



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

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DE  
LOS COMPUESTOS VASOCONSTRICTORES DEL  
EXTRACTO ACUOSO DE *Pseudodiploria strigosa*

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

QFBT. ARANSAZU PIZANA HERNANDEZ

**DIRIGIDA POR**

Dr. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, CENTRO UNIVERSITARIO. 2018



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

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS  
VASOCONSTRICTORES DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Pseudodiploria  
strigosa*

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

QFBT. ARANSAZU PIZAÑA HERNANDEZ

**SINODALES**

Dr. José Alejandro García Arredondo  
Presidente  
Dr. Mamadou Moustapha Bah  
Secretario  
Dr. César Ibarra Alvarado  
Vocal  
Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera  
Suplente  
Dr. José Fernando Lazcano Pérez  
Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad de Química

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Octubre del 2018  
México

## RESUMEN

En un estudio previo, se reportó que los extractos acuosos de tres corales escleractinios (*Pseudiploria strigosa*, *Porites astreoides* y *Siderastrea siderea*), inducen vasoconstricción sobre segmentos de aorta aislada de rata. Con base en estos resultados, el presente trabajo tiene como objetivos determinar el mecanismo de acción involucrado en la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso de *P. strigosa* y obtener información sobre la naturaleza química de los componentes responsables dicha de actividad. Los resultados obtenidos indicaron que el extracto acuoso de *P. strigosa* induce un efecto bifásico en aorta aislada de rata que consta de una fase vasorrelajante seguida de una vasoconstricción. Esta última actividad se incrementó proporcionalmente a concentraciones de 0.1 a 10 µg de proteína/ml, sin embargo, a 100 µg de proteína/ml la vasoconstricción se redujo significativamente. La eficacia de la vasoconstricción aumentó significativamente al incubar previamente el extracto a ebullición durante 20 minutos, pero al incubar el extracto a ebullición bajo condiciones reductoras se perdió por completo su actividad. La vasoconstricción inducida por el extracto fue parcialmente dependiente del endotelio y se redujo significativamente en ausencia de calcio extracelular, en presencia de verapamilo y cuando las reservas de calcio intracelular se agotaron. La presencia de propranolol y fentolamina no disminuyó la actividad vasoconstrictora del extracto, por el contrario, ésta aumentó de manera significativa a concentraciones de 100 µg de proteína/ml. Por otra parte, se fraccionó el extracto mediante cromatografía de exclusión molecular, obteniendo ocho fracciones, de las cuales únicamente cuatro presentaron actividad sobre segmentos de aorta aislada de rata, una de ellas con efecto vasorrelajante dependiente de endotelio. Los compuestos responsables de dicho efecto son termolábiles. El análisis electroforético y mediante espectrometría de masas MALDI-TOF indicó que las fracciones del extracto contienen compuestos de un amplio rango de pesos moleculares. En conclusión, el extracto acuoso de *P. strigosa* contiene compuestos termolábiles que relajan la aorta de rata, mediante un mecanismo que depende de la presencia de endotelio y componentes termoestables que inducen vasoconstricción, mediante el incremento de calcio extracelular e intracelular.

**Palabras clave:** *Pseudodiploria strigosa*, vasoconstricción, vasodilatación, aorta de rata, mecanismo de acción.

## ABSTRACT

In a previous study, it was reported that the aqueous extracts of three scleractinian corals (*Pseudiploria strigosa*, *Porites astreoides* y *Siderastrea siderea*) induce vasoconstriction on isolated rat aortic rings. Based on these results, the objective of this work is to determine the action mechanism involved in the vasoconstrictive activity of the aqueous extract of *P. strigosa* and obtain information on the chemical nature of the components responsible for this activity. The results showed that the aqueous extract of *P. strigosa* induces a biphasic effect on the isolated rat aortic rings that consisted on a vasorelaxing phase followed by vasoconstriction. The latter activity increased proportionally at concentrations of 0.1 to 10 µg of protein/ml; however, at 100 µg protein/ml, the vasoconstriction was significantly reduced. The effectiveness of the extract increased significantly when it was incubated in a boiling bath for 20 minutes, but the activity was completely lost after boiling under reducing conditions. The vasoconstrictor activity was partially dependent on the endothelium and significantly reduced in the absence of extracellular calcium, in the presence of verapamil and when the intracellular calcium storages were depleted. In the presence of propranolol and phentolamine, the vasoconstriction did not decrease, conversely, it increased significantly at concentrations of 100 µg protein/ml. On the other hand, the extract was fractionated through size-exclusion chromatography, obtaining eight fractions. Four fractions induced activity on isolated rat aortic rings, one of them with vasorelaxing activity endothelium-dependent. The compounds responsible for this effect are thermolabile. Electrophoretic and mass spectrometry analysis indicated that the fractions contained compounds of a wide range of molecular weights. In conclusion, the aqueous extract of *P. strigosa* contains heat-labile compounds that induce that relax the rat aorta, through a mechanism that depends on the presence of endothelium and thermostable components that induce vasoconstriction, by increasing extracellular and intracellular calcium.

**Key words:** *Pseudodiploria strigosa*, vasoconstriction, vasodilation, rat aorta, action mechanism.

## ÍNDICE GENERAL

### Contenido

Resumen.	3
Abstract.	4
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
1. Introducción.	12
2. Antecedentes.	14
2.1 Biodiversidad de los arrecifes coralinos de México.	14
2.2 Phylum Cnidaria.	15
2.2.1 Morfología de los cnidarios.	15
2.2.2 Cnidocitos y cnidocistos.	17
2.2.3 Toxinas del phylum Cnidaria.	19
A. Neurotoxinas.	21
B. Citolisinas.	24
C. Enzimas que degradan lípidos de la membrana.	25
D. Metabolitos secundarios.	27
E. Perspectivas en la búsqueda de compuestos bioactivos en el phylum Cnidaria.	28
2.2.4 Venenos en cnidarios con efecto cardiovascular.	29
2.3 <i>Pseudodiploria strigosa</i> .	33
2.3.1 Hábitat y clasificación taxonómica.	33
2.3.2 Características morfológicas de las especies del género <i>Pseudodiploria</i> .	34
2.3.3 Estudios toxicológicos previos en venenos de <i>Pseudodiploria strigosa</i> .	35
2.4 Generalidades sobre el sistema cardiovascular.	36
2.4.1 Estructura de los vasos sanguíneos.	38

A. Arterias.	38
B. Venas.	39
C. Capilares.	39
2.4.2 Enfermedades cardiovasculares (ECV).	40
2.4.3 Control del tono vascular	43
A. Mecanismos de regulación de la contracción del músculo liso vascular.	44
B. Mecanismos de regulación de la contracción dependiente de endotelio vascular.	47
3. Justificación.	49
4. Pregunta de investigación.	50
5. Hipótesis.	51
6. Objetivos.	52
6.1 Objetivo general.	52
6.2 Objetivos específicos.	52
7. Metodología.	53
7.1 Recolección, transporte y conservación de los especímenes.	53
7.2 Preparación del extracto acuoso.	53
7.3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso.	54
7.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida.	54
7.5 Espectrometría de masas (MALDI-TOF).	54
7.6 Bioensayos.	55
7.6.1 Animales de experimentación.	55
7.6.2 Evaluación de la actividad biológica.	55
7.6.3 Estabilidad de la vasoactividad del extracto acuoso.	56
7.6.4 Caracterización preliminar de los mecanismos involucrados en la vasoactividad del extracto acuoso.	57
7.7 Análisis estadísticos.	57
8. Resultados	58

8.1 Preparación del extracto acuoso.	58
8.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso.	58
8.3 Análisis electroforético de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso.	59
8.4 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.	60
8.5 Evaluación de la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso.	61
8.6 Estabilidad de la vasoactividad del extracto acuoso.	63
8.7 Caracterización preliminar de los mecanismos de acción involucrados en la vasoconstricción inducida por el extracto acuoso.	64
8.7.1 Participación del endotelio vascular.	64
8.7.2 Influencia del calcio.	65
8.7.3 Participación de los receptores adrenérgicos.	68
8.8 Vasoactividad de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso.	69
9. Discusión.	70
10. Conclusión.	79
11. Referencias.	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Tipos celulares en el phylum Cnidaria.	16
2	Morfología de los cnidarios.	17
3	Composición anatómica de un cnidocito.	18
4	Morfología de <i>P. strigosa</i> .	35
5	Estructura de los vasos sanguíneos.	40
6	Perfil cromatográfico del extracto acuoso de <i>P. strigosa</i> (5 mg de proteína/500 $\mu$ l) en Superdex peptide 200 10/300 GL. La columna se eluyó con ácido acético 1.6 mM a un flujo de 0.5 ml/min	59
7	Perfil electroforético de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso de <i>P. strigosa</i> .	60
8	Espectro de masas MALDI-TOF de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso de <i>P. strigosa</i> .	61
9	Curva concentración-respuesta de la actividad vasoconstrictora inducida por el extracto acuoso de <i>P. strigosa</i> .	62
10	Efecto del extracto acuoso (A) y extracto desnaturalizado (B) sobre segmentos de aorta aislada de rata. Efecto del extracto acuoso sobre segmentos de aorta sin endotelio (C).	62
11	Actividad vasoconstrictora del extracto acuoso de <i>P. strigosa</i> , normal y desnaturalizado. ** $p < 0.01$ contra actividad biológica del extracto acuoso.	63
12	Actividad vasoconstrictora del extracto acuoso de <i>P. strigosa</i> sobre segmentos de aorta con y sin endotelio. * $p < 0.5$ y *** $p < 0.001$ contra actividad biológica del extracto acuoso.	64
13	Actividad vasoconstrictora inducida por el extracto acuoso de <i>P. strigosa</i> en presencia de bloqueadores de canales de $Ca^{2+}$	66



dependientes de voltaje (A) y en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (B).  
\*\* $p < 0.01$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$  contra actividad biológica del extracto acuoso.

- 14 Actividad vasoconstrictora inducida por el extracto acuoso de *P. strigosa*, en presencia de rianodina y cafeína en un medio con  $\text{Ca}^{2+}$  (A) y en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (B). \* $p < 0.5$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$  contra actividad biológica del extracto acuoso. 67
- 15 Actividad vasoconstrictora inducida por el extracto acuoso de *P. strigosa* en presencia de propranolol (A) y fentolamina (B). \* $p < 0.5$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$  contra actividad biológica del extracto acuoso. 68
- 16 Actividad biológica de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular del extracto acuoso de *P. strigosa*. Las barras negras indican vasoconstricción. Las barras blancas indica vasodilatación. 69

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Clasificación Taxonómica de <i>Pseudodiploria strigosa</i> .	34
2	Rendimiento de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso de <i>P. strigosa</i> .	58

## ABREVIATURAS

<b>AMPC</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CCVLs</b>	Canales de calcio voltaje dependientes tipo L
<b>cPLA<sub>2</sub></b>	Actividad de fosfolipasa A <sub>2</sub> citosólica
<b>DAG</b>	1,2-diacilglicerol
<b>GMPc</b>	Guanosina monofosfato cíclico
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfato
<b>K<sub>v</sub></b>	Canales de potasio dependientes de voltaje
<b>Na<sub>v</sub></b>	Canales de sodio dependientes de voltaje
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>RyR</b>	Receptores a rianodina
<b>SCV</b>	Sistema cardiovascular
<b>sPLA<sub>2</sub></b>	Actividad de fosfolipasa A <sub>2</sub> de secreción

## 1. INTRODUCCIÓN

El phylum Cnidaria está constituido por más de 11,000 especies de organismos acuáticos de simetría radial, la mayor parte de los cuales habitan en los sistemas marinos (Collins, 2009). A este phylum pertenecen especies acuáticas como: medusas comunes, cubomedusas altamente tóxicas, hidras, corales blandos, gorgonias, plumas de mar, anémonas y corales pétreos o escleractínios (Steele *et al.*, 2011). El nombre de este phylum se deriva de la presencia de células urticantes, conocidas como cnidocitos, que están distribuidas mayoritariamente en los tentáculos (Beckmann y Özbeck, 2012). Cada uno de estos cnidocitos contiene un organelo capsular, denominado nematocisto, que tiene la función de almacenar veneno e inyectarlo en las presas (Özbek *et al.*, 2009). Se ha documentado ampliamente que los venenos de los cnidarios están constituidos por una amplia variedad de compuestos de naturaleza proteínica, entre los que se encuentran diversas enzimas, citolisinas y neurotoxinas (Turk y Kem, 2009; Steele *et al.*, 2011; Frazão *et al.*, 2012; Jouiaei *et al.*, 2015).

Además de las toxinas contenidas en sus nematocistos, los cnidarios también presentan compuestos bioactivos en sus tejidos, la mayoría de los cuales son metabolitos secundarios que generalmente son liberados en su entorno como defensa ante sus competidores. Estas moléculas presentan efectos anti-depredación, antimicrobianos, alelopáticos y antiincrustantes (Changyun *et al.*, 2008). Incluso, algunos cnidarios producen polipéptidos no nematocísticos que tienen propiedades similares a las de otras toxinas contenidas en venenos de diferentes especies (Sher y Zlotkin, 2009). Por lo anterior, el phylum Cnidaria es considerado como una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos potencialmente útiles para la generación de prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos, herramientas de investigación farmacológica y productos biotecnológicos.

El alto grado de toxicidad de algunos cnidarios se debe principalmente a las complicaciones cardiovasculares que provocan (Seymour *et al.*, 2015). En evaluaciones *in vivo*, se ha encontrado que los venenos de las cubomedusas altamente tóxicas *Chironex fleckeri*, *Chiropsalmus quadrigatus* y *Carukia barnesi*, producen hipertensión en ratas, seguida de colapso cardiovascular (Ramasamy *et al.*, 2004; Noguchi *et al.*, 2005; Ramasamy *et al.*, 2005). En cambio, los venenos de las medusas menos tóxicas *Cyanea capillata* y *Nemopilema nomurai* producen hipotensión en ratas sin producir colapso cardiovascular (Kim *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2010). En evaluaciones farmacológicas sobre tejidos aislados, también se han encontrado efectos que varían dependiendo de la especie. Los venenos de los cindarios *C. fleckeri* y *Chiropsella bronzie*, *N. nomurai*, *C. capillata*, *Millepora alcicornis*, *M. complanata* y *Palythoa caribbaeorum* inducen vasoconstricción sobre segmentos de aorta aislada de rata sin endotelio (Kim *et al.*, 2006; Winter *et al.*, 2007; García-Arredondo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Lazcano-Pérez *et al.*, 2018). Por el contrario, el veneno del sifonóforo *Physalia physalis* produce vasodilatación en segmentos de aorta aislada de conejo pre-contraídos con fenilefrina (Loredo *et al.*, 1986).

En un estudio previo, realizado por nuestro grupo de trabajo, se evaluaron por primera vez diversas actividades biológicas de los extractos acuosos de tres corales escleractinios ampliamente distribuidos en el Caribe Mexicano. Las especies consideradas fueron *Pseudodiploria strigosa*, *Porites astreoides* y *Siderastrea sidérea* (García-Arredondo *et al.*, 2016). En ese estudio se encontró que a pesar de que esos corales no son considerados como tóxicos para los humanos, sus extractos acuosos también inducen vasoconstricción en segmentos de aorta aislada de rata, siendo el extracto de *P. strigosa* el que presentó mayor actividad vasoconstrictora. En la presente propuesta de investigación, se realizó un fraccionamiento cromatográfico preliminar y un estudio farmacológico del extracto acuoso de *P. strigosa*, a fin de conocer el tipo de moléculas presentes en este extracto y el mecanismo de acción involucrado en su actividad vasoconstrictora.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Biodiversidad de los arrecifes coralinos de México.

El ambiente marino cuenta con una gran biodiversidad, por lo que constituye una fuente prácticamente ilimitada de nuevos compuestos bioactivos que pueden llegar a ser útiles para el desarrollo de nuevos fármacos y a su vez proporcionar nuevas herramientas de investigación farmacológica. El ámbito marino se puede dividir de acuerdo con las zonas de vida en: zona pelágica, asociada al cuerpo de agua, y zona bentónica, asociada al fondo. Definiendo esto, los arrecifes de coral son las comunidades bióticas bentónicas con mayor biodiversidad en el ambiente marino, formando hábitats masivos y complejos para una gran cantidad de especies (Lara-Lara, 2008).

Entre los ecosistemas más invaluable de México, se encuentran los arrecifes de coral, localizándose en los golfos de California y México, o bien, en el mar Caribe (Sandra *et al.*, 2015). En este último, se encuentra gran parte del Sistema Arrecifal Mesoamericano, que es la segunda barrera coralina más grande del mundo (Carrillo *et al.*, 2015). Las bases de los arrecifes coralinos están formadas principalmente por las estructuras duras de carbonato de calcio que producen los corales pétreos (orden Scleractinia) (Cordie y Budd, 2016). Los segundos organismos formadores de arrecifes de coral son los hidrocorales de la clase Hydrozoa, que aunque se conocen comúnmente como “corales de fuego” no son clasificados propiamente como corales (Rojas *et al.*, 2012). Otras especies que contribuyen al crecimiento de los arrecifes de coral son las algas rojas coralinas (phylum Rodophyta), algas calcáreas verdes (Género Halimeda), foraminíferos (phylum Rhizaria, Clase Foraminifera) y los moluscos (phylum Mollusca) (Lara-Lara, 2008). Los corales pétreos son también conocidos como corales hermatípicos por su contribución en la formación de los arrecifes de coral. Estos corales generalmente se extienden en aguas poco profundas, crecen mejor en aguas cálidas y claras donde la luz solar es capaz de filtrarse a través del agua para llegar a las algas simbióticas que viven dentro de sus tejidos y así alimentarse. Existen en

México alrededor de 60 especies de corales constructores de arrecifes; además, tan solo en el sur del Golfo de México se han registrado 1,983 especies de plantas y animales asociados a los arrecifes (SEMARNAT, 2011).

## **2.2 Phylum Cnidaria.**

El phylum Cnidaria agrupa alrededor de 11,000 especies acuáticas, gran parte de las cuales habitan en el ambiente marino (Collins, 2009). En la actualidad, una clasificación taxonómica bien aceptada para este phylum se define a partir de dos grupos; el primer grupo pertenece al subphylum Medusozoa que incluye las clases Scyphozoa (medusas comunes), Cubozoa (cubomedusas), Staurozoa (medusas sésiles), Hydrozoa (hidras e hidrocorales) y Polypodiozoa (cnidarios parásitos). El segundo grupo está conformado por la clase Anthozoa e incluye las subclases Octocorallia (corales blandos, gorgonias y plumas de mar) y Hexacorallia (anémonas, zoantídeos y corales pétreos) (Collins, 2009).

### **2.2.1 Morfología de los cnidarios.**

Los cnidarios tienen una forma corporal compuesta de dos capas celulares. Una de ellas es la epidermis externa o ecdodermo y la otra es la gastrodermis interna o endodermo (Figura 1). Entre ambas paredes se encuentra un material gelatinoso llamado mesoglea, el cual sostiene y da forma al organismo (Rojas-Molina *et al.*, 2012).

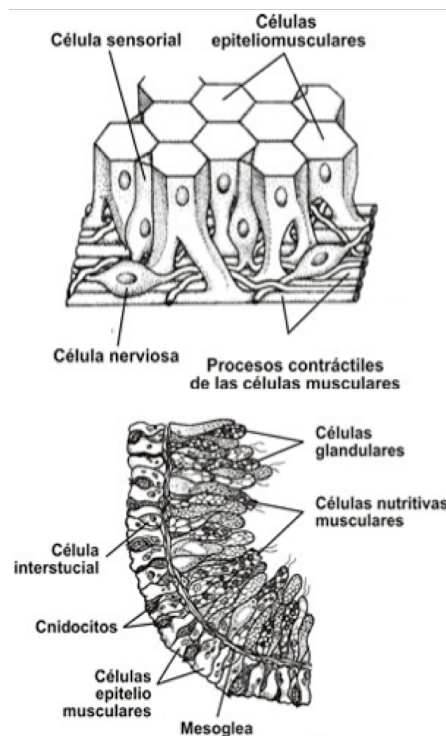
La endodermis contiene los siguientes tipos de células:

- Células gástricas: Estas células ayudan en la digestión mecánica de las presas.
- Células secretoras de enzimas digestivas o de mucus: Estas células son más abundantes en el orificio que actúa como boca y ayudan a la digestión enzimática.

- Células simbiotas de otras especies: Estas células son principalmente microalgas fotosintéticas que viven en simbiosis con el cnidario.

