

Tesis de Posgrado

Una nueva actividad citolítica en Antozoos : caracterización y significado biológico

Meinardi, Elsa Noemí

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Meinardi, Elsa Noemí. (1995). Una nueva actividad citolítica en Antozoos : caracterización y significado biológico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2761_Meinardi.pdf

Cita tipo Chicago:

Meinardi, Elsa Noemí. "Una nueva actividad citolítica en Antozoos : caracterización y significado biológico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2761_Meinardi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

TESIS DOCTORAL

***UNA NUEVA ACTIVIDAD CITOLÍTICA EN
ANTOZOOS. CARACTERIZACIÓN Y
SIGNIFICADO BIOLÓGICO***

Autora: Lic. Elsa Noemí Meinardi

Director: Dr. Jorge Florín-Christensen

Co-director: Dr. Julio M. Azcurra

1995

4761
102

PUBLICACIONES COMPRENDIDAS EN ESTA TESIS

1. Comunicaciones a Congresos y Reuniones Científicas

Meinardi, E., Azcurra, J.M., Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J. *Cytolytic and phospholipase activities in molluscs and coelenterates. Biological role and special adaptations of cell membranes.* Primera Reunión de Comunicaciones sobre Investigaciones Antárticas, Buenos Aires, Noviembre 1987.

Meinardi, E., Azcurra, J.M., Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J. *Celenterolisina: una toxin de anémoma no vinculada a nematocistos.* XXVIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB), Huerta Grande, Argentina, Noviembre 1992.

Meinardi, E., Azcurra, J.M., Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J. *Differential effects of sphingomyelin and its phosphono analog on the hemolytic activity of sea anemone toxins.* VII Congress of the Panamerican Society of Biochemists (PAABS), Ixtapa, Mexico, Septiembre 1992.

Meinardi, E., Florin-Christensen, M., Azcurra, J.M., Florin-Christensen, J. *Toxinas hemolíticas inhibidas por esfingomielina en las tres clases del phylum Celenterados.* XXX Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB) Iguazú, Argentina, Octubre 1994

2. Trabajos publicados y en vías de publicación

Meinardi, E., Azcurra, J.M., Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J. *Coelenterolysin: A hemolytic polypeptide associated with the coelenteric fluid of sea anemones,* 1994, *Comp. Biochem. Physiol.* 109B, 153-161, 1994.

Meinardi, E., Florin-Christensen, M., Azcurra, J.M., Florin-Christensen, J. *The molecular basis of the self/non-self selectivity of a cnidarian lytic toxin.* 1995, enviado a publicación.

Meinardi, E., Florin-Christensen, M., Azcurra, J.M., Rasmussen, L., Florin-Christensen, J. *Co-toxinology: The molecular strategies of self indemnity in organisms that release toxins.* 1995, enviado a publicación.

Meinardi, E., Florin-Christensen, M., Azcurra, J.M., Florin-Christensen, J. *The mechanism of cnidarian hemolytic toxin action,* 1995, en preparación.

Agradecimientos

Al doctor Julio Azcurra, por haber puesto a mi disposición el laboratorio de la Cátedra de Biología Celular, donde se realizaron la mayor parte de los experimentos de esta Tesis; también le agradezco, al igual que a los doctores Jorge y Mónica Florin-Christensen, su ayuda y guía en este trabajo.

Al doctor Mauricio Zamponi, Profesor de la Universidad Nacional de Mar del Plata, especialista en Cnidarios, por su colaboración en la determinación de los ejemplares.

Al Instituto Antártico Argentino, por la colaboración económica.

A mis compañeros: Emi, Amalia, Marcelo, Jorge, Gustavo I. y Gabriela, por su respeto, cariño y amistad.

A mi querido amigo y compañero Gustavo Paratcha, porque siempre está dispuesto a ayudarme.

A Mario Ravaglia, por las fotos y por su amabilidad.

A mis familiares y amigos, por el apoyo constante.

Y a mis dos amores, Jorge y Ale.

ÍNDICE

RESUMEN

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ubicación taxonómica

1.1.1. Clasificación

1.1.2. Características del Phylum

1.2. Anatomía de la anémona de mar

1.2.1. Características de *Phymactis clematis*

1.2.2. Distribución geográfica de *Phymactis clematis*

1.3. Nutrición de los antozoos

1.4. Nematocistos

1.4.1. Estructura

1.4.2. Función

1.4.3. Descarga

1.4.4. Efectos químicos y fisiológicos de la toxina de los nematocistos

1.5. Toxinas en celenterados

1.5.1. *Physalia physalis*

1.5.2. *Aiptasia pallida*

1.5.3. *Stichodactyla (Stoichactis) helianthus*

1.5.4. Otras anémonas de mar

1.6. Mecanismos generales de acción citolítica

1.6.1. Toxinas formadoras de poros

1.6.1.1. Lisinas tiol activadas inhibibles por colesterol

1.6.1.2. Lisinas de *Cnidarios* inhibibles por SM

1.6.1.3. α -toxina de *Staphylococcus aureus*

1.6.2. Fosfolipasas con actividad hemolítica

1.6.3. Toxinas con acción detergente

1.7. Fosfolípidos

1.7.1. Historia y clasificación

1.7.2. Presencia y distribución

- 1.7.3. **Metabolismo**
 - 1.7.3.1. Biosíntesis de esfingofosfolípidos
 - 1.7.3.2. Degradación
- 1.7.4. **Rol de los fosfolípidos**
 - 1.7.4.1. Temperatura
 - 1.7.4.2. Nutrientes
 - 1.7.4.3. Edad
 - 1.7.4.4. Otras posibles funciones
- 1.7.5. **Fosfolípidos en las anémonas de mar**
 - 1.7.5.1. Fosfonatos hidrosolubles
 - 1.7.5.2. Esfingofosfolípidos
 - 1.7.5.3. Fosfolípidos en *Phymactis clematis*

Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales empleados

2.2. Procedencia de las anémonas estudiadas

2.3. Extracción de líquido entérico

2.4. Determinación de la actividad hemolítica

2.4.1. Preparación de suspensiones de eritrocitos

2.4.2. Medición de la actividad hemolítica

2.4.3. Cinética de la hemólisis

2.4.4. Determinación de proteínas

2.5. Naturaleza química de la celenterolisina

2.5.1. Examen de la partición en solventes orgánicos

2.5.2. Tratamiento con proteasas

2.5.3. Diálisis

2.5.4. Precipitación con sulfato de amonio

2.5.5. Cromatografía en Sephadex G-50

2.5.6. Cromatografía en presencia de urea 4M

2.5.7. Cromatografía de intercambio iónico

2.5.8. Purificación de la celenterolisina

2.5.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida

2.6. Caracterización de la actividad hemolítica de la celenterolisina

2.6.1. Termolabilidad

2.6.2. Efecto del pH

- 2.6.3. Temperatura óptima
- 2.6.4. Relación dosis-efecto
- 2.6.5. Efecto del Ca^{++} , Mg^{++} y EDTA
- 2.6.6. Agentes oxidantes y reductores
- 2.7. Análisis del mecanismo de acción de la celenterolisina**
 - 2.7.1. Efecto de los inhibidores de proteasas, PMSF y BSA
 - 2.7.2. Actividades fosfolipasas en el líquido entérico
 - 2.7.2.1. Detección de actividad fosfolipasa
 - 2.7.2.2. Determinación de actividad fosfolipasa con fosfatidilcolina radiactiva
 - 2.7.3. Actividad esfingomielinasa en el líquido entérico
 - 2.7.4. Estudio del efecto de diversos lípidos sobre la actividad hemolítica
 - 2.7.4.1. Lípidos puros
 - 2.7.4.2. Extractos lipídicos de eritrocitos
 - 2.7.4.3. Extractos lipídicos de las anémonas de mar
 - 2.7.4.4. Lípidos de las anémonas de mar purificados por CCF
 - 2.7.4.5. Pretratamiento de los eritrocitos con esfingomielinasa
 - 2.7.4.6. Sensibilidad de los eritrocitos de distinto origen
 - 2.7.4.7. Unión de la lisina a los glóbulos rojos
 - 2.7.5. Interacción de la celenterolisina con los liposomas
 - 2.7.5.1. Preparación de liposomas encapsulando 5(6)-carboxifluoresceína
 - 2.7.5.2. Estudio de la lisis de liposomas por el registro continuo de fluorescencia
 - 2.7.5.3. Separación de los lípidos polares y no polares de eritrocitos por cromatografía en columna
 - 2.7.5.4. Interacción de la celenterolisina con liposomas de distinto origen
 - 2.7.6. Unión de la celenterolisina a fosfolípidos
 - 2.7.6.1. Preparación de fosfatidilcolina inmovilizada sobre Sepharosa 4BCL
 - 2.7.6.2. Preparación de esfingomielina inmovilizada sobre Sepharosa 4BCL
 - 2.7.6.3. Protocolo para la interacción de la celenterolisina con fosfolípidos inmovilizados
 - 2.7.6.4. Interacción de la celenterolisina con esfingomielina
 - 2.7.6.5. Incubación de eritrocitos con celenterolisina desnaturalizada por calor
- 2.8. Determinación del origen de la celenterolisina**
 - 2.8.1. Preparación y aislamiento de los nematocistos
 - 2.8.2. Descarga de los nematocistos

- 2.8.3. Caracterización del contenido soluble de los nematocistos
- 2.8.4. Disección de especímenes de anémona
- 2.8.5. Examen del rol de los microorganismos asociados a las anémonas en la producción de celenterolisina

Capítulo 3. RESULTADOS

3.1. Actividad citolítica en el líquido entérico de las anémonas de mar

- 3.1.1. Hallazgo de la celenterolisina de *Phymactis clematis*
- 3.1.2. Presencia de actividad lítica en el celenterón de otras anémonas de mar

3.2. Naturaleza química de la celenterolisina

- 3.2.1. La actividad hemolítica no se debe a lípidos
- 3.2.2. La actividad hemolítica es sensible a proteasas
- 3.2.3. La celenterolisina no es dializable
- 3.2.4. Precipitación con sulfato de amonio
- 3.2.5. Comportamiento frente a resinas de intercambio iónico
- 3.2.6. Cromatografía sobre Sephadex G-50
- 3.2.7. El tratamiento con urea 4M no afecta la elución de la celenterolisina
- 3.2.8. La actividad hemolítica es termolábil
- 3.2.9. Protocolo para la purificación de la celenterolisina

3.3. Caracterización de la acción de la celenterolisina

- 3.3.1. El pH óptimo de la celenterolisina es 8
- 3.3.2. La temperatura óptima es 37°C
- 3.3.3. Curva dosis-efecto. Cálculo del número medio de lesiones por eritrocito como función de la concentración
- 3.3.4. La actividad hemolítica no es afectada por el Ca^{++} ni por el Mg^{++} y es insensible al EDTA
- 3.3.5. Diversos agentes oxidantes y reductores no alteran la actividad hemolítica

3.4. Origen de la celenterolisina

- 3.4.1. Existen dos agentes hemolíticos en los tejidos de la anémona *P. clematis*, separables por cromatografía en Sephadex G-50, que responden a la celenterolisina y a la lisina de los nematocistos

- 3.4.2. El líquido entérico contiene sólo celenterolisina
- 3.4.3. Distintas partes del cuerpo de la anémona *P. clematis* contienen diferentes proporciones de la celenterolisina y de la lisina de los nematocistos
- 3.4.4. La producción de celenterolisina no se debe a los microorganismos asociados a las anémonas de mar

3.5. Mecanismo de acción de la celenterolisina

- 3.5.1. La actividad hemolítica no se debe a las actividades proteasa, fosfolipasa ni esfingomielinasa
 - 3.5.1.1. Actividad proteasa
 - 3.5.1.2. Actividad fosfolipasa
 - 3.5.1.3. Actividad esfingomielinasa
- 3.5.2. Rol desempeñado por diversos lípidos en la actividad hemolítica
 - 3.5.2.1. La actividad es inhibida por la esfingomielina
 - 3.5.2.2. La actividad no es afectada por la asolectina, la fosfatidilcolina ni el colesterol
 - 3.5.2.3. Los extractos lipídicos de los eritrocitos inhiben la hemólisis
 - 3.5.2.4. El tratamiento de los eritrocitos con esfingomielinasa suprime su sensibilidad a la celenterolisina
 - 3.5.2.5. Los eritrocitos con mayor contenido de esfingomielina son más sensibles a la celenterolisina
 - 3.5.2.6. Unión de la celenterolisina a los eritrocitos. Efecto del tratamiento con esfingomielinasa
 - 3.5.2.7. La celenterolisina no se une a los lípidos de la anémona
- 3.5.3. La celenterolisina puede inducir la liberación de 5(6)-CF encapsulada en los liposomas. La composición lipídica de los liposomas es crítica
 - 3.5.3.1. La celenterolisina lisa los liposomas de lípidos de eritrocitos pero no de lípidos de anémonas de mar
 - 3.5.3.2. La lisis de los liposomas de lípidos de eritrocitos es inhibida por la esfingomielina pero no por otros lípidos
 - 3.5.3.3. El agregado de esfingomielina, pero no de otros fosfolípidos, confiere sensibilidad a los liposomas preparados con los lípidos de las anémonas de mar
 - 3.5.3.4. La presencia de SM es necesaria pero no suficiente para la lisis de los liposomas

- 3.5.4. La celenterolisina se une a SM-Sepharosa 4B pero no a PC-Sepharosa 4B
- 3.5.5. La celenterolisina interactúa con liposomas de lípidos de glóbulos rojos y SM pero no con liposomas de lípidos de la anémona de mar ni de SPnL

Capítulo 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. La celenterolisina y sus propiedades

- 4.1.1. Características de la celenterolisina de *Phymactis clematis*
- 4.1.2. Celenterolisina y la toxina de los nematocistos
- 4.1.3. Requerimientos de lípidos para la actividad LÍTICA
- 4.1.4. Mecanismo de acción de la celenterolisina
 - 4.1.4.1. La celenterolisina interactúa con los lípidos
 - 4.1.4.2. La interacción con esfingomiélin produce cambios irreversibles en la celenterolisina
 - 4.1.4.3. La acción de la celenterolisina es cooperativa

4.2. Mecanismo molecular de la autotolerancia

4.3. Posibles funciones de la celenterolisina

BIBLIOGRAFÍA

Resumen

En esta Tesis se presentan dos aspectos de la biología de los celenterados. Por un lado, se describe el hallazgo y la caracterización de la *celenterolisina*, una potente toxina citolítica encontrada en el celenterón del antozoo *Phymactis clematis*. Por otro lado, se presenta la elucidación del mecanismo de *autotolerancia* de la toxina, es decir, la forma en que la celenterolisina ataca a las células de otros organismos sin afectar los tejidos de la anémona.

Se ha determinado que la celenterolisina es de naturaleza peptídica, con un peso molecular aproximado de 18.000. La actividad hemolítica de preparaciones de la misma purificadas por precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico y de filtración en Sephadex G-50, tiene un pH óptimo de 8, es termolábil, no es dependiente de Ca^{++} ni de Mg^{++} , y es fuertemente inhibida por esfingomiélica (SM) de diverso origen.

La celenterolisina fue comparada con la hemolisina extraída de nematocistos purificados, determinándose que se trata de dos principios hemolíticos diferentes, que poseen además una distinta distribución en las partes del cuerpo de las anémonas.

Los estudios del mecanismo de acción de la celenterolisina indicaron que su actividad no es debida a fosfolipasas, esfingomiélinasas ni proteasas. El estudio de la hemólisis de glóbulos rojos con distinto contenido de SM indicó una mayor actividad hemolítica acompañando un mayor contenido de SM.

Mediante experimentos en los que se utilizaron liposomas con carboxifluoresceína encapsulada, se halló que: i) la lisina posee una fuerte actividad lítica sobre los liposomas preparados con lípidos de eritrocitos bovinos, pero es completamente inactiva contra los liposomas de lípidos extraídos de las anémonas de mar; ii) si pequeñas cantidades de SM bovina (1% m/m) se agregan a los lípidos de la anémona, los correspondientes liposomas adquieren sensibilidad a la lisina, lo que no ocurre si en lugar de SM, se utiliza fosfatidilcolina u otros lípidos, señalando un rol crucial para la SM en el proceso.

Una notable característica de los celenterados es la particular abundancia en sus membranas de análogos fosfónicos de la esfingomiélica (SPnL), principalmente la ceramida aminoetil fosfonato. Significativamente, estos organismos no poseen la SM usualmente presente en otros metazoos. El significado de estas particularidades bioquímicas era hasta ahora desconocido. En este trabajo, he planteado la hipótesis de que las toxinas líticas y la composición lipídica son rasgos coadaptados que permiten a los celenterados destruir otros organismos, permaneciendo ellos mismos indemnes. Comprobando categóricamente esta hipótesis, se hicieron las siguientes observaciones originales: i) en contraste con la SM, los SPnL no inhiben la hemólisis causada por la celenterolisina; ii) la celenterolisina se une a los liposomas de SM pero no a los liposomas de SPnL. Es decir, estos hallazgos demuestran que la celenterolisina interactúa en forma muy diferente con estos dos análogos lipídicos casi indistinguibles.

De este modo, el trabajo presentado en esta Tesis establece las bases para comprender de qué modo estos organismos pueden contener en sus cavidades gastrocélulas un poderoso agente lítico para otras células, siendo ellos resistentes al mismo. Celenterolisina y SPnL representan así los dos elementos de una adaptación no sospechada hasta el presente. ♦

Abreviaturas y símbolos

AG:	ácido graso
AEPn:	amino etil fosfonato
Å:	Angström
βMer:	β-mercaptoetanol
BSA:	albúmina de suero bovino
CAEPn:	ceramidaaminoetilfosfonato
CCF:	cromatografía en capa fina
Chol:	colesterol
CL:	celenterolisina
CM-Sephadex:	carboximetil Sephadex 50
CMAEPn:	ceramida metil amino etil fosfonato
cpm:	cuentas por minuto
CSN:	contenido soluble de nematocistos
DG:	diacilglicerol
DTNB:	dinitrobenzoceno
DTT:	ditiotreitól
EDTA:	etilendiaminotetraacetato
GPnL:	glicero fosfolípido
GR:	glóbulos rojos
kDa:	kilo Dalton
LE:	líquido entérico
MAEPn:	metil amino etil fosfonato
MG:	monoacilglicerol

PC:	fosfatidilcolina
PE:	fosfatidiletanolamina
PL:	fosfolípido
PLA:	fosfolipasa A
PLB:	fosfolipasa B
PLC:	fosfolipasa C
PM:	peso molecular
PMSF:	fenilmetilsulfonilfluoride
PnL:	fosfonolípido
POPOP:	2,2'-phenylen-bis(5-phenyloxazol)
PPO:	2,5-diphenyloxazole
SDS:	duodecil sulfato de sodio
SM:	esfingomielina
SMasa:	esfingomielinasa
SPnL:	esfingofosfonolípido
TBS:	buffer 20 mM Tris-HCl/145 mM ClNa
TG:	triacilglicerol
TNB:	buffer 10 mM Tris-HCl/145 mM ClNa
TRIS:	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
μg :	microgramos
μl :	microlitros
UH:	unidades hemolíticas
Vo:	volumen de exclusión
Vt:	volumen total

Capítulo 1

Introducción

1.1. Ubicación taxonómica

1.2. Anatomía de la anémona de mar. Características de

Phymactis clematis

1.3. Nutrición de los antozoos

1.4. Nematocistos

1.5. Toxinas en celenterados

1.6. Mecanismos generales de acción citolítica

1.7. Fosfolípidos

La presencia de poderosas toxinas hemolíticas es característica del phylum *Coelenterata*. Es creencia general que las mismas están exclusivamente asociadas a los nematocistos, organelas venenosas diagnósticas de este importante y diverso grupo de animales. En este estudio, mostraré que, además de las hemolisinas asociadas a estas estructuras, existe una actividad hemolítica diferente liberada hacia la cavidad gastrovascular en una anémona de mar que abunda en la costa atlántica argentina, *Phymactis clematis*. Debido a que los epitelios que recubren esta cavidad se hallan directamente expuestos al fluido entérico, ha resultado importante establecer el mecanismo por el cual sus células no sufren el efecto de las citolisinas, que rápidamente lisan células provenientes de otros organismos.

1.1. UBICACIÓN TAXONÓMICA

1.1.1. Clasificación, siguiendo a Grassé, 1987.

Sub Reino:	<u>Metazoos</u>
Rama:	<u>Eumetazoos</u>
Grado:	<u>Radiados</u>
Phylum:	<u>Cnidarios</u> Hatschek, 1888
Clase:	<u>Anthozoa</u> Ehrenberg, 1834
SubClase:	<u>Hexacoralia</u> Haeckel, 1866
Orden:	<u>Actiniaria</u> Hertwig, 1882
SubOrden:	<u>Nynantheainea</u> Carlgren, 1899
Tribu:	<u>Thenaria</u> Carlgren, 1899
SubTribu:	<u>Endomyaria</u> Stephenson, 1921
Familia:	<u>Actiniidae</u> Gosse, 1858
Género:	<u>Phymactis</u> Milne Edwards, 1857
	<u>Phymactis clematis</u> Dana, 1849

1.1.2. Características del phylum (según Meglitsch, 1967)

El phylum *Cnidaria*, el cual comprende actualmente unas 9000 especies, presenta las siguientes características sobresalientes:

1. La simetría es radial, primaria, en torno al eje oral-aboral derivado de un eje primario de la gástrula; asimetría birradial con el desarrollo de un plano sagital, manteniendo caracteres radiales externos.

2. Cuerpo formado por tres capas: la epidermis, externa, que procede del ectodermo; la más interna, la gastrodermis, procedente del endodermo; y una mesoglea, celular o no, que en gran parte deriva del ectodermo.
3. Una cavidad del cuerpo, el celenterón, que deriva del intestino primitivo y una única abertura, la boca, procedente del blastoporo.
4. Órganos especiales de ataque y de defensa, llamados nematocistos, formados por células intersticiales.
5. Casi siempre existen, alrededor de la boca, una o más coronas o grupos de tentáculos.
6. Ausencia del aparato excretor y del respiratorio, aunque con un aparato neurosensorial compuesto por una red nerviosa, formada por protoneuronas no polarizadas y por varios tipos de células sensoriales, a veces reunidas en órganos sensoriales especiales.
7. Una marcada tendencia hacia el polimorfismo, con formas de hidroides y de medusas y, con frecuencia, con una variedad de zooides especializados, que se desarrollan juntos en una colonia.

1.2. ANATOMÍA DE LA ANÉMOMA DE MAR

El Orden Actiniaria comprende unas 1000 especies de anémonas marinas, solitarias, cuyo cuerpo cilíndrico está dividido en tres regiones: el **disco oral**, la **columna** y la **base**.

El **disco oral** es plano, con un margen circular muchas veces lobulado, provisto con **tentáculos**. Los mismos pueden ser pocos en número, arreglados en un anillo marginal simple, o más numerosos cubriendo la mayor parte del disco oral, dispuestos en dos o más ciclos alternados, o en forma radial. El número definitivo es, frecuentemente, un múltiplo de seis, duplicándose en cada ciclo sucesivo desde el más interno, así: 6, 6, 12, 24, 48, etcétera. Los tentáculos interiores son los más antiguos y, usualmente, los más largos, estando relacionados con los espacios inter-mesenteriales. En la mayoría de las anémonas hay un tentáculo por cada endocele y cada exocele y, todos los ciclos, excepto el más externo, son endocélicos. Los seis tentáculos más internos pertenecen al endocele de los mesenterios primarios; el siguiente ciclo, al endocele de los secundarios; etcétera. Dado que los ciclos de mesenterios alternan, los ciclos de tentáculos sucesivos son, necesariamente, alternados. Como el número de mesenterios, y consecuentemente de endocelos, se incrementa con la edad, el número de tentáculos también aumenta y puede, eventualmente, alcanzar el centenar. Los tentáculos son, usualmente, una simple estructura cónica, aunque también pueden poseer una banda espiral de nematocistos.

La unión del disco oral con la columna es llamada **margen**, y puede estar marcada por un surco. La **pared** del cuerpo se compone de una **epidermis** externa, una **mesoglea** y una **gastrodermis** interna. Dicha pared está marcada por líneas longitudinales, que representan la unión interna de los mesenterios. La **columna** presenta una variedad de estructuras

ornamentales, adhesivas o de protección. Muchas de éstas consisten en **verrugas**, protuberancias dispuestas de manera longitudinal entre la unión de los mesenterios, como en el género *Bunodactis*. Estas proyecciones cóncavas de la pared del cuerpo, provistas de una musculatura especial, poseen una epidermis glandular. Por medio de estas estructuras adhesivas, la anémona puede rodearse de conchillas u otros objetos, presumiblemente para protección.

En los géneros como *Actinia*, *Anemonia* y *Anthopleura*, en el margen aparecen unos cuerpos redondeados u ovals, cubiertos con nematocistos y denominados **acrorhagi**. En muchos miembros de las familias *Actiniidae* y *Phyllactidae*, los acrorhagi pueden ser estructuras complejas, formados por expansiones foliosas. También se pueden encontrar **vesículas** simples, o formadas por proyecciones del cuerpo, semejantes a acrorhagi, como las que se hallan en las familias *Allicidae* y *Phyllactidae*.

En algunas anémonas, la pared del cuerpo está perforada por poros, los **cíncidos**, que permiten la emisión de agua cuando la columna se contrae. La base del cuerpo está separada de la columna por una constricción, el **limbus**, luego del cual existe una expansión, el **disco pedal**, usado para la adhesión a piedras, conchas y otros objetos.

En el extremo superior de la columna, un **collar** limita una hendidura, la **foseta**, por encima de la cual se encuentra la fina pared del **capítulo**. El **peristoma** separa la **boca** de los tentáculos y la epidermis se invagina en su interior, formando una **faringe**, en cuyas comisuras se encuentran una o dos

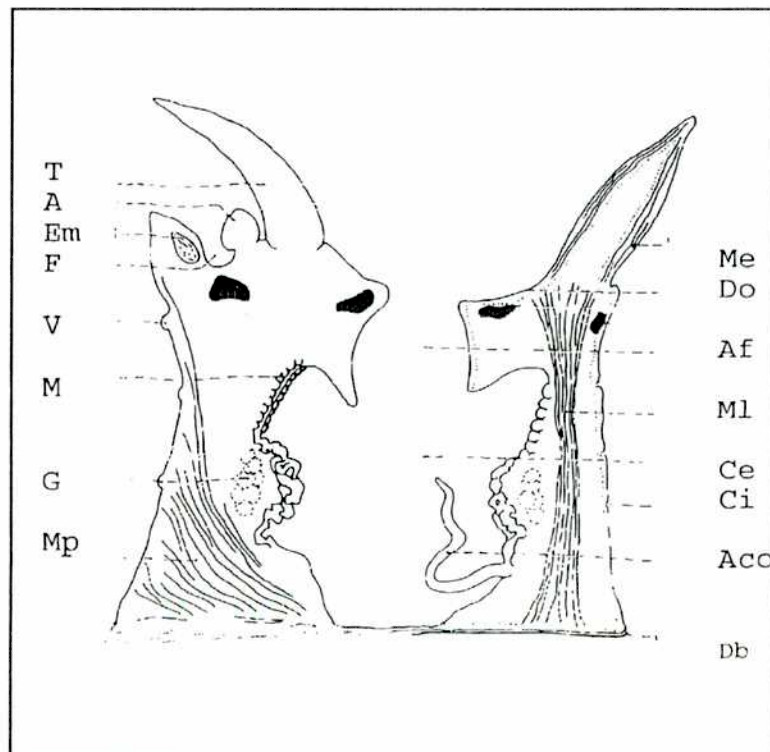
ranuras flageladas, los **sifonoglifos**, que dirigen una corriente de agua hasta el fondo de la faringe. La compresión lateral de la boca y de la faringe, y la presencia de sifonoglifos, transforman la simetría radial en birradial. Los **mesenterios**, que dividen el celenterón aumentando su superficie, pueden ser todos completos, pero generalmente completos e incompletos están presentes. Los primarios van desde la pared del cuerpo a la faringe. Los secundarios, más cortos, no llegan a la faringe. Entre estos últimos pueden haber otros terciarios, aún más cortos. Se denomina **endocele** al espacio entre los dos miembros de un par de mesenterios, mientras que el **exocela** es el espacio entre dos pares diferentes. En el margen de los mesenterios hay **filamentos mesenteriales**. Por encima del extremo de la faringe los filamentos son trilobados. El lóbulo medio es el **conducto cnidoglandular**.

Después del extremo de la faringe terminan los lóbulos laterales, permaneciendo únicamente los conductos cnidoglandulares, en los que se encuentran abundantes **cnidoblastos** y **células glandulares**. Las células glandulares son flageladas y poseen un ergastoplasma muy desarrollado con abundantes gránulos densos, que contienen proteínas que participan de la digestión extracelular. Las células de la gastrodermis, que tapizan la cavidad del celenterón, poseen además microvellosidades que facilitan la absorción de alimentos.

A continuación del extremo basal de la faringe, en muchas familias, los mesenterios se prolongan en filamentos libres, denominados **acontios**, los cuales están cargados de nematocistos. La función de dichas estructuras en

esta localización es desconocida, pero se presume que podrían tener un rol defensivo, dado que, cuando la anémona se contrae, puede extruir los acontos por la boca, como así también por los cínclicos. Los acontos y los cínclicos están ausentes en la Familia en estudio.

Las gónadas pueden localizarse cerca de la base de los filamentos mesenteriales.



Esquema de un corte transversal de la anémona de mar (según Grassé, 1987). T. Tentáculo, A. Acroraghi, Em. Esfínter marginal, F. Foseta, V. Vesícula, M. mesenterio, G. Gonada, Mp. Músculo parietal, Me. musculatura ectodérmica, Do. Disco oral, Af. Actinofaringe, ML. Músculo longitudinal, Ce. Cavidad entérica, Ci. Cínclico, Aco. Acontio, Db. Disco basal.

1.2.1. Características de *Phymactis clematis* (tomado de Zamponi, 1977)

La forma y el tamaño del cuerpo depende del estado de expansión y del tipo de sustrato al cual esté adherido el ejemplar. El promedio de tallas es de 2,7 cm para el ancho y de 3,7 cm para la longitud del cuerpo.

Los tentáculos son de color amarillo con tendencia al amarillo pálido, mientras que los acrorhagi son blanquecinos y la columna es marrón-grisácea, provista de vesículas de color oscuro, verdosas. La columna está provista de vesículas, que se disponen sobre las paredes del exo y endocele respectivamente; se distribuyen en forma irregular y se extienden desde la base hasta el extremo oral, llegando al parapeto. Este último lleva acrorhagi dispuestos en dos filas circunvalando la corona de tentáculos. El ectodermo columnar se presenta en pliegues; es alto, con abundantes espirocistos dispuestos en la periferia. La mesoglea es delgada y conectiva. El disco pedal es chato, adherente y su superficie se halla cubierta de vesículas.

El disco oral es menos ancho que la base. Los tentáculos se disponen de acuerdo con el plan $6 + 6 + 12 = 24$. Son gruesos, de longitud moderada y recorridos longitudinalmente por estrías. En su totalidad se hallan curvados hacia la boca y los ciclos más internos son más largos que los más externos. El ectodermo de los tentáculos es una superficie plegada, alta y con una abundante batería de nematocistos. La mesoglea, mucho más reducida que la capa anterior, se introduce en los pliegues formados por el ectodermo. El endodermo, de espesor más reducido que la mesoglea, limita con la cavidad del tentáculo.

1.2.2. Distribución geográfica de *Phymactis clematis*

Phymactis clematis es muy abundante en las costas marplatenses argentinas. Su distribución geográfica en nuestro país es la siguiente (Zamponi, 1977): Mar del Plata (Punta Cantera, Playa Grande, Cabo Corriente, Punta Piedra), Santa Elena del Mar, Santa Clara del Mar. También se encuentra en Baja California, Nicaragua, Panamá, islas Pearl, en la costa oeste de América del Sur al sur de Tierra del Fuego y en la isla Juan Fernández y en la isla de Pascua, en el océano Pacífico.

1.3. NUTRICIÓN DE LOS ANTOZOOS

La captura del alimento se realiza por medio de los movimientos de prensión de los tentáculos y también se debe a la acción de los espirocistos y de los nematocistos propiamente dichos. Las presas son llevadas a la cavidad entérica gracias a los movimientos peristálticos de la faringe y a las glándulas viscosas presentes en ellos; además de la continua entrada de agua provocada por los sifonoglifos que, como se mencionó anteriormente, son ranuras flageladas que dirigen una corriente de agua hasta el fondo de la faringe, y los conductos flagelados de los filamentos mesenteriales. Estas corrientes transportan las partículas alimenticias y bañan las superficies internas, provocando también un intercambio respiratorio más eficaz.

Luego de la ingestión, el alimento es atacado rápidamente por enzimas

digestivas, secretadas por las células glandulares de la cavidad gástrica (digestión extracelular) (Hyman, 1940; Grassé, 1987). La presencia de una presa en la cavidad entérica provoca la secreción de enzimas proteolíticas de las células glandulares.

La digestión se completa en las vacuolas alimenticias de las células endodérmicas fagocitarias (digestión intracelular) (Grassé, 1987).

Los residuos no digeridos son expulsados por la boca. Es evidente que el celenterón y sus ramificaciones constituyen una verdadera cavidad gastrovascular, que combina las funciones digestivas con las de transporte.

El conocimiento sobre la dieta de los celenterados actiniarios es muy escaso. Las anémonas se alimentan de casi todo el material susceptible de ser capturado o retenido para su posterior ingestión. En el caso de *Phymactis clematis*, se ha encontrado que los moluscos pelecípodos son los más abundantes en su régimen alimentario, el cual consiste, además, de crustáceos y algas; mientras que no existe selectividad en cuanto a la capacidad de digestión.

En base al estado de preservación del material, se pudo deducir que la mecánica digestiva es un proceso lento y poderoso. Esta afirmación surge de la observación de que los restos de conchilla, en lugar de ser expulsados por el organismo consumidor, se van desgastando gradualmente hasta constituir restos orgánicos transparentes y de escaso espesor (Zamponi, 1979).

