

Uso de Neurotoxinas Marinas en la Experimentación Animal

Use of Marine Neurotoxins in Animal Experimentation

Recibido: enero 01, 2009 / Aceptado: marzo 03, 2009 / Publicado: marzo 23, 2009

Ángel R. Concepción Alfonso¹

aconce@giron.sld.cu y aconce@cngen.sld.cu

RESUMEN. La neurobiología ha tenido un gran desarrollo en los últimos años, especialmente por las investigaciones realizadas con diferentes agentes neurotóxicos y que han permitido obtener nuevos conocimientos acerca de una gran variedad de enfermedades humanas, como esquizofrenia, Alzheimer, enfermedad de Parkinson y las epilepsias, mediante el uso de modelos experimentales que emplean neurotoxinas para modificar mecanismos moleculares específicos.

Las neurotoxinas que más interés han despertado en los últimos años son las de origen natural, sobre todo las extraídas de organismos marinos que se caracterizan, principalmente, por presentar mecanismos de defensa basados en la liberación al medio de sustancias altamente tóxicas.

Partiendo de estos antecedentes, se presenta en este trabajo una revisión sobre el uso de diferentes neurotoxinas en la experimentación animal y sus efectos sobre el hipocampo, estructura encefálica relacionada a funciones de aprendizaje y memoria.

Palabras clave: Extractos neurotóxicos, Anémoma marina, Bunodosoma granulifera, Ácido kaínico, Hipocampo, Neurodegeneraciones

ABSTRACT. Neurobiology has had taken a great development during the last years, specially by the researches that have been made with different neurotoxin agents, that have permitted to get new knowledge about a great variety of human illnesses, as for examples: schizophrenia, Alzheimer, Parkinson and epilepsy, by means of experimental models that use neurotoxins to modify specific molecular mechanism.

The most significant neurotoxins in the last period are those of natural sources taken from marine organism, characterized for having mechanism of defense that release to the environment of highly toxic substances.

Taking into consideration those antecedents, this work is a revision about the use of different neurotoxins in the animal experimentation and its effects on the hippocampus, that is an encephalic structure related with functions of learning and memory.

¹ Centro Nacional de Genética Médica, ISCMH, MINSAP, CUBA. Calle 146 y avenida 31, Cubanacán, CP-10600, Playa, Ciudad de La Habana. Telf: 2089991 al 95.
ISSN: 1665-5745

INTRODUCCIÓN

La neurobiología ha tenido un gran desarrollo en los últimos años, especialmente por las investigaciones realizadas con diferentes agentes neurotóxicos y que han permitido dilucidar algunas incógnitas sobre el Sistema Nervioso (SN). Al mismo tiempo, se han obtenido nuevos conocimientos acerca de una gran variedad de enfermedades humanas, como esquizofrenia, Alzheimer, enfermedad de Parkinson y las epilepsias, mediante el uso de modelos experimentales que emplean neurotoxinas para modificar mecanismos moleculares específicos [1, 7].

Las neurotoxinas que más interés han despertado en los últimos años son las de origen natural, sobre todo las extraídas de organismos marinos, tales como celenterados, equinodermos, moluscos y otros grupos de invertebrados que se caracterizan, principalmente, por presentar mecanismos de defensa basados en la liberación al medio de sustancias tóxicas [8, 9].

Partiendo de estos antecedentes, se presenta una revisión sobre la utilidad de algunas neurotoxinas en la experimentación animal.

UTILIDAD DEL ÁCIDO KAÍNICO EN LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Hoy día se conocen cientos de neurotoxinas, algunas de las cuales son compuestos sintéticos, pero muchas de las más importantes se encuentran en los organismos vivos, o sea, bacterias, plantas y animales; los cuales, aparentemente, las utilizan como mecanismos de defensa desarrollados durante su evolución [10].

Existen desde toxinas con estructuras muy simples hasta otras con estructuras bien complejas, dentro de las cuales se incluyen alcaloides y polipéptidos [11].