La ectodermis presenta varios tipos celulares, entre los cuales se encuentran:

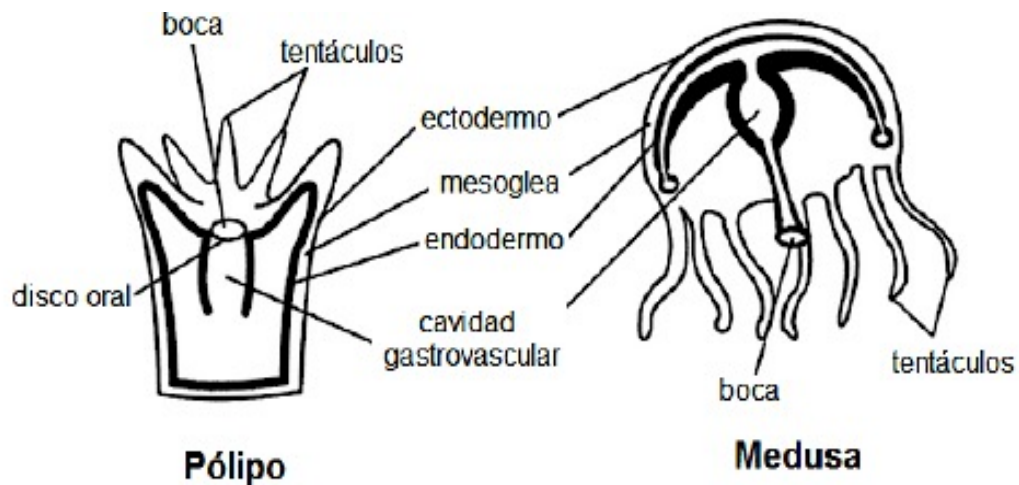
- Células epitelio-musculares que presentan en forma de columna y en la base tienen numerosas extensiones basales interconectadas que forman una capa contráctil paralela al eje del cuerpo o bien de los tentáculos.
- Células sensoriales que son alargadas y están conectadas al sistema nervioso y son muy abundantes en los tentáculos.
- Células nerviosas que forman un sistema nervioso difuso.
- Células intersticiales que dan origen a otros tipos celulares.
- Cnidocitos que son células urticantes que constituyen un buen sistema de defensa y que caracterizan al phylum.



**Figura 1.** Tipos celulares en el phylum Cnidaria (modificado de Barnes, 1985).



El cuerpo de los cnidarios suele presentar una de dos diferentes formas corporales (Figura 2): forma de pólipo y forma de medusa. La forma de pólipo la presentan generalmente los cnidarios que viven fijos al sustrato por un disco basal. Pueden vivir aislados como anémonas, o bien, formando colonias unidas por un exoesqueleto calcáreo, por ejemplo, los corales y las gorgonias. La otra forma corporal es la de medusa. Las medusas son cnidarios de vida libre con forma de campana o plato en el que la boca se encuentra en la parte inferior, su cuerpo tiene forma de sombrilla y puede flotar y nadar suavemente gracias a ligeras contracciones corporales (Solomon *et al.*, 1998).

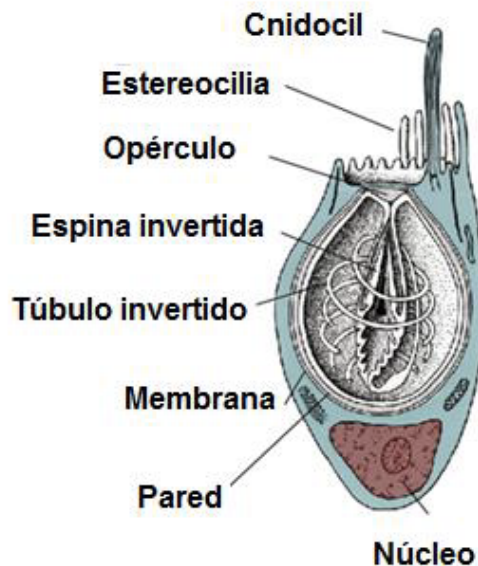


**Figura 2.** Morfología de los cnidarios (Solomon *et al.*, 1998).

### 2.2.2 Cnidocitos y cnidocistos.

Las especies del phylum Cnidaria, caracterizadas por la presencia de cnidocitos, los cuales son células eucariotas especializadas que presentan un orgánulo altamente complejo, que consiste en una cápsula rígida con un túbulo invertido dentro de ésta (Figura 3). Este orgánulo recibe el nombre de cnida o cnidocisto, y puede ser de tres tipos: pticocisto, espirocisto y nematocisto (Weill, 1934; Mariscal *et al.*, 1977; Özbek *et al.*, 2009). Los pticocistos se encuentran

exclusivamente en las anémonas tubo (clase Anthozoa, orden Ceriantharia). Los túbulos extendidos de los pticocistos se entrelazan para formar el tubo de los ceriántidos, cumpliendo con una función solamente estructural (Mariscal *et al*, 1977). Por otra parte, los espirocistos se encuentran solamente en la clase Anthozoa, la pared de su cápsula es delgada, carece de espinas y el túbulo invertido está fuertemente enroscado. Este tipo de cnidocisto secreta una sustancia higroscópica adherente y es utilizada para de forma mecánica inmovilizar a las presas (Özbek *et al.*, 2009). Los nematocistos se encuentran en todas las especies del phylum a diferencia de los pticocistos y los espirocistos. Se utilizan principalmente para la captura de presas y la defensa debido a que almacenan una compleja mezcla de toxinas (Tardent, 1995; Özbek *et al.*, 2009; Beckmann y Özbek, 2012).



**Figura 3.** Composición anatómica de un cnidocito (modificado de Anderson y Bouchard, 2009).

Los nematocitos están formados por una cápsula que puede ser de forma esférica u ovalada. En la parte apical de esta cápsula se encuentra una abertura cerrada por una pequeña tapa llamada opérculo. Al interior de la cápsula del nematocito se encuentra un filamento tubular invertido enrollado (Tardent, 1995).

Las paredes de la cápsula están constituidas principalmente por un material similar al colágeno y por una glicoproteína denominada NOWA (Meier *et al.*, 2007). La superficie del cnidocito posee una estructura sensorial, el cnidocilio, el cual se encarga de responder a los estímulos de los depredadores o de sus presas y tiene como principal función la activación de la descarga del nematocisto. Los nematocistos están inervados por lo que se encuentran en comunicación con el resto del organismo, pero de igual forma pueden ser estimulados de manera individual para la descarga, es decir, que son efectores independientes (Turk y Kem, 2009).

Bajo el estímulo adecuado, ya sea químico y/o mecánico (Watson y Hessinger, 1989), la presión osmótica del nematocisto se libera. Esto provoca la proyección del túbulo que inicialmente estaba invertido hacia el exterior, y de este modo, las toxinas presentes dentro de los nematocistos son inyectadas a las presas a través del túbulo (Özbek *et al.*, 2009). La descarga del nematocisto ocurre en un periodo menor de 3 ms, y es considerado como uno de los procesos celulares más rápidos (Holstein y Tardent, 1984).

La descripción morfológica de los nematocistos presenta un valor taxonómico potencial, debido a que esta información, en algunas ocasiones, ayuda a la clasificación de especies. Por ejemplo, de los 25 tipos de nematocistos que han sido reconocidos (Mariscal *et al.*, 1977), 17 de ellos se han encontrado exclusivamente en la clase Hydrozoa, mientras que dos son exclusivos de la clase Anthozoa (Özbek *et al.*, 2009).

### 2.2.3 Toxinas del phylum Cnidaria.

Los cnidarios son el linaje de animales venenosos más antiguo existente. A pesar de poseer una sencilla anatomía, son capaces de someter a otras especies como presas y depredadores aún más complejos que ellos. Los cnidarios inyectan nematocistos o veneno que inicia reacciones tóxicas e inmunológicas en el organismo sometido (Jouiaei *et al.*, 2015). En estudios anteriores, se ha demostrado que estos venenos contienen una gran variedad de compuestos

biológicamente activos entre los cuales están enzimas, toxinas formadoras de poros y neurotoxinas; siendo la mayor parte de éstas de naturaleza proteínica. También se ha encontrado una amplia variedad de metabolitos secundarios tóxicos en este phylum (Kem y Turk, 2009). Las enzimas lipolíticas catabolizan los tejidos de la presa. Las toxinas que forman poros se auto-ensamblan para formar robustos poros en la membrana que pueden causar la muerte celular a través de la lisis osmótica y las neurotoxinas modifican la actividad de diversos canales iónicos (Jouiaei *et al.*, 2015).

Durante los primeros años, la investigación de los venenos de los cnidarios se enfocó principalmente en los cnidarios fue en los nematocistos, que fueron identificados por varios zoólogos en la primera mitad del siglo XIX como los aparatos venenosos en las medusas y anémonas (Turk y Kem, 2009). Por otra parte, se realizaron investigaciones en Alemania y Francia en las últimas tres décadas, en donde se purificaron y caracterizaron algunos péptidos neurotóxicos de anémonas europeas por las siguientes tres décadas. Sin embargo, solo una pequeña fracción (<1%) de las especies conocidas del phylum Cnidaria han sido implicadas en picaduras en humanos, es bien sabido que la mayoría de los miembros no parasitarios de las especies de cnidarios son tóxicos para algunos animales. Además, ya han sido aisladas toxinas de algunas especies que se consideran inofensivas de acuerdo a sus actividades biológicas (Turk y Kem, 2009; Frãzao *et al.*, 2012).

El phylum Cnidaria incluye organismos que se encuentran entre los animales más venenosos (Frãzao *et al.*, 2012). Los venenos pueden definirse como secreciones complejas compuestas de muchos constituyentes activos, que generalmente contienen una amplia variedad de toxinas y sustancias accesorias que facilitan el proceso de envenenamiento (Turk y Kem, 2009). La composición de los venenos de cnidarios aún no se conoce a gran profundidad. Alrededor de 250 compuestos han sido identificados (compuestos proteicos como péptidos, proteínas, enzimas e inhibidores de proteasas y sustancias no proteicas como purinas, compuestos de amonio cuaternario, aminas y betaínas biogénicas). Las toxinas que se definen como sustancias elaboradas por un organismo vivo que

tienen un efecto adverso en algún proceso vivo, son para la adquisición de presas, pero también para disuadir predadores potenciales (con efectos neurotóxicos y cardiotoxicos) e incluso para pelear en disputas territoriales (Bosmans y Tytgat, 2007; Turk y Kem, 2009).

El envenenamiento masivo de un ser humano, causado por especies de este phylum, puede causarle la muerte, dentro de unos pocos minutos a una hora después de la picadura (Rojas-Molina *et al.*, 2012).

El phylum Cnidaria no solo es estudiado por sus efectos tóxicos como riesgo para la salud, sino también por ser una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos con posibles propiedades terapéuticas. Es importante resaltar algunas de sus actividades biológicas, como por ejemplo actividades sobre canales iónicos dependientes de voltaje (Bosmans y Tytgat, 2007). Además, ciertos venenos de cnidarios contienen o inducen la liberación de sustancias vasodilatadoras, mientras que varios estudios muestran que algunos de sus compuestos presentan actividad vasoconstrictora (Jouiaei *et al.*, 2015; García-Arredondo *et al.*, 2016).

#### A. Neurotoxinas.

Las principales toxinas aisladas de cnidarios son de dos tipos: neurotoxinas, que son principalmente péptidos capaces de modular la función de manera específica de diversos tipos de canales iónicos; y las citolisinas, las cuales son proteínas de alto peso molecular en su mayoría (Turk y Kem, 2009; Frãzao *et al.*, 2012).

Poco se conoce hasta el momento de las toxinas aisladas de los cnidarios, principalmente se han identificado cinco grupos de toxinas peptídicas aisladas de anémonas marinas que actúan sobre los canales de sodio voltaje dependientes ( $Na_v$ ) uno de estos grupos incluye péptidos pequeños de 27 a 32 residuos de aminoácidos mientras que los otros dos grupos incluyen péptidos de 45 a 50 residuos de aminoácidos (Rogers *et al.*, 1996). Estas toxinas evitan la inactivación del canal  $Na_v$  al estabilizar la conformación del estado abierto, esto debido a la

unión de la toxina con el sitio receptor 3 del canal, localizado en el asa que conecta los segmentos transmembranales S3 y S4 del dominio IV de la subunidad  $\alpha$  del canal. Estas toxinas constituyen una parte importante del veneno y esto en parte hace que sean las más estudiadas hasta la fecha (Frãzao *et al.*, 2012). Como resultado de la inactivación completa de los canales de sodio dependientes de voltaje causada por estas toxinas pueden ocurrir efectos cardiotóxicos, los cuales van desde arritmias desencadenadas por despolarización hasta un paro cardiaco, debido a la sobrecarga de calcio en las células del miocardio (Turk y Kem, 2009).

Actualmente, se sabe que estas toxinas polipeptídicas de 3 a 5 kDa pueden ser agrupadas en cuatro clases según su estructura: tipo I con 35-37 residuos de aminoácidos y tres puentes disulfuro; tipo II con 58-59 residuos y tres puentes disulfuro; tipo III con 41-42 residuos y tres puentes disulfuro; y tipo IV con 28 residuos y dos puentes disulfuro. En cuanto a la información de la actividad farmacológica de estos tipos de toxinas, se tiene el conocimiento de que las toxinas de tipo I bloquean corrientes a través de los canales  $K_v1$ , además de interferir en la conductancia de los canales voltaje-dependientes de calcio. Las toxinas de tipo II son homólogas a los inhibidores de serina proteasas tipo Kunitz. Se considera que los inhibidores de proteasas funcionan inhibiendo proteasas endógenas en animales, o bien para proteger a las toxinas inyectadas en presas de una rápida degradación en las presas (Turk y Kem, 2009).

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

Hasta la fecha han sido reportadas, una gran cantidad de toxinas aisladas de anémonas, que actúan sobre canales de potasio dependientes de voltaje ( $K_v$ ). Estas toxinas se agrupan de acuerdo a sus diferencias tanto estructurales como funcionales en 5 diferentes tipos, que se mencionan a continuación:

Las de tipo 1 contienen de 35–42 aminoácidos que forman 2 hélices casi perpendiculares que incluyen 3 puentes disulfuro; estas toxinas bloquean con gran potencia los canales  $K_V$ . Se ha observado que para la toxina ShK de *Stichodactyla helianthus* (clase Anthozoa), el residuo de lisina 22 y el residuo de tirosina 23 son esenciales para la interacción con los canales  $K_V$  en cerebro de rata. Un resultado similar fue encontrado para la toxina BgK de *Bunodosoma granulifera* (clase Anthozoa) (Pennington *et al.*, 1996).

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

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

Las toxinas de tipo 4 han sido aisladas de la anémona de mar *Bunodosoma cangicum* (Zaharenko *et al.*, 2008); mientras que las toxinas de tipo 5, se han aislado del veneno de la anémona *Bunodosoma caissarum*. Comprenden péptidos de 50 aminoácidos de largo (Orts *et al.*, 2013).

Se han encontrado toxinas de canales de potasio con actividad inhibidora de proteasas, como las kalicudinas, lo cual ha llevado a concluir que los inhibidores de proteasa de las anémonas no solo sirven como sustancias de defensa, sino también como sustancias útiles para paralizar presas. De tal manera que las toxinas inhibidoras de proteasa tipo Kunitz, además de la inhibición de serina-proteasa, también bloquean varios tipos de canales permeables a cationes, tales como los canales  $K_{V1.2}$  (González *et al.*, 2009). Por su parte, las toxinas de tipo III no son activas en las subunidades de los  $K_{V1}$  pero bloquean corrientes que involucran

subunidades de  $K_{v3}$  o canales ERG. Los canales ERG humanos son un componente esencial de las células cardiacas que controla la duración de la fase plateau del potencial de acción. Por otra parte; las toxinas tipo III, como la BDS-I y II, demostraron actuar modificando la compuerta del canal en lugar de directamente bloquear el poro del canal (Castañeda y Harvey, 2009).

## B. Citolisinas.

El objetivo principal de estas toxinas es provocar la destrucción de determinados tipos celulares, interaccionando con sus membranas celulares. El daño celular generalmente es causado por la formación de poros en las membranas celulares de los tejidos. Las citolisinas suelen ser las más comunes en el veneno de los cnidarios, por lo que se ha llegado a pensar que su efectividad al causar daño al organismo diana es evolutivamente más ventajosa, debido a que estas proteínas son capaces de lisar eritrocitos y otras células a concentraciones nanomolares (Díaz y Arm, 2003). El mecanismo general de acción de las PFTs (Pore Forming Toxins) puede ser descrito en tres pasos como se muestra a continuación: 1) como primer paso, la secreción de proteínas solubles que atacan la membrana de la célula diana por reconocimiento más o menos específico de lípidos y/o dominios de lípidos; 2) oligomerización en el plano de la membrana y 3) proyección de segmentos de polipéptidos anfifílicos de estructuras  $\alpha$  o  $\beta$  a través de la bicapa lipídica para construir poros hidrofílicos revestidos por conjuntos de  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ -PFTs) o varias horquillas  $\beta$  ( $\beta$ -PFTs) (Anderluh y Maček, 2002).

Algunas de las citolisinas que se han logrado aislar de venenos de cnidarios actúan mediante la formación de poros en las membranas. Se ha reportado que muchas especies de anémonas producen citolisinas, las cuales son un tipo de toxinas de gran importancia ya que sirven como proteínas modelo para estudiar las interacciones proteína-lípido de membrana. También son usadas para estudiar la erradicación de células tumorales y parásitos, además, también tienen propiedades cardioestimuladoras, dermatonecróticas y actividad antihistamínica (Klyshko *et al.*, 2004; Tejuca *et al.*, 2009).



En la década de los setentas, las toxinas citolíticas de las anemonas atrajeron la atención de los investigadores, que descubrieron un interesante sistema citolítico en nematocistos acantociales de la anémona *Aiptasia pallida*. Este fue el primer reporte de la presencia de fosfolipasa A<sub>2</sub> en el veneno de las especies Cnidaria, junto a un factor lítico indirecto de origen proteínico, el veneno de *A. pallida* que presentó actividad hemolítica. Por otra parte, la primera actinoporina en purificarse fue la equinatoxina, llamada así por su fuente *Actinia equina*. Después se logró demostrar que la equinatoxina es en realidad una mezcla de tres isotoxinas de las cuales la más abundante es la equinatoxina II (Ferlan y Lebez, 1974; Turk y Kem, 2009).

Las citolisinas han sido clasificadas de acuerdo a sus propiedades funcionales y a su estructura primaria en cuatro grupos de proteínas: Las tipo I (péptidos de 5 a 8 kDa) forman poros en membranas que contienen fosfatidilcolina y tiene actividad antihistamínica (Klyshko *et al.*, 2004). Por otra parte, están las citolisinas de tipo II (péptidos de 20 kDa), las cuales constituyen las más numerosas dentro de las citolisinas y son inhibidas por esfingomielina. Estas citolisinas tienen habilidad de formar poros en las membranas como resultado de su polimerización en la bicapa lipídica (Ferlan y Lebez, 1974). Las citolisinas de tipo III (péptidos de 30 a 40 kDa) pueden o no tener actividad de fosfolipasa (García-Sáez *et al.*, 2011). Finalmente, las citolisinas tipo IV (80 kDa) contienen un grupo tiol-activado. *Metridium senile* produce metridiolisina que es hasta ahora el único representante de este grupo de toxinas (Klyshko *et al.*, 2004).

### C. Enzimas que degradan lípidos de la membrana.

Las enzimas contenidas en los diferentes venenos de los cnidarios, como anémonas y corales, presentan importantes actividades citolíticas y citotóxicas (Romero *et al.*, 2010). En los venenos de *Bunodosoma caissarum* y *Millepora platyphylla* se ha observado la presencia de estas enzimas (de Oliveira *et al.*, 2006; Radwan y Aboul-Dahab, 2004). Se ha reportado que estas toxinas pueden presentar otros efectos que incluyen actividad antimicrobiana, antiparasitaria o

acción sobre canales iónicos (Dube *et al.*, 2007; Norton *et al.*, 2004; Seleglim *et al.*, 2007). En cnidarios, las toxinas con actividad enzimática se encuentran clasificadas en dos grupos: el primer grupo son las fosfolipasas A<sub>2</sub>, esta clase de enzimas hidroliza el enlace en la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos para producir ácidos grasos libres (Frazão *et al.*, 2012). La presencia estas enzimas en los venenos de organismos como reptiles, centípedos, insectos, arácnidos, cnidarios y cefalópodos indica que son componentes esenciales en el arsenal tóxico de estos animales. Las PLA<sub>2</sub>s en los cnidarios son importantes para la defensa, la inmovilización y digestión de las presas (Talvinen y Nevalainen, 2002)

Las toxinas con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) son aquellas cuyo mecanismo de acción involucra la degradación enzimática de lípidos membranales específicos. Éstas juegan un papel importante en los venenos de los cnidarios para ayudar a capturar y digerir presas, además de servir como mecanismo de defensa (Nevalainen y Talvinen, 2002).