Muchos trabajos han afirmado que el alimento sufre una digestión

preliminar sólo cuando se halla en contacto con el filamento mesenterial; sin embargo, Jordan (1907) realizó un experimento en el cual proveyó a las anémonas alimento embolsado con papel de filtro. Al ser luego eyectada, la bolsa se encontraba vacía.

Ishida (1936) demostró la presencia de proteasas y lipasas en el fluido entérico de *Actinia*, tres horas después de la alimentación. Se han detectado serín-proteasas, del tipo de la tripsina y de la quimotripsina de los vertebrados, en la anémona *Actinia equina* (Van-Praët, 1982).

En la alimentación normal, la presa es asida por los filamentos septales y reducida a fragmentos, bajo la acción de una proteasa semejante a la tripsina, activa en solución alcalina, secretada principalmente por las células glandulares de las bandas cnidoglandulares; los carbohidratos no son atacados. Posteriormente a esta digestión preliminar, ocurre la usual ingestión por la gastrodermis, particularmente en los mesenterios, y la digestión se completa intracelularmente por medio de proteasas, del tipo pepsina y erepsina, y lipasas. En los filamentos de *Metridium*, y en la gastrodermis en general, se producen proteasas, lipasas y maltasa (Bodansky, 1924).

Después de la ingestión de un número de piezas de alimento, los tentáculos reaccionan más y más lentamente, cesando finalmente la respuesta. Los tentáculos que no fueron involucrados en una respuesta pueden reaccionar ante el alimento, no así tentáculos ya involucrados. Este hecho sugiere que una condición de saciedad interna afecta la reactividad de los tentáculos,

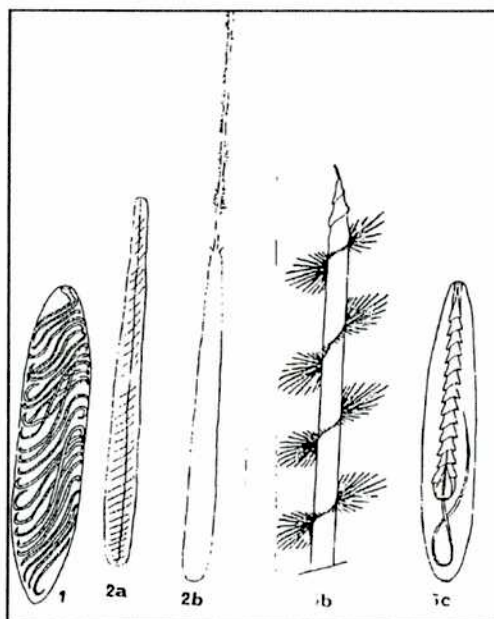
posiblemente por fatiga sensorial. Las anémonas pueden subsistir por largos períodos sin alimento, pudiendo disminuir fuertemente de tamaño durante tales períodos.

1.4. NEMATOCISTOS

1.4.1. Estructura

Estas estructuras, también denominadas células punzantes o urticantes, son diagnósticas del Phylum Cnidaria. No son células sino organoides celulares, producidos por una célula intersticial denominada **cnidoblasto**.

El cnidoma, es decir, el conjunto de nematocistos o cnidocistos, diagnóstico de la familia Actiniidae está formado por dos tipos de nematocistos: espirocistos, distribuidos fundamentalmente en los tentáculos y el disco oral, y los nematocistos propiamente dichos, del tipo atricos sobre todo en acrorhagi, y basitricos y microbásicos mastigóforos. Los espirocistos están limitados a los antozoos zoantharios y se diferencian de los nematocistos propiamente dichos porque no poseen ningún sistema disparador para la apertura de la cápsula, y porque poseen una cápsula de pared simple, con un filamento en su interior de diámetro uniforme.



Algunos ejemplos de nematocistos frecuentes en las anémonas de mar.
 1. Atrico no evaginado. 2. Basitrico no evaginado (a) y evaginado (b).
 3. Microbásico mastigófora evaginado (a) y no evaginado (b).

Al madurar el nematocisto, el cnidoblasto se fija a la mesoglea y extiende su extremo distal hacia la superficie epidérmica. Se desarrolla un **cnidocilo**, a modo de pelo rígido, que sirve de disparador cuando se estimula adecuadamente. En el citoplasma aparecen fibras, los mionemas, algunas de las cuales sirven de soporte, mientras que otras son contráctiles. Los nematocistos de *Physalia* no se disparan cuando se anestesia al animal, lo que apoya la suposición de que los mionemas del cnidoblasto contribuyen a la descarga, mientras que algunas fibras de los cnidoblastos de *Hydra* se tiñen como fibras musculares.

1.4.2. Función

Pese a ser éstas unas de las estructuras sub celulares más complejas del reino animal (Burnett et al., 1960), se conoce muy poco aún sobre su función (Hand, 1961). En un estudio realizado con el fin de esclarecer dicho rol, Zamponi y Arca-Tellechea (1988) encontraron diferencias en el número de tipos de nematocistos y en sus tallas, dependiendo de si se trataba de la forma pólipa o medusa. En los primeros, ambos caracteres son mayores que para las medusas. Esto puede estar relacionado con el modo de vida de los pólipos que, al ser sésiles, deben poseer estructuras de tamaño mayor para hacer la captura del alimento tan efectiva como en las formas libres.

Conklin y Mariscal (1976) sostienen que las funciones de los nematocistos pueden resumirse como defensivas y adhesivas; sin embargo, no todos son venenosos y no todos son penetrantes (Mariscal, 1974).

1.4.3. Descarga

Pantin (1942 a.b), a partir de la anémona *Anemonia sulcata*, encontró que (1) la estimulación mecánica con una varilla de vidrio ó (2) la inmersión del animal en una solución alimenticia, no causaban la descarga de los nematocistos, mientras que ambos estímulos, aplicados en forma conjunta, sí lo hacían. Jones (1947) llegó a la misma conclusión con los nematocistos de Hydra.

1.4.4. Efectos químicos y fisiológicos de la toxina de nematocistos

Mariscal (1974), en una extensa revisión sobre el tema, concluyó:

1) existe un número de cnidarios que poseen una toxicidad inherente a sus tejidos, no necesariamente asociada con la presencia de nematocistos. Así, posteriores estudios deberían ser hechos, aislando nematocistos de tejidos, evitando la contaminación cruzada;

2) dado que muchas preparaciones contienen diferentes tipos de nematocistos, las técnicas deberían aislar cada tipo de toxina independientemente;

3) deberían ser desarrollados bioensayos estandarizados con el fin de realizar una comparación entre las toxinas de diferente origen;

4) los experimentos debieran ser diseñados de manera de determinar el sitio de acción de la toxina. Muchas veces, resultados similares son aparentemente diferentes. Por ejemplo, mientras que muchas parecen ser neurotóxicas, otros autores las denominan miotoxinas, por afectar la conductancia de los iones a través de la membrana. Otros estudios sugieren que, cuando la conductancia iónica es la involucrada, la membrana de las células nerviosas es la más afectada;

5) son necesarios trabajos que determinen la estructura química aproximada de las varias toxinas descritas. Por ejemplo, algunas son enzimas, saponinas, histaminas, etcétera, o una combinación de ellas.

Finalmente, las toxinas de celenterados podrían ser la fuente de nuevas drogas o de compuestos bioquímicos de interés humano. Aunque no ha sido

demostrado que un componente del nematocisto esté involucrado, Tabrah et al. (1972) hallaron un agente antitumoral en los extractos de cuatro especies de cnidarios.

1.5. TOXINAS EN CELEENTERADOS

1.5.1. *Physalia physalis*

En 1903 Richet realizó un experimento clásico con el cual demostró que los extractos de los tentáculos de la "fragata portuguesa" *Physalia physalis*, eran capaces de inducir un shock anafiláctico en perros.

Lane y Dodge (1958) encontraron que la toxina de *Physalia* contiene grandes cantidades de ácido glutámico, mientras que Lane y col. (1961) reportaron la presencia de péptidos de bajo peso molecular en dicha toxina.

El efecto fisiológico de la toxina de *Physalia physalis* fue ampliamente estudiado en el músculo liso (Lane, 1967) y en el sistema cardiovascular de las ratas (Larsen y Lane, 1966); en los perros (Hastings y col., 1967) y en los crustáceos decápodos (Lane y Larsen, 1965). Estos estudios han sugerido que el efecto de la toxina se debe a la alteración del flujo transmembrana de Na^+ y K^+ , del cual dependen todos los fenómenos bioeléctricos. En un estudio posterior, Larsen y Lane (1970) verificaron el aumento del transporte de Na^+ a través de las membranas de la piel de los sapos, como consecuencia de la acción de la toxina.

1.5.2. *Aiptasia pallida*

A fin de caracterizar el factor tóxico presente en los nematocistos de la anémona *Aiptasia pallida*, Blanquet (1968) estableció una técnica de aislamiento de tales estructuras. La misma permite separar nematocistos con un mínimo de daño del animal, pudiendo usarse a la anémona repetidamente después de la regeneración de las estructuras involucradas, principalmente los acontios. Glaser y Sparrow (1909) habían observado que, cuando los tentáculos y/o los acontios de la anémona *Metridium senile* eran expuestos a ciertos estímulos químicos, los nematocistos eran expelidos de dichas estructuras, ya sea en estado descargado o no. Ellos llamaron a este fenómeno "extrusión". Yanagita (1959) observó la extrusión de los nematocistos no descargados, cuando los acontios de la anémona *Diadumene luciae* fueron colocados en agua de mar diluída o en 1.0 M de glicerol. Sin embargo, Blanquet (1968) menciona que, mientras dicho medio es excelente para provocar la extrusión de nematocistos en acontios de *Aiptasia*, un gran porcentaje de los mismos se descarga luego de un corto tiempo. La técnica propuesta por el autor permite aislar nematocistos sin descargar. La descarga posterior se produce en un medio de baja concentración salina, obteniéndose en forma pura el contenido soluble de los nematocistos (CSN). A partir de éstas preparaciones, se probó la toxicidad en cangrejos, en los cuales la toxina causa tetanía severa y, eventualmente, la muerte. De la determinación de amino ácidos se encontró que el factor tóxico contiene, principalmente, ácido glutámico (76%) y que posee un peso molecular de

130 kDa.

La técnica de aislamiento de los nematocistos es particularmente importante por el alto grado de pureza con el que se obtienen los mismos, ya que los tejidos de los cnidarios poseen agentes farmacológicos no nematocíticos (Welsh, 1961).

Hessinger y Lenhoff (1973a,b - 1974a,b) llevaron a cabo un conjunto de trabajos sobre la toxina de *Aiptasia pallida*, en los cuales comprobaron el efecto hemolítico del CSN obtenido, según el método de Blanquet (1968), a partir de los nematocistos de los acotios. La curva de lisis inducida por el veneno, en función del tiempo, es sigmoideal y tiene tres fases: una de inducción o prolítica, una segunda fase lítica con una cinética de primer orden, dependiente de Ca^{++} , y una etapa terminal durante la cual las células remanentes son lisadas. Es durante la primera etapa donde el factor lítico del veneno interactúa directamente con la membrana del glóbulo rojo; siendo la misma afectada por la concentración de Ca^{++} y de toxina.

Al analizar el efecto de la concentración de veneno sobre la tasa de hemólisis, encontraron que están linealmente relacionados y que la tasa de lisis también es linealmente proporcional a la concentración de glóbulos rojos utilizada. Sin embargo, a alta concentración de eritrocitos dicha proporcionalidad decrece progresivamente.

La incubación de la toxina con glóbulos rojos, durante 15 minutos, no produjo lisis hasta que el Ca^{++} no se agregó al medio. En acuerdo con esto se observó que el EDTA, agregado en concentraciones adecuadas, previene

completamente la lisis. El ritmo de lisis es afectado por la concentración de calcio presente en el medio de incubación. Por otro lado, se halló que una elevada concentración de la toxina y la presencia de sales estabilizan la actividad hemolítica.

Repetidos tratamientos de congelado-descongelado del veneno causan un progresivo cambio en la cinética de hemólisis; con cada sucesivo tratamiento, la tasa de lisis disminuye y la extensión final del nivel de lisis también decae. Esto indicaría una inactivación progresiva del material lítico que se une a los glóbulos rojos, ya que se observa que la toxina, inactivada por este tratamiento, aún conserva su capacidad de unirse irreversiblemente a los eritrocitos, previniendo la unión de la toxina activa.

Dichos autores concluyeron que la actividad hemolítica, inducida por el veneno de los nematocistos de la anémona, se debe a la acción de una fosfolipasa A sobre los fosfolípidos de la membrana de los eritrocitos. Estas conclusiones se basaron en el requerimiento de Ca^{++} y en una copurificación de la actividad lítica y de la fosfolipasa A, por cromatografía de tamiz molecular y de intercambio iónico.

1.5.3. *Stichodactyla helianthus*

Se han llevado a cabo numerosos trabajos sobre la toxina de la anémona de mar *Stichodactyla* (anteriormente *Stoichactis*) *helianthus*, luego del aislamiento y purificación parcial de la misma, a partir de homogenatos del animal entero, por Devlin (1974). Este autor concluyó que "no existen

pruebas directas de que dicha sustancia sea un constituyente de los nematocistos". Bernheimer y Avigad (1976) indicaron que la toxina proviene "presumiblemente" de nematocistos. Se trata de una de las más potentes hemolisinas conocidas, proteica, altamente básica, con un peso molecular de 16 kDa y un pI de 9,8, no dissociable en sub-unidades, cuya actividad no depende de Ca^{++} o Mg^{++} . Esta toxina no posee actividad lipolítica y es fuertemente inhibida por esfingomiéline. Se propuso que su mecanismo de acción no es enzimático, sino a través de la formación de poros. La toxina posee una elevada afinidad por la esfingomiéline (SM), lo cual explicaría que no tenga actividad sobre las membranas bacterianas, ya que éstas carecen de dicho lípido. Por otro lado, se observó que las células normalmente sensibles se hacían resistentes a la toxina al ser tratadas con esfingomiélinasa. El pretratamiento de la toxina con esfingomiéline protegía a los eritrocitos de la lisis. Tal protección no se halló con otros lípidos como el colesterol, la fosfatidilcolina, la esfingosina, la ceramida (una parte de la molécula de esfingomiéline), la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina o el fosfatidilinositol. Linder y col. (1977) demostraron que el 50% de la protección se obtenía con 1,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de SM, mientras que 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de SM inhibían un 70-75% de la actividad hemolítica de la toxina de *S. helianthus*. La inhibición completa no se obtenía, aún en presencia de grandes cantidades de SM en la mezcla de incubación. Este aspecto es diferente de lo que ocurre con las citolisinas oxígeno-lábiles producidas por muchas bacterias, las cuales son completamente inhibidas por pequeñas cantidades

de esteroides (Bernheimer, 1974). Tal comportamiento de inhibición incompleta es similar al observado en la neutralización de virus por anticuerpos (Luria y Darnell, 1967). Semejante también a los sistemas virales, el inhibidor de la toxina de *S. helianthus* no es soluble en medio acuoso; sin embargo, una parte existe en suspensión como agregados (Small, 1970). A causa del estado físico de la SM, es difícil especular sobre la naturaleza molecular de la interacción toxina-lípido. Una posible explicación de la actividad hemolítica residual de la toxina, luego de la incubación con SM, podría ser que la lisina de *S. helianthus* tuviera una afinidad mucho mayor por los lípidos dispuestos en la membrana del eritrocito, que en un complejo lipídico artificial. Una pequeña porción de las moléculas tóxicas, unidas más levemente a los agregados lipídicos, podrían ser así desplazadas hacia los eritrocitos.

Linder y col. (1977) mostraron la unión de toxina (marcada con ferritina) a liposomas conteniendo SM, pero no a aquéllos que contienen PC.

Las interacciones citolíticas no enzimáticas, de las toxinas bacterianas con los liposomas, han sido demostradas en un gran número de sistemas (Weissman y col., 1966; Shany y col., 1974; Smyth y col., 1975; Duncan y Schlegel, 1975), en los que se observa la liberación de pequeñas moléculas o la desorganización física de los liposomas.

Michaels (1979) demostró que la toxina derivada de *S. heliantus* podía incrementar la permeabilidad de las membranas lipídicas planas, en seis órdenes de magnitud sin compromiso de la estabilidad. Estos resultados

sugirieron que el mecanismo de acción involucra la formación de canales transmembrana, constituidos por la agregación de las moléculas tóxicas en la bicapa.

En un segundo trabajo, Shin, Michaels y Mayer (1979) concluyeron que la toxina causa daño no sólo por la formación de canales en la membrana, sino también por la acción detergente de la misma, a altas concentraciones.

La remoción de lípidos marcados con ^{14}C , es una medida de la extensión de la interacción entre la toxina y la membrana liposomal. Esta interacción depende de la capacidad de la toxina para insertarse en la bicapa lipídica, lo cual es determinado, presumiblemente, por la geometría del empaquetamiento de los lípidos.

La influencia de la composición de la membrana en la liberación de [^{14}C]fosfatidilcolina (PC) de los liposomas tratados con la toxina, fue estudiada por los mismos autores y se encontró que la liberación de los marcadores fue: SM > dilinoleoil-PC > dioleoil-PC > diestearoil-PC > dipalmitoil-PC = dimiristoil-PC.

Este orden tiene, evidentemente, relación con el tamaño decreciente y el grado de insaturación de la cadena acilada. La liberación de los lípidos marcados representa la extracción de los mismos de los liposomas por la toxina; así, la toxina actuaría de manera semejante a un detergente.

Los estudios sobre las propiedades de permeabilidad de los canales a iones y a no electrolitos, formados por la toxina de *S. helianthus* en bicapas lipídicas planas, llevados a cabo por Varanda y Finkelstein (1980),

confirmaron que la capacidad de la toxina para incrementar la conductancia era intensificada por la presencia de SM en la membrana; no obstante, la toxina era también activa en membranas lipídicas planas que contenían PC, PC + Chol, PC + PS y PE. Según estos autores, la toxina tiene una acción detergente inespecífica.

La adición de toxina a uno de los lados de la membrana producía un incremento continuo, más o menos lineal, de la conductancia de la membrana con el tiempo. Los coeficientes de permeabilidad (Pd) para urea, glicerol, glucosa y sacarosa se incrementaban linealmente con la conductancia de la membrana y en forma gradual, esto es, valores de Pd decrecientes con el incremento del tamaño molecular. Así, los canales poseían las clásicas propiedades de tamiz molecular. Los autores estimaron que si la sacarosa es permeable, el radio del canal es de, al menos, 5 Å. Estos autores sugirieron que las propiedades de los canales, estaban controladas por la presencia de grupos cargados negativamente en su interior. La evidencia más convincente fue el efecto del pH en la selectividad relativa hacia los iones K^+ y SO_4^{2-} .

A valores de pH superiores a 6,2 los canales eran idealmente K^+ selectivos, mientras que a valores de pH por debajo de 4 existía poca discriminación entre ambos iones. Esto indica que el grado de protonación de los grupos cargados, asociados con el canal, controlan la selectividad. El resultado de la disminución de la selectividad producida por el Ca^{++} , obtenido por estos autores, es también consistente con la hipótesis de la

presencia de grupos cargados negativamente. El Ca^{++} se uniría a los grupos cargados negativamente que se hallan asociados con el canal. Los autores estimaron un pK de aproximadamente 5 para dichos grupos, sugiriendo que serían grupos carboxilo.

La estructura primaria de la citolisina III de *S. helianthus* ha sido determinada (Blumenthal y Kem, 1983) y se halló que la misma posee 153 residuos de aminoácidos. Un número de regiones altamente hidrofóbicas han sido identificadas, incluyendo una región rica en tirosina y triptofano. Estas regiones podrían estar involucradas en la interacción hidrofóbica de la citolisina con las membranas.

La composición de amino ácidos de la citolisina de *S. helianthus* había sido previamente reportada por Bernheimer y Avigad (1976). Dicha composición es similar, aunque no idéntica, a la obtenida por Blumenthal y Kem (1983). La mayor discrepancia se relaciona con el contenido de cisteína (3 residuos de ácido cisteico) y carbohidratos (4% por molécula), reportado por los primeros. Blumenthal y Kem concluyeron, a partir de sus estudios de secuenciación de aminoácidos, que la toxina III de dicha anémona no es una glicoproteína y que las diferencias observadas están relacionadas con la presencia de múltiples isotoxinas.

Del material aislado en la forma descrita por Bernheimer y Avidad, Blumenthal y Kem obtuvieron, en forma homogénea, dos isotoxinas mayores y dos menores. En un trabajo posterior se encontró que, al menos las dos mayores, diferían en su secuencia NH_2 terminal (Kem y col., 1982).

Kem y Dunn (1988) caracterizaron las cuatro variantes de la citolisina (separadas por cromatografía, en presencia de urea 4M, de manera de aumentar la solubilidad de las mismas), reduciendo interacciones no covalentes, con el fin de evitar la agregación. Los resultados obtenidos por estos autores se muestran en la siguiente Tabla.

Caracterización de las cuatro variantes de la toxina de S. helianthus

TOXINA	PM en condiciones desnaturalizantes	pI
C I	18200	8,7
C II	17600	9,5
C III	17400	9,7
C IV	19600	9,8

La secuencia de aminoácidos de las cuatro toxinas es muy semejante. La citolisina I (C I) no posee histidina y las otras tres sólo un residuo histidilo. La toxina IV (C IV) posee 21 residuos aminoácidos adicionales. La toxina III (C III) contribuye con un 83 por ciento a la actividad citolítica total; la toxina II (C II), 14 por ciento. La contribución de las toxinas I y IV es del 3 por ciento.

Cuando la toxina III fue inyectada en ratón y cangrejo, se vio que producía hiperexcitabilidad, convulsiones, parálisis y muerte. La dosis letal media (LD₅₀) para ratón, inyectada endovenosamente, fue de 15 mg/Kg.

En un estudio previo (Norton y Kashiwagi, 1972), se describió que un extracto crudo de *Stichodactyla kenti* inhibía la multiplicación de células de tumor ascítico de Ehrlich, en la cavidad peritoneal de ratón. Cuando se probó la Tx III de *S. helianthus* se vio que era extremadamente activa en lisar células tumorales *in vitro* (Kem y Dunn, 1988).

Por otro lado, los autores mencionaron que, cuando se comparaba la secuencia de aminoácidos de la toxina III con la de equinatoxina, otra proteína citolítica de anémona, se veía una elevada homología. Existen además otras propiedades que comparte esta última con muchas proteínas citolíticas halladas en anémonas. Estas propiedades son:

1. Inhibición selectiva de la actividad hemolítica por preincubación con SM
2. Peso molecular entre 10 y 20 kDa
3. Punto isoeléctrico 9,0 ó mayor

La estructura secundaria de la toxina III (Chou y Fasman, 1978), contiene 16 % de α -hélice y 31 % de estructura β . Cuando se comparó la estructura primaria de la toxina con otras proteínas citolíticas que se insertan en las membranas, no se hallaron homologías.

Sin embargo, en dos casos en los cuales se hicieron un máximo de dos gaps en cada secuencia, se encontró lo siguiente:

Caso A.

Comparación de Citolisina III (residuos 1-117) con el Antígeno H2K de histocompatibilidad de ratón (residuos 221-346).

De halló un 23,1 % de residuos idénticos.

Caso B.

Comparación de Citolisina III (residuos 1-153) con la Porina de

Escherichia coli (residuos 121-289; Chen y col., 1982)

Se hallaron 31 posiciones (20,3 %) conteniendo residuos idénticos.

Dado que tanto la porina como el antígeno de histocompatibilidad son conocidos por poseer secuencias que se insertan en la membrana, se propuso el mismo mecanismo para la citolisina de *Stichodactyla* (Blumenthal y Kem, 1983).

Para investigar el mecanismo por el cual la toxina causaba la lisis se empleó un derivado tritiado de la misma (Doyle y Kem, 1989). Se comparó la sensibilidad a la toxina de eritrocitos con distinto contenido de SM (ver la siguiente Tabla).

Sensibilidad de eritrocitos de diferente origen a la toxina de *S. helianthus*

	HC ₅₀	SM	MBPC ₅₀
	(ng/ml)	% total Lip.	³ H-Toxina
RATA	26,8	12,8	18200
CABALLO	14,7	13,5	9821
HUMANO	9,8	25,8	7316
GATO	1,2	26,1	680
CABRA	10,6	45,9	7896
OVEJA	6,9	51,0	4686

MBPC₅₀: moléculas unidas por célula (al 50 % lisis)

HC₅₀: concentración hemolítica media, concentración de toxina que produce el 50 % de hemólisis (Kem, 1988)

SM: expresada sobre el total de lípidos (Condrea y col., 1964; Deuticke, 1977)

Se observó que cuanto mayor era el contenido de SM, menor era la cantidad de toxina necesaria para producir un 50 % de hemólisis.

También se analizó la dependencia de la actividad hemolítica y la unión de la toxina a las membranas, con respecto al pH. La concentración hemolítica media (HC_{50}) decrece con el aumento del pH, siendo la unión de la toxina independiente del pH, dentro del rango de 6-8. A las concentraciones estudiadas (500 ng/ml), la unión de la toxina con los glóbulos rojos fue proporcional a la concentración inicial agregada.

Los autores también dedujeron, a partir de la tasa relativamente constante de la partición de la toxina entre una fase acuosa y una membranosa, que no existiría un sitio aceptor específico en la membrana; aunque también una posible explicación es que dichos sitios sean muy abundantes.

Bernheimer y colaboradores (1976, 1977) han aportado considerables evidencias, sobre la interacción específica entre el fosfolípido SM y la toxina. Todos los eritrocitos estudiados poseen una considerable concentración de SM en las membranas (Nelson, 1967). Aún en los eritrocitos de rata, los cuales contienen la menor proporción relativa de SM, el número de moléculas de SM en el lado externo de la membrana excede, al menos en tres órdenes de magnitud, el número de moléculas unidas al 50 % de lisis.

Mientras que la unión de la toxina es proporcional a la concentración inicial de la misma, la hemólisis varía en forma sigmoideal. Esto indicaría que existe un número mínimo de moléculas tóxicas que deben interactuar

con las células, para causar la lisis. Aún en el tipo más sensible de eritrocitos, los de gato, alrededor de 700 moléculas de la toxina son requeridas para causar la lisis.

Se sugirió que la dependencia de la lisis con el pH está relacionada con un cambio en la capacidad de la toxina, unida a la membrana, de provocar la ruptura celular. Dado que Varanda y Finkelstein (1980) demuestran que la conductancia y la selectividad catiónica de los canales citolíticos son marcadamente intensificados en el mismo rango en que lo es el pH, es probable que muchos de los efectos observados se deban a este fenómeno. Normalmente, los eritrocitos de mamíferos tienen una relativamente alta permeabilidad aniónica, pero pequeña a los cationes (Bernheimer y col., 1984). El proceso de formación de canales iónicos, por agregación de monómeros de la toxina dentro de la membrana celular, podría ser afectado también por el pH externo.

Bernheimer y Lai (1985) analizaron las propiedades de la toxina citolítica de *Stichodactyla kenti*. Esta anémona posee una distribución geográfica diferente (Area Indo-Pacífica) de *S. helianthus*, que se encuentra en la región del Caribe.

Como en el género anterior, la purificación del factor lítico se realizó a partir de homogenatos de ejemplares enteros.

Comparación de las toxinas de S. helianthus y S. kenti.

	PM (kDa)	pI	Inhibición por SM	Resid/mol prot.			
				Met	Tyr	Hyst	Gli
Heliantina	16	9,8	+	6	11	1	18
Kentina	18	9,2	+	1	5	5	29

Existe neutralización de ambas toxinas por anticuerpos contra heliantina, pero la neutralización es más eficiente en la combinación homóloga que heteróloga.

En la anémona *Stichodactyla helianthus*, Kem y colaboradores (1989) encontraron, además, un polipéptido neurotóxico, selectivo para crustáceos, que no afecta a los mamíferos. Dicho péptido posee un peso molecular de 5200 daltons y un punto isoeléctrico de 8,3.

En dicho trabajo, los autores sugieren que las citolisinas de las anémonas se localizan dentro de las células glandulares tegumentarias, y no dentro de los nematocistos, como es el caso de esta neurotoxina.

1.5.4. Otras anémonas

En un estudio sobre las propiedades farmacológicas de las toxinas halladas en cuatro géneros de anémonas, *Anthopleura xantogramica*, *Anemonia sulcata*, *Stichodactyla giganteus* y *Actinodendron plumosum* (Schweitz y col., 1981), se analizó la presencia de ocho toxinas polipeptídicas diferentes. Las mismas están formadas por 50 aminoácidos, contienen 2 ó

3 puentes disulfuro y sus pesos moleculares oscilan alrededor de los 5 kDa.

Estas toxinas:

- * Tienen una elevada afinidad por los sinaptosomas de cerebro de rata.
- * Incrementan la tasa de captación de Na^+ a través de canales de Na^+ en células de neuroblastoma de ratón.
- * Son tóxicas para ratones.

La afinidad de las toxinas por el receptor específico, en los sinaptosomas del cerebro de las ratas, ha sido establecida por Vincent y col. (1980). Las toxinas de estas anémonas interactúan con una gran variedad de membranas excitables, incluyendo axones mielinizados o no (Rathmayer y Béress, 1976; Romey y col., 1976; Bergman y col., 1976), células neuronales en cultivo (Jacques y col., 1978), células musculares esqueléticas y cardíacas en cultivo (DeBarry y col., 1977; Romey y col., 1980) y terminales nerviosos (Abita y col., 1977).

La secuencia de aminoácidos de dichas toxinas fue dilucidada por Wunderer et al., 1976a; Wunderer y Eulitz, 1978; Béress y col., 1977; Martínez y col., 1977; Tanaka y col., 1977; Norton y col., 1978; Barhanin y col., 1981.

Norton (1981), al analizar concentraciones subletales de extractos de *Anthopleura xantogramica* y *Anthopleura elegantissima*, encontró un poderoso efecto inotrópico positivo, sin efectos cronotrópicos, en ratas. El sistema adrenérgico no se ve involucrado en el mecanismo de acción, la

bomba de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ no es inhibida y el tejido vascular no es afectado por los extractos. Dos polipéptidos cardiotónicos fueron aislados de *A. xantogramica* (anthopleurina A y B) y uno de *A. elegantissima* (anthopleurina-C).

Además del hallazgo de Norton, Thomson et al. (1987) describieron una nueva proteína cardioestimulante, tenebrosina-A, de *Actinia tenebrosa*.

Resultados de algunos trabajos llevados a cabo con toxinas de distintas anémonas

<u>NOMBRE</u>	<u>PM(kDa) pI</u>		<u>Inhibido por</u>		<u>pH opt</u>
			<u>SM</u>	<u>Chol</u>	
<i>Actinia equina</i> (1)	20	12,4	+		?
<i>Condylactis gigantea</i> (2)	18,3	8,9	+		8-9
<i>Epiactis prolifera</i> (3)	19,5	8,3	+		8-9
<i>Tealia lofotensis</i> (4)	10 ?	9,4	+		?
<i>Anthopleura xantogramica</i> (4)	10 ?	9,4	+		?
<i>Metridium senile</i> (5) *	80	5,0	-		5-6
<i>Aiptasia pallida</i> (6) **	43	8,8			?
<i>Actinia cari</i> (7)	20-25	10,7			8-9
<i>Stichodactyla helianthus</i> (8)	16	9,8			8-9
<i>Stichodactyla kenti</i> (9)	18	9,2			?
<i>Parascyonis actinostoloides</i> (10)	17	7,9	.		?
<i>Pseudactinia varia</i> (11)	19,5	9,8	+		?
<i>Radianthus koseirensis</i> (12)	10	?	+		?
<i>Gyrostoma helianthus</i> (12)	10		+		?

1) Ferlan y Lebez, 1974. 2) Bernheimer, Avigad y Lai, 1982; Shapiro, 1968; Shapiro, 1968B; Shapiro y Lilleheil, 1969; Murayama y col., 1972; Yost y O'Brien, 1978. 3) Bernheimer y Avigad, 1982. 4) Bernheimer y Avigad, 1981. 5) Bernheimer y Avigad, 1978; Phillips, 1956; Phillips y Abbott, 1957; Goodwin y Telford, 1971. 6) Grotendorst, 1979. 7) Macek y col., 1982. 8) Bernheimer y Avigad, 1976. 9) Bernheimer y Lai, 1985. 10) Shiomi y col., 1985. 11) Bernheimer y col., 1984. 12) Mebs y col., 1983.

* La toxina de *Metridium senile* (PM 80 kDa) está formada por dos subunidades de diferente tamaño y está presente en homogenatos de ejemplares enteros, no hallándose actividad lítica en los nematocistos presentes en los acontios.

** El factor lítico de *Aiptasia pallida* está caracterizado como una fosfolipasa A, Ca^{++} dependiente, presente en el contenido soluble de nematocistos (CSN).

Se han hallado, además, toxinas hemolíticas en los tejidos de las siguientes anémonas: *Anthopleura japonica* (Shiomi y col., 1985), *Anthopleura fuscoviridis* (Shiomi y col., 1985), *Anthopleura elegantissima* (Bernheimer y Avigad, 1981; Norton y col., 1978; Quinn y col., 1974), *Anemonia sulcata* (Béress y col., 1975; Novak y col., 1973), *Condilactis aurantica* (Béress y col., 1976), *Rhodactis howessi* (Martín, 1960), *Bolocera tuediae* (Calton y col., 1978; Béress y Zwick, 1980), *Radianthus macrodactylus* (Rudnev y col., 1984) y *Actinia tenebrosa* (Thomson y col., 1987).

En forma semejante a lo hallado en *Stichodactyla*, se ha observado actividad antitumoral en los extractos crudos de las anémonas *Anthopleura xantogramica* (Pettit y col., 1970) y *Anthopleura elegantissima* (Quinn y col., 1974), probados en la leucemia linfocítica (P388) y en células de tumor ascítico de Ehrlich. También se han descrito los efectos estimulatorios cardíacos producidos por los extractos de ambas (Shibata y col., 1974; Quin y col., 1974).

En estudios recientes (Turk, Macek y Gubensek, 1992), se ha investigado el rol de ciertos aminoácidos en las propiedades funcionales y estructurales de la toxina de la anémona *Actinia equina*. La toxina, denominada equinatoxina, es un polipéptido citolítico, formador de poros, que incrementa la concentración del Ca^{++} intracelular. Mediante la oxidación de los residuos triptofano con N-bromosuccinimida, se demostró que estos aminoácidos no estaban involucrados en la interacción hidrofóbica de la

toxina con los lípidos de la membrana.

