

## Las anémonas marinas como fuente para la obtención de sustancias biológicamente activas.

### Sea anemones as a source of new biologically active substances.

Anoland G. Garateix Fleites, Armando A. Rodríguez Alfonso.

Centro de Bioproductos Marinos, AMA, CITMA. Loma y 37. Alturas del Vedado. E-mail:  
[cebimar@infomed.sld.cu](mailto:cebimar@infomed.sld.cu); [cebimar@ama.cu](mailto:cebimar@ama.cu)

#### RESUMEN:

Como miembros de los Cnidarios, las anémonas marinas comparten una característica distintiva de este filo, la presencia de nematocistos, estando en parte asociadas a estas estructuras su toxicidad. A partir de anémonas marinas han sido obtenidos diferentes péptidos capaces de unirse con especificidad y potencia a diversos tipos de canales iónicos, contribuyendo así al conocimiento de su estructura y función. Las denominadas "toxinas de sitio 3" han sido las más estudiadas y corresponden a un grupo de péptidos que se unen al canal de sodio dependiente de voltaje produciendo un enlentecimiento en el proceso de inactivación de esta corriente. Posteriormente, se reportaron otros compuestos capaces de bloquear los canales de potasio activados por voltaje en diferentes preparaciones. Recientemente se aisló una nueva clase de toxinas, representada por un único miembro hasta el momento, que se une a los canales sensibles a protones (ASICs). En Cuba, las investigaciones sobre compuestos obtenidos de anémonas marinas datan de la década de los 80. Las especies más estudiadas han sido *Stichodactyla helianthus*, *Bunodosoma granulifera*, *Condylactis gigantea*, *Phyllactis flosculifera* y *Epicystis crucifer*. A partir de ellas han sido aislados nuevos compuestos tales como dos moléculas formadoras de poros, fosfolipasas, toxinas bloqueadoras de canales de  $K^+$ , toxinas con efecto sobre canales de  $Na^+$  y otras neurotoxinas que ejercen otras acciones farmacológicas así como inhibidores de proteasas. Estos estudios han tributado a las investigaciones que se desarrollan en el País sobre Biodiversidad y específicamente han aportado nuevos elementos en el conocimiento de las potencialidades de uso de los organismos marinos. Tanto por sus características químicas como por sus efectos farmacológicos estos compuestos han tenido y presumiblemente tendrán una contribución importante como herramientas farmacológicas para el análisis de diversos procesos a nivel molecular, y muy posiblemente podrán devenir en moléculas promisorias para el desarrollo de nuevos fármacos de aplicación médica.

**PALABRAS CLAVES:** ANÉMONAS MARINAS, CANALES IÓNICOS, TOXINAS

#### Abstract

Sea anemones, as members of Cnidaria, share a very distinctive feature of this phylum, the presence of nematocysts, which are in part responsible for the toxicity of these marine organisms. Many different peptide toxins that specifically bind with high potency to a variety of ion channels have been obtained from sea anemones; thus contributing considerably to the knowledge of ion channels structure and function. The so called "site 3 toxins" have been the most extensively studied, comprising a structurally diverse group of sea anemone peptides that bind to voltage-gated sodium channels leading to a slowing down of the inactivation process. In subsequent years, several peptide toxins targeting voltage-gated potassium channels toxins from different sources have been also reported. More recently, a new class of sea anemone toxins was discovered, so far solely represented by one peptide capable of binding to acid-sensing ion channels (ASICs). In Cuba, the study of sea anemone toxins began in the 80's; and up to date the most extensively explored species have been *Stichodactyla helianthus*, *Bunodosoma granulifera*, *Condylactis gigantea*, *Phyllactis flosculifera* and *Epicystis crucifer*. Pore-forming toxins, phospholipases, protease inhibitors,  $K^+$  channels toxins,  $Na^+$  channels toxins as well as other neurotoxins, showing dissimilar pharmacological effects, have been isolated from these organisms. These studies have contributed to the developing studies of the Cuban biodiversity and also have brought new elements to the knowledge on the potential use of sea anemones. Given their chemical and pharmacological properties, these sea anemone peptides will continue being important pharmacological tools for the analysis of different processes at the molecular level, and presumably they will become promising compounds for the development of new drugs of medical application.

