

03096
4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

**Posgrado en Ciencias del Mar
y Limnología**

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION
DE UNA CITOLISINA DE LA ANEMONA
Bunodeopsis antilliensis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

(QUIMICA ACUATICA)

P R E S E N T A :

BIOL. CLAUDIA RODRIGUEZ ALMAZAN

29/525
OK



DIRECTOR DE TESIS: DR. EDGAR PHILLIP HEIMER DE LA COTERA

COMITE TUTORAL: DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMIREZ

DRA. MA. ESTHER DE LA ROSA DUQUE

DRA. ELVA ESCOBAR BRIONES

DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOSA DE LOS MONTEROS

MEXICO, D. F.

ABRIL, 2001.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Ed Heimer por permitirme trabajar a su lado y por todo el apoyo que me brindó para desarrollar este trabajo, especialmente por todas las enseñanzas que aprendí de él para llegar a ser un excelente investigador. Dr. Ed, mil gracias.

A los investigadores que formaron parte de mi comité tutorial, Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros, Dra. Elva Escobar Briones, Dra. Ma. Esther de la Rosa Duque, Dr. Manuel Aguilar Ramírez, por todo su tiempo que dedicaron para asesorarme y corregir este escrito. Con todas sus asesorías he dado un paso enorme en mi formación como científica, gracias a los cuatro.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo con la beca crédito No. 128459 , y al PAPIIT por una beca con No. IN226998. Ambos apoyos permitieron de darme tiempo completo a este trabajo y finalizarlo satisfactoriamente.

Al Centro de Neurobiología, Campus UNAM-UAQ, Juriquilla (Laboratorio de Farmacología Marina, B-01) y al Instituto de Química de la UNAM (Laboratorio de Bioquímica 2), que me permitieron acceder a sus instalaciones para desarrollar gran parte de los experimentos de este trabajo.

Al Instituto de Ciencias Del Mar y Limnología, así como a su Posgrado por permitirme formar parte de sus estudiantes.

A mis padres, Aurelio y Otilia, por su gran amor, paciencia, apoyo para que día con día me supere, y por mantener siempre ese ambiente familiar tan agradable que se percibe en casa, esto es tan importante para no darme por vencida. Los amo.

A mis hermanos, Leticia, Mónica, Aurelio y Verónica, porque nunca dudan en apoyarme para seguir con mis estudios. Los amo.

A Pedro, por que sé que siempre contaré con él. Amor, muchas gracias por la infinidad de grandes momentos que he pasado contigo, por los numerosos meses que me has permitido estar a tu lado, y sobre todo gracias por la computadora, sin ella no hubiese terminado a tiempo mi escrito. Te amo.

A todas las personas de la Estación Puerto Morelos del ICML, que colaboraron en la recolecta de las anémonas, particularmente a la Biól. Ma. Eugenia Ramos, al M. en C. Fernando Negrete, y de manera muy especial al Biól Martín Sánchez, quien en la última colecta apoyó con equipo SCUBA, transporte, personal e instalaciones de laboratorio del Acuario de Xcaret, Quintana Roo.

Al Biól. Andrés Falcón, por su asesoría durante mis experimentos, gracias por tu amistad y por esa gran paciencia y todos tus conocimientos que me transmitiste durante mi estancia en el Centro de Neurobiología.

Al Dr. Rogelio Arellano, del Centro de Neurobiología, por el apoyo en la realización del estudio elelctrofisiológico que se llevó a cabo en la presente tesis.

Al Dr. Alfonso Carabez y M. en C. Lourdes Palma, por su asesoría y apoyo para efectuar los estudios que se efectuaron con técnicas de microscopía electrónica.

A todo el staff del laboratorio B-01 del Centro de Neurobiología por su amistad: Luz, Mónica, Estuardo, María, Manuel, Lenin, Andrés, Dr. Ed, Heriberto, Alejandra y Dorothy.

A Hortensia, mi amiga, por su apoyo, hospedaje en Querétaro y amistad para poder terminar este trabajo.

A todas las personas interesadas en investigar las toxinas de los organismos marinos.

RESUMEN

En esta tesis se reporta la purificación y la caracterización parcial de dos citolisinas de la anémona *Bunodeopsis antillensis*, a las que se dio el nombre de antillensina I y antillensina II. Con un total de 251 g de peso húmedo de organismos, se obtuvieron las citolisinas con la técnicas de filtración en gel, intercambio catiónico, intercambio iónico e isoelectroenfoque preparativo. El peso molecular se determinó por medio de electroforesis en SDS-PAGE resultando los siguientes valores: para antillensina I, 30, 025 Da, y para antillensina II, 34, 973 Da; el punto isoelectrico se determinó por isoelectroenfoque, obteniendo dos puntos isoelectricos: 5.23 y 4.89. El estudio demostró que el extracto crudo de *B. antillensis* posee una actividad hemolítica en eritrocitos de rata, humano y oveja. La sensibilidad de estos eritrocitos para ser lisados por el extracto crudo fue diferente, teniendo una disminución en la sensibilidad con el siguiente orden: humano (6.7×10^3 HU/mg), oveja (3.3×10^3 HU/mg) y rata (125 HU/mg). La actividad hemolítica fue atribuida a las toxinas contenidas en los nematocistos, debido a que durante la extracción, la actividad lítica se incrementó (80 %, aproximadamente) al ser descargados. Por esto, se presenta una descripción general de los cnida localizados en los tentáculos de las anémonas, obtenida por microscopía de luz y técnicas de microscopía electrónica. Se observó que *B. antillensis* contiene, además de espirocistos, nematocistos del tipo b-mastigoforos microbásicos de 40 μ m de longitud. Estos últimos cnida presentaron en su interior un túbulo con espinas en arreglo helicoidal y una estructura en forma de red. El estudio preliminar realizado con la técnica de control de voltaje en ovocitos de *Xenopus laevis*, se observó que la fracción I obtenida de la filtración por gel (misma fracción que se empleó para la purificación parcial de las citolisinas), tuvo una corriente entrante lisa asociada a un aumento de conductancia de la membrana.

ÍNDICE

	Pg
INTRODUCCIÓN	01
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO	12
METAS	12
ÁREA DE RECOLECTA	13
ALGUNOS ASPECTOS DE LA BIOLOGÍA DE LAS ANÉMONAS	16
TAXONOMÍA	19
MÉTODO	
a) Recolecta	21
b) Extracción de toxinas	21
c) Cuantificación de proteína	22
d) Bioensayos	
1. Ensayo lítico	23
2. Registro electrofisiológico	24
e) Purificación	26
f) Caracterización	29
RESULTADOS	
Observaciones durante la colecta	36
Cuantificación de proteína	36
Bioensayos	
1. Ensayo lítico	37
2. Registro electrofisiológico	39
Purificación	40
Descripción de cnida en tentáculos	47
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	56
BIBLIOGRAFÍA	58

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones de nuevos compuestos con actividad biológica extraídos de organismos marinos, así como el entendimiento de mecanismos involucrados en su acción son ahora objeto de investigaciones intensas. Considerando que las especies marinas comprenden aproximadamente la mitad del total de la biodiversidad mundial, el mundo marino ofrece un recurso enorme para encontrar compuestos nuevos. México es uno de los países más ricos en el mundo en biodiversidad marina, debido a su extenso litoral que abarca en los océanos Pacífico y Atlántico.

A partir de la década de los veintes, el estudio de sustancias tóxicas provenientes de organismos marinos se realiza de manera más intensa, debido al gran número de incidentes en humanos a escala global que se registraron en aquella época, producidos por los cnidarios *Physalia physalis* y *Chironex fleckeri*. La mayoría de los reportes provinieron de salvavidas o casos clínicos publicados en zonas de América y Australia. Las lesiones producidas por los cnidarios se manifestaron de manera masiva en la piel y, en la mayoría de los casos producían la muerte en minutos debido a un paro respiratorio, hipoxia y paro cardíaco (Hessinger, 1988; Fenner *et al.*, 1996).

En la década de los sesentas, cientos de personas presentaron lesión por *Physalia* en las costas de la Península de Florida, Estados Unidos, y en playas del Caribe. La picadura de dicho hidrozooario generalmente no es fatal, pero produce erupciones cutáneas y dolor muy agudo. En algunos casos los síntomas agudos incluyen dificultades en la respiración, aparentemente debido a convulsiones e irregularidades cardíacas; además de producir una hemólisis sistémica en el sistema renal (Hessinger, 1988; Fenner *et al.*, 1996). En la misma época, *Chironex fleckeri* del Indo-Pacífico fue considerado el más peligroso de los cnidarios, su picadura produce una reacción cutánea donde se produce un edema considerable y necrosis subcutánea. Con la fatal picadura, la víctima se colapsa en 20 minutos y la muerte aparentemente se debe a un paro cardíaco (Fenner *et al.*, 1996).

Physalia physalis y *Chironex fleckeri* pertenecen al Phylum Cnidaria, que es un grupo marino, antiguo y particularmente con un buen éxito evolutivo, está dividido en tres clases: Hydrozoa (hidrozooarios), Scyphozoa o Scyphomedusae (medusas) y Anthozoa (anémonas y corales). La característica principal del Phylum es la presencia de cnidocitos, células que dan origen a un orgánulo capsular llamado cnidae que contiene en su interior un tubo muy delgado, donde almacena compuestos tóxicos que son empleados por los organismos para defensa contra depredadores para proteger su territorio y para la captura de su alimento. El cnidae es una característica taxonómicamente importante en el grupo Anthozoa, principalmente en las anémonas debido a que la forma de cada tipo de nematocisto es muy específica para los organismos de dicho grupo. Existen tres tipos de cnida (Figura 1) (Halstead, 1978; Wood, 1988; Fautin, 1988; Hessinger y Lenhoff, 1988; Shick, 1991; Barnes y Ruppert, 1996; Rifkin, 1996):

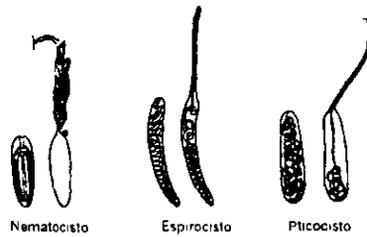


Figura 1. Representación de los tres tipos de cnida que se pueden localizar dentro del grupo Cnidaria.

1. Espirocistos: se localizan principalmente en los tentáculos donde dominan en número, constan de un tubo de diámetro constante en todo lo largo de la estructura, a lo largo del tubo se distribuyen espinas con arreglo helicoidal, el organismo emplea esta estructura para capturar su alimento, cuando se expulsa el tubo una red fina de microfibrillas se adhieren a la presa.

2. Pticocistos: se encuentran en el ectodermo de la columna de los organismos del grupo Ceriantharia. Cuando son expulsados se adhieren con las paredes de la cámara donde habita el pólipo.

3. Nematocistos: se distribuyen en diferentes regiones de los organismos: tentáculos, disco oral, acontia y columna (Figura 2). El tubo interno de este tipo de cnidae presenta espinas con un arreglo helicoidal (Figura 3), con las cuales taladra el tejido de la presa para penetrarla e inyectar la toxina contenida en la matriz del nematocisto, la toxina actúa rápidamente y está diseñada para tener inmediatamente un efecto defensivo de aturdir, inducir dolor en un depredador potencial y de inmediato puede producir una parálisis o matar a la presa.

Dentro de las respuestas agresivas de los cnidarios se presentan las siguientes: el uso de vesículas que se encuentran en la base de los tentáculos, captura por tentáculos, fricción con tentáculos y filamentos del mesenterio; todos estos mecanismos están acompañados con la descarga de cnida, principalmente nematocistos. La descarga de estas estructuras intracelulares se debe tanto a estímulos mecánicos como químicos. Es importante mencionar que los tentáculos son esenciales para capturar la presa, debido a que por medio de ellos se tiene contacto físico con la presa produciendo una descarga de cnidae y una sustancia mucosa que contiene enzimas, posteriormente el alimento es llevado a la boca (Bigger, 1988; Shick, 1991; Rifkin, 1996).

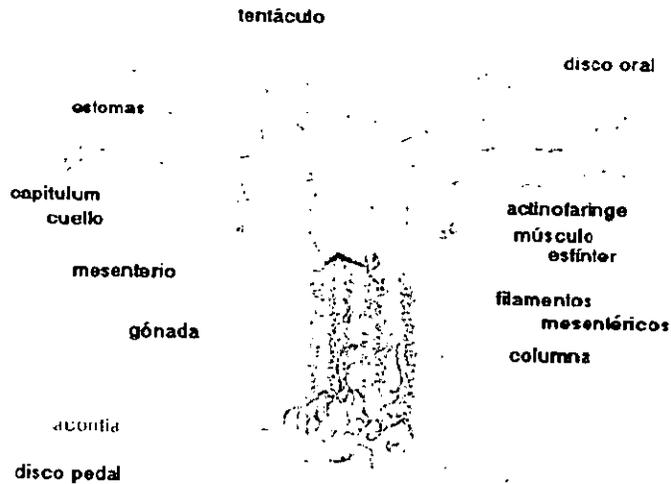


Figura 2. Anatomía de una anémona (Fautin, 200).

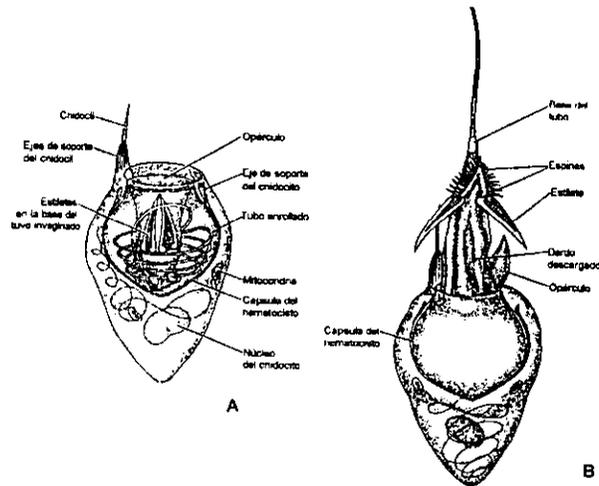


Figura 3. Anatomía del nematocisto. A: represente las estructuras de un nematocisto sin descargar. B: muestra las estructuras que exhibe un nematocisto descargado (Brusca y Brusca, 1990).

Las evidencias presentadas en diversos trabajos sugieren que, la potencia de los efectos fisiológicos de los venenos de nematocistos es el resultado de interacciones sinérgicas entre varios componentes del veneno; por lo que las toxinas son usadas como herramientas en la investigación ya que pueden ser candidatos para desarrollar fármacos con actividad antitumoral o vasodilatadora,

así como principios activos con propiedades farmacocinéticas o como un agente terapéutico, debido a que los componentes de los venenos se usan de forma individual (Hessinger, 1988; Shick, 1991; Turk, 1991).

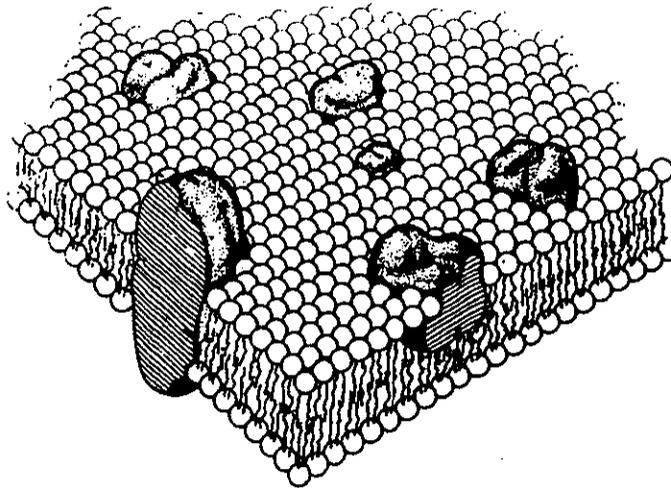
La mayoría de las toxinas inmersas en la matriz del nematocisto tienen como blanco la membrana plasmática de las células susceptibles, esto se debe a que esta es la parte más accesible de una célula blanco, especialmente si la toxina es una macromolécula hidrofílica (Figuras 4a y 4b). Se necesita una cantidad reducida de toxina para saturar los sitios de unión en la superficie celular. Dentro de las funciones de la célula que se llevan a cabo en la membrana son: excitación, regulación de metabolismo, mantenimiento de la integridad celular, transporte y reconocimiento; estas funciones representan blancos potenciales para las toxinas. Las tres primeras funciones son el mejor blanco de las toxinas, al producir inhibición o interrupción de esas funciones da por resultado un efecto inmediato, de daño o la muerte (Hessinger, 1988; Shick, 1991; Bernheimer, 1990; Kem *et al.*, 1990; Waker y Masuda, 1990; Norton, 1991).

Las toxinas son muy específicas en su sitio de acción y por eso son valiosas como herramientas biológicas. Se llama toxina al compuesto químico que produce efectos deletéreos en los organismos vivos, puede tener una función de defensa y alimentación; consiste de una o muchas entidades químicas manifestadas en una especie capaz de producir cambios patológicos en una segunda especie. Las toxinas pueden dominar la presa por bloqueo del sistema responsable de la locomoción, circulación o por la coordinación. No existe una clara distinción entre toxinas y venenos, aunque éstos últimos son considerados como tal por ser activos cuando son inyectados por las especies que las producen. (Walker y Masuda, 1990).

Se ha observado que la mayoría de las toxinas son de origen proteico; estas sustancias son de dos a cinco veces más letales que los venenos no proteicos (Hessinger, 1988). Algunas proteínas tóxicas, debido a su gran tamaño y arreglo tridimensional, pueden expandir la membrana celular afectando la permeabilidad y/o los procesos citoplásmicos. Otras proteínas son capaces de tener cambios conformacionales y funcionales desde su estado inactivo hasta el activo en respuesta a cambios de condiciones extrínsecas (Hessinger, 1988; Bernheimer, 1990; Kem *et al.*, 1990; Turk, 1991).

Todas las toxinas de anémonas que han sido caracterizadas son péptidos o proteínas. De mil especies de anémonas identificadas hasta ahora, aproximadamente de una docena se han estudiado compuestos tóxicos, los cuales son altamente selectivos afectando un proceso o receptor celular a concentraciones mínimas, de nanogramos hasta unos cuantos microgramos (Tabla1) (Walker y Masuda, 1990).

A



B

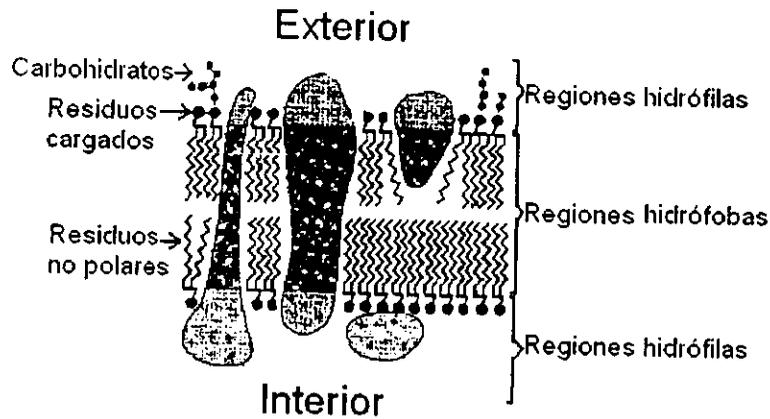


Figura 4. A: Vista tridimensional de la membrana. La mayoría de los modelos propuestos para las membranas biológicas, mencionan que éstas consisten de una bicapa lipídica que forma una red estructural, en la cual las proteínas están unidas y embebidas para proporcionar los centros funcionales dentro de las membranas. B: Sección transversal. Las cabezas polares o hidrofílicas de los lípidos están dirigidas hacia el exterior y sus colas hidrofóbicas se extienden hasta la mitad de la capa (Avers, 1991).

Con base en investigaciones *in vivo* de animales, estudios *in vitro*, así como observaciones clínicas, se sabe que las toxinas de las anémonas contienen neurotoxinas, citolisinas, cardiotoxinas e inhibidores de proteasas, que intervienen en la coagulación de la sangre de vertebrados y que se caracterizan por ser potentes y producir reacciones intensas en la piel manteniendo reacciones

locales (Ferlan y Lebez, 1974; Bernheimer y Avigad, 1978; Hessinger y Lenhoff, 1988; Kem, 1988b; Fenner *et al.*, 1996). En general, las toxinas de anémonas tienen tres mecanismos de acción en la célula (Hessinger, 1988; Kem *et al.*, 1990; Bernheimer, 1990; Norton, 1991; Shick, 1991):

1. Citolítico: las citolisinas alteran la membrana celular afectando la permeabilidad y o integridad celular. La citólisis, o en el caso de los eritrocitos, la hemólisis, es una de las acciones producidas por las toxinas de los nematocistos comúnmente reportada.

2. Neurotóxico: las toxinas actúan principalmente en membranas excitables, afectan especialmente los mecanismos asociados con la transmisión sináptica.

3. Regulador: las toxinas estimulan o inhiben procesos metabólicos vitales, como la vasodilatación.

Las neurotoxinas de anémonas afectan de manera selectiva los canales iónicos de la membrana que intervienen en la función de los sistemas nervioso, cardiovascular y muscular (Figura 5). Este tipo de toxinas actúa en la inactivación del canal de sodio, y prolonga la repolarización en membranas excitables, esto origina una gran relación de neurotransmisores que producen convulsiones y parálisis en las presas y depredadores, es decir, cuando un organismo es envenenado con una neurotoxina, el potencial de acción puede continuar aproximadamente un segundo después de la acción de la toxina, la cual, normalmente se lleva a cabo en milisegundos. Esto da como resultado en una liberación masiva de neurotransmisores en las terminaciones nerviosas, causando hiperexcitabilidad, convulsiones y hasta la muerte (Halstead, 1978; Conn, 1993; Kem, 1988a; Tu, 1988; Shick, 1991; Norton, 1991; Fenner *et al.*, 1996).

Las neurotoxinas de anémonas se han clasificado en dos grupos: tipo 1, polipéptidos que se encuentran en *Anemonia viridis* de la familia Actiniidae, toxinas con un promedio de 27 aminoácidos y peso molecular de alrededor de 3, 000 Da; tipo 2, polipéptidos presentes en *Stichodactyla*, anémona perteneciente a la familia Stichodactylidae, este tipo de toxinas tiene cadenas grandes de 46 ó 47 aminoácidos y peso molecular de alrededor de 5, 000 Da. Ambos presentan cerca del 30% de homología en su secuencia de aminoácidos y se unen a sitios diferentes del canal de sodio. Cabe mencionar que toxinas con tamaños similares se han encontrado en otras anémonas incluyendo *Condylactis gigantea* y *Anthopleura xanthogrammica* (Shick, 1991; Kem, 1988a; Norton, 1991).