Es importante diferenciar a las PLA<sub>2</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>) de las de secreción (sPLA<sub>2</sub>). Las PLA<sub>2</sub> citosólicas desempeñan un papel importante dentro de las células, ya que se encargan de la producción de diversos compuestos bioactivos endógenos, activando la vía del ácido araquidónico (Diaz y Arm, 2003). Por otra parte, las sPLA<sub>2</sub> se encuentran en los venenos de diversos organismos, así como en otras secreciones como la saliva y el jugo pancreático (Nevalainen y Talvinen, 2002). Se han encontrado en el phylum Cnidaria, altos niveles de actividad de sPLA<sub>2</sub> en los venenos de diversas especies (Nevalainen y Talvinen, 2002). Así mismo, se han llegado a clonar sPLA<sub>2</sub> de las anémonas marinas como *Adamsia palliata* (clase Anthozoa) (Nevalainen y Talvinen, 2002) y *Urticina crassicornis* (Razpotnik *et al.*, 2009). La mayoría de las veces, este tipo de toxinas actúan en conjunto con otras citolisinas para inducir la lisis de las células. También, se ha encontrado que algunas de estas citolisinas requieren de cationes divalentes (Ca<sup>2+</sup> y el Mg<sup>2+</sup>) para alcanzar su actividad óptima; tal es el caso de la β-PLA<sub>2</sub> de *A. palliata* (Diaz y Arm, 2003).

Se han encontrado en los venenos de diversas especies del phylum Cnidaria altos niveles de actividad de sPLA<sub>2</sub> (Nevalainen y Talvinen, 2002); por ejemplo, 735

U/g proteína en organismos de la clase Hydrozoa (Six y Dennis, 2000). Estas enzimas se caracterizan por tener de 5 a 8 puentes disulfuro, un tamaño que va de 14 a 19 kDa, así como por contar con una histidina en el sitio catalítico y por ser dependientes de la presencia del ion calcio (Six y Dennis, 2000).

El otro grupo se encuentran las metaloproteasas que son componentes importantes de los venenos de animales terrestres como centípedos, serpientes y garrapatas (Fry *et al.*, 2009), producen hemorragia y necrosis por la degradación de la matriz extracelular (Fox y Serrano, 2005). Las metaloproteasas han sido detectadas en el veneno de las medusas *Stomolophus meleagris* y *Chironex fleckeri* (Li *et al.*, 2014). Algunas de las funciones citotóxicas de las metaloproteasas incluyen actividades gelatinolítica, caseinolítica y fibrinolítica (Lee *et al.*, 2011).

#### D. Metabolitos secundarios.

Además de las neurotoxinas, los metabolitos secundarios bioactivos son comunes y ecológicamente más importantes entre los organismos tropicales bentónicos que están sujetos a altas tasas de ataque y competencia por el espacio territorial en los arrecifes de coral. Entre los metabolitos secundarios más comunes de origen marino, se incluyen terpenos, acetogeninas, alcaloides y compuestos polifenólicos (Hay, 1996). Además, existen algunos metabolitos secundarios que no han sido totalmente caracterizados y estudiados (Frazão *et al.*, 2012).

Algunos de los metabolitos secundarios bioactivos de origen marino más importantes y numerosos son los diterpenos cíclicos, muchos de los cuales se han encontrado en los octocorales de la clase Anthozoa. Un ejemplo de los diterpenos de mayor interés farmacológico es la lophotoxina aislada de gorgonias del pacífico cuya estructura base es un cembrano y un anillo carboxílico de 14 miembros, así como un furano heterocíclico que abarca de C3 a C6; éste compuesto cíclico bloquea irreversiblemente los receptores nicotínicos a acetilcolina debido a la formación de un enlace covalente entre uno de sus dos grupos epóxido y una importante cadena lateral de tirosilos en el sitio de unión a acetilcolina (Roethle y

Trauner, 2008; Turk y Kem, 2009).

Otro ejemplo de metabolitos secundarios de origen marino con interés farmacológico es la palitoxina (PLTX), encontrada en cnidarios y constituye uno de los compuestos más importantes debido a su alta toxicidad. Esta toxina, considerada como la más potente de origen marino, fue aislada originalmente de zoantidos (Clase Anthozoa) del género *Palythoa*. La PLTX es un complejo poliéter que actúa sobre la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , convirtiéndola en un poro, lo cual estimula el influjo de sodio y el eflujo de potasio. Por lo tanto, esta toxina despolariza las membranas de un amplio rango de sistemas. En los sistemas excitables la despolarización provocada por PLTX puede modular la actividad del canal de calcio, resultando en un incremento del calcio intracelular, el cual a su vez puede estimular eventos que son regulados por vías dependientes de calcio (Roethle y Trauner, 2008).

#### E. Perspectivas en la búsqueda de compuestos bioactivos en el phylum Cnidaria.

Aunque se han realizado numerosas investigaciones sobre los venenos de los cnidarios, aún falta realizar la caracterización de una gran cantidad de compuestos de este tipo de animales. Estudios recientes estiman que el veneno de cada especie del phylum Cnidaria contiene alrededor de 100 compuestos, pero en la actualidad solo se conoce menos del 1% (Frãzao *et al.*, 2012). Los estudios detallados de los venenos y toxinas de este phylum pueden no solo permitir un mejor entendimiento de los procesos evolutivos de los animales para adaptarse a los cambios en el ecosistema y para asegurar su supervivencia, sino que también constituyen fuentes importantes de nuevos compuestos con actividades biológicas interesantes que pueden aprovecharse en el desarrollo de nuevos fármacos, así como en la generación de herramientas biotecnológicas y de investigación farmacológica.

#### 2.2.4 Venenos en cnidarios con efecto cardiovascular.

En los ecosistemas marinos se encuentra una gran cantidad de organismos venenosos, entre los cuales destacan las especies del phylum Cnidaria (Watters, 2005), las cuales son fuentes valiosas de compuestos bioactivos novedosos que actúan sobre diferentes dianas biológicas, entre las que destaca el sistema cardiovascular.

En un estudio realizado en 1971, se demostró que dos toxinas inestables de alto peso molecular, aisladas de los tentáculos de *C. fleckeri* por cromatografía de exclusión, son cardiotoxicas. Adicionalmente, la fracción de más bajo peso molecular es también una potente hemolisina. Ambas toxinas reducen la velocidad, la amplitud de la contracción y el flujo coronario en el corazón de cobayo. Además, las dos toxinas provocan un aumento de la presión arterial en ratas y conejos anestesiados mediante una acción directa sobre la musculatura vascular. Posteriormente, se presenta también hipotensión, bradicardia e irregularidad cardíaca. Un aumento de la frecuencia respiratoria es seguido por una apnea de duración variable, que se asocia con un aumento de la presión arterial. Los animales muestran frecuentemente oscilaciones de la presión arterial con períodos de apnea intercalados con hiperpnea. Con respecto a la dosis letal en el ratón, la fracción hemolítica es menos potente que la fracción puramente cardiotoxica. En este estudio se concluyó que los efectos cardiovasculares de las dos toxinas se deben a la vasoconstricción, cardiotoxicidad, estimulación barorreceptora y posiblemente depresión del centro vasomotor (Freeman y Turner, 1971).

Otro estudio realizado en 1974 demostró que dos proteínas de alto peso molecular obtenidas de los tentáculos de la medusa *C. leeker*, tienen efectos tóxicos en el corazón. Este estudio sugiere que los efectos tóxicos son producidos por la proteína de mayor peso molecular. Sin embargo, estos efectos fueron reversibles. Los experimentos en presencia de tetrodotoxina sugirieron que la molécula más grande causó un aumento en la permeabilidad de sodio a la membrana, mientras que la molécula pequeña no causó un incremento en la permeabilidad de la membrana. El nodo atrioventricular fue particularmente

sensible a las acciones de ambas toxinas.. Aunque el nodo sinoatrial fue ligeramente despolarizado por ambas toxinas (Freeman, 1974).

Se han estudiado los efectos de las toxinas del cubomedusa *Chironex fleckeri Southcott* en corazón de cobayo, en este estudio pequeñas dosis de toxina dieron como resultado reducciones reversibles en el arco coronario, el corazón y la amplitud de la contracción, mientras que dosis mayores produjeron cambios irreversibles. Aunque la toxina no parecía actuar en receptores adrenérgicos alfa o beta, las catecolaminas proporcionaban cierta protección. La serotonina estaba desprovista de cualquier acción protectora. Los resultados de esta investigación sugieren que los diferentes efectos de los agentes vasodilatadores sobre la respuesta de la toxina se deben a sus diferentes sitios de acción dentro de la circulación coronaria. Además, la estimulación del metabolismo cardíaco por las catecolaminas y la adenosina o ATP también puede ser un factor en el mantenimiento de la contractilidad cardíaca en presencia de la toxina (Turner y Freeman, 1969).

La toxina pCrTX parcialmente purificada de los tentáculos de la medusa *Carybdea rastonii* actúa directamente sobre las células del músculo liso arterial, produciendo una contracción arterial dependiente de calcio. Estos resultados sugieren que la vasoconstricción inducida por pCrTX es causada por una acción presináptica, liberando la noradrenalina de las terminales nerviosas intramurales adrenérgicas, y por una acción postsináptica, que consiste al menos en parte en la estimulación de la afluencia de calcio al citosol. Las acciones pre y postsinápticas dependen de la concentración externa de calcio. Además, los datos sugieren que pCrTX daña los mecanismos de absorción y/o almacenamiento de la noradrenalina sin dañar la función postsináptica contráctil (Azuma *et al.*, 1986). Esta toxina también induce una contracción dependiente de calcio sobre el músculo liso en aorta aislada de conejo a concentraciones superiores a  $10^{-7}$  g/ml (Ozaki *et al.*, 1986).

Actualmente, se ha encontrado que el alto grado de toxicidad de los cnidarios se debe principalmente a las complicaciones cardiovasculares que provocan, por lo que algunas investigaciones se han enfocado en la obtención de

información sobre sus efectos sobre el sistema cardiovascular (Seymour *et al.*, 2015). En evaluaciones *in vivo*, se encontró que los venenos de las cubomedusas *Chironex fleckeri*, *Chiropsalmus quadrigatus* y *Carukia barnesi* producen hipertensión en ratas, seguida de colapso cardiovascular (Ramasamy *et al.*, 2004; Noguchi *et al.*, 2005; Ramasamy *et al.*, 2005). En cambio, los venenos de las medusas *Cyanea capillata* y *Nemopilema nomurai*, que presentan un menor grado de toxicidad para los humanos, producen hipotensión en ratas sin producir colapso cardiovascular (Kim *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2010). En evaluaciones sobre segmentos de aorta aislada de rata se encontró que los venenos de *C. fleckeri* y *Chiropsella bronzie* inducen una contracción sostenida sobre segmentos de aorta sin endotelio. Cuando se evaluaron estos venenos en segmentos de aorta con endotelio, previamente contraídos con fenilefrina, se observó que inducen un efecto vasodilatador inicial (fase 1), seguido de una contracción sostenida (fase 2). La fase 1 fue dependiente de endotelio y se inhibió significativamente en presencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa N $\omega$ -nitro-L-arginina, mientras que la fase 2 disminuyó significativamente en presencia de bloqueadores de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L y no presentó cambios significativos en presencia de inhibidores de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Winter *et al.*, 2007). En el caso de *C. capillata* se encontró que el extracto de tentáculos induce vasoconstricción sobre los segmentos de aorta sin endotelio, involucrando la entrada de calcio extracelular y la liberación de calcio de los almacenes intracelulares (Wang *et al.*, 2013).

Los efectos de los venenos de cnidarios sobre el sistema cardiovascular varían de una especie a otra. Por ejemplo; el veneno del sifonóforo *Physalia physalis*, un cnidario de la clase Hydrozoa letal para los humanos, produce vasodilatación en segmentos de aorta aislada de conejo pre-contraídos con fenilefrina (Loredo *et al.*, 1986). En nuestro grupo de trabajo hemos encontrado que los extractos de los hidrocorales *M. alcicornis* y *M. complanata*, considerados como ligeramente tóxicos para los humanos, inducen vasoconstricción no sostenida en segmentos de aorta aislada de rata (García-Arredondo *et al.*, 2011). En el caso de *M. complanata*, se encontró que el extracto de este hidrocoral también provoca una

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

En otro estudio, encontramos que los extractos acuosos de los corales escleractinios *P. strigosa*, *P. astreoides* y *S. siderea*, también inducen vasoconstricción no sostenida en segmentos de aorta aislada de rata (García-Arredondo *et al.*, 2016). Es importante mencionar que estos corales escleractinios no son considerados tóxicos para los humanos, lo cual puede deberse a que sus nematocistos no tienen la capacidad de penetrar la piel humana.

En un estudio realizado con la toxina formadora de poro EqT III, aislada de la anémona *Actinia equina*, se encontró que ésta es capaz de inducir un ligero incremento en la tensión de segmentos de arterias coronarias porcinas al unirse a la membrana del músculo liso vascular (Suput *et al.*, 2001). Sin embargo, hasta el momento no se conocen con exactitud los mecanismos involucrados en los efectos cardiovasculares que provocan los venenos de los cnidarios. Se sabe que las citolisinas pueden contribuir en la generación de los efectos cardiovasculares *in vivo*; aun así, estos efectos se presentan independientemente de la presencia de citolisinas (Liang *et al.*, 2012; Yanagihara *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Un estudio reciente reportó que el veneno de *Palythoa caribaeorum* induce vasoconstricción sobre segmentos de aorta aislada de rata, mediante mecanismos aún desconocidos (Lazcano-Pérez *et al.*, 2018).



### **2.3 *Pseudodiploria strigosa*.**

*Pseudodiploria strigosa* es una especie de coral ampliamente distribuida en el Atlántico oeste tropical con poblaciones estables. En Bermuda, *P. strigosa* es el coral dominante en los arrecifes coralinos. Este coral se conoce como hermatípico, ya que contribuye de manera importante a la formación de arrecifes de coral. Además, este organismo contiene algas fotosintéticas simbióticas de tipo Zooxanthellae, de las que dependen para la obtención de nutrientes. Tras la muerte del coral, su esqueleto contribuye a la construcción de arrecifes en la naturaleza (Helmle *et al.*, 2002). La reciente descripción del género en 2012 ha supuesto renombrar a la anteriormente conocida *Diploria strigosa* como *Pseudodiploria* (Budd *et al.*, 2012).

#### 2.3.1 Hábitat y clasificación taxonómica.

Las especies del género *Pseudodiploria* se encuentran agrupadas dentro de la clase Anthozoa. Habitan en colonias de hasta 1.8 metros de diámetro en casi todas las diferentes zonas de los arrecifes localizados en las zonas tropicales (a una latitud situada entre 30°N y 20°S) cercanas a las costas. Abundan especialmente en pendientes someras y lagunas arrecifales. Los corales de este género habitan entre 0.5 y 55 m de profundidad, mayoritariamente se encuentra hacia los 10 m, pero se reportan localizaciones hasta los 109 m de profundidad en un rango de temperatura entre 19.81 y 28.06 °C (Helmle *et al.*, 2002).

**Tabla 1.** Clasificación Taxonómica de *Pseudodiploria strigosa* (Budd *et al.*, 2012).

Reino:	Animalia
Filo:	Cnidaria
Clase:	Anthozoa
Subclase:	Hexacorallia
Orden:	Scleractinia
Familia:	Mussidae
Género:	<i>Pseudodiploria</i>
Especie:	<i>P. strigosa</i>

### 2.3.2 Características morfológicas de las especies del género *Pseudodiploria*.

Algunas de las características morfológicas más importantes para este género se mencionan a continuación. Las colonias que forman estos corales son masivas, en ocasiones incrustantes, que forman platos redondeados o cúpulas hemisféricas. Su superficie está cubierta de largos valles y crestas, en forma meandroide y en ocasiones interconectados; excepto en la franja cerca del borde de la colonia, donde tienden a volverse paralelos. Los valles suelen ser sinuosos, con un ancho de entre 6 y 9 mm (Helme *et al.*, 2002).

Los *costae* entre coralitos adyacentes son continuos e iguales en espesor. La *columnela* de los coralitos está bien desarrollada. Las líneas de pólipos están separadas por una pared llamada *teca*, de esta manera, líneas adyacentes de

pólipos comparten la *teca*. La *teca*, el *septo* y la *columnela* miden aproximadamente 3.5 mm, 6.6 mm y 4.6 mm, respectivamente (Budd *et al.*, 2012).

Las formas en su conjunto recuerdan a las circunvoluciones del cerebro humano, por lo que su nombre común es “coral cerebro simétrico” (Figura 4). El color de los pólipos puede ser verde a marrón, marrón-amarillento, marrón-púrpura o gris azulado (Helme *et al.*, 2002).



**Figura 4.** Morfología *P. strigosa* (Coralpedia, 2012).

### 2.3.3 Estudios toxicológicos previos en venenos de *Pseudodiploria strigosa*.

La mayoría de los estudios toxicológicos de los cnidarios se han centrado en la clase Anthozoa, sin embargo, el orden Scleractinia permanece relativamente inexplorado. Los corales escleractinios, también llamados corales pétreos, son los cnidarios más abundantes que forman arrecifes coralinos, por lo que se encuentran distribuidos en los arrecifes de todo el mundo. En un estudio previo, realizado por nuestro grupo de trabajo, se evaluó por primera vez la composición química y la actividad biológica de los extractos acuosos de tres corales escleractinios del Caribe Mexicano: *Pseudodiploria strigosa*, *Porites asteroides*, y *Siderastrea siderea*. Los resultados de este estudio mostraron que los extractos acuosos de

estos corales contienen compuestos como: citolisinas, capaces de lisar eritrocitos humanos y de rata; toxinas que inducen respuestas nociceptivas; y enzimas con actividad de serina proteasa y de PLA<sub>2</sub>. Este estudio también sugiere que estos corales contienen péptidos de bajo peso molecular que son letales en grillos. Por otra parte, los resultados de este trabajo sugieren que los extractos de estos corales también contienen compuestos de naturaleza peptídica, con actividad vasoconstrictora sobre segmentos de aorta aislada de rata. La identidad y el mecanismo de acción de estos péptidos no se han determinado hasta la fecha (García-Arredondo *et al.*, 2016).

#### **2.4. Generalidades sobre el sistema cardiovascular.**

El sistema cardiovascular está formado por el corazón y los vasos sanguíneos: arterias, venas y capilares. La función principal de este sistema es el transporte, en el que una bomba muscular (el corazón) proporciona la energía necesaria para mover el contenido (la sangre) en un circuito cerrado de tubos elásticos (los vasos) (Reiber y McGaw, 2009). Los vasos sanguíneos son estructuras huecas y tubulares que conducen la sangre impulsada por la acción del corazón y se clasifican en cinco grupos: arterias, arteriolas, venas, vénulas y capilares (Klabunde, 2005).

Las arterias se encargan de llevar la sangre desde el corazón hasta los órganos, transportando el oxígeno (excepto las arterias pulmonares, donde se transporta sangre con dióxido de carbono) y los nutrientes. A esta sangre se le denomina comúnmente como arterial u oxigenada. Estos vasos sanguíneos están formados por paredes gruesas y ligeramente elásticas, dado que soportan mucha presión. Estas paredes están formadas de músculo liso, el cual está innervado por el sistema nervioso autónomo, lo que le permite contraerse y dilatarse para controlar la presión arterial y la cantidad de sangre que llega a los órganos (Klabunde, 2005).

Las arteriolas son el resultado de las ramificaciones de las arterias y su función es conducir la sangre hasta los capilares. Son las arterias más pequeñas y contribuyen de manera fundamental a la regulación de la presión sanguínea,

mediante la contracción variable del músculo liso de sus paredes, y a la regulación del aporte sanguíneo a los capilares, ya que son las que oponen mayor resistencia al flujo sanguíneo, esta contracción sirve para reducir la presión de la sangre al entrar en los capilares (Patwardhan, 2012).

Las venas son las encargadas de llevar la sangre desde los órganos y los tejidos hasta el corazón, a excepción de la vena porta y las venas pulmonares. La vena porta se dirige primero al hígado y después a los pulmones, en donde se intercambia el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por el oxígeno del aire inspirado. Por otra parte, las venas pulmonares transportan sangre oxigenada. En general, la sangre venosa es más oscura que la sangre arterial. Las venas poseen válvulas unidireccionales que impiden el retroceso de la sangre. Las venas de la circulación general traen sangre de todas las regiones del cuerpo al atrio derecho del corazón. Dentro de este grupo de vasos sanguíneos se encuentran tanto las venas que se vacían en el corazón, como las que van a la vena cava (Klabunde, 2005).

Las vénulas se encargan de recoger la sangre de los capilares. Cuando estas se van uniendo van formando las venas. Poseen una túnica externa, una capa media y el endotelio (Patwardhan, 2012).

