm (New Objective Inc., Woburn, MA). El flujo del sistema LC fue de 400 nanolitros/minuto. Para la fragmentación de los péptidos se utilizaron los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 2^+ y 3^+ fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. No se consideraron los iones con cargas 1^+ , superiores a 4^+ y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizadas de forma dependiente del escaneo total de iones/segundo. Las cargas fueron pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), una energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, una activación Q de 0.250, un tiempo de activación de 40 milisegundos y un tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos se utilizó la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 15 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 60 segundos.

5.1.6 Análisis de las secuencias obtenidas

Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBI nr a través de los programas ProteinProspector y Mascot. Las secuencias se alinearon con CLUSTALW2 en línea (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

5.1.7 Análisis estadísticos

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

6. RESULTADOS

6.1 Determinación de la actividad proteolítica de los extractos acuosos de *M. alcornis* normal y blanqueada.

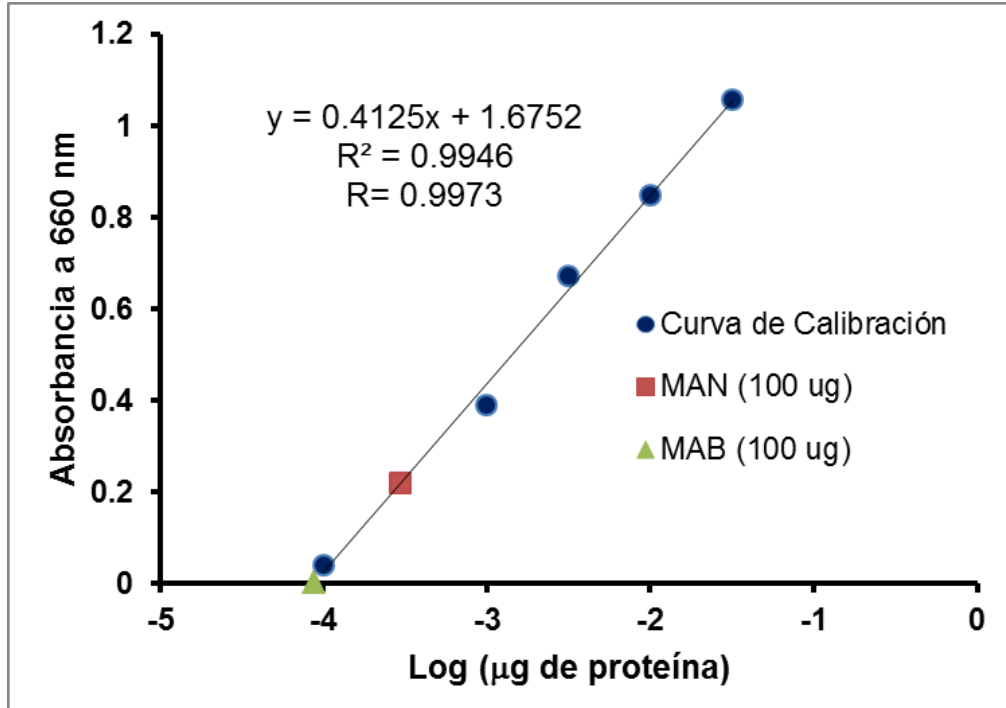


Figura 19. Curva de calibración para la actividad proteolítica.
MAN: *M. alcornis* normal y MAB: *M. alcornis* blanqueada

Dado que una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima requerida para aumentar la absorbancia de 0.01 a 660 nm/h a 37 °C, tenemos que:

400 μL de caseína al 2%w/w contienen 0.008 g de caseína. Un mol de caseína pesa 22 740 g, por lo que 0.008 g son 0.352 μmol .

Al obtener una absorbancia de 1.000, tenemos 100 U; de esta manera, 100 U hidrolizan 0.352 μmol de caseína. El extracto de *M. alcornis* normal obtuvo una absorbancia promedio de 0.22, lo que equivale a 22 U, así:

$$22 U \left(\frac{0.352 \mu\text{mol de caseína hidrolizada}}{100 U} \right) = 7.7744 \times 10^{-2} \mu\text{mol de caseína hidrolizada}$$

Debido a que se utilizaron 100 μg (0.1 mg) de proteína del extracto y el experimento duró 2 horas, la actividad proteolítica del extracto de *M. alcornis* normal se obtiene de la siguiente manera:

$$\text{Actividad Proteolítica} = \frac{7.774 \times 10^{-2} \mu\text{mol caseína}}{\left(\frac{0.1 \text{ mg de proteína del extracto}}{120 \text{ minutos}} \right)}$$

$$\text{Actividad Proteolítica} = 92.928 \mu\text{mol/mg min}$$

Para el extracto de *M. alcornis* blanqueada:

$$\text{Actividad Proteolítica} = \frac{0.2 U \left(\frac{0.352 \mu\text{mol de caseína hidrolizada}}{100 U} \right)}{\left(\frac{0.1 \text{ mg de proteína del extracto}}{120 \text{ minutos}} \right)}$$

$$\text{Actividad Proteolítica} = 0.8448 \mu\text{mol/mg min}$$

Para la proteasa de *Streptomyces griseus*:

$$\text{Actividad Proteolítica} = \frac{85 U \left(\frac{0.352 \mu\text{mol de caseína hidrolizada}}{100 U} \right)}{\left(\frac{0.01 \text{ mg de proteína del extracto}}{120 \text{ minutos}} \right)}$$

$$\text{Actividad Proteolítica} = 3590.4 \mu\text{mol/mg min}$$

6.2 Evaluación de la toxicidad sistémica aguda inducida por los extractos acuosos del hidrocoral normal y blanqueado y determinación de la dosis letal media (DL₅₀).

Cuadro 1. Toxicidad sistémica aguda inducida por la administración intravenosa del extracto acuoso de *Millepora alcicornis* normal.

Dosis (μ g proteína / g peso)	Tiempo de vida después de la administración	Observaciones / Clave / Análisis Histopatológico
0	24 h	Muerte por dislocación.
0	24 h	Muerte por dislocación. R37N -Pulmones: Congestión vascular sin edema. -Hígado: Normal. -Riñones: Normales.
0	24 h	Muerte por dislocación. R41N -Pulmones: Congestión vascular sin edema. -Hígado: Normal. -Riñones: Normales.
3	24 h	Muerte por dislocación. R38N -Pulmones: Congestión vascular sin edema. -Hígado: Normal. -Riñones: Normales.
3	24 h	Muerte por dislocación. R47N -Pulmones: Normales. -Hígado: Normal con congestión vascular. -Riñones: Normales.
3	24 h	Muerte por dislocación.

6	7 s	Convulsiones y disnea.
6	50 min	<p>A los 20 minutos aletargamiento, a los 35 minutos presentó vasodilatación de las orejas, rubefacción evidente en ojos, piel, patas y orejas.</p> <p>Muerte a los 50 minutos, hematuria y vasodilatación de órganos internos.</p> <p>R30N</p> <ul style="list-style-type: none"> -Pulmones: Congestión con edema. -Hígado: Congestión vascular leve. -Riñón: Glomérulo con espacio de Bowman con proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina.
6	24 h	<p>Sin reacción a la administración del extracto.</p> <p>Comportamiento similar a los ratones control (0 µg proteína / g peso).</p> <p>Muerte por dislocación.</p> <p>R32N</p> <ul style="list-style-type: none"> -Pulmones: Normales con congestión y edema incipiente no generalizado. -Hígado: Normal. -Riñones: Normales.
12	24 h	<p>Sin reacción a la administración del extracto.</p> <p>Muerte por dislocación.</p> <p>R92N</p> <ul style="list-style-type: none"> -Pulmones: Congestión vascular moderada con edema no generalizado. -Hígado: Normal con congestión vascular. -Riñones: Fuga de proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina al espacio de Bowman.

12	3 h 15 min	<p>Aletargamiento.</p> <p>R33N</p> <p>-Pulmones: Congestión vascular sin edema.</p> <p>-Hígado: Congestión importante no inflamatoria.</p> <p>-Riñones: Fuga de proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina al espacio de Bowman.</p>
12	24 h	<p>Aletargamiento y somnolencia.</p> <p>Muerte lenta y silenciosa. Lágrimas con sangre.</p> <p>R3N</p> <p>-Pulmones: Normales.</p> <p>-Hígado: Hepatocitos apoptóticos y necróticos con respuesta inflamatoria y presencia de leucocitos alrededor de los hepatocitos (lesión tóxica).</p> <p>-Riñones: Necrosis tubular aguda (falla renal aguda).</p>
17	17 h 23 min	<p>Convulsiones a los 3 segundos después de la administración.</p> <p>10 segundos antes de la muerte presentó convulsiones violentas que lo hacían saltar de un lado al otro de la jaula, exoftalmos, cianosis en cola, disnea, espasmos y hematuria.</p> <p>R43N</p> <p>-Pulmones: Edema alveolar de moderado a severo.</p> <p>-Hígado: Normal con congestión vascular.</p> <p>-Riñones: Fuga de proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina al espacio de Bowman.</p>
17	5 s	
17	1 h 50 min	

24	24 h	<p>Muerte por dislocación.</p> <p>R17N</p> <p>-Pulmones: Congestión vascular sin edema.</p> <p>-Hígado: Normal con congestión vascular.</p> <p>-Riñones: Normal con congestión vascular.</p>
24	13 h 15 min	<p>Aletargamiento, muerte lenta.</p> <p>R34N</p> <p>-Pulmones: Congestión vascular importante sin edema.</p> <p>-Hígado: Respuesta inflamatoria con migración de leucocitos al lobulillo hepático.</p> <p>-Riñones: Fuga de proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina al espacio de Bowman. Necrosis tubular aguda, secundaria al efecto tóxico.</p>
24	17 min	<p>Aletargamiento, petequias en las orejas, inyección sanguínea en ojos, 10 segundos antes de morir presentó espasmos en un inicio moderados y después violentos.</p> <p>R35N</p> <p>-Pulmones: Congestión vascular sin edema, sobreexpansión de los espacios alveolares.</p> <p>-Hígado: Congestión vascular.</p> <p>-Riñones: Normales</p>
48	3 s	<p>Disnea y espasmos moderados.</p> <p>R42N</p> <p>-Pulmones: Congestión vascular importante. Fuga de líquidos a alveolos (edema inicial).</p> <p>-Hígado: Congestión vascular importante.</p> <p>-Riñones: Fuga de proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina al espacio de Bowman.</p>

48	3 s	Disnea y espasmos moderados. R56N -Pulmones: Congestión vascular importante. Fuga de líquidos a alveolos (edema inicial). -Hígado: Congestión vascular importante. -Riñones: Fuga de proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina al espacio de Bowman.
48	3 s	Disnea y espasmos moderados.

Ecuación de Lorke para determinar la DL_{50} para el extracto de *M. alcornis* normal

$$DL_{50} = \sqrt[2]{(A * B)}$$

Donde:

A = Dosis a la que muere el 0 % de los individuos

B = Dosis a la que muere el 100 % de los individuos

Por lo que,

$$DL_{50} = \sqrt[2]{(3 \mu g \text{ de proteína / g de peso})(48 \mu g \text{ de proteína / g de peso})}$$

$$DL_{50} = \sqrt[2]{(144 (\mu g \text{ de proteína / g de peso})^2)}$$

$$DL_{50} = 12 \mu g \text{ de proteína / g de peso}$$

Cuadro 2. Toxicidad sistémica aguda inducida por el extracto acuoso de *Millepora alcicornis* blanqueada.