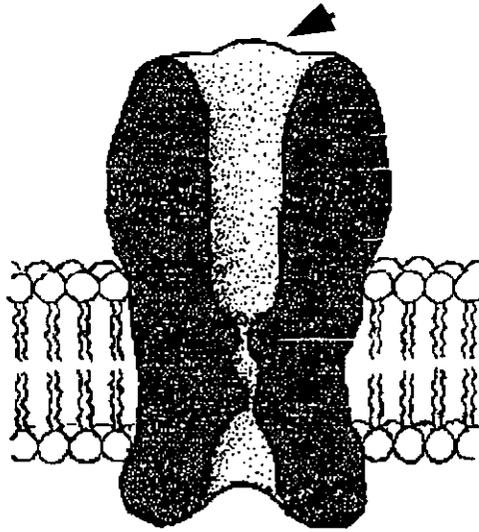


Figura 5. Representación esquemática de un canal iónico en la membrana. Una característica de las membranas es la presencia de poros acuosos (canales); la existencia de estos se ha propuesto para explicar la alta permeabilidad de la membrana plasmática al agua y otras moléculas pequeñas (Nicholls *et al.*, 1992). La flecha señala el canal iónico.

Las toxinas de anémonas han llegado a ser importantes para investigar la topografía del canal de sodio. Quizás cada uno de los cuatro dominios homólogos del canal de sodio pueden poseer sitios de unión para las diferentes toxinas, esto es quizás por la variación considerable de las secuencias del canal de sodio. Otra aplicación de las toxinas de anémonas es que pueden emplearse para el diseño de insecticidas que no afectan a los mamíferos, ya que existen diferencias fundamentales en la susceptibilidad a las toxinas de anémonas de los canales de sodio en artrópodos, así como en crustáceos e insectos, y vertebrados (Béres *et al.*, 1975; Frelin *et al.*, 1984; Elliot *et al.*, 1986; Norton, 1991; Loret *et al.*, 1994; Salgado y Kem, 1992).

El efecto de las neurotoxinas de anémonas en el canal de sodio tiene una alternativa terapéutica en tratamientos congestivos de enfermedades del corazón. Al retrasar el cierre del canal de sodio, las toxinas de anémonas favorecen temporalmente el flujo de sodio hacia el interior de células cardíacas promoviendo la liberación de calcio en el retículo endoplásmico, incrementando la intensidad de contracción ventricular. Los polipéptidos As-II (toxina II de *Anemonia sulcata*) y Ax-I (toxina I de *Anthopleura xanthogrammica*) son ejemplos de este proceso fisiológico (Kem, 1988a, b; Norton, 1991).

Se ha comentado que las toxinas tienen un blanco específico en el sistema de la membrana; pero cuando una toxina no tiene una acción específica, se presenta una estrategia citotóxica que ha sido seleccionada por el organismo que la contiene (Bernheimer y Rudy, 1986; Bernheimer, 1990).

Las citolisinas son un grupo heterogéneo de proteínas que cuenta con una acción común de destruir células al eliminar la barrera permeable de su membrana. Se ha demostrado que las citolisinas poseen una actividad hemolítica potente y la lisis celular es facilitada por inserción de sus porciones hidrofóbicas dentro de la bicapa de la membrana (Figura 4b) (Bernheimer y Rudy, 1986; Bernheimer, 1990; Turk, 1991; Rossjohn *et al.*, 1997).

El conocimiento de las citolisinas extraídas de anémonas permite categorizarlas como: citolisinas inhibidas por esfingomielinas, metridiolisinas y lisinas de *Aiptasia*; estos tipos de compuestos cuentan con pesos moleculares entre 15, 000 y 135, 000 Da (Bernheimer, 1990; Norton *et al.*, 1990; Shick, 1991).

Se han propuesto dos modelos diferentes para explicar el mecanismo por el cual los eritrocitos y otros tipos de células son lisadas por el grupo tiol (SH-) que activa toxinas:

a) La interrupción completa de la integridad celular. La citotoxicidad puede ser observada por un ataque sobre la membrana celular, produciendo la destrucción de la función de barrera mediante la interacción con colesterol en ciertas regiones de la membrana, causando una transición de fase lipídica. En este momento se fragmenta y rompe la membrana. En este modelo se forman estructuras en forma de anillo que son productos poliméricos incidentales, que no sólo participan en procesos líticos (Figura 6) (Bernheimer y Rudy, 1986; Bernheimer, 1990; Rossjohn *et al.*, 1997).

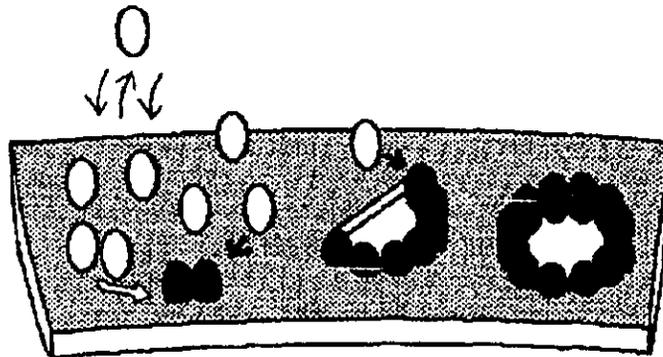


Figura 6. Lisis por interrupción completa de la integridad celular. Los monómeros de la toxina () se asocian con el colesterol de la membrana embebiéndose en esta estructura, dando lugar al proceso conocido como oligomerización, que finaliza con la formación de un anillo (Rappouli y Montecucco, 1997).

b) La formación de poros selectivos producidos por toxinas ionofóricas. Muchas de las citolisinas son capaces de formar poros o canales en la membrana plasmática de células, y su acción citolítica puede ser un resultado de su acción selectiva; esto es, las estructuras en forma de anillo generan poros grandes a través de los cuales el agua y las sales pueden pasar, aconteciendo el clásico tipo de hemólisis osmótica. Un ejemplo de citolisina (10, 000 a 20, 000 Da) se encontró en anémonas del género *Stichodactyla*, que forma un poro en la membrana celular a través del cual los iones pueden escapar. Bernheimer les da el nombre de actinoporinas (Figura7) (Bernheimer y Rudy, 1986; Kem, 1988b; Walker y Masuda, 1990).

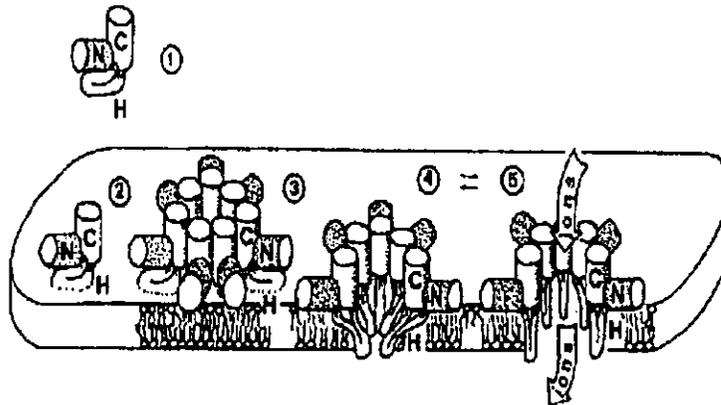


Figura 7. Formación de poros selectivos. 1) Monómero de la toxina con sus extremos C- y N-terminales. 2) Unión de la proteína a la membrana por afinidad. 3) Formación de un hexámero. 4) El hexámero penetra a la membrana en su parte lipídica creando un poro. 5) El poro formado permite el paso de iones y otras moléculas pequeñas (Rappouli y Montecucco, 1997).

En 1990, Bernhemimer da una clasificación de las toxinas de anémonas con actividad citolítica, basándose en sus características y posibles mecanismos de acción, agrupó estos compuestos en tres categorías:

1. Péptidos inhibidos por esfingomielinas, con un peso molecular entre 15, 000 y 21, 000 Da. El primer péptido de este tipo que fue descrito se aisló de *Condylactis gigantea*, y el que ha sido más estudiado es la heliantolisina extraída de *Stoichactis helianthus*. Por la capacidad de lisar eritrocitos de memíferos *in vitro* se emplea para estudiar esta actividad. Las heliantolisinas son un segundo ejemplo de toxinas inhibidas por esfingomielinas. Se ha determinado su secuencia de aminoácidos y se sabe por esto que tienen un peso molecular de 16, 600 Da. La lisis que ocurre depende de la formación de canales transmembrales que se originan por la agregación de moléculas tóxicas en la bicapa, aunque se ha sugerido que este mecanismo también puede ocurrir por una acción de tipo detergente.

2. Metridiolisina, péptido activado por el grupo tiol (-SH) con un peso molecular de 80,000 Da; aislada de *Metridium senile*. La metridiolisina es una proteína que tiene un pI de alrededor de 5, es termolábil y es inactivada por enzimas proteolíticas, su toxicidad es activada por el grupo tiol e inhibida con bajas concentraciones de colesterol. La acción de la metridiolisina en membranas está asociada con la formación de anillos de 33 nm. Estas características son similares a las de las citolisinas producidas por estreptococos, pneumococci, bacilos y clostridia.

3. Aiptasiolisina, toxina con un sistema hemolítico que incluye la acción cooperativa de la fosfolipasa A y otras dos proteínas. Esta toxina se obtuvo de la acontia de la especie *Aiptasia pallida*. La actividad lítica de este compuesto fue observada en eritrocitos de rata requiriendo la presencia de calcio para llevar a cabo la lisis.

La función de algunas citolisinas puede ser secundariamente lítica; su efecto principal comienza en la producción de dolor, inflamación y parálisis neuromuscular (Shick, 1991; Tu, 1988). Las citotoxinas de anémonas podrían ser empleadas como quimioterapéuticos para atacar selectivamente células tumorales; esta importancia biomédica se les ha atribuido debido a que, las observaciones en estudios realizados con citotoxinas de otros organismos la toxina se adhiere a una molécula específica en células de tumor matando a la célula por inhibición de su síntesis proteica (Kem, 1988a; Kem *et al.*, 1989; Turk, 1991).

Son pocos los trabajos que describen la citotoxicidad de las citolisinas de anémonas y particularmente su acción antitumoral. Esta última actividad biológica se estudió *in vitro* e *in vivo* con la toxina de la anémona *Actinia equina* (equinatoxina), y se observó que la toxina aplicada por inyección intraperitoneal en ratones con carcinoma produjo un incremento en la supervivencia de los ratones en un factor de uno a dos (Giraldi *et al.*, 1976); en *Condylactis aurantiaca* la actividad antitumoral en tratamientos de melanoma o sarcoma en ratones, no incrementó la supervivencia de estos organismos (Sedmak, 1986); la toxina Sh III extraída de *Styrodactyla* fue empleada como conjugado con anticuerpos monoclonales contra un antígeno expresado en linfocitos-T inmaduros, en esta investigación el híbrido perdió su actividad hemolítica pero retuvo su citotoxicidad contra células del antígeno (Ávila *et al.* 1988). Con base en estudios de este tipo, se ha propuesto construir inmunotoxinas específicas usando un conjugado de anticuerpos monoclonales y citolisinas de anémonas. La principal ventaja de las inmunotoxinas compuestas de citolisinas de anémonas es que no necesitan ser aplicadas directamente en el espacio intracelular para destruir un neoplasma particular. Para las investigaciones futuras se plantea como objetivo describir la caracterización y la comparación de toxinas aisladas de diferentes especies de anémonas, principalmente la evaluación de sus efectos farmacológicos en diferentes tejidos y órganos.

Las toxinas de anémonas han sido estudiadas extensivamente desde la década de los setentas, y a partir de la década de los ochentas se comenzó a caracterizarlas describiendo su

estructura terciaria, mecanismos de ionotropismo cardíaco, biosíntesis, localización en tejidos y funciones en la biología del organismo que las contiene (Kem, 1988b; Norton, 1991; Fautin y Mariscal, 1991). En la década de los 60's Hessinger y Lenhoff reportaron por primera vez el veneno de la anémona del género *Aiptasia*, el cual causa hemólisis (lisis de eritrocitos). En 1975, Béresss y colaboradores aislaron los primeros polipéptidos de la anémona *Anemonia sulcata*; a los cuales se les dió el nombre de As-I (altamente tóxico para artrópodos) y As-II (altamente tóxico para vertebrados), con un peso molecular de 5, 000 y 3, 000 Da, respectivamente; ambas con un puente disulfuro (Bernheimer, 1990). La citolisina más investigada es un polipéptido básico aislado de la anémona *Stichodactyla helianthus* con un peso molecular de 17, 000 Da (Bernheimer y Avigad, 1976).

La investigación de una toxina puede ser dividida en varios pasos, cada uno tiene como finalidad remover impurezas que están mezcladas con el compuesto de interés. Como las toxinas de anémonas de mayor importancia biomédica son derivados peptídicos, los métodos empleados para su purificación se basan en aquellos que han sido diseñados para este tipo de moléculas. Una increíble variedad de métodos de separación ahora está disponible para purificar proteínas, cualquiera que sea su fuente. Algunas innovaciones en la purificación de toxinas ocurrieron en la década de los ochentas, que facilitaron enormemente las investigaciones fisiológicas y farmacológicas de los mecanismos de acción de toxinas (Hessinger, 1988; Kem, 1988a; Béres *et al.*, 1993; Malpezzi *et al.*, 1993; Carli *et al.*, 1996; Delfin *et al.*, 1996).

El paso inicial en la purificación de una toxina es su localización en el organismo, seguida de la extracción de todo o una parte del organismo, en la cual se incluye la homogeneización, aplicación de choques eléctricos, agitación, ciclos de congelado y descongelado, centrifugación, ultrafiltración y precipitación; utilizando uno de éstos métodos, o bien, la combinación de varios. Los siguientes pasos incluyen principalmente técnicas de cromatografía líquida de rápida resolución (fast performance liquid chromatography, FPLC) como cromatografía en filtración de gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (high performance liquid chromatography, HPLC) como cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de fase reversa; así como las diferentes técnicas electroforéticas son empleadas en la purificación y caracterización de proteínas (Kem, 1988a; Norton *et al.*, 1990; Lindsay, 1992; Khoo *et al.*, 1993; Salinas *et al.*, 1997; Zykova *et al.*, 1998)

Por otro lado, los bioensayos que se han aplicado en la evaluación biológica de las toxinas, se han efectuado *in vivo* en animales de laboratorio u otros organismos tales como crustáceos y peces; *in vitro* en cultivos celulares y en células sanguíneas obtenidas de diferentes especies de mamíferos. En la tabla 1 se presentan algunos trabajos enfocados en citolisinas de anémonas mencionando datos como: autor(es), año, especie(s) de anémona(s) estudiada(s), organismo o células en que se realizaron los bioensayos, entre otros.

Tabla 1. ANTECEDENTES

AUTOR(ES)	AÑO	ESPECIE(S) ESTUDIADA(S)	BIOENSAYO	ORGANISMO DONDE SE APLICÓ EL BIOENSAYO	TOXINA OBTENIDA	PESO MOLECULAR	PUNTO ISOELÉCTRICO	ACTIVIDAD LÍTICA	RESPUESTA DOSIS LETAL
Alvarez, C. et al.	1998	<i>Stichodactyla helianthus</i>	hemolítico		polipéptido				
Anderluh, G. et al.	1997	<i>Actinia equina</i>	hemolítico	bovino	equinatoxina-II (con mutagénesis)	EqTx II 19kDa (sin mutar)	EqTx II 10.5 (sin mutar)	**1.00 (toxina sin mutar) **0.0077 (mutante: K77C) **1.14 (mutante: R126C) **1.51 (mutante: A129C)	
Anderluh, G. et al.	1998	<i>Actinia equina</i>	citotóxico		proteína				
Arlito, A. et al.	1994	<i>Anemonia sulcata</i>	citotóxico						
Batista, U. et al.	1990	<i>Actinia equina</i>	citolítico	células V-79-379	proteína	EqTx II 19kDa	EqTx II 10.5	4.3×10^6 mole/L (~34.20ng/ml)	
Batista, U. y Sentjurc, M.	1995	<i>Actinia equina</i>	citolítico	células	proteína	EqTx II 19kDa	EqTx II 10.5	$3.75 \mu\text{g}/10^6$ células	
Belmonte, G. et al.	1994	<i>Actinia equina</i>	citotóxico		proteína				
Bernheimer, A. W. y Avigad, L. S.	1976	<i>Stoichactis helianthus</i>	citolítico						
Bernheimer, A. W. et al.	1981	<i>Tealia, Epiactis, Arthropleura, Corynactis, Pachycerianthus</i>	citolítico	humano, oveja, conejo, perro y caballo	polipéptido				
Bernheimer, A. W. et al.	1982	<i>Condylactis gigantea</i>	citolítico	conejo y cangrejo	proteína				
Bernheimer, A. W. et al.	1984	<i>Pseudactinia varia</i>	citolítico	oveja	proteína				
Bernheimer, A. W.	1990	<i>Metridium senile, Aiptasia pallida</i>	citolítico		péptidos y proteínas				
Carlberg, M.	1983	<i>Metridium senile, Tealia felina</i>			dopa				
Cari, A. et al.	1996	<i>Aequorea aequorea, Rhizostoma pulmo, Anemonia sulcata</i>	citotóxico	células V79	nematocistos			<i>Aequorea aequorea</i> 76.6×10^3 N/ml <i>Rhizostoma pulmo</i> 39.9×10^3 N/ml <i>Anemonia sulcata</i> 65×10^3 N/ml	
Cline, E. I. y Wolowyk, M. W.	1995	No se especifica	hemolítico	rata, cobayo, humano, perro	polipéptido y proteína				
Delfin, J. et al.	1996	<i>Stichodactyla helianthus</i>		anémonas	proteínas				
Dellacorte, C.	1994	<i>Condylactis gigantea</i>			ácidos nucleicos				
Galettis, P. y Norton, R. S.	1990	<i>Actinia tenebrosa</i>	citolítico	cobayo, cangrejo	péptidos y proteínas				
Giese, C. et al.	1996	<i>Heteractis magnifica, Entacmaea quadricolor, Condylactis gigantea</i>	citolítico	crustáceos (LD50) y humano (HU50)	proteínas	las tres toxinas 20kDa		<i>Entacmaea</i> 0.75ng/ml <i>Heteractis</i> 64ng/ml <i>Condylactis</i> 98ng/ml	* <i>Entacmaea</i> 100µg/ml * <i>Heteractis</i> 100µg/ml * <i>Condylactis</i> 100µg/ml
Ishida, M. et al.	1997	<i>Halcurias sp</i>	canales iónico, hemolítico	cangrejo y ratón	polipéptido				
Kern, W. R. y Kunn, B. M.	1988	<i>Stichodactyla helianthus</i>	citolítico	rata	proteína				
Khoo, H. E. et al.	1995	<i>Heteractis magnifica, Actinia equina</i>	citolítico	rata	péptidos y proteínas	las tres toxinas 19kDa	HMg I 9.4 HMg II 10.0 EqTx II 10.5	HMg I 1.55×10^4 HU/mg HMg II 4.5×10^4 HU/mg EqTx II 4.5×10^4 HU/mg	
Khoo, H. E. et al.	1997	<i>Heteractis magnifica, Actinia equina</i>	hemolítico		proteína				
Khoo, S. K. et al.	1993	<i>Heteractis magnifica</i>	citolítico	ratón	polipéptido	las dos toxinas 19kDa	HMg I 9.4 HMg II 10.0	HMg I 3.6×10^3 HU/mg HMg II 3.3×10^3 HU/mg 100ng/ml	HMg I 0.14µg/g HMg II 0.32µg/g
Lafranconi, W. M. et al.	1984	<i>Actinia equina</i>	vascular	ratas	proteína				
Lin, X. Y. et al.	1996	<i>Actinia equina</i>	citolítico	cangrejos y rata	polipéptidos	Ae I ~19.8kDa		4030 HU/ml (rata)	25µg/Kg (cangrejo)
Macek y Lebez	1982	<i>Actinia equina</i>	citolítico	oveja y ratas	péptido	EqTx 20kDa	EqTx 12.5	$<1 \times 10^{-6}$ M (oveja)	33µg/Kg (ratas)
Macek y Lebez	1988	<i>Actinia equina</i>	citolítico	ratones	péptido y proteína	EqTx I 19kDa EqTx II 6-12kDa EqTx III 19kDa	EqTx I 9.8 EqTx II 10.5 EqTx III 10.5		EqTx I 23µg/Kg EqTx II 35µg/Kg EqTx III 83µg/Kg
Macek, P. et al.	1994	<i>Actinia equina</i>	citolítico	bovino, humano, oveja, porcino y células de máífero	polipéptido	Ae II 15-20kDa	EqTx II 10.5	560ng/ml (bovino) 63.6ng/ml (humano) 37.4ng/ml (oveja) 51.8ng/ml (porcino)	$\sim 10^{-6}$ M (L1210) $\sim 10^{-6}$ M (ehrllich ascites) $>5 \times 10^{-6}$ M (macrófagos) 10^{-6} M (células V-79-379)

AUTOR(ES)	AÑO	ESPECIE(S) ESTUDIADA(S)	BIOENSAYO	ORGANISMO DONDE SE APLICÓ EL BIOENSAYO	TOXINA OBTENIDA	PESO MOLECULAR	PUNTO ISOELÉCTRICO	ACTIVIDAD LÍTICA	RESPUESTA DOSIS LETAL
Mahnir, V. M. et al.	1993	Varias del norte del Pacífico	hemolítico	ratón, células de tumor, virus y bacteria					
Malpezzi, E. et al.	1993	<i>Bunodosoma caissarum</i>	hemolítico		péptido				
Malpezzi, E.	1996	<i>Bunodosoma caissarum</i>	citotóxico y neurotóxico	ratones, cobayo	péptidos				
Malpezzi, E.	1997	<i>Bunodosoma caissarum</i>	hemolítico y canales iónicos						
Mebis, D. et al.	1983	<i>Gyrostoma helianthus</i> , <i>Radianthus koseirensis</i> , <i>Rhodactis rhodostoma</i>	hemolítico	ratón, pez	polipéptidos	<i>Gyrostoma</i> 10kDa <i>Radianthus</i> 5,459kDa		<i>Gyrostoma</i> 0,71µg/ml <i>Radianthus</i> 0,75µg/ml	<i>Gyrostoma</i> >20mg/Kg (ratón) <i>Radianthus</i> >20mg/Kg (ratón) <i>Gyrostoma</i> 2µg/ml (pez) <i>Radianthus</i> 3µg/ml (pez)
Mebis, D.	1994	<i>Heteractis magnifica</i> , <i>Entacmaea quadricolor</i>	hemolítico	humano (HU50), peces (LD50)	proteína	las dos toxinas 20kDa		<i>Entacmaea</i> 0,25µg/ml <i>Heteractis</i> 0,15µg/ml	* <i>Entacmaea</i> 0,5µg/ml * <i>Heteractis</i> 0,5µg/ml
Meinardi, E. et al.	1994	<i>Phymactis clematis</i>	hemolítico		péptido				
Meinardi, E. et al.	1995	<i>Phymactis clematis</i>	hemolítico	borrego					
Monastyrnaya, M. M. et al.	1988	<i>Metridium senile</i>							
Monastyrnaya, M. M. et al.	1990	<i>Radianthus macrodactylus</i> , <i>Metridium senile</i>	hemolítico y canales iónicos	conejo, erizo de mar (huevos)	proteína				
Narat, M. et al.	1994	<i>Actinia equina</i>	inmunológico y citolítico	ratón		19,8kDa			35µg/Kg
Norton, R. S. et al.	1990	<i>Actinia tenebrosa</i>	citolítico y estimulación cardíaca	cobayo	proteína	toxina A 20,54kDa toxina B 20,78kDa toxina C 19,42kDa	toxina A 9,4 toxina B - toxina C >10	&tenebrosina A 0,7nM &tenebrosina B 2,2nM &tenebrosina C 3,0nM	
Pazos, I. F. et al.	1998	<i>Stichodactyla helianthus</i>	hemolítico		proteína modificada				
Pederzoli, C. et al.	1995	<i>Actinia equina</i>	citotóxico	eritrocitos y células de tumor en humano	polipéptidos				
Shiomi, K. et al.	1997	<i>Anemonia erythraea</i>	hemolítico y neurotóxico	ratón y cangrejos	polipéptido				
Suzuki, T. et al.	1997	<i>Anthopleura japonicus</i>			péptido				
Tejuca, M. et al.	1996	<i>Stichodactyla helianthus</i>	citolítico y canales iónicos	péptido					
Turk, T.	1991	<i>Actinaria sp.</i>							
Zhadan, G. et al.	1994	<i>Radianthus macrodactylus</i>	citotóxico	perros	polipéptido				
Zykova, T. A. et al.	1998	<i>Radianthus macrodactylus</i>	citolítico	ratón y cangrejo	proteína				

*Concentración máxima de toxina

HMg: toxina extraída de *Heteractis magnifica*

EqTx II: toxina II extraída de *Actinia equina*

Ae I: toxina I extraída de *Actinia equina*

N/ml: número de nematocistos en un mililitro para lisar el 50% de células

**Actividad hemolítica relativa registrada a una absorbancia de 700nm

‡Concentración de toxina requerida para obtener el 50% de la máxima actividad ionotrópica

HIPÓTESIS

Aunque los polipéptidos neurotóxicos han atraído la mayor atención en el Phylum Cnidaria, la variedad de proteínas citolíticas parece ser más amplia. En el caso de las anémonas se presentan tanto neurotoxinas como citolisinas, siendo estas últimas de gran importancia para la captura y digestión de sus presas, además de ser de gran utilidad en la biomedicina como agentes quimioterapéuticos. Con base en esto, en el presente estudio se pretende encontrar una toxina con actividad citolítica de la anémona *Bunodeopsis antilliensis*, especie no estudiada desde el punto de vista toxicológico.