Dentro de las sustancias neurotóxicas más estudiadas se encuentra el ácido kaínico (Ak), clasificada entre las neurotoxinas que actúan sobre receptores específicos y a la cual se le ha brindado gran interés desde su descubrimiento, ya que ha servido principalmente para la creación de modelos experimentales de epilepsia [12, 14] y de esquizofrenia [15, 17].

Este aminoácido natural fue aislado e identificado de varias algas marinas, setas, hongos y otras plantas japonesas. Por ejemplo, se obtiene del alga *Digenea simplex*, la cual ha sido incluida durante muchas décadas en la farmacognosia japonesa por sus excelentes propiedades antiáscaris. El nombre de Ak significa monstruo de los mares [11].

Muchos aminoácidos con una estructura química similar al ácido glutámico se caracterizan por ser neurotransmisores con acción excitatoria. Tal es el caso del Ak, que no es un neurotransmisor, sino un agente neurotóxico de gran potencia sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) y en específico sobre el hipocampo [18, 21].

Los daños cerebrales producidos por la administración sistémica de dicha neurotoxina en la mayoría de los mamíferos en estado adulto, están limitados a aquellas regiones del SNC que se encuentran por fuera de la barrera hematoencefálica, ya que el paso del Ak y demás análogos del glutamato a través de ella es pobre, al parecer porque en la medida que la misma va madurando, disminuyen en ella la cantidad de receptores al glutamato [18], lo cual no ocurre para las ratas. Todo lo anterior justifica el hecho de que en la mayoría de los experimentos encaminados a estudiar el efecto de los análogos del glutamato sobre el Sistema Límbico, se utilicen estos animales, ya que se pueden emplear tanto adultos como infantes y sólo en algunos de los experimentos se acude a otras especies como conejos, ratones y gatos, casi siempre utilizando los infantes, en estos últimos casos, porque todavía tienen la barrera hematoencefálica inmadura [18]; aunque también ha sido bastante utilizada la rata recién nacida e inyectada con Ak, para estudios postnatales de neurotoxicidad [22, 24]. Según Dong y col. [22], en los primeros siete días después de administrado el Ak se observa pérdida neuronal progresiva a nivel de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, así como efectos neurogénicos; después de 14 días y hasta 60, los daños más significativos se presentan en CA3, como se ha descrito para el patrón de daños en animales adultos, concluyendo que la administración de la referida neurotoxina, provoca tanto apoptosis neuronal como neurogénesis, para reemplazar las neuronas perdidas por apoptosis, en el área CA3 del hipocampo.

La administración de la dosis adecuada de esta neurotoxina por cualquier vía, produce varias señales motoras incluyendo ataques convulsivos. Las ratas asumen posturas catatónicas, ponen la vista fija, se presenta cola de Straub, conducta del perro mojado y otras manifestaciones propias de un ataque epileptogénico [18].

El patrón de regiones cerebrales dañadas se mantiene igual después de la aplicación del Ak por vía ICV en dosis de 0,4-1,5 µg o sistémica 8-12 mg/kg de peso, en ratas [18]. Las convulsiones se corresponden con una degeneración neuronal masiva, fundamentalmente de la región del hipocampo, donde las neuronas más vulnerables son las células piramidales de la zona CA3 y CA2 y las interneuronas en el hilus del giro dentado [18].

En ratones inyectados en VL con Ak también se ha visto mayor daño en las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo [25].

UTILIDAD DE ALGUNOS EXTRACTOS Y FRACCIONES EXTRAIDOS DE ORGANISMOS MARINOS, EN LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

En los organismos marinos la mayoría de las especies producen toxinas para la captura de sus presas y para la defensa, siendo los celenterados un grupo de invertebrados marinos conocidos por su toxicidad en ese sentido [26], especialmente por su carácter polipeptídico [27]. Entre los celenterados se encuentran las anémonas marinas, animales de vida sésil con mecanismos de defensa y nutrición altamente desarrollados que compensan, en cierta medida, su poca movilidad.

El desarrollo de estos mecanismos están presentes en organismos de agua salada y de agua dulce; sus toxinas pueden causar tanto letalidad como daño a una gran cantidad de órganos y se conoce que el SN es el órgano blanco de muchas de estas toxinas [28].

