

CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DEL MOLUSCO *Stylocheilus longicauda* (MOLLUSCA: GASTROPODA).

D.L. Romero, C. Fernández, A. del Monte, M. Alonso del Rivero y J. Delfin

Centro de Estudio de las Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 esq. J., Plaza, Ciudad Habana, Cuba.

(*) Autor correspondiente: adelmonte@fbio.uh.cu

RESUMEN

En el presente trabajo se describen los resultados obtenidos de la determinación de algunas actividades enzimáticas y actividad inhibidora de ellas en el molusco *Stylocheilus longicauda*. Se prepararon extractos acuosos de las diferentes partes del animal (hepatopáncreas, manto, gónadas así como un extracto total). Todos los extractos mostraron actividad proteolítica a todos los valores de pH ensayados. Se detectó también en todos, la presencia de actividad inhibidora de pepsina y bromelina, la que fue más notable en el caso del manto para pepsina, así como actividad acetilcolinesterásica para los extractos de manto y total. No se detectó inhibición para acetilcolinesterasa en ninguno de los extractos ensayados. Por otra parte, el extracto total mostró poseer actividad esterásica y lipásica.

Palabras claves: actividades enzimáticas; actividades inhibitorias; proteasas, lipasas; *Stylocheilus longicauda*,

ABSTRACT

In this paper we describe the results obtained in the determination of some enzymatic activities and inhibitory activities against these enzymes in the mollusc *Stylocheilus longicauda*. Aqueous extracts were prepared from different parts of the animal (midgut gland, gonads and mantle). The extracts showed proteolytic activity at all assayed pH. The presence of pepsine and bromeline inhibitory activity was detected in all the extracts, being more remarkable for pepsine in the case of the mantle. Only the mantle and whole extracts showed acetylcholinesterasic activity but inhibitory activity against this enzyme was not detected in any case. Furthermore, the whole extract showed esterase and lipase activities.

Key words: enzymatic activities; inhibitory activities; protease; pilase; *Stylocheilus longicauda*.

El estudio de la fauna marina ha evidenciado la presencia, en muchas de sus especies, de sustancias con importantes actividades biológicas de gran utilidad en Biomedicina como son actividad neurotóxica (Béres *et al* 1975; Burnet y Calton, 1977; Garateix *et al*, 1992), actividad inhibidora de proteasas (Fritz *et al*, 1972; Delfin *et al*, 1994) actividad lipásica (del Monte *et al*, 1998), entre otras actividades informadas. Los moluscos figuran sin duda entre los invertebrados más notables de la fauna marina, sin embargo los estudios sobre estos organismos, en su mayoría, han estado dirigidos hacia la sistemática y la zoogeografía, desconociéndose las características y propiedades bioquímicas de la mayoría de las especies (Bidart *et al* 1990). Sólo se informa en la literatura, la presencia de un inhibidor de caliceína en la especie *Aplysia dactylomela* (González *et al*, 2004). Una especie que no ha sido caracterizada desde el punto de vista bioquímico es el molusco *Stylocheilus longicauda* el que se caracteriza por no poseer concha, a pesar de lo

cual no presenta un gran número de depredadores (Kerry, 1987). El presente trabajo describe la caracterización en cuanto a algunas actividades biológicas de interés bioquímico y biomédico, como son entre otras, la actividad proteolítica y la actividad inhibidora de proteasas, en extractos obtenidos a partir de este organismo.

MATERIALES Y METODOS

Los ejemplares adultos de *Stylocheilus longicauda* (silvestres) fueron donados por el Centro de Investigaciones Marinas (CIM) de la Universidad de la Habana. La recolección se realizó en horas de la mañana con un jamo de borde recto pasándolo por las paredes de la piscina natural de dicho centro (Ciudad de la Habana), desde abajo hacia arriba.

Preparación de los extractos.

En primer lugar se procedió a hacer la disección de los animales para separarlos en sus diferentes

partes (manto, hepatopáncreas, y gónadas), preparando un "pool" de cada una de ellas a partir de los cuales se prepararon los extractos acuosos, incluyendo un extracto del cuerpo íntegro de los animales (extracto total). Previamente fue determinado el peso húmedo del material de partida. Los extractos fueron preparados en solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) una relación masa volumen de 1:2.