Dosis (μg proteína / g peso)	Tiempo de vida después de la administración	Observaciones / Clave / Análisis Histopatológico
0	24 h	Muerte por dislocación.
0	24 h	Muerte por dislocación. R10B -Pulmones: Congestión vascular sin edema. -Hígado: Normal. -Riñones: Normal.
0	24 h	Muerte por dislocación. R11B -Pulmones: Congestión vascular sin edema. -Hígado: Normal. -Riñones: Normal.
6	2 h 4 min	Exoftalmos, espasmos moderados. R6B -Pulmones: Congestión vascular sin edema. -Hígado: Respuesta inflamatoria con leucocitos alrededor de las venas centrales. Distensión vascular y sinusoidal sin necrosis. -Riñones: Túbulos normales. Lesión en la unidad de filtración: fuga de proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina al espacio de Bowman.
6	24 h	Muerte por dislocación.

6	2 h 40 min	<p>Hematuria y cianosis en cola.</p> <p>R8B</p> <p>-Pulmones: Congestión vascular sin edema.</p> <p>-Hígado: Congestión de venas centrales y respuesta inflamatoria aguda.</p> <p>-Riñones: Fuga de proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina al espacio de Bowman, lesión glomerular. Cilindros proteínas y eritrocitos.</p>
17	1 h 20 min	<p>Aletargamiento, hematuria y cianosis en cola.</p> <p>R4B</p> <p>-Pulmones: Congestión vascular sin edema.</p> <p>-Hígado: Normal.</p> <p>-Riñones: Normal.</p>
17	24 h	<p>Muerte por dislocación.</p> <p>R5B</p> <p>-Pulmones: Congestión sin edema.</p> <p>-Hígado: Normal.</p> <p>-Riñones: Normales.</p>
17	24 h	Muerte por dislocación.
48	24 h	Muerte por dislocación.
48	5 s	<p>Disnea, convulsiones, exoftalmos.</p> <p>R2B</p> <p>-Pulmones: Congestión vascular con edema no generalizado.</p> <p>-Hígado: Distensión sinusoidal y congestión vascular.</p> <p>-Riñones: Fuga de proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina al espacio de Bowman, lesión glomerular y tubular.</p>

48	24 h	Muerte por dislocación.
		<p>R3B</p> <p>-Pulmones: Congestión vascular sin edema.</p> <p>-Hígado: Distensión sinusoidal y congestión vascular.</p> <p>-Riñones: Fuga de proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina al espacio de Bowman, lesión glomerular y tubular.</p>

Debido a que a la dosis más alta ensayada no murió el 100% de los ratones de estudio, la dosis letal media (DL₅₀) se estima mayor a 48 µg de proteína / g de peso.

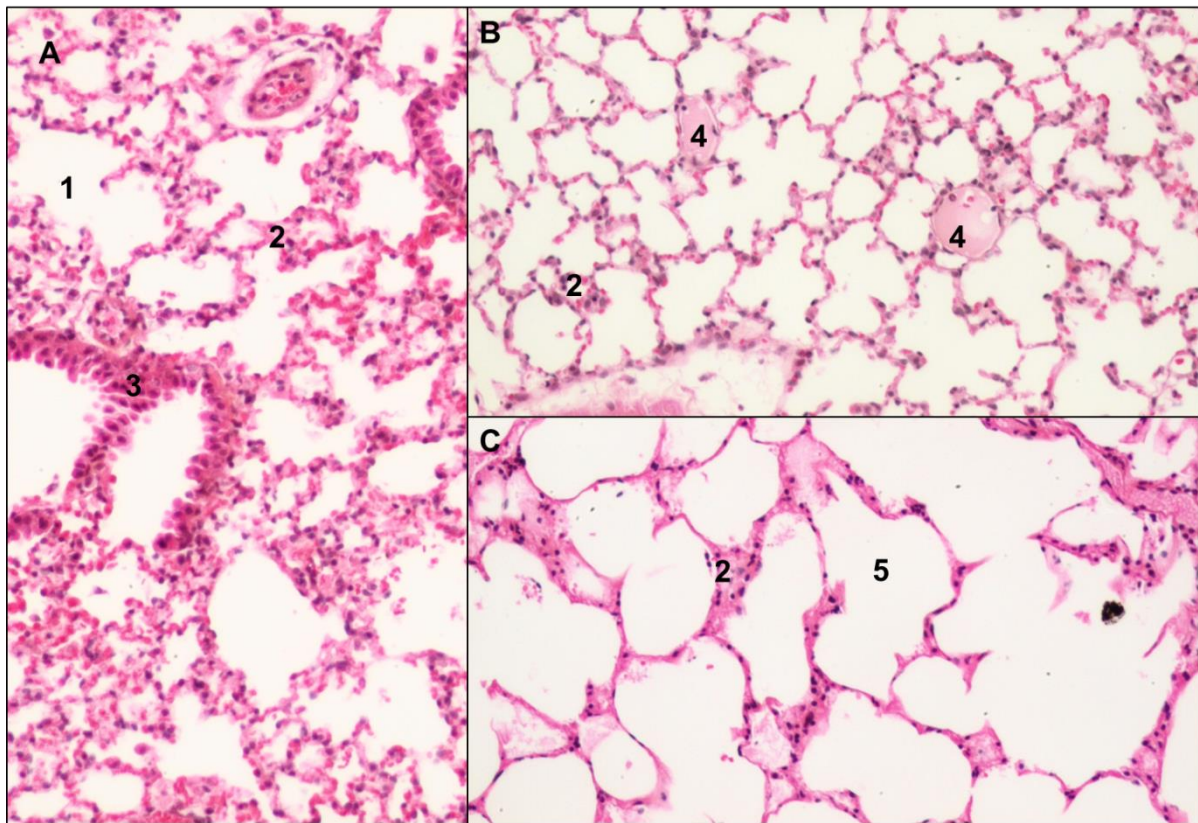


Figura 20. Fotografías de tejido pulmonar. A) Normal (R47N), B) y C) Patológicos (R2B y R35N, respectivamente). 1) Espacio alveolar normal, 2) Alvéolos, 3) Bronquios, 4) Edema pulmonar no generalizado y 5) Espacio alveolar sobreexpandido.

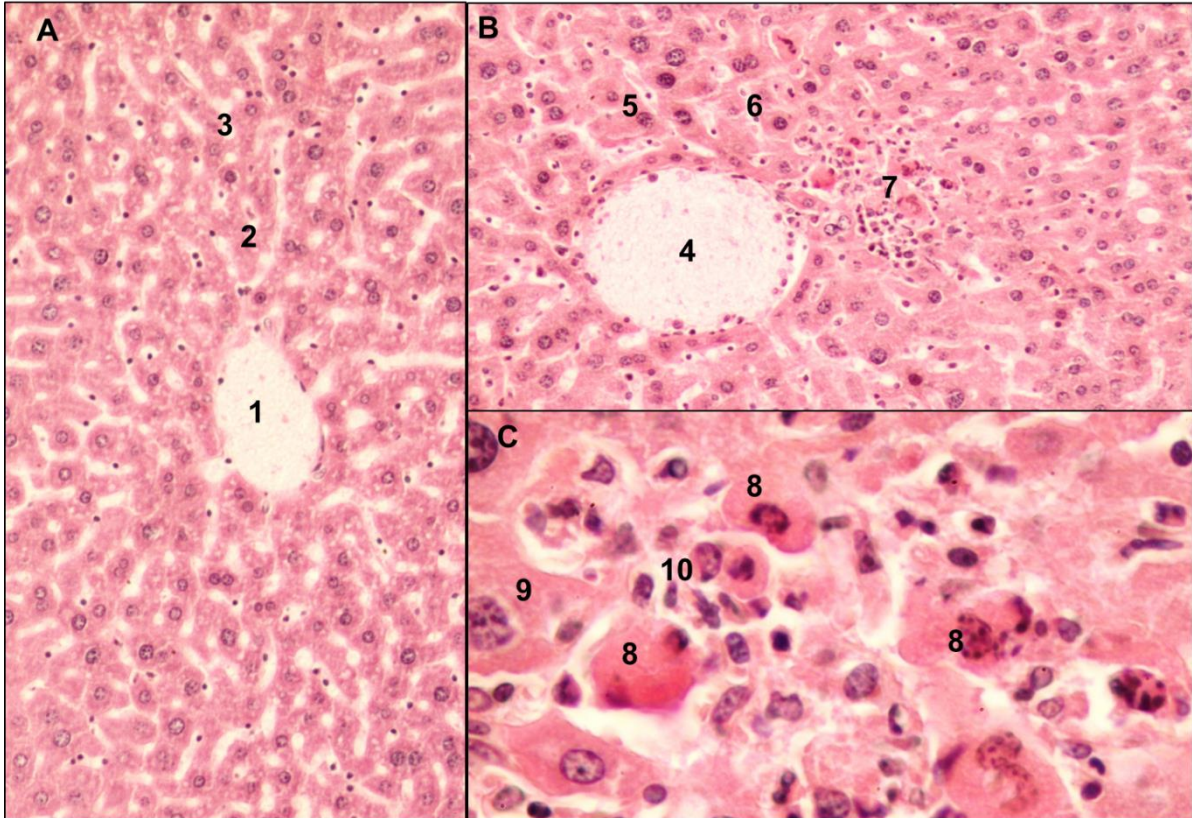


Figura 21. Fotografías de tejido hepático. A) Normal (R10B), B) Patológico (R3N) y C) Reacción inflamatoria aguda (R3N). 1) Vena central normal, 2) Hepatocitos normales, 3) Espacios sinusoides normales, 4) Vena central congestionada, 5) Lesión hepática, 6) Distensión sinusoidal, 7) Respuesta inflamatoria aguda, 8) Hepatocitos necróticos, 9) Hepatocitos apoptóticos y 10) Respuesta inmune a lesión tóxica responsable de la inflamación.