Los capilares son vasos de paredes muy finas, que comunican las arteriolas con las vénulas. Se caracterizan por el intercambio de oxígeno y sustancias nutritivas en los tejidos. Los capilares son las regiones del sistema circulatorio en donde tiene lugar el intercambio de sustancias con los tejidos adyacentes: gases, nutrientes o materiales de desecho. Para favorecer el intercambio, los capilares presentan una única célula endotelial que los separa de los tejidos. Además, los capilares no están rodeados por músculo liso. El diámetro de un capilar es menor que el diámetro de un glóbulo rojo (que normalmente mide 7 micrómetros de diámetro exterior), por lo que a su paso por los capilares, los glóbulos rojos deben deformarse para poder atravesarlos. El pequeño diámetro de los capilares proporciona una gran superficie para favorecer el intercambio de sustancias (Patwardhan, 2012).

### 2.4.1. Estructura de los vasos sanguíneos.

#### A. Arterias.

La estructura anatómica de los vasos sanguíneos varía dependiendo del tipo de vaso sanguíneo y su ubicación en el sistema circulatorio (Figura 5). Las arterias son conductos membranosos, elásticos, con ramificaciones divergentes que constan de tres capas concéntricas:

- La capa interna o íntima que está constituida por el endotelio, que es un epitelio simple plano, una lámina basal y una capa conjuntiva subendotelial. Esta capa está presente en todos los vasos sanguíneos (arterias o venas) y su composición es idéntica en todos.
- La capa media que está formada por fibras musculares lisas dispuestas de forma concéntrica, fibras elásticas y fibras de colágeno, en proporción variable según el tipo de arteria. Esta capa tiene aspecto compacto y espesor regular.
- La capa externa o adventicia está compuesta por tejido conjuntivo laxo, constituido fundamentalmente por fibroblastos y colágeno. El diámetro superior de esta capa es de 1 mm, se nutre mediante los *vasa vasorum* y está innervada por los *nervi vasorum* (nervios vasomotores).

Los límites entre estas tres capas están generalmente bien definidos en las arterias. Estos vasos presentan siempre una lámina elástica interna separando la íntima de la media, y a excepción de las arteriolas presentan una lámina elástica externa que separa la media de la adventicia. La lámina elástica externa se continúa a menudo con las fibras elásticas de la adventicia (Kierszenbaum, 2007).

## B. Venas.

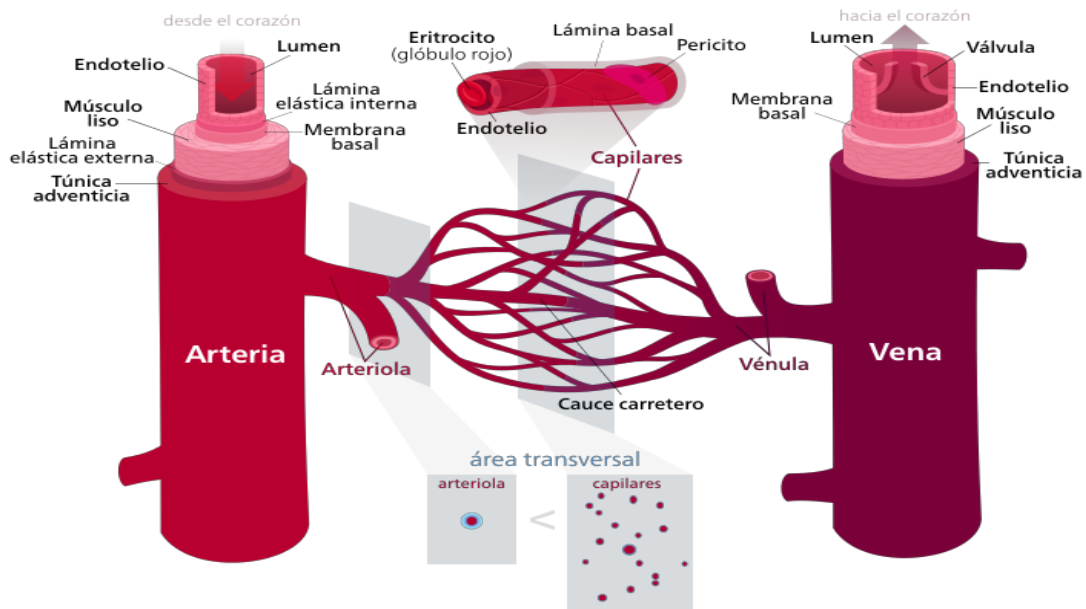
Por otra parte, las venas tienen una pared más delgada que la de las arterias, debido al menor espesor de la capa muscular, pero tienen un diámetro mayor que ellas porque su pared es más distensible, con más capacidad de acumular sangre. En el interior de las venas se encuentran unas estructuras denominadas válvulas semilunares, que impiden el retroceso de la sangre y favorecen su movimiento hacia el corazón. Las venas como las arterias están formadas por tres capas (Figura 5) (West, 2008):

- La capa interna, íntima o endotelial. Los límites entre esta capa y la siguiente no están con frecuencia bien definidos.
- La capa media o muscular está poco desarrollada en este tipo de vasos sanguíneos y contiene poco tejido elástico; está constituida, sobretudo por tejido conjuntivo, con algunas fibras musculares lisas dispuestas concéntricamente.
- La capa externa o adventicia, la cual forma la mayor parte de la pared venosa y está formada por tejido conjuntivo laxo el cual contiene haces de fibras de colágeno y haces de células musculares dispuestas longitudinalmente (Leff y Schumacker, 1993).

## C. Capilares.

Los capilares son vasos de diámetro pequeño, similar al del eritrocito (7-8 micras). La superficie acumulada de los capilares de todo el cuerpo es aproximadamente de 700 m<sup>2</sup> y están revestidos por células endoteliales apoyadas en una delgada membrana basal compuesta fundamentalmente por colágeno de

tipo IV. El pequeño diámetro de los capilares proporciona una gran superficie para favorecer el intercambio de sustancias (West, 2008).



**Figura 5.** Estructura de los vasos sanguíneos (Reiber y McGaw, 2009).

#### 2.4.2 Enfermedades cardiovasculares (ECV).

Según la Organización mundial de la salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Se clasifican en:

- Hipertensión arterial (presión alta).
- Hipotensión (presión baja).
- Cardiopatía coronaria (infarto de miocardio).
- Enfermedad cerebrovascular (apoplejía).
- Enfermedad vascular periférica.
- Insuficiencia cardíaca.



- Cardiopatía reumática.
- Cardiopatía congénita.
- Miocardiopatías.

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo. Aproximadamente, cada año mueren más personas por alguna de estas enfermedades que por cualquier otra causa.

Se calcula que tan solo en 2012 murieron 17.5 millones de personas por enfermedades cardiovasculares, lo que representa el 30% de las defunciones registradas en el mundo. De esas defunciones, aproximadamente 7.4 millones se debieron a cardiopatías coronarias y 6.7 millones a accidentes cerebrovasculares. Las enfermedades cardiovasculares afectan en mucha mayor medida a los países de ingresos bajos y medios: más del 80% de las defunciones por esta causa se producen en esos países y afectan casi por igual a mujeres y hombres. De aquí a 2030, casi 23.6 millones de personas morirán por alguna enfermedad cardiovascular, principalmente por cardiopatías y accidentes cerebrovasculares. Se prevé que estas enfermedades seguirán siendo la principal causa de muerte por muchos años (Organización Mundial de la Salud, 2016).

Por otra parte, algunas de las enfermedades cardiovasculares que también son de gran importancia, están relacionadas con la presión arterial, la cual se define como la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias. Cada vez que el corazón late, bombea sangre hacia las arterias, que es cuando su presión es más alta (presión sistólica). Cuando el corazón está en reposo entre un latido y otro, la presión sanguínea disminuye (presión diastólica) (Cheshire, 2016). En general, la presión sistólica se menciona primero y después la diastólica. En los adultos, la presión sistólica normal debe ser menor que 120 mmHg y la presión diastólica debe ser menor que 80 mmHg (Leff y Schumacker, 1993).

Entre las alteraciones más frecuentes de la presión sanguínea se encuentra la hipertensión que es el término empleado para describir el incremento en la presión arterial. Una de las características de esta enfermedad es que no presenta síntomas claros y, por lo tanto, puede pasar inadvertida durante mucho tiempo, o

bien, sus síntomas se manifiestan en situaciones de alerta o estrés (Cheshire, 2016).

Actualmente, existen diversos medicamentos que son empleados para tratar la hipertensión, entre ellos destacan los siguientes:

- Bloqueadores alfa 1 adrenérgicos.
- IECA (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina).
- Bloqueadores de los receptores de angiotensina (BRA).
- Betabloqueadores.
- Bloqueadores de los canales de calcio.
- Agonistas alfa 2 adrenérgicos centrales.
- Diuréticos.
- Inhibidores de renina.
- Vasodilatadores.

La presión arterial baja, o hipotensión, ocurre cuando la presión arterial durante y después de cada latido cardíaco es mucho más baja de lo usual, lo cual significa que el corazón, el cerebro y otras partes del cuerpo no reciben suficiente sangre (Calkins y Zipes, 2015). La hipotensión puede aparecer de forma aislada y en relación con los cambios posturales. Esta forma benigna y frecuente es la denominada hipotensión ortostática o postural, la cual se define como la caída de la presión arterial sistólica entre 10 y 20 mmHg al pasar de la postura de tumbado a estar de pie de forma brusca en un corto espacio de tiempo (un minuto). Esta alteración en la presión sanguínea se presenta debido a que los mecanismos fisiológicos que mantienen la tensión arterial no actúan de forma adecuada, por lo que se produce una bajada de presión arterial que no se recupera al ponernos de pie produciendo generalmente sensación de mareo y de inestabilidad. Puede presentarse a cualquier edad, pero suele aumentar en personas mayores (Cheshire, 2016).

Existen diversos grupos de fármacos que pueden aumentar levemente la presión arterial, aliviando los síntomas de la hipotensión arterial. Sin embargo, todos los tratamientos farmacológicos pueden causar reacciones no deseadas tales como un incremento en la presión arterial. Algunos de los medicamentos que son empleados para tratar la hipotensión, son los siguientes:

**Simpaticomiméticos.** Este grupo de fármacos es el que se utiliza con mayor frecuencia para tratar la hipotensión. Estos fármacos activan el sistema nervioso simpático, de manera similar a la adrenalina y la noradrenalina, aumentando la contractilidad y la frecuencia cardíaca del corazón, lo cual incrementa la presión arterial. Este grupo de fármacos incluye etilefrina, metilsulfato de amezinio, midodrina, norfenefrina, foledrina y oxilofrina. Los efectos adversos causados por este grupo de fármacos son, entre otros, taquicardia, alteraciones del ritmo cardíaco y trastornos de la micción (Leff, 1993; West, 2008).

**Fludrocortisona,** es una hormona sintética de la corteza suprarrenal (mineralocorticoide). En el riñón previene la eliminación de sal y agua, haciendo que aumente el volumen de sangre y con ello la presión arterial.

**Dihidroergotamina,** es un vasoconstrictor, que contrae las grandes venas. Esta acción mejora el retorno de la sangre al corazón y previene problemas circulatorios al ponerse en pie.

**Eritropoyetina (epoetina alfa o epoetina beta)** es una hormona que estimula la maduración de los glóbulos rojos (eritrocitos) en la médula ósea. El incremento en la cantidad de eritrocitos asegura el transporte de oxígeno en la sangre y, por lo tanto, la oxigenación de los diferentes tejidos del organismo (Calkins y Zipes, 2015).

#### 2.4.3 Control del tono vascular.

El tono vascular esta regulado principalmente por el sistema nervioso simpático y el endotelio vascular. No obstante, existen otros mecanismos que también regulan el tono vascular, como por ejemplo el incremento del  $Ca^{2+}$  intracelular, mediante la entrada de este catión del espacio extracelular hacia el

citósol o a través de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes intracelulares como el retículo sarcoplásmico (Francis y Chu, 2005).

#### A. Mecanismos de regulación de la contracción del músculo liso vascular.

La función principal de las células musculares lisas es el mantenimiento y modificación del diámetro de los vasos sanguíneos. Esta función se realiza gracias a la presencia de diversos factores endógenos que inducen vasoconstricción o vasodilatación, de manera directa o indirecta (Reckelhoff, 2001).

Las células de músculo liso vascular contienen múltiples filamentos de actina y miosina, conocidos también como filamentos delgados y gruesos, respectivamente. La interacción entre ambos filamentos genera la fuerza necesaria para desencadenar la contracción muscular (Huxley, 1969). La contracción en el músculo liso vascular depende de la formación de los puentes cruzados entre la actina y la miosina. La fosforilación de las cadenas de miosina es el paso principal en la regulación de la contracción en el músculo liso vascular. La forma fosforilada de las cadenas de miosina interactúan con la actina para formar los puentes cruzados y generar la contracción (Akerá, 1990).

El ion  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel importante en la regulación del tono vascular y es el principal mensajero intracelular que regula el proceso de contracción muscular. Bajo condiciones normales, la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma de la célula de músculo liso se encuentra relativamente baja, aproximadamente 140 nM (Hughes, 1994). El incremento de la concentración citoplasmática de este ión, desencadena el proceso de contracción muscular por diferentes mecanismos (Williams y Fay, 1986). El incremento de calcio en la células puede deberse al influjo del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática o a la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes intracelulares (Fabiato y Fabiato, 1979). El calcio se combina con la calmodulina para formar el complejo calcio-calmodulina (Ca-calmodulina). Este complejo activa a la cinasa de las cadenas de miosina convirtiéndola de la forma inactiva a la forma activa. La actividad de la calmodulina se determina por la concentración intracelular de calcio. La concentración del calcio citosólico en

reposo es 0.1 mm/l, pero se aumenta 100 veces durante la contracción (Aker, 1990).

En general, la contribución del calcio extracelular y del retículo sarcoplásmico para aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células del músculo liso vascular, puede variar dependiendo del estímulo específico y del agonista que active la contracción en el músculo liso vascular. La entrada de calcio extracelular puede ocurrir por diversas vías, entre las cuales están:

- 1) Canales de calcio dependientes de voltaje.
- 2) Canales cationes no selectivos, también denominados canales activados por receptores.
- 3) Transportadores sodio-calcio (Drop *et al.*, 1981; Brandt *et al.*, 1985; Chrissobolis y Sobey, 2003).

La despolarización de la membrana de las células del músculo liso vascular abre los canales de calcio voltaje dependientes tipo L (CCVLs), incrementando los niveles de calcio intracelular. Estos canales permanecen abiertos durante toda la fase 2 del potencial de acción cardíaco. La densidad de los CCVLs aumenta en diversas situaciones que pueden ser fisiológicas (con la edad) y/o patológicas (hipertensión arterial, cardiomiopatías) o bien tras la ingesta de sal. Por el contrario, su densidad disminuye con la administración de bloqueadores de los canales de calcio y durante la isquemia miocárdica. Por el contrario la hiperpolarización disminuye la entrada de calcio, inhibiendo la contracción y causando la relajación (Drop *et al.*, 1981).

El  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en la célula puede estimular la entrada de más  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula a través de los canales de calcio operados por almacenamiento, los cuales también permiten la entrada de  $\text{Na}^+$  a la célula, lo que induce la despolarización de la membrana y activa adicionalmente los CCVLs, potenciando así el efecto cardio y vasoconstrictor (Brandt *et al.*, 1985).

Hasta la fecha, se ha determinado la presencia de al menos dos canales de calcio voltaje dependientes en el músculo liso vascular, que son los tipo T y los tipo

L, siendo estos últimos los más abundantes; sin embargo, existe una gran variedad de canales iónicos, localizados en la membrana plasmática, con capacidad para regular el tono de las células del músculo liso vascular mediante el control del potencial de membrana. Entre estos canales iónicos se encuentran cuatro tipos de canales de potasio bien identificados: canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , canales de  $K^+$  de rectificador retrasado, canales de  $K^+$  dependientes de ATP, y canales de  $K^+$  de rectificador interno (Chrissobolis y Sobey, 2003; Flagg *et al.*, 2010).

Por otra parte, la apertura de los canales de cloro activados por calcio despolariza la membrana plasmática de las células del músculo liso vascular, esto induce el influjo de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, favoreciendo así la contracción (Pacaud *et al.*, 1991).

El retículo sarcoplásmico es el principal almacén de calcio de las células del músculo liso vascular y participa de forma importante en la regulación del proceso de contracción de los vasos sanguíneos (Jorgensen *et al.*, 1977). Las principales proteínas que regulan la captación, almacenaje y liberación de calcio en el retículo sarcoplásmico tanto del músculo esquelético como cardíaco son: la ATPasa de  $Ca^{2+}$ , una proteína de alta capacidad de unión a  $Ca^{2+}$  llamada calsecuestrina (CSQ) y el canal de liberación de  $Ca^{2+}$  también conocido como receptor de rianodina (RyR) (Michalak y MacLennan, 1980; Wientzek y Katz, 1991).

En el cardiomiocito, el proceso de contracción comienza cuando un estímulo despolarizante en el túbulo T activa al canal de calcio sensible a voltaje del sarcolema (receptor de dihidropiridina, DHP), el cual permite la entrada de pequeñas cantidades de  $Ca^{2+}$  extracelular al citoplasma induciendo al receptor de rianodina para que libere  $Ca^{2+}$  del interior del retículo sarcoplásmico para elevar la concentración de  $Ca^{2+}$  de aproximadamente 20 nM hasta aproximadamente 1  $\mu$ M. La fuerza de contracción muscular está regulada por la unión de  $Ca^{2+}$  a la troponina C, que desencadena el entrecruzamiento de actina y miosina (Martonosi y Pikula, 2003). Durante la relajación muscular, el  $Ca^{2+}$  es transportado del citoplasma al retículo sarcoplásmico principalmente por la ATPasa de  $Ca^{2+}$  (60-70%) y transportado al exterior por el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (30-40%). Por tanto, la contracción y la relajación en miocitos cardíacos es regulada por las

concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Wientzek y Katz, 1991).

La unión de los diferentes ligandos a sus receptores de superficie celular causa un incremento o una disminución, de corta duración en las concentraciones de las moléculas señal intracelulares que reciben el nombre de segundos mensajeros (Katz, 1991). Estos segundos mensajeros juegan un papel importante en la regulación de la contracción muscular e incluyen: 3',5'-adenosina-monofosfato cíclico (AMPc); 3',5'-guanosina-monofosfato cíclico (GMPc); 1,2-diacilglicerol (DAG); 1,4,5-trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) y distintos fosfolípidos de inositol (Kamm y Stull, 1989). En las células de músculo liso vascular existen varios receptores acoplados a proteína G que activan a la fosfolipasa C (PLC). El fosfatidilinositol difosfato (PIP<sub>2</sub>) es el sustrato de la PLC, la cual produce  $\text{IP}_3$  y el DAG (Berridge e Irvine, 1989).

El DAG que se produce por acción de la PLC puede activar a la proteína cinasa C (PKC), la cual puede fosforilar e inhibir a la fosfatasa de la cadena ligera reguladora de miosina (MLCP), lo cual hace que la cadena ligera reguladora se mantenga fosforilada y no pueda ejercer su inhibición de la interacción entre actina y miosina, favoreciendo la contracción (Li *et al.*, 1998).

Los receptores de  $\text{IP}_3$  presentes en el retículo sarcoplásmico funcionan como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y constituyen uno de los dos mecanismos para la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. El acoplamiento entre el  $\text{IP}_3$  y sus receptores induce la apertura del canal, permitiendo la salida del calcio del retículo al citosol (Michalak y MacLennan, 1980). Otro mecanismo para la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular esta constituido por los receptores de rianodina, que al igual que los receptores a  $\text{IP}_3$ , también funcionan como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wientzek y Katz, 1991).

#### B. Mecanismos de regulación de la contracción dependiente de endotelio vascular.

La monocapa de células endoteliales que se encuentra en las paredes vasculares controla la comunicación entre la sangre y los vasos, ejerciendo un papel dual como sensor y transmisor de señales (Badimón, 2002).

Una de las funciones más importantes del endotelio vascular es regular el tono de las células del músculo liso vascular, ya que las células endoteliales tienen la capacidad de producir y liberar sustancias que actúan directamente sobre las células del músculo liso vascular, induciendo vasodilatación o vasoconstricción (Drexler, 1997).

Estas funciones se llevan a cabo mediante diferentes vías de señalización, a través de diversos canales iónicos, de los cuales se puede dar en influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para desencadenar otras vías de señalización, tales como canales catiónicos no selectivos y los canales operados por almacenamiento (Rabiet *et al.*, 1996). Las células endoteliales producen la endotelina-1, la cual es uno de los agentes endógenos vasoconstrictores más potentes. En la actualidad, se conocen solamente dos tipos de receptores para la endotelina-1 ( $\text{ET}_A$  y  $\text{ET}_B$ ), los cuales son receptores acoplados a proteínas G. Hasta la fecha, los mecanismos mediante los cuales actúan estos receptores bajo la estimulación con endotelina-1 siguen sin ser claros, solamente se sabe que activan a la fosfolipasa C y a los canales de cationes no selectivos (Liu *et al.*, 2003).

