

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“ESTUDIO QUÍMICO Y TOXINOLÓGICO DE UNA FRACCIÓN
DE BAJO PESO MOLECULAR, OBTENIDA A PARTIR DEL
EXTRACTO ACUOSO DEL HIDROCORAL *Millepora*
complanata”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B. JOSÉ HÉCTOR ZAVALA GÓMEZ

DIRIGIDO POR

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

QUERÉTARO, QRO. CENTRO UNIVERSITARIO

NOVIEMBRE DE 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“ESTUDIO QUÍMICO Y TOXINOLÓGICO DE UNA FRACCIÓN DE BAJO PESO MOLECULAR, OBTENIDA A PARTIR DEL EXTRACTO ACUOSO DEL HIDROCORAL *Millepora complanata*”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B. JOSÉ HÉCTOR ZAVALA GÓMEZ

SINODALES

Dra. Alejandra Rojas Molina

Presidente

Dr. César Ibarra Alvarado

Secretario

Dr. José Alejandro García Arredondo

Vocal

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Suplente

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Suplente

M.S.P Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Alejandra Rojas M.

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

QUERÉTARO, QRO. CENTRO UNIVERSITARIO
NOVIEMBRE DE 2016

RESUMEN

Millepora complanata es un cnidario predominante en arrecifes coralinos del Mar Caribe Mexicano. Este hidrocoral es comúnmente conocido como “coral de fuego” debido a su capacidad de causar lesiones dolorosas en la piel humana después del contacto.

En el presente estudio, se evaluaron los efectos tóxicos y farmacológicos producidos por una fracción de bajo peso molecular (FBPM), obtenida mediante ultrafiltración del extracto acuoso de *M. complanata*.

La FBPM contiene un bajo contenido proteico (0.5 µg proteína/mg de polvo liofilizado), comparado con la fracción de alto peso molecular. Se encontró que la FBPM induce un aumento en las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo, en una forma dependiente de la concentración, lo cual indica la presencia de compuestos que actúan sobre blancos localizados en las neuronas del sistema nervioso entérico o células del músculo liso intestinal. Dichos compuestos son termoestables, posiblemente metabolitos secundarios. A dosis de 0.5 mg/g de peso corporal, la FBPM administrada en ratones por vía intravenosa, indujo convulsiones clónicas en ratones, los cuales se recuperaron después de unos minutos. Por otra parte, dosis mayores a 1 mg/g peso provocaron efectos similares y la muerte inmediata de los ratones. La DL₅₀ de la FBPM se estimó en 0.656 mg/g de peso corporal.

Cuando la FBPM se sometió a condiciones desnaturalizantes, el efecto letal se conservó, lo cual reforzó la idea que los compuestos responsables de la neurotoxicidad y la muerte en los ratones son metabolitos secundarios.

El análisis de la FBPM mediante HPLC en fase reversa, indicó que esta fracción consta principalmente de compuestos de mediana y alta polaridad. El análisis espectrométrico de la FBPM mediante MALDI-TOF, mostró 1 señal intensa de peso molecular de 3.432 kDa.

Estos hallazgos proporcionan información acerca de la diversidad estructural de los componentes presentes en la fracción de bajo peso molecular, los cuales contribuyen, en gran medida, a la toxicidad observada en los ratones, cuando se administra el extracto acuoso preparado a partir de este hidrocoral.

SUMMARY

Millepora complanata is a predominant cnidarian in coral reefs of the Mexican Caribbean Sea. This hydrocoral is commonly known as "fire coral", due to its ability to cause painful lesions on human skin after contact.

In the present study, the toxicological and pharmacological effects induced by a low molecular weight fraction (FBPM) obtained from the aqueous extract of *M. complanata* were assessed.

FBPM showed less protein content (0.5 µg protein/mg lyophilized) than the high molecular weight fraction and induced a concentration-dependent excitatory effect on the spontaneous contractions of isolated guinea pig ileum. This pharmacological effect indicates the presence of compounds acting on targets located either, on neurons of the enteric nervous system, or on intestinal smooth muscle cells. Such compounds, which are thermostable, are likely to be secondary metabolites. When intravenously administered to mice at a dose of 0.5 mg/g body weight, FBPM induced clonic convulsions in mice, which lasted only few minutes. Moreover, doses greater than 1 mg/g weight caused similar effects and an immediate death in mice. The calculated LD₅₀ value for FBPM was 0.656 mg/g body weight.

When FBPM was subjected to denaturing conditions, it conserved its lethality, which suggested that the compounds responsible for the neurotoxic effects and death in mice are secondary metabolites.

Reverse phase HPLC analysis of FBPM indicated that it primarily consists of medium and high polarity compounds. MALDI-TOF spectrometric analysis of FBPM showed the presence of a major compound with a molecular weight of 3.432 kDa, likely to be a peptide.

The results derived from this work provide information about the structural diversity of the compounds contained in the low molecular weight fraction obtained from *M. complanata* aqueous extract. These compounds significantly contribute to the neurotoxic effects and lethality induced in mice by the crude extract of this hydrocoral.

A mis padres Lourdes y Héctor

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado a través de la beca otorgada durante mis estudios de posgrado, para la realización de este proyecto.

A la Maestría en Ciencias Químico Biológicas, por abrirme las puertas al mundo de la investigación y permitirme formar parte de su tercera generación de estudiantes.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. César Ibarra, Dr. Moustapha Bah, y Dr. Manuel Aguilar por sus valiosas aportaciones y sugerencias durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Alejandro García, por sus consejos como tutor y guiarme en mi proyecto de investigación. Por fortalecer en mí, el sentido de competitividad.

Al Dr. Fernando Lazcano Pérez, por su valioso apoyo, sugerencias y su colaboración en este trabajo con los estudios espectrométricos mediante MALDI-TOF.

Al Dr. Martín García Servín, por su colaboración y asesoría en la administración de las muestras a los ratones de experimentación usados para este proyecto.

Al Dr. Marco Alonso Gallegos Corona, por su colaboración y sus valiosas aportaciones en la interpretación de los estudios histopatológicos.

A mis compañeros del laboratorio de Productos Naturales: Dany, Ronna, Lalo, Caro, Bere, Lim, por los buenos ratos y las charlas amenas durante mi estancia en el laboratorio.

A Andrea Herrera, por todo su apoyo y su paciencia, por escucharme y permitirme discutir con sentido crítico cada punto de vista. Por cada prueba que repetimos una y otra vez para lograr los objetivos de nuestros proyectos, por permitirme conocerla más allá de las paredes del laboratorio.

A mis compañeros de la MCQB generación 2014-2016, por los ratos amenos en los que pudimos convivir juntos, y por sus aportaciones académicas durante nuestra formación como científicos, que, sin duda, me hicieron crecer profesionalmente.

A mis amigos Luis Humberto y Ricardo, por ser mis mejores amigos y confidentes en mis frustraciones, celebrar mis victorias y su apoyo incondicional.

A mis hermanas, por su apoyo incondicional y sus atinados consejos; por su cariño y comprensión en todo momento.

A Paquito, por arrancarme sonrisas día con día y hacer mi vida más feliz, por dejarme ser un ejemplo para tí.

A mis padres Lourdes y Héctor, por su apoyo incondicional en cada faceta de mi vida, por ser una guía en este camino y por celebrar conmigo cada éxito y apoyarme en cada situación difícil. Les dedico este logro invaluable.

Finalmente agradezco especialmente a la Dra. Alejandra Rojas, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por creer en mí durante este tiempo en que desarrollé mi proyecto de investigación.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES.....	4
2.1 El phylum Cnidaria.....	4
2.2 Morfología de los cnidarios	4
2.3 Clasificación del phylum Cnidaria	6
2.4 Cnidocitos y cnidocistos.....	8
2.5 Toxinas de cnidarios	10
2.5.1 Citolisinas	11
2.5.1.1 Actinoporinas	12
2.5.1.2 Fosfolipasas A2 (PLA ₂).....	13
2.5.2 Neurotoxinas.....	14
2.5.2.1 Neurotoxinas que actúan sobre canales de Na ⁺ activados por voltaje .	15
2.5.2.2 Neurotoxinas que actúan sobre canales de K ⁺ activados por voltaje ...	17
2.5.3 Compuestos no proteicos	18
2.6 El género <i>Millepora</i>	22
2.7 Efectos tóxicos locales y sistémicos provocados por las toxinas de las especies del género <i>Millepora</i> en los seres humanos	24
2.8 Estudios bioquímicos y toxicológicos realizados sobre especies del género <i>Millepora</i>	24
3 JUSTIFICACIÓN	27
4 HIPÓTESIS.....	29
5 OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivos específicos	30

6	METODOLOGÍA	31
6.1	Obtención de los especímenes de <i>M. complanata</i>	31
6.2	Obtención del extracto acuoso de <i>M. complanata</i>	31
6.3	Perfil proteico del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> , mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
6.4	Perfil proteico del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> , mediante electroforesis bidimensional.....	32
6.5	Ultrafiltración del extracto acuoso de <i>M. complanata</i>	33
6.6	Detección de aminas biógenas en la FBPM, mediante cromatografía en capa fina	33
6.7	Separación de los componentes de la FBPM por cromatografía de exclusión molecular	34
6.8	Análisis de la FBPM y la subfracción MC2, mediante HPLC en fase reversa.....	34
6.9	Análisis de la FBPM por espectrometría de masas MALDI-TOF	34
6.10	Evaluación de la contractilidad de la musculatura lisa intestinal en un modelo de íleon aislado de cobayo	35
6.11	Evaluación de la toxicidad aguda en ratones.....	36
6.12	Evaluación de los daños histopatológicos	36
7	RESULTADOS.....	38
7.1	Obtención del extracto acuoso de <i>M. complanata</i>	38
7.2	Perfil proteico del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> , mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio	38
7.3	Perfil proteico del extracto acuoso de <i>M. complanata</i> mediante electroforesis bidimensional.....	39
7.4	Fraccionamiento del extracto acuoso de <i>M. complanata</i>	40
7.4.1	Ultrafiltración.....	40
7.4.2	Cromatografía en capa fina	41
7.4.3	Cromatografía de exclusión mediante FPLC	42
7.4.4	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa	43
7.4.5	Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	52
7.5	Ensayos biológicos	53

7.5.1	Efecto en la contractilidad del íleon aislado de cobayo	53
7.5.2	Efectos sistémicos y toxicidad aguda en ratones del extracto acuoso y de la FBPM.....	55
7.5.3	Análisis histopatológicos.....	57
8	DISCUSIÓN.....	60
9	CONCLUSIONES	70
10	LITERATURA CITADA.....	72

ÍNDICE DE CUADROS

Figura		Página
1	Clasificación del phylum Cnidaria.....	6
2	Clasificación de las citolisinas de acuerdo a su peso molecular..	12
3	Componentes mayoritarios de la FBPM a 210 nm.....	46
4	Hallazgos durante el análisis histopatológico.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fases morfológicas de los cnidarios	5
2	Especies del phylum Cnidaria.....	7
3	<i>Millepora alcicornis</i> , especie representativa de la clase Hydrozoa.....	8
4	Estructura de un cnidocito.....	9
5	Morfodinamia del mecanismo de descarga de un nematocisto.....	10
6	Estructura tridimensional de la equinotoxina (Eq TII).....	13
7	Estructura química de la maitotoxina.....	14
8	Subunidad α del canal de Na^+ activado por voltaje y sitios de unión de toxinas.....	16
9	Ejemplos de neurotoxinas que actúan sobre canales de Na^+ activados por voltaje.....	17
10	Estructura tridimensional de la toxina ShK.....	18
11	Estructura química de compuestos no proteicos identificados en especies del phylum Cnidaria.....	20
12	Estructura química del cembrano y de la lophotoxina.....	21
13	Estructura química de la palitoxina.....	22
14	Fotografía de <i>Millepora complanata</i>	23
15	SDS-PAGE del extracto acuoso de <i>M. complanata</i>	39
16	Perfil electroforético bidimensional del extracto acuoso de <i>M.</i> <i>complanata</i>	40
17	Fracciones obtenidas mediante ultrafiltración del extracto acuoso de <i>M. complanata</i>	41
18	Cromatograma de la FBPM obtenido mediante CCF.....	41
19	Cromatograma de la FBPM obtenido mediante cromatografía de exclusión molecular.....	42
20	Espectro de absorción de UV del compuesto M (23.71 min).....	43
21	Cromatograma de la FBPM, obtenido mediante HPLC en fase reversa a $\lambda=210$ nm.....	45

22	Cromatograma de la FBPM, obtenido mediante HPLC en fase reversa a $\lambda=280$ nm.....	47
23	Cromatograma de MC2, obtenido mediante HPLC en fase reversa a $\lambda=210$ nm.....	48
24	Cromatograma de MC2, obtenido mediante HPLC en fase reversa a $\lambda=280$ nm.....	49
25	Comparación del cromatograma de la FBPM con el de MC2 a $\lambda=210$ nm.....	50
26	Comparación del cromatograma de la FBPM con el de MC2 a $\lambda=280$ nm.....	51
27	Espectro de la FBPM, analizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.....	52
28	Registros del efecto excitatorio sobre las contracciones espontáneas de íleon aislado de cobayo.....	54
29	Comparación del efecto en la contractilidad de íleon aislado de cobayo.....	54
30	Letalidad del extracto acuoso de <i>Millepora complanata</i> administrado en ratones por vía i.v.....	55
31	Letalidad de la FBPM administrada en ratones por vía i.v.....	56
32	Fotografías del tejido renal de ratones experimentales.....	58
33	Fotografías del tejido pulmonar de ratones experimentales.....	59
34	Fotografías del tejido cerebral de ratones experimentales.....	59

1 INTRODUCCIÓN

Millepora complanata es un hidrocoral del phylum Cnidaria que se encuentra ampliamente distribuido en mares tropicales como el Caribe Mexicano y habita en aguas cálidas poco profundas. Los hidrocorales del género *Millepora* son los segundos organismos formadores de arrecifes de coral más abundantes en los mares tropicales del mundo (Obura y col., 2008).

Las especies del género *Millepora* son comúnmente denominadas “corales de fuego”, debido a que, al entrar en contacto con la piel humana, son capaces de inducir lesiones severas con aspecto de quemadura, presentándose en la mayoría de los casos formación de eritemas y ampollas. Resulta evidente que la capacidad de estos hidrocorales para inducir sus efectos dañinos se debe a la presencia de toxinas contenidas en sus venenos, los cuales son empleados para la captura de sus presas y para defenderse de sus depredadores (Sagi y col., 1987; Bianchini y col., 1988).

Los casos de lesiones causadas por corales de fuego son comunes, pero en general no suelen ser reportados, debido a que sanan en un tiempo relativamente corto, aunque se desconoce el tratamiento adecuado para curar estas lesiones, inclusive se han reportado algunas complicaciones sistémicas severas en humanos por el contacto con estos hidrocorales (Prasad y col., 2006).

En la actualidad, los estudios que se han realizado con relación a las toxinas producidas por las especies del género *Millepora* son escasos, en comparación con las investigaciones toxicológicas que se han efectuado sobre especies de otros géneros del phylum Cnidaria, como las anémonas (clase Anthozoa) por ejemplo.

Las toxinas que se han detectado en las especies del género *Millepora* corresponden a proteínas cuyos pesos moleculares se encuentran en el rango de 15-30 kDa, el cual es característico del grupo de las citolisinas (Anderluh y col., 2002).

En un estudio reciente, nuestro grupo de trabajo logró identificar la presencia de 2 tipos de hemolisinas en el extracto acuoso preparado a partir de *Millepora alcicornis*; algunas de ellas, con pesos moleculares entre 28 y 30 kDa, con actividad de fosfolipasa A2 (PLA₂) y otras de ≈200 kDa que no mostraron actividad enzimática (Hernández-Matehuala y col., 2015).

En otros estudios, nuestro grupo logró identificar en el extracto acuoso preparado a partir de *M. complanata*, la presencia de proteínas que poseen diversos efectos tóxicos y farmacológicos, que incluyen actividad hemolítica y excitación en la contractilidad del músculo liso arterial de rata (Ibarra-Alvarado y col., 2007) así como del músculo liso intestinal de cobayo (Rojas y col., 2002). Además, se encontró que el extracto acuoso de *M. complanata*, administrado por vía intravenosa, induce violentas convulsiones y la muerte rápida en ratones (en menos de un minuto), con una dosis letal media (DL₅₀) de 4.62 µg de proteína/g de peso corporal, lo cual se asocia con la presencia de neurotoxinas. Se observó que, a dosis menores a la DL₅₀, se produjeron daños histopatológicos en tejido pulmonar y renal indicando la posible presencia de citolisinas. Es importante señalar que cuando el extracto se sometió a condiciones desnaturalizantes, el efecto neurotóxico y letal se conservó, en tanto que el daño histopatológico desapareció, lo cual sugirió que las toxinas responsables de los efectos neurotóxicos y la muerte inmediata en ratones son probablemente metabolitos secundarios, mientras que las toxinas que provocan el daño tisular son de naturaleza proteica (García-Arredondo y col., 2015).

En este contexto resulta importante continuar con la caracterización química y farmacológica de las toxinas producidas por *M. complanata*, ya que a la fecha no se han aislado ni caracterizado las toxinas de bajo peso molecular (<10 kDa) que produce este hidrocoral. Es muy probable que dichas toxinas constituyan los compuestos responsables de los efectos neurotóxicos observados en los estudios previos sobre el extracto acuoso de este hidrocoral. Es por esta razón que se ha planteado el presente trabajo, cuyo objetivo general es caracterizar desde un punto

de vista químico, farmacológico y toxicológico, las toxinas de bajo peso molecular producidas por el hidrocoral *M. complanata*, las cuales podrían representar nuevos prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos y herramientas biotecnológicas o de investigación.

2 ANTECEDENTES

2.1 El phylum Cnidaria

El phylum Cnidaria comprende a un extenso grupo de animales de exclusividad acuática que incluye alrededor de 11,000 especies, las cuales se distribuyen en los mares tropicales de todo el mundo y se encuentran en aguas poco profundas. Los cnidarios constituyen un grupo muy diverso en cuanto a formas, coloraciones y tamaños; pueden vivir de forma individual o en colonias, fijados a un sustrato o libres, e incluso los hay nadadores (Fernández y Rivas, 2007).

2.2 Morfología de los Cnidarios

Los Cnidarios presentan una organización morfológica bien definida, ya que conservan una simetría primaria radial ó birradial que es relativamente simple. Su organización corporal es en forma de saco hueco con una cavidad gastrovascular que contiene un solo orificio, el cual actúa como boca y ano. Esta cavidad está rodeada por un número variable de tentáculos, los cuales son utilizados como órganos mecánicos de conducción del alimento (Fernandez y Rivas, 2007). La pared del cuerpo de los cnidarios es diblástica, es decir, consta de dos capas celulares: la epidermis externa (ectodermo) y la gastrodermis interna (endodermo), las cuales se encuentran separadas por una capa de tejido conectivo gelatinoso llamada mesoglea (Solomon y col., 1998).

Los cnidarios no poseen aparatos excretor, respiratorio, ni circulatorio, estas funciones se realizan a través de la cavidad gastrovascular o de la ectodermis; tienden al polimorfismo, en especial en formas coloniales. Su ciclo de vida se puede explicar desde la formación de un huevo, el cual posee poco vitelo y sufre segmentación total hasta alcanzar un estado larvario general: la larva plánula, ciliada, nadadora, que buscará en el sustrato un lugar para fijarse y es a partir de esta etapa en la que se definen dos fases morfológicas, el pólipo y la medusa (Hickman, 2006).

La forma pólipo, generalmente fija a un sustrato, posee la boca en la superficie superior, así como una amplia cavidad gastrovascular y mesoglea muy poco desarrollada, representa un cuerpo más o menos columnar por el lado aboral. La forma medusa tiene la boca en la superficie inferior y está adaptada para la flotación, toda la cavidad está tapizada por gastrodermis y el resto por ectodermis. Hay mesoglea muy desarrollada (Curtis y col., 2007). En la FIGURA 1 se ilustra la morfología, tanto de la fase de pólipo como de medusa.

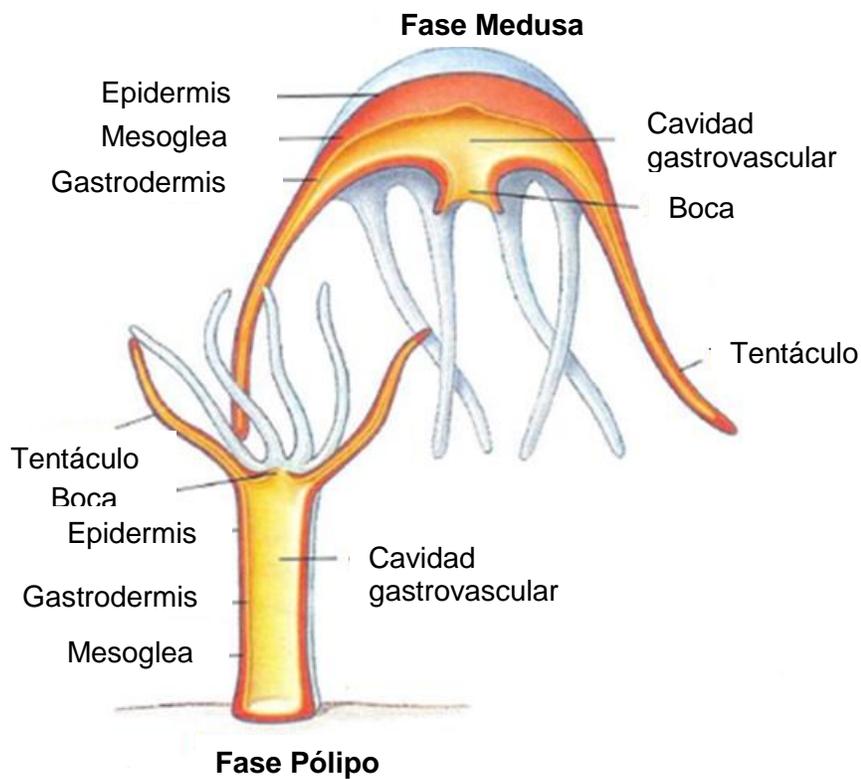


FIGURA 1. Fases morfológicas de los cnidarios

2.3 Clasificación del phylum Cnidaria

El esquema taxonómico actual divide al phylum Cnidaria en dos grandes grupos: anthozoos y medusozoos. Los anthozoos comprenden únicamente especies de la clase Anthozoa y poseen ADN mitocondrial circular. En tanto que, en el grupo de los medusozoos están incluidas especies de las clases Cubozoa, Hydrozoa, Scyphozoa y Staurozoa y se caracterizan por poseer un ADN mitocondrial lineal (atípico). En el CUADRO 1 se resume la clasificación del phylum Cnidaria en base a los estudios mitogenómicos más recientes (Kayal y col., 2013).