Hace años se viene trabajando en la extracción de sustancias tóxicas a partir de las anémonas marinas, ya que ha existido un creciente interés en el aislamiento de compuestos farmacológicamente activos a partir de los celenterados.

Entre los precursores se cuentan Beress y col. [29], quienes aislaron diversas toxinas (ATX I, II, III y IV) a partir de la *Anemonia sulcata*. Además, toda una serie de polipéptidos neurotóxicos y cardiotoxicos han sido purificados a lo largo de las últimas décadas por diversos investigadores, a partir de los tentáculos o del cuerpo de diferentes miembros de la clase Anthozoa [30, 31].

Cuba tiene una amplia plataforma insular, con una rica fauna marina muy bien representada por los grupos sistemáticos antes mencionados, lo que ha posibilitado a los científicos dedicarse con mucho éxito a la búsqueda de diferentes compuestos, incluyendo los neuroactivos [9, 32].

Entre las especies más estudiadas se encuentran, como ya se ha dicho, las anémonas pertenecientes al Phylum coelenterata, clase Anthozoa, subclase Zoantaria.

Las anémonas más utilizadas en nuestro país para diferentes investigaciones, especialmente relacionadas con toxinas de canales, han sido la *Stichodactyla helianthus*, la *Condylactis gigantea* y la *Bunodosoma granulífera*.

Específicamente se le ha prestado mayor interés a la *Bunodosoma granulífera* [33] de nuestras costas, porque se ha probado que los diferentes extractos, fracciones, etc., obtenidos de ella, tienen efectos sobre el SN de mamíferos y otros animales [34, 36].

Muchas de las toxinas aisladas de estos organismos han presentado afinidad por diferentes canales iónicos. Por ejemplo de la anémona *Stichodactyla helianthus* se han aislado toxinas muy importantes con afinidad por canales de potasio [37] y utilizado en investigaciones de esclerosis múltiple y enfermedades autoinmunes [38]. Particularmente en nuestro país se han realizado varios trabajos en este campo, con la referida anémona [39, 40].

También se logró aislar un nuevo tipo de toxina de canal de potasio (BgK), del mucus de la *Bunodosoma granulífera*, que fue la primera de este tipo aislada de un organismo marino, según Aneiros y col. [9] y que ha sido utilizada en diversas investigaciones [41, 42], otras toxinas de canal de potasio de anémonas, han sido reportadas [43, 44].

De la *Bunodosoma granulífera*, además, se han aislado toxinas con afinidad por canales de sodio, utilizadas en diferentes investigaciones [45, 46]. De la *Condylactis gigantea* también se han obtenido importantes toxinas de canales de sodio, utilizadas en diferentes investigaciones [47, 48].

Del cuerpo de la anémona *Bunodosoma granulífera* se han obtenido extractos que han sido investigados, dentro de los cuales se encuentra el etanólico (EEtBg), con fuerte acción sobre el SNC [49]. Este extracto constituye uno de los venenos más tóxicos y letales que se hayan obtenido de esta anémona [49], y un inductor de actividad epileptogénica muy fuerte, lo cual se corresponde con severos daños en áreas del hipocampo y otras estructuras cerebrales involucradas en los fenómenos de epilepsia, resultados que semejan, en gran medida, los encontrados al inyectar Ak por diferentes vías [12, 13].

A partir del EEtBg se obtienen tres fracciones por filtración en gel de sephadex G-50 [49]. La fracción 3 de dicho extracto resulta una de las más tóxicas, por lo que ha sido estudiada en ratas Wistar inyectadas en VL a una concentración de 1 µg. Las alteraciones histopatológicas provocadas por la misma han sido descritas mediante microscopía de luz, donde se ha observado en los encéfalos de los animales inyectados una severa necrosis neuronal que afecta fundamentalmente las células piramidales del hipocampo dorsal y ventral [36]. Mediante estudios realizados por microscopía electrónica, se han observado en particular los daños citoplasmáticos a nivel de los diferentes componentes de las mitocondrias y la formación de vacuolizaciones al parecer por daños a nivel del retículo endoplasmático [34, 35].