Cuando Turk y Macek (1992) investigaron el rol de los residuos histidina y lisina y de los grupos carboxilo en la actividad biológica de la equinatoxina, encontraron que una modificación de los primeros no provocaba cambios en la actividad de la toxina. Por el contrario, los residuos lisina y los grupos carboxilo estarían involucrados en la formación de poros, y en las propiedades de permeabilidad selectiva para cationes de los mismos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Varanda y Finkelstein, para la toxina III de *Stichodactyla helianthus*, como ya se mencionó en el punto 1.5.3.

1.6. MECANISMOS GENERALES DE ACCIÓN CITOLÍTICA

En años recientes se ha encontrado un gran número de polipéptidos solubles que poseen la capacidad de lisar células (Blumenthal y Kem, 1983). El daño de las membranas celulares puede efectuarse a través de dos mecanismos básicos (Bhakdi y Tranum-Jensen, 1983). El primero es un ataque enzimático directo a los lípidos de la membrana, como ocurre con ciertas fosfolipasas bacterianas. El segundo involucra una perturbación física, no enzimática, de la bicapa lipídica, a través de la acción detergente, o por medio de la inserción del agente lítico en la membrana, formando un canal transmembrana discreto.

1.6.1. Toxinas formadoras de poros

La primera hipótesis concreta para explicar el daño de las membranas celulares, provocado por medio de la formación de canales o lesiones discretas, fue propuesto en 1972 por Mayer, para explicar el mecanismo de citólisis inmune por el sistema del complemento. De esta manera, la formación de canales proteicos surge como un mecanismo amplio para el ataque de membranas. El sistema del complemento comprende al menos unas 12 proteínas plasmáticas y un número de proteínas regulatorias, que actúan en una variedad de funciones biológicas vitales.

Entre las toxinas formadoras de poros, además del sistema del complemento se conocen actualmente varios grupos: las toxinas activadas por grupos tioles e inhibibles por colesterol, las toxinas inhibibles por esfingomielina y la α -toxina de *Staphylococcus aureus*.

1.6.1.1. Lisinas tiol activadas inhibibles por colesterol (tomado de Bernheimer y Rudy, 1986)

<u>Género</u>	<u>Especie</u>	<u>Toxina</u>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. pyogenes</i>	Streptolisina O (*)
	<i>S. pneumoniae</i>	Pneumolisina
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>	Cereolisina
	<i>B. thuringiensis</i>	Turingiolisina O
	<i>B. alvei</i>	Alveolisina
	<i>B. laterosporus</i>	Laterosporolisina
<i>Clostridium</i>	<i>C. botulinum</i>	Botulinolisina
	<i>C. histolyticum</i>	Histoliticolisina
	<i>C. perfringens</i>	Perfringolisina O
	<i>C. septicum</i>	Septicolisina
	<i>C. tetani</i>	Tetanolisina
<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Listerolisina

(*) Oxígeno lábil

Todas las actividades biológicas, de este grupo de lisinas producidas por bacterias gram-positivas, son inhibidas por colesterol y otros esteroides. Son toxinas extracelulares, excepto la pneumolisina, y todas son inactivadas por oxidación y reactivadas por reducción con tioles. Este grupo de lisinas tienen actividades biológicas similares (aunque no idénticas): lisis de glóbulos rojos y de otras células eucariotas, cardiotoxicidad y letalidad.

En la anémona de mar *Metridium senile* se ha encontrado una lisina (denominada metridiolisina) activada por tioles, que se inhibe con colesterol pero no con otros esteroides. Se describen más características de esta lisina en la sección "Toxinas en celenterados".

Los estudios con microscopía electrónica indicaron que la estreptolisina O produce poros en la membrana de los eritrocitos. Otras estructuras similares son producidas también por la perfringolisina, la cereolisina, la listeriolisina y la metridiolisina. Se supone que las otras lisinas del grupo también tienen un efecto similar.

El primer paso de la acción de las lisinas tiol-activadas involucra la combinación de la lisina con el colesterol. No existe acuerdo respecto de si el poro consiste en un complejo lisina-colesterol o si se forma un polímero de lisina únicamente. Algunas observaciones (Niedermeyer, 1985) respecto de la estreptolisina O, permitieron concluir que la estructura del poro estaba formada por 18-20 subunidades de una molécula simple de estreptolisina O.

1.6.1.2. Lisinas de cnidarios inhibibles por SM

La interacción de la equinatoxina II, obtenida a partir de los homogenatos de la anémona de mar *Actinia equina*, con las membranas, da lugar a la formación de poros o canales iónicos discretos. Los resultados (Belmonte y col., 1993) indican que los canales son probablemente oligoméricos, con un número máximo de 7 monómeros en cada uno.

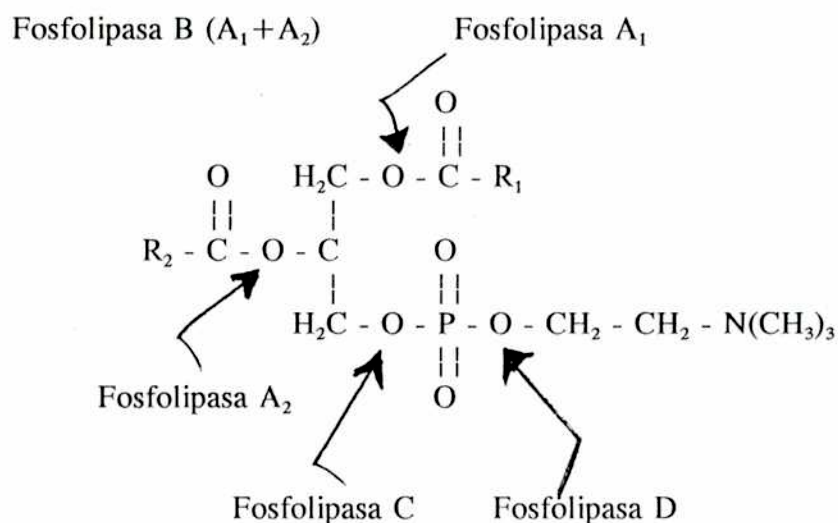
El mecanismo de acción de la toxina de *Stoichactis helianthus* involucra la formación de canales transmembrana por agregación de moléculas de la toxina, que se insertan en la bicapa lipídica (Michaels, 1979). Las investigaciones de Varanda y Finkelstein (1980) indicaron que las membranas que contenían esfingomiélinas eran especialmente sensibles a la toxina, y sugirieron que la interacción de la toxina con la membrana era irreversible.

1.6.1.3. α -toxina de *Staphylococcus aureus*

Induce la formación de canales en eritrocitos (Bernheimer y col., 1972; Harshman, 1982; Freer y col., 1968 y 1972), pero no se ha podido identificar un lípido que sirva de señal para la inserción de la toxina. La α toxina es una proteína con un peso molecular de 34.000 y es considerada uno de los agentes patogénicos más importantes de esta bacteria. El daño que produce en las membranas es análogo al producido por el complemento; forma oligómeros hexaméricos, pero el ataque de las membranas no es controlado por mecanismos sofisticados como en el caso del complemento.

1.6.2. Fosfolipasas con actividad hemolítica

En la siguiente figura se muestran los sitios de ataque de las fosfolipasas en la fosfatidilcolina (Tomado de H. van den Bosch, 1982).



La fosfolipasa A₂ (PLA₂) ha sido identificada en todos los venenos de víbora testeados, pertenecientes a las Familias *Viperidae*, *Elapidae* y *Crotalidae* (Stotta, 1955; Jaques, 1955; Balozet, 1957; Neumann, 1953; Condrea y col., 1964 y 1970; Condrea y de Vries, 1965). Una de las purificaciones más tempranas de PLA₂ fue hecha por De (1944) a partir del veneno de *Naja naja* y *Naja tripudians*. La preparación cristalina fue llamada hemolisina. Unos pocos años después Slotta (1953) obtuvo del veneno de *Crotalus sp.* una proteína, llamada crotoxina, la cual tiene actividad PLA₂ (Neumann, 1955).

Un poderoso agente hemolítico, con actividad fosfolipasa C fue detectado

en el medio de cultivo de *Tetrahymena pyriformis* y *T. thermophila* (Florín-Christensen et al, 1985 y 1986).

Fosfolipasas C con actividad hemolítica han sido descritas en un gran número de organismos (Taguchi e Ikezawa, 1976), como *Clostridium perfringens** (Takahaski y col., 1974; van Heyningen, 1974), *Clostridium oedematiens* (Oakley y col., 1947), *Clostridium bifermentans* (Miles y Miles, 1950), *Staphylococcus aureus* (Doery y col., 1963), *Acinetobacter calcoaceticus* (Lehmann, 1971), *Pseudomonas aureofaciens* (Taguchi e Ikezawa, 1976). La fosfolipasa C de *C. perfringens* también tienen actividad esfingomielinasa C.

Se ha visto que ciertos venenos de víbora, principalmente de la Flia. *Elapidae*, producen hemólisis de glóbulos rojos humanos y de varios animales (hemólisis directa); mientras que otros venenos, semejantes a los de la Flia. *Viperidae*, no poseen tal actividad. Cuando se adiciona lecitina, sin embargo, todos los tipos de eritrocitos son lisados y todos los venenos son líticos (hemólisis indirecta) (Roy, 1945).

El mecanismo de la hemólisis indirecta ha sido explicado como un proceso en dos pasos:

1. acción de la PLA del veneno sobre la lecitina exógena, con producción de lisolecitina y ácido graso, y
2. acción lítica de la lisolecitina en la membrana del eritrocito.

Se ha sugerido que la acción lítica de la lisolecitina se ejerce por la combinación con el colesterol de la membrana, o a través de la pérdida de

colinesterasa, seguida por cambios en el transporte de cationes (Greig y Gibbons, 1955, 1956ab), o por formación de complejos con la lecitina de la membrana (Saunders, 1957).

Con respecto a la hemólisis directa (sin lecitina adicionada), se han propuesto dos mecanismos diferentes. De acuerdo con uno de ellos, primero formulado por Kyes y Sachs (1903) y tomado por Turner (1957) y Turner y col. (1958), la hemólisis involucra la acción directa de la PLA₂ del veneno sobre la PC de la membrana celular. La diferencia de susceptibilidad del veneno para inducir la lisis en eritrocitos de diferentes animales, dependería del contenido de PC y de la accesibilidad de la misma. Sin embargo, este modelo no explica los siguientes puntos:

- A. que no exista una correlación directa entre la hemólisis y la degradación de lípidos,
- B. la resistencia de ciertos eritrocitos a la acción del veneno.

De acuerdo con el segundo concepto, la hemólisis directa involucra un factor lítico diferente de la PLA₂.

Neumann y Habermann (1956) aislaron un factor lítico directo del veneno de las serpientes y de abejas (Habermann y Molbert, 1954; Neumann y Habermann, 1954). Ellos observaron que el agente que produce hemólisis directa en las abejas es una proteína fuertemente básica, la cual es capaz de lisar los glóbulos rojos, pero no posee acción enzimática sobre fosfolípidos, y probablemente tampoco se trate de una proteasa.

Finalmente, Condrea y colaboradores (1964b) establecieron que las PLA

de *Naja naja* y *Vipera palestinae*, separadas de los factores líticos, no hemolizan eritrocitos humanos ni de otros animales. La hemólisis inducida por el veneno de cobra parece ser el resultado de la acción sinérgica de los dos factores: el factor lítico directo (DLF) y la fosfolipasa A (PLA). Se ha demostrado que la sensibilidad de los eritrocitos de diferente origen a la acción lítica directa, es el reflejo de su susceptibilidad a la acción del DLF y no a la PLA.

Se ha encontrado que en el curso de la hemólisis directa provocada por el veneno de abeja (Heemskerk y col., 1964) y por el veneno de *N. naja* (Klibansky y de Vries, 1964) se produce la liberación de fosfolipasa B endógena de los eritrocitos. La fracción del veneno que produce la liberación de esta enzima fue identificada como DLF; la PLA provee a los eritrocitos lisofosfolípidos, sobre los que la PLB endógena puede ejercer su acción hidrolítica. Debe destacarse que la denominación "fosfolipasa B" debería reemplazarse en este caso por "lisofosfolipasa A₁".

1.6.3. Toxinas con acción detergente

Existe otro tipo de mecanismo empleado por las toxinas para producir daño en las membranas celulares, y consiste en una acción detergente. La δ -toxina de *Staphylococcus aureus* y la subtilisina de *B. subtilis* son dos ejemplos de toxinas con este mecanismo.

La δ -toxina, por ejemplo, es un heptapéptido unido a una larga cadena de ácido graso; es estable al calor y su peso molecular es de 5.000. Es

considerada un surfactante debido a que es inhibida por fosfolípidos, es soluble en cloroformo:metanol (2:1, v/v), tiene una baja actividad hemolítica específica y lisa diversos tipos de células (Stephen y Pietrowski, 1981).

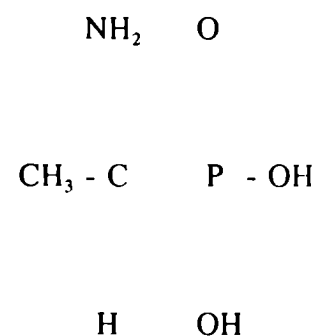
Shin y col. (1979) señalaron que la toxina de la anémona de mar *S. helianthus* causa daño, no sólo por la formación de canales en la membrana sino también, por la acción detergente de la misma a altas concentraciones. La remoción de los lípidos marcados con ^{14}C , es una medida de la extensión de la interacción entre la toxina y la membrana liposomal, y representa la extracción de los mismos por la toxina; así, la toxina actuaría de manera semejante a un detergente. Esta interacción depende de la capacidad de la toxina para insertarse en la bicapa lipídica, lo cual es determinado, presumiblemente, por la geometría del empaquetamiento de los lípidos, como ya se mencionó en la sección 1.5.3.

1.7. FOSFONOLÍPIDOS

1.7.1. Historia y clasificación

El aislamiento del ácido 2-aminoetilfosfónico (ciliatina, AEPn) (Horiguchi y Kandatsu) en 1959, de protozoos ciliados del rumen de mamíferos, inicia la investigación de la bioquímica de los compuestos conteniendo la unión C-P. El AEPn y otros ácidos aminofosfónicos estructuralmente relacionados

han sido identificados en varias especies (Kandatsu y Horiguchi, 1960 y 1962; Kittredge y col., 1962, 1964, 1967, 1969; Shimizu y col., 1965; Quin, 1965; Tamari, 1971; La Nauze y Rosenberg, 1968; Alhadeff y Daves, 1971; Hilderbrand, 1982 -revisión-; Hori y Nozawa, 1982 -revisión-). Ácidos fosfónicos adicionales, el 2-amino-3-fosfonopropiónico y tres N-metil derivados de AEPn, han sido identificados en celenterados (Kittredge y Hughes, 1964; Kittredge y col., 1967). AEPn y sus N-metil derivados se han encontrado formando parte de diversos complejos lipídicos, por lo cual Baer y Stanacev (1964) propusieron el nombre genérico de **fosfolípidos**.



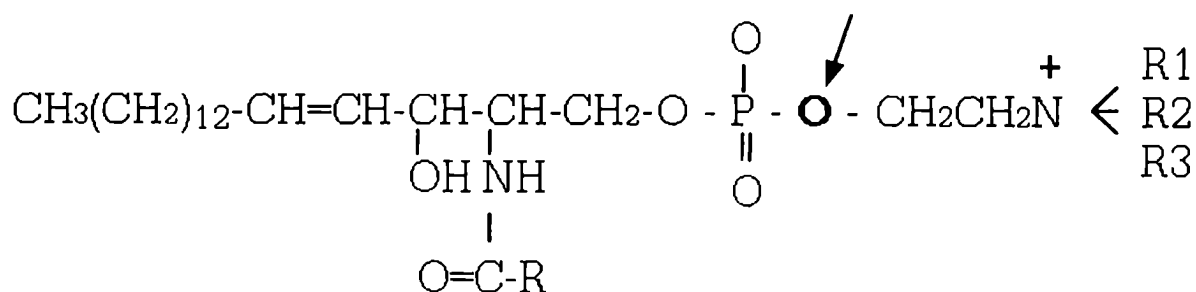
Ácido Aminoetilfosfónico (AEPn)

En los celenterados, se han hallado esfingofosfolípidos (SPnL). La primera evidencia de la existencia de estos fosfolípidos en los celenterados fue obtenida en 1963 por Rouser y col., durante un análisis de los lípidos de la anémona *Anthopleura elegantissima*. El nuevo esfingolípido fue tentativamente identificado como N-acil-esfingosil-1-(2-aminoetil)

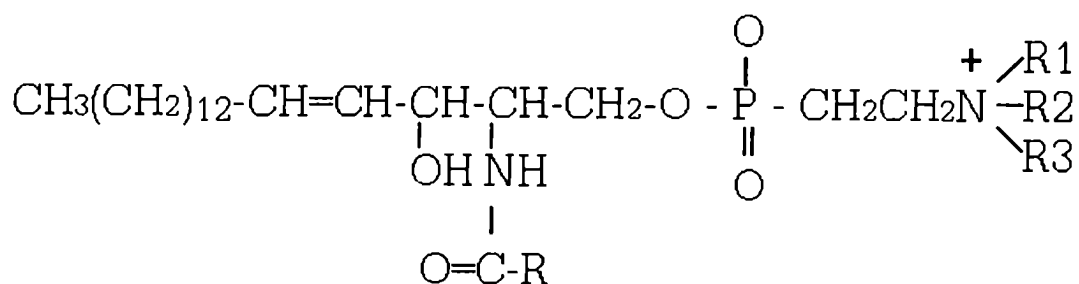
fosfonato (ceramida aminoetil fosfonato, CAEPn). En los años siguientes, Hori y col. (1964) probaron la existencia de SPnL en el bivalvo *Corbiculata sandai*. Estudios subsecuentes mostraron que los SPnL se hallan ampliamente distribuidos en varios grupos marinos, como anémonas de mar (Karlsson, 1970a,b; Karl y Samuelsson, 1974), bivalvos (Hori y col., 1966 y 1975), caracoles (Hori y col., 1967), cefalópodos (Higashi y Hori, 1968) y otros.

N-metil derivados de los SPnL fueron encontrados en varias especies de caracoles, en 1969, por Hagashi y col. y por Hori y colaboradores. Los mismos compuestos fueron aislados también del protozoo ciliado *Tetrahymena pyriformis* por Viswanathan y Rosenberg (1973) y Sugita y col. (1979). En *Tetrahymena* también se ha demostrado la presencia de glicerofosfolípidos (GPnL), glicerolípidos conteniendo AEPn (Liang y Rosenberg, 1966). Thompson (1967) presenta un análisis más detallado, mostrando que el GPnL es un derivado del alcohol quimílico, 1-O-hexadecil-2-acil-glicerol(3)-2-aminoetilfosfonato. Kennedy y Thompson (1970) demostraron que el GPnL es un componente mayoritario de la membrana ciliar de *Tetrahymena*. Tamari y col. (1976) demostraron la presencia de diacil-GPnL en la vesícula biliar bovina y Sugita y Hori (1969) también reportaron el aislamiento de diacil-GPnL de *Tetrahymena*, aunque en bajas cantidades.

Estructura química de la esfingomielina



Estructura química de los esfingofosfolípidos (SPnL)



El grupo $\text{O}=\text{C}-\text{R}$ indica un grupo acilo, normalmente palmitoil (16:0).
 $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3 = -\text{CH}_3$ ó $-\text{H}$. En los SPnL predomina $-\text{H}$; en la SM predomina $-\text{CH}_3$.

1.7.2. Presencia y distribución

Se resumen a continuación, algunos de los grupos en los que se han hallado fosfolípidos (Hilderbrand, 1982):

Bacterias

Hongos

Fitoplancton

Protozoos

Esponjas

Celenterados: Hidrozoarios, Scifozoarios y Anthozoarios

Moluscos: Pelecípodos, Gasterópodos, Cefalópodos, Loricados

Equinodermos: Equinoideos y Asteroideos

Anélidos

Artrópodos: Crustáceos

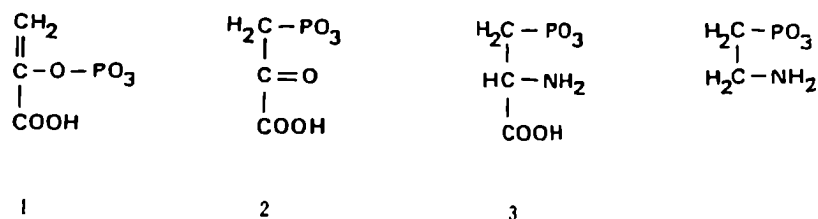
Se presume que el contenido de fosfolípidos en los vertebrados está relacionado con la ingesta, y no con la síntesis de dichos lípidos por parte de los organismos.

1.7.3. Metabolismo

1.7.3.1. Biosíntesis de esfingofosfolípidos

La ruta de la biosíntesis del AEPn aún no ha sido completamente aclarada. Se ha propuesto (Warren, 1968) que el enlace carbono-fósforo aparece por

reordenamiento interno en un residuo de fosfoenolpirúvico a ácido 3-fosfono-pirúvico, seguido de una transaminación a ácido 2-amino-3-fosfonopropiónico, que finalmente se decarboxila a 2-AEPn.



1. ácido fosfoenolpirúvico
2. ácido fosfono-pirúvico
3. ácido 2-amino-3-fosfono-propiónico
4. ácido 2-aminoetil-fosfónico

1.7.3.2. Degradación

Se encuentra bien establecido que a causa de la unión C-P, los fosfolípidos son extremadamente resistentes a la hidrólisis enzimática y química (Hilderbrand y Henderson, 1982). Hasta el presente no existen evidencias que indiquen la presencia de enzimas que degraden dicha unión en aquellos organismos que contienen fosfolípidos, tales como *Tetrahymena*, anémonas marinas, moluscos y otros.

1.7.4. Rol de los fosfolípidos

Existen evidencias que muestran que muchos organismos ajustan la composición de lípidos de sus membranas en respuesta a cambios en las condiciones de su entorno, ya sea de temperatura, nutrientes, inhibidores metabólicos, etcétera. Se acepta que es una modificación adaptativa de los lípidos, de manera de mantener el estado físico de las membranas dentro de rangos óptimos. *Tetrahymena* es uno de los casos más estudiados, en el cual la modificación depende de la alteración de las condiciones de crecimiento (Nozawa y Thompson, 1972).

1.7.4.1. Temperatura

Se ha observado que al disminuir la temperatura de crecimiento de *Tetrahymena*, aumenta el contenido de GPnL en la membranas ciliares y microsomales. El aumento en el contenido de ácidos grasos (AG) insaturados produce un descenso de la microviscosidad de la membrana (Nozawa y col., 1974). Siendo los GPnL los aceptores preferenciales de AG poliinsaturados, principalmente ácido ciliénico y linolénico (Ferguson y col., 1975), los GPnL actuarían en *Tetrahymena* como elementos regulatorios para la aclimatación al frío. Sin embargo, se desconoce el papel que juega la unión C-P del GPnL en el estado físico de la membrana.

1.7.4.2. Nutrientes

En un experimento llevado a cabo por Fukushima y col., en 1976, se observó que, al suplementar el medio de crecimiento de *Tetrahymena* con 1-O-hexadecil glicerol, un precursor de GPnL, los fosfolípidos de la membrana se enriquecían en el mencionado PnL, con una reducción de PE.

1.7.4.3. Edad

En contraste con los pequeños cambios en el contenido de GPnL hallados en *Tetrahymena*, asociados con la edad del cultivo, en el protozoo ciliado *Paramecium tetraurelia* se observa un marcado incremento en el porcentaje relativo de GPnL de la membrana ciliar. Una disminución compensatoria ocurre con el contenido de PE. La siguiente tabla, tomada de Rhoads y Kaneshiro (1979), ilustra estos cambios.

Variación en el contenido de GPnL con la edad del cultivo en P. tetraurelia

Fosfolípidos	Edad del cultivo (días)		
	3	5	7
Glicerofosfonolípido	32,1	38,6	42,3
Fosfatidiletanolamina	23,8	11,0	8,8
Esfingofosfonolípidos	13,9	14,5	15,5
Fosfatidilcolina	13,4	13,9	11,9
Fosfatidil serina + inositol	8,7	9,2	8,1
Esfingolípido	5,3	8,1	8,6

Valores expresados como mol % del total de lípidos.

1.7.4.4. Otras posibles funciones

No existen evidencias claras para explicar la función precisa de los fosfolípidos. Puesto que son altamente resistentes al ataque químico y enzimático y que su localización preferencial es la superficie de las membranas, podrían servir como protectores en células desnudas tales como *Tetrahymena* y *Paramecium*. Rosenthal y col. (1968 y 1970) demuestran que varios fosfolípidos análogos no son degradados por fosfolipasa A de *A. piscivorus* y fosfolipasa C de *C. perfringens*.

Otro ejemplo lo encontramos en la resistencia de la CAEPn a la hidrólisis por fosfolipasa C de *C. welchii* (Matsuura, 1979), una enzima que ordinariamente cliva la unión éster-fosfato entre etanolamina-fosfato y esfingosina.

Rosenthal y Pousada (1968) investigaron el efecto de los fosfonatos sobre las fosfolipasas. Las enzimas más efectivamente inhibidas por los fosfonatos eran aquellas que podían hidrolizar un éster en la localización de la unión C-P. Los fosfonatos análogos de la lecitina, con la unión C-P en la porción nitrogenada, fueron los que ejercieron mayor efecto inhibitorio sobre la fosfolipasa C de *C. perfringens*. Thompson (1969) menciona que la presencia de AEP incorporado, previene la degradación de PnL por lipasas. Así, la presencia de la unión C-P puede impartir resistencia frente a una variedad de enzimas hidrolíticas incluyendo, en el caso de *T. thermophila*, las fosfolipasas secretadas al medio extracelular por los mismos organismos (Florín-Christensen y col., 1986c).

1.7.5. Fosfolípidos en las anémonas de mar

1.7.5.1. Fosfonatos hidrosolubles

Si bien se ha hallado AEPn como molécula libre en sistemas vivos, no tiene, aparentemente, funciones biológicas, más allá de ser un reservorio de fósforo (Hilderbrand y Henderson, 1982). No obstante, en la anémona *Metridium dianthus*, la ciliatina (AEP), constituye el 1% del peso seco del tejido corporal, mientras que en *Tealia felina* se halló que el contenido de fósforo unido directamente a carbono (C-P), constituía el 50% del fósforo total presente en la anémona (Quin, 1965).

1.7.5.2. Esfingofosfolípidos

La CAEPn fue el primer esfingofosfolípido (SPnL) identificado en la anémona *A. elegantissima*, por Rouser y col. (1963). Simon y Rouser (1967) elucidaron la estructura de la CAEPn y encontraron una esfingosina con un AEPn esterificado en el primer hidroxilo, y un grupo N-acilo en el segundo carbono.

Los ácidos grasos fueron predominantemente saturados y con un largo de cadena de 14 a 18 carbonos. Las largas cadenas de ácidos grasos halladas usualmente en las ceramidas animales estaban ausentes, así como en los esfingofosfolípidos (Simon y Rouser, 1967).

Los SPnL han sido encontrados en una gran variedad de especies. Estos compuestos contienen esfingosina o bases de cadena larga estrechamente

Contenido de SPnL en anémonas (como % de lípidos totales)

	SPnL	CAEPn	CMAEPn
<i>A. elegantissima</i>	19,9	+	
<i>M. senile</i>	10,0	+	

Por otro lado, se ha encontrado AEPn como un componente del material proteináceo en varias anémonas: *Metridium senile* (Hilderbrand y col., 1971; Hilderbrand y col., 1973; Kirkpatrick y Bishop, 1972 y 1973; Hurley y col., 1977; Bunde y col., 1978), *Metridium dianthus* (Quin, 1964; Quin, 1965), *Anthopleura xantogrammica* (Kirkpatrick y Bishop, 1973).

En la tabla siguiente se muestra el contenido de fosfonatos en diferentes especies de anémonas de mar.

Contenido de fosfonatos en las anémonas de mar

	Monómero	Fracción Bioquímica
<i>A. elegantissima</i>	AEPn; mono, di y trimetil AEPn	L
<i>A. kurogane</i>	AEPn	LH
<i>A. pacifica</i>	AEPn	LH
<i>A. xanthogrammica</i>	AEPn; mono, di y trimetil AEPn	L,R,P
<i>Aiptasia pallida</i>	AEPn	R
<i>Bunodosoma cavernata</i>	AEPn	L,R
<i>Bunodosoma sp.</i>	AEPn	L,SA,R
<i>Cerianthus americanus</i>	AEPn	R
<i>Paractus repiformis</i>	NI	R
<i>Metridium dianthus</i>	AEPn	L,R,P
<i>Actinia equina</i>	NI	R
<i>Metridium senile</i>	AEPn	L,LH,GP,PS,R
<i>Tealia felina</i>	AEPn	L,R

L: lípidos; LH: líp. hidrolizados; R: residuo;
 P: proteínas; GP: glicoproteínas; SA: soluble en agua;
 Ps: proteasas. NI: no identificado.
 (Tomado de Hilderbrand y Henderson, 1982.)

1.7.5.4. Fosfolípidos en *Phymactis clematis*

En un exhaustivo estudio acerca de la composición lipídica de esta anémona, Pollero (1983) demostró que no se halla esfingomielina en ella, pero sí su análogo fosfonato (SPnL).

Se efectuaron observaciones similares en otras anémonas, en las que los esfingofosfolípidos constituyen una fracción importante del contenido lipídico (no hallándose esfingomielina ni glicerofosfolípidos en las mismas).

Pollero (1983) reconoció la presencia de varios fosfolípidos en *P.clematis*. Tres fracciones presentaron una reacción positiva con ninhidrina. La fracción menos polar fue identificada como fosfotidiletanolamina y la más polar no fue caracterizada.

Un compuesto de polaridad intermedia migró en CCF por encima de la fosfatidilcolina y fue atribuido a esfingofosfolípidos, puesto que dio reacción positiva con agentes específicos para esfingolípidos y grupos amino. Dicho compuesto ha sido observado en otros organismos marinos e invertebrados de agua dulce (Pollero, 1983).

La composición de lípidos de la anémona *P.clematis*, en dos estaciones del año, se observa en la siguiente tabla.

Composición lipídica estacional de Phymactis clematis

<u>Lípidos</u>	Distribución %	
	Otoño	Primavera
Ceras	1,5* (0,5) ^b	2,4 (0,2)
Esterol ésteres	10,8 (1,5)	30,5 (1,7)
Diacilglicerol éteres	13,1 (0,5)	14,5 (0,5)
Triacilgliceroles	25,7 (1,0)	26,4 (1,0)
Acidos grasos libres	trazas	0,7 (0,7)
Alcoholes grasos	1,1 (0,1)	1,6 (0,8)
Esteroles libres	2,5 (0,5)	11,0 (0,5)
Diacilgliceroles		
Monoacilgliceroles	3,8 (0,3)	2,1 (0,1)
Fosfatidiletanolamina	10,6 (0,2)	3,3 (0,3)
Esfingofosfolípido	14,9 (2,0)	5,1 (0,4)
Fosfatidilcolina		
No identificado	trazas	trazas
Lisofosfátidos	0,0 (0,5)	2,4 (1,0)
Lípidos neutros totales	68,5 (2,3)	89,2 (1,7)
Lípidos polares totales	31,5 (2,3)	10,8 (1,7)
Lípidos totales ^c	1,90 (0,1)	2,3 (0,1)

*Promedio de 2 muestras de 4 ejemplares cada una.

^bDesviación máxima de la media.

^c% p/p del tejido húmedo.

Capítulo 2

Materiales y métodos

- 2.1. Materiales empleados**
- 2.2. Procedencia de las anémonas en estudio**
- 2.3. Extracción de líquido entérico**
- 2.4. Determinación de la actividad hemolítica**
- 2.5. Naturaleza química de la celenterolisina**
- 2.6. Caracterización de la actividad hemolítica de la celenterolisina**
- 2.7. Análisis del mecanismo de acción de la celenterolisina**
- 2.8. Determinación del origen de la celenterolisina**

2.1. MATERIALES EMPLEADOS

Se emplearon en este trabajo los siguientes materiales:

Asolectina: extracto lipídico de semilla de soja, que contiene aproximadamente partes iguales de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina + fosfatidilinositol, y un 5 % de lípidos neutros (mono, di y triglicéridos y ácidos grasos): American Lecithin Co. (Woodside, NY, USA).

Marcadores lipídicos para cromatografía en capa fina (mono, di y triglicérido; ácido oleico; colesterol y éster de colesterol): Nu Chek Prep. Inc. (Elysian, MN, USA).

1,2-di[1-¹⁴C] oleoil PC. The Radiochemical Center (Amersham, Inglaterra).

Fosfatidilcolina, dipalmitoil y de cerebro bovino, fosfatidilcolina de soja tipo II-S y de huevo (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), colesterol y esfingomielina de cerebro y eritrocitos bovino y de yema de huevo de pollo: Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Esfingosilfosforilcolina y 2-lisofosfatidilcolina: Avanti Polar Lipids (Birmingham, Alabama).

Líquido de centelleo: PPO 4 g, POPOP 0,2 g y tolueno 660 ml: Merck (Darmstadt, Alemania), Tritón X-100 330 ml: Sigma Chem. Co.

Sephadex G-50, G-25 y G-10; Sepharosa 4BCL; CM-Sephadex; Blue Dextran 2000: Pharmacia (Uppsala, Suecia).

Cloruro de cobalto, molibdeno y trióxido de molibdeno, ácido sulfúrico: Carlo Erba (Italia).

Medio de cultivo PPY: 1% Proteosa Peptona (Difco), 0,1% Extracto de levadura (Difco), 0,1% glucosa (Anedra), 0,03% Sequestrine (CIBA-Geigy).

