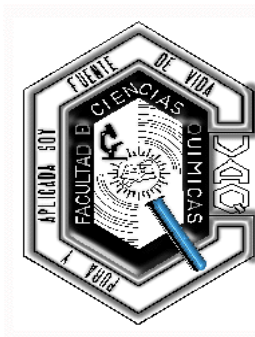


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS**



EFFECTO DEL BLANQUEAMIENTO DE ARRECIFES CORALINOS INDUCIDO  
POR EL INCREMENTO TÉRMICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
CITOLISINAS EN LOS CORALES DE FUEGO *Millepora complanata* y *Millepora  
alcicornis*"

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B. NORMA BEATRIZ OLGUÍN LÓPEZ

DIRIGIDA POR

Dra. Alejandra Rojas Molina

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, OCTUBRE 2014



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

"EFECTO DEL BLANQUEAMIENTO DE ARRECIFES CORALINOS INDUCIDO  
POR EL INCREMENTO TÉRMICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
CITOLISINAS EN LOS CORALES DE FUEGO *Millepora complanata* y *Millepora  
alcicornis*"

Opción de titulación  
**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

**Presenta:**

Q.F.B. Norma Beatriz Olgún López

Dirigido por:

Dra. Alejandra Rojas Molina

Dra. María Alejandra Rojas Molina  
Presidente

Alejandra Rojas M.  
Firma

Dr. César Ibarra Alvarado  
Secretario

[Firma]  
Firma

Dr. Mamadou Moustapha Bah  
Vocal

[Firma]  
Firma

Dra. Juana Isela Rojas Molina  
Suplente

[Firma]  
Firma

Dr. José Alejandro García Arredondo  
Suplente

[Firma]  
Firma

[Firma]  
M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

[Firma]  
Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Octubre, 2014

## RESUMEN

Los hidrocorales pertenecientes al phylum Cnidaria, clase Hydrozoa son los segundos organismos formadores de arrecifes de coral más abundantes en los mares tropicales del mundo. En particular, las especies *Millepora complanata* y *M. alcicornis* se encuentran ampliamente distribuidas en el Caribe Mexicano. Estos organismos se conocen comúnmente como “corales de fuego” debido a su capacidad de causar lesiones dolorosas, similares a quemaduras, en la piel de los humanos después del contacto. Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo indicaron que los extractos acuosos de *M. complanata* y *M. alcicornis* administrados por vía intravenosa inducen muerte en ratones con dosis letales medias (DL<sub>50</sub>) de 4.62 µg de proteína/g y 17 µg protein/g de peso corporal, respectivamente. Se encontró también que dosis menores a la DL<sub>50</sub> produjeron daños histopatológicos en tejido pulmonar y renal asociados con la presencia de citolisinas. Por otra parte, algunos estudios han demostrado que las especies de *Millepora*, al igual que otros cnidarios formadores de arrecifes, son vulnerables frente al fenómeno de “blanqueamiento” (pérdida de algas fotosintéticas simbiotes) originado por el calentamiento global. Existen evidencias que indican que el blanqueamiento produce varios efectos dañinos en el desarrollo y supervivencia de los hidrocorales. Sin embargo, a la fecha se desconoce el impacto que la ausencia de los simbiotes tiene sobre la producción de toxinas por parte de los cnidarios, en especial de citolisinas, específicamente, fosfolipasas A2 (PLA2). Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se determinó la actividad enzimática de PLA2 de especímenes blanqueados de *M. complanata* y *M. alcicornis* y ésta actividad se caracterizó mediante la técnica de zimografía con el objeto de analizar el efecto de la ausencia de las algas fotosintéticas simbiotes en la síntesis de toxinas del coral. Los resultados indicaron que no existe una diferencia significativa entre la actividad de PLA2 de los extractos de especímenes normales y los extractos de especímenes blanqueados. Se demostró también que la actividad enzimática puede ser atribuida a la presencia de toxinas de aproximadamente 25-30 KDa. Nuestros resultados sugieren, de manera

preliminar, que el blanqueamiento no afecta la síntesis de toxinas con actividad de PLA2 en las especies del género *Millepora*.

**(Palabras clave:** *Millepora alcicornis*, *Millepora complanata*, “Corales de fuego”, Blanqueamiento de arrecifes de coral, Fosfolipasas A2 (PLA2))

## ABSTRACT

Hydrozoan corals of the genus *Millepora* (phylum Cnidaria; class Hydrozoa) are the second most abundant reef-forming cnidarians found in coral reefs around the world. These organisms are commonly known as "fire corals" due to their ability to cause painful injuries similar to burns on human skin after contact. Particularly, *M. complanata* and *M. alcicornis* are widely distributed in Mexican Caribbean. Previous studies, carried out by our research group, showed that when aqueous extracts of *M. complanata* and *M. alcicornis* are intravenously administered, induce death in mice with median lethal doses (LD<sub>50</sub>) of 4.62 mg protein/g and 17 mg protein/g body weight, respectively. Doses less than the LD<sub>50</sub> (1.33, 2.67 y 4.00 µg protein/g) produced histopathological damage in kidneys and lungs attributed to presence of cytolytins. Some studies have demonstrated that *Millepora* species, like other reef-forming cnidarians, are highly vulnerable to "bleaching" phenomenon (loss of symbiotic photosynthetic algae) caused by global warming. Evidence indicates that bleaching produces several noxious effects on development and survival of hydrocorals. Nevertheless, the impact of that absence of symbionts has on toxins synthesis by cnidarians, specifically cytolytin phospholipase A2 (PLA2), still unknown. Based on this background, in this study it was determined the enzymatic activity of PLA2 of bleached specimens of *M. complanata* and *M. alcicornis*. This activity was characterized by zymography in order to analyze the effect of the absence of symbiotic photosynthetic algae toxin synthesis in coral. The results indicated no significant difference between the activities of PLA2 of normal and bleached specimens aqueous extracts. It was also shown that enzymatic activity can be attributed to the presence of toxins of approximately 25-30 kDa. Our results suggest, preliminarily, that bleaching does not affect the synthesis of toxins PLA2 activity in these two species of genus *Millepora*.

**(Key Words:** *Millepora alcicornis*, *Millepora complanata*, "Fire coral", Bleaching coral reef, Phospholipases A2 (PLA2))

## **A mis Luises**

*Por tolerar mis ausencias y aplaudir mis logros.  
Por no permitir que los obstáculos me detengan.*

*Por calmarme cuando tiendo a enojarme.  
Y por sacar una sonrisa de mi ceño fruncido hasta en los momentos más  
díficiles.*

*Por regalarme los mejores momentos de mi vida y demostrarme que lo  
único valioso que tengo es su amor y compañía*

*Por ser mi mayor motivación  
y abrazarme siempre susurrando en mi oído "TE AMO"*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra Alejandra Rojas Molina por permitirme trabajar en su grupo de investigación, así como por su valiosa asesoría y apoyo durante la realización de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. César Ibarra Alvarado, Dr. Moustapha Bah, Dr. Alejandro García Arredondo y Dra Juana Isela Rojas Molina por sus valiosas aportaciones y sugerencias durante la revisión del presente trabajo.

A la Dra. Guadalupe Alcocer por su apoyo, palabras aliento y motivación durante mi estancia en la Maestría.

A la Dra. Rosalina Hernández Matehuela por permitirme compartir con ella no solo el trabajo experimental, sino también por compartirme su experiencia y conocimientos, pero sobre todo por brindarme su amistad.

A los miembros del cuerpo académico Dr. Moustapha Bah, Dra Alejandra Rojas Molina, Dra Juana Isela Rojas Molina, Dra Guadalupe Alcocer, Dra Laura Berumen, Dr Fabián López Vallejo y Dr César Ibarra por fomentar en cada clase la búsqueda de nuevos conocimientos y por aumentar la pasión y el amor por la ciencia.

A mis compañeras de generación Sarahí López., Irasema Mendieta, Abigail Hernández y Karen Meza por fomentar siempre la crítica constructiva para mejorar cada día, por las interminables pláticas durante la comida y por los inolvidables momentos que compartí con ustedes

A CONACYT por el apoyo proporcionado durante mis estudios de maestría, con el número de becario 484223

A CONACYT por el apoyo a través del Proyecto CB-2009-133785 para el Apoyo a la Investigación Científica Básica 2009.

A CONACYT por el apoyo a través del Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica FOMIX-QRO 2012-01. Clave: QRO-2012-C01-192954

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
2.1 El Phylum Cnidaria.....	4
2.1.1 Morfología de los cnidarios .....	4
2.1.2 Clasificación del Phylum Cnidaria .....	5
2.1.3 Cnidocitos y cnidocistos (nematocistos, espirocistos y pticocisto .....	10
2.1.4 Los organismos marinos como fuente de compuestos bioactivos .....	14
2.1.5 Toxinas de Cnidarios .....	16
2.1.5.1 Neurotoxinas .....	17
2.1.5.2 Citolisinas.....	18
2.1.5.2.1 Fosfolipasas A2 (PLA2).....	18
2.1.5.3 Metabolitos secundarios obtenidos a partir de especies del Phylum Cnidaria.....	20
2.2 Los "corales de fuego" .....	23
2.2.1 Simbiosis Millepora – Symbiodinium.....	25
2.2.2 Características morfológicas de las especies del género Millepora .....	27
2.2.3 Efectos tóxicos locales y sistémicos provocados por las toxinas de las especies de Millepora en los seres humanos .....	28
2.2.4 Estudios bioquímicos y toxinológicos realizados sobre especies del género <i>Millepora</i> .....	29
2.2.5 Blanqueamiento de los "corales de fuego" .....	32
2.2.6 Mecanismos implicados en el blanqueamiento .....	37
2.2.7 Estrés y blanqueamiento.....	39



2.2.8 Consecuencias del blanqueamiento .....	41
2.2.9 Estudio del blanqueamiento en la era de las “ómicas” .....	41
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>44</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>46</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
5.1 General .....	46
5.2 Específicos.....	46
<b>6. METODOLOGIA.....</b>	<b>48</b>
6.1. Recolección y transporte de los especímenes de <i>M. complanata</i> y <i>M. alcicornis</i> .....	48
6.1.1 Inducción del blanqueamiento de los especímenes de <i>M. complanata</i> y <i>M. alcicornis</i> .....	48
6.2. Preparación de los extractos acuosos de <i>M. complanata</i> y <i>M. alcicornis</i>	49
6.2.1. Cuantificación de zooxantelas.....	49
6.2.2. Preparación de los extractos para los bioensayos .....	49
6.2.2.1. Cuantificación de proteína según el método de Bradford .....	50
6.3. Determinación de la actividad de PLA2 de los extractos acuosos de <i>M. complanata</i> y <i>M. alcicornis</i> normal y blanqueada.....	50
6.3.1. Ensayo de hemólisis indirecta para la medición de la actividad de PLA2 .	50
6.3.2 Actividad de PLA2 en placa .....	51
6.4. Electroforesis en gel.....	51
6.5 Zimografía para evaluar la actividad de PLA2.....	52
6.6. Análisis estadísticos.....	52
6.7. Secuenciación de las bandas con actividad de PLA2 .....	52

6.8. Análisis de las secuencias obtenidas.....	53
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
7.1 Inducción experimental del blanqueamiento de <i>M. complanata</i> y <i>M. alcicornis</i> y determinación del grado de pérdida de algas fotcosintéticas simbiotes.....	53
7.2. Determinación de la cantidad de proteínas presentes en los extractos acuosos de los especímenes normales y blanqueados de <i>M. complanata</i> y <i>M. alcicornis</i> .....	56
7.3. Determinación de la actividad de PLA2 de los extractos preparados a partir de especímenes normales y blanqueados de los dos hidrocorales .....	57
7.3.1. Medición de la actividad de PLA2 mediante el ensayo de hemólisis indirecta y determinación de la dependencia de la actividad enzimática de la presencia de iones $Ca^{2+}$ .....	57
7.3.2. Determinación de la actividad de PLA2 mediante el ensayo de placa en agar.....	60
7.4. Determinación del perfil electroforético de los extractos acuosos de <i>M. complanata</i> y <i>M. alcicornis</i> normales y blanqueados .....	62
7.5. Identificación, mediante la técnica de zimografía, de las proteínas con actividad de PLA2 presentes en los extractos de los especímenes normales y blanqueados de <i>M. complanata</i> y <i>M. ALCICORNIS</i> .....	63
7.6. Determinación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas con actividad de PLA2 presentes en los extractos de los especímenes normales y blanqueados de <i>M.COMPLANATA</i> Y <i>m. ALCICORNIS</i> .....	65
<b>8. DISCUSION DE RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>79</b>
<b>10. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>80</b>

## Índice de figuras

### Figura

1. Anémona e Hydra pertenecientes al Phylum Cnidaria .....	4
2. Fases morfológicas de los cnidarios .....	5
3. Árbol filogenético del phylum Cnidaria .....	6
4. Ejemplos representativos de organismos pertenecientes a las cinco clases del Phylum Cnidaria.....	9
5. Componentes anatómicos de un cnidocito.....	12
6. Morfodinámica de la descarga de un nematocisto .....	13
7. Imágenes de nematocistos del género <i>Millepora</i> .....	14
8. Alineamiento de las secuencias de PLA2 .....	20
9. Estructura básica de los cembranoides.....	21
10. Estructura química de la palitoxina.....	22
11. Ejemplos de especies del género <i>Millepora</i> .....	24
12. Modelo de simbiosis zooxantella-coral .....	26
13. Zooxantelas mostradas en su color natural.....	27
14. Descripción gráfica del blanqueamiento.....	33
15. Tendencias mundiales en la extensión y gravedad del blanqueamiento.....	36
16. Representación esquemática del daño causado por ROS en el simbiote.....	38
17. Vías de señalización activadas por el incremento en la concentración de ROS .....	39
18. Estructuras y longitudes máximas de absorción de algunos aminoácidos tipo micosporina.....	40
19. Integración de la genómica, fisiología y ecología en el estudio de la respuesta de los corales al estrés ambiental .....	43
20. Comparación de fragmentos de <i>Millepora complanata</i> normal (A) y blanqueada (B) .....	53
21. Comparación de fragmentos de <i>M. alcicornis</i> normal (A) y blanqueada (B)...	54

22. Fotografías obtenidas por microscopía de luz de las zooxantelas y algunos nematocistos observados en los tejidos de hidrocorales normales (A) y blanqueados (B).....	54
23. Número de zooxantelas presentes en los extractos de <i>M. complanata</i> y <i>M. alcicornis</i> .....	55
24. Determinación de la actividad de PLA2 en <i>M. complanata</i> .....	58
25. Determinación de la actividad de PLA2 en <i>M. alcicornis</i> .....	58
26. Comparación de la actividad de PLA2 de <i>Millepora complanata</i> y <i>Millepora alcicornis</i> . .....	60
27. Perfil electroforético de los extractos de <i>Millepora complanata</i> .....	61
28. Perfil electroforético de los extractos de <i>Millepora alcicornis</i> .....	62
29. Zimograma de actividad de PLA2. ....	62
30. Comparación de un fragmento de <i>M. complanata</i> control contra un fragmento blanqueado .....	70
31. La relación entre las anomalías regionales en la temperatura de la superficie del mar (SST) y el porcentaje de células blanqueadas.....	71
32 Algunos parámetros a considerar para el monitoreo del blanqueamiento.....	74
33 Áreas en las que se ha centrado el estudio del blanqueamiento .....	75

## Indice de tablas

### Tabla

1. Resumen de las estimaciones netas de la desaparición de los corales formadores de arrecifes .....	35
2. Cantidad de proteína contenida en los extractos acuosos de los hidrocorales .	56
3. Resultados de la prueba de Bonferroni para la prueba de PLA2 (IC=95%) .....	59
4. Secuencias de los fragmentos obtenidos de la bandas de <i>M. complanata</i> . .....	65
5. Secuencias de los fragmentos obtenidos de la bandas de <i>M. alcornis</i> .....	66
6. Categorías de blanqueamiento de corales empleadas en la Base de Datos de Arrecifes.....	72

## 1. INTRODUCCIÓN

Los hidrocorales pertenecientes al Phylum Cnidaria, clase Hydrozoa son los segundos organismos formadores de arrecifes de coral más abundantes en los mares tropicales del mundo. En particular, las especies *Millepora complanata* y *Millepora alcicornis* se encuentran ampliamente distribuidas en el Caribe Mexicano. Los organismos del género *Millepora* se conocen comúnmente como “corales de fuego” debido a que son capaces de producir en los humanos lesiones dolorosas, similares a quemaduras con escozor, eritema y formación de ampollas (Sagi *et al.*, 1987; Bianchini *et al.*, 1988). La capacidad de estos hidrocorales para inducir sus efectos dañinos se debe a la presencia de toxinas almacenadas en sus nematocistos, orgánulos urticantes característicos utilizados por todos los cnidarios para la defensa y captura de presas (Tardent, 1995).

Los casos de quemaduras causadas por estas especies son comunes, pero en general no se reportan porque sanan en promedio en una semana, aunque aún no existe un tratamiento adecuado para las lesiones. Sin embargo, se han documentado reportes de complicaciones sistémicas severas en humanos por el contacto con estos “corales de fuego” (Prasad *et al.*, 2006).

Hasta el momento, en comparación con las investigaciones toxicológicas que se han efectuado sobre otros cnidarios, los estudios que se han realizado sobre toxinas producidas por las especies del género *Millepora* y sus efectos son escasos. Estos estudios muestran que, independientemente de la localización de su hábitat, los “corales de fuego” producen efectos tóxicos similares, tales como contracción del músculo liso arterial, hemólisis retardada y efectos neurotóxicos en ratones. En el caso particular de *M. complanata*, nuestro grupo de trabajo encontró que el extracto acuoso de este hidrocoral, administrado por vía intravenosa, induce violentas convulsiones y la muerte en ratones en menos de un minuto, con una dosis letal media (DL50) de 4.62 µg de proteína/g de peso corporal. Se encontró también que dosis menores a la DL50 (1.33, 2.67 y 4.00 µg de proteína/g) produjeron daños histopatológicos en tejido pulmonar y renal asociado con la presencia de citolisinas. Cuando el extracto se sometió a

condiciones desnaturalizantes, el efecto letal se conservó, en tanto que el daño histopatológico desapareció, lo cual sugirió que las toxinas responsables de la neurotoxicidad y la muerte en ratones eran compuestos termoestables, mientras que las toxinas que provocaban el daño tisular eran de naturaleza peptídica. El análisis cromatográfico del extracto acuoso de *M. complanata* permitió la purificación de una proteína de 61 kDa con efecto vasoconstrictor. Adicionalmente, se detectó la presencia de diferentes compuestos vasoconstrictores de naturaleza no proteica (García-Arredondo, 2011).

Por otra parte, el extracto acuoso de *M. alcicornis*, cuando fue administrado por vía intravenosa resultó ser letal para los ratones con una DL50 = 17 µg proteína/g e indujo daños histopatológicos en riñones, hígado y pulmones. A diferencia de lo observado con el extracto acuoso de *M. complanata*, el extracto de *M. alcicornis* perdió su efecto letal cuando fue sometido a condiciones desnaturalizantes, lo cual indicó que las toxinas responsables de la letalidad y de los daños en los tejidos eran de naturaleza peptídica (Hernández, 2014).

*M. complanata* y *M. alcicornis*, al igual que los corales escleractinios, viven en íntima simbiosis nutricional con microalgas fotosintéticas del género *Symbiodinium*, conocidas comúnmente como zooxantelas (Banaszak *et al.*, 2003). Esta simbiosis a menudo es afectada por múltiples factores que dan como resultado episodios globales de blanqueamiento, que consiste en la pérdida de las zooxantelas simbiotas y los pigmentos fotosintéticos (Brown, 1997; Douglas, 2003). Se ha observado que la principal causa del blanqueamiento es una elevación en la temperatura del agua asociada con el calentamiento global, en combinación con un aumento en la radiación solar (Hoegh-Gudberg *et al.*, 2007). Asimismo, se ha reportado que el blanqueamiento de los corales e hidrocorales produce varios efectos deletéreos en los cnidarios, entre los que destacan: una disminución en la velocidad de crecimiento, un incremento en la susceptibilidad ante diversas especies patógenas y una disminución en los niveles de supervivencia (Weis, 2008).

Los estudios bioquímicos, farmacológicos y toxicológicos realizados hasta el momento sobre *M. complanata* y *M. alcicornis*, indican que estos hidrocorales representan fuentes muy valiosas de compuestos bioactivos que pueden ser útiles como prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos y herramientas biotecnológicas o de investigación. Por otra parte, estos organismos, al igual que las otras especies del género *Millepora*, son muy importantes en el mantenimiento del equilibrio ecológico en los arrecifes de coral de los mares tropicales de todo el mundo y son particularmente susceptibles al fenómeno de blanqueamiento. Sin embargo, a la fecha se desconoce la influencia de la ausencia de algas fotosintéticas simbiotes sobre la síntesis de toxinas, en especial de citolisinas con actividad enzimática de PLA<sub>2</sub>, por parte de los hidrocorales y su impacto sobre los mecanismos de defensa y predación de estos cnidarios.

En este contexto, el presente proyecto de investigación tiene como objetivo determinar el efecto del blanqueamiento provocado por el incremento térmico sobre la actividad enzimática de PLA<sub>2</sub> en *M. complanata* y *M. alcicornis*.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El Phylum Cnidaria

Este phylum está constituido por más de 10 000 especies acuáticas de simetría radial o birradial, que se encuentran distribuidas en todos los océanos del mundo (Collins, 2009), principalmente en hábitats marinos poco profundos, en lugares con temperaturas cálidas y regiones tropicales (Solomon *et al.*, 1998). Las especies que constituyen este phylum son muy diversas en cuanto a formas, tamaños y coloraciones (Fernandez y Rivas, 2007). En la Figura 1 se muestran dos ejemplos de estas especies.



Figura 1. Anémoma (izquierda) e Hydra (derecha) pertenecientes al Phylum Cnidaria

#### 2.1.1 Morfología de los cnidarios.

La organización morfológica de los cnidarios es de simetría radial o birradial y relativamente simple, su cuerpo está organizado alrededor de un eje oral-aboral, y una cavidad gastrovascular o celenterón con una sola abertura y rodeada de tentáculos que cumple funciones de boca y ano (Fernandez y Rivas, 2007). Los tentáculos son utilizados para conducir el alimento hacia la cavidad gastrovascular. Los cnidarios son diploblásticos, es decir, su cuerpo y tentáculos constan de dos capas de células: la epidermis externa (ectodermo) y la

gastrodermis interna (endodermo), entre las cuales se encuentra un material gelatinoso denominado mesoglea (Solomon *et al.*, 1998).

Durante su ciclo de vida se definen dos fases morfológicas evidentes, el pólipo y la medusa (Figura 2). La forma pólipo, generalmente fija a un substrato, posee la boca en la superficie superior. En tanto que la forma medusa tiene la boca en la superficie inferior y está adaptada para la flotación (Solomon *et al.*, 1998).

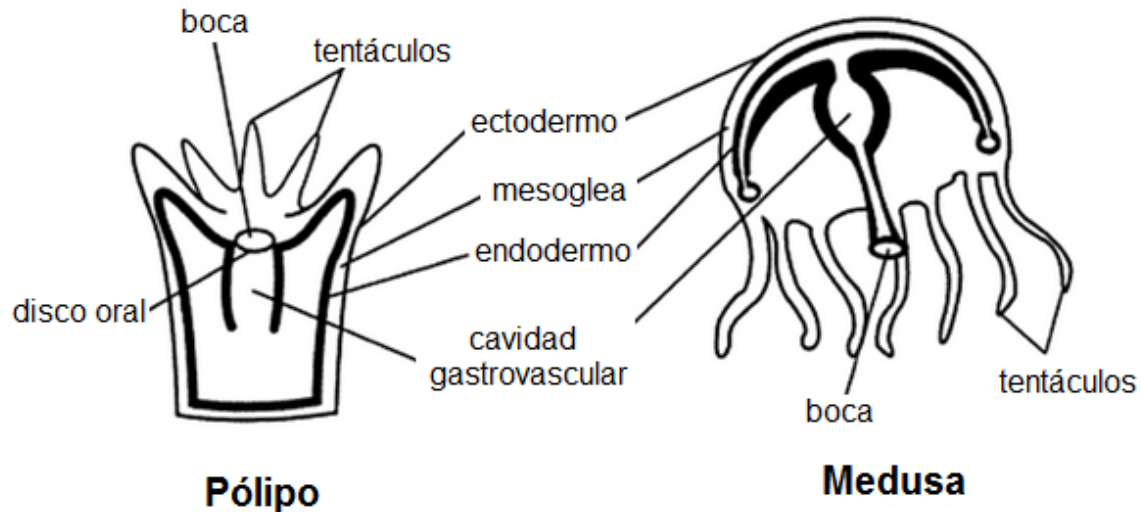


Figura 2. Fases morfológicas de los cnidarios

### 2.1.2 Clasificación del Phylum Cnidaria

La hipótesis actual sobre la clasificación del phylum Cnidaria propone que este incluye cinco clases: Anthozoa, Cubozoa, Hydrozoa, Scyphozoa y Staurozoa (Steele *et al.*, 2011; Kayal *et al.*, 2013)

En la Figura 3 se muestra el árbol filogenético de este phylum, aunque debido a que es una representación aún hipotética, cada nodo es incierto y está sujeto a cambios a la luz de nueva información (Collins, 2009).