Las células del endotelio vascular no solamente producen endotelina-1 como agente vasoconstrictor; sino que además, producen también algunas prostaglandinas con efecto vasoconstrictor, como por ejemplo la prostaglandina  $\text{H}_2$  y el tromboxano  $\text{A}_2$ , las cuales se unen a sus respectivos receptores en las células de músculo liso vascular e inducen vasoconstricción mediante mecanismos que involucran a la fosfolipasa C (Drexler, 1997).



### 3. JUSTIFICACIÓN

Los cnidarios constituyen el phylum de animales venenosos más amplio, con más de 11,000 especies reconocidas hasta el momento. Se estima que el veneno de cada especie de este phylum contiene más de 100 compuestos bioactivos que actúan sobre diferentes blancos moleculares. Es por esto que estas especies son consideradas como fuentes ricas de compuestos bioactivos novedosos que pueden ser ampliamente explotadas para el desarrollo de nuevos fármacos, herramientas de investigación farmacológica y compuestos con aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, es posible que hasta ahora solamente se conoce alrededor de un 1% de los componentes de estos venenos.

Específicamente en los cnidarios, la mayor parte de los estudios dirigidos a la búsqueda de compuestos bioactivos se ha concentrado en las neurotoxinas. La búsqueda de compuestos con actividad sobre el sistema cardiovascular es relativamente baja y se concentra principalmente en las especies que representan peligro para los humanos. En algunos estudios, se ha encontrado que el factor principal que determina la letalidad de los venenos de los cnidarios potencialmente peligrosos para los humanos, es su capacidad de generar complicaciones cardiovasculares. Hasta el momento, no se conocen con exactitud los mecanismos de acción involucrados en la generación de dichas complicaciones. Incluso, se ha encontrado que los extractos de algunos cnidarios que no representan peligro para los humanos también producen efectos sobre el sistema cardiovascular; dichos efectos varían dependiendo de la especie. La información generada con el desarrollo de la presente propuesta será de utilidad para entender qué tipo de moléculas vasoactivas producen los cnidarios y mediante qué mecanismos están generando sus efectos. Además, con esta información se reconocerá a esta especie como fuente de nuevos prototipos estructurales con efecto sobre el sistema cardiovascular, útiles para el posible desarrollo de nuevos fármacos, herramientas de investigación farmacológica y compuestos con aplicaciones biotecnológicas.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué tipo de compuestos son los responsables del efecto vasoconstrictor inducido por el extracto acuoso de *Pseudodiploria strigosa* y cuáles son sus mecanismos de acción involucrados?

## **5. HIPÓTESIS**

El extracto acuoso de *Pseudodiploria strigosa* posee compuestos de naturaleza proteínica capaces de inducir vasoconstricción sobre segmentos de aorta aislada de rata mediante su interacción directa con con receptores y/o canales iónicos presentes en las células de músculo liso vascular.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General.**

Determinar los mecanismos de acción involucrados en el efecto vasoconstrictor del extracto acuoso de *Pseudodiploria strigosa* y obtener información sobre la naturaleza química de los componentes responsables de dicho efecto.

### **6.2 Objetivos específicos.**

- Fraccionar los componentes del extracto acuoso de acuerdo con su peso molecular mediante cromatografía de exclusión molecular.
- Determinar la complejidad química de las fracciones mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y espectrometría de masas.
- Detectar la presencia de compuestos vasoconstrictores termoestables en el extracto acuoso.
- Evaluar si el efecto vasoconstrictor del extracto acuoso depende de la presencia del endotelio vascular.
- Explorar la importancia del calcio extracelular en el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto acuoso.
- Determinar si los receptores adrenérgicos están involucrados en el efecto vasoconstrictor del extracto acuoso.
- Evaluar la actividad vasoconstrictora de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Recolección, transporte y conservación de los especímenes.

Se recolectaron fragmentos del coral *Pseudodiploria strigosa* mediante inmersiones de buceo a profundidades de 4 a 10 m en arrecifes de coral situados a lo largo de la costa de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. Una vez recolectado el material, se congeló, se almacenó en hielo seco y fue transportado al Departamento de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Los fragmentos se mantuvieron en el laboratorio congelados a -70 °C hasta su uso. La recolección de las muestras se llevó a cabo de acuerdo con la aprobación de la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación del Gobierno Federal de México (número de permiso PPF/DGOPA-193/13).

### 7.2 Preparación del extracto acuoso.

La descarga de nematocistos del coral se indujo mediante agitación de los fragmentos en agua desionizada a 4 °C durante 24 h. El extracto resultante se liofilizó. Posteriormente, el liofilizado fue centrifugado a 3000 rpm (2060 x g) durante 15 min a 4 °C, y los sobrenadantes fueron separados. Los sobrenadantes se liofilizaron y se disolvieron en agua grado HPLC a una concentración de 150 mg/ml, después se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes que se obtuvieron se almacenaron a -70 °C y fueron utilizados para realizar los bioensayos y otros análisis. El contenido de proteína de los extractos acuosos se determinó por el ensayo de Bradford (1976), utilizando una curva estándar preparada con albúmina de suero bovino liofilizado.

### 7.3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso.

El extracto acuoso se fraccionó mediante de una columna de cromatografía de filtración en gel (Superdex peptide 200 10/300 GL) acoplada a un sistema de cromatografía de baja presión ÄKTApurifier (UPC 100, GE Healthcare). Las muestras (5 mg de proteína/500  $\mu$ l) fueron eluidas con ácido acético 1.6 mM a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. La absorbancia se leyó a 280 nm y las fracciones se recogieron de acuerdo con los picos observados en el cromatograma. Las fracciones colectadas se liofilizaron, se pesaron y posteriormente se diluyeron a una concentración de 50  $\mu$ g de polvo liofilizado en 600  $\mu$ l de agua grado HPLC. Se determinó el contenido de proteína de cada fracción mediante el método de Bradford. Se evaluó la actividad biológica de cada fracción mediante el ensayo de aorta aislada de rata a una concentración de 10  $\mu$ g/ml.

### 7.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se analizaron las fracciones mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras, utilizando métodos convencionales previamente descritos (Laemmli, 1970). Se corrieron las muestras en cantidades de 10  $\mu$ g de proteína en geles al 12 % de acrilamida. Durante los primeros 30 minutos las muestras se corrieron a 90 V, posteriormente se corrieron a 120 V. Las bandas de proteína se observaron mediante la tinción de Coomassie. Los pesos moleculares relativos se determinaron mediante estándares de amplio espectro (Bio-Rad).

### 7.5 Espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Las fracciones se analizaron por espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Para este análisis, 5  $\mu$ l de una solución saturada de ácido sinapínico se añadieron a 10  $\mu$ g de la fracción

lío-filizada. Entonces, 1  $\mu$ L de esta solución se depositó sobre la placa de MALDI-TOF y se dejó secar a temperatura ambiente. El espectro fue registrado en el modo positivo lineal en un espectrómetro de masas (Bruker Daltonics Microflex, Bremen, Alemania) equipado con láser de nitrógeno  $\lambda = 377$  nm y 20 kV de voltaje de aceleración.

## 7.6 Bioensayos.

### 7.6.1 Animales de experimentación.

Para las evaluaciones biológicas en este estudio se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar con un peso de 200 a 250 g, las cuales fueron adquiridas en el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro. Todos los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico con condiciones de agua y alimento *ad libitum* por al menos un periodo de 5 días de climatización (Obernier y Ransom, 2006). El manejo de los animales de experimentación se realizó de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

### 7.6.2 Evaluación de la actividad biológica.

La evaluación de la actividad del extracto y sus fracciones se realizó mediante el ensayo de aorta aislada de rata bajo condiciones previamente estandarizadas (García-Arredondo *et al.*, 2015). Los animales de experimentación se sacrificaron por decapitación con guillotina. Se extrajo la aorta torácica descendente y se colocó en solución fisiológica de Krebs-Henseleit (pH 7.4; NaCl 126.8 mM, KCl 5.9 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 30 mM y D-glucosa 5 mM) sobre un baño de hielo y gasificada constantemente con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). Inmediatamente después de extraerla, se hizo fluir solución de Krebs-Henseleit por el interior de la aorta para evitar la formación de coágulos. Posteriormente, se eliminó el tejido conectivo y se cortaron segmentos de 4 mm de longitud. Estos anillos fueron montados en ganchos de acero inoxidable

suspendidos en cámaras de baño orgánico que contenían la solución de Krebs-Henseleit a 37 °C oxigenada constantemente con carbógeno. Los tejidos se estabilizaron durante 60 min bajo una tensión de 1.5 g. Durante la estabilización, se renovó la solución de Krebs-Henseleit en las cámaras. Después del periodo de estabilización, los segmentos de aorta fueron contraídos con KCl 100 mM para sensibilizar el tejido. Una vez estabilizada la tensión, los tejidos se lavaron con solución de Krebs-Henseleit para recuperar la tensión basal de 1.5 g. Después de esto, los tejidos se contrajeron con fenilefrina (1  $\mu$ M) y se registró como referencia el grado de contracción alcanzado. En el caso de la actividad vasoconstrictora, los tejidos se lavaron nuevamente después de registrar la contracción con fenilefrina, entonces se agregó la muestra a evaluar. En los casos en los que se evaluó el efecto vasodilatador, la muestra se agregó directamente sobre los tejidos una vez alcanzado el grado máximo de contracción con fenilefrina (1  $\mu$ M). Los cambios en la tensión de los tejidos se midieron con transductores de fuerza (Grass FT003) acoplados a un polígrafo de cuatro canales de registro (Grass 7D). El efecto vasoconstrictor se expresó como el porcentaje de la contracción inducida por 1  $\mu$ M de fenilefrina, mientras que el efecto vasodilatador se expresó como el porcentaje de reducción del efecto vasoconstrictor inducido por 1  $\mu$ M de fenilefrina.

### 7.6.3 Estabilidad de la vasoactividad del extracto acuoso.

A fin de determinar si los compuestos responsables de la vasoactividad del extracto acuoso son sensibles a la temperatura, el extracto se incubó en un baño de agua a ebullición durante 20 min con agitación constante. Posteriormente se evaluó su efecto mediante el ensayo de aorta aislada de rata. Adicionalmente, se evaluó la estabilidad de la actividad biológica del extracto ante condiciones reductoras, esto se realizó incubando el extracto a ebullición durante 20 min en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, la concentración final del agente reductor en las cámaras de baño orgánico fue 0.05%.



#### 7.6.4 Caracterización preliminar de los mecanismos involucrados en la vasoactividad del extracto acuoso.

Con la finalidad de determinar la participación del endotelio vascular, se evaluaron diferentes concentraciones del extracto sobre segmentos de aorta sin endotelio. Para llevar a cabo estos experimentos, primero se removió el endotelio haciendo fluir por el interior de la aorta 5 ml de una solución de ácido desoxicólico al 0.2% en solución salina fisiológica. La ausencia de endotelio se comprobó al obtener una relajación menor al 5% con acetilcolina (1  $\mu$ M).

Para determinar el grado de participación del calcio en el efecto vasoconstrictor del extracto, se evaluó la actividad del extracto a diferentes concentraciones sobre los segmentos de aorta en una solución de Krebs-Henseleit libre de calcio. Se evaluó también la actividad vasoconstrictora del extracto a diferentes concentraciones en segmentos de aorta incubados durante 10 min con verapamilo (1  $\mu$ M), un bloqueador de canales de calcio tipo L. Para determinar la participación de calcio intracelular, se evaluó el extracto acuoso en segmentos de aorta incubados durante 10 min con rianodina (10  $\mu$ M) y cafeína (10 mM). Adicionalmente, se evaluó la actividad vasoconstrictora del extracto en segmentos de aorta incubados con rianodina (10  $\mu$ M) y cafeína (10 mM) en un medio libre de calcio.

Con el propósito de determinar una posible participación de receptores adrenérgicos, se evaluó la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso en segmentos incubados durante 10 min con propranolol (1  $\mu$ M), un antagonista no selectivo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, o con fentolamina (1  $\mu$ M), un antagonista  $\alpha$ -adrenérgico no selectivo.

#### 7.7 Análisis estadísticos.

Los resultados se muestran como la media  $\pm$  S.E.M. de n = 3 a 4 experimentos, por cada tratamiento y concentración. Las gráficas se realizaron con el programa estadístico Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Las

comparaciones múltiples se realizaron mediante un ANOVA de dos vías, seguido por una prueba post hoc de Bonferroni.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Preparación del extracto acuoso.

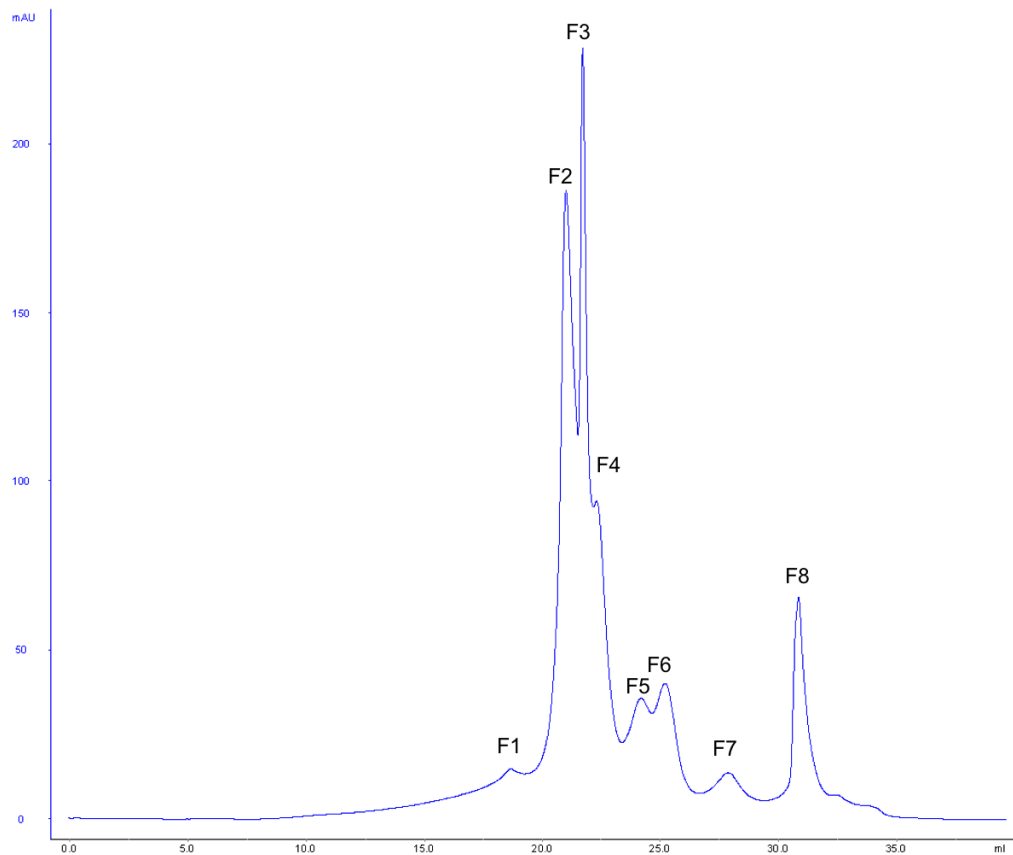
Los fragmentos de *P. strigosa* que se emplearon en este estudio fueron recolectados en octubre del 2013. Se utilizaron 978 g (peso húmedo) de fragmentos del coral y se obtuvieron 9.0959 g de polvo liofilizado. La determinación de proteínas totales mediante el método de Bradford indicó que cada gramo de extracto liofilizado contiene 13.7445 mg de proteína.

### 8.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso.

Se obtuvieron ocho fracciones (F1-F8) del fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso de *P. strigosa* por exclusión molecular. En la tabla 2 se muestran los rendimientos obtenidos de cada fracción, en la primera fracción no se detectó la presencia de proteína. En la Figura 6 se muestra el perfil cromatográfico obtenido para este fraccionamiento.

**Tabla 2.** Rendimiento de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso de *P. strigosa*.

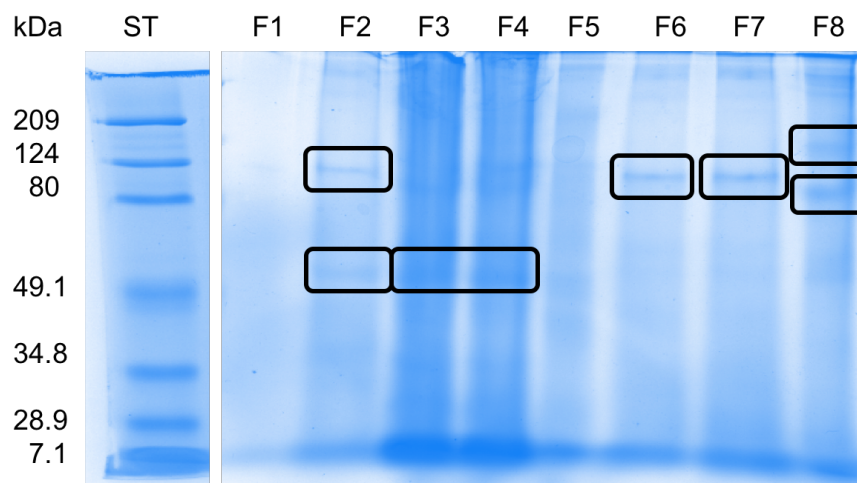
Fracción	Peso (g)	Contenido de proteína (µg)
F1	0.1055	-
F2	0.2216	102.834
F3	0.1417	120.993
F4	0.0955	121.118
F5	0.0812	121.253
F6	0.1871	83.788
F7	0.156	91.387
F8	0.1299	56.768



**Figura 6.** Perfil cromatográfico del extracto acuoso de *P. strigosa* (5 mg de proteína/500  $\mu$ l) en Superdex peptide 200 10/300 GL. La columna se eluyó con ácido acético 1.6 mM a un flujo de 0.5 ml/min.

### 8.3 Análisis electroforético de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso.

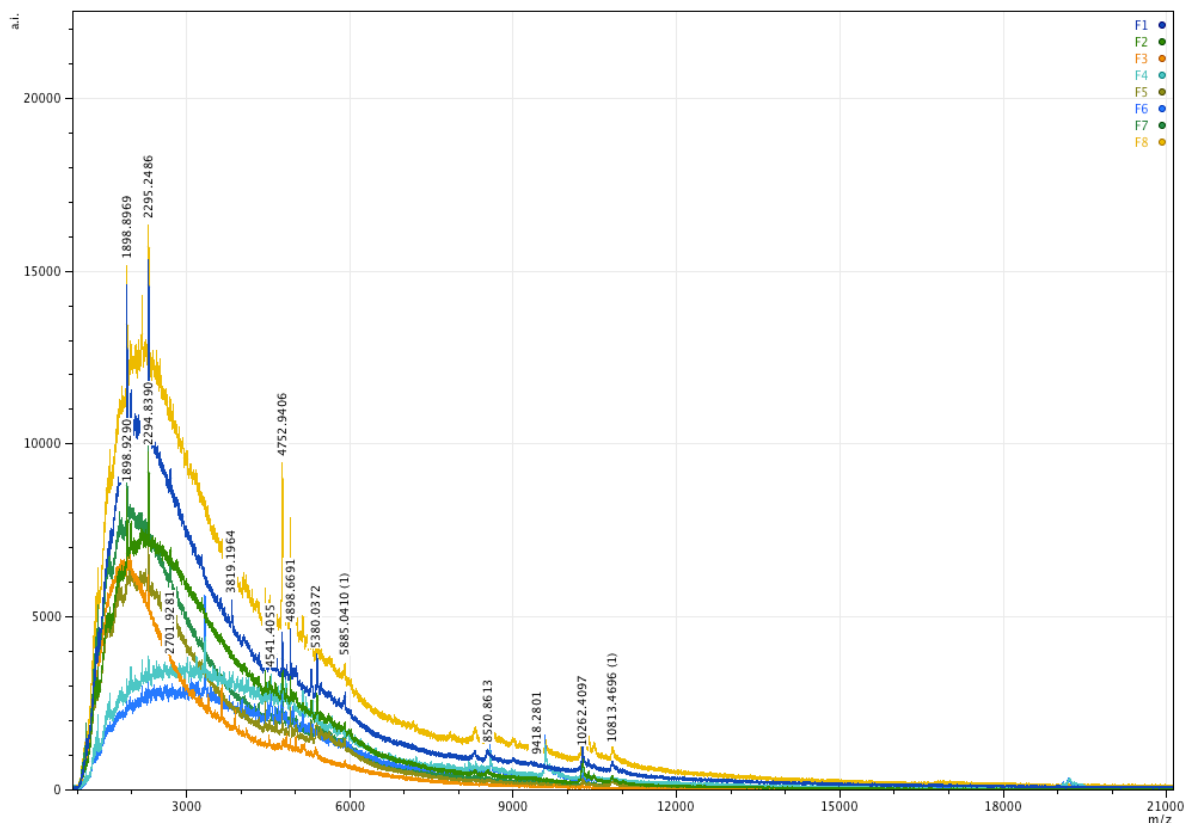
El extracto acuoso de *P. strigosa* contiene proteínas que abarcan un intervalo de pesos moleculares comprendidos entre 8 y 200 kDa (Figura 7). En condiciones no reductoras, el perfil electroforético indicó que la fracción 1 (F1) no presentó bandas, mientras que la fracción 2 (F2) presentó bandas de 120 y 50 kDa, las fracciones F3 y F4 tuvieron bandas de aproximadamente 50 kDa, las fracciones F6 y F7 presentaron bandas evidentes de alrededor de 112 kDa y la fracción F8 mostró bandas principales de aproximadamente 120 y 90 kDa.