El material de partida en todos los casos fue homogenizado con una cuchilla eléctrica MPW-309 a una velocidad de 2000 rpm, temperatura de 25°C durante 30 seg, repitiéndose la operación 3 veces y los homogenizados se centrifugaron 9 000 g durante 50 min y temperatura de 4°C. en una centrifuga Beckman JA-10. Los sobrenadantes fueron recogidos, medidos sus volúmenes y conservados a -20°C para su uso posterior.

Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976)

Actividades enzimáticas.

Se determinaron diferentes actividades funcionales: Actividad proteolítica e Inhibidora de proteasas, Actividad colinesterásica e inhibidora de esta y Actividad esterásica y lipásica.

La actividad proteolítica se realizó por el método de Anson modificado (Anson, 1938) utilizando como sustrato hemoglobina al 2% desnaturalizada a diferentes pH (2, 4, 7 y 9), para determinar posibles proteasas ácidas, básicas o neutras, en los diferentes extractos.

La evaluación de la actividad inhibidora de proteasas se realizó siguiendo el método planteado para la actividad proteolítica, con una incubación previa de 10 min. de las enzimas con los extractos (Chávez *et al*, 1988). Se usaron enzimas control pertenecientes a dos de las diferentes familias de proteasas (Beynon y Bond, 1989), la pepsina (Sigma), proteasa aspártico dependiente (pH óptimo 2) y bromelina (Fluka), cisteíno dependiente (pH óptimo 7), con una concentración de 0.1 mg/mL.

Los ensayos de actividad acetilcolinesterásica se realizaron según el método propuesto por Mahmood y Carmichael en 1987, utilizando yoduro de acetilcolina como sustrato. La actividad inhibidora se determinó de igual forma pero se

procedió a incubar, previo al ensayo de actividad, los extractos con acetilcolinesterasa de eritrocitos (Sigma), durante 10 min a temperatura ambiente y como control del 100% de actividad, se utilizó la enzima previamente incubada con el buffer de trabajo en sustitución del extracto.

Para la determinación de la actividad enzimática esterásica utilizando p-Nitrofenilacetato (pNPA, Sigma) o p-Nitrofenilbutirato (pNPB, Sigma) como sustrato se empleó un método continuo (del Monte *et al*, 1998) y la reacción se siguió por el incremento de la absorbancia a 348 nm producto de la liberación del p-nitrofenol. El ϵ para estas condiciones es $5\,150\text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}$. La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de extracto enzimático soluble capaz de transformar $1\text{ }\mu\text{mol}$ de pNPA o pNPB en un minuto, a una temperatura de 30 °C. Se realizaron los correspondientes controles de hidrólisis espontánea del pNPA y pNPB.

La determinación de la actividad lipásica se realizó por el método de titulación automática en un titulador (pH-Stat) (del Monte *et al*, 1998). Las determinaciones se realizaron en agitación constante y temperatura de 30°C. Se utilizó Tributirina como sustrato y la reacción se siguió mediante la liberación de protones, producto de la hidrólisis de los enlaces éster de la Tributirina, lo que provoca una disminución del pH en el medio de reacción, que permite la titulación con NaOH ($0.01\text{ }\mu\text{mol/mL}$). Paralelamente se realizaron los controles de hidrólisis espontánea de la Tributirina.

RESULTADOS Y DISCUSION

El estudio de los organismos marinos ha revelado la presencia en éstos, de una serie de sustancias con gran potencialidad para su uso en Biomedicina. Dentro de estos organismos han despertado un gran interés los invertebrados, pero debido a la gran diversidad de especies que estos comprenden, aún permanecen vírgenes un gran número de ellas. Este es el caso del opistobranquio *Stylocheilus longicauda*, molusco que se caracteriza por no poseer concha y al que, se le conocen pocos o ningún depredador (Clark y De Freese, 1987). A pesar de que Kato *et al* en 1974 informan la presencia de una toxina en esta especie a la que llaman aplysiatoxina, a este grupo no se le reconoce toxicidad en la literatura consultada, lo que pudiera sugerir que su contenido de toxinas, si las posee, no es de importancia pero si debe poseer algún tipo de

actividad biológica que justifique el que estos organismos no resulten apetecibles. Por otra parte informes posteriores (Conklin y Mariscal, 1977; Day y Harris, 1978; Greenwood and Mariscal, 1987; Johnson and Willows, 1999) plantean que muchas de estas especies se alimentan de anémonas y son capaces de almacenar los nematocistos de éstas en estructuras llamadas cnidosacos, por lo que la presencia de toxinas se debe a esta razón y no a que sean producidas por ellos.

