

# Búsqueda de toxinas y metabolitos secundarios a partir del hidrocoral de fuego *Millepora alcicornis*.

Gutiérrez Chávez, B.C.<sup>(1)</sup>; Rojas Molina, A.<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.

## RESUMEN

En el presente trabajo de verano de la investigación se participó en la purificación de las toxinas y metabolitos secundarios producidos por *Millepora alcicornis*. Para la purificación de las toxinas, el extracto acuoso de este hidrocoral se sometió a un análisis por cromatografía utilizando FPLC de intercambio iónico y de exclusión molecular. Posteriormente a las fracciones obtenidas se les evaluó el efecto hemolítico y el efecto sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. Las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. Por otro lado, con respecto a la búsqueda de metabolitos secundarios, se preparó un extracto de diclorometano:metanol (1:1) a partir del cual se realizaron particiones utilizando solventes de diferente polaridad y los componentes extraídos en cada partición, se separarán por medio de cromatografía en capa fina.

## INTRODUCCIÓN

Los cnidarios son animales acuáticos, solitarios o coloniales, simétricos, cuyo cuerpo se encuentra organizado alrededor de un eje oral-aboral. Tienen epidermis y una gastrodermis, separadas por una capa gelatinosa llamada mesoglea, así como una sola abertura rodeada de tentáculos que funciona como boca y ano. (Fernández y Rivas, 2007). Los cnidarios se caracterizan por tener unas células especializadas denominadas cnidocitos (de los cuales toma su nombre este Phylum). Los cnidocitos (palabra que significa “células de aguijón”), que se encuentran en la superficie de los tentáculos en los pólipos y las medusas, funcionan como defensa y para capturar presas (Campbell y Mitchell, 2001). Los cnidocitos cuentan con organelos especializados llamados nematocistos, los cuales contienen toxinas que se liberan durante la descarga del cnidocito después de una estimulación (Kruijf, 1995). El Phylum Cnidaria incluye cuatro clases: Anthozoa, Scyphozoa, Cubozoa e Hydrozoa; esta última (Hydrozoa) comprende a los organismos del género *Millepora*, los cuales constituyen componentes muy importantes de los arrecifes de coral en los mares tropicales y se encuentran a profundidades comprendidas entre 1 y 40 metros; se alimentan de zooplancton y de fuentes autótrofas y debido a la presencia de nematocistos que producen compuestos altamente tóxicos, son comúnmente conocidos como corales de fuego (Lewis, 1989). Los efectos reportados de las toxinas de *Millepora* al contacto con la piel incluyen dolor intenso (Russell, 1965); eritemas (Sagi et al, 1987); erupciones cutáneas (Bianchini et al, 1988) y estudios llevados a cabo con el extracto crudo de *M. tenera* y *M. alcicornis* mostraron actividades hemolíticas y dermonecroticas (Wittle and Wheeler, 1974); mientras que *M. platyphylla* y *M. dichotoma* poseen efectos letales y hemolíticos (Shiomi et al, 1988). Estudios recientes llevados a cabo con las toxinas de *M. complanata* mostraron un efecto excitatorio sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo y sobre el tono del músculo liso de aorta de rata (Rojas y col., 2002; Ibarra y col., 2007). Los estudios llevados a cabo con hidrocorales son muy escasos y actualmente no se

conoce por completo la composición y estructura de sus toxinas, por esta razón se emprende el estudio hacia la búsqueda de toxinas y metabolitos secundarios a partir de *Millepora alcicornis*, ya que este organismo representa una fuente potencial valiosa de moléculas bioactivas que podrían desarrollar un papel importante en el campo de la química, bioquímica, farmacología y biotecnología.

## **OBJETIVO**

Colaborar en la búsqueda de toxinas y metabolitos secundarios producidos por el coral de fuego *Millepora alcicornis*.

## **METODOLOGÍA**

*Recolección del hidrocoral y preparación del extracto crudo de Millepora alcicornis:* La colecta se llevo a cabo en el estado de Quintana Roo en el parque nacional de arrecifes de Puerto Morelos; los fragmentos se congelaron y mantuvieron en hielo seco para su transportación al Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Posteriormente se elaboró el extracto crudo, para lo cual se descargaron los nematocistos de los hidrocorales sometiendo los fragmentos a agitación con agua desionizada durante 18 horas a 4°C. A continuación la muestra fue liofilizada.