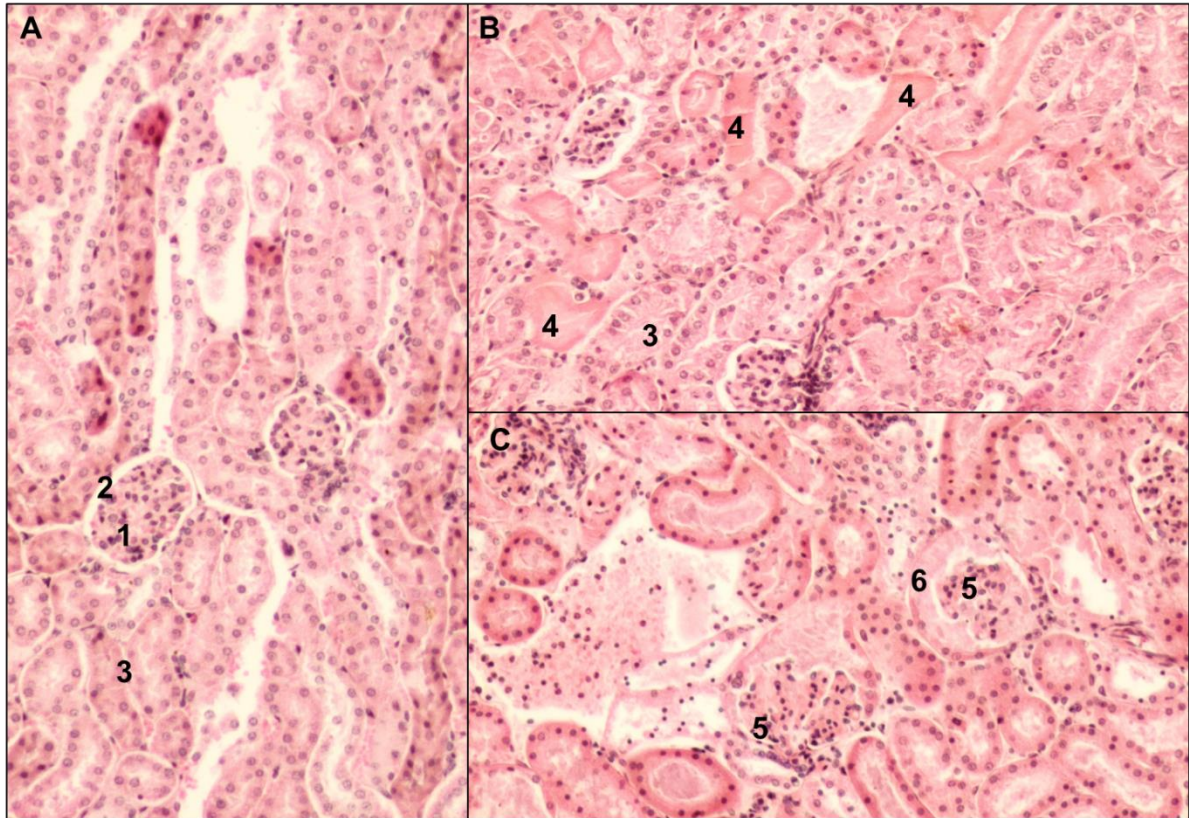


Figura 22. Fotografías de tejido renal. A) Normal (R47N), B) y C) Patológicos (R3N y R8B, respectivamente) 1) Glomérulo normal, 2) Espacio de Bowman normal, 3) Túbulo renales normales, 4) Túbulo renales necróticos, 5) Lesión glomerular y 6) Fuga de proteínas, eritrocitos y/o hemoglobina al espacio de Bowman.

6.3 Determinación de la actividad hemolítica de los extractos acuosos de *M. alcornis* normal y blanqueada.

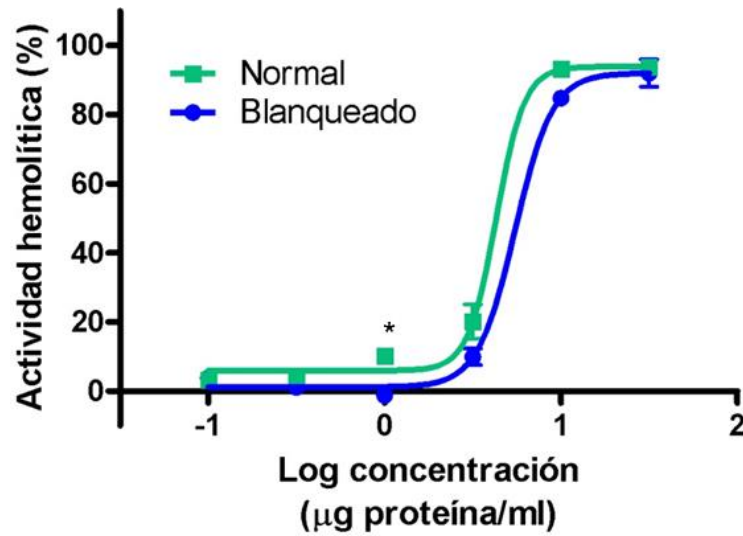


Figura 23. Curva sigmoide de Boltzmann para la actividad hemolítica.

* Significativamente diferentes, $p < 0.05$

6.4 Determinación del efecto de los extractos de *M. alcornis* sobre la contractilidad del íleon aislado de cobayo

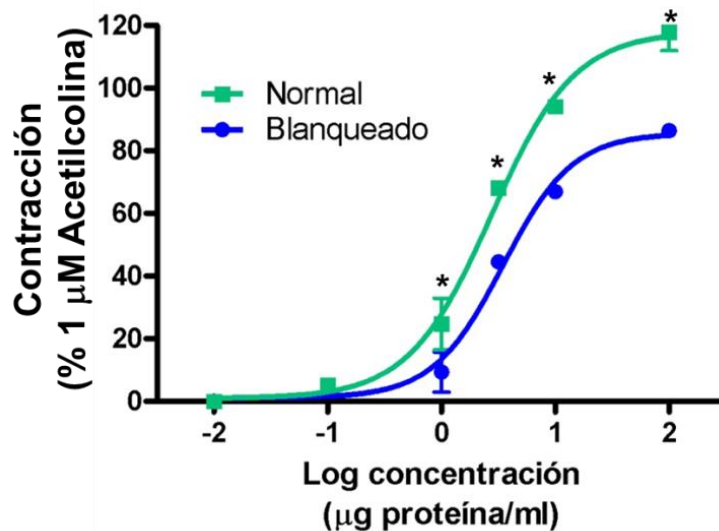


Figura 24. Curva sigmoide de Boltzmann para el porcentaje de contracción en íleon aislado de cobayo. * Significativamente diferentes, $p < 0.05$.

6.5 Electroforesis en gel

6.5.1 Tinción de Plata

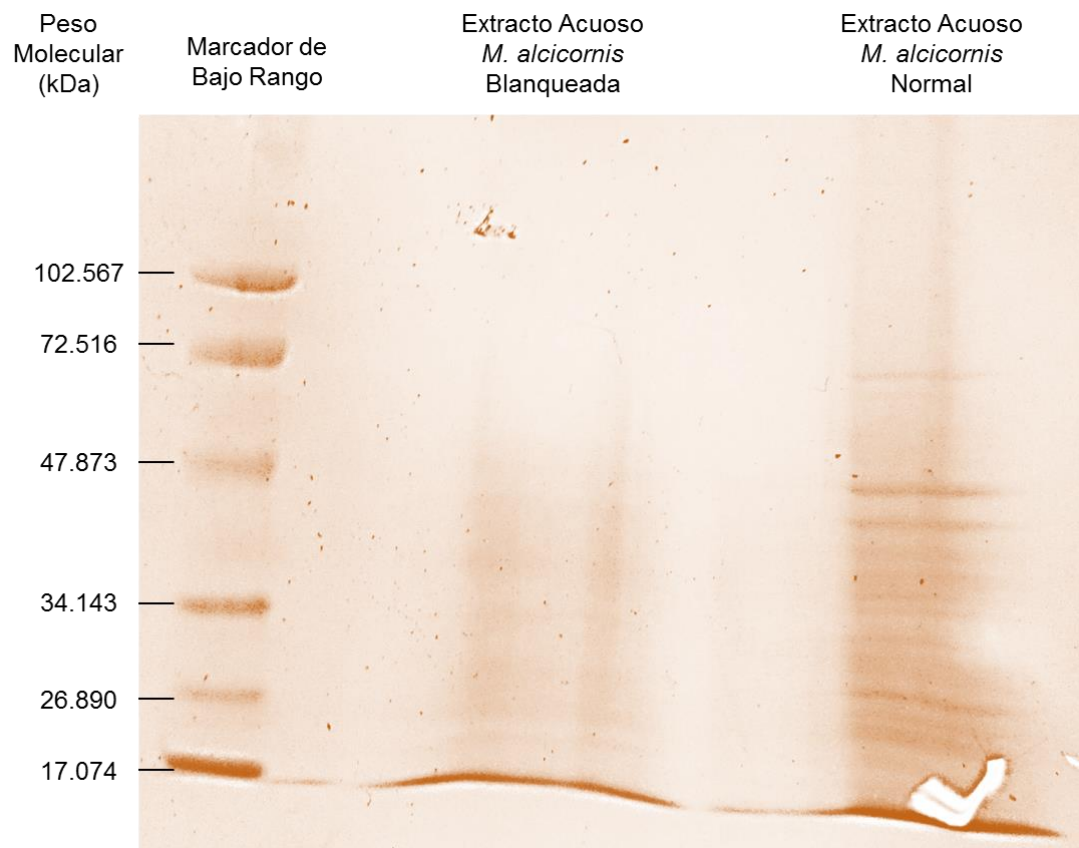


Figura 25. Gel de electroforesis SDS-PAGE teñido con plata.

6.5.2 Tinción de Coomassie

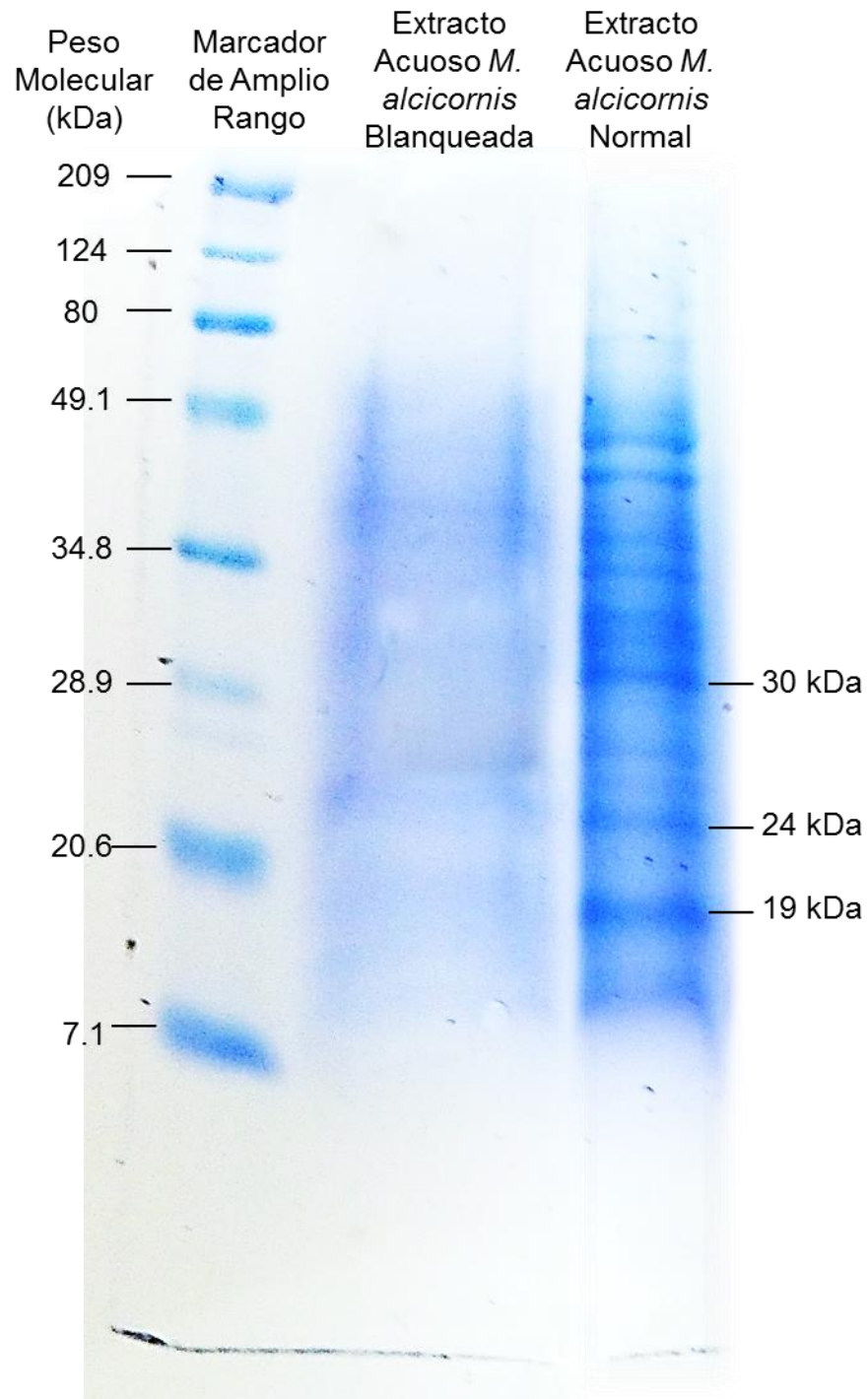


Figura 26. Gel de electroforesis SDS-PAGE teñido por Coomassie. A la izquierda se muestra el peso molecular de las proteínas que conforman el marcador de amplio rango, mientras que a la derecha se muestra el de las bandas seleccionadas para su secuenciación.

