

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN CIENCIAS DE LA VIDA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE TOXINAS DE *Anthopleura* sp Y
TRES CARACOLES MARINOS DEL GÉNERO *Conus* CON EFECTO EN LA
RESPUESTA NOCICEPTIVA**

TESIS

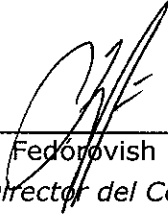
que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

SAMANTA MIREYA JIMÉNEZ FLORES

Ensenada, Baja California, México, Diciembre del 2011.

TESIS DEFENDIDA POR
SAMANTA MIREYA JIMÉNEZ FLORES
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

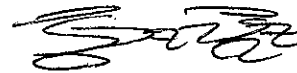


Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director del Comité




Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez

Miembro del Comité



Dra. Idania Valdéz Vázquez

Miembro del Comité



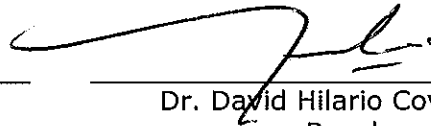
Dra. María Teresa Viana Castrillón

Miembro del Comité



Dra. Rufina Hernández Martínez

*Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias de la Vida*



Dr. David Hilario Covarrubias
Rosales


Director de Estudios de Posgrado

15 de Diciembre de 2011

RESUMEN de la tesis de **SAMANTA MIREYA JIMÉNEZ FLORES**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS DE LA VIDA CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Octubre del 2011.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE TOXINAS DE *Anthopleura* sp Y TRES CRACOLES MARINOS DEL GÉNERO *Conus* CON EFECTO EN LA RESPUESTA NOCICEPTIVA

Resumen aprobado por:



Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de Tesis

Dentro del veneno de la anémona *Anthopleura* sp y de los caracoles marinos del género *Conus*, existen toxinas con capacidad para bloquear los canales iónicos. Los canales iónicos dependientes de voltaje participan en muchos eventos fisiológicos, entre ellos, la transmisión de impulsos nocivos, mediante la propagación del potencial de acción y la liberación de neurotransmisores. El dolor nociceptivo es un padecimiento que afecta a una gran parte de la población. Los analgésicos utilizados en la terapia del dolor, tienen efectos secundarios dañinos para el paciente y se utilizan frecuentemente de manera combinada para generar alivio.

En el presente trabajo se purificó por medio de cromatografía de exclusión molecular y cromatografía líquida de alta presión de fase reversa (HPLC-RP), fracciones del veneno de *Anthopleura* sp y *Conus ximenes*. Se evaluó la actividad analgésica a los péptidos puros, provenientes del veneno de *Conus regularis* y *Conus californicus*, con actividad en canales de calcio previamente reportada. Las fracciones se analizaron mediante ensayos biológicos para evaluar el efecto analgésico periférico en dos modelos, para dolor agudo sobre la placa caliente ("hot-plate") y para el dolor persistente por inflamación, con la prueba de la formalina. Se observó la actividad analgésica periférica en la fracción llamada ASP7, proveniente del veneno de *Anthopleura* sp. En el péptido puro CRP20a proveniente del veneno de *C. regularis*, se encontró una eficiente actividad analgésica en ambos ensayos biológicos. Para la fracción CXF10, aislada del veneno de *C. ximenes*, se observó actividad analgésica en la prueba de la placa caliente. Las subfracciones CXF10 se repurificaron y analizaron, sin embargo, a la fecha, no se puede concluir sobre un posible efecto analgésico. Para los péptidos sintéticos CCP1, CCP2, provenientes del veneno de *C. californicus*, no se encontró actividad analgésica de manera periférica.

Palabras Clave: *Conus*, *Anthopleura* sp, transmisión nociceptiva, canales iónicos, analgésicos.

ABSTRACT of the thesis presented by **SAMANTA MIREYA JIMÉNEZ FLORES** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Science of Life, Marine Biotechnology Orientation. Ensenada, Baja California, México October, 2011.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TOXINS FROM *Anthopleura* sp AND THREE CONE SNAILS OF *Conus* WITH EFFECT IN NOCICEPTIVE RESPONSE

In the venom from the anemone *Anthopleura* sp as well as from the marine cone snails there are toxins with the capacity of blocking ion channels. The voltage gated ion channels are involved in the transmission of noxious impulses through the release of neurotransmitters. The nociceptive pain is a condition that affects a large proportion of the population. where the analgesics are used as pain therapy. Despite to the pain relief, most analgesics show secondary effects for the patient and are frequently used in a combination to generate relief.

In the present study the toxic fraction from the venom of *Anthopleura* sp y *Conus ximenes* were purified by molecular exclusion chromatography and Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC-RP). We evaluate the analgesic effect from the pure peptides from *Conus regularis* y *Conus californicus*, with calcium ion channel activity, previously reported. These fractions were analyzed through biological tests to evaluate the peripheral analgesic activity (PAA) with two models. The acute pain (AP) was evaluated with the hot-plate test whereas the persistent pain (PP) the formalin test was used. The PPA was observed in the AsP7 isolated from *Anthopleura* sp. In the pure peptide CRP20a from the venom of *C. regularis* analgesic activity was found. We observe analgesic effect in the fraction CXF10 isolated from the venom of *C. ximenes* by the hot-plate test; however after repurification it cannot be conclude their possible analgesic effect. For the synthetic peptides CPP1, CPP2 from the venom *C. californicus*, there was no analgesic activity found in a peripheral.

Keywords: toxins, *Conus*, *Anthopleura* sp, noxious stimuli, nociceptive transmission, ion channels, analgesics.

Dedicatoria

Esta tesis es para mi persona favorita en todo el mundo.

Eres el mejor regalo que la vida me ha dado, eres quien me levanta, quien me sostiene, quien
saca lo mejor de mí para seguir el camino, juntitas como un combo.

Eres un oasis, eres perfecta.

Agradecimientos Académicos

Al **CONACYT** por otorgarme la beca de Maestría en el periodo de Agosto del 2009 a Agosto del 2011.

Al **CICESE** por facilitar la terminación del presente trabajo de tesis.

Al **Dr. Alexei F. Licea Navarro**, por creer en mí, por permitirme estar en su equipo y por darme la oportunidad de realizar este hermoso proyecto.

A mis sinodales, el **Dr. Carlos Brizuela**, por el interés en el tema, por estar siempre disponible. A la **Dra. Idania Valdez** por su comprensión, por su apoyo y a la **Dra. Teresa Viana**, por sus correcciones, por ayudarme con sus comentarios a la buena escritura de la tesis, gracias.

Al **M.C. Eduardo Morales**, por ayudarme con la purificación del veneno, por su disponibilidad en el HPLC. A la **Dra. Edna Sánchez**, por enseñarme a trabajar, por ayudarme siempre en el laboratorio. A las **M.C. Johanna Bernáldez** y **M.C. Karla Cervantes**, por compartir su experiencia y sabiduría en el manejo de los venenos.

Al **Dr. Gerardo Corzo**, por aceptarme en su laboratorio y guiarme durante mi estancia. Al **Dr. Possani** y su equipo de trabajo por permitirme estar en su laboratorio, en sus seminarios, gracias por compartir con el mundo su conocimiento. Al **M.C. Guillermo Barraza** por su gran apoyo durante los ensayos, por su tiempo y su trabajo, gracias.

A todo el personal académico y administrativo que hicieron de mi estancia en CICESE, toda una aventura de crecimiento personal y aprendizaje científico, gracias.

Agradecimientos personales

A **Díos**, por ponerme donde debo estar, al tiempo que debo estar, con quienes debo estar.

A mi jefe, el **Doc Alexei**, por su amistad, por su dedicación, por su confianza, por darme este proyecto que significó tanto para mí, gracias.

A mi chaparrita hermosa, **Elim Sofia**, te amo con todo mi corazoncito. Gracias por tu compañía durante las colectas, seminarios, horas de empaquetado de columna, por aguantar mis histerias... gracias por ser mi media manzana.

A mis **papás**, por todo, simplemente no tengo palabras, ni como agradecer todo el amor, cuidado y entrega absoluta de su parte. Al **Toí**...te amamos mensín!!

A mi **familia**, que si los menciono a todos, necesitaría otra tesis. A mis primos, que realmente son mis hermanos. A mis tíos y tías, por su apoyo incondicional. A mis abuelitos, a Mariela (y familia), gracias por prestarme su casa en Morelos. A las gemelas, a Lidia (por sacarme libros de la biblia). A **Marco**, por los buenos tiempos, por ser un papá muy divertido.

A mis amigas **Ana**, mi amigocha, por tus consejos, por sufrir mis penas y festejar mis alegrías. A **Loris**, por soltarme de Nutri (contra su voluntad) por ser el mejor ejemplo de lo que una mujer puede lograr. A mi amiguís **Hanna**, por animarme a llegar hasta aquí, por su ejemplo de dedicación y pasión por la ciencia; por su fortaleza, por el cafecito y chismes incluidos, por ser mi familia en Ensenada.

A todos mis amigos del labo: **Edna** (por su paciencia, por su ayuda invaluable dentro y fuera del labo), **Karlita** (por sus comidas victoriosas, por prestarme su tele con cable y wii), **Félix** (por estar ahí, porque aprendió a empacar columnas igual que yo), **Andrea** (por su amistad, por TODO el apoyo), **Jairo** (por los conciertos..jeje), **Laura**, **Flor** (por ayudarme con las tareas de la Sofí y más), **Leo** (por escuchar), **Ana**, **Agente T**, **Abraham**. Gracias por ser nuestros amiguítos y compañeros de viaje, los queremos mucho, mucho!!

Gracias a todo el equipo del Doc Alexei (Carmen, Mayra, Mimi, Ricardo, Paola, Erika, Pavel, Tania, David, Jenifer, Elia, Irasema) por dejar que el seminario fuera la hora de la siesta (de Sofia). A todos los que se estropearon el manicure y pasaron frios durante las colectas, **Ada**, **Andrea**, **Karlita**, **Ramón**, **Mimi**, **Ricardo**, **Mayra**, **Ángles**, **Jennifer**, fué divertido, que no?

A mis compañeros del labo del Dr. Possani, **Memo** (por tu paciencia, no sé que hubiera hecho sin tí, mil gracias), **Mary** (por enseñarme a manejar a los ratones), **Irán**, **Lorenzo**, **Rosbi**, **Nene** (porque hicieron de mi estancia una aventura de aprendizaje y amistad).

