



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA  
DE TOXINAS TERMOESTABLES PRODUCIDAS POR EL  
HIDROCORAL *Millepora complanata*”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

**MARIELA ÁLVAREZ CÁRDENAS**

DIRIGIDA POR

**Dr. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO**

SANTIAGO DE QUERETARO, QUERETARO, 2013.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA  
DE TOXINAS TERMOESTABLES PRODUCIDAS POR EL  
HIDROCORAL *Millepora complanata*”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**MARIELA ÁLVAREZ CÁRDENAS**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO**

**SINODALES**

**Dr. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO \_\_\_\_\_**

**DIRECTOR**

**Dra. MARÍA ALEJANDRA ROJAS MOLINA \_\_\_\_\_**

**SINODAL**

**Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH \_\_\_\_\_**

**SINODAL**

**Dra. JUANA ISELA ROJAS MOLINA \_\_\_\_\_**

**SINODAL**

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE	i
INDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Biodiversidad de los arrecifes coralinos de México	1
1.2. Phylum Cnidaria	5
1.3 Genero <i>Millepora</i>	7
1.4 Toxinas del Phylum Cnidaria	9
1.4.1 Toxinas que actúan sobre canales de sodio voltaje dependientes (Na <sub>v</sub> )	12
1.4.2 Toxinas que actúan sobre canales de potasio voltaje dependiente (K <sub>v</sub> )	12
1.4.3 Proteínas citolíticas o citolisinas	14
1.4.4 Metabólitos secundarios	16
1.4.5. Perspectivas en la búsqueda de compuestos bioactivos en cnidarios	21
1.5 Estudios toxicológicos previos en venenos de <i>Millepora</i>	21
2. HIPÓTESIS	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 General	27
3.2 Específicos	27
4. METODOLOGÍA	28
4.1 Materiales	28
4.1.1 Material biológico	28
4.1.2 Preparación y conservación de los extractos	28
4.1.3 Evaluaciones farmacológicas	28
4.1.4 Análisis cromatográficos	29
4.2 Reactivos	29
4.2.1 Preparación, conservación y tratamiento de los extractos	29
4.2.2 Evaluaciones farmacológicas	29
4.2.3 Análisis cromatográficos	30
4.3 Métodos	30

4.3.1 Preparación del extracto acuoso de <i>Millepora complanata</i>	30
4.3.2 Determinación de proteínas totales método de Bradford	30
4.3.3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso de <i>Millepora complanata</i> mediante FPLC	31
4.3.4 Análisis de las fracciones mediante HPLC	31
4.3.5 Electroforesis en gel	32
4.3.6 Obtención de los compuestos no proteínicos mediante el método de reciclaje y corte	32
4.3.7 Análisis espectroscópicos y espectrométricos	32
4.3.8 Modelo de aorta aislada de rata	33
4.3.9 Ensayo de hemólisis	34
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	35
6. RESULTADOS	36
6.1 Preparación del extracto acuoso de <i>Millepora complanata</i>	36
6.2 Bioensayos	36
6.2.1. Ensayo de aorta aislada de rata	36
6.2.2 Ensayo de hemólisis	37
6.3 Separación cromatográfica mediante FPLC	37
6.4 Cromatografía de exclusión mediante FPLC	38
6.5 Cromatografía en fase reversa mediante HPLC	41
7. DISCUSIÓN	49
8. CONCLUSIONES	54
9. REFERENCIAS	55
ANEXOS	60

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Condiciones cromatográficas para la inyección de MC1-I	41
2	Tiempos de retención de la fracción MC1-I	43
3	Gradiente de las fases móviles utilizadas para la separación de MC1-IA	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	28 ecorregiones marinas que rodean México	3
2	Niveles del arrecife	4
3	Organización que presentan los cnidarios	5
4	Clases de Cnidarios	6
5	Nematocisto	8
6	Lesiones causadas por corales del genero <i>Millepora</i>	9
7	Análogos de la Lophotoxina	19
8	Análogos de la Palitoxina	20
9	Efecto vasoconstrictor del extracto de <i>M. complanata</i>	37
10	Efecto hemolítico del extracto <i>M. complanata</i>	38
11	Cromatografía de intercambio iónico	39
12	Cromatografía de exclusión	40
13	Cromatografía de alta eficiencia en fase reversa.	42
14	Método de reciclaje y corte	44
15	Gradiente en columna C4	45
16	Separación con fase móvil constante	46
17	Cromatograma obtenido a 250 nm	47
18	Cromatograma obtenido a 350 nm	48
19	RMN protónica de la fracción MC1-IA-e	60
20	<sup>13</sup> C RMN de la fracción MC1-IA-e	61
21	Espectroscopia de correlación (COSY) de la fracción MC1-IA- e	62

## RESUMEN

*Millepora complanata* es un cnidario que se encuentra habitualmente en arrecifes coralinos del Caribe Mexicano. Este organismo se conoce comúnmente como “coral de fuego” debido a su capacidad de causar lesiones dolorosas similares a quemaduras en la piel humana. En estudios previos se ha encontrado que el extracto acuoso de *M. complanata* presenta actividad hemolítica, vasoconstrictora y de fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Además, el extracto es letal en ratones por vía intravenosa, produciéndoles severos daños en tejido renal y pulmonar. La desnaturalización del contenido de proteína del extracto no afecta sus efectos letales pero su capacidad para inducir hemólisis y daños histopatológicos si se pierde completamente. Esto indica que el extracto contiene toxinas termoestables que inducen una muerte inmediata y citolisinas termolábiles que inducen una muerte tardía. En el presente trabajo, se purificó un componente bioactivo no proteínico del extracto mediante diversos análisis cromatográficos con el fin de establecer un método adecuado de purificación de este tipo de compuestos y obtener información sobre su estructura química.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Biodiversidad de los arrecifes coralinos de México

Los países megadiversos constituyen un selecto grupo de naciones que poseen una gran cantidad y diversidad de especies (albergan entre el 60 y 70 por ciento de la diversidad conocida en el planeta). México es considerado un país megadiverso no solo debido a su gran riqueza de especies, sino también a su diversidad genética y de ecosistemas, ocupando el cuarto lugar mundial entre los países megadiversos. En la parte continental de nuestro país podemos encontrar casi todos los tipos de vegetación reconocidos en el mundo ya que nuestro país confluyen dos zonas biogeográficas (Neártica y Neotropical), hay una gran cantidad de relieves que funcionan como barreras que impiden que las poblaciones se extiendan a otras regiones, esto aunado a la posición geográfica proporciona una gran variedad de climas. No obstante, gran parte de la riqueza natural de México se encuentra también en los ecosistemas acuáticos, ya que nuestro país se encuentra entre las influencias oceánicas del Atlántico centro-occidental y el Pacífico centro-oriental, lo cual le confiere niveles de riqueza de especies, diversidad y endemismos comparables con la biota continental (Sarukhán y col., 2009). En el ámbito marino existe también una gran diversidad de ecosistemas, como taludes continentales, planicies abisales, islas oceánicas, fosas y cadenas montañosas submarinas, de tal modo que la diversidad marina costera llega incluso a ser mayor que la continental. Sin embargo, debido a que la exploración marina es difícil y costosa, el conocimiento que se tiene sobre sus ecosistemas y especies es menor que en el caso de los ecosistemas terrestres (SEMARNAT, 2011). Para caracterizar el fondo marino en cuanto a su profundidad y topografía, los mares mexicanos quedan ubicados en 28 ecorregiones que se muestran en la Figura 1 y que comprenden: 1) Plataforma del Golfo de México norte, 2) Talud del Golfo de México norte, 3) Plataforma del Golfo de México sur, 4) Talud del Golfo de México sur, 5) Planicie del Golfo de México, 6) Plataforma del Caribe Mesoamericano, 7) Talud del Caribe Mesoamericano, 8) Cuenca de Yucatán, 9) Cadena montañosa



caimán, 10) Plataforma del Golfo de Tehuantepec, 11) Talud del Golfo de Tehuantepec, 12) Cresta de Tehuantepec, 13) Cuenca de Guatemala, 14) Plataforma del Pacífico transicional mexicano, 15) Talud del Pacífico transicional mexicano, 16) Trinchera mesoamericana, 17) Dorsal del Pacífico oriental, 18) Planicies y montañas marinas del Pacífico transicional mexicano, 19) Archipiélago oceánico Revillagigedo, 20) Plataforma cortesiana, 21) Grandes islas, 22) Talud y depresiones del Golfo de California, 23) Planicies y montañas Marinas del Golfo de California, 24) Plataforma sandieguina, 25) Margen continental de Baja California, 26) Planicies y montañas marinas del Pacífico sudcaliforniano, 27) Islas oceánicas del Pacífico sudcaliforniano, y 28) Planicies y montañas marinas del Pacífico transicional de Monterrey.

La investigación oceanográfica de los ecosistemas marinos de manera integrada es reciente. Hay poca inversión y un lento progreso en formación de recursos humanos. Aunado a esto, hay una pobre vinculación entre los sectores académico, privado y gubernamental que dificulta el manejo de recursos marinos y costeros de México. Debido a lo anterior en México se tiene poco conocimiento de la biodiversidad marina de todos los grupos, tanto de aguas profundas como someras. Se desconocen también las consecuencias ambientales y socioeconómicas de las modificaciones en los servicios que nos proporcionan los ecosistemas marinos. Además en México se carece de información científica sólida para hacer un uso sustentable y una conservación adecuada sus mares. Desafortunadamente, el deterioro ambiental, con la consecuente pérdida de hábitats naturales de biodiversidad marina y de muchos recursos socioeconómicos, sigue incrementándose cada día. Actualmente México es uno de los países con los ecosistemas marinos más frágiles y vulnerables ante los impactos de los fenómenos naturales y de origen antropogénico entre ellos el cambio climático (Sarukhán y col., 2009).

Los arrecifes coralinos constituyen los ecosistemas marinos de mayor riqueza biológica. En México existen alrededor de 60 especies de corales constructores de

arrecifes y tan solo en el sur del Golfo de México se han registrado 1,983 especies de plantas y animales asociados a los arrecifes. (SEMARNAT, 2011). Aunque diferentes formaciones coralíferas se encuentran tanto en el litoral del Pacífico

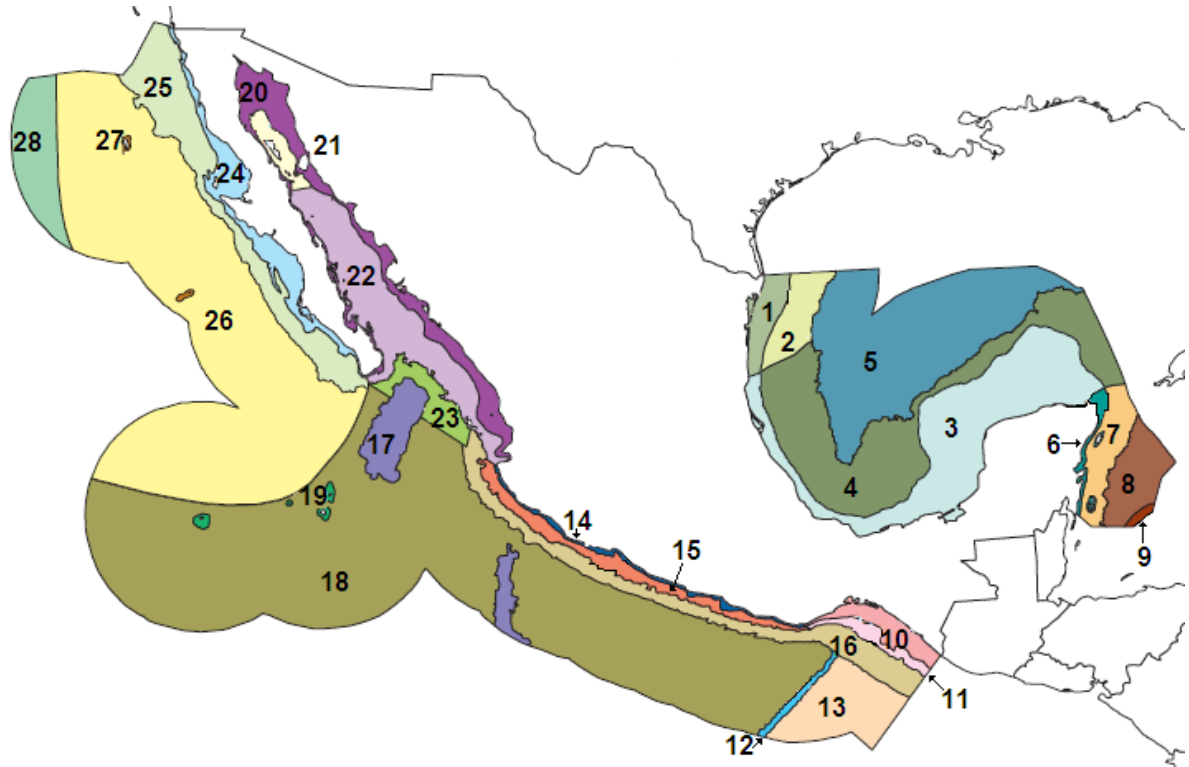


Figura 1. 28 ecorregiones marinas que rodean México.

como del Atlántico, la formación más importante es el Sistema Arrecifal Mesoamericano en el Mar Caribe, considerada como la segunda barrera arrecifal más grande del mundo, compartida con Belice y Guatemala (Sarukhán y col., 2009).

Los arrecifes coralinos se extienden en aguas poco profundas y cálidas alrededor de islas tropicales y masas de tierras continentales, constituyendo una acumulación única de material esquelético muerto, formado por organismos productores de carbonato de calcio: coral vivo (phylum Cnidaria), algas rojas coralinas (Phylum Rodophyta), algas calcáreas verdes (Género *Halimeda*), foraminíferos (Phylum Rhizaria, Clase Foraminifera) y moluscos (Phylum Mollusca). Estos organismos se

desarrollan sobre asentamientos estables, tales como las plataformas continentales y los volcanes submarinos (Figura 2). De este modo forman una red de carbonato de calcio que actúa como una trampa para los nutrientes, constituyendo un oasis de producción en un mar pobre en nutrientes (Smith y col., 2001).

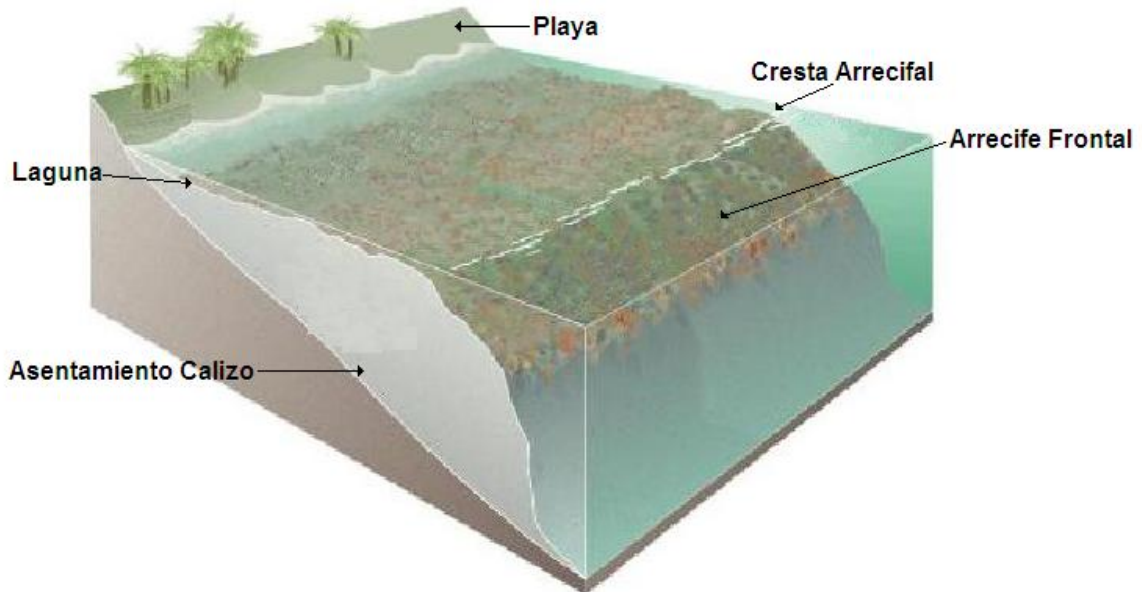


Figura 2. Niveles del arrecife. La imagen muestra los niveles del arrecife y el asentamiento calizo sobre las plataformas continentales, islas y volcanes marinos que permite el desarrollo de este importante ecosistema.

Debido a su amplia biodiversidad, comparable a la de las selvas altas perennifolias, los arrecifes de coral presentan un alto valor comercial y pesquero (Rojas y col., 2002; Sarukhán y col., 2009). De tal modo que el estudio de las especies constructoras de arrecifes coralinos en México resulta indispensable debido a que al ser un país megadiverso, se tiene el compromiso de identificar y estudiar el comportamiento de estas especies para así establecer programas de conservación de estos ecosistemas marinos tan valiosos. Así mismo, los organismos constructores de arrecifes pertenecientes al phylum Cnidaria, debido a sus característicos mecanismos de defensa, constituyen una fuente rica de compuestos

bioactivos novedosos con alto potencial farmacológico que vale la pena explorar (Rojas y col., 2012).