6.6 Secuenciación parcial de las proteínas seleccionadas, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

Cuadro 3. Simbología del alineamiento en Clustal2®	
Color / Símbolo	Significado
*	Residuos de aminoácidos del péptido, muestra que son idénticos a los de la proteína ya conocida.
Rojo	Residuos de aminoácidos pequeños e hidrofóbicos: AVFPMILWY (Alanina, Valina, Fenilalanina, Prolina, Metionina, Isoleucina, Leucina, Triptófano y Tirosina)
Azul	Residuos de aminoácidos ácidos: DE (Ácido Aspártico y Ácido Glutámico)
Magenta	Residuos de aminoácidos básicos: RHK (Arginina, Histidina y Lisina)
Verde	Residuos de aminoácidos básicos con grupos hidroxilo o amino: STYHCNGQ (Serina, Treonina, Tirosina, Histidina, Cisteína, Asparagina, Glicina, Glutamina)

Cuadro 4. Secuenciación parcial de la proteína de ~19 kDa.

Proteína Especulada	Proteína de Unión a Peridinin-clorofila a Soluble en Cloroplasto
Origen	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>
Masa nominal	21 201
Punto Isoeléctrico Calculado	8.77
Porcentaje de Similitud	46%

Alineamiento con ClustalW2®

```

PCPprecursor_Symbiodinium_micr      MAKAAARAVAVLILGLCLCSLPAFVPGPGRFARVAPAAVGAGALGMLGAAP 50
Extracto_Millepora_alcicornis      -----

PCPprecursor_Symbiodinium_micr      AYADKIDDAAKVLEKSYFPLKEIDWTSDVYGKLPTQNALDVLKAIDTML 100
Extracto_Millepora_alcicornis      -----SYFPLKEIDWTSDVYGKLPTQNALDVLKAIDTML 34
                                     *****

PCPprecursor_Symbiodinium_micr      KMGASMDPAALKTGVLAHSAKAIANMDSKGVATLADYTAI NA AIGHMIS SV 150
Extracto_Millepora_alcicornis      KMGASMDPAALKTGVLAHSAKAIANMDSK-----TAI NA AIGHMIS SV 76
                                     *****

PCPprecursor_Symbiodinium_micr      PASQTM DVYNAF NKFN LGNDVGPYIMSKVNAGDAKAA YQALMDFKDVVKA 200
Extracto_Millepora_alcicornis      PAS-----AA YQALMDFKDVVK- 93
                                     ***

PCPprecursor_Symbiodinium_micr      SQR 203
Extracto_Millepora_alcicornis      ---
    
```


Cuadro 5. Secuenciación parcial de la proteína de ~24 kDa.

Proteína Especulada	Gelsolina
Origen	<i>Suberites domuncula</i>
Masa nominal	42 414
Punto Isoeléctrico Calculado	5.23
Porcentaje de Similitud	3%

Alineamiento con Clustaw12®

Gelsolina_Suberites_domuncula	MSGFVKAKKYDWKDTNISLFGSDTDRQVKKESAETEPAWKAGQAVGIQI	50
Extracto_Millepora_alcicornis	-----	
Gelsolina_Suberites_domuncula	WRIVKFKVWHWDKNEYGKIFYNGDSYIILNTYKEKDS DALLYDVHFWIGKY	100
Extracto_Millepora_alcicornis	-----	
Gelsolina_Suberites_domuncula	STQDEYGTAA YKTVELDTLLDDKPIQHREVQHESSLFKSYFPTLELLNG	150
Extracto_Millepora_alcicornis	STQDEYGTAA YK-----	12

Gelsolina_Suberites_domuncula	GADTGFKHVKPQEYCPRLLFHGEKKKIEIKEVPLCRSSIDSSDVFILD I	200
Extracto_Millepora_alcicornis	-----	
Gelsolina_Suberites_domuncula	GLEVYQWNGKTCNKDEKFKAVQHLQTLKSERNGKPKVESLDEREISESHK	250
Extracto_Millepora_alcicornis	-----	
Gelsolina_Suberites_domuncula	FYSYFNDDNEEEPDEQDDPDFVKSLFRLSDQSGELERTLEGTGSMRSTL	300
Extracto_Millepora_alcicornis	-----	
Gelsolina_Suberites_domuncula	DENDVFILDTGCELFVWVNGTSAAEQRNALPYAHAYLKTTHPLICVTC	350
Extracto_Millepora_alcicornis	-----	
Gelsolina_Suberites_domuncula	YRQSATPDSFYKAMED	366
Extracto_Millepora_alcicornis	-----	

Cuadro 6. Secuenciación parcial de la proteína de ~36 kDa.

Proteína Especulada	Actina no muscular tipo 6.2
Origen	<i>Hydra magnipapillata</i>
Masa nominal	41998
Punto Isoeléctrico Calculado	5.30
Porcentaje de Similitud	17%

Alineamiento con Clustaw12®

```

ActinaNomuscular_Hydra_magnipa      MADDEVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHQGVVMVGMGQ 50
Extracto_Millepora_alcicornis      -----

ActinaNomuscular_Hydra_magnipa      KDSYVGDQAQSKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAAPE 100
Extracto_Millepora_alcicornis      -----

ActinaNomuscular_Hydra_magnipa      EHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNSPAMYVAIQAVLSLYASGRIT 150
Extracto_Millepora_alcicornis      -----TT 2
                                         **

ActinaNomuscular_Hydra_magnipa      GIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAIIRLDLAGFDLTDYLMKILTERGYS 200
Extracto_Millepora_alcicornis      GIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAIIR----- 30
                                         *****

ActinaNomuscular_Hydra_magnipa      FTTTAEREIVRDIKELSYVALDFEQEMQTAASSSSLEKSYELPDGQVIT 250
Extracto_Millepora_alcicornis      -----SYELPDGQVIT 41
                                         *****

ActinaNomuscular_Hydra_magnipa      IGNERFRCPETLFQPSFIGMESAGIHETTYSIMKCDVDIRKDLYANTVL 300
Extracto_Millepora_alcicornis      IGNE-----RDLYANTVL 54
                                         ***          :*****

ActinaNomuscular_Hydra_magnipa      SGGTTFMFGIADRMQKEISALAPPTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASL 350
Extracto_Millepora_alcicornis      SGGTTFMFGIADR----- 67
                                         *****

ActinaNomuscular_Hydra_magnipa      STFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF 376
Extracto_Millepora_alcicornis      -----
    
```

7. DISCUSION

Como se mencionó en los antecedentes, el blanqueamiento es un fenómeno que se presenta en los corales e hidrocorales como respuesta a cambios en su medio ambiente habitual, ya sea por un incremento en la temperatura o el pH del agua del mar, de la radiación UV o por otras situaciones de carácter antropogénico. Los hidrocorales, como *M. alcicornis*, viven en simbiosis con dinoflagelados de la familia Zooxanthellae, que son algas unicelulares capaces de realizar fotosíntesis, de ahí que posean pigmentos verdes o cafés para este propósito, los cuales le dan a los corales e hidrocorales ese color característico. Cuando dichos microorganismos abandonan a los animales marinos, el esqueleto calcáreo de éstos queda desnudo, es decir, el color blanquecino permanece visible, dando así el nombre a este acontecimiento.

Como cualquier organismo vivo, los hidrocorales y sus simbioses, al reaccionar a una alteración medioambiental, modifican la biosíntesis de diversos metabolitos tanto primarios como secundarios, alterando su fisiología. Esto tiene como consecuencia un cambio en las actividades farmacológicas y/o tóxicas inducidas por los extractos preparados a partir de estos organismos. El valor de la presente investigación radica en que, al conocer con mayor detalle los efectos, tanto farmacológicos como toxicológicos inducidos por el extracto acuoso preparado a partir de especímenes normales y blanqueados de *M. alcicornis*, se contribuirá a comprender mejor la importancia de la simbiosis entre las zooxantelas y las especies del género *Millepora* y su influencia en la biosíntesis de toxinas y metabolitos biológicamente activos.

Al inicio del desarrollo de este proyecto, se cuantificó la proteína presente en el extracto de los extractos acuosos de *M. alcicornis* normal y blanqueada, ya que a partir de esta determinación se desarrollarían los experimentos restantes. Se encontró que 1 mg de liofilizado del extracto de fragmentos normales contiene 0.415 mg de proteína, mientras que la misma cantidad de liofilizado de extracto de hidrocoral blanqueado contiene tan sólo 8.2 µg de proteína. Evidentemente, la

disminución en el contenido proteico del extracto preparado a partir de los especímenes blanqueados se debe a la ausencia de proteínas provenientes de los simbioses y quizá, a la disminución en la síntesis de este tipo de metabolitos primarios por parte de los cnidarios.

Posteriormente, se determinó la actividad de proteasa del extracto con la finalidad de establecer si entre las toxinas contenidas en dichos extractos se encontraban enzimas con capacidad de degradar proteínas. Como se observa en la Figura 19, y en el posterior desarrollo de los cálculos, así como en el análisis estadístico; la actividad preteolítica del extracto normal es significativamente más alta que la del extracto de hidrocoral blanqueado, sin embargo, los valores de actividad de proteasa del extracto son significativamente inferiores a los encontrados para el control positivo de proteasa de *Streptomyces griseus*. Estos resultados nos permiten concluir que *M. alcicornis* no produce toxinas con actividad proteolítica. El bajo efecto proteolítico presentado por el extracto del hidrocoral normal se puede atribuir a la presencia de proteasas constitutivas. Esto se confirma al observar el corrimiento de las bandas correspondientes a los extractos de los hidrocorales en el gel de electroforesis (Figuras 25 y 26), en donde se un fondo azul a lo largo de los carriles, lo cual sugiere la presencia de fragmentos de proteínas. Por esta razón, se sugiere que en los estudios subsecuentes, se utilicen inhibidores de proteasas para evitar la degradación de compuestos bioactivos de naturaleza proteica.

Con respecto a la toxicidad sistémica y el efecto letal inducidos por los extractos acuosos de los hidrocorales, se encontró que la DL_{50} presentada por el extracto obtenido a partir de fragmentos normales fue de 12 μg de proteína/g de peso; mientras que para el extracto del espécimen blanqueado es superior a 48 μg de proteína/g de peso, es decir, este extracto es por lo menos 4 veces menos potente que el primero, por lo que se infiere que los metabolitos responsables de la letalidad se encuentran presentes en mayor abundancia en el espécimen normal.