En primer lugar se procedió a caracterizar los diferentes extractos en cuanto a su contenido de proteínas, por ser los polipéptidos, los responsables fundamentales de las actividades biológicas más importantes encontradas en los organismos marinos (Romero *et al*, 1987, Delfin *et al*, 1994). No se realizó la determinación de la proteína total ya que, nuestro interés estuvo encaminado a la búsqueda de polipéptidos que pudieran tener alguna actividad biológica de importancia para su uso en solución. Los extractos preparados mostraron un considerable contenido proteico, más aún si se tiene en cuenta que un gran por ciento del peso del animal lo constituye el agua (Clark y De Freese, 1987) y que además sólo se determinó la proteína soluble. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Una vez establecida la concentración y el contenido de proteínas se procedió a determinar la actividad proteolítica de los extractos a diferentes valores de pH para proporcionar condiciones tales, que pudiera medirse la actividad de proteasas ácidas, neutras y básicas.

Nuestro interés estuvo encaminado hacia este grupo de moléculas debido a que las proteasas, mejor llamadas peptidasas, son enzimas indispensables para la sobrevivencia de muchos organismos (Neil *et al* 2004) no obstante, deben estar sometidas a un estricto control, pues una actividad proteolítica no deseada puede desencadenar serios problemas en el organismo (Cooper, 2002). Un gran número de enfermedades están relacionadas con el descontrol de esta actividad como son por ejemplo, la epilepsia, y diferentes formas de enfisemas (Cooper, 2002; Neil *et al*, 2004). Existen diferentes mecanismos de control de la actividad proteolítica o peptidásica. Uno de ellos es la interacción con proteínas que inhiben a estas enzimas (Neil *et al*, 2004) por lo que la presencia de enzimas de este tipo en un organismo, debe traer aparejada la existencia de inhibidores capaces de controlar su actividad proteolítica. Además por partir de una fuente no

explorada pueden encontrarse nuevas enzimas con características tal vez diferentes a las del resto de los organismos conocidos como sucede con otras enzimas procedentes de organismos marinos (Grotendorst y Hessinger, 2000).

Los resultados de la determinación de la actividad proteolítica a diferentes pH (2, 4, 7, 9) se muestran en la Tabla 2 y nos permiten aseverar la presencia de este tipo de actividad en los extractos ensayados para todos los valores de pH lo que pudiera ser el resultado de la presencia de proteasas diferentes en los extractos aunque podemos considerar que esta actividad no es muy elevada. En el extracto de hepatopáncreas la mayor actividad se manifiesta a pH 7.

En el caso del extracto de manto, los valores de actividad proteolítica son relativamente bajos con respecto al de hepatopáncreas sobre todo a pH 2 y pH 7 e indican que la mayor proteólisis ocurre a pH 4. Estos resultados pueden estar afectados por la presencia de inhibidores que no permitan la expresión de la actividad, lo cual analizaremos posteriormente.

Para el extracto de gónadas la actividad específica en general resultó la más baja, lo que no carece de lógica, según nuestro criterio, puesto que éstas constituyen los órganos reproductores del animal por lo que una elevada actividad proteolítica en este extracto no se justificaría debido a que en éstos, están priorizados los procesos de síntesis.

El resultado más notable y aparentemente contradictorio para el extracto total, es la elevada actividad proteolítica específica a pH 4, con un valor muy superior al esperado (0.132 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), ya que éste debería tener cuando más, un valor muy cercano a la sumatoria de las actividades del resto de los extractos en este pH (0.072 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) o un valor inferior debido a la concentración relativa de las enzimas en este extracto, lo que sí se manifiesta en los otros pH ensayados, donde se obtuvieron valores de actividad proteolítica inferiores a los obtenidos para el resto de los extractos. Los resultados obtenidos posteriormente pueden dar explicación a esta aparente contradicción.

Para continuar la caracterización se determinó la actividad inhibidora de los extractos frente a dos tipos de proteasas diferentes, pepsina (aspártico dependiente) y bromelina (cisteino dependiente). Los resultados de la determinación de esta actividad se muestran en las Tablas 3 y 4.

Tabla 1. Concentración de proteínas y relación proteína soluble / peso húmedo de los extractos preparados a partir de la especie *Stylocheilus longicauda*.