## 1.2. Phylum Cnidaria

Los cnidarios representan un antiguo grupo de animales (>500 Mda de antigüedad) que nos revela uno de los primeros sistemas nerviosos en la evolución de los metozoarios (Özbek y col., 2009). Este phylum, está constituido por una gran diversidad de organismos acuáticos de simetría radial cuya organización es relativamente simple, consta de un saco hueco con una cavidad gastrovascular que contiene una sola abertura que cumple con la función de boca y ano (Figura 3). Esta abertura está rodeada de tentáculos que son utilizados para conducir el alimento hacia la cavidad gastrovascular. Por su parte, las paredes del cuerpo de los cnidarios constan de dos capas celulares: la epidermis externa (ectodermo) y la gastrodermis interna (endodermo) entre las cuales se encuentra un material gelatinoso llamado mesoglea (Rojas-Molina y col, 2012).

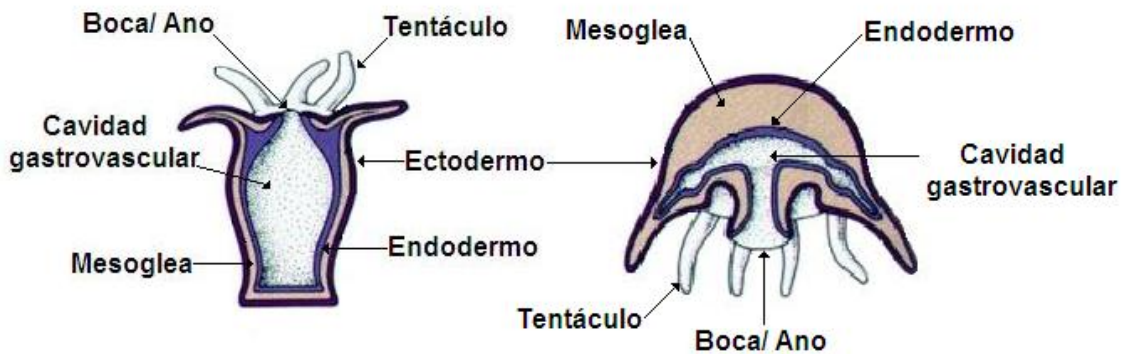


Figura 3. Organización de los cnidarios. Izquierda: forma corporal de pólipo. Derecha: forma corporal de medusa.

Actualmente los cnidarios se encuentran agrupados en cuatro clases principales (Figura 4) que son reconocidas por la mayoría de los sistemistas: *Anthozoa*, *Cubozoa*, *Scyphozoa* e *Hydrozoa* (Kem y Turk, 2009). Por ejemplo, organismos

como las anémonas, las gorgonias (corales blandos) y los corales escleractíneos (corales pétreos), pertenecen a la clase Anthozoa. Las medusas grandes pertenecen a la clase Scyphozoa. Las medusas cubo, como la avispa de mar, pertenecen a la clase Cubozoa. Finalmente, organismos como las hidras, la fragata portuguesa (comúnmente conocida como agua mala) y las especies del género *Millepora* (corales de fuego) pertenecen a la clase Hydrozoa (Rojas-Molina y col., 2012).



Figura 4. Clases de cnidarios; A) *Gorgonia (Iciligorgia schrammi)* clase Anthozoa; B) Medusa grande, clase Scyphozoa, C) Avispa de mar (*Chironex fleckeri*), clase Cubozoa, D) A la izquierda coral de fuego (*Millepora complanata*) y a la derecha fragata portuguesa (*Physalia physalis*) pertenecientes a la clase Hydrozoa.

El tipo celular característico de todos los cnidarios es el cnidocito (Figura 5), el cual sintetiza en su citoplasma un organelo urticante único llamado nematocisto. Estos organelos están armados con un fuerte filamento que inyecta veneno en las presas. Los nematocistos son de morfología variable y también son usados para captura de presas o para funciones defensivas y locomotoras (Özbek y col., 2009). Estructuralmente los nematocistos 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. Dentro de la cápsula del nematocisto se encuentra el filamento tubular invertido enrollado. Las paredes de la cápsula están hechas principalmente de una glucoproteína denominada NOWA y de un material similar al colágeno denominado minicolágeno (García-Arredondo, 2012). La cápsula de los nematocistos es altamente resistente y soporta una presión intracapsular (150 bar) generada por una alta concentración del polianión poli- $\gamma$ -glutamato. Bajo un estímulo apropiado, que puede ser químico y/o mecánico, el opérculo se abre liberando la presión osmótica interna. Esto provoca la proyección hacia el exterior del túbulo urticante, de tal modo que las toxinas almacenadas dentro de los nematocistos son inyectadas a las presas a través del túbulo (Özbek y col., 2009). Debido a su rol en la depredación, los nematocistos están localizados principalmente en los tentáculos, permitiéndoles a los animales de este phylum una captura de presas eficiente. De acuerdo a sus propiedades morfológicas los nematocistos se pueden dividir entre 25-30 tipos por lo tanto representan una característica importante para el agrupamiento taxonómico de los cnidarios (Beckmann y Özbeck, 2012).

### 1.3 Genero *Millepora*

Los hidrocorales del genero *Millepora* (phylum Cnidaria; clase Hidrozoa) son los segundos organismos constructores de arrecifes en todo el mundo, siendo los primeros los corales escleractínios (corales pétreos de la clase Anthozoa), sin embargo, a pesar de su amplia distribución en los arrecifes de coral de casi todo el

mundo, las especies del genero *Millepora* han recibido relativamente poca atención en estudios exhaustivos de arrecifes (Lewis, 2006).

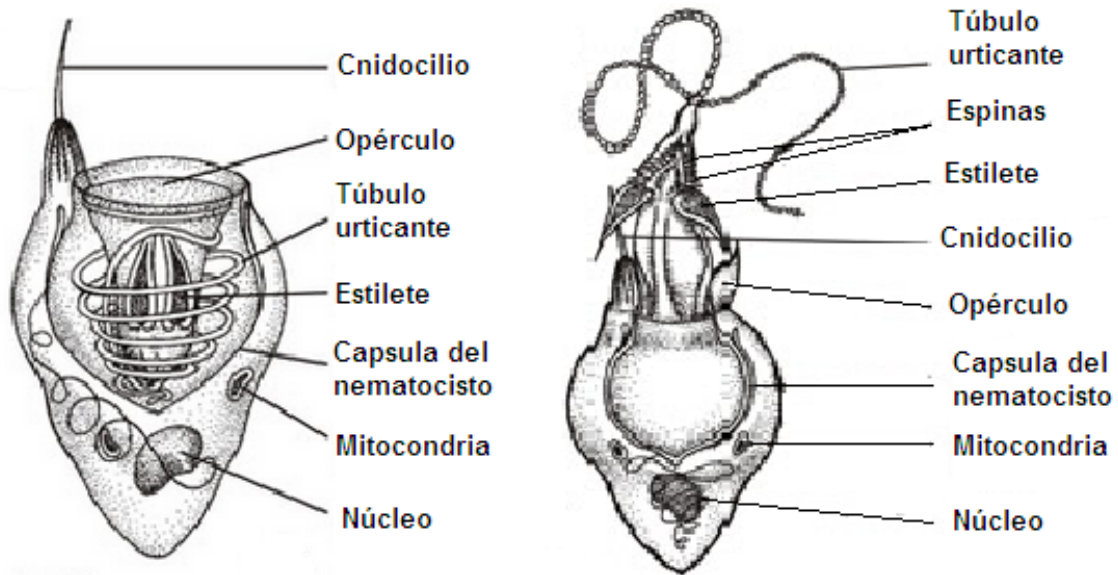


Figura 5. Nematocisto. A la izquierda se muestra un nematocisto en su forma en reposo, a la derecha la imagen muestra un nematocisto en su forma activa.

Las milleporas secretan un esqueleto calcáreo de forma incrustante o en posición vertical, a menudo de tamaño considerable. Los pólipos defensivos y de alimentación sobresalen a través de poros en el esqueleto, estos pólipos son numerosos y altamente tóxicos y por esta razón son llamados “corales urticantes” o “corales de fuego” (Lewis, 2006). Cuando se ponen en contacto con la piel humana, estas especies, pueden causar dolor intenso, erupciones y ampollas, como resultado de la liberación de toxinas no identificadas (Figura 6). La reacción usual al envenenamiento por “coral de fuego” esta generalmente limitada a irritación local y dolor punzante que se produce con una decoloración eritematosa de forma lineal. Esto puede ser seguido por urticaria y prurito. Estos síntomas desaparecen a través de un periodo de 1-2 semanas, ocasionalmente dejando áreas hiperpigmentadas (Moats, 1992). No obstante estas toxinas son capaces de inducir efectos tóxicos

sistémicos en humanos, incluyendo síndrome nefrótico, falla renal aguda, y edema pulmonar (Prasad y col., 2006).



Figura 6. Lesiones causadas por corales del género *Millepora*. A la izquierda se muestra una lesión reciente mientras que a la derecha se muestra una lesión después de una semana de contacto con el coral.

#### 1.4 Toxinas del phylum cnidaria

Se ha encontrado que los cnidarios presentan una amplia variedad de sustancias biológicamente activas que pueden ser consideradas como toxinas. Los estudios dirigidos hacia la identificación de estas toxinas indican que la mayor parte de éstas son de naturaleza proteínica (Nevalainen y col, 2004). Estas proteínas actúan como neurotoxinas o citolisinas. Cada veneno usualmente contiene polipéptidos citolíticos y neurotóxicos. Además de los péptidos y las proteínas también se han encontrado diversos metabolitos secundarios tóxicos en cnidarios (Kem y Turk, 2009).

Las investigaciones biológicas de extractos crudos son especialmente complicadas, ya que las sustancias activas en los tejidos pueden mezclarse con los componentes del veneno. Para entender las acciones de un veneno entero es necesario aislar y estudiar los constituyentes individuales. El trabajo pionero de Laszlo Béress y sus



colaboradores (1975) en Alemania y Francia es especialmente notable, ya que purificaron y caracterizaron farmacológicamente varios péptidos neurotóxicos de anemonas europeas por las pasadas tres décadas (Turk y Kem, 2009). Mientras que solo una pequeña fracción (<1%) de las especies conocidas de cnidarios han sido implicados en las picaduras en humanos, es probable que casi todos los miembros no parasitarios del phylum son tóxicos al menos para algunos animales. Ya han sido aisladas toxinas de especies que se consideran inofensivas en contacto con la piel humana pero son estudiadas por sus actividades biológicas (Frãzao, 2012; Turk y Kem, 2009). En los primeros años de investigación de los venenos de cnidarios el principal enfoque fue en los nematocistos, los cuales fueron reconocidos como los aparatos venenosos en las anemonas y las medusas por varios zoólogos en la mitad del siglo XIX (Turk y Kem, 2009).

El phylum cnidaria incluye organismos que se encuentran entre los animales más venenosos (Frãzao, 2012). Los venenos son secreciones complejas que están compuestas de muchos constituyentes activos, usualmente incluyen una variedad de toxinas y sustancias accesorias que facilitan el proceso de envenenamiento (Turk y Kem, 2009). La composición de venenos de cnidarios no es conocida a detalle, pero parecen contener una variedad de compuestos proteínicos. Actualmente alrededor de 250 de estos compuestos han sido identificados (péptidos, proteínas, enzimas e inhibidores de proteinasa) y sustancias no proteicas (purinas, compuestos de amonio cuaternario, aminas y betaínas biogénicas). Las toxinas que se definen como sustancias elaboradas por un organismo vivo que tienen un efecto adverso en algún proceso vivo, son para la adquisición de presas, pero también para disuadir predadores potenciales (con efectos neurotóxicos y cardiotoxicos) e incluso para pelear disputas territoriales.

Los cnidarios no son solo estudiados por sus toxinas y venenos, son una fuente de compuestos marinos naturales con propiedades terapéuticas, a saber actividad antitumoral. Además muchas de las toxinas que actúan sobre canales iónicos dependientes de voltaje son estudiados como una inspiración del diseño de

fármacos con aplicaciones terapéuticas, así como también con otras aplicaciones como herramientas de investigación e insecticidas (Bosmans, 2007; Turk y Kem, 2009).

En las primeras décadas del siglo XX, era imposible aislar y caracterizar químicamente los compuestos de venenos, porque difícilmente existían las técnicas bioquímicas de aislamiento, sin embargo el químico francés Richet parcialmente purificó, estudio y nombro dos componentes activos de extractos tentaculares de anemonas europeas, “congestina” y “thalasina”, obtenidos principalmente de *Actinia equina* pero también de *Anemonia sulcata*. Posteriormente se encontró que la thalasina libera histamina de los mastocitos y cuando se inyecta en la piel, causa la liberación de una sustancia de reacción lenta, que más tarde se demostró era una prostaglandina. Aunque se pensó en un principio que la thalasina era un ion trimetilamonio, estudios subsecuentes demostraron que esta simple amina carece de los efectos de la thalasina. Por lo tanto la identidad de la thalasina es aún desconocida, en 1975 se aislaron inicialmente tres neurotoxinas peptídicas. Los tres péptidos homólogos grandes se muestran prontos para retrasar el proceso de inactivación de los canales de sodio voltaje dependiente. La secuencia de aminoácidos de la toxina II de *A. sulcata* fue la primera en ser reportada como un péptido de cnidario (Turk y Kem, 2009).

La actividad de la congestina se debió probablemente a la equinatoxina, un péptido formador de poros, ya que ambos producen edema pulmonar y efectos cardiovasculares y se encuentran en la misma anemona. Richet también reporto la presencia de una toxina no dializable, la “hipnotoxina”, en tentáculos de un hidrozooario comúnmente referido como fragata portuguesa. Posteriormente, un largo complejo proteínico fue aislado de los nematocistos de *physalia* probablemente la misma “hipnotoxina” de Richet (Turk y Kem, 2009).

Las toxinas que más se han estudiado son las de anemonas marinas, comprenden principalmente proteínas y péptidos con características estructurales y

farmacológicas variadas y altamente eficientes para atacar diferentes animales tales como insectos, crustáceos y vertebrados. Entre las toxinas de anemona se incluyen dos tipos principales de toxinas: neurotoxinas, que consisten principalmente en péptidos capaces de modular la función de diversos tipos de canales iónicos de manera específica; y citolisinas, donde se incluyen proteínas de grandes pesos moleculares (Turk y Kem, 2009; Frãzao, 2012).

#### 1.4.1 Toxinas que actúan sobre canales de sodio voltaje dependientes ( $\text{Na}_v$ )

Las toxinas que más se han estudiado son las de anemonas marinas, comprenden principalmente proteínas y péptidos con características estructurales y farmacológicas variadas y altamente eficientes para atacar diferentes animales tales como insectos, crustáceos y vertebrados. Entre las toxinas de anemona se incluyen dos tipos principales de toxinas: neurotoxinas, que consisten principalmente en péptidos capaces de modular la función de diversos tipos de canales iónicos de manera específica; y citolisinas, donde se incluyen proteínas de grandes pesos moleculares (Turk y Kem, 2009; Frãzao, 2012).

#### 1.4.2 Toxinas que actúan sobre canales de potasio voltaje dependiente ( $\text{K}_v$ )

Hasta el momento, se reconocen tres grupos de toxinas peptídicas aisladas de anemonas marinas que actúan sobre los  $\text{Na}_v$ , dos de estos grupos incluyen péptidos de 45 a 50 residuos de aminoácidos y otro grupo que incluye péptidos más pequeños de 27 a 32 residuos de aminoácidos. El efecto que producen estas toxinas sobre los  $\text{Na}_v$  es el de evitar la inactivación del canal al estabilizar la conformación del estado abierto. Este hecho se debe a la unión de la toxina con el sitio receptor 3 del canal, localizado en el asa que conecta los segmentos transmembranales S3 y S4 del dominio IV de la subunidad  $\alpha$  del canal (Rogers y col., 1996). Las toxinas de canales de sodio voltaje dependientes son las más estudiadas, en parte porque constituyen una importante fracción del veneno. Los efectos cardiotóxicos de toxinas incluyen arritmias desencadenadas poco después

por despolarizaciones resultado de inactivación incompleta de canales de sodio voltaje dependiente, y un paro sistólico debido a una sobrecarga de calcio en las células del miocardio (Turk y Kem, 2009).