*Análisis cromatográfico:* La muestra liofilizada fue resuspendida en agua obteniéndose el extracto crudo, el cual se sometió a un fraccionamiento mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna empacada con DEAE-celulosa, de aquí surgieron 2 fracciones denominadas MA1 y MA2. Posteriormente, estas dos fracciones se liofilizaron y se resuspendieron en agua desionizada y se sometieron a una separación por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna empacada con Sephadex G-15, de la que se obtuvieron de MA1 4 fracciones (MA1-1; MA1-2; MA1-3 y MA1-4). Y de MA2 5 fracciones (MA2-1; MA2-2; MA2-3, MA2-4 y MA2-5).

*Ensayo de íleon aislado de cobayo:* Se realizó el ensayo de íleon aislado de cobayo para evaluar la actividad excitatoria de las fracciones MA1-1; MA1-2; MA1-3 y MA1-4. Se utilizaron segmentos de íleon, los cuales se montaron en celdas con solución de Krebs-Henseleit a 37°C gasificada constantemente con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Las contracciones espontáneas de los tejidos se registraron por medio de transductores de fuerza acoplados a un polígrafo Grass. El efecto excitatorio se expresó como el porcentaje de la contracción inducida por acetilcolina a una concentración 1µM (Samuelsson, 1991 y Rojas y col., 2002).

*Ensayo hemolítico:* La determinación de la actividad hemolítica del extracto acuoso de *M. alcicornis* se realizó de acuerdo con el método empleado por Torres y col. (2001), utilizando eritrocitos de sangre fresca de ratas macho. El efecto hemolítico se expresó como el porcentaje de hemoglobina liberada comparado con la hemoglobina presente en la hemólisis total producida por la suspensión de las muestras de eritrocitos en agua desionizada.

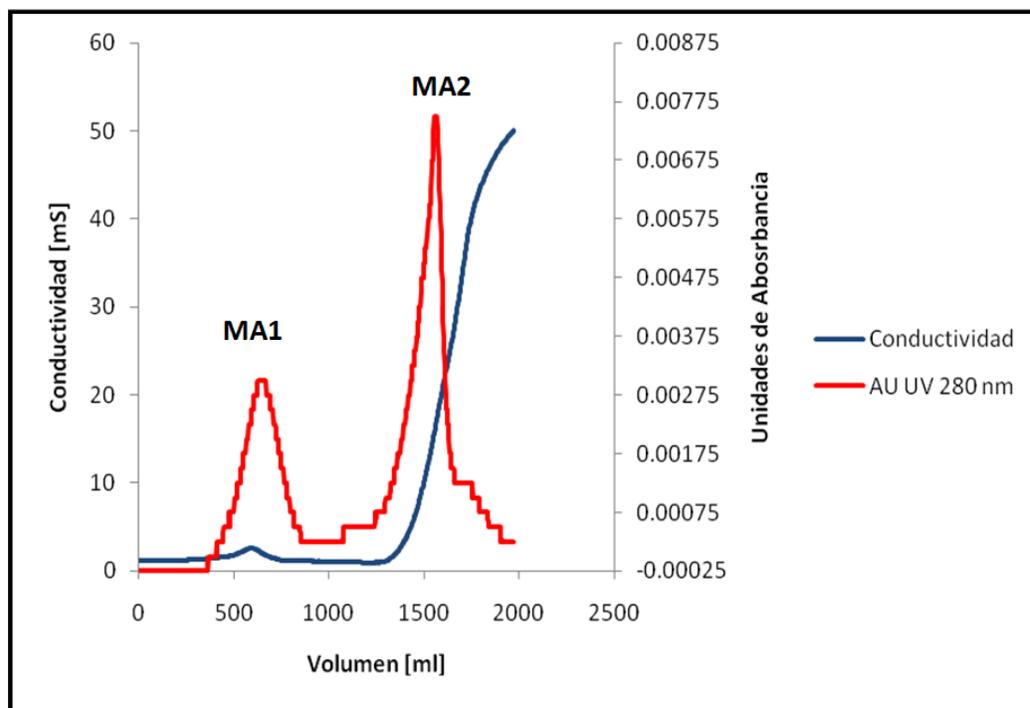
*Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio:* Se realizó un análisis electroforético en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de las fracciones MA1 y MA2, utilizando geles de poliacrilamida al 12%, los cuales se corrieron a 90 V 30 minutos y posteriormente a 120 V durante aproximadamente hora y media. Las bandas de proteína se visualizaron mediante azul de Comassie. Para la determinación de los pesos

moleculares relativos de las proteínas presentes en las muestras se utilizaron estándares preteñidos de amplio espectro (Bio-Rad) para obtener una aproximación de los pesos moleculares relativos de las principales bandas observadas en el gel.

