



Revista Peruana de Biología

ISSN: 1561-0837

revistaperuana.biologia@unmsm.edu.pe

Universidad Nacional Mayor de San

Marcos

Perú

Cuya, Antony; Escobar, Enrique

Estudio bioquímico del veneno de la anémona de mar *Phymactis papillosa* (Actiniidae)

Revista Peruana de Biología, vol. 24, núm. 3, octubre, 2017, pp. 303-309

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Lima, Perú

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195053390010>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

## TRABAJOS ORIGINALES

### Estudio bioquímico del veneno de la anémona de mar *Phymactis papillosa* (Actiniidae)

#### Biochemical study of venom sea anemone *Phymactis papillosa* (Actiniidae)

Antony Cuya y Enrique Escobar\*

Laboratorio de Bioquímica de Toxinas Naturales. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

\*Autor para correspondencia

Email Enrique Escobar: [eescobarg@unmsm.edu.pe](mailto:eescobarg@unmsm.edu.pe)

Email Antony Cuya: [antony.cuya@unmsm.edu.pe](mailto:antony.cuya@unmsm.edu.pe)

#### Resumen

En este trabajo se ha estudiado bioquímicamente el veneno de *Phymactis papillosa*, colectadas en la bahía de Ancón. El veneno fue obtenido mediante shock hipotónico y luego se liofilizó. El análisis electroforético del veneno soluble mostró la presencia de 5 bandas proteicas con pesos moleculares entre 5 y 25.1 kDa.

El veneno soluble fue fraccionado por cromatografía de filtración en una columna de Sephadex G-50, obteniéndose cuatro picos de proteína (I, II, III y IV). Tanto en el veneno soluble como en las fracciones colectadas se midió actividad de proteasa, fosfolipasa, hialuronidasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina; así como, actividad hemolítica y neurotóxica. Se encontró actividad proteolítica sobre caseína, en el veneno soluble y en los picos I y III. No se detectó actividad de fosfolipasa, hialuronidasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina. La actividad hemolítica, ensayada sobre eritrocitos humanos, se encontró en el veneno soluble y en el pico II. Finalmente, tanto el veneno soluble como el pico III mostraron ser neurotóxicos al ser inyectados en ratones albinos vía intraperitoneal. Se concluye que el veneno soluble de *P. papillosa* tiene actividad proteolítica, hemolítica y neurotóxica.

**Palabras clave:** veneno; anémona de mar; toxinas; neurotoxinas.

#### Abstract

In this work, the poison of *Phymactis papillosa* collected in Ancón bay has been studied biochemically. The venom was obtained by hypotonic shock and then lyophilized. Electrophoretic analysis of the soluble poison showed the presence of 5 protein bands with molecular weights between 5 and 25.1 kDa. The soluble venom was fractionated by filtration chromatography on a Sephadex G-50 column, yielding four protein peaks (I, II, III and IV). In the soluble venom and collected fractions was measured protease activity, phospholipase, hyaluronidase, acid phosphatase and alkaline phosphatase; as well as hemolytic and neurotoxic activity. Proteolytic activity on casein was found in the soluble venom and peaks I and III. Was not detected phospholipase activity, hyaluronidase, acid phosphatase and alkaline phosphatase. Hemolytic activity on human red cells tested, was found in the soluble venom and peak II. Finally, the soluble venom as the peak III showed be neurotoxic when injected into white mice intraperitoneally. It is concluded that the soluble venom of *P. papillosa* has proteolytic, hemolytic and neurotoxic activity.

**Keywords:** poison; sea anemone; toxins; neurotoxins.

#### Citación:

Cuya A. & E. Escobar. 2017. Estudio bioquímico del veneno de la anémona de mar *Phymactis papillosa* (Actiniidae). Revista peruana de biología 24(3): 303 - 310 (octubre 2017). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i3.13901>

**Presentado:** 21/12/2016  
**Aceptado:** 13/06/2017  
**Publicado online:** 28/10/2017

#### Información sobre los autores:

AC, EE: realizaron el diseño experimental, los experimentos, analizaron los datos, redactaron y aprobaron el manuscrito.  
Los autores no incurren en conflictos de intereses.