Actualmente, estas toxinas polipeptídicas de 3 a 5 kDa pueden ser agrupadas en cuatro clases estructurales: tipo I con 35-37 residuos de aminoácidos y tres puentes disulfuro; tipo II con 58-59 residuos y tres puentes disulfuro; tipo III con 41-42 residuos y tres puentes disulfuro; y tipo IV con 28 residuos y dos puentes disulfuro. En cuanto a la información farmacológica, se sabe que las toxinas de tipo I bloquean corrientes a través de los canales  $K_v1$ , además de interferir en la conductancia de los canales voltaje dependientes de calcio. Las toxinas de tipo II, son homologas a los inhibidores de serina proteasas tipo Kunitz. Los inhibidores de proteasa se considera que funcionan mediante la inhibición de proteasas endógenas en animales o para proteger las toxinas inyectadas en presas de una rápida degradación (Turk y Kem, 2009). El hallazgo de toxinas de canales de potasio con actividad inhibidora de proteasas, como las Kaliclidinas, ha llevado a concluir que los inhibidores de proteasa de las anemonas no solo sirven como sustancias de defensa sino también como sustancias de ofensa para paralizar presas. Por lo tanto las toxinas inhibidoras de proteasa tipo Kunitz, además de la inhibición de serina-proteasa, también bloquean varios tipos de canales permeables a cationes, tales como los canales  $K_v1.2$  (Gonzalez, 2009). Por su parte, las toxinas de tipo III no son activas en las subunidades de los  $K_v1$ . Estas bloquean corrientes que involucran subunidades de  $K_v3$  o canales ERG. Los canales ERG humanos son un componente esencial de las células cardiacas que controla la duración de la fase "plateau" del potencial de acción. Las toxinas tipo III, como la BDS-I y II, demostraron actuar modificando la compuerta del canal en lugar de directamente bloquear el poro del canal (Castañeda, 2009).

La toxina EPETx2 es muy singular. A pesar de compartir de 36% a 64% de identidad de secuencia con las toxinas tipo III, no inhibe los canales de potasio, pero si los canales iónicos ácido-sensibles (canales ASIC3, bombas de  $H^+$ , canales

Na<sub>v</sub>) en neuronas sensoriales. Este tipo de canales están implicados en la modulación de la sensación de dolor. Este descubrimiento hecho por Dichot y colaboradores fue muy importante en el campo de la toxicología. Sin embargo recientemente se encontró que la toxina EPETx2 también afecta al canal de sodio voltaje dependiente Na<sub>v</sub>1.8, lo que eleva su valor como analgésico, reduciendo al mismo tiempo su valor como herramienta farmacológica específica (Blanchard, 2012).

#### 1.4.3 Proteínas citolíticas o citolisinas

La vida celular es dependiente de la integridad de la membrana celular que es responsable de controlar la distribución adecuada de solutos. Por lo tanto no es sorprendente que la permeabilización de la membrana inducida por péptidos diseñados específicamente se ha desarrollado como una estrategia común (García-Sáez, 2011). Las toxinas citolíticas de las anemonas atrajeron atención en la década de los setentas. Se descubrió un interesante sistema citolítico en nematocistos acontiales de la anemona *Aiptasia pallida*. Este fue el primer reporte de la presencia de fosfolipasa A<sub>2</sub> en veneno de cnidario. Junto a un “factor lítico indirecto” de origen proteínico el veneno de *A. pallida* que presentó actividad hemolítica. Por otra parte, la primera actinoporina en purificarse fue la equinatoxina, llamada así por su fuente *Actinia equina*. Después se demostró que la equinatoxina es en realidad una mezcla de tres isotoxinas de las cuales la equinatoxina II es la más abundante (Ferlan, 1974;; Turk y Kem, 2009).

Se ha reportado que muchas especies de anemonas producen citolisinas. Este tipo de toxinas son importantes porque sirven como proteínas modelo para estudiar las interacciones proteína-lipido membrana. También son usadas para estudiar la erradicación de células tumorales y parásitos, además también tienen propiedades cardioestimuladoras, dermatonecróticas y actividad antihistamina (Klyshko, 2004; Tejuca, 2009).

Basados en su estructura primaria y propiedades funcionales, las citolisinas han sido clasificadas en cuatro grupos de proteínas. Las tipo I son péptidos de 5- 8 kDa que forman poros en membranas que contienen fosfatidilcolina y tiene actividad antihistamina (Klyshko, 2004). Las citolisinas tipo II son las más numerosas dentro de las citolisinas, han sido ampliamente estudiadas y comprenden proteínas de 20 kDa, las cuales son inhibidas por esfingomiélin. Estas citolisinas tipo II también son llamadas actinoporinas debido a su habilidad de formar poros en las membranas como resultado de su polimerización en la bicapa lipídica. Los poros hidrofílicos formados por las actinoporinas son selectivos de cationes de alrededor de 1 nm de diámetro interno (Suput, 2009). Las toxinas tipo III tienen de 30-40 kDa y están formados por citolisinas con o sin actividad fosfolipasa, hasta la fecha solo son representadas por las proteínas citolíticas del género *Urticina* (García-Sáez, 2011). Finalmente, las toxinas tipo IV son citolisinas tiol-activado con 80 kDa. *Metridium senile* produce metridiolisina que es hasta ahora el único representante de este grupo de toxinas (Anderluh, 2002).

Existe también otro grupo de citolisinas que tienen el complejo de ataque a la membrana/ perforina (MACPF, por sus siglas en inglés). Esta familia de toxinas está más estudiada en el sistema inmune. El complejo de ataque a la membrana del complemento y la perforina producida por las células T y NK, forman poros de más de 20 nm en la célula blanco, lo cual lisa y mata a la célula. Las proteínas PsTX-60A y PsTX-60B de *Phyllodiscus semoni* y AvTX-60A de *Actinaria villosa*, anemonas japonesas, pertenecen a este grupo de citolisinas. La presencia de estas toxinas producidas por nematocistos fue el primer caso de proteínas MACPF encontradas en venenos. En este sentido la forma de acción del veneno puede explicarse como la formación de poros en la misma forma en que las proteínas MACPF lo hacen en el sistema inmune de los mamíferos (Oshiro, 2004; Satoh, 2007).

Otro tipo importante de citolisinas son las que actúan como enzimas con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) de secreción, éstas catalizan la hidrólisis de los enlaces 2-

acil éster de los fosfolípidos sn-2, produciendo ácidos grasos y lisofosfolípidos. Estas enzimas tienen muchos roles importantes en el catabolismo de lípidos de la dieta, en el metabolismo de la membrana celular y en enfermedades inflamatorias. Existen dos grupos importantes de PLA<sub>2</sub>: las citosólicas y las de secreción. Las primeras desempeñan una función importante dentro de las células a través de la vía del ácido araquidónico (Díaz y Arm, 2003). Por otro lado, las PLA<sub>2</sub> de secreción se encuentran en la saliva, jugo pancreático y venenos de diversos animales. Las PLA<sub>2</sub> de secreción se encuentran presentes en venenos suelen poseer diferentes efectos toxicológicos dependiendo de la especie. Entre estos efectos se encuentra la actividad neurotóxica, miotóxica, anticoagulante y hemolítica principalmente (Kini, 2003). Se han encontrado PLA<sub>2</sub> de secreción en venenos de muchos grupos animales, tales como serpientes, insectos, moluscos, cnidarios y esponjas (Razpotnik, 2010). Basándose en su estructura molecular las PLA<sub>2</sub>s se han clasificado en varios grupos numerados del I a XIV y numerosos subgrupos. Existen otros tipos de fosfolipasas que incluyen a la fosfolipasa A<sub>1</sub>, fosfolipasa B, fosfolipasa C y fosfolipasa D (Frãzao, 2012). Muchas de las PLA<sub>2</sub> de cnidarios pertenecen al grupo III al igual que las PLA<sub>2</sub> de veneno de abeja y lagarto. Sin embargo, la UcPLA<sub>2</sub> es una fosfolipasa perteneciente al grupo I, aislada de *Urticina crassicornis* que habita en el norte del océano pacífico y es similar a las PLA<sub>2</sub> neurotóxicas de serpientes Elapidae, lo cual sugiere un rol funcional idéntico en venenos serpientes y cnidarios (Frãzao, 2012).

#### 1.4.4 Metabólitos secundarios

Además de los péptidos y proteínas, los metabolitos secundarios bioactivos son comunes y ecológicamente más importantes entre los organismos tropicales bentónicos que están sujetos a altas tasas de ataque y competencia por el espacio en los arrecifes de coral. Entre los metabolitos secundarios de origen marino más comunes se incluyen terpenos, acetogeninas, alcaloides y compuestos polifenólicos (Hay, 1996). Además, existen algunos metabolitos secundarios que no han sido

totalmente caracterizados, por lo que éstos no cuentan con una clasificación (Frazao, 2012).

Los metabolitos secundarios bioactivos de origen marino más numerosos son los diterpenos cíclicos, muchos de los cuales se han encontrado en los octocorales (Clase Anthozoa). Uno de los diterpenos de mayor interés farmacológico es la lophotoxina (Figura 7), aislada de gorgonias del pacífico, cuya estructura base es un cembrano y un anillo carboxílico de 14 miembros, así como un furano heterocíclico que abarca de C3 a C6 (Roethle y Trauner, 2008). Este compuesto cíclico bloquea irreversiblemente los receptores nicotínicos a acetilcolina por la formación de un enlace covalente entre uno de sus dos grupos epóxido y una importante cadena lateral de tirosilos en el sitio de unión a acetilcolina (Turk y Kem, 2009), ha sido hasta la fecha el furanocembranoide más estudiado, debido quizá a su potente actividad biológica, así como a su interesante estructura química (Roethle y Trauner, 2008).

La palitoxina (PLTX), es otro de los compuestos bioactivos encontrados en cnidarios más importantes debido a su alta toxicidad. Esta toxina es considerada como la más potente de origen marino, es un complejo poliéter (Figura 8), que fue aislado originalmente de zoantidos (Clase Anthozoa) del género *Palythoa*, también ha sido detectada en crustáceos y peces, a través de los cuales entra en la cadena alimenticia. De hecho la palitoxina es considerado el agente causal de diversos casos de intoxicación en humanos causados por ingesta de alimentos marinos, resultando en síntomas sistémicos graves e incluso la muerte. La PTX actúa sobre la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , convirtiéndola en un poro, lo cual estimula el influjo de sodio y el eflujo de potasio. Por lo tanto, la PTX despolariza las membranas de un amplio rango de sistemas. En los sistemas excitables la despolarización provocada por PTX puede modular la actividad del canal de calcio, resultando en un incremento del calcio intracelular, el cual a su vez puede estimular eventos que son regulados por vías dependientes de calcio (da Rocha, 2013).



Entre las aplicaciones de la PTX se encuentra su uso para ayudar a probar el rol de diferentes tipos de mecanismos de señalización en carcinogénesis, ya que se ha visto que esta toxina es promotora de tumores de piel (da Rocha, 2013). La determinación de la estructura de esta toxina fue muy difícil en los tiempos en que los protocolos de RMN no estaban disponibles. Más tarde la finura de la síntesis elaborativa dio como resultado una palitoxina idéntica al compuesto natural, pero su síntesis requiere al menos 65 pasos (Turk y Kem, 2009).

Las zoantoxantinas son alcaloides fluorescentes producidos por especies de las familias Zoanthidae y Epizoanthidae. Estos alcaloides son importantes debido a su efecto inhibitor de la acetilcolinesterasa. La estructura de las zoantoxantinas puede variar entre tres tipos de esqueletos: 3H- zoantoxantina, 3H- pseudozoantoxantina y 4H- pseudozoantoxantina. El descubrimiento de estos alcaloides se inició con los estudios de Turk y colaboradores (1995), en donde obtuvieron un extracto etanólico de la corteza del coral *Parazoanthus axinellae*. Este extracto exhibía actividad anticolinesterasa y se encontró que su inhibidor más abundante era una pseudozoantoxantina metilada, de un peso molecular de 242 y un efecto *in vivo* típico de la inhibición sistémica de acetilcolinesterasa. En 1995 Uemura y colaboradores identificaron 5 nuevas zoantaminas; norzoantamina, norzoantaminona, oxyzoantamina, ciclozoantamina y epinorzoantamina, aisladas de especies de *Zoanthus* colectados en Japón, los autores reportaron que estas zoantaminas exhiben una potente citotoxicidad contra células de leucemia murina P388. La citotoxicidad más potente fue exhibida por norzoantaminona y oxyzoanthamina. En la actualidad, muchos grupos de investigación están interesados en la síntesis de nuevas zoantaminas, ya que estas exhiben un amplio rango de actividades biológicas.

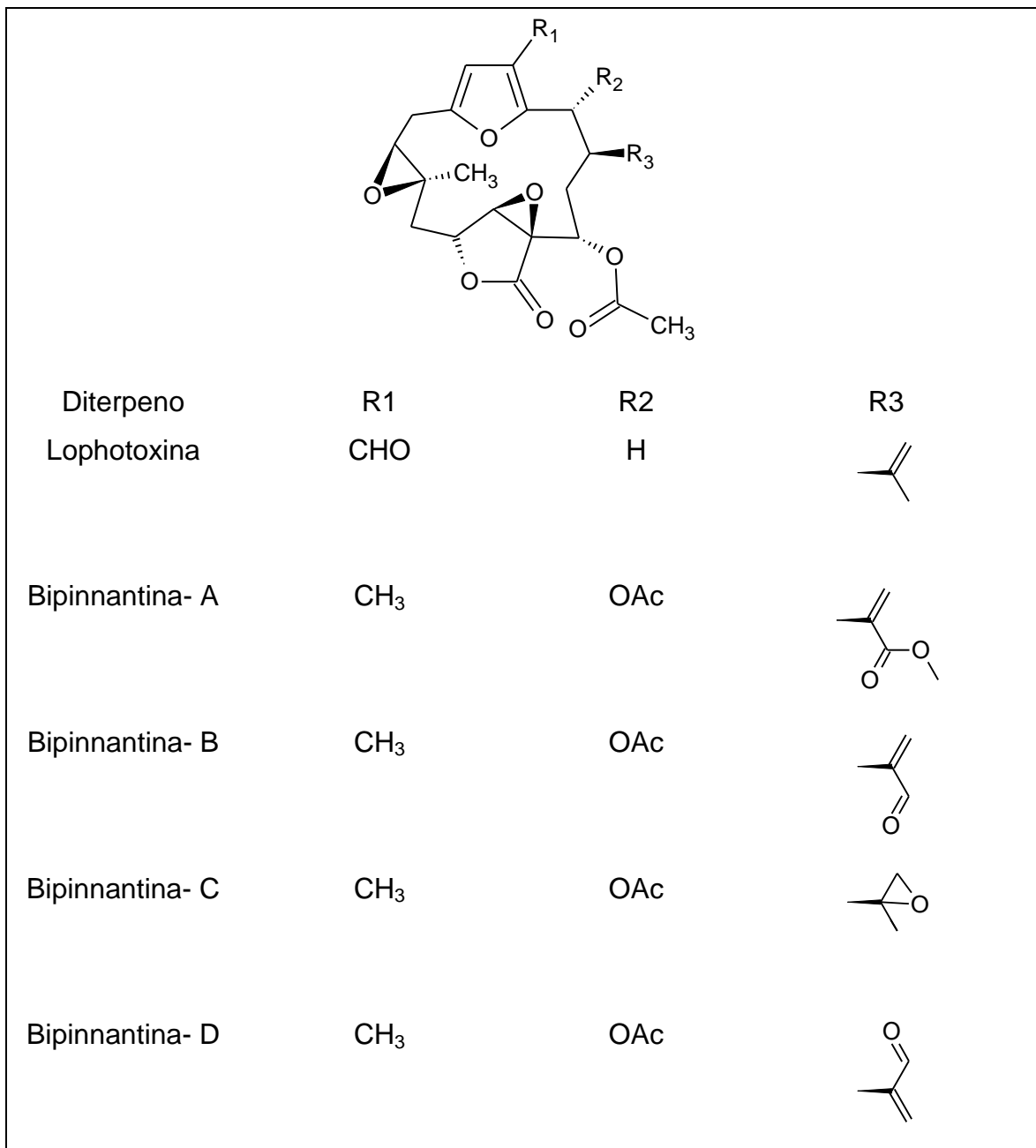
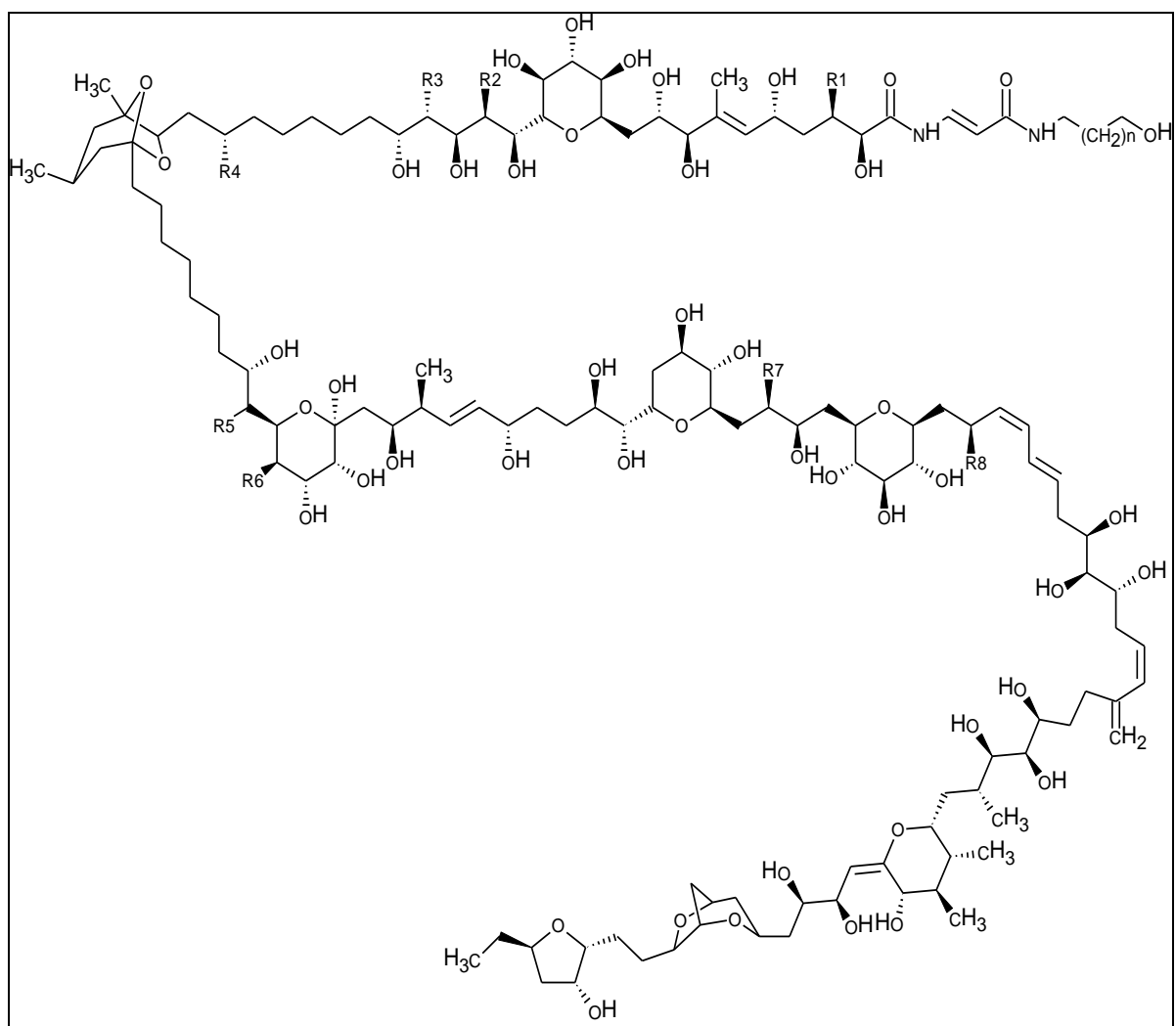


