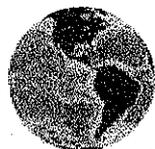


03096

6



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología  
Universidad Nacional Autónoma de México



**Caracterización toxinológica de péptidos bioactivos de la  
anémona *Bartholomea annulata* (Le Sueur, 1817)**

**TESIS**

Que para obtener el grado académico de

**Maestro en Ciencias**

**(Química Marina)**

**PRESENTA**

Hidrobiol. Alejandro Zugasti Cruz

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Co-Director de Tesis: Dra. Judith Sánchez Rodríguez

Co-Director de Tesis: Dr. Abel Santamaría del Ángel

Comité Tutorial: Dra. Lourdes Segura Puertas

Dr. Edgar Heimer de la Cotera

Dr. Roberto Arreguín Espinosa

2007



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.

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi madre Isabel y a mi hermano Carlos por su apoyo incondicional en todos los aspectos. Gracias.

También a mis amigos de Puerto Morelos: Griselda César, Gloria, Hugo, Marissa, Claudia, Lorenzo, Luis, Norma y Korn por todos los momentos inolvidables que compartimos. De igual forma gracias.

La investigación que se presenta en esta tesis fue realizada en el laboratorio de Toxinología Marina de la Unidad Académica de Puerto Morelos del ICMYL, bajo la dirección de las Dras. Judith Sánchez Rodríguez y Lourdes Segura Puertas, así como también en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, bajo el asesoramiento del Abel Santamaría del Ángel, a quienes les agradezco todo el apoyo y experiencia brindados durante mi estancia en esos laboratorios y durante mi permanencia en el programa de maestría.

Agradezco la participación de los Dres. Edgar Heimer de la Cotera, del Instituto de Neurobiología, y Roberto Arreguín Espinosa, del Instituto de Química, por sus valiosas aportaciones para la corrección del escrito.

A los doctores Patricia Tomé y Roberto Iglesias por permitirme utilizar sus instalaciones para experimentos y por su apoyo brindado .

A la técnica Maria Eugenia Ramos por la ayuda brindada en la colecta de los organismos y en el procesamiento del material biológico en el laboratorio de la Unidad Académica de Puerto Morelos.

También deseo expresar mi gratitud a la investigadora Sonia Galván Arzate por su valiosa asesoría con respecto a las técnicas de laboratorio durante mi estancia en el Instituto Nacional de Neurología.

A la técnica Leticia Andrés, del Instituto de Neurología, por sus asistencia en el manejo de los animales de laboratorio.

A la Bióloga Argelia Martínez por realizar los experimentos de dosis letales en el Instituto Nacional de Neurología.

Agradezco al Comité Académico del Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por el apoyo económico brindado durante mi estancia en la maestría.

También agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca que permitió mantener y concluir estos estudios.

Para todos ellos mi más sincero agradecimiento.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	1
Índice general	2
Índice de figuras	4
Índice de tablas	4
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>5</b>
1. Generalidades sobre Cnidarios	
a) Características del Phylum Cnidaria	5
b) Características de los venenos de anémonas	6
c) Aspectos biológicos de la anémona <i>Bartholomea annulata</i>	8
2. Área de recolecta de los organismos	9
3. Objetivos	11
<b>CAPÍTULO II. CNIDOCISTOS DE LA ANÉMONA <i>Bartholomea annulata</i></b>	<b>12</b>
a) Estructura y función de los cnidocistos	12
b) Materiales y Métodos	16
c) Resultados	17
d) Discusión	22
<b>CAPÍTULO III. IMPLICACIONES MÉDICAS POR URTICACIONES DE CNIDARIOS -DERMATITIS CAUSADA POR <i>Bartholomea annulata</i>-</b>	<b>24</b>
a) Urticaciones por cnidarios	24
b) Mecanismos de inyección del veneno	25
c) Caso de urticación por <i>Bartholomea annulata</i>	28
d) Discusión	30
<b>CAPÍTULO IV. OBTENCIÓN DEL VENENO EN CRUDO DE <i>Bartholomea annulata</i> Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA TÓXICA EN ERITROCITOS DE MAMÍFEROS</b>	<b>31</b>
a) Toxinas de anémonas que alteran las membranas biológicas	31
b) Características de los eritrocitos	32
c) Estrés oxidativo	33
d) Peroxidación de lípidos por radicales libres	34
e) Métodos de extracción del veneno en crudo	36
f) Materiales y Métodos	38

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1. Extracción del veneno en crudo	38
a) Modificación del método de Kem y col. (1989) (Ciclos de congelado-descongelado)	38
b) Modificación del método de Malpezzi y col. (1993) (Aplicación de descargas eléctricas)	38
2. Ensayos hemolíticos	39
3. Pruebas de peroxidación de lípidos en eritrocitos de ratón	40
4. Pruebas de letalidad en ratones	40
5. Determinación de proteínas	41
6. Análisis estadístico	41
g) Resultados	42
1. Extracción del veneno en crudo	42
2. Hemólisis	43
3. Peroxidación de lípidos	45
4. Letalidad en ratones	45
h) Discusión	46
<b>CAPÍTULO V. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD LETAL EN EL CANGREJO <i>Ocypode quadrata</i></b>	50
a) Introducción	50
b) Mecanismos de acción de las toxinas de anémonas que alteran los canales de sodio	51
c) Materiales	53
1. Cromatografía líquida de baja presión	53
2. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	54
3. Determinación de proteínas	54
d) Métodos	54
1) Obtención del extracto crudo	54
2) Pruebas para evaluar la toxicidad	55
3) Purificación de las toxinas	55
4) Determinación de proteínas	56
e) Resultados	57
f) Discusión	60
<b>CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES</b>	63
a) Discusión	63
b) Conclusiones	68
<b>7. REFERENCIAS</b>	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Fotografía de <i>Bartholomea annulata</i>	9
Fig. 2. Área de recolecta de las anémonas	10
Fig. 3. Sección longitudinal esquematizada de un cnidocisto	12
Fig. 4. Esquema de un nematocisto cargado y descargado	13
Fig. 5. Fotomicrografías (contraste de fases) de mastigóforos microbásicos de <i>B. annulata</i>	18
Fig. 6. Fotografía de un amastigóforo microbásico	19
Fig. 7. Fotografía de un espirocisto cargado y otro parcialmente descargado	19
Fig. 8. Fotografía de un isorhiza basitríco cargado	20
Fig. 9. Fotografía de un nematocisto de un tipo nuevo	21
Fig. 10. Esquema de un nematocisto penetrando la epidermis de un mamífero	26
Fig. 11. Fotografía que muestra las lesiones cutáneas en el brazo derecho por urticación con nematocistos de <i>B. annulata</i>	28
Fig. 12. Mastigóforo p-microbásico aislado de la piel	29
Fig. 13. Esquema de una membrana celular	32
Fig. 14. Reacciones de iniciación y propagación de la peroxidación de lípidos	35
Fig. 15. Fotografía de nematocistos y algas simbiotes en el extracto crudo obtenido por ciclos de congelado-descongelado de las anémonas	42
Fig. 16. Mastigóforos p-microbásicos e isorhizas basitrícos aislados de las anémonas vivas por las descargas eléctricas	43
Fig. 17. Hemólisis dependiente de la concentración de extracto crudo de <i>B. annulata</i> en eritrocitos de diferentes fuentes animales.	44
Fig. 18. Hemólisis en eritrocitos de ratón con extracto crudo	44
Fig. 19. Peroxidación de lípidos cuantificada por productos fluorescentes en eritrocitos de ratón	45
Fig. 20. Formación de poros membranales por una citolisina	48
Fig. 21. Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50	57
Fig. 22. Cromatografía de intercambio iónico QAE Sephadex A-25	58
Fig. 23. Cromatografía de intercambio iónico Fractogel EMD SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 650 M	59
Fig. 24. Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-25	59
Fig. 25. Purificación cromatográfica por RP-HPLC	60

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Tipos de cnidocistos presentes en las diferentes clases de cnidarios.	15
Tabla II. Mediciones de las cápsulas de nematocistos cargados.	17
Tabla III. Dosis letales en cangrejo inyectados con polipéptidos purificados que afectan canales de sodio.	52

## RESUMEN

*Bartholomea annulata*, una anémona encontrada comúnmente en el Caribe, posee compuestos biológicamente activos en sus nematocistos. El propósito de este trabajo fue identificar los nematocistos, evaluar diferentes métodos para aislar el veneno y estudiar los efectos tóxicos del veneno en crudo y de fracciones purificadas sobre diferentes sistemas biológicos. Se describieron cuatro tipos de nematocistos: mastigóforos p-microbásicos, amastigóforos microbásicos, espirocistos e ishorizas basitricos. El método de congelado-descongelado en agua destilada de las anémonas resultó efectivo para extraer las toxinas de los nematocistos. El extracto crudo de *B. annulata* provocó la lisis (evaluada mediante la liberación de hemoglobina) de diversos eritrocitos de mamíferos. La mayor sensibilidad hacia el extracto crudo la tuvieron los eritrocitos de perro, seguido por los eritrocitos de conejo, humano y ratón. Se comprobó la peroxidación de lípidos (evaluada como productos fluorescentes finales) en eritrocitos de ratón con concentraciones crecientes del veneno en crudo. La peroxidación de los lípidos membranales de los eritrocitos de ratón por daño oxidativo representó una nueva vía de daño producido por las toxinas de la anémona. El extracto crudo inyectado i.p. en ratones fue letal en dosis de 700.7 mg/kg (período de 24 horas) y provocó en los animales arritmia cardiaca y respiratoria, parálisis de sus extremidades posteriores y convulsiones espasmódicas. *Bartholomea annulata* posee péptidos neurotóxicos que provocaron en los cangrejos *Ocypode quadrata* una respuesta de tipo tetánica –movimiento muscular incontrolado y posterior parálisis- que produjeron finalmente la muerte de los animales. Para purificar las neurotoxinas se utilizó filtración en gel sobre Sephadex G-50 y G-25 y cromatografía de intercambio iónico sobre QAE Sephadex A-25 y Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 650 M, finalizando con cromatografía líquida de alta resolución. *B. annulata* también puede inducir en el humano lesiones cutáneas por el contacto con los nematocistos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.a) Características del Phylum Cnidaria

El phylum Cnidaria (aproximadamente 7700 especies) representa, junto con los Placozoa y Porifera, uno de los niveles más primitivos de organización multicelular dentro de la fauna reciente. Su arquitectura corporal, la cual está dominada por una simetría radial, es diploblástica; es decir, consiste únicamente de dos capas germinales (ectodermo y endodermo), con una matriz gelatinosa intermedia acelular, la mesoglea (Shick, 1991). Poseen células multifuncionales y células altamente especializadas como células sensoriales y nerviosas, así como los cnidocistos, los organelos urticantes. Los cnidocistos son comunes a todos los miembros del phylum y comprenden una de las armas celulares más sofisticadas encontradas en el reino animal (Tardent, 1995).

*Los Cnidarios comprenden las siguientes clases:*

Anthozoa, la cual incluye a los corales, anémonas y plumas de mar; Scyphozoa, comprende las medusas con forma de campana; Cubozoa, o medusas con forma de cubo; Hidrozoa, con medusas, sifonóforos y coral de fuego (Brusca & Brusca, 1990).

Las anémonas (Orden Actinaria) son organismos solitarios y la mayoría de ellas se adhieren por medio de su base o disco pedal a substratos duros, tales como rocas, corales u otros animales. Las anémonas poseen tentáculos dispuestos alrededor de una boca central y son utilizados para capturar y transferir su alimento (moluscos, crustáceos y pequeños peces) hacia su boca. En los extremos de los tentáculos y en toda su superficie corporal presentan organelos urticantes, denominados nematocistos (Schick, 1991). Con el estímulo apropiado el nematocisto se descarga y se liberan las toxinas (McKay & Anderson, 1988).

Los venenos de cnidarios son casi siempre péptidos o proteínas. Además, no es común que estas toxinas dañen al depredador cuando son ingeridas ya que no resisten la acción de las proteasas digestivas (Hessinger, 1988).

### **1.b) Características de los venenos de anémonas**

Clásicamente, un veneno es definido como una secreción tóxica que se inyecta en otros organismos. En el caso de los cnidarios, el veneno o toxina se refiere al material soluble contenido dentro de los nematocistos penetrantes cargados. Esto no incluye o no se refiere a sustancias citoplasmáticas que puedan también ser tóxicas. El término de veneno proveniente de los nematocistos tampoco se refiere necesariamente a una sola sustancia tóxica dentro de los nematocistos, sino a todos los materiales solubles liberados del nematocisto cuando se descarga, independientemente de si los componentes individuales sean tóxicos por sí solos o no (Hessinger, 1988).

Las anémonas contienen una variedad interesante de compuestos biológicamente activos, principalmente toxinas peptídicas y protéicas (Béress, 1982; Kem, 1988; Hessinger, 1988; Norton, 1991). No obstante, también se han aislado otros compuestos biológicamente activos: compuestos de amonio cuaternario (tetramina, anthopleurina), aminas biogénicas (histamina, serotonina, dopamina) y compuestos del tipo de las palitoxinas (Mathias, *et al.*, 1960; Béress, 1982).

Kem (1988) postula que, de acuerdo a su modo de acción, las toxinas de las anémonas pueden ser divididas principalmente en:

- 1) Neurotoxinas, que interactúan con canales iónicos sensibles a voltaje.
- 2) Citolisinas, que dañan las membranas celulares porque producen poros o canales.
- 3) Inhibidores de proteasas.

Las toxinas primeramente aisladas fueron las neurotoxinas que actúan a nivel de canales de  $\text{Na}^+$  (Béress & Béress, 1974) y cardiotoxinas (Simpson *et al.*, 1990), aunque también se han aislado diversas citolisinas (Kem, 1988) y neurotoxinas a nivel de

canales de  $K^+$  (Karlsson *et al.*, 1993), así como inhibidores de proteasas (Delfín *et al.*, 1996).

Mientras que las neurotoxinas son polipéptidos de masa molecular que raramente excede los 5,000 Daltons (Béress, 1982; Karlsson *et al.*, 1993), las citolisinas son generalmente moléculas más grandes, entre 15 a 21 KDa (Kem, 1988; Macek, 1992).

Hessinger (1988) postula que la mayoría de las toxinas de cnidarios son de naturaleza protéica (en casos donde la toxina no es una proteína, el sitio de acción es una proteína) por las siguientes razones:

- 1) Las toxinas protéicas generalmente son de 2 a 5 órdenes de magnitud más letales que los venenos no protéicos.
- 2) Las proteínas pueden actuar en diversos sitios moleculares.
- 3) Algunas toxinas protéicas pueden poseer actividad enzimática para amplificar la extensión de sus efectos biológicos.
- 4) Algunas toxinas protéicas, debido a su gran tamaño y estructura tridimensional, pueden ser capaces de extenderse sobre la membrana plasmática para afectar la permeabilidad de la membrana y/o procesos citoplasmáticos.
- 5) Algunas proteínas son capaces de experimentar cambios conformacionales y funcionales de estados inactivos a activos en respuesta a cambios en las condiciones extrínsecas. De esta forma, una toxina puede estar inactiva pero estable dentro de los nematocistos, y llegar a ser activa y lábil cuando se libera o en contacto con una membrana blanco.

La mayoría de las toxinas inmersas en la matriz del nematocisto tienen como blanco la membrana plasmática, ya que es la parte más accesible de una célula. Dentro de las funciones de la célula que se llevan a cabo en la membrana son: excitación, regulación del metabolismo, mantenimiento de la integridad celular, transporte y reconocimiento.

Las tres primeras funciones son el mejor blanco de las toxinas, ya que al producirse su inhibición o interrupción, es más probable tener un efecto inmediato, ya sea dañino o letal (Hessinger & Lenhoff, 1974; Hessinger, 1988; Bernheimer & Rudy, 1986; Kem *et al.*, 1989; Shick, 1991; Norton, 1991).

Aunque algunas toxinas de anémonas han sido investigadas extensivamente durante los últimos años, el estatus total de su investigación puede ser considerado básico: aún con las toxinas mejor caracterizadas, se conoce poco acerca de su estructura terciaria, biosíntesis, localización en los tejidos y papeles biológicos (Kem, 1988).

De la anémona *Bartholomea annulata* (Le Sueur, 1817) no se tiene ningún estudio previo acerca de los aspectos toxinológicos, así que se espera con este trabajo, aportar conocimientos nuevos acerca de las sustancias activas de origen proteínico presentes en la anémona y sus efectos tóxicos sobre diferentes sistemas biológicos.

### **1.c) Aspectos biológicos de la anémona *Bartholomea annulata***

La información acerca de las actividades biológicas de *Bartholomea annulata* están escasamente documentadas, a pesar de que es una especie con un intervalo de distribución amplio: Florida, las Bahamas y el Caribe (Humann, 1996).

*Bartholomea annulata* (Fig. 1) posee tentáculos transparentes con anillos blancos y cafés intercalados que llegan a medir hasta 12.5 cm (Kaplan, 1982). Los anillos blancos representan las baterías de nematocistos, mientras que las bandas cafés son agrupaciones de dinoflagelados simbiotes de la especie (Fitt *et al.*, 1981).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Fig. 1. *Bartholomea annulata* (Le Sueur, 1817).**

Las anémonas de esta especie se encuentran usualmente adheridas a sustratos duros en áreas arenosas o coralinas, desde la línea de la marea baja hasta profundidades de 43 m (Limbaugh *et al.*, 1961; Humann, 1996).

El cuerpo de los animales se encuentra protegido en grietas o en conchas vacías de caracoles y sólo sobresalen los tentáculos que utiliza para capturar a sus presas (Humann, 1996).

Varias especies de crustáceos viven en simbiosis con esta anémona, principalmente del género *Periclimenes* y *Alpheus* (Limbaugh *et al.*, 1961; Levine *et al.*, 1980; Knowlton & Keller, 1983; Criales, 1984). El exoesqueleto *per se* no protege a los crustáceos de los nematocistos, sino que éstos deben adquirir una mucosidad secretada por los tentáculos de la anémona, a manera de un camuflaje químico, para evitar la descarga de los nematocistos (Levine *et al.*, 1980).

## **2. Área de recolecta de los organismos**

La recolecta de los ejemplares de *Bartholomea annulata* se realizó en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo, durante enero a junio del 2000.

Generalmente, los animales recolectados estaban adheridos a rocas o conchas de moluscos, por lo que fue necesario desprender al máximo el sustrato adherido a los animales sin maltratarlos. Los animales fueron mantenidos varios días en acuarios para dejar que se desprendieran completamente del material al que estaban adheridos y también permitir su recuperación por el estrés de la captura. Los organismos posteriormente fueron congelados a temperaturas de  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  para evitar la degradación de las toxinas.

La laguna arrecifal de Puerto Morelos se encuentra ubicada en la porción nororiental de la península de Yucatán, entre los  $20^{\circ} 52' \text{ N}$  y los  $86^{\circ} 51' \text{ O}$ , en el estado de Quintana Roo (Ruiz *et al.*, 1998). Tiene una extensión aproximada de 7 km y una amplitud entre 350 y 1600 m; la profundidad varía entre 1 y 8 m, presentando en promedio 3 m (Merino-Ibarra & Otero-Dávalos, 1983) (Figura 2).