Phylum	Bloque	Clase	Subclase	Orden	
Cnidaria (≈ 11,287 especies)	Anthozoos	Anthozoa (≈7,500 especies)	Hexacorallia	Actiniaria Antipatharia Ceriantharia Corallimorpharia Scleractinia Zoanthidea	
			Octocorallia	Alcyonacea Gorgonacea Helioporacea Pennatulacea	
	Medusozoos	Cubozoa (≈36 especies)		Carybdeida Chirodropida	
		Hydrozoa (≈3,500 especies)		Anthoathecata Leptothecata Siphonophorae Actinulida	Limnomedusae Narcomedusae Trachymedusae
		Polypodiozoa (≈ 1 especie)		Única especie: <i>Polypodium hydriforme</i>	
		Scyphozoa (≈ 200 especies)		Coronatae Rhizostomeae Semaestomeae	
		Staurozoa (≈50 especies)		Stauromedusae	

CUADRO 1. Clasificación del phylum Cnidaria

Aproximadamente el 95% de las especies que conforman al phylum Cnidaria están concentradas en las clases Anthozoa (7,500) e Hydrozoa (3,500), es por esta razón que han sido mayormente estudiadas y de las cuales se han identificado un gran número de compuestos bioactivos respecto a las demás clases (Daly y col., 2007). En la FIGURA 2 se ilustra una especie de cada clase del phylum Cnidaria.

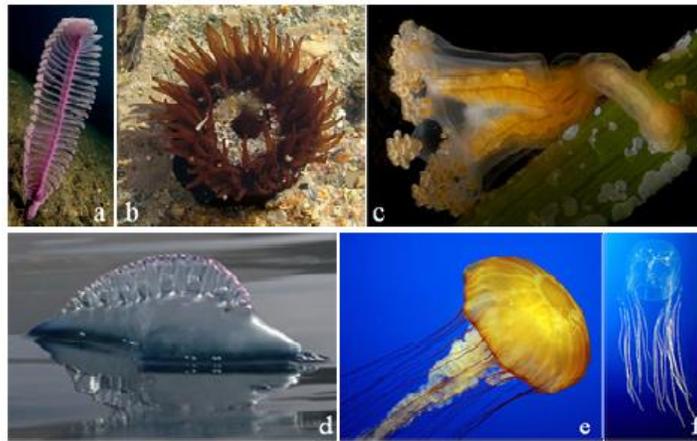


FIGURA 2. Especies del phylum Cnidaria

a) y b) clase Anthozoa, c) clase Staurozoa, d) clase Hydrozoa, e) clase Scyphozoa y f) clase Cubozoa. Tomado de Turk y Kem, 2009.

En México se han identificado un total de 289 especies del grupo Medusozoa, de las cuales 3 son de Cubozoa, 20 de Scyphozoa y 266 de Hydrozoa. En total, el número de especies registradas en aguas mexicanas representa el 7.3% de los medusozoos conocidos actualmente en el mundo, lo que indica que la diversidad de este grupo de organismos merece mayores esfuerzos en cuanto a su estudio, particularmente en ambientes poco explorados (Gasca y Lomán-Ramos, 2014).

La clase Hydrozoa cuenta con la mayor diversidad de cnidarios y comprende aproximadamente 3,500 especies, lo que representa el 30% del total de especies encuadradas en este phylum (Collins y col., 2006). Las especies de la clase Hydrozoa se caracterizan por tener una cavidad gastrovascular que no se encuentra dividida. Los hidrozooarios más representativos son las hidras (orden

Hydroida, familia Hydridae) y también se incluyen especies que presentan forma de medusas marinas (orden Trachylina), siendo éstas generalmente más pequeñas que las de la clase Scyphozoa y las medusas de agua dulce. Dentro de esta clase se encuentran también formas coloniales flotantes (orden Siphonophora), las cuales se caracterizan por presentar una vejiga llena de gas que les sirve como flotador, denominado pneumatóforo. Asimismo, esta clase comprende a los hidrocorales, los cuales son hidrozoarios coloniales que secretan esqueletos calcáreos (Collins, 2009).

Los hidrocorales más abundantes son los “corales de fuego” (orden Anthoathecata, familia Milleporidae); en la FIGURA 3 se ilustra un espécimen de *Millepora alcicornis*, una especie representativa de este grupo.

Los hidrozoos se alimentan de una variedad amplia de presas, además del zooplancton, su dieta incluye bacterias, protozoos, fitoplancton y metabolitos de origen algal o materia orgánica disuelta (Fernández y Rivas, 2007).



FIGURA 3. Fotografía de *M. alcicornis*
Tomado de World register of marine species

2.4 Cnidocitos y cnidocistos

Los cnidarios se caracterizan por la presencia de células eucariotas especializadas denominadas cnidocitos que segregan sustancias urticantes, las cuales tienen 2 funciones vitales: la defensa contra los depredadores y la captura de sus presas (Lewis, 2006). Los cnidocitos son especialmente abundantes en la epidermis de los

tentáculos en la zona que rodea la cavidad gastrovascular (Fernández y Rivas, 2007).

Los cnidocitos contienen un organelo complejo llamado cnidocisto, el cual consiste en una cápsula rígida que contiene un túbulo urticante (FIGURA 4), de acuerdo a sus características morfológicas, los cnidocistos pueden ser de tres tipos: espirocisto, pterocisto y nematocisto (Östman, 2000).

Los nematocistos son especialmente importantes, ya que se encuentran en todas las especies del phylum Cnidaria y son considerados como una de las estructuras de secreción intracelular más grandes y complejas que se conocen en el reino animal. Constan de una cápsula que puede ser de forma ovalada o esférica, la cual posee en la parte superior una abertura cerrada, que se conoce como opérculo. Dentro de la cápsula del nematocisto, se encuentra un filamento tubular invertido enrollado (Beckmann y Özbek, 2012).

La cápsula es altamente resistente y soporta una presión intracapsular de hasta 150 bar (Özbek y col., 2009).

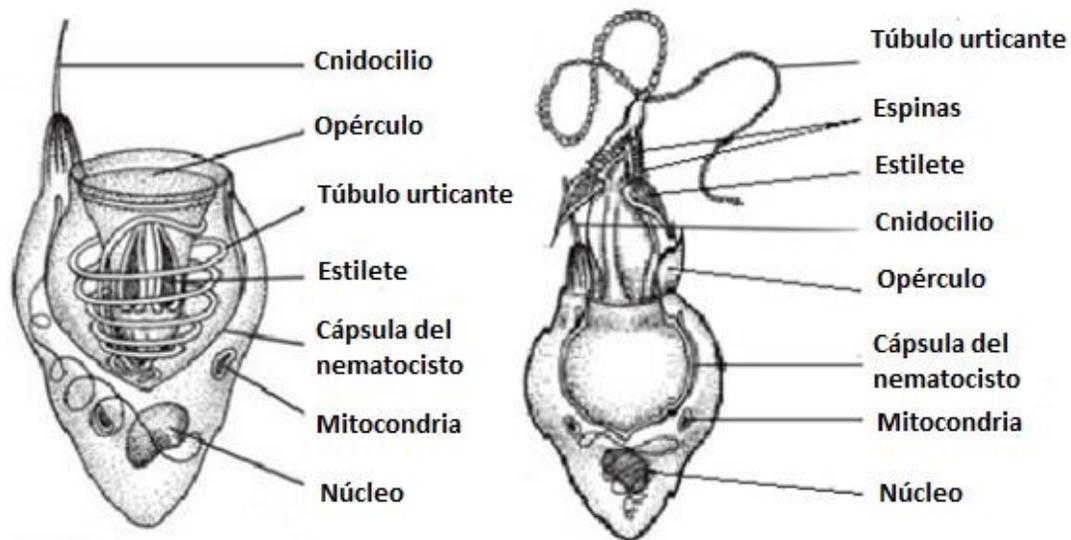


FIGURA 4. Estructura de un cnidocito.

De lado izquierdo la forma en reposo y del lado derecho la forma activa: descarga del nematocisto.

La superficie de un cnidocito posee una estructura sensorial llamada cnidocilio, la cual responde a los estímulos producidos por las presas o depredadores y tiene como función principal la activación de la descarga del nematocisto (Watson, 1989). Este mecanismo inicia con la liberación de la presión osmótica interna del nematocisto mediante un estímulo apropiado, que puede ser químico o mecánico, provocando así, la proyección del túbulo hacia el exterior y de esta manera las toxinas almacenadas dentro de los nematocistos son inyectadas a las presas a través del túbulo (Anderson y col., 2009; Özbek y col., 2009). En la FIGURA 5 se ilustra la morfodinamia del mecanismo de descarga de un nematocisto, el cual ocurre en un periodo menor a 3 milisegundos, considerándose como uno de los procesos celulares más rápidos.

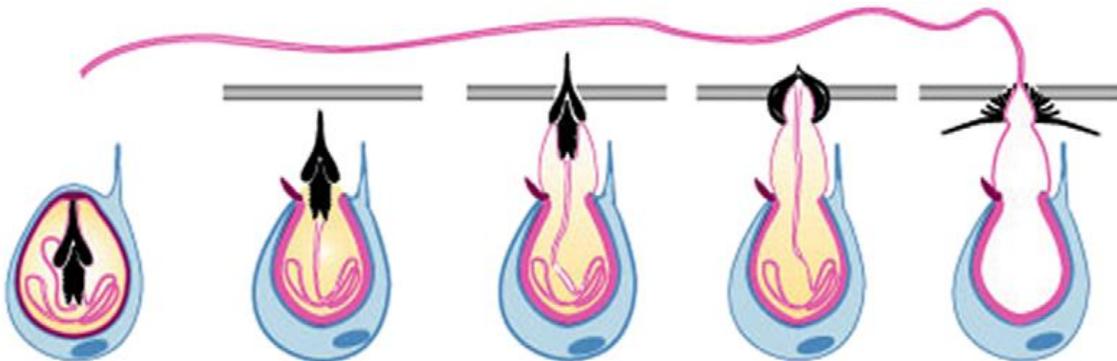


FIGURA 5. Morfodinamia del mecanismo de descarga de un nematocisto
Modificado de Özbek y col., 2009.

2.5 Toxinas de cnidarios

Las especies del phylum Cnidaria representan los organismos más venenosos dentro de los invertebrados marinos. Por ejemplo, a partir de organismos de la clase Anthozoa, se han identificado alrededor de 250 toxinas, que incluyen proteínas, péptidos y sustancias no proteicas (Frazão y col., 2012). Las toxinas almacenadas en los nematocistos de los cnidarios, son mezclas complejas de compuestos de pesos moleculares variados que tienen la capacidad de inducir reacciones tóxicas e inmunológicas (Turk y Kem, 2009).

La diversidad de los componentes del veneno de los cnidarios comprende desde compuestos no proteicos hasta proteínas de alto peso molecular (Jouiaei y col., 2015). En ese sentido, los estudios realizados a la fecha sobre la identificación de las toxinas presentes en el veneno de algunos cnidarios indican que la mayor parte de éstas son de naturaleza proteica (Anderluh y col., 2002).

2.5.1 Citolisinas

Las citolisinas son un amplio grupo de toxinas que han sido identificadas en organismos del phylum Cnidaria, principalmente en especies de la clase Anthozoa como las anémonas de mar. Este tipo de toxinas interaccionan con las membranas de ciertos tipos celulares provocando su degradación. Las citolisinas producidas por cnidarios pueden clasificarse de acuerdo a su forma de interaccionar con la membrana celular: las formadoras de poro (actinoporinas) y las que tienen actividad enzimática de fosfolipasa A2 (Anderluh y Maček, 2002).

Por otro lado, se ha reportado que más de 32 especies de anémonas de mar producen proteínas y péptidos citolíticos letales. Este tipo de toxinas se han clasificado en 4 grupos, de acuerdo al rango de peso molecular. El grupo I incluye péptidos entre 5–8 kDa que forman poros en las membranas que contienen fosfatidilcolina; el grupo II comprende a las actinoporinas (≈ 20 kDa) que se asocian normalmente con membranas que contienen esfingomiélin, formando poros catiónicos selectivos; en el grupo III se encuentran fosfolipasas A2 citolíticas letales ≈ 40 kDa; el grupo IV incluye únicamente a la metridiolisina de *Metridium senile* (80 kDa), una citolisina tiol-activada que actúa sobre colesterol o fosfátidos (Anderluh y Maček, 2002). En el CUADRO 2 se resumen los 4 grupos mencionados.

Grupo	Rango de Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico pI	Blanco molecular	Tipo de Actividad
I	5 - 8	>9	Fosfatidilcolina	Formación de poro
II	20	>9.5	Esfingomielina	Formación de poro
III	~30 - 45	>8.8	Esfingomielina	Actividad PLA ₂
IV	80	5.0	Colesterol, Fosfátidos	Formación de poro

CUADRO 2. Clasificación de las citolisinas de anémonas de acuerdo a su peso molecular.

2.5.1.1 Actinoporinas

Muchas de las citolisinas que se han aislado de venenos de cnidarios actúan mediante la formación de poros específicos en las membranas. Las anémonas representan un ejemplo claro de cnidarios que producen este tipo de toxinas.

Las actinoporinas son proteínas monoméricas que no poseen residuos de cisteína y presentan pesos moleculares que oscilan alrededor de los 20 kDa. Estas toxinas son hidrosolubles, en presencia de lípidos membranales se oligomerizan de tres o cuatro moléculas para formar un poro selectivo a cationes de aproximadamente 2 nm de diámetro (Anderluh y col., 2005).

En la anémona *Actinia equina* se han encontrado al menos 5 isoformas de proteínas formadoras de poro denominadas equinatoxinas (Anderluh y col., 2005). La FIGURA 6 ilustra la estructura de la equinatoxina II aislada a partir de *Actinia equina*. Además de las equinatoxinas, se encuentran las esticolisinas I a IV, aisladas de *Stichodactyla helianthus* (Álvarez y col., 2001) y las magnificalisinas I a III, aisladas de *Heteractis magnifica* (Khoo y col., 1993).

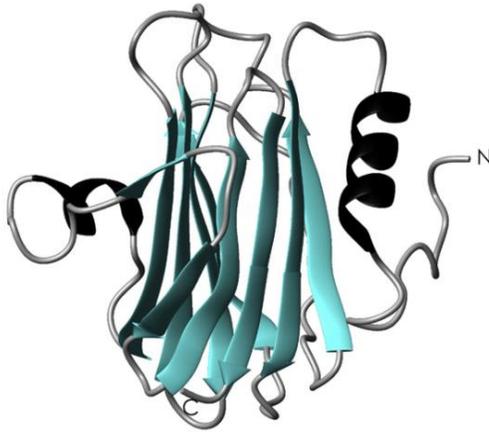


FIGURA 6. Estructura tridimensional de la equinotoxina (Eq TII)
Tomado de Norton, 2009.

2.5.1.2 Fosfolipasas A2 (PLA₂)

Las fosfolipasas de tipo A2 (PLA₂) identificadas en cnidarios corresponden a un tipo de citolisinas que degradan lípidos membranales específicos (Anderluh y col., 2002). Estas enzimas hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos. Poseen un rol importante en el catabolismo de lípidos de la dieta, en el metabolismo de la membrana celular y en enfermedades inflamatorias (Romero y col., 2010; Burke, y col., 2009).

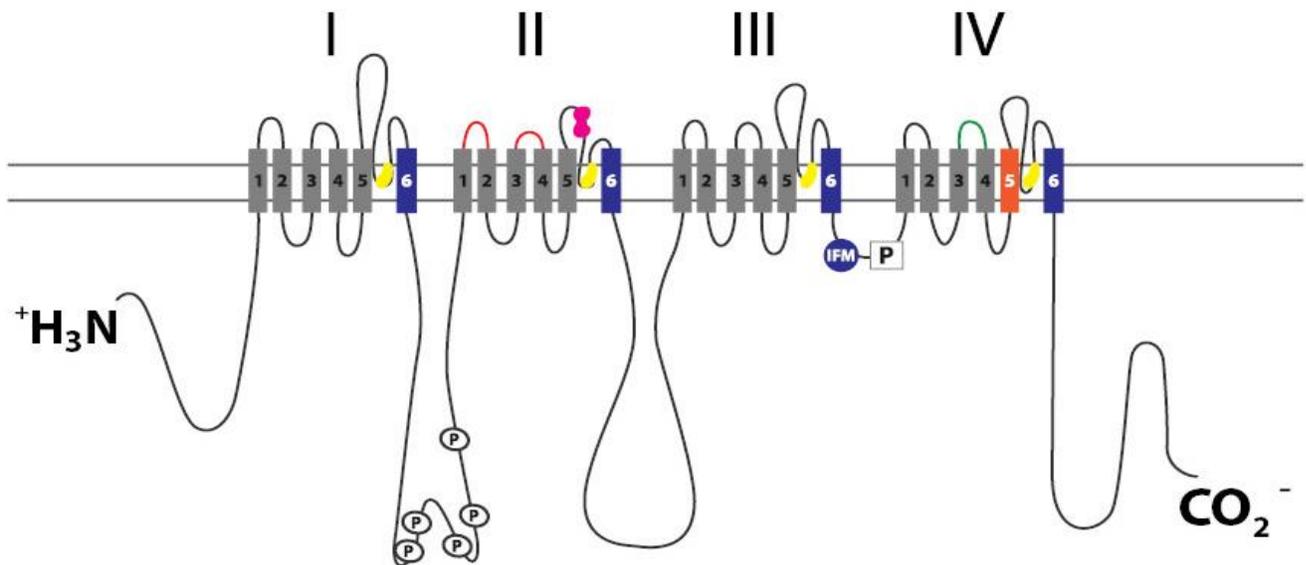
Las PLA₂ se encuentran ampliamente distribuidas en venenos de diversos organismos. En el phylum Cnidaria, se han detectado proteínas con significativa actividad de PLA₂ en los venenos de diversas especies. El peso molecular de estas enzimas oscila entre 30 y 40 kDa (de 5 a 8 puentes disulfuro) y se caracterizan por la presencia de histidina en el sitio catalítico (Six y col., 2000; Nevalainen y col., 2004).

Particularmente, las neurotoxinas presentes en el veneno de Cnidarios corresponden mayoritariamente a polipéptidos que actúan sobre canales iónicos activados por voltaje presentes en células excitables. A partir de las anémonas de mar (clase Anthozoa), se ha obtenido una gran diversidad de toxinas peptídicas capaces de interactuar con canales iónicos activados por voltaje (de sodio y potasio principalmente) produciendo una amplia variedad de efectos farmacológicos (Messerli y Greenberg, 2006).

2.5.2.1 Neurotoxinas que actúan sobre canales de Na⁺ activados por voltaje

Las neurotoxinas que actúan sobre canales de sodio activados por voltaje han sido las más estudiadas, debido a que constituyen mayoritariamente la composición de los venenos de anémonas de mar (Moran y col., 2009).

El canal de sodio activado por voltaje consiste en un poro formado por una subunidad α que está conformada por 4 dominios homólogos, cada dominio consta de 6 segmentos transmembranales (S1-S6). Las neurotoxinas de anémonas de mar se unen al sitio 3 del canal de sodio, el cual consiste en un “loop” extracelular que une a los segmentos transmembranales 3 y 4 del dominio IV de la subunidad α del canal, el cual se ilustra en la FIGURA 8 (Catterall y col., 2007). La unión de las neurotoxinas al sitio 3, induce un retraso parcial de la inactivación del canal y por lo tanto el mantenimiento de un potencial de acción sostenido (Rogers y col., 1996).



- Sitio 1** Tetrodotoxina (TTX) , saxitoxina (STX)
- Sitio 1** μ conotoxina
- Sitio 2** Veratridina, Bactrocotoxina (BTX), Aconitina, Grayanotoxina (GTX)
- Sitio 3** Toxinas de escorpiones africanos. Toxinas de anémonas marinas, γ -atractoxinas.
- Sitio 4** Toxinas β de escorpiones americanos
- Sitio 5** Brevetoxinas (PbTX), Ciguatoxinas (CTX)

FIGURA 8. Subunidad α del canal de Na^+ activado por voltaje y sitios de unión de toxinas.

Con base a su secuencia de aminoácidos, las neurotoxinas que actúan sobre canales de sodio activados por voltaje, se dividen en tres grupos principales, de acuerdo a su secuencia de aminoácidos (Watters, 2005). Tanto el tipo 1, que representa el grupo más numeroso, como el tipo 2 están constituidos por péptidos de 47 a 49 aminoácidos con tres enlaces disulfuro. En tanto que, el tipo 3 está constituido por péptidos más cortos, que constan de 27 a 32 residuos de aminoácidos (Oliveira y col., 2004).

En la FIGURA 9 se ilustran algunas de las neurotoxinas que actúan sobre canales de Na^+ activados por voltaje (del tipo 1 y 2) cuya estructura ha sido elucidada mediante cristalografía de Rayos X (Norton, 2009).

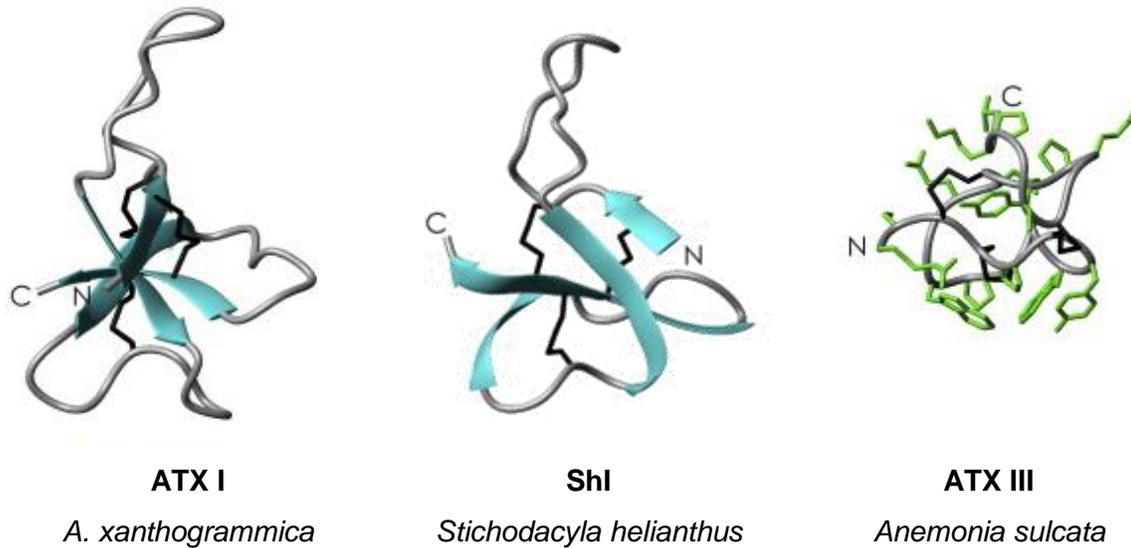


FIGURA 9. Ejemplos de neurotoxinas que actúan sobre canales de Na^+ activados por voltaje
Tomado de Norton, 2009.