- Clase Scyphozoa: Incluye a las medusas de diámetros grandes, en la Figura 4 se muestra un ejemplo de éstas, su cavidad gastrovascular esta

dividida por cuatro septos incompletos. Se caracterizan por su movilidad, atraen agua hacia la cavidad gastrovascular y la expulsan mediante contracciones rítmicas, lo cual genera un efecto propulsor. Ejemplos de especies características de esta clase son las medusas corona (orden Coronatae) y las medusas invertidas (familia Cassiopeidae, orden Rhizostomeae) (Solomon *et al.*, 1998).

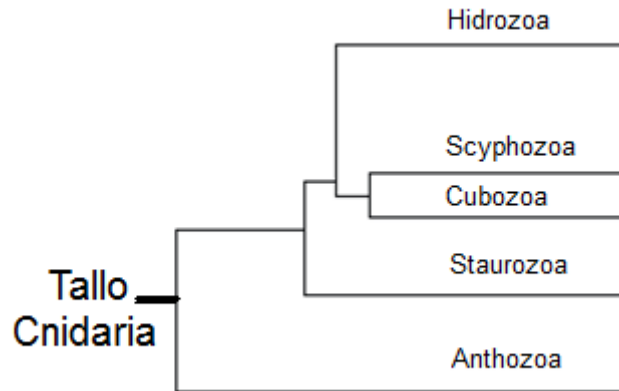


Figura 3. Árbol filogenético del phylum Cnidaria (modificado de Steele, 2011)

- Clase Cubozoa: Su nombre alude a la forma cúbica del cuerpo, que presenta una división tetramérica (Ejemplo en la Figura 4). Se conocen comúnmente como “avispa de mar” debido a sus venenos altamente tóxicos (Solomon *et al.*, 1998). Esta clase contiene solamente 36 especies divididas en dos órdenes: Carybdeida y Chirodropida (Daly *et al.*, 2007). En su ciclo de vida predomina la fase medusoide. La mayoría de estas especies son de tamaño pequeño entre 2 y 5 centímetros. Son exclusivamente marinos, abundantes en la región del Indo-pacífico Occidental. Su dieta consiste principalmente de crustáceos, poliquétidos y peces (Fernández y Rivas, 2007).
- Clase Anthozoa: Son exclusivamente polipoides y pueden ser coloniales, clonales o solitarios, como se muestra en la Figura 4. Esta clase contiene alrededor de 7 500 especies. Comprende dos linajes: Octocorallia y

Hexacorallia (Daly *et al.*, 2007). Las especies de la clase Hexacorallia reciben este nombre debido a que presentan múltiplos de seis tentáculos y comprenden a todos los corales escleractinios y organismos como anémonas (orden Actinaria), corales negros (orden Antipatharia), anémonas tubo (orden Ceriantharia), corales pétreos (orden Scleractinia), corales falsos (orden Corallimorpharia) y zoántidos (orden Zoanthidea). Por otra parte, la subclase Octocorallia (Alcyonaria) incluye cnidarios que tienen múltiplos de ocho tentáculos, tales como los corales blandos (orden Alcyonacea), gorgonias y las plumas de mar (orden Pennatulacea), entre otros. Los octocorales forman pólipos coloniales, a excepción de *Taiaroa tauhou*. La cavidad gastrovascular de estos organismos se encuentra dividida radialmente por septos (Solomon *et al.*, 1998).

- Clase Stauromeduzoa: Comprende aproximadamente 50 especies conocidas comúnmente como las medusas acechadas o stauromedusae, clasificadas en una orden, seis familias y 14 géneros [1-4 cm (0,4-1,6 pulgadas)], de las cuales se muestra un ejemplo en la Figura 4. Es un grupo reducido de pequeñas medusas sésiles de aspecto polipoide y fijas a un sustrato, el cuerpo o cáliz está dividido en cuatro pares de brazos, la boca es central ubicada al final de un manubrio corto y cuadrangular con ocho tentáculos primarios simples y ocho grupos de tentáculos primarios huecos, localizados en cada uno de los extremos de los brazos. La cavidad gástrica está dividida en cuatro bolsas mediante septos longitudinales. Sus plánulas reptantes (sin cilios) se desarrollan en pólipos y posteriormente en medusas, pólipos y plánulas se reproducen asexualmente por gemación.

Son organismos comunes de los mares fríos y templados, siendo raros en las zonas tropicales, se encuentran bien adheridos a pastos marinos, algas y trozos de coral muerto. Su tamaño varía entre 10 y 50 mm de diámetro y se alimentan de pequeños crustáceos, se conocen alrededor de 36 especies (Fernández y Rivas, 2007).



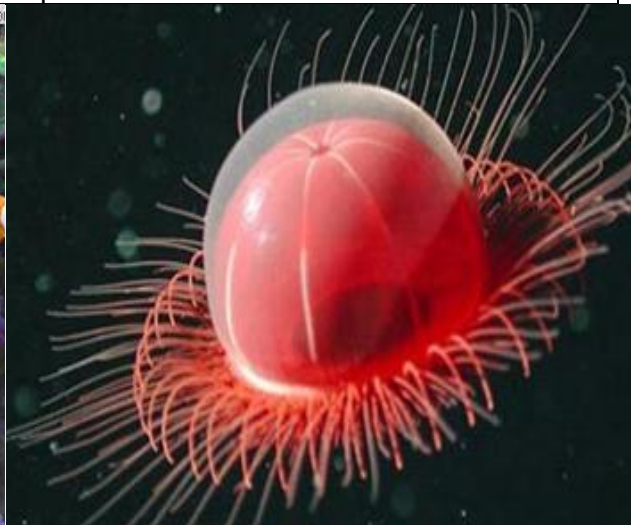
Phylum: Cnidaria  
 Clase: Scyphozoa  
 Orden: Rhizostomeae  
 Familia: Rhizostomae  
 Género: *Rhizostoma*  
 Especie: *Rhizostoma pulmo*



Phylum: Cnidaria  
 Clase: Cubozoa  
 Orden: Cubomedusae  
 Familia: Chirodripidae  
 Género: *Chironex*  
 Especie: *Chironex fleckeri*



Phylum: Cnidaria  
 Clase: Anthozoa  
 Orden: Alcyonacea  
 Familia: Alcyoniidae  
 Género: *Sinularia*  
 Especie: *Sinularia polydactyla*



Phylum: Cnidaria  
 Clase: Hydrozoa  
 Orden: Trachylina  
 Familia: Rhopalonematidae  
 Género: *Benthocodon*  
 Especie: *Benthocodon pedunculata*





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

Figura 4. Ejemplos representativos de organismos pertenecientes a las cuatro clases del phylum Cnidaria

- Clase Hydrozoa: Esta clase es la que cuenta con una mayor diversidad de especies, 3 500 aproximadamente, divididas en dos órdenes Trachylina e Hydroidolina, en la Figura 4 se muestra un ejemplo (Collins 2002; Collins et al., 2006), Estas especies tienen la característica común de tener una cavidad gastrovascular que no se encuentra dividida. Los organismos más representativos de esta clase son las hidras (orden Hydroida, familia Hydridae) y también se incluyen especies que presentan la forma de medusas marinas (orden Trachylina), siendo éstas generalmente más pequeñas que las de la clase Scyphozoa y medusas de agua dulce (orden Hydroida, Limnomedusae). Dentro de esta clase se encuentran también formas coloniales flotantes (orden Siphonophora), que se caracterizan por presentar una vejiga llena de gas que sirve como flotador, denominado pneumatóforo (Schuchert, 2009). Asimismo, esta clase comprende a los

hidrocorales, los cuales son hidrozoarios coloniales que secretan esqueletos calcáreos y se asemejan a los auténticos corales escleractinios. Los hidrocorales más abundantes son los “corales de fuego” (orden Anthoathecata, familia Milleporidae). El otro grupo de hidrocorales (orden Stylasterina) habita generalmente en cuevas y grietas a profundidades de 200 a 500 m (Lewis, 2006).

Su ciclo de vida alterna entre dos morfos con funciones diferentes: un pólipo (hidroide) sésil que asexualmente por gemación produce medusas y una medusa libre nadadora que se reproduce sexualmente mediante gametos.

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

### 2.1.3 Cnidocitos y cnidocistos (nematocistos, espirocistos y pticocistos)

Todas las especies del phylum Cnidaria se caracterizan por la presencia de cnidocitos, células eucariotas especializadas muy complejas. Cada una de estas células presenta un orgánulo altamente complejo, producto secretorio del aparato de Golgi, que consiste de una cápsula rígida con un túbulo invertido dentro de ésta (Özbek *et al.*, 2009). Este orgánulo recibe el nombre de cnida (plural cnidae), o cnidocisto, y puede ser de tres tipos: espirocisto, pticocisto y nematocisto (Weill, 1934; Mariscal *et al.*, 1977). Los espirocistos se encuentran solamente en la clase Anthozoa, la pared de su cápsula es delgada y el túbulo invertido está fuertemente enroscado y carece de espinas. Este tipo de cnidocisto secreta una sustancia higroscópica adherente y es utilizado para inmovilizar a las presas de manera mecánica (Özbek *et al.*, 2009). Por otra parte, 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). A diferencia de los espirocistos y pticocistos, los nematocistos se encuentran en todas las especies del phylum Cnidaria y son utilizados principalmente para capturar a sus presas y como defensa debido a que almacenan una mezcla compleja de toxinas (Tardent, 1995; Özbek *et al.*, 2009).

La primera descripción detallada de los nematocistos fue probablemente llevada a cabo por Chun en 1881. Casi medio siglo después, Weill en 1930 describió y clasificó los diversos tipos de nematocistos, con base a sus características morfológicas. Yanagita (1960) fue el primero en investigar los mecanismos fisiológicos de la descarga de los nematocistos. Posteriormente, el grupo de Tardent en Suiza captura la rápida secuencia de eventos asociados con la descarga de los nematocistos (Holstein y Tardent, 1984; Tardent, 1995). Técnicas de microscopía electrónica de barrido fueron utilizadas por Mariscal (1984) y otros investigadores para revelar las finas estructuras de los nematocistos. El microanálisis de rayos X permitió la medición precisa de las concentraciones de cationes particulares (calcio, potasio, etc) dentro del nematocisto no descargado *in situ* (Tardent *et al.*, 1990). Los procesos de señalización del cnidocito como respuesta a estímulos y las causas que originan la descarga fueron investigados por Anderson y McKay (1987).

Los nematocitos constan de una cápsula que puede ser de forma ovalada o esférica. En la parte apical de esta cápsula se encuentra una abertura cerrada por una pequeña tapa que se conoce como opérculo (Figura 5). Dentro de la cápsula del nematocisto se encuentra un filamento tubular invertido enrollado (Tardent, 1995). Las paredes de la cápsula están constituidas principalmente por una glucoproteína denominada NOWA y un material similar al colágeno denominado minicolágeno (Meier *et al.*, 2007). La cápsula es altamente resistente y soporta una presión intracapsular de 150 bar, originada principalmente por una alta concentración del polianión poli- $\gamma$ -glutamato (Weber, 1990). La superficie del cnidocito posee una estructura sensorial, el cnidocilio, que se encarga de responder a los estímulos de las presas o depredadores y que tiene como



principal función la activación de la descarga del nematocisto. Los nematocistos son inervados y por lo tanto están en comunicación con el resto del organismo, pero también pueden ser individualmente estimulados para la descarga, es decir, son efectores independientes (Turk y Kem, 2009).

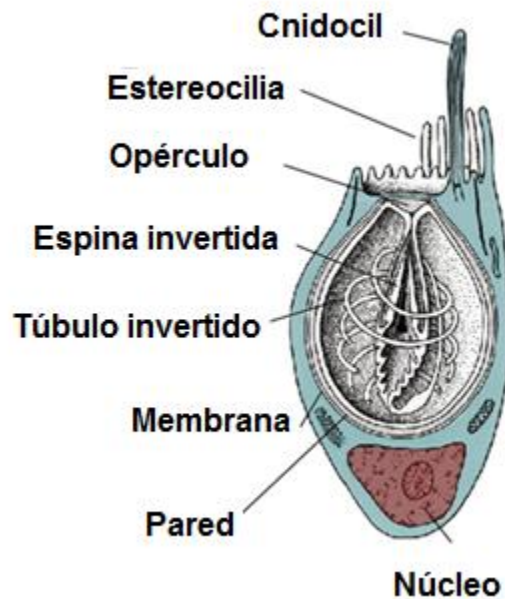


Figura 5. Componentes anatómicos de un cnidocito (modificado de Anderson y Bouchard, 2009)

Bajo un estímulo apropiado, que puede ser químico y/o mecánico (Watson y Hessinger, 1989), la presión osmótica interna del nematocisto se libera. Esto provoca la proyección del túbulo que inicialmente estaba invertido hacia el exterior (Figura 6). De este modo, las toxinas almacenadas 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 de menos de 3 ms, considerándose como uno de los procesos celulares más rápidos (Holstein y Tardent, 1984). Un ejemplo de la descarga de un nematocisto se aprecia en la Figura 6.

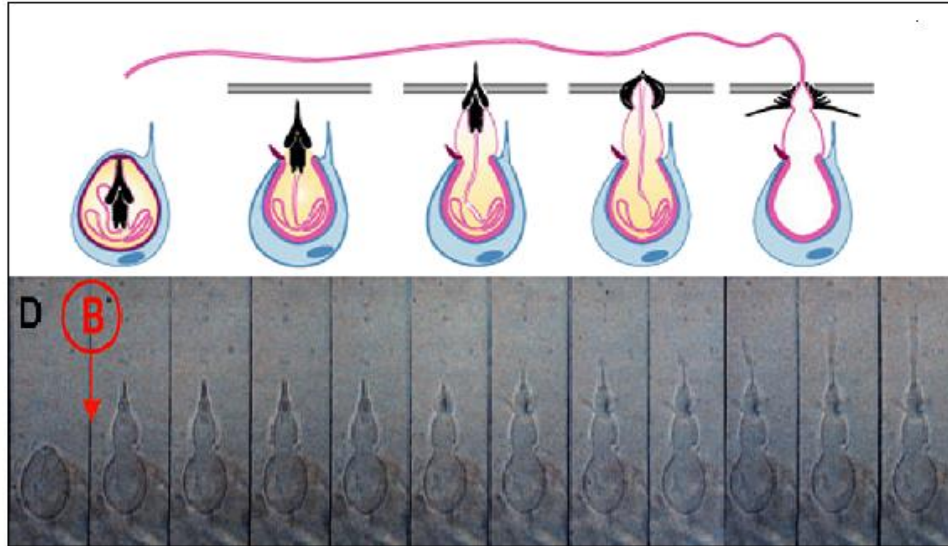


Figura 6. Morfodinámica de la descarga de un nematocito (modificado de Özbek *et al.*, 2009)

Debido a su morfología variable, los nematocistos constituyen el grupo de cnidocistos más diverso. Basándose principalmente en el patrón de espinas del túbulo extendido y en la forma de la cápsula, actualmente se han encontrado hasta 30 tipos de nematocistos (Mariscal *et al.*, 1977; Östman, 2000). Mismos que se han clasificado basándose en los trabajos iniciales de Weill (Weill, 1934), en los que él realizó una descripción detallada de los nematocistos de diferentes cnidarios, mediante observaciones hechas con el microscopio de luz. La descripción morfológica de los nematocistos presenta un valor taxonómico potencial, ya que esta información, en algunas ocasiones, puede ayudar en la clasificación de las especies. Por ejemplo, de los 25 tipos de nematocistos reconocidos (Mariscal *et al.*, 1977), 17 se han encontrado exclusivamente en la clase Hydrozoa, mientras que dos son exclusivos de la clase Anthozoa. En la Figura 7 se muestran los nematocistos encontrados en *M. complanata* y *M. alicornis*. Incluso, se ha llegado a considerar que la morfología y el tamaño de los nematocistos deben de ser esenciales en la descripción taxonómica de los cnidarios (Östman, 2000).

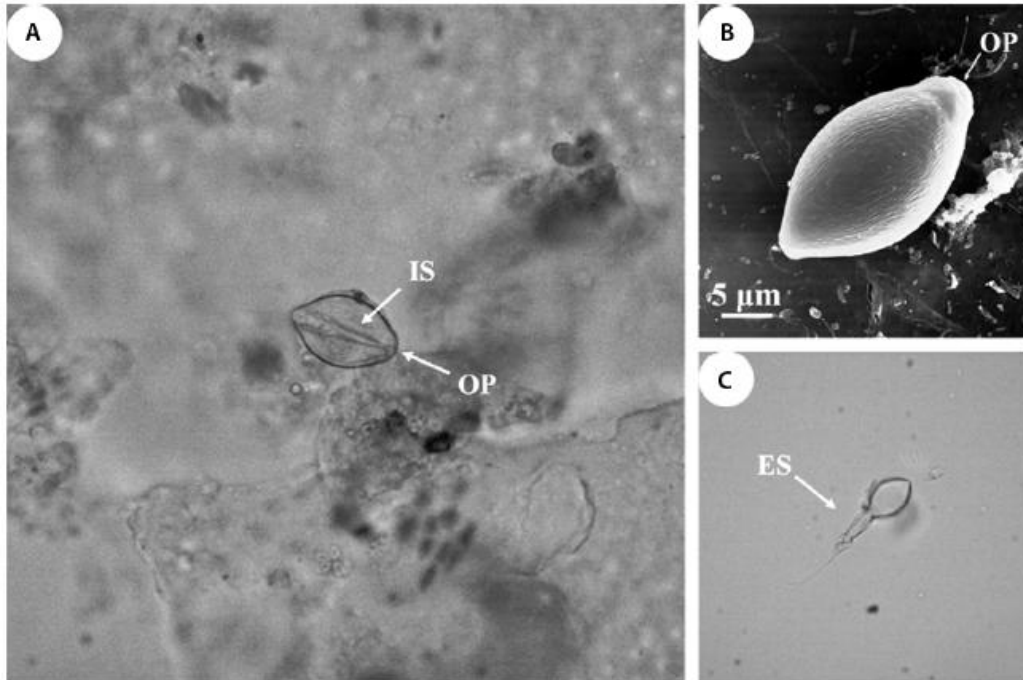


Figura 7. Imágenes de nematocistos del género *Millepora*. (A) Imagen obtenida por microscopía de luz de un estenotele no descargado aislado de *Millepora complanata* que muestra el opérculo (OP) y el eje invertido (IS), 400x de aumento. (B) Imagen obtenida por microscopía de transmisión de un estenotele no descargado aislado de *M. alcornis*. (C) Imagen obtenida por microscopía de luz de un estenotele descargado aislado de *M. complanata*, mostrando el eje evertido (ES), 400x de aumentos (Garcia-Arredondo *et al.*, 2012)

#### 2.1.4 Los organismos marinos como fuente de compuestos bioactivos

En términos de biodiversidad, los ecosistemas marinos son los más ricos y complejos, por ello no es de sorprender que los organismos que los constituyen sean productores de una gran variedad de moléculas con características estructurales únicas y que éstas exhiban una gran diversidad de actividades biológicas (Jain *et al.*, 2008). Por ello, se considera que los organismos invertebrados marinos son una rica fuente de compuestos bioactivos y su potencial tanto farmacéutico, como biotecnológico es de alto interés económico y científico en todo el mundo. Sin embargo, pese a que más de 20 000 compuestos han sido descubiertos a partir de 1960, año en el que comenzó la exploración de

organismos marinos como fuente de compuestos bioactivos, solo pocos han logrado tener una aplicación industrial. Lo que sí ha quedado claro es que los océanos representan el mayor recurso en la tierra para el descubrimiento de nuevos compuestos, esto se comprobó cuando se probó que los compuestos marinos tienen un mayor potencial anti-cancerígeno que los compuestos terrestres (Fenical *et al.*, 2009).

Además del efecto anticancerígeno, las moléculas de origen marino exhiben actividades antivirales (especialmente anti-VIH), antiinflamatorias y antimicrobianas, además de poseer propiedades que les permiten ser empleadas como herramientas moleculares, en la industria cosmética, como nutracéuticos y en productos agroquímicos (Fusetani, 2010)

Blunt y colaboradores (Blunt *et al.*, 2003; Blunt *et al.*, 2004; Blunt *et al.*, 2005; Blunt *et al.*, 2006; Blunt *et al.*, 2007; Blunt *et al.*, 2008; Blunt *et al.*, 2009; Blunt *et al.*, 2010; Blunt *et al.*, 2011, Blunt *et al.*, 2012; Blunt *et al.*, 2013) han proporcionado extensas revisiones sobre el número total de productos naturales marinos descubiertos en los últimos años, los más prometedores son producidos por esponjas del Phylum Porifera, el cual ha sido reconocido como el grupo más interesante de invertebrados marinos para el descubrimiento de nuevos fármacos. Sin embargo, con el crecimiento de la bioprospección, el potencial de otros grupos de invertebrados marinos también ha comenzado a atraer la atención de los investigadores.

El phylum Cnidaria es un grupo de invertebrados marinos grande, diverso y ecológicamente importante, que incluye más de 11 000 especies. Más de 3 000 productos naturales de origen marino se han obtenido a partir de este phylum, principalmente en la última década (Jain *et al.*, 2008).

### 2.1.5 Toxinas de Cnidarios

En los ecosistemas marinos se encuentra una gran cantidad de organismos venenosos, entre los cuales destacan las especies del phylum Cnidaria (Watters, 2005). Incluso se ha mencionado que estos organismos pertenecen al phylum que presenta mayor diversidad de toxinas, aunque no se le ha prestado tanta atención como a serpientes y a otros animales terrestres (Turk y Kem, 2009).

La historia de la identificación de compuestos tóxicos se remonta al fisiólogo francés Richet quien aisló parcialmente dos componentes activos, congestina y talasina de extractos tentaculares de anémonas de mar europeas, principalmente *Actinia equina* y *Anemonia sulcata*. Posteriormente, se encontró que la talasina libera histamina de los mastocitos y, cuando se inyecta en la piel, provoca la liberación de una sustancia de reacción lenta (SRS), que fue más tarde identificada como una prostaglandina (Jacques y Schachter, 1954).

La mayoría de los estudios realizados a la fecha sobre la identificación de las toxinas producidas por los cnidarios indican que la mayor parte de éstas son de naturaleza proteínica (Rogers *et al.*, 1996; Anderluh y Maček, 2002; Nevalainen *et al.*, 2004). Tomando en cuenta los conocimientos generales que se tienen respecto a sus efectos, estas toxinas se pueden clasificar en dos grupos principales: neurotoxinas y citolisinas.

#### 2.1.5.1 Neurotoxinas

En los venenos de cnidarios, principalmente en los de las anémonas (clase Anthozoa, subclase Hexacorallia, orden Actinaria), se han encontrado una gran diversidad de neurotoxinas, las cuales presentan una alta afinidad por canales iónicos de membranas excitables, principalmente canales de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Rogers *et al.*, 1996).

Hasta el momento se conoce la estructura primaria de una gran cantidad de toxinas de anémonas que actúan sobre canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje. Basándose en su secuencia de aminoácidos, las neurotoxinas de anémonas que actúan sobre estos canales se agrupan en tres tipos principales. Tanto el tipo 1, que representa el grupo más numeroso, como el tipo 2 están constituidos por péptidos de 47 a 49 aminoácidos con tres enlaces disulfuro. En tanto que, el tipo 3 está constituido por péptidos más cortos, que constan de 27 a 32 residuos de aminoácidos (Oliveira *et al.*, 2004). El otro grupo importante de neurotoxinas de anémonas está integrado por toxinas que actúan sobre canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje. Estas toxinas también se agrupan en tres tipos principales, basándose en diferencias funcionales y estructurales. El tipo 1 lo constituyen toxinas de 35 a 37 residuos de aminoácidos que bloquean los canales Kv1, presentan dos hélices cercanas y tres puentes disulfuro. El tipo 2 está representado por toxinas de 58 a 59 residuos de aminoácidos que también bloquean a los canales Kv1, aunque con menor potencia que las del tipo 1. Curiosamente, las toxinas de anémona del tipo 2 que actúan sobre canales de K<sup>+</sup> presentan homología secuencial con las dendrotoxinas aisladas de venenos de serpiente (Schweitz *et al.*, 1995). Finalmente, en el tipo 3 se encuentran diversas toxinas que bloquean selectivamente los canales Kv3 (Messerli y Greenberg, 2006).

#### 2.1.5.2 Citolisinas

El objetivo principal de estas toxinas es provocar la destrucción de determinados tipos celulares, esto lo hacen generalmente interaccionando con las membranas celulares. Muchas de las citolisinas que se han aislado de venenos de cnidarios actúan mediante la formación de poros en las membranas.

Las anémonas representan un ejemplo claro de cnidarios que producen este tipo de toxinas, por ejemplo, en *Actinia equina* se han encontrado al menos 5 isoformas de proteínas formadoras de poro denominadas equinatoxinas (Anderluh

y Maček, 2002). Además de las equinatoxinas, se encuentran las esticolisinas I a IV, aisladas de *Stichodactyla helianthus* (Kem y Dunn, 1988) y las magnificalisinas I a III, aisladas de *Heteractis magnifica* (Khoo *et al.*, 1993).

Las equinatoxinas, esticolisinas y magnificalisinas constituyen la familia de las actinoporinas, las cuales tienen la característica de ser monoméricas, no poseen residuos de cisteína y presentan pesos moleculares de aproximadamente 20 kDa. Estas toxinas son hidrosolubles, en presencia de lípidos membranales oligomerizan de tres o cuatro moléculas para formar un poro selectivo a cationes de aproximadamente 2 nm de diámetro.