Figura 7. Principales análogos de la Lophotoxina.



Principales análogos de la Palitoxina encontrados en cnidarios.

	n	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Palitoxina	1	CH <sub>3</sub>	OH	OH	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH	OH
Homopalitoxina	2	CH <sub>3</sub>	OH	OH	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH	OH
Bishomopalitoxina	3	CH <sub>3</sub>	OH	OH	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH	OH
Neopalitoxina	1	-	OH	OH	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH	OH
Deoxipalitoxina	1	CH <sub>3</sub>	OH	OH	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH	H
42- Hidroxipalitoxina.	1	CH <sub>3</sub>	OH	OH	CH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	OH

Figura 8. Principales análogos de la Palitoxina encontrados en cnidarios.

#### 1.4.5. Perspectivas en la búsqueda de compuestos bioactivos en cnidarios

A pesar de los recientes esfuerzos para estudiar los venenos de cnidarios, aún falta mucho para caracterizar estos compuestos en este diverso grupo de animales. Se estima que el veneno de cada especie de phylum Cnidaria contiene alrededor de 100 compuestos, pero actualmente se conoce menos del 1% (Frãzao, 2012). Tomando en cuenta que los cnidarios tienen estrategias impresionantes de defensa y depredación, queda claro su valor como fuente de compuestos bioactivos de interés farmacológico y biomédico. Así mismo, el estudio detallado de los venenos de cnidarios puede permitir un mejor entendimiento de los procesos evolutivos que han sufrido los venenos de las diferentes especies venenosas para adaptarse a los cambios en su ecosistema y asegurar su supervivencia.

#### 1.5 Estudios toxicológicos previos en venenos de *Millepora*

En los estudios sobre las toxinas producidas por los organismos del género *Millepora* se ha detectado una proteína hemolítica de 31.5 kDa con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) en el veneno de *M. plantiphyla* colectada en el Mar Rojo. Esta proteína se nombró milleporina-1 y muestra una alta recuperación de actividad de PLA<sub>2</sub> así como una actividad hemolítica 13 veces mayor que la del extracto completo. En este estudio, los autores sugirieron que el efecto hemolítico producido por el veneno de este hidrocoral se debe en parte a una acción enzimática de fosfolipasa A<sub>2</sub> sobre los lípidos membranales, la cual es facilitada por un posible enlace con una parte no enzimática de la toxina. (Radwan y Aboul-Dahab, 2004).

Estudios llevados a cabo por el equipo de investigadores del Departamento de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de la Facultad de Química de la UAQ muestran que el veneno de *M. complanata* provoca una estimulación dependiente de concentración de contracciones espontaneas en segmentos de íleon aislados de de cobayo (Rojas y col., 2002). En otros estudios realizados por este mismo grupo se demostró que el veneno de este hidrocoral induce hemólisis sobre eritrocitos de rata y exhibe actividad de PLA<sub>2</sub>. Cuando se

incubó previamente el extracto en presencia de 2,4-dibromo-acetofenona, un inhibidor del sitio catalítico de PLA<sub>2</sub>, se observó una disminución significativa del efecto hemolítico, lo cual muestra una relación entre la actividad de PLA<sub>2</sub> con la actividad hemolítica. Por otra parte, se encontró que el extracto de *M. complanata* también provoca una contracción dependiente de la concentración en aorta aislada de rata. Después de eso, se llevó a cabo una serie de experimentos para investigar el papel del Ca<sup>2+</sup> intracelular y extracelular en el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de *M. complanata*. De este modo se mostró que cuando el Ca<sup>2+</sup> extracelular está ausente, la respuesta contráctil del extracto se reduce significativamente, pero no es anulada por completo. Adicionalmente, el agotamiento del retículo sarcoplásmico, vía tratamiento combinado de rianodina / cafeína, disminuye significativamente la vasoconstricción. Estos resultados sugieren la hipótesis de que el extracto de *M. complanata* induce vasoconstricción no solo por el incremento del influjo de Ca<sup>2+</sup> extracelular, sino también por la liberación de Ca<sup>2+</sup> de reservas intracelulares (Ibarra- Alvarado y col., 2007). En otra serie de experimentos, se encontró que al desnaturalizar el contenido de proteínas en el extracto de *M. complanata*, incubado en baño de agua hirviendo por 20 minutos, las actividades hemolítica y de PLA<sub>2</sub> se inhibieron completamente. Por otra parte, el efecto vasoconstrictor del extracto se redujo significativamente tras la desnaturalización de su contenido de proteína, pero no se inhibió completamente. Este efecto vasoconstrictor no se afectó de manera significativa por el blanqueamiento. Los resultados de estos estudios indicaron que *M. complanata* produce proteínas citolíticas con propiedades que incluyen actividad de PLA<sub>2</sub> y actividad hemolítica, así como compuestos termoestables y termolábiles que inducen en conjunto efectos contráctiles en células de músculo liso vascular e intestinal (García-Arredondo y col., 2011).

Continuando con el estudio toxicológico de *M. complanata*, se realizaron experimentos para evaluar la toxicidad sistémica inducida por el extracto acuoso de *M. complanata* en ratones. Los resultados obtenidos de estas evaluaciones indicaron que la administración intravenosa del extracto induce convulsiones

violentas y muerte en ratones en menos de un minuto a dosis de 4.62 µg de proteína/ g de peso corporal. Dosis más pequeñas producen una muerte lenta acompañada de hemoglobinuria, inflamación ocular y daños histopatológicos en pulmón y riñón atribuidos a la presencia de citolisinas. Los cambios histopatológicos fueron completamente eliminados después de la incubación del extracto en condiciones de desnaturalización. Inesperadamente, el extracto desnaturalizado conserva su efecto letal. Estos resultados sugieren que el extracto de *M. complanata* contiene hemolisinas que pueden ser responsables de los cambios histopatológicos observados en riñón y pulmón. Es muy probable que este tipo de citolisinas estén relacionadas a la toxicidad sistémica en humanos debido al contacto con *Millepora spp.*, ya que existen reportes de síntomas que incluyen síndrome nefrótico, falla renal aguda, y edema pulmonar (Prasad y col., 2006). Estos estudios, también muestran que el veneno de este hidrocoral contiene otras toxinas termoestables indefinidas, probablemente metabolitos secundarios que tienen efectos letales en ratones (Rojas-Molina et al., 2012). En un análisis cromatográfico preliminar del extracto de este hidrocoral, por cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa (HPLC), se obtuvieron 19 fracciones (F1 a F19). F4 indujo hemólisis y contuvo principalmente una proteína de 30 kDa, probablemente una enzima PLA<sub>2</sub>, mientras F8 y F11 contuvo principalmente proteínas de 15 y 17 kDa respectivamente que producen efectos vasoconstrictores (Ibarra-Alvarado y col., 2007).

Con la finalidad de identificar algunos de los principales componentes bioactivos presentes en el extracto de *M. complanata*, se realizó un análisis cromatográfico biodirigido empleando inicialmente una cromatografía de intercambio iónico. La fracción MC1 obtenida de este análisis se sometió a un segundo análisis cromatográfico por exclusión. Dos de las fracciones obtenidas a partir de este segundo análisis cromatográfico MC1- I y MC1- II, se sometieron a un análisis mediante HPLC en fase reversa.

Tras el análisis de la fracción MC1-II en cromatografía de fase reversa se obtuvo una fracción, denominada MC1-IIA, con actividad vasoconstrictora ( $40.26 \pm 16.85$  % de la contracción inducida por fenilefrina  $1 \mu\text{M}$  a  $6 \text{ mg}$  de muestra/ml), actividad hemolítica retardada ( $37.28 \pm 1.07$  % de hemólisis a  $12.6 \mu\text{g}$  de muestra/ml) y actividad letal en ratones al administrarse por vía i.v. ( $3 \text{ mg}$  de muestra/g de peso). Tras un proceso de re-purificación de esta fracción se identificó la presencia de un compuesto aromático con una cadena alifática polihidroxilada (García Arredondo, 2012). Por otra parte, el análisis cromatográfico de MC1-I permitió la obtención de tres fracciones que indujeron vasoconstricción significativa sobre los segmentos de aorta aislados de rata. En estas fracciones no se logró detectar cantidad de proteína ni se observaron bandas en los análisis de electroforesis, indicando que estas fracciones son compuestos no proteínicos. Dado que los efectos contráctiles inducidos por estas fracciones son claramente diferentes uno del otro, es posible que los compuestos responsables de estos efectos estén actuando mediante mecanismos de acción diferentes, es probable que en la fracción MC1- IC, que presenta un efecto vasoconstrictor transitorio, se encuentre presente algún componente que induce la liberación de calcio de los almacenes intracelulares. Por otro lado, las fracciones MC1- IA y MC1- IB posiblemente producen vasoconstricción mediante un mecanismo que involucra la entrada de calcio intracelular (Ibarra-Alvarado y col., 2007). Debido a la poca cantidad que se obtuvo de estas fracciones, no fue posible continuar con su re-purificación ni con los análisis espectroscópicos y espectrométricos necesarios para determinar sus estructuras químicas.

Los antecedentes antes mencionados, constituyen evidencias firmes de la riqueza de las especies del Género *Millepora* como fuente de compuestos novedosos con actividad biológica que pueden ser útiles para el futuro desarrollo de fármacos y herramientas de investigación biomédica. Considerando esto, es importante retomar el estudio del veneno de *M. complanata* a fin de purificar mayor cantidad de los metabolitos vasoconstrictores de la fracción MC1-I y establecer los métodos de purificación adecuados para así poder realizar los correspondientes análisis

espectroscópicos y espectrométricos de sus componentes. La relevancia del presente estudio es que los resultados derivados del presente trabajo servirán para conocer más sobre las estructuras de los compuestos bioactivos no proteínicos presentes en el extracto de *M. companata*, además de que estos resultados también servirán como un antecedente para establecer un método de purificación adecuado de estos compuestos. Esto constituye un primer paso para los futuros estudios farmacológicos y químicos de estos componentes, ya que gran parte de los estudios sobre organismos del género *Millepora* se han centrado en la búsqueda de toxinas proteínicas y evaluación de sus efectos.



## **2. HIPÓTESIS**

En la fracción MC1-I del extracto acuoso de *Millepora complanata*, obtenida mediante cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión, se encuentran compuestos bioactivos no proteínicos altamente polares que pueden purificarse mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 General

Purificar los compuestos no proteínicos presentes en la fracción MC1-I del extracto de *Millepora complanata* y caracterizar de manera parcial su estructura química.

#### 3.2 Específicos

- Obtener más extracto de *M. complanata* y evaluar su actividad vasoconstrictora y hemolítica.
- Fraccionar el extracto de *M. complanata* mediante las técnicas cromatográficas previamente establecidas hasta obtener la fracción MC1-1
- Establecer las condiciones adecuadas para purificar los compuestos no proteínicos de la fracción MC1-I.
- Efectuar estudios espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos que se logren purificar.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Material biológico

- Fragmentos del hidrocoral *Millepora complanata*.
- Ratas machos de la cepa Wistar (200-250g).

#### 4.1.2 Preparación y conservación de los extractos

- Cristalería: embudos matraces Erlenmeyer, matraces bola, probetas y vasos de diferentes capacidades.
- Gradillas
- Celdas desechables para espectrofotómetro.
- Puntas desechables para micropipetas de diferentes capacidades.
- Papel filtro.
- Micropipetas de diferentes capacidades.

#### 4.1.3 Evaluaciones farmacológicas

- Jaulas de acrílico con tapa y recipiente para alimento.
- Tubos para microcentrífuga de diferentes capacidades.
- Estuche de disección.
- Puntas desechables para micropipetas de diferentes capacidades.
- Cámaras de vidrio para el mantenimiento de tejidos aislados durante la determinación del efecto farmacológico.
- Guillotina.

#### 4.1.4 Análisis cromatográficos

- Membranas de nylon y polipropileno hidrofílico para filtración de disolventes (47 mm de diámetro y 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro).
- Jeringas micrométricas desechables y acrodiscos (13 mm de diámetro y 0.2  $\mu\text{m}$  de poro) para la filtración de muestras.
- Jeringas micrométricas de vidrio de 100 y 500  $\mu\text{L}$  para inyección de muestras.
- Jeringas micrométricas desechables y acrodiscos (13 mm de diámetro y 0.2  $\mu\text{m}$  de poro) para filtración de muestras.
- Jeringas micrométricas de vidrio de 100 y 500  $\mu\text{L}$  para inyección de muestras.
- Jeringa de purga de 10 mL.
- Loop para inyector de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) de 500 $\mu\text{L}$ .

#### 4.2 Reactivos

##### 4.2.1 Preparación, conservación y tratamiento de los extractos

- Metanol grado HPLC de la marca (Mallinckrodt).
- Acido clorhídrico (J.T. Barker).
- Solución estándar de albumina sérica bovina (Bio-Rad).
- Reactivo de Bradford (Bio-Rad).

##### 4.2.2 Evaluaciones farmacológicas

- Cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), carbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) y dextrosa (J.T. Barker).
- Acetilcolina y cloruro de calcio (Sigma).
- Carbógeno 5%  $\text{CO}_2$  – 95%  $\text{O}_2$  para la oxigenación de los tejidos aislados (Infra).

#### 4.2.3 Análisis cromatográficos

- Metanol (Mallinckrodt), acetonitrilo (J.T. Barker) y ácido trifluoroacético (Fluka) grado analítico. Todos grado HPLC.

#### 4.3 Métodos

##### 4.3.1 Preparación del extracto acuoso de *Millepora complanata*

La descarga de los nematocistos del hidrocoral se indujo mediante agitación de los fragmentos en agua desionizada (pH 7) durante 18 h a 4°C. El extracto resultante, se centrifuga 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. El polvo liofilizado se preparó de la siguiente manera: el polvo se agitó en agua desionizada, a una concentración de 150 mg (liofilizado)/mL, durante 20 min a 4°C. Posteriormente el polvo se centrifugó a 3,000 rpm 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 almacenó en alícuotas de 2 mL a -70°C. Este filtrado se usó para efectuar el fraccionamiento cromatográfico.

##### 4.3.2 Determinación de proteínas totales método de Bradford

Para la determinación del contenido de proteínas totales en el extracto y las fracciones se preparó una curva estándar de albumina sérica bovina (BSA): 1, 2, 4, 8, 10, 12, 16 µg/mL. Tanto las muestras como los estándares se llevaron a un volumen de 800 µL con agua desionizada. Se agregaron 200 µL de reactivo de Bradford para obtener un volumen total de 1 mL. Las mezclas se agitaron y se dejaron reaccionar durante 5 min y posteriormente se leyó a una  $\lambda$  de 590 nm.