Marcadores proteicos para la determinación de peso molecular (Anhidrasa Carbónica, Inhibidor de Tripsina, Ribonucleasa A, Citocromo C, β -Lactoglobulina, Lactato deshidrogenasa, Albúmina de huevo de pollo, Glutamasa deshidrogenasa y Fosforilasa B), Sílica Gel G para CCF, iodo bisublimado, Resina Dowex-50W (catiónica), trizma base libre, NaCl, acetato de Na, glucosa, ácido cítrico, citrato de sodio, pronasa E, esfingomielinasa C de *S. aureus* (0,25 U/ μ l), aprotinin (Trassylol), albúmina de suero bovino, glutatión oxidado, urea, tripsina, hidróxido de Na, cloruro de potasio, ácido bórico, ácido clorhídrico, EDTA, DTNB, DTT, β -mercaptoetanol, cloruro de calcio, fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF 7626), reactivo de Folin, Coomassie brilliant blue, 5(6)-carboxifluoresceína sal sódica, SDS (dodecil sulfato de sodio), glicina, acrilamida, metilenbisacrilamida, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino), persulfato de amonio, INa, dimetilformamida, fosfato de celulosa, ácido 12-amino dodecanoico, antibiótico y antimicótico para el cultivo de células (A-7292), etanol, ninhidrina: Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Sulfato e hidróxido de Amonio, iodoacetamida, ácido trifluoroacético, tetrahidrofurano, ácido tricloroacético: Merck (Darmstadt, Alemania).

Cloroformo, metanol, ácido acético, dietiléter, hexano, carbonato y bicarbonato de sodio, tartrato de sodio y potasio, sulfato de cobre, azul de bromofenol, isopropanol, glicerol, dimetilformamida: Mallinckrodt Chemical Works (USA).

Arena de mar lavada: Baker & Co.

Sangre de: Rata (Sprague Dawley), cabra, bovina y humana. En todos los casos, fueron extraídas asépticamente y conservadas a 4°C, en Solución de Alsever: citrato de Na 8 g/l, NaCl 4,2 g/l, glucosa 20,5 g/l y ácido cítrico 10% 5,5 ml/l.

Autorradiografía: película radiográfica Film KODAK X-OMAT RP.

Revelador radiográfico: 3M, RLX-6. Fijador radiográfico: 3M, XFA-2.

Papel de filtro N° 1: Whatman, H. Reeve Angel and Co.

(Londres, Inglaterra).

Microporus filters, corte 10.000, Amicon Corporation (Massachusetts, USA).

N₂ para evaporación, A.G.A. Argentina.

En todos los casos, las drogas fueron de grado analítico y el agua bidestilada.

Instrumental:

Centrífuga clínica: Beckman TJ-6.

Centrífuga de alta velocidad refrigerada: Sorvall.

Microcentrífuga: ECYS.

Ultracentrífuga refrigerada: Sorvall OTD 75B.

Espectrofotómetro: Jasco J-0063.

Espectrofluorómetro: GK Turner, modelo 430.

Cubetas de cuarzo: FISHERbrand.

Cubetas descartables: Kartell.

Microscopio óptico: Axioplan.

Contador de centelleo líquido: Tm Analytic 6891/Delta 300.

Columnas para cromatografía: Pharmacia Fine Chemicals.

Colector de fracciones: Isco 272.

Bomba peristáltica: Scientific Industries 403.

Sonicador de baño: Branson 100.

Homoginizador de tejidos: Tissue Tearor, modelo 985-370. Biospec Products, Inc.

Columnas descartables para cromatografía: Bio-Rad.

Cuba para electroforesis: Vertical slab gel unity, Modelo SE 200. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California.

Fuente para electroforesis: BRL 500, Life Technology.

Espectrómetro para ^{31}P -NMR: Bruker Instruments, Inc. Billerica, MA (121.5 MHz).

2.2. PROCEDENCIA DE LAS ANÉMONAS EN ESTUDIO

Los ejemplares de *Phymactis clematis* empleados para este estudio fueron recogidos en las costas de Mar del Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina, y mantenidos en acuarios instalados en el laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Las peceras con agua de mar se mantuvieron a temperatura ambiente, con aireación e iluminación permanente.

2.3. EXTRACCIÓN DE LÍQUIDO ENTÉRICO (LE)

La presencia de actividad hemolítica fue investigada en el líquido presente en la cavidad entérica de la anémona *Phymactis clematis*. Para obtener el mismo, se practicaron las extracciones al cabo de 5 días, después de la alimentación de los ejemplares, con pipetas de vidrio introducidas cuidadosamente por la boca. Posteriormente, el LE fue filtrado a través de papel Whatman n° 1.

En la mayoría de los casos, el líquido entérico fue usado inmediatamente; en los casos en los que se indica, se guardó congelado a - 20°C.

2.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

2.4.1. Preparación de suspensiones de eritrocitos

Los eritrocitos empleados en este trabajo se obtuvieron de sangre de diferentes animales, extraída en forma aséptica y guardada en dos partes de solución de Alsever modificada (pH 6,1), a 4°C. La solución de Alsever contiene: 8 g/l de citrato de sodio, 4,2 g/l de NaCl, 20,5 g/l de glucosa y 0,55 g/l de ácido cítrico.

Para la determinación de la actividad citolítica, los glóbulos rojos fueron lavados tres veces con buffer TBS (20 mM Tris-Cl, 145 mM NaCl, pH 7,4) y centrifugados a 3000 xg, durante 10 minutos. De esta manera, los eritrocitos se separan de las proteínas plasmáticas y de la solución de Alsever.

2.4.2. Medición de la actividad hemolítica

Para este ensayo se realizaron diluciones seriadas de LE en buffer TBS, pH 7,4 y se incubaron 900 μ l de la toxina con 100 μ l de una suspensión de glóbulos rojos 3 %. El blanco del ensayo consistió en TBS, en lugar de LE, y glóbulos rojos en las mismas proporciones que en los demás ensayos.

Las incubaciones se realizaron a 37°C, durante una hora. El porcentaje de hemólisis en cada dilución de LE fue determinado a partir de la absorbancia del sobrenadante, a 570 nm, luego de la centrifugación de las muestras durante 5 minutos. En base a estos datos, se determinó por interpolación la

dilución correspondiente al 50% de hemólisis.

La unidad hemolítica (UH) fue definida como la cantidad de toxina requerida para causar un 50 % de hemólisis de una suspensión de eritrocitos al 0,3%; es decir, de unos 40 millones de glóbulos rojos. La inversa del factor de dilución expresa, directamente, la cantidad de UH presentes en el LE sin diluir (Bernheimer y Avigad, 1974).

En todos los casos se usaron glóbulos rojos de cabra, salvo que se indique lo contrario.

2.4.3. Cinética de la hemólisis

Los ensayos de hemólisis se hicieron con suspensiones de glóbulos rojos, en una concentración tal que su absorbancia aparente a 500 nm fuera de 1,0 leída contra el buffer del ensayo.

Se registró la variación de la absorbancia, en función del tiempo, al someter a los eritrocitos al LE.

Al lisarse los glóbulos rojos la absorbancia aparente disminuye, ya que la suspensión se hace más transparente.

2.4.4. Determinación de proteínas

La determinación de la concentración de las proteínas se realizó por el método de Lowry (1951).

2.5. NATURALEZA QUÍMICA DE LA CELENTEROLISINA

2.5.1. Examen de la partición en solventes orgánicos

A fin de establecer cómo particiona la actividad hemolítica en solventes orgánicos, se extrajeron los lípidos del LE según el método de Bligh y Dyer (1959) y se estudió la actividad hemolítica de las fracciones superior e inferior. Luego de la evaporación de los solventes bajo N₂, los lípidos fueron resuspendidos en buffer TBS, pH 7,4, agitando la muestra en vórtex, con bolillas de vidrio para favorecer el desprendimiento de los lípidos de las paredes del tubo.

2.5.2. Tratamiento con proteasas

A fin de estudiar el efecto de las proteasas sobre el factor lítico del LE, alícuotas del mismo fueron incubadas con Pronasa E y Tripsina (1 y 5 mg/ml). Estas enzimas fueron disueltas primero en TBS, en concentración 10x. Como blanco se usó la misma concentración de enzimas en buffer.

Luego de la incubación, se estudió la presencia de actividad lítica en cada muestra.

2.5.3. Diálisis

Con el fin de caracterizar adicionalmente la actividad hemolítica entérica, se procedió a dializar dos alícuotas de LE, una contra mil volúmenes de 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, durante 16 horas, y otra contra agua de mar

hervida, durante 21 horas, a 4°C. En ambos casos se utilizó agitación constante.

La presencia de actividad hemolítica en el contenido de la bolsa de diálisis y en el material dializado fue luego investigada.

2.5.4. Precipitación con sulfato de amonio.

Las sales en solución como el $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (sulfato de amonio) ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas globulares. El sulfato de amonio, por su gran solubilidad en agua, permite alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas.

Como un primer paso de purificación del factor hemolítico presente en el LE de la anémona, se preparó una solución saturada de sulfato de amonio, que se llevó a pH 7,0 con NH_4OH . A 3 ml de LE se agregaron diferentes volúmenes de la solución saturada y agua destilada para lograr la concentración de sales deseada, en un volumen final de 20 ml. Luego de mantener las muestras 1 hora a 4°C, se centrifugaron a 16000 xg, durante 30 minutos, a 4°C. El pellet se resuspendió en TBS, hasta el mismo volumen final.

Se determinó luego la presencia de actividad hemolítica en cada fracción.

2.5.5. Cromatografía en Sephadex G-50

Es éste un método de cromatografía líquida que separa moléculas de diferente tamaño. Es una técnica analítica, que permite la separación de

proteínas que difieren notablemente en sus tamaños.

El lecho cromatográfico (fase estacionaria) consiste en diminutas partículas porosas no cargadas (gel), empaquetadas dentro de una columna. La separación en la filtración en gel depende de la diferencia de la capacidad de las distintas moléculas de una muestra, para entrar en los poros del gel, en los que se halla la fase estacionaria. Las moléculas grandes, que no pueden entrar a la fase estacionaria, se mueven a través del lecho cromatográfico más rápidamente, eluyendo de la columna con el volumen de exclusión. Las moléculas pequeñas se mueven más lentamente a través de la columna, dado que se distribuyen entre el líquido libre y el líquido contenido en los poros del gel. Las moléculas son eluidas, por lo tanto, en orden de tamaño molecular decreciente (Andrews, 1964).

Con el fin de purificar la celenterolisina y determinar su peso molecular, se utilizó una columna de 93 cm de largo y 1,2 cm de diámetro. La fase estacionaria fue Sephadex G-50 medio (Pharmacia). La determinación del volumen de exclusión (V_0) se realizó con Blue dextran 2000 (PM 6.000 kDa) y la del volumen total (V_t) con cloruro de cobalto (PM 270 Da), aprovechando su coloración rojiza. La calibración de la columna para la determinación del peso molecular se llevó a cabo con los siguientes marcadores proteicos: Anhidrasa carbónica (PM 29 kDa), Inhibidor de tripsina (PM 20,1 kDa) y Ribonucleasa A (PM 13,7 kDa). El buffer de elución usado fue TBS y el flujo, de 12 ml por hora (4 ml/fracción).

Cada standard proteico fue corrido por separado y su elución de la columna

fue seguida por medición de la absorbancia a 280 nm.

La elución de la actividad hemolítica del LE fue seguida por medio de la determinación de las unidades hemolíticas presentes en cada fracción. La absorbancia a 280 nm de cada fracción fue también determinada.

2.5.6. Cromatografía en presencia de urea 4 M

Con el fin de estudiar la posible presencia de subunidades en la estructura polipeptídica de la celenterolisina, el experimento anterior fue repetido empleando como buffer de elución 4 M Urea en TBS.

2.5.7. Cromatografía de intercambio iónico

A fin de investigar otro posible método de purificación, se estudió el pI aproximado de la celenterolisina, de acuerdo con su comportamiento en las columnas de CM-Sephadex (5 ml), las cuales fueron equilibradas con buffer a distintos pH.

Hasta pH 8,5 se utilizó Tris-HCl, y para pH 9,0 y 9,5, buffer borato de sodio. La elución se hizo por aumento de la fuerza iónica, con un gradiente discontinuo de NaCl (0,1-0,5-1,0 M). El volumen de muestra sembrado fue de 100 μ l. Este tipo de estudios permite estimar el punto isoeléctrico (pI) (Lampson y Tytell, 1965).

2.5.8. Purificación de la celenterolisina

Se realizaron dos esquemas de purificación de la celenterolisina, a partir

del líquido entérico, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos que se han mencionado más arriba. Comprendieron los siguientes pasos:

1. Precipitación con sulfato de amonio
2. Cromatografía de intercambio iónico
3. Cromatografía en Sephadex G-50

Protocolo I.

Para esta purificación, 50 ml de LE fueron recogidos de la forma descrita en la sección 2.3. El primer paso de purificación de la celenterolisina consistió en una precipitación con 80 % de sulfato de amonio (concentración de sales en la cual precipita la actividad lítica), según la sección 2.5.4.

Luego de la centrifugación, el pellet fue resuspendido en 3 ml de 20 mM Tris-HCl/25 mM NaCl, pH 7,4 (buffer A). Una alícuota de 2,5 ml fue aplicada en una columna de intercambio catiónico, Dowex-50W (Volumen del lecho = 15 ml), equilibrada con el buffer A.

Después del lavado de la columna con 2 volúmenes de buffer A, la actividad lítica fue eluida con 500 mM NaCl.

Se recogieron dos fracciones consecutivas, de 0,5 ml cada una, con actividad lítica. Medio ml fue cromatografiado en Sephadex G-50 (columna de 93 x 2 cm), con TBS. La tasa de flujo fue de 1 ml/min y se recogieron fracciones de 0,5 ml.

Las fracciones en las cuales se detectó actividad lítica fueron empleadas

para realizar estudios de caracterización de la celenterolisina.

Protocolo II

En este protocolo, el primer paso de precipitación son sulfato de amonio fue utilizado en dos etapas. Primero, se llevó un volumen de líquido entérico (120 ml) a 40% de saturación con la sal. Luego de 2 horas a 4°C, la solución resultante fue centrifugada (10.000 rpm en el rotor SS34 de una centrífuga Sorvall de alta velocidad) y el precipitado descartado. El sobrenadante fue luego llevado a 80% de saturación con sulfato de amonio y, luego de 24 horas a 4°C, se procedió como en el paso anterior, recuperándose en este caso el precipitado. Éste fue disuelto en 10 mM Tris-HCl, pH 8,1, y sembrado en una columna de fosfato de celulosa (5 x 2,5 cm de diámetro) equilibrada con este buffer. Luego de lavar la columna con 5 volúmenes de 10 mM Tris-HCl, pH 8,1, se eluyó la actividad hemolítica con 10 mM Tris-HCl, pH 8,1/0,15 M NaCl. Este eluato fue concentrado por precipitación con 80% de saturación de sulfato de amonio, rediseuelto en 10 mM Tris-HCl/0,1 M NaCl, pH 7,4, y cromatografiado en una columna de Sephadex G-50 (50 x 1 cm de diámetro) equilibrada con el mismo buffer. En todos los casos, se determinó la A₂₈₀ y la actividad hemolítica, conservándose aquellas fracciones con máxima actividad.

Las fracciones eluidas de la columna de Sephadex G-50 fueron concentradas por precipitación con sulfato de amonio, disueltas en un mínimo volumen de 10 mM Tris-HCl/0,1 M NaCl y analizadas por

electroforesis en gel de 15% de acrilamida, en presencia de sodio dodecil sulfato.

2.5.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Con el fin de investigar la pureza de una fracción de celenterolisina tratada en la forma descrita en la sección anterior, se realizó una electroforesis, en gel de poliacrilamida, en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) (según el método de Weber y Osborn, 1969).

Las muestras, purificadas por precipitación con sulfato de amonio, intercambio iónico (Dowex-50W), diálisis y Sephadex-G50, como se describe en la sección 2.5.8., fueron liofilizadas y diferentes cantidades (75, 150, 300 y 600 μg) fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia del detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS). Esta separación electroforética es dependiente del peso molecular de las cadenas polipeptídicas (Shapiro, Viñuela y Maizel, 1967; Weber y Osborn, 1969).

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de 15% de acrilamida, con un gel espaciador de 7%, conteniendo ambos 0,1% de SDS. El buffer de corrida fue Tris-glicina, pH 8,3. Las muestras fueron previamente resuspendidas en 10 mM Tris-HCl, 1% SDS, 5% β -mercaptoetanol y 10% de glicerol; incubadas 3 minutos a 100°C y diluidas al medio con una solución 1 % de azul de bromofenol, con el fin de visualizar el frente de corrida.

Se aplicó una diferencia de potencial de 40 V durante 30 minutos, hasta que las muestras penetraron en el gel espaciador, y luego 80 V durante 3 horas.

La tinción se realizó con: Coomassie blue 0,05 %, isopropanol 25 %, ácido acético glacial 10%. La destinción se llevó a cabo con: metanol 10 %, ácido acético glacial 10% (Ball, 1986).

Los estándares proteicos usados para calibrar los geles fueron:

Citocromo C (12.4 kDa); β -Lacto globulina (18.4 kDa); Anhidrasa carbónica (29 kDa); Lactato deshidrogenasa (36 kDa); Albúmina de huevo de pollo (43 kDa); Glutamasa deshidrogenasa (55 kDa); Fosforilasa B (95.5 kDa).

2.6. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LA CELENTEROLISINA

2.6.1. Termolabilidad

Se investigó el efecto de la temperatura sobre el factor hemolítico sometiendo el LE a 0, 20, 37, 60 y 80°C, durante 30 minutos. Luego del agregado de glóbulos rojos, se determinó en cada fracción las UH presentes.

Asimismo fue analizado el efecto de repetidos congelados (-20°C, 24 horas) y descongelados, sobre la capacidad del LE para lisar eritrocitos, mediante la determinación de UH luego de cada descongelado.

2.6.2. Efecto del pH

El efecto del pH sobre la actividad lítica fue analizado ajustando el líquido entérico a distintos valores de pH; con buffer citrato a pH 5,5 y 6,0, y con buffer Tris-HCl a pH 7,0; 7,5; 8,0 y 8,5. La concentración final de los buffers fue de 50 mM. Las muestras ajustadas se llevaron al mismo volumen con 0,15 M NaCl.

La lisis de los glóbulos rojos fue seguida por medio de un espectrofotómetro, a 500 nm, determinándose también las unidades hemolíticas resultantes para cada pH.

2.6.3. Temperatura óptima

Una solución de lisina en buffer TBS, conteniendo aproximadamente 300 UH, fue incubada a diferentes temperaturas (0, 20, 37°C) por espacio de una hora, con una suspensión de GR. En base al número de UH, se estudió la temperatura óptima requerida por el factor lítico para producir la ruptura de los eritrocitos.

2.6.4. Relación dosis-efecto

Cuando se examinó el efecto de la concentración de la celenterolisina sobre la lisis de los glóbulos rojos, una muestra conteniendo 200 UH fue sometida a diluciones seriadas, en TBS.

La cinética de hemólisis se registró en un espectrofotómetro, a 500 nm, determinándose la disminución de la absorbancia aparente de la suspensión

de GR en función del tiempo, como se indicó en 2.4.3.

Por otro lado, suspensiones de 5% de eritrocitos fueron incubadas con distintas cantidades de CL, en un volumen final de 1 ml, durante una hora a 37°C. Después de la centrifugación de las muestras, se determinó la absorbancia del sobrenadante y se estimó el número de lesiones por célula, en función de la concentración de toxina.

2.6.5. Efecto del Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ y EDTA

Para investigar los requerimientos iónicos de la actividad lítica, se ensayó el efecto del Cl₂Ca y del Cl₂Mg sobre una muestra de CL. Dicha actividad no fue aumentada por el agregado de 1 ó 10 mM de Cl₂Ca o Cl₂Mg.

A fin de secuestrar los cationes que pudieran haber quedado junto con la celenterolisina, se agregó EDTA (2 mM, concentración final) al eluato y se determinó nuevamente la capacidad de lisis.

2.6.6. Agentes oxidantes y reductores

Se examinó el efecto de un número de agentes oxidantes y reductores sobre la actividad de 200 UH de la celenterolisina.

Así, se determinó el número de unidades hemolíticas de la celenterolisina, como se indicó en 2.4.3., luego de la incubación de la misma en presencia de DTT, β-mercaptoetanol, DTNB y glutatión oxidado, todos en una concentración final de 1 mM, y de 1 y 10 mM de iodoacetamida.

Los agentes fueron agregados al LE 5 minutos antes de la incubación con glóbulos rojos, a partir de soluciones stock 20 mM en TBS.

2.7. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CELENTEROLISINA

2.7.1. Efecto de los inhibidores de proteasas, PMSF y BSA

Con el fin de esclarecer el mecanismo de acción de la toxina entérica de anémona, se ensayó el efecto de los inhibidores de proteasas, Trassylol (Aprotinin) y PMSF, sobre la actividad hemolítica. Para esto, 200 UH de CL se incubaron con distintas concentraciones de Trassylol (720 $\mu\text{g/ml}$, 180 $\mu\text{g/ml}$ y 36 $\mu\text{g/ml}$) y 1 mM de PMSF, en un volumen final de 500 μl , durante 1 hora, a 37°C.

En otros ensayos, 1% de BSA fue adicionada al medio de reacción.

2.7.2. Actividades fosfolipasas en el líquido entérico

2.7.2.1. Detección de actividades fosfolipasa

Con la intención de investigar la presencia de fosfolipasas en *Phymactis clematis* y su posible actividad hemolítica, se realizaron los siguientes ensayos:

Detección de Plipasas en el homogenato (Hto) de anémonas:

Ejemplares enteros fueron homogeneizados con agua de mar, hasta un

volumen final de 3 ml, en un homogeinizador de tejidos (Tearor), durante dos minutos, a velocidad máxima y bajo hielo.

El homogenato resultante fue centrifugado durante 10 minutos a 20.000 xg y 4°C. El sobrenadante fue investigado como se describe a continuación.

1. Incubación de 280 μ l de homogenato de anémona con el buffer correspondiente (25 mM buffer citrato, pH 4,5 ó 25 mM buffer tris pH 8,0), durante 1 hora a 37°C, para la determinación de actividad sobre sustratos endógenos.
2. Incubación de 280 μ l de homogenato de anémona total con 40 μ l de PC de semilla de soja, tipo II-S, (50mg/ml) y 80 μ l de 50 mM buffer Tris-Cl, pH 8, a 37°C, por espacio de 1 y 2 horas.

Detección de fosfolipasas en el líquido entérico:

3. Incubación de 40 μ l de Asolectina (30 mg/ml) con 280 μ l de LE, durante 4 horas, a 37°C.

En todos los casos, al finalizar las incubaciones se extrajeron los lípidos de acuerdo con Bligh y Dyer (1959). Se agregó a cada tubo, por cada 0,4 ml de muestra: 1,5 ml de cloroformo/metanol (1:2, v/v), y se agitó hasta lograr una sola fase. Luego se añadieron 0,5 ml de cloroformo y 0,5 ml de 0,1 N HCl. Después de centrifugar las muestras durante 5 minutos a 1000 xg se separan dos fases. La fase inferior conteniendo los lípidos fue extraída con

pipeta Pasteur, y el solvente fue evaporado bajo atmósfera de nitrógeno.

Los distintos lípidos fueron separados por cromatografía de capa fina (CCF), en placas de 20 x 20 cm de Sílica Gel G (Sigma), extendidas en el laboratorio. El desarrollo de los cromatogramas se realizó con una mezcla de solventes consistente en hexano/dietiléter/metanol/ácido acético (90:20:3:2, v/v), para separar los lípidos neutros.

La visualización de las manchas lipídicas se hizo por exposición a vapores de yodo. De esta forma, es posible determinar la presencia de fosfolipasa A en una muestra, por el aumento de ácidos grasos y lisocompuestos.

2.7.2.2. Determinación de actividades fosfolipasa con fosfatidilcolina radiactiva

El sustrato empleado fue 1,2-di[1-¹⁴C] oleoil PC, diluido con PC de huevo a una actividad específica de 0,05 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$. La concentración del lípido fue de 3mg/ml, dispersada en 0,5 M buffer Tris-Cl, pH 8,0. El ensayo consistió en 50 μl de la suspensión y 150 μl de cada fracción de los eluatos, obtenidos luego de cromatografiar una muestra de LE a través de una columna de tamiz molecular (Sephadex G50), en las condiciones descriptas en 2.5.5.

Luego de 1 a 3 horas de incubación a 37°C, los lípidos resultantes fueron extraídos como se indicó (Bligh y Dyer, 1959) y separados por CCF de la siguiente forma:

1. Cloroformo/metanol/agua (65:35:5;v/v)

Se desarrolla la corrida hasta 12 cm del borde superior de la placa.

2. Hexano/etil éter/ácido acético (90:20:2; v/v)

Se desarrolla la corrida hasta el extremo superior.

De esta forma se pueden separar los lípidos polares y los no polares, en la misma placa. Las placas de CCF fueron autorradiografiadas.

Finalmente se procedió a recuperar los AG y diacilgliceroles de la placa de Sílica Gel, recogiendo las porciones correspondientes en viales de centelleo. Luego del agregado de solución de centelleo, la radiactividad fue cuantificada en un contador de centelleo líquido. Las eficiencias de conteo se determinaron mediante el método de standard externo.

Las placas de CCF mencionadas en la sección anterior fueron autorradiografiadas. Para esto, fueron expuestas, durante 10 días, a película radiográfica sensible (KODAK X), a temperatura ambiente. La película fue procesada con revelador y fijador 3M.

2.7.3. Actividad esfingomielinasa en el líquido entérico

Con el fin de determinar la presencia de esta actividad en el líquido entérico, se utilizó como sustrato esfingomielina (SM) de yema de huevo de pollo. Se preparó una suspensión de 2 mg/ml en buffer TBS, pH 7,4, que se dispersó por sonicación (3 minutos a temperatura ambiente en un sonicador de baño Branson 100).

El ensayo consistió en la incubación de 400 μ l de este sustrato y 400 μ l de

la toxina. Después de 2 horas de incubación a 37°C, los lípidos fueron extraídos de acuerdo con el método de Bligh y Dyer (1959), como se describe en la sección 2.7.2.1. Al mismo tiempo, se realizó una incubación de SM con SMasa de *Bacillus cereus* como control positivo, la cual rinde ceramida.

Una vez evaporada la fase inferior con nitrógeno, los lípidos fueron separados por cromatografía en capa fina (CCF), con el siguiente sistema de solventes:

1. Cloroformo/metanol/agua (65:35:5;v/v); para separar los fosfolípidos. Se desarrolla la corrida hasta 12 cm del borde superior de la placa.
2. Cloroformo/metanol/amoníaco (100:10:1; v/v); para separar los lípidos neutros. Se desarrolla la corrida hasta el extremo superior.

La posición de los distintos lípidos fue puesta en evidencia por la exposición de la placa a los vapores de yodo.

2.7.4. Estudio del efecto de diversos lípidos sobre la actividad hemolítica

2.7.4.1. Lípidos puros

Se estudió el efecto de las concentraciones crecientes de diferentes lípidos -SM, PC, Chol y Asolectina- sobre la actividad hemolítica. Para ello se incubaron alícuotas de la toxina, conteniendo 20 UH, con suspensiones de lípidos (en 10 mM Tris-HCl/145 mM NaCl, pH 7,2, sonicadas durante 15 minutos), por una hora a 37°C (Bernheimer

y Avigad, 1976), determinándose las UH presentes en cada muestra. También se investigó el efecto de los lípidos sobre la cinética de la hemólisis de los glóbulos rojos, agregando cada uno de los lípidos individualmente.

Se investigaron esfingomielinas de diferente origen: cerebro y eritrocitos bovinos y yema de huevo de pollo.

2.7.4.2. Extractos lipídicos de eritrocitos

Para la extracción de los lípidos totales de los eritrocitos de cabra, se empleó un volumen de 5 ml de sangre (conservado en Solución de Alsever como se describió anteriormente). Luego del lavado de los eritrocitos con solución fisiológica (NaCl 9%), se extrajeron los lípidos según el método de Bligh y Dyer (1959). El solvente de la fase inferior, en la que se hallan los lípidos, se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno y los lípidos fueron pesados. Se repitió el procedimiento hasta obtener un peso constante.

Distintas concentraciones de una suspensión sonicada de dichos lípidos, en 20 mM Tris-HCl/145 mM NaCl, pH 7,2, fueron incubadas junto con la toxina, por 1 hora a 37°C, según Linder y col. (1977), a fin de estudiar la inhibición de la toxina por los lípidos naturales. Luego de la incubación se determinaron las UH presentes en los controles no tratados y en cada una de las mezclas lípido-toxina probadas.

2.7.4.3. Extractos lipídicos de las anémonas de mar

Con el objeto de examinar la presencia, en las anémonas de mar, de lípidos que pudieran causar inhibición de la hemólisis, se procedió a extraer los lípidos totales de un homogenato de anémona. El homogenato fue obtenido como se indica en la sección 2.7.2.1.

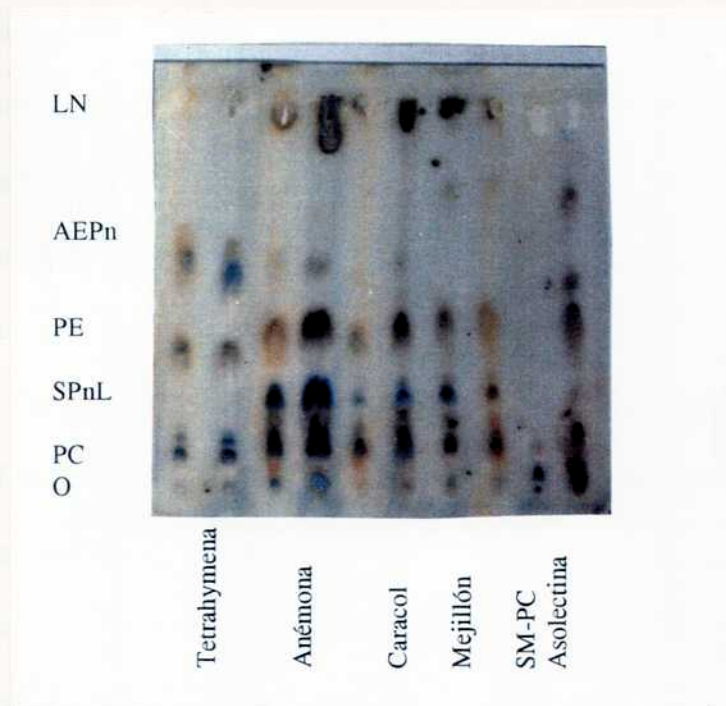
Los lípidos fueron resuspendidos e incubados con el LE como se indicó para los lípidos de eritrocitos (sección 2.7.4.2.). Luego de la incubación se determinaron las UH presentes.

2.7.4.4. Lípidos de anémonas de mar purificados por CCF

Una vez extraídos los lípidos totales de la anémona de mar, según el método ya descrito de Bligh y Dyer (1959), los fosfolípidos fueron separados de los fosfonolípidos por cromatografía en capa fina (CCF) de Sílica gel G. El sistema de solventes desarrollado por Thompson (1969) para tal fin consiste en: cloroformo/ácido acético/metanol/agua (75:25:5:1,5; v\v).

La identificación de los fosfonolípidos en la placa se realizó por dos métodos de tinción, uno de ellos consiste en el rociado de la placa con ninhidrina, en solución etanólica al 0,3 %, seguida de exposición de la placa a 70°C por breves minutos. Los lípidos reactivos, es decir aquellos que contienen grupos amino libres, se visualizan por su color morado. El otro procedimiento fue descrito por Stillway y Harmon (1980) para la tinción selectiva de fosfonolípidos. Dicho procedimiento consiste en el empleo de

trióxido de molibdeno y molibdeno metálico, disueltos en ácido sulfúrico diluido. En una primera etapa tanto los fosfo como los fosfolípidos adquieren un color azul característico, pero a diferencia de los fosfolípidos, los fosfonolípidos conservan este color luego de la exposición a 100°C durante 15 minutos, seguida de enfriamiento a temperatura ambiente por 30 minutos. Los fosfolípidos no fosfónicos adquieren un color pardo, que los diferencia claramente de los fosfonolípidos azulados.



Separación cromatográfica de los lípidos de diferentes organismos. La coloración azul, dada por la tinción con molibdeno, revela la presencia de fosfolípidos. En la anémoma de mar se distingue una fracción muy importante, que corresponde al esfingofosfolípido (SPnL). AEPL=aminoetilfosfolípido; SM=esfingomielina; PC=fosfatidilcolina; PE=fosfatidiletanolamina.

La confirmación de la identidad del lípido aislado como SPnL en las bandas que indicaban la presencia de fosfolípidos, se realizó por resonancia magnética nuclear (^{31}P NMR), en un espectrómetro Bruker (121.5 MHz). Esta determinación se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Universidad de Cincinnati (USA).

En los casos en que se requirió usar el fosfolípido, la visualización de las manchas se hizo por breve exposición de las placas a vapores de yodo.

Los lípidos fueron separados de la placa raspando y recogiendo las diferentes porciones de sílica en las que se hallaban. La elución de la sílica se llevó a cabo luego con cloroformo/metanol (1:2). Luego de la evaporación del solvente, se analizó el posible efecto inhibitorio de cada lípido sobre la actividad de la celenterolisina, de la misma forma que en la sección anterior.

2.7.4.5. Pretratamiento de los eritrocitos con esfingomielinasa

Al encontrarse que los lípidos totales extraídos de los eritrocitos provocaban la inhibición de la actividad hemolítica y, al mismo tiempo, comprobarse que el único lípido inhibitorio era la SM, se realizó un experimento adicional, preincubando los eritrocitos con esfingomielinasa (SMasa). De esta forma, se estudió el efecto de hidrolizar la SM de los glóbulos rojos, sobre la actividad lítica de la CL.

La incubación de los GR con la enzima se extendió por 30 minutos a 37°C. Luego se centrifugaron las muestras a 1.100 xg por 5 minutos, y el pellet

conteniendo los GR se incubó con la toxina para la determinación de las UH (Bernheimer y Avigad, 1976).

2.7.4.6. Sensibilidad de los eritrocitos de distinto origen

A fin de establecer una relación entre el contenido de SM de la membrana de los eritrocitos y su sensibilidad a la toxina, suspensiones de GR de distinto origen fueron incubadas con celenterolisina, determinándose las UH (Bernheimer, Avigad y Avigad, 1975). También se midió la cinética de hemólisis. En ambos casos se usaron GR de cabra, rata y humanos.