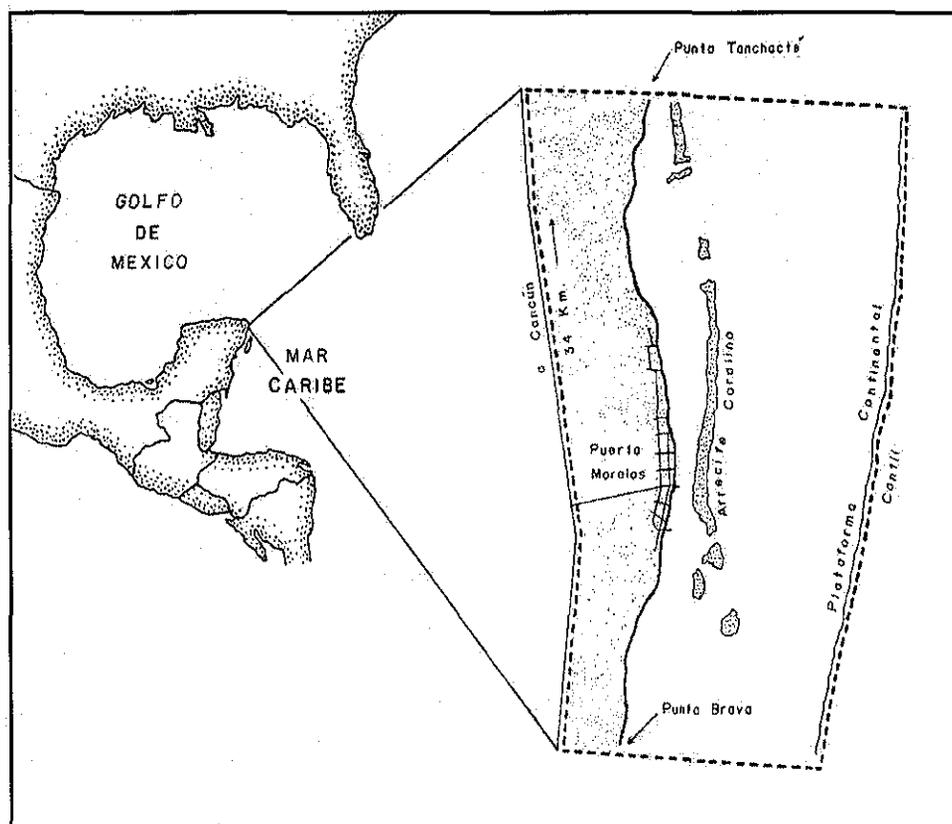


Fig. 2. Área de recolecta de *Bartholomea annulata* (tomado de Merino-Ibarra & Otero-Dávalos, 1983).

### 3. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar la actividad tóxica de la anémona *Bartholomea annulata* en diferentes sistemas biológicos.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar los diferentes tipos de organelos urticantes presentes en los tejidos de la anémona.
- Probar la eficiencia de diferentes métodos de extracción del veneno en crudo.
- Evaluar la toxicidad del veneno en crudo mediante pruebas hemolíticas en eritrocitos de diferentes mamíferos (perro, humano, ratón y conejo).
- Determinar la Dosis Letal Media con el extracto crudo en ratones macho albinos, variedad NIH.
- Caracterizar la posible participación del estrés oxidativo en el patrón de daño celular inducido por los extractos tóxicos sobre eritrocitos de ratón.
- Aislar y purificar los polipéptidos activos de *Bartholomea annulata* letales en el cangrejo *Ocypode quadrata*.

## CAPTULO II. CNIDOCISTOS DE LA ANÉMONA *BARTHOLOMEA ANNULATA*

### a) Estructura y función de los cnidocistos

Cnidocisto es el término colectivo usado para los diferentes tipos de estructuras urticantes usadas para la captura, defensa u otras funciones de los miembros del phylum Cnidaria (McKay & Anderson, 1988; Tardent, 1995) (Figura 3).

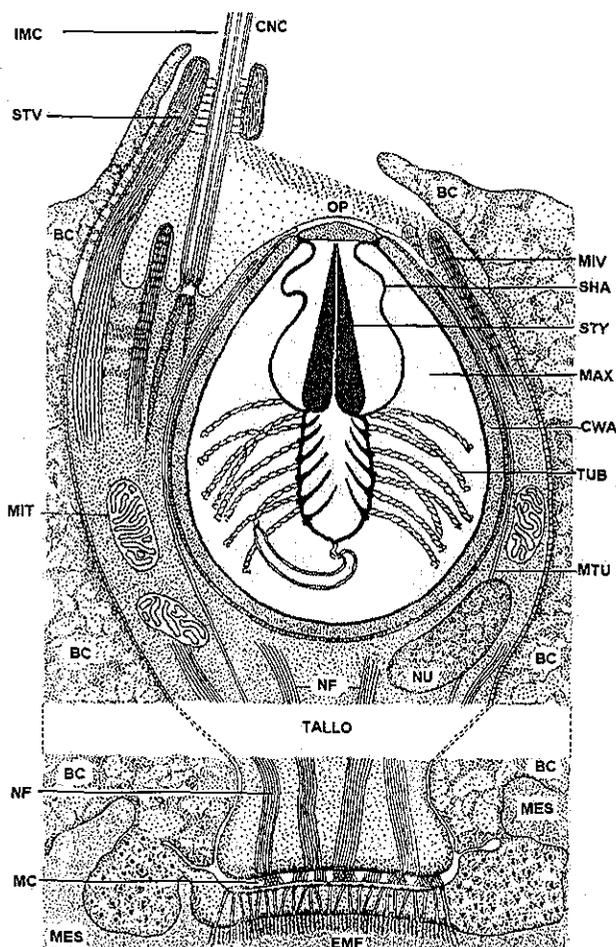
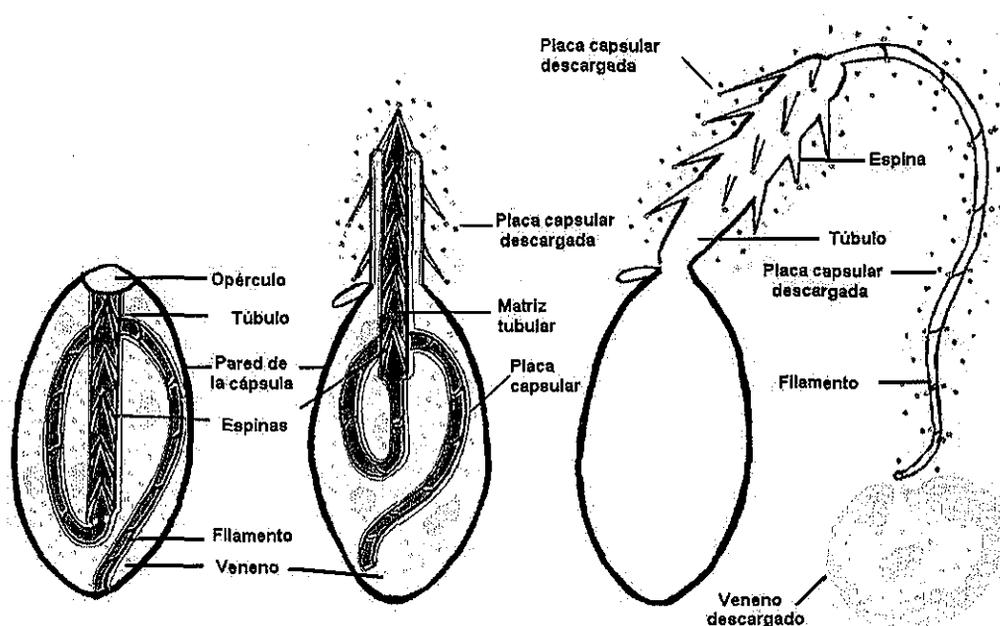


Fig. 3. Sección longitudinal esquematizada de un cnidocito estenotele cargado de *Hydra vulgaris* (Hydrozoa). Esta está embebido en una célula epitelial (BC) del tentáculo y está anclado por una extensión llamada tallo tanto en la parte basal de la célula epitelial (BC) como de la matriz extracelular (mesoglea, MES). El cnidocilo es la estructura que recibe el estímulo (CNC); muro del quiste (CWA); filamentos mesogleales extracelulares (EMF); conexiones intermembranales (IMC); matriz líquida del quiste o veneno (MAX); mesoglea (MES); mitocondria (MIT); microvellosidades (MIV); microtúbulos (MTU); filamento del nematocisto (NF); núcleo (NU); túbulo (SHA); macrovellosidades (STV); estilete (STY); filamento (TUB) (Tomado de Tardent, 1995).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los cnidocistos, de los que se han descrito más de 30 diferentes, han sido divididos en tres categorías principales: nematocistos, espirocistos y ptycocistos (Williamson, *et al.*, 1996). Los cnidocistos se caracterizan por poseer una cápsula de colágeno secretada por el aparato de Golgi, la cual contiene un túbulo invertido y plegado (Mariscal, 1974; Williamson *et al.*, 1996). La descarga de los cnidocistos es provocada por la alta presión hidrostática de la cápsula: alrededor de 15 megapascales ( $\approx 150$  atmósferas), lo que provoca el disparo del túbulo hacia el exterior (Fig. 4). La eversión del túbulo se realiza con aceleraciones hasta de 40,000 gravedades, siendo uno de los eventos más rápidos en la naturaleza (Holstein & Tardent, 1984; Holstein, *et al.*, 1994).



**Fig. 4. Nematocisto cargado, parcialmente descargado y completamente descargado, mostrando la distribución de la matriz tubular, la placa capsular y el veneno descargado en el proceso de descarga. (Tomado de Williamson *et al.*, 1996).**

Los cnidocistos son estructuras complejas ya que ejercen funciones tanto efectoras como receptoras (Aerne *et al.*, 1991). El compartimento sensorial de un cnidocisto funcional maduro es dominado por un estereocilium proyectante, el cual está en contacto con dos estructuras, las micro y macro vellosidades (Fig. 3). Este "aparato

cnidocilo”, cuando es estimulado mecánicamente por una presa o un atacante, traduce una señal mecano-eléctrica a la célula para disparar la cápsula. Al estar involucrado el sistema nervioso, se puede ejercer un control inhibitorio sobre el cnidocisto de otra forma autónomo (Tardent, 1995). Tal autoinhibición de la descarga de la cápsula tiene sentido: cuando los cnidocilos sensoriales son mecánicamente estimulados por el mutuo contacto de los tentáculos cuando se mueven o cuando el animal está bien alimentado y tiene contacto con una presa que ya no puede consumir, esto conduciría a un uso y pérdida innecesaria de cápsulas. No obstante, las cápsulas pueden dispararse aún en la ausencia de células nerviosas y sensoriales (Mariscal, 1974; Tardent, 1995).

Los cnidocistos tienen diferentes propósitos. Los nematocistos, como los mastigóforos, amastigóforos, euriteles y estenoteles presentan una fuerte armadura de espinas para anclarse en los tejidos de sus presas e inyectar las toxinas (Hyman, 1940; Mariscal, 1974), mientras que los que tienen filamentos delgados y adhesivos, como los espirocistos, sujetan el cuerpo de la presa y previenen que escape de los tentáculos (Mariscal, 1974; Williamson *et al.*, 1996).

Las cápsulas de los nematocistos cargados tienen generalmente forma esférica, ovoide o semejante a un bastón. Pueden variar ampliamente en tamaño (desde 3  $\mu\text{m}$  hasta 100  $\mu\text{m}$  en longitud), tanto intra como interfiléticamente (Mariscal, 1974).

Los túbulos varían en diámetro a lo largo de su estructura, así como también en el tamaño, forma y abundancia de las espinas sobre la superficie del tubo descargado (Williamson *et al.*, 1996). El filamento descargado también varía en longitud, diámetro y estructura. Todas estas características permiten la identificación de los cnidocistos (Mariscal, 1974; England, 1991).

Los espirocistos, no son venenosos ni penetrantes y se caracterizan por tener túbulos pegajosos que actúan como adhesivos (Williamson *et al.*, 1996). Los espirocistos están limitados a la clase Anthozoa (Tabla I) y, aunque también son productos de secreción intracelular y se descargan por eversión, no pueden ser considerados nematocistos debido a sus propiedades físicas y químicas únicas, como son presentar una cápsula delgada de una sola pared y contener un filamento enrollado espiralmente sin espinas, de diámetro uniforme (Mariscal, 1974).

Tanto los nematocistos como los espirocistos pueden ser usados sólo una vez. Después de su uso son liberados de la célula que los originó (Mariscal, 1974). No obstante, los nematocistos también pueden descargarse aún aislados de la célula (Mariscal, 1974; Tardent, 1995; Williamson *et al.*, 1996).

El tercer grupo de cnidocistos –los ptycocistos- son no penetrantes y presentan cápsulas alargadas que son usadas en la construcción de tubos protectores para ciertas anémonas que se entierran (Orden Ceriantharia). En la tabla I se muestran los diferentes tipos de cnidocistos encontrados en las anémonas, así como en los otros tipos de cnidarios (Mariscal, 1974).

**Tabla I. Tipos de cnidocistos presentes en las diferentes clases de cnidarios.**

Tipo de nematocisto	Hydrozoa	Scyphozoa	Anthozoa
Isorhiza atrico	+	+	+
Isorhiza basitrico	+	-	+
Isorhiza holotrico	+	+	+
Mastigóforo microbásico	+	-	+
Amastigóforo microbásico	-	-	*
Amastigóforo macrobásico	-	-	*
Espirocistos	-	-	*

Clave de los símbolos: +: presente; -: ausente; \*: sólo en esa clase.  
Modificado de Mariscal, 1974.

No se conoce todavía en que compartimiento interno del nematocisto cargado es almacenado el veneno, aunque ya se conoce la ruta por la que el veneno es liberado en la descarga. Por ejemplo, Lotan y colaboradores (1995) descubrieron que en los nematocistos de la medusa *Rhopilema nomadica*, el veneno se descarga a través de las espinas del túbulo. Blanquet (1970) observó en preparaciones de mastigóforos aislados de la anémona *Aiptasia pallida* que los nematocistos, al ser descargados osmóticamente en un medio ácido, precipitan en la punta del túbulo las toxinas. Al parecer, la manera de descargar el veneno depende del tipo de nematocisto.

Con respecto a los tipos de cnidocistos encontrados en *Bartholomea annulata*, existe el trabajo realizado por Calgren en 1949, quién determinó que esta especie presenta cuatro tipos de cnidocistos: mastigóforos p-microbásicos, amastigóforos microbásicos, espirocistos e isorhizas basitricos. En el trabajo actual, con base en las diferencias en el tamaño y estructura de la cápsula, se reconocieron cinco tipos de cnidocistos, observando el túbulo y el filamento, se reconocieron solamente cuatro. El nuevo nematocisto observado no pudo determinarse si es del tipo penetrante o adhesivo debido a que no pudo ser descargado.

## **b) Materiales y Métodos**

Los cnidocistos fueron observados en el microscopio compuesto (20x, 40 x y 100 x) a partir de preparaciones con diferentes tejidos, principalmente los tentáculos y la columna de varios ejemplares de la anémona *B. annulata* preservados en las siguientes soluciones: formol al 4 %, glicerina y alcohol etílico al 96 %. También se observaron un ejemplar fresco y uno mantenido en congelación para comparar el estado físico de los cnidocistos. Los tentáculos liofilizados también fueron estudiados bajo el microscopio para determinar si este proceso daña la integridad física de sus cápsulas.

La determinación de los nematocistos se basó en los trabajos de Mariscal (1974) y England (1991), basándose en las características del túbulo, su armadura de espinas y el filamento.

La longitud y anchura de los cnidocistos cargados y descargados fueron medidos utilizando una reglilla graduada (0.02mm). Cuando fue posible, se midieron hasta 30 cnidocistos de cada tipo.

También se evaluó la efectividad de diferentes sustancias para provocar la descarga de los nematocistos: agua destilada,  $\text{CaCl}_2$  1 M y KCl 1 M.

### c) Resultados

*Bartholomea annulata* presentó 5 tipos de cnidocistos (Tabla II).

**Tabla II. Tamaños de las cápsulas de nematocistos cargados (material no fijado).**

Tipo		A	B	C	D	E
Número		30	2	30	30	5
Longitud	Mínima	40	24	7.5	12	30
( $\mu\text{m}$ )	Máxima	44	28	14	15	33
	Promedio	42	26	22.23	13.66	31.5

**A = Mastigóforos p-microbásicos**

**B = Amastigóforos microbásicos**

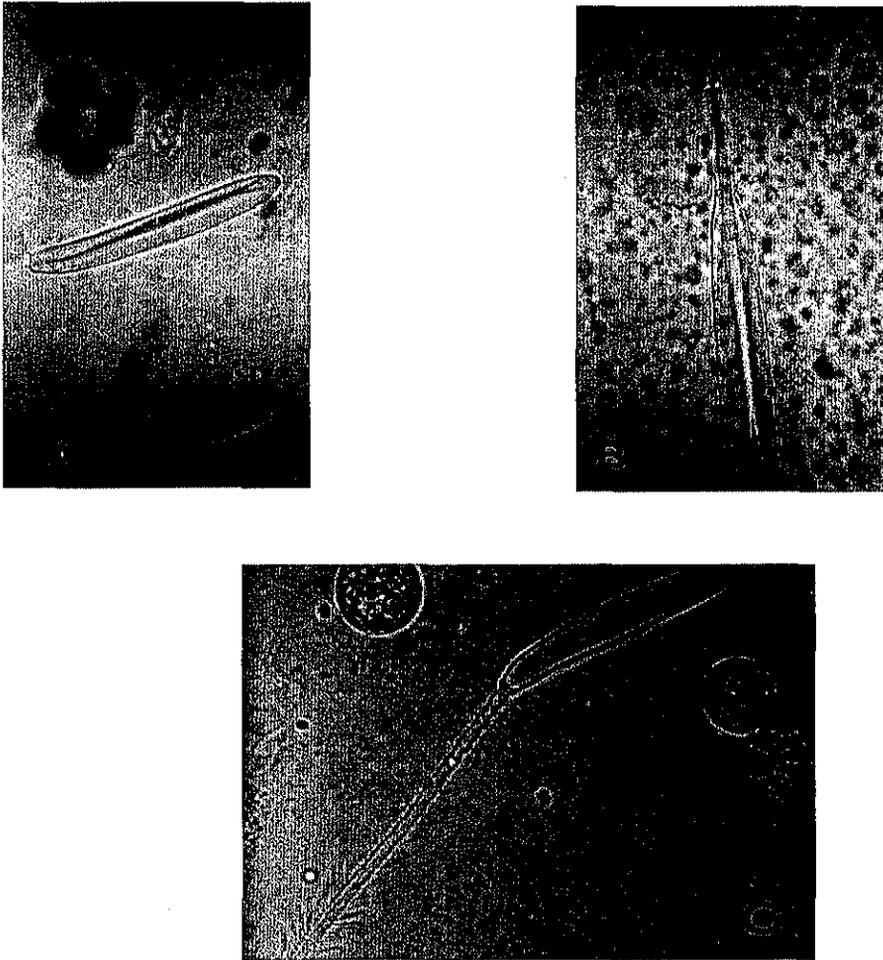
**C = Isorhizas basitricos**

**D = Espirocistos**

**E = Nematocisto no identificado de un tipo nuevo**

#### **A. Mastigóforos p-microbásicos**

La cápsula tiene forma de bastón y presenta el túbulo una muesca en forma de "V" cuando está cargado (Fig. 5A y Fig. 5B). La longitud del túbulo es corta, menor de tres veces la longitud de la cápsula. Además, en la parte distal del túbulo se encuentran espinas largas (Fig. 5C). Otra característica muy importante para identificar los mastigóforo p-microbásico es que presentan un filamento después del túbulo.



**Fig. 5. Fotomicrografías (contraste de fases) de mastigóforos microbásicos de *B. annulata*. A. Mastigóforo p-microbásico cargado. B. Mastigóforo p-microbásico al comienzo de la eversión del túbulo. C. Mastigóforo p-microbásico descargado en el que se muestran el túbulo y las espinas. (Aumento 1200x).**

### **B. Amastigóforos microbásicos**

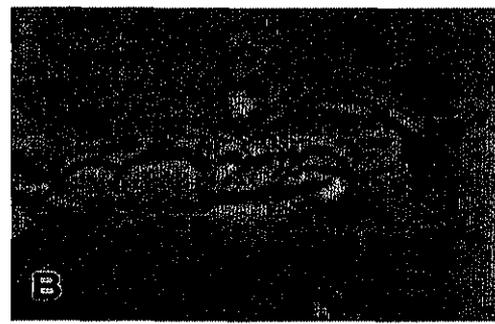
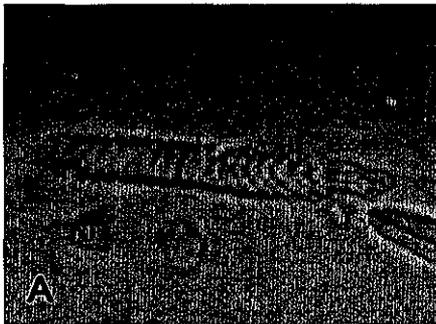
La cápsula es de forma ovoide (Fig. 6). La longitud del túbulo es menor de tres veces la longitud de la cápsula.