**Figura 7.** Perfil electroforético de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso de *P. strigosa*.

#### 8.4 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.

En la Figura 8 se muestran los espectros de masas de las fracciones (F1-F8) obtenidas a partir del extracto acuoso de *P. strigosa*, se utilizó un método de detección para péptidos de bajo peso molecular (entre 1 y 10 kDa). Se logra apreciar que todas las fracciones tienen perfiles similares, mostrando señales de alta intensidad entre 1 y 10 kDa.

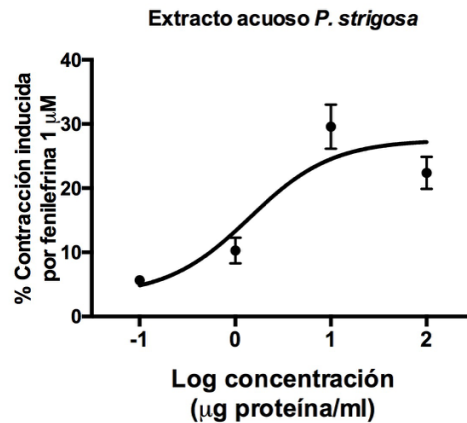


**Figura 8.** Espectro de masas MALDI-TOF de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso de *P. strigosa*.

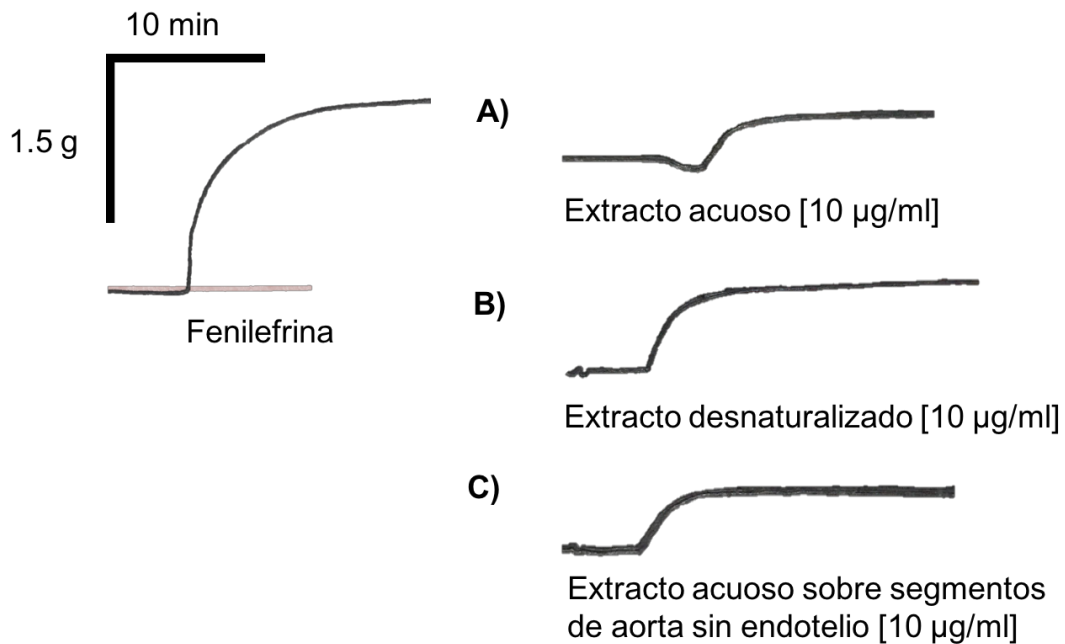
### 8.5 Evaluación de la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso.

La Figura 9 muestra la curva concentración-respuesta de la actividad del extracto acuoso a diferentes concentraciones de proteína sobre segmentos de aorta aislada de rata. Los resultados de estos experimentos indicaron que el extracto indujo vasoconstricción en todas las concentraciones evaluadas; sin embargo, el efecto vasoconstrictor fue mayor a una concentración de 10 µg de proteína/ml. Mediante un ajuste no lineal se determinó que el extracto acuoso tiene una concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) de 1.230 ± 0.2996 µg de proteína/ml y un efecto máximo (E<sub>max</sub>) de 27.53 ± 4.82 %. También, se observó un efecto bifásico en

los registros, el cual consta de una primera fase vasorrelajante, seguido de una segunda fase de vasoconstricción (Figura 10).



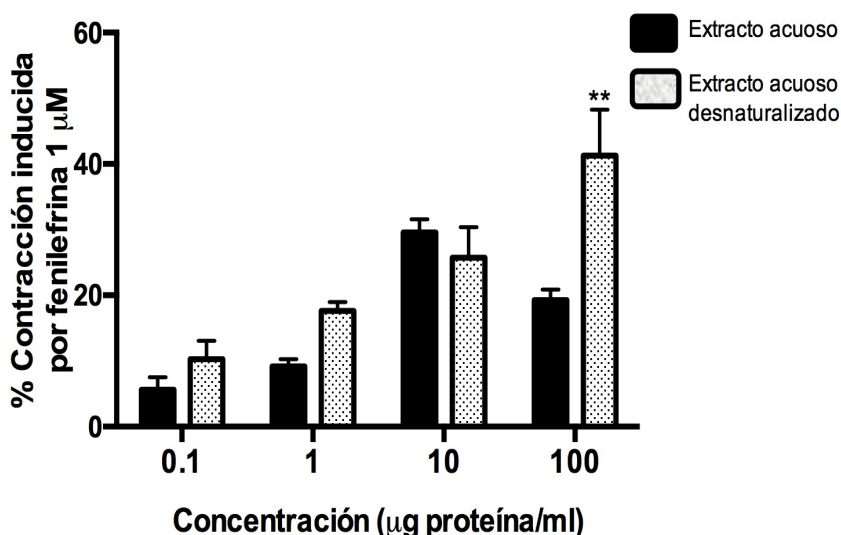
**Figura 9.** Curva concentración-respuesta de la actividad vasoconstrictora inducida por el extracto acuoso de *P. strigosa*.



**Figura 10.** Efecto del extracto acuoso (A) y extracto desnaturalizado (B) sobre segmentos de aorta aislada de rata. Efecto del extracto acuoso sobre segmentos de aorta sin endotelio (C).

## 8.6 Estabilidad de la vasoactividad del extracto acuoso.

Con la finalidad de obtener información sobre la estabilidad de la actividad vasoactiva inducida por el extracto acuoso, se evaluó la actividad biológica del extracto después de desnaturalizar el contenido de proteína, mediante incubación a ebullición; el extracto obtenido a partir de este tratamiento se denominó extracto desnaturalizado por acción térmica. Los resultados de estos experimentos indicaron que la actividad contráctil del extracto desnaturalizado se conservó, e inclusive aumentó de manera significativa a una concentración de 100  $\mu\text{g}$  de proteína/ml (Figura 11). Sin embargo, el efecto bifásico del extracto se perdió después de someterlo al tratamiento térmico, de tal modo que no se observó el efecto vasorrelajante (Figura 10). Adicionalmente, se evaluó la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso desnaturalizado en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. La incubación del extracto acuoso con este compuesto causó la pérdida completa de su actividad biológica.

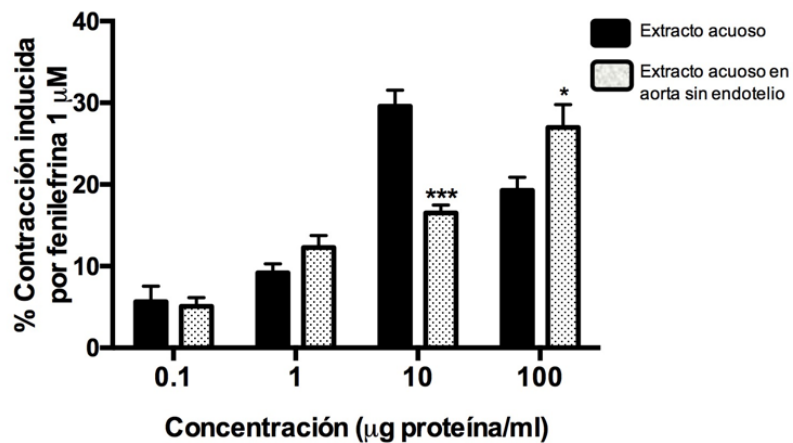


**Figura 11.** Actividad vasoconstrictora del extracto acuoso de *P. strigosa*, normal y desnaturalizado. \*\* $p < 0.01$  contra actividad biológica del extracto acuoso.

## 8.7 Caracterización preliminar de los mecanismos de acción involucrados en la vasoconstricción inducida por el extracto acuoso.

### 8.7.1 Participación del endotelio vascular.

Se evaluó el efecto del extracto acuoso de *P. strigosa* sobre segmentos de aorta desprovistos de endotelio. El efecto bifásico no se observó al evaluar el extracto en los segmentos de aorta sin endotelio, de tal modo que sólo se observó el efecto vasoconstrictor (Figura 10). Como se muestra en la Figura 12, la actividad vasoconstrictora se redujo de manera significativa al evaluar el extracto a la concentración de 10 µg de proteína/ml sobre los segmentos libres de endotelio. Sin embargo, la vasoconstricción aumentó significativamente a la concentración de 100 µg de proteína/ml.



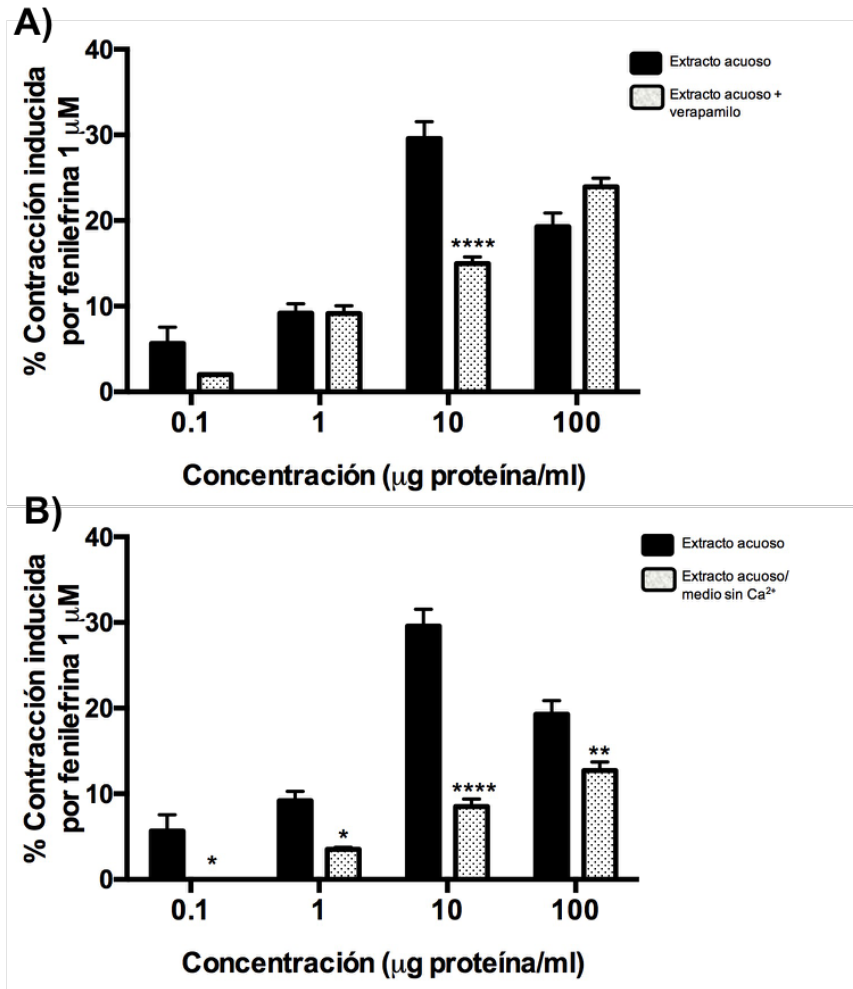
**Figura 12.** Actividad vasoconstrictora del extracto acuoso de *P. strigosa* sobre segmentos de aorta con y sin endotelio. \* $p < 0.5$  y \*\*\* $p < 0.001$  contra actividad biológica del extracto acuoso.



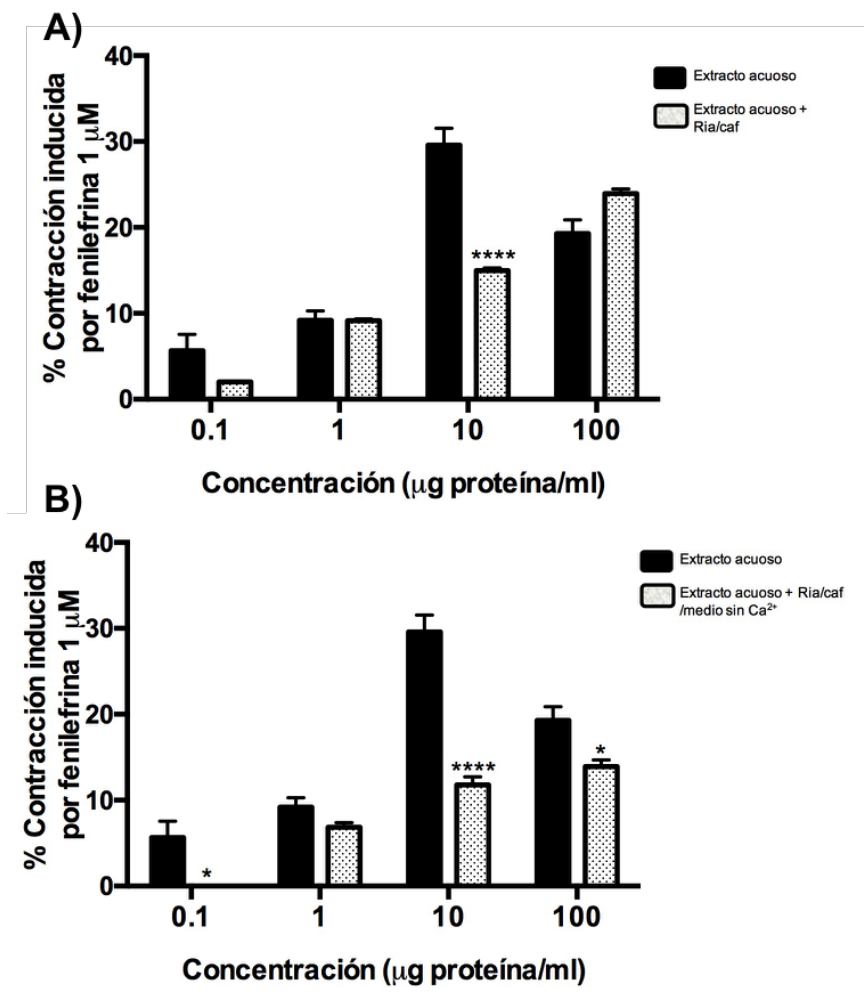
### 8.7.2 Influencia del calcio.

Al evaluar el extracto acuoso de *P. strigosa* sobre segmentos de aorta con endotelio intacto y en presencia de verapamilo, un bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L, se observó una disminución significativa de la actividad vasoconstrictora del extracto sólo a la concentración de 10  $\mu\text{g}$  de proteína/ml (Figura 13A). Por otro lado, al evaluar la actividad del extracto en un medio libre de calcio se observó que el efecto vasoconstrictor disminuyó significativamente a todas las concentraciones evaluadas (Figura 13B).

Con la finalidad de determinar la participación del calcio intracelular en la vasoconstricción inducida por el extracto, se agotaron los almacenes de calcio intracelular de los tejidos mediante un tratamiento con rianodina y cafeína. Al evaluar el extracto sobre estos tejidos se observó una disminución significativa sólo a la concentración de 10  $\mu\text{g}$  de proteína/ml (Figura 14A). Adicionalmente, en un experimento combinado, se evaluó la actividad vasoconstrictora del extracto sobre segmentos de aorta incubados con cafeína y rianodina en un medio libre de calcio, observándose disminución significativa en varias concentraciones (Figura 14B).



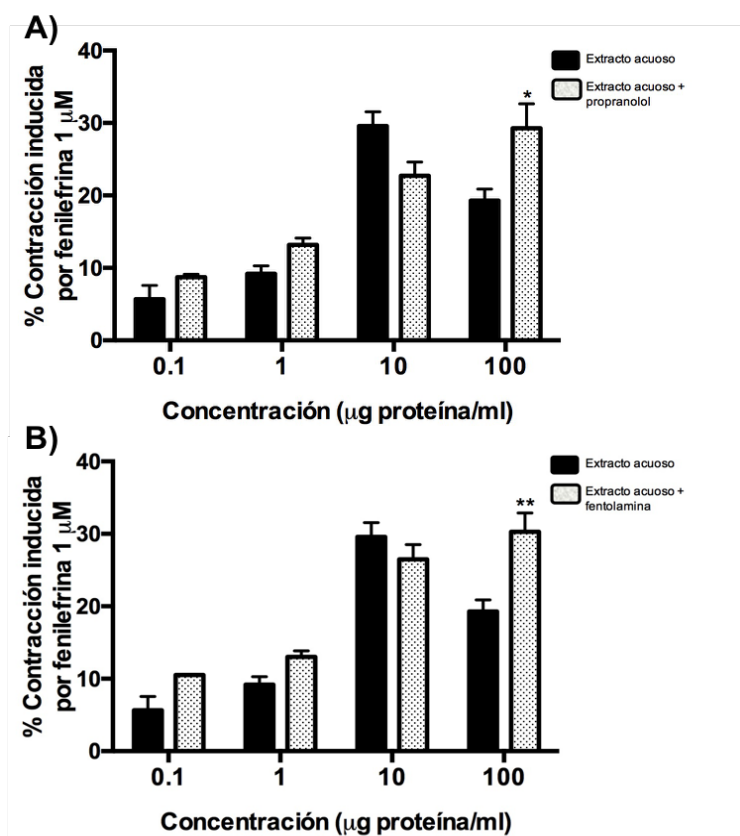
**Figura 13.** Actividad vasoconstrictora inducida por el extracto acuoso de *P. strigosa* en presencia de bloqueadores de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (A) y en un medio libre de Ca<sup>2+</sup> (B). \*\**p* < 0.01 y \*\*\*\* *p* < 0.0001 contra actividad biológica del extracto acuoso.



**Figura 14.** Actividad vasoconstrictora inducida por el extracto acuoso de *P. strigosa*, en presencia de rianodina y cafeína en un medio con Ca<sup>2+</sup> (A) y en un medio libre de Ca<sup>2+</sup> (B). \* $p < 0.5$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$  contra actividad biológica del extracto acuoso.

### 8.7.3 Participación de los receptores adrenérgicos.

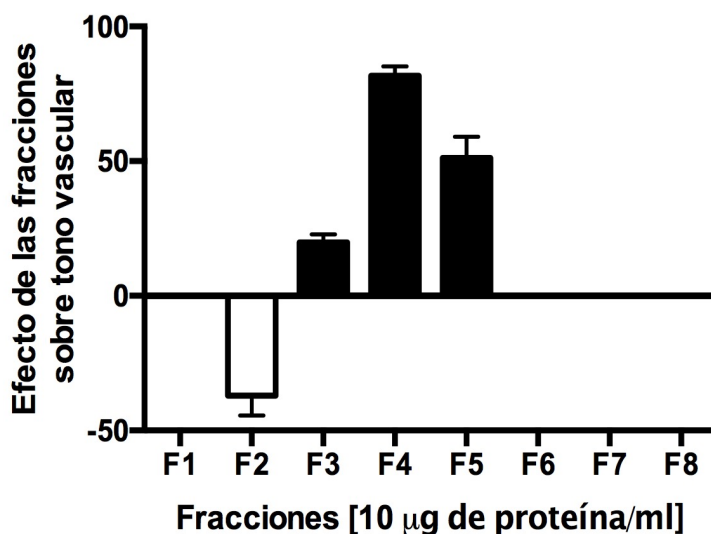
En presencia de propranolol, un bloqueador no selectivo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso no disminuyó. Incluso a una concentración de 100  $\mu\text{g}$  de proteína/ml, la vasoconstricción del extracto aumentó de manera significativa (Figura 15A). Por otra parte, en presencia de fentolamina, un bloqueador no selectivo de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, tampoco disminuyó la actividad vasoconstrictora del extracto, al igual que en presencia de propranolol, el efecto del extracto aumentó de manera significativa a una concentración de 100  $\mu\text{g}$  de proteína/ml (Figura 15B).