2.5.2.2 Neurotoxinas que actúan sobre canales de K^+ activados por voltaje

El otro grupo importante de neurotoxinas de anémonas está integrado por toxinas que actúan sobre canales de K^+ activados por voltaje.

Los canales de K^+ activados por voltaje tienen un papel esencial en la repolarización de la membrana después de la iniciación de un potencial de acción. También están implicados en procesos fisiológicos, tales como la regulación de la frecuencia cardíaca, la excitabilidad neuronal, la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina, la señalización de Ca^{2+} , la proliferación celular y la migración y la regulación del volumen celular (Orts y col., 2013).

Las toxinas de anémonas que actúan sobre canales de K^+ activados por voltaje también se agrupan en tres tipos principales, basándose en diferencias funcionales

y estructurales. El tipo 1 lo constituyen toxinas de 35 a 37 residuos de aminoácidos que bloquean los canales K_{v1} , presentan dos hélices cercanas y tres puentes disulfuro. El tipo 2 está representado por toxinas de 58 a 59 residuos de aminoácidos que también bloquean a los canales K_{v1} , aunque con menor potencia que las del tipo 1. Finalmente, en el tipo 3 se encuentran diversas toxinas que bloquean selectivamente los canales K_{v3} (Messerli y Greenberg, 2006).

En la FIGURA 10 se ilustra la ShK, que fue la primera neurotoxina de este tipo que fue completamente secuenciada.

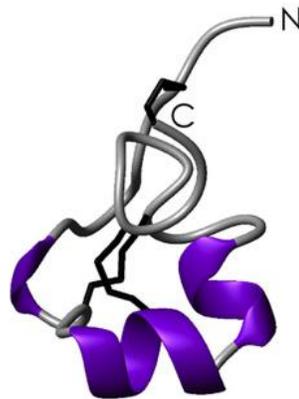


FIGURA 10. Estructura tridimensional de la toxina ShK.
Tomado de Norton, 2009.

2.5.3 Compuestos no proteicos

Además de las toxinas de naturaleza proteica, se han identificado componentes tóxicos no proteicos de bajo peso molecular en especies del phylum Cnidaria. Estos compuestos corresponden a metabolitos secundarios, principalmente terpenos, esteroides, poliéteres y alcaloides (Blunt y col., 2016). Un ejemplo particular de los componentes no proteicos nitrogenados es la serotonina (FIGURA 11A). Este compuesto se ha identificado en altas concentraciones cuando especímenes de hidras (clase Hydrozoa) son estimuladas eléctricamente. La serotonina, aparentemente derivada de los nematocistos, causa dolor instantáneo en las presas y probablemente por esta razón puede tener un rol de defensa (Sher y

Zlotkin, 2009). Además, la vasodilatación generada por la serotonina puede potenciar el efecto de otros componentes del veneno (Sher y Zlotkin, 2009).

Por otro lado, se ha detectado histamina (FIGURA 11B) en tentáculos homogenizados de la *Anemonia viridis* (antes conocida como *Anemonia sulcata*) y en *Actinia equina*. Al igual que la serotonina, la histamina produce dolor agudo e incrementa la permeabilidad vascular (Jouiaei y col., 2015).

A pesar de que estas aminas biógenas no han sido detectadas directamente en nematocistos aislados, es probable que estén involucradas en el envenenamiento ocasionado por los cnidarios; esta es una de las razones por la que se ha recomendado usar antihistamínicos como tratamiento para aliviar los síntomas generados por las picaduras de estos organismos (Burnett, 2009).

La Bunodosina es un N-acil aminoácido que fue purificado a partir del veneno de la anémona de mar *Bunodosoma cangicum*; este compuesto exhibe una potente actividad analgésica por la activación de receptores de serotonina. Su estructura se ilustra en la FIGURA 11C (Zaharenko y col., 2011).

Por otro lado, la Caissarona (FIGURA 11D) es un compuesto derivado de una purina cuaternaria que fue aislado a partir de la anémona de mar *Bunodosoma caissarum* mediante la extracción del cuerpo completo del animal en acetona. Este compuesto de origen marino posee una potente actividad antagonista de los receptores de adenosina, los cuales estimulan la función intestinal en el íleon de cobayo (Cooper y col., 1995).

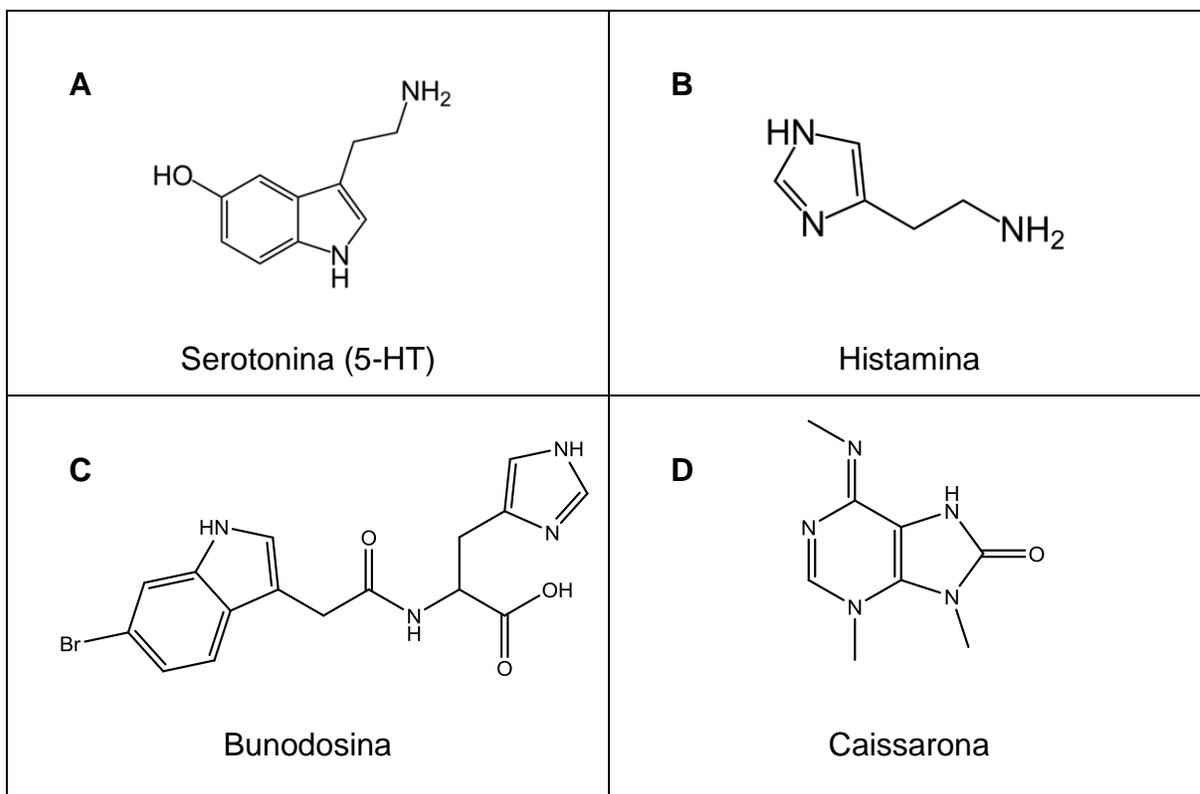


FIGURA 11. Estructura química de compuestos no proteicos identificados en especies del phylum Cnidaria.

Otro grupo importante de compuestos no proteicos que se han identificado en cnidarios son los terpenos, particularmente compuestos diterpenos. La mayoría de los compuestos diterpénicos que se han identificado en el veneno de cnidarios poseen una estructura química similar, con una base carbonada de “cembrano”, el cual consiste en un anillo de 14 carbonos (Ferchmin y col., 2009). En la FIGURA 12A se ilustra la estructura química de un anillo cembrano.

Se ha demostrado que algunos cembranoides actúan sobre receptores de acetilcolina nicotínicos modulando su actividad. La lophotoxina (FIGURA 12B) es un diterpeno que fue aislado por primera vez en 1981 a partir de un coral blando del género *Lophogorgia* que pertenece a la clase Anthozoa (Fenical y col., 1981). Este diterpeno tiene como base estructural un anillo cembrano y posee también un anillo de furano desde C3 a C6 por lo que es encuadrado dentro de los furano-cembranoides. La lophotoxina induce un bloqueo selectivo irreversible de la

transmisión colinérgica ya que se une covalentemente a la subunidad α del receptor de acetilcolina nicotínico (Abramson y col., 1988). Debido a su capacidad de bloquear selectivamente los receptores nicotínicos a nivel del sistema nervioso central, la lophotoxina es una herramienta farmacológica importante para estudiar vías complejas en neurobiología.

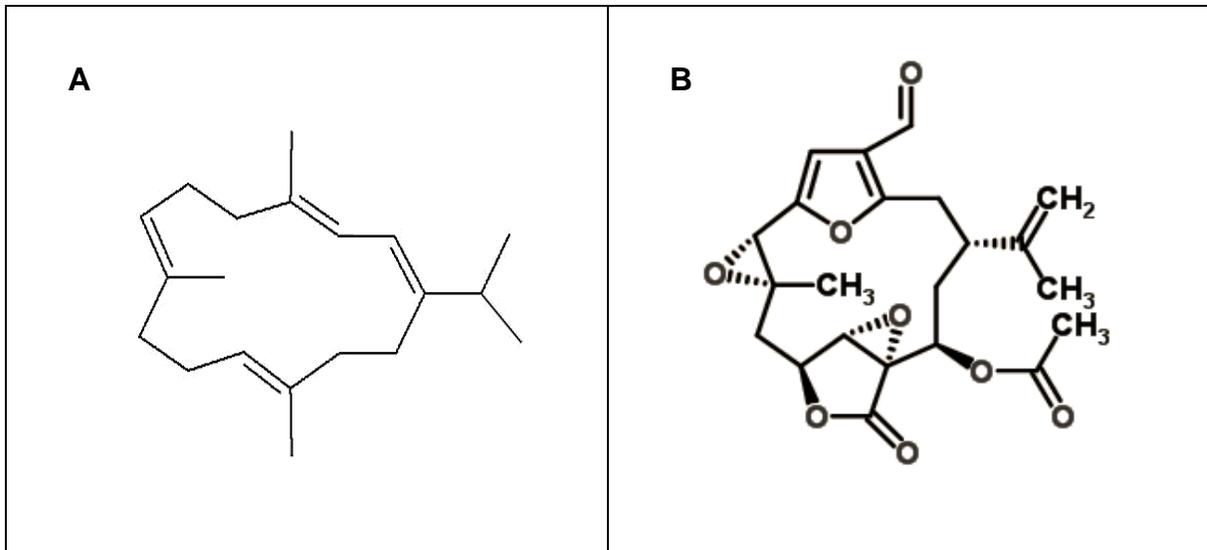


FIGURA 12. Estructura química de un anillo cembrano (A) y de la lophotoxina (B).

Los corales blandos del género *Clavularia* producen el diterpeno Stolonidiol, el cual posee actividad de acetilcolin-transferasa en neuronas cultivadas *in vitro* y podría ser un agente neurotrófico en las neuronas colinérgicas del sistema nervioso (Yabe y col., 2000).

Por otro lado, el compuesto de naturaleza no proteica más tóxico que se ha identificado a partir de un cnidario es la palitoxina, un poliéter de gran tamaño (FIGURA 13) aislado a partir de corales blandos del género *Palythoa*, y que es un potente inhibidor de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa.

La unión de la palitoxina, convierte a la bomba en un poro permeable, ocasionando un influjo de Na^+ y eflujo de K^+ y dando como resultado la despolarización de la

membrana (da Rocha, 2013). Al ser administrada en ratones, produce violentas convulsiones a dosis muy bajas (Wu, 2009).

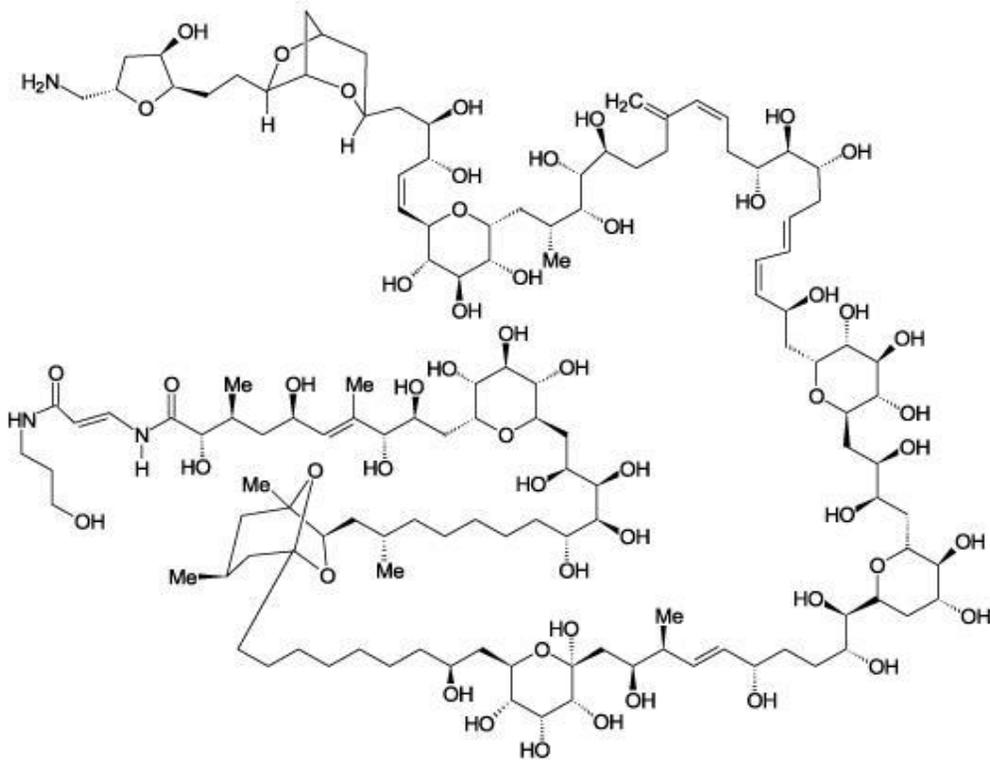


FIGURA 13. Estructura química de la Palitoxina

2.6 El género *Millepora*

Millepora, es el único género de coral de la familia Milleporidae que pertenece a la orden Anthoathecata. Forma parte del grupo de los hidrocorales, ya que pertenece a la clase Hydrozoa. Presentan fase de pólipo y de medusa, a diferencia del resto de corales pertenecientes a la clase Anthozoa (Razak, 2003).

Los hidrocorales del género *Millepora*, son los segundos organismos más abundantes formadores de arrecifes de coral de todo el mundo y son comúnmente denominados “corales de fuego”, debido a que cuando entran en contacto con la piel humana inducen lesiones de aspecto similar a quemaduras, las cuales incluyen escozor, formación de eritema y ampollas (Sagi y col., 1987; Bianchini y col., 1988).

Las especies de este género forman colonias de pólipos que producen exoesqueletos de carbonato de calcio. Su reproducción puede ser asexual o sexual, según la fase morfológica de que se trate (Lewis, 2006).

La superficie del exoesqueleto calcáreo de las especies de *Millepora* se encuentra perforada por múltiples poros microscópicos (0.1 a 0.3 mm de diámetro) (Collins, 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 (Lewis, 2006).



FIGURA 14. Fotografía de *Millepora complanata*, hidrocoral habitual del Mar Caribe.

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

Los nematocistos contenidos en las células de las especies del género *Millepora* son capaces de penetrar la piel humana y descargar sus toxinas produciendo lesiones graves en la piel. Los síntomas locales habituales incluyen: dolor intenso, ardor, eritema, pápulas, vesículas pustulosas, e incluso lesiones ulcero-necrotizantes (Bianchini y col., 1988; Sagi y col., 1987).

Actualmente, no existe un tratamiento adecuado para curar las lesiones graves de la piel humana causadas por los "corales de fuego". Por lo general, el dolor disminuye lentamente y la lesión local, que se mantiene durante un periodo que oscila entre 1-2 semanas, se cura paulatinamente. Sin embargo, existen casos reportados de toxicidad sistémica provocada por especies de este género en humanos (Bianchini y col., 1988; Sagi y col., 1987).

2.8 Estudios bioquímicos y toxinológicos realizados sobre especies del género *Millepora*

En los estudios realizados sobre las toxinas producidas por las especies del género *Millepora*, se ha encontrado que los extractos crudos de *M. tenera* y *M. alcicornis* inducen efectos hemolíticos y dermonecroticos, además de ser muy tóxicos en ratones cuando se administraron por vía intravenosa, causando disnea, convulsiones y la muerte. La dosis letal media (DL₅₀) calculada para los extractos de *M. alcicornis* y *M. tenera* fue de 550 y 330 mg proteína/kg de peso corporal, respectivamente. Los experimentos realizados en ese estudio sugirieron que las toxinas responsables de los efectos tóxicos son proteínas (Middlebrook y col., 1971; Wittle y col., 1971).

En un estudio posterior, se realizó un análisis del extracto de los nematocistos de *M. platyphylla*, mediante cromatografía de filtración en gel y cromatografía de

intercambio iónico. A partir de este análisis se obtuvo una fracción rica en proteínas, con pesos moleculares de 30 a 34 kDa, con actividad hemolítica sobre eritrocitos de humano y actividad de PLA₂. El análisis de esta fracción, mediante cromatografía de intercambio iónico, permitió detectar una proteína con un peso molecular de 32.5 kDa como componente mayoritario, que se denominó Milleporina-1. Esta fracción presentó actividad hemolítica y de fosfolipasa A2 (Radwan y col., 2004).

En un estudio más 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 (CE₅₀ = 79 ng/ml), indujo hemaglutinación en una suspensión de 0.8 % de eritrocitos de oveja (0.2 µg de proteína/ml) y fue letal al administrarse en cangrejos con una DL₅₀ = 106 µg/kg (Iguchi y col., 2008).

Por otra parte, los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo sobre *M. complanata*, demostraron que el extracto acuoso de este hidrocoral produce estimulación en las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo (Rojas y col., 2002) y en el músculo liso arterial de rata, además presenta actividad hemolítica y de PLA₂ (Ibarra y col., 2007).

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 (Ibarra-Alvarado y col., 2007).

Por otro lado, se encontró que al desnaturalizar el contenido proteico del extracto acuoso de *M. complanata*, éste conservó sus efectos letales a la dosis más alta

evaluada (5.33 μg proteína/g peso corporal), pero perdió su capacidad para inducir la muerte tardía y los daños histopatológicos. Estos resultados indicaron que *M. complanata* produce, por un lado, toxinas termoestables que inducen efectos neurotóxicos provocando la muerte inmediata en ratones y por otro lado toxinas termolábiles que inducen la muerte tardía causada por los daños histopatológicos (García-Arredondo y col., 2015).

3 JUSTIFICACIÓN

Los estudios toxicológicos, químicos y farmacológicos realizados a la fecha sobre *Millepora complanata* indican que este hidrocoral representa una valiosa fuente potencial de nuevas moléculas bioactivas, ya que se ha evidenciado que produce compuestos con diferentes efectos tóxicos y farmacológicos. 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 los corales de fuego y se tiene poca información sobre su mecanismo de acción.

Los estudios bioquímicos y farmacológicos realizados sobre el extracto acuoso de *M. complanata* han permitido detectar la presencia de toxinas de peso molecular superior a 15 kDa que provocan daños en las membranas de eritrocitos, células renales y pulmonares; también se ha detectado la presencia de citolisinas que poseen actividad de fosfolipasa A2 y compuestos que modifican la excitabilidad membranal del músculo liso intestinal y arterial. Sin embargo, a la fecha no se ha realizado ningún estudio sobre los compuestos de bajo peso molecular (menores a 10 kDa) que, en estudios previos, han sido detectados en el extracto acuoso de este hidrocoral y que probablemente son los responsables de los efectos neurotóxicos y letalidad en ratones.

Los hallazgos anteriormente descritos constituyen un evidente punto de partida para continuar con los estudios químicos y farmacológicos de las toxinas producidas por este hidrocoral, ya que éstas representan fuentes potenciales de compuestos bioactivos que pueden ser útiles como prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos y herramientas biotecnológicas o de investigación. Adicionalmente, el conocimiento de la estructura química y la actividad biológica de las toxinas producidas por los organismos del género *Millepora*, permitiría el diseño de un tratamiento adecuado para tratar las lesiones originadas por estos hidrocorales así como comprender la biología de estos organismos y de manera

complementaria, pero no menos importante, el diseño de estrategias para su protección ambiental, dado que los hidrocorales del género *Millepora* (clase Hydrozoa) son los segundos organismos formadores de arrecifes de coral más abundantes en los mares tropicales del mundo.

4 HIPÓTESIS

El extracto acuoso del hidrocoral *Millepora complanata* contiene compuestos de bajo peso molecular con actividad neurotóxica y letal.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la composición química y la actividad biológica de la fracción de bajo peso molecular obtenida a partir del extracto acuoso del hidrocoral *Millepora complanata*

5.2 Objetivos específicos

- A. Obtener la fracción que contiene los compuestos de bajo peso molecular (<10 kDa) a partir del extracto acuoso de *Millepora complanata*
- B. Analizar el perfil proteico del extracto acuoso de *M. complanata* y determinar el punto isoelectrico y peso molecular de los componentes de bajo peso molecular (<10 kDa)
- C. Analizar, mediante técnicas cromatográficas, la fracción de bajo peso molecular y determinar la estructura química de los componentes mayoritarios
- D. Evaluar los efectos farmacológicos y toxicológicos de la fracción de bajo peso molecular

6 METODOLOGÍA

6.1 Obtención de los especímenes de *M. complanata*

En noviembre de 2015, se colectaron fragmentos del hidrocoral *Millepora complanata*, mediante inmersiones de buceo a profundidades de 5 a 10 m en arrecifes de coral situados en la zona de la “Bocana chica” ubicada en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo. Una vez colectado, el material se congeló y se transportó al Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la UAQ.

6.2 Obtención del extracto acuoso de *M. complanata*

La descarga de los nematocistos del hidrocoral se indujo mediante agitación de los fragmentos en agua desionizada (pH 7) durante 21 h a 4 °C. El extracto resultante se centrifugó a 12,500 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se separó y fue sometido a un segundo ciclo de centrifugación. El sobrenadante final obtenido se filtró a través de acrodiscos de 0.45 µm de poro, se liofilizó y se almacenó a -70 °C. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976).

6.3 Perfil proteico del extracto acuoso de *M. complanata*, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A partir del extracto acuoso de *M. complanata* se realizaron análisis electroforéticos en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras y condiciones reductoras (utilizando β-mercapto etanol como agente reductor), empleando el método convencional de Laemmli (Laemmli, 1970).