#### 2.1.5.2.1 Fosfolipasas A2 (PLA2)

Existe otro mecanismo de acción de las citolisinas, el cual involucra la degradación enzimática de lípidos membranales específicos (Anderluh y Maček, 2002). Las principales toxinas de este tipo son aquellas con actividad de fosfolipasa A2 (PLA2). Estas enzimas hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos. Es importante diferenciar a las PLA2 citosólicas (cPLA2) de las de secreción (sPLA2). Las primeras desempeñan un papel importante dentro de las células, mediante la producción de diversos compuestos bioactivos endógenos, activando la vía del ácido araquidónico (Diaz y Arm, 2003). Por otro lado, las sPLA2 se encuentran en venenos de diversos organismos, así como en otras secreciones como la saliva y el jugo pancreático (Nevalainen *et al.*, 2004). En el phylum Cnidaria, se han encontrado altos niveles de actividad de sPLA2 en los venenos de diversas especies (Nevalainen *et al.*, 2004) llegando al dato de: 735 U/g proteína en organismos de la clase Hydrozoa (Six y Dennis, 2000). Estas enzimas se caracterizan por tener un tamaño que va de 14 a 19 kDa y de 5 a 8 puentes disulfuro, así como la presencia de histidina en el sitio catalítico y ser dependientes de la presencia del ion calcio (Burke y Dennis, 2009).

En 2004 Radwan y Aboul-Dahab reportaron la actividad de PLA2 y hemolítica de una fracción rica en proteínas de 30 a 34 KDa de *Millepora platyphylla* y nombraron Milleporina-1 a una proteína de 32.5 KDa que presentaba la mayor actividad enzimática. La literatura reporta la clonación de sPLA2 de las anemonas marinas *Adamsia cariniopados* (Talvinen y Nevalainen, 2002) y *Urticina crassicornis* (Razpotnik *et al.*, 2007) y posteriormente en 2010 se reportó la secuenciación de estas enzimas que presentaron un 70% de homología con una PLA2 putativa identificada del genoma de *Nematostella vectensis* (Figura 8). Es importante mencionar que dichas enzimas mostraron actividad de PLA2 y de neurotoxina (Razpotnik *et al.*, 2010). Muchas veces, este tipo de toxinas actúan en conjunto con otras citolisinas para inducir la lisis de las células. Por ejemplo, en el veneno de la anémona *Aiptasia pallida* se han encontrado dos isoformas de PLA2 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), las cuales requieren la presencia de un tercer componente para ejercer un efecto hemolítico. Este tercer componente presenta actividad hemolítica al evaluarse en ausencia de las dos isoformas de PLA2. Además, se ha encontrado que algunas de estas citolisinas requieren de cationes divalentes, como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$ , para alcanzar su actividad óptima, tal es el caso de la  $\beta$  PLA2 de *A. pallida* (Grotendorst y Hessinger, 2000). En 2007 se reportó la secuenciación del genoma de *Nematostella vectensis* (Cnidaria, Anthozoa) y en 2008 un estudio reportó la identificación de 22 PLA2 putativas encontradas en dicho genoma, estas PLA2 mostraron 40-50% de identidad con cPLA2 intracelulares, incluidas PLA2 de humano (Nevalainen, 2008).





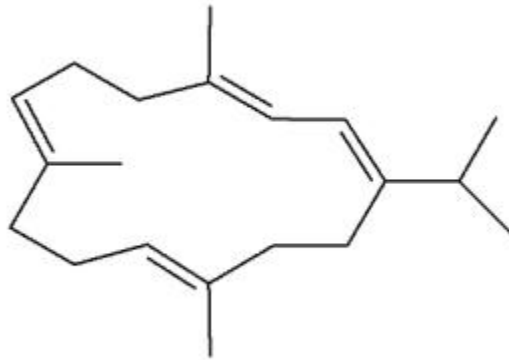


Figura 9. Estructura básica de los cembranoides

El metabolito secundario con efectos letales de mayor potencia que se ha encontrado en los cnidarios es la palitoxina, un poliéter de estructura compleja (Figura 10) que se une específicamente a la bomba Na, K-ATPasa. Esta toxina convierte a la bomba en un canal iónico, por lo que produce un eflujo de  $K^+$  y un influjo de  $Na^+$ , dando como resultado la despolarización de la membrana (Hoffmann *et al.*, 2008). La palitoxina afecta todas las células sobre las que se ha estudiado, por lo que se le han encontrado diversas actividades biológicas (Wu, 2009).

Esta toxina se encuentra principalmente en corales blandos del género *Palythoa*. Se purificó por primera vez del coral *P. toxica* a partir de un extracto etanólico acuoso (7:3), utilizando cromatografía en fase reversa (Moore y Scheuer, 1971). También se ha encontrado en diversas especies de la subclase Octocorallia, en la anémona *Radianthus macrodactylus* (Mahnir *et al.*, 1992). Además de los cnidarios, la palitoxina se ha encontrado en otras especies marinas, como en los dinoflagelados de forma libre pertenecientes al género *Ostreopsis*, en gusanos poliquetos, cangrejos y peces (Wu, 2009).

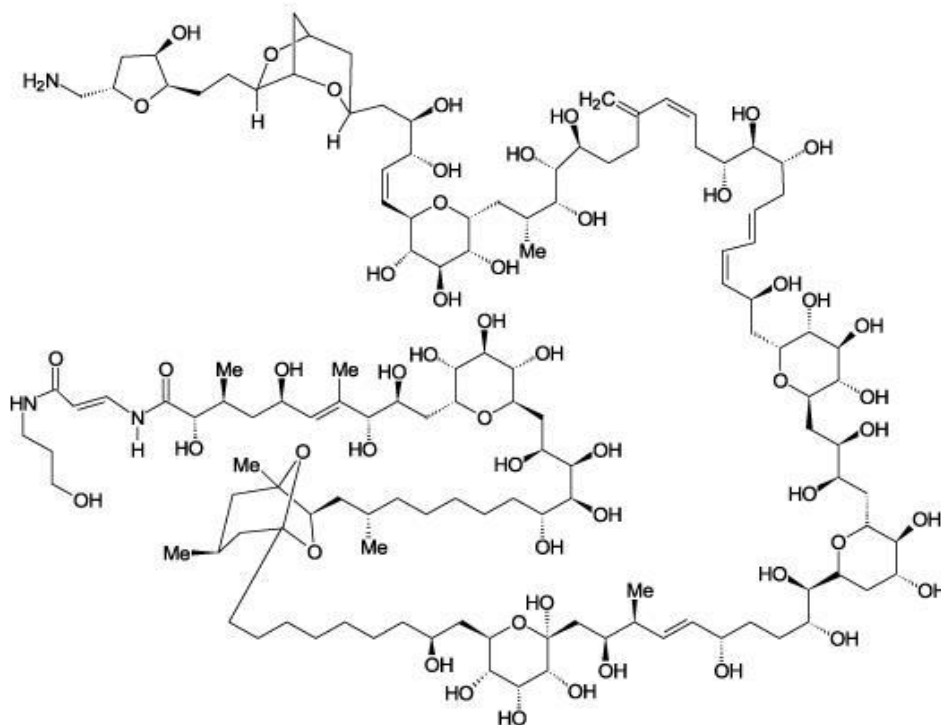




Figura 10. Estructura química de la palitoxina

En el año de 2012 se reportó un metabolito secundario novedoso con actividad neuroprotectora en neuronas humanas dopaminérgicas, en un modelo de ensayo de enfermedad de Parkinson, se trata de una sulfona proveniente de *Cladiella australis* del sur de Taiwan. También se encontraron dos nuevos girosanoles de *S. gyrosa*, los cuales exhibieron actividad antiviral contra citomegalovirus y supresión de la expresión de COX-2 en macrófagos (Blunt *et al.*, 2012)

En el año 2013 se reportó un incremento pronunciado en el número de nuevos metabolitos secundarios identificados de este phylum, entre los que se encuentran alcaloides, sesquiterpenos, eicosanoides, clovanos, flavalinas, alfa-tocoferoles, cembranoides, diterpenos, triangulenos, lactonas, briaranos. Dichos compuestos mostraron una amplia gama de actividades biológicas como citotoxicidad por la inducción de apoptosis, actividad antiviral, inhibición del crecimiento celular, actividad antifúngica, inhibición de la producción de óxido nítrico e inhibición de la acumulación de iNOS y COX-2 en macrófagos estimulados (Blunt *et al.*, 2013).

## 2.2 Los “corales de fuego”

<p>Taxonomía</p> <p>Reino: Animalia</p> <p>Phylum: Cnidaria</p> <p>Clase: Hydrozoa</p> <p>Subclase: Hydroidolina</p> <p>Orden: Anthoathecata</p> <p>Suborden: Capitata</p> <p>Familia: Milleporidae</p> <p>Género: <i>Millepora</i></p> <p>Especie: <i>Millepora complanata</i></p>	
	<p>Taxonomía</p> <p>Reino: Animalia</p> <p>Phylum: Cnidaria</p> <p>Clase: Hydrozoa</p> <p>Subclase: Hydroidolina</p> <p>Orden: Anthoathecata</p> <p>Suborden: Capitata</p> <p>Familia: Milleporidae</p> <p>Género: <i>Millepora</i></p> <p>Especie: <i>Millepora alcicornis</i></p>

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

Las especies de este género forman colonias de pólipos que producen exoesqueletos de carbonato de calcio. Actualmente se conocen 13 especies

(Schuchert, 2009). Estos hidrocorales producen esqueletos morfológicamente complejos con diversas formas de crecimiento que varían de finas cúpulas de ramificación a robustas estructuras laminares, como se muestra en la Figura 11. Las características morfológicas de los organismos del género *Millepora* se ven directamente afectadas por el ambiente, de tal manera que las especies con formas sólidas son más comunes en zonas de arrecifes en donde existe movimiento turbulento del agua, mientras que las formas delgadas y ramificadas suelen habitar en aguas tranquilas (Davies y Montaggioni, 1985).

Existen semejanzas biológicas importantes entre las especies del género *Millepora* y los corales escleractinios. Por ejemplo, ambos grupos presentan un tipo de alimentación heterotrófica, además de poseer nutrición autótrofa por su relación simbiótica con algas fotosintéticas del género *Symbiodinium*. Adicionalmente, sus procesos de reproducción son similares, ya que pueden reproducirse asexual y sexualmente (Lewis, 2006).

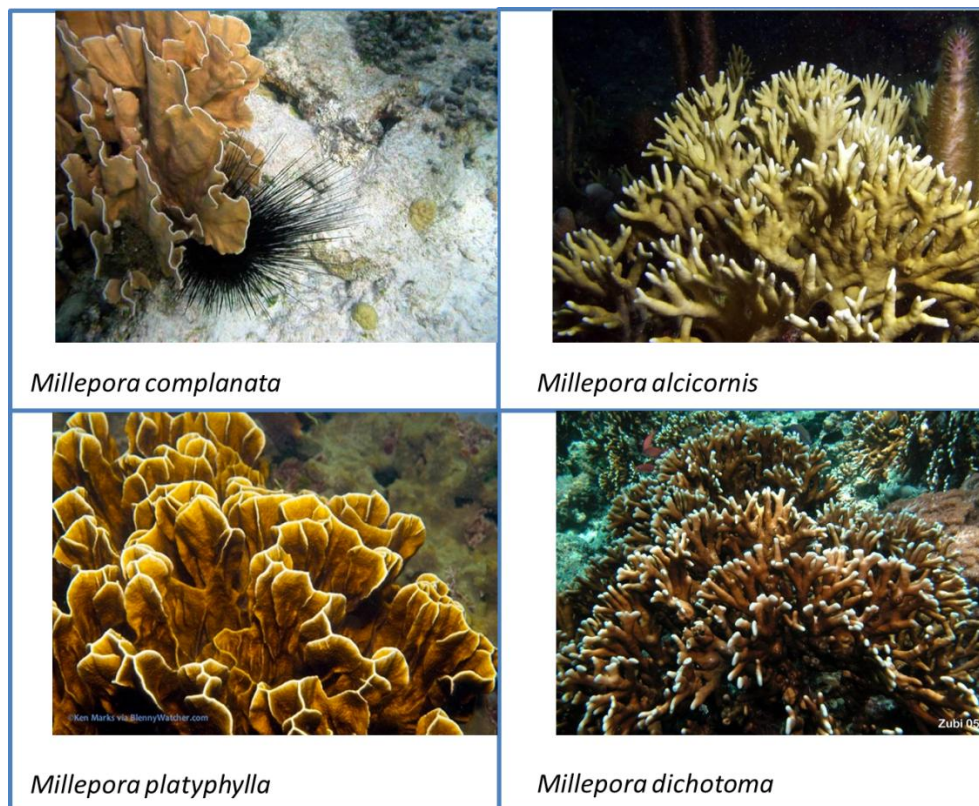


Figura 11. Ejemplos de especies del género *Millepora*

### 2.2.1 Simbiosis *Millepora* - *Symbiodinium*

Los arrecifes de coral son únicos en mantener una simbiosis mutualista entre animales multicelulares y un protista unicelular dinoflagelado del género *Symbiodinium* (zooxantelas). Estos pequeños protistas (8-10 micras en diámetro) parecidos a las plantas viven dentro de las células del coral y llevan a cabo la fotosíntesis y en lugar de retener los azúcares y aminoácidos que resultan de esta actividad para su propio crecimiento y reproducción, *Symbiodinium* exporta más del 95% de su producción fotosintética al coral. A cambio, *Symbiodinium* tiene acceso directo a los productos de desecho del metabolismo de los corales, que faltan en las aguas circundantes (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2009). En condiciones normales, las densidades de población de simbiosis oscilan entre 0,5 a  $5 \times 10^6$  células  $\text{cm}^2$  de superficie acogida (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2009)

Las zooxantelas proveen a sus huéspedes oxígeno molecular y la mayoría de su carbono fijado fotosintéticamente a cambio de nitrógeno inorgánico, fósforo y carbono, además de un medio ambiente iluminado que constituye un refugio contra la herbivoría, como se muestra en la Figura 12 (Venn *et al.*, 2008; Yellowless *et al.*, 2008).

Las células de las zooxantelas presentan una coloración café dorada debido a la presencia de pigmentos fotosintéticos en sus cloroplastos, como se observa en el Figura 13. Dado que los corales e hidrocorales tienen la capacidad de almacenar millones de zooxantelas por centímetro cuadrado en sus tejidos, ellos también presentan una coloración semejante. Se realizó un estudio para identificar las especies de simbiosis presentes en 86 especies de corales de la Gran Barrera de Coral, los resultados mostraron 23 distintos tipos de *Symbiodinium*. Muchos anfitriones pueden tener 2 o más variedades genéticas de *Symbiodinium* en sus tejidos (LaJeunesse *et al.*, 2008).



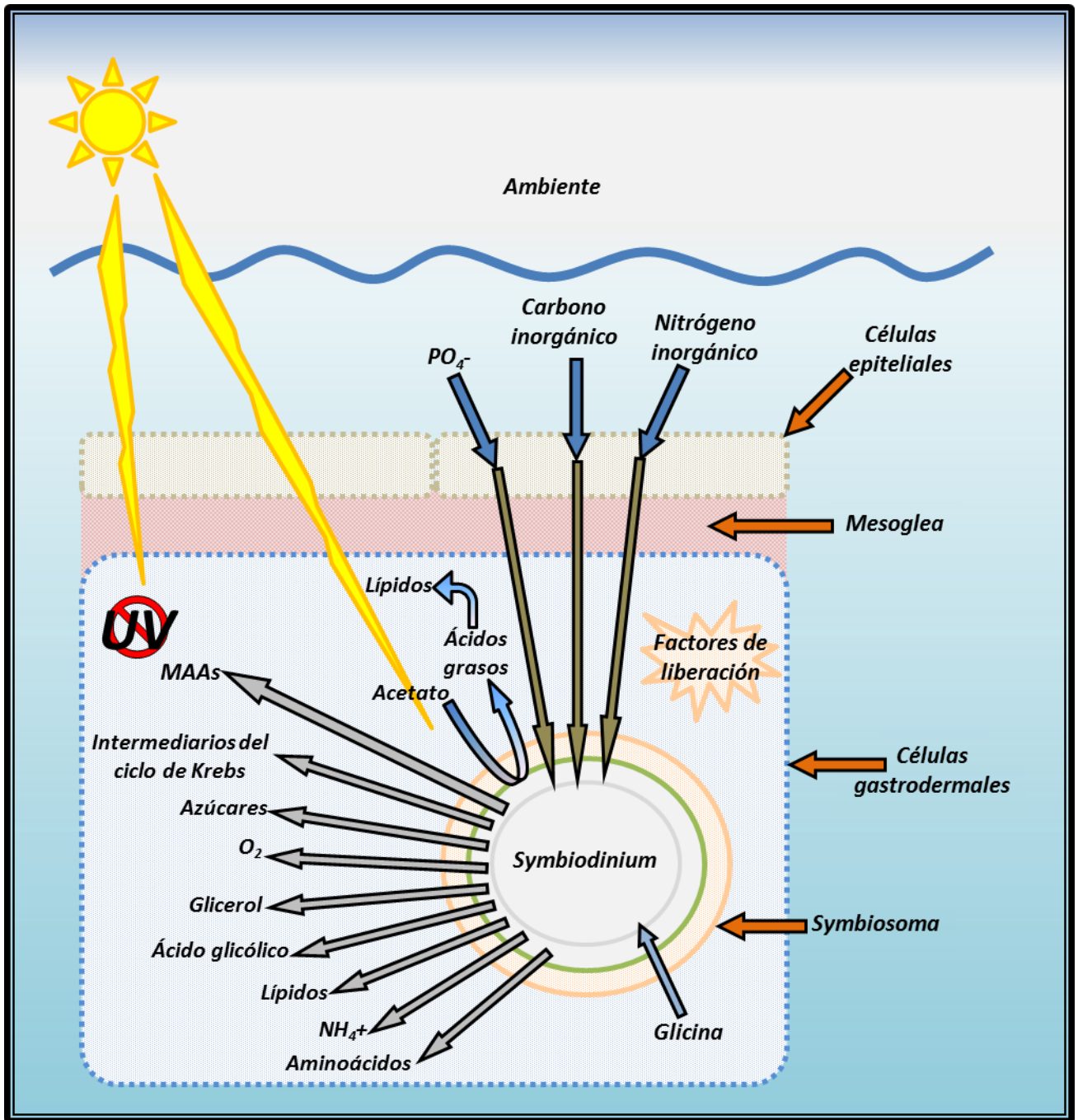


Figura 12. Modelo de simbiosis zooxantela-coral (modificado de Gordon y Leggat, 2010)

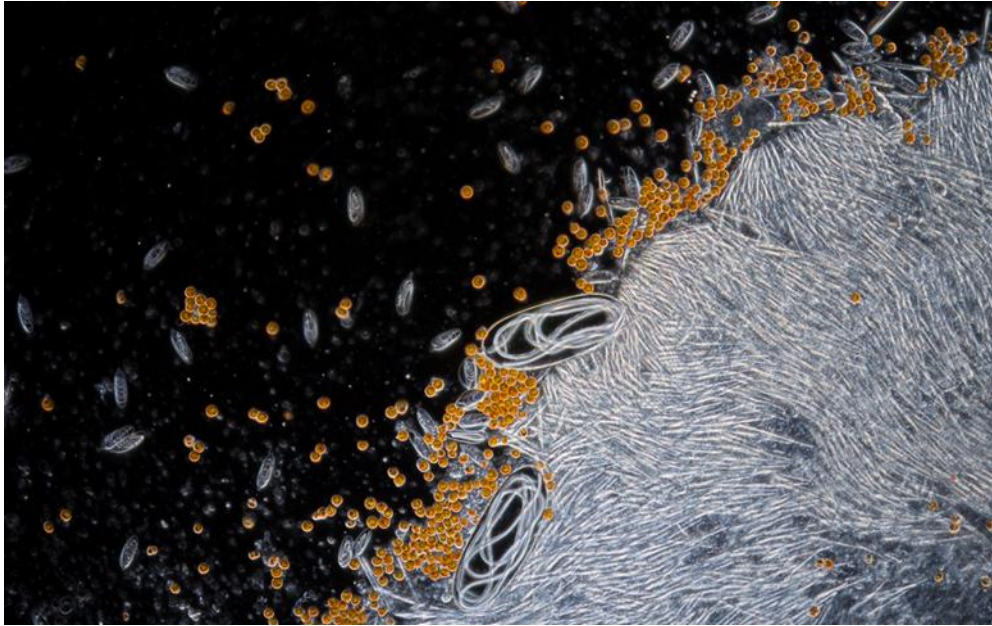


Figura 13. Zooxantelas mostradas en su color natural. Pequeños y grandes nematocitos también pueden observarse, algunos embebidos en el filamento mesenterial.

### 2.2.2 Características morfológicas de las especies del género *Millepora*

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

- La superficie del exoesqueleto calcáreo de las especies de *Millepora* se encuentra perforada por múltiples poros microscópicos (0.1 a 0.3 mm de diámetro), de ahí la nomenclatura científica del género (*Millepora* - mil poros) (Veron, 1986; Cartwright y Collins, 2007).
- La morfología de los pólipos de las especies de *Millepora* está estrechamente relacionada con la de las hidras, en las que la cavidad gastrovascular no está dividida por septos internos. Los hidrocorales del género *Millepora* tienen un complejo nivel de organización de colonias formadas por zooides polimórficos, que incluyen: gastrozoides, dactylozoides y gonóforos. El primer grupo comprende pólipos cortos y robustos que llevan a cabo una función digestiva y poseen una cavidad bucal rodeada de cuatro a siete tentáculos cortos. Los dactylozoides, que



desempeñan un papel defensivo, son pólipos largos y delgados que poseen tentáculos dispersos y carecen de cavidad oral. Por otro lado, los gonóforos son pólipos reproductivos que surgen a partir de un sistema de canales internos de ramificación de una forma arborescente (Schuchert, 2009).

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

### 2.2.3 Efectos tóxicos locales y sistémicos provocados por las toxinas de las especies de *Millepora* en los seres humanos

Es un hecho bien documentado que los nematocistos de las especies del género *Millepora* pueden perforar la piel humana para inyectar sus toxinas y producir lesiones graves en la piel. Por esta razón, estos organismos se conocen comúnmente como "corales de fuego". Los síntomas locales habituales incluyen: dolor intenso, ardor, eritema, pápulas, vesículas pustulosas, hemorragias e incluso lesiones ulcero-necrotizantes (Bianchini *et al.*, 1988; Sagi *et al.*, 1987). Los síntomas sistémicos comprenden náuseas, vómitos, dolor abdominal, dificultad respiratoria, y fiebre (Bianchini *et al.*, 1988; Moats, 1992). En la actualidad, no existe un tratamiento adecuado para curar las lesiones graves de la piel humana causadas por los "corales de fuego". Por lo general, el dolor disminuye lentamente y la lesión local, que se mantiene durante un período de 1-2 semanas, se cura poco a poco. Sin embargo, existen casos reportados de toxicidad sistémica provocada por especies de este género en humanos. Por ejemplo, se documentó

un caso de neuropatía torácica asociada con el contacto con un "coral de fuego" (Moats, 1992). Por otra parte, se reportó un caso clínico de toxicidad sistémica debido al contacto con *Millepora sp.*, la cual provocó síndrome nefrótico, insuficiencia renal aguda y edema pulmonar (Prasad *et al.*, 2006).

#### 2.2.4 Estudios bioquímicos y toxicológicos realizados sobre especies del género *Millepora*

Los primeros estudios realizados sobre las toxinas sintetizadas por las especies del género *Millepora* datan de hace más de cuarenta años. En dichos estudios se encontró que los extractos crudos de *M. tenera* y *M. alcicornis* indujeron efectos hemolíticos y dermonecróticos, además de ser muy tóxicos en ratones, cuando se administraron por vía intravenosa, causando disnea, convulsiones y muerte. Las dosis letales medias (DL50) calculadas para los extractos de *M. alcicornis* y *M. tenera* fueron 550 y 330 mg proteína/kg de peso corporal, respectivamente (Middlebrook *et al.*, 1971; Wittle *et al.*, 1971; Wittle *et al.*, 1974). Las actividades hemolíticas, dermonecróticas y letales de estos extractos se bloquearon completamente después de una incubación a 60 ° C por 15 min, lo cual sugiere que las toxinas responsables de los efectos tóxicos eran proteínas termolábiles.

Posteriormente, el extracto de *M. alcicornis* fue sometido a sucesivas cromatografías en DEAE-celulosa y Sephadex G-100, lo cual permitió purificar parcialmente una proteína con un peso molecular aproximado de 100 000 Da y una actividad tóxica 14 veces mayor que la del extracto original (Wittle *et al.*, 1971). Por otra parte, el fraccionamiento cromatográfico en DEAE-celulosa del extracto de *M. tenera* permitió purificar parcialmente una fracción proteica 8 veces más activa que el extracto original (Middlebrook *et al.*, 1971). Unos años más tarde, se reportó un estudio en donde se encontró que las toxinas que se purificaron parcialmente a partir de los extractos de ambos hidrocorales también se encontraban presentes en sus nematocistos (Wittle *et al.*, 1974). También se encontró que el extracto de *M. tenera* presentaba actividad hemolítica sobre

eritrocitos de rata e inducía dermonecrosis en ratones y conejos inyectados con el extracto por vía intradérmica (Wittle *et al.*, 1974).