OBJETIVO

Purificar y caracterizar parcialmente una toxina con actividad citolítica en la anémona *B. antilliensis*, de la familia Boloceroididae.

METAS

- Aislar, purificar y caracterizar parcialmente una toxina bioactiva de *B. antilliensis*.
- Identificar la actividad citolítica producida por la toxina.
- Describir, de manera general, el cnidae o los cnida presentes en los tentáculos de la anémona.

HIPÓTESIS

Aunque los polipéptidos neurotóxicos han atraído la mayor atención en el Phylum Cnidaria, la variedad de proteínas citolíticas parece ser más amplia. En el caso de las anémonas se presentan tanto neurotoxinas como citolisinas, siendo estas últimas de gran importancia para la captura y digestión de sus presas, además de ser de gran utilidad en la biomedicina como agentes quimioterapéuticos. Con base en esto, en el presente estudio se pretende encontrar una toxina con actividad citolítica de la anémona *Bunodeopsis antilliensis*, especie no estudiada desde el punto de vista toxicológico.

OBJETIVO

Purificar y caracterizar parcialmente una toxina con actividad citolítica en la anémona *B. antilliensis*, de la familia Boloceroididae.

METAS

- Aislar, purificar y caracterizar parcialmente una toxina bioactiva de *B. antilliensis*.
- Identificar la actividad citolítica producida por la toxina.
- Describir, de manera general, el cnidae o los cnida presentes en los tentáculos de la anémona.

ÁREA DE RECOLECTA

El estado de Quintana Roo ocupa la porción oriental de la Península de Yucatán, la cual se sitúa en una amplia plataforma de carbonato de calcio; con una altura promedio sobre el nivel medio del mar de 10 m. En la parte norte de Quintana Roo, el suelo es del tipo terra-rosa, mientras que hacia el sur predominan los suelos que son ricos en humus (SEP, 1982; Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1991).

El relieve es escaso con una alta permeabilidad de las rocas calcáreas que forman la Península, impidiendo la existencia de corrientes de aguas superficiales, siendo la única corriente de importancia el Río Hondo, que limita a México de Belice. El aporte de agua del subsuelo está directamente relacionado con las lluvias que se presentan principalmente en verano, teniendo un clima cálido-húmedo entre Aw1 y Aw2, según la clasificación modificada de Köppen. La precipitación pluvial es máxima en los meses de verano, con un valor superior a los 750 mm. La temperatura media anual es de 27° C. Quintana Roo posee tres regiones naturales: selva, sabana y litoral; contando con 860 Km de ésta última región. A lo largo de toda la costa corre una barrera arrecifal más o menos desarrollada y con algunas interrupciones (Jordán, 1979, SEP, 1982).

Durante el año se presentan tres vientos dominantes: 1) los alisios, presentes durante todo el año y en particular en verano, con una velocidad media de 30 m/seg, soplando generalmente de noroeste a suroeste; 2) los nortes, que se presentan durante el otoño y el invierno en la parte norte de Quintana Roo; y 3) los ciclones, cuyos movimientos giratorios alcanzan grandes velocidades y azotan al estado, principalmente durante los meses de agosto, septiembre y octubre (SEP, 1982; Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1991).

Las corrientes en las costas de Quintana Roo tienen dos direcciones, de norte-noreste y sur-suroeste, o sea, en dirección paralela a la costa, las cuales podrían formar parte de uno de los giros ubicados cerca de Puerto Morelos (Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1991).

La zona marina de Puerto Morelos está situada a los 20° 50' de latitud Norte y 86° 55' de longitud Oeste (Figura 8), posee un sistema arrecifal de barrera con orientación norte-sur. El arrecife está compuesto por corales escleractinios, gorgonáceos, algas y otros organismos asociados; la zona marina está dividida en laguna arrecifal, arrecife posterior, cresta arrecifal y arrecife frontal (Jordán et al., 1981; Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1991).

El área de recolecta de la anémona *Bunodeopsis antilliensis* se ubicó en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, la cual está delimitada por la línea de costa y la barrera arrecifal; las dimensiones de esta depresión varían a lo ancho entre los 350 y 1600 m, con una profundidad de 3 m a 8 m (zona

sur); el fondo de la laguna está cubierto por comunidades de pastos marinos, con mayor abundancia de *Thalassia estudinum* Banks, ex Köing, combinado con algas de las que destacan por su abundancia las del género *Halimeda* Lamouroux, *Penicillus* Lamarck, *Rhipocephalus* Kützing, *Lobophora* Lamouroux, *Avrainvillea* Decaisne y *Udotea* Lamouroux. (Colinas-Sánchez y Briones-Fourzán, 1990; Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1991; Tussenbroek, 1995),

El arrecife posterior con una profundidad de 1 a 2 m, está constituido por una gran diversidad de especies de corales escleractínios, destacando por su abundancia *Acropora palmata*, corales gorgonáceos, algas y una gran variedad de organismos asociados. La cresta arrecifal o rompiente es una zona somera donde el basamento arrecifal alcanza su máxima altura, con una profundidad de 1.0 a 0.5 m; en esta zona se encuentra gran cantidad de pedacería de corales y crecimientos de algas incrustantes, corales y otros cnidarios. El arrecife frontal tiene una profundidad máxima de 20 m, con colonias de gorgonáceos abundantes y en menor medida de escleractínios, algas calcáreas y esponjas (Jordán et al., 1981; Merino-Ibarra y Otero-Dávalos, 1991).

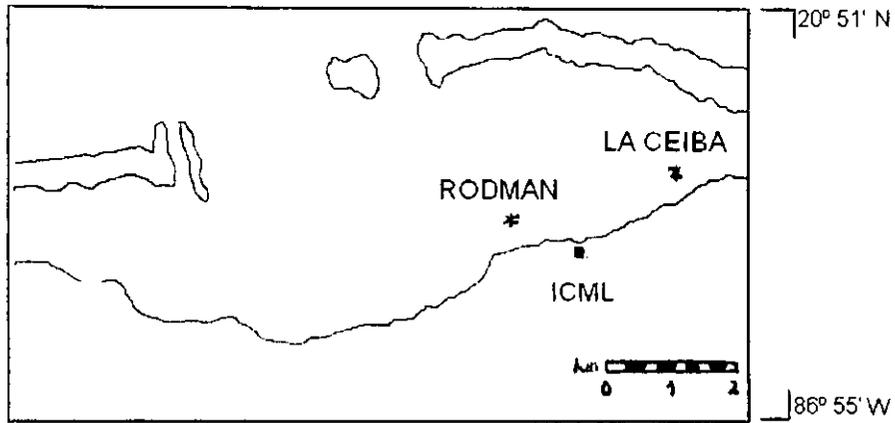


Figura 8. Ubicación del área de estudio. Arriba, la flecha indica donde se localiza Puerto Morelos. Abajo, los asteriscos señalan las zonas donde se realizó la recolecta de *Bunodeopsis antillensis*.

ALGUNOS ASPECTOS DE LA BIOLOGÍA DE LAS ANÉMONAS

Brusca y Brusca (1990), Shick (1991) y Fautin (2, 000) mencionan los siguientes aspectos de la biología de las anémonas:

Las anémonas son organismos con una alta diversidad en los océanos, las podemos encontrar desde los trópicos hasta los polos (Figura 9), y a profundidades que van desde los 2 metros hasta los 6, 000 metros.

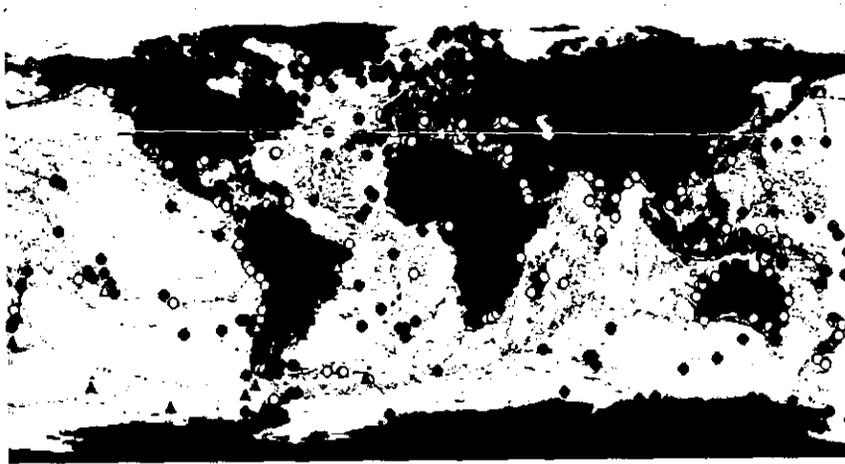


Figura 9 Distribución mundial de las anémonas. La mayoría de los puntos indican registros exactos de alguna(s) especie(s) de anémona(s). Las fuentes de información que refieren la localización de anémonas provienen de expediciones científicas, reporte de especies de anémonas en artículos científicos de diferentes áreas, colecciones de museos, entre otras (Fautin, 2, 000).

Morfológicamente hablando, las anémonas tienen forma de pólipo, el cual consiste de un cuerpo tubular, donde el extremo superior se ubica la boca rodeada de tentáculos huecos y en su extremo inferior existe un disco pedal (Figura 4). El cuerpo o la columna de la anémona es lisa o con vesículas, esférulas marginales o pseudoesférulas y otras estructuras especializadas. Los tentáculos pueden o no ser retráctiles. El esfínter (músculo que ayuda a la contracción de los tentáculos) está ausente o presente en el endodermo o mesoglea.

Los antozoarios, grupo al que pertenecen las anémonas, están caracterizados por dos estructuras anatómicamente relacionadas, la actinofaringe y los mesenterios, que son únicos entre los pólipos de los cnidarios. La actinofaringe de la mayoría de las especies contiene por lo menos un canal especializado llamado sifonoglifo, el cual conduce agua dentro del coelenteron. En la mayoría

de las anémonas y corales, dos sifonoglifos están situados de manera opuesta (uno frente a otro) en la actinofaringe. Los sifonoglifos y sus estructuras asociadas imparten una simetría bilateral o biradial en el pólipo.

Los mesenterios están adheridos a los sifonoglifos y pueden estar anatómicamente especializados conteniendo cilios; por esto se infiere que los mesenterios incrementan la superficie para la respiración y especialmente para la absorción de la comida, otra función que se ha otorgado a los mesenterios es la de soporte. La acontia (grupo de filamentos mesentéricos) puede estar o no presente; esta estructura produce secreciones que funcionan durante la digestión.

Las anémonas han sido caracterizadas como máquinas depredadoras y su biología en la alimentación ha sido de gran interés para muchos investigadores. Los cnidocistos y sus contenidos juegan un papel central en la captura de presas, responden a estímulos mecánicos y químicos de estas. Los tipos de cnidae que se pueden encontrar en las anémonas son: espirocistos, atricos, holotricos, mastigóforos microbásicos b- y p-, amastigóforos microbásicos y macrobásicos. Aunque son estrictamente carnívoras, algunas especies de anémonas pueden ser polípagos oportunistas, y como muchos invertebrados marinos incluyen materia orgánica disuelta y detritus en sus dietas. Su capacidad digestiva es amplia e incluye enzimas que actúan extracelularmente para fragmentar presas grandes, así como digestivas intracelulares que actúan sobre partículas pequeñas. Su naturaleza politrófica se extiende hasta el nivel de productores primarios, debido a las algas simbioses que las anémonas hospedan en la zona intracelular. La influencia de cada endosimbiosis contribuye en la transferencia de energía y en el reciclamiento de nutrientes y desechos nitrogenados, en la conducta, y en el intercambio de gases por respiración.

El mayor éxito evolutivo de las anémonas son sus diversas estrategias de reproducción asexual. Este tipo de reproducción puede llevarse a cabo por alguno de los siguientes procesos: 1) fisión longitudinal: la comuna de la anémona presenta una hendidura longitudinal resultando dos partes, cada parte origina una anémona joven, y esto da como resultado grupos grandes o clones de individuos genéticamente idénticos, como en las especies *Anthopleura*, *Diadumene* y *Metridium*. El proceso menos común es la laceración del disco pedal, en esta región de la columna, la anémona se extiende y al desplazarse se originan pequeños fragmentos del disco, y cada uno de estos se desarrolla en una anémona joven. Esto se puede observar en las especies *Diadumene*, *Haliplamene* y *Metridium*. 2) Fisión transversal, cerca del extremo inferior de la columna se hace una fisión transversal generando un organismo nuevo (*Gonactinia prolifera*). 3) Laceración basal, por constricción de fragmentos de la columna y disco basal se desarrollan anémonas jóvenes. Este proceso se lleva a cabo únicamente en los organismos que pertenecen a las tribus Boloceroidea y Mesomyaria. 4) Gemación, se origina una yema que posteriormente presenta el proceso de regeneración *in situ*. La yema se desarrolla de un solo tentáculo del adulto (*Boloceroidea*)

macmurrichi). La reproducción por laceración basal se presenta encontrada en anémonas que habitan la zona sublitoral, las cuales usualmente crecen en mejores condiciones que las anémonas de zonas más profundas, de las cuales la mayoría se reproduce por fisión binaria. En la estructura de poblaciones clonales, los clones individuales dominan frecuentemente grandes áreas, algunas veces para excluir la competencia de clones agonistas, mientras que la dispersión de propágulos sexuales llega más lejos de sus territorios.

En la reproducción sexual, las gónadas se originan de las células endodermales o del mesenterio. Los huevos son fertilizados en el coelenteron (fertilización interna), después se presenta un desarrollo temprano comúnmente fuera del cuerpo de la anémona, originándose una larva plánula planctotrófica. La habilidad de alimentación de dicha larva, permite un incremento de las posibilidades de sobrevivencia y, al mismo tiempo da lugar a un aumento de la dispersión de las anémonas. En el desarrollo de la larva plánula se producen ocho septos que darán lugar a la boca y tentáculos, los cuales estarán dirigidos hacia arriba, y finalmente, cuando el organismo encuentra un substrato termina su desarrollo (Figura 10).

En las anémonas también existe el hermafroditismo, que está frecuentemente asociado al cuerpo de tamaño pequeño y a juveniles. El hermafroditismo y reproducción asexual son mutuamente excluyentes. Cabe mencionar que la reproducción vegetativa tiene menos requerimientos para ambientes restringidos, ya que la gametogénesis, vitelogénesis, huevecillos, fertilización, desarrollo, dispersión y metamorfosis, demandan un rango estrecho de condiciones favorables..

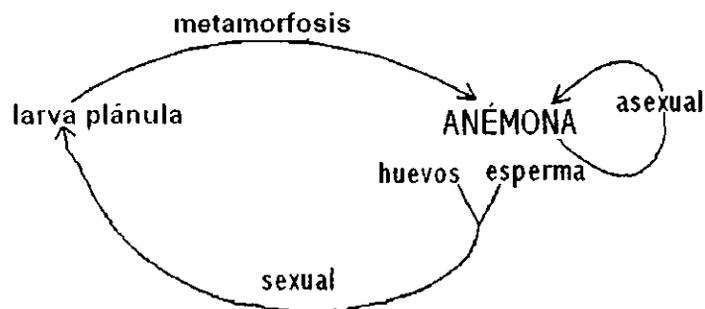


Figura 10. Ciclo de vida de las anémonas.

TAXONOMÍA

Phylum	Cnidaria
Clase	Anthozoa
Subclase	Hexacorallia
Orden	Actinaria
Suborden	Nyantheae
Tribu	Boloceroidaria
Familia	Boloceroididae

Bunodeopsis antilliensis



Figura 11. *Bunodeopsis antilliensis* adherida en *Thalassia testudinum* (Humman, 1991).

A continuación se mencionan algunas características taxonómicas de la familia Boloceroididae (Fautin, 2, 000), a la cual pertenece *Bunodeopsis antilliensis* (figura 11):

Los miembros de la familia Boloceroididae presentan una delgada columna, la cual en su parte más baja está provista con vesículas simples, esferoidales; son organismos sésiles o se desplazan con movimientos lentos; contienen una musculatura débil en la columna así como en la actinofaringe. El músculo esfínter puede o no estar presente. Los tentáculos son largos con manchas que producen irritación. No se distinguen sifonoglifos. Los músculos del mesenterio son débiles. Los cnidae que pueden contener son: espirocistos, basitricos, p-mastigóforos microbásicos y amastigóforos microbásicos.

La nomenclatura de *B. antilliensis* es inconsistente, por lo que necesita ser determinada en una revisión futura del género. De acuerdo con Carlgren (1949) dicha especie ha sido clasificada con los siguientes nombres:

Bunodeopsis strumosa Andres 1880

Bunodeopsis antilliensis Duerden 1897

Viatrix globulifera Verril 1899

Bunodeopsis sp Panikkar 1937

Bunodeopsis australis Haddon 1898.

MÉTODO

Para cumplir con las metas propuestas se implementaron los siguientes métodos:

Campo.

- a) Recolecta de los organismos.

Laboratorio.

- b) Extracción de la toxina.
- c) Cuantificación de proteína.
- d) Bioensayos.
- e) Purificación parcial de un compuesto con actividad biológica.
- f) Caracterización.
- g) Descripción de cnida en tentáculos por técnicas de microscopía electrónica.

a) Recolecta de los organismos. En la laguna arrecifal de Puerto Morelos, a una profundidad entre 2 y 3 m, se recolectaron 250 g (peso húmedo) de la especie *Bunodeopsis antillensis*. Esta especie se encontró adherida en las láminas de *Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme*.

Las anémonas se recolectaron manualmente empleando buceo SCUBA, cortando las láminas de *T. testudinum* y perturbando lo menos posible al organismo con el fin de evitar la expulsión de nematocistos. Los organismos fueron transportados con vida en agua de mar hasta el laboratorio.

b) Extracción de toxinas.

Ciclo de congelado-descongelado y centrifugado:

Después de la recolecta, las anémonas se congelaron a -40°C con una mínima cantidad de agua de mar en frascos de plástico, iniciando un ciclo de congelado-descongelado para inducir la descarga de los nematocistos. Posteriormente los organismos se descongelaron en 500 ml de agua destilada, agitando la muestra intermitentemente a una intensidad de 6 durante 5 minutos a 4°C (Agitador Magnético Cole-Rirmer, Modelo 4802-00, intensidad 6) (Schweitz *et al.*, 1981; Elliot *et al.*, 1986; Kem *et al.*, 1989; Norton *et al.*, 1990).

Como un paso previo a la purificación, la muestra se centrifugó a 3 , 000 rpm (1549 x g) durante 10 minutos (Centrifuga Beckman, Rotofor de columpio GH-37), obteniendo un precipitado y sobrenadante con la mayor cantidad de proteínas solubles. Ambos productos obtenidos a partir de la centrifugación se liofilizaron para concentrarlos (Liofilizadora Labconco, Modelo 4451G). El

precipitado liofilizado se pulverizó y resuspendió en 20 ml de agua desionizada, se centrifugó a 11, 000 rpm (12 466 xg) durante 10 minutos a 4° C (Microcentrífuga SORVALL FA-MICRO, MC-12V), el precipitado obtenido de esta centrifugación se resuspendió en 15 ml de acetato de amonio 10 mM, pH 7.1, y se centrifugó por segunda ocasión a 11, 000 rpm (12 466 xg) durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante obtenido en esta última centrifugación se empleó para realizar tanto los bioensayos como la purificación (Bernheimer y Avigad, 1981; Kem *et al.*, 1989; Kaul y Mattiasson, 1992)

c) Cuantificación de proteína.

Para la cuantificación de proteína se empleó el método de Bradford (Proein Assay Dye Reagent Concentrate, Kit II), el cual se basa en la tinción con azul de Coomassie G-250 para proteínas. En los reactivos ácidos los colorantes rojo y verde catiónico tienen una absorbancia ente 470 y 650 nm; en contraste, la mayor forma de azul aniónica del reactivo de Bradford, el cual se une a proteínas, tiene una absorbancia máxima en 595 nm. Por lo tanto la cuantificación de proteína puede ser estimada al determinar la cantidad de colorante en la forma azul iónica (Bradford, 1976; Harris y Angal, 1989; Bollag *et al.*, 1996; Walker, 1996).