A todas las personas que han estado en mi vida, a las que se adelantaron.

“No solo no hubiera sido nada sin ustedes, sino con toda esa gente, que hasta hoy...sigue. Gracias, totales”

G.C.

MANZANA.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos Académicos.....	vi
Agradecimientos personales.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABLAS.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1. Características generales de <i>Anthopleura</i> sp.....	3
II.2. Aparato venenoso.....	4
II.3. Toxinas de anémonas y su efecto fisiológico	6
II.4. Características del género <i>Conus</i>	7
II.5. Aparato venenoso.....	8
II.6. <i>Conus ximenes</i> (Gray, 1839).....	10
II.7. <i>Conus regularis</i> (Sowerby, 1841)	11
II.8. <i>Conus californicus</i> (Hinds, 1844).....	11
II.9. Composición del veneno del género <i>Conus</i>	12
II.10. Genética de las conotoxinas.....	12
II.11. Clasificación de las conotoxinas.....	14
II.12. Canal de sodio dependiente de voltaje y respuesta fisiológica.....	15
II.13. Canal de calcio dependiente de voltaje y respuesta fisiológica	16
II.14. Neurotransmisión y neurotoxinas	18
II.15. Fisiología y tratamiento del dolor.....	21

ÍNDICE GENERAL (continuación)

III. JUSTIFICACIÓN.....	25
IV. HIPÓTESIS.....	26
V. OBJETIVOS	27
V.1 Objetivo general	27
V.2. Objetivos específicos	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	28
VI.1 Colecta de organismos.....	28
VI.1.1 <i>Anthopleura</i> sp.....	28
VI.1.2 <i>C. ximenes</i> , <i>C. regularis</i> y <i>C. californicus</i>	28
VI.2. Obtención del veneno total.....	29
VI.2.1. <i>Anthopleura</i> sp.....	29
VI.2.2. <i>C. ximenes</i>	30
VI.2.3. <i>C. regularis</i> y <i>C. californicus</i>	30
VI.3. Cuantificación de veneno total	31
VI.3.1. <i>Anthopleura</i> sp.....	31
VI.3.2. <i>C. ximenes</i> , <i>C. regularis</i> y <i>C. californicus</i>	31
VI.4. Aislamiento de las toxinas.....	32
VI.4.1. <i>Anthopleura</i> sp.....	32
VI.4.2. <i>C. ximenes</i>	34
VI.4.3 Purificación del veneno de <i>C. regularis</i> y <i>C. californicus</i>	35
VI.5. Ensayos biológicos.....	36
VI.5.1. "Hot-plate"	36
VI.5.2 Prueba de la formalina.....	37
VI.5.3. Disposición de los organismos utilizados en las pruebas biológicas.	38
VI.6. Análisis de los datos.....	39
VI.6.1. "Hot-plate"	39
VI.7.2. Prueba de la formalina.....	39

ÍNDICE GENERAL (continuación)

VII. RESULTADOS	41
VII.1 <i>Anthopleura</i> sp	41
VII.1.1 Colecta de Organismos	41
VII.1.2. Obtención y cuantificación de veneno total.....	41
VII.1.3. Purificación y caracterización del veneno	42
VII.2. <i>C. ximenes</i>	50
VII.2.1. Colecta de organismos, obtención y cuantificación de veneno total.....	50
VII.2.2. Purificación y caracterización del veneno	51
VII.3. Caracterización de toxinas de <i>C. regularis</i>	57
VII.3.1. "Hot-plate" para CRP20a, péptido obtenido del veneno de <i>C.</i>	57
VII.3.2. Prueba de la formalina para CRP20a	58
VII.4. Caracterización de toxinas de <i>C. californicus</i>	59
VII.4.1. "Hot-plate"	59
 VIII. DISCUSION	 61
VIII.1 Colecta de <i>Anthopleura</i> sp	61
VIII.1.2. Caracterización de toxinas de <i>Anthopleura</i> sp con efecto analgésico	61
VIII.2. Caracterización de toxinas de <i>C. ximenes</i> con efecto analgésico	63
VIII.3. Caracterización de toxinas de <i>C. regularis</i> con efecto analgésico.....	64
VIII.4. Caracterización de toxinas de <i>C. californicus</i> con efecto analgésico.....	66
 IX. CONCLUSIONES	 67
 X. PERSPECTIVAS	 68
 XI. REFERENCIAS	 70
 XII. ANEXOS	 78

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Organismos del filo Cnidaria.	3
2. Esquema del corte transversal de un pólipo de antozoario.....	4
3. Esquema de nematocistos.	5
4. Conchas de tres especies de <i>Conus</i> que habitan en la región.	8
5. Esquema del aparato venenoso del género <i>Conus</i>	10
6. Precursor peptídico característico de las conotoxinas	13
7. Diagrama organizacional de las conotoxinas.	15
8. Canal de calcio dependiente de voltaje (VGCC)..	17
9. Transmisión de estímulos nocivos.	19
10. Escalera analgésica según la OMS.	23
11. Cromatografía de Exclusión Molecular para As I.4.	43
12. "Hot-plate" de <i>Anthopleura</i> sp.	45
13. Cromatograma de la repurificación de AsI.4 F3.	46
14. "Hot-plate" de las subfracciones AsI.4 F3.	48
15. Prueba de la formalina para <i>Anthopleura</i> sp.	50
16. Cromatograma de la purificación del veneno total de <i>C. ximenes</i>	51

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
17. "Hot-plate" de veneno total de <i>C. ximenes</i>	54
18. Cromatograma de la repurificación de la fracción CXF10.....	55
19. Prueba de la formalina para las subfracciones de CX10.	56
20. "Hot-plate" del péptido CRP20a aislado de <i>C. regularis</i>	57
21. Prueba de la formalina para <i>C. regularis</i>	58
22. "Hot-plate" para dos péptidos sintéticos de <i>C. californicus</i>	59

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Clases principales de toxinas de anémonas	6
II. Cuantificación de veneno total <i>Anthopleura</i> sp.	42
III. Cuantificación de las fracciones de Asl.4	43
IV. Cuantificación de las fracciones de <i>Anthopleura</i> sp.	44
V. Cuantificación de las subfracciones de Asl.4 F3	47
VI. Dosis de AsP7 utilizadas en "hot-plate"	47
VII. Cuantificación de las fracciones del veneno total de <i>C. ximenes</i>	52
VIII. Dosis de <i>C. ximenes</i> utilizada en "hot-plate"	53
IX. Concentración de CX10 utilizadas en la prueba de la formalina.....	56

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, las toxinas provenientes de animales marinos han cobrado interés especial, ya que son importantes en el estudio de la estructura, mecanismo, diferenciación y efectos fisiológicos de los canales iónicos. Un ejemplo de ello son las toxinas del género *Conus*, así como las del filo Cnidaria, y entre las más estudiadas se encuentran las de los Antozoarios.

El potencial farmacológico de las toxinas de anémonas y de los caracoles marinos del género *Conus*, se debe a la acción bloqueadora o moduladora sobre los canales iónicos, implicados en varias canalopatías y eventos fisiológicos, como la transducción del dolor (Cestèle y Catteral, 2000; Wanke *et al.*, 2009; Motin y Adams, 2008; Wang *et al.*, 2006). Existen toxinas de anémonas que actúan como bloqueadoras del canal de sodio dependiente de voltaje (VGSC por sus siglas en inglés) en células neuromusculares, que participan en la transmisión de impulsos nociceptivos (Sūput, 2009). Dentro del género *Conus* existen toxinas que tienen como blanco de acción, los canales de calcio, los cuales son, dependientes de voltaje (VGCC por sus siglas en inglés) y participan en la liberación de segundos mensajeros dentro de la cascada de transmisión de señales nocivas. (Motin y Adams, 2008).

El dolor se clasifica dependiendo el origen del estímulo doloroso, en nociceptivo y neuropático (Lawson y Wallace, 2010); así como por su duración en agudo y crónico. En Estados Unidos, se estima una prevalencia de dolor crónico del 17% durante la atención primaria. Si bien no se tienen datos estadísticos acerca de la prevalencia del dolor en México, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) ha reportado que el 5% de los pacientes atendidos por médicos de primer contacto, presentan padecimientos dolorosos crónicos (Covarrubias-Gómez *et al.*, 2010). La

Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una escalera analgésica, donde el primer escalón corresponde al dolor leve y el escalón 3 corresponde a dolor crónico (Poggi e Ibarra, 2007). Los fármacos que se utilizan en el tratamiento del dolor durante la atención primaria son: analgésicos no opioides, antiinflamatorios (primer escalón), analgésicos opioides débiles (segundo escalón) y opioides fuertes (tercer escalón). En el manejo del dolor con analgésicos, existen limitantes debido a los efectos secundarios que se presentan, como la tolerabilidad y habituación, en el caso de los analgésicos opioides.

En el presente trabajo se analizaron toxinas provenientes de la anémona *Anthopleura* sp y del caracol marino *Conus ximenes* en modelos murinos para evaluar su efecto analgésico de manera periférica. De igual manera se evaluó el efecto analgésico de péptidos puros, aislados de los venenos de *Conus regularis* y *Conus californicus*, previamente caracterizados como bloqueadores de canales de calcio.

II. ANTECEDENTES

II.1. Características generales de *Anthopleura* sp

Anthopleura sp es un invertebrado que pertenece al filo Cnidaria que incluye medusas, corales, esponjas, plumas de mar y anémonas. Existen hasta el momento 11,000 especies registradas en este filo, en la Figura 1 se muestran algunas de ellas (Brusca y Brusca 2003).

Anthopleura sp pertenece a la clase Anthozoa que comprende tres subclases: Hexacoralia, Cubozoa y Octocoralia. *Anthopleura* sp es un organismo exclusivamente marino que se encuentra tanto en aguas profundas como en la zona intermareal, tiene una extensión continua que va desde California hasta Baja California (Smith y Potts, 1987). Las regiones arenosas o rocosas son la primera elección de hábitat para *Anthopleura* sp.