**Journal home page:** <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/index>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Peruana de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citadas. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con [editor.revperubiol@gmail.com](mailto:editor.revperubiol@gmail.com).

## Introducción

El estudio bioquímico de los venenos de anémonas de mar ha mostrado que contienen, principalmente, componentes proteicos que funcionan como enzimas, hemolisinas, neurotoxinas o inhibidores de proteasa (Frazao et al. 2012). Entre las enzimas de estos venenos, se han encontrado enzimas proteolíticas y lipolíticas. Así por ejemplo, en el veneno de *Anthothoe chilensis* se han reportado fracciones proteicas con actividad proteolítica y actividad de fosfolipasa (Retuerto et al. 2007, Landucci et al. 2012), y del veneno de *Aiptasia pallida* se ha purificado y caracterizado una fosfolipasa (Grottel et al. 2009).

En relación a las hemolisinas, las actinoporinas, éstas se caracterizan por ser proteínas de aproximadamente 1 nm de radio en las membranas celulares, lo cual provoca que la célula pierda su integridad y muera (Carrion et al. 2009). En las membranas celulares, las actinoporinas forman poros específicos que destruyen las membranas de células cancerosas y pueden destruir las células de

Otro de los componentes característicos de los venenos de anémonas de mar lo constituyen los péptidos que afectan el funcionamiento de sodio y de potasio de las membranas y células musculares, y cuyo bloqueo de la actividad central (Jouiaei et al. 2015). Estos péptidos, pueden ser utilizados en estudios de estructura y función de canales iónicos.

En el Perú solamente *Anthothoe chilensis* ha sido estudiado parcialmente (Retuerto et al. 2012, Quiroz 2005), y no se tiene información de venenos en otras especies. En este trabajo se informa de las características de *Phymactis papillosa* (Lesson, 1830).

## Material y métodos

**Anémonas de mar.-** Siete ejemplares de *Phymactis papillosa* (Lesson, 1830) var. *viridis* (Haussermann 2004) fueron colectados en la orilla rocosa de la playa Lima, Perú. Los ejemplares fueron colocados en frascos de vidrio con agua de mar y trasladados al laboratorio.

**Ratones blancos.-** Se utilizaron ejemplares de *Mus musculus* de 20 a 22 g de peso, que fueron cedidos por el Departamento de Medicina Tropical de la Universidad San Marcos, el mismo día de los ensayos. Los ratones se procedió a su manejo y cuidado con la guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón, del Instituto Nacional de Salud de Lima (Fuentes et al. 2008); y la ley de animales domésticos y a los animales en cautiverio (Ley 27265).

**Extracción del veneno.-** El veneno se obtuvo por shock hipotónico, para lo cual se colocaron los ejemplares en un beaker con 30 mL de agua destilada (Fig. 1). Luego el material fue filtrado en papel Whatman y posteriormente centrifugado a 12 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue liofilizado.

**Preparación del veneno.-** El veneno liofilizado se disolvió en 1 mL de buffer acetato de sodio 0.05 M pH 7 y los

restos insolubles fueron separados por centrifugación a 12 000 rpm durante 20 minutos.

**Cuantificación de proteínas.-** Para estimar la cantidad de proteína en el veneno soluble y en las fracciones de la separación cromatográfica, se midió la absorbancia ultravioleta a 280 nm (Warburg & Christian 1941).

**Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).-** El perfil electroforético del veneno de *Phymactis papillosa* se determinó en condiciones de reducción en gel, como se describe en el protocolo de Schagger & von Jagow (1987), utilizando como proteínas estándares un kit de proteínas estándares de BioRad (BioRad 150-0150). Las proteínas fueron separadas en un gel de 4-20% (BioRad 456-1010) en un buffer de running de Tris/Glycine (BioRad 161-0150). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad 450-1010) y detectadas con un sustrato de diaminodipiridina (BioRad 161-0150). Las proteínas fueron detectadas con un sustrato de diaminodipiridina (BioRad 161-0150).