#### 4.3.3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto acuoso de *Millepora complanata* mediante FPLC

El extracto acuoso de *M. complanata* se sometió a un fraccionamiento cromatográfico mediante FPLC (Pharmacia Biotech®), utilizando una columna de intercambio iónico de 200 mL de capacidad, empaquetada con DEAE-celulosa y equilibrándola con un amortiguador de acetato de amonio 10 mM, pH 7. La columna se eluyó con un gradiente escalonado de una solución amortiguadora de acetato de amonio 10 mM y cloruro de sodio 1M, pH 7, a una velocidad de flujo de 3 mL/min. La detección se realizó mediante un espectrofotómetro ajustado a 280 nm. Durante el fraccionamiento se realizaron las inyecciones necesarias. Se recolectaron las fracciones y se reagruparon de acuerdo a los picos del cromatograma. Estas fracciones se concentraron por liofilización, se resuspendieron en agua desionizada y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Después del fraccionamiento inicial realizado por cromatografía de intercambio iónico y de corroborar que los cromatogramas coincidieron con los resultados anteriormente obtenidos, la fracción MC1 se sometió a una separación mediante cromatografía de exclusión para eliminar el contenido de sales que se agregan en el primer fraccionamiento. Para este fin se utilizó una columna de 200 mL empaquetada con Sephadex G-15 y se eluyó con ácido acético 1.6 mM a una velocidad de flujo de 3 mL/min, la absorción se registró a 280 nm. Tras verificar los cromatogramas, la fracción MC1-I se concentró por liofilización, se resuspendió en agua desionizada y se le determinó concentración de proteínas totales por el método de Bradford.

#### 4.3.4 Análisis de las fracciones mediante HPLC

La fracción MC1-I obtenida mediante el fraccionamiento por FPLC se analizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa. Se

utiliza una columna de separación semipreparativa C4. El flujo a utilizar fue de 2.5 mL/min con un gradiente que iba de 100% de una solución A, a un 100% de solución B, donde: (A) 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua y (B) 90% de acetonitrilo en agua con 0.085% de TFA.

#### 4.3.5 Electroforesis en gel

Durante el fraccionamiento cromatográfico del extracto de *Millepora complanata* se realizaron análisis electroforéticos en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE), utilizando los métodos convencionales previamente descritos (Schägger y Von-Jagow, 1987). Estos análisis se realizaron usando geles de poliacrilamida al 12% con Tris- glicina como amortiguador de corrida, los cuales se corren a 120 V durante aproximadamente 2h. Las bandas de proteína se visualizaron mediante la técnica de tinción de Coomassie. Para la determinación de los pesos moleculares relativos de las proteínas presentes en las muestras se usaron los estándares preteñidos de amplio espectro (Bio-Rmad Cat # 161-0318).

#### 4.3.6 Obtención de los compuestos no proteínicos mediante el método de reciclaje y corte

Se utilizó la técnica cromatográfica de reciclaje y corte en HPLC para establecer las mejores condiciones para lograr una separación adecuada de los compuestos no proteínicos presentes en la fracción MC1-I. Para este fin se utilizó un detector de arreglo de diodos y columnas cromatográficas C4 (YMC-Pack, 10 x 4.6 mm; 5 µm de diámetro de partícula; 300 Å de tamaño de poro) y C18 spherisorp, empleando diferentes condiciones de elusión.

#### 4.3.7 Análisis espectroscópicos y espectrométricos

Los espectros de resonancia magnética nuclear, en sus modalidades de una y dos dimensiones, se midieron en agua deuterada ( $D_2O$ ) en espectrofotómetros Varian Mercury 300, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros RMN de  $^1H$ , se determinaron a 300 MHz, mientras que los espectros de  $^{13}C$  se determinan a 75.4 MHz.

#### 4.3.8 Modelo de aorta aislada de rata

Para monitorear el efecto del extracto de *M. complanata* y sus fracciones se emplea el ensayo de segmentos de aorta aislada de rata previamente descrito por Feelish y col. (1999) con las siguientes modificaciones: se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, las cuales se anestesian con cloroformo y se sacrifican por decapitación. Se extrajo la aorta torácica descendente y se colocó en solución fisiológica de Krebs-Henseleit (pH 7.4; NaCl 126.8 mM, KCl 5.9 mM,  $CaCl_2$  2.5 mM,  $MgSO_4$  1.2 mM,  $KH_2PO_4$  1.2 mM,  $NaHCO_3$  30 mM y D-glucosa 5 mM) con baño de hielo y gasificada constantemente con carbógeno (95%  $O_2$  y 5%  $CO_2$ ). Inmediatamente después de extraerla, la aorta se limpió haciendo fluir por su interior la solución de Krebs-Henseleit a través de ella, con esto se evitó la formación de coagulo. Se eliminó el tejido conectivo de la aorta y se cortaron en segmentos de 4 a 5 mm de longitud. Estos anillos se montan en ganchos de acero inoxidable suspendidos en cámaras de baño orgánico que contenían la solución de Krebs-Henseleit a 37°C oxigenada constantemente con carbógeno. Los tejidos se estabilizan durante 60 min bajo una tensión de 1.5 g. Durante este periodo los tejidos se lavan cada 15 min. Después del ajuste final a la tensión basal de 1.5 g, los segmentos de aorta se contraen con KCl 100 mM para sensibilizar el tejido. Una vez que se estabiliza la tensión, los tejidos se lavaron con solución de Krebs-Henseleit para recuperar la tensión basal de 1.5 g. después de establecer su tensión basal los tejidos se contrajeron con fenilefrina (1  $\mu M$ ), se registró el grado de contracción a los 15 min y se tomó este valor como estándar. Una vez registrada la contracción con fenilefrina, los tejidos nuevamente se lavaron para recuperar la tensión basal y entonces se agregó la sustancia a evaluar. Los cambios que se produjeron se midieron con

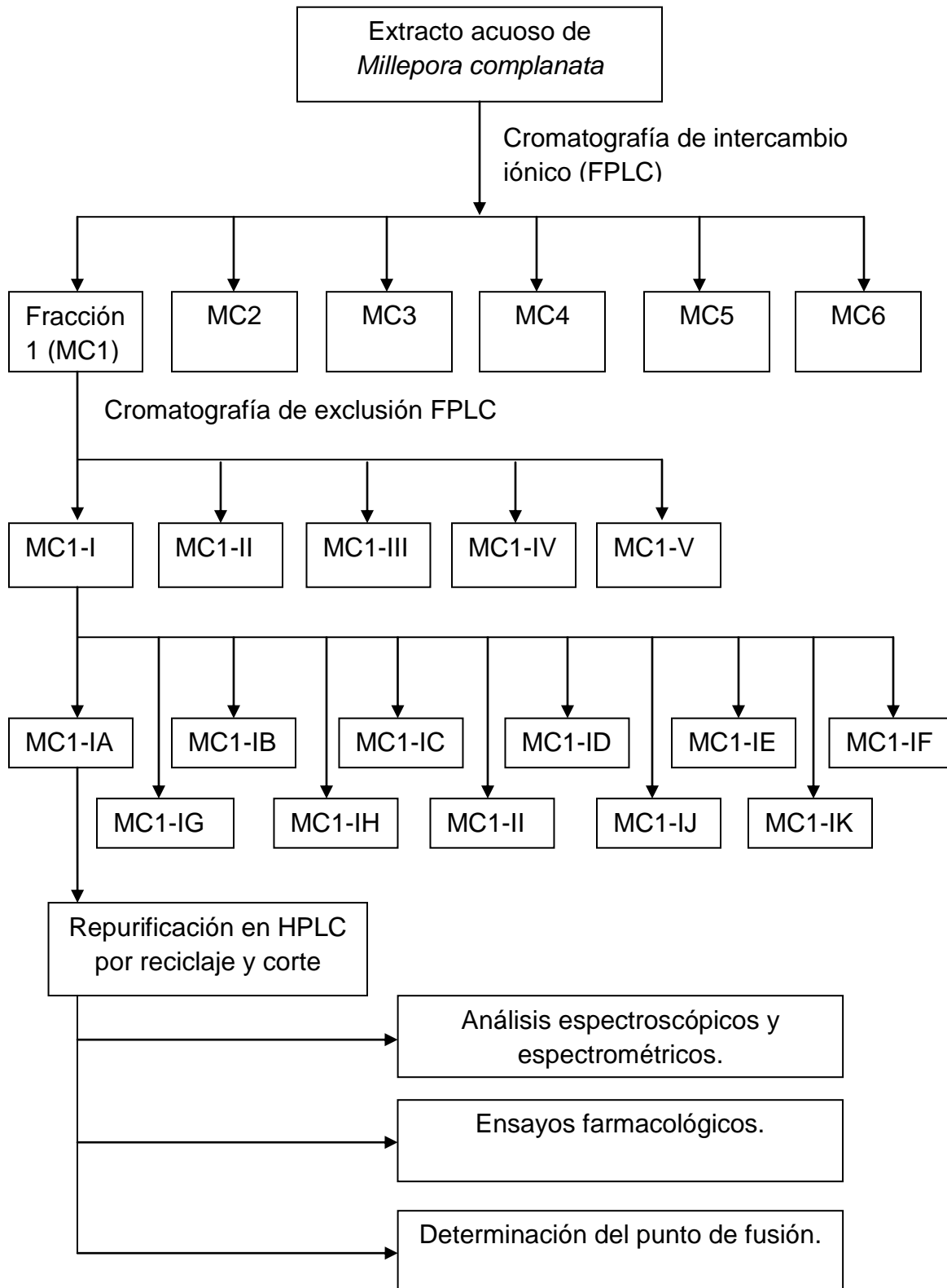


transductores de fuerza, acoplados a un polígrafo (Grass 7D) de cuatro canales de registro. El efecto vasoconstrictor se expresó como el porcentaje de la contracción inicial inducida por 1  $\mu$ M de fenilefrina.

#### 4.3.9 Ensayo de hemólisis

El monitoreo de la actividad hemolítica se realizó de acuerdo con el método empleado por Torres y col (2001), que se describe brevemente a continuación: se utilizaron eritrocitos de ratas machos de la cepa Wistar (275-325 g) lavados en una solución de Alsever (pH 7.4; D-glucosa 120 mM, citrato de sodio 30 mM, NaCl 7 mM y ácido cítrico 2 mM). Posteriormente se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ L de una suspensión de eritrocitos al 1% en solución amortiguadora de Alsever mas la muestra a evaluar disuelta en 50  $\mu$ L de la misma solución. Los tubos se llevaron a un volumen de 1 mL con solución de Alsever. Las muestras así preparadas se incubaron durante 30 min a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación la muestra se centrifugó a 2,500 rpm (1,430 x g) durante 4 min a 4°C y el resultado de la hemólisis se evaluó mediante la liberación de la hemoglobina haciendo lecturas en un espectrofotómetro (Jenway 6320D) a una  $\lambda$  de 415 nm. El efecto hemolítico se expresó como el porcentaje de la hemoglobina liberada comparado con la hemoglobina presente en la hemólisis total producida por la suspensión de muestras de eritrocitos en agua desionizada, en lugar de la solución de Alsever. Una unidad hemolítica media (UH<sub>50</sub>) se definió como la cantidad de proteína requerida para producir un 50% de hemólisis.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Preparación del extracto acuoso de *Millepora complanata*

Los fragmentos de *Millepora complanata* que se emplearon en este estudio fueron recolectados en noviembre del 2008, se conservaron en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta que se utilizó para la preparación del extracto crudo en febrero del 2011. Se utilizaron 656 g (peso húmedo) de fragmentos del hidrocoral, mismos que se sometieron a agitación en 1.5 L de agua desionizada durante 24 h. Con esto se obtuvieron 4.0959 g de polvo liofilizado que se resuspendió en 26 mL de agua desionizada y se sometió al procedimiento de centrifugación, filtración y determinación de proteína que se indica en la sección de métodos. De esta manera, se encontró que los 4.0959 g de polvo liofilizado contienen un total de 157.36 mg de proteína.

### 6.2 Bioensayos

Con la finalidad de comprobar que los compuestos bioactivos que se encuentran en el extracto de *M. complanata* aun conservaban sus efectos biológicos tras el periodo prolongado de almacenamiento de los fragmentos del hidrocoral a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se determinó la actividad vasoconstrictora y hemolítica del extracto que se empleó para este estudio.

#### 6.2.1. Ensayo de aorta aislada de rata

Tras la evaluación del efecto del extracto de *M. complanata* sobre el tono vascular de los segmentos de aorta aislados de rata, se encontró que el extracto produce un efecto vasoconstrictor dependiente de la concentración (Figura 9). Mediante un ajuste no lineal, utilizando la ecuación de sigmoideal de Boltzman se encontró una  $\text{CE}_{50}$  de  $50.11 \pm 1.15$   $\mu\text{g}$  de proteína/mL y un  $\text{E}_{\text{max}}$  de  $111.70 \pm 5.12$  % (media  $\pm$  S.E.M, n = 3).

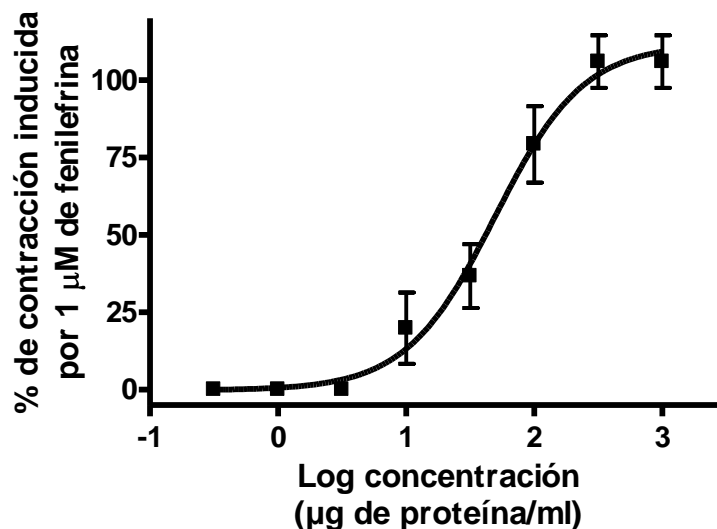


Figura 9. Efecto vasoconstrictor del extracto de *M. complanata*. Curva concentración- respuesta que muestra el efecto vasoconstrictor del extracto completo de *M. complanata* sobre segmentos de aorta aislados de rata.

### 6.2.2 Ensayo de hemólisis

Mediante el ensayo de hemólisis se encontró que el extracto de *M. complanata* produce hemólisis de una manera dependiente de la concentración (figura 10). Mediante el ajuste no lineal de los datos, empleando la ecuación sigmoide de Boltzman, se encontró una  $UH_{50}$  de  $2.00 \pm 1.074$  µg de proteína/mL (media  $\pm$  S.E.M. n=3).

### 6.3 Separación cromatográfica mediante FPLC

El extracto crudo de *M. complanata* se sometió a un proceso de separación cromatográfica de dos pasos mediante un equipo cromatográfico de FPLC (Pharmacia Biotech®). El primero de ellos consistió en una cromatografía de intercambio aniónico, empleado una columna de DEAE- celulosa (dietilaminoetil-celulosa), la columna se eluyó con un gradiente escalonado de una solución amortiguadora de acetato de amonio 10 mM y cloruro de sodio 1M, pH 7, a una

velocidad de flujo de 3 mL/min. La detección se realizó mediante un espectrofotómetro ajustado a 280 nm. Obteniéndose el cromatograma de la figura 11. Se recuperaron 6 fracciones, de las cuales solo se liofilizo la primera fracción MC1 y posteriormente se disolvió en 15 mL de agua.

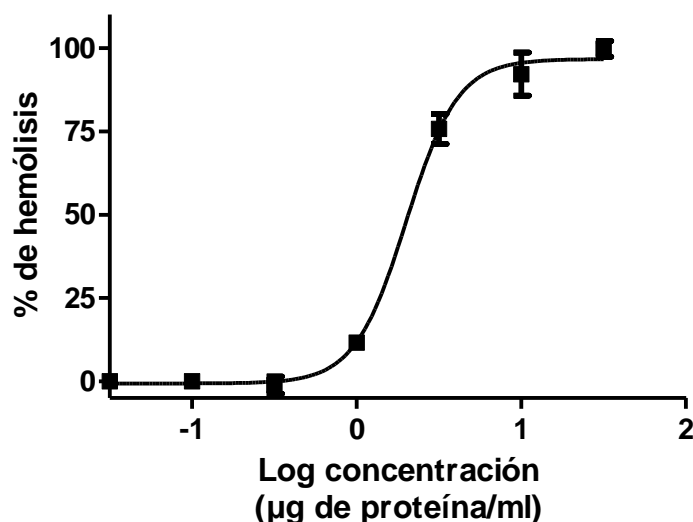


Figura 10. Efecto hemolítico de *M. complanata*. Curva concentración-respuesta que muestra el efecto hemolítico del extracto de *M. complanata* sobre eritrocitos de rata.