En un estudio realizado sobre *M. dichotoma* y *M. platyphylla*, hidrocorales comunes en las costas del Mar Rojo, se encontró que los extractos de los nematocistos de estos organismos presentaron toxicidad en ratones al inyectarlos por vía intravenosa. El extracto de *M. dichotoma* presentó una DL50 de 0.51 µg de proteína/g de peso corporal, en tanto que la DL50 del extracto de *M. platyphylla* fue de 0.21 µg de proteína/g de peso corporal. Además, se encontró que ambos extractos presentaron actividad dermonecrótica y vasopermeable cuando se inyectaron en ratones, por vía subcutánea, a dosis de 1 µg de proteína/g de peso corporal. También se encontró que los dos extractos presentaron actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos a concentraciones de 20 a 200 µg de proteína/ml. La actividad hemolítica de ambos extractos se inhibió parcialmente por la presencia de fostatidilcolina, fosfatidilserina o dihidrocolesterol, siendo más notable la actividad inhibitoria de este último. Además, en ambos extractos se encontró que las fracciones obtenidas mediante cromatografía de filtración en gel, en las que se concentró la actividad hemolítica, también presentaron letalidad en ratones (Radwan *et al.*, 2004).

En otro estudio subsiguiente, se realizó un fraccionamiento del extracto de los nematocistos de *M. platyphylla* mediante cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. De esta manera, se encontró una fracción rica en proteínas, con pesos moleculares de 30 a 34 kDa, con actividad hemolítica sobre eritrocitos de humano y actividad de PLA2. El análisis subsecuente de esta fracción, mediante cromatografía de intercambio iónico, permitió detectar una proteína con un peso molecular de 32.5 kDa como componente mayoritario, que se denominó Milleporina-1. Esta fracción presentó actividades hemolítica y de fosfolipasa A2 (Radwan *et al.*, 2004).

En un estudio reciente, se purificó una citotoxina de 18 kDa a partir de un extracto de nematocistos de *M. dichotoma*. Esta toxina, denominada MCTx-1, presentó toxicidad sobre células leucémicas de ratón L1210 (CE50 = 79 ng/ml), indujo hemaglutinación en una suspensión de 0.8 % de eritrocitos de oveja (0.2 µg de proteína/ml) y fue letal al administrarse en cangrejos (DL50 = 106 µg/kg). En ese estudio, el extracto de los nematocistos se fraccionó mediante cromatografía de exclusión, usando una columna de Sephadex-200. De esta manera, se obtuvo una fracción citotóxica que no presentó actividad de PLA2, a partir de la cual se purificó la MCTx-1 (Iguchi *et al.*, 2008).

Los primeros estudios realizados por nuestro grupo de trabajo sobre *M. complanata*, un hidrocoral que se encuentra comúnmente en los arrecifes del Caribe Mexicano, demostraron que el extracto acuoso de este cnidario produce una estimulación en las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo y en el tono del músculo liso arterial de rata y además, presenta actividad hemolítica y de PLA2 (Rojas *et al.*, 2002). A partir del fraccionamiento del extracto de *M. complanata*, mediante cromatografía en fase reversa, se obtuvieron dos fracciones cromatográficas con efecto vasoconstrictor significativo. Una de estas fracciones con actividad vasoconstrictora contenía como componente mayoritario una proteína de aproximadamente 15 kDa, mientras que la otra fracción vasoconstrictora contenía una proteína de 17 kDa como componente mayoritario. Además, se obtuvo una fracción hemolítica, cuyo componente mayoritario era una proteína de 30 kDa (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2007)

Por otra parte, nuestro grupo de trabajo comparó los efectos vasoconstrictor, hemolítico, y la actividad de PLA2 de extractos acuosos crudos preparados a partir de muestras normales y blanqueadas de dos hidrocorales recolectados en el Caribe mexicano *M. alicornis* y *M. complanata*. El análisis electroforético reveló algunas diferencias entre los perfiles proteicos de los extractos preparados a partir de muestras normales y muestras blanqueadas. En dicho estudio se encontró que el blanqueamiento disminuyó, pero no suprimió, los efectos hemolítico y de PLA2

inducidos por los extractos de *M. complanata*. Tampoco se observó ninguna modificación en la actividad de PLA2 del extracto de *M. alcicornis*, ni en el efecto vasoconstrictor inducido por los extractos de ambas especies. Los resultados obtenidos sugieren que los componentes responsables de los efectos tóxicos y farmacológicos provienen del cnidario y no de sus zooxantelas simbiotes. (García *et al.*, 2011)

#### 2.2.5 Blanqueamiento de los “corales de fuego”

Los arrecifes de coral juegan un papel de importancia crítica, a pesar de constituir solo el 0.1% del océano, como fuente de ingresos y recursos a través del turismo, los materiales de construcción y la protección del litoral. Así mismo, los arrecifes también poseen un significativo valor cultural y espiritual para las comunidades costeras. Adicionalmente, estos ecosistemas marinos representan una fuente muy rica de compuestos con actividades biológicas y un gran potencial farmacéutico y biotecnológico (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2009; Veron *et al.*, 2009).

En especial las especies del género *Millepora* representan los segundos organismos formadores de arrecifes más importantes, después de los corales duros escleractinios de la clase Anthozoa, por lo que desempeñan un papel muy importante en la ecología marina (Lewis, 1989). Particularmente, las especies *M. complanata* y *M. alcicornis* se encuentran ampliamente distribuidas en arrecifes de coral del Caribe mexicano.

Los arrecifes de coral de todo el mundo se encuentran amenazados por varios impactos ambientales que los pueden dañar seriamente y degradarlos, entre estos impactos se encuentra el evento denominado “blanqueamiento”, en el cual, los tejidos de los corales e hidrocorales pierden sus zooxantelas fotosintéticas (algas dinoflageladas del género *Symbiodinium*) o bien pierden los pigmentos de las zooxantelas (Ali, 2009), con lo cual resalta el color blanco del exoesqueleto de carbonato de calcio (Lesser, 2006).

Recientemente, se ha descrito al blanqueamiento como un efecto visual del estrés, que se presenta cuando se rompe la homeostasis en la simbiosis entre zooxantelas y corales, este se describe en la Figura 14. Cuando se da ésta disfunción, las zooxantelas sufren un desequilibrio metabólico y existen dos mecanismos para controlarlo: disminución de la clorofila dentro de las zoxantellas y disminución de la biomasa relativa de éstas (Obura, 2009).

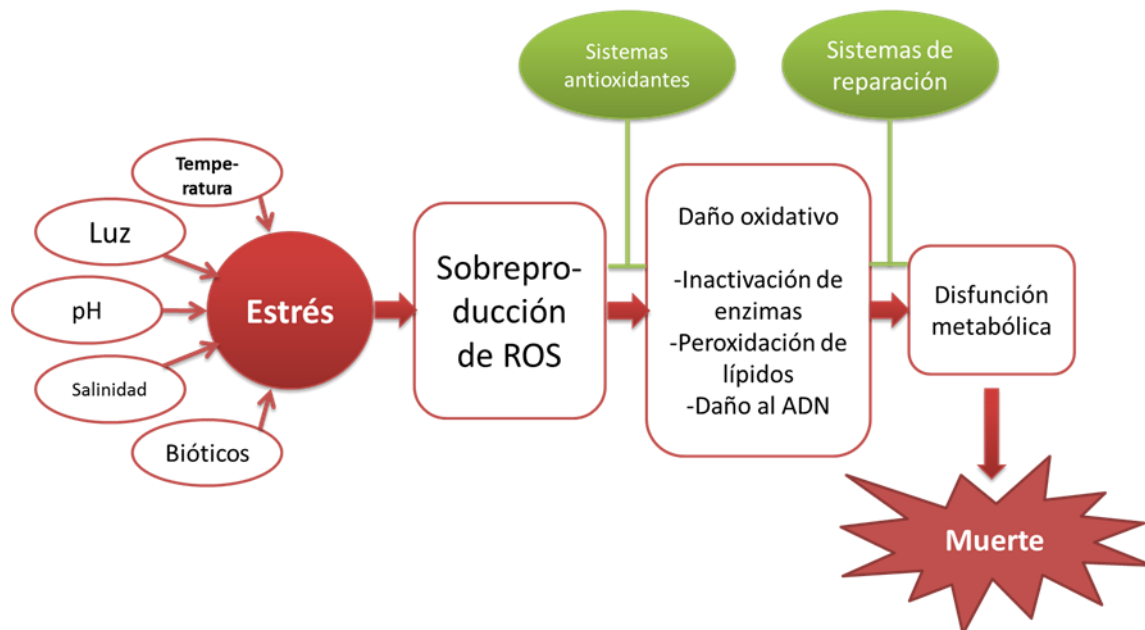


Figura 14. Descripción gráfica del blanqueamiento (modificado de Baird *et al.*, 2009)

El blanqueamiento se debe a que los hábitats marinos costeros en particular están expuestos y parecen ser susceptibles a una amplia gama de alteraciones, incluyendo tormentas, precipitación y escorrentía terrestre, enfermedades, brotes de equinodermos depredadores (Wilson, *et al.*, 2006), contaminación, estrés antropogénico, erosión, sedimentación, variación de la salinidad, infecciones bacterianas, exposición durante la marea baja, radiación solar (incluida la radiación ultravioleta) y la elevación de la temperatura de la superficie del mar debido al cambio climático global, que es el más importante factor entre todos (Ali, 2009; Hume *et al.*, 2013).

Se ha documentado ampliamente que el blanqueamiento es perjudicial para los arrecifes de coral y altera, de manera significativa, los procesos biológicos y ecológicos que mantienen las comunidades de arrecifes (Lesser, 2006). Se estima que actualmente, 30% de los arrecifes han sufrido daños graves y más del 50% se puede perder en las próximas dos décadas, según predicciones climáticas (Hume *et al.*, 2013), resulta alarmante que 32.8% de todas las especies de corales formadores de arrecifes que contienen algas dinoflageladas están consideradas en peligro de extinción (Huang, 2012).

Antes de 1979, no hay informes formales de blanqueamiento masivo de corales en la literatura científica, sin embargo desde esa fecha, el número de informes ha aumentado de forma espectacular. (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2009). Un fenómeno importante de blanqueamiento de hidrocorales fue observado por primera vez en 1982-1983 durante el fenómeno denominado “Oscilación del Sur- El Niño”, lo que provocó una alta mortalidad en las colonias de *M. platyphylla* de los arrecifes de coral del Pacífico oriental (Weerdt y Glynn, 1991). Aparentemente, la recuperación de los hidrocorales es dependiente de la temperatura y la duración del evento de calentamiento del océano. En 1997, algunas colonias de *M. alcyon* ubicadas en la laguna del arrecife de Puerto Morelos (Caribe mexicano), que fueron blanqueados por un aumento de 1.5 ° C en la temperatura promedio del agua de mar, se recuperaron completamente del blanqueamiento después de varias semanas (Iglesias-Prieto *et al.*, 2003). Sin embargo, las mismas colonias sufrieron un daño irreversible cuando la temperatura del agua de mar se elevó hasta 3 ° C por encima de la media (Banaszak *et al.*, 2003).

La Red Mundial de Vigilancia de Arrecifes Coralinos, GCRMN (con el apoyo de más de 30 países, la IOC-UNESCO, UNEP, IUCN y el Banco Mundial) ha elaborado una serie de informes anuales sobre el estado de los arrecifes de coral. Los números de 1997 a 1998 (Tabla 1) indican la magnitud de la mortalidad que puede ocurrir en un ciclo global de blanqueamiento masivo de corales. Antes de 1998, las encuestas GCRMN reportaron una pérdida de 9,5% de los corales que viven en seis regiones. Durante 1998, uno de los años más cálidos registrados, las

regiones perdieron un promedio de 17.7% de sus corales constructores de arrecifes vivos (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2009).

Tabla 1. Resumen de las estimaciones netas de la desaparición de los corales formadores de arrecifes.

<b>Ubicación</b>	<b>% destruido antes de 1998</b>	<b>% destruido en 1998</b>
<b>Región arábiga</b>	2	33
<b>Gran océano Índico</b>	13	46
<b>Australia, Papua Nueva Guinea</b>	1	3
<b>Sudeste y este de Asia</b>	16	18
<b>Gran océano Pacífico</b>	4	5
<b>Atlántico, Caribe</b>	21	1
<b>Promedio (región)</b>	9.5	17.7

Varios estudios han investigado el comportamiento pasado de los arrecifes y han reportado datos convincentes que indican que las muertes masivas de la década de 1990 no se habían visto por lo menos durante los últimos 3 000 años. *Acropora cervicornis*, por ejemplo, era una especie dominante en la plataforma central de Belice hasta hace 20 años. Sin embargo, en la década de 1980, el blanqueamiento resultó en casi la mortalidad total de *A. cervicornis* (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2009).

Además, el número de regiones en las que se ha reportado un blanqueamiento masivo de corales se ha incrementado sustancialmente en los últimos años, como se observa en la Figura 15 (Marshall y Schuttenberg, 2006).



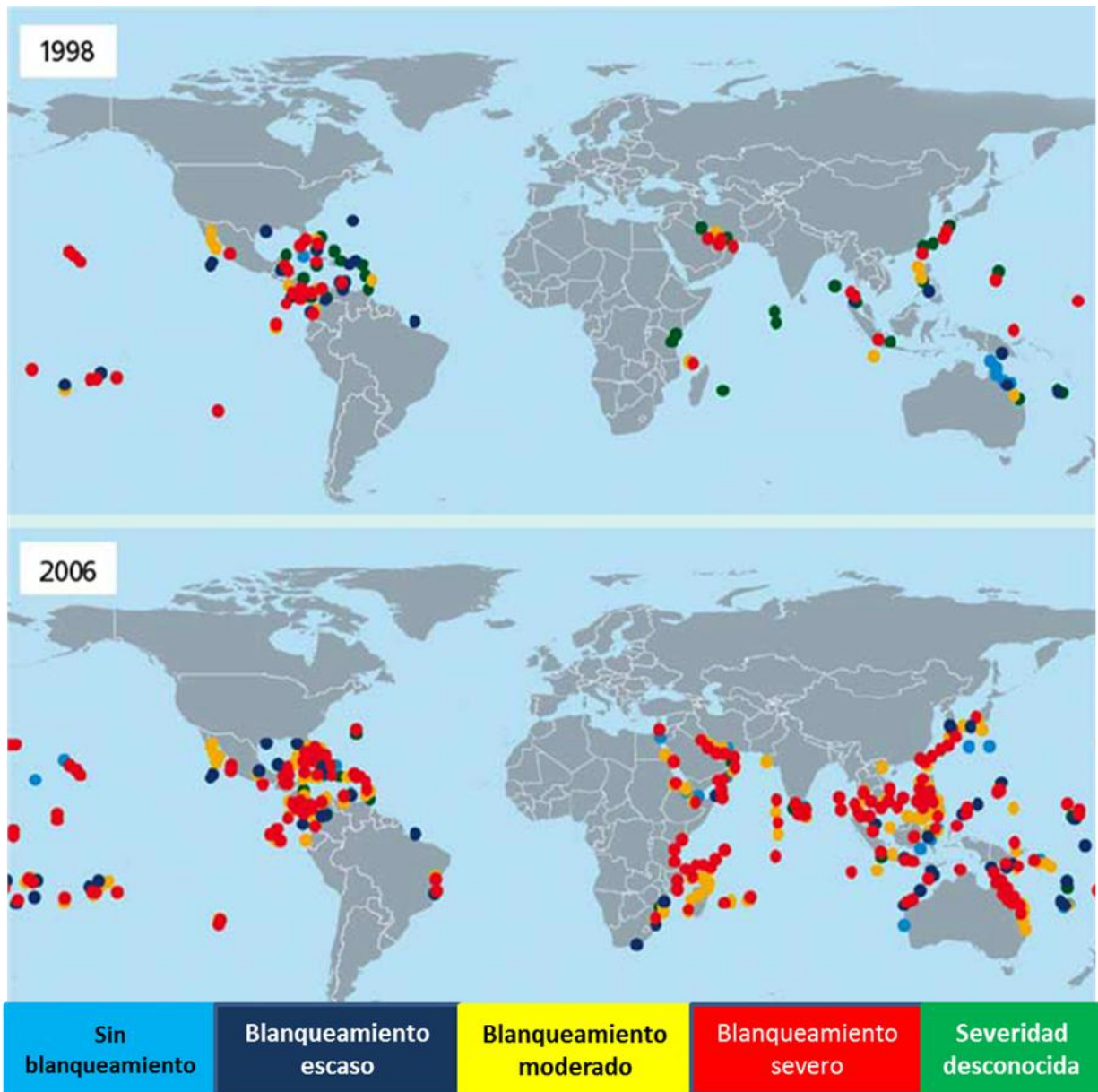


Figura 15. Tendencias mundiales en la extensión y gravedad del blanqueamiento (modificado de Marshall y Schuttenberg, 2006).

## 2.2.6 Mecanismos implicados en el blanqueamiento

Se considera al blanqueamiento como un medio de control para minimizar el daño fisiológico, ocasionado por el desequilibrio metabólico producido por el estrés (Obura, 2009) y la literatura sugiere que el mecanismo por el cual se genera el blanqueamiento es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), en especial de  $H_2O_2$  (Hume *et al.*, 2013).

Ante elevadas temperaturas, alta irradiación y condiciones de estrés se produce fotoinhibición, daño en el cloroplasto y aparato fotosintético de los simbiositos en al menos tres maneras:

- Proteína D1: Componente del fotosistema I, que consta de cinco hélices transmembranales y que está implicada en la fotólisis del agua.
- RuBisCO: La enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa, que cataliza dos procesos opuestos: la fijación del  $CO_2$  a una forma orgánica y como oxigenasa del mismo sustrato
- Membranas tilacoides: Desacoplamiento energético del transporte de electrones en los dos fotosistemas, por lo cual se continúan generando electrones, pero se deja de producir ATP y NADP.

El exceso de electrones producido reduce  $O_2$  en lugar de NADP y produce el ion superóxido  $O_2^-$ , que puede ser reducido por la superóxido dismutasa (SOD) a peróxido de hidrógeno que es menos reactivo, pero aún perjudicial, y más estable ( $H_2O_2$ ). El  $H_2O_2$  puede reaccionar con hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) para formar una especie aún más reactiva, el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Además, el exceso de electrones puede reaccionar fotoquímicamente con pigmentos y  $O_2$  para generar en última instancia, oxígeno atómico altamente reactivo ( $^1O_2$ ), lo cual se aprecia en la Figura 16.

Para tratar de contrarrestar la alta concentración de ROS, el simbiote aumenta la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la ascorbato peroxidasa, pero si este sistema de defensa se ve superado, los ROS se acumulan causando daños a las membranas fotosintéticas, que es el tercer tipo de

daño ocasionado; de esta manera se cierra un circuito de retroalimentación positiva en la cascada de daños (Weis, 2008).

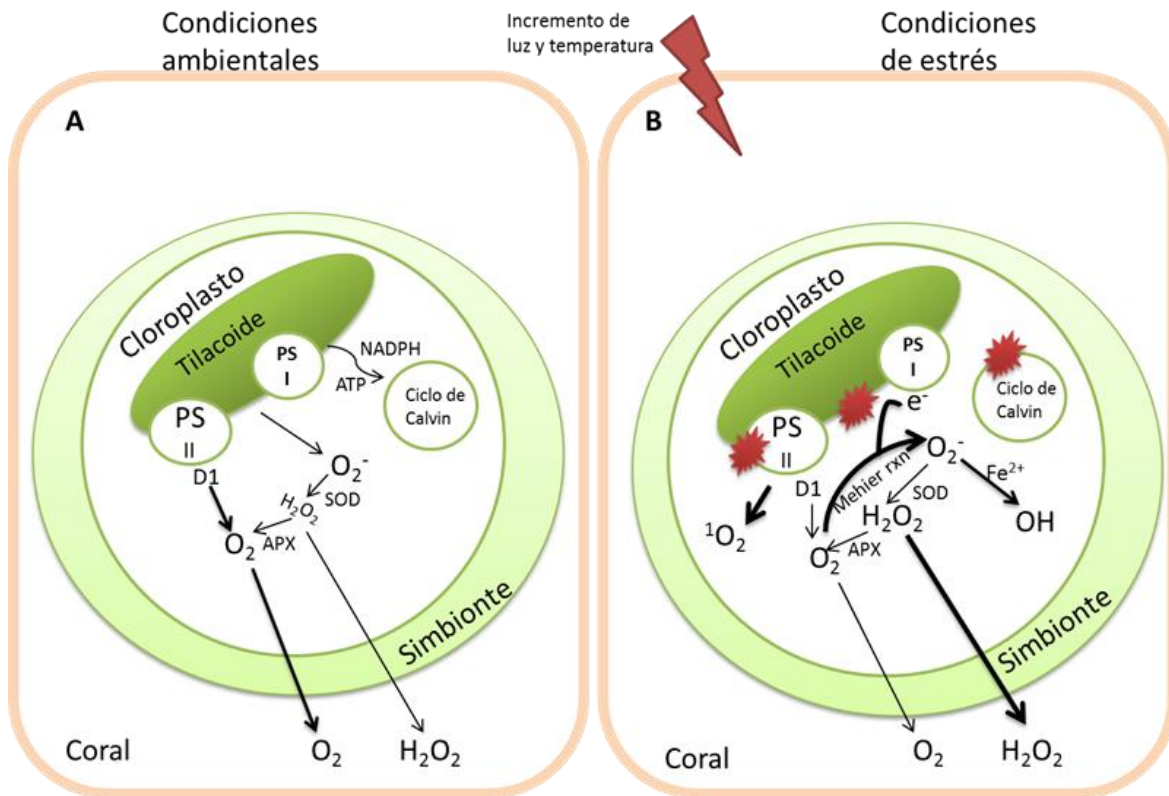


Figura 16. Representación esquemática del daño causado por ROS en el simbiote (modificado de Weis, 2008)

Al existir altas concentraciones de ROS, éstos pueden difundir hasta los tejidos del huésped, desencadenando inmunidad innata a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual activa apoptosis. El factor de transcripción también puede inducir la expresión de iNOS, la cual aumenta la concentración de óxido nítrico, el cual reacciona con el ion superóxido para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que es altamente reactivo y daña la membrana mitocondrial, la cual libera moléculas proapoptóticas como FIA, que activa vía de las caspasas y termina en la apoptosis, como se observa en la Figura 17 (Weis, 2008).

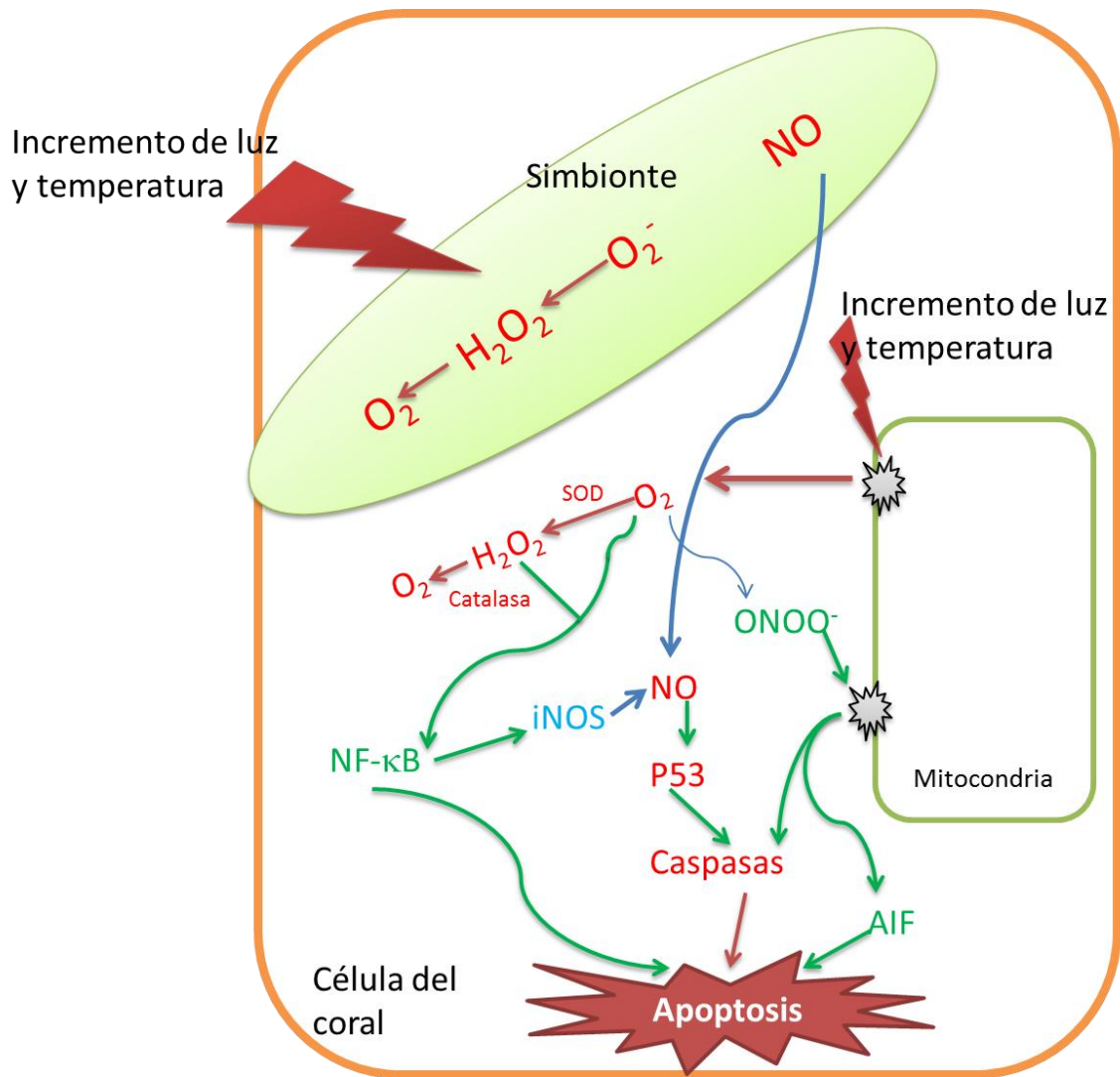


Figura 17. Vías de señalización activadas por el incremento en la concentración de ROS (modificado de Weis, 2008)

Estudios sobre los últimos mecanismos por los cuales el coral pierde sus algas simbiotes sugieren que esta pérdida se da por degradación *in situ*, excitosis, apoptosis y necrosis (Weis, 2008).