Extracto	Peso (g)	Concentración de Proteínas (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Proteína total/ peso (mg/g)
Hepatopáncreas	14.33	19.41	601.71	41.99
Manto	23.27	15.65	939	40.35
Gónadas	3.03	5.86	99.62	32.90
Total	66.41	29.34	2640.6	39.76

Tabla 2. Actividad proteolítica a diferentes pH de los extractos de *S. longicauda*

Extracto	pH	Actividad Específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
Hepatopáncreas	2	0.048 \pm 0.003
	4	0.046 \pm 0.002
	7	0.064 \pm 0.003
	9	0.007 \pm 0.0003
Manto	2	0.005 \pm 0.000
	4	0.013 \pm 0.001
	7	0.003 \pm 0.000
	9	0.012 \pm 0.001
Gónadas	2	0.009 \pm 0.000
	4	0.013 \pm 0.001
	7	0.011 \pm 0.001
	9	0.004 \pm 0.000
Total	2	0.011 \pm 0.005
	4	0.132 \pm 0.008
	7	0.011 \pm 0.001
	9	0.012 \pm 0.001

Aunque se obtuvo actividad inhibidora en todos los extractos para ambas enzimas, el resultado más relevante fue, la elevada actividad inhibidora frente a pepsina del extracto de manto, lo que evidencia la presencia en este de, al menos, una sustancia inhibidora de proteasas aspártico dependiente. Este resultado podría explicar en primer lugar, la baja actividad proteolítica de este extracto a valores bajos de pH y en segundo lugar al aparente resultado contradictorio obtenido para la actividad proteolítica del extracto total a pH 4, muy superior al esperado como se apuntó anteriormente. En este extracto, los componentes de cada una de las partes del animal deben presentar una menor concentración relativa, por lo cual la cantidad de inhibidores presentes en forma relativa es menor y producto de esto se encontrarían más diluidos, por lo que pudiera pensarse que no está favorecida la unión del

inhibidor a las proteasas o que no exista la cantidad de inhibidor necesaria para la detección de esta actividad y por tanto éstas expresen una mayor actividad proteolítica en el extracto total, no siendo así para los demás extractos, donde la concentración relativa del inhibidor sería mayor y por tanto la actividad proteolítica se expresa en menor cuantía. Por otra parte al estar un poco alejado este pH (pH 4) del pH en el cual el inhibidor de pepsina debe mostrar su mayor actividad (pH 2) podría también estar desfavorecida la unión y esto sumado a la dilución sería la causa de la elevada actividad proteolítica observada para el extracto total a pH 4. Otro resultado que apoyaría este planteamiento es que el extracto total presenta una actividad inhibidora menor a pH 2 que el extracto de manto, lo que resultaría de la menor concentración de inhibidor en este extracto.

Tabla 3. Actividad inhibidora frente a pepsina de los extractos de *S. Longicauda*.

Extracto	Actividad Inhibidora Específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
Hepatopáncreas	0.227 ± 0.018
Manto	106.78 ± 8.542
Gónadas	0.843 ± 0.067
Total	0.226 ± 0.181

Tabla 4. Actividad inhibidora frente a bromelina de los extractos de *S. longicauda*

Extracto	Actividad Inhibidora Específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
Hepatopáncreas	0.100 ± 0.008
Manto	0.096 ± 0.008
Gónadas	0.321 ± 0.026
Total	0.078 ± 0.006

No podemos descartar la posibilidad de que la presencia de inhibidores en el extracto de manto, se deba a la presencia de nematocistos en los cnidosacos que forman parte de esta estructura, ya que se ha descrito la presencia de éstos en anémonas marinas (Fritz *et al*, 1972; Delfin *et al*, 1994), aunque no se ha demostrado que formen parte de la batería de toxinas de estas especies presentes en los nematocistos (Mebs y Guebauer, 1980.)

En cuanto a la actividad inhibidora de bromelina la mayor actividad se obtuvo para el extracto de gónadas lo que pudiera ser un mecanismo de control de la actividad proteolítica no necesaria en estos órganos en la zona de pH neutro.