La similitud observada entre los resultados histopatológicos obtenidos con la F3 EEtBg y los referidos para el extracto, en cuanto a los daños necróticos específicos sobre las células piramidales del hipocampo, indican que al parecer el o los compuestos neurotóxicos que se encontraban en este último, se mantienen en la F3 EEtBg, lo cual ha sido de gran importancia, ya que con la purificación de dicha fracción se obtuvo la toxina de canal de potasio de nuevo tipo referida anteriormente [9].

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ando N., Morimoto K., Watanabe T., Ninomiya T., Suwaki H. (2004). Enhancement of central dopaminergic activity in the kainate model of temporal lobe epilepsy: implication for the mechanism of epileptic psychosis. *Neuropsychopharmacol* **29**(7):1251-1258.
2. Heida JG., Pittman QJ. (2005). Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat. *Epilepsia* **46**(12): 1906-1913.
3. Perez Y., Ratte S., Sanon N., Lapointe V., Lacaille JC. (2005). Cell type-specific changes in spontaneous and minimally evoked excitatory synaptic activity in hippocampal CA1 interneurons of kainate-treated rats. *Epilepsy Res.* **68**(3):241-254.
4. Tokuhara D., Sakuma S., Hattori H., Matsuoka O., Yamano T. (2007). Kainic acid dose affects delayed cell death mechanism after status epilepticus. *Brain Dev.* **29**(1):2-8.
5. Dong H., Csernansky CA., Chu Y., Csernansky JG. (2003). Intracerebroventricular kainic acid administration to neonatal rats alters interneuron development in the hippocampus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **145**(1): 81-92.
6. Howland JG., Hannesson DK., Phillips AG. (2004). Delayed onset of prepulse inhibition deficits following kainic acid treatment on postnatal day 7 in rats. *Eur J Neurosci* **20**(10): 2639-2648.
7. Parihar MS., Hemnani T. (2004). Experimental excitotoxicity provokes oxidative damage in mice brain and attenuation by extract of *Asparagus racemosus*. *J Neural Transm.* **111**(1): 1-12.
8. Breton P., Delamanche I., Buee J., Goudey-Perriere F., Perriere C. (2002). Evidence for a neurotoxic activity in crude venom of the stonefish (*Synanceia verrucosa*). *J Nat Toxins* **11**(4): 305-311.
9. Aneiros A., Garateix A. (2004). Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *J Chromatography B*, **803**: 41-53.
10. Garateix A., Salceda E., Aneiros A., Soto E. (2003). *Bunodosoma granulifera*: fuente de péptidos con acción sobre canales iónicos. *Avicennia*, **N 16**, 13-21.
11. McGeer EG., McGeer PL. (1981). Neurotoxins as tools in neurobiology. *International review of neurobiol.* **22**: 123-201.
12. Kemppainen EJ., Nissinen J., Pitkanen A. (2006). Fear conditioning is impaired in systemic kainic acid and amygdala-stimulation models of epilepsy. *Epilepsia* **47**(5):820-829.
13. Ledergerber D., Fritschy JM., Kralic JE. (2006). Impairment of dentate gyrus neuronal progenitor cell differentiation in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* **199**(1):130-142.
14. Taniura H., Sng JC., Yoneda Y. (2006). Histone modifications in status epilepticus induced by kainite. *Histol Histopathol* **21**(7):785-791.
15. Martin MV., Dong H., Bertchume A., Csernansky JG. (2005). Low dose quetiapine reverses deficits in contextual and cued fear conditioning in rats with excitotoxin-induced hippocampal neuropathy. *Pharmacol Biochem Behav.* **82**(2): 263-269.