**Keywords:** SEA ANEMONES, ION CHANNELS, TOXINS

## INTRODUCCIÓN

De apariencia frágil y bellos colores las anémonas, son organismos de vida sésil que aportan gran colorido y diversidad al arrecife coralino y se encuentran distribuidas en diferentes ambientes marinos. Como representantes del phylum de los celenterados comparten la característica fundamental de este grupo taxonómico que consiste en la presencia de nematocistos u orgánulos urticantes. Cada nematocisto está encerrado en una célula llamada cnidocito y es una especie de cápsula ovoidea o en forma de puro, que contiene un filamento enrollado el que al ser tocado o estimulado químicamente se proyecta bruscamente atravesando o enredando a su posible presa o agresor e inoculando en éste sustancias tóxicas. Las cápsulas individuales no alcanzan más allá de un milímetro de longitud, pero las sustancias que contienen resultan muy potentes lo cual juega un papel muy importante en la captura y parálisis de las presas tales como crustáceos y pequeños peces. Puesto que las presas de las anémonas, a diferencia de éstas, tienen más movilidad y pueden desplazarse en diferentes direcciones debe existir una fuerte selección para las sustancias tóxicas de tal forma que sean capaces de causar una parálisis rápida en sus posibles víctimas (Figura 1)

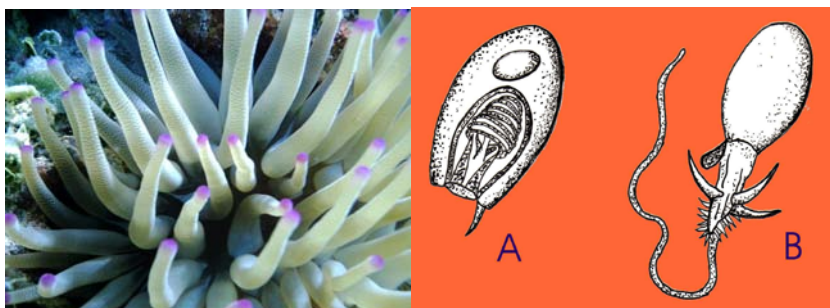


Figura 1-Anémona *Condylactis gigantea* (izquierda, Foto José R. Martínez). Nematocisto sin descargar (A) y descargado (B) a la derecha de la figura.

Figure 1-Left: The sea anemone **Condylactis gigantea** (Photograph José R. Martínez). Right: Nematocyst: undischarged (A) and discharged (B).

Estos animales han sido empleados en diferentes laboratorios de investigación como fuente para la obtención de sustancias biológicamente activas. En las anémonas los nematocistos usualmente están concentrados en los tentáculos pero también pueden encontrarse en todo el cuerpo así como en los filamentos gástricos. El cuerpo entero, tejidos ricos en nematocistos o nematocistos aislados se han utilizado como fuente de compuestos con actividades farmacológicas. Entre éstos se encuentran una gran diversidad de toxinas capaces de unirse a los canales iónicos de diferentes membranas excitables.

Los canales iónicos son proteínas de membrana que se insertan en las membranas biológicas con un poro en su centro que controla a manera de una "puerta específica" el paso (a favor del gradiente de concentración) de iones entre el interior y el exterior de la célula. Este mecanismo interviene en una amplia variedad de procesos fisiológicos, como la contracción muscular o la comunicación de señales entre las células nerviosas. El estudio de la estructura molecular y las propiedades funcionales de los canales iónicos así como el análisis de su participación en diversos procesos normales y patológicos ha permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos básicos de funcionamiento del sistema nervioso y cardiovascular. Además, se conoce en la actualidad que diferentes alteraciones funcionales de los canales iónicos están relacionadas con gran número de enfermedades. Es por todo ello que la búsqueda de nuevas sustancias de origen natural capaces de unirse a los canales iónicos resulta de gran interés.