### 2.2.7 Estrés y blanqueamiento

Se ha planteado también que el blanqueamiento no es la primera respuesta a un estrés externo, sino que este puede ser evitado si se presentan otras respuestas específicas. Por ejemplo, la estimulación por la alta temperatura y

radiación puede provocar alguna o una combinación de las siguientes respuestas antes del blanqueamiento (Obura, 2009):

- Fotoinhibición y fotoprotección.
- Extinción no fotoquímica (NPQ) que disipa el exceso de luz en forma de calor.
- Aumento de la producción de pigmentos fluorescentes que pueden actuar como bloqueadores solares, algunos conocidos como aminoácidos tipo micosporina (Figura 18).
- Aumento en la expresión de proteínas de choque térmico con el fin de reparar daño a otras proteínas.
- Aumento en la expresión de enzimas que secuestran los radicales de oxígeno.
- Respuestas adaptativas del coral y el simbiote,

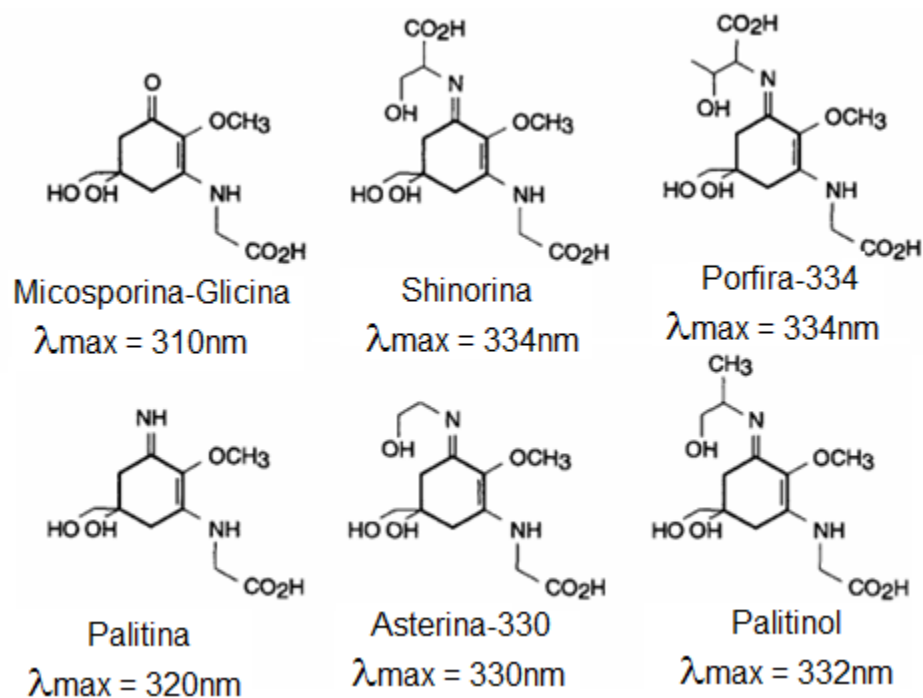


Figura 18. Estructuras y longitudes máximas de absorción de algunos aminoácidos tipo micosporina (modificado de Dunlap y Yamamoto, 1995)

### 2.2.8 Consecuencias del blanqueamiento

Desafortunadamente, el fenómeno de blanqueamiento ha afectado gravemente a los corales, ya que aunque se ha observado que los corales que sufren la pérdida de sus zooxantelas simbiotes, pueden sobrevivir y recuperarse en algunas ocasiones (Hume *et al.*, 2013), la decoloración también puede conducir a la mortalidad en masa de estas especies (Banaszak *et al.*, 2003; Lewis, 2006), afectando el equilibrio ecológico del arrecife completo. En observaciones realizadas durante procesos de blanqueamiento, se ha encontrado que algunas especies del género *Millepora* pueden sobrevivir hasta 4 semanas en ausencia de sus zooxantelas simbiotes (Lewis, 2006).

Asimismo, se ha encontrado que los cnidarios que llegan a recuperarse tras un periodo de blanqueamiento, muestran un decremento en la velocidad de crecimiento y calcificación (Coles y Brown, 2003), además de que son más susceptibles a padecer enfermedades (Rosenberg *et al.*, 2007), lo cual no es de extrañar, ya que el estrés térmico reduce la cantidad de actividad fotosintética en *Symbiodinium*, por lo tanto la cantidad de energía disponible para procesos fundamentales se reduce. Además, la cantidad de energía disponible para la reproducción también está potencialmente comprometida bajo estrés térmico (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2009).

El impacto en la reducción de la biodiversidad de los corales todavía no se conoce en su totalidad, sin embargo, se estima que si no se da una rápida evolución de los corales hacia la tolerancia térmica, estos ya no dominarán los arrecifes de coral en los próximos años (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2009).

### 2.2.9 Estudio del blanqueamiento en la era de las “ómicas”

La supervivencia de los arrecifes coralinos depende de la funcionalidad de la simbiosis entre los corales y dinoflagelados, dicha simbiosis está basada en el intercambio de nutrientes. Sin embargo, a pesar de la importancia de los arrecifes de coral y las amenazas crecientes debido al cambio climático y otras

perturbaciones ambientales, apenas comienzan a entenderse los mecanismos moleculares y celulares que subyacen en esta relación. Esto gracias al desarrollo de importantes disciplinas como la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, las cuales ofrecen una compilación comparativa de los genes de interés y moléculas involucradas en esta simbiosis (Sunagawa *et al.*, 2009. Meyer y Weis, 2012).

Técnicas tales como la expresión génica ayudan a comprender cómo los organismos responden al estrés abiótico y biótico. Uno de los modelos más empleados en esta tarea es el modelo *Aiptasia pallida* y el dinoflagelado simbiote (*Symbiodinium sp*) (Sunagawa *et al.*, 2009). En una época en la que, tanto a corto como a largo plazo, las perturbaciones de los ecosistemas marinos están aumentando con gravedad, este tipo de enfoque integral podría generar nuevas e interesantes hipótesis sobre el funcionamiento de los organismos marinos y las comunidades como se aprecia en la Figura 19 (Hofmann *et al.*, 2005).

Gracias a los avances en el área de las “ómicas” hoy en día se sabe que las respuestas al estrés térmico se producen en los tejidos del coral huésped antes del inicio del blanqueamiento. Algunas de las primeras respuestas incluyen el aumento en la expresión de proteínas antioxidantes, detención del crecimiento y las modificaciones metabólicas que incluyen mayor expresión de proteínas de choque térmico, pérdida de la homeostasis de calcio, reorganización del citoesqueleto, además de una señalización y transcripción alterada (DeSalvo *et al.*, 2012, Barshis *et al.*, 2013).

Otras respuestas incluyen regulación diferencial de la apoptosis que conlleva a la reducción en el espesor de las capas de tejido del coral, aunque se ha subestimado la importancia de esta serie de episodios tempranos y la complejidad celular que estos representan (Ainsworth *et al.*, 2008)

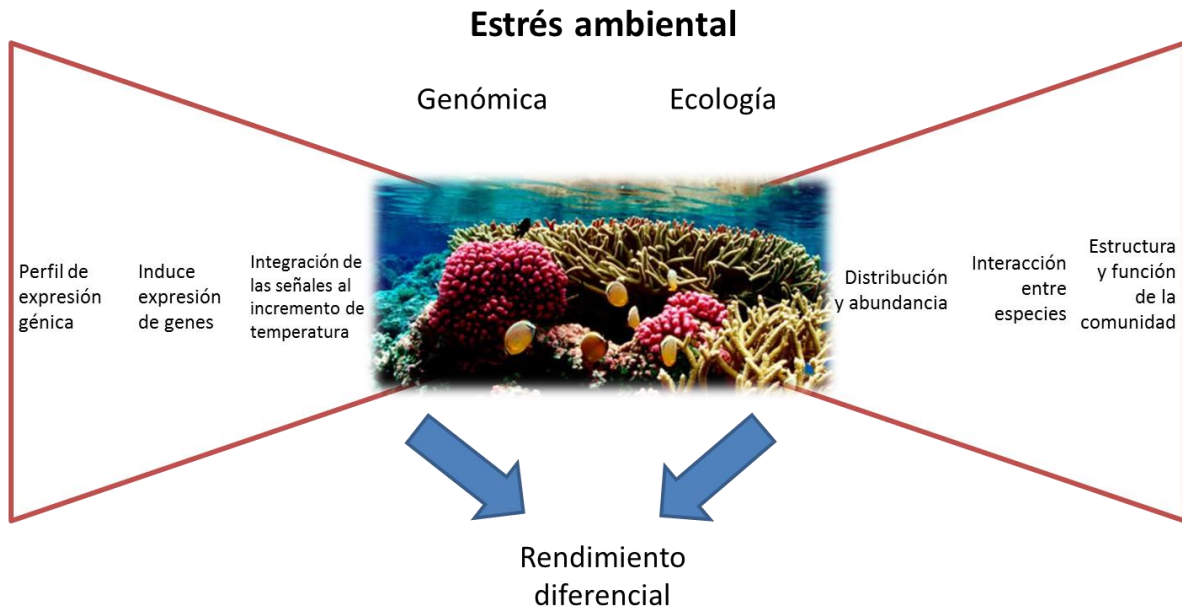


Figura 19. Integración de la genómica, fisiología y ecología en el estudio de la respuesta de los corales al estrés ambiental



### 3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios toxicológicos, farmacológicos y químicos realizados a la fecha sobre *M. complanata* y *M. alcicornis* indican que estos hidrocorales representan una fuente potencial y valiosa de nuevas moléculas bioactivas, ya que producen compuestos con diferentes efectos tóxicos y farmacológicos, entre los que se incluyen moléculas de naturaleza peptídica y metabolitos secundarios. Actualmente, se desconoce, en gran medida, la identidad de los compuestos responsables de estos efectos biológicos. Más aún, se desconoce la estructura primaria de las toxinas producidas por las especies del género *Millepora*, y sólo se tiene una idea con relación a su mecanismo de acción, ya que los estudios bioquímicos y farmacológicos realizados sobre estos hidrocorales solamente han permitido detectar la presencia de toxinas que inducen letalidad en ratones, citolisinas que producen daño en las membranas de eritrocitos, células renales y pulmonares y toxinas que modifican la conductividad iónica membranal del músculo liso intestinal y arterial. Se desconoce también el tratamiento adecuado para tratar las lesiones originadas por estos organismos. De manera adicional, algunos estudios han demostrado que las especies de *Millepora*, al igual que otros cnidarios formadores de arrecifes, son muy vulnerables frente al fenómeno de blanqueamiento originado por el calentamiento global de la Tierra. Existen evidencias que indican que la pérdida de algas fotosintéticas simbiotas produce varios efectos dañinos en el desarrollo y supervivencia de los hidrocorales. Sin embargo, a la fecha no se conoce el impacto que la ausencia de los simbiotas tiene sobre la producción de toxinas por parte de los cnidarios, ya que el conocimiento actual sobre la participación de la simbiosis en la síntesis de estas toxinas es muy limitado.

Con base en estos antecedentes resulta evidente que es muy importante continuar con el estudio bioquímico, farmacológico y toxicológico de *M. complanata* y *M. alcicornis* analizar la influencia de las algas fotosintéticas simbiotas sobre la síntesis de toxinas. No sólo porque estos hidrocorales representan una fuente

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

#### 4. Hipótesis

La ausencia de algas fotosintéticas simbiotes del género *Symbiodinium* afecta la síntesis de citolisinas con actividad de fosfolipasa A2 en *Millepora complanata* y *Millepora alcicornis* (“corales de fuego”)

#### 5. Objetivos

##### 5.1 General

Determinar el efecto del blanqueamiento provocado por el incremento térmico sobre la actividad de citolisinas con actividad de fosfolipasa A2 producidas por *Millepora complanata* y *M. alcicornis* (“corales de fuego”)

##### 5.2 Específicos

- A. Obtener especímenes de *M. complanata* y *M. alcicornis* e inducir su blanqueamiento de manera experimental
- B. Obtener los extractos acuosos de los especímenes normales y blanqueados de *M. complanata* y *M. alcicornis* y determinar su concentración de proteína.
- C. Cuantificar el número de zooxantelas presentes en los tejidos de los especímenes normales y blanqueados de *M. complanata* y *M. alcicornis*
- D. Determinar la actividad de fosfolipasa A2 de los extractos acuosos de *M. complanata* y *M. alcicornis* normales y blanqueados
- E. Determinar el perfil electroforético de los extractos acuosos de *M. complanata* y *M. alcicornis* blanqueados y normales
- F. Identificar, mediante la técnica de zimografía, las proteínas con actividad de fosfolipasa A2 presentes en los extractos de los especímenes normales y blanqueados.

G. Determinar la secuencia de aminoácidos de las proteínas con actividad de PLA2 presentes en los extractos de los especímenes normales y blanqueados.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Recolección de los especímenes de *M. complanata* y *M. alcornis*

Se recolectaron fragmentos de los hidrocorales mediante inmersiones de buceo a profundidades de 4 a 10 m en arrecifes de coral situados en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos en octubre de 2013. Los trabajos de recolección se llevaron a cabo por técnicos especializados de la Estación Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

#### 6.1.1 Inducción del blanqueamiento de los especímenes de *M. complanata* y *M. alcornis*

Después de la recolección, los fragmentos de los hidrocorales se transportaron a un acuario con flujo de agua de mar y en la misma noche se anclaron individualmente a una base de acrílico con plastilina. Después de esto, los fragmentos se separaron en dos grupos para cada especie, control y experimental y se colocaron en dos estanques de 80 L montados al aire libre con un flujo de agua de mar a temperatura ambiente (27 °C). Los fragmentos se dejaron estabilizar a las condiciones de los estanques durante una semana.

Después del periodo de acondicionamiento, la temperatura del estanque con el grupo experimental se elevó a 31 °C durante 9 días y posteriormente, se elevó a 33 °C durante 4 días más para inducir el blanqueamiento de los fragmentos de *M. complanata*. En el caso de *M. alcornis*, la temperatura se elevó a 31°C por 9 días y posteriormente se elevó a 33°C durante 6 días. Por otro lado, el estanque con los grupos control se mantuvo a una temperatura de 27 °C durante el tiempo que tardaron en blanquearse los fragmentos del grupo experimental. Una vez que se observó el blanqueamiento de los grupos experimentales, los fragmentos de ambos grupos se desmontaron de sus bases y se almacenaron a -70 °C.

Posteriormente, se prepararon los extractos acuosos a partir de los fragmentos de ambos grupos.

## *6.2 Preparación de los extractos acuosos de *M. complanata* y *M. alcicornis* normal y blanqueada*

### *6.2.1 Cuantificación de zooxantelas*

Los nematocistos fueron liberados al disolver el exoesqueleto calcáreo sumergiendo los fragmentos de coral en solución salina ácida (0.02 M de HCl en NaCl 0.15 M a pH 5.5) y manteniéndolos en agitación suave por 24 horas a 4°C. Una vez terminado el proceso de disolución se removieron las partículas grandes del exoesqueleto mediante una filtración con una malla con tamaño de poro de 0.5 mm.

Posteriormente, se centrifugó el filtrado 1-2 minutos a 200 rpm, se deshecho el sobrenadante y se recuperó el pellet que contenía zooxantelas y nematocistos sin descargar. Se resuspendió el pellet en 5 ml de agua desionizada (Radwan, 2002).

A continuación se tomaron 50 µL de la solución de nematocistos y se colocaron en una cámara de Neubauer. Se observó entonces la cámara en un microscopio MOTIC BA-210 y se contó el número de zooxantelas presentes en un cuadrante de la cámara de Neubauer.

### *6.2.2 Preparación de los extractos para los bioensayos*

La descarga de los nematocistos de los hidrocorales se indujo mediante agitación de los fragmentos en agua desionizada (pH 7) durante 36 h a 4 °C. El extracto resultante, se centrifugó a 3,000 rpm (2,060 x g) durante 15 min a 4 °C. Este sobrenadante, que contiene las toxinas provenientes de los nematocistos, se liofilizó y se almacenó a -20 °C. Cada vez que se requería para los diferentes

estudios, el polvo liofilizado se preparó de la siguiente manera: el polvo se agitó en agua desionizada, durante 20 min a 4 °C. Posteriormente, la solución que contenía el liofilizado se centrifugó a 3,000 rpm (2,060 x g) durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se separó y se filtró a través de acrodiscos de 0.45 µm de poro (Millipore). Se midió el volumen obtenido de filtrado y se le determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976).

### *6.3 Determinación de la actividad de fosfolipasa A2 de los extractos acuosos de M. complanata y M. alcicornis normal y blanqueada.*

#### *6.3.1 Ensayo de hemólisis indirecta para la medición de la actividad de PLA2*

Se empleó un ensayo cinético hemolítico indirecto para medir la actividad de PLA2 de los extractos preparados a partir de especímenes normales y blanqueados de *M. complanata* y *M. alcicornis* (Campos *et al.*, 2013). Se utilizó yema de huevo como sustrato, basándose en la capacidad que poseen las PLA2s para hidrolizar la fosfatidilcolina presente en la yema de huevo. La hidrolisis de este fosfolípido genera ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. Los lisofosfolípidos se acumulan en las membranas de los eritrocitos promoviendo su ruptura e iniciando el proceso de hemólisis. Este ensayo se realizó por triplicado en microplacas de 96 pocillos. La mezcla de reacción contenía en 140 µL de Tris-HCl 50 mM a pH 7.4 adicionado con 140 mM de NaCl y 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub>, también se adicionaron 20 µL de solución de eritrocitos lavados al 1%, 20 µL de solución de yema de huevo al 6.4% y 20 µL de extracto (que contenía µg de proteína). Se incubó la mezcla de reacción a 37°C y se monitoreó el decremento en la absorbancia mediante un lector espectrofotométrico de microplacas Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) a 650 nm, registrando las lecturas cada 5 min para registrar el decremento de la absorbancia.

Para evaluar si el efecto de las PLA2s presentes en los extractos era dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , se repitió el ensayo empleando Tris-HCl 50 mM a pH 7.4 sin adicionarle las soluciones de NaCl y de  $\text{CaCl}_2$ .

### *6.3.2 Actividad de PLA2 en placa*

Se prepararon 20 ml una solución de agar-agar al 1.5% final en PBS a un pH 7,4 la cual contenía eritrocitos lavados al 3%, yema de huevo al 5% y cloruro de calcio 10 mM. La mezcla se mantuvo a 45°C y se vertió rápidamente y con cuidado a una placa Petri estéril. Una vez gelificado el agar, se realizaron pocillos con ayuda de un sacabocados y se colocaron las muestras de los extractos, 8  $\mu\text{g}$  de proteína para cada extracto. Posteriormente, se hicieron observaciones a las 0, 12 y 24 horas para determinar la presencia de halos de hemólisis, los cuales se midieron en mm.

### *6.4 Electroforesis en gel*

Se realizaron análisis electroforéticos de los extractos acuosos de los especímenes normales y blanqueados de los hidrocorales, empleando -geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio en condiciones reductoras y desnaturizantes y no reductoras, ni desnaturizantes (SDS-PAGE), empleando la metodología descrita previamente (Schägger y Von-Jagow, 1987). En estos análisis se utilizaron geles de poliacrilamida al 12 %, usando Tris-glicina como buffer de corrida, los cuales se corrieron a 120 V durante aproximadamente 2 h. Las bandas de las proteínas se visualizaron mediante la técnica de tinción de Coomassie. Para la determinación de los pesos moleculares relativos de las proteínas presentes en los extractos se utilizaron estándares pre-teñidos de amplio espectro (Bio-Rad Cat # 161-0318).



### 6.5 Zimografía para evaluar la actividad de PLA2

Con el objetivo de determinar el peso molecular aproximado de las PLA2s presentes en los extractos de los hidrocorales, se empleó la técnica de zimografía en gel, de acuerdo a la metodología previamente descrita con algunas modificaciones (Campos *et al.*, 2013). Para ello se realizó un gel de electroforesis empleando 60 µg de proteína de cada uno de los extractos de prueba. En este análisis se empleó poliacrilamida al 12% y las muestras se corrieron en condiciones no reductoras a una temperatura de 4°C, empleando un voltaje de 90 V. Posteriormente, los geles se lavaron durante 1 h con una solución de Tris-HCl (100 mM) a pH 7.4 adicionado con 1.0% (v/v) de Triton X-100 para eliminar los residuos de SDS. Posteriormente, los geles se incubaron durante 14 horas a temperatura ambiente en contacto con otro gel de agarosa al 2% preparado en 20 solución de Tris-HCl (50 mM) a un pH 7.4, adicionada con NaCl (140 mM), CaCl<sub>2</sub> (2.5 mM) y 6% de yema de huevo. Las zonas claras en los geles que contenían el sustrato de yema de huevo indicaron la presencia de PLA2.

### 6.6 Análisis estadísticos

Las comparaciones múltiples se realizaron mediante una prueba de ANOVA de dos vías, seguida por una prueba post hoc de Bonferroni. En todos los casos la significancia estadística está indicada por  $p < 0.05$ .

### 6.7 Secuenciación de las bandas con actividad de PLA2.

Las bandas de los geles de electroforesis que fueron seleccionadas para realizar su secuenciación fueron reducidas con ditioneitol (DTT), alquiladas con iodoacetamida (obtenida con Sigma-Aldrichy) y digeridas *in gel* con tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin). Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS constituido de un cromatógrafo de líquidos de micro-flujo Accela (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) con "splitter" (1/20) y un

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

#### 6.8. Análisis de las secuencias obtenidas

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

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Inducción experimental del blanqueamiento de *M. complanata* y *M. alcornis* y determinación del grado de pérdida de algas fotosintéticas simbiotas

Los fragmentos de *M. complanata* y *M. alcornis* se colectaron en octubre del 2013. El proceso de blanqueamiento artificial de los fragmentos de los hidrocorales se indujo con un tratamiento a 31°C por 9 días y posteriormente, un tratamiento a 33°C por 4 días más en el caso de *M. complanata* y 6 días en el caso de *M. alcornis*. En las Figuras 20 y 21 se muestran fotografías de los especímenes normales y blanqueados de *M. complanata* y *M. alcornis*, respectivamente. A fin de determinar el grado de blanqueamiento logrado en ambas especies de cnidarios, se realizó un conteo del número de zooxantelas presentes en los tejidos de los hidrocorales. En la Figura 22 se muestran fotografías de las imágenes obtenidas por microscopía de luz de las zooxantelas encontradas y de algunos nematocistos presentes en *M. complanata*. Los resultados del conteo mostraron que el calentamiento indujo una disminución del 38.5% en el número de zooxantelas con respecto a los especímenes normales de *M. complanata*. En tanto, que en el caso de *M. alcornis*, se observó una disminución del 50% en el número de simbiotas del hidrocoral (Figura 23).

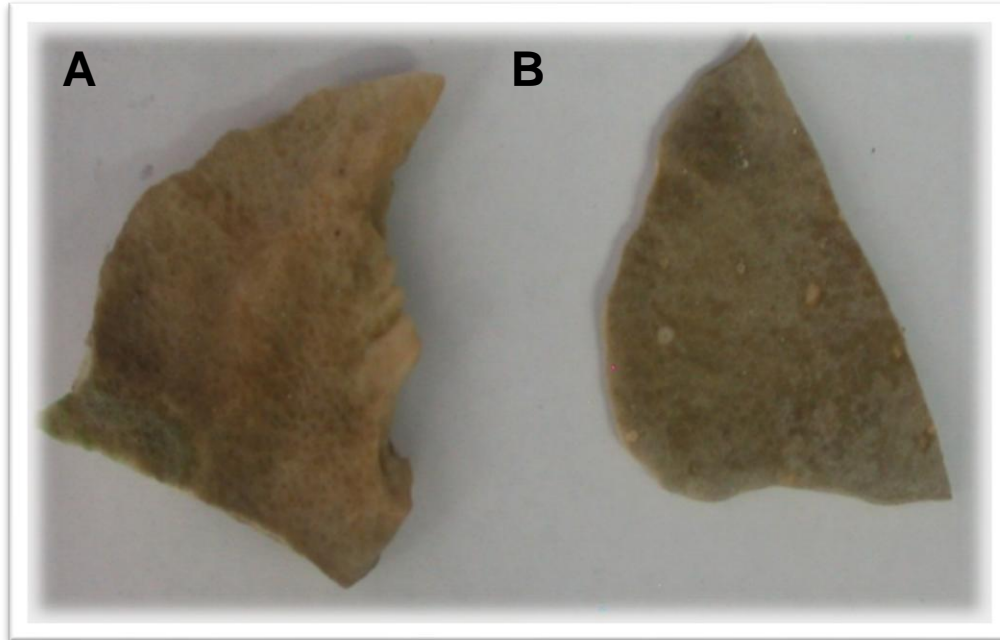


Figura 20. Comparación de fragmentos de *Millepora complanata* normal (A) y blanqueada (B).