**Figura 15.** Actividad vasoconstrictora inducida por el extracto acuoso de *P. strigosa* en presencia de propranolol (A) y fentolamina (B). \* $p < 0.5$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$  contra actividad biológica del extracto acuoso.

## 8.8 Vasoactividad de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso.

De las fracciones obtenidas al someter el extracto a cromatografía de exclusión molecular, únicamente cuatro tuvieron actividad sobre el tono vascular al ser evaluadas a la concentración de 10  $\mu\text{g}$  de proteína/ml (Figura 16). Las fracciones F3, F4 y F5 presentaron actividad vasoconstrictora, siendo F4 la que presentó mayor actividad ( $81.694 \pm 2.039 \%$ ). Solamente F2 presentó actividad vasorrelajante sobre los segmentos de aorta ( $37.038 \pm 4.261 \%$ ). Al evaluar la fracción 2 (10  $\mu\text{g}$  de proteína/ml) sobre segmentos de aorta desprovistos de endotelio no se observó actividad vasorrelajante. Adicionalmente, se evaluó la actividad de F2 después de someterla a condiciones desnaturalizantes y se observó que bajo este tratamiento también se pierde su actividad biológica.



**Figura 16.** Actividad biológica de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular del extracto acuoso de *P. strigosa*. Las barras negras indican vasoconstricción, la barra blanca indica vasodilatación.

## 9. DISCUSIÓN

De acuerdo con estudios anteriores, se ha encontrado que la capacidad de generar complicaciones cardiovasculares es el principal factor que determina la letalidad de los venenos de los cnidarios potencialmente peligrosos para los humanos (Ramasamy *et al.*, 2004; Noguchi *et al.*, 2005; Ramasamy *et al.*, 2005; Seymour *et al.*, 2015;). Hasta el momento, no se conocen con exactitud los mecanismos de acción involucrados en la generación de dichas complicaciones. Incluso, se ha encontrado que los extractos de algunos cnidarios que no representan peligro para los humanos también producen efectos sobre el sistema cardiovascular, tal es el caso de los corales escleractinios *S. siderea*, *P. astreoides* y *P. strigosa*, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el Caribe Mexicano. Los extractos acuosos de estos corales contrajeron, de una manera dependiente de la concentración, la aorta de rata. Considerando que el extracto acuoso de *P. strigosa* fue el que presentó mayor actividad vasoconstrictora, se decidió continuar con el estudio de esta especie a fin de obtener información sobre el tipo de compuestos responsables de su vasoactividad y los mecanismos de acción involucrados (García-Arredondo *et al.*, 2016).

En este estudio, se encontró que el extracto acuoso de *P. strigosa* produjo un efecto vasoconstrictor en la aorta de rata, el cual fue similar al observado en un estudio previo, realizado por nuestro grupo de investigación (García-Arredondo *et al.*, 2016). En el presente trabajo se obtuvo un efecto vasoconstrictor menor al observado en el estudio anterior, lo cual puede deberse a que los fragmentos de coral estuvieron almacenados desde el 2015 a -70 °C. El efecto vasoactivo del extracto presentó dos fases: una ligera fase inicial de vasodilatación, seguida de una vasoconstricción muy marcada que fue dependiente de la concentración. Sin embargo, la actividad vasoconstrictora del extracto fue menor a la concentración más alta (100 µg de proteína/ml), sugiriendo la posibilidad de que el extracto presenta una mezcla compleja de compuestos vasoconstrictores y vasorrelajantes. Un efecto bifásico similar se ha observado en estudios de los venenos de los

cnidarios *Chironex fleckeri* y *Chiropsella bronzie*. En segmentos de aorta de rata previamente contraídos con fenilefrina, se observó que los venenos de estos cnidarios inducen una fase inicial de vasodilatación, seguida de una fase de vasoconstricción sostenida (Winter *et al.*, 2007). En estudios con otros cnidarios como *Carybdea rastonii* y *Cyanea capillata* también se ha encontrado que sus extractos inducen una mezcla de actividades vasoconstrictoras y vasodilatadoras (Azuma *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017). En otros estudios, se ha encontrado que los extractos de algunos cnidarios sólo producen un efecto vasoconstrictor, tal es el caso de los hidrocorales *Millepora alcicornis* y *M. complanata* (García-Arredondo *et al.*, 2011) y el zoantido *Palythoa caribbaeorum* (Lazcano-Pérez *et al.*, 2018). Sólo en el caso del hidrozooario *Physalia physalis* se ha observado actividad netamente vasodilatadora (Loredo *et al.*, 1986).

Para comprobar si el extracto acuoso de *P. strigosa* está constituido por una mezcla compleja de compuestos vasoactivos, en este estudio se sometió el extracto a un fraccionamiento mediante cromatografía de exclusión molecular que permitiera una mejor separación. En el estudio previo antes mencionado se fraccionó el extracto mediante una columna de Sephadex G-50 empaquetada manualmente, con lo cual se obtuvieron solamente dos fracciones, de las cuales la segunda presentó actividad vasoconstrictora (García-Arredondo *et al.*, 2016). En este estudio se fraccionó el extracto con una columna comercial de mayor resolución, obteniéndose ocho fracciones, de las cuales únicamente cuatro tuvieron actividad sobre el tono vascular. La fracción 2 tuvo actividad vasorrelajante sobre segmentos de aorta aislada de rata, esto confirmó la presencia de compuestos vasorrelajantes en el extracto. Mientras que, las fracciones 3, 4 y 5 presentaron actividad vasoconstrictora, siendo la fracción 4 la que presentó mayor actividad, incluso que la del extracto acuoso. El hecho de que la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso disminuye al ser evaluado a la concentración más alta se debe a que el o los compuestos vasorrelajantes interfieren en la vasoconstricción. De manera adicional, se determinó en este estudio que la actividad vasorrelajante de la fracción 2 fue dependiente del endotelio vascular y

que los componentes vasodilatadores contenidos en esta fracción son proteínas termosensibles.

El análisis electroforético reveló que el extracto acuoso de *P. strigosa* contiene proteínas de un amplio intervalo de pesos moleculares. La fracción 2, que produce vasodilatación, presentó bandas de 120 y 50 kDa, las cuales podrían ser las responsables de la actividad vasorrelajante. Esto podría explicar la termosensibilidad de los compuestos vasodilatadores presentes en la fracción 2, ya que las proteínas son más inestables que los péptidos (Walker, 2002). Las fracciones 3 y 4, que indujeron vasoconstricción, presentaron un amplio espectro de bandas de diferentes pesos moleculares, observándose bandas bien definidas en la región de 50 kDa. Por otra parte, no se lograron apreciar bandas en la fracción 5, que también presentó actividad vasoconstrictora. Estos resultados sugieren que algunas proteínas cercanas a un peso molecular de 50 kDa podrían tener una participación en la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso. Los pesos moleculares encontrados en estas fracciones se pueden comparar con los de algunas toxinas encontradas en un estudio realizado por Hiroshi y colaboradores, quienes aislaron dos toxinas de la avispa de mar *Carybdea rastoni*: CrTX-A y CrTX-B con pesos moleculares de 43 y 48 kDa, respectivamente obtenidos mediante SDS-PAGE (Nagai *et al.*, 2000A). Estas toxinas produjeron una contracción dependiente de calcio en el músculo liso de aorta aislada de conejo (Ozaki *et al.*, 1986). En otro estudio, se aislaron dos toxinas de la cubo medusa *Carybdea alata*, CaTX-A y CaTX-B con pesos moleculares entre 43 y 45 kDa, respectivamente (Nagai *et al.*, 2000B). En un estudio reportado en el 2002, se aisló una toxina proveniente de la medusa *Chiropsalmus quadrigatus* (CqTX-A) con un peso molecular de aproximadamente 44 kDa y que presenta actividad hemolítica (Nagai *et al.*, 2002). Es importante tomar en cuenta que los efectos cardiovasculares provocados por los cnidarios se deben en su mayor parte a otras toxinas diferentes a las hemolisinas (Xiao *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha sugerido que podría haber alguna participación de las hemolisinas, que actúan mediante la formación de poros en las membranas celulares, en la inducción de los efectos cardiovasculares de algunos cnidarios, esto debido al influjo de calcio



extracelular en las células musculares (Wang *et al.*, 2017). De ser así, es posible sugerir también que la actividad vasodilatadora del extracto acuoso de *P. strigosa* y de la fracción 2 podría ser causado por toxinas formadoras de poros, de tal manera que al permitir el influjo de calcio a las células endoteliales se activaría la vía del óxido nítrico/GMPc. Esto explicaría también el hecho de que tanto las fracciones 3 y 4, como la fracción 2, presentaron bandas bien definidas en la región de 50 kDa, de tal modo que el efecto predominantemente vasoconstrictor de las fracciones 3 y 4 podría deberse a la presencia de otros componentes vasoconstrictores. Para comprobar lo antes mencionado, se requieren más estudios de mecanismos de acción con las toxinas purificadas.

El análisis mediante espectrometría de masas en la modalidad MALDI-TOF, utilizando un método de detección para compuestos de bajo peso molecular, aportó que el extracto acuoso contiene compuestos de pesos moleculares entre 1 y 10 kDa. Sin embargo, la separación del extracto acuoso no fue buena, ya que no se aprecia una diferencia entre la composición de compuestos de ese intervalo de pesos moleculares de las fracciones. No obstante, mediante este fraccionamiento si se logró apreciar una diferencia en la actividad biológica entre las fracciones. Esto puede deberse a que en estas fracciones se concentran compuestos de pesos moleculares que no están presentes en las otras fracciones, o bien, están presentes en bajas concentraciones, lo que hace que el efecto sobre aorta no se haga presente, tal es el caso de las bandas de 50 kDa presentes en la electroforesis o bien, algunos compuestos de entre 2.5 y 4.7 kDa que podrían encontrarse en abundancia en estas fracciones y ser los responsables de los efectos vasoactivos.

Cuando se determinó el efecto de la temperatura sobre la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso de *P. strigosa* a diferentes concentraciones, se observó que la actividad vasoactiva de este extracto no se modifica, incluso aumenta de manera significativa a la concentración más alta. Estos resultados indican que los compuestos responsables del efecto vasoconstrictor son termoestables en su mayor parte. El aumento del efecto vasoconstrictor a la concentración más alta sugiere que los compuestos vasodilatadores son

termosensibles. Considerando que en los venenos de algunas especies existen toxinas peptídicas con puentes disulfuro que les confieren estabilidad térmica (Escoubas y Rash, 2004), se sometió el extracto acuoso a un tratamiento bajo condiciones reductoras en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. Posterior a este tratamiento, el extracto perdió completamente su actividad biológica, sugiriendo que gran parte de los compuestos responsables del efecto vasoconstrictor son péptidos ricos en puentes disulfuro.

Como parte de la caracterización preliminar de los mecanismos de acción involucrados en la actividad del extracto acuoso de *P. strigosa* sobre el tono del músculo liso vascular, se evaluó inicialmente la participación del endotelio vascular. De este modo, se observó que el efecto vasoconstrictor disminuyó de manera significativa a la concentración de 10  $\mu$ g de proteína/ml, mientras que a la concentración de 100  $\mu$ g de proteína/ml el efecto vasoconstrictor aumentó significativamente. Como se comprobó con la fracción 2, el efecto vasodilatador del extracto depende en gran medida de la presencia del endotelio vascular, de tal manera que al eliminarse estas células, a la concentración más alta, la actividad vasoconstrictora no se ve alterada y se incrementa. La disminución significativa de la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso a concentraciones intermedias sobre segmentos de aorta desprovistos de endotelio podría deberse a la presencia de algunos compuestos vasoconstrictores dependientes de endotelio, lo que sugiere que el extracto acuoso de *P. strigosa* está constituido por una mezcla compleja de compuestos vasoactivos, incluyendo compuestos vasoconstrictores y vasodilatadores. Al parecer, algo similar ocurre con los venenos de otros cnidarios. Como se mencionó anteriormente, la vasodilatación inducida por los venenos de *C. fleckeri* y *C. bronzie* fue dependiente de endotelio y se inhibió significativamente en presencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa N $\omega$ -nitro-L-arginina, además de que la actividad vasoconstrictora también disminuyó en segmentos desprovistos de endotelio (Winter *et al.*, 2007). En un estudio previo, se reportó que el extracto de tentáculos de la medusa *Cyanea capillata* induce vasoconstricción, dependiente de la concentración, sobre segmentos de aorta aislada de rata. La amplitud de la

respuesta es mayor al evaluarse en segmentos de aorta desprovistos de endotelio (Wang *et al.*, 2013). En estos experimentos se encontró que el efecto vasoconstrictor se incrementó al evaluarse en segmentos de aorta desprovistos de endotelio (Wang *et al.*, 2013), lo cual sugiere la presencia compuestos vasodilatadores que actúan, induciendo la fosforilación inhibitoria de la óxido nítrico sintasa endotelial (Wang *et al.*, 2017). Una fracción obtenida a partir de tentáculos de *Carybdea rastoni* (pCrTX) produjo también vasoconstricción, pero a altas concentraciones induce vasodilatación, la cual se inhibe removiendo el endotelio o en presencia de azul de metileno, que interfiere directamente con la guanilato ciclasa soluble (Azuma *et al.*, 1986).

Considerando que la contracción muscular es un proceso altamente regulado que depende de la concentración de calcio libre en el citoplasma (Jorgensen *et al.*, 1977; Williams y Fay, 1986; Sperelakis, 1990; Minowa *et al.*, 1997), en este estudio se realizaron experimentos para determinar la participación del calcio en la vasoconstricción inducida por el extracto acuoso de *P. strigosa*. Al evaluar la actividad del extracto en presencia de verapamilo, un bloqueador de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L CCVL, se observó una disminución significativa de la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso sólo a la concentración de 10 µg de proteína/ml. Estos resultados muestran que el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto involucra la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L. Por otra parte, la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso disminuyó de manera significativa en todas las concentraciones evaluadas, cuando se incubaron los anillos de aorta en un medio libre de calcio. Estos resultados indicaron que el efecto vasoconstrictor inducido por este extracto depende en gran medida del influjo extracelular de iones calcio, a través de otros canales de calcio como los activados por ligando (Minowa *et al.*, 1997) o más probablemente por la acción de toxinas formadoras de poros en las membranas (Jouiaei *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

Con la finalidad de determinar la participación del calcio de los almacenes intracelulares en la actividad vasoconstrictora del extracto acuoso de *P. strigosa*, se realizó un experimento en el que se agotaron los almacenes de calcio con rianodina

y cafeína. El retículo endoplásmico es el principal almacén de calcio intracelular en el músculo y participa de forma importante en la regulación del proceso acoplamiento-excitación-contracción (Jorgensen *et al.*, 1977). La liberación de calcio de los almacenes intracelulares, se lleva a cabo a través de dos mecanismos principales: la activación del receptor  $IP_3$  y la activación del receptor a rianodina (Van y Entman, 1979; Ferris y Snyder, 1992). Se ha reportado que la función de los almacenes intracelulares de calcio puede bloquearse con un tratamiento de cafeína y rianodina (Sitsapesan y Williams, 1990; Rohra *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en este experimento mostraron que el efecto vasoconstrictor del extracto acuoso se redujo significativamente sólo a una de las concentraciones intermedias, indicando una participación parcial de los almacenes intracelulares de calcio. Al realizar un experimento combinado, en el que se evaluó la actividad vasoconstrictora del extracto sobre segmentos tratados con cafeína y rianodina en un medio libre de calcio, se observó que hubo una disminución significativa en el efecto vasoconstrictor del extracto acuoso en en la mayoría de las concentraciones evaluadas. El hecho de que no se observó un bloqueo completo de la actividad vasoconstrictora con este tratamiento combinado, se debe a la posible participación de los receptores de  $IP_3$ , ya que existe ambigüedad en cuanto a si los receptores de  $IP_3$  y los receptores de rianodina se encuentran en almacenes separados o en uno mismo; por otra parte, existe la posibilidad de que no se hayan agotado por completo los almacenes de calcio intracelulares con el tratamiento (Blaustein *et al.*, 2002; Raynbow *et al.*, 2009). De manera general, los resultados estos experimentos indicaron que la vasoconstricción inducida por el extracto acuoso de *P. strigosa* involucra principalmente el influjo de calcio extracelular y, en menor medida, la salida de calcio de los almacenes intracelulares. En estudios previos, se encontraron resultados similares respecto a la actividad vasoconstrictora del extracto de tentáculos de *C. capillata* (Wang *et al.*, 2013) y del extracto acuoso del hidrocoral *M. complanata* (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2007).

En experimentos con animales, se ha reportado que en presencia de bloqueadores adrenérgicos se observa una disminución significativa de los efectos cardiovasculares inducidos por los venenos de algunos cnidarios (Ozaki *et al.*,

1986; Ramasamy *et al.*, 2005; Winkel *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2017). En un estudio reciente, se observó que el extracto de tentáculo de *Cyanea capillata* incrementa la concentración de AMPc y la actividad de PKA en cardiomiocitos aislados de ratón mediante una vía que involucra a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Wang *et al.*, 2017). Para determinar la posible participación de los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos en el efecto contráctil inducido por el extracto acuoso de *P. strigosa*, en este estudio se evaluó la actividad del extracto en presencia de propranolol, un bloqueador no selectivo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, y fentolamina, un bloqueador no selectivo de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. Los resultados no mostraron una disminución en el efecto contráctil inducido por el extracto en presencia de los bloqueadores adrenérgicos. Sin embargo, en ambos casos se observó que el efecto vasoconstrictor aumentó de manera significativa a la concentración más alta. En el caso de los experimentos con propranolol, el aumento en la contracción inducida por el extracto a la concentración más alta podría deberse a una posible participación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, que al ser activados producen vasodilatación en el músculo liso vascular (Casey *et al.*, 2012; Cotecchia *et al.*, 2012), lo cual es congruente con los resultados observados con el extracto de *C. capillata* (Wang *et al.*, 2017). Por otro lado, el incremento del efecto vasoconstrictor del extracto a la concentración más alta, en presencia de fentolamina, podría deberse a una posible activación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  en las terminaciones nerviosas que inervan el vaso sanguíneo, que podrían estar inhibiendo la liberación de catecolaminas (Fisher y Fadel, 2010; Cotecchia *et al.*, 2012). En otros estudios con cnidarios no se ha observado la participación de los receptores adrenérgicos en los efectos cardiovasculares producidos por algunos cnidarios. Por ejemplo, en estudios previos con la cubomedusa *Chironex fleckeri*, no se encontró una participación importante de los receptores adrenérgicos en su actividad vasoconstrictora (Winter *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2012). De acuerdo con lo propuesto por Wang y colaboradores (2017), la razón por la que se observan resultados negativos en los experimentos con bloqueadores adrenérgicos al evaluar los efectos cardiovasculares de los extractos de algunos cnidarios es que los efectos podrían estar enmascarados por

la entrada de calcio extracelular provocada por otros mecanismos, como la formación de poros en las membranas.

## 10. CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio indicaron que el extracto acuoso de *P. strigosa* induce un complejo efecto vasoactivo sobre segmentos de aorta aislada de rata que consta de dos fases. La primera consiste en un efecto vasorrelajante, dependiente de endotelio vascular, que es causado por compuestos termolábiles. La segunda fase consiste en un efecto vasoconstrictor, causado en su mayor parte por compuestos termoestables pero sensibles a condiciones reductoras. Al parecer, parte del efecto vasoconstrictor inducido por el extracto acuoso también depende de la presencia del endotelio vascular. Dicho efecto vasoconstrictor involucra en su mayor parte a la entrada de calcio del medio extracelular, y en menor grado a la liberación de calcio de los almacenes intracelulares. Finalmente, en menor grado, los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos también están involucrados en el complejo efecto vasoactivo inducido por el extracto acuoso de *P. strigosa* en los segmentos de aorta aislada de rata.

## 11. REFERENCIAS.

- Akera T (1990).** Pharmacological agents and myocardial calcium, in Langer GA (ed): Calcium and the Heart. New York, Raven Press Ltd, p 299.
- Anderluh G, Maček P (2002).** Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria). *Toxicon*, 40:111-124.
- Azuma H, Ishikawa M, Nakajima T, Satoh A, Sekizaki S (1986).** Calcium-dependent contractile response of arterial smooth muscle to a jellyfish toxin (pCrTX: *Carybdea rastonii*). *Br J Pharmacol*, 88:549-559.
- Badimón L, Martínez-González J (2002).** Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Rev Esp de Card*, 55(Supl. 1):17-26.
- Barnes, Robert D (1985).** *Zoología de los Invertebrados I*. Ed. Revolucionaria, Cuarta edición. pág 184 – 189, il.
- Beckmann A, Özbek S (2012).** The nematocyst: a molecular map of the Cnidarian stinging organelle. *Int J Dev Biol*, 56:577-582.
- Berridge MJ, Irvine RF (1989).** Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 341: 197-205.
- Blaustein MP, Golovina VA, Song H, Choate J, Lencesova L, Robinson SW, Wier WG (2002).** Organization of Ca<sup>2+</sup> stores in vascular smooth muscle: functional implications. *Novartis Found Symp*. 246:125-137.
- Bosmans F, Tytgat J (2007).** Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Toxicon*, 49:550-560.
- Bradford MM (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Brandt NR, Brunschwig JP, Lattanzio FA (1985).** A functional identification of cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun*, 128:739-745.
- Budd AF, Fukami H, Smith ND, Knowlton N (2012).** Taxonomic classification of the reef coral family Mussidae (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia). *Zool. J. Linn. Soc*, 166:465-529.