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 14 % empleando “Tris-glicina” como amortiguador de corrida; estos geles se corrieron a 120 V durante aproximadamente 2 h. Las bandas de proteína se visualizaron mediante la técnica de tinción de Coomassie. Para la determinación de los pesos moleculares relativos

de las proteínas presentes en las muestras, se utilizaron estándares preteñidos de amplio espectro (Bio-Rad, cat #161-0318).

6.4 Perfil proteico del extracto acuoso de *M. complanata*, mediante electroforesis bidimensional

El perfil proteico del extracto acuoso de *M. complanata* se obtuvo mediante electroforesis bidimensional, de acuerdo al protocolo de iniciación “ReadyPrep 2-D starter kit” (Bio-rad, cat #163-2105). Previamente, la muestra del extracto acuoso de *M. complanata* (150 µg de proteína) se sometió a un proceso de limpieza utilizando el kit “Readyprep 2D clean up Kit” (Bio-Rad, cat. # 163-2130).

La muestra limpia se disolvió en un volumen de 125 µL de “buffer” de rehidratación bajo condiciones reductoras (urea 8 M, CHAPS 2%, ditiotretitol 0.2% y anfolitos 3/10 0.5%). Se emplearon tiras IPG de 7 cm con un rango lineal de pH de 3-10 (Bio-Rad, Cat #163-2001).

Posteriormente, la muestra se aplicó en las tiras IPG y éstas se colocaron en el equipo “Protean i12 IEF system”, en el cual se programó la rehidratación activa a 12 h bajo una corriente constante de 50 V.

Al término de la rehidratación, se inició con la primera dimensión: el isoelectroenfoco (IEF), la cual se llevó a cabo programando el equipo bajo las siguientes condiciones:

Etapas	Voltaje	Gradiente	Corriente (mA)	Tiempo	Unidades
1	250	Lineal	50	0:20	HH:MM
2	4000	Lineal	50	2:00	HH:MM
3	4000	Rápido	50	10000	Volt hr
4	500	Sostenido	50		

Después del isoelectroenfoco, las tiras IPG se lavaron durante 10 minutos con el buffer de equilibrio 1 (Urea 6M, SDS 2%, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, glicerol 20%,

DTT 2%) y 10 minutos con el buffer de equilibrio 2 (urea 6M, SDS 2%, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, glicerol 20%). Para el análisis de la segunda dimensión, se utilizó un gel de poliacrilamida al 14 %, empleando “Tris-glicina” como amortiguador de corrida. La electroforesis se realizó a un voltaje de 150 V a 4°C. Una vez finalizada la corrida de la muestra, los geles obtenidos se lavaron tres veces con agua destilada durante 15 min. Los “spots” de proteína se visualizaron mediante la técnica de tinción de Coomassie (Coomassie G-250) (Bio-Rad, cat #161-0787).

6.5 Ultrafiltración del extracto acuoso de *M. complanata*

A partir del extracto acuoso liofilizado de *M. complanata* se preparó una solución con agua ultrapura a una concentración de 150 mg/mL. La solución obtenida se centrifugó a 12,500 rpm durante 30 minutos y se filtró por acrodiscos de 0.45 µm de poro. Posteriormente, se llevó a cabo el fraccionamiento del extracto acuoso mediante ultrafiltración usando dispositivos Amicon® Ultra-2mL (Millipore) con punto de corte nominal de peso molecular de 10 kDa. Se centrifugaron alícuotas de 1.5 mL de la solución preparada a 6,000 rpm durante 90 minutos (Greening y col., 2010).

Posteriormente, se cuantificó el contenido de proteína de la solución filtrada correspondiente a la fracción de bajo peso molecular (FBPM), se liofilizó y se almacenó a -70°C.

6.6 Detección de aminas biógenas en la FBPM, mediante cromatografía en capa fina

La FBPM se analizó mediante cromatografía en capa fina. Se emplearon placas de celulosa (20 cm x 4 cm x 0.1 mm), como fase estacionaria (Merck, Germany) y una mezcla de n-butanol, ácido acético glacial y agua (1:1:1). La FBPM (10 mg/mL) se sembró en un carril de la placa, y adicionalmente se sembraron las aminas biógenas serotonina e histamina como controles positivos. La elución se llevó a cabo en cámaras cromatográficas y se usó ninhidrina como revelador. Las placas se secaron en un plato calentador a 105°C.

6.7 Separación de los componentes de la FBPM por cromatografía de exclusión molecular

La FBPM obtenida mediante ultrafiltración del extracto acuoso de *M. complanata*, fue sometida a un fraccionamiento por cromatografía de filtración en gel, utilizando un sistema de FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare, USA). La muestra se eluyó en una columna de exclusión molecular pre-empaquetada de alta resolución (Superdex™ Peptide 10/300 GL) con ácido acético 0.05 M a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min y la detección se realizó a una longitud de onda de 280 nm. En cada inyección, se aplicaron 50 mg de la FBPM en un volumen de inyección de 500 µL del eluyente. Las subfracciones obtenidas se concentraron por liofilización y se almacenaron a -70°C.

6.8 Análisis de la FBPM y la subfracción MC2, mediante HPLC en fase reversa

Tanto la FBPM como las sub-fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular, fueron analizadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase reversa, usando un sistema cromatográfico (Waters®). Se utilizó una columna de separación analítica C18 (Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6 × 150 mm; 3.5 µm diámetro de partícula) bajo las siguientes condiciones: durante los primeros 10 minutos, la muestra se eluyó isocráticamente con la solución A y después se inició un gradiente lineal que va desde un 100% de A hasta un 100% de B. La solución A consistió de 0.1 % de ácido trifluoroacético en agua y la solución B de 0.09% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo al 90%.

En cada elución, se inyectaron 20 µL de la muestra a una concentración de 10 mg/mL.

6.9 Análisis de la FBPM por espectrometría de masas MALDI-TOF

La FBPM, obtenida mediante ultrafiltración del extracto acuoso de *M. complanata*, fue analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF. A 5 µg de la fracción liofilizada se le adicionaron 5 µL de una solución saturada de ácido sinapínico

(>99.0% pureza para MALDI-MS, Sigma, St. Louis, MO, USA). 1 μ L de esta solución fue introducida dentro de una placa para MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente. El espectro se registró en modo lineal positivo en un espectrómetro de masas (Bruker Microflex Daltonics, Bremen, Germany) con un láser de nitrógeno a $\lambda = 337$ nm y un voltaje de aceleración de 20 kV. (Lazcano-Pérez y col., 2016).

6.10 Evaluación de la contractilidad de la musculatura lisa intestinal en un modelo de íleon aislado de cobayo

Se determinó el efecto del extracto acuoso de *M. complanata*, de la FBPM y de la subfracción MC2, sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. Se utilizaron cobayos machos de entre 500 y 850 g, los cuales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente después 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 fue lavada con solución de Krebs-Henseleit. Después de limpiar los tejidos, se cortaron segmentos de 1 cm aproximadamente, los cuales se montaron en celdas que contenían la solución de Krebs-Henseleit gasificada constantemente con 95% de O₂ y 5% de CO₂. Las contracciones espontáneas de cada tejido aislado se registraron isométricamente por medio de transductores de fuerza acoplados a un polígrafo de 4 canales. Todos los tejidos montados se ajustaron a una tensión basal de 10 mN. Después de un tiempo de estabilización de 30 min, se registró un periodo control de 10 min y después de este tiempo, se aplicó la muestra disuelta en agua desionizada en concentraciones de 10, 31.6, 100, 316, 500 y 1000 μ g/mL.

Se registró el efecto tanto del extracto acuoso, como de las fracciones obtenidas, sobre las contracciones espontáneas del íleon por un periodo de 10 minutos aproximadamente. La magnitud de la respuesta de los efectos contráctiles se

determinó comparando la fuerza de la contracción de la muestra, con la del control positivo (acetilcolina 10 μ M).

Con el fin de comparar la fuerza de contracción del extracto acuoso con las de la FBPM y de la subfracción MC2, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía seguido de una prueba de Tuckey, con ayuda del programa PRISMA 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Se consideraron significativas aquellas diferencias con $p \leq 0.05$.

6.11 Evaluación de la toxicidad aguda en ratones

Se evaluó la letalidad en ratones de distintas dosis tanto del extracto acuoso de *M. complanata*, así como de la FBPM, obtenida mediante ultrafiltración. La administración de las muestras se llevó a cabo por vía intravenosa (en la vena caudal de los ratones). Se utilizaron ratones machos CD1 de un peso aproximado de 30 g. Cada dosis fue resuspendida en 100 μ l de solución salina fisiológica esterilizada (NaCl al 0.9 %). Se registró el tiempo en que ocurrieron las muertes de los ratones después de la administración de la muestra y se utilizó el método de Probit para determinar la dosis letal media (DL_{50}) tanto del extracto acuoso, como de las fracciones evaluadas.

6.12 Evaluación de los daños histopatológicos

A partir de los ratones empleados en el ensayo de toxicidad aguda se extrajeron inmediatamente después de la muerte, los pulmones, los riñones, el hígado y el cerebro, los cuales se fijaron en una solución de formol al 10 % durante 2 días a 4 °C. Se realizaron diferentes cortes histológicos de estos órganos. Después, los cortes se colocaron en laminillas y se almacenaron en formol al 10% durante 12 horas a 4°C. Las muestras de los diferentes tejidos se deshidrataron utilizando concentraciones graduales de alcohol etílico en agua (70, 80, 90 y 96 %), para después embeberlas en parafina. Se realizaron cortes de 5 a 6 μ m mediante un

microtomo, los cuales fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina-eosina y se examinaron con un microscopio de luz.

7 RESULTADOS

7.1 Obtención del extracto acuoso de *M. complanata*

En noviembre de 2015, se realizó la colecta de los especímenes de *M. complanata* en la zona de la “Bocana chica” ubicada en Puerto Morelos, Q. Roo, México. A partir de un kilogramo del hidrocoral, se obtuvieron finalmente 7.6 g de extracto acuoso liofilizado. Mediante la determinación de proteínas por el método de Bradford se obtuvo que cada miligramo de extracto acuoso liofilizado contiene 21.5 µg de proteína.

7.2 Perfil proteico del extracto acuoso de *M. complanata*, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio

El extracto acuoso de *M. complanata* se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras y no reductoras, utilizando los métodos convencionales previamente descritos (Laemmli, 1970). La FIGURA 15 muestra el perfil proteico del extracto acuoso de *M. complanata*; el carril “A” corresponde al perfil obtenido bajo condiciones no reductoras. En este carril se aprecian bandas entre 11 kDa y 200 kDa, e incluso se observan algunas bandas de más de 200 kDa. En el carril “B” se observa el perfil proteico obtenido mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, usando β-mercapto etanol como agente reductor, en el cual únicamente se observan bandas con peso molecular relativo menor a 100 kDa. Así mismo se observan dos bandas en el rango de 1 a 10 kDa que no aparecen en el perfil obtenido bajo condiciones no reductoras. Estas bandas tienen un peso molecular relativo de 7 y 9 kDa respectivamente.

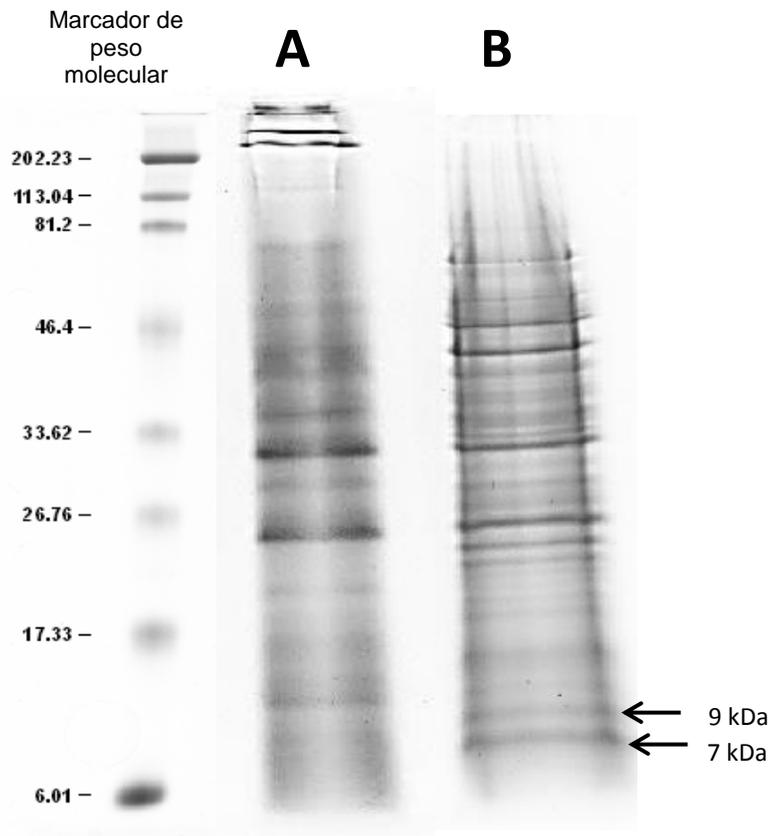


FIGURA 15. SDS-PAGE del extracto acuoso de *M. complanata* (60 µg proteína) en gel de poliacrilamida al 14% usando tris-glicina como amortiguador de corrida. Del lado izquierdo se observa el marcador de peso molecular de amplio rango; el carril A corresponde a la SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y el carril B al perfil proteico del extracto acuoso de *M. complanata* bajo condiciones reductoras. Las bandas de proteína fueron visualizadas con tinción de Coomassie.

7.3 Perfil proteico del extracto acuoso de *M. complanata* mediante electroforesis bidimensional

El perfil proteico del extracto acuoso de *M. complanata* se obtuvo también mediante electroforesis bidimensional.

El perfil proteico obtenido bajo condiciones reductoras se muestra en la FIGURA 16. Se observa que la mayoría de los “spots” de proteínas están concentrados en el rango de punto isoeléctrico entre 5 y 7.5 y en un rango de peso molecular entre 14 y 80 kDa. Sin embargo, se observan 2 “spots” de 7 y 9 kDa respectivamente, los cuales tienen un punto isoeléctrico aproximado de 6.

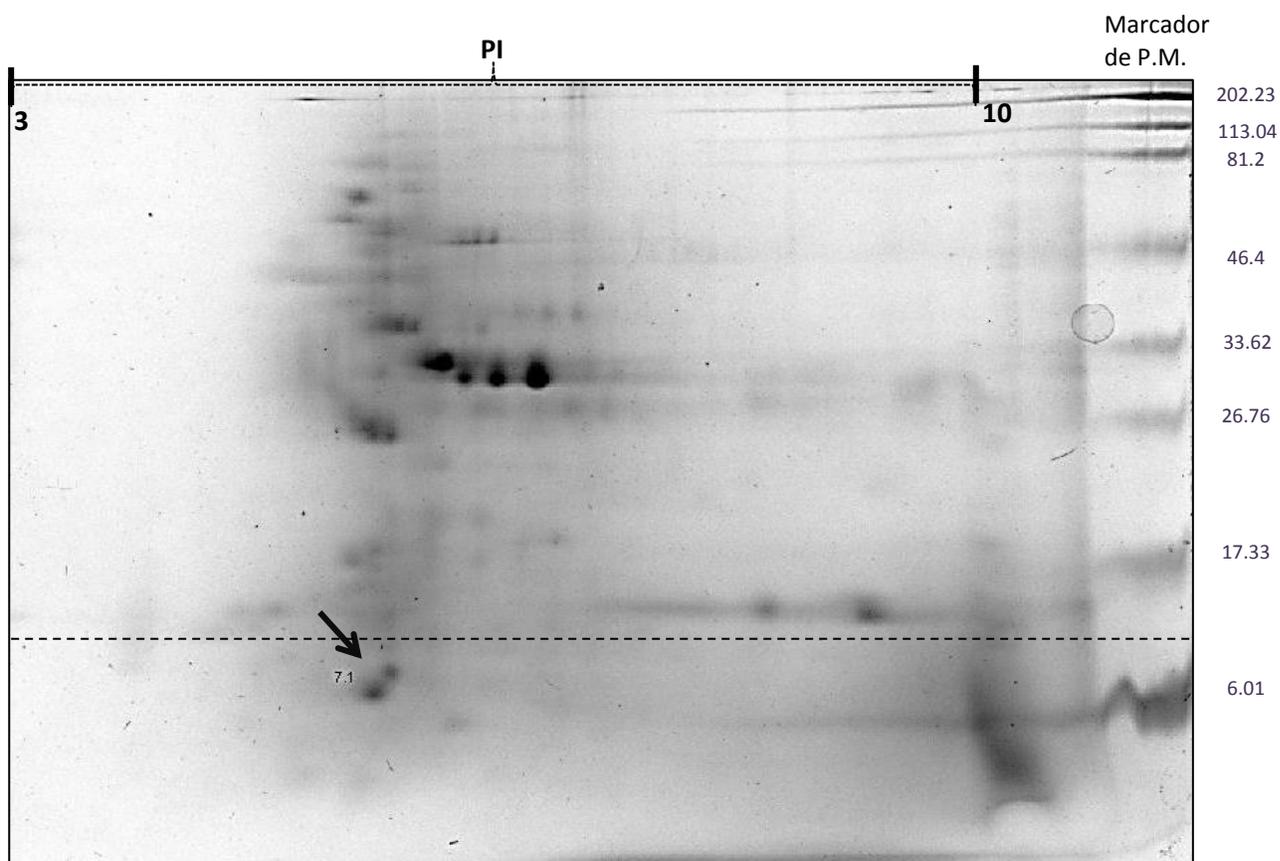


FIGURA 16. Perfil electroforético bidimensional del extracto acuoso de *M. complanata* (150 µg proteína), obtenido bajo condiciones reductoras. Los spots de proteína fueron visualizados con tinción de Coomassie. Los pesos moleculares se determinaron, mediante el uso de un marcador estándar de peso molecular de amplio espectro.

7.4 Fraccionamiento del extracto acuoso de *M. complanata*

7.4.1 Ultrafiltración

Con la finalidad de obtener la FBPM (<10 kDa), se llevó a cabo la ultrafiltración del extracto acuoso de *M. complanata*, usando dispositivos Amicon® Ultra-2mL (Millipore) con punto de corte nominal de peso molecular de 10 kDa. A partir de 2 g de extracto acuoso liofilizado se obtuvieron 1.76 g de la fracción de bajo peso molecular liofilizada, lo que corresponde a un rendimiento final del 88%. Posteriormente, se cuantificó el contenido de proteína de esta fracción por el método colorimétrico de Bradford, obteniendo que cada miligramo de la fracción liofilizada contiene 0.5 microgramos de proteína. En la FIGURA 17 se muestran las

fracciones de alto peso molecular y bajo peso molecular, obtenidas después de la ultrafiltración del extracto.

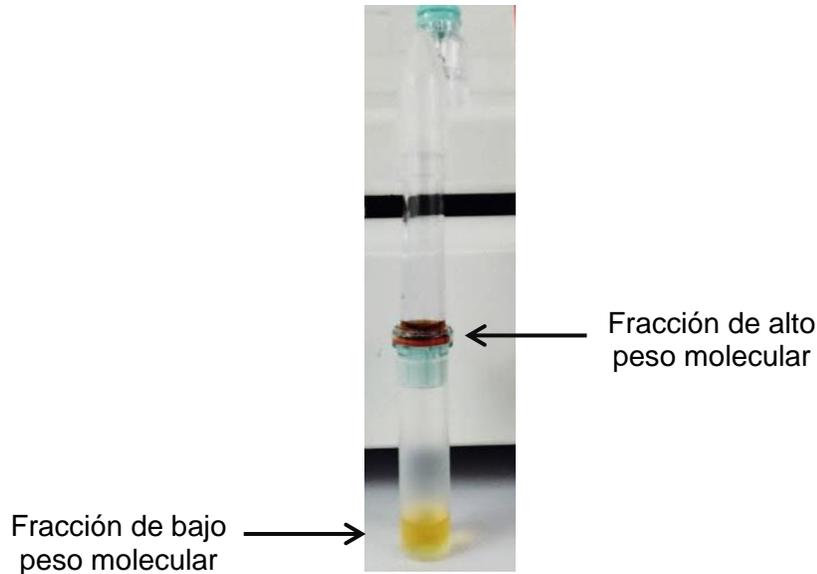


FIGURA 17 Fracciones obtenidas mediante ultrafiltración del extracto acuoso de *M. complanata*

7.4.2 Cromatografía en capa fina

Con la finalidad de detectar la presencia de aminas biógenas en la FBPM se realizó un análisis de esta fracción mediante cromatografía en capa fina, utilizando ninhidrina como revelador para la detección de grupos amino terminales (NH_2). En la FIGURA 18 se ilustra el cromatograma de la FBPM en el cual se detectaron compuestos que contienen en su estructura este grupo funcional.

FIGURA 18. Cromatograma de la FBPM, obtenido mediante cromatografía en capa fina.

Se emplearon placas de celulosa como fase estacionaria y como sistema de elución una mezcla de ácido acético, n-butanol y agua (1:1:1). Las muestras corresponden a: A) Histamina, B) Serotonina y C) FBPM y fueron reveladas con ninhidrina.



7.4.3 Cromatografía de exclusión mediante FPLC

La FBPM obtenida mediante la ultrafiltración del extracto acuoso de *M. complanata*, se analizó mediante cromatografía de exclusión molecular en un sistema FPLC, empleando como fase estacionaria una columna de separación con límites de exclusión entre 100 Da y 7 kDa y ácido acético 0.5 M como fase móvil. Este análisis cromatográfico condujo a la obtención de tres subfracciones (MC1, MC2 y MC3). El rendimiento obtenido de cada una de las subfracciones fue el siguiente:

MC1= 6.5%, MC2= 74% y MC3= 7.8%. En la FIGURA 19 se muestra el perfil cromatográfico para el fraccionamiento de la FBPM.

De acuerdo a las especificaciones relativas a la capacidad de exclusión de la columna, los rangos aproximados de peso molecular correspondientes a MC1, MC2 y MC3 son: 1-4 kDa, 0.5-1 kDa y <0.5 kDa, respectivamente.