La reacción con el reactivo Bradford es completa después de 5 minutos, pero la precipitación comienza de 10 a 15 minutos. Las ventajas del método son: rapidez y sensibilidad (1–10 µg, este rango es para microensayos); es relativamente libre de interferencia por reactivos bioquímicos comúnmente usados, así como componentes no proteicos; y las desventajas que presenta son que se tiene alguna variabilidad de respuesta entre diferentes proteínas purificadas; las proteínas usadas en este ensayo son irreversiblemente desnaturalizadas (Bradford, 1976; Harris y Avigal, 1989; Bollag *et al.*, 1996; Walker, 1996.).

Antes de determinar la concentración de proteína se construyó una curva de calibración para microensayos, en dicha curva las alícuotas contuvieron: para el blanco, 800 µl de agua desionizada y 200 µl del reactivo de Bradford; y para las alícuotas con proteína (albúmina), se restó a los 800 µl de agua desionizada el volumen determinado de la albúmina en solución y se llevó a un volumen final de 1 ml. Las cantidades de albúmina empleadas fueron: 1µg, 2µg, 4µg, 6µg, 8µg, 10µg y 12µg, con seis réplicas de cada cantidad. Las alícuotas se analizaron en el espectrofotómetro (Espectrofotómetro Perkin-Elmer, Lambda-Bio) a una absorbancia de 590 nm a los seis minutos después de agregar el reactivo de Bradford.

Para las fracciones obtenidas en los pasos de purificación, se les determinó la concentración de proteína bajo los mismos parámetros con que se construyó la curva de calibración; en lugar de la albúmina se agregó a las alícuotas un volumen determinado de cada fracción. Con la ecuación de

dicha gráfica se determinaron los valores de concentración de proteína considerando el valor del promedio de tres réplicas por cada fracción.

d) Bioensayos. Para la investigación de la actividad biológica, se efectuaron los siguientes análisis:

1. Ensayo lítico

La hemólisis inducida por citolisinas se estimó usando eritrocitos de oveja, humano y rata detectando por espectrofotometría el efecto lítico del extracto crudo. Se han elegido los eritrocitos de esos tres organismos debido a que, la oveja se ha empleado con mayor frecuencia en estudios hemolíticos de toxinas de anémonas, por lo que el presente estudio se puede comparar con los reportados; el humano es quien llega a estar en contacto directo con las anémonas en su hábitat, y los resultados obtenidos en este estudio también se podrían aplicar en la medicina a través de la investigación farmacológica, como herramientas para la creación de nuevos fármacos (ver Introducción); y la rata fue considerada ya que es el animal de laboratorio que con mayor frecuencia se emplea para estudios de farmacología (Kem, 1988b; Elliot *et al.*, 1986; Khoo *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1996; Khoo *et al.*, 1997; Álvarez *et al.*, 1998).

La sangre extraída (5 ml) de los tres organismos se colocó en 50 ml de solución Alsever como amortiguador (dextrosa anhidra, 0.11M; cloruro de sodio, 0.07M; citrato de sodio, 0.02M; ácido cítrico, 0.002 M) (Macek y Lebez, 1982; Venier *et al.*, 1997). Para obtener sólo a los eritrocitos se centrifugó tres veces a 2, 500 rpm durante 5 minutos a 4° C; el sobrenadante obtenido en cada centrifugación se desechó y se agregó nuevamente amortiguador, resuspendiendo con mucho cuidado el precipitado para evitar que se rompieran los eritrocitos; esto se realizó con una pipeta pasteur llenándola y vaciándola dentro de la suspensión con eritrocitos. Después de la tercera centrifugación, el precipitado total se dividió en dos partes iguales, a cada uno se le agregó aproximadamente 20 ml de amortiguador; la suspensión se agitó suavemente y en una sola dirección; posteriormente fue calibrada.

La calibración de la suspensión consistió en que el 0% y 100% de la actividad hemolítica correspondieran a una absorbancia de aproximadamente 0.03 y 1.03, respectivamente, medidos a una longitud de onda de 415 nm, en la cual absorbe la hemoglobina. El 0% se preparó con 950 µl de la solución Alsever y 50 µl de la suspensión de eritrocitos; para el 100 % de hemólisis se emplearon 950 µl de agua desionizada y 50 µl de la suspensión de eritrocitos. La actividad hemolítica fue medida en espectrofotómetro después de una incubación a 37° C (Termo-Baño Felissa) durante 30 minutos y centrifugación a 2, 500 rpm (1290 xg) por 5 minutos a 4°C. Si la absorbancia presentaba un valor

mayor a los antes mencionados, se agregó 1 ml de amortiguador por cada 0.1 nm de absorbancia que se deseaba disminuir; en caso contrario, se restó esta misma cantidad de amortiguador de la suspensión, una vez que los eritrocitos se precipitaban por sí solos (24 horas aproximadamente). La solución final tuvo una concentración de 0.05 % de eritrocitos, y fue la que se empleó para los bioensayos. Las muestras siempre se conservaron a 4° C. (Mahnir et al., 1993; Rowe y Welch, 1994; Rottini et al., 1995)

Para caracterizar la acción hemolítica de las toxinas de *B. antillensis*, se creó una curva dosis-respuesta, en la cual el 0 % y 100 % de la actividad hemolítica se prepararon de la misma manera como se describió anteriormente. La curva se construyó únicamente con el extracto crudo, debido a que en cada paso de purificación los rendimientos de proteína cada vez eran menores. Las cantidades de toxina para la curva dosis-respuesta fueron determinadas con una medición previa de hemólisis con 0.1 µg, 0.5 µg y 0.25 µg de proteína, la solución para estas alícuotas se preparó con amortiguador. Esta medición previa fue con el fin de conocer las concentraciones con que se obtenían el 0%, ~ 50% y 100% de hemólisis, respectivamente. Para cada porcentaje de la actividad hemolítica se realizaron seis réplicas. La actividad hemolítica fue medida después de una incubación a 37° C durante 30 minutos y se centrifugó a 2, 500 rpm (1, 290 xg) durante 5 minutos a 4°C. Cabe mencionar que la actividad hemolítica se determinó para las fracciones obtenidas en cada paso de purificación para calcular la actividad específica, y como monitoreo para corroborar que se conservó dicha actividad (Rottini et al., 1995; Rowe y Welch, 1994; Mahnir et al., 1993).

Los resultados de la exposición de los eritrocitos ante la toxina fueron graficados en un plano que, relacionó el porcentaje del número de eritrocitos que se lisaron (variable dependientes) con la concentración de toxina que interactuaron (variable independiente). La parte central de la curva representó la cantidad de toxina que se requirió para lisar el 50% de eritrocitos, y a esto se le conoce como unidad hemolítica (HU₅₀).

2.- Registro electrofisiológico en ovocitos de *Xenopus laevis*

El ovocito de *Xenopus laevis* es un sistema que ha sido utilizado en investigaciones de canales iónicos, receptores de membrana, síntesis de proteínas, polaridad celular, entre otros; además de ser uno de los modelos donde se puede aplicar la técnica de control de voltaje, la cual se empleó para conocer el tipo de respuesta electrofisiológica de las toxinas de *Bunodeopsis antillensis*.

La técnica de control de voltaje es usada por las siguientes razones: 1) al controlar el voltaje se elimina la corriente capacitiva, salvo por un corto tiempo (µs) seguido de un cambio a un nuevo voltaje; 2) excepto para cargas breves, las corrientes que fluyen son proporcionales a la conductancia de la membrana, y al número de canales abiertos; 3) si la compuerta de un canal es determinada por

el voltaje transmembranal, la fijación de voltaje ofrece también control sobre la variable clave que determina la apertura o cierre de canales iónicos (Arellano *et al.*, 1996)..

El control de voltaje consiste en que la célula es bañada en solución y dos electrodos de plata muy finos son insertados. Uno provee una medida del potencial interno de la célula con respecto a la de la solución, es decir, una medición del potencial de membrana. El otro se coloca al amplificador del control de voltaje que es conectado a una fuente de voltaje variable, cuyo valor puede ser preestablecido; a este valor se le llama potencial comando y en general es cercano al potencial de membrana (Arellano *et al.*, 1996).

El amplificador en la fijación de voltaje transmite la corriente de su salida siempre que existe una diferencia de voltaje entre los electrodos. El flujo de corriente de salida a través de la membrana celular entre el segundo electrodo y la solución, es medido por la disminución de voltaje a través de un resistor pequeño en serie. En el caso de los registros electrofisiológicos efectuados con *Bunodeopsis antillensis* fueron aplicados a ovocitos desfoliculados de *X. laevis*, es decir, se trabajó con ovocitos desprovistos de capas celulares que los rodean.

El método para desfolicular ovocitos consiste en un tratamiento con colagenasa, que permite remover todas las células foliculares del ovocito sin alterar las proteínas de la membrana. Este procedimiento simplifica la interpretación de resultados eliminando la posibilidad de tejidos del folículo y facilitando la inserción de microelectrodos. El procedimiento es el siguiente: los ovocitos fueron inmersos en un medio de 0.5 a 2 mg/ml de colagenasa (Sigma tipo I) en solución Ringer (NaCl 115mM; KCl 2mM; CaCl₂ 1.8mM; N-(2-hidroxitetil)piperazina-N'-(ácido 2- etanosulfónico) (HEPES) 5mM ajustado a pH 7.0) por un periodo de 1 a 2 horas. Las células foliculares de cada ovocito fueron removidas en su totalidad empleando pinzas. Los ovocitos desfoliculados fueron regresados a medio Barth estéril (NaCl 88mM; KCl 2.4mM; NaHCO₃ 2.4 mM; Ca(NO₃)₂ 0.33mM; CaCl₂ 0.41mM; MgSO₄ 0.82mM; KH₂PO₄ 0.88 mM; Na₂HPO₄ 2.7mM; ajustado a pH 7.4 con glucosa), pudiendo mantenerse en este medio a una temperatura de 16-18°C durante varios días (Arellano *et al.*, 1996).

Los registros electrofisiológicos se efectuaron con el extracto crudo y las cuatro fracciones obtenidas en la cromatografía de filtración por gel. Para cada preparación se requirió de una concentración de toxina (proteína) de 10µg/ml, diluida en 20ml de solución Ringer. El voltaje comando se fijó a -60 mV. Sólo se describió de manera general el tipo de corriente que se obtuvo, debido a que corresponde a un análisis preliminar para futuros estudios.

e) Purificación de sustancias con actividad biológica

Centrifugación.

El empleo de la centrifuga tiene como finalidad separar las proteínas (que como se sabe se trata de macromoléculas) por sedimentación al someter a la mezcla a aceleraciones grandes (20 , 000 o hasta 80 , 000 rpm) (Lehninger, 1985; Voet y Voet, 1995).

Como procedimiento previo a cada paso de purificación, la fracción de interés se centrifugó a 11, 000 rpm (12 466 xg) durante 10 minutos, a 4° C. El sobrenadante obtenido en cada centrifugación fue lo que se sometió a la purificación.

Cromatografía.

Uno de los medios que se emplean con mayor frecuencia para purificar proteínas es la cromatografía, la cual se basa en que la mezcla de sustancias que se va a fraccionar se disuelve en un líquido conocido como fase móvil. La disolución resultante se hace fluir a través de una columna constituida por una matriz sólida y porosa que se conoce como fase estacionaria. Los componentes separados pueden recuperarse en fracciones para su posterior análisis (Lehninger, 1985; Voet y Voet, 1995).

Cromatografía de filtración por gel o cromatografía de exclusión molecular.

La cromatografía de filtración por gel consiste en que, las moléculas de mayor tamaño no pueden penetrar los poros de las partículas de gel, y por lo tanto, son excluidas pasando a través de la columna con la fase móvil en el exterior de los gránulos. Las moléculas de menor tamaño penetran en las partículas del gel. Las proteínas de tamaño intermedio son excluidas de los gránulos en un grado que dependerá de sus dimensiones. Cuando todas las moléculas han sido eluidas de la columna, ésta queda lista para otro experimento. Esta es una de las ventajas de la filtración de gel, la misma columna puede ser usada para un gran número de experimentos, existe compatibilidad con todos los solventes y mezclas de amortiguadores usados para cromatografía, y su estabilidad física y química permite reproducir el ensayo (figura 12) (Pharmacia, 1970b; Lehninger, 1985; Voet y Voet, 1995).

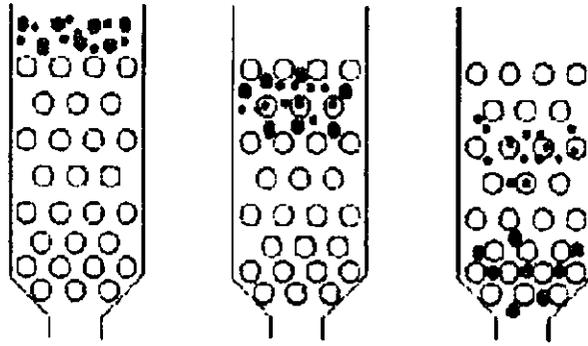


Figura 12. En la filtración en gel, las moléculas grandes (círculos negros grandes) eluyen primero sin penetrar las partículas de gel (círculos sin relleno), mientras que las moléculas pequeñas (círculos negros pequeños) son la últimas en eluir, debido a que penetran las partículas de la matriz.

En el caso de la purificación de proteínas de la anémona *B. antilliensis*, el sobrenadante obtenido en la extracción de toxinas, fue tratado en cromatografía líquida de rápida resolución (Fast Performance Liquid Chromatography, FPLC) (Pharmacia-Biotec AB) con tres columnas de Sephadex G-50 (Sigma) de 4.0 cm de diámetro y un volumen de 417 ml, usando como amortiguador acetato de amonio 10 mM y pH 7.1, con un flujo de 4 ml/min. La lectura de absorción fue de 280 nm con una sensibilidad de 1.0, y la conductividad fue monitoreada automáticamente.

Cromatografía de intercambio iónico (IEC)

En la cromatografía de intercambio iónico (IEC) se incluyen dos eventos, la unión de la proteína a la carga fijada y la elución de la proteína con cargas determinadas. La retención implica una interacción electrostática entre las cargas fijadas y las de la proteína; las uniones incluyen un reemplazo de iones no fijados por la proteína. En el caso de la elución (lavado de la columna), las proteínas con afinidades relativamente bajas por el intercambiador iónico se desplazarán en la columna más de prisa que las sales que se unen al intercambiador iónico con afinidad superior. Cuanto mayor es la afinidad de unión de una sal por el intercambiador iónico tanto mayor será el retraso que experimente.

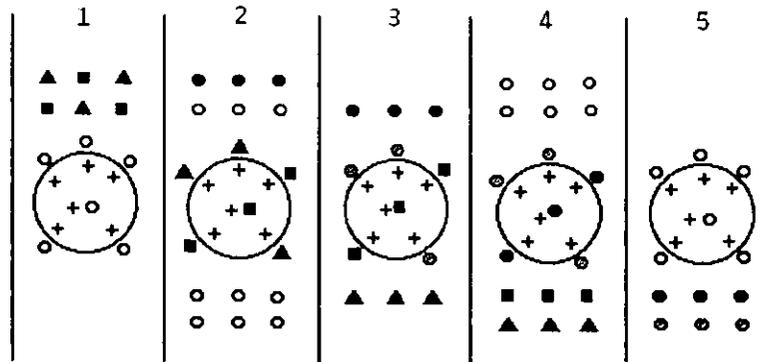


Figura 13. Pasos que se efectúan en IEC. 1) El intercambiador iónico está en equilibrio por un amortiguador. 2) Los contraiones (círculos blancos) provenientes del amortiguador están unidos electrostáticamente a la fase estacionaria, y son sustituidos por las proteínas (triángulos y cuadrados) 3) Las proteínas son intercambiadas por gradientes iónicos (círculos blancos y grises) y posteriormente eluidas del intercambiador iónico. 4) Las moléculas de proteína que se van quedando, son intercambiadas por el mismo gradiente iónico y eluidas. 5) Una vez que las proteínas han salido del intercambiador iónico, lo que queda junto con el intercambiador iónico son los gradientes iónicos, los cuales son intercambiados por los contraiones iónicos y entonces el intercambiador iónico es regenerado para ser usado nuevamente.

La IEC se nombra con base al signo de sus cargas, en la IEC aniónica la carga fijada es positiva, y en la IEC catiónica las cargas fijadas son negativas; es decir, si la fase estacionaria acarrea grupos de carga positiva, la resina tendría carga negativa (intercambiador aniónico); y si la columna acarrea grupos negativos la fase estacionaria sería positiva (intercambiador catiónico) (figura 13) (Pharmacia, 1970a).

Cromatografía de intercambio catiónico

La fracción obtenida en Sephadex G-50 se centrifugó a 11,000 rpm (12,466 xg) durante 10 minutos a 4°C, posteriormente se aplicó a una columna 400 VHP 575 Vydac, de 7.5 mm de diámetro interno y 5 cm de largo, con un diámetro de poro de 900 Å, en cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Varian Pro Star, Modelo 230). La columna se equilibró con bicarbonato de amonio 20 mM, pH 8.22. Subsecuentemente la fracción fue eluida usando bicarbonato de amonio 1 M, pH 8.66, con un gradiente lineal de 0 a 100 % en 25 minutos, con una velocidad de flujo de 1 ml/min. La lectura de absorción fue de 280 nm con una sensibilidad de 2.0.

Cromatografía de intercambio aniónico

Para este método la fracción que contiene la proteína de interés, se sometió a HPLC en una columna de amonio cuaternario 300VHP 575, de 7.5 m de diámetro interno y 5 cm de largo, con un diámetro de poro de 900 Å, en HPLC. Los amortiguadores aquí empleados fueron: bicarbonato de amonio 0.02 M, pH 8.22 y bicarbonato de amonio 1.0 M, pH 8.66; con un gradiente lineal de 0 a 100 % en 25 minutos, y con una velocidad de flujo de 1 ml/min. La lectura de absorción fue de 280 nm con una sensibilidad de 1.0.

Separación de sales.

La cromatografía de filtración por gel ha sido usada para desalar proteínas en solución, debido a la diferencia del tamaño molecular entre la proteína y las sales (contaminantes). La porosidad del gel es selectiva para excluir las sales, debido a que el tamaño de la partícula de la matriz es escogida para contar con una superficie baja, y de esta manera minimizar las propiedades de adsorción. Desalar una proteína se puede efectuar usando agua destilada como fase móvil. Este procedimiento para desalar puede ser usado para transferir el soluto a otro amortiguador (Janson y Rydén, 1998).

La fracción con mayor actividad hemolítica que se obtuvo de la cromatografía de intercambio aniónico fuerte contenía sales se desaló empleando una columna HiTrap Desalting Sephadex G-25 superfino (Pharmacia Biotech), volumen de 5 ml, en FPLC, y usando agua desionizada como eluyente. La lectura de absorción fue de 280 nm con una sensibilidad de 0.1.

f) Caracterización

Electroforesis en gel

La electroforesis en gel se halla entre los métodos más resolutivos y convenientes en la separación macromolecular. En esta técnica, los geles retrasan las moléculas grandes con respecto a las menores al emigrar a través del gel. El aislamiento molecular se basa en la filtración en gel, así como en las movilidades electroforéticas de las moléculas que se están separando. Los geles de uso común son la poliacrilamida y la agarosa, que poseen poros de dimensiones moleculares cuyos tamaños pueden especificarse (Walker, 1996; Hawcroft, 1997).

Para conocer el peso molecular relativo de la proteína purificada parcialmente de *Bunodeopsis antillensis*, se realizó electroforesis en gel SDS-PAGE, con 3µg de proteína de las fracciones de Sephadex G-50. El sistema empleado consistió de geles preparados (Phast-Gel,

Pharmacia) con 10-15% de gel concentrador y 12.5% de gel resolvidor; se usaron marcadores de amplio rango de peso molecular (14-94 kDa). La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y como colorante se aplicó azul de Coomasie, después el gel se sumergió en una solución de glicerol al 5%, y se secó a temperatura ambiente. Este procedimiento se efectuó usando "Phast-System", donde se requiere de 30 minutos para efectuar la electroforesis, y la aplicación de las muestras al gel es automatizada así como el ajuste de voltaje, que en este caso la electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 70-140V.

Isoelectroenfoque (IEF).

El IEF es una técnica de alta resolución capaz de separar proteínas que difieren en su punto isoeléctrico por un valor de pH de 0.02. El punto isoeléctrico es el pH al que una proteína es neutra eléctricamente y no se desplaza en un campo eléctrico. A cualquier valor de pH superior al punto isoeléctrico, una proteína posee carga negativa neta y se desplazará hacia el electrodo positivo (ánodo). A cualquier pH por debajo del punto isoeléctrico, la proteína poseerá carga positiva neta y se desplazará hacia el electrodo negativo (cátodo) (Voet y Voet, 1995; BIO-RAD, 1990; Deutscher, 1990).

El punto isoeléctrico de la toxina de *B. antilliensis* se determinó en microplacas (0.35 X 0.43 x 50 mm) con gradientes de pH de 3 a 10, aplicando 4µg de proteína de cada fracción. El isoelectroenfoque se efectuó en Phast-System, con un voltaje de 70-140V. Al final, la tinción se realizó con azul de Coomasie; después el gel se sumergió en una solución de glicerol al 5% y el secado fue a temperatura ambiente.

Isoelectroenfoque en columna.

El isoelectroenfoque en columna es un sistema donde se puede preparar un IEF que permite separar en solución una mezcla de proteínas por punto isoeléctrico, ya sea de un extracto crudo o semicrudo. Dicha técnica consiste de compartimientos cilíndricos de poliéster que permiten el transporte de proteínas mediante la rotación en un eje horizontal. Cuenta con un eje de cerámica fría con el cual se mantiene al sistema a una temperatura de 4° C. Al igual que los equipos para electroforesis, el empleado para el isoelectroenfoque en columna (rotofor) cuenta con una fuente de poder, y para llevar a cabo el IEF emplea una mezcla de anfolitas para mantener el gradiente de pH por un largo periodo y amortiguadores como: H₃PO₄ (0.1 M) y NaOH (0.1 M) (BIO-RAD, 1990; Deutscher, 1990).

Las proteínas son dispersadas uniformemente a través de la cámara, migran a uno o más compartimentos donde los valores de pH están muy cerca al punto isoeléctrico de cada proteína. El

efecto combinado de compartimentalización y rotación es superior a los métodos de enfoque. La segmentación de la columna facilita la colección de fracciones en solución permitiendo así el análisis de la actividad biológica (BIO-RAD, 1990; Deutscher, 1990).

De este modo, la fracción de interés obtenida en la cromatografía de intercambio aniónico se fraccionó en un rotofor (Rotofor-Cell, BIO-RAD), con el fin de eliminar los contaminantes que pudieron intervenir en la electroforesis en gel SDS-PAGE e isoelectroenfoque, empleando anfolitas de marca Pharmacia.