Derivado de la observación de la letalidad inducida por los dos extractos, se eligieron los tejidos pulmonares, renales y hepáticos para la evaluación del daño tisular,

debido a que estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, revelaron que éstos eran los órganos más susceptibles al daño provocado por los componentes del veneno de los hidrocorales. Se conoce que el veneno de cnidarios se compone, entre otros metabolitos, de neurotoxinas y citolisinas. El análisis de los efectos observados en los ratones y los daños histológicos, muestra que cuando se administraron dosis altas del extracto normal, el efecto neurotóxico es el predominante, ya que la manifestación de convulsiones/espasmos y la muerte instantánea son atribuibles a este tipo de toxinas. Otros efectos atribuibles a neurotoxinas son disnea y colapso cardiaco. Por otro lado, cuando se administraron dosis inferiores, en los casos en que el roedor vivió por un lapso superior a segundos, el efecto predominante corresponde al producido por las citolisinas, pues se observó daño membranal en los tejidos observados. Este daño se manifestó al presentarse edema, daño glomerular y tubular, fuga de proteínas y hematuria o lágrimas con sangre; indicadores de acción degradadora de lípidos de membrana o de proteínas formadoras de poro (PFT's); incluso los últimos dos efectos incluso son indicativos de la acción de hemolisinas.

La variabilidad observada, tanto en los efectos histológicos como en los tiempos de vida de cada uno de los ratones, puede ser explicada por la falta de homogeneidad en la solubilidad del extracto, ya que a pesar de ser resuspendido con ayuda del vórtex, el extracto permanecía en una suspensión inestable, lo que podría afectar la cantidad de proteína administrada a cada uno de los ratones. De igual manera, la administración intravenosa se vuelve complicada ya que los ratones no quedaban inmovilizados al 100% y al inyectarlos, el reflejo de alejamiento o la vasoconstricción derivada de un primer piquete, impedía que la administración se hiciera de manera ideal, es decir, no todo el volumen de extracto destinado a ser inyectado llegaba al torrente sanguíneo de manera íntegra. Incluso, la misma variabilidad biológica de un individuo a otro es un factor a considerar.

En cuanto a los hallazgos particulares en cada uno de los diferentes tejidos, se observó en tejido pulmonar, a dosis bajas del extracto de *M. alcicornis* normal (3 µg de proteína/g de peso) se observó congestión sin edema; fenómeno derivado de la

dislocación cervical para el sacrificio del animal, mas no como consecuencia del efecto del extracto. Con respecto a la dosis de 48 μg de proteína/g de peso de ambos extractos, se observó edematización aguda de los espacios alveolares debido a la extravasación de fluidos (Figura 20). Esto es resultado de insuficiencia cardiaca y el posterior colapso del corazón, derivados de la hemólisis y por ende, pérdida de la hemostasis. Estos efectos también podrían atribuirse a la presencia de neurotoxinas en ambos extractos.

En el análisis del tejido hepático no se observó, en la mayoría de los casos, efecto alguno diferente de la congestión vascular y, en algunos casos, distensión sinusoidal; que son indicativas de colapso cardiaco. En las dosis de 17 y 24 μg de proteína/g de peso de extracto normal (R3N y R34N) y en la dosis de 6 μg de proteína/g de peso de extracto blanqueado (R6B); se observó la diapédesis de leucocitos hacia los hepatocitos como respuesta inflamatoria a la lesión causada en estas células (Figura 21). Es importante remarcar, que este proceso sólo es observable tras haber transcurrido de 2 a 3 h después de una lesión vital en hígado (Calabuig, 2004). Este proceso se corrobora en los tejidos de los ratones R3N, R34N, R6B y R8B. Efectos de este tipo, necesitan la instalación de la lesión y la respuesta a la misma en periodos más prolongados de tiempo. En muerte súbita o menor al lapso de tiempo indicado, es difícil verlo. De manera paralela, se observó en el ratón R3N la presencia de hepatocitos necróticos y apoptóticos. Los primeros indican la posible unión covalente de un agente tóxico con macromoléculas propias del tejido (proteínas o ADN) o, por otra parte, también podrían indicar una modificación en la permeabilidad a los iones Ca^{2+} ; pues se exhibe una alta permeabilidad al influjo de estos iones, debido a la pérdida de estabilidad de la membrana (Calabuig, 2004). Esto puede deberse a la presencia de toxinas que actúan en canales de calcio dependientes de voltaje o por acción de proteínas degradadoras de fosfolípidos (PLA_2). Se propone continuar con el estudio de este efecto como lo hicieron Rojas y col. en 2002, con el extracto de *Millepora complanata* y lograr identificar a la o las moléculas responsables de este efecto. Cabe mencionar que en los procesos hepatonecróticos se presenta liberación al

torrente sanguíneo de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato aminotransferasa). En cuanto a los hepatocitos apoptóticos, éstos son consecuencia del colapso o el encogimiento del órgano, y la manera de diferenciarlos de la necrosis hepática es que, en el proceso de apoptosis no hay edematización. Así, también, el daño hepático puede verse agravado si también existe daño renal (Calabuig, 2004).

El estudio de los riñones reveló que en todas las dosis de ensayo del extracto de *M. alcicornis* normal (3, 6, 12, 17, 24 y 48 μg de proteína/g de peso), el daño renal se muestra de moderado a severo presentándose, principalmente, deterioro a nivel de la unidad de filtración, lo que permitió una hiperperfusión de plasma, proteínas e incluso eritrocitos en el espacio de Bowman (Figura 22); además de la ruptura de la cápsula de Bowman, el componente más sensible de la nefrona, causando con ello insuficiencia renal derivada del efecto de las toxinas. El extracto de *M. alcicornis* blanqueada presentó el mismo comportamiento, con excepción de la concentración de 17 μg de proteína/g de peso. Asimismo, se realizó el hallazgo de cilindros de proteínas y eritrocitos a nivel tubular a la concentración de 6 μg de proteína/g de peso (R8B), fenómeno que se ve favorecido según Calabuig (2004) por efectos hemolíticos; lo que confirma lo hallado por García-Arredondo y col. (2011) y en la curva de hemólisis: el efecto hemolítico se conserva a pesar del blanqueamiento. Es importante mencionar que la presencia de este tipo de cilindros es un signo precoz de lesión tubular, porque se presenta antes que otros marcadores de insuficiencia renal, como el aumento de la urea sérica o la depuración de creatinina. La importancia de identificar a las moléculas causantes de eventos nefrotóxicos radica en que, el daño renal causado por toxinas puede ser impedido o, en el menor caso, evitar la progresión de las anomalías funcionales causadas por las toxinas.

Por otra parte, el efecto hemolítico causado por los extractos acuosos del coral de fuego, observado en la Figura 23, es causado por citolisinas. En la Figura 23 se observa que dicho efecto presenta una respuesta dependiente de la concentración;

ya que al incrementar la dosis, el porcentaje de actividad hemolítica también aumenta. Se observó que no existe una diferencia significativa en el efecto hemolítico causado por el extracto de *M. alcicornis* blanqueada con respecto a la hemólisis provocada por extracto de *M. alcicornis* normal, lo que indica que la síntesis de hemolisinas no se ve afectada por la pérdida de los organismos simbioses o zooxanthelas, resultado que concuerda con lo reportado por García–Arrendondo y col., en 2011.

Para evaluar la acción de neurotoxinas que pudieran estar presentes en los extractos acuosos de los hidrocorales, se utilizó el ensayo de íleon aislado de cobayo, pues el sistema nervioso entérico (presente en íleon) tiene la capacidad de reaccionar de la misma manera que el sistema nervioso central (SNC), debido a que sus células nerviosas se ven influenciadas por los mismos neurotransmisores y poseen los mismos receptores (Beyder y Farrugia, 2012). Al analizar la Figura 24, se observa que los efectos de contracción en íleon, provocados por los extractos acuosos de *M. alcicornis* normal y blanqueada, son dependientes de la concentración y que la ausencia de las algas simbioses disminuye, pero no inhibe completamente la producción de metabolitos que pudieran actuar a nivel de sistema nervioso entérico. Los resultados encontrados en el ensayo de íleon aislado de cobayo indican que *M. alcicornis* produce metabolitos, posiblemente neurotoxinas que estimulan las contracciones espontáneas del músculo liso intestinal, ya sea por efecto directo sobre las células musculares o sobre las neuronas del sistema nervioso entérico. Estas neurotoxinas, de acuerdo a lo que se ha reportado para otros cnidario, podrían estar actuando sobre canales dependientes de voltaje de a) sodio, inhibiendo el cierre del canal; b) potasio, bloqueando el canal o c) calcio, activando el canal (Messerli y Greenberg, 2006).

En este punto, resulta interesante hacer notar que para que las neurotoxinas puedan tener acceso al sistema nervioso central y producir los efectos neurotóxicos observados en los ratones a los que se les administraron los extractos por vía intravenosa a dosis elevadas, estas neurotoxinas deben ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, para lo cual necesitan ser moléculas bastante

liposolubles. Hasta la fecha, las neurotoxinas que se han encontrado en cnidarios son de naturaleza proteica y tienen un número de aminoácidos en un rango de 27 a 49 (≤ 5 kDa). Este tipo de moléculas no son capaces de difundir libremente a través de membranas, a menos que los aminoácidos que posean sean residuos muy liposolubles. Quizá este sea el caso de las neurotoxinas producidas por *M. alcicornis*. También existe la posibilidad de que *M. alcicornis* produzca otro tipo de metabolitos neuroactivos de naturaleza no proteica, que sean de bajo peso molecular y muy liposolubles y que además, tengan la capacidad de difundir a través de membranas y con ello dar como resultado, un efecto en sistema nervioso central.

Con el fin de observar las diferencias en el perfil de proteínas entre ambos extractos acuosos, se realizó un gel de electroforesis. Se utilizó la tinción de plata (Figura 25), debido a que ésta es más sensible (capacidad de detección del orden de ng) que la tinción de Coomassie y con ello se lograrían observar, incluso, las diferencias mínimas de proteínas. Por otro lado, la tinción de Coomassie se realizó con el fin de mejorar las condiciones de preparación del gel para optimizar la resolución de las bandas diferenciales y así poder extraerlas y mandarlas a secuenciar (Gel SDS-PAGE al 16%). Como se indica en la Figura 26, fueron seleccionadas 3 bandas para la secuenciación posterior. El criterio de selección fue la presencia de tales proteínas en el extracto de *M. alcicornis* normal y su ausencia en el extracto del espécimen blanqueado; además del peso molecular, el cual debía de corresponder al peso de toxinas proteicas ya conocidas: la de 30 kDa, a hemolisinas o fosfolipasas (PLA₂); 24 kDa, a algunas actinoporinas y 19 kDa, a citotoxinas o algunas proteínas con actividad vasoconstrictora.

El análisis secuencial de las proteínas seleccionadas del gel de electroforesis reveló que ninguna de las 3 bandas correspondía a los tipos de toxinas ya mencionados. Se encontró que la banda de aproximadamente 19 kDa podría pertenecer al microorganismo simbiote, ya que presenta una similitud del 46% con una proteína correspondiente a *Symbiodinium microadriaticum*. De las bandas de 24 y 30 kDa no se puede establecer ninguna conclusión, ya que el porcentaje de

similitud es tan bajo que no puede aseverarse que se trate de las proteínas que sugirieron los softwares. Se esperaba que dadas las características de las bandas; su definición y ausencia en el extracto de hidrocoral blanqueado, se pudiera obtener algún resultado preliminar que nos aportara evidencia sobre la presencia de toxinas conocidas en cnidarios. Es probable que debido a la falta de purificación de las proteínas de cada una de las bandas, no se haya logrado secuenciar un péptido derivado de la digestión de las proteínas de la muestra sino un péptido pequeño procedente de la acción de las proteasas presentes en el extracto, por lo que una vez más se hace la recomendación del uso de un inhibidor de proteasas.

8. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso preparado a partir de especímenes normales de *M. alcicornis* presenta un mayor contenido proteico que el extracto de especímenes blanqueados, debido a la presencia de proteínas provenientes de las zooxantelas simbiotes.
- *M. alcicornis* no produce toxinas con actividad de proteasa.
- El extracto acuoso de *M. alcicornis* contiene citolisinas que inducen daños en las membranas de eritrocitos y otros tejidos al ser administradas en ratones por vía intravenosa.
- Las membranas de los eritrocitos y de las células renales resultaron ser más susceptibles al efecto tóxico inducido por las citolisinas de *M. alcicornis*.
- El efecto citolítico inducido por las toxinas contenidas en el extracto acuoso de *M. alcicornis* no se modificó cuando este extracto se preparó a partir de especímenes de cnidarios que carecen de simbiotes.
- Las citolisinas contenidas en el extracto acuoso de *M. alcicornis* inducen una muerte lenta en ratones, la cual puede observarse cuando se administran dosis bajas del extracto.
- El extracto acuoso de *M. alcicornis* también contiene neurotoxinas, las cuales producen efectos neurotóxicos y una muerte inmediata al ser administradas en ratones por vía intravenosa. La letalidad inmediata producida por las neurotoxinas de *M. alcicornis* sólo se presenta cuando se administra el extracto a las dosis más altas. Esto sugiere que estas neurotoxinas se encuentran en más baja concentración que las citolisinas responsables de la muerte lenta observada en los ratones de prueba.
- La DL_{50} obtenida para el extracto preparado a partir de especímenes blanqueados resultó ser mayor que la respectiva DL_{50} obtenida para el extracto preparado a partir de hidrocorales normales.
- Las neurotoxinas contenidas en el extracto acuoso de *M. alcicornis* inducen un efecto excitatorio en las células del músculo liso intestinal y/o neuronas del

sistema nervioso entérico. Este efecto disminuyó, pero no desapareció, cuando se evaluó el extracto preparado a partir de especímenes blanqueados.

- La ausencia de simbiosis no modifica la síntesis de citolisinas por parte de los cnidarios, sin embargo sí disminuye, aunque no impide, la síntesis de neurotoxinas.
- Se encontraron evidencias de que los compuestos responsables de las actividades farmacológicas y toxicológicas inducidas por el extracto acuoso de *M. alcicornis* provienen del hidrocoral y no de sus zooxantelas simbiosis, lo cual sugiere que, de alguna manera, *M. alcicornis* mantiene su capacidad de biosintetizar toxinas para su defensa y alimentación, incluso en ausencia de los importantes nutrientes que le proveen sus algas simbiosis.

9. REFERENCIAS

- Abrego** D, Willis BL, Van Oppen MJH. Impact of light and temperature on the uptake of algal symbionts by coral juveniles. PLoS ONE **2012**; 7: 1–9.
- Alcala** CC, Alcala LC, Garth JS, Yasumura D, Yasumoto, T. Human fatality due to the ingestion of the crab *Demania reynaudiik* that contained a palytoxin– like toxin. Toxicon **1988**; 26: 105–107.
- Anderluh** G, y Maček P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria; Toxicon **2002**; 40: 111–124.
- Anderluh** G y Lakey JH. Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. Trends Biochem Sci **2008**; 33: 482–490.
- Anderluh** G, Sepčič K, Turk T, Maček P. Cytolytic proteins from Cnidarians—an overview. Acta Chim Slov **2011**; 58: 724–729.
- Arai** MN. A functional biology of Scyphozoa. Londres: Editorial Chapman & Hall, **1997**: 1–8.
- Bader** T, Yamada Y, Ankel H. Antiviral activity of the prostanoid clavulone II against vesicular stomatitis virus. Antiviral Res **1991**; 16: 341–355.
- Baker** AC Flexibility and specificity in coral–algal symbiosis: diversity, ecology and biogeography of Symbiodinium. Ann Rev Ecol Syst **2003**; 34: 661–689.
- Baker** AC. Coral health and disease. Springer **2004**; 177–194.
- Banaszak** AT, Ayala SBN, Rodríguez RA, Enríquez S, Iglesias PR. *Millepora alcicornis* (Milleporina: Milliporidae) to two bleaching events at Puerto Morelos reef, Mexican Caribbean. Revista de Biología Tropical **2003**; 51: 57–66.
- Bandurraga** M, Fenical W, Donovan SF, Clardy J. Pseudopterolide, an irregular diterpenoid with unusual cytotoxic properties from the Caribbean sea whip *Pseudopterogorgia acerosa* (Pallas) (Gorgonocea). J Am Chem Soc **1982**; 104: 6463–6465.
- Banin** E, Vassilakos D, Orr E, Martinez RJ, Rosenberg E. Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. Curr Microbiol **2003**; 46: 418–422.

Barshis DJ, Ladner JT, Oliver TA, Seneca FO, Traylor KN, Palumbi, SR. Genomic basis for coral resilience to climate change. *PNAS* **2013**; 110: 1387–1392.

Bateman TD, Joshi AL, Moon K, Galiotovskaya EN, Upreti M, Chambers TC, McIntosh MC. Synthesis and anticancer activity of sclerophytin–inspired hidrobenzofurans. *Bioorg Med Chem Letter* **2009**; 19: 6898–6901.

Bedulina DS, Zimmer M, Timofeyev MA. Sub–littoral and supra–littoral amphipods respond differently to acute thermal stress. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **2010**; 155: 413–418.

Behenna DC, Stockdill JL, Stoltz BM. The biology and chemistry of the zoanthamine alkaloids. *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**; 47: 2365–2386.

Bellantuono AJ, Granados CC, Miller DJ, Hoegh–Guldberg O, Rodriguez LM. Coral thermal tolerance: Tuning gene expression to resist thermal stress. *PLoS ONE* **2012**; 7: 1–14.

Beltrán TAU y Carricat, GJP. Lista Revisada y clave para los corales pétreos zooxantelados (Hydrozoa: Milleporina; Anthozoa: Scleractinia) del Atlántico mexicano. *Rev Biol Trop* [online] **1999**; 47: 813–829.

Berrue F y Kerr RG. Diterpenes from gorgonian corals. *Nat Prod Rep* **2009**; 26: 681–701.

Beyder A y **Farrugia** G. Targeting ion channels for the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Ther Adv Gastroenterol* **2012**; 5: 5–21.

Bianchini G, Lotti T, Campolmi P, Casigliani R, Panconesi E. Coral ulcers and vasculitis. *Int J Dermatol* **1988**; 27: 506–507.

Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep* **2012**; 29: 144–222.

Cachet N, Genta JG, Regalado EL, Mokrini R, Amade P, Culioli G, Thomas OP. Parazoanthines A–E, hydantoin alkaloids from the Mediterranean sea anemone *Parazoanthus axinellae*. *J Nat Prod* **2009**; 72: 1612–1615.

Calabuig G. Medicina legal y toxicología. 6a. edición. Barcelona, España: Editorial Elsevier, **2004**: 733–754.

Cariello L, de Santis A, Fiore F, Piccoli R, Spagnuolo A, Zanetti L, Parente A. Calitoxin, a neurotoxic peptide from the sea anemone *Calliactis parasitica*: amino

acid sequence and electrophysiological properties. *Biochemistry* **1989**; 28: 2484–2489.

Chapman GB, y Tilney LG. Cytological studies of the nematocyst of Hydra. II. The stenoteles. *J Biophys Biochem Cytol* **1959**; 5: 79–84.

Chi V, Pennington MW, Norton RS, Tarcha EJ, Londono LM, Sims FB, Upadhyay SK, Lakey JT, Iadonato S, Wulff H, Beeton C, Chandy KG. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator as therapy of autoimmune diseases. *Toxicon* **2012**; 59: 529–546.

Chin–Hsiang C, Zhi–Hong W, Shang–Kwei W, Chang–Yih D. New anti-inflammatory steroids from the Formosan soft coral *Clavularia viridis*. *Steroids* **2008**; 73: 562–567.

Coleman C. Manual del Buceador. Badalona: Editorial Paidotribo, **2008**: 246.

Coles SL y Brown BE. Coral bleaching–capacity for acclimatization and adaptation. *Adv Mar Biol* **2003**; 46: 183–223.

Curtis H, Barnes NS, Schnek A, Flores G. Invitación a la biología. 7ª. edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, **2007**: 384–386.

Da Rocha CAM. Bioactive compounds from zoanthids (Cnidaria: Anthozoa): A brief review with emphasis on alkaloids. *Int Res J Biochem Bioinform* **2013**; 3: 1–6.

Daly M, Brugler MR, Cartwright P, Collin AG, Dawson MN, Fautin DG, Frances SC, McFadden CS, Opresko DM, Rodríguez E, Romano SL, Stake JL. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* **2007**; 1668: 127–182.

Daranas AH, Fernández JJ, Norte M, Souto ML. Alkaloids from marine zoanthids. *Curr Top Phytochem* **2000**; 4: 106–119.

Davies PJ y Montaggioni L. Reef growth and sea–level change: the environmental signature. *Proc 5th Int Coral Reef Symp* **1985**; 3: 477–511.

Dewick MP. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. 2a. edición. West Sussex: Editorial John Wiley & Sons Ltd, **2002**: 51–58.

Diaz BL y Arm JP. Phospholipase A₂. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **2003**; 69: 87–97.

Diochot S, Loret E, Bruhn T, Beress L, Lazdunski M. APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether- α -go-go-related gene potassium channels. *Mol Pharmacol* **2003**; 64: 59–69.

Dong YW, Ji TT, Meng XL, Dong SL, Sun WM. Difference in thermotolerance between green and red color variants of the Japanese sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: Hsp70 and heat-hardening effect. *Biol Bull* **2010**; 218: 87–94.

Dong YW, Miller LP, Sanders JG, Somero GN. Heat-shock protein 70 (Hsp70) expression in four limpets of the genus *Lottia*: Interspecific variation in constitutive and inducible synthesis correlates with in situ exposure to heat stress. *Biol Bull* **2008**; 215: 173–181.

Donner SD, Skirving WJ, Little CM, Oppenheimer M, Hoegh-Guldberg O. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* **2005**; 318: 1737–1742.

Douglas AE. Coral bleaching—how and why? *Mar Pollut Bull* **2003**; 46: 385–392.

Duh CY, El-Gamal AAH, Chu JH, Wang SK, Dai CF. New cytotoxic constituents from the Formosan soft corals *Clavularia viridis* and *Clavularia violacea*. *J Nat Prod* **2002**; 65: 1535–1539.

Duh CY, Lo IW, Wang SW, Dai CF. New cytotoxic steroids from the soft coral *Clavularia viridis*. *Steroids* **2007**; 72: 573–579.

Dunn DF. Cnidaria, synopsis and classification of living things. Nueva York: Editorial McGraw–Hill, 1982: 669–670.

Edmunds PJ. The role of colony morphology substratum inclination in the success of *Millepora alcicornis* on shallow coral reefs. *Coral reefs* **1999**; 18: 133–140.

Engel U, Özbek S, Engel R, Petri B, Lottspeich F, Holstein TW. Nowa, a novel protein with minicollagen Cys-rich domains, is involved in nematocyst formation in *Hydra*. *Journal of Cell Science* **2002**; 115: 3923–3934

Fallowski PG, Dubinsky Z, Muscatine L, Porter JW. Light and the bioenergetics of a symbiotic coral. *Bioscience* **1984**; 34: 705–709.

Fautin DG. Structural diversity, systematics and evolution of cnidae. *Toxicon* **2009**; 54: 1054–1064.

Fenical W, Okuda RK Bandurraga MM, Culver V, Jacobs RS. Lophotoxin: A novel neuromuscular toxin from Pacific sea whips of the genus *Lophogeorgia*. *Science* **1981**; 212: 1512–1514.