**Fig. 6. Amastigóforo microbásico. Su característica distintiva es la forma en la que el túbulo se encuentra enrollado dentro de la cápsula. Sin embargo, a diferencia del mastigóforo p-microbásico, no se presenta un filamento después del túbulo.**

### **C. Espirocistos**

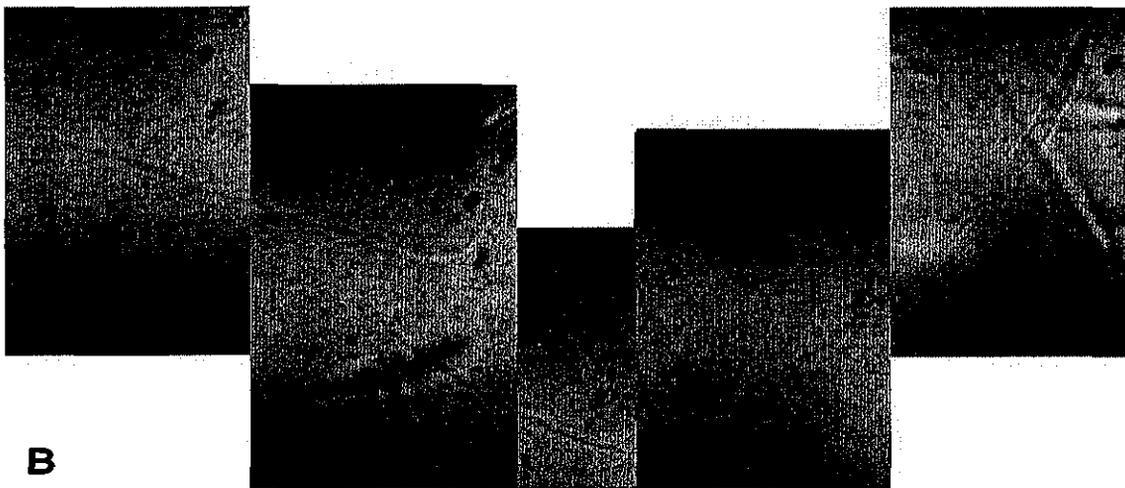
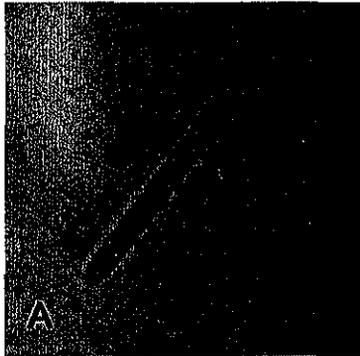
Presentan una cápsula en forma de bastón. La característica que los identifica es la forma del túbulo en espiral cuando el nematocisto está cargado (Fig. 7A). Cuando este cnidocisto está descargado presenta un filamento delgado uniforme (Fig. 7B).



**Fig. 7. A. Espirocisto cargado en el que se observa el túbulo enrollado en forma de bobina. B. Espirocisto descargado parcialmente (1200x).**

#### D. Isorhizas basitricos

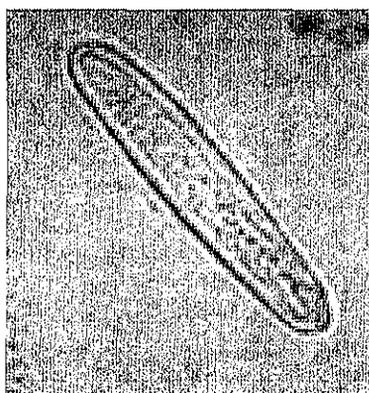
Presentan una cápsula elongada, en la que puede distinguirse el túbulo y el filamento (Fig. 8A). Cuando este cnidocisto está descargado presenta un filamento delgado uniforme muy largo, lo que permite su identificación (Fig. 8B).



**Fig. 8. A. Isorhiza basitricos cargado. B. Fotomicrografías de un isorhiza basitricos descargado, en el que se muestra la gran extensión del filamento (2500x).**

### E. Nematocisto de un tipo nuevo:

La cápsula tiene forma de bastón y presenta un túbulo largo y plegado en forma de espiral cuando está cargado, diferente del tipo espirocisto (Fig. 9). Este nematocisto presentó una estructura y un tamaño capsular diferentes a los cnidocistos descritos anteriormente. Otra característica distintiva es que el túbulo es menor de la mitad de la longitud de la cápsula y el filamento se encuentra enrollado a lo largo de toda la longitud del nematocisto.



**Fig. 9. Nematocisto de un tipo nuevo (2500x).**

Con respecto a la efectividad de diferentes sustancias para provocar la descarga de los nematocistos, se observó lo siguiente:

El agua desionizada provocó la descarga de mastigóforos p-microbásicos en un grado mayor al 70 %, mientras que los espirocistos se descargaron en menor proporción ( $\approx 20$  %). El agua desionizada no fue efectiva para descargar los amastigóforos microbásicos, los basitricos isorhizas y los nematocistos del tipo nuevo no identificado

El cloruro de potasio y el cloruro de calcio fueron efectivos para descargar los mastigóforos p-microbásicos ( $>60$  %) y espirocistos ( $>50$  %). También los basitricos isorhizas pudieron ser descargados, aunque en una baja proporción (10 %).

Los amastigóforos microbásicos, ni el nematocisto no identificado pudieron ser descargados por el agua desionizada ni con el cloruro de calcio ni de potasio.

## **D) Discusión**

De acuerdo con Mariscal (1974), de las 8 categorías de cnidocistos presentes en las anémonas (Tabla I), los que ocurren en más del 60 % de los géneros examinados son sólo tres: espirocistos, isorhiza basitricos y mastigóforos p-microbásicos.

Los cnidocistos extraídos de *Bartholomea annulata* concuerdan con estas observaciones: la mayor cantidad correspondió a los mastigoforos microbásicos, seguido por los espirocistos e isorhiza basitricos, y en forma aislada se encontraron amastigóforos microbásicos.

La morfología de los nematocistos de *B. annulata* había sido descrita por Calgren en 1949, quién describió los mastigóforos p-microbásicos, amastigóforos microbásicos, isorhizas basitricos y espirocistos. No obstante, se ha observado en este trabajo un nuevo tipo de nematocisto diferente de los demás. Este nematocisto presentó una cápsula con una estructura y longitud diferente de los nombrados anteriormente. También la forma del túbulo y el filamento dentro de la cápsula tienen un patrón diferente. Desafortunadamente, este nematocisto no pudo ser descargado y, por lo tanto, no pudo distinguirse el arreglo del túbulo y las espinas, características morfológicas necesarias para una identificación adecuada.

Existen diferentes técnicas para provocar la descarga de los cnidocistos. Por ejemplo, Hyman (1940) demostró que entre los agentes efectivos se encuentran la agitación mecánica, el calor, la presión, descargas eléctricas, bases y ácidos diluidos y el agua destilada. Hyman (1940) postuló que la descarga de los cnidocistos se produce porque tales agentes actúan dañando la pared de la cápsula, ya sea penetrando directamente como en el caso de ácidos o bases, o por simple acción osmótica, en cualquier caso involucrando la entrada de fluido dentro de la cápsula.

En este trabajo se encontró que el agua desionizada fue efectiva para descargar físicamente dos tipos de cnidocistos presentes en *Bartholomea annulata*: los mastigóforos p-microbásicos y los espirocistos.

Por otro lado, Hyman (1940) encontró que soluciones como la glicerina, el xylol, la formalina, el alcohol absoluto, el cloroformo y las soluciones hipertónicas no fueron efectivas para provocar las descargas. En el presente estudio se comprobó que el formol al 4%, la glicerina y el alcohol etílico al 96 % efectivamente no provocan la descarga de ningún tipo de cnidocistos de *B. annulata*.

Diversos trabajos muestran que la liofilización no destruye los nematocistos, permitiendo que puedan ser mantenidos en refrigeración o puedan ser transportados a grandes distancias (Weber *et al.*, 1988; Bloom *et al.*, 1998). Esto también pudo ser comprobado con los nematocistos aislados de los tentáculos liofilizados de *B. annulata*. Se observó que los mastigóforos p-microbásicos y los espirocistos pudieron descargarse normalmente en agua desionizada aún cuando estuvieron durante un año liofilizados y congelados.

### CAPÍTULO III. IMPLICACIONES MÉDICAS POR URTICACIONES DE CNIDARIOS -DERMATITIS CAUSADA POR *BARTHOLOMEA ANNULATA*-

#### a) Urticaciones por cnidarios

Aunque numerosos bañistas son urticados cada año por cnidarios, el conocimiento de estos incidentes en una escala global es escaso y está basado en informes aislados descritos por salvavidas o publicados como estudios de casos clínicos.

La mayoría de estos informes provienen de personas que tienen un alto riesgo de encuentro, tales como buzos, salvavidas, científicos ambientales y pescadores comerciales. Los cnidarios involucrados en estas afecciones principalmente son el hidrozooario *Physalia physalis*, los scyphozoarios *Pelagia noctiluca* y *Chrysaora quinquecirrha*, y las cubomedusas *Chironex fleckeri* y *Chiropsalmus quadrigatus* (Endean *et al.*, 1969; Burnett *et al.*, 1983; Hessinger, 1988).

Además, en muchas ocasiones los casos de afecciones cutáneas producidos por cnidarios no son registrados porque la persona afectada no puede precisar el animal que lo afectó o porque tales incidentes no son considerados como un riesgo para la salud pública (Hessinger, 1988).

Aunque proporcionalmente pocos envenenamientos son fatales, en algunas regiones, como en el noroeste de Australia, la cubomedusa *Chironex fleckeri* ha provocado al menos 55 encuentros fatales documentados (Williamson *et al.*, 1996).

Los cnidarios contienen venenos que son mezclas de péptidos (neurotoxinas y citolisinas), enzimas (fosfolipasas) y sustancias que provocan reacciones alérgicas e inducen el dolor (serotonina, histamina y tetramina); por lo tanto, las reacciones clínicas producidas en humanos resultan tanto por la toxicidad así como por las reacciones alérgicas (Béress, 1982; Burnett *et al.*, 1986; Anthoni *et al.*, 1989; Burnett *et al.*, 1995).

Los síndromes provocados por envenenamientos por cnidarios incluyen reacciones locales: erupciones cutáneas dolorosas y de variable duración, usualmente desde

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

minutos hasta horas y pueden ser vesiculares, hemorrágicas, necrotizantes o ulcerativas (Burnett *et al.*, 1986; Burnett *et al.*, 1987).

En adición a las lesiones cutáneas, algunas erupciones están acompañadas por síntomas sistémicos: malestar, debilidad, fiebre en un grado bajo, náusea y vómito, entre otros; todas estos síntomas se cree que representan reacciones tóxicas desarrolladas por la víctima al veneno (Burnett *et al.*, 1986).

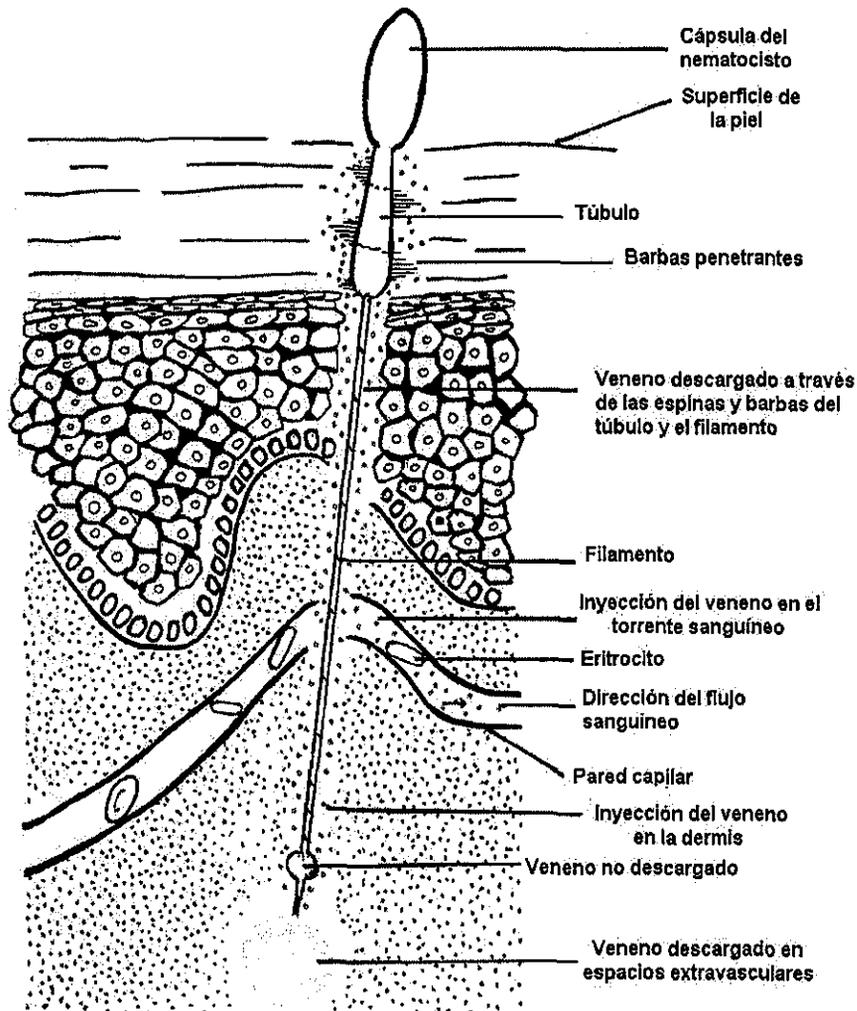
También se pueden presentar reacciones persistentes (como mononeuritis múltiple y gangrena) que varían en severidad (Filling-Katz, 1984; Burnett *et al.*, 1986). Los casos más graves que implican choque anafiláctico, falla renal aguda, paro cardíaco o respiratorio han sido la causa de varias muertes (Maretic & Russell, 1983; Burnett *et al.*, 1986; Williamson *et al.*, 1996).

La toxicidad de los cnidarios hacia las personas no debe considerarse sorprendente, ya que los venenos de estos invertebrados están entre los más potentes de todos los venenos conocidos (Endean *et al.*, 1993).

En el caso de las anémonas, se tienen documentados muy pocos casos de estas afecciones y sus manifestaciones clínicas; por ejemplo, los casos de envenenamiento producido por la anémona *Anemonia sulcata* en el Mar Adriático (Maretic & Russell, 1983). No obstante, también se ha descrito un caso de contacto fatal por una anémona del caribe –*Condylactis sp.*– la cual produjo daño hepático agudo en la persona (García *et al.*, 1994).

## **b) Mecanismos de inyección del veneno**

Los cnidarios producen las diversas afecciones por sus nematocistos, localizados en sus tejidos epiteliales (Halstead, 1988). Los filamentos barbados de estas estructuras son expulsados con gran fuerza y pueden penetrar fácilmente la dermis rica en tejidos vasculares y nerviosos inyectando las sustancias venenosas (Burnett & Calton, 1987) (Fig. 10).



**Fig. 10. Nematocisto descargado penetrando en la epidermis de un ratón e inyectando el veneno (tomado de Williamson *et al.*, 1996).**

Los efectos fisiológicos desencadenados por los venenos de los nematocistos son el resultado de interacciones cooperativas entre los diversos componentes del veneno (Hessinger, 1988).

Los nematocistos maduros funcionan tanto como organelos efectores o sensoriales que pueden o no estar asociados con un sistema nervioso, lo que los hace capaces de descargar aún en forma aislada, aspecto que hay que tomar en cuenta cuando se aplican primeros auxilios a víctimas urticadas (Williamson *et al.*, 1996).

Los nematocistos, principalmente del tipo mastigóforos microbásicos, han recibido mucha atención porque han estado asociados con víctimas humanas afectadas por la cubomedusa *Chironex fleckeri* (Endean, *et al.*, 1993). No obstante, existen otros tipos de nematocistos penetrantes como son los amastigóforos microbásicos, los euriteles y los estenoteles (Williamson *et al.*, 1996). Estos nematocistos pueden ser estructuralmente similares entre las diferentes clases de cnidarios, pero todos ellos pueden contener diferentes venenos y pueden penetrar la piel humana (Hessinger, 1988).

La razón por la cual los tipos y potencia de los venenos varía entre las especies, puede reflejar el uso intencional del veneno de cada especie sobre su presa usual (Williamson *et al.*, 1996). Por ejemplo, las anémonas se alimentan principalmente de pequeños crustáceos, mientras que la cubomedusa *Chironex fleckeri* se alimenta también de crustáceos pero a su vez puede inmovilizar peces grandes; por lo tanto, requiere la inmovilización rápida de estos vertebrados y, los efectos cardiotoxicos y miotóxicos (y posiblemente neurotóxicos y hemolíticos) se efectúan rápidamente (Williamson *et al.*, 1996).

No existe más que un sólo antiveneno para contrarrestar los ocasionados por cnidarios, en este caso para *Chironex fleckeri*. Además, los tratamientos médicos para reducir el daño en la piel de las personas afectadas son muy diversos y también pueden cambiar en función de la especie que produjo el daño y la extensión de las heridas (Burnett & Calton, 1987). Generalmente, si sólo existe eritema local y edema, la aplicación tópica de una crema con antihistamínicos o hidrocortisona aliviará los síntomas de escozor y ardor en el área afectada. En ocasiones las personas se frotan o rascan en las zona afectadas para aliviar el escozor y esto puede conducir a una infección secundaria, la cual requerirá de un antibiótico adecuado (Williamson *et al.*, 1996).

En casos de dolor sistémico, una inflamación más seria de la piel o respuestas alérgicas se requerirá asistencia médica (Williamson *et al.*, 1996).

### c) Afección cutánea producida por *Bartholomea annulata*

Una persona de 28 años (autor de este trabajo), en buenas condiciones de salud, fue urticado por la anémona *B. annulata* a una profundidad de 2-3 m mientras recolectaba ejemplares de esta especie utilizando buceo SCUBA, en marzo del 2000. Como estos organismos se encuentran en grietas de rocas o corales, es necesario romper parte del sustrato para obtenerlas y cuando éstos perciben las vibraciones, liberan una mucosidad abundante que, al ser observada en el microscopio compuesto (20 x), contiene dos tipos de nematocistos penetrantes: mastigóforos p-microbásicos y amastigóforos microbásicos cargados.

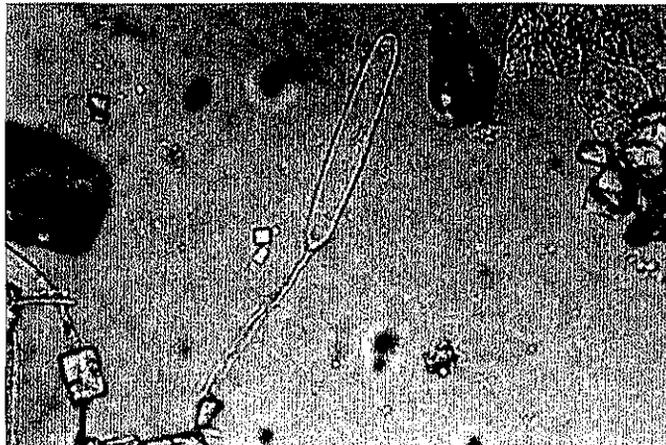
Es importante mencionar que esta persona no tuvo contacto directo con los tentáculos o cualquier otra estructura corporal de la anémona, sino que la urticaria fue producida únicamente por el contacto con la secreción cargada de nematocistos expulsada por el animal. La víctima no portaba ningún tipo de protección, como guantes o traje de neopreno. Al contacto con la secreción, se produjo un dolor intenso y una sensación de quemazón que se prolongó durante treinta minutos. Las lesiones, manifestadas como erupciones papulo-vesiculares eritematosas en los dedos de ambas manos, brazos y costado derecho, tardaron cuatro días en desaparecer sin dejar ningún tipo de marca en la piel o cicatriz (Fig. 11).