Densitómetro.

Para el análisis de los geles obtenidos en electroforesis en gel e isoelectroenfoque se empleó un densitómetro (BIO-RAD). El densitómetro consiste en un sistema de luz y detector de radiación que es capaz de convertir señales químicas en datos digitales, los cuales son desplegados en la computadora en un formato bidimensional usando un software de Multi-Análisis (BIO-RAD, 2, 000).

g) Descripción de cnida en tentáculos por técnicas de microscopía electrónica.

A diferencia de los moluscos los cuales usan sus conchas o coloración como protección contra depredadores potenciales, las anémonas utilizan los nematocistos para defensa y captura de la presa. Han sido identificados entre veinticinco y treinta y cinco tipos de nematocistos, y se ha descrito que están involucrados en una variedad de funciones desde una simple adhesión hasta la inyección hipodérmica de toxinas en la presa (Wood, 1988; Shick, 1991).

Los estudios enfocados en la ultraestructura de nematocistos han ayudado en la clasificación de estas estructuras; y también han provisto de un mejor entendimiento de la formación de la cápsula.

Fijación.

Para el caso de organismos pequeños como protozoarios, suspensiones celulares, algas bacterias y otros; el espécimen puede ser preparado comenzando directamente con la fijación. El objetivo de este paso es la exposición rápida del tejido ante el fijador para interrumpir rápidamente la actividad biológica, preservar estructuras celulares y minimizar las alteraciones post-mortem en las estructuras finas (Wischnitzer, 1981, Dykstra, 1992).

El fijador es empleado para evitar la contracción e hinchamiento de los constituyentes de células y tejidos muertos, además de mantener la forma y tamaño inicial de los mismos, preservar la relación posicional de los componentes celulares y la reactividad química de los constituyentes

celulares, tales como enzimas y proteínas; así como ser capaz de resistir los efectos de los subsecuentes pasos en el procedimiento preparativo (Dykstra, 1992).

Los fijadores más comunes son los aldehídos: formaldehído y glutaraldehído, siendo éste último el más usado en microscopía electrónica debido a que da una consistencia firme al tejido. Las ventajas de éstos tipos de fijadores son: penetran el tejido rápidamente debido a que su molécula es pequeña, disminuyen distorsión y se mantiene la relación estructural.

El formaldehído penetra rápidamente debido a su molécula es la más pequeña de los aldehídos y la fijación con formaldehído es reversible con suficientes lavados en disolventes acuosos. Para usar formaldehído en el proceso de fijación, se recomienda prepararlo en solución a una concentración al 4%, realizar el proceso a temperatura ambiente o en hielo, considerando que la velocidad de penetración es más rápida que la del OsO_4 , y no efectuar la fijación por más de 2 horas (Wischnitzer, 1981; Dykstra, 1992).

A diferencia del formaldehído, el glutaraldehído penetra más lentamente en los tejidos, inactiva algunas enzimas y anticuerpos, además de afectar sólo el alfa hélice de las proteínas. Comúnmente se emplea el glutaraldehído en la fijación a una concentración de 1.5-4%, a temperatura ambiente o en hielo, tomando en cuenta que penetra a los tejidos a una profundidad de 0.7 mm después de 3 horas a temperatura ambiente (Dykstra, 1992).

Debido a las diferentes propiedades del formaldehído y glutaraldehído que presentan para la fijación de tejidos, se han creado mezclas de aldehídos para tener mejores resultados. La primera mezcla que se estableció fue 5% de glutaraldehído y 4% de formaldehído en una solución con amortiguador de cacodilato (80mM), pH 7.3 y CaCl_2 (5mM). Más tarde se determinó una mezcla de 4F:1G (F: formaldehído, G: glutaraldehído) con un amortiguador de fosfato de sodio monobásico y pH 7.2-7.4. La finalidad de usar las mezclas de aldehídos es debido a que, el formaldehído penetra a los tejidos rápidamente y después penetra más lentamente el glutaraldehído, el cual estabiliza el tejido y es más permanente que el formaldehído (Wischnitzer, 1981; Dykstra, 1992).

Para la observación de cnida de tentáculos de *B. antillensis*, se recolectaron organismos en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, y se transportaron al laboratorio en agua de mar. En un recipiente con agua de mar se adicionó tabaco para obtener una solución concentrada. En otro recipiente con la mínima cantidad de agua de mar se colocaron a los organismos y poco a poco se incorporó la solución concentrada con tabaco con el fin de narcotizarlos, hasta lograr que los tentáculos no se contrajeran con estímulo mecánico (Escobar, com. per.).

A partir de la siguiente solución de glutaraldehído al 4% se prepararon tres fijadores: agua de mar artificial (20 g) preparada con agua bidestilada (600 ml), filtrada (millipore 0.22 μ m), amortiguador de sulfatos cacodilato de sodio (12.6 g), pH 7.4:

Fijador 1: Formol al 4% en solución de glutaraldehído (8ml).

Fijador 2: Formol al 2% en solución de glutaraldehído (4ml).

Fijador 3: Formol al 1% en solución de glutaraldehído (2ml).

Los organismos con el fijador 1 fueron los que se emplearon para las observaciones en el microscopio, debido a que el tejido no presentó daño alguno en su estructura con dicho fijador. El tiempo de fijación fue de cuatro horas seguido de un proceso de cuatro lavados cada 15 minutos con la solución de lavado (fosfato dibásico 0.1 M, ajustar a pH 7.4 con sacarosa 0.25M y fosfato monobásico 0.1M, ajustar a pH 7.4 con sacarosa 0.25M).

Post-fijación.

La mayoría de los fijadores comunes producen distorsiones en estructuras citoplásmicas, por ello, el uso del tetróxido de osmio (OsO_4) como fijador ha dado resultados satisfactorios empleándose para preservación de ultraestructuras de tejidos de animales. El OsO_4 reacciona con los grupos laterales de los péptidos con triptofano e histidina, uniendo cadenas de proteína y actúa como estabilizador de proteínas celulares las cuales están en el protoplasma. Las ventajas de usar osmio como fijador son: interrumpe movimientos citoplásmicos en segundos o minutos, tiene nueve estados de oxidación y por lo menos cinco de ellos son relativamente estables, reacciona de manera diferente con los componentes celulares, es soluble en medios polares y no polares, penetra y fija los dominios celulares hidrofóbico e hidrofílico. Las desventajas del osmio son: la lenta penetración en los tejidos y al ser un fuerte oxidante, inactiva todas las enzimas provocando daños por antígenos (Wischnitzer, 1981; Dykstra, 1992).

Es importante considerar algunos factores que intervienen en la fijación con OsO_4 , como son:

a) pH: si el OsO_4 tiene un pH no adecuado como amortiguador produce una acidificación del tejido, lo que origina alteraciones en la fijación. El pH adecuado para la fijación con OsO_4 es entre 7.2 a 7.6.

b) Tonicidad de fijación: para mantener la tonicidad de la fijación se adicionan sales al medio estándar, además de sacarosa para controlar la molaridad.

c) Temperatura: realizar la fijación con OsO_4 a temperatura entre 0° y 4°C reduce la velocidad del cambio celular.

d) Tiempo de fijación: la fijación con OsO_4 requiere de un tiempo entre 30 a 90 minutos, dependiendo del tamaño y densidad del espécimen, aunque se considera que de 1 a 2 horas es suficiente para fijar muestras de 1 mm de grosor, en al menos una dimensión; y para tejidos embrionarios se recomienda fijar por más de 12 horas. La duración de la fijación depende de la estabilización de las proteínas del tejido y la subsecuente solubilización de algunos de los componentes del tejido.

e) Velocidad de penetración: a temperatura ambiente, la velocidad de penetración del tetróxido de osmio es de 0.5mm/hr.

Es muy importante mantener una estabilidad química en el medio al que será sometido el espécimen durante la fijación, es por eso que se han propuesto algunos amortiguadores para preparar las soluciones para fijar. Los amortiguadores que comúnmente se emplean son el amortiguador de fosfatos y el cacodilato. El amortiguador de fosfatos mantiene de manera más efectiva el pH en comparación con otros amortiguadores comunes, como el cacodilato de sodio. Para microscopía electrónica se puede preparar amortiguador de fosfato de sodio o una combinación de fosfato monobásico y dibásico de sodio (Dykstra, 1992).

Los tentáculos de *B. antilliensis* se disectaron desde la base. Durante este tiempo los tentáculos se mantuvieron en solución de lavado para evitar daños en el tejido por deshidratación. En una solución de OsO_4 (1%) se colocaron los tentáculos permaneciendo en este medio durante dos horas, agitando suavemente cada 15 minutos. Después se lavaron los tentáculos dos veces con solución de lavado.

Deshidratación.

El espécimen es deshidratado después de la fijación para eliminar el exceso de agua en el tejido, y que ésta no intervenga en el tratamiento con resina no soluble en agua. El etanol es uno de los disolventes más comunes para deshidratar tejidos porque no es un fuerte agente orgánico como la acetona. El proceso de deshidratación comienza con gradientes de concentración de etanol de 10% hasta llegar a una concentración del 95% y finalmente los especímenes son transferidos a 100% de etanol. Trabajar con gradientes de concentración es con la finalidad de evitar distorsiones en los tejidos producidas por grandes cambios de presión osmótica, además de que la mejor deshidratación se obtiene al incrementar los pasos en ésta (Wischnitzer, 1981; Dykstra, 1992).

Se realizó una deshidratación con gradientes de concentración de etanol en agua desionizada (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%). Tanto los tentáculos como las soluciones se mantuvieron a una temperatura de 4°C. Se hicieron dos cambios de 10 minutos con cada concentración, excepto para la concentración de 100% que fue un cambio de 15 minutos y a temperatura ambiente. Al final, los tentáculos se sumergen en una solución de óxido de propileno, con dos cambios de 30 minutos de este solvente.

Infiltración y polimerización.

La fijación permanente de los especímenes se realiza con resinas, siendo las resinas epóxicas las de mayor uso en microscopía electrónica, por su capacidad de penetración en tejidos, su viscosidad y estabilidad bajo irradiación de electrones, además de que son solubles en etanol, acetona y óxido de propileno. Siempre se debe considerar que un medio para fijación permanente cumpla con lo siguiente: ser soluble en etanol, no modificar la composición química del espécimen, no producir distorsiones físicas del espécimen, polimerizar de manera uniforme, y como resultado final formar un bloque lo suficientemente flexible para realizar cortes ultrafinos (Wischnitzer, 1981; Dykstra, 1992).

En la fijación permanente de los tentáculos se aplicó resina epóxica, colocándolos posteriormente en el desecador durante 24 horas. Después de este tiempo y teniendo la precaución de no exponer al aire los tentáculos, cada tentáculo se colocó con resina concentrada para obtener un bloque y se orientaron dependiendo del tipo de corte que se hizo (transversal o longitudinal); los bloques se polimerizaron en un tiempo de 36 horas a 55°C.

Cortes.

Los cortes ultrafinos se realizan en ultramicrotomos que actualmente tienen avanzados mecanismos automáticos, con los cuales en teoría, se pueden obtener cortes menores a algunos Angstroms. Los cortes son recuperados en la superficie del agua u otros líquidos en los cuales flotan hasta que son llevados a un portaobjetos para su contraste. El contraste se efectúa para incrementar el poder de dispersión de electrones de varios componentes de tejidos y células (Dykstra, 1992).

En el extremo de cada bloque donde se colocó el tentáculo, se formó una pirámide para exponer el tejido y se realizaron cortes semifinos de 500 nm que se tiñieron con azul de toluidina. Posteriormente, se obtuvieron cortes finos de 60-90 nm de espesor, y se contrastaron con dos soluciones: una compuesta de acetato de uranilo al 2% durante 20 minutos, y otra solución de citrato de plomo al 2% de 10 a 15 minutos en ausencia de CO₂. Se observaron al microscopio electrónico a 80 kV.

RESULTADOS

Observaciones durante la recolecta

Durante la recolecta de organismos de *B. antillensis* que se realizó para llevar a cabo este trabajo se observó que esta especie es estacional, es decir, que en la laguna arrecifal de Puerto Morelos sólo se encuentra en los meses de mayo a septiembre, meses que abarcan desde final de la primavera y todo el verano. Se piensa que esto se debe al cambio en la temperatura del agua.

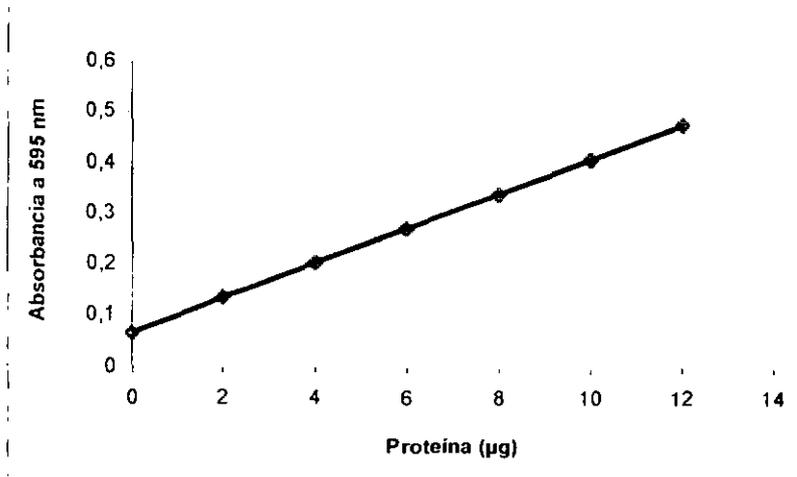
El sitio donde se localizó un mayor número de organismos fue en la zona marina frente a Rodman. Esto quizás se deba a que en verano (época de lluvias), se han presentado descargas de agua del manglar que se ubica al norte de la laguna arrecifal, y esto puede incrementar la cantidad de nutrientes en el agua. Hay que recordar que las anémonas no sólo son carnívoras, también son organismos filtradores.

Los organismos recolectados se encontraron adheridos tanto en *Siringodium filiforme* como en *Thalassia testudinum*, y a profundidades que van desde los 50 cm hasta 3 m.

Las personas que llegaron a estar en contacto físico con *B. antillensis*, presentaron los siguientes síntomas: lesión local (como puntos rojos), ardor, entumecimiento local y comezón. Cabe mencionar, que Humman (1991) y Schwarts y Meinking (1998) describen a *B. antillensis* como un organismo altamente tóxico, y que buceadores de las costas de Florida llegan a ser lesionados por este organismo. La toxicidad de las anémonas también se observó con los organismos liofilizados, cuando se trabajó la muestra para pulverizarla. Las partículas finas de este polvo se introduce en la nariz causando ardor, comezón e hinchazón.

Cuantificación de proteína.

Los promedios obtenidos correspondientes a los valores de absorbencia por cada cantidad de albúmina se relacionaron en un plano con su respectiva cantidad de proteína, y se obtuvo la ecuación de la gráfica (Gráfica 1). El cálculo de la concentración de proteína se realizó de la siguiente manera: 1) calcular las absorbencias de un volumen determinado de una fracción; 2) usar la curva de calibración extrapolando la absorbencia de una fracción con la cantidad de albúmina (asumiendo que iguala la cantidad de proteína); por ejemplo, para fracciones con absorbencia de 0.15, se intersecta la curva estandar en el punto que corresponde a 2 µg; 3) otra manera de usar la curva de calibración es calculando la concentración de proteína empleando la ecuación de la gráfica, sustituyendo los valores de absorbencia en "y" y despejando la variable "x" que corresponde a la cantidad de proteína.



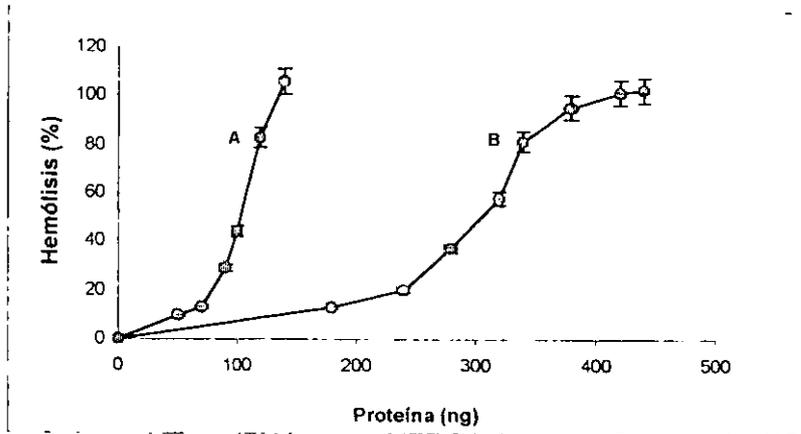
Gráfica 1. Curva de calibración para cuantificación de proteína por el método de Bradford. La regresión expresada como ecuación es: $y = 0.0343x + 0.0663$, $R^2 = 0.905$.

Bioensayos

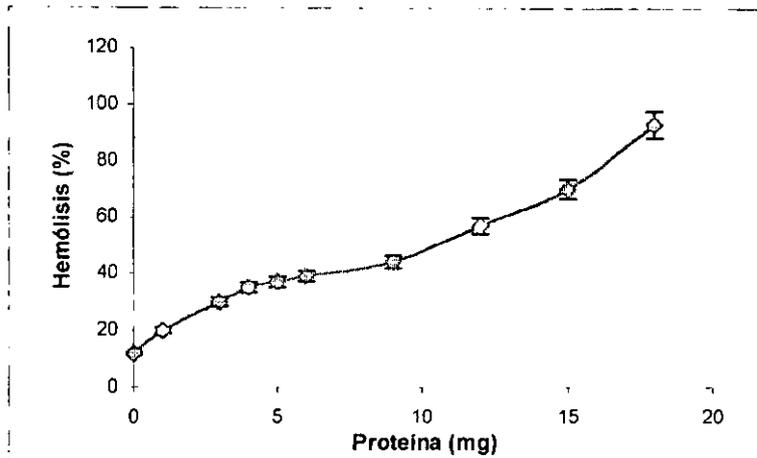
1. Ensayo lítico

Para la hemólisis inducida por citolisinas usando eritrocitos de borrego, humano y rata, se construyó una curva dosis-respuesta para cada tipo de eritrocito (Gráficas 2 y 3; Tabla 2), a partir de cada una se calculó la unidad hemolítica (HU_{50}), así como la unidad hemolítica por miligramo de proteína (HU/mg). Una HU_{50} corresponde a la cantidad de proteína (toxina) que se requirió para lisar el 50% de eritrocitos, cuyo valor se obtuvo trazando una línea recta que va desde el 50% de hemólisis hasta interceptar la curva en el punto que corresponde a la cantidad de proteína (toxina) buscada.

Como se puede observar en las gráficas 2 y 3, y en la tabla 2, el extracto crudo obtenido de *B. antillensis* fue más potente en eritrocitos de humano que en los otros dos tipos de eritrocitos, debido a que se requirió menor cantidad de toxina (proteína) para lisar el 50% y 100 % de células, y por consiguiente, la HU/mg es mucho mayor en eritrocitos de humano que en eritrocitos de oveja y rata.



Gráfica 2. Curva dosis respuesta del ensayo lítico en eritrocitos de borrego (B) y humano (A).



Gráfica 3. Curva dosis respuesta del ensayo lítico en eritrocitos de rata.

Eritrocitos de:	HU ₅₀	HU/mg
Humano	100 ng	6.7x10 ³
Oveja	300 ng	3.3x10 ³
Rata	10.5 mg	125

Tabla 2. Concentración de proteína que se empleó para obtener la unidad hemolítica (HU₅₀) dentro de la curva dosis-respuesta y unidades hemolíticas por miligramo de proteína (HU/mg) correspondiente a cada tipo de eritrocito. Una unidad hemolítica es la cantidad de toxina para lisar el 50% de células (eritrocitos).

2. Registro electrofisiológico en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Las figuras 14A y 14B representan la respuesta electrofisiológica del extracto crudo y la fracción I obtenida en la cromatografía de filtración por gel, respectivamente. Ambos registros muestran una corriente entrante lisa asociada a un aumento de conductancia de la membrana. Las fracciones II, III y IV obtenidas en la cromatografía de filtración por gel no tuvieron respuesta electrofisiológica (Figuras 14C, 14D, 14E).

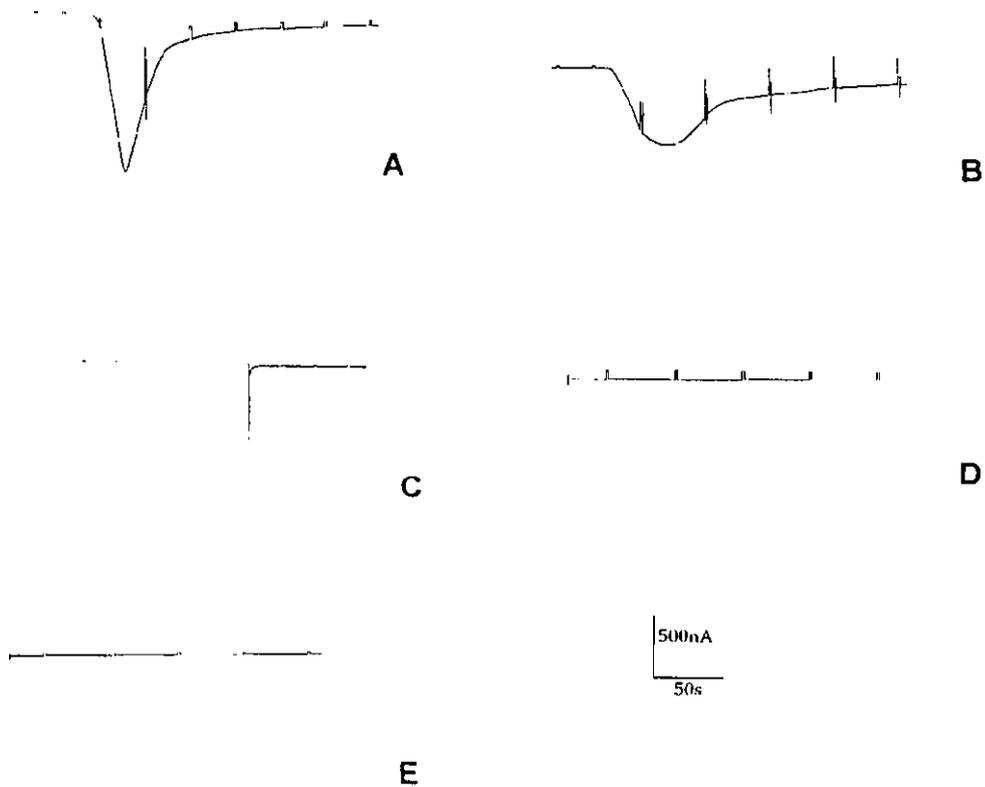


Figura 14. Registros electrofisiológicos en ovocitos de *Xenopus laevis* del extracto crudo (A) y fracciones obtenidas por cromatografía de filtración por gel: fracción I (B), fracción II (C), fracción III (D), fracción IV (E).