2.7.4.7. Unión de la lisina a los glóbulos rojos

A fin de estudiar la unión de la toxina a los glóbulos rojos, se preincubó CL con diferentes concentraciones de eritrocitos (diluciones al medio con TBS, desde 5% hasta 0,07%) durante 30 segundos, en frío. Después de la centrifugación durante 5 minutos a 3.000 xg, se determinó el número de unidades hemolíticas remanentes en el sobrenadante de la incubación.

2.7.5. Interacción de la celenterolisina con los liposomas

El uso de liposomas para estudiar la interacción entre liposomas y proteínas presenta grandes ventajas, pues ofrece la posibilidad de emplear bicapas constituidas únicamente por lípidos, sin las proteínas presentes en las membranas nativas. Se logra así simplificar y acotar notablemente los sistemas en estudio.

Con el fin de analizar la interacción entre la celenterolisina, sensible a SM, y los esfingofosfolípidos endógenos de la anémona de mar, se empleó un ensayo de ruptura de liposomas. Los liposomas fueron preparados con extractos lipídicos de distinta procedencia.

2.7.5.1. Preparación de liposomas encapsulando

5(6)-carboxifluoresceína

Para las preparaciones empleadas en este trabajo se utilizó la técnica descrita por Weinstein y col. (1977), basada en la liberación intracelular de un marcador fluorescente, retenido por las vesículas lipídicas. Dicho colorante no fluoresce (self-quenching) cuando se halla en altas concentraciones (100 mM o más). Encapsulando carboxifluoresceína en liposomas, en dicha concentración, puede seguirse la ruptura de los mismos y la liberación del colorante por la intensificación de la fluorescencia que acompaña a la dilución. Los lípidos fueron agregados en solución clorofórmica, en un tubo cónico de 10 ml. Se procedió luego a la formación de un "film" por depósito del material, de manera uniforme, sobre las paredes del tubo, rotándolo y evaporando el solvente bajo corriente de nitrógeno. Los lípidos, secados de esta forma, se dispersaron en una solución 100 mM del marcador fluorescente, en una concentración de 10 mg/ml. La dispersión del film de lípidos desde el vidrio fue facilitada por el agregado de pequeñas perlas de vidrio (0,2 mm de diámetro).

La etapa final de la preparación involucra el pasaje de los liposomas a

través de una columna (1 x 20 cm) de Sephadex G-75, con el fin de separar los liposomas del colorante no encapsulado. El buffer empleado fue 10 mM Tris-HCl/100 mM NaCl, pH 7,4. Los liposomas eluyen con el volumen de exclusión de la columna ($V_o = 13,5$ ml).

Los cambios de fluorescencia se estudiaron a 37°C, en un espectrofluorómetro con registro continuo de la emisión fluorescente (λ excitación 490; λ emisión 520).

2.7.5.2. Estudio de la lisis de los liposomas por registro continuo de la fluorescencia

Con el fin de obtener un registro espectrofluorométrico de la sensibilidad diferencial de los liposomas de distinta composición, a la celenterolisina, se ensayaron los siguientes preparados, todos en una concentración final de 0,1 mg lípido total/ml.

- a. Lípidos totales de anémona (LAne)
- b. LAne + SM, 4:1
- c. LAne + PC, 4:1
- d. Lípidos totales de glóbulos rojos bovinos (LGR)
- e. LGRN* + SM
- f. LGRP* + SM
- g. DOPC
- h. DOPC + SM

- i. DOPC + SM + PS
- j. PC huevo pollo + SM + Ác. fosfatídico
- k. PC huevo pollo + SM + Chol
- l. PC + SPnL
- ll. PC + SM + PE

* LGRN y LGRP: lípidos neutros y polares de los glóbulos rojos, separados por cromatografía en columna de sílica gel G (sección 2.7.5.3.).

DOPC: di-oleoil-fosfatidilcolina

En una cubeta termostatizada a 37°C, se colocó 0,9 ml de buffer 10 mM Tris/ 100 mM NaCl, pH 7,4 y 100 μ l de la suspensión de liposomas (preparados como se indicó en 2.7.5.1.), y se registró la fluorescencia emitida por la carboxifluoresceína, al ser liberada por la ruptura de los liposomas. Para este ensayo se empleó un espectrofluorómetro Turner, modelo 430, con cubetas termostatizadas.

Los liposomas fueron sometidos a la acción de distintas concentraciones de la celenterolisina de la anémona. Aquéllos que permanecieron intactos frente a este tratamiento, fueron lisados posteriormente por el agregado de 50 μ l de 2% de Tritón X-100 en agua.

2.7.5.3. Separación de los lípidos polares y no polares de los eritrocitos por cromatografía en columna

Una vez extraídos los lípidos totales de los glóbulos rojos bovinos, como se indica en la sección 2.7.4.2., dos fracciones de diferente polaridad fueron

separadas con distintos solventes, en una columna conteniendo 500 mg de Sílica gel G.

Después de sembrada la mezcla de lípidos, se eluyeron los lípidos neutros con cloroformo. En una segunda etapa, los lípidos polares se eluyeron con metanol. Una vez evaporados los solventes, ambas fracciones lipídicas fueron empleadas para la preparación de liposomas (sección 2.7.5.2.).

2.7.5.4. Interacción de la celenterolisina con liposomas de distinto origen

Con el fin de estudiar la interacción de la celenterolina con diferentes lípidos, se prepararon liposomas de distintos orígenes, evaporando bajo nitrógeno soluciones en cloroformo de dichos compuestos. Este procedimiento se llevó a cabo haciendo rotar el tubo que contenía la solución, de manera de lograr la formación de una fina película sobre las paredes del mismo. Luego se agregó TBS en cantidad suficiente como para lograr una concentración final de 2mg/ml. Se resuspendieron los lípidos con ayuda de unos pocos granos de arena de mar lavada (washed sea sand, obtenida comercialmente de Baker & Co.) y con agitación vigorosa en vórtex. Posteriormente se sonicaron las preparaciones por 10 minutos, en un sonicador de baño Bransonic 100. Estas suspensiones fueron diluidas adecuadamente con TBS, para dar lugar a las distintas concentraciones utilizadas en los ensayos de unión.

Los ensayos consistieron en la incubación de CL (128 UH/ml, 19 ng) con

los liposomas, a temperatura ambiente y por espacio de 5 minutos; posteriormente se centrifugaron las muestras en una microcentrífuga Elys, con el fin de sedimentar los liposomas. Una vez recogidos los sobrenadantes se determinó la actividad hemolítica remanente en los mismos.

En este ensayo se empleó como control una muestra de CL tratada en las mismas condiciones que las demás, pero incubada sin lípidos; no se observó la pérdida de actividad en este control.

2.7.6. Unión de la celenterolisina a fosfolípidos

2.7.6.1. Preparación de fosfatidilcolina (PC) inmovilizada sobre Sepharosa 4BCL

Este medio de afinidad (PC-Sepharosa 4BCL) fue preparado según se describió recientemente (Delfino y col., 1994). Brevemente, el proceso consistió en acilar 1-acil-lisofosfatidilcolina con anhídrido 12-amino(N-tBOC)dodecanoico, de acuerdo con el procedimiento ideado por Khorana (Gupta y col., 1977). Una vez completada la acilación, el grupo amino terminal de esta nueva PC fue desprotegido mediante ácido trifluoroacético y la PC fue acoplada covalentemente a Sepharosa 4BCL activada en la forma CH-Sepharosa 4BCL, es decir, como éster de N-hidroxisuccinimida, en tetrahidrofurano/50 mM bicarbonato de sodio (3:1, v/v). Se utilizó un exceso de 5 veces de fosfolípido respecto de los grupos activos teóricos de la Sepharosa activada. Los grupos no reaccionados de la resina fueron

desactivados por reacción con 1M de Tris-HCl, pH 8,1. La resina se sometió luego a lavados con solventes orgánicos para eliminar cualquier traza del fosfolípido no ligado covalentemente. Finalmente, fue resuspendida en 20 mM Tris-HCl/150 mM NaCl, pH 7,4.

2.7.6.2. Preparación de esfingomielinea (SM) inmovilizada sobre Sepharosa 4BCL

Este es un medio de afinidad que no registra antecedentes y fue desarrollado específicamente para el trabajo de esta Tesis. El procedimiento consistió en reaccionar el grupo amino libre presente en la esfingosilfosforilcolina directamente con CH-Sepharosa 4BCL, en tetrahidrofurano/50 mM bicarbonato de sodio (3:1, v/v), utilizándose asimismo un exceso de 5 veces de esfingosilfosforilcolina respecto de los grupos activos de la matriz activada. La incubación se realizó con agitación continua durante 24 horas y luego se concluyó la reacción por lavado con exceso de 1M Tris-HCl, pH 8,1. Nuevamente, se efectuaron lavados con solventes orgánicos para eliminar el fosfolípido no acoplado y, finalmente, se resuspendió esta matriz de afinidad en TBS.

2.7.6.3. Protocolo para la interacción de la celenterolisina con fosfolípidos inmovilizados

Se usaron pequeñas columnas descartables (Bio-Rad) en las que se preparó un lecho de 1 ml de las resinas activadas. A través de las mismas, se

hicieron fluir 10 ml de líquido entérico crudo, llevado a Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, recogién dose el eluato en fracciones de 2 ml. Luego de sucesivos lavados con 2 ml de TBS, se procedió al pasaje por la columna de 2 alícuotas de 2 ml de distintas soluciones, para eluir la actividad hemolítica. Una vez llena la columna con cada solución, se interrumpió el flujo y se incubó a temperatura ambiente por espacio de 10 minutos.

Las soluciones usadas corresponden con los protocolos para cromatografía de afinidad, establecidos por la compañía Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, fabricantes de las matrices activadas (Affinity chromatography, 1979):

- A) 4M urea, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
 - 8M urea, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
 - 4M urea, 25 mM acetato de sodio, pH 7,4
- B) 5M NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,4
- C) 10% dimetilformamida, TBS
- D) 50 mM citrato, pH 2,6
 - 50 mM citrato, pH 4,0
 - 50 mM citrato, pH 6,0
- E) 3M ácido tricloroacético, llevado a pH 7 con HONa
- F) 2,5M INa, pH 7,5
- G) 1 a 10 mg/ml de SM en TBS, sonicados

2.7.6.4. Interacción de la celenterolisina con esfingomielina

Con el fin de determinar si la unión de la celenterolisina a la SM es reversible, se procedió a incubar liposomas de SM con LE, y luego tratarlos con esfingomielinasa (SMasa), a efectos de eliminar el fosfolípido.

Para este ensayo se incubaron 10 ml de CL con 100 μ l de un pellet, obtenido al centrifugar una suspensión de liposomas conteniendo 2,5 mg de SM (1 mg/ml en buffer TBS, pH 7,4). Después de 15 minutos (a temperatura ambiente), las muestras fueron centrifugadas y el pellet obtenido fue incubado con 2 μ l de SMasa (0,5 U), durante 1 hora a 37°C.

Finalmente, se trató las muestras con 5 volúmenes de hexano. En la fase superior se encuentra la ceramida, obtenida al hidrolizarse la esfingomielina. En la fase inferior, acuosa, se determinó la presencia de la celenterolisina, con glóbulos rojos en una concentración final de 0,3%.

En experimentos controles se omitieron la SM y la SMasa. Se demostró que el tratamiento con hexano no afecta la actividad de la CL y que la SMasa carece de actividad hemolítica a la concentración empleada.

2.7.6.5. Incubación de eritrocitos con celenterolisina desnaturalizada por calor

En este ensayo se estudió el efecto del tratamiento de la celenterolisina con el calor, sobre la unión de la misma a los glóbulos rojos. Si el calor no afectara la capacidad de la celenterolisina de unirse a los eritrocitos, los glóbulos rojos puestos en contacto con la CL no deberían ser lisados

posteriormente por la exposición a una nueva dosis de CL.

Para ello, una alícuota de 1 ml de celenterolisina fue calentada a 90°C durante 10 minutos, y después de verificarse que no poseía actividad hemolítica, fue incubada con 1 ml de glóbulos rojos 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo, los eritrocitos fueron lavados y usados para determinar las unidades hemolíticas de LE fresco, sin tratar. Estas unidades líticas fueron comparadas con las obtenidas con glóbulos rojos no incubados con lisina tratada, en las mismas concentraciones que en el ensayo descripto.

2.8. DETERMINACIÓN DEL ORIGEN DE LA CELENTEROLISINA

2.8.1. Preparación y aislamiento de los nematocistos

Se obtuvieron grandes cantidades de nematocistos mediante una ligera modificación (Blanquet, 1968) de la técnica de extrusión descrita por Yanagita (1959). Esta metodología permite el aislamiento de nematocistos no descargados, libres de otras células y con un mínimo de daño tisular. Como fuente de nematocistos, se utilizaron los filamentos mesenteriales. Para obtener dichos filamentos, las anémonas fueron colocadas en un vaso de precipitado con agua de mar filtrada; luego se introdujeron con una pipeta 5 ml de agua de mar a través de la cavidad oral, lo que provoca la expulsión de los filamentos mesenteriales. Estos fueron cortados y transferidos a una solución 1 M de citrato de sodio. En este medio los

filamentos se contraen y liberan una gran cantidad de nematocistos no descargados. La suspensión de nematocistos fue filtrada por mallas de Nylon y el filtrado fue centrifugado por 3 minutos a 10.000 xg, a 0°C. El pellet, lavado con 1 M citrato de sodio puede ser congelado a - 20°C para su uso posterior.

2.8.2. Descarga

Para inducir la descarga osmótica (Blanquet, 1968) de los nematocistos, se resuspendió el pellet en una pequeña cantidad de buffer de baja concentración salina (30 mM Tris-HCl, pH 7,5). Las cápsulas de los nematocistos descargados fueron recogidas por centrifugación (3000 xg, 10 minutos). El sobrenadante, denominado "contenido soluble de los nematocistos" (CSN), fue conservado para su análisis.

2.8.3. Caracterización del contenido soluble de los nematocistos

Una alícuota de CSN fue filtrada a través de una columna de Sephadex G-50, de las mismas características que la utilizada para la filtración de LE (sección 2.5.5.).

En cada fracción de eluato recogida (2ml\fracción\5 min) se analizó la actividad hemolítica como se describió para LE en la sección 2.4.3..

2.8.4. Disección de especímenes de anémona

A fin de analizar la distribución corporal del agente lítico de nematocistos

y la celenterolisina, se realizó la disección de ejemplares congelados (-20°C) de *Phymactis clematis*, dividiendo el cuerpo en seis regiones: tentáculos, acroraghi, faringe, gónada, pared y pie.

Las distintas secciones fueron homogeneizadas como se describe en la sección 2.7.2.1. Los homogenatos, en un volumen final de 3 ml de agua de mar, fueron centrifugados en un rotor SS34, 10 minutos a 20000 xg.

Las alícuotas de 30 µl de los sobrenadantes de cada fracción se diluyeron 1:10 en TBS y se cromatografiaron en una columna de Sephadex G-50 (17 x 1 cm; $V_t=14$ ml, $V_o=5,5$ ml). El buffer de elución fue TBS y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Como referencia, en la misma columna se cromatografiaron separadamente el CSN y el LE.

2.8.5. Examen del rol de los microorganismos asociados a las anémonas, en la producción de la celenterolisina

Con el fin de estudiar la posibilidad de que la celenterolisina hallada en las anémonas, pudiera ser producida por los microorganismos que frecuentemente conviven con ellas, un grupo de tres anémonas fue mantenido en la oscuridad, para reducir el desarrollo de zooxantellas. Otro grupo fue expuesto a dos antibióticos y un antimicótico, durante tres semanas (se empleó 100 µg/ml de Estreptomicina, 100 U/ml de Penicilina y 0,25 µg/ml de Anfotericina B, en concentraciones finales).

Capítulo 3

Resultados

- 3.1. Actividad citolítica en el líquido entérico de anémonas de mar**
- 3.2. Naturaleza química de la celenterolisina**
- 3.3. Caracterización de la acción de la celenterolisina**
- 3.4. Origen de la celenterolisina**
- 3.5. Mecanismos de acción de la celenterolisina**

3.1. ACTIVIDAD CITOLÍTICA EN EL LÍQUIDO ENTÉRICO DE ANÉMONAS DE MAR

3.1.1. Hallazgo de la celenterolisina de *P. clematis*

Al mezclar glóbulos rojos de cabra con el líquido entérico (LE) extraído de la cavidad gastrocélula de la anémona *Phymactis clematis* se observó que, al cabo de pocos segundos de incubación a 37°C, la suspensión de eritrocitos era completamente lisada. Esta lisis fue valorada por la variación de la absorbancia aparente (la cual disminuye a medida que los glóbulos rojos se lisan), registrada a 500 nm en un espectrofotómetro con cubeta termostatzada a 37°C. La *Figura 1* ilustra los resultados típicos, obtenidos con suspensiones de eritrocitos, preparadas según la sección 2.4.1.

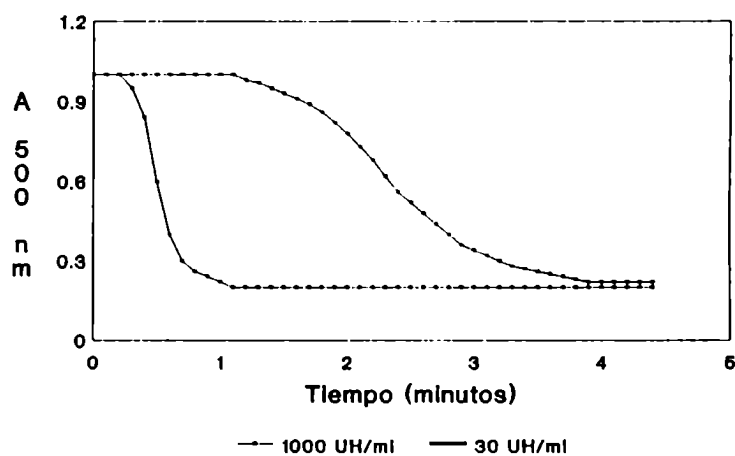


Figura 1. Cinética de hemólisis, medida como la variación de la absorbancia en función del tiempo, con dos concentraciones de celenterolisina, 2000 UH (0,3 µg de CL) y 30 UH (4,5 ng de CL).

En muestras suficientemente diluidas se observa un período de latencia, en el cual no hay hemólisis, el período prelítico. Se observa luego un rápido cambio en la absorbancia, y finalmente un acercamiento asintótico hacia los valores de absorbancia de las suspensiones totalmente hemolizadas.

Este perfil sigmoide en la cinética de hemólisis es común a otros agentes hemolíticos de antozoos.

Al someter las suspensiones de glóbulos rojos humanos y de ratas a la acción de la lisina, se obtuvieron resultados similares.

La actividad puesta de manifiesto en el presente estudio se denominó **celenterolisina (CL)**.

3.1.2. Presencia de actividad lítica en el celenterón de otras anémonas de mar

Se investigó la presencia de actividad lítica en el líquido entérico de ejemplares de las anémonas de mar *Bunodactis marplatensis* y *Anthopleura xantogrammica* y *Metridium senile*.

Mientras que el primer grupo mostró una actividad similar a la hallada en el celenterón de *P. clematis*, ninguna actividad fue encontrada en *A. xantogrammica* y sólo una actividad débil en el caso de *M. senile* (*Tabla I*). Si bien se ha mencionado la presencia de actividad hemolítica en los homogenatos de estas últimas anémonas, su actividad fue baja en relación con otras especies (Bernheimer y Avigad, 1981).

	<i>Phymactis clematis</i>	<i>Bunodactis marplatensis</i>	<i>Anthopleura xantogrammica</i>	<i>Metridium senile</i>
Act. hemolítica (UH ₅₀ /ml)	512 - 1024	256-512	0	16 - 32

Tabla 1. Actividad hemolítica en el celenterón de distintas especies de anémonas de mar. Rango observado en cuatro ejemplares de cada especie.

3.2. NATURALEZA QUÍMICA DE LA CELENTEROLISINA

3.2.1. La actividad hemolítica no se debe a lípidos

Luego de la extracción de LE y la comprobación de la presencia de una actividad lítica en el mismo, se analizó la posibilidad de que dicha actividad radicara en un lípido. Para ello, se extrajeron los lípidos presentes en el líquido entérico de ejemplares de *P. clematis*, según el método de Bligh y Dyer. Estos extractos no mostraron ninguna actividad hemolítica. En consecuencia, otro tipo de compuesto debe dar cuenta de la actividad lítica.

3.2.2. La actividad hemolítica es sensible a proteasas

Una vez descartada la posibilidad de que la lisis fuera causada por una molécula de naturaleza lipídica, se investigó la posibilidad de que fuese provocada por un polipéptido presente en el LE. Si así fuera, la actividad debería ser destruida por proteasas. Alícuotas de LE incubadas con Pronasa

y Tripsina (1 y 5 mg/ml), por 2 hs a 37°C, destruyeron completamente la actividad hemolítica.

Este resultado indica fuertemente el carácter **peptídico** de la celenterolisina.

3.2.3. La celenterolisina no es dializable

Con el fin de establecer con mayor precisión la naturaleza química de la celenterolisina, se procedió a dializar una alícuota del LE de *P. clematis* contra 10 mM Tris-HCl, pH 7,4. Luego de 16 horas de diálisis, se determinó la presencia de actividad hemolítica dentro y fuera de la bolsa de diálisis, llevando previamente las muestras a una concentración de 150 mM NaCl. Los resultados indicaron que la actividad lítica está asociada a un **factor no dializable**, ya que la actividad fue recuperada totalmente en el interior de la bolsa de diálisis.

3.2.4. Precipitación con sulfato de amonio

Como un primer paso de purificación de la celenterolisina a partir del extracto crudo del LE, se llevó a cabo una precipitación con sulfato de amonio.

Se encontró que la actividad hemolítica precipita a una concentración de 80% de saturación de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Esta elevada concentración, necesaria para provocar la precipitación de la actividad, sugiere un bajo peso molecular, lo cual concuerda con el valor determinado por Sephadex G-50, como se describe a continuación.

3.2.5. Comportamiento frente a resinas de intercambio iónico

Cuando se examinó el comportamiento cromatográfico de la celenterolisina en columnas de CM-Sephadex, equilibradas a diferentes valores de pH (desde 7 a 9,5), se observó que la actividad lítica se une a las resinas equilibradas a pH inferiores a 8,5.

A pH 9,0 la actividad eluye con el buffer de lavado de la columna (50 mM Borato de sodio). La actividad hemolítica, unida a la resina equilibrada a pH 8,5, eluye en un pico simple, con 0,1 M NaCl como eluyente.

Este experimento sugiere que la celenterolisina es un **polipéptido básico**.

3.2.6. Cromatografía en Sephadex G-50

La *Figura 2* muestra el perfil de elución de la actividad hemolítica, al cromatografiar una alícuota del líquido entérico en Sephadex G-50. En el mismo gráfico se muestran los datos de absorbancia a 280 nm, de cada fracción.

Se halló un único pico hemolítico en el líquido entérico de *P. clematis*. Un 90% de la actividad lítica fue recuperada en 3 fracciones (13, 14 y 15), correspondiendo a la fracción número 6 el 60% de la actividad recuperada.

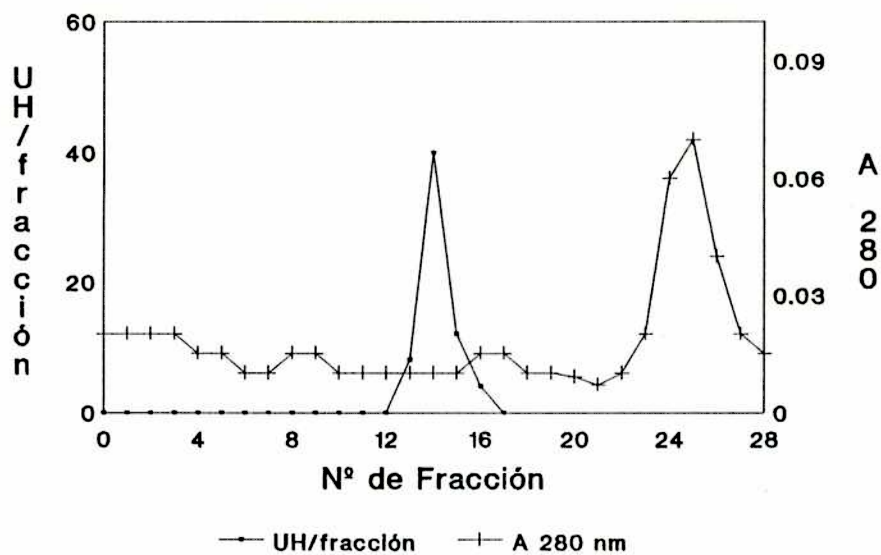


Figura 2. Cromatografía de filtración en Sephadex G-50 de una muestra de líquido entérico. Elución de la actividad hemolítica, expresada en UH, y de la absorbancia a 280 nm. Columna de 93 x 1,2 cm. Fracción 9 = Volumen de exclusión, Fracción 26 = Volumen total.

La **Figura 3** representa la curva de calibración de la columna mencionada, donde se indica la posición de los marcadores de peso molecular y la elución de la lisina, de la cual se estima su peso molecular.

El peso molecular, estimado por este método, de la celenterolisina de *Phymactis clematis*, es de 18200.

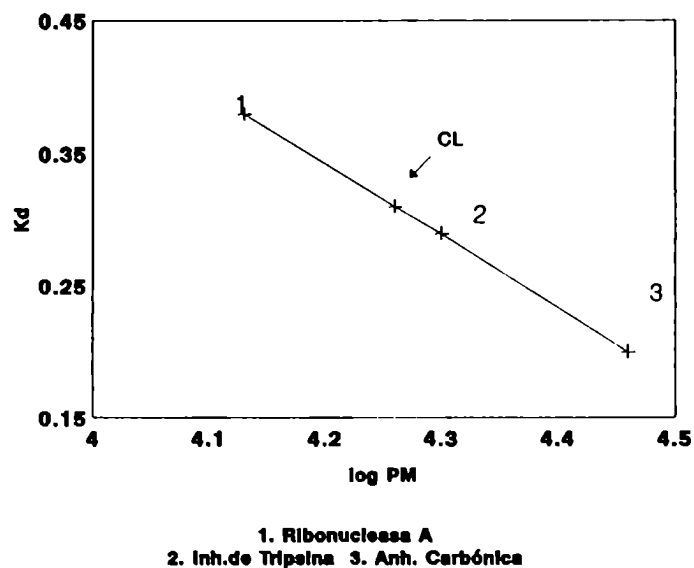


Figura 3. Determinación del peso molecular de la celenterolisina en Sephadex G-50.

3.2.7. El tratamiento con urea 4M no afecta la elución de la celenterolisina

En un segundo experimento, una columna de características semejantes a la empleada en la sección anterior (3.2.5.) fue equilibrada con 4 M urea, en buffer TBS. A la dilución usada, la urea no resulta hemolítica *per se*.

El peso molecular estimado para la celenterolisina, en dichas condiciones, coincidió con el obtenido anteriormente.

La relación invariable entre el volumen de elución de la lisina y los parámetros de la columna (volumen de exclusión y volumen total), en presencia o ausencia del agente caotrópico, indica que la celenterolisina no está formada por subunidades dissociables por este método.

3.2.8. La actividad hemolítica es termolábil

Se analizó el efecto del calor sobre la celenterolisina, sometiéndola a diferentes temperaturas, por espacio de 30 minutos, según se consigna en la *Tabla 2*. Se determinaron luego las unidades hemolíticas presentes, incubando cada fracción con eritrocitos, durante 1 hora y a 37°C.

°C	UH/ml	% Actividad
20	1800	100
40	1500	92
60	7	< 1
80	5	< 1

Tabla 2. Actividad hemolítica de la celenterolisina luego de la exposición a distintas temperaturas, durante 30 minutos, en TBS ajustado a pH 8,1.

Los estudios sobre labilidad dieron como resultado una inactivación irreversible de la capacidad lítica, al someter la celenterolisina a temperaturas de 60°C ó superiores.

Por otro lado, al someter la celenterolisina a ciclos sucesivos de congelado (-20°C, 24 horas) y descongelado, se encontró que en cada ciclo ocurría una pérdida de actividad de 25 a 35% (*Figura 4*).

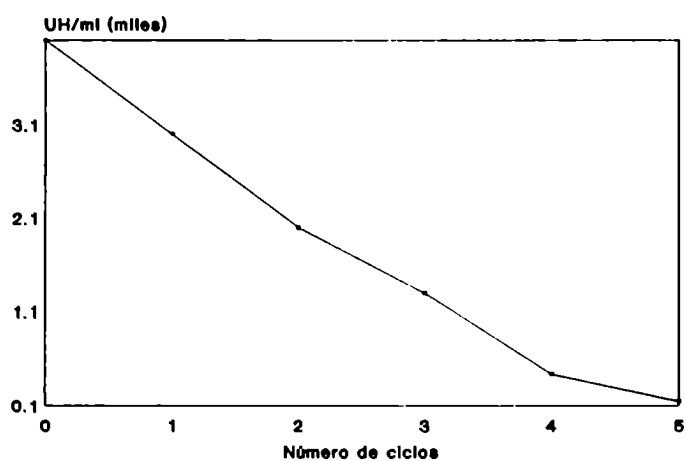


Figura 4. Actividad hemolítica remanente de la celenterolisina, luego de sucesivos ciclos de congelado y descongelado.

3.2.9. Protocolos para la purificación de la celenterolisina

Los estudios anteriores demostraron que la actividad lítica presente en el LE, precipita con una concentración de 80% de sulfato de amonio. Esta propiedad fue utilizada para realizar el primer paso de la purificación de la celenterolisina.

Protocolo I.

El precipitado obtenido por 80% $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y disuelto en 20 mM Tris-HCl/25 mM NaCl, pH 7,4 (como se indica en la sección 2.5.9.), fue sembrado en una columna de intercambio iónico equilibrada a pH 7,4 con el mismo buffer. En estas condiciones la actividad lítica, unida a la resina, eluye en un pico simple con 150 mM NaCl. A continuación, se sembró una alícuota de esta fracción hemolítica en Sephadex G-50 y un único pico lítico fue recuperado de la columna, con el volumen de elución correspondiente

al peso molecular estimado para la celenterolisina (18 kDa).

Protocolo II.

El segundo esquema de purificación contempló los mismos pasos que el protocolo anterior, es decir, precipitación con sulfato de amonio, intercambio iónico y tamiz molecular, con la excepción de precipitaciones adicionales son sulfato de amonio entre las dos columnas cromatográficas y al final de la segunda. Estas precipitaciones se realizaron con el fin de concentrar la muestra.

El pico hemolítico recuperado de la columna de Sephadex G-50, fue analizado por electroforesis en gel de 15 % de acrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE). Se encontró una única banda con un peso molecular aproximado de 18.200.

El protocolo utilizado permitió purificar cantidades apreciables de proteína y su análisis electroforético. El procedimiento de concentración por precipitación con sulfato de amonio produce una gran pérdida de actividad, estimada en un 80% en cada paso. A pesar de ello, es el que mejor preserva la actividad lábil de la celenterolisina, de entre los diversos métodos ensayados (utilización de membranas Amicon, centrifugación en tubos de Centrikon, concentración por diálisis contra sacarosa sólida, liofilización). Las preparaciones finales obtenidas resultaron homogéneas pero de baja actividad específica.

Para los experimentos en los que se utilizó celenterolisina purificada, se evitaron los pasos de precipitación con sulfato de amonio, a expensas del

procesamiento de menores cantidades de muestra. Por ejemplo, se sembraron alícuotas sin concentrar de los eluatos activos de la columna de fosfato de celulosa y, para estudios funcionales, se utilizó la fracción más activa obtenida por cromatografía en Sephadex G-50.

Los resultados son mostrados en la *Figura 5*.

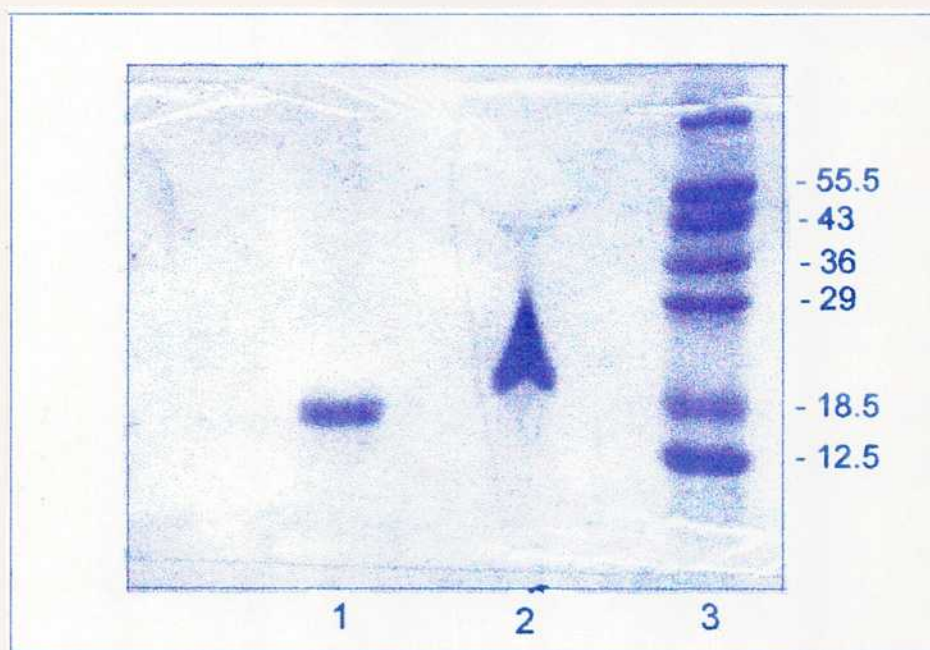


Figura 5. Electroforesis de la celenterolisina purificada, en gel de 15% de poliacrilamida en presencia de sodio dodecil sulfato. Se sembraron 10 μ l (calle 1) y 30 μ l (calle 2) de una muestra purificada conteniendo 0,45 μ g/ μ l de celenterolisina.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA ACCIÓN DE LA CELENTEROLISINA

3.3.1. El pH óptimo de la celenterolisina es 8

Del análisis del efecto del pH sobre la actividad de la celenterolisina con los glóbulos rojos de cabra, se desprende que a pH inferiores a 8,0 se reduce notablemente la capacidad lítica. La *Figura 6* muestra que el líquido entérico presenta un 20% de la actividad cuando el pH es inferior a 8,0.