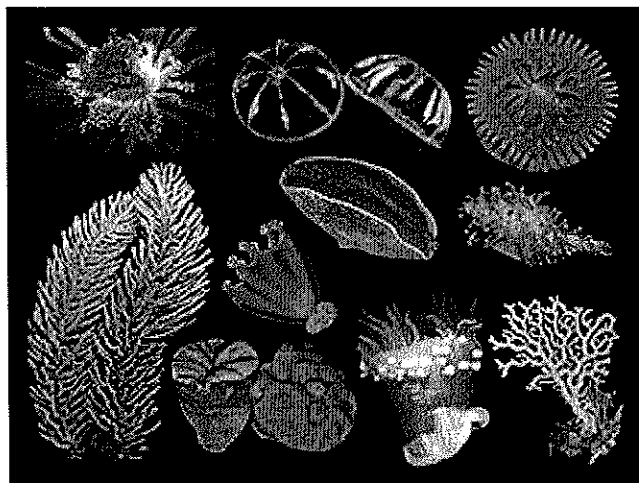


Figura 1. Organismos del filo Cnidaria que comprenden medusas, corales y anémonas (obtenida de www.beim.us.es).

Los pólipos de las anémonas tienen un eje longitudinal oral-aboral con simetría birradial. Comprenden estructuras tubulares con una capa externa y la epidermis compuesta de células de epitelio muscular. En la terminación aboral se encuentra el disco pedal con el cual se adhieren al sustrato, que puede ser arenoso o rocoso. La boca en forma de disco se rodea de tentáculos dispuestos usualmente en múltiplos de seis, que participan en la captura de presas o como defensa (Figura 2). Las anémonas se caracterizan por poseer múltiples tentáculos cónicos, digitiformes o ramificados concéntricos a la boca, generalmente en múltiplos de seis. Carecen de una cubierta corporal y viven de manera solitaria o clonal (Brusca y Brusca 2003).

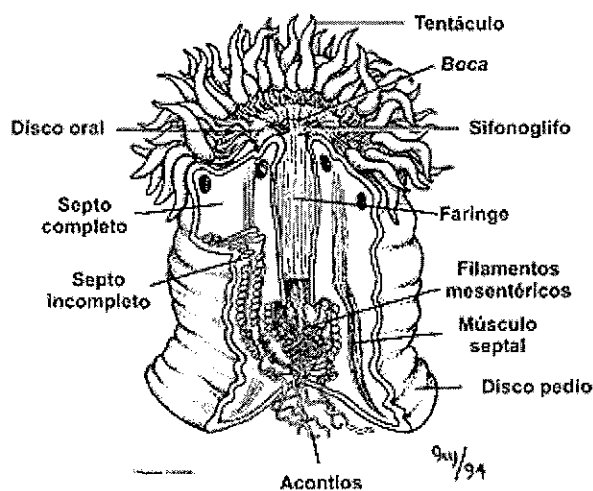


Figura 2. Esquema del corte transversal de un pólipo de antozoario. Los antozoarios se caracterizan por poseer múltiples tentáculos concéntricos a la boca y un disco pedal con el que se adhieren al sustrato (obtenida de www.asturnatura.com).

II.2. Aparato venenoso

Los cnidarios poseen estructuras punzantes o adhesivas, llamadas cnidae, tienen funciones diferentes incluyendo captura de presas, defensa, locomoción y

adhesión. Se producen en células llamados cnidoblastos, que se desarrollan a partir de las células intersticiales en la epidermis y en muchos grupos, de la gastrodermis. Una vez que la cnida se forma completamente se le llama cnidocito. Los cnidae de antozoarios carecen de cnidocil, que es un mecanoreceptor en forma de cilio que al ser estimulado descarga el nematocisto; en lugar de cnidocil poseen una hoja apical tripartita (Brusca y Brusca 2003).

Los cnidocitos son más abundantes en la epidermis de la región oral y sobre todo en los tentáculos donde a menudo se les llama "baterías de nemastocistos" (Brusca y Brusca 2003).

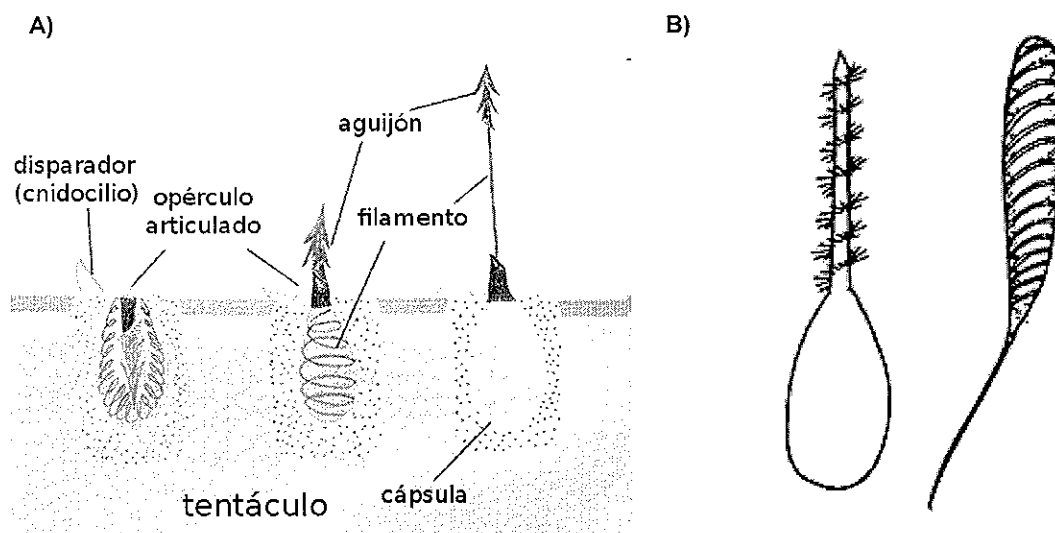


Figura 3. Esquema de nematocistos. A) Se observa la ubicación de los nemastocistos, se concentran en la epidermis, sobre todo de la región oral, en los tentáculos (tomado de herramientas.educa.madrid.org). B) Esquema que muestra la diferencia entre un nematocisto (izquierda) y un espirocisto (derecha), difieren principalmente en la forma, la cápsula y la ornamentación del flagelo (Tomado de <http://www.invemar.org.co>).

Se han descrito unas 30 clases de cnidae. Los antozoarios poseen **espirocistos** (Fig. 3 B), con cápsulas de pared única que contienen mucoproteínas o glucoproteínas, los túbulos adhesivos se enrollan y adhieren a la víctima en lugar de penetrarla (Brusca y Brusca 2003).

II.3. Toxinas de anémonas y su efecto fisiológico

Las toxinas que conforman el veneno de las anémonas actúan sobre canales iónicos, aunque las hay también con actividad citolítica e inhibidoras de proteasas. Las dos clases de toxinas provenientes de anémonas mejor caracterizadas, son las toxinas de 5 kDa, que actúan uniéndose a los canales iónicos dependiente de voltaje y las citolisinas de 18-20 kDa, formadoras de poros en la membrana de las células (Norton, 2009). Para una mejor clasificación de las toxinas se han dispuesto en grupos conforme su tamaño y función efectora (Tabla I).

Tabla I. Clasificación de las toxinas de anémonas y su blanco de acción (tomada de Norton, 2009)

Clase	Toxina	Especie	Blanco	
Toxinas canal Na ⁺ Largas Tipo 1	ATX I (As I)	<i>Anemonia sulcata</i>	Na _v 1	
	Anthopleurina A	<i>A. xanthogrammica</i>	Na _v 1	
	Anthopleurina B	<i>A. xanthogrammica</i>	Na _v 1	
	CgNa	<i>Condylactis gigantea</i>	Na _v 1	
Largas Tipo 2	ShI	<i>Stichodactyla helianthus</i>	Na _v 1 (cangrejo)	
Cortas Tipo 3	ATX III (As III)	<i>Anemonia sulcata</i>	Na _v 1 (cangrejo)	
Otras	APETx2	<i>A. elegantissima</i>	ASIC3	
Toxinas canal K ⁺	ShK	<i>Stichodactyla helianthus</i>	Kv1, IKCa	
	BgK	<i>Bunodosoma granulifera</i>	Kv1, IKCa (molusco)	
	BDS-1	<i>Anemonia sulcata</i>	Kv3.4	
Actinioporinas	APTEx1	<i>A. elegantissima</i>	HERG	
Inhibidoras de Fosfatasa	Equinatoxina II	<i>Actinia equina</i>	Membranas esfingomielina	c/
	Sticholisina II	<i>Stichodactyla helianthus</i>	Membranas esfingomielina	c/

Las toxinas de anémona tienen un amplio espectro de respuestas, que en general se pueden interpretar como ganancia de función, esto es por el efecto de duración

del potencial ya que siempre produce cambios en la actividad de los tejidos excitables (Wanke *et al.*, 2009).

La actividad paralítica y letal del veneno de las anémonas fue investigada por Murayama y colaboradores (1972), quienes demostraron que la fracción tóxica de la anémona *Condylactis gigantea*, causa un retraso en el cierre de la corriente de sodio en el axón gigante de crustáceos. La apertura continua de los canales de sodio sensibles al voltaje (Navs) causan la hiperpolarización de la membrana, con la consecuente entrada de calcio y la prolongación de la fuerza contráctil (Moran *et al.*, 2009).

II.4. Características del género *Conus*

Los caracoles marinos (familia Conidae) son moluscos gasterópodos del género *Conus*, que comprende alrededor de 500 a 700 especies reportadas a la fecha. Se distribuyen ampliamente en los mares tropicales (Duda y Kohn, 2005; Han *et al.*, 2007). Algunas especies se han adaptado a aguas frías, pueden ser encontradas a profundidades mayores a los 100 metros (m). Habitan en los sustratos arenosos, rocosos, camas de pastos marinos o adheridos a rocas (Díaz *et al.*, 2005).

Los *Conus* se caracterizan por mostrar conchas cónicas, de diversos colores y patrones llamativos; con variación de tamaño, que en los ejemplares adultos, va desde uno hasta los 22 cm (Röckel *et al.*, 1995). Los cónidos son, en su mayoría, de hábitos nocturnos que cuentan con un par de ojos, pero su visión es pobre y se considera que son quimiosensitivos (Terlau y Olivera, 2004).