Purificación

La cantidad total de proteína empleada para cromatografía de filtración por gel fue 57.8 mg, obteniendo cuatro fracciones, siendo la primera fracción la de mayor interés para obtener una citolisina, considerando que las citolisinas tienen un peso molecular en un rango que va de 5, 000 a 80, 000 Da, y que esta fracción presentó el 100% de hemólisis usando una unidad hemolítica, en eritrocitos de oveja (Gráfica 4). La fracción I obtenida en la cromatografía de filtración por gel se sometió a una cromatografía de intercambio catiónico fuerte, donde se obtuvo la fracción de mayor actividad hemolítica, y que corresponde a lo no retenido en la columna (Gráfica 5). En este paso de la purificación el rendimiento de la proteína disminuyó drásticamente, y esto se puede deber a que la mayor parte de la proteína se quedó en la columna, y el amortiguador y/o pH no fueron los ideales para eluirlo.

La fracción I obtenida de la cromatografía de intercambio catiónico se fraccionó en una columna de intercambio aniónico fuerte. La gráfica 6 representa el cromatograma correspondiente a este paso de la purificación, donde se obtuvieron cinco fracciones, siendo la fracción III la que se empleó para el siguiente paso de purificación que fue la separación de sales (Gráfica 7). Aquí se obtuvieron dos fracciones, la primera presentó la mayor actividad hemolítica y se fraccionó por medio de la técnica de isoelectroenfoque preparativo en Rotofor; donde, por medio de un gradiente de pH resultaron 20 fracciones (Gráfica 8), además de iniciar la caracterización de las toxinas. De este paso, en las fracciones 3 y 12 se observó la mayor actividad hemolítica, pero sólo la fracción 12 se empleó para la caracterización final, debido a que contenía la mayor cantidad de proteína.

La secuencia de los pasos seguidos en la purificación se muestra en las tablas 3 y 4, donde muestra el rendimiento de proteína y actividad hemolítica desde la extracción. En estas tablas se puede observar que, conforme la proteína es cada vez más pura, se va incrementando su potencia para lisar eritrocitos, y esto lo podemos ver en los valores de HU/mg, se necesitan cada vez menos unidades hemolíticas para lisar dichas células.

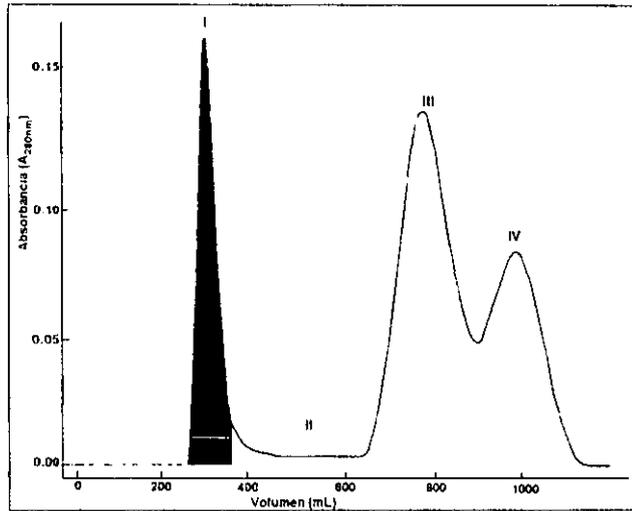
A pesar de que porcentaje total muestra una gran pérdida de proteína, en los valores de proteína total (peso) se puede observar que, con excepción del segundo paso de purificación, el resto de las técnicas empleadas en el presente estudio proporcionaron un buen rendimiento de proteína, es decir, se recuperó en todas cerca del 80% de la cantidad inicial de proteína que se usó al principio de cada paso de purificación.

Fracción	Proteína total recuperada	Proteína total recuperada (%)	Actividad hemolítica (HU/mg)	Actividad hemolítica (%)
Extracto crudo	57.8 mg	100	192.6x10 ³	100
Filtración en gel				
I	24.90 mg	43.07	83x10³	100
II	14.47 mg	25.03	48.23x10 ³	94
III	8.05 mg	13.9	26.83x10 ³	100
IV	0.58 mg	1.0	1.93x10 ³	100
TOTAL	48.0 mg	83		
Intercambio catiónico				
I	198.5 µg	0.34	661.6	100
II	10.12 µg	0.017	33.73	21.7
III	0		0	0
IV	0		0	0
TOTAL	208.62 µg	0.36		
Intercambio aniónico				
I	37.00 µg	0.064	123	10.7
II	20.98 µg	0.034	69.93	33.2
III	97.0 µg	0.16	323.3	100
IV	9.50 µg	0.015	31.6	10.3
V	0		0	0
TOTAL	164.48 µg	0.28		
Separación de sales				
I	51 µg	0.088	170	80
II	40 µg	0.069	133	15
TOTAL	91 µg	0.15		

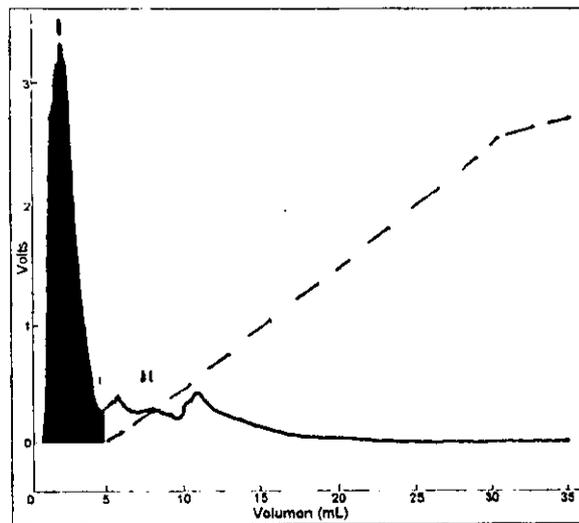
Tabla 3. En esta tabla se muestran los valores de cantidades y porcentajes de la proteína y actividad hemolítica de las fracciones obtenidas en cada paso de la purificación. Los datos en negritas corresponden a las fracciones con mayor actividad hemolítica.

Fracción	pH	Proteína total recuperada (μg)	Proteína total recuperada ($\% \times 10^{-3}$)
1	2.39	0	0
2	2.87	1.6	2.7
3	3.3	3.9	5.1
4	3.58	2.9	5.0
5	3.94	3.6	6.2
6	4.11	3.2	5.5
7	4.17	2.15	3.7
8	5.11	2.18	3.7
9	4.89	0.3	0.5
10	5.97	4.7	8.1
11	6.25	5.7	9.8
12	5.99	4.1	7.1
13	6.24	2.4	4.1
14	7.23	5.8	10
15	7.6	5.7	9.8
16	8.2	4.8	8.3
17	8.67	3.2	5.5
18	9.46	1.8	3.1
19	10.03	4.5	7.7
20	*	2.5	4.3
TOTAL		47.03	8.13

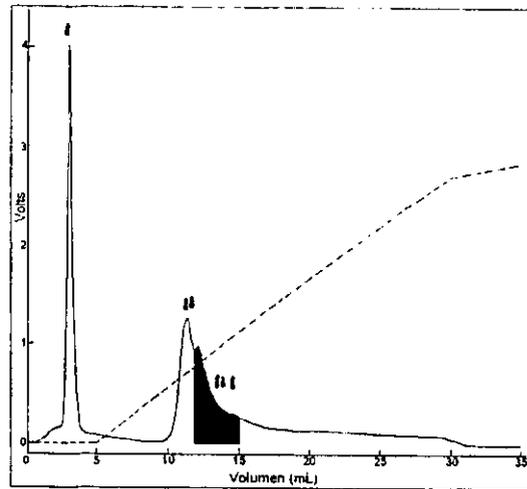
Tabla 4. Después de la separación de sales, la fracción I obtenida en este paso se fraccionó en Rotofor, los datos correspondientes a las fracciones obtenidas por esta técnica se muestran en esta tabla. El pH de la fracción 20 no se pudo determinar debido al pequeño volumen que contenía (*). La fracción 3 y 12 se emplearon para la caracterización. Fracción 3 con una actividad hemolítica de 40% (26 HU/mg); fracción 12 con una actividad hemolítica de 38% (27.3 HU/mg).



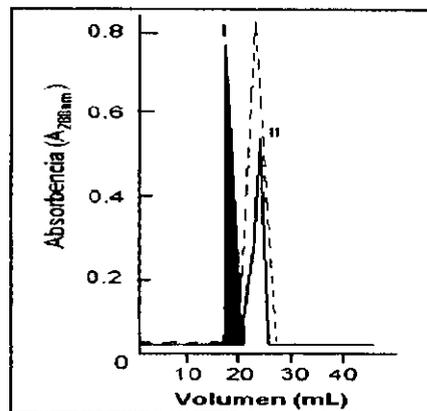
Gráfica 4. Cromatografía de filtración por gel. Los números romanos indican las fracciones obtenidas por esta técnica.



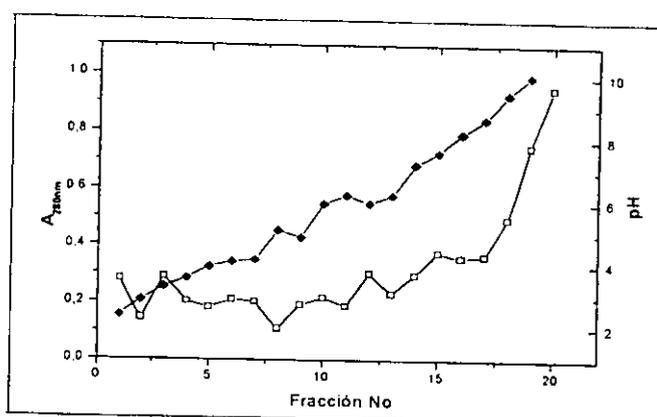
Gráfica 5. Cromatograma obtenido en la cromatografía de intercambio catiónico. El pico más grande y sombreado representa la fracción I con la mayor actividad hemolítica.



Gráfica 6. Cromatograma correspondiente a la cromatografía de intercambio aniónico. El área indica dónde se obtuvo la fracción (fracción III) con mayor actividad hemolítica.



Gráfica 7. Cromatograma correspondiente a la separación de sales. El área sombreada representa la fracción I con mayor actividad hemolítica. La línea punteada es la conductividad medida automáticamente en FPLC.

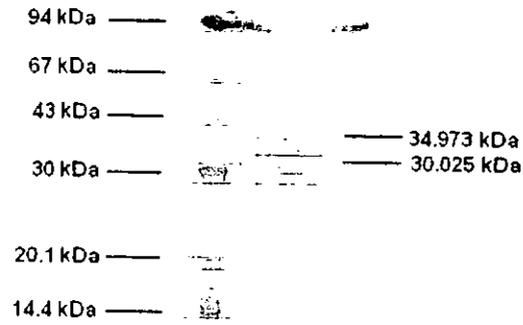


Gráfica 8. Representación de las fracciones obtenidas en el rotor.

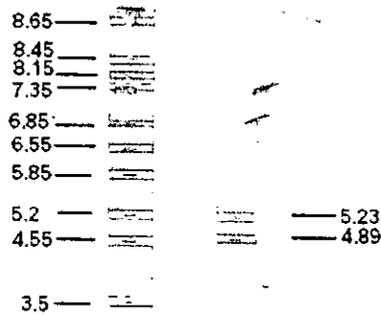
Los cuadros sin relleno representan los valores de absorbancia (A_{280nm}) de cada fracción, y los rombos negros son los valores de pH correspondientes a cada fracción.

Caracterización

Debido al bajo rendimiento en la fracción 3, sólo se determinó el peso molecular y punto isoeléctrico de la fracción 12 correspondiente a la fraccionación en rotor. El densitómetro detectó dos bandas tanto para el gel en SDS-PAGE para peso molecular, como el gel del isoelectroenfoque para punto isoeléctrico. Se nombró antilliensina I a la banda con peso molecular de 30.025 kDa y antilliensina II a la banda con peso molecular de 34.973 kDa. El punto isoeléctrico de la primera banda que detectó el densitómetro presentó un valor de 5.23 y para la segunda banda el punto isoeléctrico fue de 4.89 (Figuras 15 A y 15 B).



A



B

Figura 15. Geles que fueron analizados para la caracterización de las antillensinas. A: gel correspondiente al peso molecular. Del lado izquierdo se muestran los pesos moleculares de los patrones y del lado derecho están los pesos moleculares correspondientes a las antillensinas I y II. B: gel que muestra el punto isoeléctrico de las antillensinas (derecho). Del lado izquierdo se muestran los valores de pH correspondientes a los patrones usados.

Descripción de cnida en tentáculos por técnicas de microscopía electrónica

En las figuras 16 y 17 se aprecian los cnida y simbiositos (*Symbiodinium*) presentes en los tentáculos de *B. antillensis* (Day, 1994). Estos resultados corresponden a observaciones en microscopía de luz, con preparaciones hechas con un "squash" de un tentáculo de la anémona.

En las secciones longitudinal y transversal del tentáculo de *B. antillensis* se revelaron los cnida no descargados, el túbulo con espinas en arreglo helicoidal y una estructura en forma de red que está asociada con las espinas. Además, se observaron numerosos aparatos de Golgi estuvieron presentes a lo largo de todo el tentáculo (figuras 18, 19 y 20).

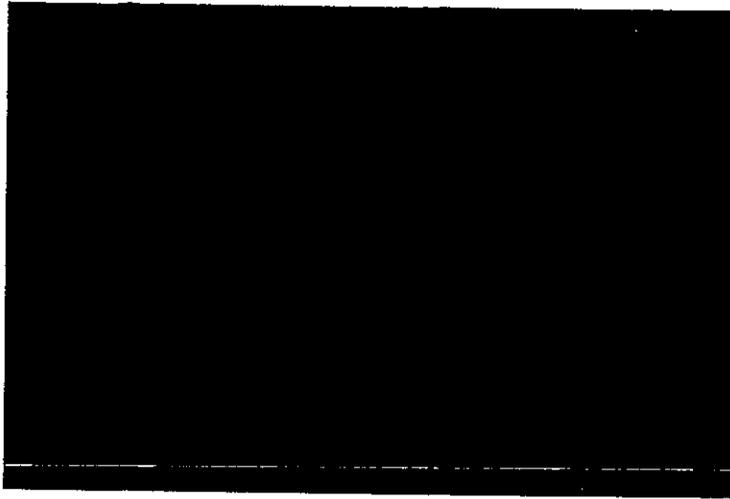


Figura 16. Espirocistos descargados y simbiontes (puntos verdes) de *B. antillensis* (500x).

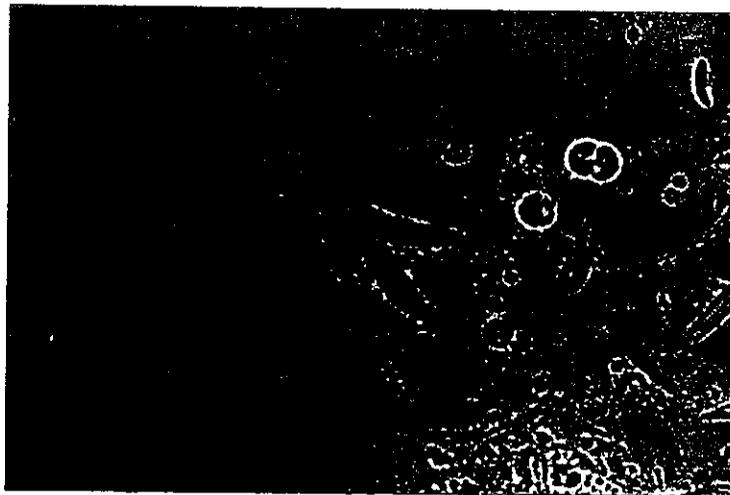


Figura 17. Nematoscitos de tipo p-mastigóforos microbásicos descargados, y simbiontes (*Symbiodinium*). (500x).

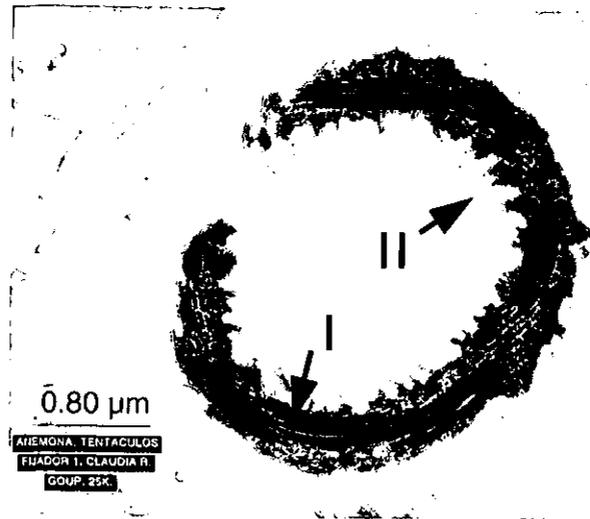


Figura 18. Corte longitudinal del tentáculo de la anémona. La estructura que se aprecia se trata de un nematocisto. En este corte se muestra el arreglo helicoidal que presentan las espinas (II) alrededor del túbulo, así como la estructura de red asociada con las espinas (I).

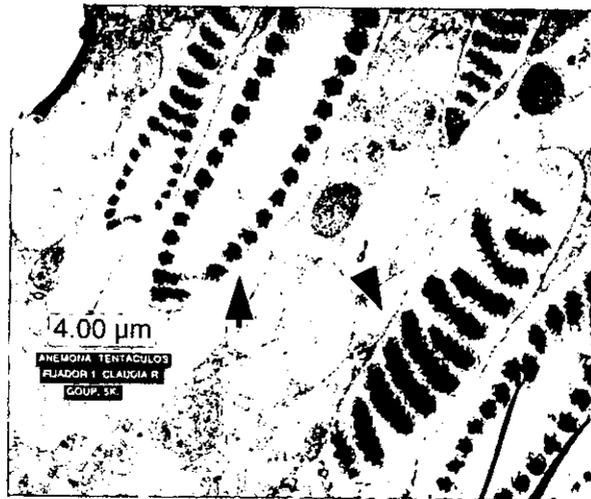


Figura 19. Corte transversal del tentáculo de *B. antillensis*. Las flechas señalan los numerosos cnida que se pueden localizar en los tentáculos. Los cnida no están descargados, por lo que se puede apreciar el túbulo plegado con sus espinas.

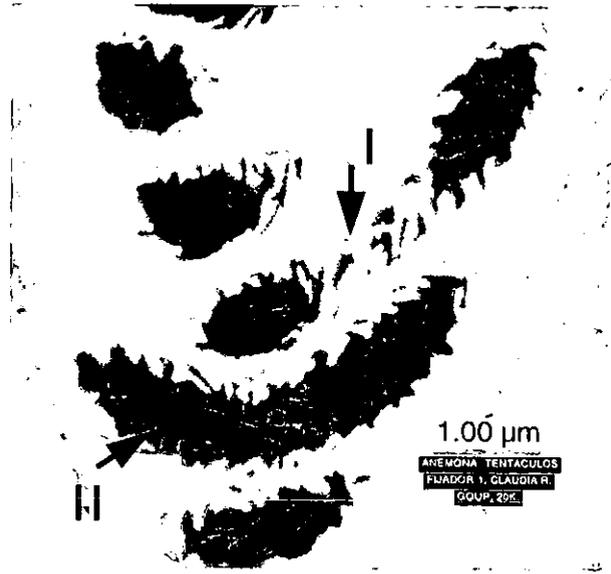


Figura 20. Acercamiento de uno de los cnida que se presentan en la figura 19. En esta imagen se pueden apreciar con claridad las espinas (I) y la estructura en forma de red (II).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las propiedades físico químicas y biológicas de péptidos citolíticos provienen de diversas entidades vivientes que han sido estudiadas. Las principales fuentes de estos agentes son bacterias, hongos, cnidarios, insectos, artrópodos y los venenos de serpientes.

En este trabajo se describió la purificación y caracterización de dos proteínas con actividad hemolítica. La clave para aislar una proteína manteniendo su bioactividad fue usando un procedimiento de extracción basado en un solo ciclo de congelado y descongelado. Esto da un material inicial mucho más limpio para pasos subsecuentes en la purificación que si se obtuviera por homogeneización de todos los animales (Bernheimer y Avigad, 1976; Macek y Lebez, 1988; Kem *et al.*, 1989; Norton *et al.*, 1990). Aunque la desventaja de trabajar con una mezcla de proteínas con enzimas u otros contaminantes es que dificulta el proceso de purificación, además de incrementar las posibilidades de modificación de la toxina.

Los dos polipéptidos obtenidos fueron extraídos de *Bunodeopsis antillensis* y se les dió el nombre de antillensina I y antillensina II, que se tratan de proteínas ácidas (pI 5.23 y 4.89) con pesos moleculares de: 30, 025 Da y 34, 973 Da, respectivamente. En términos de peso molecular, las antillensinas son de mayor peso que la mayoría de las citolisinas aisladas de anémonas que presentan un rango de peso molecular entre 5, 000 Da y 20, 000 Da. En cuanto al punto isoeléctrico se refiere, los primeros trabajos en citolisinas de anémonas establecieron que en estos organismos existe una clase de toxinas básicas muy potente de peso molecular en un rango que va de 5 , 000 Da a 20 , 000 Da, y que son específicamente inhibidas por esfingomielina. Estas toxinas han sido aisladas de las anémonas: *Actinia equina*, *Stoichactis helianthus*, *Condylactis gigantea*, *Epiactis prolifera*, *Tealia lofotensis* y *Anthopleura santogrammica* (Ferland y Lebez, 1974; Bernheimer y Avigad 1982), *Radianthus kosirensis* y *Gyrostoma helianthus* (Mebs *et al.*, 1983). Calton y colaboradores (1978) aislaron una fracción hemolítica de los nematocistos y filamentos mesentéricos de la anémona *Bolocera tuediae* (de la familia Actiniidae), y se obtuvo una banda por isoelectroenfoque con un pI de 4.2. En otro estudio del extracto crudo obtenido de todo el cuerpo de *Epiactis prolifera*, fueron separados por isoelectroenfoque preparativo a tres isotoxinas nombradas epiactina A, B y C con un pI a pH 6.4, 8.3 y 7.6 respectivamente (Bernheimer y Avigad, 1982). Esto refleja los escasos trabajos realizados en citolisinas acídicas y de donde posiblemente se pueden obtener nuevas proteínas o péptidos, o bien, aportar un conocimiento más para comprender el mecanismo citolítico de las toxinas aisladas de anémonas.