16. Cosi C., Waget A., Rollet K., Tesori V., Newman-Tancredi A. (2005). Clozapine, ziprasidone and aripiprazole but not haloperidol protect against kainic acid-induced lesion of the striatum in mice, in vivo: role of 5-HT1A receptor activation. *Brain Res.* **1043**(1-2):32-41.
17. Csernansky JG., Martin MV., Czeisler B., Meltzer MA., Ali Z., Dong H. (2006). Neuroprotective effects of olanzapine in a rat model of neurodevelopmental injury. *Pharmacol Biochem Behav* **83**(2):208-213.
18. Sperk G. (1994). Kainic acid seizures in the rat. *Progress in Neurobiol* **42**: 1-32.
19. Lee H., Seo Y., Choi S., Kwon M., Shim E., Lee J., Suh H. (2005). Role of gamma-aminobutyric acid B (GABA (B)) receptors in the regulation of kainic acid-induced cell death in mouse hippocampus. *Exp Mol Med* **37**(6):533-545.
20. Hasegawa S., Yamaguchi M., Nagao H., Mishina M., Mori K. (2007). Enhanced cell-to-cell contacts between activated microglia and pyramidal cell dendrites following kainic acid-induced neurotoxicity in the hippocampus. *J Neuroimmunol* **186**(1-2): 75-85.
21. Rao MS., Hattiangady B., Reddy DS., Shetty AK. (2006). Hippocampal neurodegeneration, spontaneous seizures, and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Res* **83**(6):1088-1095.
22. Dong H., Csernansky CA., Goico B., Csernansky FG. (2003). Hippocampal Neurogenesis Follows Kainic Acid-Induced Apoptosis in Neonatal Rats. *J Neurosci* **23**(5):1742-1749
23. Bick-Sander A., Steiner B., Wolf SA., Babu H., Kempermann G. (2006). Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. *PNAS* **103**(10):3852-3857.
24. Abrous DN., Koehl M., Le Moal M. (2005). Adult Neurogenesis: From Precursors to Network1 and Physiology. *Physiol. Rev.* **85**(2):523-569.
25. Jin-Koo L., Seong-Soo C., Han-Kyu L., Ki-Jung H., Eun-Jung H., Hong-Won S. (2003). Effects of Ginsenoside Rd and Decursinol on the Neurotoxic Responses Induced by Kainic Acid in Mice. *Pharmacol Planta Med.* **69**: 230-234. DOI: 10.1055/s-2003-38475.
26. Pazos IF., Martinez D., Tejuca M., Valle A., del Pozo A., Alvarez C., Lanio ME., Lissi EA. (2003). Comparison of pore-forming ability in membranes of a native and a recombinant variant of Sticholysin II from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* **42**(6):571-578.
27. Honma T., Shiomi K. (2006). Peptide Toxins in Sea Anemones: Structural and Functional Aspects. *Mar. Biotechnol* **8**: 1-10.
28. MacPhail RC., Jarema KA. (2005). Prospects on behavioral studies of marine and freshwater toxins. *Neurotoxicol Teratol.* **27**(5):695-699.
29. Beress L., Beress R., Wunderer G. (1975). Purification of three polypeptides with neuro- and cardiotoxic activity from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Toxicon* **13**(5): 359-364.
30. Bruhn T., Schaller C., Schulze C., Sánchez J., Dannmeier C., Ravens U., Heubach J., Eckhardt K., Schmidtmayer J., Schmidt H., Aneiros A., Wachter E., Beress L. (2001). Isolation and characterization of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Toxicón* **39**(5):693-702.