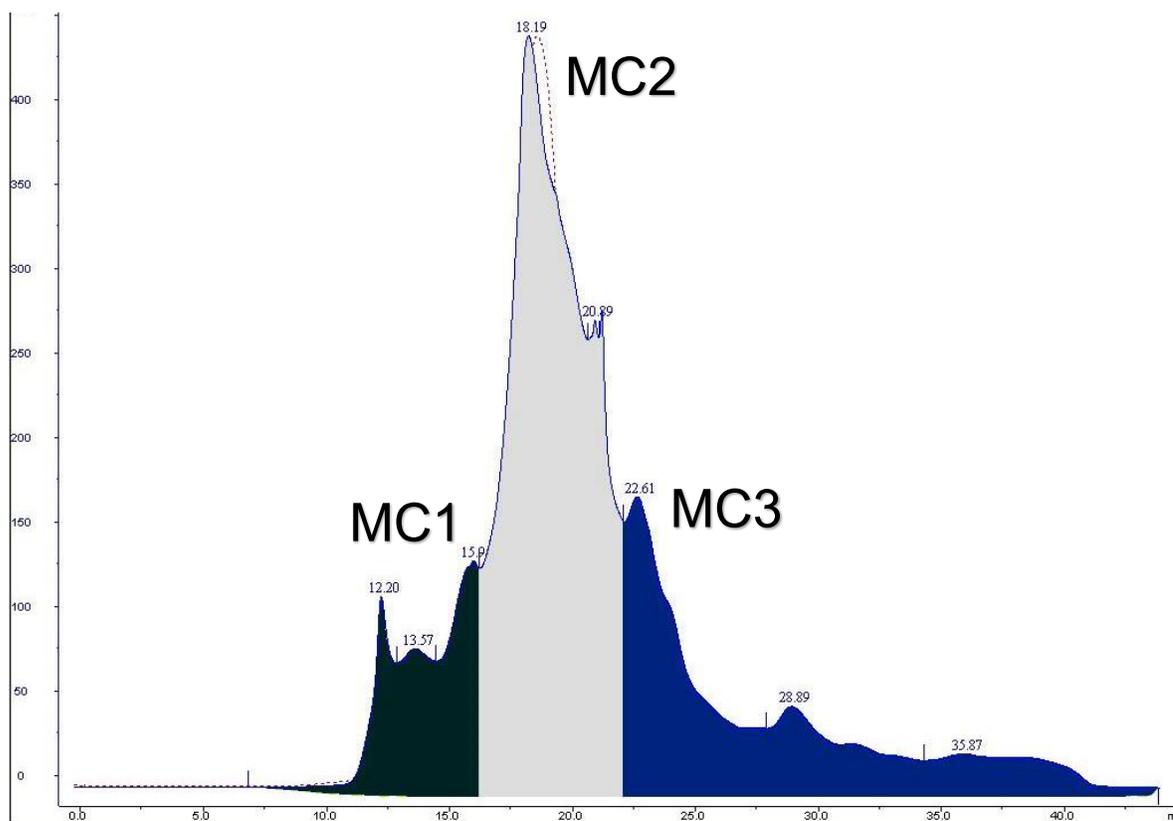


FIGURA 19. Cromatograma de la FBPM, obtenido mediante cromatografía de exclusión molecular.

7.4.4 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa

La FBPM, así como la subfracción MC2, se analizaron mediante cromatografía líquida de adsorción, en un sistema de HPLC en fase reversa.

Los compuestos de ambas fracciones eluyen durante un tiempo total de 30 minutos.

La mayoría de los componentes de la FBPM presenta su máxima absorbancia a una longitud de onda entre 210 y 220 nm. Al obtener el espectro de absorción UV de cada uno de los compuestos del cromatograma (A-M), se observó que algunos de ellos también absorben ligeramente a una longitud de onda de ≈ 280 nm, como es el caso del pico M (23.71 min) el cual presenta su máxima absorbancia a 219.2 nm, como se ilustra en la FIGURA 20.

La FIGURA 21 ilustra el perfil cromatográfico de la FBPM a $\lambda=210$ nm, en el que se han señalado los 13 picos con mayor absorbancia, los cuales se identificaron con las letras A-M.

En el CUADRO 3 se enlistan los 13 picos detectados, así como su tiempo de retención y su longitud de máxima absorbancia.

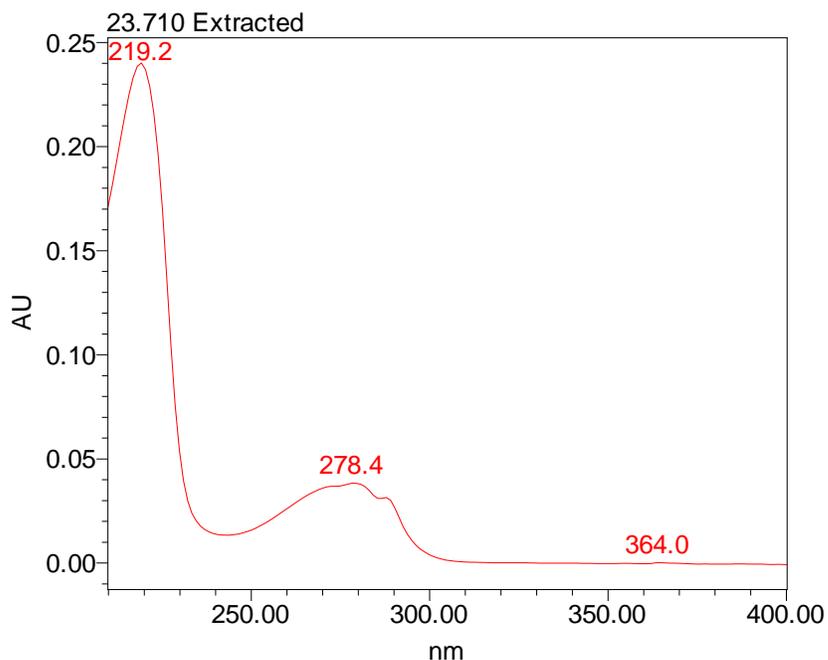


FIGURA 20. Espectro de absorción de UV del compuesto M (23.71 min).

El perfil cromatográfico de la FBPM, obtenido a una longitud de onda de 280 nm, muestra algunos cambios en comparación al perfil obtenido a 210 nm. La absorbancia de los compuestos se ve disminuida considerablemente a $\lambda = 280$ nm. Además, a esta longitud de onda se observan 2 picos de 7.6 min y 8.1 min de tiempo de retención que se nombraron como X y Z (FIGURA 22).

Por otro lado, el perfil cromatográfico de la subfracción MC2, obtenido a una longitud de onda de 210 nm (FIGURA 23), es similar al de la FBPM; los picos A, D, I y K, se conservan en ambas longitudes de onda; sin embargo, algunos de los picos observados en el perfil de la FBPM desaparecen en el perfil de la subfracción MC2 (Picos B, C, E y L), mientras que otros como F, G, H, J y M, disminuyen considerablemente en su intensidad.

Al igual que en la FBPM, los componentes de la subfracción MC2 absorben mayoritariamente a una longitud de onda de 210 nm y algunos de ellos también absorben a 280 nm. La FIGURA 24 muestra el cromatograma de la subfracción MC2 obtenido a una longitud de onda de 280 nm.

En la FIGURA 25, se muestra una comparación de los cromatogramas de la FBPM y la subfracción MC2 a 210 nm y en la FIGURA 26 se ilustra el comparativo de ambas fracciones a una longitud de onda de 280 nm.

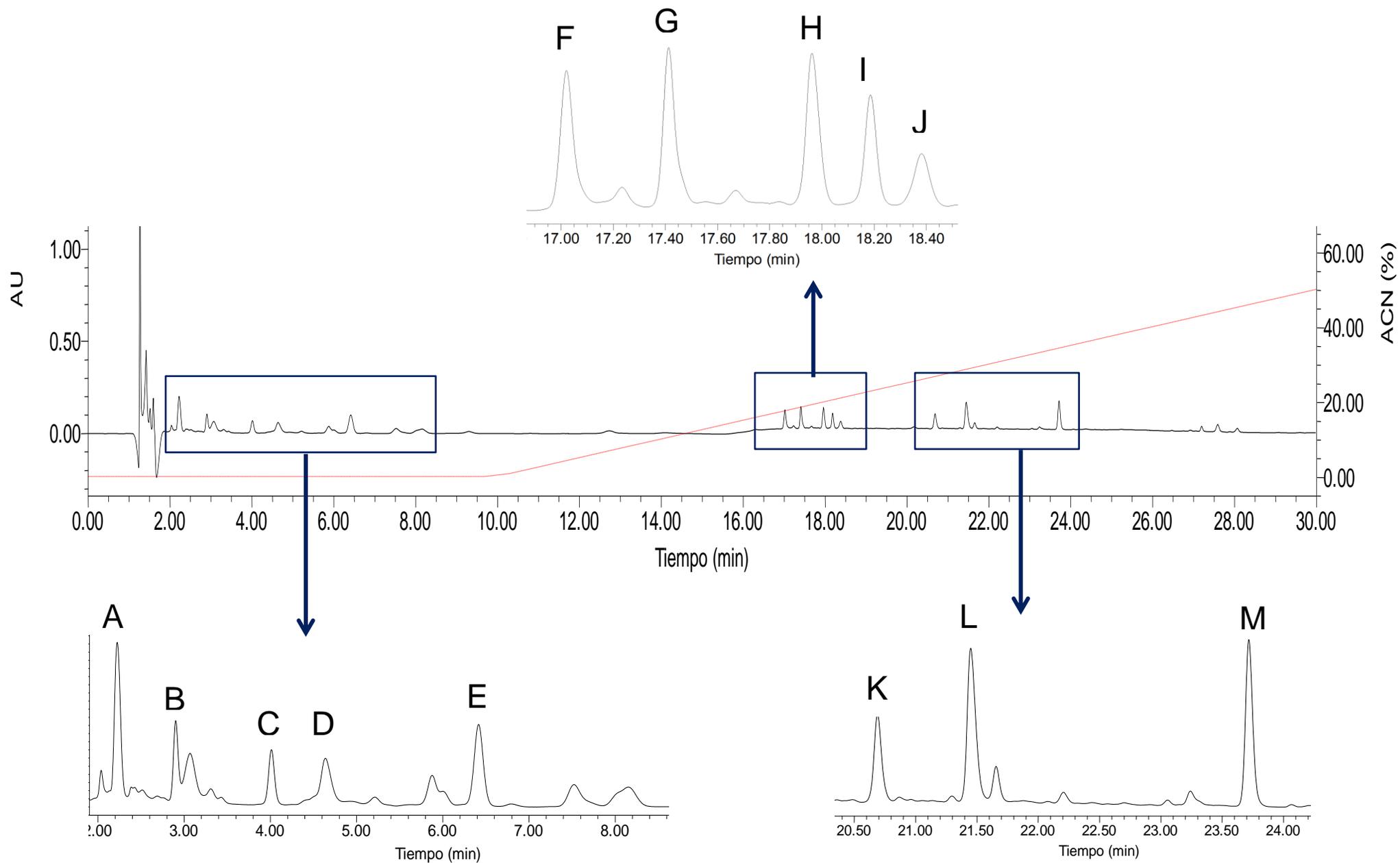


FIGURA 21. Cromatograma de la FBPM, obtenido mediante HPLC en fase reversa a $\lambda=210$ nm
El cromatograma se dividió en 3 rangos de tiempo.

PICO	Tiempo de elución (min)	Absorbancia $\lambda = 210 \text{ nm}$	Longitud de onda de máxima absorbancia (nm)
A	2.24	0.198	220
B	2.89	0.107	210
C	4.07	0.088	210
D	4.62	0.068	210
E	6.40	0.101	210
F	17.02	0.129	210
G	17.41	0.146	210
H	17.96	0.142	210
I	18.19	0.111	210
J	18.38	0.067	210
K	20.69	0.107	210
L	21.45	0.169	210
M	23.72	0.177	219

CUADRO 3. Componentes mayoritarios de la FBPM, detectados de $\lambda=210 \text{ nm}$.

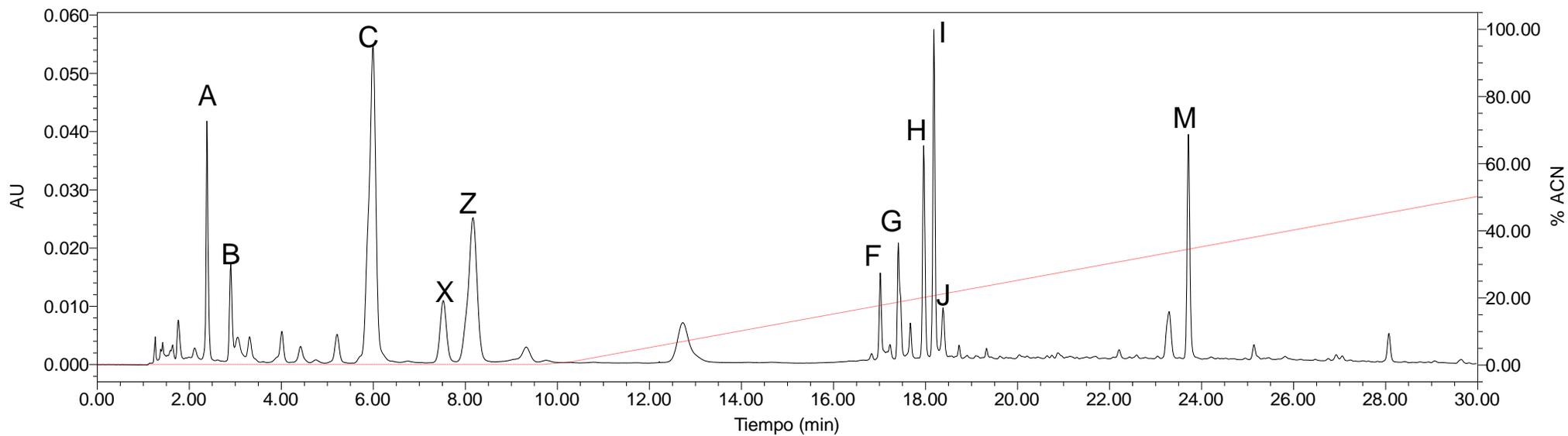


FIGURA 22. Cromatograma de la FBPM, obtenido mediante HPLC en fase reversa a $\lambda=280$ nm.

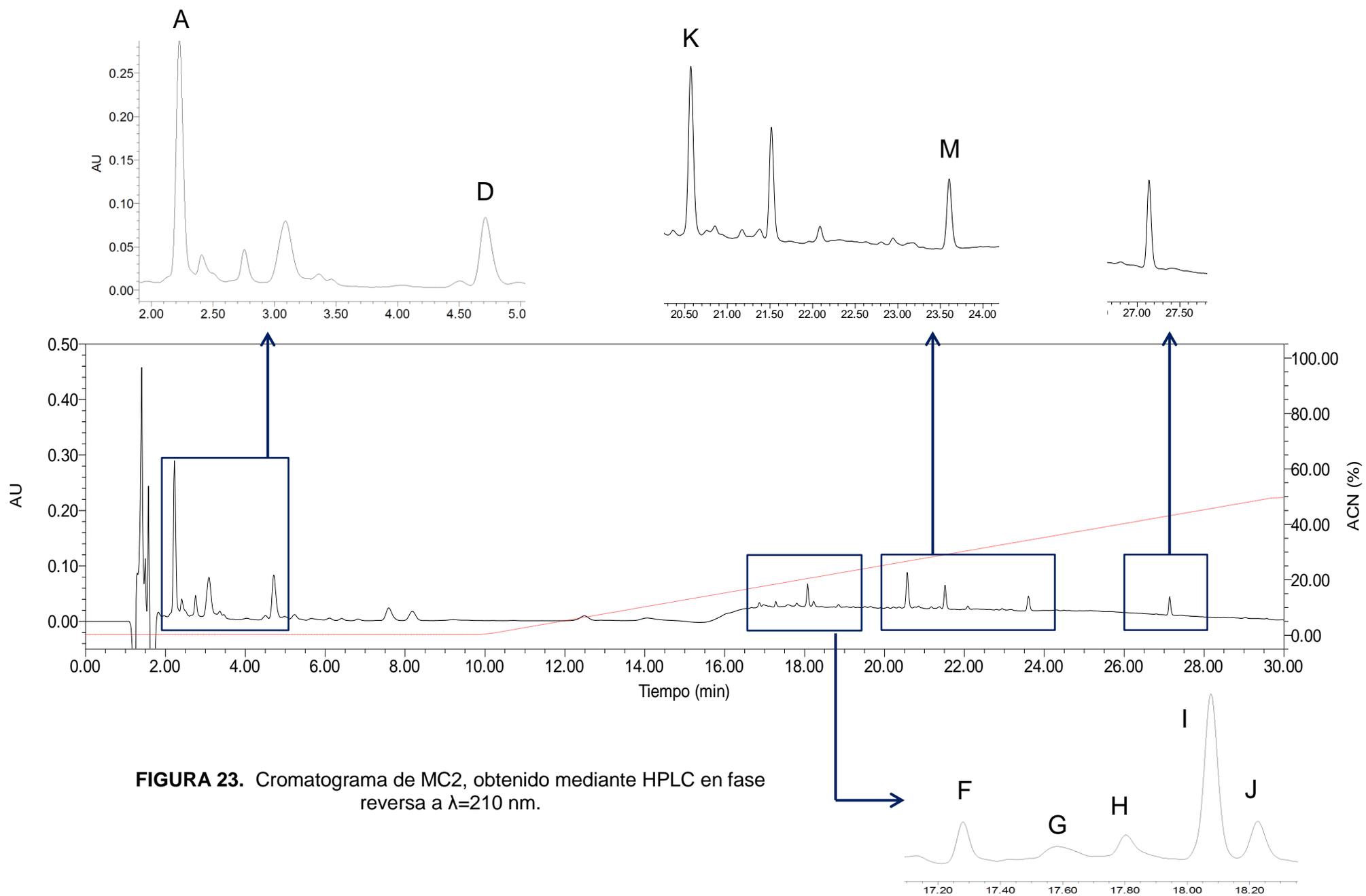


FIGURA 23. Cromatograma de MC2, obtenido mediante HPLC en fase reversa a $\lambda=210$ nm.

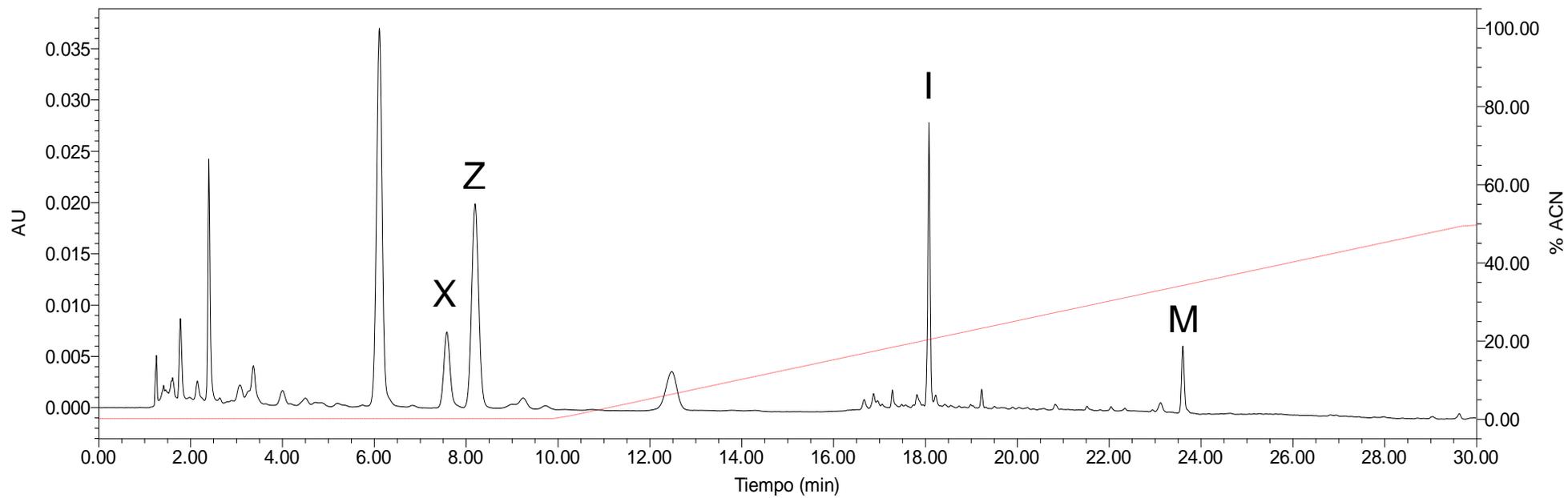


FIGURA 24. Cromatograma de MC2, obtenido mediante HPLC en fase reversa a $\lambda=280$ nm.

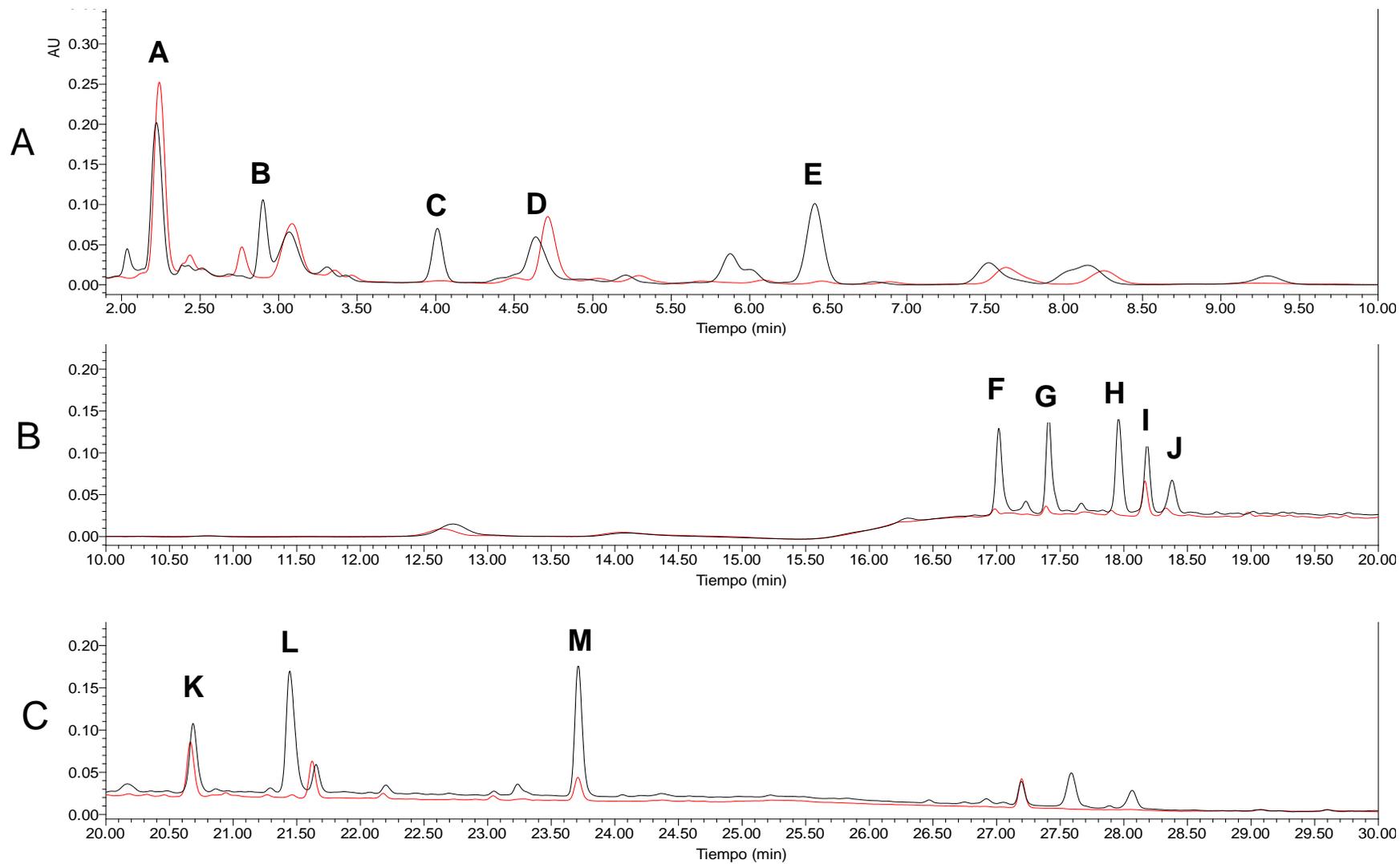


FIGURA 25. Comparación del cromatograma de la FBPM con el de MC2 a $\lambda=210$ nm. El cromatograma de la FBPM está representado con línea negra y el de MC2 con línea roja. Se ha dividido el perfil obtenido, en tres rangos de tiempo: A) de 2 a 10 min, B) de 10 a 20 min y C) de 20 a 30 min.