**Separación de las proteínas del veneno por cromatografía de filtración.-** Los componentes del veneno fueron separados por cromatografía de filtración molecular en un gel de filtración de 6% (BioRad 450-1010) en un buffer de running de Tris/Glycine (BioRad 161-0150). Las proteínas fueron separadas en un gel de 4-20% (BioRad 456-1010) en un buffer de running de Tris/Glycine (BioRad 161-0150). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad 450-1010) y detectadas con un sustrato de diaminodipiridina (BioRad 161-0150).



**Figura 1.** Extracción del veneno de *Phymactis papillosa* var. *rubra-viridis* por shock hipotónico. Siete ejemplares de *P. papillosa* fueron colocados en 30 mL de agua destilada durante 1 hora. Este cambio osmótico produce la liberación del veneno de los nematocitos. 0.05 M pH 7 y los

**Actividad proteolítica sobre caseína.-** La actividad proteolítica en el veneno soluble y las fracciones se evaluó sobre caseína mezclando 5  $\mu$ L de caseína al 20 mg/mL en un buffer Tris 0.05 M pH 8, y 20  $\mu$ L del veneno o fracciones colectadas. Luego de incubación a 37 °C durante 30 minutos, la hidrólisis de la caseína fue evaluada por el método de Lowry (1970).

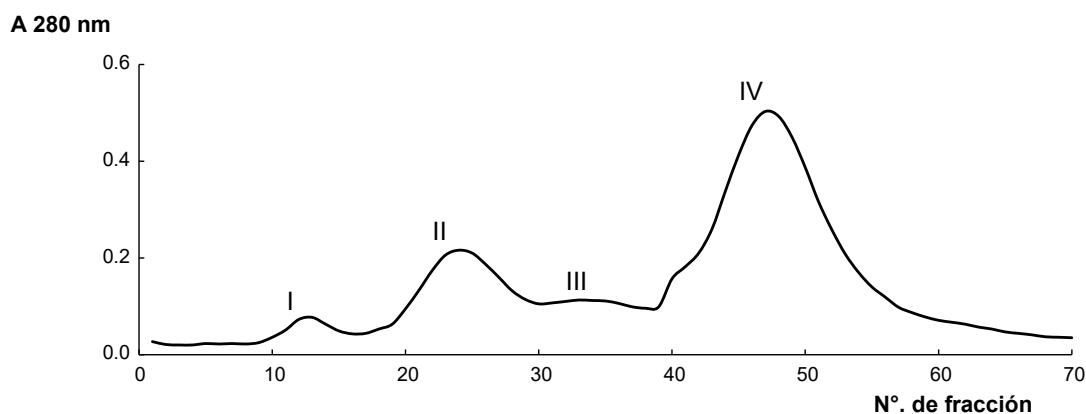
**Actividad proteolítica sobre fibrinógeno.-** Solo en el veneno soluble se ensayó la actividad proteolítica sobre fibrinógeno. La mezcla de reacción contenía 5  $\mu$ L de fibrinógeno al 20 mg/mL en un buffer Tris 0.05 M pH 7.5 y 20  $\mu$ L de veneno o fracciones colectadas. Luego de incubación a 37 °C durante 30 minutos, la actividad proteolítica se determinó por el método de Dittmer (1956).

**Extracción del veneno.-** La extracción de veneno se realizó por el método de Warburg (1949). Se tomó 100 mg de *Phymactis papillosa* e hincó en un buffer Tris 0.05 M pH 7.5 y 20  $\mu$ L de veneno o fracciones colectadas. Luego de incubación a 37 °C durante 30 minutos, la actividad proteolítica se determinó por el método de Dittmer (1956).