#### 6.4 Cromatografía de exclusión mediante FPLC

Nuestra fracción de interés MC1 se sometió a un segundo análisis cromatográfico, esta vez por cromatografía de exclusión con la finalidad de retirar las sales que se unieron a nuestra fracción en la separación anterior, pero también, como ya se había demostrado en estudios anteriores para obtener una separación mas. Para este fin se utilizó una columna de 200 mL empaquetada con Sephadex G-15, que es un gel de filtración media para moléculas de peso molecular mayor a 1500 g/mol, se eluyó con ácido acético 1.6 mM a una velocidad de flujo de 3 mL/min, la absorbancia se registró a 280 nm obteniéndose 6 fracciones (MC1-I a MC1-VI), que se muestran en la Figura 12 y seleccionándose la primera fracción MC1-I, para continuar con la caracterización.

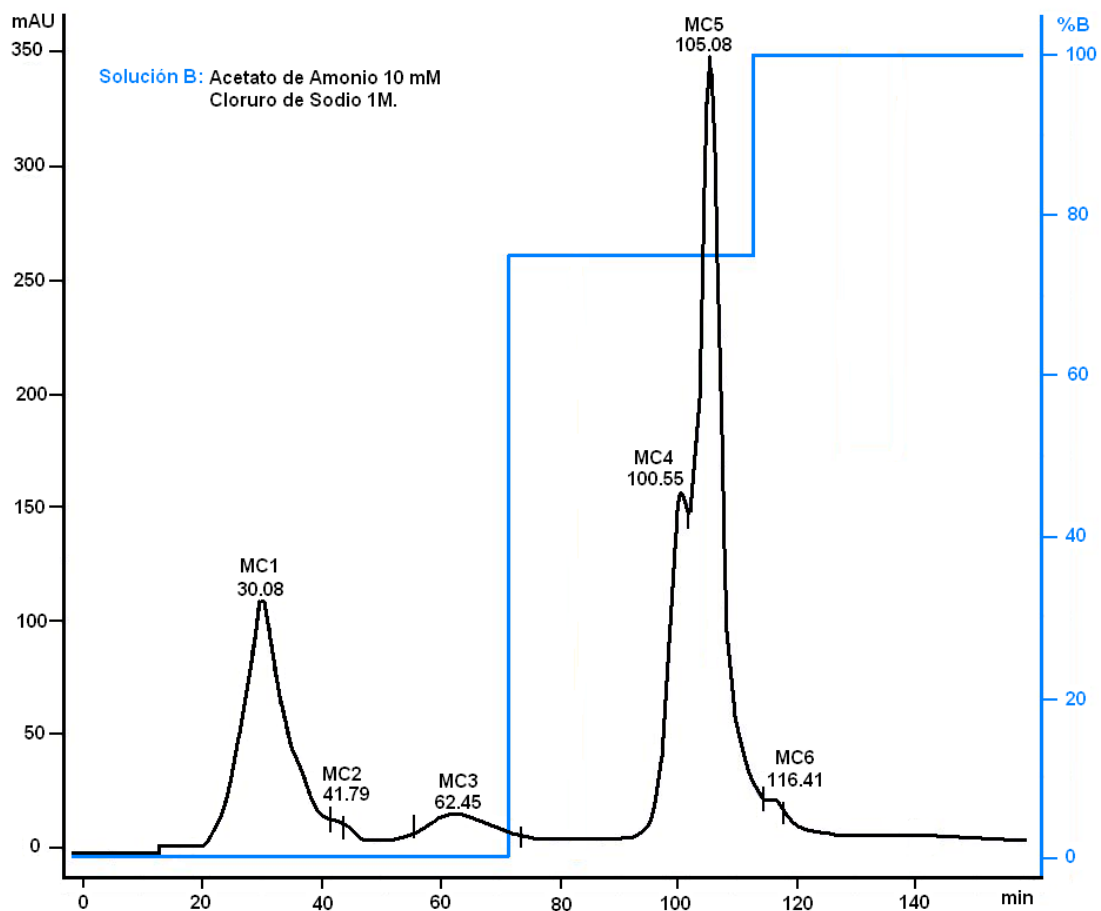


Figura 11. Cromatografía de intercambio iónico. El cromatograma muestra la primera separación del extracto crudo de *Millepora complanata* y el cambio de fase móvil escalonada, utilizada para devolver la resina a su carga original y para recuperar las fracciones que se unieron en el intercambio iónico inicial.

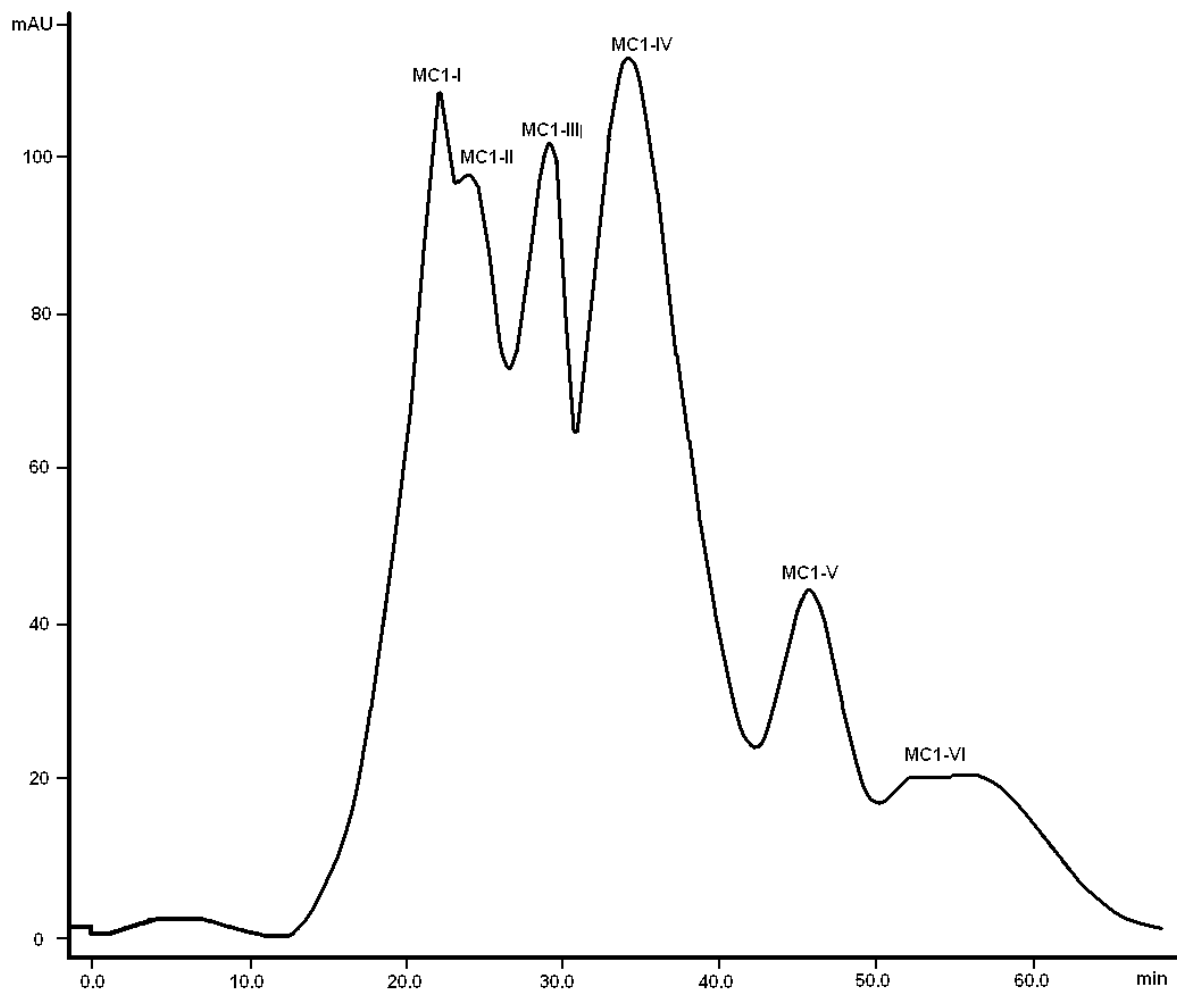


Figura 12. Cromatografía de exclusión. Cromatograma obtenido de la cromatografía de exclusión en Sephadex G-15, hasta este punto se puede deducir que las moléculas contenidas en nuestra fracción MC1-I, al ser las primeras en salir tienen un peso molecular menor a 1500 g/mol.

## 6.5 Cromatografía en fase reversa mediante HPLC

En el siguiente paso, la fracción MC1-I, obtenida en el fraccionamiento en Sephadex G-15, se sometió a un análisis mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa en una columna C4 con las condiciones que se muestran en el Cuadro 1. La solución A consistió en una solución al 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) y la solución B consistió en 90% de acetonitrilo, 0.085% de TFA y 9.9% de agua grado HPLC.

Cuadro 1. Condiciones cromatográficas para la inyección de MC1-I.

Paso	Minuto	Flujo (mL/min)	Línea A	Línea B
			Solución A	Solución B
1	0	2.5	100%	0%
2	15	2.5	100%	0%
3	28	2.5	80%	20%
4	32	2.5	0%	100%
5	38	2.5	100%	0%
6	60	2.5	100%	0%

De esta cromatografía se obtuvieron 12 fracciones, que se muestran en la Figura 13, que se recolectaron según los tiempos de retención que se muestran en el Cuadro 2, para continuar con el presente trabajo se selecciono la fracción MC1-IA, que se concentró por liofilización.

Al hacer la determinación de proteínas de la fracción MC1-IA por el método de Bradford no se observó actividad, lo que nos asegura que no hay proteínas en los componentes de esta fracción.



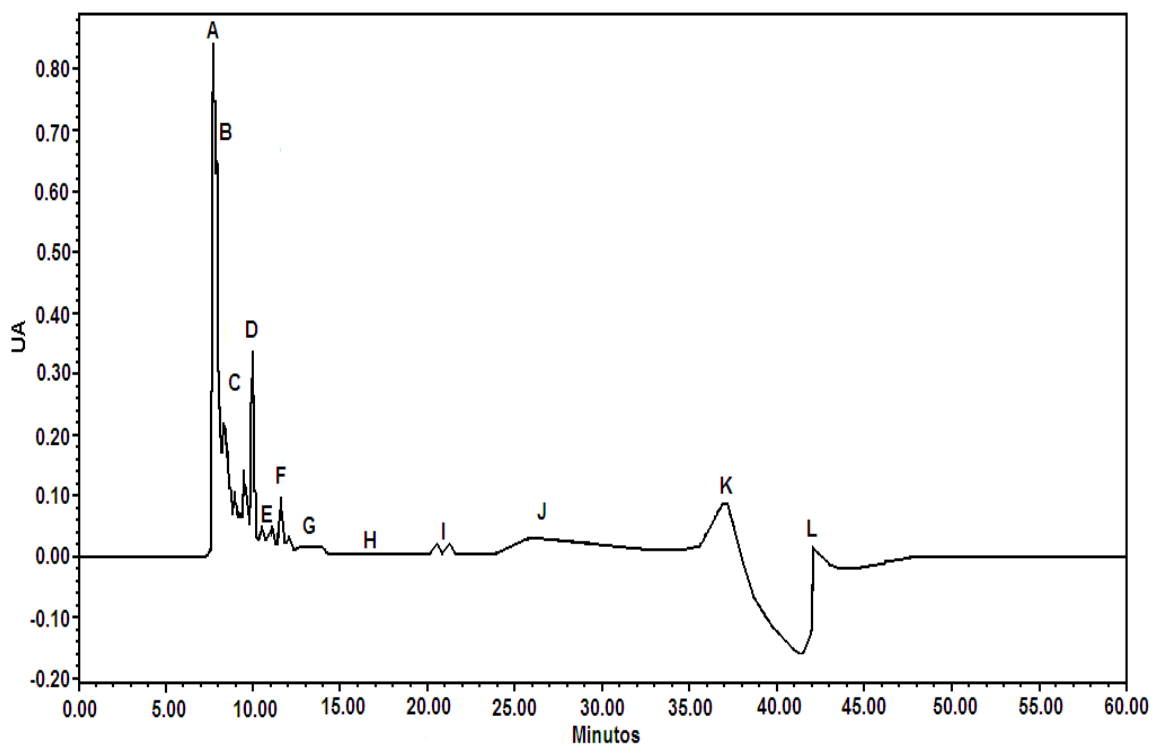


Figura 13. Cromatograma obtenido por HPLC, se selecciono el pico A por ser el que muestra mayor absorbancia y polaridad.

Cuadro 2. Tiempos de retención de la fracción MC1-I, conforme a estos tiempos se hizo la recolección.

Fracciones de MC1-I obtenidas por cromatografía de líquidos de alta eficiencia	Tiempos de retención
A	7.5 - 8.0 min
B	8.0 - 8.3 min
C	8.3 - 9.9 min
D	9.9 - 10.2 min
E	10.2 - 11.1 min
F	11.1 - 12.3 min
G	12.3 - 14.4 min
H	14.4 – 20.0 min
I	20.0 – 21.5 min
J	24.0 – 32.1 min
K	35.4 – 38.7 min
L	42.0 – 43.4 min

Para purificar la fracción MC1-IA se probó el método de reciclaje y corte en una columna C18 con metanol: agua, 1:1 como fase móvil y un flujo de 6 mL/min., en este método al hacer el reciclaje se observó q los picos se unían y hacían imposible la separación de los componentes de esta fracción, como se observa en la figura 14.

Como no se obtuvo una buena separación, se probó hacer un gradiente en la columna C4 ya que esta columna al ser mas polar puede separar los componentes presentes en esta fracción, el gradiente se usó para tratar de separar los componentes al cambiar la polaridad de la fase móvil, el cromatograma obtenido se muestra en la Figura 15. Como se observa en el cromatograma en relación con el

Cuadro 3, se logra una separación cuando el porcentaje de agua en la fase móvil es mayor que el porcentaje de metano

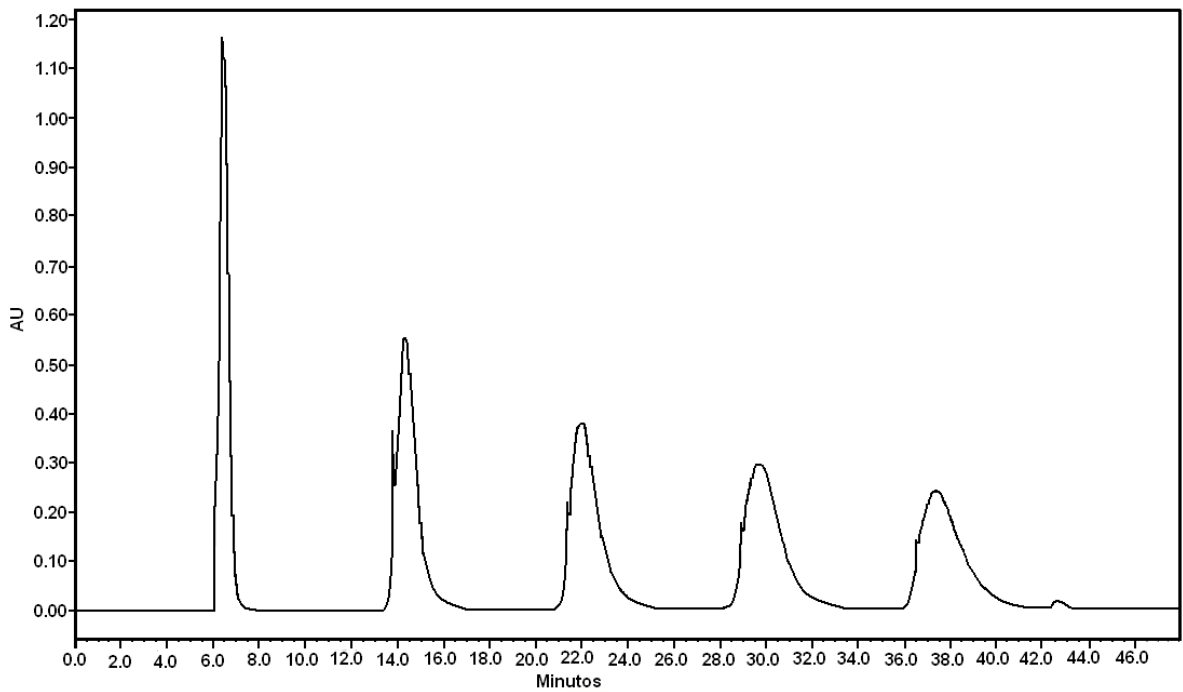


Figura 14. Reciclaje y corte, el primer ciclo muestra dos picos con resolución casi nula, al reciclarse, se nota una pequeña separación, pero no es suficiente para separar los picos, se decide usar otro método.