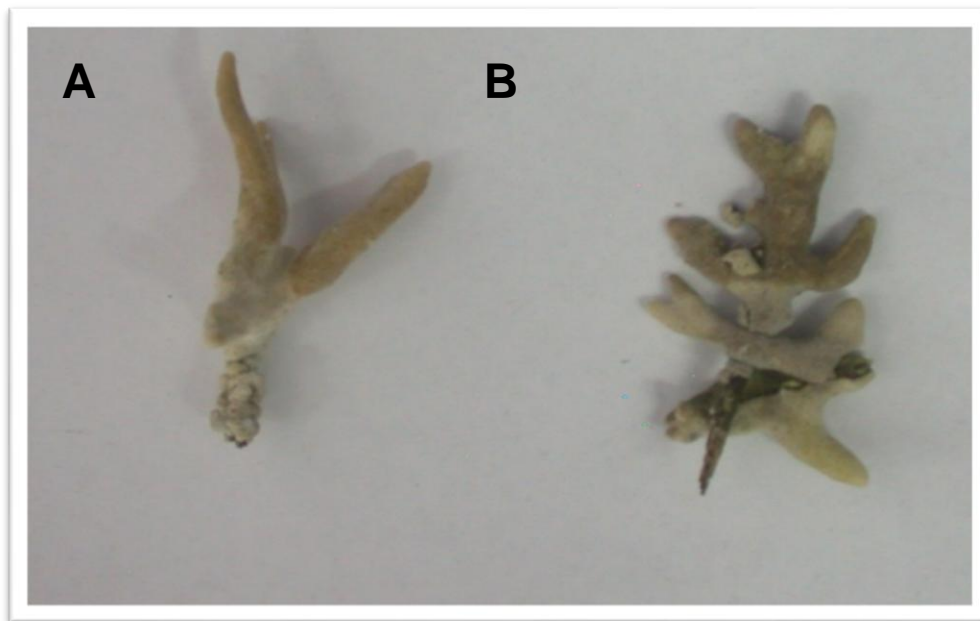


Figura 21. Comparación de fragmentos de *Millepora alcicornis* normal (A) y blanqueada (B).

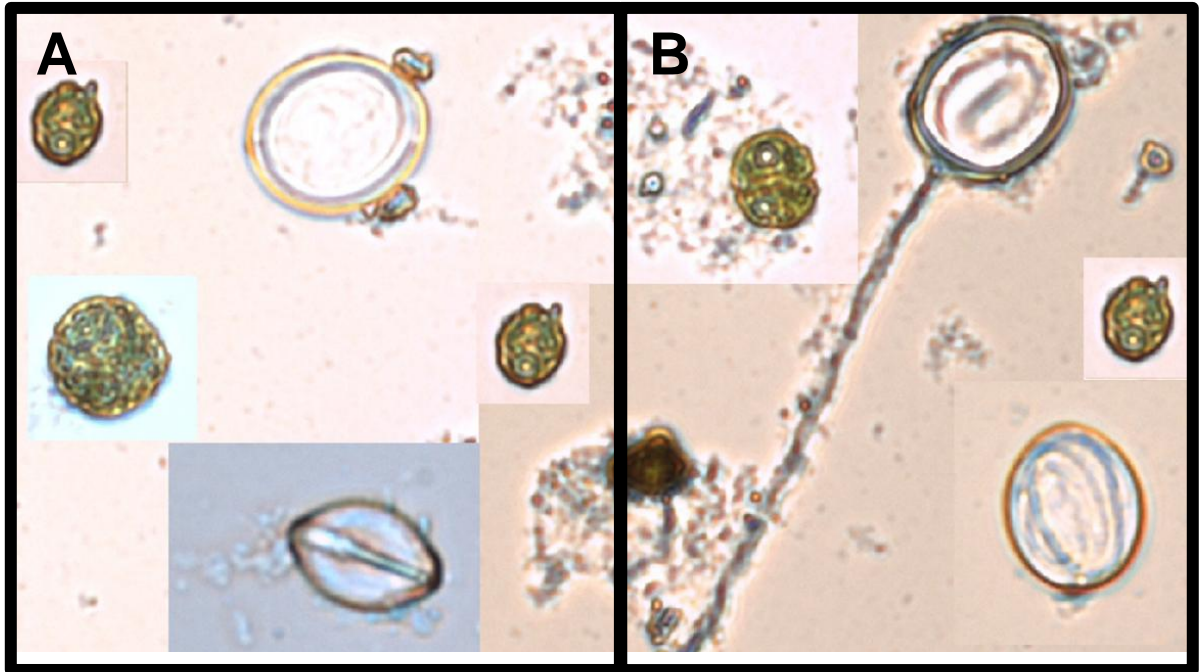


Figura 22. Fotografías obtenidas por microscopía de luz de las zooxantelas y algunos nematocistos observados en los tejidos de hidrocorales normales (A) y blanqueados (B). Se puede apreciar que las zooxantelas presentan una coloración verdosa debido a los pigmentos fotosintéticos.

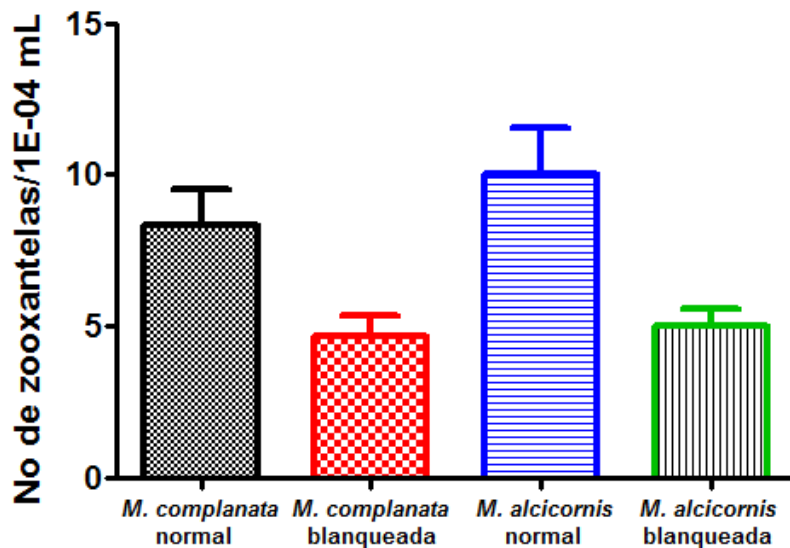


Figura 23. Número de zooxantelas presentes en los extractos de *M. complanata* y *M. alcicornis*

## 7.2 Determinación de la cantidad de proteínas presentes en los extractos acuosos de los especímenes normales y blanqueados de *M. complanata* y *M. alcornis*

La inducción de la descarga de los nematocistos para la preparación de los extractos acuosos de los hidrocorales se indujo mediante choque osmótico provocado por la agitación de los especímenes en agua desionizada a 4°C. Para obtener los extractos de *M. complanata*, se utilizaron 8.14 g (peso húmedo) del hidrocoral normal y 9.55 g del hidrocoral blanqueado. Por otra parte, los respectivos extractos de *M. alcornis* se prepararon empleando 9.66 g (peso húmedo) del hidrocoral normal y 9.65 g (peso húmedo) del hidrocoral blanqueado. Los extractos liofilizados, se re-suspendieron en agua desionizada y después de someterlos a un proceso de centrifugación y filtración se determinó su contenido de proteínas. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cantidad de proteína contenida en los extractos acuosos de los hidrocorales

Extracto	Proteína
<i>M. complanata</i> normal	11.52 µg/mg liofilizado
<i>M. complanata</i> blanqueada	12.56 µg/mg liofilizado
<i>M. alcornis</i> normal	10 µg/mg liofilizado
<i>M. alcornis</i> blanqueada	12.89 µg/mg liofilizado

## 7.3 Determinación de la actividad de PLA2 de los extractos preparados a partir de especímenes normales y blanqueados de los dos hidrocorales

### 7.3.1 Medición de la actividad de PLA2 mediante el ensayo de hemólisis indirecta y determinación de la dependencia de la actividad enzimática de la presencia de iones $Ca^{2+}$

Con el objeto de evaluar el efecto del blanqueamiento sobre la síntesis de citolisinas con actividad de PLA2 en *M. complanata* y *M. alcicornis*, se evaluó de manera indirecta la actividad enzimática, empleando como sustrato la fosfatidilcolina presente en la yema de huevo. Este fosfolípido es hidrolizado por las PLA2 presentes en los extractos de los hidrocorales, generando ácidos grasos libres y lisofosfolípidos, los cuales actúan como detergentes que provocan lisis de la membrana de los eritrocitos presentes en la mezcla de prueba (Campos *et al.*, 2013). Como control negativo se empleó buffer isotónico y como control positivo se utilizaron 0.2 µg de PLA2 de abeja (*Apis Mellifera* (P9279, Sigma-Aldrich)). Se evaluaron 8 µg de proteínas totales de los extractos de *M. complanata* y *M. alcicornis*. Los resultados derivados de esta prueba indicaron que, en el caso de los extractos preparados con especímenes normales y blanqueados de *M. complanata*, éstos presentaron actividad de PLA2, cuyo máximo se observó antes de 20 minutos (Figura 24). No se encontró una diferencia significativa entre la actividad enzimática de los extractos preparados con especímenes normales y blanqueados, pese a la disminución del 38.5% en el número de zooxantelas presentes en el extracto preparado con las muestras blanqueadas (Tabla 3). Se observó también que existe una clara dependencia de la presencia del ión  $Ca^{2+}$  sobre la actividad de las PLA2 contenidas en los extractos de los hidrocorales normales y blanqueados, ya que en ausencia de este catión, la actividad enzimática desaparece (Figura 24).

Por otra parte, en el caso de los extractos de *M. alcicornis*, solamente se observó una disminución estadísticamente significativa en la actividad de PLA2 del extracto obtenido a partir de especímenes blanqueados, con respecto al extracto preparado con hidrocorales normales a los tiempos 0 y 5 min. En el resto de las mediciones realizadas en los subsiguientes periodos de tiempo, no se observaron diferencias significativas en las actividades de PLA2 de los extractos de hidrocorales normales y blanqueados (Figura 25). En la ausencia de  $Ca^{2+}$ , la actividad enzimática de ambos extractos desapareció, indicando una dependencia

directa de la presencia de este ión, al igual que en el caso de las PLA2 presentes en los extractos de *M. complanata*.

Adicionalmente, al comparar la actividad de PLA2 de los extractos preparados a partir de especímenes normales de las dos especies de hidrocorales, se encontró que el extracto de *M. alicornis* presentó un mayor efecto que el extracto de *M. complanata*, específicamente al tiempo cero y a los 5 min.

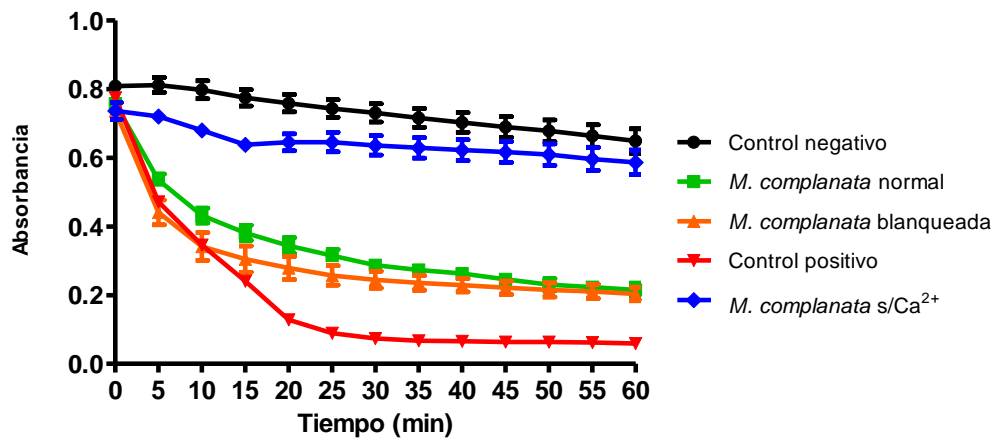


Figura 24. Determinación de la actividad de PLA2 en *M. complanata*.

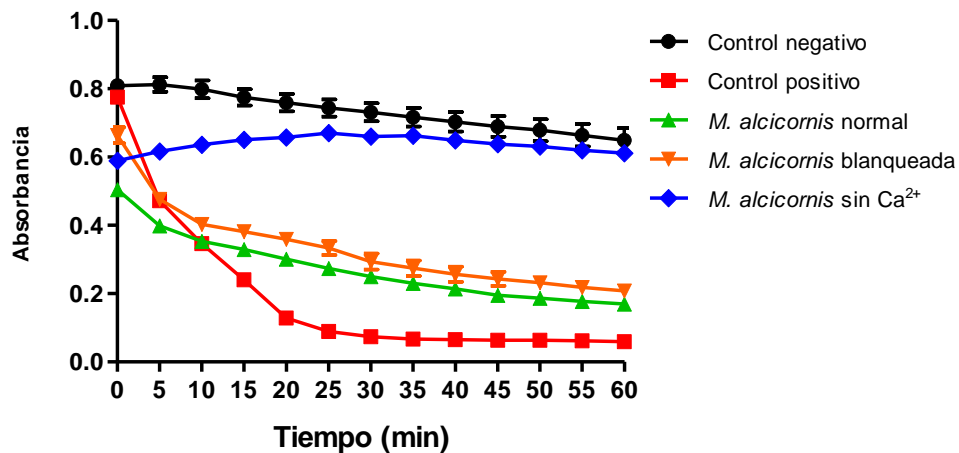


Figura 25. Determinación de la actividad de PLA2 en *M. alicornis*



Tabla 3. Resultados de la prueba de Bonferroni para la prueba de PLA2 (IC=95%)

<b>Tiempo</b>	<b><i>M. alcicornis</i> normal vs <i>M. alcicornis</i> blanqueada</b>	<b><i>M. complanata</i> normal vs <i>M. complanata</i> blanqueada</b>	<b><i>M. alcicornis</i> vs <i>M.</i> <i>complanata</i></b>
<b>0</b>	***	ns	***
<b>5</b>	*	*	***
<b>10</b>	ns	*	ns
<b>15</b>	ns	ns	ns
<b>20</b>	ns	ns	ns
<b>25</b>	ns	ns	ns
<b>30</b>	ns	ns	ns
<b>35</b>	ns	ns	ns
<b>40</b>	ns	ns	ns
<b>45</b>	ns	ns	ns
<b>50</b>	ns	ns	ns
<b>55</b>	ns	ns	ns
<b>60</b>	ns	ns	ns

### 7.3.2 Determinación de la actividad de PLA2 mediante el ensayo de placa en agar

Con el objeto de comparar la actividad de PLA2 inducida por los extractos preparados de especímenes normales y blanqueados de *M. complanata* con la actividad de PLA2 de los respectivos extractos de *M. alcicornis*, se determinó la actividad enzimática en placas de agar. En estos experimentos, al igual que en el ensayo de hemólisis indirecta, se empleó como sustrato fosfatidilcolina de yema de huevo, que al ser hidrolizada por las enzimas con actividad de PLA2, produce lisofosfolípidos que actúan como detergentes en las membranas de los eritrocitos presentes en el gel de agar. Por lo tanto, la actividad enzimática se observa como

un halo de hemólisis alrededor de los pocillos que contienen las muestras de prueba.

Los resultados mostraron que los extractos (8  $\mu\text{g}$  de proteínas totales) de *M. alcicornis* normal y blanqueada producían halos de hemólisis con diámetros comparables (15 mm). Así mismo, los diámetros de los halos de hemólisis correspondientes a los extractos (8  $\mu\text{g}$  de proteínas totales) de *M. complanata* normal y blanqueada, resultaron ser de las mismas dimensiones (13 mm) (Figura 26). En estas pruebas el control positivo empleado fue PLA2 de abeja (0.2  $\mu\text{g}$ ; *Apis mellifera* (P9279, Sigma-Aldrich)), el cual presentó un halo de hemólisis de 10 mm y el control negativo fue buffer isotónico.

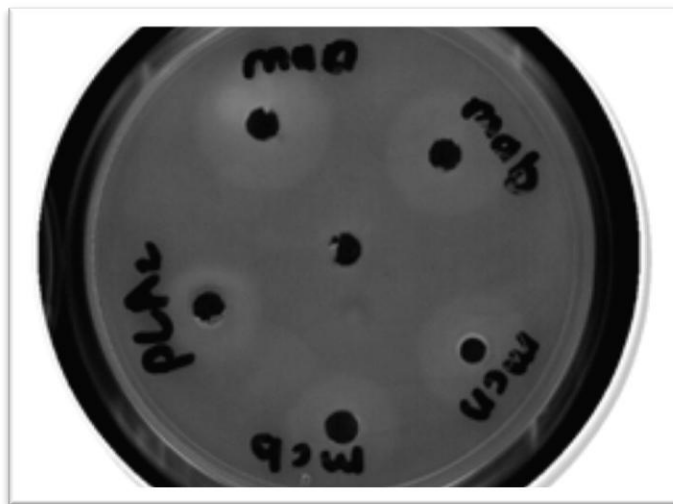


Figura 26 Comparación de la actividad de PLA2 de *M. complanata* y *M. alcicornis*. PLA2: control positivo (*Apis mellifera*); man: *M. alcicornis* normal; mab: *M. alcicornis* blanqueada; mcn: *M. complanata* normal; mcb: *M. complanata* normal

#### 7.4 Determinación del perfil electroforético de los extractos acuosos de *M. complanata* y *M. alcicornis* normal y blanqueada

A fin de analizar el efecto del blanqueamiento sobre la síntesis de toxinas producidas por los “corales de fuego” *M. complanata* y *M. alcicornis*, se analizó, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, el perfil proteico de los extractos preparados a partir de muestras normales y blanqueadas de ambos hidrocorales. El análisis electroforético de los extractos preparados a partir de *M. complanata* no reveló ninguna diferencia en el perfil proteico (Figura 27). En tanto que en el perfil electroforético del extracto proveniente de especímenes blanqueados de *M. alcicornis* se observó una disminución en la intensidad de las bandas (Figura 28).

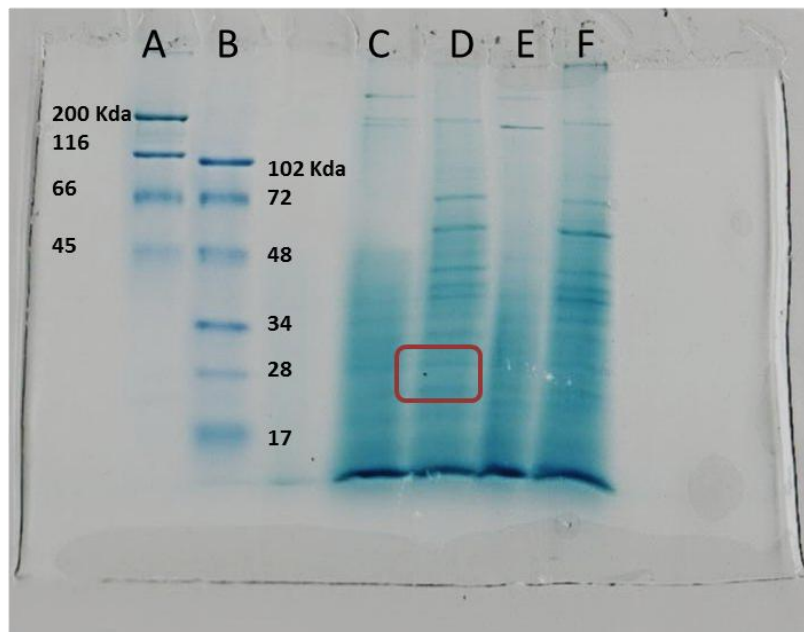


Figura 27. Perfil electroforético de los extractos de *M. complanata* (A) marcador de alto peso molecular; (B) marcador de bajo peso molecular; (C) extracto de *M. complanata* normal; (D) extracto desnaturalizado de *M. complanata* normal corrido en condiciones reductoras; (E): extracto de *M. complanata* blanqueada; (F) extracto desnaturalizado de *M. complanata* blanqueada corrido en condiciones reductoras.

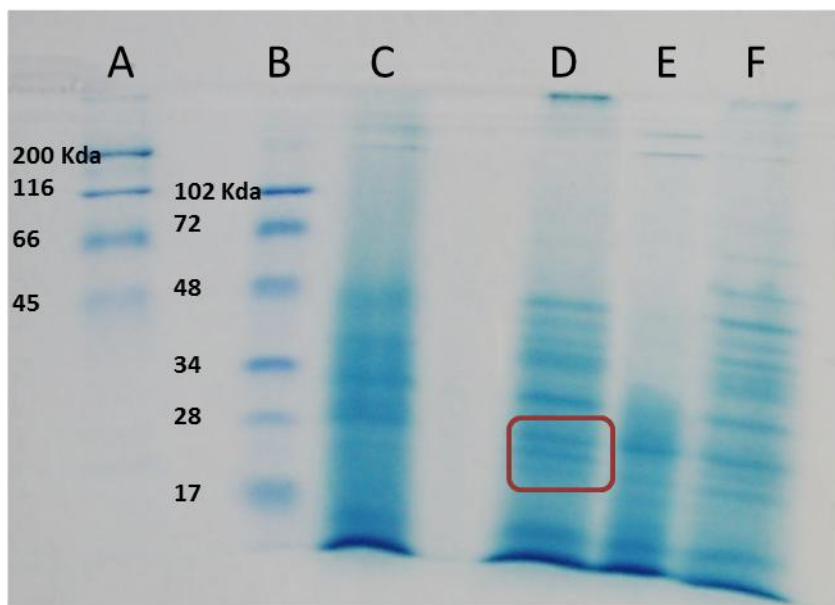


Figura 28. Perfil electroforético de los extractos de *M. alcicornis* (A) marcador de alto peso molecular; (B) marcador de bajo peso molecular; (C) extracto de *M. alcicornis* normal; (D) extracto desnaturalizado de *M. alcicornis* normal corrido en condiciones reductoras; (E): extracto de *M. alcicornis* blanqueada; (F) extracto desnaturalizado de *M. alcicornis* blanqueada corrido en condiciones reductoras.

*7.5. Identificación, mediante la técnica de zimografía, de las proteínas con actividad de PLA2 presentes en los extractos de los especímenes normales y blanqueados de M. complanata y M. alcicornis*

Con el objeto de identificar las proteínas responsables de la actividad de PLA2 producida por los extractos acuosos obtenidos a partir de especímenes normales y blanqueados de ambas especies de hidrocorales, se analizaron los extractos, mediante zimografía en gel, empleando como sustrato fosfatidilcolina de yema de huevo. Este análisis mostró la presencia en cada extracto analizado de aparentemente dos bandas proteicas en un rango de peso molecular entre 25 y 30 kDa, excepto en el extracto de *M. complanata* blanqueada, en el que se observa una sola banda. Las bandas fueron evidenciadas como zonas más claras en el gel de electroforesis, las cuales indicaban la acción de enzimas con actividad de PLA2

que hidrolizaban el sustrato empleado en el gel (Figura 29). En el caso de los extractos preparados a partir de *M. complanata*, las dos bandas correspondientes al extracto de especímenes normales (28 kDa y 25 kDa) resultaron ser más intensas que la banda (25 kDa) que se observó en el extracto de especímenes blanqueados. Por otra parte, el análisis zimográfico de los extractos de *M. alcicornis*, indicó que ambos extractos contienen dos bandas de la misma intensidad, cuyos pesos moleculares aproximados son 28 kDa y 25 kDa.

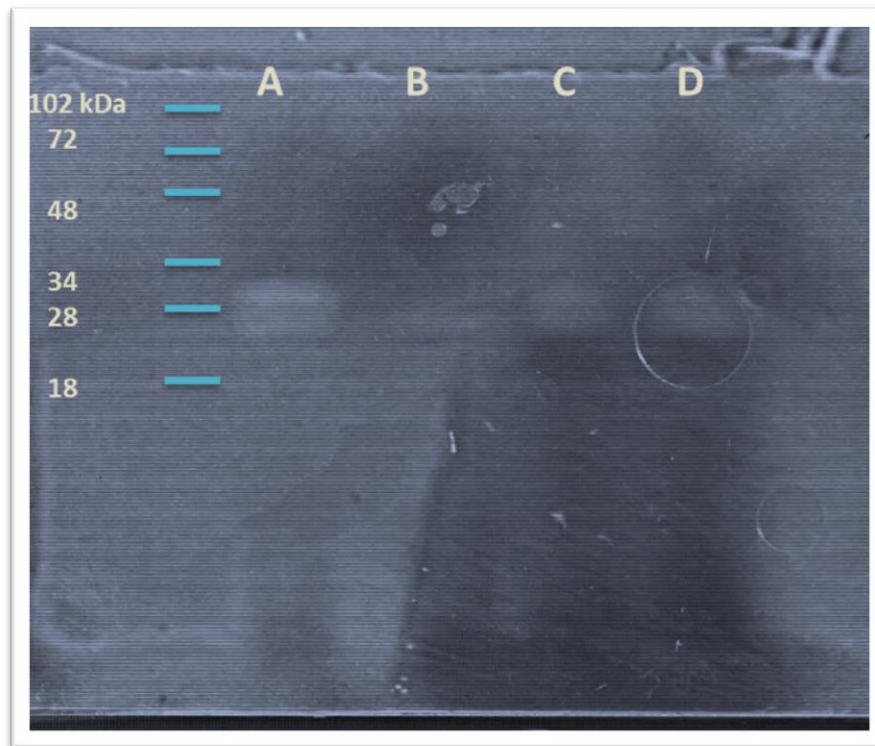


Figura 29. Zimograma de actividad de PLA2. (A) *Millepora complanata* normal; (B) *Millepora complanata* blanqueada; (C); *Millepora alcicornis* normal; (D) *Millepora alcicornis* blanqueada.