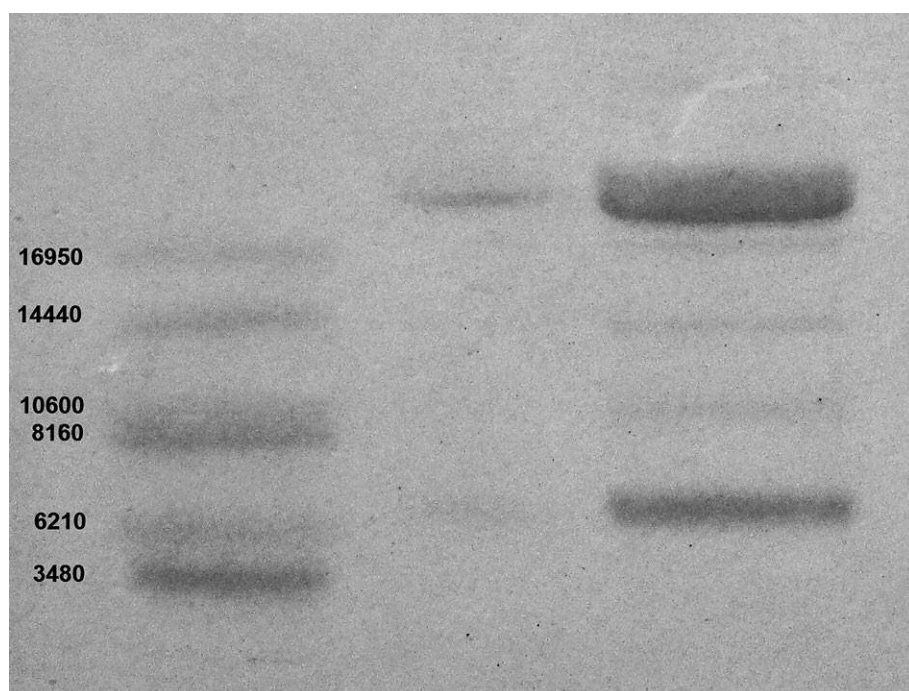
**Actividad de fosfatasa.-** La mezcla de reacción contenía 0.5 mL de p-nitro fenil fosfato 20 mM, 0.275 mL de buffer acetato de sodio 0.01 M pH 4.8 (para detectar fosfatasa ácida) o 0.275 mL de buffer Tris 0.05 M pH 8 (para detectar fosfatasa alcalina). Se incubó a 37 °C durante 30 minutos y la reacción fue detenida con NaOH 0.2 M, para luego leer a 410 nm.

**Actividad de hialuronidasa.-** Fue determinada por el método de Di Ferrante (1956). La mezcla de reacción contenía 0.1 mL de ácido hialurónico 0.5 mg/mL en un buffer acetato de sodio 0.01 M pH 5, y 20  $\mu$ L de veneno o fracciones colectadas. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos y la reacción fue detenida con 1.4 mL de ácido tris(hidroximetil)ammonio 2.5%, para luego leer a 410 nm.

**Actividad de fosfolipasa.-** La actividad de fosfolipasa se evaluó por el método de Marinetti (1965). La mezcla de reacción contenía 1 mL de una emulsión de lípidos en un buffer Tris 0.05 M pH 8 (A 920 = 0.8) y 100  $\mu$ L de veneno o fracciones colectadas. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos y la reacción fue detenida con 1.4 mL de ácido tris(hidroximetil)ammonio 2.5%, para luego leer a 410 nm.



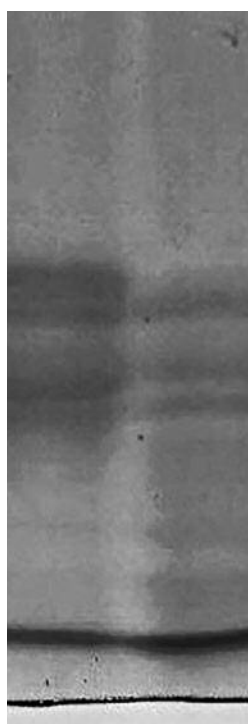
**Figura 2.** Perfil cromatográfico del veneno soluble de *Phymactis papillosa* var. *rubra-viridis*. Se empleó una columna de Sephadex G-50 a pH 7 obteniéndose cuatro picos de proteína (I, II, III y IV). Se colectaron 70 fracciones de 1 mL con las cuales se ensayaron diferentes actividades.