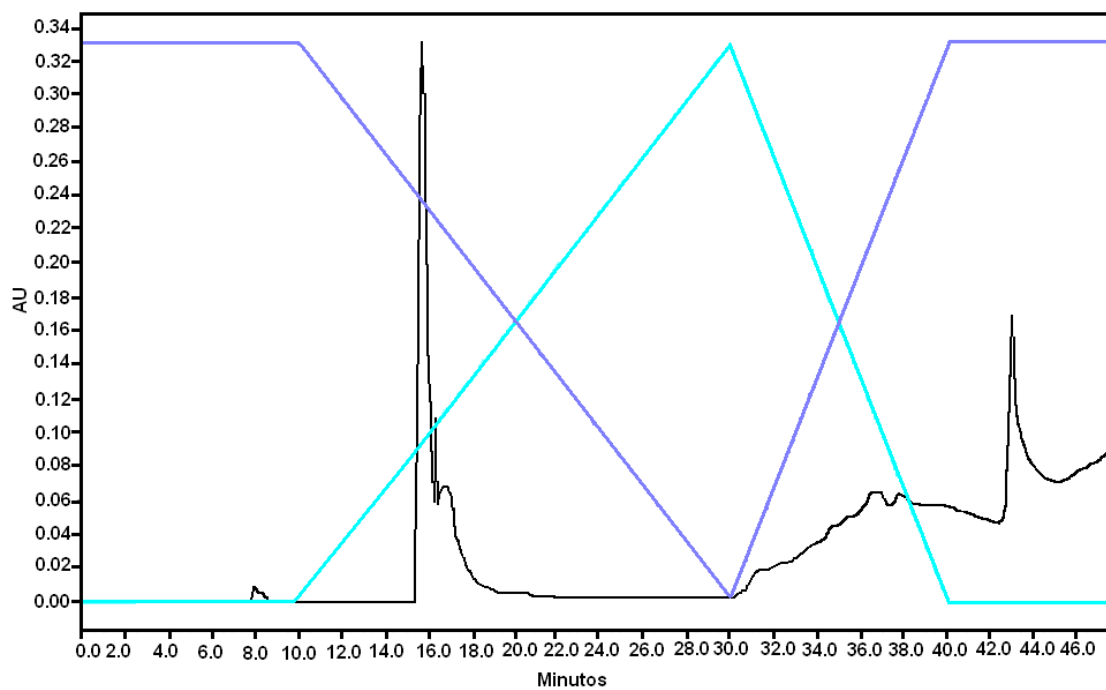


Figura 15. Gradiente en columna C4. Primero se inyectó con un 100% de agua, que decrece gradualmente hasta obtener una fase móvil de 100% de metanol.

Cuadro 3. Gradiente de las fases móviles utilizadas para la separación de MC1-IA

Paso	Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Línea A	Línea B
			Agua	Metanol
1	0	1.0	100%	0%
2	10	1.0	100%	0%
3	30	1.0	0%	100%
4	40	1.0	100%	0%

Como no se obtuvo una buena separación, la fracción se sometió a una nueva separación en HPLC en una columna C4, con una fase móvil constante de metanol: agua 9:1 un flujo también constante de 1 mL/ min e inyecciones de 20  $\mu$ L, en un principio, se recirculo la muestra, para ver si era posible una mejor separación por reciclaje y corte, pero como se observa en la Figura 16, esto no fue posible porque al recircular la muestra los picos perdían resolución.

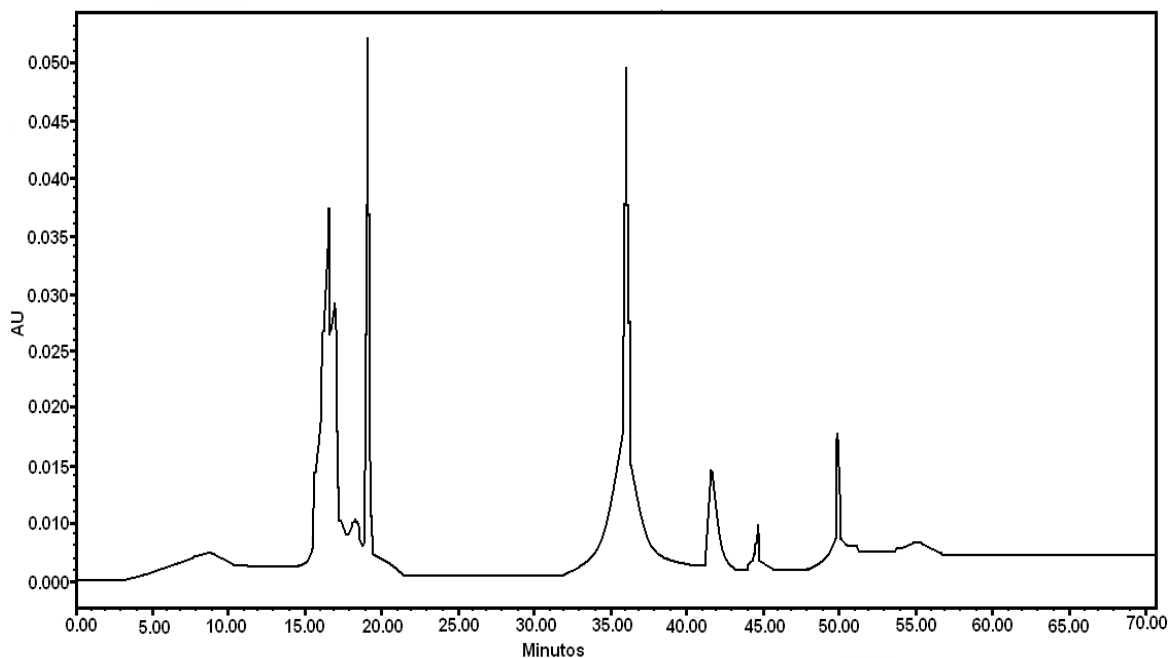


Figura 16. Separación con fase móvil constante, la reinyección se observa a partir del minuto 32, como también se observa la pérdida de resolución de los picos.

Una vez que se observó que bajo estas condiciones si había una separación a pesar de no poder separar todos los componentes se decidió utilizar esta columna y condiciones cromatográficas clasificándose el primer pico como MC1-IA-abc ya que a simple vista se observan 3 componentes en el, el segundo pico que solo muestra 0.011 unidades de absorbancia a 250 nm y 0.009 unidades de absorbancia a 350 nm se nombró MC1-IA-d, el tercer pico que es el que muestra una mejor resolución y por lo tanto el que se sometió a estudios espectroscópicos y espectrométricos posteriores se nombró como MC1-IA-e además de tomar esta decisión basándonos en la resolución de esta fracción, se decidió continuar los estudios sobre la misma ya que muestra la señal de 0.066 unidades de absorbancia a una  $\lambda$  de 250 nm (Figura 17) y una señal de 0.098 unidades de absorbancia a una  $\lambda$  de 350 nm (Figura 18).

La fracción MC1-IA-e se liofilizo y se obtuvieron 11.52 mg de liofilizado, dada la cantidad se decidió pasar a los análisis espectroscópicos y espectrométricos.

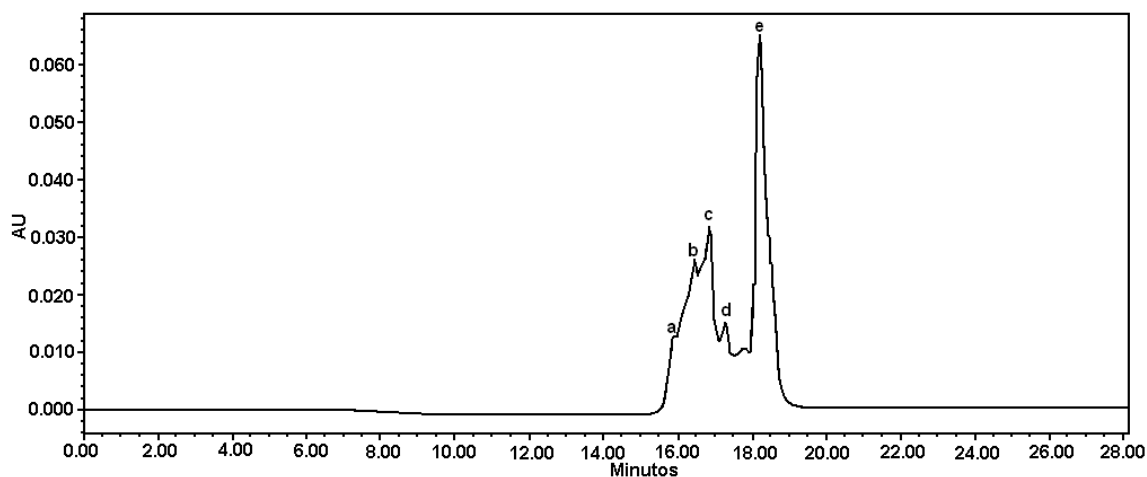


Figura 17. Cromatograma a 250 nm.

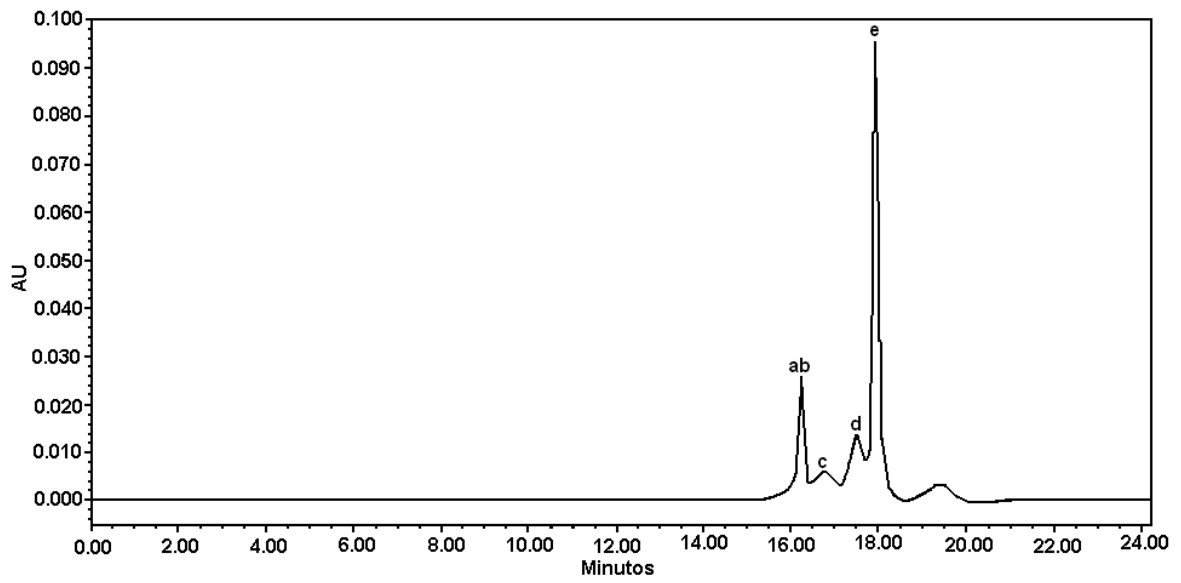


Figura 18. Cromatograma a 350 nm.

## 7. DISCUSIÓN

De acuerdo con estudios anteriores, se ha visto que los principales efectos biológicos que presenta el extracto de *M. complanata* son la actividad vasoconstrictora, el efecto hemolítico y la letalidad en ratones (García-Arredondo y col., 2011). El enfoque principal del presente estudio fue encontrar un método de purificación adecuado para obtener los principales componentes no proteínicos de la fracción MC1-I del extracto de este hidrocoral. Sin embargo, considerando que los fragmentos de *M. complanata* que se utilizaron para la preparación del extracto estuvieron almacenados durante un tiempo prolongado, es importante comprobar que el extracto conserva su actividad biológica. Tomando en cuenta esto, se evaluó la actividad del extracto sobre el tono de segmentos de aorta aislados de rata y su actividad hemolítica.

Al evaluar el efecto del extracto de *M. complanata* sobre el tono vascular de los segmentos de aorta aislados de rata, se encontró una  $CE_{50}$  de  $50.11 \pm 1.15$   $\mu$ g de proteína/mL y un  $E_{max}$  de  $111.70 \pm 5.12$  % (media  $\pm$  S.E.M, n = 3). En un estudio reportado anteriormente acerca del efecto del blanqueamiento sobre la toxicidad del hidrocoral *M. complanata* se encontró una  $CE_{50}$  de  $2.7 \pm 1.1$   $\mu$ g de proteína/mL y un  $E_{max}$  de  $64.6 \pm 2.7$  % (García-Arredondo y col., 2011). Los fragmentos del hidrocoral empleados para ese estudio se recolectaron en la misma fecha y la misma zona del arrecife que los fragmentos empleados para este estudio. Comparando los valores del efecto vasoconstrictor de ambos extractos, puede notarse que evidentemente el extracto preparado para el presente estudio es menos potente que el extracto que se preparó anteriormente para el estudio de blanqueamiento pero presenta una mayor eficiencia. Ambos extractos se prepararon bajo las mismas condiciones. Sin embargo, es importante hacer notar que, dado que el experimento así lo requería, los fragmentos de hidrocoral empleados para la preparación del extracto en el estudio de blanqueamiento estuvieron almacenados en estanques bajo condiciones artificiales similares a las de su hábitat natural por 15 días, posteriormente se preparó el extracto sin pasar



por periodos prolongados de almacenamiento en congelación. Por otra parte, los fragmentos que se utilizaron para preparar el extracto en este estudio se congelaron inmediatamente después de su recolección y estuvieron almacenados hasta por tres años a -70 °C.

Existen dos posibilidades que pueden explicar la variación en el efecto vasoconstrictor de los extractos. Es bien sabido que muchos organismos presentan variación en la producción de sus componentes bioactivos dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentran. De tal modo que los fragmentos de hidrocoral que estuvieron bajo condiciones artificiales pudieron haber presentado cambios en la producción de sus componentes, dando como resultado el aumento en la potencia del efecto vasoconstrictor de su extracto y la disminución de su eficiencia. Es importante recordar que en previos estudios, ya ha quedado comprobado que el efecto vasoconstrictor inducido por el extracto de este hidrocoral es debido a una mezcla de compuestos no proteínicos y proteínicos (Ibarra-Alvarado y col., 2007; García-Arredondo y col., 2011; García 2012). La otra posibilidad que puede explicar el cambio en los efectos es que tras el almacenamiento prolongado las proteínas presentes en el extracto pudieron haber sufrido algún cambio que disminuyera su efecto. Es probable que el extracto de *M. complanata* también presente componentes que disminuyen el tono del músculo liso vascular, de tal manera que al disminuir su efecto de como resultado un aumento en la eficiencia del efecto vasoconstrictor. Un resultado que sustenta esta posibilidad es que en el estudio reportado acerca del efecto del blanqueamiento sobre la toxicidad de *M. complanata* y *M. alcicornis*, se encontró que tras la desnaturalización del contenido de proteína de ambos extractos se observó una disminución en la potencia y un aumento de la eficiencia en ambos casos (García-Arredondo y col., 2011). Además, en uno de los estudios toxicológicos iniciales sobre las especies del género *Millepora* se encontró que los efectos biológicos del extracto de *M. tenera* disminuyen durante el proceso de purificación, liofilización y almacenamiento (Middlebrook y col., 1971), lo cual apoya la idea de que algunos

componentes bioactivos del extracto de *M. complanata* pierden su actividad después del almacenamiento prolongado.

Al evaluar la actividad hemolítica del extracto empleado en este estudio se encontró que éste produce hemólisis con una  $UH_{50}$  de  $2.00 \pm 1.074$   $\mu\text{g}$  de proteína/mL, mientras que en el estudio sobre el efecto del blanqueamiento la  $UH_{50}$  del extracto control fue  $0.5 \pm 0.02$   $\mu\text{g}$  de proteína/mL. Esto significa que el extracto empleado para este estudio es alrededor de cuatro veces menos potente que el extracto empleado como control en los experimentos de blanqueamiento. Esta disminución en la potencia del extracto, al igual que como en el caso del efecto vasoconstrictor, podría deberse al almacenamiento prolongado del extracto.

Una vez comprobada la actividad biológica del extracto, se inició el proceso de purificación para obtener la fracción MC1-I del extracto de *Millepora complanata*, ya que los antecedentes muestran que en esta fracción, además de la MC1-II, también contiene compuestos bioactivos no proteínicos.

El primer paso cromatográfico empleado para fraccionar el extracto acuoso completo se realizó mediante una resina de intercambio aniónico (DEAE-celulosa), a la cual se le unen proteínas y compuestos con carga negativa. El primer pico de interés basándose en los antecedentes (García, 2012) es el primero en salir (MC1). Esto indica que en esta fracción no se encuentran presentes proteínas cargadas negativamente dado que salen con lo no retenido en la columna. Una de las desventajas que presenta este tipo de cromatografías es que se adiciona una gran cantidad de sales para despegar lo retenido en la columna. Considerando esto, el siguiente paso cromatográfico que se realizó en los estudios anteriores fue someter las fracciones obtenidas al paso por una columna de exclusión (Sephadex G-15). Este tipo de columnas pueden separar compuestos con rangos moleculares que van de 5 a 15 kDa, pero también son muy empleadas para eliminar sales de una manera rápida y sin perder mucha muestra como en el caso de los métodos de diálisis. Mediante este proceso, la fracción MC1 se fraccionó en 6 sub-fracciones

En este caso, la fracción de interés es MC1-I, ya que la MC1-II ya ha sido analizada.