El resultado de que la actividad lítica se ve incrementada a pH básico, es congruente con que el pH del medio en el cual actúa naturalmente (el agua de mar) presenta también un valor de pH cercano a 8,0.

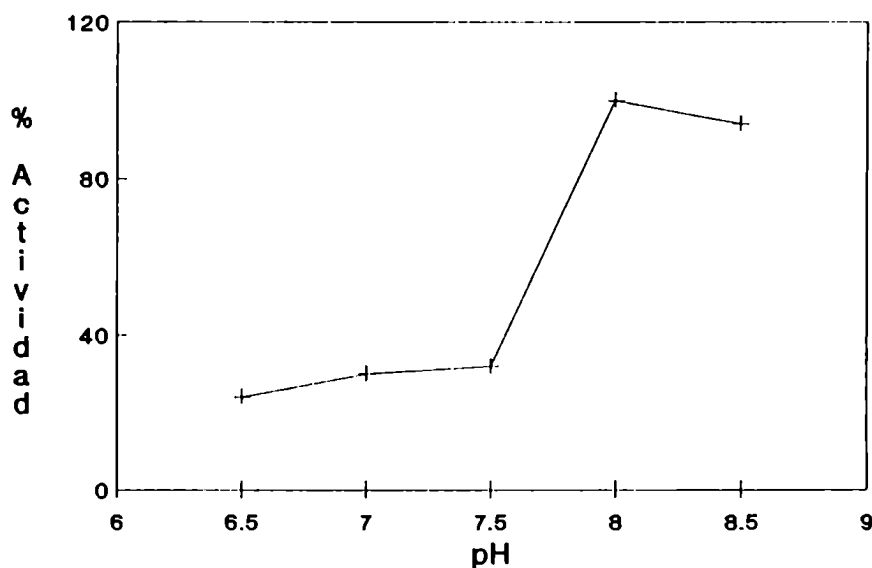


Figura 6. Determinación del pH óptimo para la actividad de la CL. Los valores se expresan como porcentajes de la actividad máxima, obtenida a pH 8.

3.3.2. La temperatura óptima es 37°C

Al estudiar el efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad hemolítica, se encontró que la temperatura de 37°C redonda en un aumento de unidades hemolíticas, respecto de 20 y 0°C.

Al incubar el LE con eritrocitos, por 30 minutos a 20°C, se encontró que las unidades hemolíticas se reducen a la mitad, mientras que la incubación a 0°C arrojó una actividad del 16% respecto de la actividad hallada a los 37°C.

En todos los casos, el pH de la incubación fue de 7,4 y el buffer TBS.

Los resultados se muestran en la *Tabla 3*.

Temperatura (°C)	% Actividad
0	16
20	54
37	100

Tabla 3. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de la celenterolisina. La actividad fue estimada después de 30 minutos y los valores se expresan como porcentajes de la actividad hallada a los 37°C.

3.3.3. Curva dosis-efecto. Cálculo del número medio de lesiones por eritrocito en función de la concentración

Para estudiar el efecto de la concentración de la celenterolisina sobre la

cinética de la lisis de los glóbulos rojos, se utilizó una muestra conteniendo 2000 UH/ml ($0,3 \mu\text{g/ml}$ de celenterolisina), la que fue sometida a diluciones seriadas en buffer TBS. Se observó (*Figura 7*) un notable incremento del período prelítico con cada dilución, y una marcada disminución en la velocidad (pendiente) de la lisis.

La cinética de la hemólisis fue registrada en un espectrofotómetro a 500 nm, determinándose la disminución de la absorbancia aparente de la suspensión de glóbulos rojos en función del tiempo.

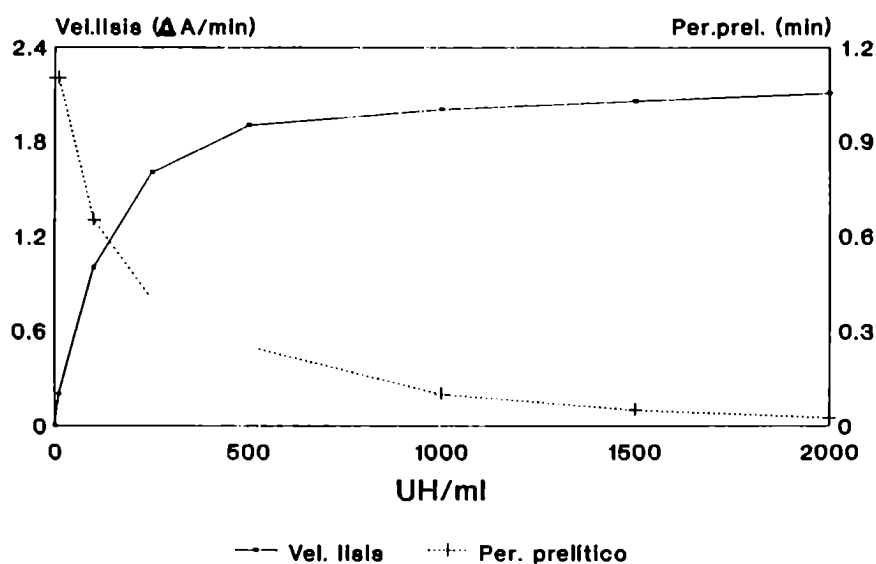


Figura 7. Duración del período prelítico (Per.prel.) y valor de la pendiente (Vel.lisis=velocidad de la lisis), estimada en el punto correspondiente al 50% de hemólisis, de las curvas obtenidas por registro continuo de la hemólisis, causada por distintas concentraciones de celenterolisina.

Con el fin de determinar la relación entre la concentración de lisina y el número de lesiones producidas por eritrocito, se realizó el siguiente estudio: si se supone que la probabilidad $P(k)$ de que en un eritrocito se produzcan k lesiones sigue una distribución de Poisson, donde m es el número medio de lesiones líticas por eritrocito, se verifica lo siguiente:

$$P(k) = e^{-m} \frac{m^k}{k!}$$

La probabilidad de que un eritrocito carezca de lesiones líticas es:

$$P(k=0) = e^{-m}$$

de donde $m = -\ln P(0)$

La proporción de células no lisadas, luego de someter una determinada concentración de eritrocitos a cada cantidad de toxina, constituye una estimación de los valores de $P(0)$ para cada concentración de toxina. Por lo tanto, si y es la proporción de células lisadas, $P(0) = 1 - y$. El valor de m puede expresarse como

$$m = -\ln (1-y)$$

Puesto que el valor de y puede determinarse experimentalmente, y depende de la concentración de toxina agregada a la suspensión de glóbulos rojos, se puede calcular el valor de m , es decir, el número medio de lesiones por célula, en función de la cantidad de toxina agregada, x . Los valores obtenidos, incubando una suspensión de 5% de glóbulos rojos con distintas cantidades de toxina, en un volumen final de 1 ml, se ven en la **Tabla 4**.

x (fmoles/ml)	y	$m = -\ln(1-y)$
5,2	0,20	0,22
10,4	0,42	0,54
15,6	0,75	1,39
20,8	0,92	2,59
26,0	1	∞

Tabla 4. Número de lesiones líticas por célula (m , expresado en fmoles) estimado a partir de la proporción de células lisadas (y) en función de la concentración de la toxina (x), agregada a una suspensión de 5% de GR.

A partir de dichos valores, se observa que el número m de lesiones por célula crece con x más rápidamente que lo que correspondería a una relación de proporcionalidad lineal. Esto es indicativo de una acción cooperativa de las moléculas de celenterolisina para causar la hemólisis.

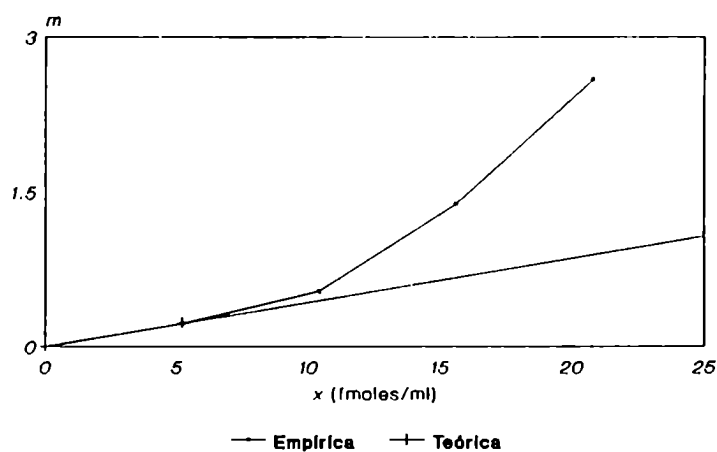


Figura 8. Promedio de lesiones por célula (m) en función de la toxina agregada (x).

3.3.4. La actividad hemolítica no es afectada por el Ca^{2+} o el Mg^{2+} y es insensible al EDTA

No se hallaron efectos sobre la actividad lítica, con el agregado de concentraciones crecientes de Ca^{2+} , Mg^{2+} ó EDTA (de 1 a 10 mM), demostrando que la actividad de la celenterolisina **no depende de cationes divalentes**. Lo mismo ocurre con otros polipéptidos hemolíticos de antozoos en los que se hallaron resultados similares (Bernheimer y Avigad, 1976).

3.3.5. Diversos agentes oxidantes y reductores no alteran la actividad hemolítica

La actividad de la celenterolisina no fue alterada en presencia de un número de agentes oxidantes, como la cloramina T, el ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB) y el glutatión oxidado, y reductores como el ditiotreitól (DTT) o el β -mercaptoetanol, todos en la concentración de 1mM. Tampoco fue inhibida por 1 a 10 mM de iodoacetamida. Este resultado sugiere que no hay grupos tioles involucrados en el efecto hemolítico de la celenterolisina.

3.4. ORIGEN DE LA CELENTEROLISINA

3.4.1. Existen dos agentes hemolíticos en los tejidos de la anémona

P. clematis, separables por cromatografía en Sephadex G-50, que

corresponden a la celenterolisina y a la lisina de los nematocistos

Con el objeto de establecer el origen de la lisina presente en la cavidad entérica (celenterolisina) y su relación con la hemolisina de los nematocistos, se procedió a aislar los nematocistos de *P. clematis*, presentes en los filamentos mesenteriales, según la técnica descrita en la sección 2.8.1..

Phymactis clematis posee, principalmente, además de espirocistos, nematocistos microbásicos mastigóforos. En la **Figura 9** se observa un nematocisto extraído de dicha anémona.

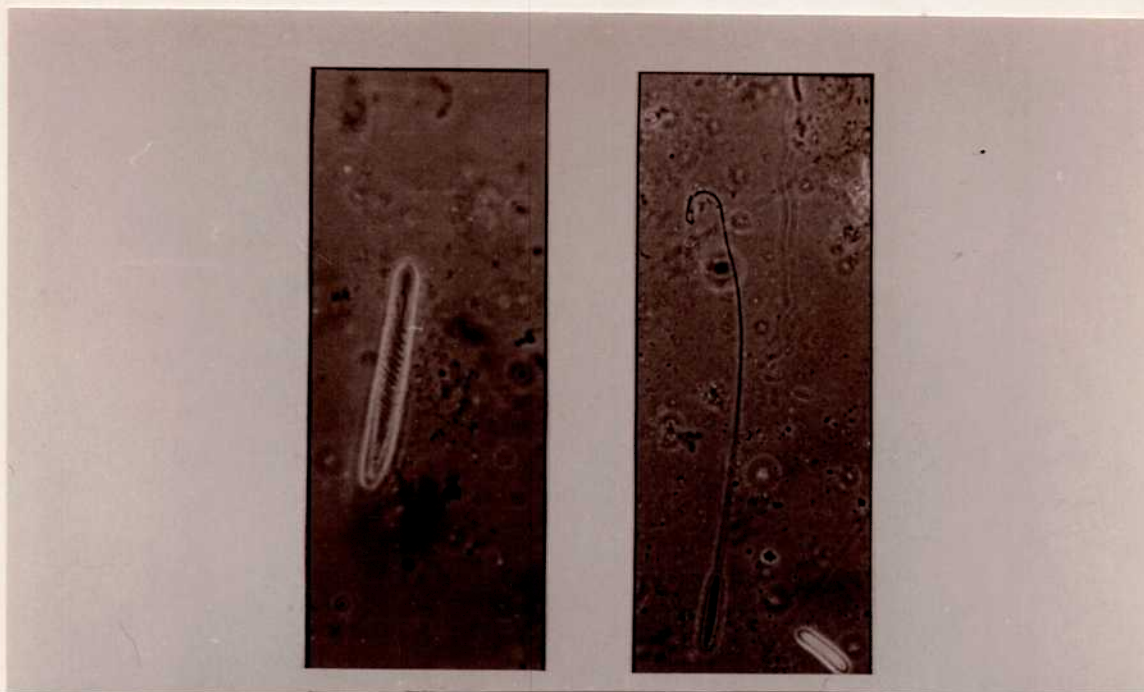


Figura 9. Nematocistos de la anémona de mar *Phymactis clematis*. A la izquierda se observa un nematocisto sin descargar (A 1000 x) y a la derecha un nematocisto descargado (A 400 x).

3.4.2. El líquido entérico contiene sólo celenterolisina

Por cromatografía del contenido soluble de los nematocistos (CNS) en Sephadex G-50, separado de las cápsulas por centrifugación como se indica en la sección 2.8.1., se halló un único pico hemolítico, que eluyó en el volumen de exclusión de la columna. Esto implica un peso molecular, para la lisina de estos nematocistos de *Phymactis clematis*, superior a 30000.

En este experimento no se encontró ningún otro pico de actividad hemolítica en el resto del eluato; en particular, no se observa actividad en las fracciones correspondientes al volumen de elución de CL. Es decir, el CSN no contiene CL.

Por otra parte, cuando se cromatografía LE en Sephadex G-50, no se obtiene actividad hemolítica eluyendo en el volumen de exclusión de la columna. Esto muestra que el líquido entérico, a su vez, no contiene hemolisina de los nematocistos.

Podemos concluir entonces que la actividad hemolítica de los nematocistos y la celenterolisina son entidades independientes.

3.4.3. Distintas partes del cuerpo de la anémona *P. clematis* contienen distintas proporciones de celenterolisina y de la lisina de los nematocistos

Dado que el método más frecuentemente utilizado por otros autores para la obtención de las hemolisinas de anémonas, es el que se realiza a partir de homogenatos de los tejidos de los animales, tres ejemplares de *Phymactis*

fueron disecados y 6 fracciones corporales fueron separadas: tentáculos, acroraghi, actinofaringe, gónadas, pared del cuerpo y disco basal (según se indica en la *Figura 10*).

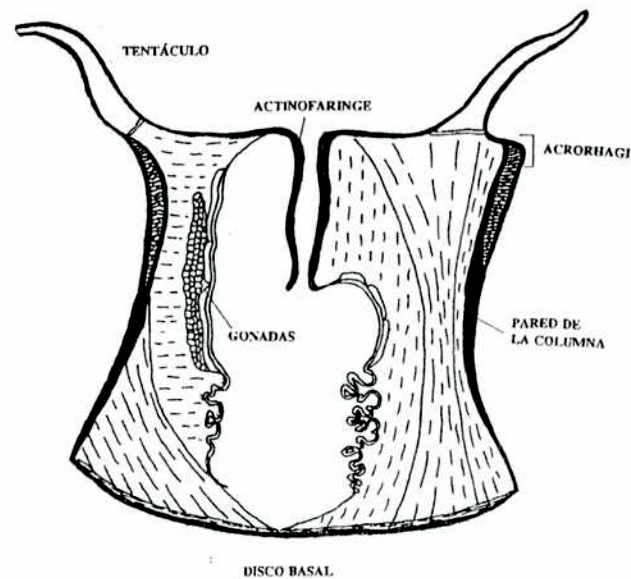


Figura 10. Diagrama de un corte longitudinal de la anémona marina. Los tentáculos, el acroraghi, la actinofaringe, la pared de la columna, el disco basal y las gónadas fueron separadas para investigar la presencia de actividades hemolíticas en sus tejidos.

Una vez homogeneizadas y centrifugadas las fracciones (según se describió en la sección 2.8.4.), las alícuotas de los sobrenadantes, diluidas 1/10 en TBS, fueron cromatografiadas separadamente en una columna de Sephadex G-50 (17 x 1 cm), equilibrada con TBS.

Se observaron 2 picos hemolíticos en los tentáculos y acroraghi, la columna y el disco basal. Estos picos eluyeron, uno con el volumen correspondiente a la hemolisina de los nematocistos (Vol de elución = 5,5 ml = Volumen de exclusión de la columna), y el otro con una mayor retención, coincidente

con el volumen de elución de la celenterolisina (7,5 ml).

Sólo un pico de actividad lítica, que eluyó en el volumen de exclusión de la columna, fue observado en las fracciones correspondientes a las gónadas y la actinofaringe.

Cuando el líquido entérico y el contenido soluble de los nematocistos (CSN) fueron cromatografiados en la misma columna, la actividad hemolítica eluyó a los 7,5 ml en el caso del LE, y a los 5,5 ml en el del CSN.

Estos resultados indican, nuevamente, un peso molecular mayor para la lisina de CSN, respecto de la lisina presente en LE.

La presencia de dos picos hemolíticos en los homogenatos apoya, una vez más, la hipótesis de que en la anémona en estudio existen dos principios hemolíticos diferentes: celenterolisina y la toxina de nematocistos.

Su diferente distribución en los tejidos de la anémona de mar indica que el origen y, posiblemente también, el rol fisiológico de estas actividades, no es el mismo.

3.4.4. La producción de celenterolisina no se debe a los

microorganismos asociados a las anémonas de mar

Las anémonas de mar poseen muchos organismos asociados, con los cuales conviven. Con el fin de determinar si la producción de celenterolisina podía estar asociada con las bacterias, los hongos o las algas simbiotes de la anémona, se mantuvo a tres ejemplares de *P. clematis* en la oscuridad y a

otros tres en un medio con luz, pero en presencia de altas concentraciones de los antibióticos Penicilina y Estreptomina y del antimicótico Anfotericina B. Se observó que, a partir de las 72 horas de exposición a los antibióticos, las muestras de LE inoculadas en un medio de cultivo PPY no dieron lugar al crecimiento de bacterias y hongos, demostrando la efectividad del tratamiento.

A lo largo de un período de tres semanas en estas condiciones, el líquido entérico, extraído cada dos días, mostró la misma actividad lítica encontrada usualmente en las anémonas no sometidas a las condiciones de este experimento.

3.5. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA CELENTEROLISINA

3.5.1. La actividad hemolítica no se debe a las actividades proteasa, fosfolipasa y esfingomielinasa

A fin de determinar el mecanismo por el cual la celenterolisina provoca la lisis de los glóbulos rojos, se investigó la presencia de actividades proteasas y fosfolipasas en el líquido entérico, que pudieran dar cuenta de la actividad lítica.

3.5.1.1. Actividad proteasa

Cuando se investigó la presencia de actividades proteasas, distintas concentraciones (36, 180 y 720 $\mu\text{g/ml}$) de Trassylol (un inhibidor de

proteasas de amplia especificidad) y 1mM de PMSF se incubaron con 200 UH de la celenterolisina, por 1 h a 37°C. Se observó que estos inhibidores de proteasas no afectan la actividad hemolítica.

El agregado de albúmina de suero bovino (BSA) al medio de reacción, en concentraciones de 0,1 a 10 mg/ml tampoco no previno la hemólisis.

Estos ensayos indican que la hemólisis no se debe a una actividad proteasa, ya que en ese caso la actividad lítica hubiera sido inhibida por la albúmina (BSA), un inhibidor competitivo del sustrato, o bien por un inhibidor de proteasas como el Trasylol o el PMSF.

3.5.1.2. Actividad fosfolipasa

En un estudio preliminar, se investigó la presencia de actividades lipolíticas sobre diferentes sustratos, en los tejidos de la anémona, para lo cual se procedió a incubar el homogenato de los ejemplares enteros, a 37°C durante 1 hora, como se describe en la sección 2.7.2.

Resultado de la incubación del homogenato de anémona con sustratos endógenos (lípidos propios de la anémona, presentes en el homogenato): la **Figura 11** muestra una separación por CCF, de los lípidos resultantes al incubar a pH 4,5 y 8,0.

Se ve claramente un aumento de ácidos grasos libres (AG) en la muestra sometida a pH alcalino, lo cual indica la presencia de una fosfolipasa tipo A (deacilante), en el homogenato de la anémona total.

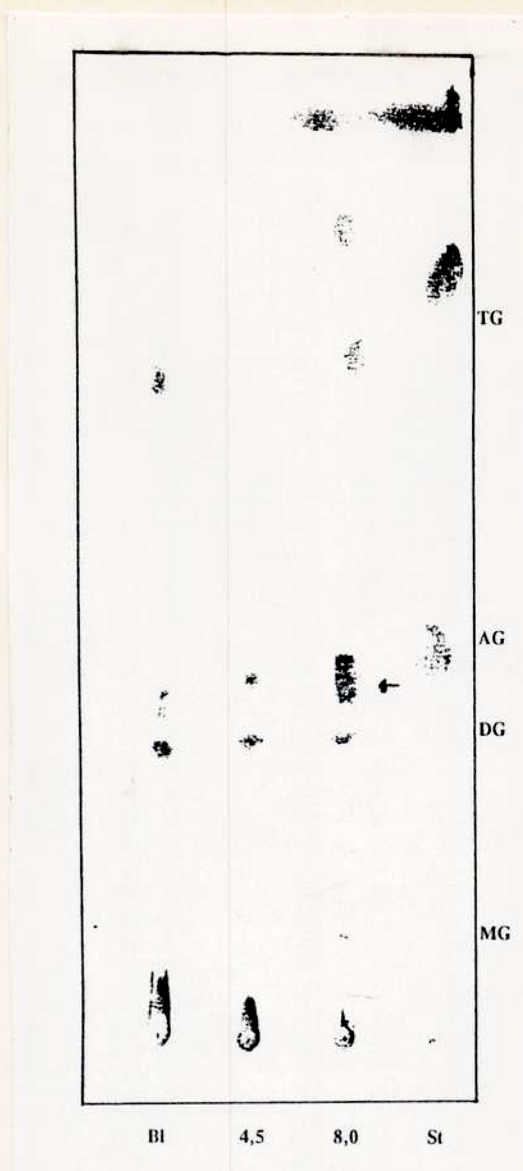


Figura 11. Cromatografía en placa delgada de los lípidos resultantes al incubar el homogenato de anémona con sustratos endógenos, a distintos pH (4,5 y 8,0). Bl=blanco; st=estandar de lípidos (MG, DG, TG=mono, di y triglicérido; AG=ácido graso)

Resultado de la incubación del homogenato de anémona con fosfatidilcolina: en la **Figura 12** se ve también un aumento de la misma fracción (AG), a las dos horas de incubación (con respecto a una hora) del homogenato de anémona, a pH alcalino, empleando fosfatidilcolina de soja como sustrato.

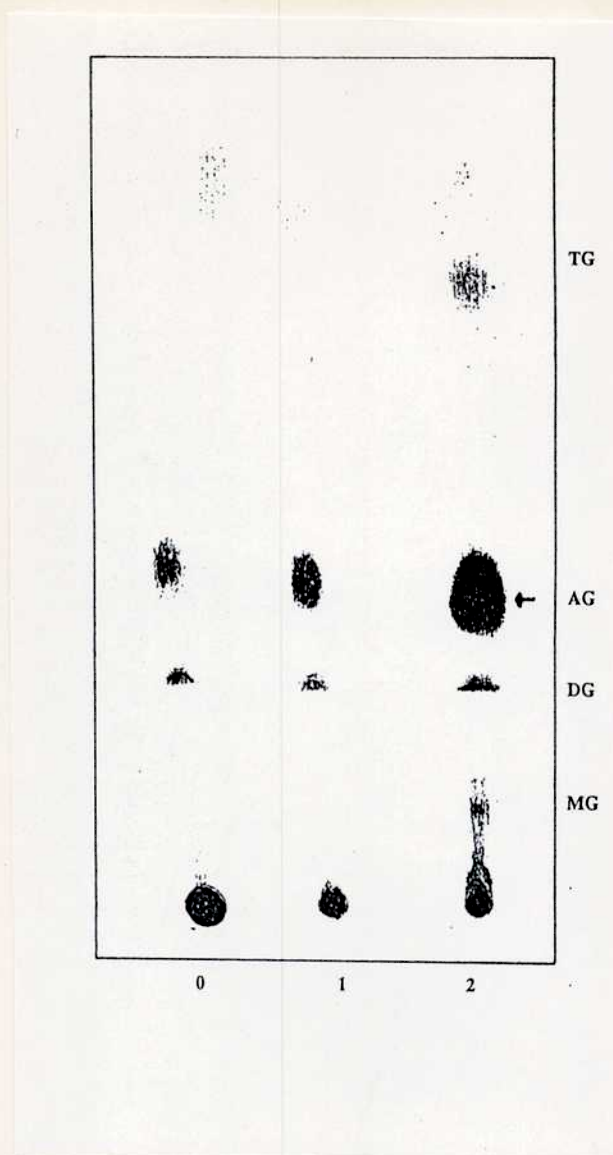


Figura 12. Cromatografía en placa delgada de los lípidos resultantes al incubar el homogenato de anémona con PC, durante 0, 1 y 2 horas (0, 1 y 2, respectivamente), a pH alcalino.

Una vez determinada la presencia de la actividad fosfolipasa en los homogenatos de los tejidos de la anémona, se investigó la presencia de estas enzimas en el líquido entérico de los organismos. Para ello, se incubó LE con Asolectina: la incubación del LE con Asolectina como sustrato, por 4 horas, a pH 8 y 37°C, demostró la presencia de una fosfolipasa tipo A en el LE (*Figura 13*).

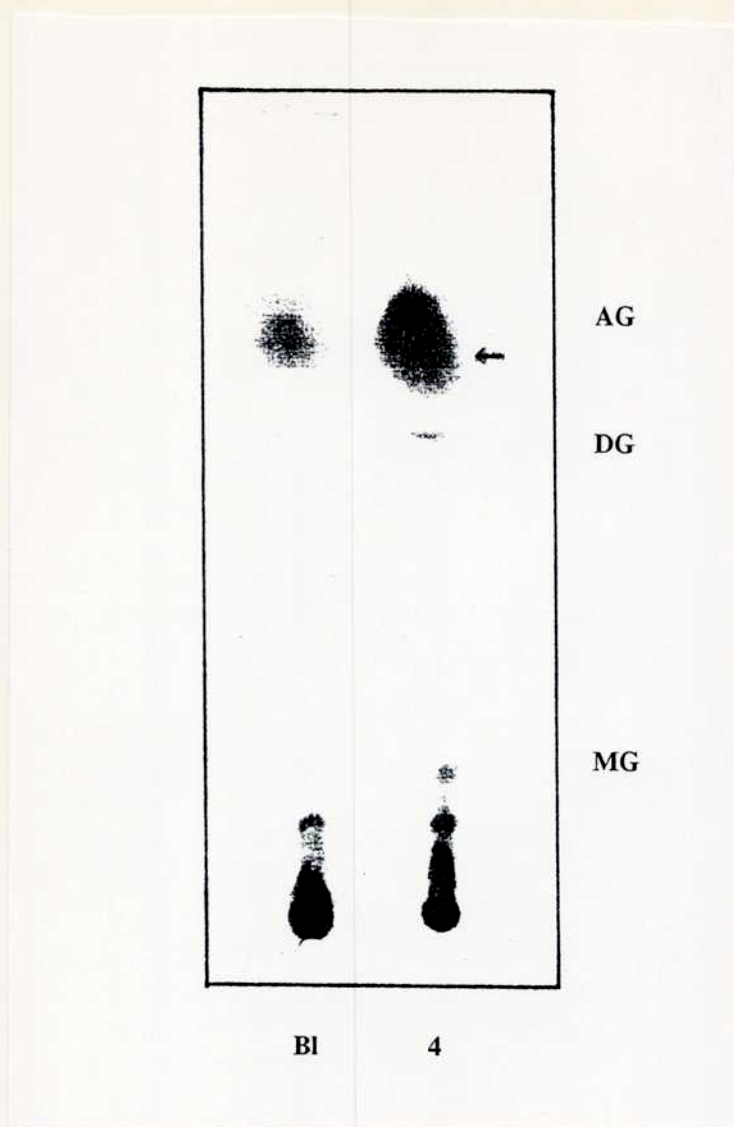


Figura 13. Cromatografía en placa delgada de los lípidos resultantes al incubar el líquido entérico con Asolectina, durante 4 horas (4). Bl=lípidos resultantes de la incubación con el agua de mar, como control.

Como segundo paso, se estudió la posibilidad de que ambas actividades (hemolítica y fosfolipasa) co-eluyeran, dado que podían residir en la misma molécula.

Los eluatos, obtenidos al cromatografiar una muestra de LE a través de una columna de Sephadex G-50, fueron incubados con [$1-^{14}\text{C}$] oleoilPC como sustrato. Los lípidos resultantes fueron extraídos como se indicó en la

sección 2.7.2.1 y luego separados por cromatografía en placas delgadas de Sílica gel, como se indicó en la sección 2.7.2.2..

La autorradiografía de dicha cromatografía permitió detectar un aumento de AG y de lisofosfolípidos (en cantidades equimoleculares) en algunas de las fracciones eluidas de la columna. La determinación de radiactividad en las fracciones de ácidos grasos confirmó dichos resultados (*Figura 14*).

Se observa un aumento de los ácidos grasos libres (indicativo de la presencia de fosfolipasas tipo A, es decir, deacilantes), en la fracción correspondiente al volumen de exclusión (V_0) de la columna, y en las últimas fracciones eluidas de la columna. No se detecta la presencia de actividad fosfolipasa en la fracción correspondiente al pico de hemólisis, lo cual indica que las actividades lítica y fosfolipasa residen en distintas proteínas.

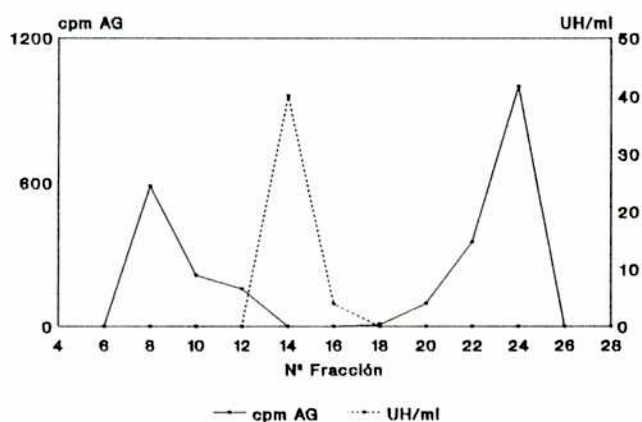


Figura 14. Detección de actividad fosfolipasa en las distintas fracciones del LE separadas en una columna de Sephadex G-50. El aumento de ácidos grasos y de cantidades equimoleculares de lisofosfolípidos (dato no mostrado) indica la presencia de actividad fosfolipasa A en el LE. Se detectan dos actividades fosfolipasas, una eluye con el volumen de exclusión de la columna y la otra con el volumen total. Ninguna de ellas co-eluye con la actividad hemolítica.

3.5.1.3. Actividad esfingomielinasa

Para determinar la presencia de una actividad esfingomielinasa (SMasa) en el líquido entérico, se incubó el mismo con SM de huevo, por 2 horas a 37°C. La incubación fue terminada por el agregado de cloroformo:metanol (1:2) y los lípidos, extraídos de acuerdo con el método de Bligh y Dyer, fueron analizados por CCF. Este ensayo mostró que no hay una hidrólisis detectable de la SM.

Paralelamente se realizó una incubación de la SM con SMasa de *Bacillus cereus*, que si rindió ceramida. En consecuencia, este control positivo indica que con la metodología empleada, de haber existido una actividad SMasa, se la habría detectado.

3.5.2. Rol desempeñado por diversos lípidos en la actividad hemolítica

Dado que la actividad de la celenterolisina sobre las membranas de los eritrocitos no mostró estar asociada a una actividad enzimática, se investigó su posible interacción con distintos compuestos.

3.5.2.1. La actividad es inhibida por la esfingomielina

La incubación del LE con SM resultó en una fuerte inhibición de la capacidad hemolítica de la celenterolisina (*Figura 15*).

Una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de SM en la mezcla de incubación, determinó que la actividad inicial de 20 UH (100%) se redujera en un 70%, aproximadamente, mientras que, concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ y

superiores, reducen progresivamente los valores obtenidos.

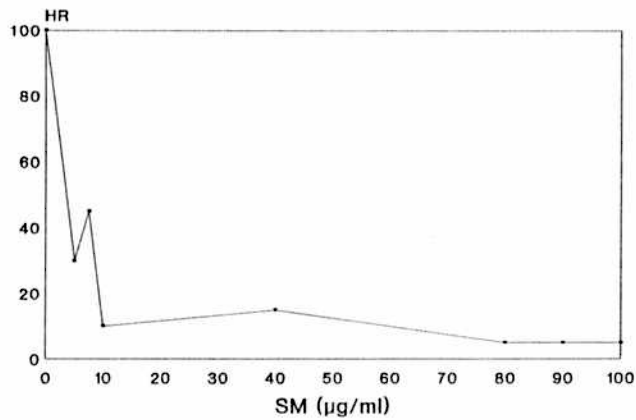


Figura 15. Inhibición de la actividad hemolítica de la celenterolisina al ser incubada con SM. La actividad hemolítica relativa (HR) indica el porcentaje de la actividad observada en cada condición, con respecto a una muestra idéntica no incubada con SM, como control.

Resultados semejantes se obtuvieron tanto con SM de cerebro y eritrocitos bovinos, como de yema de huevo de pollo. El estudio de la cinética de la hemólisis arrojó resultados similares (*Figura 16*).