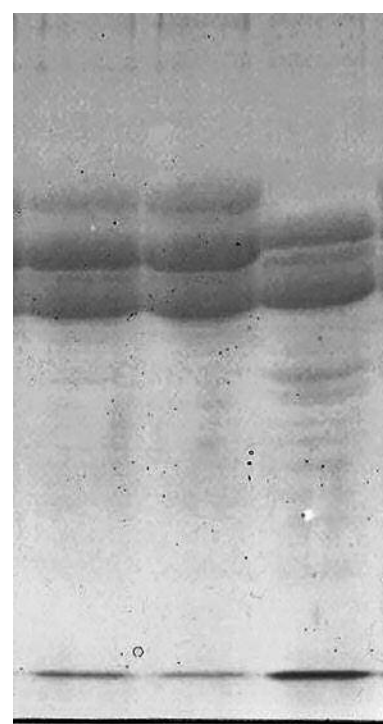
**Figura 3.** PAGE-SDS del veneno soluble de *P. papillosa* var. *rubra-viridis* según el método de Shagger & Von Jagow. En el primer carril se observan las bandas correspondientes a los estándares proteicos utilizados, indicándose el peso molecular de cada uno; en el segundo y tercer carril se tiene el perfil electroforético del veneno soluble con 100 y 670 µg de veneno total, respectivamente.



**Figura 4.** Actividad proteolítica sobre caseína, del veneno soluble de *Phymactis papillosa* var. *rubra-viridis*. El patrón electroforético característico de la caseína (carril 1), fue modificado drásticamente luego de ser tratada con el veneno (carril 2).



**Figura 5.** Actividad proteolítica sobre caseína de las fracciones cromatográficas. En el primer carril se muestra el control de caseína, mientras que en el segundo carril se observa un patrón representativo de la hidrólisis parcial de la caseína que se evidenció solo por acción de las fracciones 12, 13 o 33.



**Figura 6.** Actividad proteolítica del veneno soluble de *Phymactis papillosa* var. *rubra-viridis* sobre fibrinógeno. En el carril del centro se tiene el control de fibrinógeno, mientras que en el carril de la derecha se tiene el fibrinógeno tratado con el veneno soluble; en el primer carril se tiene el fibrinógeno tratado con el veneno preincubado con EDTA.

tercer pico solo hidrolizaron parcialmente, a diferencia de los otros dos picos, que se observa en las Figuras 5.

**Actividad proteolítica sobre fibrinógeno.-** Adicionalmente se detectó que el veneno soluble también tiene actividad proteolítica sobre fibrinógeno, sin embargo, no se pudo utilizar y, sin afectar la actividad del veneno sobre fibrinógeno. Estos resultados

**Actividad de fosfolipasa, hialuronidasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina.-** No se encontraron estas actividades en el veneno soluble de *Papillosa*.

**Actividad hemolítica.-** La actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos se detectó tanto en las fracciones colectadas correspondientes a los picos I y II, lo que determinó que 1.88 µg del veneno son suficientes para causar hemólisis en 10 minutos. En las fracciones colectadas correspondientes al pico II, los resultados mostraron que la actividad hemolítica; uno de ellos, en la caída del mismo. Separadamente, la primera hemolisina causa 96% de hemólisis en 10 minutos.

**Toxicidad sobre *Mus musculus*.** Tanto el veneno (75.4 µg de proteína) como las fracciones del pico I (11 µg de proteína en promedio), mostraron los síntomas que correspondieron a espasmos en las patas, salivación, convulsión y, después, la muerte del animal. Tanto el veneno como las fracciones del pico I (11 µg de proteína en promedio), mostraron los síntomas que correspondieron a espasmos en las patas, salivación, convulsión y, después, la muerte del animal. Tanto el veneno como las fracciones del pico I (11 µg de proteína en promedio), mostraron los síntomas que correspondieron a espasmos en las patas, salivación, convulsión y, después, la muerte del animal.