**Calkins H, Zipes DP. (2015).** Hypotension and syncope. In: Mann DL, Zipes DP, Libby P, eds. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, cap 40.

**Carrillo L, Johns EM, Smith RH, Lamkin JT, Largier JL. (2015).** Pathways and hydrography in the Mesoamerican Barrier Reef System Part 1: Circulation. *Continental Shelf Research*, 10:164-176.

**Casey DP, Curry TB, Joyner MJ, Charkoudian N, Hart EC (2012).** Acute  $\beta$ -adrenergic blockade increases aortic wave reflection in young men and women: Differing mechanisms between sexes. *Hypertension*, 59:145-150.

**Castañeda O, Harvey AL. (2009).** Discovery and characterization of Cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. *Toxicon*, 54:1119-1124.

**Changyun W, Haiyan L, Changlun S, Yanan W, Liang L, Huashi G. (2008).** Chemical defensive substances of soft corals and gorgonians. *Acta Ecol Sin*, 28(5):2320-8.

**Chapman AD. (2009).** Numbers of Living Species in Australia and the World, 2nd edition. Australian Biodiversity Information Services ISBN.

**Cheshire WP. (2016).** Autonomic disorders and their management. In: Goldman L, Schafer AI, eds. Goldman's Cecil Medicine. 25th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, cap 418.

**Chrissobolis S, Sobey CG, (2003).** Inwardly rectifying potassium channels in the regulation of vascular tone. *Curr Drug Targets*, 4:281-289.

**Collins AG, (2009).** Recent insights into Cnidarian phylogeny. *Smithson Contrib Mar Sci*, 38:139–49.

**Coralpedia. (2012).** Your guide to Caribbean corals and sponges. Disponible en <[http://coralpedia.bio.warwick.ac.uk/sp/corals/millepora\\_striata.html](http://coralpedia.bio.warwick.ac.uk/sp/corals/millepora_striata.html)> Consultado [marzo de 2017].

**Cordie DR, Budd AF. (2016).** Histological data in a combined phylogenetic analysis of scleractinian reef corals. *J Morphol*, 277:494-511.

**Cotecchia S, Stanasila L, Diviani D (2012).** Protein-Protein interactions at the adrenergic receptors. *Curr. Drug Targets*, 13:15-27.

**de Oliveira JS, Zaharenko AJ, de Freitas JC, Konno K, de Andrade SA, Portaro F CV, Tambourgi DV (2006).** Caissarolysin I (Bcs I), a new hemolytic toxin from the Brazilian sea anemone *Bunodosoma caissarum*: Purification and biological characterization. *Biochim Biophys Acta*, 1760(3), 453–461.

**Diaz BL, Arm JP. (2003).** Phospholipase A2. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 69:87-97.

**Diocot S, Loret E, Bruhn T, Beress L, Lazdunski M. (2003).** APETx1A new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *Mol Pharmacol*, 64:59–69.

**Drexler H (1997).** Endothelial dysfunction: clinical implication. *Prog Cardiovasc Dis*, 4:287-324.

**Drop LJ, Geffin GA, O. Keefe DD (1981)** Relation between ionized calcium concentration and ventricular pump performance in dog under hemodynamically controlled conditions. *Am J Cardiol*, 47:1041-1051.

**Dube A, Singh N, Saxena A, Lakshmi V (2007).** Antileishmanial potential of a marine sponge, *Haliclona exigua* (Kirkpatrick) against experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*, 101(2), 317–324.

**Escoubas P, Rash L (2004).** Tarantulas: eigh-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, 43:555-574.

**Fabiato A, Fabiato F (1979).** Calcium and cardiac excitation- contraction coupling. *Annu Rev Physiol*, 41:473-484.

**Ferlan I, Lebez D (1974).** Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina*—I. purification and characterization. *Toxicon*, 12:57-61.

**Ferris CD, y Snyder, SH (1992).** Inositol 1, 4, 5-trisphosphate-activated calcium channels. *Annual Review of Physiology*, 54(1):469-488.

**Fisher JP, Fadel PJ (2010).** Therapeutic strategies for targeting excessive central sympathetic activation in human hypertension. *Exp. Physiol*, 95, 572–580.

**Flagg TP, Enkvetchakul D, Koster JC, Colin G, Nichols CG (2010).** Muscle KATP Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection. *Physiol Rev*, 90: 799–829.

**Fox JW, Serrano SMT (2005).** Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, 45(8),969–985.

**Francis GS, Chu C (2005).** Compensatory and maladaptive responses to cardiac dysfunction. *Curr. Opin. Cardiol*, 10:260-67.

**Frazão B, Vasconcelos V, Antunes A (2012).** Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actinaria) Toxins, an overview. *Mar Drugs*, 10:1812-1851.

**Freeman SE (1974).** Actions of Chironex fleckeri toxins on cardiac transmembrane potentials. *Toxicon*, 12(4):395-404.

**Freeman SE, Turner RJ (1971).** Cardiovascular effects of toxins isolated from the Cnidarian Chironex fleckeri Southcott. *Br J Pharmacol*, 41(1):154-166.

**Fry BG, Roelants K, Champagne DE, Scheib H, Tyndall JDA, King GF, Vega RCR (2009).** The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 10(1), 483–511.

**García-Arredondo A, Rojas-Molina A, Ibarra-Alvarado C, Lazcano-Pérez F, Arreguín-Espinosa R, Sánchez-Rodríguez J (2016).** Composition and biological activities of the aqueous extracts of three scleractinian corals from the Mexican Caribbean: *Pseudodiploria strigosa*, *Porites astreoides*, and *Siderastrea sidérea*. *J Venom Anim Toxins Inc Trop Dis*, 22:36.

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

**García-Arredondo A, Murillo-Esquivel LJ, Rojas A, Sanchez-Rodriguez J (2014).** Characteristics of hemolytic activity induced by the aqueous extract of the Mexican fire coral *Millepora complanata*. *J Venom Anim Toxins Inc Trop Dis*, 20(1):1.

**García-Arredondo A, Rojas-Molina A, Ibarra-Alvarado C, Iglesias-Prieto R (2011).** Effects of bleaching on the pharmacological and toxicological activities elicited by the aqueous extracts prepared from two “fire corals” collected in the Mexican Caribbean. *J Exp Mar Biol Ecol*, 396:171-6.

**García-Sáez** AJ, Buschhorn SB, Keller H, Anderluh G, Simons K, Schwille (2011). P. oligomerization and pore formation by equinatoxin II inhibit endocytosis and lead to plasma membrane reorganization. *J Biol Chem*, 286:37768- 37777.

**González** S, Fló M, Margenat M, Durán R, González-Sapienza G, Graña M, Parkinson J, Maizels RM, Salinas G, Alvarez B, Fernández C (2009). A family of diverse Kunitz inhibitors from *Echinococcus granulosus* potentially involved in host-parasite cross-talk. *PloS One*, 4; e7009.

**Hay** ME (1996). Marine chemical ecology: what's known and what's next. *J Exp Mar Biol Ecol*, 200:103-134.

**Helmle** KP, Dodge RE, Ketcham RA (2002). Skeletal architecture and density banding in *Diploria strigosa* by X-ray computed tomography. *Proceedings 9th International Coral Reef Symposium*.

**Holstein** T, Tardent P (1984). An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. *Science*, 223(4638):830-833.

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

**Hughes** RJA, Angus JA, Winkel KD, Wright CE (2012). A pharmacological investigation of the venom extract of the Australian box jellyfish, *Chironex fleckeri*, in cardiac and vascular tissues. *Toxicol Lett*, 209:11–20.

**Hughes** AD (1994). Calcium channels in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res*, 32:253-370.

**Huxley** HE (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science*, 164:1356-1366.

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

**Jorgensen** Ao, Kalnins Vi, Zubrzycka E, Maclennan Dh (1977). Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Localization by immunofluorescence of sarcoplasmic reticulum proteins in differentiating rat skeletal muscle cell cultures. *J Cell Biol*, 74: 287-298.

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

**Kamm KE, Stull JT (1989).** Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu. Rev. Physiol*, 51:299-313.

**Kierszenbaum AL (2007).** Histology and cell biology: an introduction to pathology (2<sup>o</sup> edición).

**Kim E, Lee S, Kim JS, Yoon WD, Lim D, Hart AJ, Hodgson WC (2006).** Cardiovascular effects of *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) jellyfish venom in rats. *Toxicol Lett*, 167:205-211.

**Klabunde RE (2005).** Cardiovascular physiology concepts. Lippincott Williams & Wilkins, Ch.8: Exchange function of microcirculation.

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

**Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

**Lara-Lara JR (2008).** Los ecosistemas costeros, insulares y epicontinentales, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, 109-134.

**Lazcano-Pérez F, Zavala-Moreno A, Rufino-González Y, Ponce-Macotela M, García-Arredondo A, Cuevas-Cruz M, y Arreguín-Espinosa R (2018).** Hemolytic, anticancer and anti-giardial activity of *Palythoa caribaeorum* venom. *J Venom Anim Toxins Inc Trop Dis*, 24(1), 12.

**Lee H, Jung E, Kang C, Yoon WD, Kim JS, Kim E (2011).** Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity. *Toxicon*, 58(3), 277–284.

**Leff AR, PT, Schumacker (1993).** “Oxygen and carbon dioxide transport in blood”. *Respiratory physiology: basics and applications*. W.B. Saunders Co.

**Li R, Yu H, Xue W, Yue Y, Liu S, Xing R, Li P (2014).** Jellyfish venomomics and venom gland transcriptomics analysis of *Stomolophus meleagris* to reveal the toxins associated with sting. *J Proteomics*, 106, 17–29.

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

**Liang X**, Beilei W, Ying L, Qianqian W, Sihua L, Yang W, Guoyan L, Jia L, Xuting Y, Liming Z (2012). Cardiovascular effects is independent of hemolytic toxicity of tentacle-only extract from the jellyfish *Cyanea capillata*. *PLoS One*, 7(8):e43096.

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

**Loredo JS**, Gonzalez RR, Hessinger DA (1986). Effect of Portuguese man-of-war venom on isolated vascular segments. *J Pharmacol Exp Ther*, 236(1):140-143.

**Mariscal RN**, McLean RB, Hand C (1977). The form and function of Cnidarian spirocysts. 3. Ultrastructure of the thread and the function of spirocysts. *Cell Tissue Res*, 178:427-433.

**Martonosi AN**, Pikula S (2003). The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim Pol*, 50:1-30.

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

**Michalak M**, Maclennan DH (1980). Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Biosynthesis of the high affinity calcium binding protein in rat skeletal muscle cell cultures. *J Biol Chem*, 255:1327-1334.

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

**Nagai H**, Takuwa-Kuroda K, Nakao M, Oshiro N, Iwanaga SY, Nakajima T (2002). A novel protein toxin from the deadly box jellyfish (sea wasp, Habu-kurage) *Chiropsalmus quadrigatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 66(1), 97-102.

**Nagai H, Takuwa K, Nakao M, Ito E, Miyake, M, Noda M, y Nakajima T (2000A).** Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish (sea wasp) *Carybdea rastonii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 275(2), 582-588.

**Nagai H, Takuwa K, Nakao M, Sakamoto B, Crow GL, y Nakajima T (2000B).** Isolation and characterization of a novel protein toxin from the Hawaiian box jellyfish (sea wasp) *Carybdea alata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 275(2), 589-594.

**Nevalainen TJ, Talvinen KA (2002).** Cloning of a novel phospholipase A2 from the Cnidarian *Adamsia carciniopados*. *Comp Biochem Physiol B*, 132:571-578.

**Noguchi K, Sakanashi M, Matsuzaki T, Nakasone J, Sakanashi M, Koyama T, Hamadate N, Sakanashi M (2005).** Cardiovascular effects and lethality of venom from nematocysts of the box-jellyfish *Chiropsalmus quadrigatus* (Habu-Kurage) in anaesthetized rats. *Toxicon*, 45:519-526.

**Norton RS, Pennington MW, Wulff H. (2004).** Potassium Channel Blockade by the Sea Anemone Toxin ShK for the Treatment of Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. *Curr Med Chem*, 11(23), 3041– 3052.

**Obernier JA, Ransom LB (2006).** Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals. *ILAR Journal*, 47:364-369.

**Organización Mundial de la Salud (2016).** [en línea] Disponible en <[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/about\\_cvd/es/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/)> [Consultado 17 enero 2017].

**Orts DJB, Moran Y, Cologna CT, Peigneur S, Madio B Praher D, Quinton L, De Pauw E, Bicudo JEPW, Tytgat J, de Freitas JC (2013).** Bcstx3 is a founder of a novel sea anemone toxin family of potassium channel blocker. *FEBS J*, 280:4839-4852.

**Ozaki H, Karaki H, Nagase H, Urakawa N, Azuma H, Nakajima T (1986).** Contractile effects of jellyfish toxin extracted from *Carybdea rastonii* on isolated rabbit aorta. *Jpn J Pharmacol*, 42(3):425-430.

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

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

**Patwardhan K (2012).** The history of the discovery of blood circulation: unrecognized contributions of Ayurveda masters. *Adv Physiol Educ*, 36(2):77-82.

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

**Rabiet MJ, Plantier JI, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E (1996).** Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol*, 135:497-510.

**Radwan FF, Aboul-Dahab HM (2004).** Milleporin-1, a new phospholipase A 2 active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocysts. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 139(4), 267–272.

**Ramasamy S, Isbister GK, Seymour JE, Hodgson WC (2005).** The *in vivo* cardiovascular effects of the Irukandji jellyfish (*Carukia barnesi*) nematocyst venom and tentacle extract in rats. *Toxicol Lett*, 155:135-141.

**Ramasamy S, Isbister GK, Seymour JE, Hodgson WC (2004).** The *in vivo* cardiovascular effects of box jellyfish *Chironex fleckeri* venom in rats: efficacy of pre-treatment with antivenom, verapamil and magnesium sulphate. *Toxicon*, 43:685-690.

**Raynbow RD, MacMillan D, McCarron JG (2009).** The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store arrangement in vascular smooth muscle. *Cell Calcium*, 46:313-322.

**Reckelhoff JF (2001).** Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*, 37(5):1199-1208.

**Reiber CL, McGaw IJ (2009).** A Review of the "Open" and "Closed" Circulatory Systems: New Terminology for Complex Invertebrate Circulatory Systems in Light of Current Findings. *Int J Zool*. 1:8.

**Roethle PA, Trauner D (2008).** The chemistry of marine furanocembranoids, pseudopteranes, gersolanes and related natural products. *Nat Prod Rep*, 25:298-317.



**Rohra DK, Saito SY, Ohizumi Y (2003).** Mechanism of acidic pH-induced contraction in spontaneously hypertensive rat aorta: role of Ca<sup>2+</sup> release from the sarcoplasmic reticulum. *Acta Physiologica Scandinavica*, 179:273-280.

**Rojas-Molina A, García-Arredondo A, Ibarra-Alvarado C, Bah M (2012).** *Millepora* (“firecorals”) species: toxinological studies until 2011. *Advances in environmental research* 2012; 26.

**Romero L, Marcussi S, Marchi-Salvador DP, Silva Jr F, Fuly AL, Stábeli RG, Soares AM (2010).** Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub> from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Biochimie*, 92(8), 1063–1071.

**Sandra O, Dubinsky Z, Stambler N (2015).** *Coral reef: An Ecosystem in Transition*. (1ra Edición) New York. Springer, 552.

**Selegim MHR, Lira SP, Kossuga MH, Batista T, Berlinck RGS, Hajdu E, Peixinho S (2007).** Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. *Rev Bras Farmacogn*, 17(3),287–318.

**SEMARNAT (2011).** Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Biodiversidad conocer para conservar, 1:1-38.

**Seymour B, Andreosso A, Seymour J (2015).** Cardiovascular toxicity from marine envenomation. In: Ramachandran editor. *Heart and Toxins*. Londres: Academic Press. 203-223.

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

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

**Sitsapesan, Rebeca y Williams AJ (1990).** Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Physiol*, 423(1):425-439.

**Sperelakis N (1990).** Properties of calcium channels in cardiac muscle and vascular smooth muscle. *Mol Cell Biochem*, 99(2):97-109.

**Six DA, Dennis EA (2000).** The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub>

enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*, 1488(1):1-19.

**Solomon EP, Berg LR, Martín DW, Villet C (1998)**. *Biología de Villet*. 4<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Interamericana, México D.F. 598-602.

**Steele RE, David, CN, Technau U (2011)**. A genomic view of 500 million years of Cnidarian evolution. *TIG*, 27:7-13.

**Suput D, Frangez R, Bunc M (2001)**. Cardiovascular effect of equinatoxin III from the sea anemone *Actinia equina* (L.). *Toxicon*, 39(9):1421-7.

**Talvinen KA, Nevalainen TJ (2002)**. Cloning of a novel phospholipase A2 from the Cnidarian *Adamsia carciniopados*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 132(3), 571–578.

**Tardent P (1995)**. The Cnidarian cnidocyte, a hightech cellular weaponry. *BioEssays*. 17(4):351-362.

**Tejuca M, Anderluh G, Dalla Serra M (2009)**. Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon*, 54:1206-1214.

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

**Turner RJ, Freeman SE (1969)**. Effects of Chironex fleckeri toxin on the isolated perfused guinea pig heart. *Toxicon*, 7(4): 277-286.

**Van Winkle Wb, Entman MI (1979)**. Comparative aspects of cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Life Sci*, 25:1189-1200.

**Wang B, Liu D, Wang C, Wang Q, Zhang H, Liu G, Tao X, Zhang L (2017)**. Mechanism of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and activation by tentacle extract from the jellyfish *Cyanea capillata*. *PeerJ*. 5:e3172.

**Wang B, Zhang B, Wang Q, Zhang Z, Nie F, Zheng J, Xiao L, Zhang L (2013)**. Pharmacological studies of tentacle extract from the jellyfish *Cyanea capillata* in isolated rat aorta. *Mar Drugs*, 11:3335-3349.

**Walker JM (2002)**. *The protein protocols handbook*. 2<sup>nd</sup> edition. Humana Press, New Jersey, USA. 1172 pp.

**Watters MR (2005)**. Tropical marine neurotoxins: venoms to drugs. *Semin. Neurol*, 25:278-289.

**Watson GM, Hessinger SA (1989).** Cnidocyte mechanoreceptors are tuned to the movement of swimming prey by chemoreceptors. *Science*, 243:1589-1591.

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

**West JB (2008).** "Gas transport by the blood". *Respiratory physiology: the essentials*. Lippincott Williams & Wilkins.

**Wientzek M, Katz S (1991).** Isolation and characterization of purified sarcoplasmic reticulum membranes from isolated adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 23:1149-1163.

**Williams DA, Fay FS (1986).** Calcium transients and resting levels in isolated smooth muscle cells as monitored with quin-2. *Am. J. Physiol*, 250:C779-C791.

**Winkel KD, Tibballs J, Molenaar P, Lambert G, Coles P, Ross-Smith M, et al. (2005)** Cardiovascular actions of the venom from the Irukandji (*Carukia barnesi*) jellyfish: effects in human, rat and guinea-pig tissues in vitro and in pigs in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 32:777–88.

**Winter KL, Fernando R, Ramasamy S, Seymour JE, Isbister GK, Hodgson WC (2007).** The *in vitro* vascular effects of two chironomid (*Chironex fleckeri* and *Chiropsella bronzie*) venoms. *Toxicol Lett*, 168:13-20.

**Xiao L, Wang B, Li Y, Wang Q, Liu S, Wang Y, Liu G, Lu J, Ye X, Zhang L (2012).** Cardiovascular effect is independent of hemolytic toxicity of tentacle-only extract from the jellyfish *Cyanea capillata*. *PLOS one*, 7:e43096.

**Xiao L, Liu GS, Wang QQ, He Q, Liu SH, Li Y, Zhang J, Zhang LM (2010).** The lethality of tentacle-only extract from jellyfish *Cyanea capillata* is primary attributed to cardiotoxicity in anaesthetized SD rats. *Toxicon*, 55:838-845.

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

**Zaharenko AJ, Richardson M, Carvalho Pimenta D, Konno K, Portaro FCV de Freitas, J.C (2008).** Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: novel peptides belonging to new classes of toxins.

Comp. Biochem. Physiol. Part D, 3:219-225.