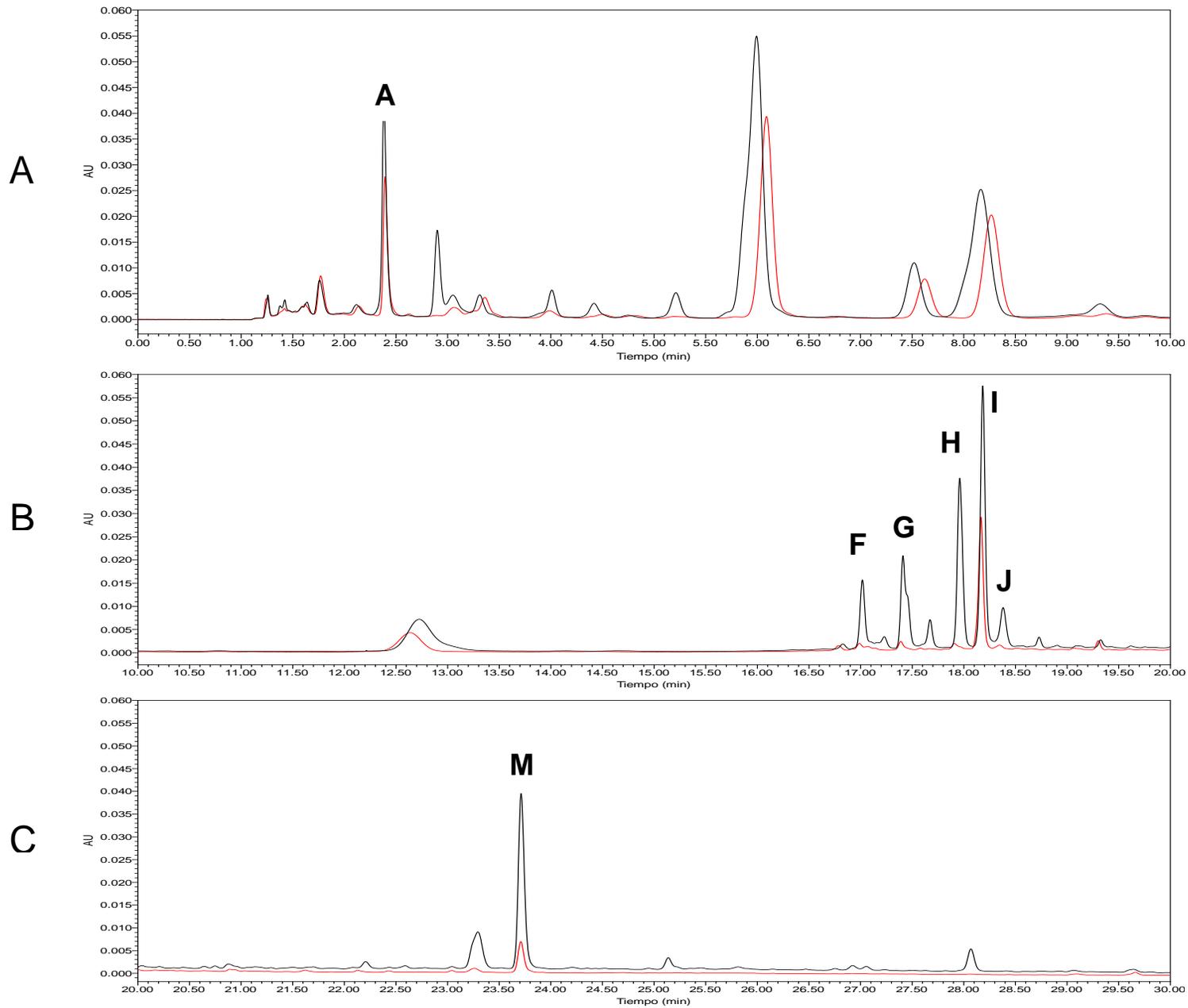


FIGURA 26. Comparación del perfil de elución de la FBPM con el de MC2 a $\lambda=280$ nm. El cromatograma de la FBPM está representado con línea negra y el de MC2 con línea roja. El perfil obtenido, se dividió en tres rangos de tiempo: A) de 0 a 10 min, B) de 10 a 20 min y C) de 20 a 30 min.

7.4.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La FBPM fue analizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. El espectro fue grabado en modo lineal positivo por medio de pulsos directos con láser de nitrógeno. En la FIGURA 27 se muestra el espectro obtenido mediante el análisis espectrométrico, en el cual se observan señales abundantes de intensidad débil entre 1,500 y 3,200 m/z y una señal intensa de 3,432 m/z.

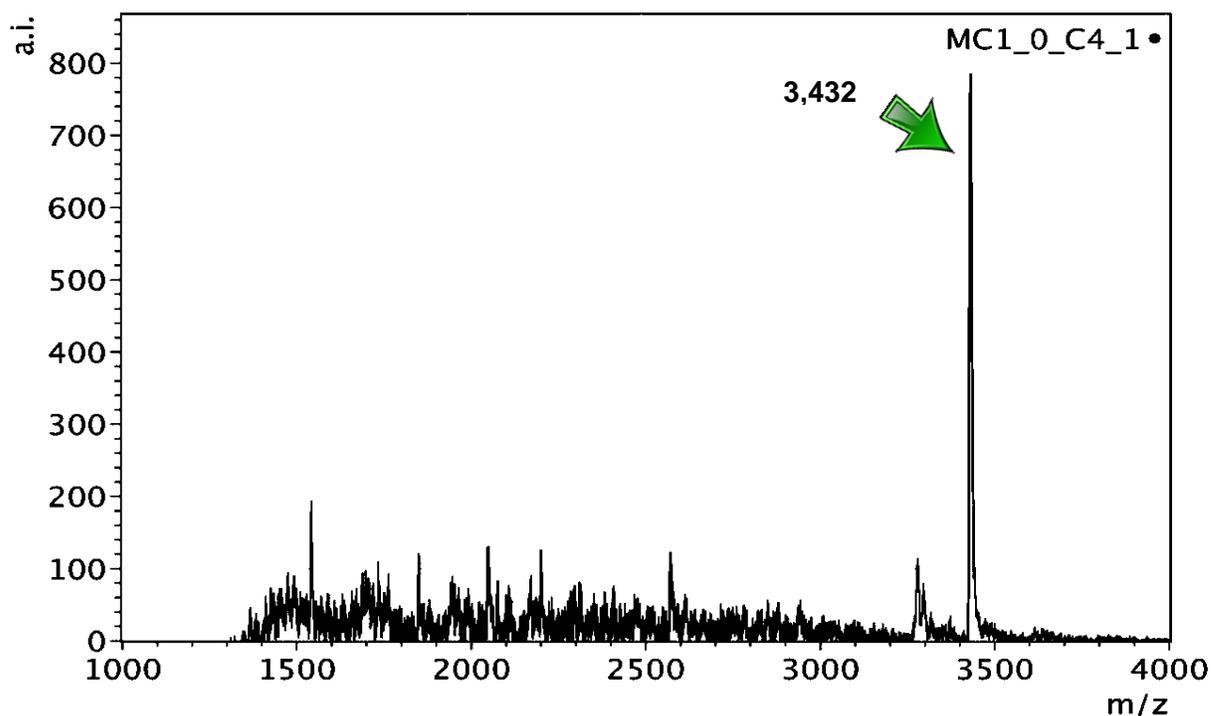


FIGURA 27. Espectro de la FBPM analizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

7.5 Ensayos biológicos

7.5.1 Efecto en la contractilidad del íleon aislado de cobayo

El extracto acuoso de *M. complanata*, así como la FBPM y la subfracción MC2 fueron evaluadas en el modelo de íleon aislado de cobayo.

Los resultados obtenidos de esta evaluación indican que el extracto acuoso de *M. complanata* induce un efecto excitatorio en la contractilidad del íleon aislado de cobayo, asimismo se observa un aumento en el tono de las contracciones espontáneas. En la FIGURA 28B se ilustra el efecto del extracto acuoso de *M. complanata* a una concentración de 500 µg de polvo liofilizado/mL.

De la misma manera, la FBPM induce un aumento en la contractilidad del íleon aislado de cobayo. La FIGURA 28C muestra el efecto excitatorio de la FBPM (500 µg/mL) en el íleon aislado de cobayo, cuya magnitud es equivalente a la del efecto inducido por acetilcolina 10 µM (FIGURA 28A).

El efecto de la subfracción MC2 únicamente pudo ser evaluado a la concentración de 500 µg/mL, se observó que esta subfracción también induce un aumento en la contractilidad del íleon aislado de cobayo, la amplitud de este efecto excitatorio es similar al del efecto inducido por la FBPM. La FIGURA 28D ilustra el efecto de la subfracción MC2 en las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo.

El efecto contráctil tanto de la FBPM como de la subfracción MC2 es significativamente mayor que el efecto del extracto acuoso (FIGURA 29).

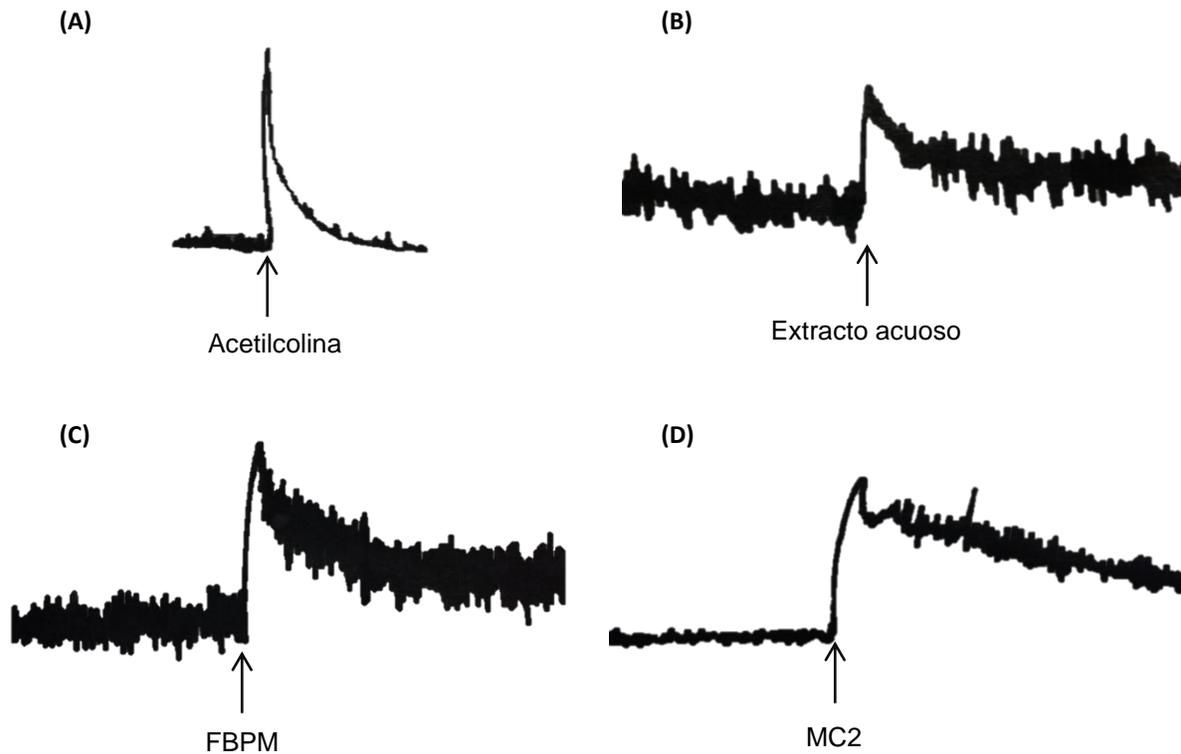


FIGURA 28. Registros del efecto excitatorio sobre las contracciones espontáneas de íleon aislado de cobayo inducido por: a) acetilcolina 10 μ M, b) extracto acuoso de *M. complanata* (500 μ g/mL), la FBPM (500 μ g/mL) y d) subfracción MC2 (500 μ g/mL) (n=4).

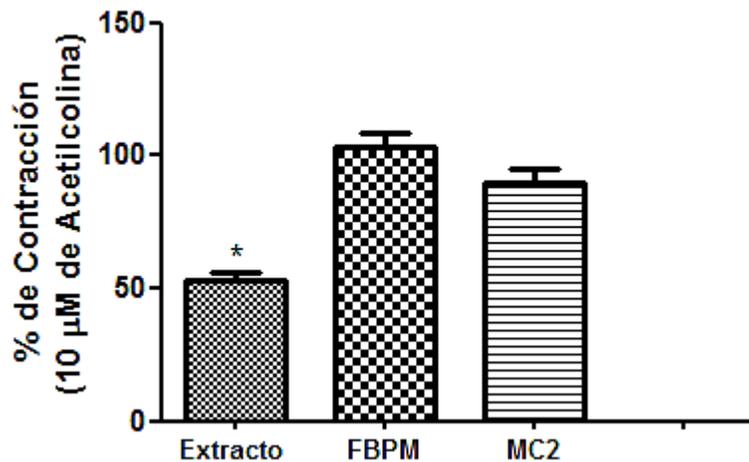


FIGURA 29. Comparación del efecto en la contractilidad de íleon aislado de cobayo de: a) el extracto acuoso de *M. complanata* (500 μ g/ml), b) la FBPM (500 μ g/ml) y c) la subfracción MC2 (500 μ g/ml). El % de contracción fue calculado respecto al efecto ejercido por la acetilcolina 10 μ M.

* Significativamente diferente mediante una prueba de Tukey ($p < 0.05$) (n=4)

7.5.2 Efectos sistémicos y toxicidad aguda en ratones del extracto acuoso y de la FBPM

El extracto acuoso de *M. complanata* fue administrado a ratones machos CD1, por vía intravenosa (i.v.) a diferentes concentraciones (1.25, 2.5, 5.0, y 10.0 μg de proteína/g de peso corporal) (n=5), con la finalidad de evaluar sus efectos tóxicos sistémicos y letalidad. De esta manera, al administrar dosis menores a 5 μg proteína/g peso del extracto por vía i.v. se observaron convulsiones clónicas, dificultad respiratoria, una evidente disminución de la movilidad y murió el 66% de los ratones a los cuales se les administraron dichas dosis; el tiempo de muerte osciló entre las 3 h y 12 h después de la administración. Paralelamente, al administrar el extracto acuoso a dosis mayores a 5 μg proteína/g peso corporal, se observaron convulsiones clónicas, dificultad respiratoria y la muerte del 100% de los ratones en menos de un minuto después de la administración del extracto. La FIGURA 30 muestra el porcentaje de mortalidad de los ratones a las distintas concentraciones que fueron evaluadas. La dosis letal media fue calculada, mediante el método PROBIT, considerando el porcentaje de mortalidad de individuos de cada una de las dosis evaluadas en un periodo de 24 horas y se estimó que la DL_{50} del extracto acuoso por vía intravenosa es de 1.42 μg proteína/g peso corporal.

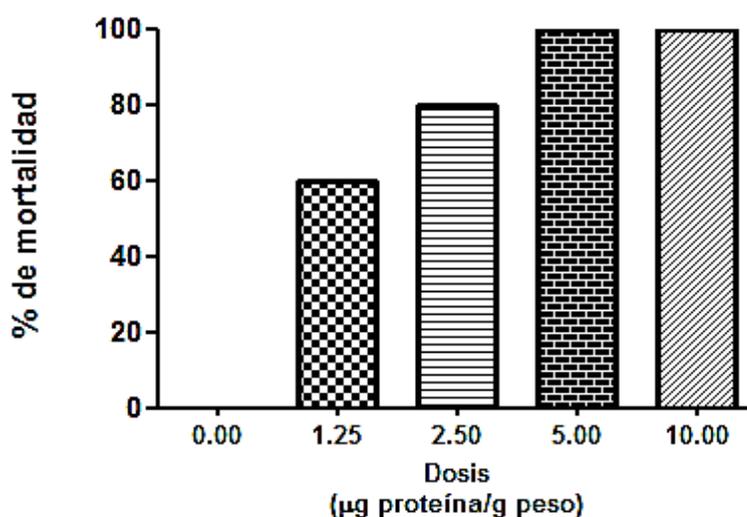


FIGURA 30. Letalidad del extracto acuoso de *Millepora complanata* administrado en ratones por vía i.v (n=5)

Por otra parte, la FBPM también fue administrada en ratones, por vía intravenosa a tres concentraciones distintas (0.5, 1.0, y 1.5 mg de liofilizado/g de peso corporal) (n=5) con la finalidad de determinar su letalidad. Se observó que al administrar esta fracción a la dosis más baja evaluada (0.5 mg /g peso de peso corporal) por vía i.v., los ratones experimentaron dificultad respiratoria y convulsiones clónicas. Sin embargo, sólo el 20% de los ratones murió, en un tiempo aproximado de 3 minutos. A dosis de 1 mg/g de peso corporal se observaron los mismos efectos neurotóxicos, sin embargo, los ratones no se recuperaron y murieron en un tiempo aproximado de 30 segundos. La administración de la dosis más alta evaluada (1.5 mg/g de peso corporal), provocó la muerte instantánea de los ratones. La dosis letal media de la FBPM por vía i.v., es de 0.656 mg/ g peso corporal.

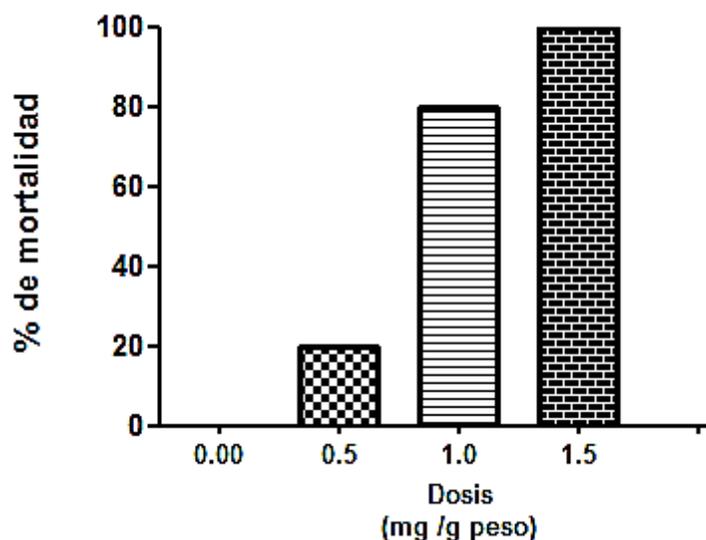


FIGURA 31. Letalidad de la FBPM administrada en ratones por vía i.v (n=5)

Debido al bajo rendimiento de la subfracción MC2, ésta únicamente pudo ser administrada a una dosis de 1 mg/g de peso corporal (n=5). Los ratones murieron en un tiempo promedio de 15 segundos. Previamente, algunos de ellos experimentaron convulsiones clónicas más evidentes que las ocasionadas por la administración de la FBPM a la misma dosis.

7.5.3 Análisis histopatológicos

Mediante la observación al microscopio de los cortes de tejidos de los ratones a los cuales se les administraron diferentes dosis del extracto de *M. complanata* por vía i.v., se observaron los siguientes daños histopatológicos: en los cortes de riñón, se observó congestión vascular glomerular, y la presencia de material proteináceo intratubular (FIGURA 32).

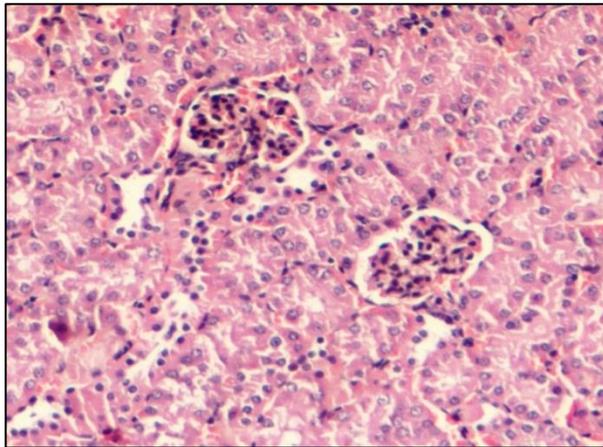
En los cortes de tejido pulmonar se observó congestión en los capilares alveolares (FIGURA 33). En el tejido cerebral de los ratones que fueron administrados con las dosis más altas del extracto acuoso, se observaron vacuolas en la glía, así como hemorragia superficial (FIGURA 34). Los cortes de tejido correspondientes a los órganos de los ratones que fueron administrados con la FBPM (1.5 mg/g), mostraron daños significativos, tales como congestión severa de los capilares alveolares e incluso se observó hemorragia intra alveolar. Además, se observaron vacuolas en el tejido cerebral y hemorragia superficial neuronal. En el CUADRO 4, se describen los hallazgos más sobresalientes encontrados en el análisis histopatológico de tejidos de los ratones a los cuales se les administró el extracto acuoso de *M. complanata* y la FBPM por vía i.v.