A partir de las anémonas se han obtenido una gran diversidad de toxinas peptídicas capaces de combinarse con diferentes canales iónicos (canales de sodio y potasio activados por voltaje, entre otros) y producir una amplia variedad de efectos farmacológicos.

Las toxinas de anémonas con acción sobre canales de  $\text{Na}^+$  activados por voltaje fueron las primeras en describirse y han sido aisladas a partir de diferentes especies de anémonas. Se unen a un sitio específico situado en la cara externa del canal de sodio (el denominado sitio 3).

Estas toxinas son cardio y neurotóxicas, producen un enlentecimiento en el proceso de inactivación de este canal por lo cual entra más sodio a la célula y se prolonga la duración de los potenciales de acción o impulsos nerviosos. Debido a la especificidad y potencia de sus acciones sobre los canales de sodio en tejido muscular y nervioso constituyen instrumentos valiosos en la caracterización de estos canales por lo cual han sido empleadas como reactivos biológicos en diferentes laboratorios de investigación (Catterall 2000; El-Sherif, Fozzard and Hanck, 1992). Por otra parte, además de la posible aplicación biomédica de estos nuevos compuestos ellos pueden constituir modelos para el estudio de diversas patologías. Sus efectos son similares a los síntomas que se presentan en algunas enfermedades genéticas como la miotonía y parálisis periódica en el músculo esquelético y el síndrome de QT largo en el corazón (Benzinger, Tonkovich and Hanck, 1999).

Posteriormente, se reporta una nueva clase de toxinas capaces de bloquear los de canales de potasio activados por voltaje, las que fueron aisladas a partir de diferentes especies de anémonas (Aneiros, García, Martínez, Harvey, Anderson, Marshall, Engstrom, Hellman and Karlsson 1993; Castañeda, Sotolongo, Amor, Stockiln, Anderson, Harvey, Engstrom, Wernstedt and Karlsson. 1995; Schweitz, Bruhn, Guillermare, Moinier, Lancelin, Beress and Lazdunski 1995). Estos péptidos no guardan homología estructural con otras toxinas bloqueadoras de canales de potasio pero de origen terrestre. Se ha demostrado que algunas de estas toxinas de anémonas bloquean canales de potasio específicos (en particular los canales  $\text{K}(\text{Ca})$  y los  $\text{Kv}1.3$ ) que se expresan en gran número en los linfocitos T humanos por lo que la inhibición de estos canales puede ser de utilidad terapéutica por suprimir la proliferación de los linfocitos T (Alessandri-Haber, Lecoq, Gasparini, Grangier-Macmath, Jacquet, Harvey, de Medeiros, Rowan, Gola, Ménez, and Crest. 1999; Kalman, Pennington, Lanigan, Nguyen, Rauer, Mahnir, Paschetto, Kem, Grissmer, Christina, Cahalan, Norton and Chandy. 1998). El estudio de estos péptidos se encuentra en desarrollo como agentes inmunosupresores potenciales. Estas sustancias actúan como bloqueadoras de los canales de  $\text{K}^+$  uniéndose a un sitio receptor localizado en la cara extracelular del canal e impidiendo el paso de iones. Además, debido a su mecanismo de acción y a su especificidad estas toxinas han contribuido también a definir las propiedades biofísicas y el papel funcional de diversos subtipos de canales iónicos en diferentes tejidos (Kem, Pennington and Norton 1999).