La actividad hemolítica de las antillensinas en eritrocitos de humano y oveja puede ser comparada con los valores de las actividades líticas producidas por las toxinas kenti, caritoxina I y II, y HMg I y II, observando que las toxinas antillensina I y II son más potentes (6.7×10^3 HU/mg) que la

caritoxina II (5.8×10^3 HU/mg), mientras que las otras citolisinas son más potentes que las antilliensinas, aunque el valor de la actividad lítica de las últimas es muy cercano a caritoxina I, (7.0×10^3 HU/mg), HMg I (1.55×10^4 HU/mg), HMg II (4.5×10^4 HU/mg) y kenti (4.3×10^5 HU/mg) (Tabla 1).

El estudio demostró que la anémona *B. antilliensis* posee dos toxinas polipeptídicas (antilliensina I y II) con una actividad hemolítica en eritrocitos de rata, humano y oveja. La sensibilidad de estos eritrocitos para ser lisados por las dos toxinas fue diferente, teniendo una disminución en la sensibilidad con el siguiente orden: humano, oveja y rata. Comparando este resultado con otras especies de anémonas, se ha observado que para *Condylactis gigantea* y *Stichodactyla helianthus*, los eritrocitos de oveja son más sensibles a sus toxinas que los eritrocitos de humano (Bernheimer y Avigad, 1982).

Se ha propuesto que la sensibilidad de los eritrocitos de diferentes mamíferos para la actividad lítica de citolisinas de anémonas, está relacionada con la composición de lípidos en la membrana. En la membrana plasmática y en algunas otras membranas de las células animales, el colesterol es uno de sus mayores constituyentes y funciona como un receptor para citolisinas activadas por el grupo tiol, como la metridiolisina. La metridiolisina (toxina ácida con un peso molecular de 80, 000 Da) es inhibida por colesterol y su mecanismo citolítico es similar a las citolisinas de bacterias activadas por un grupo tiol (Kem, 1988a), y quizás las antilliensinas ácidas obtenidas en el presente estudio puedan también ser inhibidas por el colesterol y activadas por un grupo tiol. Se ha mostrado que citolisinas activadas por el grupo tiol pueden formar un canal iónico en lípidos de membranas que consta de un complejo de tres o cuatro proteínas moleculares (Michaels, 1979; Varanda y Finkelstein, 1980; Norton *et al.*, 1990).

Otro lípido presente en las membranas plasmáticas y que está relacionado con el proceso citolítico es la esfingomielina. La acción citolítica de las toxinas de anémonas purificadas hasta ahora son inhibidas fuertemente por la esfingomielina, con excepción de la metridiolisina, esto sugiere que dicho esfingolípido es un aceptor o receptor en la membrana para la unión de toxinas. No hay una correlación directa entre las cantidades de esfingomielina presentes en diferentes eritrocitos de mamíferos y su sensibilidad contra la acción citolítica de las toxinas (Shiomi *et al.*, 1985; Doyle *et al.*, 1989). Cabe mencionar que, las células que carecen de esfingomielina o que tienen una pared celular no son sensibles a la citolisinas de anémonas (Bernheimer y Avigad, 1976).

El mecanismo de la hemólisis todavía no se conoce totalmente, incluyendo el de las toxinas de anémonas más estudiadas; por ejemplo, existe evidencia de que la hemólisis inducida por la equinatoxina II es debida a la formación de poros en la membrana (Belmonte y Menestrina, 1990). Macek y colaboradores (1994) reportaron que equinatoxina II causa hemólisis como un resultado de un choque osmótico por la apertura de poros selectivos por la toxinas.

A partir de lo antes mencionado, se propone que los distintos valores de las unidades hemolíticas empleadas para lisar uno u otro tipo de eritrocitos utilizados en este trabajo, se puede deber a la diferencia en la composición lipídica de las membranas, sabiendo que en la membrana de los eritrocitos de humano tanto el colesterol como la esfingomielina se presentan en menor proporción que en membranas de eritrocitos de oveja y rata, siendo este último organismo el que exhibe eritrocitos con gran cantidad de lípidos en su membrana (Tabla 5).

Eritrocitos de:	CL	SM	PC	PE	PI	PS
Humano	9	17	28	27.2	1.3	13
Oveja	10	-	36	40	2	12
Rata	17	20	47.5	21.5	3.5	10.8

Tabla 5. Comparación de los porcentajes de lípidos de membranas en eritrocitos de humano, oveja y rata. CL: colesterol, SM: esfingomielina, PC: fosfatidilcolina, PE: etanolamina, PI: inositol, PS: serina (Chapman y Wallach, 1976; Avers, 1991; Lowey *et al.*, 1991; Dealtri y Rickwood, 1992; Yeagle, 1993).

En cuanto a la actividad electrofisiológica de las toxinas, se observó la existencia de toxinas que actúan en algún canal iónico, que probablemente se trate del canal de sodio, ya que la mayoría de las proteínas de anémonas que han sido caracterizadas con un peso molecular de 5 , 000 Da y las citsolisinas que forman poros selectivos y que poseen un peso molecular en un rango de 15 , 000 a 20 , 000 Da, actúan en el canal de sodio (Norton, 1991). Con esto se concluye que *B. antilliensis* contiene tanto hemolisinas como neurotoxinas, y se sugiere la realización de un estudio electrofisiológico detallado, para poder conocer si las antilliensinas además de ser hemolíticas son o no neurotóxicas, o bien, para describir las neurotoxinas de *B. antilliensis*.

Las toxinas obtenidas de *B. antilliensis* están contenidas en los nematocistos, debido a que después de la descarga de estas estructuras se incrementó la actividad hemolítica. Aunque no existe un método completamente eficaz para aislar los nematocistos; se ha propuesto enfáticamente aplicar choques eléctricos para inducir su descarga, pero esto no resulta ser muy eficiente para *B. antilliensis*, y así obtener una cantidad de proteína suficiente para aislar la toxina de interés (Venkateshvaran, com. pers.), y aunado a esto, es muy importante considerar el tamaño del organismo. En el caso de *Bunodosoma caissarum* este método resultó ser muy favorable para aislar péptidos contenidos en los nematocistos (Malpezzi *et al.*, 1993).

En cuanto a la anatomía de los cnida de los tentáculos de *B. antilliensis* se refiere, se observó un arreglo helicoidal de las espinas que rodean el tubo del nematocisto, así como microfibrillas en la

matriz del orgánulo. El arreglo de espinas puede servir de manera ofensivamente como taladro dentro del tejido de la presa y para sujetar a ésta. Cabe mencionar que la variedad de las espinas morfológicas pueden estar relacionadas con la función y/o características del veneno de un tipo particular de nematocistos, sin embargo esto aún no está demostrado (Fautin y Mariscal, 1991; Shick, 1991).

Además de la presencia de espinas dentro del nematocisto, se observó una estructura en forma de red. Se ha sugerido que dicha estructura se puede extender hacia fuera para incrementar la superficie y propiedades adhesivas (Mariscal y McLean, 1976; Mariscal, 1974).

La presencia de toxinas muy potentes en anémonas es sorprendente ya que estos animales están adaptados a un modo de vida sedentario el cual requiere de sustancias altamente efectivas y que actúen rápido para inmovilizar, matar las presas y/o repeler un depredador potencial. Claramente los cnidarios aún representan una frontera toxicológica, y se puede anticipar que investigaciones futuras de otros miembros de este Phylum revelarían otras toxinas, como polipéptidos con estructuras y modos de acción de interés.

Estudios ecológicos en algunos animales tóxicos como peces, cnidarios, esponjas y otros, han demostrado que sus toxinas juegan un papel importante en la captura de su presa, y a partir de esto se ha sugerido que las toxinas producidas, principalmente por antozoarios y esponjas, actúan como protección no sólo contra depredadores, sino también durante la forma larval de animales sésiles, lo que ha favorecido la formación de colonias. Se ha propuesto que el origen de las toxinas dentro de los organismos tóxicos es el resultado de (Gleibs y Mebs, 1999; Mebs, 1998; Sierra-Beltrán et al., 1998):

1) La red trófica, si un organismo consume productores primarios tóxicos, el eslabón secundario adquiere las toxinas de su alimento y puede emplearlas como tal, y dentro de esta posibilidad se tiene el ejemplo del coral *Palythoa* (produce palitoxina) que consume un dinoflagelado tóxico (*Gambierdiscus toxicus*); a su vez, *Palythoa* es consumido por poliquetos, estrellas de mar y peces, en cada uno de estos organismos se va acumulando la toxina.

2) Algunas toxinas marinas tienen un significado fisiológico para el organismo que las contiene; por ejemplo, los peces tetrodóntidos con tetrodotoxina y peces que contienen dinogunelina dichas sustancias se encuentran en sus huevecillos donde probablemente ayuden al desarrollo embrionario.

3) Acumulación de sustancias tóxicas como resultado de cambios anormales en su metabolismo producido por alteraciones de su ambiente.

B. antilliensis contiene endosimbiontes, los cuales no se sabe si son tóxicos, es un factor determinante para la producción de toxinas, o sólo es un simbiote. El modo de alimentación de dicha anémona es por filtración, y es posible que existan dinoflagelados con toxinas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos que sean consumidos por la anémona, o bien, durante todo su periodo de evolución. las anémonas producen toxinas sólo para capturar su alimento y defensa.

PERSPECTIVAS

De acuerdo al conocimiento de la relación estructura-función de las citolisinas de anémonas, los mecanismos cinéticos de las hemolisinas y los estudios de canales en las membranas celulares, se presentan las siguientes perspectivas:

- Determinación de la estructura primaria de las antillinsinas. Se ha sugerido que la estructura primaria de las citolisinas de anémonas pueden ser marcadores quimiotaxonómicos (Norton *et al.*, 1991).
- Estudio sobre las fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas que pueden actuar en las uniones específicas de las antillinsinas con las esfingomielinas. Aparentemente la carga neta de toda la superficie molecular de una proteína influye en sus interacciones, aunque solamente una pequeña área en la superficie de la proteína hace contacto con la superficie (MacRitchie, 1978). Graham y Phillips (1978) analizaron en detalle las diferentes fuerzas atractivas y repulsivas que influyen en la inserción de la proteína dentro de la superficie molecular, y su modelo cualitativamente predice la cinética y presiones de superficie, observando cómo la carga neta de una citolisina puede ser reducida a pH altos. Doyle y colaboradores (1982) concluyeron que la citolisina de *Stichodactyla* inicialmente se une a lípidos de membrana a través de fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas; mientras tanto, uniones específicas a esfingomielina facilita la inserción del monómero de la toxina en la bicapa de lípidos. En este sentido, la esfingomielina podría estimular la agregación de algunos monómeros de toxina, para procesos aparentemente necesarios para la formación de un canal iónico.
- Estudio de la fuerza iónica en el mecanismo lítico de las antillinsinas. El incremento de la actividad de las citolisinas a altas concentraciones de sal, puede estar relacionado con cambios conformacionales de las citolisinas producidos por su medio natural, cuando estas son secretadas de la anémona al ambiente marino, y puede operar como un mecanismo regulador de su actividad contra la presa (Álvarez *et al.*, 1998).
- Analizar las interacciones de las antillinsinas con esfingomielinas y colesterol para conocer cómo se puede inhibir el mecanismo lítico de las antillinsinas.
- Estudio de la relación de las antillinsinas con la actividad de Ca^{2+} intracelular. Se ha encontrado que la acción citotóxica de algunas citolisinas de anémonas, como la equinatoxina II, está correlacionada con la actividad de Ca^{2+} intracelular, debido a la formación de canales permeables de Ca^{2+} . Estos resultados han sido consistentes con los efectos descritos en los trabajos

realizados en *Stoichachtis helianthus*. Debido al elevado gradiente electroquímico de Ca^{2+} a través del plasma de la membrana, y a la baja actividad de Ca^{2+} en el citosol (Shin et al., 1979; Bernheimer y Rudy, 1986; Kem, 1988a).

- Describir la especificidad de la toxina con diferentes tipos sanguíneos para conocer si se trata de una lectina. Las lectinas son proteínas específicas capaces de unirse a ciertas células o provocar su aglutinación. Lo más notable y significativo es el hecho de que algunas lectinas aglutinan preferentemente las células de los tumores; los residuos de carbohidratos específicos a los que se unen las lectinas se hallan más expuestos sobre las superficies de las células tumorales. La especificidad de las lectinas, así como su utilidad práctica, se muestra por su capacidad para distinguir entre las células rojas sanguíneas de los tipos A, B y O, que se diferencian en la estructura de los grupos oligosacáridos (Zenteno et al., 1995; Matsui et al., 2001).

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, C.; Lanio, M. E.; Tejuca, M.; Martínez, D.; Pazos, F.; Campos, A. M.; Encinas, M. V.; Pertinhez, T.; Schreier, S. y Lissi, E. A. (1998) The role of ionic strength on the enhancement of the hemolytic activity of sticholysin I, a cytolysin from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* **36** (1), 165-78.
- Anderluh, G.; Barlic, A.; Krizaj, I.; Menestrina, G.; Gubensek, F. y Macek, P. (1998) Avidin-FITC topological studies with three cysteine mutants of equinatoxin II, a sea anemone pore-forming protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242** (1), 187-190.
- Anderluh, G.; Pungercar, J.; Krizaj, I.; Strukelj, B.; Gubensek, F. y Macek, P. (1997) N-terminal truncation mutagenesis of equinatoxin II, a pore-forming protein from the sea anemone *Actinia equina*. *Protein Eng.* **10** (7), 751-755.
- Ariño, A.; Burlando, B.; Carli, A. M. y Mariottini, G. L. (1994) Mitochondrial alteration caused by cnidarian toxins: a preliminary study. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **70** (12), 307-313.
- Avers, Ch. J. (1991). *Biología Celular. Iberoamérica, México.* 748 pp.
- Ávila, A. D., Mateo de Acosta, C. y Lage, A. (1988) A new immunotoxin built by linking a hemolytic toxin to a monoclonal antibody specific for immature T lymphocytes. *Int. J. Cancer.* **42**, 568.
- Batista, U. y Sentjerc, M. (1995) EPR study of the sea anemone cytolysin, equinatoxin II, cytotoxicity on V-79 cells. *Cell. Biol. Int.* **19** (3), 215-222.
- Barnes, R. y Ruppert, E. E. (1996) *Zoología de los invertebrados.* McGraw-Hill, México. 114 pp.
- Belmonte, G. y Menestrina, G. (1990). Interaction of sea anemone cytolysins with model lipid membranes. *Toxicon.* **28**, 143.
- Béress, L., Béress, R. y Wunderer, G. (1975) Purification of three polypeptides with neuro- and cardio-toxic activity from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Toxicon* **13**, 359.
- Béress, L. (1982) Biologically active compounds from coelenterates. *Pure & Appl. Chem.* **54** (10), 1981-1994.
- Béress, L., Wachter, E., Béress, R., Zurick, J., Leimenstoll, A., Fritz, H. y Wasserman, O. (1993) Isolation and characterization of biologically active polypeptides from the sea anemone *Anemonia sulcata*: 25 years work on marine toxins. *Toxicon* **31**, 498.

- Bernheimer, A. W. y Avigad, L. S. (1976)** Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 467.
- Bernheimer, A. W. y Avigad, L. S. (1978)** A cholesterol-inhibitable cytolytic protein from the sea anemone *Metridium senile*. *Biochim. Biophys. Acta.* **541**, 96.
- Bernheimer, A. W. y Avigad, L. S. (1981)** New cytolsins in sea anemones from the west coast of the United States. *Toxicon.* **19** (4), 529-534.
- Bernheimer, A., W., Avigad, L. S. y Lai, C. Y. (1982)** Purification and properties of a toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Arch. Biochem. and Biophys.* **214** (2), 840 - 845.
- Bernheimer, A. W. y Avigad, L. S. (1982)** Toxins of the sea anemone *Epiactis prolifera*. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 174-180.
- Bernheimer, A. W., Avigad, L. S., Branch, G., Dowdle, E. y Lai, C. Y. (1984)** Purification and properties of a toxin from the South African sea anemone *Pseudactinia varia*. *Toxicon* **22**, 183-191.
- Bernheimer, A. W. y Rudy, B.. (1986)** Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochem. et Bioph. Act.* **864**, 123-141.
- Bernheimer, A. W. (1990)** Cytolytic peptides of sea anemones. En: Marine Toxins. Origin, structure and molecular pharmacology, Acs. Symposium Series **418**, 304-311.
- Bigger, Ch. H. (1988)** *The role of nematocysts in anthozoan aggression*. En: The biology of nematocysts. (Eds.: Hessinger, D. A. y Lenhoff, H. M.). Ac. Press. Inc. San Diego. pp 295-308.
- BIO-RAD (1990)** Rotofor Cell, Instruction Manual. pp 1-12.
- BIO-RAD (2, 000)** Multi-Analyst/PC. PC Software for Bio-Rad's Image Analysis Systems. Version 1.1, Instruction Manual. pp 1-2.
- Bollag, D. M.; Rozycki, M. D. y Edelstein, S. J. (1996)** *Protein methods*. Wiley-Liss, New York. 396 pp
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein_dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brusca, C. B. y Brusca, G. J. (1990)** Invertebrates. Sinauer Associates, Sunderland MA.
- Calton, G. J., Burnett, J. W. y Vader, W. A. (1978)** Study of the nematocyst venoms of the sea anemone, *Bolocera tuediae*. *Toxicon*, **16**: 443.

- Cariello, L. y D'Aniello, A. (1975)** Isolation and characterization of four toxic protein fractions from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Toxicon* **13**, 353.
- Carlberg, M. (1983)** Evidence of dopa in the nerves of sea anemones. *J. Neural Transm.* **57** (1-2), 75-84.
- Carli, A.; Bussotti, S.; Mariottini, G. L. y Robbiano, L. (1996)** Toxicity of jellyfish and sea-anemone venoms on cultured V79 cells. *Toxicon* **34** (4), 496-500.
- Chapman, D. y Wallach, D. F. H. (1976)** *Biological membrane*. Ac. Press, London. pp 115
- Cline, E. I. y Wolowyk, M. W. (1994)** Potent hemolytic action of sea anemones prevalent along the west coast of Canada. *J. Toxicol.: Toxin Rev.* **14** (2), 135.
- Colinas-Sánchez, F. y Briones-Fourzán, P. (1990)** Alimentación de las langostas *Panulirus guttatus* y *P. argus* (Latreille, 1804) en el Caribe Mexicano. *An. Inst. Cienc. Mar y Lim.* **17** (1), 89-106.
- Conn, P. M. (1993)** *Neuropeptide analogs, conjugates, and fragments*, Vol. 13. Ac. Press. Inc. New York. 396 pp.
- Contreras-Espinosa, F. (1993)** *Ecosistemas costeros mexicanos*. Com. Nal. Conoc. Uso Biod., UAM, México. 415 pp.
- Cooper, R. A.; de Freitas, J. C.; Porreca, F.; Eisenhour, C. M.; Lukas, R. y Huxtable, R. J. (1995)** The sea anemone purine, caissarone: adenosine receptor antagonism. *Toxicon* **33** (8), 1025-1031.
- Dealtri, G. B. & Rickwood, D. (1992)** *Cell Biology*. Bios. Scientific Publishers. Pp 83
- Delfin, J.; Martinez, I.; Antuch, W.; Morera, V.; Gonzalez, Y.; Rodriguez, R.; Marquez, M.; Saroyan, A.; Larionova, N.; Diaz, J.; Padron, G. y Chavez, M. (1996)** Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* **34**, 11-12.
- Dellacorte, C. (1994)** Isolation of nucleic acids from the sea anemone *Condylactis gigantea* (Cnidaria: Anthozoa). *Tissue Cell (Scotland)* **26** (4), 613-619.
- Deutscher, M. P. (1990)** Guide to protein purification. *Methods in enzymology*, **182**. Ac. Press., San Diego. 894 pp.
- Devlin, J. P. (1974)** Isolation and partial purification of hemolytic toxin from sea anemone, *Stoichactis helianthus*. *J. Pharm. Sci.* **63**, 1478.

- Doyle, J. K., Dem, W. R. y Villalonga, F. A. (1989)** Interfacial Activity of an ion channel-generating protein cytolyisin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, 27:465
- Dykstra, M. J. (1992)** *Biological electron microscopy. Theory, techniques and troubleshooting*. Plenum Press, New York. 360 pp.
- Elliot, R., R. Konya y K. Vickneshwara (1986)** The isolation of a toxina form the dahlia sea anemone, *Tealia felina* L. *Toxicon* **24** (2), 117 - 122.
- Fautin, D. G. (1988)** *Importance of nematocysts to actinian taxonomy*. In *The biology of nematocysts*. (Hessinger, D. A. y Lenhoff, H. M.). Ac. Press. Inc. San Diego. pp 487-500.
- Fautin, D. G. y Mariscal, R. N. (1991)** *Cnidaria: Anthozoa*. En: *Microscopic anatomy of investebates*. Vol. 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria and Ctenophora. (Eds.: Harris, F. W. y Wetfall, J. A.) Wiley-Liss, Inc. pp 267-358.
- Fautin, D. G. (2, 000)**. <http://www.cba.uh.edu/~dfautin/>
- Fenner, P. Mulcahy, M. y Williamson, J. (1996)** *Historical background to marine envenomation*. En *Venomous and poisonous marine animals: a medical and biological handbook*. (Eds.: Eilliamson, J. A., Fenner, P. J., Burnett, J. W. y Rifkin, J. F.) Univ. New South Wales. Press. Sydney. pp 40-57
- Ferlan, I. And Lebez, D. (1974)** Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina*-I. Purification and characterization. *Toxicon* **12**, 57.
- Frelin, C., Vigne, P., Schweitz, H. y Lazdunski, M. (1984)** The interaction of sea anemone and scorpion neurotoxins with tetrodotoxins-resistant Na⁺ channels in rat myoblasts. A comparison with Na⁺ channels in other excitable and non-excitable cells. *Mol. Pharmacol.* **26**, 70-74.
- Galletis, P. y Norton, R. S. (1990)** Biochemical and pharmacological studies of the mechanism of action of tenebrosin-C, a cardiac stimulatory and haemolytic protein from the sea anemone, *Actinia tenebrosa*. *Toxicon* **28** (6), 695-706.
- Gallagher, M. J.y Blumenthal, K. M. (1994)** Importance of the unique cationic residues arginine 12 and lysine 49 in the activity of the cardiotoxic polypeptide anthopleurin B. *J. Biol. Chem.* **269** (1), 254-259.