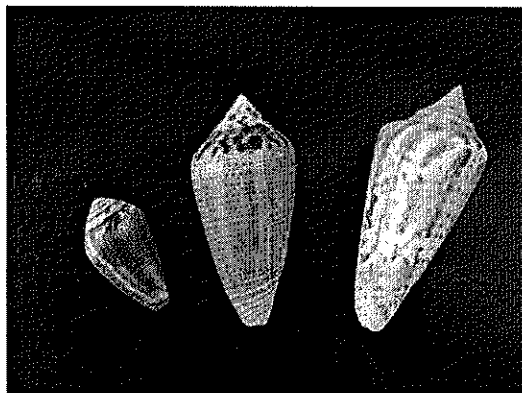


Figura 4. Conchas de tres especies de *Conus* que habitan en las costas de Baja California. De izquierda a derecha; *C. californicus*, habita en la región intermareal del Océano Pacífico; *C. ximenes* y *C. regularis*, habitan en la región intermareal del Golfo de California y costa del Océano Pacífico.

Las cónidos pueden clasificarse de acuerdo al tipo de alimentación en tres grupos; los vermívoros, que constituyen al grupo con más especies reportadas, se alimentan principalmente de poliquetos, pero pueden alimentarse de hemicordados y equiuridos; los llamados moluscívoros, en donde se estima que hay alrededor de 70 especies y se alimentan de otros gasterópodos; y por último, los piscívoros, que constituyen el grupo de cónidos mejor caracterizado. Los *Conus* piscívoros se dividen en dos grupos, de acuerdo a su estrategia de caza: 1) "línea y anzuelo" son aquellos conos marinos que utilizan su probósida larga y su diente en forma de arpón para capturar un pez; 2) "pesca con redes" se refiere a aquellos *Conus* que distienden su boca para atrapar peces, antes de que sean inyectados con veneno por el diente radular (Olivera, 1997).

II.5. Aparato venenoso

Los conos marinos desarrollaron un mecanismo especializado para la caza y captura de sus presas, el cual también les es útil como defensa y competencia. El aparato venenoso (Figura 5), consiste principalmente en un conducto, donde el veneno es sintetizado y almacenado; un bulbo venenoso, que se cree sirve para

impulsar el veneno desde el conducto; la probóscide y una modificación de un diente radular hueco que funciona como aguja hipodérmica con el que inyectan el veneno (Norton y Olivera, 2006).

La producción del veneno y la manera en que es inyectado a la presa, se da básicamente en tres pasos:

1) Síntesis, proceso y plegamiento de las toxinas ocurre en el conducto venenoso. El extremo proximal del conducto está provisto de un músculo, el bulbo. El extremo distal del conducto entra a la faringe, justo antes del esófago. Los dos extremos, proximal y distal difieren en grosor y en contenido venenoso. La síntesis, modificaciones post-traduccionales y formación de gránulos venenosos permanece incierta. Se piensa que estos gránulos participan en la síntesis de las toxinas, pero no hay evidencia contundente de que contengan péptidos activos (Marshall *et al.*, 2002).

2) Generación y almacenamiento del diente radular y la transferencia de éste hacia la punta de la probóscide. Los dientes son generados y almacenados en el saco radular. Cuando se utiliza un diente, se transporta individualmente hacia la faringe. En este momento, el diente se encuentra vacío, sin veneno. El veneno se desplaza hacia la faringe directamente desde el conducto venenoso, al menos así ocurre en *C. californicus*. Finalmente la probóscide se extiende con el diente radular cargado de veneno (Kohn *et al.*, 1960; Marsh, 1997; Marshall *et al.*, 2002).

3) Inserción del diente en la presa e inyección del veneno. El bulbo venenoso es un músculo que se cree provee la fuerza para el disparo del diente y la consecuente inyección del veneno (Olivera, 1997), sin embargo algunos autores consideran que sería más factible que el músculo de la probóscide diera la fuerza necesaria para la inyección del veneno (Kohn y Hunter, 2001; Marshall *et al.*, 2002; Stewart y Gilly, 2005).

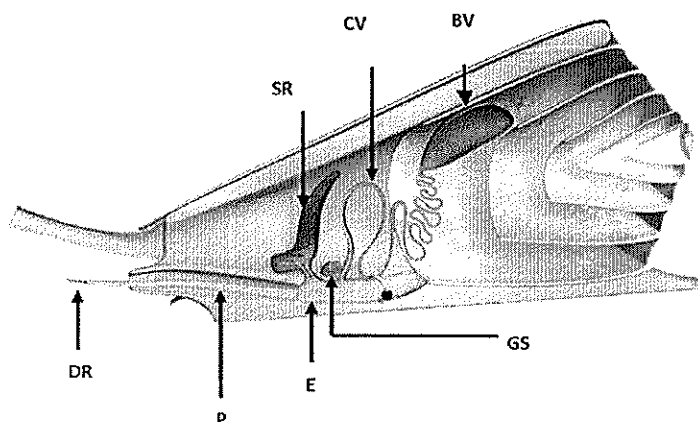


Figura 5. Esquema del aparato venenoso del género *Conus*. Las partes que lo conforman son: diente radular (DR), probósido (P), saco radular (SR), esófago (E), conducto venenoso (CV), glándula salival (GS) y bulbo venoso (BV) (Modificada de Olivera *et al.*, 2002)

Los cónidos son considerados como unos de los animales marinos más exitosos en términos evolutivos, esto se atribuye al desarrollo de venenos con toxinas especializadas, que utilizan para diversos propósitos, así como su sistema eficiente de inyección de veneno.

II.6. *Conus ximenes* (Gray, 1839)

Los ejemplares de *C. ximenes* se caracterizan por poseer conchas de color marfil con puntos o manchas marrón arreglados de manera lineal con orientación vertical, con una abertura de color lavanda. El tamaño de las conchas varía entre 17 hasta 40 mm de longitud. Se distribuyen desde las costas de Baja California, México llegando hasta Panamá. A pesar de que su biología no se ha descrito a fondo; se sabe que habita en terrenos arenosos, por lo que podría alimentarse de poliquetos y otros gusanos. Es un espécimen de hábitos nocturnos (Tucker, 1985).

II.7. *Conus regularis* (Sowerby, 1841)

La concha de *C. regularis* tiene forma un poco más alargada que *C. ximenes*, posee manchas de color marrón a naranja, dispuestas en patrones verticales con ornamentaciones horizontales. La abertura es blanca y el labio ligeramente curvado hacia afuera. El tamaño de sus conchas se ha descrito entre los 36 y 57 mm de longitud. Su distribución va desde el Golfo de California, hasta el sur de Panamá, pudiendo llegar a las costas de Perú (Kerstitch y Bertsch, 1998). Habita en la zona intermareal de sustratos lodosos (Kenn, 1971; González-Villareal, 2005). Por el tipo de hábitat en que se encuentra, se presume que se alimenta de poliquetos y otros gusanos.

II.8. *Conus californicus* (Hinds, 1844)

El gasterópodo *C. californicus*, se encuentra en las costas del Océano Pacífico, desde San Francisco California llegando a Cabo San Lucas, Baja California Sur y es el único *Conus* reportado en esa localidad (Hanna y Strong, 1949). Habita en la zona intermareal sobre pastos marinos y sustratos lodosos, está bien adaptado a aguas frías. Su concha es de color marrón, de 20 a 36 mm de longitud.

Debido a la falta de competencia con otros cónidos, se ha reportado que *C. californicus* se alimenta de una gran variedad de organismos, tales como peces, moluscos y gusanos (Kohn, 1966; Stewart y Gilly, 2005). En el 2010 J. Biggs y colaboradores observaron que *C. californicus* puede organizar una estrategia de caza cooperativa y de esta forma capturar presas de tamaño mayor al suyo. Se demostró también que se alimentan de crustáceos, estas son características alimentarias nuevas y diferentes a las reportadas para otros cónidos.

El veneno de *C. californicus* difiere en varios aspectos de la mayoría de los venenos reportados para otros *Conus*. Dentro del veneno de *C. californicus* no

podemos encontrar péptidos pertenecientes a las familias A y M. Los péptidos provenientes del veneno de muchos de los *Conus* estudiados a la fecha pertenecen en su mayoría a las familias A, M y O (Biggs *et al.*, 2010; Bernaldez *et al.*, 2010).

II.9. Composición del veneno del género *Conus*

La necesidad de poseer un veneno que actúe de manera rápida, llevó a los cónidos a desarrollar toxinas especializadas que le proporcione ventajas durante la caza (Olivera, 1997).

Se estima que el veneno de un solo caracol marino posee de 50 a 200 componentes biológicos activos. La mayoría son péptidos pequeños (6-40 residuos de aminoácidos), predominando los de 12 a 30 residuos de aminoácidos (Olivera *et al.*, 1990). Las toxinas de *Conus* muestran una serie de enlaces disulfuro intramolecular, así como modificaciones postraduccionales que favorecen la presencia de α -hélices que estabilizan a la molécula y la hacen más pequeña (McIntoch *et al.*, 1982; Myers *et al.*, 1990; Olivera *et al.*, 1990).

II.10. Genética de las conotoxinas

Se sabe que el ARNm de cada conopéptido se traduce como un pre-propéptido (70-120 aminoácidos), en donde se localiza el péptido activo, el cual está localizado hacia el C-terminal. Dicho precursor tiene una secuencia señal típica, llamada región pre (aproximadamente de 20 aminoácidos) y una región variable, la región pro (aproximadamente de 40 aminoácidos). Podemos encontrar una señal estándar para proteólisis (XR), antes de la secuencia del péptido maduro, que en general se compone de 10-30 aminoácidos en promedio (Craig *et al.*, 1999; Olivera y Cruz, 2001; Becker y Terlau, 2008).

Los precursores son hidrolizados por enzimas proteolíticas para entonces generar a la toxina madura (Figura 6). Generalmente en la misma superfamilia, la secuencia señal en el extremo N-terminal se encuentra bien conservada; mientras que el péptido maduro en el C-terminal difiere en gran medida excepto por los residuos de cisteínas bien definidos. Lo que quiere decir que el arreglo de cisteínas se conserva en el péptido maduro (Pi *et al.*, 2006).