**Fig. 11. Lesiones papulovesiculares en la parte superior del brazo derecho.**

Para comprobar que la secreción urticante provenía de la anémona, la persona afectada, 90 minutos después de salir del agua, se colocó 20 cintas adhesivas de celofán en las partes afectadas -técnica denominada como "sticky tape" (Curie & Wood, 1995). Las cintas después fueron montadas sobre portaobjetos con la parte adhesiva hacia arriba y fueron observadas en el microscopio compuesto (10x y 20 x). Es importante mencionar que la observación al microscopio de las muestras debe realizarse inmediatamente ya que las cintas adhesivas se degradan rápidamente: después de 5 días las preparaciones originales fueron nuevamente estudiadas y los nematocistos ya no eran distinguibles.

Una de las cintas adhesivas observadas al microscopio compuesto (20x), tomada del dedo medio de la mano derecha, presentó nematocistos, los cuáles fueron de dos tipos: amastigóforos microbásicos y mastigóforos microbásicos (Fig. 12).



**Fig. 12. Mastigóforo p-microbásico aislado de la piel (1200x).**

Cabe mencionar que aproximadamente dos meses después la misma persona durante la recolecta de *B. annulata* sufrió nuevamente de erupción en ambas manos, presentando una sintomatología clínica similar, con la excepción de que ahora la sensación de ardor y comezón reapareció en intervalos de 2-3 horas al día, y se mantuvieron durante tres días. Los resultados detallados de esta afección se pueden consultar en el trabajo de Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2001).

#### d) Discusión

Existen antecedentes de que la mayoría de las afecciones cutáneas de personas ocurren cuando la piel de la víctima se pone en contacto directo con los tentáculos de diferentes especies de cnidarios y, al descargarse los nematocistos, pueden atravesar fácilmente la epidermis e inyectar sus toxinas en el torrente sanguíneo (Burnett *et al.*, 1986; Williamson *et al.*, 1996).

En este capítulo se describe que también las anémonas, como *Bartholomea annulata*, pueden urticar sin tener contacto directo con ellas, mediante la liberación de una secreción saturada de nematocistos cargados para defenderse de posibles depredadores. Asimismo, las sustancias tóxicas inyectadas por los nematocistos de esta anémona producen una sintomatología clínica similar a otros casos registrados de envenenamiento por cnidarios.

Otro mecanismo tóxico que desarrollan las anémonas para protegerse cuando se sienten amenazadas, es el descrito por Martin (1968), quién describió que las anémonas *Rhodactis howessi* y *Anthopleura elegantissima* liberan antígenos específicos al ambiente durante las contracciones de sus tentáculos. Concluye que la liberación de este material antigénico puede ser una característica común para otros cnidarios y puede resultar en una sensibilización humana a estas sustancias. También postula que un contacto repetido puede desarrollar una reacción alérgica cada vez más intensa en personas sensibilizadas. Esta sensibilidad alérgica debido al contacto frecuente con las toxinas de un cnidario probablemente aconteció con la persona urticada por *B. annulata*; las molestias físicas como ardor y comezón fueron mayores, se presentó fiebre y la desaparición de las ronchas tardó más tiempo después de la segunda ocasión, pero la cantidad de veneno inyectado seguramente fue menor ya que el número de animales recolectados también fue menor (2 animales en la segunda ocasión vs 8 animales en la primera).

## **CAPITULO IV. OBTENCIÓN DEL VENENO EN CRUDO DE BARTHOLOMEA ANNULATA Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA TÓXICA EN ERITROCITOS DE MAMÍFEROS**

### **a) Toxinas de anémonas que alteran las membranas biológicas**

Las anémonas son una fuente importante de toxinas citolíticas, mismas que han sido extraídas de al menos 16 especies de anémonas (Macek, 1992). Las citolisinas son un grupo heterogéneo de proteínas que no se enlazan a sitios receptores proteínicos de la membrana, sino que tienen afinidad por los fosfolípidos membranales (Bernheimer & Avigad, 1976).

La lisis parece depender de la formación de canales transmembranales que son originados por la agregación de las moléculas de toxina en la bicapa (Michaels, 1979). Estos poros en la membrana celular permiten la entrada de iones, principalmente calcio y sodio (Zorec *et al.*, 1990; Belmonte *et al.*, 1993; Macek *et al.*, 1994). Kem (1988) denominó a estos poros como "actinoporos"; sin embargo, no hay un entendimiento definitivo de todos los mecanismos biológicos producidos por estas proteínas citotóxicas.

Las citolisinas tienen como blanco las membranas plasmáticas (Fig. 13), por la importancia que tiene esta estructura celular:

1) La membrana plasmática es la parte más accesible de una célula, especialmente si la toxina es macromolecular y/o hidrofílica (Hessinger, 1988).

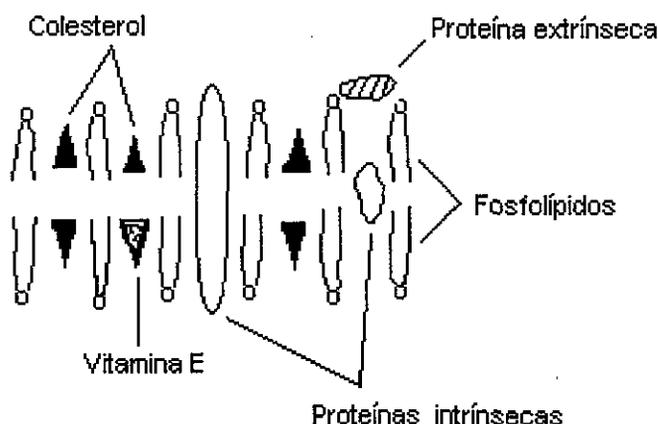
2) Muchas funciones vitales que son mediadas por las membranas plasmáticas sirven como blancos potenciales. Tales funciones incluyen excitabilidad, regulación del metabolismo, mantenimiento de la integridad celular, transporte y reconocimiento. De estas funciones la excitabilidad, la regulación y la integridad celular son los objetivos más frecuentes de las toxinas, ya que su inhibición o perturbación puede provocar efectos deletéreos inmediatos o letales (Hessinger, 1988).

## b) Características de los eritrocitos

Los eritrocitos maduros son de las células más especializadas, ya que únicamente tienen la función de transportar oxígeno a los tejidos. Los eritrocitos carecen de organelos citoplasmáticos tales como núcleo, citoplasma, mitocondrias o ribosomas y son incapaces de sintetizar nuevas proteínas, llevar a cabo las reacciones oxidativas asociadas con las mitocondrias o experimentar mitosis.

Los eritrocitos consisten de un poco más que una membrana que rodea una solución de proteínas y electrolitos, y más del 95 % de las proteínas citoplasmáticas la constituye la hemoglobina (la proteína que transporta el oxígeno); el resto lo constituyen las enzimas requeridas para la producción de energía y para el mantenimiento de la hemoglobina en un estado reducido funcional.

La membrana del eritrocito es una matriz formada por una doble capa de fosfolípidos y, virtualmente, todos los lípidos en los eritrocitos maduros se localizan en esta estructura (Dodge *et al.*, 1963; Halliwell & Gutteridge, 1985) (Fig. 13).



**Fig. 13.** La bicapa lipídica es la estructura básica de la membrana celular. El colesterol es encontrado en la membrana plasmática celular pero no es usual en la membrana de los organelos (Tomado de Halliwell & Gutteridge, 1985).

La mayoría de los lípidos en la membrana de los eritrocitos humanos son fosfolípidos o colesterol no esterificado, los cuales están presentes en cantidades similares. Cuatro clases de compuestos componen los fosfolípidos: fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina, esfingomiélin y fosfatidilserina (Halliwell & Gutteridge, 1985).

Los fosfolípidos están distribuidos asimétricamente entre las dos capas lipídicas de la membrana (Bretscher, 1978). Los aminofosfatidos, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina se encuentran en un 80% o más en la monocapa interna (citoplasmática), mientras que los lípidos que contienen colina (fosfatidilcolina y esfingomiélin) son los mayores componentes de la monocapa exterior.

### **c) Estrés Oxidativo**

El oxígeno es requerido para muchas reacciones metabólicas de los organismos. Sin embargo, el oxígeno y los radicales libres derivados de él pueden reaccionar con los componentes celulares y producir la degradación o inactivación de moléculas esenciales.

*El conjunto de condiciones intracelulares o extracelulares que conducen a la generación metabólica o química de especies reactivas del oxígeno (ROS), tales como radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxil, hidroperóxidos o entidades químicas relacionadas, se denomina estrés oxidativo (Chow, 1991).*

El estrés oxidativo es una de las vías más importantes de daño celular causado por la reactividad de los radicales libres, los cuales son producidos durante la exposición de las células a una gran variedad de químicos, agentes ambientales y drogas (Chow, 1991).

El daño celular inducido por el oxígeno y los radicales libres derivados de él, puede afectar a una molécula específica o a todo el organismo y esta clase de moléculas existen en todos los organismos aeróbicos (Halliwell y Gutteridge, 1985).

Los radicales libres son definidos como entidades químicas que contienen uno o más electrones desapareados; para alcanzar la estabilidad "secuestran" electrones de otras

moléculas, provocándoles alteraciones en su estructura. Cuando un radical libre reacciona con un no radical, un nuevo radical resulta y comienza una reacción en cadena. El efecto acumulativo por los cambios en las estructuras celulares producidos por los radicales libres causan importantes daños celulares (Fridovich, 1998). Afortunadamente, la mayoría de las moléculas biológicas son no radicales, teniendo sus dos electrones apareados (Halliwell & Gutteridge, 1984).

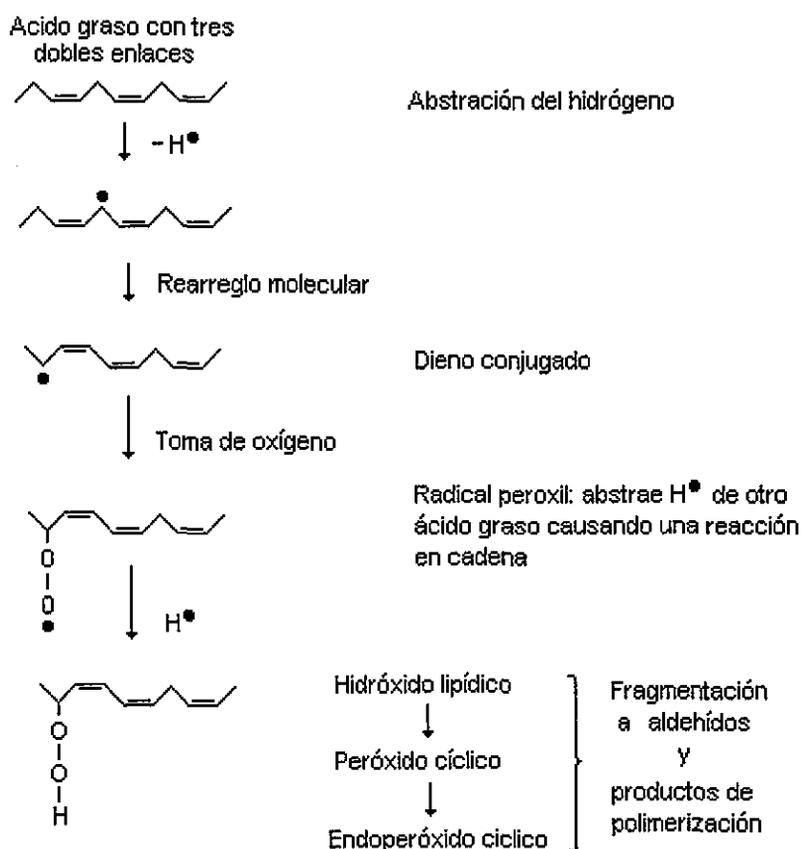
Los sitios críticos del daño de estos radicales son las membranas celulares y las membranas de los organelos celulares, principalmente por la peroxidación de los lípidos y/o modificaciones a las proteínas membranales (Van Ginkel & Sevanian, 1994).

#### **d) Peroxidación de lípidos por radicales libres**

El daño peroxidativo inducido por radicales libres ha sido considerado desde hace tiempo como un evento inicial crítico que conduce a daño celular (Mead, 1976). Los ácidos grasos poli-insaturados son esenciales en todo el sistema de soporte de las células, incluyendo las membranas celulares, el retículo endoplásmico y la mitocondria, y son rápidamente atacados por radicales libres (Halliwell & Gutteridge, 1984; Rice-Evans, 1994). La peroxidación de los lípidos causa importantes daños en la función de la membrana, ya que altera su fluidez, produce cambios en la actividad de las enzimas enlazadas a la membrana y receptores, así como también altera los canales iónicos y la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y otros iones (Halliwell & Gutteridge, 1985; Rice-Evans, 1994; Van Ginkel & Sevanian, 1994).

El proceso de iniciación en una secuencia de peroxidación en una membrana o ácido graso poli-insaturado se debe al ataque de cualquier entidad química que tenga la suficiente reactividad para abstraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-). Ya que el átomo de hidrógeno tiene un sólo electrón, esto produce que el carbono quede con un electrón desapareado (-C-). La presencia de un doble enlace en el ácido graso debilita los enlaces C-H del átomo de carbono adyacente al doble enlace facilitando la remoción del H<sup>•</sup>. El radical carbono tiende a estar estabilizado mediante un rearrreglo molecular que produce un dieno conjugado, el cual reacciona después fácilmente con un oxígeno molecular para producir un radical peroxil R-OO<sup>•</sup> (Halliwell & Gutteridge 1985) (Fig. 14).

Los radicales peroxil pueden abstraer un átomo de hidrógeno de otros ácidos grasos poli-insaturados en la membrana, este es el estado de propagación de la peroxidación lipídica y, una vez que el proceso es iniciado, tiende a continuar en una reacción en cadena. El radical peroxil tiene la posibilidad de combinarse con el hidrógeno que quitó para producir hidroperóxidos lipídicos R-OOH ó la de producir peróxidos cíclicos (Halliwell & Gutteridge 1985) (Fig. 14).



**Fig. 14. Reacciones de iniciación y propagación de la peroxidación de lípidos, en la que se muestra la peroxidación de un ácido graso con tres dobles enlaces conjugados (Tomado de Halliwell & Gutteridge, 1985).**

Esta peroxidación finalmente termina cuando la relación lípido/proteína disminuye lo suficiente tal que R-OO $\cdot$  tenga que reaccionar con proteínas más que con lípidos, o cuando R-OO $\cdot$  encuentra un antioxidante capaz de donar un átomo de hidrógeno

rápidamente para formar ROOH, con lo cual se rompe la reacción en cadena (Rice-Evans, 1994).

Además de los efectos sobre las membranas, también se produce la oxidación de las bases del DNA, primariamente guanina vía radicales alkoxil o peroxil. Los radicales reactivos del oxígeno pueden también inducir la oxidación de grupos sulfhidrilos críticos para mantener la estabilidad de proteínas y DNA (Rice-Evans, 1994).

### **e) Métodos de extracción del veneno en crudo**

La siguiente evaluación es mostrada en términos de dos dificultades que se presentan en la investigación de los venenos de los nematocistos:

- 1) Desarrollo de métodos para obtener los venenos de los nematocistos libre de componentes citoplasmáticos, y
- 2) Aplicación de ensayos adecuados de los cuales un estudio sistemático del mecanismo de toxicidad pueda ser dirigido.

En general se han desarrollado cuatro métodos para aislar las toxinas de los nematocistos (Hessinger, 1988):

#### **1. Extracto de animales totales y de tentáculos**

Posiblemente debido a que los nematocistos maduros son estructuras frágiles y muy propensas a descargarse por el contacto mecánico, se ha optado por estudiar los venenos de los nematocistos extrayendo las sustancias tóxicas del cuerpo completo de los cnidarios.

Las primeras toxinas extraídas en forma pura de una anémona fueron obtenidas a partir de homogeinados de la anémona *Anemonia sulcata* (Béress & Béress, 1974).

## 2. Obtención de nematocistos por descargas eléctricas

Por este método, Barnes (1967) utilizó tentáculos aislados vivos de la medusa *Chironex fleckeri*, los cuales fueron estimulados eléctricamente para descargar sus nematocistos a través de una membrana amniótica especial. Los túbulos de los nematocistos penetraron completamente la membrana para emitir su veneno en el extremo opuesto de la membrana, el cual después fue recolectado. En un trabajo más reciente Malpezzi y colaboradores (1993), con la anémona *Bunodosoma caissarum*, obtuvieron una preparación que contenía únicamente nematocistos.

## 3. Obtención de veneno por descarga osmótica, mediante el procedimiento de congelado -descongelado

Las anémonas son sometidas a ciclos de congelado-descongelado para extraer los nematocistos y también provocar la liberación de las toxinas hacia el medio. Después, las proteínas se precipitan con sulfato de amonio (Kem *et al.*, 1989). Esta técnica tiene por objeto inducir la liberación de las toxinas de los nematocistos mediante cambios osmóticos y térmicos.

## 4. Extractos de nematocistos aislados.

Para evitar las ambigüedades asociadas con los extractos en crudo de tentáculos o del animal completo, se ha intentado aislar los nematocistos intactos para evaluar su contenido tóxico. En general, los nematocistos son primero aislados de los tejidos que los transportan y después desintegrados para liberar sus contenidos venenosos. Aunque este método asegura que el contenido de los nematocistos está incluido en el extracto de los nematocistos finales, las toxicidades de muchos extractos han resultado bajas e inestables. Las posibles razones son explicadas a continuación:

Los nematocistos inmaduros pueden ser aislados preferencialmente. Los nematocistos maduros son frágiles y notoriamente susceptibles a descargarse. Los métodos que rompen los tejidos que transportan los nematocistos por técnicas tales como homogenización (Phillips y Abbott, 1957), o presionando el tejido a través de tamices de mallas (Endean *et al.*, 1969; Bloom *et al.*, 1998) pueden descargar nematocistos

inmaduros y maduros, sin embargo, los primeros pueden contener venenos de nematocistos inmaduros (Barnes, 1967).

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1. Extracción del veneno en crudo**

#### *a) Ciclos de congelado-descongelado (modificación del método de Kem et al., 1989).*

Se tomaron 15 ejemplares congelados de *Bartholomea annulata* (225 g como peso húmedo) y se les agregó 300 ml de agua desionizada; este material se agitó durante 15 minutos hasta su descongelación y después fueron separadas las anémonas del líquido y puestas a congelación nuevamente a  $-20^{\circ}$  C durante 30 minutos. Se repitió el procedimiento dos veces más. Esta técnica tuvo por objeto inducir la liberación de las toxinas de los nematocistos mediante cambios osmóticos y térmicos.

El extracto crudo fue filtrado por papel Whatman No. 1 para eliminar los restos de tejido y detritos y fue centrifugado posteriormente a 3000 g x 15 min.

El material obtenido en el precipitado fue utilizado para los bioensayos de hemólisis, peroxidación de lípidos y una determinación de dosis letal media (DL<sub>50</sub>) en ratones machos albinos, variedad NIH.

#### *b) Aplicación de descargas eléctricas (Método modificado de Malpezzi et al., 1993)*

Se aplicaron descargas eléctricas controladas a los animales vivos para provocar la liberación de los nematocistos. Cada anémona de un grupo de 10 (peso húmedo total de 136 g) fue puesta en un volumen de 50 ml y se le aplicó una descarga eléctrica de 3 volts y 75 miliamperes (DC) por un minuto (Gelman Instrument Model 38206); posteriormente se colocó en un recipiente con 50 ml de agua marina donde permaneció por tres minutos hasta la siguiente descarga. Este procedimiento se realizó en total tres veces con cada uno de los animales. La secreción obtenida por este procedimiento fue

posteriormente liofilizada y utilizada para determinar la dosis letal media en ratones machos albinos, variedad NIH.

## 2. Ensayos hemolíticos

Se utilizaron eritrocitos de ratón, perro, conejo y humano para las pruebas de hemólisis con extracto crudo de *Bartholomea annulata*. Se realizó un mínimo de cuatro y un máximo de 9 ensayos para cada uno de los tipos sanguíneos.

Los eritrocitos de ratón, perro y conejo fueron obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Neurología, en la Ciudad de México. Los eritrocitos humanos fueron obtenidos de voluntarios sanos. En todos los casos se agregó 10 % de heparina como anticoagulante. La sangre, en caso de no utilizarla inmediatamente, fue colocada en buffer Alsever pH 6.4 [dextrosa 0.116 M; cloruro de sodio 0.071 M; citrato de sodio 0.027 M y ácido cítrico 0.002 M] por períodos no mayores de cuatro días a 4 ° C.