- Garateix, A.**; Flores, A.; Garcia-Andrade, J. M.; Palmero, A.; Aneiros, A.; Vega, R. y Soto, E. (1996) Antagonism of glutamate receptors by a chromatographic fraction from the exudate of the sea anemone *Phyllactis flosculifera*. *Toxicon* **34** (4), 443-450.
- Giese, C.**; Mebs, D. y Werding, B. (1996) Resistance and vulnerability of crustaceans to cytolytic sea anemone toxins. *Toxicon* **34** (8), 955-959.
- Giraldi, T.**, Ferlan, I. y Romeo, D. (1976) Antitumor activity of equinatoxin. *Chem. Biol. Interactions*. **13**, 199.
- Gleibs, S.**, Mebs, D. (1999) Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon* **37**, 1521-1527.
- Gosner, K. L.** (1971) *Guide to identification of marine and estuarine invertebrates*, pp. 141-151. Wiley-Interscience, New York.
- Halstead, B. W.** (1978) *Poisonous and venomous marine animals of the world*. The Darwin Press, New York. 1275 pp.
- Hall, S.** y Strichartz, G. (1990) *Marine toxins*. Am. Chem. Soc., Washington. 377 pp.
- Harris, E. L. V.** y Angal, S. (1989) *Protein purification methods. A practical approach*. IRL Press, Oxford. 317 pp.
- Hawcroft, D. M.** (1997) *Electrophoresis. The basics*. IRL, Press, Oxford. 141 pp.
- Heffernan, L. M.**; Ertl, R.P.; Stegeman, J. J.; Buhler, D. R. y Winston, G. W. (1996) Immuno-detection of proteins by cytochrome P450 antibodies in five species of sea anemones. *Mar. Environ. Res.* **42** (1-4), 353-357.
- Hellberg, S.** y Kem, W. (1990) Quantitative structure-activity relationships for sea anemone polypeptide toxins. *Int. J. Peptide Protein Res.* **36**, 440-444.
- Hessinger, D. A.** y Lenhoff, H. W. (1973) Assay and properties of the hemolysins activity of pure venom from the nematocysts of the acontia of the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Archs. Biochem. Biophys.* **159**, 629.
- Hessinger, D. A.** y Lenhoff, H. W. (1974) Degradation of red cell membrane phospholipids by sea anemone nematocyst venom. *Toxicon* **12**, 379.

- Hessinger, D. A. y Lenhoff, H. W.** (1976) Membrane structure and function. Mechanism of hemolysis induced by nematocyst venom: Roles of phospholipase and direct lytic factor. *Archs. Biochem. Biophys.* **173**, 603.
- Hessinger, D. A.** (1988a) *Nematocyst venoms and toxins*. En: The biology of nematocysts. (Eds.: Hessinger, D. A. y Lenhoff, H. M.). Ac. Press. Inc. San Diego. pp 333-368.
- Hessinger, D. A. Y Lenhoff, H. M.** (1988b) *The biology of nematocysts*. Academic Press, San Diego. 592 pp.
- Humman, P.** (1991) *Reef creature identification. Florida, Caribbean, Bahamas*. Paramount, Florida. 328 pp.
- Ishida, M.; Yokoyama, A.; Shimakura, K.; Nagashima, Y. y Shiomi, K.** (1997) Halcurin, a polypeptide toxin from the sea anemone *Halcurias* sp., with a structural resemblance to type 1 and 2 toxins. *Toxicon (England)* **35** (4), 537-544.
- Jordán, E.** (1979) Estructura y composición de arrecifes coralinos, en la región noreste de la Península de Yucatán, México. *An. Centro Cienc. Del Mar y Limnol.* **6** (1), 69-86.
- Jordán, E.; Merino, M.; Moreno, O. Y Martín, E.** (1981) Community structure of coral reefs in the mexican caribbean. Proceedings of the Fourth International Coral Reef Symposium, Manila **2**, 303-308.
- Kandel, E. R.; Schwartz, J. H. y Jessell, T. M.** (1997) *Principles of neural science*. McGraw-Hill, New York.
- Kaul, R. y Mattiasson** (1992) Secondary purification. *Bioseparation.* **3**(1), 1-26.
- Kem, W.** (1988a) *Peptide chain toxins of marine animals*. En: Biomedical importance of marine organisms. (Ed.: D. Fautin). Cal. Ac. Sc., San Francisco. pp 69-83.
- Kem, W.** (1988b) Sea anemone toxins: structure and action. En: The biology of nematocysts (Eds.: Hessinger, D. A. y Lenhoff, H. M.) Ac. Press, San Diego. pp 375-406.
- Kem, W.R. y Dunn, B.M.** (1988) Separation and characterization of four different amino acid sequence variants of a sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolyisin. *Toxicon* **26** (11), 997-1008.

- Kem, W. R.; Parten, B.; Pennington, M.; Price, D. A. y Dunn, B. M. (1989)** Isolation, characterization and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* **288**, 3483-3489.
- Kem, W.; Pennington, M. y Dunn, B. (1990)** *Sea anemone polypeptide toxins affecting sodium channels*. En: *Marine Toxins. Origin, structure, and molecular pharmacology*. (Eds.: S. Hall and G. Strichartz). 377 pp.
- Khoo, H. E.; Lim, J. P. C. y Tan, C. H. (1995)** Effects of sea anemone (*Heteractis magnifica* and *Actinia equina*) cytolytins on synaptosomal uptake of GABA and choline. *Toxicon* **33**(10), 1365-1371.
- Khoo, H. E.; Fong, C. L.; Yuen, R. y Chen, D. (1997)** Stimulation of haemolytic activity of sea anemone cytolytins by 8-anilino-1-naphthalenesulphonate. *Biochem. Biophys. Res. Com. (U. S. A.)* **232** (2), 422-426.
- Khoo, K. S.; Kam, W. K.; Khoo, H. E.; Gopalakrishnakone, P. y Chung, M. C. M. (1993)** Purification and partial characterization of two cytolytins from a tropical sea anemone, *Heteractis magnifica*. *Toxicon* **31** (12), 1567-1579.
- Konya, R. S. y Elliott, R. C. (1996)** The coronary vasoconstrictor action of extract IV from the dahlia sea anemone *Tealia felina* L. *Toxicon* **34** (2). 277-282.
- Lafranconi, W. M.; Ferlan, I.; Russell, F. E. Y Huxtable, R. J. (1984)** The action of equinatoxin, a peptide from the venom of the sea anemone, *Actinia equina*, on the isolated lung. *Toxicon* **22**(3), 347-352.
- Latorre, R., Barneo, J. L.; Bezanilla, F. y Llinás, R. (1996)** *Biofísica y Fisiología Celular*. Univ. De Sevilla, España. 708 pp.
- Lehninger, A. L. 1985.** *Bioquímica*. Omega, Barcelona.
- Lin, X. Y.; Ishida, M.; Nagashima, Y. y Shiomi, K. (1996)** A polypeptide toxin in the sea anemone *Actinia equina* homologous with other sea anemone sodium channel toxins: isolation and amino acid sequence. *Toxicon* **34** (1), 57-65.
- Lindsay, S. (1992)** *High performance liquid chromatography*. J. W. & S. , New York. 337 pp.
- Lowey, A. G., Siekevite, P., Menninger, J. R. y Gallant, H. A. N. (1991)** *Cell structure & function an integrated approach*. Saunders College Pub., Philadelphia. 948 pp.

- Loret, E. P.; del Valle, R. M.; Mansuelle, P.; Sampieri, F. y Roachat, H. (1994)** Positively charged amino acid residues located similarly in sea anemone and scorpion toxins. *J. Biol. Chem.* **269** (24), 16785-16788.
- Macek, P., Sencic, L. y Lebez, D. (1982)** Isolation and partial caharacterisation of three lethal and haemolytic toxins from the sea anemone *Actinia cari*. *Toxicon* **20**, 181-185.
- Macek, P. y Lebez, D. (1982)** Kinetics of hemolysis induced by equinatoxin, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia equina*. Effect of some ions and pH. *Toxicon* **20**, 181-
- Macek, P. y Lebez, D. (1988)** Isolation and characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia equina* L. *Toxicon* **26** (5), 441-451.
- Macek, P.; Belmonte, G.; Pederzolli, C. y Menestrina, G. (1994)** Mechanism of action of equinatoxin II, a cytolsin from the sea anemone *Actinia equina* L. belonging to the family of actinoporins. *Toxicology*. **87**, 205 - 227.
- Mahnir, V. M.; Shumilov, U. N.; Kovalevskaya, A. M.; Romanenko, L. A. y Grebelny, S.D. (1993)** Evidence for several types of biologically active substances in north Pacific sea anemones. *Comp. Biochem. Physiol. C*. **106**, 661-665.
- Malpezzi, E. L. A., De Freitas, J. C.; Muramoto, K. y Kamiya, H. (1993)** Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* **31** (7), 853-864.
- Malpezzi, E. L. A. (1996)** Pharmacologically active substances of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*, Correa, 1964 (Cnidaria, Anthozoa, Actiniidae). *J. Venom. Anim. Toxins*. **2** (1), 60.
- Malpezzi, E. L. A. (1997)** Study of the nematocyst toxins from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*, Correa 1964 (Cnidaria, Anthozoa, Actiniidae). *J. Venom. Anim. Toxins*. **3** (2), 342-343.
- Mariscal, R. N. (1974)** Nematocysts. En: L. Muscatine y H. M. Lenhoff (eds.). *Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives*. Ac. Press, New York. pp 695-702.
- Mariscal, R. N. Y McLean, R. B. (1976)** The form and function of cnidarian spirocysts. 2. Ultrastructure of the capsule tip and wall and mechanism of discharge. *Cell Tissue Res*. 169: 313-321.
- Mariscal, R. N., McLean, R. B. y Hand, C. (1977)** The form and function of cnidarian spirocysts. 3. Ultrastructure of the thread and the function of spirocysts. *Cel. Tissue Res*. 178: 427-433.

- Matsui, T., Hamako, J., Ozeki, Y. y Titani, K. (2001)** Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosacarides. *Biochemica et Biophysica Acta* **1525**, 50-57.
- Mebs, D. y Gebaluer, E. (1980)** Isolation of proteinase inhibitory, toxic and hemolytic polypeptides from a sea anemone, *Stoichactis* sp. *Toxicon* **18**, 97. **Mebs, D. y Gebaluer, E. (1980)** Isolation of proteinase inhibitory, toxic and hemolytic polypeptides from a sea anemone, *Stoichactis* sp. *Toxicon* **18**, 97.
- Mebs, D.; Liebrich, M.; Reul, A. y Samejima, Y. (1983)** Hemolysins and proteinase inhibitors from sea anemones of the Gulf of Aqaba. *Toxicon* **23** (2), 257-264.
- Mebs, D. (1994)** Anemonefish symbiosis: Vulnerability and resistance of fish to the toxin of the sea anemones. *Toxicon* **32** (9), 1059-1068.
- Mebs, D. (1998)** Occurrence and sequestration of toxins in food chains. *Toxicon*, **36** (11), 1519-1522.
- Meinardi, E.; Florin-Christensen, M.; Paratcha, G.; Azcurra, J. M. y Florin-Christensen, J. (1995)** The molecular basis of the self/nonself selectivity of a coelenterate toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216** (1), 348-354.
- Meinardi, E; Azcurra, JM; Florin-Christensen, M y Florin-Christensen, J. (1994)** Coelenterolysin: A hemolytic polypeptide associated with the coelenteric fluid of sea anemones. *Comp. Biochem. Physiol., B.* **109B** (1),153-161.
- Merino-Ibarra, M. y Otero-Dávalos, L. (1991)** *Atlas ambiental costero, Puerto Morelos, Quintana Roo.* ICMyL, UNAM y Cen. Inves. Quintana Roo, México. 80 pp.
- Michaels, D. W. (1979)** Membrane damage by a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*. I. Formation of transmembrane channels in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **555**, 67-68.
- Minagawa, S.; Ishida, M.; Nagashima, Y. y Shiomi, K. (1998)** Primary structure of a potassium channel toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *FEBS Lett (Netherlands)* **427** (1), 149-151.
- Monastyrnaya, M. M.; Kozlovskaya, E. P.; Ivanov, S.; Molnar, A. A.; Khalilov, E. M. y Yelvakov, G.B. (1988)** Effect of metridiolysin from the sea anemone *Metridium senile* on biological membranes and membrane models. *Biol. Membr.* **5** (8), 830-835.

- Monastyrnaya, M. M.; Kozlovskaya, E. P. y Elyakov, G. B. (1990)** Hemolysins from sea anemone: Investigation of mechanism of action. *J. Toxicol.: Toxin Rev.* **9** (1), 82.
- Monks, S. A.; Pallaghy, P. K.; Scanlon, M. J. y Norton, R. S. (1995)** Solution structure of the cardiostimulant polypeptide anthopleurin-B and comparison with anthopleurin-A. *Structure (England)* **3** (10), 1126.
- Monks, S. A.; Norton, R. S.; Curtain, C. C. y Berliner, L. J. (1996)** Preparation and characterization of a biologically active spin-labeled sea anemone toxin. *J. Protein. Chem.* **15** (5), 427-434.
- Narat, M.; Macek, P.; Kotnik, V. y Sedmak, B. (1994)** The humoral and cellular immune response to a lipid attenuated pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina* L. *Toxicon* **32** (1), 65-71.
- Nicholls, H. G.; Martin, A. R. y Wallace, B. G. (1992)** *From neuron to brain. A cellular and molecular approach to the function of the nervous system.* Sinauer Associates, Massachusetts. 695 pp.
- Norton, T. R. y Kashawagi, M. (1972)** Purification of a potent antitumor agent from a Tahitian sea anemone and methods of administration studies with Ehrlich ascites tumor in mice. *J. Pharmac. Sci.* **61**, 1814.
- Norton, T. R. (1981)** Cardiostimulant polypeptides from *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt). And *A. elegantissima*. (Brandt) *Fed. Proc.* **40**, 21- 25.
- Norton, R. S.; Bobek, G.; Ivanov, J. O.; Thomson, M.; Fiala-Beer, E. ; Moritz, R. L. y Simpson, R. J. (1990)** Purification and characterisation of proteins with cardiac stimulatory and haemolytic activity from the anemone *Actinia tenebrosa*. *Toxicon* **28** (1), 29 - 41
- Norton, R. S. (1991)** Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* **29** (9), 1051-1084.
- Pazos, I. F.; Alvarez, C.; Lanio, M. E.; Martinez, D.; Morera, V.; Lissi, E. A. y Campos, A. M. (1998)** Modification of sticholysin II hemolytic activity by free radicals. *Toxicon* **36** (10), 1383-1393.
- Pederzoli, C.; Belmonte, G.; Serra, M.; Macek, P. y Menestrina, G. (1995)** Biochemical and cytotoxic properties of conjugates of transferrin with equinatoxin II, a cytolytic toxin from a sea anemone. *Bioconjug. Chem.* **6** (2), 166-173.
- Pharmacia Fine Chemicals (1970a)** *Shepadex ion exchanger. A guide to ion exchange chromatography.* Appelbergs Boktryckeri, Sweden. 47 pp.

- Pharmacia** Fine Chemicals (1970b) *Sephadex gel filtration in theory and practice*. Appelbergs Boktryckeri, Sweeden. 63 pp.
- Rappouli, R. y Montecucco, C.** (1997) *Guidebook to protein toxins and their use in cell biology*. Oxford Univ. Press, 256 pp.
- Rifkin, J.** (1996) *Cnida structure and function*. In *Venomous and poisonous marine animals: a medical and biological handbook*. (Eilliamson, J. A., Fenner, P. J., Burnett, J. W. y Rifkin, J. F.) Univ. New South Wales. Press. Sydney. pp 155-173.
- Rossjohn, J., Feil, S. C., McKinsty, W. J., Twenten, R. K. y Parker, M. W.** (1997) Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cystolysin and a model of its membrane form. *Cell* **89**, 685- 692.
- Rottini, G., Gusmani, L, Parovel, E., Avian, M. y Patriarca, P.** (1995) Purification and properties of a cytolytic toxin in vemon of the jellyfish *Caribdea marsupialis*. *Toxicon* **33** (3): 315 – 326.
- Rowe, G. E. y Welch, R. A.** (1994) Assay of hemolytic toxins. En: *Enzyme and toxin assays*. Acad. Press. pp 657-678.
- Salgado, V. L. y Kem, W. R.** (1992) Actions of three structurally distinct sea anemone toxins on crustacean and insect sodium channels. *Toxicon* **30** (11), 1365-1381.
- Salinas, E. M.; Cebada, J.; Valdes, A.; Garateix, A.; Aneiros, A. y Alvarez, J. L.** (1997) Effects of a toxin from the mucus of the Caribbean sea anemone (*Bunodosoma granulifera*) on the ionic currents of single ventricular mammalian cardiomyocytes. *Toxicon* **35** (12), 1699-1709.
- Schweitz, H.; Vincent, J. P.; Barhanin, J.; Frelin, Ch.; Linden, G.; Hugues, M. y Lazdunski, M.** (1981) Purification and pharmacological properties of eight sea anemone toxins from *Anemonia sulcata*, *Anthopleura xanthogrammica*, *Stoichactis giganteus*, and *Actinodendron plumosum*. *J. Biochemistry*. **20**, 5245-5252.
- Sencic, L. y Macek, P.** (1990) New method for isolation of venom from the sea anemone *Actinia cari*. Purification and characterization of cytolytic toxins. *Comp. Biochem. Physiol.* **97B**, 687-693.
- SEP** (1982) *Quintana Roo. Monografía Estatal*. México. 284 pp.
- Shick, M.** (1991) *A funtional Biology of sea anemones*. Chapman & Hall, New York. 395 pp.
- Shiomi, K., Tanaka, E., Yamanaka, H. y Kikuchi, T.** (1985) Isolation and characterization of a lethal hemolysin in the sea anemona *Parasicyonis actinostoloides*. *Toxicon*, **23**: 865.

- Shiomi, K.**; Qian, W. H.; Lin, X. Y.; Shimakura, K.; Nagashima, Y. e Ishida, M. (1997) Novel polypeptide toxins with crab lethality from the sea anemone *Anemonia erythraea*. *Biochim. Biophys. Acta* **1335** (1-2), 191-198.
- Schwartz, S.** y Meinking, T. (1997) Venomous marine animals of Florida: morphology, behavior, health hazards. *J. Florida M. A.* **84** (7), 433-440.
- Sedmak, B.**, Skrk, J. y Lebez, D. Cytolysin inhibits growth of melanoma and sarcoma cells *in vivo*. *Period. Bio.* **88**, 198.
- Sierra-Beltrán, A. P.**, Cruz, A. , Núñez, E., Del Villar, L. M., Cerecero, J. y Ochoa, J. L. (1998) An overview of the marine food poisoning in México. *Toxicon*, **36** (11), 1493-1502.
- Sket, D.**, Draslar, K., Ferlan, I. Y Lebez, D. (1974) Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina* II. Pathophysiological action. *Toxicon* **12**, 63-68.
- Smith, B. L.** y Watt, W. B. (1994) Adenylate levels and environmental stress in the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3** (5), 261-269.
- Spagnuolo, A.**; Zanetti, L.; Cariello, L. y Piccoli, R. (1994) Isolation and characterization of two genes encoding calitoxins, neurotoxic peptides from *Calliactis parasitica* (Cnidaria). *Gene (Netherlands)* **138** (1-2), 187-191.
- Suput, D.** (1994) Equinatoxin II and exocytosis. *Toxins and Exocytosis* **710**, 30-37.
- Tejuca, M.**; Serra, M. D.; Ferreras, M.; Lanio, M. E. y Menestrina, G. (1996) Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolysin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry (Wash.)* **35** (47), 14947-14957.
- Tu, A. T.** (1988) *Marine Toxins and venoms. Handbook of natural toxins*. Vol. 3. Marcel Dekker, New York. 587 pp.
- Turk, T.** (1991) Cytolytic toxins from sea anemones. *J. Toxicol.: Toxin Rev.* **10** (3), 223-262.
- Tussenbroek, van B. I.** (1995) *Thalassia testudinum* leaf dynamics in a Mexican Caribbean coral reef lagoon. *Marine Biology* **122**, 33-40.
- Varanda, W.** y Finkelstein, A. (1980) Ion and nonelectrolyte permeability properties of channels formed in planar lipid bilayer membranes by the cytolytic toxin from the sea anemone, *Stoichactis helianthus*. *J. Membrane Biol.* **55**:203

- Vladimir, M. M.**; Shumilov, U. N.; Kovalevskaya, A. M.; Romanenko, L. A. y Grebelny, S. D. (1993) Evidence for several types of biologically active substances in north Pacific sea anemones. *Comp. Biochem. Physiol.* **106** (3), 661-665.
- Voet, D.** y Voet, J. G. (1995) *Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York. 1360 pp.
- Walker, M. J. A.** y Masuda, V. L. (1990) *Toxins from marine invertebrates*. En: *Marine Toxins. Origin, structure, and molecular pharmacology*. (Eds.: S. Hall y G. Strichartz).pp 312-332
- Walker, M. J.** (1996) *The protein protocols. Handbook*. Humana Press, New Jersey. 809 pp.
- Watson, G. M.** y Hessinger, D. A. (1994) Evidence for calcium channels involved in regulating nematocyst discharge. *Comp. Biochem. Physiol., A.* **107A** (3), 473-481.
- Williamson, J.**; Fenner, P. J.; Burnett, J. W. y Rifkin, J. F. (1996) *Venomous and poisonous marine animals: a medical and biological handbook*. Univ. New South Wales, Sydney. 504 pp.
- Wischnitzer, S.** (1981) *Introduction to Electron Microscopy*. Pergamon Press, New York. 405 pp.
- Wood, R. L.** (1988) *Survey of the ultrastructure of cnidocytes*. En: *The biology of nematocysts*. (Eds.: Hessinger, D. A. y Lenhoff, H. M.). Ac. Press. Inc. San Diego. pp 25-40.
- Yeagle, P. L.** (1993) *The membranes of cells*. Ac. Press. San Diego. pp 23
- Zenteno, R.**, Chávez, R., Portugal, D., Páez, A., Lascurain, R. y Zenteno, E. (1995) Purification of a N-Acetyl-D-Galactosamine specific lectin from the orchid *Laelia autumnalis*. *Phytochemistry* **40** (3), 651-655.
- Zhadan, G.**; Kuznetsova, S.; Opalikova, O.; Monastymaya, M.; Zykova, T.; Emelyanenko, V.; Villar, E. y Shnyrov, V. (1994) Stability of a low molecular mass cytotoxin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* and membrane-toxin interactions. *Biochem. Mol. Biol. Int. (Australia)* **32** (2), 331-340.
- Zorec, R.**, Tester, M., Macek, P. y Mason, W. T. (1990) Cytotoxicity of equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina* involves ion channel formation and an increase in intracellular calcium activity. *J. Membr. Biol.* **118**, 243-249.
- Zühlke, R. D.**; Zhang, H. J. y Joho R. H. (1995) *Xenopus* oocytes: a system for expression cloning and structure-function studies of ion channels and receptors. En: *Methods in Neurosciences* .Vol. **25**, 67-87.

Zykova, T. A.; Monastyrnaia, M. M.; Apalikova, O. V.; Shvets, T. V. y Kozlovskaiia, E. P. (1998) Low-molecular cytolytins and trypsin inhibitors from sea anemone *Radianthus macrodactylus*. Isolation and partial characterization. *Bioorg. Khim.* **24** (7), 509-516.