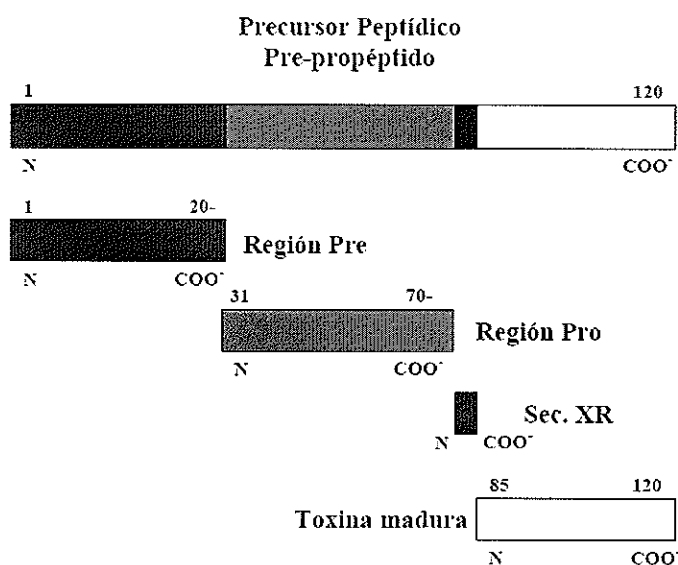


Figura 6. Precursor peptídico característico de las conotoxinas (Tomada de Oman y Van der Donk, 2010).

Si tomamos en cuenta que de un total de 500 especies reportadas de cono marinos se producen potencialmente 50,000-100,000 conopeptidos diferentes en sus conductos venenosos; debería existir una enorme diversidad de genes. Sin embargo el análisis de los péptidos sugiere que la mayoría de los 50,000 péptidos están codificados en aproximadamente 12 genes, los de las *superfamilias de conotoxinas*, cada una de ellas posee un arreglo característico de residuos de cisteína; el cual es ensamblado en un enlace disulfuro particular, a esta unión característica se le llama "marco de lectura de enlace disulfuro" (Bulaj *et al.*, 2003).

II.11. Clasificación de las conotoxinas

Las toxinas del veneno de *Conus*, se pueden nombrar de dos maneras, dependiendo la presencia de enlaces disulfuro:

- I) Conopéptidos, son aquellas toxinas que poseen un solo enlace disulfuro, como los contrifanos.
- II) Conotoxinas, se caracterizan por tener patrón definido de cisteínas, con 2 y hasta 6 enlaces disulfuro.

En las conotoxinas, las cisteínas se presentan en arreglos, que van de 0-6 residuos de separación a la siguiente cisteína, en la secuencia primaria. Para clasificar a las conotoxinas se ha utilizado el patrón de cisteínas presente en la secuencia primaria del péptido y su "marco de lectura de enlace disulfuro". En la Figura 7 se muestran patrones de cisteínas, su enlace disulfuro y el blanco molecular de cada conotoxina (Norton y Olivera, 2006). Los miembros de una familia de *Conus*, también poseen similitud en las regiones pre y pro. La diversidad de los conopéptidos se debe por la hipermutación del extremo C-terminal en el péptido maduro (Craig *et al.*, 1999).

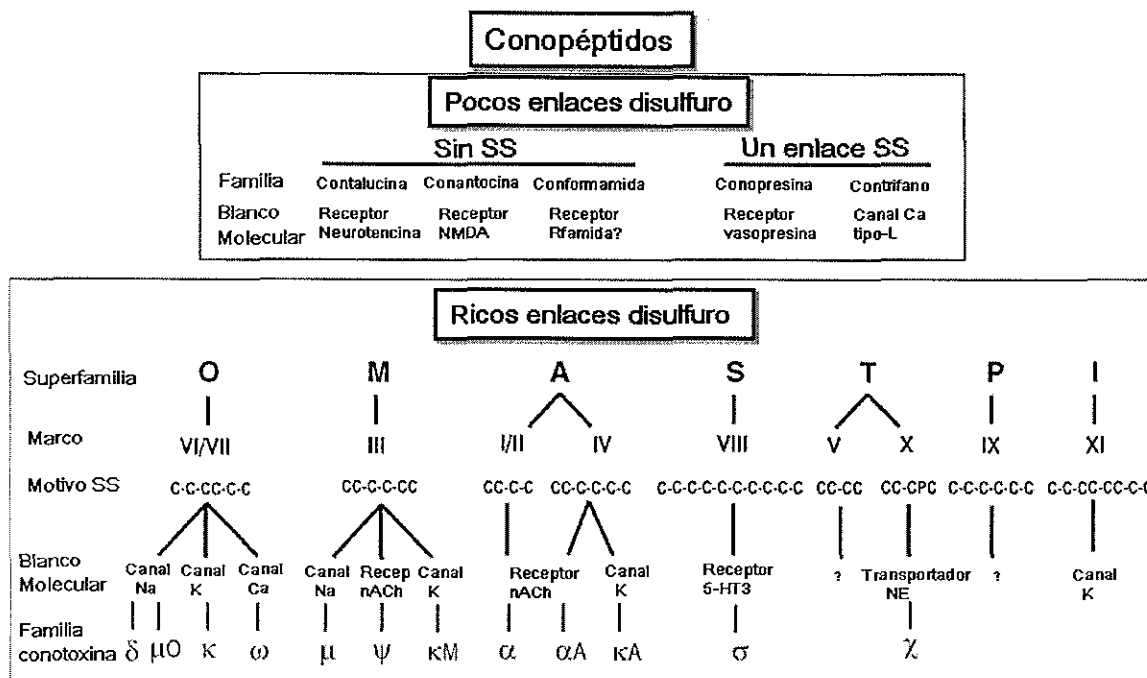


Figura 7. Diagrama organizacional de las conotoxinas. Se clasifican dependiendo la cantidad de enlaces disulfuro. El marco de enlace disulfuro y los patrones de cisteínas de las conotoxinas derivan en motivos SS característicos de cada superfamilia (Tomada de Norton y Olivera, 2006).

II.12. Canal de sodio dependiente de voltaje y respuesta fisiológica

Los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC por sus siglas en inglés) son proteínas transmembranales compuestas por una subunidad alfa conservada que forma el poro y subunidades auxiliares como subunidades beta en vertebrados (Cestéle y Catterall, 2000).

La subunidad alfa es una proteína compuesta por 4 dominios homólogos (D1-D4) cada uno comprende 6 fragmentos transmembranales (S1-S6). La región identificada que afecta principalmente al sitio de unión, se encuentra en el giro de S3-S4 en D4 y es llamada **sitio de unión 3**.

El efecto fisiológico que induce la unión de las toxinas en el sitio 3, es provocar un retraso en la inactivación del canal; así permanece en su forma abierta por un mayor tiempo y el potencial de acción se prolonga (Wanke *et al.*, 2009). El segmento S4 está cargado positivamente y sirve como un sensor de voltaje que inicia la activación del canal de sodio (Cestéle y Catterall, 2000).

La acción de las toxinas de animales venenosos en los VGSC de las células, se acompaña por un significativo efecto tónico. La manera en que ocurre este efecto tónico se da de la siguiente manera:

- 1) La toxina disminuye considerablemente la inactivación del canal de sodio.
- 2) Este efecto aumenta la concentración interna de sodio.
- 3) El incremento de la concentración interna de sodio desencadena la entrada de calcio a través del sistema de intercambio de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ que a su vez incrementa la fuerza contráctil (Moran *et al.*, 2009).

II.13. Canal de calcio dependiente de voltaje y respuesta fisiológica

Los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC por sus siglas en inglés) son proteínas transmembranales, compuestas por múltiples subunidades: α_1 , β , γ y una subunidad $\alpha_2\beta$. La subunidad α_1 permite al poro ser permeable a calcio. El canal de calcio se organiza en 4 dominios homólogos, cada uno posee 6 regiones transmembranales. En la Figura 8 se observa las subunidades del VGCC (Doan Lisa, 2010).

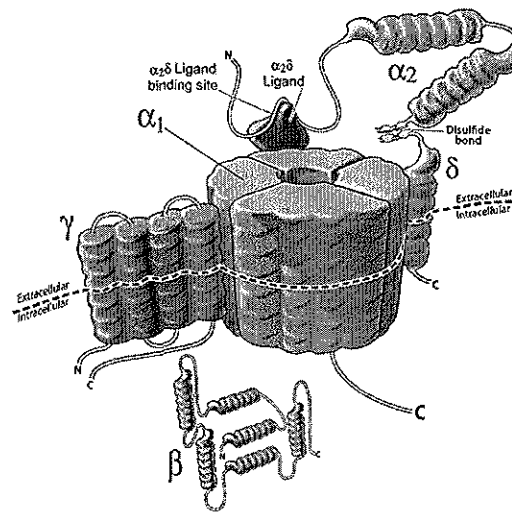


Figura 8. Canal de calcio dependiente de voltaje (VGCC). La subunidad α_1 consta de 4 dominios homólogos que forman el poro, con 6 regiones transmembranales. La subunidad $\alpha_2\beta$ es esencial para la unión del ligando. (Tomado de Doan Lisa, 2010).

Los canales de calcio dependientes de voltaje, poseen propiedades únicas, como el voltaje de activación, conductancia del canal, grado de activación y la sensibilidad hacia bloqueadores específicos. Se han clasificado en 6 tipos, se les conoce como VGCC tipo L, P/Q, N, R y T.

Los VGCCs se activan por la despolarización de la membrana. El calcio entra a la célula y en muchos procesos actúa como segundo mensajero; algunos ejemplos son durante la contracción muscular, neurotransmisión y expresión de genes (Doan Lisa, 2010).

Se ha demostrado que los VGCCs tipo N, son los canales asociados con la transmisión sináptica nociceptiva. Los canales de calcio tipo N, están situados en la membrana post y presináptica, en la sinapsis de los aferentes primarios y lámina superficial de las neuronas de la sustancia gelatinosa (Bao *et al.*, 1998; Westenbroek *et al.*, 1998; Soeda *et al.*, 2002).

II.14. Neurotransmisión y neurotoxinas

Existen muchos estudios donde se ha demostrado la importancia de los canales iónicos durante la transmisión neuromuscular. Esta función fisiológica las hace blanco de acción de muchos tipos de neurotoxinas, producidas por animales venenosos como arañas, escorpiones, anémonas, moluscos, entre otros, para la captura de su presa.