7.6 Determinación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas con actividad de PLA2 presentes en los extractos de los especímenes normales y blanqueados *M. complanata* y *M. alcornis*

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los extractos mediante zimografía en gel indicaron las bandas proteicas que presentaban actividad de PLA2. Considerando el procedimiento previamente descrito por Martínez-Romero, *et al.*, (2013), se seleccionaron dichas bandas para realizar su respectivo análisis de secuenciación, el cual se realizó en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los resultados obtenidos a partir de dicho análisis se muestran en las Tablas 4 y 5. El análisis de secuenciación de las proteínas seleccionadas reveló que ninguna de las bandas correspondía a toxinas previamente descritas en cnidarios.

Tabla 4. Secuencias de los fragmentos obtenidos a partir de la bandas de *M. complanata*

Banda	Masa aproximada	Ion m/z	Secuencia	Familia de proteínas
1	28 KDa	733.37	VVAGSDGADENYR	Proteína hipotética BRAFLDRAFT_280591 [ <i>Branchiostoma floridae</i> ]
1	28 KDa	954.45	TYVDELFPHMGNAPK	No encontrada
2	25 KDa	606.34	LTVNDLPVGR	Peroxiredoxina [ <i>Euglena gracilis</i> ]
2	25 KDa	609.38	LLDQTLDSLK	Transportador de fosfato [ <i>Methanocaldococcus</i> sp. FS406-22]
2	25 KDa	637.30	TYSGSHEAFK	Sintasa del O-succinilbenzoato-CoA [ <i>Pseudoalteromonas citrea</i> ]
2	25KDa	637.87	LVVYPWKEK	No encontrada
2	25 KDa	557.85	VNVDEVNEALGR	Proteína hipotética [ <i>Halarchaeum acidiphilum</i> ]
2	25 KDa	814.78	AGSGDLVLDVLDPK	proteína de secreción tipo IV [ <i>Salinispora pacifica</i> ]

2	25 KDa	836.47	EALLLPEDVAYR	Proteína hipotética METH_23100 [ <i>Leisingera methylohalidivorans</i> DSM 14336]
2	25 KDa	896.46	ELPDGQVITLGNER	Actina 2 citoplasmática
2	25 KDa	1143.08	ADNQPGVLIQVFEGER	Proteína de choque térmico 70

No encontrada: La secuencia no fue encontrada en las bases de datos.

Tabla 5. Secuencias de los fragmentos obtenidos a partir de la bandas de *M. alcornis*

Banda	Masa aproximada	Ion m/z	Secuencia	Familia de proteínas
1	30 KDa	704.37	STEFTLEGVFK	Hidralasina [ <i>Hydra vulgaris</i> ]
1	30 KDa	851.91	GSEFMSVTAGSSQSK	No encontrada
1	30 KDa	946.46	FDDLQGLDSSPN DVR	No encontrada
1	30 KDa	1200.61	LGGSTDPNLLTLLAGAYGPK	No encontrada
1	30 KDa	1171.04	SVWETENLPNYS GK	Proteína asociada a los microtúbulos ( <i>Aplysia californica</i> )
1	30 KDa	1143.08	ADNQPGVLLQVFEWR	Proteína de choque térmico 70 [ <i>Ectocarpus siliculosus</i> ]
2	28 KDa	637.87	LVVYPQPAFK	No encontrada
2	28 KDa	8554.46	VGDLSQLGTYWDLK	No encontrada
2	28 KDa	1143.08	ADNQPGVLIQVFEGER	Proteína de choque térmico 70 [ <i>Leucocryptos marina</i> ]
2	28 KDa	902.01	LEQVLTGETLVNK	Proteína hipotética VOLCADRAFT_86 170 [ <i>Volvox carteri f. nagariensis</i> ]
2	28 KDa	962.46	EENPNASKDEYEAK	No encontrada
2	28 KDa	980.20	EFENGELLVESHALLR	No encontrada
2	28 KDa	1171.59	DNQGPVLLQVQPNYS GK	No encontrada
3	25 KDa	614.88	LQAYQFTDK	Peroxisredoxina 2

				[ <i>Crassostrea gigas</i> ]
<b>3</b>	25 KDa	606.85	LTVNDLPVGR	Proteína hipotética HELRODRAFT_1 54361 [ <i>Helobdella robusta</i> ]
<b>3</b>	25 KDa	511.27	AGVEFTER	Proteína hipotética [ <i>Plesiocystis pacifica</i> ]
<b>3</b>	25 KDa	987.49	VATGSHNSPSEEFR	No encontrada
<b>3</b>	25 KDa	1016.01	NPESDSSALVHQPYK	No encontrada
<b>3</b>	25 KDa	1172.55	VGQETENLPNYS GK	No encontrada
<b>3</b>	25 KDa	1199.56	TDLSVGQETENLPNYS GK	No encontrada

No encontrada: La secuencia no fue encontrada en las bases de datos



## 8. DISCUSION DE RESULTADOS

La gran importancia de los hidrocorales del género *Millepora* radica en que constituyen los segundos organismos formadores de arrecifes de coral en los mares tropicales de todo el mundo. En especial, *M. complanata* y *M. alcicornis* son dos especies de hidrocorales ampliamente distribuidas en el Caribe mexicano (Lewis, 2006). Estas dos especies, además de ser fundamentales en el equilibrio ecológico de los arrecifes del Caribe, son importantes desde el punto de vista toxicológico, ya que su hábitat se ubica en una región altamente turística, en donde existe una gran probabilidad de que entren en contacto con las personas que practican el buceo a bajas profundidades y en las que pueden ocasionar lesiones de diversa gravedad. Se ha propuesto que las altas concentraciones de enzimas con actividad de PLA2 son las responsables de la irritación que causan las toxinas de los “corales de fuego” (Suput, 2011). Este tipo de toxinas también se han relacionado con la inflamación y el dolor, ya que al tener la capacidad de hidrolizar fosfolípidos de membrana, pueden originar compuestos, tales como el ácido araquidónico que es precursor en la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, los cuales controlan una gran variedad de procesos fisiológicos como el dolor y la inflamación (Ternon y Thomas, 2014).

El blanqueamiento de los arrecifes de coral causado, entre otros factores, por el calentamiento global representa una de las principales amenazas para estos ecosistemas (Baird *et al.*, 2009). Durante los últimos 50 años, muchos arrecifes del Caribe han perdido hasta el 80% de su cobertura de coral (Wilkinson y Souter, 2008), por ello es de suma importancia realizar investigaciones que permitan comprender con mayor profundidad el efecto que tiene este devastador fenómeno sobre los procesos bioquímicos que son indispensables para la vida y supervivencia de los organismos formadores de arrecifes. En este contexto, se planteó el presente trabajo de investigación que tenía como principal objetivo determinar la influencia del blanqueamiento sobre la producción de citolisinas con actividad de PLA2 en las especies *M. complanata* y *M. alcicornis*.

Para lograr el cumplimiento del objetivo general planteado, en primer término se procedió a inducir el blanqueamiento artificial de los hidrocorales de prueba. En este punto es importante mencionar, que se decidió provocar el blanqueamiento artificial con un aumento en la temperatura del agua, ya que se ha demostrado que el calentamiento del océano constituye la principal causa de la pérdida de zooxantelas simbiotes o de sus pigmentos fotosintéticos por parte de los cnidarios hospederos (McWilliams *et al.*, 2005). En el caso de los especímenes de *M. complanata*, éstos inicialmente se mantuvieron durante 9 días a una temperatura del agua de 31°C y posteriormente, la temperatura se incrementó a 33°C y en esas condiciones los hidrocorales se mantuvieron por 4 días más. La elección de la temperatura empleada para inducir el blanqueamiento artificial de *M. complanata* se realizó con base en los resultados obtenidos en un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo, en el que se observó que un tratamiento térmico similar indujo un significativo blanqueamiento en especímenes de *M. complanata* (Figura 30) (García-Arredondo *et al.*, 2011). En el caso del presente trabajo, el blanqueamiento obtenido no fue tan notorio a simple vista (Figura 20), como en el caso del estudio anterior

Por otra parte, el tratamiento empleado para inducir el blanqueamiento artificial de *M. alcicornis* consistió en mantener a los hidrocorales a una temperatura de 31°C por 9 días y posteriormente, aumentar la temperatura a 33°C durante 6 días, es decir dos días más que el tratamiento empleado para producir el blanqueamiento en *M. complanata*, debido a que a simple vista no se observaba una disminución en el color de los especímenes.

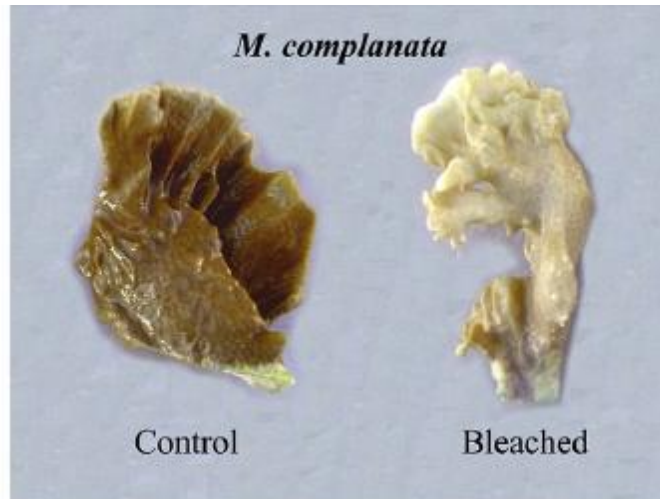


Figura 30. Comparación de la coloración de un fragmento de *M. complanata* control con la coloración de un fragmento blanqueado (García-Arredondo *et al.*, 2011)

Vale la pena hacer notar que el aumento en la temperatura del agua que se empleó en el presente trabajo para inducir el blanqueamiento, puede considerarse drástico, ya que reportes previos en los que se ha registrado la relación entre el incremento térmico regional y el grado de blanqueamiento, indican que un aumento inferior a 1°C en la superficie del agua es suficiente para lograr niveles severos de blanqueamiento de los arrecifes (Figura 31). Se sabe que la temperatura promedio del agua en el océano en las zonas tropicales varía entre 28 y 29.7 °C (Baker *et al.*, 2008).

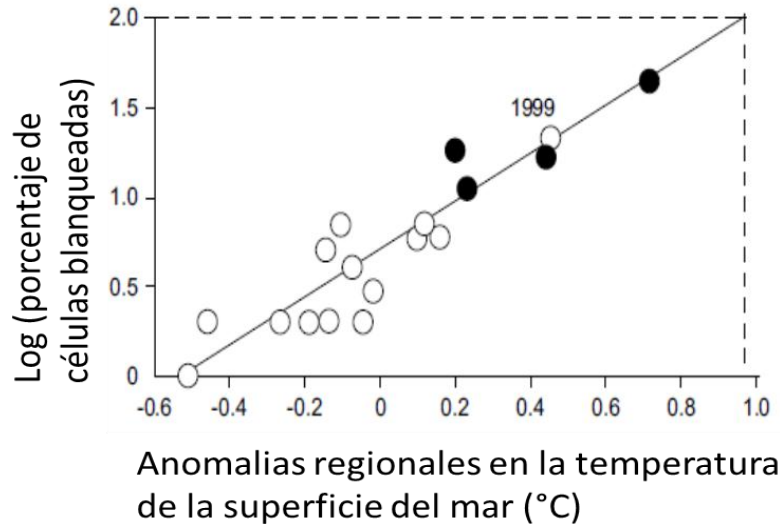


Figura 31. La relación entre las anomalías regionales en la temperatura de la superficie del mar (SST) y el porcentaje de células blanqueadas. Los círculos negros indican fenómenos de blanqueamiento masivo (modificado de Baker *et al.*, 2008.)

A fin de medir el grado de blanqueamiento logrado con los tratamientos térmicos aplicados a los hidrocorales, se realizó un conteo de las zooxantelas presentes en los extractos. Los resultados de este análisis indicaron que los tejidos de *M. complanata* perdieron un 38.5% de sus zooxantelas, en tanto que los tejidos de *M. alcicornis* perdieron aproximadamente un 50% de sus algas fotosintéticas simbiotes. Considerando las categorías para el blanqueamiento de corales establecidas en la Base de Datos de Arrecifes, que se muestran en la Tabla 6 (Oliver *et al.*, 2009), se puede afirmar que en el presente trabajo de investigación el nivel de blanqueamiento obtenido para *M. complanata* fue moderado, mientras que para *M. alcicornis* fue severo. En un estudio reportado en el año 2009, se encontró que al mantener durante 9 h a una temperatura del agua de 32°C especímenes del coral *Acropora hyacinthus*, se redujo el porcentaje de zooxantelas del tejido del cnidario en un rango de 60-90% (Strychar y Sammarco, 2009). Tomando en cuenta estos datos, se puede concluir que las especies de hidrocorales *M. complanata* y *M. alcicornis* presentan una mayor resistencia al blanqueamiento que la especie *A. hyacinthus*, perteneciente a clase Anthozoa.

Tabla 6. Categorías de blanqueamiento de corales empleadas en la Base de Datos de Arrecifes (modificada de Oliver *et al.*, 2009)

<b>Código</b>	<b>Categoría</b>	<b>Descripción</b>	<b>Notas</b>
<b>0</b>	Sin blanqueamiento	No se observa blanqueamiento	Para las encuestas cuantitativas, se registra sin blanqueamiento si el porcentaje de blanqueamiento es menor de 1%
<b>-1</b>	Blanqueamiento (severidad desconocida)	Blanqueamiento registrado	Se ha observado blanqueamiento, pero no hay información sobre la gravedad. Para los propósitos de análisis esta categoría es convertida a 2 (blanqueamiento moderado)
<b>1</b>	Blanqueamiento leve	Hasta 10% de la cobertura de coral blanqueado	Si no hay una estimación del % de los corales blanqueados. términos como "suave", "ocasional" se utilizan para identificar esta categoría

<b>2</b>	Blanqueamiento moderado	10-50% de la cobertura de coral blanqueado	Si no hay una estimación del % de los corales blanqueados. términos como "significativo", "frecuente", "común" se utilizan para identificar esta categoría
<b>3</b>	Blanqueamiento severo	Más de 50% de la cobertura de coral blanqueado	Si no hay una estimación del % de los corales blanqueados. términos como "pesado", "abundante" se utilizan para identificar esta categoría

Resulta conveniente en este tipo de investigaciones, aplicar metodologías que permitan monitorear cuantitativamente y de manera más precisa el grado de blanqueamiento que presentan las especies objeto de estudio, ya que como se ha reportado previamente (Veron *et al.*, 2009), el evento del blanqueamiento no sólo implica una disminución en el número de zooxantelas, sino que también involucra un decremento en la producción de pigmentos fotosintéticos por parte de estas algas. Incluso puede presentarse blanqueamiento, sin que exista una disminución en la cantidad de zooxantelas, pero sí una drástica disminución en el contenido de pigmentos como la clorofila a, la clorofila c2 y la xantofila, como se reportó en el año 2006 para *Montipora monasteriata* (Dove *et al.*, 2006).

En este sentido se han propuesto diferentes parámetros para determinar con precisión el grado de blanqueamiento presentado en especies de cnidarios, entre los que se incluyen: contenido de clorofila a, presión luminosa, grado de absorción de fotones, entre otros (Figura 32). Adicionalmente, se ha considerado la evaluación de la densidad de las células empleando PCR en tiempo real, incluso para identificar las cladas de *Symbiodinium* que habitan en los corales (Mieog *et al.*, 2009). Por otra parte, existe otro indicador que permite evaluar la viabilidad de las zooxantelas que se encuentran en simbiosis con los cnidarios formadores de arrecifes: la eficiencia cuántica. Ésta se refiere a la máxima eficiencia fotosintética de las algas e indica la capacidad de flujo de electrones a través del fotosistema II. La medición de este indicador se ha empleado previamente para evaluar el blanqueamiento en especies de *M. alcornis* (Banaszak *et al.*, 2003). Considerando que uno de los mecanismos involucrados en el daño producido por el blanqueamiento implica la generación de ROS, también resulta indispensable evaluar el potencial de los mecanismos antioxidantes presentes en los cnidarios (Griffin y Bhagooli, 2004), así como la expresión de proteínas antioxidantes, haciendo uso de técnicas de proteómica.

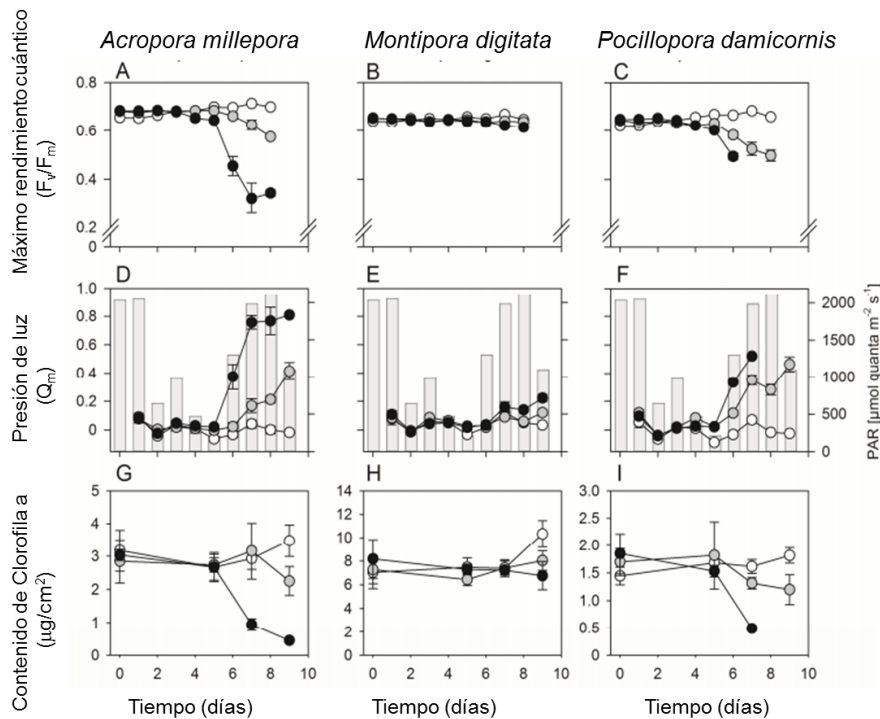


Figura 32. Algunos parámetros a considerar para el monitoreo del blanqueamiento

A la fecha, los estudios realizados sobre el fenómeno del blanqueamiento de arrecifes coralinos se han centrado en comprender las causas que lo originan; los mecanismos celulares implicados en la ruptura de la simbiosis y en la expulsión de las zooxantelas del tejido del cnidario. También se han explorado algunos de los mecanismos de adaptación a los que han recurrido tanto los simbiosites como los cnidarios para subsistir al daño generado por el blanqueamiento (Figura 33). Sin embargo, no se ha investigado el efecto de este fenómeno sobre la síntesis de toxinas. Este aspecto es crucial, sobre todo si se considera que debido a que los cnidarios expelen de su interior a las zooxantelas, están perdiendo su principal fuente de nutrientes. Ante esta situación se desconoce cuáles son los mecanismos mediante los cuales los cnidarios suplen las deficiencias de nutrimentos provenientes de manera autótrofa, por procesos que les permitan alimentarse de forma heterótrofa, mediante el empleo de su arsenal de toxinas.

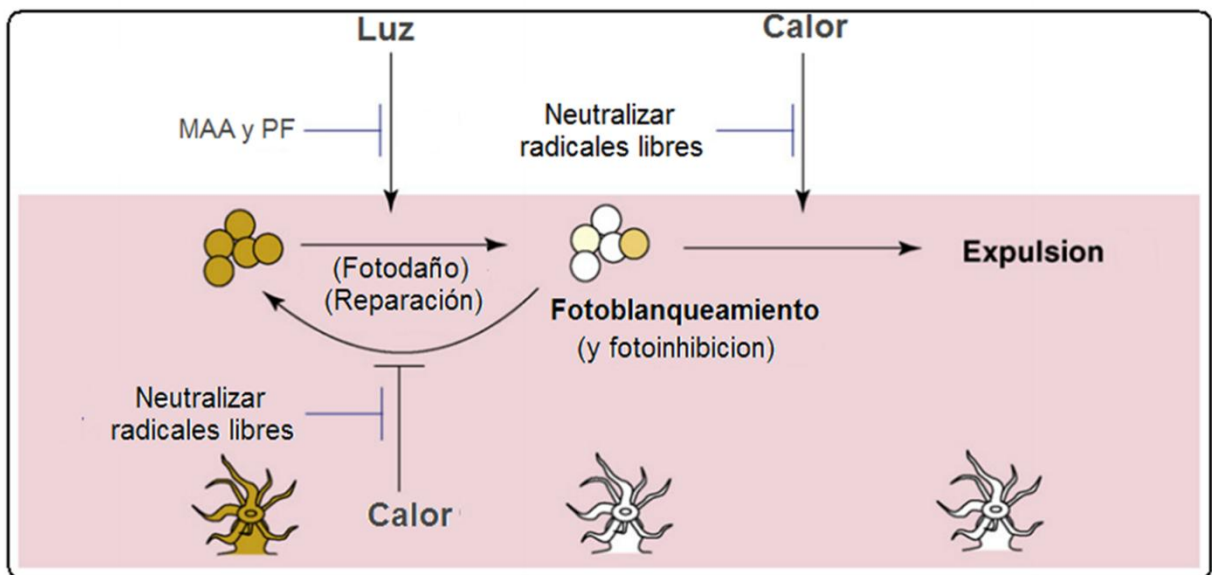


Figura 33. Áreas en las que se ha centrado el estudio del blanqueamiento (modificado de Baird *et al.*, 2009)



Considerando que en estudios previos se ha detectado la presencia de PLA2, como parte del arsenal de toxinas de los hidrocorales y en especial del género *Millepora* sp (Nevalainen *et al.*, 2004) y tomando en cuenta las altas concentraciones que se han reportado de estas enzimas en los hidrocorales (Šuput, 2009), en el presente estudio se propuso analizar la influencia del blanqueamiento sobre la actividad de PLA2. El estudio adquiere relevancia, si se considera que a la fecha solamente se han reportado dos trabajos sobre especies de *Millepora* en los que se han identificado enzimas con actividad de PLA2, cuyo peso molecular se encuentra en un rango de 28 - 33 kDa (Radwan y Aboul-Dahab, 2004; Ibarra-Alvarado *et al.*, 2007). De hecho, actualmente no existe aún información acerca de la secuencia de aminoácidos de estas proteínas.

La hipótesis que se planteó en este estudio consideraba que, debido a que se ha observado que los cnidarios sufren una serie de efectos deletéreos como consecuencia del blanqueamiento (Baird y Marshall, 2002), era muy probable que este fenómeno también afectara de manera negativa la síntesis de toxinas con actividad de PLA2. Sin embargo los resultados derivados de la determinación de la actividad de PLA2 de los extractos acuosos de *M. complanata* y *M. alcicornis* normales y blanqueadas indicaron que una disminución del 38.5% en el número de zooxantelas presentes en los tejidos de *M. complanata*, lo cual implica un blanqueamiento moderado, no tiene ningún efecto sobre la actividad de PLA2 del extracto acuoso preparado a partir de este hidrocoral. Más aún, incluso si la disminución en el número de zooxantelas alcanza el 50% (blanqueamiento severo), como lo que sucedió con los especímenes de *M. alcicornis*, se sigue manteniendo la actividad de PLA2. Estos resultados sugieren que la disminución significativa de algas fotosintéticas simbiotas no afecta la síntesis de citolisinas con actividad de PLA2 en las especies *M. complanata* y *M. alcicornis*.

Estos resultados pueden ser explicados con base en información derivada de estudios previos, en los que se ha observado que algunas especies de corales escleractinios pueden adaptarse a aumentos moderados en la temperatura del agua, en un lapso aproximado de dos años. Se ha propuesto que este proceso

adaptativo se lleva a cabo mediante la modificación en los niveles de expresión de ciertos genes que expresan algunos factores de transcripción, proteínas de choque térmico y proteínas apoptóticas (Palumbi *et al.*, 2014). Posiblemente, los hidrocorales del género *Millepora*, que ya han estado expuestos a incrementos térmicos en el agua de su hábitat natural, han empezado a desarrollar mecanismos bioquímicos que les permiten adaptarse a las nuevas condiciones ambientales de su entorno.

Mediante el empleo de la técnica de zimografía en gel de electroforesis se lograron detectar en los extractos de especímenes normales y blanqueados de ambos hidrocorales proteínas con actividad de PLA2, cuyos pesos moleculares se encontraban en un rango de 25 y 30Da. Estos pesos moleculares concuerdan con los de las PLA2 que se detectaron previamente en *M. platyphylla* y *M. complanata* (Radwan y Aboul-Dahab, 2004; Ibarra-Alvarado *et al.*, 2007). En el caso de *M. alcicornis*, tanto el extracto obtenido a partir de especímenes normales, como el preparado con especímenes blanqueados, presentaron dos bandas proteicas con actividad enzimática, las cuales presentaban la misma intensidad, independientemente del blanqueamiento. Por otra parte, el extracto preparado a partir de especímenes normales de *M. complanata*, presentaba también dos bandas, similares a las observadas para ambos extractos de *M. alcicornis*. Sin embargo, el extracto de especímenes blanqueados de *M. complanata*, sólo presentó una banda, la cual por cierto tenía menos intensidad que las bandas observadas para el extracto de hidrocorales normales. Con la información disponible en este momento, no es posible llegar a alguna conclusión que pudiera justificar esta observación.