Ferchmin PA, Pagán OR, Ulrich H, Szeto AC, Hann RM, Eterović VA. Actions of octocoral and tobacco cembranoids on nicotinic receptors. *Toxicon* **2009**; 54: 1174–1182.

Fernández AMA y Rivas G. Niveles de organización en animales. Distrito Federal: UNAM, 2007: 79–82.

Fujiki H, Yasutoshi Y. Inhibitory effect of Sarcophytol A on development of spontaneous hepatomas in mice. *Cancer Science* **2003**; 46: 385–392.

Fukuzawa S, Hayashi Y, Uemura D, Nagatsu A, Yamada K, Ijuin Y. The isolation and structures of five new alkaloids, norzoanthamine, norzoanthaminone, cyclozoanthamine, oxyzoanthamine and epinorzoanthamine. *Heterocycl Commun* **1995**; 1: 207–214.

García-Arredondo A, Rojas MA, Ibarra AC, Iglesias PR. 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: 171–176.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **2000**; 11: 4241–4257.

Grotendorst GR y Hessinger DA. Enzymatic characterization of the major phospholipase A₂ component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon* **2000**; 38: 931–943.

Han C, Qi J, Shi X, Sakagami Y, Shibata T, Uchida K, Ojika M. Prostaglandins from a Zoanthid: Paclitaxel-like neurite-degenerating and microtubule-stabilizing activities. *Biosci Biotechnol Biochem* **2006**; 70: 706–711.

Hashimoto N, Fujiwara S, Watanabe K, Iguchi K, Tsuzuki M. Localization of clavulones, prostanoids with antitumor activity, within the Okinawan soft coral *Clavularia viridis* (Alcyonacea, Clavulariidae): Preparation of a high-purity

Symbiodinium fraction using a protease and a detergent. Chem Biodivers **2003**; 38: 991–997.

Hassan HM, Khanfar MA, Elnagar AY, Mohammed R, Shaala LA, Youssef DTA, Hifnawy MS, El Sayed KA. Pachycladins A–E, prostate cancer invasion and migration inhibitory Eunicelli–based diterpenoids from the red sea soft coral *Cladiella pachyclados*. J Nat Prod **2010**; 73: 848–853.

Häussermann V. Phylum Cnidaria–Cnidarians. En Gallardo, A. y Earle, S. **2009**; Marine Benthic Fauna of Chilean Patagonia. Illustrated identification guide: 172–173.

Ho CL, Ko JL, Lue HM, Lee CY, Ferlan I. Effects of equinatoxin on the guinea–pig atrium. Toxicol. **1987**; 25: 659–664.

Hoegh–Guldberg O. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. Mar Freshw Res **1999**; 50: 839–866.

Honda A, Mori Y, Iguchi K, Yamada Y. Antiproliferative and cytotoxic effects of prostanoids clavulones from the stolonifer *Clavularia viridis* on human myeloid leukemia cells in culture. Mol Pharmacol **1987**; 32: 530–535.

Honma T y Shiomi K. Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects. Mar Biotechnol **2006**; 8: 1–10.

Iguchi A, Iwanaga S, Nagai H. Isolation and characterization of a novel protein toxin from fire coral. Biochem Biophys Res Commun **1995**; 365: 107–112.

Iguchi K, Iwashima M, Watanabe K. Clavulolactones, new marine prostanoids with a gamma–lactonic moiety in the alfa–side–chain of the Okinawan soft coral, *Clavularia viridis*. J Nat Prod **1995**; 58: 790–792.

Iguchi A, Iwanaga S, Nagai H. Isolation and characterization of a novel protein toxin from fire coral. Biochem Biophys Res Commun **2008**; 365: 107–112.

Ibarra AC, García JA, Aguilar MB, Rojas A, Falcón A, Heimer de la Cotera EP. Biochemical and pharmacological characterizations obtained from the fire coral *Millepora alcicornis*. Comp Biochem Physiol C **2007**; 146: 511–518.

Iwashima M, Watanabe K, Iguchi K. New marine prostanoids, preclavulone lactones, from the Okinawan soft coral *Clavularia viridis*. Tetrahedron Lett **1997**; 38: 8319–8322.

Iwashima M, Okatomo K, Iguchi K. New marine prostanoids from the Okinawan soft coral, *Clavularia viridis*. *J Nat Prod* **1999**; 62: 352–354.

Iwashima M, Terada I, Okamoto K, Iguchi K. Tricycloclavulone and clavubicyclone, novel prostanoid-related marine oxylipins, isolated from the Okinawan soft coral *Clavularia viridis*. *J Org Chem* **2002**; 67: 2977–2981.

Jacobson PB y Jacobs RS. Fucoside: an anti-inflammatory marine natural product which selectively inhibits 5-lipoxygenase. Part I: Physiological and biochemical studies in murine inflammatory models. *J Pharmacol Exp Ther* **1992**; 262: 866–873.

Jiménez C y Crews P. ¹³C-NMR Assignments and cytotoxicity assessment of zoanthoxanthin alkaloids from Zoanthid corals. *J Nat Prod* **1993**; 56: 9–14.

Jokiel PL y Coles SL. Response of Hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperature. *Coral Reefs* **1990**; 8: 155–162.

Jones RJ, Hoegh-Guldberg O, Larkum AWD, Schreiber U. Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO₂ fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant Cell Environ* **1998**; 21: 1219–1230.

Jyh-Horng S, Kuie-Chi C, Chang-Yih D. A Cytotoxic 5R,8R-Epidioxysterol from a Soft Coral *Sinularia* Species. *J Nat Prod* **2000**; 63: 149–151.

Kass-Simon G y Scappaticci AAJr. The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Can J Zool* **2002**; 80: 1772–1794.

Kühl M, Cohen Y, Tage D, Jorgensen B, Revsbech B. Microenvironment and photosynthesis of zooxanthellae in scleractinian corals studied with microsensors for O₂, pH and light. *Mar Ecol Prog Ser* **1995**; 117: 159–172.

Kuramoto M, Arimoto H, Uemura D. Bioactive alkaloids from the sea: A review. *Mar Drugs* **2004**; 2: 39–54.

Lazzaro M, Tashjian AHJr, Fujiki H, Levine L. Palytoxin: An extraordinary potent stimulator of prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calcariae. *Endocrinology* **1987**; 120: 1338–1345.

Lesser MP. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* **2006**; 68: 253–278.

- Lesser** MP, Bailey MA, Merselis DG, Morrison JR. Physiological response of the blue mussel *Mytilus edulis* to differences in food and temperature in the Gulf of Maine. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **2010**; 156: 541–551.
- Lewis** JB. Heterotrophy in corals: Zooplankton predation by the hydrocoral *Millepora alcicornis*. *Marine Ecology Progress Series* **1992**; 90: 251–256.
- Lewis** JB. Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Adv Mar Biol* **2006**; 50: 1–55.
- Light** RJ, Samuelsson B. Identification of prostaglandins in the gorgonian, *Plexaura homomalla*. *Eur J Biochem* **1972**; 28: 232–240.
- Look** SA, Burch MT, Fenical W, Qi-tai Z, Clardy J. Kalloide A, a new anti-inflammatory diterpenoid, and related lactones from the Caribbean octocoral *Pseudopterogorgia kallos* (Bielschowsky). *J Org Chem* **1985**; 50: 5741–5746.
- Look** SA, Fenical W, Jacobs RS, Clardy J. The pseudopterins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Proc Natl Acad Sci* **1986**; 83: 6238–6240.
- Loredo** JS, Gonzalez RRJr, Hessinger DA. Vascular effects of *Physalia physalis* venom in the skeletal muscle of the dog. *J Pharmacol Exp Ther* **1985**; 232: 301–304.
- Lorke** D. A new approach to partial acute toxicity testing. *Arch Toxicol* **1983**; 54: 275–287.
- Mariscal** RN. Nematocysts. En Muscatine L. y Lenhoff HM, Ed. *Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives*. Nueva York: Ed. Academic Press, **1974**: 129–178.
- Mariscal** RN, McLean RB, Hand C. The form and function of cnidarian spirocysts. 3. Ultrastructure of the thread and the function of spirocysts. *Cell Tissue Res* **1977**; 178: 427–433.
- Maróti** G, Kereszt A, Kondorosi E, Mergaert P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol* **2011**; 162: 363–374.
- Marques** AC y Collins AG. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* **2004**; 123: 23–42.

McCulloch MWB, Haltli B, Marchbank DH, Kerr RG. Evaluation of Pseudopteroxazole and Pseudopterosin Derivatives against Mycobacterium tuberculosis and Other Pathogens. *Mar Drugs* **2012**; 10: 1711–1728.

Mayer, MSA, Jacobson PB, Fenical W, Jacobs RS, Glaser KB. Pharmacological characterization of the pseudopterosins: novel anti-inflammatory natural products isolated from the Caribbean soft coral, *Pseudopteroergorgia elisabethae*. *Pharm Lett* **1998**; 62: 401–407.

Meier S, Jensen PR, Adamczyk P, Bächinger HP, Holstein TW, Engel J, Özbek, S, Grzesiek, S. Sequence–structure and structure–function analysis in cysteine–rich domains forming the ultrastable nematocyst wall. *J. Mol. Biol* **2007**; 368: 718–728.

Messerli, S. M y Greenber, R. M. Cnidarian toxins acting on voltage–gated ion channels. *Mar Drugs* **2006**; 4: 70–81.

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

Moats, W. E. Fire coral envenomation. *J. Wilderness Med.* **1992**; 3: 284–287.

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

Muscatine L. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. En: Dubinsky Z, Ed. *Coral reefs: Ecosystems of the world*. Amsterdam: Elsevier Science, **1990**; vol. 25: 75–87.

Nagase H y Karaki H. Palytoxin–induced contraction and release of prostaglandins and norepinephrine in the aorta. *J Pharmacol Exp Ther* **1987**; 242: 1120–1125.

Nagase H, Karaki H, Ozaki H, Urakawa N, Azuma H, Nakajima T. Contractile and relaxant effects of jellyfish toxin on the vascular and intestinal tissues. *Comp Biochem Physio.* **1987**; 86C: 411–414.

Nakao Y, Yoshida S, Matsunaga S, Fusetani N. (Z)–sarcodictyin A, a new highly cytotoxic diterpenoid from the soft coral *Bellonella albiflora*. *J Nat Prod* **2003**; 66: 524–527.

Nevalainen TJ, Peuravuori HJ, Quinn RJ, Llewellyn LE, Benzie JAH, Fenner PJ, Winkel KD. Phospholipase A₂ in Cnidaria. *Comp Biochem Physiol* **2004**; 139: 731–735.

Newmann DJ y Cragg GM. Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. *Curr Med Chem* **2004**; 11: 1693–1713.

Noguchi T, Hwang FF, Arakawa O, Daigo K, Sato S, Ozaki H, Kawai N, Ito M, Hashimoto K. Palytoxin as the causative agent in the parrotfish poisoning. En: Gopalakrishnakone P y Tan CK, Ed. *progress in venom and toxin research: proceedings of the first Asia–Pacific congress on animal, plant and microbial toxins*. Singapur: Faculty of Medicine, National University of Singapore, 1987: 325–335.

Norton RS. Structure and structure–function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* **1991**; 29: 1051–1084.

Oliver TA y Palumbi SR. Do fluctuating temperature environments elevate coral thermal tolerance? *Coral Reefs* **2011**; 30: 429–440.

Onuma Y, Satake M, Ukena T, Roux J, Chanteau S, Rasolofonirina N, Ratsimaloto M, Naoki H, Yasumoto T. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon* **1999**; 37: 55–65.