La liberación de neurotransmisores desde las terminales nerviosas es influenciada por la actividad de los canales de potasio, sodio y calcio, estos afectan la duración y frecuencia de liberaciones repetitivas neuronales (Massensini *et al.*, 2003; Motin y Adams, 2008).

La activación de nociceptores genera la propagación del potencial de membrana a lo largo del cuerpo de la neurona pseudobipolar, que se encuentra localizada en el ganglio de la raíz dorsal, hacia el asta posterior de la espina dorsal (Nieto y Cruciani, 2006). Una terminal nerviosa de un aferente primario nociceptivo se estimula por señales nocivas en tejidos periféricos, como los de la piel; neurotransmisores, como glutamato o sustancia P son liberados desde esas neuronas, estimulando neuronas secundarias en la raíz dorsal en la espina dorsal, quienes envían una segunda señal hacia el cerebro (Motin y Adams, 2008; Lawson y Wallace, 2010). En la Figura 9 se muestra la propagación de los impulsos dolorosos en la sinapsis neuronal.

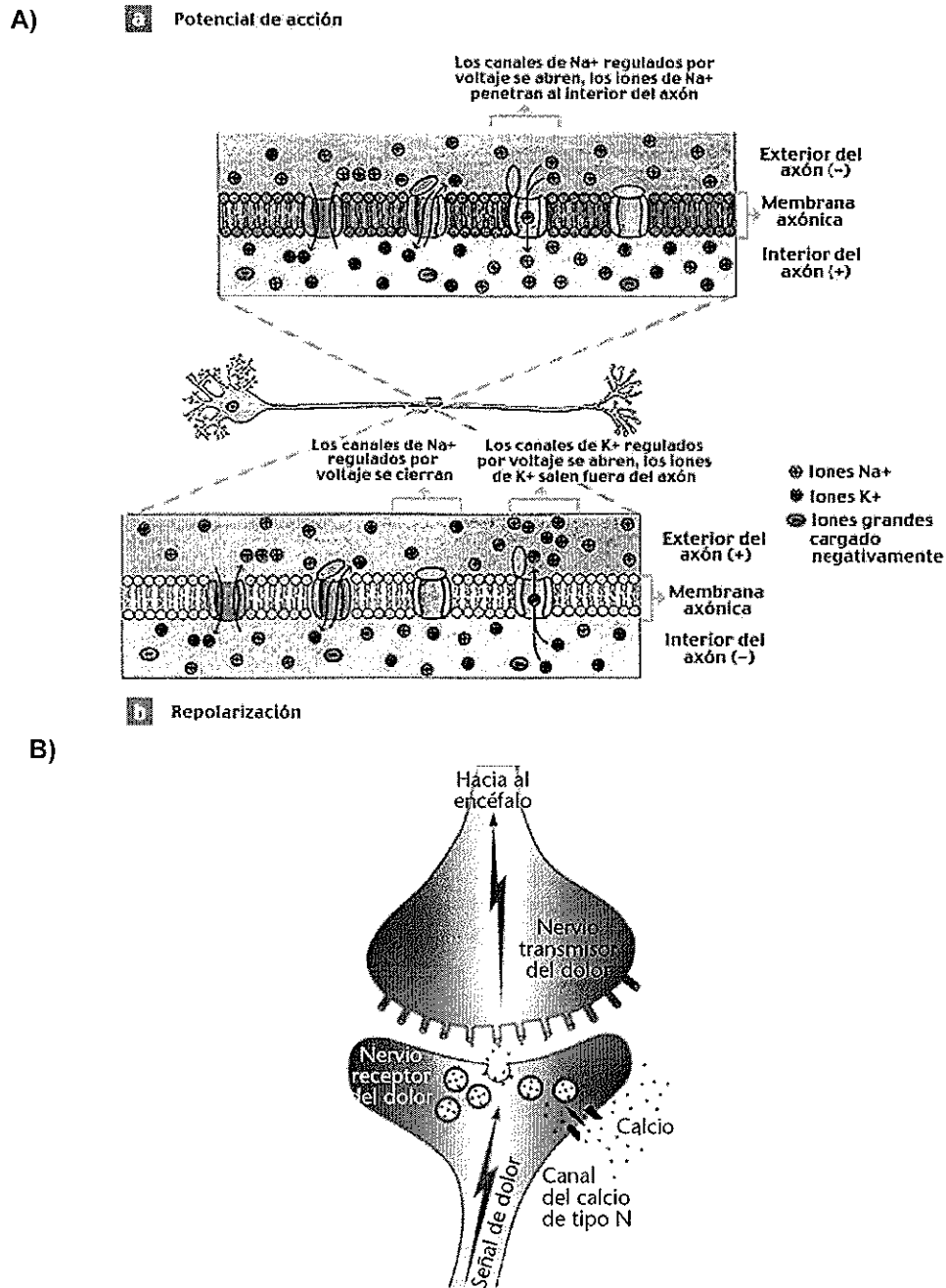


Figura 9. Transmisión de estímulos nocivos. A) Potencial de acción a lo largo del cuerpo de una neurona (monografias.com). B) La entrada de calcio a la terminal presináptica, causa la liberación de neurotransmisores en el espacio sináptico que finalmente llegarán a la membrana de la célula postsináptica (obtenida de www.dfarmacia.com).

Algunas de las toxinas aisladas de organismos marinos, que tienen como blanco canales iónicos y participan en la propagación del potencial de acción de las neuronas implicadas en la respuesta nociceptiva son:

- APETx2 aislada a partir de *Anthopleura elegantissima* tiene como blanco de acción el canal ASIC3, el cual es un canal de sodio sensible a acidez y pH. El canal ASIC3 está implicado en la transducción del dolor asociado con acidosis en tejidos isquémicos o inflamados (Diochot *et al.*, 2004). Se encuentra en neuronas del sistema nervioso periférico.
- ATXII aislada a partir de *Anemonia sulcata* por Bèress y colaboradores (1975), hoy en día llamada *A. viridiflora* afecta el canal de sodio. Se ha demostrado el efecto en la transmisión neuromuscular y potencial de acción en neuronas aisladas de crustáceo y la inactivación de la conductividad de sodio por las toxinas ATXII (Moran *et al.*, 2009).
- APHC1 (Yaroslav *et al.*, 2008) péptido de 56 residuos de aa, aislado a partir de la anémona *Heteractis crispa*. APHC1 es antagonista de los canales TRPV1. Los canales TRPV1 inician la respuesta neuronal nociva, detectando estímulos químicos y físicos.
- Las ω -conotoxinas aisladas a partir del género *Conus*, como MVIIA (Ziconotide) aislado a partir del veneno de *C. magus*, actúan sobre los VGCCs tipo N, quienes son críticos en la transducción de la información nociceptiva, estos canales se sitúan en la membrana sináptica de los aferentes primarios nociceptivos y lámina superficial de las neuronas de la sustancia gelatinosa (Heinke *et al.*, 2004; Motin y Adams, 2008).
- SO3 pertenece a las conotoxinas de la superfamilia O. Tiene efecto inhibitorio en la frecuencia de la corriente de calcio en cultivos de células

del hipocampo. SO3 posee una similitud del 72% en la secuencia con MVIIA (Wang *et al.*, 2006) y se sabe que tiene efectos analgésicos para dolores neuropáticos en animales experimentales (Lui *et al.*, 2001).

- Se han reportado tres α -conotoxinas como antagonistas de receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChRs por sus siglas en inglés) $\alpha 9\alpha 10$, PeIA (*C. pergrandis*), Vc1.1 (*C. victoriae*) y RgIA (*C. regius*). Se demostró la actividad analgésica de las α -conotoxinas, en modelos murinos de dolor agudo y neuropático (McIntosh *et al.*, 2009)
- Bernáldez en el 2008 identificó, mediante electrofisiología, una conotoxina en el veneno del caracol *C. californicus* con actividad en VGCC. La conotoxina purificada, se caracterizó como un péptido de 13 residuos de aminoácidos, con cuatro cisteínas y dos enlaces disulfuro, con actividad en canales de calcio en células neuronales de ganglio de rata.
- Martínez en el 2010, aisló una conotoxina a partir del veneno del caracol *C. regularis*. La conotoxina se identificó como un péptido con ocho cisteínas y cuatro enlaces disulfuro, con actividad sobre canales de calcio. Se tiene la secuencia de 41 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 4279 Da. Contiene ocho cisteínas en su estructura primaria y se piensa que pertenece a una nueva superfamilia, debido a que presenta un patrón de cisteínas particular.

II.15. Fisiología y tratamiento del dolor

El dolor se considera un problema de salud pública, que afecta a un 25-29% de la población a nivel mundial. En México no existen estudios epidemiológicos concretos, pero en base a datos proporcionados por el IMSS, se ha declarado que un 5% de los pacientes que acuden a consultas de medicina familiar, tienen

padecimientos dolorosos crónicos. Las mujeres son más vulnerables a este padecimiento y se asocia también con la edad (Covarrubias-Gómez *et al.*, 2010). La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP por sus siglas en inglés) define dolor como:

“La experiencia sensitiva y emocional desagradable asociada a una lesión real o potencial de un tejido; que incluye una serie de conductas visible y/o audibles que pueden ser modificadas por el aprendizaje”

Se han descrito tres tipos de dolor según su origen; nociceptivo, neuropático y psicogénico. Nos enfocaremos solamente en el dolor nociceptivo y neuropático, debido a que el dolor psicogénico es de naturaleza psicológica y no por una afectación física.

- **El dolor nociceptivo** se produce por la activación de receptores específicos que no tienen protección miélnica ni estructuras adicionales especializadas y están ubicados en los tejidos, como piel, músculos, vísceras y articulaciones, así como en los nervios. Al producirse una lesión, se liberan iones que activan a los nociceptores liberando segundos mensajeros (Nieto y Cruciani, 2006).
- **El dolor neuropático** es el resultado de alteraciones durante la transmisión normal de los impulsos dolorosos. Se producen modificaciones en las propiedades eléctricas de las neuronas normales. Estas alteraciones se han detectado en las terminaciones nerviosas periféricas, en el ganglio de la raíz dorsal, en el asta posterior de la espina dorsal y en la corteza somatosensorial (Nieto y Cruciani, 2006).