El primer paso fue centrifugar la sangre a 3000 g x 5 min a 5° C. El plasma contenido en el sobrenadante fue desechado y el paquete de eritrocitos fue lavado con 1 ml de solución Alsever; el procedimiento fue repetido dos veces más. El pellet de eritrocitos fue diluido posteriormente con 1.5 ml de solución de Alsever.

Se tomaron 100 µl de esta suspensión y se diluyeron con diferentes concentraciones de buffer y extracto crudo (0.037 a 0.224 mg/ml de proteína) hasta un volumen de 1.7 ml. Los eritrocitos fueron incubados posteriormente a 37° C x 30 min con agitación constante. Después se centrifugó toda la suspensión por 5 min a 3000 g a 5° C y se separó 1 ml del sobrenadante.

La concentración de hemoglobina en el sobrenadante fue leída a una absorbancia a 415 nm y fue correlacionada con una curva estándar de hemoglobina bovina (Sigma) y expresada como mg/ml.

### 3. Pruebas de letalidad en ratones

La letalidad, expresada como Dosis Letal Media ( $DL_{50}$ ), para un período de 24 horas, fue cuantificada en ratones albinos machos, variedad NIH (peso 25-30 g), mediante la inyección intraperitoneal del extracto crudo.

Se utilizaron 3 grupos de 4 ratones cada uno y se le aplicó a cada grupo las siguientes dosis: 500, 750 y 1000 mg de extracto crudo liofilizado, respectivamente. El extracto liofilizado fue diluido en solución salina de NaCl al 9 %.

El valor de  $DL_{50}$  fue calculado de acuerdo al método de Lehmann (1980). Se registró también toda la sintomatología que presentaron los ratones después de la inyección i.p de los extractos tóxicos.

### 4. Pruebas de peroxidación de lípidos en eritrocitos de ratón

Esta técnica tuvo por objeto medir los productos lipídicos fluorescentes finales resultado de la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana de los eritrocitos de ratón (Ríos & Santamaría, 1991).

Para la realización de estas pruebas se utilizaron las mismas concentraciones de toxina que las usadas en la hemólisis, es decir, desde 0.037 mg/ml hasta 0.224 mg/ml de proteína. Los experimentos se realizaron por triplicado, con  $n=7$ .

Se obtuvo 1 ml de sangre de ratones machos albinos variedad NIH y se aplicó el 10 % de heparina como anticoagulante. Después la sangre fue centrifugada a 3000 g x 5 min a 5° C.

El plasma contenido en el sobrenadante fue desechado y el paquete de eritrocitos fue lavado con 1 ml de solución Alsever; el procedimiento fue repetido dos veces más.

El pellet de eritrocitos fue diluido posteriormente con 1.5 ml de solución de Alsever. Se tomaron 100  $\mu$ l de esta suspensión y se diluyeron con diferentes concentraciones de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

buffer y extracto crudo (0.037 mg/ml a 0.224 mg/ml de proteína) hasta un volumen de 1.7 ml. Los eritrocitos fueron incubados a 37° C x 30 min con agitación constante; después se tomó 1 ml de esta suspensión y se le añadió 4 ml de una mezcla 2:1 de cloroformo-metanol, y se agitó con vortex por 15 seg. Las preparaciones fueron incubadas en frío por 45 min y en la oscuridad. De la fase clorofórmica se tomaron 1.8 ml, se mezclaron con 0.2 ml de metanol y se realizó la lectura en un espectrofotómetro de fluorescencia a 370 nm de excitación y 430 de emisión. La sensibilidad del equipo fue calibrada previamente con una solución estándar de quinina (0.1µg/ml). Se consideraron valores entre 250-300 unidades de fluorescencia.

## 5. Determinación de proteínas

Las proteínas se determinaron de acuerdo al método de Lowry *et al.* (1951). El método se basa en la reacción de Biuret, donde las proteínas reaccionan con el cobre en solución alcalina y se produce la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se requirieron los siguientes reactivos:

Solución A:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  al 0,5% (p/v).

Solución B: Tartrato de sodio y potasio al 1% (p/v).

Solución C:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en NaOH 0,1M.

Solución D: Reactivo de Folin-Ciocalteu/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:2 en v/v).

Se mezclaron volúmenes iguales de las soluciones A y B. Después se tomó un volumen de esta solución y se diluyó en 50 volúmenes de la solución C (reactivo 1). Se añadieron 5 ml del reactivo 1 a la muestra (1ml) . Se agitó la solución y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se agregaron 0,5 ml de la solución D, posteriormente se agitó la solución y finalmente se midió la absorbancia a 750 nm tras 30 minutos. Se utilizó albúmina bovina como estándar, construyéndose una curva con la concentración de 10 mg albúmina/10 ml.

## 6. Análisis estadístico

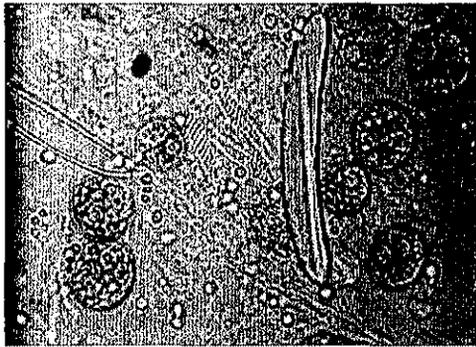
Se realizaron pruebas de Análisis de varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias entre los tratamientos contra el valor control fueron evaluadas mediante la prueba de Dunnet, con valores de significancia de  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  (Daniel, 1993).

## RESULTADOS

### 1. Extracción del veneno en crudo

a) Por el método modificado de extracción desarrollado por Kem *et al.* (1989).

El procedimiento de congelado-descongelado permitió obtener una cantidad de extracto crudo precipitado de 4 g y sobrenadante de 3.5 g. No obstante, el procedimiento de extracción no fue posible separar exclusivamente a los nematocistos, sino que también el extracto crudo presentó restos de tejidos del animal y algas simbióticas (Fig. 15).



**Fig. 15.** El extracto crudo presentó todos los tipos de nematocistos, así como también simbioentes y restos de tejidos que no fue posible separar (1200x).

b) Método de Malpezzi *et al.* (1993) aplicando descargas eléctricas a las anémonas vivas.

La obtención de extracto crudo por descargas eléctricas controladas a los animales permitió obtener una preparación que tuvo únicamente cnidocistos de varios tipos (mastigoforos p-microbásicos, isorhizas basitricos y espirocistos (Fig. 16). La cantidad de extracto crudo total liofilizado fue de 1 g aproximadamente.



**Fig. 16. Mastigóforos p-microbásicos e isorhizas basitricos fueron aislados del cuerpo de la anémona por medio de descargas eléctricas (240x).**

## **2. Hemólisis**

El extracto crudo de la anémona *Bartholomea annulata* provocó la hemólisis de eritrocitos de diferentes especies de mamíferos.

La mayor sensibilidad hacia el extracto crudo la tuvieron los eritrocitos de perro, seguido por los eritrocitos de conejo, humano y ratón, utilizando concentraciones de extracto crudo de 0.02 a 0.224 mg/ml de proteína.

Los resultados de los ensayos hemolíticos con eritrocitos de humano, conejo, perro y ratón se muestran en la figura 17.

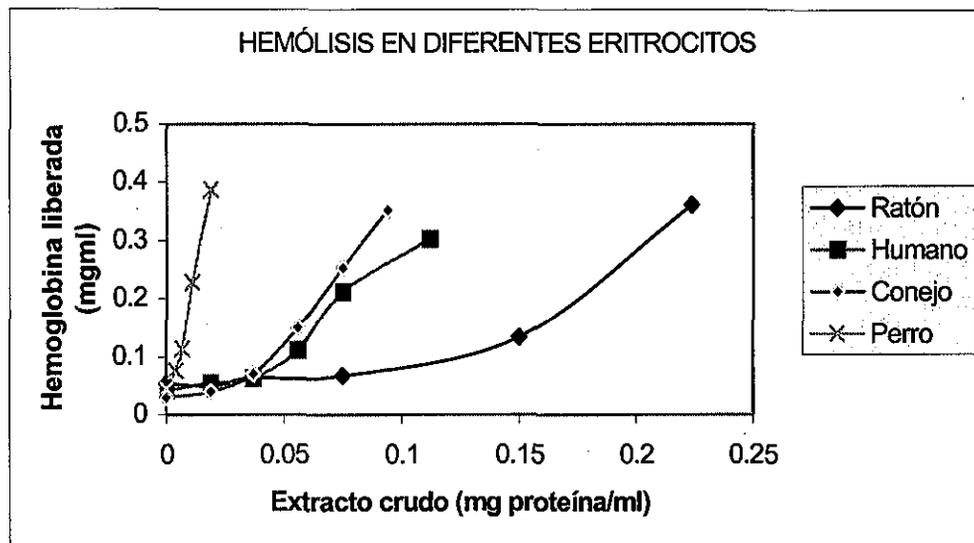


Fig. 17. Hemólisis dependiente de la concentración de extracto crudo de *B. annulata* en eritrocitos de diferentes fuentes animales.

Como se mencionó anteriormente, se aplicó veneno crudo en concentraciones crecientes de toxina desde 0.037 hasta 0.224 mg de proteína/ml en eritrocitos de ratón que resultó en una hemólisis dependiente de la concentración (Figs.17 y Fig.18).

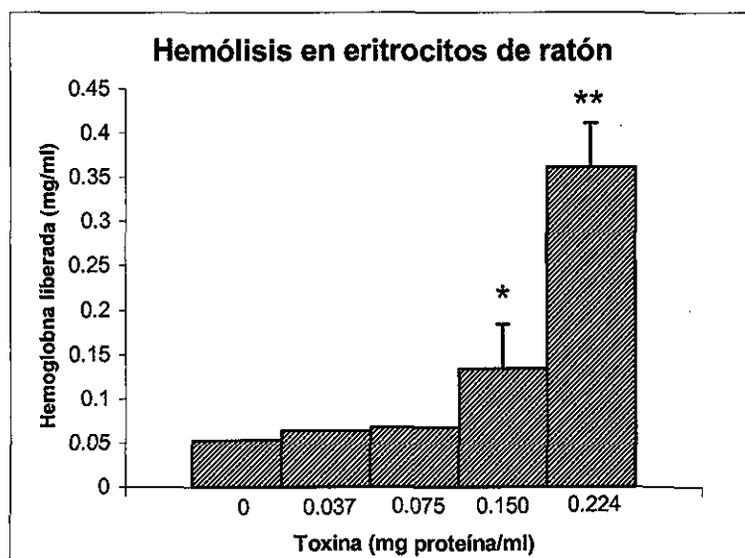
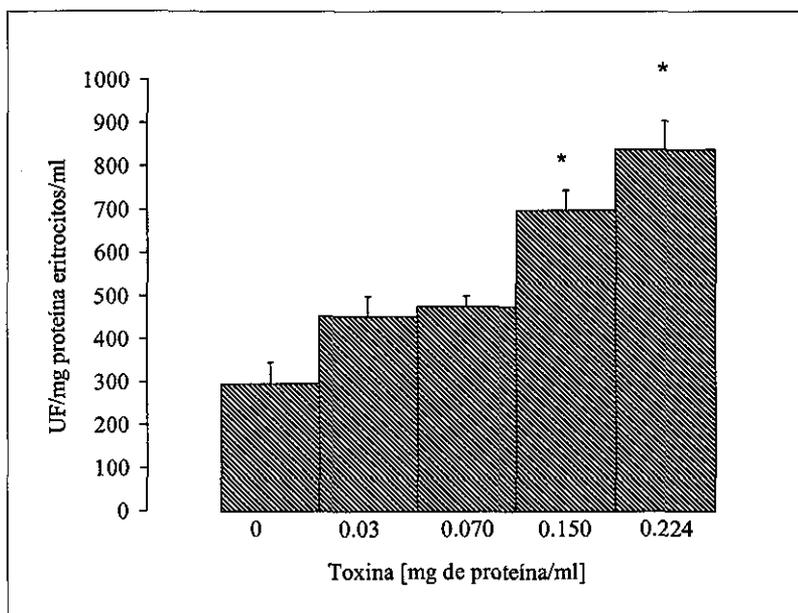


Fig. 18. Los valores de hemólisis están representados como hemoglobina liberada (mg/ml). \* Indica diferencias significativas entre el control y el grupo con toxina, con  $\alpha=0.05$ . \*\*  $\alpha=0.01$

Los valores de toxina que provocaron la hemólisis y la peroxidación de lípidos de manera significativa ( $\alpha=0.05$ ) en ambos casos fueron 0.150 y 0.224 mg/ml de proteína. Los resultados de peroxidación de lípidos se muestran a continuación:

### 3. Peroxidación de lípidos

Los eritrocitos de ratón expuestos a concentraciones crecientes de extracto crudo mostraron una peroxidación de lípidos membranales dependiente de la concentración de toxina (Fig.19).



**Fig. 19. Peroxidación de lípidos cuantificada por productos fluorescentes finales. Los valores están presentados como unidades de fluorescencia/ mg de tejido de eritrocitos/ ml. \* Indica diferencias significativas entre el control y el grupo con toxina, con  $\alpha=0.01$  y  $n=7$ .**

### 4. Pruebas de letalidad en ratones

Se cuantificó una Dosis Letal Media, para un periodo de 24 hr, de 700.7 mg proteína/kg de ratón vía intraperitoneal, para el extracto crudo obtenido por el método de congelado-descongelado.

El extracto obtenido por el procedimiento de descargas eléctricas se probó hasta una dosis de 1000 mg/kg de ratón y no fue suficiente para obtener una DL<sub>50</sub>. Por lo tanto, se requiere más de 1000 mg de este extracto para provocar la muerte de los ratones.

Los ratones inyectados con ambos extractos crudos presentaron la misma sintomatología: arritmia cardiaca y respiratoria, parálisis de sus extremidades posteriores, convulsiones espasmódicas, pelo erizado y levantamiento de la cola. Los ratones también presentaron episodios estáticos de letargia y movimiento errático lento, alternándose con episodios de alta agitación, tales como saltos súbitos y movimiento incontrolado de la cabeza.

## DISCUSIÓN

Muchos de los síntomas exhibidos por los ratones inyectados letalmente son comunes a varios venenos de anémonas. Los ratones inyectados con los venenos en crudo (obtenidos por ciclos de congelado-descongelado y descargas eléctricas) de *B. annulata* presentaron letargia y episodios de respiración irregular, seguido generalmente por la parálisis parcial de las extremidades e, inmediatamente antes de morir, por violentas convulsiones y espasmos de los músculos esqueléticos mayores, causando algunas veces que los animales saltaran. Estos síntomas han sido observados previamente con el veneno de *Aiptasia pallida* en ratones (Hessinger & Grove, 1979).

Por otro lado, la obtención de extracto crudo de *B. annulata* por descargas eléctricas permitió aislar cnidocistos sin que existiera mezcla de las toxinas con restos de tejidos y algas provenientes de los tentáculos y otros tejidos de la anémona. No obstante, la cantidad de extracto crudo total liofilizado fue de 1 g, una proporción mucho menor que la obtenida por el procedimiento de congelado-descongelado, el cual fue 7.5 g.

Resultados previos de otros autores indican las ventajas del método de obtención de extracto por descargas eléctricas. Por ejemplo, Barnes (1967) aplicó continuas descargas eléctricas controladas a la medusa *Chironex fleckeri* y obtuvo muy pocas cantidades de veneno para ser analizado, pero el veneno fue muy tóxico y estable. Malpezzi y colaboradores (1993) aislaron por este método también toxinas de los nematocistos de *Bunodosoma caissarum*, altamente citolíticas para eritrocitos.

No obstante, en este trabajo se encontró que el extracto tóxico de *B. annulata* obtenido por el procedimiento de las descargas eléctricas fue menos tóxico (>1000 mg/kg ratón i.p) para los ratones que con el extracto obtenido por el método de congelado-descongelado (707.1mg/kg ratón i.p).

La razón de esta baja toxicidad radicó en que faltó agitación mecánica al extracto obtenido por las descargas eléctricas para provocar una mayor descarga de los nematocistos; es decir, como se muestra en la figura 16, la mayoría de los nematocistos se encontraban cargados. En contraparte, el método de congelado-descongelado requirió la agitación mecánica, dando como resultado una mayor cantidad de nematocistos descargados. Sin embargo, con este último método se complica el procedimiento de purificación porque se mezclan las toxinas con otros componentes celulares.

Por otro lado, ha sido sugerido que las toxinas de las anémonas son semejantes entre ellas tanto toxicológica como bioquímicamente (Toom *et al.*, 1975; Eno *et al.*, 1998). Además, la hemólisis ha sido usada principalmente para aislar y caracterizar la actividad de citolisinas que forman poros, siendo un ensayo simple y sensible para la mayoría de las toxinas que dañan las membranas (Macek *et al.*, 1994). Por lo tanto, se espera que las actividades hemolíticas activas de *B. annulata* estén causadas por citolisinas.

El extracto crudo de *Bartholomea annulata* provocó la lisis de los eritrocitos con la siguiente sensibilidad, en orden decreciente: perro, conejo, humano, y ratón.

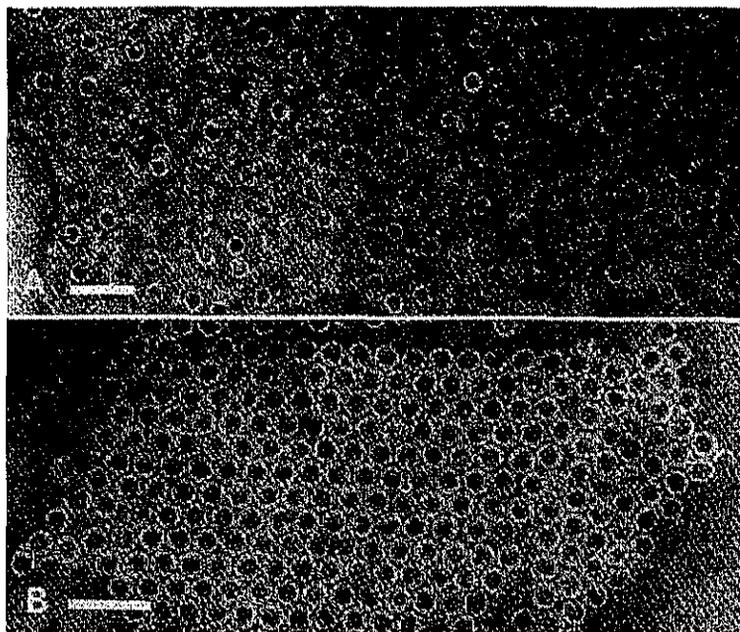
Existen pocos trabajos en la literatura en los que hayan ensayado la hemólisis con extractos crudos de anémonas. Eno *et al.* (1998) encontraron que el extracto crudo de la anémona *Bunodosoma cavernata* provocó la hemólisis en eritrocitos humanos.

En otras especies de anémonas del Caribe, el orden de sensibilidad de los eritrocitos de animales hacia las toxinas parece ser diferente a la de *B. annulata* (aunque se utilizaron en esos casos citolisinas purificadas). Por ejemplo, para *Condylactis gigantea*, la hemólisis fue, en orden decreciente: oveja, humano, perro, conejo y caballo (Shapiro,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1968), mientras que para *Stichodactyla helianthus* fue conejo, oveja, perro, humano y caballo (Bernheimer & Avigad, 1976).

Existen pocas evidencias acerca de los mecanismos que provocan la ruptura de las células rojas sanguíneas. Diversos estudios (Macek et al., 1994; Bernheimer & Rudy, 1986) postulan que las citolisinas se enlazan con la esfingomieline y otros lípidos de las membranas para producir poros oligoméricos, de 1 nm de radio, permeables a cationes como el calcio y el sodio (fig. 20).



**Fig. 20.** Formación de poros en un eritrocito después de su exposición a la citolisina de la anémona *Metridium senile*. A) La membrana muestra formaciones semejantes a anillos distribuidos al azar (barra =100 nm). B) Preparación de membrana similar a la anterior, en la que se muestran las estructuras anilladas en un arreglo hexagonal.

Zorec y colaboradores (1990) también argumentan que la entrada de iones, principalmente calcio y sodio, produce un choque osmótico coloidal que eventualmente provoca la destrucción de la célula.