## Discusión

**Extracción del veneno y cuantificación de proteínas.-** Existen hasta cuatro formas de obtener el veneno de los nematocistos de las anémone de mar, sin que existan estudios que indiquen cuál de los métodos es el mejor (Frazar et al. 2012). Una forma consiste en utilizar todo el cuerpo del animal, mientras que en una segunda opción se trabaja solo con los tentáculos (Hu et al. 2011) porque éstos concentran la mayor cantidad de nematocistos. Sin embargo, en cualquier caso, se genera mucho material contaminante de los nematocistos. Las otras dos formas de obtener el veneno de los nematocistos, consiste en tratarlos con corriente eléctrica (estimulación eléctrica) o con choque hipotónico (shock hipotónico) lo que genera un material más limpio (Malpezzi et al. 1993).

Para este estudio, previamente se seleccionó el veneno por estimulación eléctrica y no mostrados), y se seleccionó el veneno por estimulación eléctrica y no mostrados), y se seleccionó el veneno por estimulación eléctrica y no mostrados).

Nuestros resultados han mostrado de Warburg & Christian, los 67 mg de veneno obtenidos de 7 ejemplares de *Papillosa* corresponden a 9.47 mg de proteína. En algunos trabajos se utilizó el shock hipotónico para encontrar que cada ejemplar expone una cantidad de veneno de 20 a 30

Tal como se describió en *P. papillipes*, el veneno de *A. chilensis* denominada banda por hidrolizó completamente a la caseína, mientras que la banda por fracciónamiento cromatográfico la actividad proteolítica se detectó en los resultados puros I y III; sin embargo, en estos casos se observó que la caseína sólo fue hidrolizada parcialmente. Estos resultados indicarían que el veneno total posee al menos dos proteasas y que, cada una de ellas hidroliza parcialmente a la caseína, pero cuando están juntas, en el veneno total, producen su completa hidrólisis. Solo en el veneno de la *Amorpha chilensis* se ha reportado actividad proteolítica, la cual fue determinada utilizando también caseína (Retuerto et al. 2007), no existiendo otros reportes de proteasas en anémonas de mar. Por otro lado, Morroa et al. (2013) han identificado por espectrometría de masas y secuenciación de proteínas tripsinizada a *Nematostella venensis* detectado 2 neurotoxinas denominadas dominios de metalopeptidasa similares a la caseína en ratones albinos.

Adicionalmente se ensayó la actividad proteolítica del veneno total sobre fibrinógeno. Como es conocido el fibrinógeno es una proteína plasmática formada por 6 cadenas polipeptídicas (2  $\alpha$ , 2  $\beta$  y 2  $\gamma$ ), que participa en la etapa final de la coagulación sanguínea y que muchas veces es el blanco de acción de ciertas enzimas proteolíticas. Nuestros resultados mostraron que el veneno de *P. papillosa* hidrolizó completamente las cadenas  $\beta$  del fibrinógeno, pero no la cadena  $\alpha$ . Las proteasas con acción sobre fibrinógeno también denominadas fibrinogenasas o enzimas fibrinogénolíticas han sido reportadas

## Literatura citada

das ampliamente en venenos de Anemonas de mar, por lo que este hallazgo es un nuevo reporte de ese tipo. La actividad proteolítica que tienen algunos venenos sobre el fibrinógeno, se ha asociado con la presencia de un anticoagulante que tiene ese veneno (Brazón et al., 2014). Por otro lado en este estudio también E.DTA, un quelante de iones metálicos y Mg<sup>++</sup>, inhibe completamente la actividad del veno de *Anapipillaea* lo que indicaría que esta enzima es una metaloproteasa.