A partir de estos organismos, en fecha más reciente, se han aislado nuevos compuestos capaces de ejercer otras acciones farmacológicas de interés. Dentro de éstos se destaca un péptido aislado de la anémona *Anthopleura elegantissima* con efecto sobre canales activados por protones (ASICs) (Diochot, Baron, Rash, Deval, Escoubas, Scarzello, Salinas and Lasdunski. 2004). El estudio de estos canales resulta de gran importancia debido a su participación en diversos procesos como: mecanismos de dolor, memoria y aprendizaje, isquemia cerebral así como en diversas enfermedades neurodegenerativas

En Cuba, las investigaciones con compuestos obtenidos de anémonas marinas datan de la década de los 80 (Álvarez, Garateix, Tejuca, Aneiros, Pazos and Lanio. 2003; Nuñez, Garateix, Laguna, Fernández, Ortiz, Llanio, Valdés, Rodríguez, Menéndez 2006). Las especies de anémonas más estudiadas han sido *Stichodactyla helianthus* (Castañeda et al., 1995; Gómez, Romero, Wong, Barral, Martínez and Chávez 1986; Lanio, Moreira, Alvarez, Tejuca, Gomez, Pazos, Besada, Martínez, Huerta, Padron and Chavez. 2001), *Bunodosoma granulifera* (Aneiros et al., 1993; Aneiros, Karlsson, Béress, Garateix, Alvarez, Soto and Salinas.1998; Salinas, Cebada, Valdés, Garateix, Aneiros, and Álvarez 1997; Garateix, Vega, Salceda, Cebada, Aneiros and Soto. 2000; Garateix, Salceda, López, Salazar, Aneiros, Zaharenko, de Freitas and Soto 2006; Loret, Menéndez, Mansuelle, Sampieri and Rochat. 1994) *Condylactis gigantea* (Garateix, Hernández, Más, Romero and Chávez 1990; Garateix, Castellanos, Hernández, Más, Romero, and Chávez. 1992; Romero 1997; Ständker, Béress, Garateix, Christ, Ravens, Salceda, Soto, John, Forssmann, Aneiros 2006; Salceda, Pérez-Castells, López-Méndez, Garateix, Salazar, López, Aneiros, Standker, Béress, Forssmann, Soto, Jiménez-Barbero, Giménez-Gallego 2007, *Phyllactis flosculifera* (Garateix, Flores, Garcia-Andrade, Palmero, Aneiros, Vega and Soto. 1996; Aneiros et al., 1998) y *Epicystis crucifer*. A

partir de ellas han sido aislados nuevos compuestos tales como dos moléculas formadoras de poros (Lanio et al., 2001), fosfolipasas (Pazos, Gómez, Tejuca, Alvarez and Lanio. 1993; Garateix et al.,1990), toxinas bloqueadoras de canales de  $K^+$  (Castañeda et al., 1995, Garateix et al.,2000), toxinas con efecto sobre canales de  $Na^+$  (Salceda et al., 2002, 2007) y otras neurotoxinas capaces de ejercer disímiles efectos farmacológicos (Garateix et al., 1992, 1996) así como inhibidores de proteasas (Antuch, Berndt, Chavez, Delfin and Wuthrich. 1993; Delfin, Gonzalez, Diaz, and Chavez. 1994). Estos estudios han tributado a las investigaciones que se desarrollan en el País sobre Biodiversidad y específicamente han aportado nuevos elementos en el conocimiento de las potencialidades de uso de los organismos marinos. Por otra parte, algunos de los compuestos obtenidos además de la especificidad y potencia de sus acciones sobre diversas "dianas" farmacológicas presentan una gran novedad estructural, lo cual les confiere un interés adicional.

Por todo lo anteriormente expuesto, las toxinas de anémonas han tenido y presumiblemente tendrán una contribución importante como instrumentos o herramientas farmacológicas para el análisis molecular de los procesos que subyacen en el funcionamiento del Sistema Nervioso y cardiovascular y muy posiblemente podrán devenir en moléculas promisorias para el desarrollo de nuevos fármacos de aplicación médica.