La presencia de inhibidores del grupo de proteasas aspártico dependientes constituye un resultado muy interesante por su potencialidad en la lucha contra el SIDA y otras enfermedades asociadas a enzimas de este tipo como son la hipertensión, la enfermedad de Alzheimer, malaria, algunas neoplasias y algunas infecciones bacterianas (De Clerq, 1991; Cooper, 2002). En el caso de los inhibidores de proteasas cisteíno dependientes, pudieran ser utilizados en la terapéutica contra el parasitismo (White *et al*, 1992; Karanu *et al*, 1993)

Otra actividad ensayada en los extractos fue la actividad acetilcolinesterásica. Las acetilcolinesterasas son enzimas que juegan un papel fundamental en los mecanismos colinérgicos involucrados en el control de la conducta motora

(Dajas *et al*, 1991) y son muy utilizadas en estudios neurofisiológicos, por lo que contar con una fuente importante de esta molécula posibilitaría el estudio de una serie de fenómenos al ser utilizada como reactivo biológico. Estas enzimas son inhibidas por una serie de compuestos entre los cuales se encuentran los organofosforados y la huperazina (utilizada en el tratamiento del Alzheimer), por lo que la detección de posibles inhibidores en los extractos utilizados resulta interesante.

La determinación de actividad acetilcolinesterásica mostró, la presencia de este tipo de enzima en el extracto de manto, el valor de actividad específica fue de $0.031 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, actividad que fue recuperada en gran medida en el extracto total, no así en el resto de los extractos ensayados, lo que confirma la presencia de la enzima sólo en el manto y no en el resto de las partes del animal estudiadas. Descartamos la posibilidad de que la enzima proceda de los nematocistos conservados en los cnidosacos pues hasta el momento, no se ha informado la presencia de esta enzima en estas estructuras.

Este resultado es de gran interés pues no es común encontrar fuentes de esta enzima en los organismos marinos, a pesar de que la acetilcolinesterasa que más se comercializa y a un elevado costo, se obtiene del pez torpedo. Por otra parte, la actividad inhibidora de acetilcolinesterasa ha sido informada para organismos marinos tales como, la cianobacteria *Anabaena flos* (Mahmood y Carmichael, 1987) pero en nuestro trabajo no se encontró actividad inhibidora de esta enzima en ninguno de los extractos estudiados. Este resultado pudiera deberse a que la concentración de inhibidores es muy inferior a la concentración de enzima y esto imposibilita su detección.

Otras enzimas de interés son las esterasas y en especial las lipasas por su gran utilidad para la construcción de biorreactores utilizados en la industria biofarmacéutica, para la producción de medicamentos. El estudio realizado con el extracto total en cuanto a actividad esterásica y lipásica brindó resultados muy interesantes (Tabla 5), ya que como puede observarse la actividad enzimática presentó un aumento considerable al aumentar la complejidad del sustrato y alcanzó un valor muy elevado frente a la tributirina, lo que demuestra la presencia de lipasas en dicho extracto. La presencia de lipasas ha sido informada para otros organismos marinos (del Monte *et al*, 1998).

Tabla 5. Actividad esterásica y lipásica del extracto total de *S. longicauda*.

Sustrato	Actividad Específica (U/mg)
pNPA	0.001 ± 0.000
pNPP	0.017 ± 0.001
Tributirina	0.307 ± 0.015

Los resultados obtenidos, nunca antes descritos para esta especie, evidencian la potencialidad del molusco *Stylocheilus longicauda* como fuente de nuevas sustancias bioactivas con perspectivas de aplicación en la Biomedicina como son los inhibidores de proteasas aspártico dependientes y las enzimas ya que su uso brinda muchas ventajas para la obtención de sustancias de gran interés farmacológico o diseño de procesos de síntesis química.

REFERENCIAS

Anson, M.I. (1938): The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol*; 22 : 79-85.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* 86 : 248-254.

Béress, L. y R. Béress (1971): Purification of three polypeptides with neuro and cardiotoxic activity from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Toxicon* 13 : 359-367 [citado por L. Béress, R. Béress y G. Wunderer, 1975]

Béress, L., R. Béress y G. Wunderer (1975):

Beynon y Bond (1989): Proteolytic enzymes: a practical approach. IRI Press at Oxford University Press.

Bidart, L., A.A. Socarrás, C. Iglesias, M. Reyes y M. Hidalgo-Gato (1990): Aspectos del ciclo de vida de *Polymita muscarum muscarum* y *Polymita picta nigrolimbata* en el laboratorio. Reporte de Investigación del Instituto de Ecología y Sistemática, Academia de Ciencias de Cuba, 8 pp.

Burnet, J.W. y G.J. Calton (1977): The chemistry and toxicology of some venomous pelagic coelenterates. *Toxicon* 15 : 177-181.