El manejo de dolor trae consigo algunos riesgos para el paciente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una escalera analgésica para facilitar la

elección de la terapia (Figura 10). La escalera analgésica fue diseñada para tratar el dolor oncológico, posteriormente se aplicó en atención primaria del dolor agudo, dolor post-operatorio, dolor neuropático, así como en el dolor crónico.

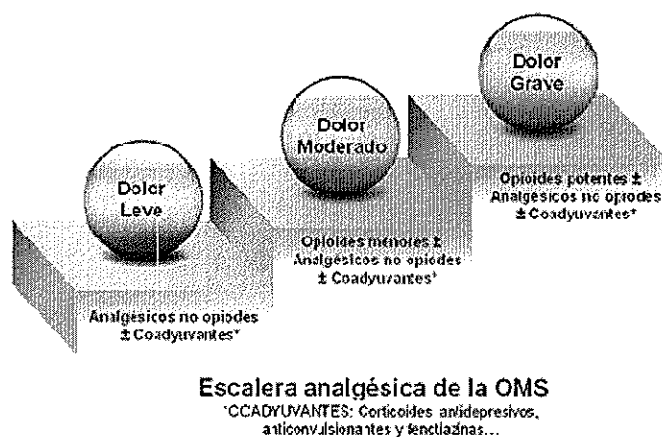


Figura 10. Escalera analgésica según la OMS. La escalera analgésica se dio a conocer en 1986 y se basa en dos parámetros, la intensidad algica y el tiempo escalonado (tomado de www.dfarmacia.com).

A través de los años la escalera analgésica ha sufrido varias modificaciones, debido a que la atención del dolor debe ser individualizada. La intensidad del dolor y su etiología determinarán la elección para administrar el tipo de fármaco, la vía de administración, la dosis y la duración de la terapia, para lograr un alivio eficaz e inmediato.

1. *Primer escalón* (dolor leve). La primera elección es la administración de paracetamol, en segunda línea los Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs) con la introducción de los Coxibs y en tercera línea la analgesia regional (Poggi e Ibarra, 2007). Los AINEs y los Coxibs deben ser indicados a dosis reducidas, durante el menor tiempo posible y evaluando

constantemente el riesgo cardiovascular y gastrointestinal de cada paciente (Romero *et al.*, 2008).

2. *Segundo escalón* (dolor moderado). Las dos primeras líneas son iguales al primer escalón, la tercera opción: bloqueo de nervio periférico a una dosis o en infusión continua de opioides débiles (Poggi e Ibarra, 2007). Se continúa con la administración de la codeína, pero se limita por sus efectos secundarios, como tolerancia y habituación. Se ha introducido el uso de tramadol, este analgésico opioide de potencia moderada, retrasa el paso al tercer escalón. (Torres, 1997).

3. *Tercer escalón* (dolor crónico). En las dos primeras líneas, se eligen los dos primeros escalones, en tercer lugar: administración epidural en infusión continua de opioides fuertes (Poggi e Ibarra, 2007). A demás de la administración de la morfina, se ha introducido fármacos como la buprenorfina, fentanilo, hidromorfina, oxicodona y metadona. Las vías de administración son más variables permitiendo una dosificación más controlada, de manera gradual, iniciando con dosis mínimas (Romero *et al.*, 2008). Los opioides actúan principalmente sobre el sistema nervioso central e intestino, actuando como agonistas de receptores μ . Sin embargo también presentan afinidad por los receptores δ y κ (Goodman y Gilman, 1991). Recientemente en el 2004, la FDA aprobó la introducción de ziconotide, como fármaco de uso intratecal para pacientes con dolor oncológico.

III. JUSTIFICACIÓN

Existe una búsqueda continua de nuevos tratamientos para el dolor, que sean seguros, de fácil administración y mayor efectividad. Debido a esto, es necesario encontrar por lo menos un compuesto que bloquee el dolor de manera periférica, a partir del veneno de *Anthopleura* sp, así como de tres caracoles marinos del género *Conus*.

IV. HIPÓTESIS

En el veneno de *Anthopleura* sp, *Conus ximenes*, *C. regularis* y *C. californicus* existe por lo menos un péptido con efecto analgésico periférico.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar fracciones de toxinas de *Anthopleura* sp y tres caracoles marinos del género *Conus*, que muestren efecto en la respuesta nociceptiva.

V.2. Objetivos específicos

V.2.1 Evaluar el efecto analgésico de los compuestos del veneno de *Anthopleura* sp, *C. ximenes*, *C. regularis* y *C. californicus*.

V.2.2 Caracterizar químicamente las toxinas de *Anthopleura* sp y *C. ximenes* con actividad analgésica.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Colecta de organismos

VI.1.1 *Anthopleura* sp

Se realizaron dos colectas de 1 Kg de organismos de *Anthopleura* sp en la zona intermareal del Kilómetro 100 de la carretera Tijuana-Ensenada Baja California. La primera colecta se realizó durante el mes de agosto del 2010 y la segunda durante el mes de septiembre del mismo año, previa consulta de predicción de mareas, otorgada por el Centro de Investigación Científica y Estudios Superiores de Ensenada (CICESE). Los organismos se desprendieron del sustrato rocoso con la ayuda de una espátula sin lastimar la zona aboral del animal. Se transportaron vivos al laboratorio dentro de una cubeta con tapa y un poco de agua de mar a temperatura 18 ± 1 °C.

Para su colecta se tomó en cuenta el patrón radiado en la zona oral, así como las verrugas adhesivas dispuestas en filas en el cuerpo de la anémona. Se eligieron los ejemplares aislados de 7 cm de diámetro como mínimo.

VI.1.2 *C. ximenes*, *C. regularis* y *C. californicus*

Se colectaron 70 ejemplares de *C. ximenes* en la zona intermareal de Bahía de los Ángeles, Baja California, México durante los meses de Septiembre y Octubre del 2010. Los caracoles marinos se transportaron vivos al Laboratorio de Biotoxinas del CICESE en cubetas con agua de mar. Se lavaron con agua destilada, para retirar los restos de arena y lodo. Se colocaron en tubos tipo Falcon de 50 mL y se congelaron a -70°C hasta su utilización.

Los organismos de *C. regularis* se colectaron en el mismo sitio de *C. ximenes* y se transportaron bajo las mismas condiciones descritas para dicho organismo.

La colecta de *C. californicus* se realizó en la zona intermareal del kilómetro 48 de la carretera Tijuana-Ensenada, los organismos se transportaron y procesaron bajo las mismas condiciones implementadas para *C. ximenes*.

Las colectas de *C. regularis* y *C. californicus* las realizó el equipo del Laboratorio de Biotoxinas del CICESE en el año 2010.

VI.2. Obtención del veneno total

VI.2.1. *Anthopleura* sp

La metodología que se utilizó fue la misma empleada previamente en el Laboratorio de Biotoxinas del CICESE por Prior Mier (2002) y Munro (2005).

El cuerpo completo de las anémonas se lavó con agua de mar para remover sedimentos y piedras. Para la extracción del veneno, se pesaron 1000 g de anémonas (peso húmedo) en una balanza Metler E 2000, y se mezcló con 1 L de etanol al 30% durante 24 horas. La solución sobrenadante se recuperó, se filtró y se centrifugó a 4,500 x g a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó, se congeló a -70° C, se liofilizó y se conservó a -4 °C hasta su proceso. A la solución obtenida se le llamó veneno crudo de *Anthopleura* sp.

El veneno crudo, obtenido de la extracción con etanol, se dializó para eliminar el exceso de sal y obtener el veneno total. Se pesaron 2 g del veneno crudo de *Anthopleura* sp, se resuspendieron en 18 mL de agua destilada. La solución anterior se centrifugó a 16,060 x g a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se colocó

en una membrana MWCO2000. Las membranas para diálisis que contienen el veneno crudo, se colocaron en un recipiente con 3 L de agua destilada y se mantuvieron en agitación constante, a 4 °C por tres periodos de 3 horas cada uno. El extracto contenido en la membrana de diálisis, se recuperó en un tubo limpio y previamente pesado. Se congeló a -70 °C y liofilizó. La solución obtenida se le nombró veneno total de *Anthopleura* sp.

VI.2.2. *C. ximenes*

Para la obtención del veneno total de *C. ximenes*, los organismos previamente congelados, se centrifugaron a 4,500 x g a 4 °C por 10 min. Los organismos se disecaron para obtener el conducto venenoso. El conducto venenoso se colocó en un homogeneizador de vidrio con pistilo y se maceró con 500 µL de solución C (Anexo 3). Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 10,000 x g a 4 °C y se recuperó el sobrenadante en un tubo tipo Eppendorf limpio y previamente pesado.

Se realizó una segunda maceración del conducto venenoso con 500 µL de solución C (Anexo 3), se centrifugó durante 5 minutos a 10, 000 x g a 4 °C. El sobrenadante se recuperó en otro tubo tipo Eppendorf limpio y previamente pesado. El veneno total se congeló a -70 °C, se liofilizó y se almacenó a 4 °C para su utilización posterior. Se colocaron aproximadamente 20 conductos venenosos por 1 mL de solución C (Anexo 3)

VI.2.3. *C. regularis* y *C. californicus*

Las fracciones venenosas de *C. regularis* y *C. californicus* fueron otorgadas por el Laboratorio de Biotoxinas del CICESE y forman parte de la colección privada de toxinas del mismo laboratorio. Los venenos se obtuvieron siguiendo la metodología que se utilizó en el apartado VI.2.2.

Se utilizó el péptido puro CRP20a, con actividad sobre canales de calcio, aislado durante la tesis "CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE CARACOL MARINO *C. regularis*" trabajo realizado por el MC Óscar Martínez (2010).

Se utilizaron los péptidos sintéticos obtenidos del veneno de *C. californicus*, nombrados CCP1 y CCP2 (Bernáldez *et al.*, 2010), con actividad sobre canales de calcio.

VI.3. Cuantificación de veneno total

VI.3.1. *Anthopleura* sp

Se realizó una cuantificación por diferencia de peso seco del veneno total. Una vez liofilizado, el tubo que contiene la muestra se pesó y se realizó la cuantificación por diferencia de peso. Lo que se obtiene es el peso seco del veneno total de *Anthopleura* sp y se nombró **As**. Se almacenó a 4 °C hasta ser utilizado.