### BIBLIOGRAFIA

- Alessandri-Haber, N., Lecoq, A., Gasparini, S., Grangier-Macmath, G., Jacquet, G., Harvey, A. L., de Medeiros, C., Rowan, E. G., Gola, M., Ménez, A., and M. Crest. 1999. Mapping the functional anatomy of BgK on Kv1.1, Kv1.2 and Kv1.3. *J. Biol. Chem.* 274:35653-61.
- Alvarez C., A. Garateix, M. Tejuca, A. Aneiros, I. F. Pazos and M. E. Lanio. 2003. Overview of Marine Toxin Research in Cuba Comments on Toxinology. Vol. 9: 117-119.
- Aneiros, A., Garcia, I., Martinez, J. R., Harvey, A. L., Anderson, A. J., Marshall, D. L., Engstrom, A., Hellman, U., and E. Karlsson. 1993. A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochim. Biophys. Acta* 71157:86-92.
- Aneiros A., E. Karlsson, L. Beress, A. Garateix, J. Alvarez, E. Soto and E. Salinas.1998. Isolation of toxins from the Caribbean sea anemones *Bunodosoma granulifera* and *Phyllactis flosculifera*. *Toxicon* 36, 1276..
- Antuch, W., Berndt, K. D., Chavez, M. A., Delfin, J., and K. Wuthrich. 1993. The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Eur. J. Biochem.* 15; 212:675-84.
- Benzinger R., Tonkovich GS and Hanck DA 1999. Augmentation of recovery from inactivation by site 3-Na channel toxins. A single channel and whole cell study of persistent currents . *J. Gen Physiol.* 113, 336-346.
- Bosman, F., Aneiros, A., and J., Tytgat (2002). The sea anemone *Bunodosoma granulifera* contains surprisingly efficacious and potent insect-selective toxins. *FEBS Letter.* 532: 131-134.
- Castañeda, O., Sotolongo, V., Amor, A. M., Stockiln, R., Anderson, A. J., Harvey, A. L., Engstrom, A., Wernstedt, C., and E. Karlsson. 1995. Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon.* 33:603-613.
- Catterall, W. A. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage gated sodium channels. *Neuron.* 26:13-25.
- Delfin, J., Gonzalez, Y., Diaz, J., and M. Chavez. 1994. Proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*: purification, characterization and immobilization. *Arch. Med. Res.* 25:199-204.
- Diochot S. , A. Baron, L.D.Rash. E. Deval., P. Escoubas, S. Scarzello, M. Salinas and M. Lasdunski. 2004A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *The EMBO Journal* 23, 1516-1525.
- El-Sherif N, Fozzard HA.and Hanck DA 1992, Dose-dependent modulation of the cardiac sodium channel by sea anemone toxin ATXII. *Circ. Res.* 70, 285-301.