Araújo J. Y. Alarcos, L. Pedreira, C. R. Ros, M. P. Lario, A. Valle & C. (Swenson & Markland 2005, Brazón et al., 2014). Isolation and partial purification of a hemolytic sphingomyelin-inhibitable fraction from the sea anemone *Anthopleura nigrescens*. Biotechnologia aplicada. 31 (1): 53-56.  
Bernheimer A. & L. Avigad. 1981. New cytotoxins in sea anemones from the west coast of the United States. Toxicon. 19(4):529-534. DOI http://doi.org/10.1016/0041-0101(81)90011-8  
Brazón J. B., Gutiérrez G. D' Souza, C. Sevil & C. Arechaga. 2014. Fibrin(ogen)olytic enzymes in scorpion (Tityus discrepans) venom. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 163: 62-69. DOI http://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.11.007  
Bruhn T., C. Schaller, C. Schulze, J. Sanchez-Rodriguez, C. Dannmeier,

**Actividad hemolítica.**- Las hemolisinas son toxinas que forman poros en la membrana celular de la célula. A aquellas que pertenecen se denominan actinoporinas y se caracterizan por tener pesos moleculares alrededor de 20 kDa, actúan sobre las membranas ricas en esfingomielina y forman poros de pequeño diámetro (Frazao et al. 2012).

En este estudio se ha detectado que *E. papillosa* del Delfín I., J. Martínez, W. Antuch, V. Morera, Y. González, R. Rodríguez, M. Marqu岸ez, A. Saroyan, N. Larioanova, J. Díaz, G. Padron & M. Chavez. 1996. Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from Stichodactyla helianthus. Toxicon. 34 (11/12):1367-1376. DOI [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00114-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00114-6)

Di Ferrante N. 1956. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. Journal of Biological Chemistry. 220: 303-306

de Máz de una hemolinfina de *Actinia equina* se le atribuye a Frezza B., V. Vasconcelos & A. Antunes. 2012. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview. Marine Drugs. 10: 412-431. DOI: <https://doi.org/10.3390/md10020412>

detectado tres hemolisinas (Macek & Leber 1980, DOI: <https://doi.org/10.3390/md10020412>)

La familia actiníida de *P. papillosa*, unadiposidad. Fuentes, F.M. & R.A. Mendoza, A.L. Rosales & R.A. Cisneros. 2008. Otras anémomas de mar com venenos que... Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. litica, tal como se ha reportado en los... Instituto Nacional de Salud (Perú). Ministerio de Salud, y *Anthopleura xanthogrammica*, donde la actividad de... Instituto Nacional de Salud. Lima. Pp 52. de ambos venenos puede ser inhibida... Hotendorff, P.G. & D. Hiesinger. 1999. Purification and partial cha- heim er & Avigad, 1981). Otra anémoma de... racterization of the phospholipase A2 (cDc) lytic factor from sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. he *Anthopleura asiatica* a partir de cuyo veneno... Toxicon. 37(12): 1779-1796. DOI [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00100-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00100-8)