La siguiente cromatografía se efectuó en un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), usando una columna de fase reversa C4, de aquí se obtuvieron 12 fracciones de la cual se eligió la primera, dado que en los primeros 15 minutos se mantuvo un flujo constante de una solución 0.1% de ácido trifluoroacético y nuestra fracción de interés aparece de 7.5-8.0 minutos, se puede inferir que esta fracción es altamente polar. Después de esta separación se efectuó la determinación de proteínas por el método de Bradford. Como se esperaba, la fracción no presentó cantidades de proteína detectables sugiriendo la presencia de compuestos altamente polares y no proteicos en la fracción (Skoog DA, *et al.*, 2001).

Continuando con la purificación de los componentes de la fracción MC1-IA y dado que este paso no tenía precedentes se hicieron separaciones basadas en las propiedades de la fracción como su solubilidad, altamente soluble en agua y parcialmente soluble en metanol, se decidió una columna C18 para tratar de purificar sus componentes. Lamentablemente no se obtuvo una buena separación como se puede observar en el cromatograma (Fig. 14), además de que al recircular la muestra, para tratar de cortar la impureza esta no se separó lo suficiente, esto se debe a la presencia de compuestos con propiedades similares (Skoog DA, *et al.*, 2001)..

Las siguientes condiciones de separación que se emplearon fue utilizar un gradiente que va de 100% de agua a 100% de metanol en una columna C4. Este método mostró una mejor separación sin un efecto notable en la implementación de un gradiente (Fig. 15), pero con una separación notable cuando la proporción de agua baja, observando esto se decidió hacer una nueva inyección con una fase móvil constante de metanol: agua 9:1 en la cual se observó una buena separación. Los picos fueron recolectados y etiquetados como “abc”, que están juntos, “d” que

es un pico pequeño y “e” que fue el pico más puro y con máximas absorbancias en 250 nm y 350 nm.

Del pico “e” obtenido a partir de MC1-IA se purificaron 11.52 mg de polvo blanco, mismos que se utilizaron para hacer los análisis espectroscópicos de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono 13 en sus modalidades de una y dos dimensiones (ANEXO 1).

## **8. CONCLUSIONES**

Se encontró que utilizando una fase móvil constante de metanol:agua 9:1 en una columna de HPLC en fase reversa con cantidades de muestra bajas se puede lograr una separación de los picos presentes en la fracción MC1-I obtenida a partir del fraccionamiento cromatográfico del veneno del hidrocoral *M. complanata*. El componente mayoritario de esta fracción bioactiva presenta un compuesto altamente polar de cadena larga que no es análogo de palitoxina.

## 9. REFERENCIAS

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

**Blanchard MG, Rash LD, Kellenberger S.** Inhibition of voltage-gated Na (+) currents in sensory neurons by the sea anemone toxin APETx2. *Br J Pharmacol* **2012**: 165; 2167-2177.

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

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

**da Rocha C. A. M.** Bioactive compounds from zoanthids (Cnidaria: Anthozoa): a brief review with emphasis on alkaloids. *Int. Res. J. Biochem. Bioinform.* **2013**: 3; 1-6.

**Feelisch M, Kotsonis P, Siebe J, Clement B, Schmidt HHH.** The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3,-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Mol Pharmacol* **1999**; 56: 243-253.

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

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

**García-Arredondo** JA. Purificación, caracterización de la estructura primaria y elucidación del mecanismo de acción de toxinas presentes en el veneno de *Millepora complanata*. Querétaro: UNAM, **2012**: 162: 4-8.

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

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

**Hay** M E. Marine chemical ecology: what's known and what's next?. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1996**: 200; 103-134.

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

**Kem** WR, Turk T. Cnidarian toxins and venoms. Preface. *Toxicon* **2009**; 54: 1029.

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

**Lewis** JB. Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Adv Mar Biol* **2006**; 50: 1-55.

**Moats** WE. Fire coral envenomation. *J wilderness med* **1992**; 3: 284-287.

**Nevalainen** TJ, Peuravuori HJ, Quinn RJ, Llewellyn LE, Benzie JA, Fenner PJ, Winkel KD. Phospholipase A2 in cnidaria. *Comp Biochem physiol b biochem mol boil.* **2004**; 139: 731-735.

**Oshiro** N, Kobayashi C, Iwanaga S, Nozaki M, Namikoshi M, Spring J, Nagai H. A new membrane-attack complex/perforin (MACPF) domain lethal toxin from the nematocyst venom of the okinawan sea anemone *Actinaria villosa*. *Toxicon* **2004**; 43; 225-228.

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

**Prasad** GV, Vicent L, Hamilton R, Lim K. Minimal change disease in association with fire coral (*Millepora* species) exposure. *Am j kidney dis* **2006**; 47: E15-E16.

**Radwan** FFY, Aboul-Dahab HM. Millepirin-1, a new phospholipase A2 active protein from the fire coral *Millepora plantyphyla* nematocyst. *CBP* **2004**; 139: 267-272.

**Razpotnik** A, Krizaj I, Sribar J, Kordis D, Macek P, Frangez R, Kem WR, Turk T. A new phospholipase A2 isolated from the sea anemone *Urticina crassicornis* – its primary structure and phylogenetic classification. *FEBS J* **2010**; 277; 2641-2653.

**Roethle** P A, Trauner D. The chemistry of marine furanocembranoids, pseudopteranes, gersolanes and related natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2008**; 25; 298-317.

**Rojas** A, Torres M, Rojas JI, Feregrino A, Heimer-de la Cotera EP. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon* **2002**; 40: 777-785.



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

**Sarukhán** J, Koleff P, Carabias J, Soberón J, Dirzo R, Llorente-Bousquets J et al. Capital natural de México síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. México: Comisión nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad, **2009**: 9- 18.

**Satoh** H, Oshiro N, Iwanaga S, Namikoshi M, Nagai H. Characterization of PsTX-60B, a new membrane-attack complex/perforin (MACPF) family toxin, from the venomous sea anemone *Phylodiscus semoni*. *Toxicon* **2007**: 49; 1208-1210.

**Schägger** H, Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **1987**; 166: 368-379.

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

**Skoog** DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. 5ª edición. Madrid; Mc Graw-Hill, **2001**: 785-830.

**Smith** TM, Smith RL, San José-Román E. Ecología. 4ª edición. Madrid: Pearson Addison Wesley, **2001**: 569- 573.

**Suput** D. In vivo effects of cnidarians toxins and venoms. *Toxicon* **2009**: 54; 1190-1200.

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

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

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

## ANEXOS

Anexo I. Análisis Espectroscópicos y Espectrométricos del compuesto MC1-IA-e.

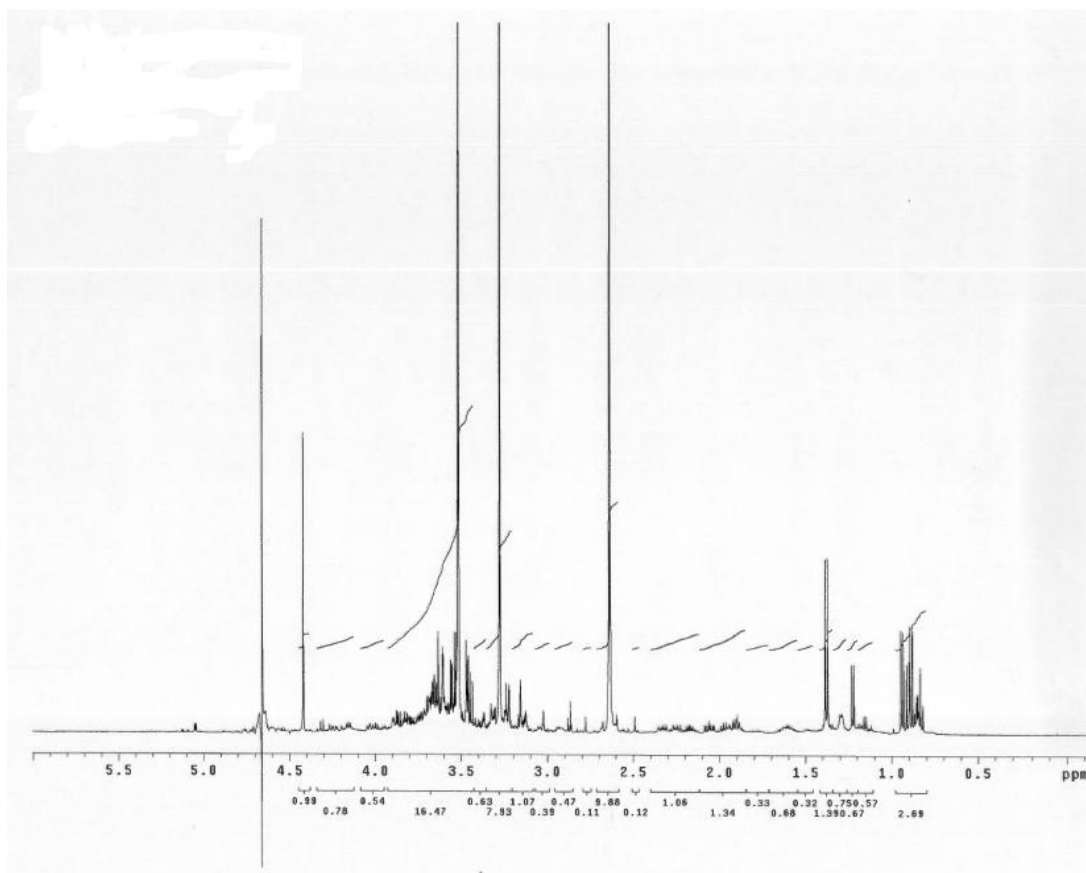


Figura 19. RMN protónica de la fracción MC1-IA-e

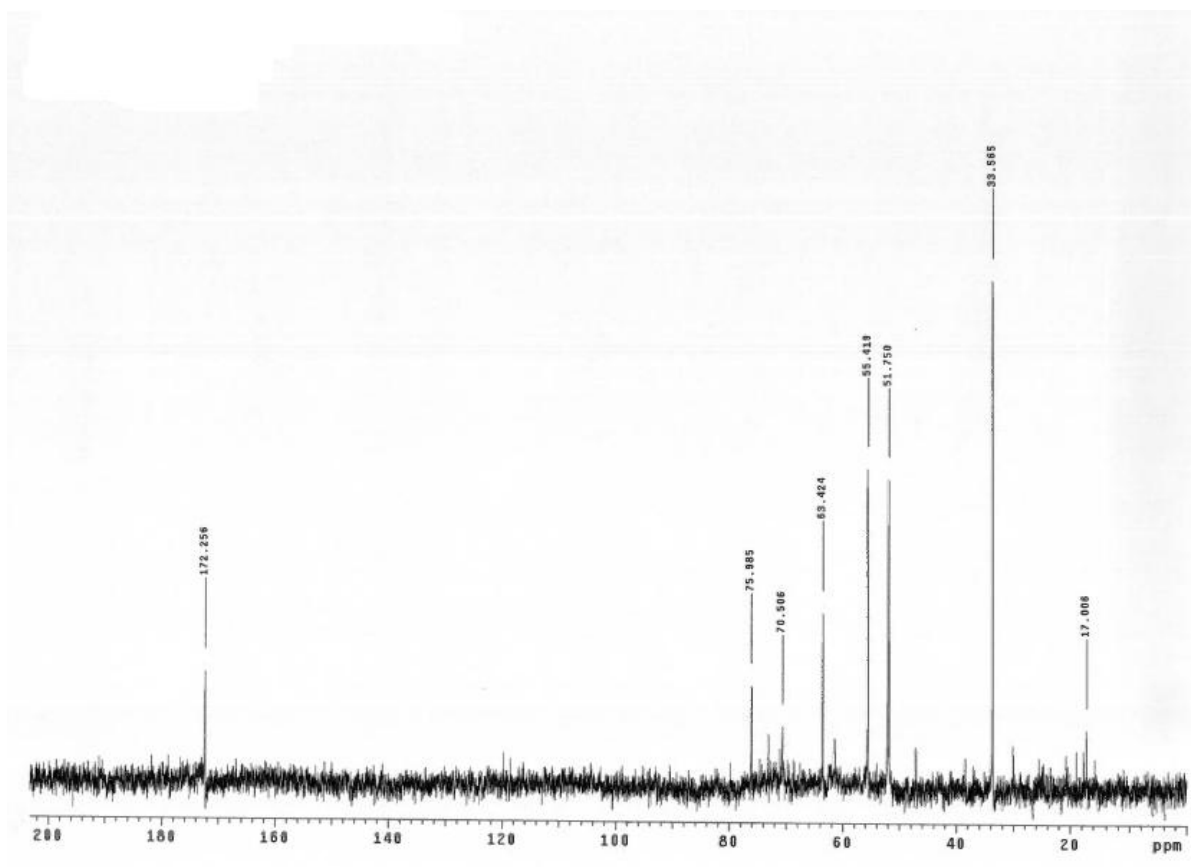


Figura 20.  $^{13}\text{C}$  RMN de la fracción MC1-IA-e.

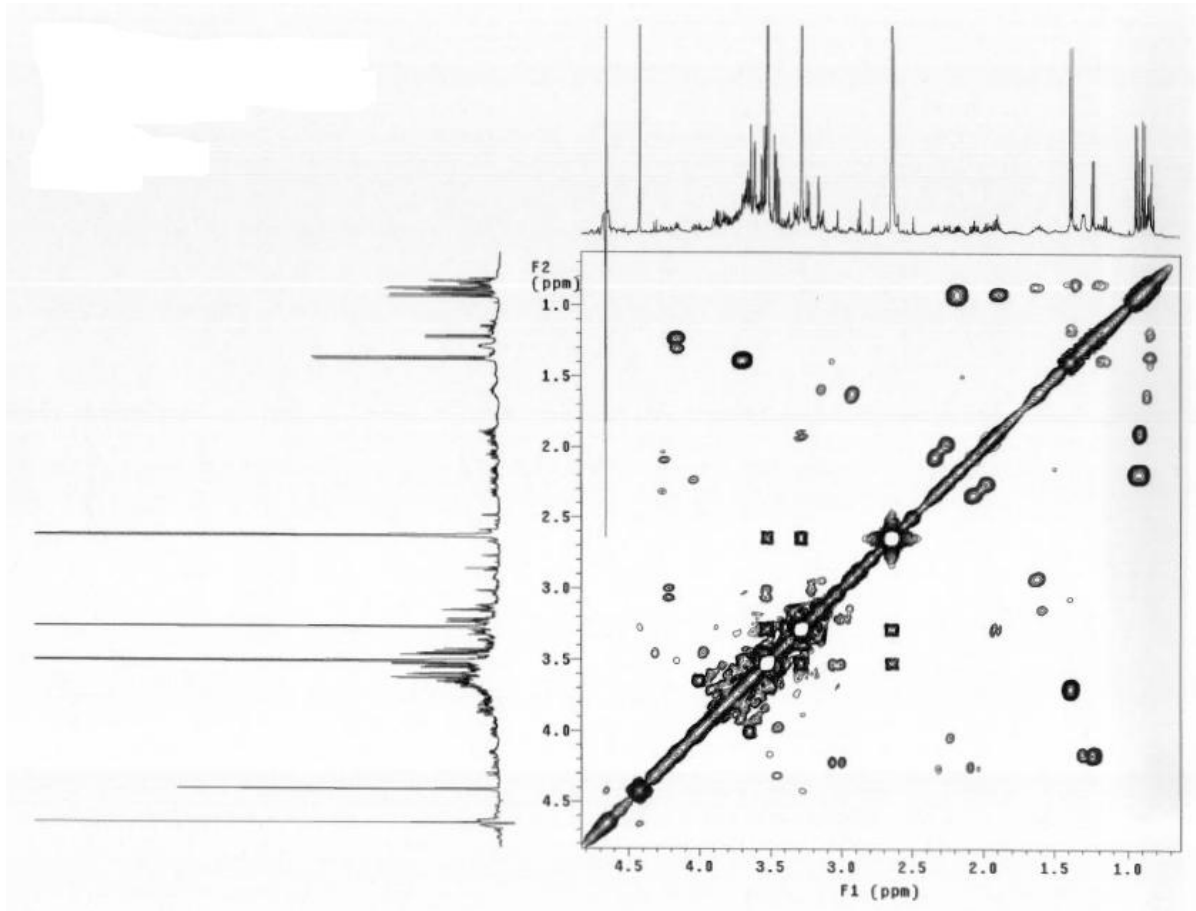


Figura 21. Espectroscopia de correlación (COSY) de la fracción MC1-IA-e.