- Garateix, A., Hernández, J. L., Más, R., Romero, L., and M. Chávez. 1990. Effects of intra and extracellularly applied *Condylactis gigantea* phospholipase A on ionic currents of isolated molluscan neurons. *Comp. Biochem. Physiol.* 97:481-486.
- Garateix, A., Castellanos, M., Hernández, J., Más, R., Romero, L., and M. Chávez. 1992. Effects of a high molecular weight toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* on cholinergic responses. *Comp. Biochem. Physiol.* 103:403-409.
- Garateix, A., Flores, A., Garcia-Andrade, J. M., Palmero, A., Aneiros, A., Vega, R., and E. Soto. 1996. Antagonism of glutamate receptors by a chromatographic fraction from the exudate of the sea anemone *Phyllactis flosculifera*. *Toxicon.* 34:443-50.
- Garateix, A., Vega, R., Salceda, E., Cebada, J., Aneiros, A., and E. Soto. 2000. BgK anemone toxin inhibits outward K<sup>+</sup> currents in snail neurons. *Brain Res.* 864:312-314.
- Garateix A., E. Salceda, O. López, H. Salazar, A. Aneiros, A. J. Zaharenko, J. C de Freitas and E. Soto 2006. Pharmacological characterization of *Bunodosoma* toxins on mammalian voltage dependent sodium channels. *Pharmacology on line* 3: 507-513.
- Gomez, T., Romero, D. L., Wong, L., Barral, A. M., Martínez, J. R., and M.A. Chávez. 1986. Isolation and partial purification of two toxins and a protease inhibitor from *Stoichactis helianthus* anemone. *Rev. Cubana Invest. Biom.* 5:117-125. (In Spanish)
- Goudet, C., Ferrer, T., Glan, L., Artilles, A., Batista, C. F. V., Possani, L. D., Alvarez, J., Aneiros, A., and J. Tytgat. 2001. Characterization of two *Bunodosoma granulifera* toxins active on cardiac sodium channels. *Br. J. Pharmac.* 134:1195-1206.
- Kalman, K., Pennington, M. W., Lanigan, M. D., Nguyen, A., Rauer, H., Mahnir, V., Paschetto, K., Kem, W. R., Grissmer, G. A., Christina, E. P., Cahalan, M. D., Norton, R. S., and K. G. Chandy. 1998. ShK-Dap<sup>22</sup> a potent Kv1.3-specific Immunosuppressive Polypeptide. *J. Biol. Chem.* 273:32697-07.
- Kem, W. R., Pennington, M. W., and R. Norton. 1999. Sea anemone toxins as templates for the design of immunosuppressant drugs. *Perspectives in Drug Discovery and Design.* 15/16:111-129.
- Lanio, M. E., Moreira, V., Alvarez, C., Tejuca, M., Gomez, T., Pazos, F., Besada, V., Martinez, D., Huerta, V., Padron, G., and M. A. Chavez. 2001. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon.* 39:187-194.
- Loret, E. P., Menéndez-Soto del Valle, R., Mansuelle, P., Sampieri, P., and H. Rochat. 1994. Positively charged amino acid residues located similarly in sea anemone and scorpion toxins. *J. Biol. Chem.* 269:16785-16788
- Núñez R., Garateix A., Laguna A., Fernández M.D., Ortiz E., Llanio M., Valdés O., Rodríguez A., Menéndez R 2006. Caribbean marine biodiversity as a source of new compounds of biomedical interest and others industrial applications. *Pharmacology on line* 3: 111-119.
- Pazos, F., Gómez, T., Tejuca, M., Alvarez, C., and M. E. Lanio. 1993. Enzymatic characteristics of a fraction with phospholipase activity isolated from the anemone *Stichodactyla helianthus*. *Rev. Biologia* 7: 115-123.
- Romero, L. 1997. Isolation and purification of toxins from the sea anemone *Condylactis gigantea*. Master in Science Thesis. Biochemistry Department, University of Havana, Cuba. (in Spanish).
- Salceda, E., Garateix, A., and E. Soto. 2002. The sea anemone toxins BgII and BgIII prolongs the inactivation time course of the tetrodotoxin-sensitive sodium current in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303:1067-74.
- Salceda E., Pérez-Castells J., López-Méndez B., Garateix A., Salazar H., López O., Aneiros A., Standker L., Béress L., Forssmann W.G., Soto E., Jimenez-Barbero J., Giménez-Gallego G. (2007)-CgNa, a type I toxin from the giant Caribbean sea anemone *Condylactis gigantea* shows structural similarities to both type I and type II toxins, as well as distinctive structural and functional properties. *Biochem. J.* 406, 67-76.

Salinas, E. M., Cebada, J., Valdes, A., Garateix, A., Aneiros, A., and J. L. Alvarez. 1997. Effects of a toxin from the mucus of the Caribbean sea anemone (*Bunodosoma granulifera*) on the ionic currents of single ventricular mammalian cardiomyocytes. *Toxicon*. 35:1699-709.

Schweitz H., Bruhn, Guillerma E., Moinier D., Lancelin JM, Beress L. and Lazdunski M 1995. Kalicludines and kaliseptine. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 25121-25126.

Ständker, L., L. Bèrès, A. Garateix, T.Christ, U. Ravens, E. Salceda, E. Soto, H. John, W. G. Forssmann, A. Aneiros 2006. A new toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation. *Toxicon* 48: 211-220.