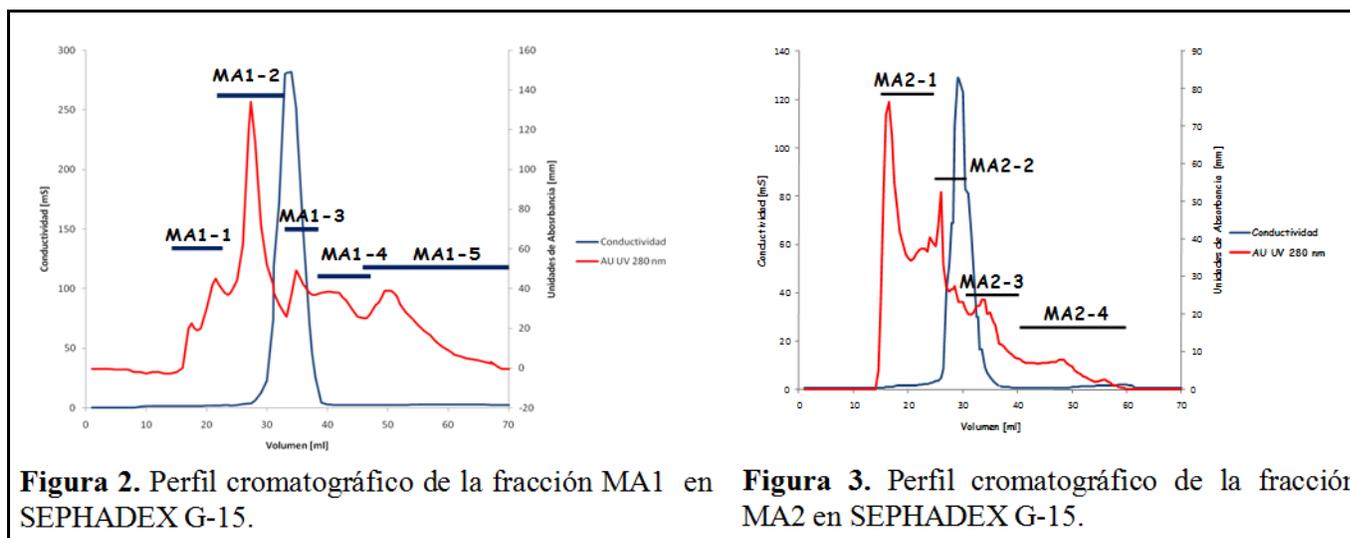
*Búsqueda de metabolitos secundarios:* La muestra liofilizada obtenida de la descarga de los nematocistos se resuspendió en una solución de diclorometano-metanol 1:1 y se dejó en reposo por 15 días, posteriormente se filtró y evaporó, este proceso se realizó tres veces. De aquí se obtuvo una parte de la muestra que fue soluble en el diclorometano a la cual se le denominó extracto, y la parte no soluble se llamó residuo. El extracto y el residuo se evaporaron a sequedad, se resuspendieron en agua y se llevaron a cabo las particiones para separar sus componentes de acuerdo a su polaridad empleando como solventes: hexano, diclorometano, acetato de etilo, butanol y agua. De las particiones obtenidas con hexano y diclorometano se prepararon alícuotas de 3 mg para realizar análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Por otra parte, de las particiones obtenidas con acetato de etilo se realizaron placas cromatográficas en capa fina con diferentes sistemas para la separación de los componentes.

## DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

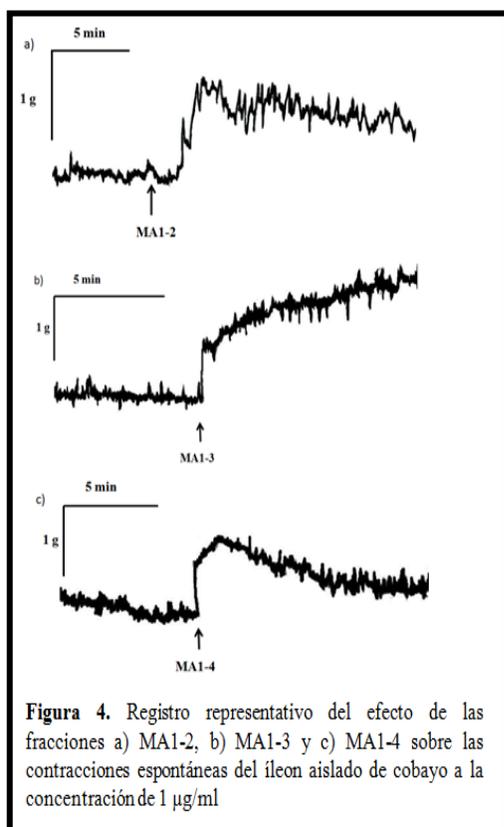
Como resultado del fraccionamiento mediante cromatografía de intercambio aniónico se muestra el cromatograma obtenido, (Figura 1) en el cual se pueden apreciar claramente las fracciones señaladas anteriormente (MA1 y MA2). Posteriormente se llevó a cabo la separación por cromatografía de exclusión molecular utilizando la columna Sephadex G-15, de la cual se obtuvieron los cromatogramas que se muestran en las figuras 2 y 3, donde se pueden observar los perfiles cromatográficos obtenidos de las fracciones MA1 y MA2, respectivamente.