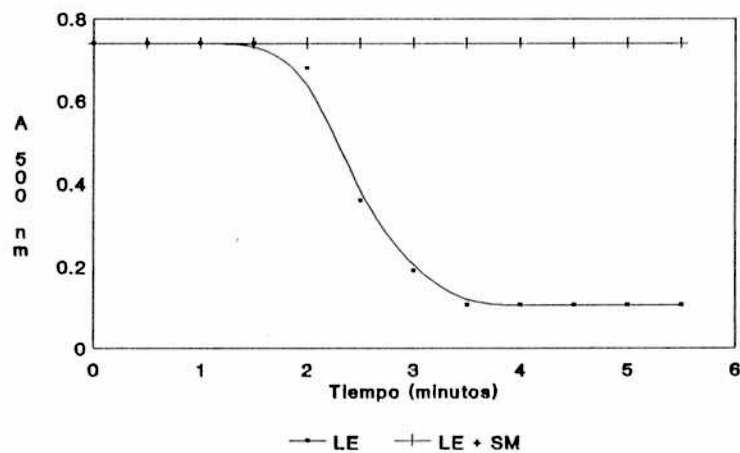


Figura 16. Variación de la absorbancia en función del tiempo. Al agregar SM al medio de incubación se inhibe la hemólisis provocada por la CL.

3.5.2.2. La actividad no es afectada por asolectina, fosfatidilcolina o colesterol

Al estudiar el efecto de otros lípidos abundantes en las membranas celulares, se vio que la fosfatidilcolina (de huevo) y la fosfatidilcolina junto con el colesterol no producen inhibición de la lisis, aún en concentraciones de 500 $\mu\text{g/ml}$ (*Figura 17 a y b*). La mezcla de lípidos obtenida de poroto de soja (Asolectina), empleada frecuentemente para ensayos biológicos, compuesta por fosfolípidos (PC, PE, PS y PI) y lípidos neutros (MG, DG, TG, AG), tampoco mostró un efecto inhibitorio de la actividad de la celenterolisina sobre los glóbulos rojos (*Figura 17 c*).

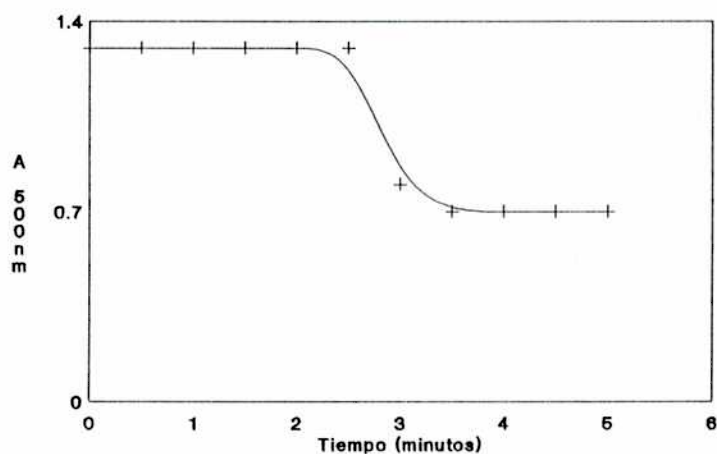


Figura 17 a. Cinética de hemólisis en presencia de fosfatidilcolina.

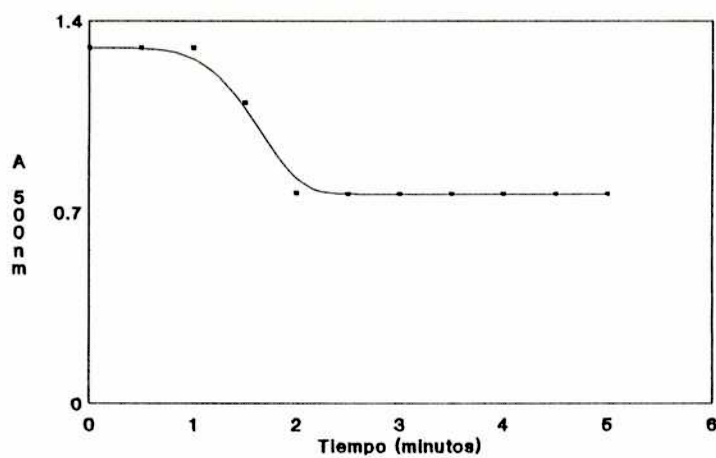


Figura 17 b. Cinética de hemólisis en presencia de Fosfatidilcolina + colesterol.

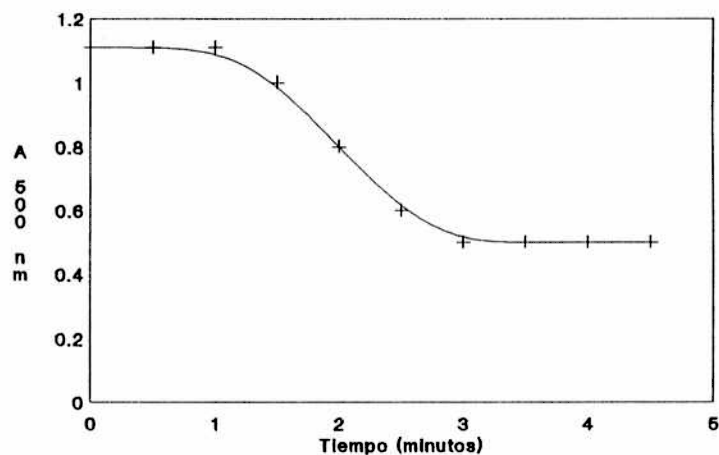


Figura 17 c. Cinética de hemólisis en presencia de Asolectina.

3.5.2.3. Los extractos lipídicos de los eritrocitos inhiben la hemólisis

Los lípidos extraídos de los glóbulos rojos (GR) de cabra, poseen un efecto inhibitorio de la actividad hemolítica, semejante al observado para SM, cuando son agregados a la mezcla de reacción (*Figura 18*).

Estos GR poseen la particularidad de contener una proporción muy baja de

PC en sus membranas, mientras que el contenido de SM es muy elevado (47% de los fosfolípidos totales).

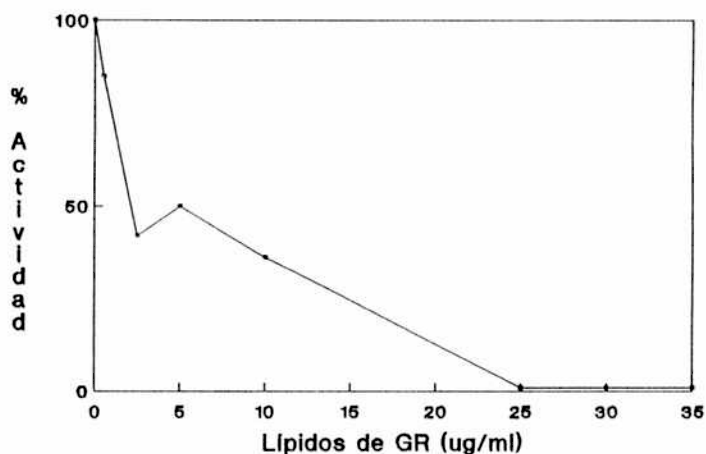


Figura 18. Inhibición de la actividad hemolítica de la celenterolisina al ser incubada con lípidos totales extraídos de glóbulos rojos.

3.5.2.4. El pretratamiento de los eritrocitos con esfingomielinasa suprime su sensibilidad a la celenterolisina

Dado que la esfingomielina mostró un fuerte efecto inhibitorio sobre la capacidad lítica de la celenterolisina, y que un resultado semejante se observó con los lípidos extraídos de los eritrocitos de cabra (cuyo contenido en SM es muy elevado), se analizó el efecto de la destrucción de dicho lípido en los GR.

El pretratamiento con SMasa C, hizo que los eritrocitos de cabra perdieran sensibilidad a la toxina de la anémona, es decir, no fueron lisados por el líquido entérico. La concentración de enzima empleada no provoca lisis de los eritrocitos *per se*.

Estos resultados muestran que GR sensibles a la lisina, se hacen resistentes

a la misma al hidrolizarse la esfingomielina presente en sus membranas celulares.

3.5.2.5. Los eritrocitos con mayor contenido de esfingomielina son más sensibles a la celenterolisina

A fin de establecer una posible correlación entre el contenido de SM de las membranas celulares de eritrocitos de distintas especies, y la sensibilidad de los mismos a la celenterolisina, se determinaron las unidades hemolíticas que presentaba una misma muestra de líquido entérico frente a eritrocitos de cabra, rata y humanos, los que se caracterizan por diferir fuertemente en el contenido de esfingomielina de sus membranas celulares.

Como se muestra en la **Tabla 5**, existe una relación directa entre ambos parámetros, es decir, la toxina mostró un mayor número de unidades hemolíticas, frente a eritrocitos con un contenido de SM mayor, en este caso de cabra.

	% SM/PL *	UH/ml **	% Sensib. ***
Cabra	45.9	256	100.0
Humanos	26.6	80	31.1
Rata	12.8	22	8.5

Tabla 5. Sensibilidad de distintos tipos de eritrocitos a la celenterolisina. * Porcentaje de SM sobre el total de fosfolípidos (Nelson, 1967; Condrea y col., 1964). ** Unidades hemolíticas por ml. *** Sensibilidad respecto de los GR de cabra.

3.5.2.6. Unión de la celenterolisina a los eritrocitos. El tratamiento con esfingomielinasa inhibe la unión

La estimación de la capacidad de unión de la CL a los glóbulos rojos se efectuó exponiendo una concentración fija (16 UH) de la lisina, a distintas concentraciones de GR (de 0,07 a 5%). Luego de la centrifugación, el sobrenadante de la incubación, conteniendo la celenterolisina, fue expuesto a la concentración usualmente empleada para determinar la actividad lítica.

Así, se determinó que un mililitro de 0,07% de glóbulos rojos humanos reduce la capacidad lítica a la mitad, es decir, los aproximadamente 5 millones de eritrocitos presentes en un mililitro de la suspensión al 0,07%, unen aproximadamente 8 unidades líticas de la celenterolisina.

Además, se investigó si la celenterolisina aún era capaz de unirse a los eritrocitos pretratados con esfingomielinasa C. En este ensayo se encontró que el sobrenadante de la incubación de la CL con los GR pretratados, tiene la misma actividad lítica que la CL original (32 UH/ml), y mayor que la determinada en el sobrenadante de la incubación de la CL con los GR que conservan su esfingomielina intacta (4 UH/ml). Estos resultados indican que la pérdida de esfingomielina de la membrana de los eritrocitos, impide la **unión** de la celenterolisina a los mismos.

3.5.2.7. La celenterolisina no se une a los lípidos de la anémona

Con el objeto de estudiar el mecanismo de protección de las células de la anémona de mar frente a sus propias lisinas, a las que se hallan continuamente expuestas, se realizaron experimentos similares a los llevados a cabo con los lípidos de los GR.

Cuando la CL fue incubada con lípidos totales de anémonas, extraídos según el método empleado para los eritrocitos de cabra, los resultados obtenidos fueron exactamente opuestos a aquéllos, es decir, no se observó ninguna inhibición de la actividad hemolítica por parte de los lípidos de *P. clematis*. Al separar los lípidos de la anémona por CCF, se obtuvieron tres fracciones lipídicas, correspondientes a PC, SPnL y PE (*Figura 19*).

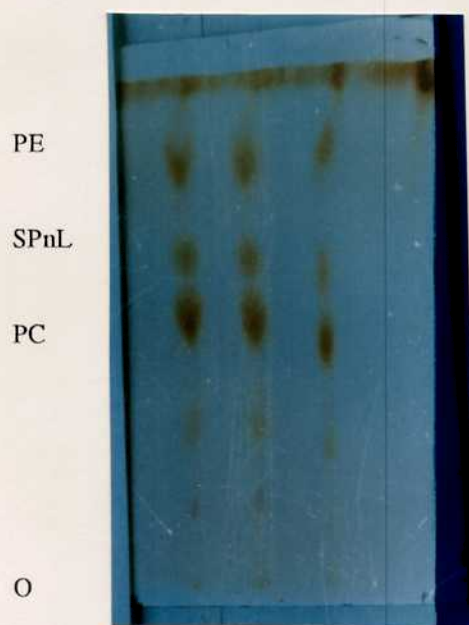


Figura 19. Separación cromatográfica de los lípidos de la anémona. Se observan tres fracciones predominantes: 1. fosfatidilcolina, 2. esfingofosfolípido, 3. fosfatidiletanolamina.

Al incubarse los eritrocitos con la CL, en presencia de cada una de estas fracciones lipídicas por separado, tampoco se observó la inhibición de la actividad lítica. Esto indica que ninguna de las fracciones lipídicas de la anémona, por separado, produce la inhibición de la actividad hemolítica de la celenterolisina. En la *Figura 20* se observa el perfil obtenido al incubar los glóbulos rojos con el SPnL.

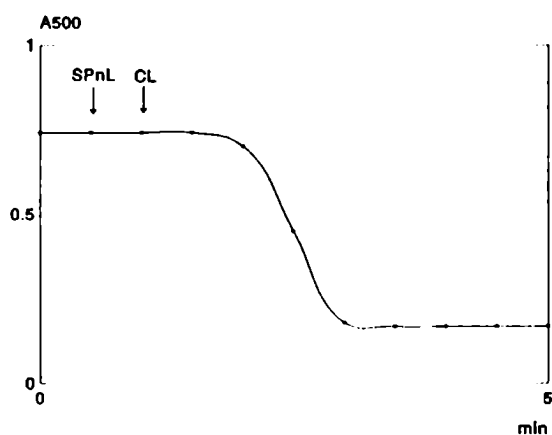


Figura 20. Cinética de hemólisis de los glóbulos rojos incubados con el esfingofosfolípido (SPnL) purificado de la anémona de mar.

3.5.3. La celenterolisina puede inducir la liberación de 5(6)-CF

encapsulada en los liposomas. La composición lipídica de los liposomas es crítica.

Los liposomas constituyen excelentes modelos para el estudio de los efectos de los agentes líticos sobre las bicapas lipídicas. Con el uso de los liposomas, preparados exclusivamente en base a los lípidos extraídos de las

células en estudio, se logra reducir notablemente la complejidad del sistema, ya que se eliminan las proteínas de la membrana. Es decir, todos los fenómenos observados pueden explicarse exclusivamente en base a la interacción lípido-agente lítico.

El enfoque utilizado consistió en preparar los liposomas conteniendo 5(6)-carboxifluoresceína (CF) en alta concentración. La fluorescencia de este compuesto se halla, en estas condiciones, suprimida por concentración (self-quenching). Al producirse un daño en la pared de los liposomas, la CF escapa de los mismos, diluyéndose grandemente en el medio exterior. Con ello, se produce un aumento de la fluorescencia que puede registrarse convenientemente con un espectrofluorómetro.

3.5.3.1. La celenterolisina lisa los liposomas de lípidos de eritrocitos pero no de lípidos de anémonas de mar

Los estudios llevados a cabo mostraron que este método es excepcionalmente útil para el estudio de los problemas planteados. En efecto, se observó que los liposomas preparados con lípidos extraídos de los eritrocitos bovinos, son rápidamente lisados al ponerse en contacto con la celenterolisina (*Figura 21*).

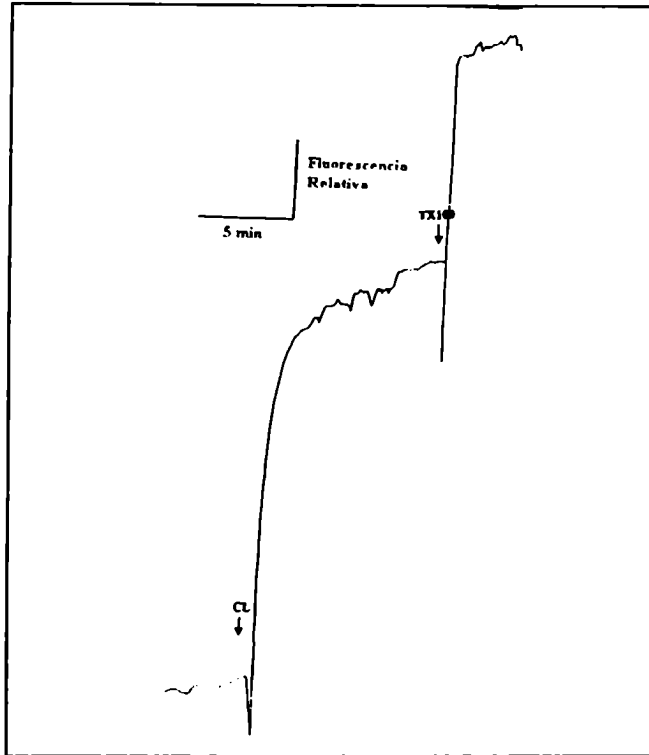


Figura 21. Efecto de la celenterolisina sobre liposomas preparados con lípidos de eritrocitos bovinos. CL=celenterolisina (10UH; 1,5ng), TX100=Tritón X100.

En contraste, los liposomas preparados con lípidos extraídos de *P. clematis* son totalmente resistentes a la CL (**Figura 22**). Es decir, las propiedades observadas en los sistemas intactos (lisis de eritrocitos versus resistencia de los tejidos de la anémona) pueden ser explicadas exclusivamente en base a los lípidos que componen sus membranas.

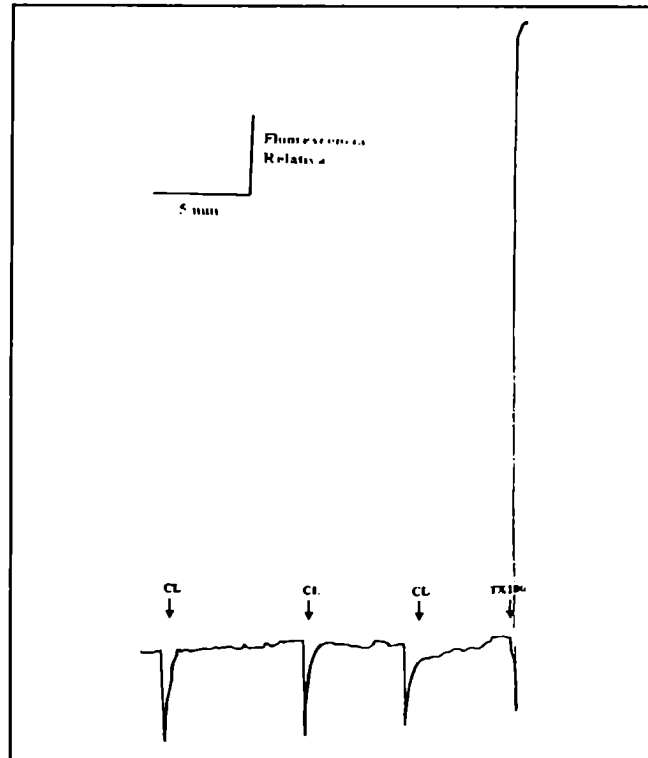


Figura 22. Efecto de la celenterolisina sobre liposomas preparados con lípidos de anémona. CL=celenterolisina (10UH; 1,5ng). TX100=Tritón X100.

3.5.3.3. El agregado de esfingomielina, pero no de otros fosfolípidos, confiere sensibilidad a los liposomas preparados con los lípidos de la anémona

Si la lisina se preincuba con diversos lípidos antes de agregarla a la suspensión de liposomas con CF encapsulada, se observa que, al igual que lo que ocurre con la hemólisis, sólo la SM inhibe la lisis de los liposomas; no así la DOPC, DOPC + colesterol o la asolectina. Los lípidos extraídos de la anémona tampoco son inhibitorios, en cambio aquéllos extraídos de los eritrocitos sí lo son, en concordancia con su gran contenido de SM.

Si a los lípidos extraídos de la anémona se añade una pequeña cantidad de

SM (1% m/m) antes de preparar los liposomas, se observa que los mismos adquieren ahora sensibilidad a la CL (*Figura 23 y 24*). Esto indica que, en los celenterados, la presencia de SPnL en lugar de SM, puede explicar cómo las membranas permanecen indemnes frente a sus toxinas.

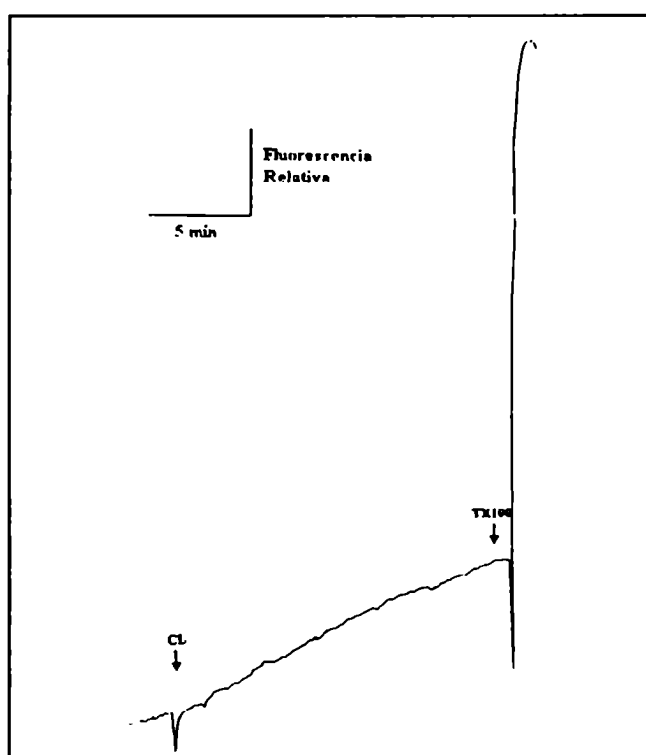


Figura 23. Efecto de la celenterolisina sobre liposomas preparados con lípidos de anémona y 1% de SM. CL=celenterolisina (10UH; 1,5ng). TX100=Tritón X100.

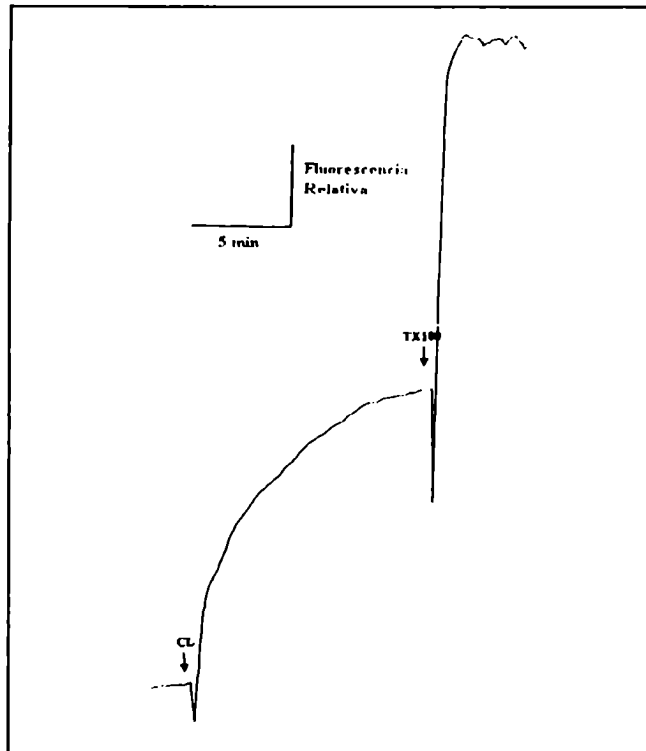


Figura 24. Efecto de la celenterolisina sobre liposomas preparados con lípidos de anémona y 20% de SM. CL=celenterolisina (10UH; 1,5ng). TX100=Tritón X100.

3.5.3.4. La presencia de SM es necesaria pero no suficiente para la lisis de los liposomas

Si se preparan liposomas de PC purificada + SM, en diversas proporciones, no se observa la lisis. Sin embargo, si se añade además al sistema la fracción de los lípidos polares, separada de los lípidos totales de los eritrocitos bovinos, se encuentra ahora lisis por exposición a la CL. Es decir, es probable que el efecto lítico resulte de la unión de la CL a la SM y luego entren en juego otros fosfolípidos para dar lugar a los complejos líticos.

Utilizando lípidos puros obtenidos comercialmente, se comprobó que la

fosfatidiletanolamina es capaz de conferir sensibilidad a los liposomas compuestos de esfingomiélinea-fosfatidilcolina. Cuando se preparó una mezcla de composición 1:1:1 (mol/mol) de estos tres lípidos, se observó una sensibilidad semejante a la encontrada con el agregado de los lípidos polares totales provenientes de glóbulos rojos. Es decir, basta con la fosfatidiletanolamina para completar los requerimientos lipídicos de la celenterolisina.

3.5.4. La celenterolisina se une a SM-Sepharosa 4BCL pero no a PC-Sepharosa 4BCL

Se investigó la capacidad de la celenterolisina de unirse a fosfatidilcolina y a esfingomiélinea inmovilizadas sobre Sepharosa 4BCL. Estas resinas fueron preparadas *ad hoc* como se describe en Materiales y Métodos. Luego de hacer fluir alícuotas de 10 ml del líquido entérico (con aprox. 640 UH totales) a través de columnas conteniendo 1 ml de estas resinas, se midió la actividad hemolítica en los efluentes para determinar si había habido unión de la CL a estas matrices de afinidad.

En el caso de la PC-Sepharosa 4BCL, la muestra original y la muestra tratada a través de la columna mostraron la misma actividad hemolítica, indicando que no hubo unión de la lisina a la PC inmovilizada.

En el caso de la SM-Sepharosa 4BCL, en cambio, se encontró que el efluente de la columna carecía por completo de actividad, o sea que la lisina se había unido en su totalidad.

Luego de lavar exhaustivamente con TBS, se procedió a pasar 2 porciones de 2 ml, de diversas sustancias, a través de la resina de SM-Sepharosa 4BCL para intentar la elución de la celenterolisina. Éstas incluyeron soluciones de alta fuerza iónica como 5 M NaCl, soluciones de pH ácido (50 mM citrato, pH 2,6; 4 y 6) agentes caotrópicos como INa (2,5 M) y urea (4 M a pH 7,4 y 4,8 M a pH 7,4) y solventes como dimetilformamida (10%). Se ensayó la actividad hemolítica en todos los eluatos, luego de ajustar el pH o la concentración de NaCl, en los casos en que era necesario.

En ninguno de los lavados o de los eluatos se halló actividad hemolítica, es decir, ninguno de los tratamientos llevados a cabo fue efectivo para eluir a la celenterolisina de la resina de SM-Sepharose 4B.

Finalmente, se examinó si suspensiones sonicadas de SM en TBS, que contenían de 1 a 10 mg/ml del esfingolípido, podían resultar efectivas para la elución. En este caso, las alícuotas de los eluatos fueron sometidas a un tratamiento con esfingomielinasa (2 U/ml) por 1h a 37°C, ya que, de eluirse la CL, la actividad hemolítica podría estar inhibida por su unión a la SM. Sin embargo, se encontró que las muestras de eluato tratadas con la esfingomielinasa, y las muestras no tratadas, no tenían actividad hemolítica, es decir, la SM no fue efectiva para eluir la CL. Estos resultados sugieren que la unión de la CL a la SM da lugar a la pérdida irreversible de la actividad, probablemente como consecuencia de un cambio de conformación, que implica la transición de un estado hidrofílico a uno anfifílico capaz de asociarse a las membranas, como es el caso de otras

proteínas formadoras de poros (Bhakdi y Tranun-Jensen, 1983).

3.5.5. La celenterolisina interactúa con liposomas de lípidos de glóbulos rojos y SM pero no con liposomas de lípidos de la anémona de mar ni de SPnL

El estudio de la unión de la CL a distintos lípidos se realizó incubando la toxina con liposomas, luego de lo cual los liposomas fueron sedimentados y se midió la actividad hemolítica remanente en los sobrenadantes. La centrifugación de la celenterolisina sin lípidos (control) no produce la pérdida de actividad.

Este experimento mostró resultados categóricos (ver Tabla 6). Mientras que en los sobrenadantes de los liposomas preparados con lípidos de eritrocitos bovinos no se observa ninguna actividad remanente, en los sobrenadantes correspondientes a los liposomas preparados con los lípidos totales, extraídos de *P.clematis*, la actividad hemolítica permanece igual a la original. Coincidentemente la SM, pero no su análogo fosfónico, el SPnL, provoca un efecto similar al de los lípidos de los glóbulos rojos.

La interpretación más simple de estas observaciones es que, mientras que la CL es capaz de unirse a los liposomas de lípidos de eritrocitos y de SM, no parece interactuar de modo alguno con los lípidos totales de la anémona de mar, ni con el SPnL en particular.

	Lípidos de eritrocitos	Lípidos de <i>P.clematis</i>	SM	SPnL
1 mg/ml	0	100	0	100
0,3 mg/ml	0	100	2	100
0,1 mg/ml	0	100	4	100

Tabla 6. Actividad hemolítica remanente en los sobrenadantes luego de la incubación de celenterolisina (128 UH; 19 ng) con liposomas de distinta composición. Los resultados se expresan como porcentajes de la actividad inicial.

Capítulo 4

Discusión y conclusiones

4.1. La celenterolisina y sus propiedades

4.2. Mecanismo molecular de la autotolerancia

4.3. Posibles funciones de la celenterolisina

Las toxinas citolíticas de los celenterados han sido objeto de una intensa investigación. Se ha encontrado que la mayoría tiene en común tres características importantes (Bernheimer y col., 1984; Bernheimer & Rudy, 1986): i) la de ser polipéptidos básicos, de bajo peso molecular (entre 10 y 20 kDa); ii) ser fuertemente inhibidas por esfingomielina y iii) no poseer funciones enzimáticas conocidas.

Las características de la toxina citolítica hallada en este trabajo y a la que he denominado *celenterolisina*, coinciden bien con esta descripción.

En relación con las citolisinas de las anémonas de mar, dos importantes preguntas han quedado sin respuesta hasta el presente:

- I) ¿Están estas toxinas asociadas solamente a los nematocistos, o se generan, acumulan y secretan en otras partes del organismo?
- II) ¿Cuál es el mecanismo por el cual las células de los organismos que las producen, es decir, las de la propia anémona, no se ven afectadas por sus toxinas?

El trabajo presentado en esta Tesis ofrece una explicación original para estos interrogantes.

Acerca de la primera cuestión, se demuestra aquí que, contrariamente a lo que dan por supuesto muchos autores, existen citolisinas de anémonas de mar que no están relacionadas con los nematocistos. Así, he hallado que las celenterolisinas de las anémonas de mar *Phymactis clematis* y

Bunodactis marplatensis se encuentran presentes normalmente en la cavidad entérica.

Dado que el líquido entérico que contiene las lisinas baña permanentemente las células de la gastrodermis, es importante determinar el mecanismo por el cual dichas células no son afectadas. Este fue el segundo aspecto investigado.

En los párrafos que siguen se discutirán las características de la celenterolisina, su mecanismo de acción, los fundamentos de la autotolerancia de las anémonas de mar, y las posibles funciones de esta nueva toxina hemolítica.

4.1. LA CELENTEROLISINA Y SUS PROPIEDADES

4.1.1. Características de la celenterolisina de *Phymactis clematis*

La potente citolisina hallada en la cavidad gastrovascular de la anémona *Phymactis clematis*, ha mostrado ser de naturaleza proteica, termolábil y sensible a la acción de proteasas. Posee un peso molecular de 18 kDa y no es dissociable en subunidades; su pH óptimo es alcalino, y no posee actividad fosfolipasa. Su actividad no depende de Ca^{++} o de Mg^{++} , tiene un pI próximo a 9,0 y es fuertemente inhibida por SM. Es decir, la celenterolisina reúne las características de una típica toxina hemolítica de los cnidarios.

Se encuentran dos actividades fosfolipasa A en el líquido entérico total, detectadas por el aumento de AG libres. Una en la fracción correspondiente con el volumen de exclusión ($\text{PM} > 30000$) y otra con el volumen total ($\text{PM} < 1500$) de una columna de Sephadex G-50; no se halló actividad fosfolipasa co-eluyendo con la actividad lítica, indicando que las fosfolipasas de este organismo no son citolíticas. Por otro lado, no se ha detectado actividad esfingomielinasa en el líquido entérico.

En conclusión, la actividad lítica no se debe a la presencia de una fosfolipasa hemolítica, como es el caso de algunas toxinas de otros organismos (Hessinger y Lenhoff, 1974; Florín-Christensen y col., 1986).

4.1.2. *Celenterolisina* y la toxina de los nematocistos

Las características anteriormente mencionadas han sido observadas también en otras hemolisinas de las anémonas de mar. Sin embargo, su presencia en el celenterón se demuestra por primera vez en estos estudios. La hemolisina de los nematocistos, obtenida a partir de los nematocistos purificados, mostró que la misma difiere claramente en tamaño de la celenterolisina. En efecto, el peso molecular de la celenterolisina es de 18.000, aproximadamente, en tanto que el peso molecular de la toxina de los nematocistos es superior a 30.000.

El método de extracción del líquido entérico, utilizado en este trabajo, no provoca la descarga de los nematocistos, ya que ello requiere dos fenómenos simultáneos: una estimulación mecánica y otra química (Mariscal, 1974; Pantin, 1942 a,b). Más aún, cuando el líquido entérico es cromatografiado en una columna de Sephadex G-50, se halla un único pico hemolítico, diferente del pico encontrado cuando se cromatografía el contenido soluble de los nematocistos en el mismo gel, indicando que no hay aporte significativo de los nematocistos a la actividad lítica del celenterón. Por otra parte, cuando homogenatos del animal entero son cromatografiados en la misma columna, se hallan dos actividades líticas de diferente peso molecular, una correspondiente a la celenterolisina y otra, a la lisina de los nematocistos. Concluimos entonces que la actividad hemolítica descrita no está relacionada con los nematocistos.

Algunos estudios previos de otros autores han sugerido la posible existencia

de toxinas hemolíticas independientes de los nematocistos. Así, en 1974, Mariscal concluye que un gran número de celenterados posee una toxicidad inherente a sus tejidos, la cual no necesariamente está asociada con la presencia de nematocistos. Por otra parte, Devlin (1974), al aislar por primera vez una toxina de *Stichodactyla helianthus*, menciona que no existen pruebas directas que indiquen que la lisina es un constituyente de los nematocistos. Numerosos trabajos en distintas especies de anémonas de mar se han llevado a cabo utilizando su técnica de aislamiento, la cual parte de homogenatos del animal entero (Bernheimer y Avigad, 1976; Blumenthal y Kem, 1983; Kem y Dunn, 1988; Linder y col., 1977; Varanda y Finkelstein, 1980; Doyle y Kem, 1989; Kem y Ostmann, 1989). La mayor parte de estos autores adscriben, sin más, la actividad citolítica aislada a los nematocistos. Sin embargo, debido a las similitudes de la *celenterolisina* con muchas de las toxinas descritas, es probable que estos autores, en realidad, hallan trabajado con toxinas semejantes a la *celenterolisina* y no necesariamente provenientes de los nematocistos. Por otra parte, los experimentos que he llevado a cabo, en los que se utilizaron especímenes de *Phymactis clematis* tratados con antibióticos, para inhibir la proliferación de bacterias y hongos, y otros mantenidos en la oscuridad, para reducir la presencia de zooxantelas simbióticas, indican fuertemente que la *celenterolisina* no depende de la actividad de los microorganismos asociados a estas anémonas, pues aún en estas rigurosas condiciones se sigue observando la producción de *celenterolisina* a niveles normales.