Chávez, M., J. Delfin, J. Díaz, U. Pérez, Y. Martínez, Y. González, M. Márquez y R. Más (1988): Caracterización de un inhibidor de proteasas purificado de la anémona *Stichodactyla helianthus*. *Revista CENIC* 19: 82- 87.

Clark, K.B. y D. de Freese (1987): Population ecology of Caribbean Ascoglosa (Mollusca: Opisthobranchia): a study of specialized algal herbivores. *Ame. Malacol. Bull.* 5(2):259-280.

Conklinn, E.J. y R.N. Mariscal (1977): Feeding behavior, ceras structure and storage inn the aeolid nudibranch, *Spurilla neapolitana*. *Bull Mar Sci*; 27(4):658-667.

Cooper, J.B. (2002). Aspartic proteinase in disease: a structural perspective. *Current Drugs Targets* 3:155-173.

Day, R.M. y L.G. Harris (1978) Selection and turnover of coelenterate nematocysts in some aeolid nudibranchs. *The Veliger*. 21(1):104-109.

De Clerq, E. (1991). Basic approaches to antiretroviral treatment. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome* 4(3):210-215.

del Monte, A. P. Sabuquillo, R. Fernández-Lafuente, D. Pio, M.E. García, J. Díaz, M.A. Chávez y J.M. Guisán (1998): Detection, purification and immobilization of lipases from marine organisms: Their perspectives in the chiral precursors preparation. *Revista Cubana de Química* X(4):160-161.

Delfin, J., Y. González, J. Díaz y M. Chávez (1994). Proteinase inhibitor from *Stichodactyla helianthus* : Purification , characterization and immobilization. *Arch. of Med. Res.* 25 : 199-204.

Fritz, H., B. Brey y L. Béress (1972): Purification of three polypeptides with neuro and cardiotoxic activity from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Toxicon* 13:359-367. [citado por L. Béress, R. Béress y G. Wunderer]

Garateix, A., M. Castellanos, J.L. Hernández, R. Más, R. Menéndez, L. Romero y M. Chávez (1992): Effects of a high molecular weight toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* on cholinergic response. *Comp. Biochem. Physiol.* 103(2):403-409.

González, Y., M.S. Araújo, M.L. Oliva, C.A. Sampaio y M.A. Chávez (2004): Purification and preliminary characterization of a plasma kallikrein

inhibitor isolated from sea hares *Aplysia dactylomela*. *Toxicon* (In press).

Grotendorst, G.R y D.A. Hessinger (1999) Purification and partial characterization of the phospholipase A2 component of the sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon* 37(12):1779-1796.

Johnson, P.M y A.O.D. Willows (1999): Defense in Sea Hares (Gastropoda, Opisthobranchia, Anaspidae): multiple layers of protection from egg to adult. *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology* 32:147-180.

Karanu, F.N., F.R. Rurangirwa, T.C. McGuire y D.P. Jasmer (1993): *Haemonchus contortus*: identification of protease with diverse characteristics in adult worm excretory – secretory products. *Exp. Parasitol.* 77(3):362-371.

Kato, Y. y P.J. Scheuer (1974): Aplysiatoxin and debromoaplysiatoxin, constituents of the marine mollusk *Stylocheilus longicauda* (Quoy and Gaimard, 1824). *J. Am. Chem. Soc.* 96(7):2245-2246.

Kerry, B.C. y Duane De Freese (1987): Population ecology of Caribbean *Ascoglossa* (Mollusca: Opisthobranchia): a study of specialized algal herbivores. *Ame Malacol. Bull.* 5(2):259-265.

Mahmood, N.A. y W.W. Carmichael (1987): Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos.* NRC; 1: 525-517.

Mebs, D. y E. Gebauer (1980): Isolation of proteinase inhibitory, toxic and hemolytic polypeptides from a sea anemone, *Stoichactis* sp. *Toxicon* 18: 97-106.

Neil, D., N.D. Rawlings, D.P. Toll y A.J. Barret (2004): Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378: 705-716.

Romero, L., A. Luberta, L. Dávila, A.M. Barral y M.A. Chávez (1987): Aislamiento y Purificación parcial de cuatro polipéptidos a partir de la anémona marina *Condylactis gigantea*. *Revista Biología* 1(3):3-13.

White Jr, A.C., J.L. Molinari, A.V. Pillai y A.A. Rege (1992). Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. *J. Parasitol.* 78(2):281-287.

Aceptado: 23 de enero del 2005