**Figura 1.** Perfil cromatográfico obtenido para el fraccionamiento del extracto de *M. alcicornis*, al pasar por una columna de DEAE-celulosa.



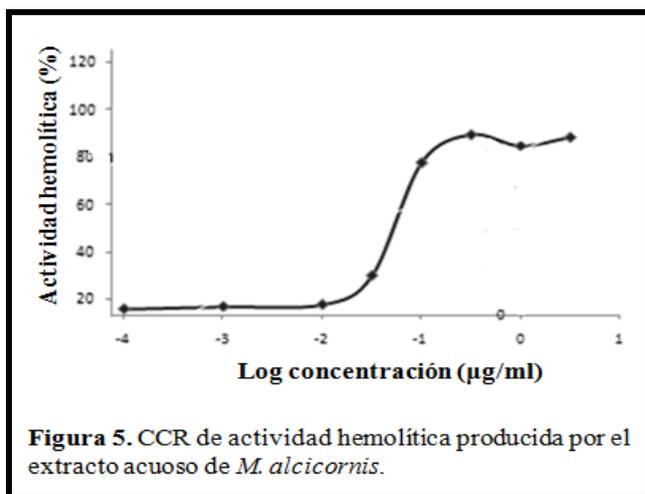
### Ensayo de íleon aislado de cobayo



Las fracciones de MA1 (MA1-2; MA1-3 y MA1-4) se evaluaron en el modelo de íleon aislado de cobayo a una concentración de 1 µg/ml, todas produjeron una respuesta excitatoria en el íleon: MA1-2 = 107.41% ± 3.74, MA1-3 = 86.99% ± 5.8 y MA1-4 = 51.84% ± 11.66 (expresados como el porcentaje de la contracción inducida por acetilcolina a una concentración 1 µM). El efecto máximo excitatorio inducido por MA1-2 se presentó a los 2 ± 0.7 min, mientras que en el caso de MA1-3 y MA1-4 el efecto fue inmediato (Figura 4).

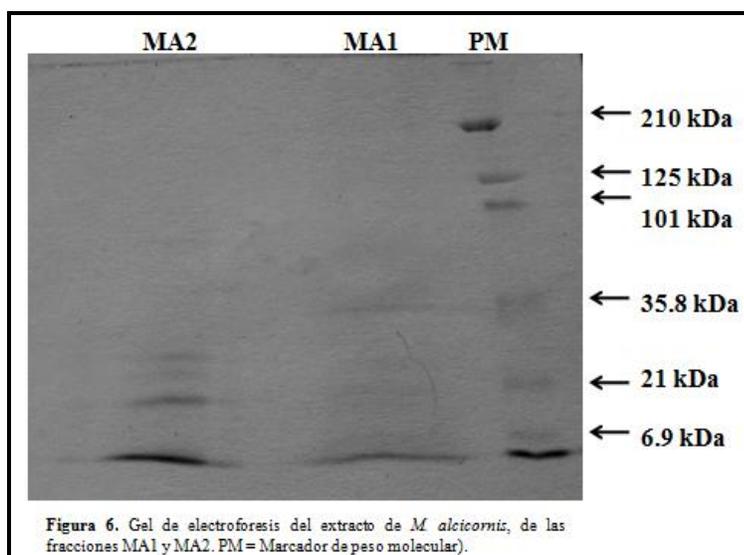
## Ensayo de Hemólisis

Este ensayo permitió valorar la capacidad hemolítica del extracto acuoso de *M. alcornis*, a diferentes concentraciones (0.0001 – 3.16  $\mu\text{g/ml}$ ), observando un alto poder hemolítico del extracto. La Figura 5 muestra la curvas concentración-efecto hemolítico obtenidas para el extracto de *M. alcornis*, ( $\text{CH}_{50} = 0.0728 \pm 0.1850 \mu\text{g/ml}$ ).



## Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio

El análisis electroforético mostró que ambas fracciones MA1 y MA2 tienen un patrón de proteínas y péptidos de bajo peso molecular. Se observan similitudes en 2 bandas cerca de los 21 kDa.



## Búsqueda de metabolitos secundarios

Se llevó a cabo la obtención del extracto de diclorometano:metanol 1:1 a partir del extracto acuoso liofilizado de *Millepora alcicornis* y posteriormente se efectuaron particiones con disolventes de polaridad creciente. De cada una de las particiones resultantes se calculó el rendimiento con respecto al extracto crudo (Figura 7).

Solvente		Peso (mg)	Rendimiento (%)
Hexano	Extracto	6.77	0.312
	Residuo	623.23	28.73
Diclorometano	Extracto	15.07	0.69
	Residuo	50.78	2.341
Acetato de Etilo	Extracto	15.39	0.7095
	Residuo	8.98	0.414
Butanol	Extracto	124.46	0.7079
	Residuo	64.19	0.414
Agua	Extracto	617.6	5.73
	Residuo	64.0175	2.95

Figura 7. Pesos obtenidos y rendimiento a partir del extracto crudo de *M. alcicornis*

El proceso para la obtención de los sistemas de elución que separen completamente los componentes de las diferentes particiones aún sigue en marcha, sin embargo, los resultados hasta aquí obtenidos, muestran que la partición de acetato de etilo obtenida a partir del sobrenadante tiene una mezcla en componentes muy compleja en la que se logran distinguir 5 bandas principales en la mayoría de los sistemas, mientras que la partición de acetato de etilo del residuo presenta únicamente una banda de gran tamaño que en algunas ocasiones se ha logrado separar en 2, pero debido a la similitud que presentan en cuanto a sus polaridades, es difícil separarlos.



Figura 8. Cromatografía en capa fina del extracto y residuo solubles en acetato de etilo a un sistema de Diclorometano (DCM): Acetato de Etilo 1:1

## CONCLUSIONES

El proyecto aún sigue en marcha, sin embargo, se observó que las toxinas tienen un poder inhibitor y excitatorio de las contracciones del íleon de cobayo que dependen de la concentración de las mismas, también tienen un alto poder hemolítico en eritrocitos de ratón y por su parte la electroforesis mostró que las proteínas tienen un patrón de bajo peso molecular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bianchini, G., Lotti, T., Campolmi, P., Casigliani, R., Panconesi, E., 1988. Coral ulcer as a vasculitis. *Int. J. Dermatol.* 27 (7), 506-507.
- Campbell, N. y Mitchell, L. *Biología*. Editorial Pearson. México. 371, 2001.
- Fernández, M. y Rivas, G. Niveles de organización en animales. Facultad de ciencias, UNAM. México. 62-63. 2007.
- Ibarra A. C., García J. A., Aguilar M. B., Rojas A., Falcón A. y Heimer de la Cotera E. P. (2007). Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comparative. Biochemistry and Physiology. C*:146;511-518.
- Kruijf, H. 1975. General morphology and behaviour of gastrozooids and dactylozooids in two species of *Millepora* (Meleporina, Coelenterata). *Mar. Behav. Physiol.* 3, 181-192.
- Lewis, J. 1989. The ecology of *Millepora*. *Coral Reefs* 8, 99-107.
- Rojas A., Torres M., Rojas J. I., Feregrino A. y Heimer de la Cotera E. (2002). Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon* 40:777-785.
- Russell, E. 1965. Marine Toxins and venomous and poisonous marine animals. *Advances in Marine biology*. Vol. 3. p 255.
- Sagi, A., Rosenberg, L., Ben-Meir, P., Hauben, D., 1987. The fire coral (*Millepora dichotoma*) as a cause of burns: a case report. *Burns Incl. Therm. Inj.* 13 (4), 325-326.
- Samuelsson G. (1991). Assays for pharmacological activity: Non-specific assays. *Methods in plant biochemistry*. 1ra ed. *Academic Press, Nortfolk*. 261- 280.
- Shiomi, K., Masatoshi, H., Norie, Y., Hideaki, Y. Takeaki, K. 1988. Partial Characterization of Venoms from two species of fire corals *Millepora platyphylla* and *Millepora dichotoma*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 357-362.
- Torres M., Aguilar M.B., Falcón A., Sánchez L., Radwan F. F., Burnett J.W., Heimer-de la Cotera E. y Arellano R. O. (2001). Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of jellyfish *Casiopea xamachana*. *Toxicon*: 39:1297-1307.
- Wittle L. W. y Wheeler (1974). Toxic and immunological properties of stinging coral toxin. *Toxicon*. 12:487-493.