- Haussermann V. 2004. Re-description of *Phymactis papillosa* (Lesson, 1830) and *Phymanthea pluvia* (Drayton in Dana, 1846) (Cnidaria: Anthozoa), two common actiniid sea anemones from the south east Pacific with a discussion of related genera. *Zoologische Mededelingen* 78. <http://www.repository.naturalis.nl/document/43183>
- Hu B., W. Guo, L. Wang, J. Wang, X. Liu & B. Jiao. 2011. Purification and characterization of gigantoxin-4, a new actinoporin from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *International Journal of Biological Sciences*. 7(6): 729-739. DOI <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.729>
- Jouiaei M., A. Yanagihara, B. Madio, T. Nevalainen, P. Alewood & B. Fry. 2015. Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins*. 7: 2251-2271. DOI <https://doi.org/10.3390/toxins7062251>
- Kem W. & B. Dunn. 1988. Separation and characterization of four different aminoacid sequence variants of a sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolyisin. *Toxicon*. 26 (11): 997-1008. DOI [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90198-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90198-5)
- Kohn Y., H. Satoh, A. Iguchi & H. Nagai. 2009. Characterization of a new hemolytic protein toxin from the sea anemone *Anthopleura asiatica*. *Fisheries Science*. 75 (4): 1049-1054. DOI <https://doi.org/10.1007/s12562-009-0112-2>
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685. DOI <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Landucci E., Q. Dias, F. Marangoni, A. Vilca-Quispe, J. Valeriano-Zapana, F. Torres-Huaco, D. Martins-de-Souza, S. Marangoni & L. Ponce-Soto. 2012. Purification and inflammatory edema induced by two PLA2 (Anch TX-I and Anch TX-II) from sea anemone *Anthothoe chilensis* (Actiniaria: Sagartiidae). *Comp. Biochem. Physiol. B* 161: 170-7. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.11.003>
- Lenarcic B., A. Ritonja, B. Strukelj, B. Turk & V. Turk. 1997. Equisatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from *Actinia equina*, is structurally related to Thyroglobulin type-1 domain. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(21):13899-13903. DOI <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13899>
- Loret E., R. Menendez, P. Mansuelle, F. Sampieri & H. Rochat. 1994. Positively charged amino acid residues located similarly in sea anemone and scorpion toxins. *Journal of Biological Chemistry*. 269(24): 16785-16788.
- Macek P. & D. Lebez. 1988. Isolation and characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia equina* L. *Toxicon*. 26(5): 441-451. DOI [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90183-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90183-3)
- Malpezzi E., J. De Freitas, K. Muramoto & H. Kamiya. 1993. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon*. 31(7): 853-864. DOI [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90220-D](https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90220-D)
- Marinetti G. 1965. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 98: 554-565. DOI [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(65\)90152-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(65)90152-9)
- Minagawa S., M. Sugiyama, M. Ishida, Y. Nagashima & K. Shiomi. 2008. Kunitz-type protease inhibitors from acorhagi of three species of sea anemones. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 150: 240-245. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.03.010>
- Moran Y., D. Praher, A. Schlesinger, A. Ayalon, Y. Tal & U. Technau. 2013. Analysis of soluble protein contents from the nematocysts of a model sea anemone sheds light on venom evolution. *Marine Biotechnology*. 15: 329-339. DOI <https://doi.org/10.1007/s10126-012-9491-y>
- Peigneur S., B. Billen, R. Derua, E. Waelkens, S. Debaveye, L. Béress & J. Tytgat. 2011. A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochemical Pharmacology*. 82 (1): 81-90. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.023>
- Razpotnik A., I. Krizaj, W. Kem, P. Macek & T. Turk. 2009. A new cytolytic protein from the sea anemone *Urticina crassicornis* that binds to cholesterol- and sphingomyelin-rich membranes. *Toxicon*. 53: 762-769. DOI <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.007>
- Retuerto F., E. Arbaiza, Y. Quiroz-Garrido, R. Estrada & J. Zavala. 2007. Actividad biológica del veneno de *Anthothoe chilensis* (Lesson, 1830) (Actiniaria: Sagartiidae). *Revista Peruana de Biología*. 14(2): 277-282. DOI <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v14i2.1800>
- Rodríguez A., J. Silva, F. Sac, Z. Qiang, J. de Freitas, A. Pimenta, M. de Lima, K. Konno, S. Yuen, A. Garateix & A. Zaharenko. 2012a. Peptide fingerprinting of the neurotoxic fractions isolated from the secretions of sea anemones *Stichodactyla helianthus* and *Bunodosoma granulifera*. New members of the APETx-like family identified by a 454 pyrosequencing approach. *Peptides*. 34:26-38. DOI <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.10.011>
- Rodríguez A., L. Standker, A. Zaharenko, A. Garateix, W. Forssmann, L. Béress, O. Valdés, Y. Hernández & A. Laguna. 2012b. Combining multidimensional liquid chromatography and MALDI-TOF-MS for the fingerprint analysis of secreted peptides from the unexplored sea anemone species *Phymanthus crucifer*. *Journal of Chromatography B*. 903:30-39. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.06.034>
- Schagger H. & von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem*. 166 (2): 368-379. DOI [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Swenson S. & F. Markland. 2005. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* 45 (8): 1021-39. DOI <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.027>
- Torres-Larios, A., G. Gurrola, F. Zamudio & L. Possani. 2000. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *European Journal of Biochemistry*. 267: 5023-5031. DOI <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01556.x>
- Warburg O. & W. Christian. 1941. Isolierung und kristallisation der garungs ferments enolase. *Biochem Z*. 310: 384-421.