Las bandas que presentaron actividad de PLA2 presentes en los extractos de especímenes normales de ambas especies, así como la banda que se encontró en el extracto de la muestra blanqueada de *M. complanata*, se analizaron mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. El análisis secuencial de las proteínas seleccionadas reveló que ninguna de las bandas correspondía a toxinas previamente identificadas o predichas. Se esperaba que

considerando que dichas bandas presentaban actividad de PLA2, era altamente probable que la secuenciación pudiera proporcionar información acerca de su identidad y su similitud con otras PLA2 encontradas en cnidarios. Evidentemente, debido a la falta de purificación de las proteínas de cada una de las bandas, no fue posible obtener la secuencia de las PLA2 que se encuentran en los extractos de estos hidrocorales. Por este motivo, resulta indispensable realizar un proceso de purificación previo a fin de lograr la caracterización química de las toxinas detectadas.

## 9. CONCLUSIONES

- El tratamiento térmico aplicado en el presente trabajo a los especímenes de *M. alcicornis* indujo un blanqueamiento severo en estos hidrocorales, el cual provocó una disminución del 50% en el número de zooxantelas contenidas en los tejidos de este hidrocoral.
- El tratamiento térmico aplicado a los especímenes de *M. complanata* indujo un blanqueamiento moderado en estos hidrocorales, que provocó una disminución del 38.5% en el número de algas fotosintéticas simbiotes presentes en los tejidos de este cnidario.
- Los resultados derivados del presente trabajo sugieren que la pérdida de algas fotosintéticas simbiotes provocada por un aumento en la temperatura del agua de su ambiente no afecta la síntesis de citolisinas con actividad de PLA2 en las especies de cnidarios *M. complanata* y *M. alcicornis*. Estos resultados indican que estas especies de cnidarios, que desde hace tiempo han sido expuestas a incrementos térmicos provocados por el calentamiento global de la tierra, han empezado a desarrollar mecanismos bioquímicos que les permiten adaptarse a las nuevas condiciones ambientales de su entorno.
- La actividad de PLA2 presentada por los extractos acuosos preparados a partir de especímenes normales y blanqueados de estos hidrocorales puede atribuirse a la presencia de citolisinas con un rango de pesos moleculares entre 28 y 33 KDa. Este rango de peso molecular coincide con los pesos moleculares de PLA2 encontradas en otras especies de cnidarios.

## 10. LITERATURA CITADA

- Ainsworth, T. D., Hoegh-Guldberg, O., Heron, S. F., Skirving, W. J. and Leggat, W. 2008. Early cellular changes are indicators of pre-bleaching thermal stress in the coral host. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 364(2):63-71.
- Ali M. 2009. Coral bleaching: Processes, extent and implications: A Review. *Mesop. J. Mar. Sci.* 24 (1):35-42.
- Anderluh, G. and Maček, P. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria). *Toxicon.* 40:111-124.
- Anderson, P. A. and Bouchard, C. 2009. The regulation of cnidocyte discharge. *Toxicon.* 54(8):1046-1053.
- Anderson, P. A. and McKay, M. C. 1987. The electrophysiology of cnidocytes. *J. Exp. Biol.* 133(1):215-230.
- Baird, A. H. and Marshall, P. A. 2002. Mortality, growth and reproduction in scleractinian corals following bleaching on the Great Barrier Reef. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 237:133-141.
- Baird, A. H., Bhagooli, R., Ralph, P. J. and Takahashi, S. 2009. Coral bleaching: the role of the host. *Trends Ecol. Evol.* 24(1):16-20.
- Baker, A. C., Glynn, P. W. and Riegl, B. 2008. Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuar. Coast. Shelf.* 80(4):435-471.
- Banaszak, A.T., Ayala-Schiaffino, B.N., Rodríguez-Román, A., Enríquez, S. and Iglesias-Prieto, R. 2003. Response of *Millepora alcicornis* (Milleporina: Milleporidae) to two bleaching events at Puerto Morelos reef, Mexican Caribbean. *Rev. Biol. Trop.* 58:1211-1221.
- Barshis, D. J., Ladner, J. T., Oliver, T. A., Seneca, F. O., Traylor-Knowles, N. and Palumbi, S. R. 2013. Genomic basis for coral resilience to climate change. *PNAS.* 110(4):1387-1392.
- Bianchini, G., Lotti, T., Campolmi, P., Casigliani, R. and Panconesi, E. 1988. Coral ulcers and vasculitis. *Int. J. Dermatol.* 27:506-507.

- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. and Prinsep, M. R. 2013. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 30(2):237-323.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. and Prinsep, M. R. 2012. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 29: 144-222
- Blunt, J. W., Copp, B., R., Hu, W.P., Munro, M.H., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2007. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 24:31-86.
- Blunt, J. W., Copp, B., R., Hu, W.P., Munro, M.H., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2008. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 25:35-94.
- Blunt, J. W., Copp, B., R., Hu, W.P., Munro, M.H., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2009. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 26:170-224.
- Blunt, J. W., Copp, B., R., Munro, M.H., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2010. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 27:165-237.
- Blunt, J. W., Copp, B., R., Munro, M.H., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2011. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 28:196-268.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2004. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 21:1-49.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2005. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 22:15-61.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2006. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 23:26-78.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Murno, M.H., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2003. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 20:1-48.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1):248-254.
- Brown, B.E. 1997. Coral bleaching, causes and consequences. *Coral Reefs.* 16:129-138.
- Burke, J. E. and Dennis, E. A. 2009. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc. Drug Ther.* 23(1):49-59.

- Campos, L. B., Pucca, M. B., Roncolato, E. C., Bertolini, T. B., Netto, J. C. and Barbosa, J. E. 2013. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian *Bothrops spp.* venoms. *Toxicon*. 76:1-10.
- Cartwright, P. and Collins, A. 2007. Fossils and phylogenies: integrating multiple lines of evidence to investigate the origin of early major metazoan lineages. *Integr Comp Biol*. 47(5):744-751.
- Chapman, G. B. and Tilney, L. G. 1959. Cytological studies of the nematocysts of Hydra. II. The stenoteles. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5:79-84.
- Coles, S.L. and Brown, B.E. 2003. Coral bleaching-capacity for acclimatization and adaptation. *Adv. Mar. Biol.* 46:183-223.
- Collins, A. G. 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *J. Evolution Biol.* 15(3):418-432.
- Collins, A. G. 2009. Recent insights into cnidarian phylogeny. *Smithsonian Contributions to Marine Sciences*. 38:139-149.
- Collins, A. G., Schuchert, P., Marques, A. C., Jankowski, T., Medina, M. and Schierwater, B. 2006. Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *System. Biol.* 55(1):97-115.
- Coralpedia, your guide to Caribbean corals and sponges.[http://coralpedia.bio.warwick.ac.uk/sp/corals/millepora\\_striata.html](http://coralpedia.bio.warwick.ac.uk/sp/corals/millepora_striata.html). Consulta: 09/12
- Daly, M., Brugler, M. R., Cartwright, P., Collins, A. G., Dawson, M. N., Fautin, D. G. and Stake, J. L. 2007. The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa.*, 1668:127-182.
- Davies, P.J. and Montaggioni, L. 1985. Reef growth and sea-level change: the environmental signature. *Proc. 5ht Int. Coral Reef Symp.* 3:477-511.
- DeSalvo, M. K., Estrada, A., Sunagawa, S. and Medina, M. 2012. Transcriptomic responses to darkness stress point to common coral bleaching mechanisms. *Coral Reefs*. 31(1):215-228.

- Diaz, B.L. and Arm, J.P. 2003. Phospholipase A2. Prostaglandins Leukot. *Essent. Fatty Acids*. 69:87-97.
- Douglas, A.E. 2003. Coral bleaching-how and why? *Mar. Pollut. Bull.* 46:385-392.
- Dove, S., Ortiz, J. C., Enriquez, S., Fine, M., Fisher, P., Iglesias-Prieto, R. and Hoegh-Guldberg, O. 2006. Response of holosymbiont pigments from the scleractinian coral *Montipora monasteriata* to short-term heat stress. *Limnol. Oceanogr.* 51:1149-1158.
- Dunlap, W. C. and Yamamoto, Y. 1995. Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 112(1):105-114.
- Fenical, W., Jensen, P. R., Palladino, M. A., Lam, K. S., Lloyd, G. K. and Potts, B. C. 2009. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17(6):2175-2180.
- Fenical, W., Okuda, R.K. Bandurraga, M.M., Culver, V. and Jacobs, R.S. 1981. Lophotoxin: a novel neuromuscular toxin from Pacific sea whips of the genus *Lophogeorgia*. *Science*. 212:1512-1514.
- Ferchmin, P.A., Pagán, O.R., Ulrich, H., Szeto, A.C., Hann, R.M. and Eterović, V.A. 2009. Actions of octocoral and tobacco cembranoids on nicotinic receptors. *Toxicon*. 54:1174-1182.
- Fernández. A.M.A. and Rivas, G. (2007). Niveles de organización en animales. Distrito Federal, UNAM, 79–82.
- Fusetani, N. 2011. Antifouling marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 28(2):400-410.
- García-Arredondo, A., Rojas, A., Iglesias-Prieto, R., Zepeda-Rodriguez, A. and Palma-Tirado, L. 2012. Structure of nemoatocysts isolated from the fire corals *Millepora alcicornis* and *Millepora complanta*(Cnidaria: Hydrozoa). *J. Venom. Anim. Toxins*. 18(1):109-115.
- García-Arredondo, A., Rojas-Molina, A., Ibarra-Alvarado, C. and 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.*, 396:171–176.

- Garcia-Arredondo. 2011. Purificación, caracterización de la estructura primaria y elucidación del mecanismo de acción de toxinas presentes en el veneno de *Millepora complanata*. Tesis doctoral
- Gordon, B. R. and Leggat, W. 2010. Symbiodinium—Invertebrate symbioses and the role of metabolomics. *Marine drugs*. 8(10):2546-2568.
- Griffin, S. P. and Bhagooli, R. 2004. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *J. Exp. Mar. Biol Ecol.* 302(2):201-211.
- Grotendorst, G.R. and Hessinger, D.A. 2000. Enzymatic characterization of the major phospholipase A2 component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon*. 38:931-943.
- Hoegh-Guldberg O., Loya Y., Bythell J., Fitt W., Gates R., Iglesias-Prieto R., Lesser M., McClanahan T., Woesik R. and Wild C. 2009 Bleaching and Relate Ecological Factors. Ed. Currie Communications.
- Hoegh-Guldberg, O. 2009. Climate change and coral reefs: Trojan horse or false prophecy? *Coral Reefs*. 28(3):569-575.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, A.J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, A.J. and Caldeira, K. 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science.*, 318:1737 - 1742.
- Hoffmann, K., Hermanns-Clausen, M., Buhl, C., Büchler, M.W., Schemmer, P., Mebs and D., Kaufenstein, S. 2008. A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury. *Toxicon*. 51:1535-1537.
- Hofmann, G. E., Burnaford, J. L. and Fielman, K. T. 2005. Genomics-fueled approaches to current challenges in marine ecology. *Trends. Ecol. Evol.* 20(6):305-311.
- Holstein, T. and Tardent, P. 1984. An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. *Science*. 223(4638):830-833.
- Huang, D. 2012. Threatened reef corals of the world. *PLoS. One.*, 7(3): e34459.

- Hume, B., D'Angelo, C., Burt, J., Baker, A. C., Riegl, B. and Wiedenmann, J. 2013. Corals from the Persian/Arabian Gulf as models for thermotolerant reef-builders: Prevalence of clade C3 Symbiodinium, host fluorescence and ex situ temperature tolerance. *Marine. Poll. Bull.* 72(2):313-322
- Ibarra-Alvarado, C., García, J.A., Aguilar, M.B., Rojas, A., Falcón, and A., Heimer de la Cotera, E.P. 2007. Biochemical and pharmacological characterizations obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 146:511-518.
- Iglesias-Prieto, R. 2003. Response of *Millepora alcicornis* (Milleporina: Milleporidae) to two bleaching events at Puerto Morelos reef, Mexican Caribbean. *Rev. Biol. Trop.* 58:1211-1221.
- Iglesias-Prieto, R., Matta, J.L., Robins, W.A. and Trench, R.K. 1992. Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10302-10305.
- Iguchi, A., Iwanaga, S. and Nagai, H. 2008. Isolation and characterization of a novel protein toxin from fire coral. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365(1):107-112.
- Jaques, R. and Schachter, M. 1954. A sea anemone extract (thalassine) which liberates histamine and a slow contracting substance. *Br. J. Pharmacol.* 9(1):49-52.
- Jain, R., Sonawane, S. and Mandrekar, N. 2008. Marine organisms: Potential source for drug discovery. *Current Science-Bangalore.* 94(3):292.
- Jones, R.J., Hoegh-Guldberg, O., Larkum, A.W.D. and Schreiber, U. 1998. Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO<sub>2</sub> fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant Cell Environ.* 21:1219-1230.
- Kayal, E., Roure, B., Philippe, H., Collins, A. G. and Lavrov, D. V. 2013. Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. *BMC Evol. Biol.* 13(1):5.

- Kem, W.R. and Dunn, B.M. 1988. Separation and characterization of four different amino acid sequence variants of a sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolysin. *Toxicon*. 26:997-1008.
- Khoo, K.S., Kam, W.K., Khoo, H.E., Gopalakrishnakone, P. and Chung, M.C.M. 1993. Purification and partial characterization of two cytolysins from a tropical sea anemone *Heteractis magnifica*. *Toxicon*. 31:1567-1579.
- LaJeunesse, T. C., Bonilla, H. R., Warner, M. E., Wills, M., Schmidt, G. W. and Fitt, W. K. 2008. Specificity and stability in high latitude eastern Pacific coral-algal symbioses. *Limnol. Oceanogr.* 53(2):719.
- Lesser, M.P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68:253-278.
- Lewis, J. 1989. The ecology of *Millepora*. *Coral Reefs*. 8:99-107.
- Lewis, J. B. 1992. Heterotrophy in corals: Zooplankton predation by the hydrocoral *Millepora complanata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 90:251-256.
- Lewis, J.B. 2006. Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Adv. Mar Biol.* 50:1-55.
- Mahnir, V.M. Kozlobskaya, E.P. and Kalinovsky, A.I. 1992. Sea anemone *Radianthus macrodactylus* – a new source of palytoxin. *Toxicon*. 30:1449-1456.
- Mariscal, R. N. (1984). Cnidaria: cnidae. In *Biology of the Integument*. Springer Berlin Heidelberg. Pp:57-68
- Mariscal, R. N., McLean R. B. and 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.
- Marshall, P. A. and Schuttenberg, H. 2006. A reef manager's guide to coral bleaching. Great Barrier Reef Marine Park Authority.
- Martínez-Romero, G., Rucavado, A., Lazcano, D., Gutiérrez, J. M., Borja, M., Lomonte, B. and Zugasti-Cruz, A. (2013). Comparison of venom composition and biological activities of the subspecies—*Crotalus lepidus* *Lepidus*, *Crotalus lepidus klauberi*—and *Crotalus lepidus morulus* from Mexico. *Toxicon*. 71:84-95.

- McWilliams, J. P., Côté, I. M., Gill, J. A., Sutherland, W. J. and Watkinson, A. R. 2005. Accelerating impacts of temperature-induced coral bleaching in the Caribbean. *Ecol.* 86(8):2055-2060.
- Meier, S., Jensen, P. R. Adamczyk, P., Bächinger, H.P., Holstein, T. W., Engel, J., Ozbek, S. and Grzesiek, S. 2007. Sequence-structure and structure-function analysis in cysteine-rich domains forming the ultrastable nematocyst wall. *J. Mol. Biol.* 368:718-728.
- Messerli, S.M. and Greenberg, R.M. 2006. Cnidarian toxins acting on voltage-gated ion channels. *Mar. Drugs.* 4:70-81.
- Meyer, E. and Weis, V. M. 2012. Study of cnidarian-algal symbiosis in the “omics” age. *Biol, Bull.* 223(1):44-65.
- Middlebrook, R., Wittle, L., Scura, E. and Lane, C. 1971. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. *Toxicon.* 9:333-336.
- Mieog, J. C., van Oppen, M. J., Berkelmans, R., Stam, W. T. and Olsen, J. L. 2009. Quantification of algal endosymbionts (Symbiodinium) in coral tissue using real-time PCR. *Mol. Ecol. Resour.* 9(1):74-82.
- Moats, W. E. 1992. Fire coral envenomation. *J. Wilderness. Med.* 3:284-287.
- Moore, R.E. and Scheuer, P.J. 1971. Palytoxin: a new marine toxin from Coelenterate. *Science.* 172:495.
- Murata, J., Stake, M. and Suzuki, T. 1963. Studies on snake venom XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venoms. *J. Biochem.* 53:431-443.
- Nevalainen, T. J. 2008. Phospholipases A in the genome of the sea anemone *Nematostella vectensis*: *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics. Proteomics.* 3(3):226-233.
- Nevalainen, T.J., Peuravuori, H.J., Quinn, R.J., Llewellyn, L.E., Benzie, J.A.H., Fenner, P. J. and Winkel, K. D. 2004. Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol.* 139:731-735.
- Obura, D. O. 2009. Reef corals bleach to resist stress. *Mar. Pol.I Bull.* 58(2):206-212.

- Oliveira, J.S., Redaelli, E., Zaharenko, A.J., Cassulini, R.R., Konno, S., Pimenta, D.C., Freitas, J.C., Clare, J.J. and Wanke, E. 2004. Binding specificity of sea anemone toxins to Nav 1.1-1.6 sodium channels. *J. Biol. Chem.* 279:33323-33335.
- Oliver, J. K., Berkelmans, R., and Eakin, C. M. 2009. Coral bleaching in space and time. In *Coral bleaching*. Springer Berlin Heidelberg. Pp. 21-39
- Östman, C. 2000. A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Sci. Mar.* 64:31-46.
- Özbek, S., Balasubramanian, P. G., and Holstein, T. W. 2009. Cnidocysts structure and biomechanics of discharge. *Toxicon.* 54:1038-1045.
- Palumbi, S. R., Barshis, D. J., Traylor-Knowles, N. and Bay, R. A. 2014. Mechanisms of reef coral resistance to future climate change. *Science.* 344(6186):895-898.
- Prasad, G.V., Vincent, L., Hamilton, R. and Lim, K. 2006. Minimal change disease in association with fire coral (*Millepora* species) exposure. *Am. J. Kidney. Dis.* 47:15-6.
- Radwan, F. F. 2002. Comparative toxinological and immunological studies on the nematocyst venoms of the Red Sea fire corals *Millepora dichotoma* and *M. platyphylla*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 131(3): 323-334.
- Radwan, F.F.Y. and Aboul-Dahab, H. M. 2004. Milleporin-1, a new phospholipase A2 active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocysts. *Comp. Biochem. Physiol., C.* 139:267-272.
- Razpotnik, A., Križaj, I., Šribar, J., Kordiš, D., Maček, P., Frangež, R. and Turk, T. 2010. A new phospholipase A2 isolated from the sea anemone *Urticina crassicornis*—its primary structure and phylogenetic classification. *FEBS. Journal.* 277(12):2641-2653.
- Rogers, J.C., Qu, Y., Tanada, T.N., Scheuer, T. and Catterall, W.A. 1996. Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and

sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na<sup>+</sup> channel alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 271:15950-15962.

- Rojas, A., Torres, M., Rojas, J.I., Feregrino, A. and Heimer-de la Cotera, E.P. 2002. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon.* 40:777-785.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R. and Zilber-Rosenberg, I. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev. Microbiol.* 5:355-362.
- Sagi, A., Rosenberg, L., Ben-Meir, P. and Hauben, D.J. 1987. The "fire coral" (*Millepora dichotoma*) as a cause of burns: a case report. *Burns. Incl. Therm. Inj.* 13:325-326.
- Schägger, H. and Von-Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
- Schuchert, P. 2009. World hydrozoa data base. [<http://www.marinespecies.org/hydrozoa>]. Consulta: 30/05/2010.
- Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J.-M., Baress, L. and Lazdunski, M. 1995. Kalicludines and kaliseptine: two different classes of sea anemone toxins for voltage-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 270: 25121-25126.
- Six, D. A. and Dennis, E. A. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488(1):1-19.
- Solomon, E.P., Berg, L.R., Martín, D.W. and Villee, C. 1998. Biología de Villee. 4<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Interamericana, México D.F. 598-602.
- Steele, R. E., David, C. N. and Technau, U. 2011. A genomic view of 500 million years of cnidarian evolution. *Trends. Genet.* 27(1):7-13.
- Strychar, K. B. and Sammarco, P. W. 2009. Exaptation in corals to high seawater temperatures: Low concentrations of apoptotic and necrotic cells in host coral tissue under bleaching conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 369(1):31-42.

- Sunagawa, S., Wilson, E. C., Thaler, M., Smith, M. L., Caruso, C., Pringle, J. R. and Schwarz, J. A. 2009. Generation and analysis of transcriptomic resources for a model system on the rise: the sea anemone *Aiptasia pallida* and its dinoflagellate endosymbiont. *Bmc. Genomics*. 10(1):258.
- Šuput, D. (2009). *In vivo* effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon*. 54(8):1190-1200.
- Suput, D. 2011. Interactions of cnidarian toxins with the immune system. *Inflamm. Allergy. Drug. Targets*. 10(5):429-437.
- Talvinen, K.A. and Nevalainen, T.J. 2002. Cloning of a novel phospholipase A2 from the cnidarian *Adamsia carciniopados*. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 132:571-578.
- Tamarozzi, M. B., Soares, S. G., Marcussi, S., Giglio, J. R. and Barbosa, J. E. 2006. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. *BBA-Gen. Subjects*. 1760(9):1450-1457.
- Tardent, P. 1995. The cnidarian cnidocyte, a hightech cellular weaponry. *BioEssays*. 17(4):351-362.
- Tardent, P., Zierold, K., Klug, M. and Weber, J. 1990. X-ray microanalysis of elements present in the matrix of cnidarian nematocysts. *Tissue and Cell*. 22(5):629-643.
- Tchernov, D., Gorbunov, M.Y., de Vargas, C., Narayan Yadav, S., Milligan, A.J., Haggblom, M. and Falkowski, P.G. 2004. Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:13531-13535.
- Ternon, E. and Thomas, O. P. 2014. Toxins from Marine Invertebrates. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*. 77.
- Torres, M., Aguilar, M. B., Falcón, A., Sánchez, L., Radwan, F. F. Y., Burnett, J. W., Heimer-de la Cotera, E. and Arellano, R.O. 2001. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon*. 39:1297-1307.

- Turk, T. and Kem, W. R. 2009. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*. 54(8):1031-1037.
- Venn, A.A., Loram J.E. and Douglas A.E. 2008. Photosynthetic symbioses in animals. *J. Exp. Bot.* 59:1069 - 1080.
- Veron, J. E. N. 1986. Corals of Australia and the Indo-Pacific. London: Angus & Robertson Publishers.
- Veron, J. E. N., Hoegh-Guldberg, O., Lenton, T. M., Lough, J. M., Obura, D. O., Pearce-Kelly, P. and Rogers, A. D. 2009. The coral reef crisis: The critical importance of < 350ppm CO<sub>2</sub>. *Marine. Poll. Bull.* 58(10):1428-1436.
- Warner, M.E., Fitt, W.K. and Schmidt, G.W. 1996. The effect of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae in hospite from four different species of reef coral: A novel approach. *Plant. Cell. Environ.* 19:291-299.
- Warner, M.E., Fitt, W.K. and Schmidt, G.W. 1999. Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: a determinant of coral bleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:8007-8012.
- Watson, G.M. Hessinger, S.A. 1989. Cnidocyte mechanoreceptors are tuned to the movement of swimming prey by chemoreceptors. *Science.*, 243:1589-1591.
- Watters, M.R. 2005. Tropical marine neurotoxins: venoms to drugs. *Semin. Neurol.* 25:278-289.
- Weber, J. 1990. Poly( $\gamma$ -glutamic acid)s are the major constituents of nematocysts in hydra (Hydrozoa, Cnidaria). *J. Biol. Chem.* 265:9664-9669.
- Weerdt, W.H. and P.W. Glynn, 1991. A new and presumably now extinct species of Millepora (Hydrozoa) in the eastern Pacific. *Zool. Meded. Leiden.* 65:267-276.
- 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.
- Weis, V.M. 2008. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J. Exp. Biol.* 211:3059-3066.



- Wilkinson, C. R. and Souter, D. (Eds.). 2008. Status of Caribbean coral reefs after bleaching and hurricanes in 2005 (p. 148). *Global Coral Reef Monitoring Network*.
- Wilson, S. K., Graham, N. A., Pratchett, M. S., Jones, G. P. and Polunin, N. V. 2006. Multiple disturbances and the global degradation of coral reefs: are reef fishes at risk or resilient? *Global Change Biol.* 12(11):2220-2234.
- Wittle, L.W., Middlebrook, R. and Lane, C. 1971. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicornis*. *Toxicon.* 9:327-331.
- Wittle, L.W., Scura, E.D. and Middlebrook, R.E., 1974. Singing coral (*Millepora tenera*) toxin: a comparison of crude extracts with isolated nematocyst extracts. *Toxicon.* 12:481-486.
- Wu, C.H. 2009. Palytoxin: Membrane mechanisms of action. *Toxicon.* 54:1183-1189.
- Yanagita, T. M. 1960. Physiological mechanism of nematocyst responses in sea-anemone. Effects of surface-active agents on the cnidae in situ and in isolation. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 1(2):140-154.
- Yellowlees, D., Rees, T. A. V. and Leggat, W. 2008. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant, cell & environment.* 31(5), 679-694.