Muestra administrada por vía i.v.	Análisis histopatológico
Extracto acuoso de <i>M. complanata</i>	
1.25 y 2.5 µg proteína /g peso corporal	Cerebro: Normal Pulmón: Ligera congestión de los capilares alveolares sin edema Hígado: Normal Riñón: Presencia de cilindros (alteración glomerular). Proteinuria
5.0 y 10.0 µg proteína /g peso corporal	Cerebro: Retracción neuronal, vacuolas en la glía (edema cerebral), hemorragia en la superficie cerebral Pulmón: Congestión de los capilares alveolares sin edema Hígado: Normal Riñón: Presencia de cilindros (alteración glomerular). Proteinuria

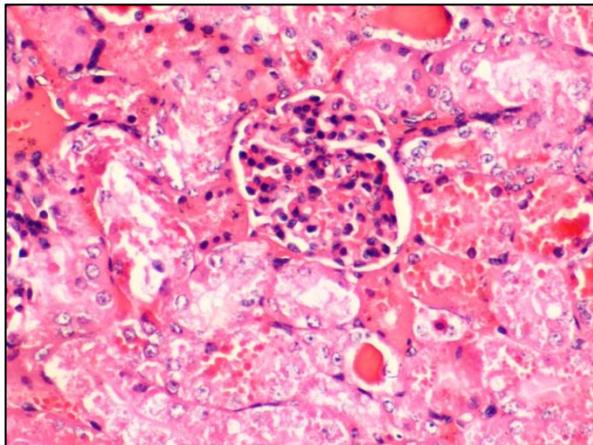
5.0 μ g proteína /g peso corporal (extracto desnaturalizado)	Cerebro: Normal Pulmón: Ligera congestión capilar Hígado: Normal Riñón: Normal
FBPM	
1.0 mg / g peso corporal	Cerebro: Normal Pulmón: Congestión capilar alveolar Hígado: Normal Riñón: Congestión capilar tubular
1.5 mg / g peso corporal	Cerebro: Edema cerebral. Hemorragia superficial Pulmón: Congestión capilar alveolar extrema, hemorragia intraalveolar Hígado: Normal Riñón: Edema en los túbulos renales

CUADRO 4. Hallazgos durante el análisis histopatológico

A



B



C

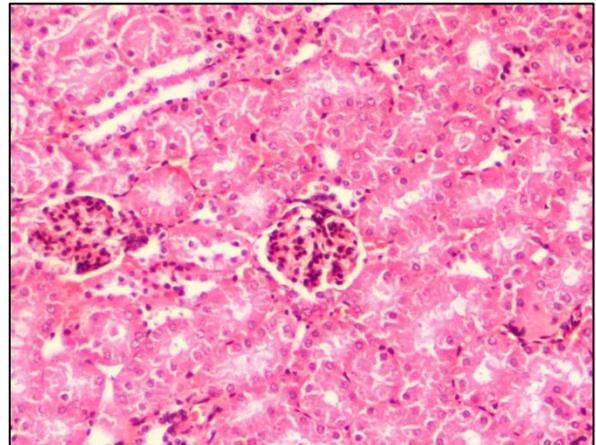


FIGURA 32. Fotografías del tejido renal. A) Ratón control (-), B) Ratón administrado con el extracto acuoso de *M. complanata* (5 μ g proteína/g peso) y C) Ratón administrado con la FBPM (1.5 mg/ g peso)

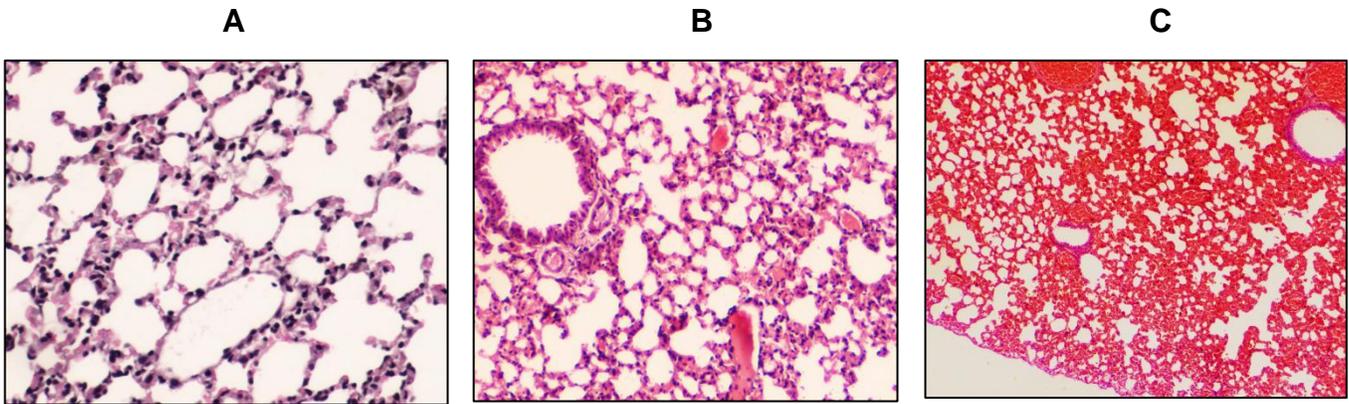


FIGURA 33 Fotografías del tejido pulmonar. A) Ratón control (-), B) Ratón administrado con el extracto acuoso de *M. complanata* (10 μ g proteína/g peso) y C) Ratón administrado con la FBPM (1.5 mg/ g peso)

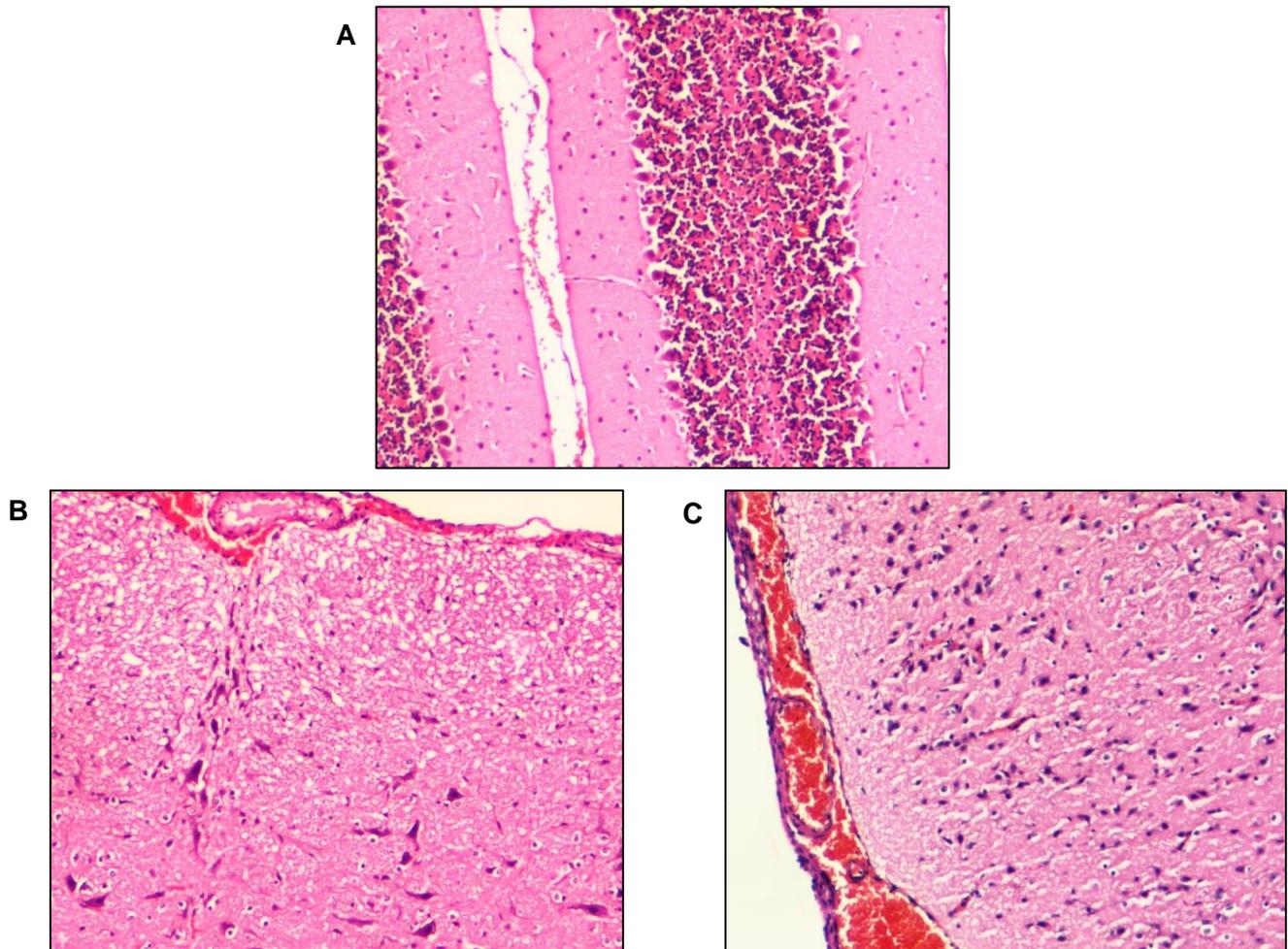


FIGURA 34. Fotografías del tejido cerebral. A) Ratón control (-), B) Ratón administrado con el extracto acuoso de *M. complanata* (10 μ g proteína/g peso) y C) Ratón administrado con la FBPM (1.5 mg/ g peso)

8 DISCUSIÓN

Los cnidarios son los organismos más venenosos que se han identificado en el ecosistema marino. Esto se debe al arsenal de toxinas que alojan en organelos urticantes llamados cnidocistos presentes en el interior de sus células (Beckmann y Özbek, 2012). De las cinco clases que comprenden el phylum Cnidaria, la clase Anthozoa ha sido la más estudiada, debido a que, en comparación con las demás, está más ampliamente distribuida en los mares de todo el mundo (Frazao y col., 2012).

Las especies de la clase Hydrozoa se caracterizan por tener la mayor diversidad en cuanto a la morfología que presentan. Los hidrozoarios también son considerados como organismos de riesgo por la severidad de las lesiones ocasionadas al contacto con sus tentáculos, destacando por su toxicidad, algunas hidras, los sifonóforos como *Physalia physalis*, las hidromedusas como *Olindias sambaquiensis* y los hidrocorales del género *Millepora* (Haddad y col., 2002).

Millepora complanata es un hidrocoral de la clase Hydrozoa que habita preferentemente en aguas turbulentas y poco profundas; en México es particularmente abundante en los arrecifes coralinos del Mar Caribe (Lewis, 2006). Se ha demostrado, en estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, que el extracto acuoso preparado a partir de este hidrocoral contiene toxinas termolábiles, probablemente citolisinas, que inducen una muerte tardía en ratones debido al daño histopatológico y toxinas termoestables que inducen convulsiones y una muerte inmediata en ratones. Se han encontrado también evidencias de que este hidrocoral produce compuestos no proteicos que inducen efectos neurotóxicos y letalidad en ratones. Aunque a la fecha se desconoce la estructura de estos metabolitos secundarios, se tienen evidencias que indican que poseen anillo(s) aromático(s) y una cadena policarbonada polihidroxilada. (García-Arredondo y col., 2015).

En el presente trabajo se encontró que en el perfil proteico del extracto acuoso de *M. complanata*, obtenido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida unidimensional SDS-PAGE (bajo condiciones no reductoras) no fue posible detectar la presencia de péptidos en un rango de peso molecular entre 1 y 10 kDa. En contraste, en la SDS-PAGE bajo condiciones reductoras se observan 2 bandas de proteína de 7 y 9 kDa aproximadamente; además, las bandas de más de 100 kDa ya no fueron detectadas con la tinción de Coomasie. Dado que el β -mercapto etanol, es un agente reductor capaz de romper los enlaces disulfuro que unen a las subunidades de las proteínas, es muy probable que las bandas de 7 y 9 kDa, observadas en el perfil proteico obtenido mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, correspondan a subunidades monoméricas de proteínas más grandes, de tal manera que, bajo estas condiciones, las bandas de más alto peso molecular desaparecen. Este resultado es consistente con el perfil proteico obtenido mediante electroforesis bidimensional bajo condiciones reductoras, en el cual se detectaron 2 “spots” de proteína con un peso entre 7 y 9 kDa.

Los resultados obtenidos a partir de los análisis electroforéticos no permiten descartar por completo la presencia de péptidos en este rango de peso molecular, ya que también existe la posibilidad de que este tipo de componentes estén presentes en el extracto acuoso en una muy baja concentración.

En el año 2012, Balasubramanian y col. publicaron el primer proteoma de los nematocistos de una especie perteneciente a la clase Hydrozoa: *Hydra magnipapillata*. Sorpresivamente, el análisis de distribución proteica indicó que los péptidos de 1 a 10 kDa son considerablemente menos abundantes que las proteínas de entre 10 y 100 kDa. Considerando el hecho de que las hidras son taxonómicamente las especies más relacionadas a los hidrocorales ya que tanto el género *Millepora* como el género *Hydra* pertenecen a la suborden Capitata (Kayal y col., 2013), es probable que los nematocistos de *M. complanata* contengan pocos compuestos proteicos de menos de 10 kDa y esto puede explicar el hecho de que en el perfil electroforético del extracto acuoso de este hidrocoral, obtenido bajo condiciones no reductoras, no se detecten péptidos entre 1 y 10 kDa.

Con el objeto de separar los componentes de bajo peso molecular (<10 kDa) a partir del extracto acuoso de *M. complanata*, se empleó el método de ultrafiltración. El rendimiento obtenido de la FBPM a partir de este procedimiento fue del 88%, lo cual indica, en primera instancia, que el extracto acuoso de este hidrocoral contiene mayoritariamente, compuestos con un peso molecular menor a 10 kDa. Sin embargo, debe considerarse que el contenido salino del extracto acuoso se queda retenido principalmente en esta fracción debido a su peso molecular, aportando un porcentaje considerable en la masa total de la fracción.

Con el fin de confirmar o descartar la presencia de péptidos de peso molecular entre 1 y 10 kDa se realizó un análisis directo de la FBPM, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. El espectro obtenido no muestra señales en el rango de 5 a 10 kDa, sin embargo, sí se observan señales débiles en el rango entre 1.5 y 3 kDa. La señal más intensa se observa a 3.432 kDa, la cual podría corresponder a un compuesto polimérico, posiblemente un péptido o un polisacárido. Sin embargo, resulta evidente que la mayoría de los componentes presentes en la FBPM tienen pesos moleculares < 1 kDa.

Con la finalidad de conocer la naturaleza química de los componentes presentes en la FBPM se desarrolló un método cromatográfico en un sistema de HPLC, empleando una columna de fase reversa, para lo cual fue necesario estandarizar las condiciones de elución que permitieran la mejor resolución de los cromatogramas. Los análisis cromatográficos preliminares indicaron que algunos de los componentes son de muy alta polaridad y únicamente logran ser separados empleando 100% de agua como fase móvil. Las condiciones que se estandarizaron para la separación de los componentes de la FBPM consistieron en emplear al inicio, una elución isocrática con agua durante 10 minutos y a partir de este tiempo, iniciar un gradiente lineal que va desde un 100% de agua hasta un 100% de acetonitrilo al 90%. En el perfil cromatográfico de la FBPM, obtenido bajo estas condiciones, se confirmó que la mayoría de los compuestos presentes en esta fracción son de alta y mediana polaridad, debido a que casi todos los compuestos eluyeron en un tiempo menor a 25 minutos, siendo el tiempo total de elución de 30

minutos, en el cual se alcanza un porcentaje de 50% de acetonitrilo en la fase móvil.

Es importante señalar que al analizar el espectro de absorción de cada componente (cada pico), se observa que los compuestos presentes en esta fracción absorben principalmente a $\lambda=210$ nm. A esta longitud de onda, los compuestos con mayor absorbancia corresponden a los picos obtenidos en un tiempo entre 17 y 24 minutos (cuando la fase móvil contiene entre 20 y 25% de acetonitrilo).

Estos resultados son consistentes con el perfil cromatográfico de una fracción de bajo peso molecular, obtenida a partir del extracto crudo del cnidario *Palythoa caribaeorum* (Lazcano-Pérez y col., 2014), en el cual los picos mayoritarios (a una $\lambda=220$ nm) se observaron en un tiempo de elución entre 20 y 30 minutos, cuando la fase móvil contiene un 20 % de acetonitrilo. De igual manera, el perfil cromatográfico de la FBPM concuerda con el perfil reportado en 2014 por Junior y col., a partir del extracto crudo del hidrozooario *Olindias sambaquiensis*, en el cual los componentes peptídicos presentes en el extracto, eluyeron en un tiempo de 25 a 30 minutos, cuando la fase móvil contenía un 30% de acetonitrilo.

El hecho de que la mayoría de los componentes presentes en esta fracción, absorbe principalmente a una longitud de onda de 210 nm, indica la alta probabilidad de que las señales abundantes de intensidad débil en el rango entre 1,500 y 3,500 m/z observadas mediante el análisis espectrométrico por MALDI-TOF, correspondan a compuestos peptídicos que, debido a su baja concentración en la FBPM, no pudieron ser detectados mediante técnicas electroforéticas.

Adicionalmente, con el objeto de detectar en la FBPM, la presencia de grupos amino (NH_2) característicos de los aminoácidos N-terminales y de la cadena lateral de la lisina, se realizó el análisis de esta fracción mediante cromatografía en capa fina utilizando un método de detección común para compuestos que poseen este grupo funcional en su estructura química, usando como revelador una solución de ninhidrina. El resultado fue positivo para la FBPM al igual que para la serotonina e histamina, usadas como control positivo en el análisis. Sin embargo, al comparar el

tiempo de retención de estos compuestos con el de la muestra, se puede descartar preliminarmente, la presencia de serotonina o histamina en la FBPM.

La ninhidrina es un agente capaz de reaccionar con los aminoácidos, formando un complejo colorido que posee un máximo de absorción a $\lambda=570$ nm. Esta técnica es muy sensible, por lo que permite detectar bajas concentraciones de aminoácidos, sin embargo, no es específica, ya que la ninhidrina puede reaccionar con cualquier compuesto que presente en su estructura al menos un grupo (NH_2) libre, por lo que una gran cantidad de metabolitos pueden dar positivo a esta prueba. Es probable que los grupos (NH_2) detectados en la FBPM formen parte de la estructura de aminoácidos presentes en péptidos o de metabolitos secundarios como las acilpoliaminas que se han identificado en el veneno de tarántulas y de algunos cnidarios (Moore y col., 2009; Diaz-Garcia y col., 2012), e incluso aminoácidos modificados como la bunodosina, un compuesto con actividad analgésica de 391 Da que fue aislado a partir del veneno de la anémona de mar *Bunodosoma cangicum* (Zaharenko y col., 2011).

Siguiendo con el proceso de fraccionamiento de la FBPM se realizó un análisis cromatográfico por exclusión molecular (filtración en gel). El perfil cromatográfico de la FBPM, no mostró una separación óptima de los picos, lo cual puede indicar que la mayoría de los compuestos presentes en la FBPM se encuentran en un rango de peso molecular muy similar. En este fraccionamiento se detectaron 3 subfracciones, que de acuerdo al tiempo en que eluyen de la columna, corresponden a 3 rangos de peso molecular. MC1 (1,000 - 4,000 Da). MC2 (500 - 1000 Da) y MC3 (<500 Da). Como era de esperarse, la subfracción menos abundante es la MC1, seguida de la MC3 y la subfracción mayoritaria es la MC2.

El perfil cromatográfico de la subfracción MC2, obtenido mediante HPLC en fase reversa mostró un cambio evidente, comparado con el perfil de la FBPM. De los 13 picos con mayor absorbancia, detectados en la FBPM a una longitud de onda de 210 nm, únicamente 4 de ellos se conservan en la subfracción MC2 (A, D, I y K)

con una intensidad similar, los demás disminuyen drásticamente su absorbancia (F, G, H, J y M) o desaparecen (B, C, E y L).

Algunos de los picos con mayor absorbancia observados en el análisis de la FBPM a $\lambda=280$ nm, también se observan en el perfil de la subfracción MC2 (a la misma longitud de onda), principalmente los que eluyen durante los 10 primeros minutos, sin embargo, la absorbancia de estos compuestos es significativamente menor, comparada con la observada a una $\lambda=280$ nm. Resulta evidente que al ser MC2 una subfracción obtenida a partir de la FBPM, todos los componentes observados en el perfil cromatográfico de MC2 se observen también en el perfil de la FBPM, en contraste, el hecho de que algunos compuestos observados en el perfil cromatográfico de la FBPM y que no se observen en el perfil cromatográfico de MC2 indica que dichos componentes tienen un peso molecular superior a 1,000 Da, y que evidentemente corresponden a los compuestos (1,500 Da a 3,500 Da) detectados previamente en el análisis espectrométrico de la FBPM mediante MALDI-TOF.

Por otro lado, con la finalidad de evaluar la actividad farmacológica del extracto acuoso de *M. complanata*, así como de la FBPM y la subfracción MC2, se utilizó el modelo de íleon aislado de cobayo para determinar sus efectos en la musculatura lisa intestinal y el sistema nervioso entérico. Los resultados indicaron que el extracto acuoso de *M. complanata* induce un aumento en las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo, de manera dependiente de la concentración. Este resultado es consistente con lo ya reportado en 2002 por nuestro grupo de trabajo, en donde se encontró que el extracto acuoso preparado a partir de *M. complanata*, estimula las contracciones espontáneas de íleon aislado de cobayo (Rojas y col., 2002). Lo anterior, pone en evidencia que los compuestos responsables de este efecto excitatorio están presentes en los especímenes de ambas colectas, por lo que se trata de componentes bioactivos altamente conservados en este hidrocoral.

El efecto de la FBPM es significativamente mayor que el del extracto acuoso de *M. complanata*, lo cual indica que los compuestos responsables del efecto excitatorio en la contractilidad del íleon aislado de cobayo son principalmente de bajo peso molecular (<10 kDa). Estos compuestos son termoestables, ya que luego de someter la FBPM a ebullición durante 20 minutos, el efecto excitatorio se conservó, indicando que se trata muy probablemente de metabolitos secundarios.

Por otra parte, la subfracción MC2, induce un efecto similar al de la FBPM, lo que permite inferir que los compuestos que inducen el aumento en la contractilidad del íleon aislado de cobayo se encuentran contenidos en la FBPM, particularmente en la subfracción MC2. Sin embargo, es necesario realizar más pruebas específicas que permitan elucidar el mecanismo de acción mediante el cual, los componentes de bajo peso molecular están ejerciendo un aumento en la contractilidad de la musculatura intestinal del modelo evaluado.

En 1995, Cooper y col., aislaron un compuesto de bajo peso molecular, a partir del extracto acetónico de la anémona de mar *Bunodosoma caissarum*; se trata de un compuesto derivado de una purina cuaternaria, que bloquea los receptores de adenosina presentes en el plexo muscular mientérico y en consecuencia induce un aumento en las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo (Cooper y col., 1995). Lo anterior, permite ampliar las perspectivas para determinar si los componentes de bajo peso molecular presentes en el extracto acuoso de *M. complanata*, actúan a nivel de musculatura lisa intestinal y/o sistema nervioso entérico, y por lo tanto poder correlacionar los efectos observados con un cuadro de neurotoxicidad.