El extracto crudo de *B. annulata*, además de producir la hemólisis en eritrocitos de ratón, también resultó efectivo para producir la peroxidación de los lípidos membranales. El proceso de peroxidación de lípidos ha sido demostrado por estar asociado con la pérdida de ácidos grasos poli-insaturados y la formación de hidroperóxidos y otros productos secundarios derivados de radicales libres (Chiu et al., 1982; Chow, 1991). La

peroxidación de ácidos grasos puede perturbar la fina estructura de las membranas biológicas y de esta forma alterar la permeabilidad y las funciones de la membrana (Rice-Evans, 1994). Además, los productos generados por la peroxidación de lípidos son frecuentemente tóxicos, capaces de dañar a la mayoría de las células del cuerpo de los mamíferos (Chow, 1991).

Asimismo, existen importantes consecuencias de la peroxidación de la membrana de los eritrocitos *in vivo*, como son la pérdida de su habilidad para cambiar de forma y plegarse a través de los capilares más pequeños, y esto eventualmente conduce a la hemólisis (Halliwell & Gutteridge, 1985). Probablemente, este mecanismo también estuvo involucrado en la muerte de los ratones después de inyectarles el veneno en crudo.

También se ha observado que la peroxidación de los lípidos en eritrocitos de rata produce "huecos" o "poros" debido a la disrupción de la integridad de los fosfolípidos involucrados en mantener la integridad de la membrana plasmática (Jacob & Lux, 1968).

De esta manera el extracto crudo de *B. annulata* provocó daño membranal en los eritrocitos de ratón, producidos por la peroxidación de lípidos, lo que probablemente desencadenó alteraciones estructurales en la membrana de los eritrocitos que, aunadas a los efectos citolíticos del extracto, provocaron su hemólisis. Es importante destacar que no se tienen registros previos que postulen al estrés oxidativo como un mecanismo de daño adicional por los componentes tóxicos de los venenos de un cnidario, en este caso una anémona.

Para finalizar, si bien no hay seguridad que la peroxidación de lípidos sea una causa potencial de hemólisis y/o formación de poros membranales en eritrocitos, constituye un mecanismo potencial de toxicidad que requiere un estudio más detallado y permanece en este trabajo como un importante marcador de daño membranal.

## CAPÍTULO V. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD LETAL EN EL CANGREJO *Ocypode quadrata*

### Introducción

Las toxinas más ampliamente caracterizadas de las anémonas son los polipéptidos de bajo peso molecular (3400-5000 daltons) que actúan enlazándose a canales de sodio sensibles a voltaje (Norton, 1991). Para la caracterización biológica inicial de estas neurotoxinas se han utilizado principalmente crustáceos, ya que son animales altamente sensibles a estos péptidos (Béress & Zwick, 1980). Estas toxinas tienen un efecto paralizante inmediato en los crustáceos después de su inyección (Béress *et al.*, 1975, 2000).

La purificación parcial de la primera toxina polipeptídica que paraliza cangrejos fue aislada del homogenizado de tentáculos de la anémona *Condylactis gigantea* (Shapiro, 1968). Posteriormente, en 1974, Béress & Béress lograron la purificación de dos toxinas de la anémona *Anemonia sulcata*, denominadas como ATX-I y ATX II. Ambas toxinas son polipéptidos de peso molecular aproximado a 5000 daltons y causan la parálisis del cangrejo *Carcinus maenas* y ratones después de inyección i.m e i.v respectivamente.

A partir de 1974 se pudieron obtener extractos purificados de la especie *Anemonia sulcata* en cantidades de 10-50 mg, lo que permitió realizar investigaciones detalladas sobre el modo de acción de las toxinas de esta anémona sobre la transmisión neuromuscular (Rathmayer & Béress, 1976; Béress & Zwick, 1980; Warashina & Fujita, 1983) y canales de sodio en crustáceos (Romey *et al.*, 1976; Fujita & Warashina, 1980; Schweitz *et al.*, 1981; Warashina *et al.*, 1988).

Todas las neurotoxinas de anémonas en canales de sodio descritas poseen una sola cadena polipeptídica eslabonada por tres puentes disulfuro (Béress *et al.*, 2000). Estos polipéptidos consisten usualmente de 46-49 residuos de aminoácidos, pero dos neurotoxinas cortas también han sido aisladas –la toxina ATX III de *Anemonia sulcata* con 2933 Dalton (Béress *et al.*, 1975) y la toxina PaTx de *Parasicyones actinostoloides* con 2000 Da (Fujita & Warashina, 1980).

## **Mecanismos de acción de las toxinas de anémonas que alteran los canales de sodio**

Los canales de sodio sensibles a voltaje participan en la generación de los potenciales de acción en células musculares y nerviosas (Schweitz *et al.*, 1985). Por estudios electrofisiológicos se han identificado diferentes clases de neurotoxinas que interactúan con sitios específicos del canal de sodio y el uso de estas toxinas ha permitido la elucidación detallada de las características funcionales y estructurales de estos canales proteicos (Cestele & Caterall, 2000).

El mayor efecto de las neurotoxinas de anémonas sobre el canal de sodio es retrasar su proceso de inactivación (Frelin *et al.*, 1984; Schweitz *et al.*, 1985; Norton, 1991). La inactivación involucra una transición de un canal abierto activado a un canal cerrado, pero en un estado no activable rápidamente:

Reposo ↔ Abierto ↔ Inactivado

Normalmente, la despolarización de la membrana activa la transición del canal de sodio de R → A → I. Después de la exposición a estos polipéptidos, la probabilidad de la transición de A→I se reduce considerablemente, así que algunos canales de sodio parece que nunca se inactivan. Esto causa que los potenciales de acción se prolonguen considerablemente, conduciendo a que los cangrejos presenten movimientos musculares incontrolados, al menos en las etapas tempranas de la intoxicación (Norton, 1991). Posteriormente se produce la parálisis de los organismos, que eventualmente conduce a su muerte (Béress & Zwick, 1980; Norton, 1991).

Las toxicidades de diferentes neurotoxinas polipeptídicas de anémonas en crustáceos se enlistan en la tabla III.

**Tabla III. Dosis letal de polipéptidos purificados que afectan canales de sodio. Las dosis letales medias están basadas en inyecciones intrahomocélicas en cangrejo.**

Toxina	LD50 (microgramos/kg)	
	Cangrejo	Referencia
Cg-II	0.2	Kem, 1988
Pf-I	0.4	Kem, 1988
As-I	2	Schweitz, et al., 1981
As-II	2	Schweitz, et al., 1981
As-V	5	Schweitz, et al., 1981
Ax-I	11	Schweitz, et al., 1981
Ax-II	39	Schweitz, et al., 1981
Sh-I	0.3	Kem, 1988
Sg-I	7	Schweitz, et al., 1981
Hp-III	10	Schweitz et al., 1985
Hp-II	15	Schweitz et al., 1985
Hp-I	36	Schweitz et al., 1985
Hp-IV	90	Schweitz, et al., 1985
Hm-III	820	Kem, 1988.

**As= *Anemonia sulcata*, Ax= *Anthopleura xanthogrammica*, Cg= *Condylactis gigantea*, Hm = *Heteractis macrodactylus*, Hp = *Heteractis paumotensis*, Pf = *Phyllactis flosculifera*, Sg = *Stichodactyla giganteum*, Sh = *Stichodactyla helianthus*. Tabla modificada de Kem, 1988.**

Las neurotoxinas de las anémonas tienen una alta toxicidad, no sólo para los crustáceos, sino también para muchos vertebrados. La dosis letal para un ratón, expresada como un valor de LD<sub>50</sub>, puede estar en el intervalo de 1 a 100 µg/kg (Norton, 1991).

## Materiales

### 1. Cromatografía líquida de baja presión.

#### a) Geles cromatográficos

Sephadex G-50 medio, Sephadex G-25 fino y QAE Sephadex A-25 (Pharmacia Biotech). Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$  650 M (Merck).

#### b) Buffers de elución

Acetato de amonio (J.T. Baker) y ácido acético (Sigma).

Buffer de acetato de amonio pH 5.2	0.01 M
Buffer de acetato de amonio pH 5.2	0.05 M
Buffer de acetato de amonio pH 5.2	0.1 M
Buffer de acetato de amonio pH 5.2	0.3 M
Buffer de acetato de amonio pH 5.2	0.5 M
Buffer de acetato de amonio pH 5.2	1.0 M
Buffer de acetato de amonio pH 8.2	0.01 M
Buffer de acetato de amonio pH 8.2	0.1 M
Buffer de acetato de amonio pH 8.2	0.3 M
Buffer de acetato de amonio pH 8.2	1.0 M
Ácido acético	0.3 M
Ácido acético	0.7 M
Ácido acético	1.0 M

#### c) Equipos

Colector de fracciones modelo GradiFrac, bomba peristáltica de baja presión modelo P-1, detector UV a 280 nm modelo UV-1, monitor de conductividad y graficador modelo Rec 102 son de Pharmacia Biotech. Centrífuga IEC Centra CL2, Sistema Freeze Drye Labconco, Rotoevaporador Büchi.

## 2. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

### a) Buffers de elución

Acetonitrilo (J.T. Baker), ácido trifluoroacético (Sigma) y agua grado HPLC (Waters).

### b) Equipos

Módulo de distribución de solventes ProStar (Varian), detector UV-VIS (Varian) y automuestreador ProStar (Varian).

Columna Nucleosil RP-100-5 C18, de 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm (Varian)

## 3. Determinación de proteínas

Albúmina (Sigma)

Reactivo Bradford (Sigma)

Espectrofotómetro AMINCO con detector UV-VIS

## Métodos

### a) Obtención del extracto crudo

Se tomaron 28 ejemplares congelados de *Bartholomea annulata* (peso húmedo de 205 g) y se les agregó 150 ml de agua destilada; este material se agitó durante 15 minutos hasta su descongelación y después fueron separadas las anémonas del líquido y puestas a congelación nuevamente a  $-20^{\circ}$  C durante 30 minutos; se repitió el procedimiento dos veces más.

La suspensión resultante fue centrifugada 15 min a 3000 rpm (centrífuga IEC Centra CL2). Los sobrenadantes fueron combinados, filtrados a través de papel Whatman No. 1 y concentrados a baja presión hasta 1/10 de su volumen inicial en un roto-evaporador

(Buchi, R-124) a 35° C. El sobrenadante posteriormente fue liofilizado (Sistema Freeze Drye Labconco) y se obtuvieron 8 g.

### **c) Pruebas para evaluar la toxicidad**

Muestras liofilizadas del extracto crudo, de las fracciones obtenidas durante la cromatografía en columna y de las toxinas purificadas, fueron disueltas en agua destilada para evaluar su actividad tóxica en cangrejos *Ocypode quadrata* (peso 10-20 g). Alícuotas de 0.1 ml fueron inyectadas en la sección del homocelo; es decir, entre la unión del cuerpo y la tercera pata caminadora del cangrejo. Las fracciones que provocaron parálisis en los animales fueron purificadas.

### **d) Purificación de las toxinas**

#### **1. Filtración en gel**

El extracto crudo, conteniendo 7 g de proteína, fue añadido a una columna de filtración en gel Sephadex G-50 grado medio de 90 x 8 cm, eluida con ácido acético 0.7 M. Se recolectaron fracciones de 12 ml con una tasa de flujo de 3 ml/min. La absorbancia fue monitoreada a 280 nm.

La fracción activa en los cangrejos fue denominada I y fue posteriormente concentrada al vacío (Rotoevaporador Büchi) y liofilizada (Sistema Freeze Drye Labconco). Se obtuvo un rendimiento de 105 mg.

#### **2. Cromatografía de intercambio aniónico**

La fracción I fue sometida a cromatografía en una columna QEA Sephadex A-25 (columna de 25 X 1.2 cm), eluida con buffer de acetato de amonio pH 8.2, mediante un gradiente molar de 0.01, 0.1, 0.3 y 1 M. Las fracciones recolectadas fueron de 18 ml con un flujo de 2.5 ml/min. La fracción activa obtenida en este paso de separación (II) fue concentrada y liofilizada y pesó 39 mg.

### 3. Cromatografía de intercambio catiónico

La fracción letal II fue colocada en una columna Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$ -650M (25 X 1.2 cm), eluida con un gradiente de 0.01, 0.05, 0.1, 0.3 y 0.5 M de acetato de amonio pH 5.2. Se recolectaron fracciones de 12.5 ml con un flujo de 2.8 ml/min. La fracción activa obtenida pesó 21 mg (fracción III) y, al igual que en los procedimientos anteriores, también fue concentrada y liofilizada.

### 4. Filtración en gel

La fracción III fue sometida a cromatografía en una columna Sephadex G-25 fino para desalinizarla. La parte activa obtenida pesó 11 mg (fracción IV) después de su concentración y liofilización.

En estas separaciones cromatográficas se utilizó un equipo Pharmacia Biotech, con detector UV a 280 nm y detector de conductividad y fueron realizadas a temperatura ambiente.

### 5. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

La fracción tóxica (IV) fue fraccionada posteriormente por HPLC (Varian ProStar) utilizando una columna Nucleosil RP-100-5 C18, de 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  (Varian). La elución fue desarrollada con un gradiente lineal por 60 minutos desde 10 hasta 100 % de solvente B, siendo el disolvente A TFA al 0.1 % y el disolvente B acetonitrilo con TFA al 0.1 %, a una tasa de flujo de 1 ml/min. Se inyectó un volumen de muestra de 50  $\mu\text{l}$ , con una concentración de toxina de 1  $\mu\text{g}$  /1  $\mu\text{l}$ . La longitud de onda utilizada fue 280 nm. Los péptidos activos probados en los crustáceos fueron denominados como V.

### e) Determinación de proteínas

Con el fin de establecer el contenido en proteínas de los extractos crudos y purificados, se empleó el método descrito por Bradford (1976), el cual se basa en el enlace que tiene el compuesto azul de Coomassie G250 a las proteínas. A 25  $\mu$ l de muestra (1-10 microgramos) se le adicionaron 75  $\mu$ l de agua destilada y 2.5 ml de reactivo de Bradford -reactivo azul de Coomassie 0.01% en una solución de H<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%:etanol 95% (87:8:5, v:v:v)-. Tras 15 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de la mezcla a 595 nm. La recta patrón se realizó empleando albúmina bovina como estándar. Estos datos se interpolaron en una curva tipo de albúmina (10 mg de albúmina bovina en 10 ml de agua destilada).

### Resultados

El extracto crudo y las fracciones purificadas de *Bartholomea annulata* produjeron los siguientes síntomas en el cangrejo *Ocypode quadrata*: intenso temblor de las patas en los primeros minutos después de la aplicación, actividad motora violenta, seguida de una progresiva insensibilidad a estímulos externos hasta producir una parálisis total; la muerte de los animales se produjo con una concentración de 15  $\mu$ g/cangrejo para un período menor de una hora. En algunos animales también se presentó la pérdida de la extremidad en el sitio de la inyección.

El primer paso de purificación por Sephadex G-50 permitió aislar la fracción con la actividad tóxica en los cangrejos (Fig. 21). El uso de ácido acético 0.7 M como eluyente facilitó el aislamiento de las toxinas en crudo, las cuales eluyeron antes que las sales. De esta forma las toxinas después pudieron ser concentradas y liofilizadas.

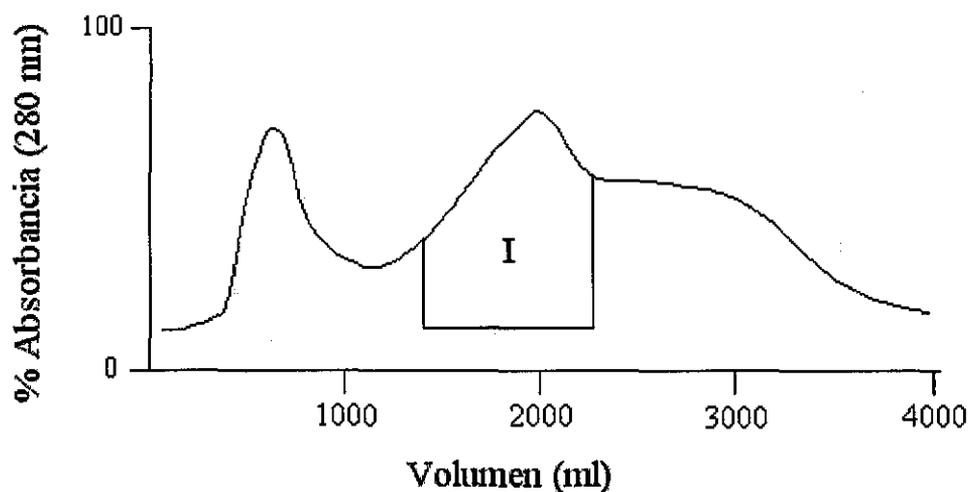


Fig. 21. Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50 (92 x 8 cm). Buffer de elución: ácido acético 0.7 M. Fracciones de 12 ml a una tasa de flujo de 3 ml/min. El área marcada representa la fracción activa en el cangrejo *Ocypode quadrata*.

La fracción I aislada por cromatografía en gel fue sometida posteriormente a cromatografía de intercambio aniónico con QAE Sephadex A-25 (Fig.22).

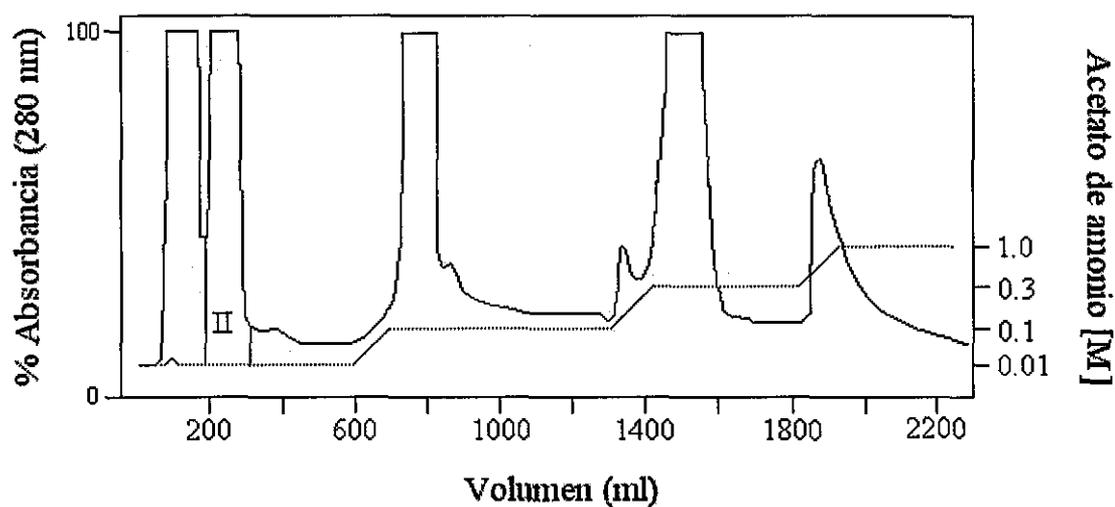
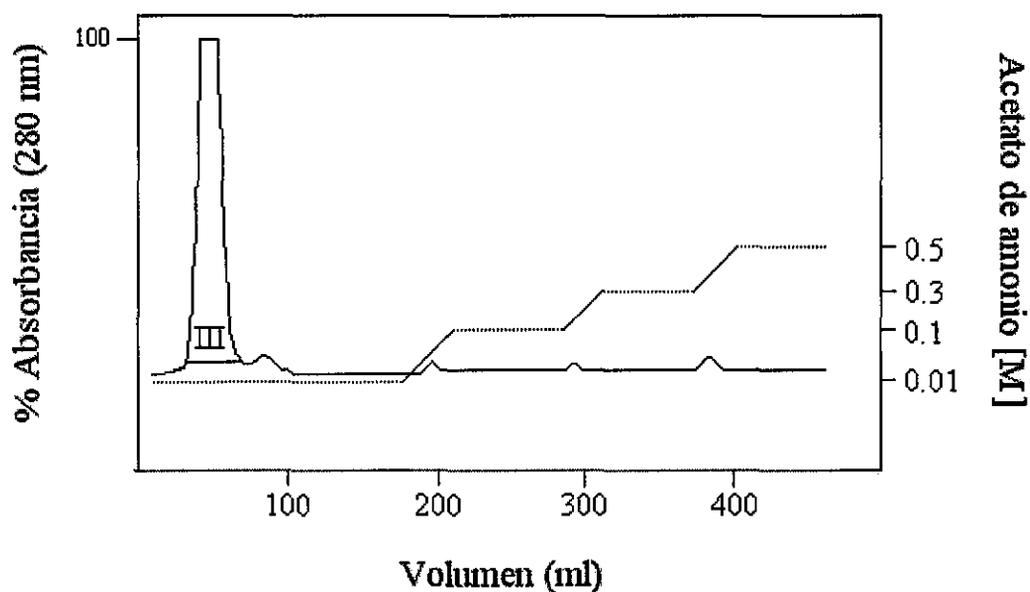


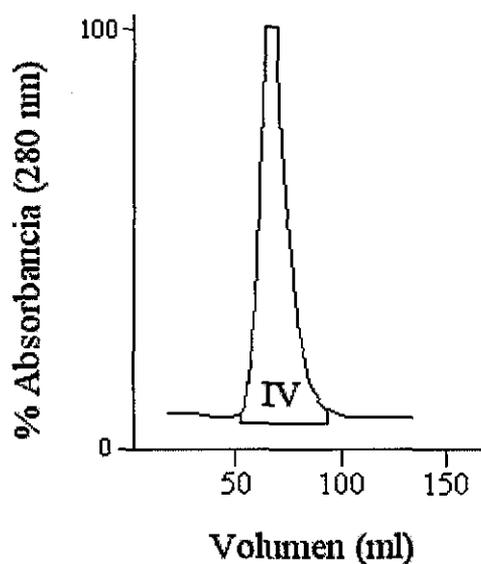
Fig. 22. Cromatografía de intercambio iónico QAE Sephadex A-25, columna 20 x 2.2 cm. Buffer de elución: acetato de amonio pH 8.2, gradiente 0.01, 0.1, 0.3 y 1.0 M. Fracciones de 18 ml, flujo de 2.5 ml/min.