Östman C. A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Sci Mar* **2000**; 64: 31–46.

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

Parker MW y Feil SC. Pore–forming protein toxins: from structure to function. *Prog. Biophys. Mol Biol* **2005**; 88: 91–142.

Pawlik JR, Burch MT, Fenical W. Patterns of chemical defense among Caribbean gorgonian corals: a preliminary survey. *J Exp Mar Biol Ecol* **1987**; 108: 55–56.

Pawlowski J, Holzmann M, Fahrni JF, Pochon X, Lee JJ. **2001**; Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid foraminifera: 2. Dinoflagellates. *J Eukaryot Microbiol* **2001**; 48: 368–373.

Pennington MW, Mahnir VM, Khaytin I, Zaydenberg I, Byrnes ME, Kem WR. An essential binding surface for ShK toxin interaction with rat brain potassium channels. *Biochemistry* **1996**; 35: 16407–16411.

Pochon X, Pawlowski J, Zaninetti L, Rowan R. High genetic diversity and relative specificity among Symbiodinium–like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans. *Mar Biol* **2001**; 139: 1069–1078.

Prasad GV, Vincent L, Hamilton R, Lim K. Minimal change disease in association with fire coral (*Millepora* species) exposure. *Am J Kidney Dis* **2006**; 47: 15–16.

Quero RJ, Esteves MA, Kossuga MH, Berlinck RGS, Tempone AG. Antiprotozoan activity of Brazilian marine cnidarian extracts and of a modified steroid from the octocoral *Carioja riisei*. *Parasitol Res* **2008**; 103: 1445–1450.

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

Razpotnik A, Križaj I, Šribar J, Maček P, Turk T. A new cytolytic protein from the sea anemone *Urticina crassicornis* that binds to cholesterol– and sphingomyelin–rich membranes. *Toxicon* **2009**; 53: 762–769.

Rocha J, Peixe L, Gomes NCM, Calado R. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds – An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Mar Drugs* **2011**; 9: 1860–1886.

Rogers JC, Qu Y, Tanada TN, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of high affinity binding of alpha–scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3–S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel alpha subunit. *J Biol Chem* **1996**; 271: 15950–15962.

Rojas 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 alcicornis*. *Toxicon* **2002**; 40: 777–785.

Rojas MMA, García AA, Ibarra AC, Bah MM. *Millepora* (“Fire corals”) Species: Toxinological studies until 2011. En: Daniels, J. A. *Advances in Environmental Research*. Nova **2012**; 26: 133–148.

Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber–Rosenberg, I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol* **2007**; 5: 355–362.

Rowley A, Vogan C, Taylor G, Clare A. Prostaglandins in non–insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *J Exp Biol* **2005**; 208: 3–14.

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.

Sepčić K, Turk, Macek P. Anticholinesterase activity of the fluorescent zaonthid pigment, parazoanthozanthin A. *Toxicon* **1998**; 36: 937–940.

Schweitz H, Bruhn T, Guillemare E, Moinier D, Lancelin JM, Beress L, Lazdunski M. Kaliclodines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels. *J Biol Chem* **1995**; 270: 25121–25126.

Schuchert, P. World hydrozoa data base. [monografía en internet]. The Catalogue of Life, the Encyclopedia of Life, the Global Biodiversity Information Facility and the Census of Marine Life, **2009** [consultado 2013 enero 31]. Disponible en: <http://www.marinespecies.org/hydrozoa>.

Schuchert, P. World Register of Marine Species. [monografía en internet]. The Catalogue of Life, the Encyclopedia of Life, the Global Biodiversity Information Facility and the Census of Marine Life, **2012** [consultado 2013 marzo 18]. Disponible en: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=210726>.

Schneider WP, Hamilton RD, Rhuland LE. Occurrence of esters of (15S)–prostaglandin A 2 and E 2 in coral. *J Am Chem Soc* **1972**; 94: 2122–2123.

Sharma P y Alam M. Sclerophytins A and B. Isolation and structure of novel cytotoxic diterpenes from the marine coral *Sclerophytum capitalis*. *J Chem Soc Perkin Trans* **1988**; 1: 2537–2540.

Shen YC, Cheng YB, Lin YC, Guh JH, Teng CM, Ko CL. New prostanoids with cytotoxic activity from Taiwanese octocoral *Clavularia viridis*. *J Nat Prod* **2004**; 67: 542–546.

- Sher** D, Knebel A, Bsor T, Neshar N, Tal T, Morgenstern D, Cohen E, Fishman Y, Zlotkin E. Toxic polypeptides of the hydra—a bioinformatics approach to cnidarian allomones. *Toxicon* **2005**; 45: 865–879.
- Shin** J, Seo Y, Rho JR, Cho KW. Isolation of polyhydroxysteroids from the gorgonian *Acabaria undulata*. *J Nat Prod* **1996**; 59: 679–682.
- 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.
- Shiomi** K, Honma T, Ide M, Nagashima Y, Ishida M, Chino M. An epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *Toxicon* **2003**; 41: 229–236.
- Solomon** EP, Berg LR, Martín DW, Villée C. *Biología de Villée*. 4ª. edición. Distrito Federal. Editorial McGraw–Hill Interamericana, **1998**: 598–602.
- Spagnuolo** A, Zanetti L, Cariello L, Piccoli R. Isolation and characterization of two genes encoding calitoxins, neurotoxic peptides from *Calliactis parasitica* (Cnidaria). *Gene* **1994**; 138: 187–191.
- Steele** RE, David CN, Technau U. A genomic view of 500 million years of cnidarian evolution. *Trends in Genetics* **2011**; 27: 7–13.
- Stonik** VA. Marine polar steroids. *Russ Chem Rev* **2001**; 70: 673–715.
- Szczepanek** S, Cikala M, David CN. Poly- γ -glutamate synthesis during formation of nematocyst capsules in Hydra. *Journal of Cell Science* **2002**; 115: 745–751.
- Talvinen** KA, Nevalainen TJ. Cloning of a novel phospholipase A2 from the cnidarian *Adamsia carciniopados*. *Comp Biochem Physiol B* **2002**; 132: 571–578.
- Tardent** P. The cnidarian cnidocyte, a high-tech cellular weaponry. *BioEssays* **1995**; 17: 351–362.
- Taylor** DL. Symbiotic marine algae: Taxonomy and biological fitness. En: Vernberg WB y Vernberg FG, Ed. *Symbiosis and the sea*. Columbia: University of South Carolina Press, **1974a**: 245–262.
- Terrón** SA y López GPJ. Cnidae variability in *Balanophyllia europea* and *B. regia* (Scleractinia: Dendrophylliidae) in the NE Atlantic and Mediterranean Sea. *Sci Mar* **2005**; 69: 75–86.

Torres M, Aguilar MB, Falcón A, Sánchez L, Radwan FFY, Burnett JW, Heimer de la Coteria E, Arellano RO. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon* **2001**; 39: 1297–1307.

Turk T, Macek P, Šuput D. Inhibition of acetylcholinesterase by a pseudozoanthoxanthin– like compound isolated from the zoanthid *Parazoanthus axinellae* (O. Schmidt). *Toxicon* **1995**; 33: 133–142.

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

Ulrich K. Comparative animal biochemistry. Springer–Verlag **1994**; 634.

Valmsen K, Järving I, Boeglin W, Varvas K, Koljak R, Pehk T, Brash A, Samel N. The origin of 15R–prostaglandins in the Caribbean coral *Plexaura homomalla*: Molecular cloning and expression of a novel cyclooxygenase. *PNAS* **2001**; 98: 7700–7705.

Venn AA, Loram JE, Douglas AE. Photosynthetic symbiosis in animals. *J Exp Bot* **2008**; 59: 1069 – 1080.

Villar RM, Gil–Longo J, Daranas AH, Souto ML, Fernandez JJ, Peixinho S, Barral MA, Santafé G, Rodríguez J, Jiménez C. Evaluation of the effects of several zoanthamine–type alkaloids on the aggregation of human platelets. *Bioorg Med Chem* **2003**; 11: 2301–2306.

Warner ME, Fitt WK, Schmidt GW. The effect of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae in hospite from four different species of reef coral: A novel approach. *Plant Cell Environ* **1996**; 19: 291–299.

Watanabe K, Iwashima M, Iguchi K. New bioactive marine steroids from the Okinawan soft coral *Clavularia viridis*. *Steroids* **1996**; 61: 439–446.

Watanabe K, Sekine H, Takahashi K, Iguchi K. New halogenated marine prostanoids with cytotoxic activity from the Okinawan soft coral *Clavularia viridis*. *J Nat Prod* **2001**; 64: 1421–1425.

Watson GM y Hessinger SA. Cnidocyte mechanoreceptors are tuned to the movement of swimming prey by chemoreceptors. *Science* **1989**; 243: 1589–1591.

Watters MR. Tropical marine neurotoxins: venoms to drugs. *Semin Neurol* **2005**; 25: 278–289.

Weber J. Poly(γ -glutamic acid)s are the major constituents of nematocysts in hydra (Hydrozoa, Cnidaria; J Biol Chem **1990**; 265: 9664–9669.

Weerdt WH y Glynn P. W. A new and presumably now extinct species of *Millepora* (Hydrozoa) in the eastern Pacific. Zool Meded Leiden **1991**; 65: 267–276.

Weill R. Contribution à l'étude des cnidaires et de leurs nématocystes I. Recherches sur les nématocystes. Travaux de la Station Zoologique de Wimereux **1934a**; 10: 1–347.

Weinheimer AJ y Spraggins RL. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla* chemistry of coelenterates. XV. Tetrahedron Lett **1969**; 2: 5185–5188.

Weis VM. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. J Exp Biol **2008**; 211: 3059–3066.

Wilmes M, Cammue BPA, Sahl HG, Thevissen K. Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. Nat Prod Rep **2011**; 28: 1350–1358.

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 RE. Singing coral (*Millepora tenera*) toxin: a comparison of crude extracts with isolated nematocyst extracts. Toxicon **1974**; 12: 481–486.

WoRMS. WoRMS: World Register of Marine Species. [monografía en internet]. The Catalogue of Life, the Encyclopedia of Life, the Global Biodiversity Information Facility and the Census of Marine Life, **2013** [consultado 2013 marzo 18]. Disponible en: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1337>.

Wu CH. Palytoxin: Membrane mechanisms of action. Toxicon **2009**; 54: 1183–1189.

Ya-Ching S, Kuang-Liung L, Jiun-Yang C, Yu-Sheng L, Khongorzul M, Yao-Haur K, Yu-Chi L. New cytotoxic prostanoids from Taiwanese soft coral *Clavularia viridis*. Chem Biodivers **2010**; 7: 2702–2708.

Yamauchi O, Omori M, Ninomiya M, Okuno M, Moriwaki H, Suganuma M, Fujiki H, Yasutoshi Y. Inhibitory effect of Sarcophytol A on development of spontaneous hepatomas in mice. Cancer Science **1991**; 82: 1234–1238.

Yellowless D, Rees TA, Leggat W. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant Cell Environ* **2009**; 54: 1183–1189.

Yokomatsu H, Satake K, Hiura A, Tsutsumi M, Suganuma M. Sarcophytol A: a new chemotherapeutic and chemopreventive agent for pancreatic cancer. *Pancreas* **1994**; 9: 526–530.

Yun–Sheng L, Ashraf TK, Shih–Hwa C, Yuh–Chi K, Yuan–Bin C, Chia–Ching L, Ya–Ching S. Bioactive marine prostanoids from octocoral *Clavularia viridis*. *Chem Biodivers* **2008**; 5: 784–792.