Finalmente, los resultados de la evaluación de la toxicidad aguda y letalidad en ratones, mostraron que a dosis menores a 5 µg de proteína/g de peso, el extracto acuoso de *M. complanata*, administrado en ratones por vía i.v., induce aletargamiento, pérdida de la actividad exploratoria y dificultad respiratoria. A dosis mayores a 5 µg de proteína/g de peso, los ratones experimentan convulsiones clónico-tónicas, dificultad respiratoria y la muerte en menos de un minuto después de la administración del extracto; estos síntomas son representativos de un evidente cuadro neurotóxico/cardiotóxico. En el análisis histopatológico de los

ratones que fueron administrados con el extracto acuoso de *M. complanata*, se observaron daños principalmente en el tejido pulmonar, lo que permitió concluir que los ratones experimentaron un cuadro de congestión vascular alveolar antes de morir. Así mismo, se observaron daños glomerulares en el tejido renal y retracción neuronal moderada en el tejido cerebral. Estos cambios fueron más severos con las dosis más altas evaluadas del extracto acuoso. En el tejido hepático, no se observaron daños evidentes.

Con respecto a la evaluación de los efectos tóxicos inducidos por la FBPM, se encontró que ésta, administrada a dosis de 1 mg de liofilizado/g de peso, induce convulsiones clónicas severas en los ratones. La muerte de los ratones fue evidentemente más rápida que la ocasionada por la administración del extracto acuoso. A dosis de 1.5 mg/ g de peso, los ratones convulsionaron y murieron en menos de 10 segundos.

El análisis histopatológico de los tejidos de ratones a los cuales se les administró la FBPM (1.5 mg/g), mostró una severa congestión de los capilares alveolares, incluso presencia de hemorragia al interior de los alveolos. Asimismo, en el tejido nervioso, se observó edema cerebral y hemorragia superficial lo cual puede explicar la muerte instantánea de los ratones que fueron administrados con esta dosis de la FBPM.

Los ratones a los cuales se les administró la subfracción MC2 (a dosis de 1 mg/g de peso), murieron instantáneamente. No se pudo realizar el análisis histopatológico de los ratones que murieron por la administración de esta subfracción.

En un estudio paralelo a este trabajo, se evaluaron los efectos de la fracción de alto peso molecular, obtenida a partir del extracto acuoso de *M. complanata*, en el cual, se observó que la administración por vía i.v. de esta fracción (a una dosis de 5 µg proteína/g de peso), indujo dificultad respiratoria congestiva y los ratones experimentaron convulsiones clónico tónicas. El tiempo en que ocurre la muerte de los ratones fue aproximadamente de 3 minutos. Esta fracción induce una muerte más agónica en los ratones, comparada con la muerte ocasionada por la administración de la FBPM (por vía i.v), lo cual puede ser debido al daño citolítico

que ejercen los componentes presentes en la fracción de alto peso molecular. Además, al desnaturalizar la fracción de alto peso molecular, ésta pierde su capacidad de causar daños histopatológicos, así como la muerte de los ratones, lo cual evidencia que los compuestos responsables de la muerte tardía ocasionada por los daños histopatológicos, son de naturaleza proteica.

En 1998, Santana y col., evaluaron los efectos tóxicos de un compuesto de bajo peso molecular aislado a partir de la anémona de mar *Bunodosoma granulifera* (clase Anthozoa) el cual denominaron granulotoxina. La administración de este compuesto por vía i.p., indujo efectos neurotóxicos severos en ratones, tales como disnea, convulsiones clónico-tónicas y la muerte. La dosis letal de la granulotoxina, a las 2 h de la administración, se estimó en $400 \pm 83 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Un estudio publicado por Díaz-García y col., en 2012, evidenció la presencia de un compuesto de 550.7 Da (PpV9.4) en una fracción de bajo peso molecular, obtenida a partir del extracto crudo del hidrozooario *Physalia physalis*. Los resultados de los análisis cromatográficos y espectrométricos, indicaron que este compuesto muy probablemente corresponde a una acilpoliamina. Las acilpoliaminas, son compuestos que tienen un rango de peso molecular entre 500 y 1000 Da (Moore y col., 2009) e inducen efectos neurotóxicos, debido a que son capaces de bloquear reversiblemente los receptores de acetilcolina nicotínicos ubicados en la unión neuromuscular provocando cuadros de parálisis y convulsiones clónico-tónicas (Rocha y col., 2013).

Más recientemente, Domínguez y col., reportaron un estudio acerca de las propiedades toxicológicas de una fracción de bajo peso molecular, obtenida a partir del extracto crudo del cnidario *Zoanthus sociatus* (clase Anthozoa), en el cual se observó que esta fracción induce efectos cardiotóxicos y acelera el tiempo del paro cardíaco de los ratones administrados con esta fracción por vía intraperitoneal. En este estudio, se encontró que cuando se administró la fracción de bajo peso molecular (a dosis de $1,350 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso), los ratones experimentaron espasmos, disnea, convulsiones y la muerte después de 2 minutos. El análisis espectrométrico de la fracción por MALDI-TOF-TOF mostró que la fracción contiene

mayoritariamente compuestos de menos de 1 kDa y algunos péptidos que no fueron caracterizados (Domínguez y col., 2013).

Las neurotoxinas que se han identificado en cnidarios son principalmente de dos tipos: aquellas que interactúan con canales activados por voltaje y las que bloquean los receptores de acetilcolina nicotínicos presentes en la unión neuromuscular Mariotini y col., (2013). El primer grupo, comprende péptidos de entre 3 y 7 kDa, los cuales han sido aislados únicamente a partir de anémonas de mar (clase Anthozoa) y de cubomedusas (clase Cubozoa). En las especies de la clase hydrozoa no se han identificado este tipo de neurotoxinas, inclusive, Sher y Slotkin reportaron que el veneno de las hidras (las especies más representativas de esta clase), no contiene péptidos con actividad tóxica y que los responsables de la toxicidad del veneno de estos organismos son componentes no proteicos de bajo peso molecular, así como proteínas mayores a 15 kDa (Sher y Slotkin, 2009). Esta información es consistente con lo que hemos obtenido a partir de la evaluación tanto del extracto acuoso, como de la FBPM de *M. complanata*.

9 CONCLUSIONES

-El extracto acuoso del hidrocoral *M. complanata* preparado a partir de la colecta realizada en noviembre de 2015, induce efectos neurotóxicos y letalidad en ratones.

-El fraccionamiento del extracto acuoso de *M. complanata*, mediante ultrafiltración, permitió obtener una fracción de bajo peso molecular (<10 kDa), la cual induce (*ex vivo*) un aumento en la contractilidad de la musculatura lisa intestinal de cobayo, de una manera dependiente de la concentración. El efecto contráctil inducido por esta fracción, es significativamente mayor que el inducido por el extracto acuoso, lo cual sugiere la interacción con receptores presentes en la musculatura lisa intestinal y/o en las neuronas del sistema nervioso entérico.

-La FBPM (1 mg/g de peso) induce convulsiones violentas y la muerte inmediata en ratones ($DL_{50}=0.656$ mg/ g de peso), ocasionándoles un daño severo en el tejido pulmonar y retracción neuronal en tejido nervioso.

-En los análisis electroforéticos (1D y 2D) no se detectaron péptidos menores a 10 kDa presentes en el extracto acuoso de *M. complanata*. Los resultados del análisis cromatográfico mediante HPLC en fase reversa y el análisis espectrométrico mediante MALDI-TOF sugieren la presencia de péptidos de muy bajo peso molecular que se encuentran contenidos en el extracto acuoso de *M. complanata* en una baja concentración.

-Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, se detectó una señal intensa que corresponde a un componente de peso molecular de 3.432 kDa y cuya identificación se encuentra en curso.

-La FBPM contiene componentes de alta y mediana polaridad, algunos de estos compuestos poseen grupos amino terminal (NH_2) en su estructura química, que, de

acuerdo a la literatura, probablemente se trate de aminoácidos y/o metabolitos secundarios como acilpoliaminas ó aminas biógenas modificadas.

- Al igual que la FBPM, la subfracción MC2 induce un efecto excitatorio en la contractilidad de la musculatura lisa intestinal en el modelo de íleon aislado de cobayo, además, induce una muerte instantánea en ratones. Esta subfracción contiene compuestos en un rango de peso molecular entre 500 y 1,000 Da. Se necesitan esfuerzos adicionales para identificar los compuestos presentes en la subfracción neurotóxica MC2.

10 LITERATURA CITADA

- **Abramson**, S. N., Culver, P., Kline, T., Li, Y., Guest, P., Gutman, L. **1988**. Lophotoxin and related coral toxins covalently label the α -subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 263: 18568-73.
- **Alvarez**, C., Pazos, I.F., Lanio, M.E., Martinez, D., Schreier, S., Casallanovo, F., Campos, A.M., Lissi, E., **2001**. Effect of pH on the conformation, interaction with membranes and hemolytic activity of sticholysin II, a pore forming cytolyisin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 39: 539-553.
- **Anderluh**, G., and Maček, P. **2002**. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria). *Toxicon.* 40:111-124.
- **Anderluh**, G., Razpotnik, A., Podlesek, Z., Macek, P., Separovic, F., Norton, R.S., **2005**. Interaction of the eukaryotic pore-forming cytolyisin equinatoxin II with model membranes: ^{19}F NMR studies. *J. Mol. Biol.* 347, 27-39.
- **Anderson**, P. A., and Bouchard, C. **2009**. The regulation of cnidocyte discharge. *Toxicon.* 54(8):1046-1053.
- **Balasubramanian**, P.G., Beckmann, A., Warnken, U., Schnölzer, M., Schüler, A., Bornberg-Bauer, E., Holstein, T. and Özbek, S. **2012**. Proteome of Hydra nematocyst. *Biol Chem.* 287(13):9672-81.
- **Beckmann**, A.; Özbek, S. **2012**. The nematocyst: A molecular map of the cnidarian stinging organelle. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 577–582.
- **Bianchini**, G., Lotti, T., Campolmi, P., Casigliani, R., and Panconesi, E. **1988**. Coral ulcers a vasculitis. *Int. J. Dermatol*, 27:506-507.
- **Blunt**, J.W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. and Prinsep, M. R. **2016**. Marine natural products. *Nat .Prod. Rep.* 33(3):382-431.
- **Bradford**, M.M., **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- **Burke**, J. E., and Dennis, E. A. **2009**. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc. Drug Ther.* 23(1):49-59.

- **Burnett, J.W. 2009.** Treatment of Atlantic cnidarian envenomations. *Toxicon*. 54, 1201–1205.
- **Catterall, W.A., Cestele, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F.H., Konoki, K. and Scheuer, T., 2007.** Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49, 124-141.
- **Collins, A. G. 2002.** Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *J. Evolution Biol.* 15(3):418-432.
- **Collins, A. G. 2009.** Recent insights into cnidarian phylogeny. *Smithsonian Contributions to Marine Sciences*. 38:139-149.
- **Collins, A. G., Schuchert, P., Marques, A. C., Jankowski, T., Medina, M., and Schierwater, B. 2006.** Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *System. Biol.* 55(1):97-115.
- **Cooper, R.A.; de Freitas, J.; Porreca, F.; Eisenhour, C.M.; Lukas, R.; Huxtable, R.J. 1995.** The sea anemone purine, caissarone: Adenosine receptor antagonism. *Toxicon* 33, 1025–1031.
- **Curtis H, Barnes NS, Schnek A, Flores G. 2007.** Invitación a la Biología. 7a edición. Buenos Aires: Editorial Panamericana. P.p. 384-386.
- **Da Rocha, C. A. M. 2013.** Bioactive compounds from zoanthids (Cnidaria: Anthozoa): A brief review with emphasis on alkaloids. *Int Res J Biochem Bioinform* 3:1-6.
- **Daly, M., Brugler, M. R., Cartwright, P., Collins, A. G., Dawson, M. N., Fautin, D. G., and Stake, J. L. 2007.** The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa*. 1668:127-182.
- **Dixit, A.; Dhaked, R.K., and Singh, L. 2005.** Military potential of biological neurotoxins. *Toxin Reviews*. Vol. 24, Iss. 2
- **Domínguez, D., Diaz, C., García, N., Sierra, Y., Castañeda, O. and Antunes, A. 2013.** Insights into the toxicological properties of a low molecular weight fraction from *Zoanthus sociatus* (Cnidaria). *Mar. Drugs*, 11, 2873-2881.

- **Fenical**, W., Okuda, R. K., Bandurraga M. M., Culver, V. and Jacobs, R. S. **1981**. Lophotoxin: a novel neuromuscular toxin from Pacific sea whips of the genus *Lophogorgia*. *Science* 212: 1512-14.
- **Ferchmin**, P.A., Pagán, O.R., Ulrich, H., Szeto, A.C., Hann, R.M., and Eterović, V.A. **2009**. Actions of octocoral and tobacco cembranoids on nicotinic receptors. *Toxicon*. 54:1174-1182.
- **Fernández**, A.M.A. y Rivas, G., **2007**. Niveles de organización en animales. Distrito Federal, UNAM, 62–65.
- **Frazão**, B.; Vasconcelos, V.; Antunes, A., **2012**. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: An overview. *Mar. Drugs*. 10: 1812–1851.
- **García-Arredondo**, A., Rojas-Molina, A., Ibarra-Alvarado, C., Bah, M., Gallegos-Corona, M.A., García-Servín, M., **2015**. Systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora complanata* and partial purification of thermostable neurotoxins with lethal effects in mice. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology*. 169: 55-64
- **García-Arredondo**, A., Murillo-Esquivel, L.J., Rojas-Molina, A., Sanchez-Rodríguez, J. **2014**. Characteristics of hemolytic activity induced by the aqueous extract of the Mexican fire coral *Millepora complanata*. *J. Venom. Anim. Toxins*. 20(1): 49.
- **García-Arredondo**, A., Rojas-Molina, A., Iglesias-Prieto, R., Zepeda, A. and Palma, L. **2012**. Structure of nemoatocytes isolated from the fire corals *Millepora alcicornis* and *Millepora complanata* (Cnidaria: Hydrozoa). *J. Venom. Anim. Toxins*. 18(1):109-115.
- **Greening**, D. and Simpson, R. **2010**. A centrifugal ultrafiltration strategy for isolating the low-molecular weight (≤ 25 K) component of human plasma proteome. *J Proteomics*. 73 (3):637-48.
- **Hernández-Matehuala**, R., Rojas-Molina, A., Vuelvas-Solórzano, A., Garcia-Arredondo, A., Ibarra-Alvarado, C., Olguín-López, N., and Aguilar M.B. **2015**. Cytolytic and systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora alcicornis* collected in the Mexican Caribbean and

detection of two types of cytolisins. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 21:36.

- **Hickman**, C. P., Ober, W. C. & Garrison, C. W., **2006**. Principios integrales de zoología, 13^a edición. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid Cap. XVIII 1022-1024.
- **Ibarra-Alvarado**, C., García, A., Aguilar, M.B., Rojas, A., Falcón, and A., Heimer de la Coteria, E. **2007**. Biochemical and pharmacological characterizations obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 146:511-518.
- **Iguchi**, A., Iwanaga, S., and Nagai, H. **2008**. Isolation and characterization of a novel protein toxin from fire coral. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365(1):107-112.
- **Jouiaei** M., Yanagihara, A., Madio B., Nevalainen, T., Alewood, P. and Fry, B. **2015**. Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria. *Toxins.* 7, 2251-2271.
- **Kayal**, E., Roure, B., Philippe, H., Collins, A. G., and Lavrov, D. V. **2013**. Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. *BMC Evol. Biol.* 13(1):5.
- **Khoo**, K.S., Kam, W.K., Khoo, H.E., Gopalakrishnakone, P., and Chung, M.C.M. **1993**. Purification and partial characterization of two cytolisins from a tropical sea anemone *Heteractis magnifica*. *Toxicon.* 31:1567-1579.
- **Laemmli**, U. K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685.
- **Lazcano-Pérez**, F., Castro, H., Arenas, I., García, D., González-Muñoz, R. and Arreguín-Espinosa, R. **2016**. Activity of *Palythoa caribaeorum* Venom on Voltage-Gated Ion Channels in Mammalian Superior Cervical Ganglion Neurons. *Toxins (Basel).* 8(5): 135.
- **Lazcano-Pérez**, F., Vivas O., Román-González, S.A., Rodríguez-Bustamante E., Castro, H., Arenas, I, García, D.E, Sánchez-Puig, N. and Arreguín-

Espinosa R. **2014**. A purified Palythoa venom fraction delays sodium current inactivation in sympathetic neurons. *Toxicon*. 82:112-6.

- **Lewis**, J.B. **2006**. Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Adv. Mar Biol.* 50:1-55.
- **Mariottini**, G. and Pane, L. **2013**. The Role of Cnidaria in Drug Discovery. A Review on CNS Implications and New Perspectives. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 8(2):110-22.
- **Messerli**, S.M., and Greenberg, R.M. **2006**. Cnidarian toxins acting on voltage-gated ion channels. *Mar. Drugs.* 4:70-81.
- **Middlebrook**, R., Wittle, L., Scura, E. and Lane, C. **1971**. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. *Toxicon.* 9:333-336.
- **Moore**, S., Smyth, W.F., Gault, V.A., O'Kane, E., McClean, S. **2009**. Mass spectrometric characterization and quantitation of selected low molecular mass compounds from the venom of *Haplopelma lividum* (Theraphosidae). *Rapid Commun Mass Spectrom.* 23(12):1747-55.
- **Moran**, Y., Gordon, D. and Gurevitz, M. **2009**. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels-molecular and evolutionary features. *Toxicon.* 54:1089–1101.
- **Nevalainen**, T.J. and Talvinen, K.A. **2004**. Cloning of a novel phospholipase A2 from the cnidarian *Adamsia carciniopados*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 132:571-578.
- **Norton** R.S. **2009**. Structures of sea anemone toxins. *Toxicon.* 54: 1075–1088.
- **Obura**, D., Fenner, D., Hoeksema, B., Devantier, L. & Sheppard, C. **2008**. *Millepora complanata*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- **Oliveira**, J.S., Redaelli, E., Zaharenko, A.J., Cassulini, R.R., Konno, S., Pimenta, D.C., Freitas, J.C., Clare, J.J. and Wanke, E. **2004**. Binding specificity of sea anemone toxins to Nav 1.1-1.6 sodium channels. *J. Biol. Chem.* 279:33323-33335.

- **Orts**, D. J. B., Peigneur, S., Madio, B., Cassoli, J., Montandon, G.; Pimenta, M. C. **2013**. Biochemical and Electrophysiological Characterization of Two Sea Anemone Type 1 Potassium Toxins from a Geographically Distant Population of *Bunodosoma caissarum*. *Mar Drugs*. 11:655-679.
- **Östman**, C.A. **2000**. A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Sci. Mar.* 64:31-46.
- **Özbek**, S., Balasubramanian, P.G. and Holstein, T.W. **2009**. Cnidocysts structure and biomechanics of discharge. *Toxicon*. 54:1038-1045.
- **Prasad**, G.V., Vincent, L., Hamilton, R. and Lim, K. **2006**. Minimal change disease in association with fire coral (*Millepora* species) exposure. *Am. J. Kidney. Dis.* 47:15-6.
- **Radwan**, F. F. and Aboul-Dahab, H.M. **2004**. Milleporin-1, a new phospholipase A2 active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocysts. *Comp. Biochem. Physiol., C.* 139:267-272.
- **Razak**, T.B., Hoeksema B.W., **2003**. The hydrocoral genus *Millepora* (Hydrozoa: Capitata: Milleporidae) in Indonesia. *Zool. Verh. Leiden* 345: 313-336.
- **Rocha**, T., Ferreira, S., Leite, G., da Silva, P., Hyslop, S. and Rodrigues, L. **2013**. VdTX-1, a reversible nicotinic receptor antagonist isolated from venom of the spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon* 70 (2013) 135–141.
- **Rogers**, J.C., Qu, Y., Tanada, T.N., Scheuer, T., and Catterall, W.A. **1996**. 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.* 271:15950-15962.
- **Rojas**, A., Torres, M., Rojas, J.I., Feregrino, A., and Heimer-de la Cotera, E.P. **2002**. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon*. 40:777-785.
- **Romero**, L.; Marcussi, S., Marchi-Salvador, D.P., Silva, F.P., Jr., Fuly, A.L., Stabeli, R.G., da Silva, S.L., Gonzalez, J., Monte, A.D., Soares, A.M., **2010**.

Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A2 from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Biochimie*, 92:1063–1071.

- **Sagi**, A., Rosenberg, L., Ben-Meir, P. and Hauben, D.J. **1987**. The "fire coral" (*Millepora dichotoma*) as a cause of burns: a case report. *Burns. Incl. Therm. Inj.* 13:325-326.
- **Samuelson**, G., **1990**. Assays for pharmacological activity: Non-specific assays. *Methods in plant biochemistry*, 1ra ed. Academix Press, Nortfolk: 261-280.
- **Schagger**, H., **2006**. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1(1): 16–22.
- **Sher**, D. and Zlotkin, E. 2009. A hydra with many heads: Protein and polypeptide toxins from hydra and their biological roles. *Toxicon*, 54, 1148–1161.
- **Six**, D.A. and Dennis, E.A. **2000**. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488(1):1-19.
- **Solomon**, E.P., Berg, L.R., Martín, D.W. and Villee, C. **1998**. *Biología de Villee*. 4^a ed. McGraw-Hill Interamericana, México D.F. 598-602.
- **Turk**, T. and Kem, W. R. **2009**. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*. 54(8):1031-1037.
- **Watson**, G.M. Hessinger, S.A. **1989**. Cnidocyte mechanoreceptors are tuned to the movement of swimming prey by chemoreceptors. *Science*. 243:1589-1591.
- **Watters**, M.R., **2005**. Tropical marine neurotoxins: venoms to drugs. *Semin. Neurol.* 25:278-289.
- **Wittle**, L.W., Middlebrook, R. and Lane, C. **1971**. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicornis*. *Toxicon* 9:327-331.
- **Wu**, C.H. **2009**. Palytoxin: Membrane mechanisms of action. *Toxicon* 54, 1183-1189.
- **Yabe**, T., Yamada, H., Shimomura, M., Miyaoka, H. and Yamada Y. **2000**. Induction of choline acetyltransferase activity in cholinergic neurons by stolonidiol: structure–activity relationship. *J Nat Prod.* 63(4):433-35.

- **Yokoyama**, A., Murata, M., Oshima, Y., Iwashita, T. and Yasumoto, T. **1988**. Some chemical properties of maitotoxin, a putative calcium channel agonist isolated from a marine dinoflagellate. *J. Biochem.* 104, 184-187.
- **Zaharenko**, A.J., Picolo, G., Ferreira, W.A., Jr., Murakami, T., Kazuma, K., Hashimoto, M., Cury, Y., de Freitas, J.C., Satake, M. and Konno, K. **2011**. Bunodosine 391: An analgesic acylamino acid from the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *J. Nat. Prod.* 74, 378–382.