La fracción II fue sometida a cromatografía por Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$  650 M (Fig. 23). Esta fracción eluyó con la concentración de acetato de amonio 0.01 M, pH 5.2, posteriormente fue concentrada y liofilizada.



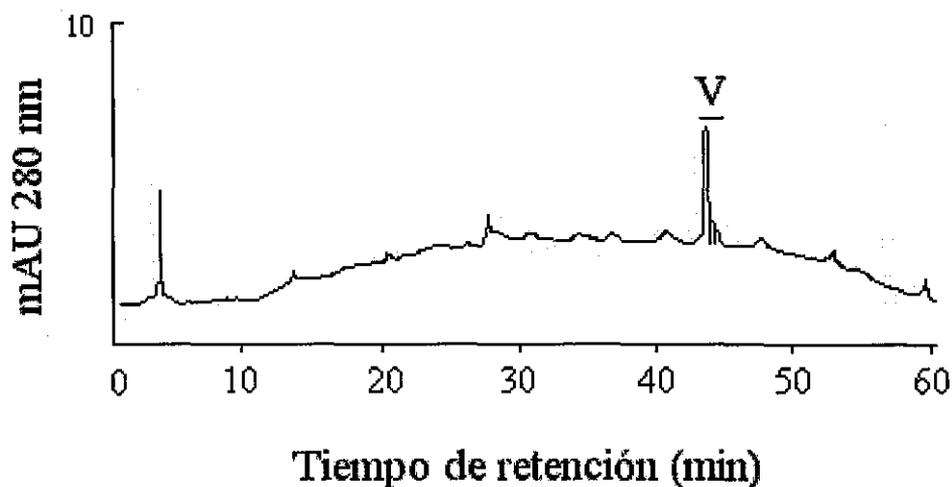
**Fig. 23. Cromatografía de intercambio iónico Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$  650 M, columna 20 x 1.2 cm. Disolvente: acetato de amonio pH 5.2, gradiente 0.01, 0.05, 0.1, 0.3 y 0.5. Fracciones de 12.5 ml, flujo de 2.8 ml/min.**

La fracción tóxica III, la cual contenía la actividad paralizante en crustáceos, fue desalinizada por Sephadex G-25 y liofilizada. De este paso de purificación resultó la fracción IV (Fig. 24).



**Fig. 24.** Cromatografía en Sephadex G-25 (columna 20 x 1.2 cm) eluida con ácido acético. Se recolectaron fracciones de 12.5 ml con una tasa de flujo de 2.5 ml.

El último paso de la separación cromatográfica consistió en la purificación por cromatografía líquida de alta presión de la fracción activa IV (Fig. 25).



**Fig. 25.** Purificación cromatográfica de la fracción IV por HPLC. Disolvente A: TFA 0.1 %; B: acetonitrilo con TFA 0.1%. Las toxinas (V) fueron eluidas mediante un gradiente lineal de 10 a 100 % del disolvente B en 60 min. Muestra aplicada: 50  $\mu$ g; absorbancia a 280 nm. Los picos fueron recolectados manualmente.

Las fracciones activas en los cangrejos (denominadas como V) eluyeron a los 43.9 minutos.

## Discusión

La purificación de las toxinas de las anémonas no es una tarea fácil ya que generalmente los extractos crudos contienen no sólo una mezcla de toxinas, sino también, simbiontes y restos de tejidos y un gran número de compuestos orgánicos e inorgánicos no tóxicos, los cuales incluyen proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, aminoácidos y sales (Béress *et al.*, 2000). Esto no ocurre con el aislamiento de otro tipo de toxinas polipeptídicas, como son las de serpiente o escorpión, de los que pueden obtenerse directamente los venenos crudos (Béress *et al.*, 2000).

Por lo tanto, para la purificación de las neurotoxinas de las anémonas ha sido necesario el uso de métodos de separación basados en diferentes principios, como son la filtración en gel, la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía líquida de alta presión (Schweitz *et al.*, 1981; Schweitz *et al.*, 1985; Béress *et al.*, 2000). En el presente trabajo resultó efectivo utilizar esta combinación de métodos para aislar los péptidos tóxicos de *Bartholomea annulata*.

El método de purificación utilizado en este trabajo, desarrollado inicialmente por Kem y colaboradores (1989) para purificar las toxinas de *Stichodactyla helianthus*, permitió recolectar el exudado tóxico en agua fría después de dos ciclos de congelado-descongelado, seguido de centrifugación para eliminar los componentes insolubles. Con este procedimiento se redujo la contaminación entre las toxinas y la mezcla de tejidos del animal porque no se homogeneiza éste; como resultado, se complicó en menor grado la purificación. Otra ventaja de este método es que no se pierden otro tipo de toxinas, como podrían ser las citolisinas.

No obstante, esta técnica no siempre resulta efectiva para extraer las toxinas polipeptídicas. Por ejemplo, según Kem (1988), con esta técnica no fue posible separar las neurotoxinas de *Anthopleura xanthogrammica* y *A. elegantísima*.

Por lo tanto, el procedimiento descrito en este trabajo ha probado ser efectivo para aislar neurotoxinas de *Bartholomea annulata*. No obstante, no fue posible aislar cada uno de los picos activos, así que no fue posible determinar con certeza si es solo una o más las toxinas presentes en la anémona. Estas toxinas tuvieron un efecto paralizante

muy potente en los cangrejos después de su inyección. Las neurotoxinas de las anémonas han sido de gran interés debido a que, por su alta especificidad, sirven para estudiar canales iónicos de células sensibles a voltaje, no sólo de crustáceos, sino también de mamíferos u otras especies. Sus acciones específicas están dirigidas sobre la transmisión neuromuscular, en particular sobre el canal de sodio (Romey et al., 1976; Vincent et al., 1980; Cestele & Caterall, 2000).

Las toxinas aisladas de *Bartholomea annulata*, con una concentración de 15 µg/cangrejo en un período menor a una hora, provocaron reacciones musculares violentas, seguido por la parálisis de sus extremidades; estos son efectos similares a los causados por otras neurotoxinas de anémonas aplicadas en diferentes especies de crustáceos. Como ejemplos tenemos (además de los presentados en la tabla III) los siguientes: Yost & O'Brien (1978) aislaron de los tentáculos de *Condylactis gigantea* dos polipéptidos de peso molecular cercano a los 4500 daltons letales para el crustáceo terrestre *Armadillium vulgare*.

De igual forma, Hessinger (1988) describe una neurotoxina aislada de la anémona *Aiptasia pallida* que provocó temblor de las patas, actividad motora violenta, autotomía extensiva (pérdida de patas) y progresiva parálisis en el cangrejo *Uca pugilator* con una DL<sub>50</sub> de 150 µg toxina / kg.

También la toxina letal aislada por Shapiro en 1968 de *Condylactis gigantea*, provocó en el cangrejo *Orconectes virilis* (LD<sub>50</sub> de 1 µg de proteína/ kg) una fase inicial de movimientos activos, seguida por una parálisis severa.

La ventaja de utilizar cangrejos para detectar la acción de neurotoxinas fue comprobada en este trabajo: se requirieron pocos animales y su detección es rápida debido a los síntomas característicos que producen estas toxinas en los crustáceos: intensa actividad motora de las extremidades, seguido por una parálisis total que produce eventualmente la muerte de los organismos. Estos signos no son evidenciados en otro tipo de toxinas, como son las citolisinas o los inhibidores de proteasas, toxinas aisladas de otras anémonas (Schweitz et al., 1995; Béress et al., 2000).

El modo de acción de la toxinas de *B. annulata* aisladas en este trabajo sugiere que actúan sobre el sistema neuromuscular de los cangrejos debido a la alteración de los canales de sodio de sus células nerviosas y musculares sensibles a voltaje. No obstante, se requieren de investigaciones posteriores en los que se evalúen las toxinas en preparaciones musculares o nerviosas de crustáceos o mediante experimentos electrofisiológicos en células para probar esta hipótesis.

## CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

El phylum Cnidaria (hidras, medusas, anémonas y corales) poseen una amplia variedad de sustancias neurotóxicas, citolíticas y enzimáticas (Béress, 1982). Las toxinas están diseñadas para tener un efecto defensivo inmediato de urticar o inducir dolor en un depredador potencial o para tener un efecto ofensivo inmediato para matar o paralizar la presa (Mariscal, 1974). Recientemente se ha demostrado (Lotan *et al.*, 1995) que el sitio de almacenaje inequívoco de las toxinas son los cnidocistos, los cuáles consisten de una cápsula con un túbulo plegado eversible (Tardent, 1995). De todos los tipos de cnidocistos, únicamente los nematocistos (que presentan los túbulos penetrantes) contienen las toxinas. Por lo tanto, es muy importante la identificación de los diferentes tipos de cnidocistos presentes en la anémona para precisar cuales son los cnidocistos penetrantes y determinar si el método de extracción del extracto crudo utilizado permite aislar en una proporción significativa este tipo de cnidocistos.

La identificación de los nematocistos requirió observar las cápsulas descargadas porque el diámetro de los túbulos, así como también el tamaño, la forma y la abundancia de las espinas sobre su superficie del túbulo varían y son criterios que se utilizan para la identificación (Mariscal, 1974; England, 1991).

En el caso de *Bartholomea annulata* fue posible aislar cinco diferentes tipos de cnidocistos: mastigóforos p-microbásicos, amastigóforos microbásicos, isorhizas basitricos, espirocistos y un cnidocisto de un tipo nuevo; no obstante, como no fue posible observar el túbulo descargado de este cnidocisto, fue imposible determinar si es del tipo penetrante o adhesivo. Sin embargo, en este cnidocisto la longitud de la cápsula y la forma del túbulo enrollado son diferentes a los cnidocistos anteriores; por este motivo se consideró que es un cnidocisto de un tipo nuevo. Los dos métodos de extracción de cnidocistos utilizados en este trabajo –ciclos de congelado-descongelado en agua destilada (Kem *et al.*, 1989) y el método de las descargas eléctricas en animales vivos (Malpezzi *et al.*, 1993), fueron efectivos para aislar principalmente mastigóforos p-microbásicos, los cuáles se ha comprobado que contienen toxinas (Williamson *et al.*, 1996).

Por otro lado, cuando se utilizan toxinas para experimentos bioquímicos o se purifican las toxinas de un nuevo organismo, es necesario comprobar la toxicidad específica del material y generalmente sólo está disponible en pequeñas cantidades, por lo tanto, se requiere un sistema de ensayos muy sensible.

En este trabajo se utilizaron crustáceos como el cangrejo porque son altamente sensibles a las neurotoxinas de las anémonas, que se traduce como una parálisis inmediata y, además, se seleccionaron ensayos hemolíticos porque permiten detectar y cuantificar toxinas que afectan específicamente membranas celulares.

De igual forma, las pruebas con ratones permitieron evaluar la potencia del extracto crudo, mostrando la presencia de otras toxinas que afectan diferentes sistemas fisiológicos. Por ejemplo, los síntomas de arritmia cardíaca que presentaron los ratones inyectados con el veneno crudo de *B. annulata*, puso de manifiesto la presencia de compuestos cardiotóxicos. Esta no-especificidad permite la detección de sustancias activas que pueden ser notadas con bioensayos más selectivos, como serían las preparaciones de corazón aislado de mamífero que han sido muy utilizadas para detectar las toxinas polipeptídicas de anémonas en mamíferos (Shibata *et al.*, 1974).

Por otro lado, la ventaja de los ensayos celulares *in vitro* radica en que su respuesta es más específica y menos influenciada por factores fármaco-cinéticos tales como la sangre, la barrera hemato-encefálica y la inactivación proteolítica (Kem, 1988).

En este sentido los ensayos de hemólisis son procedimientos cuantitativos muy simples que permiten detectar las citolisinas que actúan sobre las membranas celulares. No obstante, la sensibilidad de los ensayos de hemólisis es dependiente de varios factores, entre los que destacan el tipo de eritrocitos, el método de conteo de los eritrocitos usado y las condiciones de incubación (Kem, 1988). Por estas razones es difícil frecuentemente comparar los datos de hemólisis obtenidos con los eritrocitos de diferentes especies (Kem, 1988). No obstante, las pruebas hemolíticas de un extracto tóxico sobre diferentes eritrocitos muestra que la sensibilidad entre los diversos tipos de eritrocitos es frecuentemente muy grande. Por ejemplo, en este trabajo se determinó que los eritrocitos de perro son extremadamente sensibles a los componentes citolíticos del veneno de *B. annulata*.

Se desconocen las causas por las que los eritrocitos de diversas especies muestran diferentes grados de hemólisis cuando se les aplican compuestos citolíticos de anémonas, por que no ha encontrado una relación directa entre la proporción de los fosfolípidos (principalmente la esfingomielina) existente en cada tipo de eritrocito con respecto a la lisis utilizando el mismo tipo de toxina (Ma ek et al., 1994). De igual manera, Kem (1988) postuló que no hay una relación evidente entre el contenido de esfingomielina de una célula roja y su sensibilidad a las citolisinas.

La evidencia de daño por peroxidación de lípidos en los eritrocitos de ratón por el veneno crudo de *B. annulata* puso de manifiesto una nueva vía de daño celular, por radicales libres, que no había sido estudiada con anterioridad. Diversos estudios (Halliwell & Gutteridge, 1984; Van Ginkel & Sevanian, 1994) demostraron que la peroxidación de los lípidos provoca importantes alteraciones en la estructura y función de la membrana, ya que se ve afectada su fluidez, permeabilidad, actividad enzimática, canales y transporte de proteínas y receptores. Así que no se puede descartar que la peroxidación de los lípidos membranales pueda estar involucrada de una manera muy importante en el mecanismo de lisis de los eritrocitos por las toxinas citolíticas presentes en el veneno de *B. annulata*. No obstante, se requiere de más evidencia experimental para sustentar esta hipótesis.

La purificación de las toxinas de las anémonas es una tarea difícil ya que al extraer los nematocistos generalmente también se extraen restos de tejidos u otros componentes celulares. La separación de los nematocistos con baja o nula contaminación por otras sustancias del cuerpo de la anémona ha sido intentado muchas veces, pero sólo ha sido exitoso con los nematocistos de la acontia de unas pocas especies, como son *Metridium senile* (Phillips y Abbott, 1957) y *Aiptasia pallida* (Blanquet, 1968; Hessinger & Lenhoff, 1974), así como y de los tentáculos de *Bunodosoma caissarum* (Malpezzi, 1993).

A pesar de que muchas sustancias tóxicas de cnidarios han sido aisladas de homogenados de animales enteros o de tentáculos, se ha comprobado recientemente que su sitio de almacenaje y estructuras de descarga son atributos de los nematocistos. Este hecho fue demostrado por Lotan y colaboradores (1995), quienes demostraron que los nematocistos son la fuente inequívoca de las toxinas en los cnidarios. En ese

estudio, realizado con la medusa *Rhopilema nomadica*, se estableció la naturaleza química de sus toxinas, su localización subcelular y la ruta de su liberación, así, el veneno de los cnidarios es almacenado en los nematocistos sobre la superficie exterior del túbulo y es liberado durante la descarga a través del arreglo en forma de espiral de las barbas del túbulo hueco extendido, semejante a una flecha venenosa con múltiples puntas.

Sería ideal que el procedimiento de purificación seleccionado aisle completamente el tejido donde se conoce que está la toxina, para minimizar la contaminación. En el caso de ciertos cnidarios, el procedimiento más conveniente sería obtener nematocistos cargados y después por medio de un choque osmótico o de otro tipo, obtener prácticamente el veneno puro. Algunos trabajos mencionan los beneficios de obtener nematocistos aislados mediante descargas eléctricas. Por ejemplo, Malpezzi y colaboradores (1993) mostraron que se pueden obtener nematocistos aislados mediante la aplicación de descargas eléctricas controladas en los animales vivos. De igual manera, Tardent (1988) postuló que cuando se tienen tentáculos aislados vivos de pólipos o medusas, un pulso eléctrico es el método más apropiado para descargar al menos un cierto tipo de nematocisto.

En este trabajo se utilizó también el procedimiento de descargas eléctricas y fue posible aislar nematocistos cargados sin restos de tejidos de *Bartholomea annulata*. Las desventajas fueron su baja toxicidad al inyectarse en ratones, además de la baja cantidad de toxina obtenida.

No obstante, la obtención de las toxinas de *B. annulata* por el método de las descargas eléctricas y su inyección en los ratones produjeron importantes indicios acerca de que las toxinas provienen de los nematocistos. Este se debe a que los animales presentaron sintomatologías similares con ambos extractos –uno con nematocistos aislados solamente y el otro con nematocistos más tejido y otros componentes celulares-, así que es muy probable que las toxinas que provocan estas alteraciones en los ratones provengan directamente de los nematocistos y no de otros componentes citoplasmáticos.

El método por descargas eléctricas fue adecuado para aislar nematocistos. Sin embargo, existen otros aspectos por considerar al aplicar este método: no debe sobrepasarse la cantidad y tiempo de descarga administrada a las anémonas porque la electricidad daña sus tejidos, principalmente los tentáculos. Además, las anémonas, aunque permanezcan vivas después de las descargas, sufren daños en sus tejidos que requieren periodos de recuperación de varias semanas. Por lo tanto, sólo se puede obtener veneno crudo por esta vía manteniendo una gran población de anémonas vivas para realizar extracciones periódicas sobre diferentes animales.

Por otro lado, mantener a la especie *B. annulata* en cautiverio es difícil porque los animales, por instinto, necesitan refugios para protegerse y, si no los tienen, no sobreviven. Resulta también complicado mantener los animales con un refugio (como una roca o un trozo de coral) porque los animales se adhieren, mediante su base del disco pedal, a las pequeñas hendiduras de los sustratos y, al tratar de desprenderlas, pueden maltratarse sus tejidos de manera irreversible.

Por lo tanto, aunque en este trabajo se utilizó el método modificado de Kem y colaboradores (1989), el cual presentó la desventaja de que el extracto crudo obtenido tuvo una cantidad apreciable de restos de tejido y algas, lo que dificultó el trabajo de purificación. No obstante, tuvo las siguientes ventajas: se utilizan organismos que pueden estar congelados por grandes periodos de tiempo sin que se pierda la actividad de las toxinas y se obtuvo una mayor cantidad de extracto crudo.