31. Basulto A., Perez VM., Noa Y., Varela C., Otero AJ., Pico MC. (2006). Immunohistochemical targeting of sea anemone cytolytins on tentacles, mesenteric filaments and isolated nematocysts of *Stichodactyla helianthus*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* **305**(3):253-258.
32. Aneiros A., García I., Martínez JR., Morales A., Pérez M., Acosta K., Cuquerella E., Alvarez M., Marrero M., Jomarrón L., Harvey A., Engström A., Karlsson E. (1998). Diversidad de propiedades biológicamente activas en la secreción de la anémona *Bunodosoma granulifera*. Fondo Nac. de Manuscritos de C. y Técnica. *Biblioteca Nac. de C. y Tecnología*, No. de registro **96135**, 8 pp.
33. Herrera A. (1982). Las Anémonas Marinas I. *Mar y Pesca* **189**: 36-39.
34. Concepción AR., del Vallín T., Aneiros A. (1998). Electron microscopy study of rats' hippocampus injected with different neurotoxins. *XIV Congreso Internacional de Microscopía Electrónica, Simposio XX*, Vol.1: 807-808.
35. Concepción AR., de la Peña R. (2005). Electron microscopy study of rats' hippocampus injected with *Bunodosoma granulifera* toxic fraction. *VII Congreso Interamericano de Microscopía Electrónica, La Habana, Cuba*.
36. Concepción AR. Tesis para optar por el título de Maestro en Ciencias, 2001. Evaluación Neurohistológica de una fracción tóxica (f3), de la anémona marina *Bunodosoma granulifera*. CNIC, Cuba.
37. Pennington MW., Lanigan MD., Kalman K., Mahnir VM., Rauer H., McVaugh CT., Behm D., Donaldson D., Chandy KG., Kem WR., Norton RS. (1999). Role of disulfide bonds in the structure and potassium channel blocking activity of ShK toxin. *Biochemistry* **38**: 14549-14558.
38. Norton RS., Pennington MW., Wulff H. (2004). Potassium channel blockade by the sea anemone toxin ShK for the treatment of multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *Curr. Med. Chem.* **11**: 3041-3052.
39. Castañeda O., Sotolongo V., Amor AM., Stochlin R., Anderson A., Harvey A., Engström A., Wernstedt Ch., Karlsson E. (1995). Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicón* **33**: 603-615.
40. Pico MC., Basulto A., del Monte A., Hidalgo A., Lanio E., Alvarez C., Felico E., Otero A. (2004). Cross-reactivity and inhibition of haemolysis by polyclonal antibodies raised against St II, a cytolytin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicón* **43**(2):167-171.
41. Braud S., Belin P., Dassa J., Pardo L., Mourier G., Caruana A., Priest BT., Dulski P., Garcia ML., Menez A., Boulain JC., Gasparini S. (2004). BgK, a disulfide-containing sea anemone toxin blocking K⁺ channels, can be produced in *Escherichia coli* cytoplasm as a functional tagged protein. *Protein Expr Purif.* **38**(1):69-78.
42. Garateix A. (2005). El mar: fuente de nuevos fármacos. *Elementos No. 58, Abril -junio* **12**: 39-47.
43. Messerli SM., Greenberg RM. (2006). Cnidarian Toxins Acting on Voltage-Gated Ion Channels. *Marine Drugs* **4**, x-x ISSN 1660-3397 Review, Special Issue on "Marine Drugs and Ion Channels" Edited by Hugo Arias.
44. Diochot S., Loret E., Bruhn T., Beress L., Lazdunski M. (2003). APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *Mol Pharmacol* **64**: 59-69.



- [45.](#) Salceda E., Garateix A., Soto E. (2002). The Sea anemone toxins BgII and BgIII prolong the inactivation time course of the tetrodotoxin-sensitive sodium current in rat dorsal root ganglion neurons. *Pharmacol Exp Therapeutics* **303**(3): 1067-1074.
- [46.](#) Smith JJ., Blumenthal KM. (2007). Site-3 sea anemone toxins: Molecular probes of gating mechanisms in voltage-dependent sodium channels. *Toxicon* **49**(2): 159-170.
- [47.](#) Salceda E., Pérez-Castells J., Opez-Méndez B., Garateix A., Salazar H., Opez O., Aneiros A., Ludger L., Béress L., Forssmann W., Soto E., Jiménez-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 II toxins, as well as distinctive structural and functional properties. *Biochem J* **406**: 67–76. doi:10.1042/BJ20070130 67
- [48.](#) Ständker L., Béress L., Garateix A., Christ T., Ravens U., Salceda E., Soto E., John H., Forssmann WG., Aneiros A. (2006). A new toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation. *Toxicon* **48**(2):211-220.
- [49.](#) García-Alonso I., Aneiros A., Acosta K., Rovnij N., Manso M., Llanio M. (1992). Study of the biotoxins from the anemone *Bunodosoma granulífera*. Ethanol extracts. *Physiopathol. of nervous system: Proceedings of the second conference*. Ed. Academia. La Habana, 59-63.