4.1.3. Requerimientos de lípidos para la actividad lítica

Como se ha mencionado, en muchos estudios sobre las lisinas de diferentes anémonas de mar, se ha observado que las mismas son inhibidas fuertemente por bajas concentraciones (1ug/ml) de esfingomielina (SM) (Bernheimer y col., 1982, 1984; Bernheimer y Avigad, 1982; Linder y col., 1977).

Los experimentos de inhibición, llevados a cabo en esta Tesis, se realizaron con eritrocitos de cabra, los que constituyen un excelente modelo ya que poseen como característica importante una gran riqueza en SM (46% de SM sobre el total de fosfolípidos en sus membranas; Condrea y col., 1964; Deuticke, 1977). Se demuestra aquí que estos glóbulos rojos, al ser tratados con esfingomielinasa, pierden totalmente su sensibilidad a la celenterolisina.

En concordancia con estos resultados, al tratar eritrocitos de diferente origen con la lisina de *P. clematis*, se halló una correlación directa entre la sensibilidad de los mismos y el contenido de SM de sus membranas; siendo la toxina más activa cuanto mayor era el porcentaje de SM en las mismas.

Los experimentos adicionales confirmaron la fuerte acción inhibitoria de la SM sobre la hemólisis producida por la *celenterolisina*. No se halló inhibición con los otros lípidos también abundantes en las membranas de los eritrocitos, como la fosfatidilcolina o el colesterol, en armonía con los estudios de otros autores al respecto (Bernheimer y Avigad, 1981; Bernheimer y Avigad, 1976; Mebs y col., 1983).

Estos resultados experimentales demuestran la importancia de la SM en la

actividad lítica de la *celenterolisina*.

4.1.4. Mecanismo de acción de la *celenterolisina*

4.1.4.1. La *celenterolisina* interactúa con los lípidos

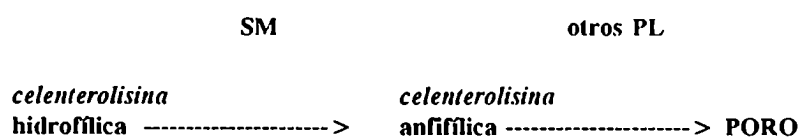
Los experimentos en los que se analizó el efecto de la *celenterolisina* sobre los liposomas de diversa composición, tienen especial importancia pues permiten explicar los fenómenos observados exclusivamente en base a la interacción del agente lítico con los lípidos. La lisis de los liposomas preparados a partir de los lípidos de los glóbulos rojos se inhibe, del mismo modo que la hemólisis, por SM pero no por los otros fosfolípidos o lípidos neutros analizados, indicando que la hemólisis y la lisis de los liposomas responden a un mismo proceso.

Cuando se investigaron liposomas de composición definida, preparados por la mezcla de fosfolípidos puros, se halló que la presencia de SM es esencial para lograr la lisis, pero no suficiente. Los liposomas de fosfatidilcolinas puras o fosfatidilcolinas + colesterol no son lisados. El agregado de SM entre 1 y 50 % mol/mol tampoco favoreció la lisis, a menos que se agreguen otros lípidos polares, como los obtenidos separando la fracción de lípido polar de los glóbulos rojos bovinos. Se observó que el fosfolípido activo para dar lugar a la lisis, además de la SM, es la fosfatidiletanolamina.

Por otra parte, se demostró que, aunque los liposomas formados por

fosfatidilcolina - esfingomielina no son lisados, unen sin embargo a la celenterolisina pues son capaces de arrastrarla consigo por centrifugación. En consecuencia, se postula en esta Tesis que la formación de la estructura lítica requiere dos pasos, uno inicial que involucra a la SM y uno posterior que involucra a otros fosfolípidos.

Un posible modelo es el siguiente:



La *celenterolisina hidrofílica* está representada por la forma activa de la lisina, hallada normalmente en el celenterón. La interacción con la SM produciría un cambio conformacional con la exposición de los grupos hidrofóbicos, dando lugar a la forma *anfifílica*, con las propiedades necesarias para asociarse a las membranas celulares. Finalmente, la asociación de varios complejos SM-*celenterolisina anfifílica* daría lugar a la formación de los oligómeros que constituirían los poros líticos. Este proceso requiere la participación de otros lípidos polares.

Debe destacarse que esta hipótesis acerca de la formación de los oligómeros como estructuras líticas finales, es ampliamente aceptada como explicación del mecanismo de acción de las citolisinas bacterianas, el complemento inmune (Bhakdi y Tranum-Jensen, 1983, Phil.Trans.) y

también para el caso de las citolisinas de los cnidarios (Belmonte y col., 1993; Bernheimer y Rudy, 1986).

4.1.4.2. La transición con esfingomielina produce cambios irreversibles en la *celenterolisina*

Las evidencias para esta afirmación son las siguientes:

- 1) La hemólisis con cantidades de *celenterolisina* insuficientes para causar la lisis completa, se detiene completamente luego de llegar a un valor dado, independientemente de la temperatura a la cual se haga la incubación o el tiempo transcurrido. Sólo se puede obtener una mayor hemólisis añadiendo nueva *celenterolisina*. Estos resultados sugieren que las moléculas de *celenterolisina* que han participado en la lisis de un glóbulo rojo, no pueden participar en la lisis de otro. Esto no sucedería en el caso de una enzima que sucesivamente va degradando nuevos componentes de las membranas de los eritrocitos.
- 2) Las mismas observaciones se verifican con liposomas: su lisis llega a un punto final que no se supera, aún después de tiempos prolongados. Sólo puede reiniciarse la lisis añadiendo nueva *celenterolisina*.
- 3) Si se permite la interacción de la SM con la *celenterolisina*, no es posible recuperar la actividad hemolítica, aún después de destruir completamente la SM con SMasa y extraer las ceramidas.
- 4) La interacción con la matriz de afinidad SM-Sepharose 4BCL indica exactamente la misma conclusión ya que esta resina une ávidamente a la

celenterolisina, pero ningún procedimiento habitual de elución consigue obtenerla en forma activa.

Debe destacarse que, de acuerdo con estos resultados, el complejo *SM-celenterolisina*, para ser lítico, debe formarse con SM pre-insertada en la membrana, pues si se forma con moléculas de SM no insertadas en la misma, no puede luego acceder a la membrana. Esto explicaría la causa de la inhibición por SM.

4.1.4.3. La acción de la *celenterolisina* es cooperativa

El análisis de la relación dosis-efecto en la hemólisis causada por la *celenterolisina* revela efectos cooperativos. Se acepta que una descripción adecuada de la distribución de las lesiones por eritrocito, al añadir una lisina, corresponde a una distribución de Poisson. Si no existieran efectos cooperativos entre las moléculas de *celenterolisina* y cada una de ellas diera origen a una lesión lítica, la media del número de lesiones por célula debería crecer linealmente con la concentración de *celenterolisina*. Los resultados obtenidos, sin embargo, revelan que dicha media crece significativamente más rápido que lo esperado (Fig. 8), es decir que se manifiesta el efecto cooperativo. Este fenómeno sugiere que, para la formación de un poro lítico, se requiere la asociación de varias moléculas de *celenterolisina*, de manera tal que puedan formar un oligómero, como ocurre con algunas toxinas bacterianas y con el complemento inmune en vertebrados (Bhakdi y Tranum-Jensen, 1983).

4.2. MECANISMO MOLECULAR DE LA AUTOTOLERANCIA

Se encuentra bien establecido que los celenterados son un grupo zoológico único por la ausencia de SM en sus tejidos ((Kittredge y col., 1967,1969; Rosenberg, 1973; Hori y Nozawa, 1982; Hilderbrand y Henderson, 1982)). Este hecho ha sido documentado en el caso particular de *Phymactis clematis* por Pollero (1983). Es curioso que no exista ningún antecedente relacionando la falta de SM con la producción de citolisinas que actúan a través de este fosfolípido.

Como contrapartida a la ausencia de SM, los celenterados poseen análogos estructurales de la misma, los esfingofosfolípidos.

La observación realizada en este estudio acerca de que la *celenterolisina* une SM pero no los fosfono-análogos, se convierte en crucial cuando se desea explicar el mecanismo de autotolerancia. En efecto, los celenterados parecen capaces de tolerar sus propias toxinas mediante su composición lipídica particular, ya que *al carecer de SM, no poseen en sus membranas el receptor específico para sus toxinas citolíticas*. Es decir, en esta Tesis propongo que las toxinas y los lípidos han coevolucionado en *Cnidaria*, confiriendo a este grupo un efectivo sistema de ataque. Sin duda, un sistema selectivo como el puesto de manifiesto aquí, puede contribuir significativamente a explicar el marcado éxito ecológico de este antiguo y diverso grupo de organismos.

Existen antecedentes de coadaptación entre la composición lipídica y la

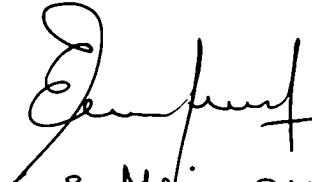
secreción de los agentes citolíticos en otros organismos. Un ejemplo de este tipo lo constituye la secreción de las fosfolipasas citolíticas en los ciliados, organismos que poseen en sus membranas plasmáticas fosfolípidos altamente resistentes a estas enzimas, en lugar de los fosfolípidos corrientes (Florin-Christensen y col., 1986). Del mismo modo, diversas bacterias secretan toxinas que deben unirse a colesterol (Davis y col., 1990) y ellas mismas no contienen esteroides (Amdur y col., 1978).

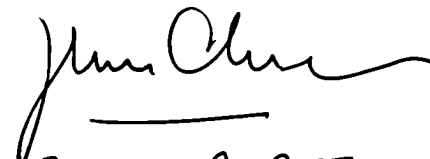
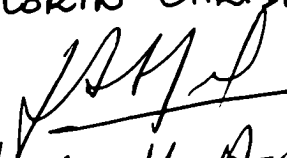
4.3. POSIBLES FUNCIONES DE LA *CELENTEROLISINA*

La acción lítica de la *celenterolisina* puede contribuir a la destrucción de presas incorporadas al celenterón y facilitar así su digestión. Es importante destacar que los cnidarios no poseen estructuras trituradoras, por lo tanto, la presencia de una actividad lítica en el celenterón puede ser crítica para la digestión extracelular de las presas enteras.

La *celenterolisina* puede constituir también un sistema de defensa contra los organismos comensales y parásitos, evitando la colonización de la cavidad gastrovascular. Finalmente, la abundancia de *celenterolisina* en la cavidad gastrovascular y en los tejidos que la rodean puede participar, junto con los nematocistos, en una estrategia de defensa contra predadores. Estos pueden sufrir efectos tóxicos al consumir cnidarios y, si los mismos no son letales, podrán aprender a evitar la predación en ulteriores contactos. De

esta forma, los elementos tóxicos podrían funcionar en forma análoga a como lo hacen las glándulas tóxicas presentes en la piel de los batracios, es decir, como elementos de disuasión de predadores. Esto sería crítico para las anémonas de mar, ya que son muy visibles y, por lo tanto, expuestas a la predación.


E. Meinardi


J. FLORIN CHRISTENSEN

Julio H. Azcurra.

Bibliografía

- Abita J.P., Chicheportiche R., Schweitz H. y Lazdunski M. (1977) *Biochemistry* 16:1838-1844
- Affinity chromatography (1979) ed. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia
- Alhadeff J.A. y Daves G.D. (1971) 244:211-213
- Amdur B.H., Szabo I. y Socransky S.S. (1978) *J. Bacteriol* 135(1):161-163
- Andrews P. (1964) *Biochem. J.* 91:222-233
- Baer E. y Stanacev N.Z. (1964) *J. Biol. Chem* 239:3209-3214
- Balozet L. (1957) *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie* 35: 220
- Bangham A.D., Standish M.M. y Watkins J.C. (1965) *J. Mol. Biol.* 13:238
- Barhanin J., Hugues M., Shweitz H., Vincent J.P. y Lazdunski M. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:5764-5769
- Belmonte G., Pederzolli C., Macek P. y Menestrina G. (1993) *J. Membrane Biol.* 131:11-22
- Béress L., Béress R. y Wunderer G. (1977) *FEBS Lett.* 50:311-314
- Béress L., Wunderer G. y Wachter E. (1977) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358:985-988
- Béress L. y Zwick J. (1980) *Mar. Chem.* 8:333-338
- Béress R., Béress L. y Wunderer G. (1976) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357:409-414
- Bergman C., Du Bois J.M, Rojas E. y Rathmayer W. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 455:173-184
- Bernheimer A.W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 344:27-50

- Bernheimer A.W., Kim K.S., Remsen C.C., Antanavage J. y Watson S.W. (1972) *Infect. Immunity* 6:636-642
- Bernheimer A.W. y Avigad L.S. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73:467-471
- Bernheimer A.W. y Avigad L.S. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 541:96-106
- Bernheimer A.W. y Avigad L.S. (1981) *Toxicon* 19:529-534
- Bernheimer A.W. y Avigad L.S. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 217: 174-180
- Bernheimer A.W., Avigad L.S. y Lai C.Y. (1982) *Arch. Biochem. Biophysiol.* 214:840-845
- Bernheimer A.W., Avigad L.S., Branch G., Dowdle E. y Lai C.Y. (1984) *Toxicon* 22:183-191
- Bernheimer A.W. y Lai C.Y. (1985) *Toxicon* 23:791-799
- Bernheimer A.W. y Rudy B. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 864:123-141
- Bhakdi S. y Trandum-Jensen J. (1983) *TIBS Trends Biochem. Sci.*, 4:154
- Blanquet R. (1968) *Comp. Biochem. Physiol.* 25:893-902
- Bligh E.G. y Dyer W.J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917
- Blumenthal K.M. y Kem W.R. (1983) *The Journal of Biol. Chem.* 258: 5574-5581
- Bodansky M. (1924) *Amer. Journ. Physiol* 67
- Bodansky M. y ROSE W.C. (1922) *Amer. Journ. Physiol* 62
- Burnett A., Lents T. y Warren M. (1960) *Ann. Soc. Royal. Zool. Belg.* 90: 247-267
- Calton G.J., Burnett J.W. y Vader W. (1978) *Toxicon* 16:443
- Chen R., Kramer C., Schmidmayr W., Chen-Schmeisser V. y Henning V. (1982) *Biochem. J.* 203:33-43

- Chou P. y Fasman G.D. (1978) *Annu. Rev. Biochem.* 47:251-276
- Condrea E., De Vries A. y Mager J. (1964a) *Biochim. Biophys. Acta* 84:60
- Condrea E., Mammon Z., Aloof S. y De Vries A. (1964b) *Biochim. Biophys. Acta* 84:365-375
- Condrea E. y De Vries A. (1965) *Toxicon* 2:261-273
- Condrea E., Barzilay M. y Mager J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 210: 65-73
- Conklin E.J. y Mariscal R.N. (1976) en *Third International Symposium on Coelenterate Biology*, Victoria, pp.744; 549-558
- Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N. y Ginsberg H.S. (1990) en *Microbiology*, ed. Lippincott Company, Philadelphia.
- De S.S. (1944) *Ann. Biochem. Exp. Med.* 4:45
- De Barry J., Fosset M. y Lazdunsky M. (1977) *Biochemistry* 16:3850-3855
- Delfino J.M., Florín-Christensen J., Florín-Christensen M. y Richards F.M. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 205 (1):113-119
- Deuticke B. (1977) *Rev. Physiol. Bioch. Pharmac.* 78:1-97
- Devlin J.P. (1974) *J. Pharm. Sci.* 63:1478-1480
- Doyle J.W. y Kem W.R. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 987:181-186
- Duncan J.L y Schlegel R. (1975) *J. Cell Biol.* 67:160-173
- Faucon J.F., Duforcq J., Couraud F. y Rochat H. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 554:332-339
- Ferguson K.A., Davis F.G., Conner R.L., Landrey J.R. Y Mallory F.B. (1975) *J. Biol. Chem.* 250:6998-7005
- Ferlan I. y Lebez D. (1974) *Toxicon* 12:51-56
- Ferlan I. y Lebez D. (1974) *Toxicon* 12:57-61

- Florín-Christensen J., Florín-Christensen M., Knudsen J. y Rasmussen L. (1985) *J. Protozool.* 32:657-660
- Florín-Christensen J., Florín-Christensen M., Rasmussen L. y Knudsen J. (1986a) *Comp. Bioch. Physiol.* 85A:143-148
- Florín-Christensen J., Florín-Christensen M., Rasmussen L., Knudsen J. y Hansen O.H. (1986b) *Comp. Bioch. Physiol.* 85B: 149-155
- Florín-Christensen J., Florín-Christensen M., Knudsen J. y Rasmussen L. (1986c) *TIBS Trends Biochem. Sci.* 11:354-355
- Freer J.H., Arbuthnott J.P. y Bernheimer A.W. (1968) *J. Bacteriol.* 95: 1153-1168
- Freer J.H., Arbuthnott J.P. y Billcliffe B. (1972) *J. Gen. Microbiol.* 75: 321-332
- Fukushima H., Martin C.F., Iida H., Kitajima Y., Thompson G.A. y Nozawa Y. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 431:165-179
- Fukushima H., Watanabe T. y Nozawa Y. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 436: 249-259
- Gallai-Hatchard J., Magee W.L., Thompson R.H.S. y Webster G.R. (1962) *J. Neurochem.* 9:545
- Glaser O.C. y Sparrow C.M. (1909) *J. Exp. Zool.* 6:361-382
- Goodwin M H. y Telford M. (1971) *Biol. Bull.* 140:389-399
- Grassé P.P. (1987) *Traité de Zoologie Tomo III Fasc.3.* Ed. Masson, París.
- Greig M.E. y Gibbons A.J. (1955) *Amer. J. Physiol.* 181:313
- Greig M.E. y Gibbons A.J. (1956a) *Arch. Biochem. Biophys.* 61:335-342
- Greig M.E. y Gibbons A.J. (1956b) *Arch. Biochem. Biophys.* 61:343
- Grotendorst G. (1979) *Doctoral dissertation, Un. of South Florida, Tampa*
- Habermann E. y Molbert E. (1954) *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 223:203

- Hand C. (1961) en *The Biology of Hydra* pp. 187-202
- Harshman S. (1982) *Fed. Proc.* 41:1492 (Abstr.)
- Hastings S.G., Larsen J.B. y Lane C.E. (1967) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125:41-45
- Hayaishi O. y Kornberg A. (1954) *J. Biol. Chem.* 206:647
- Hayashi O., Matsuura F. y Matsubara T. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 176: 208-210
- Hayashi O., Matsubara T. y Matsuura F. (1969) *Yukagaku* 18:118-123
- Heemskerk C.H.T. y Van Deenen L.L.M. (1964) *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. van Wetenschappen ser.B.* 67:181
- Hessinger D.A. y Lenhoff H.M. (1973a) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 53:475-481
- Hessinger D.A. y Lenhoff H.M. (1973b) *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 629-638
- Hessinger D.A. y Lenhoff H.M. (1974a) *Comp. Biochem. Physiol* 49B: 139-150
- Hessinger D.A. y Lenhoff H.M. (1974b) *Toxicon* 12:379-383
- Higashi S., Hori T. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 152:568-575
- Hilderbrand R.L., Henderson T.O., Glonek T. y Meyers T.C. (1971) *Fed. Proc. Abstr.* 30:1072
- Hilderbrand R.L., Henderson T.O., Glonek T. y Meyers T.C. (1973) *Biochem.* 12:4756
- Hilderbrand R.L. y Henderson T.O. (1982) en *The Role of Phosphonates in Living System* (ed. Hilderbrand) CRC Press, Inc., pp. 5-30
- Hori T., Itasaka O. y Inoue H. y Yamaka K (1964) *J. Biochem.* 56:477-479
- Hori T., Itasaka O. y Inohue H. (1966) *J. Biochem.* 59:570-573
- Hori T., Arakawa I. y Sugita M. (1967) *J. Biochem.* 62:67-70

- Hori T., Sugita M. y Itasaka O. (1969) *J. Biochem.* 65:451-457
- Hori T., Sugita M., Kanbayashi J. y Itasaka O. (1975) *Yukagaku* 24: 181-184
- Hori T. y Nozawa Y. (1982) en *Phospholipids* (eds. Hawthorne y Ansell) Elsevier Biom. Press., pp. 95-128
- Horiguchi M. y Kandatsu M. (1959) *Nature* 184:901-902
- Hurley J.C., Bunde T.A., Dell J.C., Kirkpatrick D.S. y Bishop S.H. (1977) *Comp. Biochem. Physiol.* 58:253
- Hyman L.H. (1940) *The invertebrates: Protozoa through Ctenophora.* McGraw-Hill, NY.
- Ishida J. (1936) *Annot. Zool. Jap.* 15
- Ishikawa Y., Onodera K. y Takeuchi A. (1979) *J. Neurochem.* 33:69-73
- Jacques R. (1955) *Helv. Physiol. Pharm. Acta* 13:113
- Jacques Y., Fosset M. y Lazdunsky M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 7383-7392
- Jones C.S. (1947) *J. Exper. Zool.* 105:25-60
- Jordan H. (1907) *Arch. Gesam. Physiol. Mensch. Tiere* 116
- Kandatsu M. y Horiguchi M. (1960) *Agr. Biol. Chem.* 24:565-570
- Kandatsu M. y Horiguchi M. (1962) *Agr. Bio. Chem.* 26:721-722
- Karlsson K.A. (1970a) *Chem. Phys. Lipids* 5:6-43
- Karlsson K.A. (1970b) *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 39:847-851
- Karlsson K.A. y Samuelsson B.E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 337:204

- Kem W.R. (1988) en *The Biology of Nematocysts*, pp.375-405 (ed. Hessinger y Lenhoff), Acad. Press, N.Y.
- Kem W.R., Doyle J.W., Dunn B.M. y Blumenthal K.M. (1982) *Fed. Proc.* 41, 8025 (abstr)
- Kem W.R. y Dunn B.M. (1988) *Toxicon* 26:997-1008
- Kem W.R., Parten B., Pennington M., Price D. y Dunn B.M. (1989) *Biochemistry* 28, 3483-3489.
- Kennedy K.E. y Thompson G.A. (1970) *Science* 168:989-991
- Kinsky S.C. (1974) en *Methods in Enzymology Vol.XXXII(B)* (ed. Fleischer, Packer), pp. 501-513, Academic Press, N.Y.
- Kirkpatrick D.S. y Bishop S.H. (1972) *Fed. Proc. Abstr.* 31:874
- Kirkpatrick D.S. y Bishop S.H. (1973) *Biochem.* 12:2829
- Kittredge J.S. y Hughes R.R. (1964) *Biochem.* 3:991-996
- Kittredge J.S., Roberts E. y Simonsen D.G. (1962) 1:624-628
- Kittredge J.S., Isbell A.F. y Hughes R.R. (1967) *Biochem.* 6:289-295
- Kittredge J.S. y Roberts E. (1969) *Science* 164:37-42
- Kittredge J.S., Horiguchi M. y Williams P.M. (1969) *Comp. Biochem. Physiol.* 29:859-863
- Klibansky CH. y De Vries A. (1964) *Toxicon* 2:181-186
- Kyes y Sachs (1903) *Berl. Klin. Wochenschrift* 40:21
- Lampson G.P. y Tytell A.A. (1965) *Anal. Biochem.* 11:374-377
- La Nauze J.M. y Rosenberg H. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 165:438-447
- La Nauze J.M., Rosenberg H. y Shaw D.C. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 212:332-350

- Lane C.E. (1967) en *Animal Toxins* (ed. Russell, F.E.) Pergamon Press, Oxford
- Lane C.E. y Dodge E. (1958) *Biol. Bull.* 115:219-225
- Lane C.E., Coursen B.W. y Hines K. (1961) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107:670-672
- Lane C.E. y Larsen J.B. (1965) *Toxicon* 3:69-71
- Lankisch P.G. y Vogt W. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 270:241-247
- Larsen J.B. y Lane C.E. (1966) *Toxicon* 4:199-203
- Larsen J.B. y Lane C.E. (1970) *Comp. Biochem. Physiol.* 34:333-338
- Liang C.R. y Rosenberg H. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 125:548-562
- Linder R., Bernheimer A.W. y Kim K-S (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 467:290-300
- Lowry O.H., Rosebrough N.H., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193:265-275
- Luria S.E. y Darnell J.E.Jr. (1967) *General Virology*, pp.127-147, 2nd.edn., Wiley, N.Y.
- Macek P., Sencic L. y Lebez D. (1982) *Toxicon* 20:181-185
- Magee W.C., Gallai-Hatchard J., Sanders H. y Thompson R.H.S. (1962) *Biochem. J.* 83:17
- Maget-Dana R., Tamari M., Marmayuet J. y Douste-Blazy L. (1974) *Eur. J. Biochem.* 42:129-134
- Manuel R.L. (1981) en *British Anthozoa* (ed. Kermack D.M. y Barnes R.S.K.) 18:9,11,15,85 Academic Press, London
- Mariscal R.M. (1974) en *Coelenterate Biology, Reviews and New Perspectives* (ed. Muscatine L. y Lenhoff H.M.) pp.129 Academic Press, Inc.
- Martín E.J. (1960) *Pacif. Sci.* 14:403

Martínez G., Kopeyan C., Schweitz H. y Lazdunski M. (1977) FEBS Lett. 84:247-252

Mason W.T. (1972) Biochim. Biophys. Acta 280:538-544

Matsuura F. (1979) J. Biochem. 85:433

Mebs D., Liebrich M., Reul A. y Samejima Y. (1983) Toxicon 21:257

Meglitsch P.A. (1967) Invertebrate Zoology, NY, Oxford University Press

Michaels D.W. (1979) Biochim. Biophys. Acta 555:67-78

Murayama K., Abbott N.J., Narahashi T. y Shapiro B.I. (1972) Gen. Pharmacol. 3:391-400

Murdock G.R. (1978) Bulletin Marine Sci. 28(2):354-362

Nelson G.J. (1967) Biochim. Biophys. Acta 144:221-232

Neumann W. (1953) Ber. Phys. Med. Gesells. Wurtzburg 66:166

Neumann W.P. (1955) Naturwissenschaften 12:370

Neumann W. y Habermann E. (1954) Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 222:367

Neumann W. y Habermann E. (1956) en Venoms (ed. Buckley y Porges) Amer. Assoc. Adv. Sc. Washington

Norton T.R., Kashiwagi M. y Shibata S. (1978) en Drugs and Food from the Sea (ed. Kaul P.N. y Sinderman C.J.), pp 37-50, Univ. of Oklahoma Press, Norman, OK

Novak V., Sket D., Cankar G. y Lebez D. (1973) Toxicon 11:411

Nozawa Y. y Thompson G.A. (1979) en Biochemistry and Physiology of Protozoa (eds. Levandowsky, Hutner), Acad. Press, N.Y., Vol 2, pp. 275-338

Nozawa Y., Iida H. Fukushima H., Ohki K. y Ohnishi S. (1974) Biochim. Biophys. Acta 367:134-147

Nozawa Y., Kasai R. y Sekiya T. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 552:38-52

Pantin C.F.A. (1942a) *Nature (London)* 149:109

Pantin C.F.A. (1942b) *J. Exp. Biol.* 19:291-310

Pettit G.R., Day J.F., Hartwell J.L. y Wood H.B. (1970) *Nature* 227:962

Phillips J.H. (1956) *Nature, Lond.* 178:932

Phillips J.H. y Abbott D.P. (1957) *Biol. Bull.* 113:296-301

Pollero R.J. (1983) *Lipids* 18:12-17

Ponder E. (1948) en *Hemolysis and Related Phenomena*, pp.168, (ed. Grune y Stratton, N.Y.)

Quin L.D. (1964) *Science* 144:1133

Quin L.D. (1965) *Biochem.* 4:324-329

Quinn R.J., Kashiwagi M., Norton T.R., Shibata S., Kuchii M. y Moore R.E. (1974) *J. Pharm. Sci.* 63:1798-1800

Rathmayer W. y Béress L. (1976) *J. Comp. Physiol.* 109:373-382

Rhoads D.E. y Kaneshiro E.S. (1979) *J. Protozool.* 26:329-338

Richet C. (1903) *Soc. Biol., París* 55:246

Rimon A. y Schapiro B. (1959) *Biochem.* 71:620

Romey G., Abita J.P., Schweitz H., Wunderer G. y Lazdunsky M. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:4055-4059

Romey G., Renaud J.F., Fosset M. y Lazdunski M. (1980) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213:607-615

- Rosenberg H. (1973) en Form and Function of Phosphonolipids (eds, Ansell, Dawson, Hawthorne) BBA Library N.Y., pp.333-344
- Rosenthal A.F. y Pousada M. (1968) Biochim. Biophys. Acta 164:226-237
- Rosenthal A.F. y Ham S.C. (1970) Biochim. Biophys. Acta 218:213-220
- Rouser G., Kritchevsky G., Heller D. y Lieber E. (1963) J. Am. Oil Chem. Soc. 40:425-454
- Roy A.C. (1945) Nature 155:696
- Rudnev B.S., Likhatskaya G.N. y Kozlovskaya E.P., Monastyrnaya M.M. y Esyakov G.B. (1984) Biol. Membr. 1:1019
- Saunders L. (1957) J. Pharmacol. 9:834
- Shapiro B.I. (1968) Toxicol. 5:253-259
- Shapiro B.I. (1968B) Comp. Biochem. Physiol. 27:519-531
- Shapiro B.I. y Lilleheil G. (1969) Comp. Biochem. Physiol. 28:1225-1241
- Shibata S., Dunn D.F., Kuchii M., Kashiwagi M. y Norton T.R. (1974) J. Pharm. Sci. 63:1332
- Shimizu H., Kakimoto Y., Nakajima T., Kanazawa A. y Sano I. (1965) Nature 207:1197-1198
- Shin M.L., Michaels D.W. y Mayer M.M. (1979) Biochim. Biophys. Acta 555:79-89
- Shiomi K., Tanaka E., Yamanaka H. y Kikuchi T. (1985) Toxicol. 23:865-874
- Simon G. y Rouser G. (1966) Lipids 2:55-59
- Slotta K. (1953) Experientia 9:81
- Slotta K. (1955) Progress Chem. org. nat. prod. 12:406
- Small D.M. (1970) Fed. Proc. 29:1320-1326
- Smith J.D. (1982) en The Role of Phosphonates in Living Systems (ed.

- Hilderbrand) CRC Press, Inc., pp. 31-52
- Stephen J. y Pietrowsky R.A. (1981) en *Bacterial Toxins* (ed. American Society for Microbiology)
- Stillway L.W. y Harmon S.J. (1980) *J. Lipid Research* 21:1141-1143
- Sugita M., Fukunaga Y., Ohkawa K., Nozawa Y. y Hori T. (1979) *J. Biochem.* 86:281-288
- Tabrah F.L., Kashimagi M. y Norton T.R. (1972) *Int. J. Clin. Pharmacol., Ther. Toxicol.* 5:420-422
- Tamari M. (1971) *Agr. Biol. Chem.* 35:1799-1802
- Tamari M., Ogawa M., Hasegawa S. y Kametaka M. (1976) *Agr. Biol. Chem.* 40:2057-2062
- Tanaka M., Haniu M., Yasunobu K.T. y Norton T.R. (1977) *Biochemistry* 16:204-208
- Thompson G.A. (1967) *Biochem.* 6:2015-2022
- Thompson G.A. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 176:330
- Thomson M., Moritz R.L., Simpson R.J. y Norton R.S. (1987) *Biochem. Int.* 15:711
- Turk T., Macek P. y Gubensek F. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1119:1-4
- Turk T. y Macek P. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1119:5-10
- Turner J.C. (1957) *J. Exp. Med.* 105:198
- Turner J.C., Anderson H.M. y Gandall C.P. (1958) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 99:547
- van den Bosch H. (1982) *Phospholipases in Phospholipids* (ed. Hawthorne y Ansell). Chap.9, pp.313-357. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
- Van-Praët M. (1982b) *Comp. Biochem. Physiol.* 72A:523-528

- Varanda W. y Finkelstein A. (1980) *J. Membrane Biol* 55:203-211
- Vincent J.P., Balerna M., Barhanin J., Fosset M. y Lazdunski M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:1646-1650
- Viswanathan C.V. y Rosenberg H. (1973) *J. Lipid Res.* 14:327-330
- Warren W.A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 964:113-115
- Watanabe T., Fukushima H. y Nozawa Y. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 620:133-141
- Weber K. y Osborn M. (1969) *The Journal of Biological Chemistry* 44 (16):4406-4412
- Weinstein J.N., Yoshikami S., Henkart P., Blumenthal R. y Hagens W.A. (1977) *Science* 195:489-492
- Weissman G., Sessa G. y Bernheimer A.W. (1966) *Science* 154:772-774
- Welsh J.H. (1961) en *The Biology of Hydra and of some other Coelenterates* (ed. Lenhoff H.M. y Loonis W.F.) Coral Gables, Un. of Miami Press.
- Wunderer G., Fritz H., Wachter E. y Machleidt W. (1976A) *Eur. J. Biochem.* 68:193-198
- Wunderer G. y Aulitz M. (1978) *Eur. J. Biochem.* 89:11-17
- Yanagita T.M. (1959) *J. Exp. Biol.* 36:478-494
- Yost G.A. y O'Brien R.D. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 185:483-487
- Zamponi M.O. (1977) *Neotropica* 23(70):137-153
- Zamponi M.O. (1979) *Neotropica* 25(74):195-201
- Zamponi M.O. y Arca-Tellechea M. (1988) *Physis* 46 (111):73-85