Por otro lado, los experimentos realizados en este trabajo con el cangrejo *Ocypode quadrata* demostraron que *B. annulata* posee potentes neurotoxinas. Estas toxinas alteraron el sistema neuromuscular de los animales, probablemente por sus efectos a nivel de canales de sodio.

Es importante mencionar también que las toxinas de las anémonas no sólo afectan a los crustáceos cuando son inyectadas experimentalmente, sino también se ha comprobado que el túbulo y el filamento de los nematocistos pueden penetrar a cierta distancia dentro de los tejidos suaves y pasar aún a través del caparazón de los crustáceos (Hyman, 1940).

El contacto con los nematocistos de *B. annulata* en el humano induce reacciones tóxicas y alérgicas. Tales efectos se deben probablemente a la mezcla compleja de sustancias activas que presentan los venenos de los cnidarios, como son la histamina, la serotonina y las catecolaminas (Welsh & Prock, 1958; Anthoni *et al.*, 1989), además de los compuestos citolíticos y neurotóxicos evidenciados en el presente trabajo.

## Conclusiones

Se realizó la descripción morfológica de cuatro tipos de cnidocistos: mastigóforos p-microbásicos, amastigóforos microbásicos, espirocistos e ishorizas basitricos.

El método de congelado-descongelado de las anémonas (método modificado de Kem *et al.*, 1989) resultó efectivo para extraer las toxinas de los nematocistos.

El extracto crudo de la anémona *Bartholomea annulata* provocó la lisis de los eritrocitos. La mayor sensibilidad se observó en los eritrocitos de perro, seguida por los eritrocitos de conejo, humano y ratón.

Se comprobó la hemólisis y peroxidación de lípidos a nivel significativo en los eritrocitos de ratón con concentraciones de toxina de 0.150 y 0.224 mg proteína/ml.

La peroxidación de los lípidos membranales de los eritrocitos de ratón por daño oxidativo, representó una nueva vía de daño producido por las toxinas de la anémona.

El extracto en crudo inyectado en ratones fue letal en dosis de 700.7 mg/kg y provocó en los animales arritmia cardiaca y respiratoria, parálisis de sus extremidades posteriores y convulsiones espasmódicas.

*Bartholomea annulata* tiene neurotoxinas que ocasionaron en los cangrejos *Ocypode quadrata* una respuesta de tipo tetánica –movimiento muscular incontrolado y posterior parálisis- que provocó finalmente la muerte de los animales.

En este trabajo se comprobó que las toxinas de *B. annulata* pueden ser descargadas en dos formas: a través del contacto directo con los nematocistos corporales de la

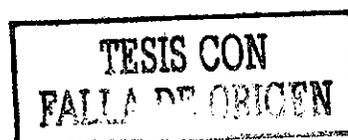
ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

anémona, o por medio del revestimiento mucoso, cargado de nematocistos, que libera al medio como respuesta a la presencia de un depredador. La segregación de esta mucosidad es una adaptación que les permite repeler a los depredadores, y que no había sido registrada con anterioridad para esta especie. Además, los nematocistos de *B. annulata* pueden inducir en el humano síntomas clínicos que acompañan a las lesiones cutáneas.

## 7. REFERENCIAS

- Aerne, B. L., Stidwill, R. P. & P. Tardent. 1991. Nematocyst discharge in *Hydra* does not require the presence of nerve cells. *J. Exp. Zool.* 258, 137-141.
- Anthoni, U., Bohlin, L., Larsen, C., Nielsen, P., Nielsen, N.H. & C. Christophersen. 1989. Tetramine: occurrence in marine organisms and pharmacology. *Toxicon* 27, 7, 707-716.
- Barnes, J. H. 1967. Extraction of cnidarian venoms from living tentacle. En: *The Cnidaria and their Evolution: Symposium of the Zoological Society of London*, No. 16. London. Academic Press. Pag. 307-332.
- Belmonte, G., Pederzoli, C., Macek, P. & G. Menestrina. 1993. Pore formation by sea anemone cytolytic equinatoxin-II in red blood cells and model lipid membranes. *J. Membrane Biol.* 131, 11-22.
- Béress L. 1982. Biologically active compounds from coelenterates. *Pure Appl. Chem.* 54, 1981-1994.
- Béress, L. & R. Béress. 1974. Purification of biological active polypeptides from the sea anemone *Anemonia sulcata*. 9<sup>th</sup> FEBS Meeting. Abstract No. F-127.
- Béress, L. & J. Zwick. 1980. Purification of two crab-paralyzing polypeptides from the sea anemone *Bolocera tuediae*. *Mar. Chem.* 8, 333-338.
- Béress, L., Béress, R. & G. Wunderer. 1975. Isolation and characterization of three polypeptides with neurotoxic activity from *Anemonia sulcata*. *FEBS Letters* 50, 311.
- Béress, L., Bruhn, T., Sánchez-Rodríguez, J., Watcher, E. & H. Schweitz. 2000. Sea anemone toxins acting on Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels. Isolation and characterization. En: Rochat, H. & M.F. Martín-Euclaire (Eds). *Animal Toxins. Facts and Protocols*. Birkhäuser Verlag, Germany.
- Berheimer, A.W & L.S. Avigad. 1976. Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 467-471.
- Bernheimer, A.W. & B. Rudy. 1986. Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 864, 123-141.
- Blanquet, R. 1970. Ionic effects on discharge of the isolated an in situ nematocyst of the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Comp. Biochem. Physiol.* 35, 451-461.
- Bloom D. A. & J. W. Burnett. 1998. Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beachside. *Toxicon* 36, 8, 1075-1085
- 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.

- Bretcher, M.S. 1978. Membrane structure: some general principles. *Science* 181, 623.
- Brusca, R.C. & G.J. Brusca. 1990. *Invertebrates*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, USA.
- Burnett, J.W., & G.J. Calton. 1987. Jellyfish envenomation syndromes updated. *Annals Emerg. Med.* 9, 1000-1005.
- Burnett, J.W., Calton, G.J. & H.W. Burnett. 1986. Jellyfish envenomation syndromes. *J. Amer. Acad. Dermatology* 14, 1, 100-106.
- Burnett, J.W., Cobbs, C.S., Kelman, S.N. & G.J. Calton. 1983. Studies on the serologic response to jellyfish envenomation. *J. Amer. Acad. Dermatology* 9, 2, 229-231.
- Burnett J.W., Calton, G.J., Burnett, H.W. & R.M. Mandojana. 1987. Local and systemic reactions from jellyfish stings. *Clin. Dermatol.* 5, 14- 28.
- Burnett, J.W., Kumar, S., Malecki, J., & A. Szmant. 1995. The antibody response in seabather's eruption. *Toxicon* 33, 1, 99-104.
- Carlgren, O. 1949. A survey of the Ptychodactiaria, Corallimorpharia and Actiniaria. *Kungl. Svenska Vetenskapsakademiens Handlinga*.
- Cestele, S. & W.A. Catterall. 2000. Molecular mechanism of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883-892.
- Chiu, D., Lubina, B. & S. B. Shohet. 1982. Peroxidative reactions in red cell biology. En: Pryor, W.A. (Ed.), *Free Radicals in Biology*. Volume V. Academic Press, Inc.
- Chow, C K. 1991. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 11, 215-232.
- Criales, M.M. 1984. Shrimps associated with coelenterates, echinoderms and mollusc in the Santa Martha Region, Colombia. *J. Crustacean Biology* 4, 2, 307-317.
- Curie, B. & Y. K. Wood. 1995. Identification of *Chironex fleckeri* envenomation by nematocyst recovery from skin. *Med. J. Aust.* 162, 478-480.
- Daniel, W.W. 1993. *Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud*. Noriega Editores, México.
- Delfín, J., Martínez, I., Antuch, W., Morera, V., González, Y., Rodríguez, R., Márquez, M., Saroyán, A., Larionova, N., Díaz, J., Padrón, G. & M. Chávez. 1996. Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 34, 1367-1376.
- Dodge, J. T., Mitchell, C. & D. J. Hanahan. 1963. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Arch. Biochem.* 100, 119-130.



- Endean, R., Monks, S.A. & A.M. Cameron. 1993. Toxins from the box-jellyfish *Chironex fleckeri*. *Toxicon* 31,4, 397-410.
- Endean, R., Duchemin, C., McColm, D. & E. H. Fraser. 1969. A study of the biological activity of toxic material derived from nematocyst of the cubomedusan *Chironex fleckeri*. *Toxicon* 6, 179-204.
- England, K.W. 1991. Nematocysts of sea anemones (Actinaria, Ceriantharia and Corallimorphoaria: Cnidaria). Nomenclature. *Hydrobiologia* 216/217, 691-697.
- Eno, A. E., Konya, R.S. & J. O. Ibu. 1998. Biological properties of a venom extract from the sea anemone *Bunodosoma cavernata*. *Toxicon* 36, 12, 2013-2020.
- Filling-Katz, M.R. 1984. Mononeuritis multiplex following jellyfish stings. *Ann. Neurol.* 152, 13.
- Fitt, W.K., Chang, S.S. & R.K. Trench. 1981. Motility patterns of different strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium* (=Gymnodinium) *microadriaticum* (Freudenthal) in culture. *Bull. Marine Sciences* 31,2, 436-443.
- Frelin C., Vigne P., Schweitz H. Y M. Lazdunski. 1984. The interaction of sea anemone and scorpion neurotoxins with tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> channels in rat myoblasts. A comparison with Na<sup>+</sup> channels in other excitable and non excitable cells. *Mol. Pharm.* 26, 70-74.
- Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201, 1203-1209.
- Fujita, S. & A. Warashina. 1980. *Parasicyonis* toxin: effect on crayfish giant axon. *Comp. Biochem Physiol.* 67 C, 71-74.
- García, M.D., Roland, M. H., Schein, M.D. & J. W. Burnett. 1994. Fulminant hepatic failure from a sea anemone sting. *Annals Internal. Medic.* 15,120, 665-666.
- Halliwell, B. & J.M.C. Gutteridge. 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 23, 1396-1397.
- Halliwell, B. & J.M.C. Gutteridge. 1985. *Free Radical in Biology and Medicine*. Claedon Press, Oxford. Pp?
- Halstead, B.W. 1988. *Poisonous and venomous marine animals of the world*. The Darwin Press, Inc. New Jersey.
- Hessinger, D.A. 1988. Nematocyst venoms and toxins. En: Hessinger, D.A. & M.H. Lenhoff (Eds.), *The Biology of Nematocysts*. Academic Press, Inc, San Diego, pp. 333-368.
- Hessinger, D.A. & H.M. Lenhoff. 1974. Degradation of red cell membrane phospholipids by sea anemone nematocyst venom. *Toxicon* 12, 379-383.

Hessinger, D.A. & R.I. Grove. 1979. Antibodies to sea anemone nematocyst venom: II. Neutralization of the hemolytic, phospholipase A2 and lethal activities by purified antibodies produced in response to attenuated venom. *Toxicon* 17, 109-120.

Holstein, T.W. & P. Tardent. 1984. An ultra-high speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. *Science* 223, 830-832.

Holstein, T.W., Benoit, M., Herder, G.V., Wanner, G., David, C. N. & H. E. Gaub. 1994. Fibrous mini-collagens in *Hydra* nematocyst. *Science* 265, 402-404.

Humann, P. 1996. Reef Creatures: Florida, Caribbean, Bahamas. New World Publications, Inc. USA

Hyman, L.H. 1940. The Invertebrates. Protozoa through Ctenophora. McGraw-Hill Book Company, Inc. USA. 726 p.

Jacob, H.S. & S.E. Lux. 1968. Degradation of membrane phospholipids and thyols in peroxide hemolysis: studies in vitamin E deficiency. *Blood* 32, 549-568.

Kaplan, E.H. 1982. Peterson Field Guides. Coral Reefs: Caribbean and Florida. Houghton Mifflin Company. Boston. 288 p.

Karlsson, E., Harvey, A.L., Aneiros, A. & O. Castaneda. 1993. Potassium channels toxins from marine animals. *Toxicon* 31, 497-540.

Kem, W.R. 1988. Sea anemone toxin: structure and action. En: *The Biology of Nematocyst*. (Lenhoff, H.M. & Hessinger, D.A., Eds). Academic Press, San Diego. p. 375-405.

Kem, W.R., Parten, B., Pennington, M.W., Dunn, B.M & D. Price. 1989. Isolation and characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochem. J.* 28, 3483-3489

Knowlton, N. & B. D. Keller. 1983. A new, sibling species of snapping shrimp associated with the Caribbean sea anemone *Bartholomea annulata*. *Bull. Marine Sciences* 33, 2, 353-362.

Lehmann, A.L. 1980. Dosis Letal o Efectiva Media: Un cálculo manual, fácil y rápido. *Archivos de Farmacología y Toxicología* (Madrid) 6, 161-178.

Levine, D.M. & O.J. Blanchard. 1980. Acclimation of two shrimps of the Genus *Periclimenes* to sea anemones. *Bull. Marine Sciences* 30, 2, 460-466.

Limbaugh, C., Pederson, H. & F.A. Chace. 1961. Shrimps that clean fishes. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean* 11 (1-4), 237-257.

Lotan, A., Fishman, L., Loya. & E. Zlotkin. 1995. Delivery of a nematocyst toxin. *Nature* 375, 8, 456.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

- Macek, P. 1992. Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones (*Actinaria*). F.E.M.S. Microbiol. Immunol. 105, 121-130.
- Macek, P., Belmonte, G., Pederzoli, C. & G. Menestrina. 1994. Mechanism of action of equinatoxin II, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia equina* L. belonging to the family of actinoporins. Toxicology 87, 227-234.
- Malpezzi, E.L., de Freitas, J.C., Muramoto, K. & H. Kamiya. 1993. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by novel procedure. Toxicon 31, 7, 853-864.
- Maretic, Z. & F.E. Russell. 1983. Stings by the sea anemone *Anemonia sulcata* in the Adriatic Sea. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32, 891-896.
- Mariscal, R.N. 1974. Nematocyst. En: *Coelenterate Biology, Reviews and New Perspectives* (Lenhoff, H.M. & L. Muscatine., Eds). Academic Press, New York. p. 129-178.
- Martin, E.J. 1968. Specific antigens released into sea water by contracting anemones (Coelenterata). Comp. Biochem. Physiol., 25, 169-176.
- Mathias, A.P., Ross, D.M. & M. Schachter. 1960. The distribution of 5-hydroxytryptamine, tetramethylammonium, homarine, and other substances in sea anemones. J. Physiol. 151, 296-311.
- McKay, M.C. & P.A.V. Anderson. 1988. Preparation and properties of cnidocytes from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. Biol. Bull. 174, 47-53.
- Mead, J.F. 1976. Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes. Free Radic. Biol. Med 1, 51-68.
- Merino-Ibarra, M. & L. Otero-Dávalos. 1983. Atlas Ambiental Costero –Puerto Morelos, Quintana Roo-. CONACYT-UNAM.
- 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, 67-78.
- Norton, R.S. 1991. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. Toxicon 29, 1051-1084.
- Phillips, J.H. & D.P. Abbott. 1957. Isolation and assay of the nematocyst toxin of *Metridium senile*. Biol. Bull. 113, 296-301.
- Rathmayer, W. & L. Béress. 1976. The effects of toxins from *Anemonia sulcata* (Coelenterata) on neuromuscular transmission and nerve action potentials in the crayfish (*Astacus leptodactylus*). J. Comp. Physiol 109, 373-382.

- Rice-Evans, C.A. 1994. Formation of free radicals and mechanism of action in normal biochemical processes and pathological states. En: C.A. Rice-Evans., R.H. Burdon (Eds.), *Free Radical Damage and It's Control*. Elsevier Science B.V.
- Rios, C. & A. Santamaría. 1991. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem. Res.* 16, 1139-1143.
- Romey, G., Abita, J. P., Schweitz, H., Wunderer, G. & M. Lazdunski. 1976. Sea anemone toxin: a tool to study molecular mechanism of nerve conduction and excitation-secretion coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 11, 4055-4059.
- Ruíz-Rentería, F., Van Tussenbroek, B. & E. Jordán-Dahlgren. 1998. Characterization of the Puerto Morelos (México) CARICOMP site. P.57-66. En: *Caribbean Coastal Marine Productivity (CARICOMP)*. UNESCO. Paris.
- Sánchez-Rodríguez, J., Zugasti-Cruz, A. & J.W. Burnett. 2001. Cutaneous sting by *Bartholomea annulata*. *Contact Dermatitis* 44, 314-315.
- Schweitz, H., Vincent, J.P., Barhanin, J., Frelin, C., Linden, G., Hugues, M. & M. Lazdunski. 1981. Purification and pharmacological properties of eight sea anemone toxins from *Anemonia sulcata*, *Anthopleura xanthogrammica*, *Stoichactis giganteus* and *Actinodendron plumosum*. *Biochemistry* 20: 5245-5252.
- Schweitz H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J. M., Béress, L. & M. Lazdunski. 1995. Kalicludines and Kalipsetine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 270, 25121-25126.
- Schweitz, H., Bidard, J.N., Frelin, C., Pauron, D., Vijverberg, H.P., Mhasneh, D.M., Lazdunski, M., Vilbois, F. & A. Tsugita. 1985. Purification, sequence, and pharmacological properties of sea anemone toxins from *Radianthus paumotensis*. A new class of sea anemone toxins acting on the sodium channel. *Biochemistry* 24, 3554-3561.
- Shapiro, B.I. 1968. Purification of a toxin from tentacles of the anemone *Condylactis gigantea*. *Toxicon* 5, 253-259.
- Shibata, S., Dunn, D. F., Kuchii, M., Kashiwagi, M. & T.R. Norton. 1974. Cardiac stimulant action of extracts of some coelenterates on rat atria. *J. Pharm. Sci.* 63, 1332-1333.
- Shick, J.M. 1991. *A Functional Biology of Sea Anemones*. Chapman & Hall, Great Britain.
- Simpson, R.J., Reid, G.E., Moritz, R.L., Morton, C. & R.S. Norton, 1990. Complete amino acid sequence of tenebrosin-C, a cardiac stimulatory and haemolytic protein from the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Eur. J. Biochem.* 190, 605-612.
- Tardent, P. 1995. The cnidarian cnidocyte, a high-tech cellular weaponry. *BioEssays* 17,4, 351-362.
- Toom, P.M., Larsen, J.B., Chan, D.S. Pepper, D.A. & W. Price. 1975. Cardiac effects of *Stomolophus meleagris*. *Toxicon* 13, 159-164.

- Van Ginkel, G. & A. Sevanian. 1994. Lipid peroxidation-induced membrane structural alterations. *Meth. Enzymol.* 233, 273.
- Vincent, J.P., Balerna, M., Fosset, M. & M. Lazdunski. 1980. Binding of sea anemone toxin to a receptor sites associated with gating system of sodium channel in synaptic nerve endings *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3, 1646-1650.
- Warashina, W. & S. Fujita. 1983. Effect of sea anemone toxins on the sodium inactivation process in crayfish axons. *J. Gen. Physiol.* 81, 305-324.
- Warashina, A., Jiang, Z.Y. & T. Ogura. 1988. Potential-dependent action of *Anemonia sulcata* toxins III and IV on sodium channels in crayfish giant axons. *Pflügers Arch.* 411, 88-93.
- Weber, J., Klug, M. & P. Tardent. 1988. Chemistry of *Hydra* nematocyst. En: *The Biology of Nematocyst* (Lenhoff, H.M. and Hessinger, D.A., Eds). San Diego: Academic Press. p. 427-444.
- Welsh, J. H. P. & B. Prock. 1958. Quaternary ammonium bases in the coelenterates. *Biol. Bull.* 115, 551-561.
- Williamson, J.A., Fenner, P.J., Burnett, J.W & J.F. Rifkin (Eds.). 1996. *Venomous and Poisonous Marine Animals. A Medical and Biological Handbook.* University of New South Wales Press, Sydney. 504 p.
- Yost, G.A. & R.D. O'Brien. 1978. Isolation of the two components of *Condylactis* toxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 185: 483-487.
- Zorec, R., Tester, M., Mašek, P. & W. T. Mason. 1990. Cytotoxicity of equinatoxin-II from the sea anemone *Actinia equina* involves ion channel formation and an increase in intracellular calcium activity. *J. Membrane Biol.* 118, 243-249.