VI.3.2. *C. ximenes*, *C. regularis* y *C. californicus*

La cuantificación se realizó por diferencia de peso. La diferencia de peso, del tubo en peso constante y el peso del tubo con el veneno obtenido en el apartado VI.2.2, nos indica el peso seco del veneno total para *C. ximenes*.

La cuantificación de veneno total de *C. regularis* y *C. californicus* se realizó siguiendo la metodología descrita para *C. ximenes*. Los péptidos CRP20a, CCP1 y CCP2 que se utilizaron durante el presente trabajo, se cuantificaron en nanodrop a 230 nm.

VI.4. Aislamiento de las toxinas

VI.4.1. *Anthopleura* sp

VI.4.1.1 *Cromatografía de exclusión molecular*

La purificación de toxinas del veneno total de *Anthopleura* sp se realizó siguiendo la metodología utilizada por Sánchez y colaboradores (1996) y Ständker y colaboradores. (2006), con algunas modificaciones.

Se realizaron cuatro corridas del veneno total (As) de *Anthopleura* sp, dos de la primera colecta y dos más de la segunda colecta. Las corridas se realizaron en un ambiente controlado de temperatura, a 16 °C.

Se utilizó una columna de exclusión molecular (50 x 1 cm) empacada homogéneamente con una resina Bio-Gel P 100 con un flujo de 2.5 mL/hr. Como fase móvil se utilizó acetato de amonio 20 mM a pH 4.70. La columna se equilibró con acetato de amonio 20 mM a pH 4.7, el tiempo necesario para que el pH de entrada a la columna y el pH de salida de la columna fueran similares. Una vez equilibrada la columna, se aplicó la muestra.

El veneno total As se resuspendió 1.7 mL de agua destilada, se centrifugó a 4,500 x g a 4 °C durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. La muestra se aplicó con ayuda de una pipeta larga, se tomaron 1.66 mL de la muestra. La fase móvil se adicionó con precaución de no perturbar la columna. Las fracciones se colectaron en tubos de vidrio con ayuda de un colector automático Cygnet™ facilitado por el laboratorio del Dr. Stefano de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

Se colectaron 70 fracciones de 40 min y se midió la absorbancia a $\lambda = 280$ nm en celdas de cuarzo de 1 cc en un espectrofotómetro SmartSpec 3000 (BioRad). Las lecturas de absorbancia se graficaron en un programa computacional Microsoft Excel y se concentraron de acuerdo a su perfil cromatográfico.

VI.4.1.2 Cuantificación de las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular

Los compuestos pépticos presentes en cada fracción se cuantificaron. Se midió la densidad óptica (DO) a una longitud de onda $\lambda = 280$ nm en un nanómetro NanoVue GE, mediante el método BCA para cuantificación proteínas. Se tomó en cuenta que 1 DO = 1mg/mL de proteína (Current Prot. Prot. Scie., 2003). Las fracciones obtenidas se congelaron a -70 °C, se liofilizaron y almacenaron a 4°C hasta su utilización.

VI.4.1.3. Cromatografía líquida de alta presión de fase reversa (HPLC-RP por sus siglas en inglés)

La purificación final del veneno de anémona se llevó a cabo en un cromatógrafo Varian ProStar, con una columna analítica C18 Perkin Elmer 5 μ m (250 x 4.6 mm). La columna se equilibró con solución A (Anexo 1) durante 15 minutos. Se inyectaron 2mg/200 μ L de la fracción AsF3. Se utilizó un gradiente de elución lineal de 10-60% de solución B (Anexo 2) y tiempo de corrida de 40 minutos.

Se colectaron picos individuales. La absorbancia de cada fracción se midió a $\lambda = 280$ nm. La columna se lavó con 100% de solución B (Anexo 2) durante 15 min. Las fracciones colectadas se congelaron a -50 °C, se concentraron al vacío en un concentrador SpeedVac SAVANT y se almacenaron a 4 °C. Este trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), campus Cuernavaca, Morelos.

VI.4.1.4. Cuantificación de las sub-fracciones de *Anthopleura* sp, obtenidas de la re-purificación por HPLC-RP

Las sub-fracciones liofilizadas, obtenidas de la re-purificación por HPLC-RP, se resuspendieron en agua tetradestilada. Se tomaron 2 μL de cada fracción y se midió la DO de los compuestos pépticos en nanodrop a $\lambda=280$ nm, en el Laboratorio del IBT de la UNAM, campus Cuernavaca, Morelos. Se utilizó agua tetradestilada como blanco. Se tomó en cuenta que 1 DO= 1 mg/mL de proteína (Current Prot. Prot. Scie., 2003).

VI.4.2. *Conus ximenes*

VI.4.2.1 HPLC-RP

La muestra se preparó para la inyección como se describe a continuación. Se tomó una alícuota de 200 μL de veneno total y se centrifugó a 4,500 x g a 4 °C durante 5 minutos, para eliminar restos celulares y partículas suspendidas.

La purificación del veneno de *C. ximenes* se realizó en un cromatógrafo Agilent 110 (Agilent Technologies). Se utilizó una columna C18 Grace-Vydac 218TP54 (250 x 4.6 mm, 300 Å) y una pre-columna Zorbax- Agilent C18 (Agilent Technology, 4.6 x 12.5 mm, 5 μm). Las columnas se equilibraron con 100 % de solución A (Anexo 1) durante 15 minutos. Una vez equilibradas, se inyectaron 6mg/200 μL de veneno total de *C. ximenes*. La muestra se eluyó con solución B (Anexo 2) en un gradiente lineal de 0-60 % y tiempo de corrida de 60 min. Se realizó un lavado con 100 % de solución B (Anexo 2) durante 7 minutos.

Se colectaron fracciones de 5 minutos. La absorbancia de los componentes pépticos se detectó a $\lambda=230$ nm. Las fracciones obtenidas se congelaron a -70 °C, se liofilizaron y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

VI.4.2.2 Re-purificación de la fracción CXF10 de *C. ximenes*

La re-purificación de la fracción CXF10 se realizó mediante una serie de cromatografías en HPLC-RP. El Laboratorio de Biotoxinas del CICESE, realizó la re-purificación de la fracción CXF10.

VI.4.2.3 Cuantificación de las fracciones obtenidas por HPLC-RP

La cuantificación de las fracciones obtenidas durante la purificación del veneno total de *C. ximenes*, se llevó a cabo de dos maneras.

Se calculó el área bajo la curva de cada una de las fracciones. Se consideró que el 100% del área bajo la curva corresponde a 6 mg, los cuales fueron inyectados a la columna cromatográfica. Cada pico corresponde a un compuesto con tiempo de retención y absorbancia propio. Con ayuda de un programa computacional Agilent 1100A se calculó el porcentaje de área bajo la curva que le corresponde a cada pico y se estimó el equivalente en miligramos.

El segundo método utilizado y el que se tomó como válido para los análisis biológicos posteriores, es el siguiente. Las fracciones liofilizadas se resuspendieron en agua tetradestilada, se tomaron 2 μ L de cada una y se midió la DO de los compuestos pépticos en nanodrop a $\lambda=280$ nm, se utilizó agua tetradestilada como blanco. Se tomó en cuenta que 1 DO= 1 mg/mL de proteína (Current Prot. Prot. Scie., 2003). Este trabajo se realizó en el Laboratorio del IBT de la UNAM, campus Cuernavaca, Morelos.

VI.4.3 Purificación del veneno de *C. regularis* y *C. californicus*

La purificación de los péptidos aislados a partir del veneno de *C. regularis* y *C. californicus*, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado

VI.2.1 para *C. ximenes*. Adicionalmente se continuó con una serie de re-purificaciones, este trabajo fue realizado por el Laboratorio de Biotoxinas del CICESE.

VI.5. Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos se realizaron en las instalaciones del IBT de la UNAM, campus Cuernavaca, Morelos. El Bioterio de dicha institución puso a disposición del proyecto todos los organismos utilizados durante los ensayos. Los animales fueron tratados bajo las políticas de ética animal establecidos por el Bioterio anteriormente mencionado.

VI.5.1. "Hot-plate"

Las fracciones del veneno total de *Anthopleura* sp, *C. ximenes*, *C. regularis* y *C. californicus* se analizaron siguiendo el modelo de la placa caliente o "hot-plate" test (Current Prot. Neuro., 1999) en ratón. Se colocaron seis organismos por caja. Se mantuvieron con comida estándar de laboratorio y agua *ad libitum* durante las 24 horas previo a su proceso. Se mantuvieron en ambiente controlado de temperatura a 24 °C y con periodos de 12 horas de luz y 12 horas de obscuridad, iniciando el ciclo a las 6:00 hrs. Cada ratón se utilizó solo una vez.

Se utilizaron ratones machos CD1 con peso corporal de 23 ± 2 g. Se utilizaron tres ratones por grupo y controles. Se utilizó como control negativo, una solución amortiguadora de sales, PBS 1X (Anexo 4) y como control positivo nalbufina 10 mg/kg peso ratón. Se inyectó cada uno de los ratones, la vía de administración fue intraperitoneal (IP), aplicando 200 μ L de muestra, así como de los respectivos controles. La primera lectura de analgesia se tomó 30 minutos (min) post-inyección. Los ratones se colocaron durante 30 segundos (s) sobre una placa caliente ("Hot-plate" LE7406) a 55 °C, se observó y registró el tiempo en que

aparece la primera respuesta nociceptiva. La segunda lectura de analgesia se realizó 45 min posteriores a la inyección de la muestra.

Las lecturas de analgesia se determinaron como latencia en segundos en que el ratón muestra el primer signo de percepción de dolor. Los ratones manifiestan la percepción de dolor térmico agudo, ya sea lamiéndose las patas traseras o brincando. Se establecieron 30 s como límite máximo de exposición al estímulo nocivo, esto con la finalidad de evitar el daño tisular en las patas del ratón.

VI.5.2 Prueba de la formalina

La prueba de formalina (Hunkaar *et al.*, 1985; Murray *et al.*, 1988) se utilizó para medir la actividad analgésica en el dolor persistente por inflamación, de las fracciones venenosas de *Anthopleura* sp, *C. ximenes* y los péptidos puros de *C.regularis* y *C.californicus*.

Se utilizaron ratones machos CD1 con peso corporal de 23 ± 2 g, se etiquetaron tres ratones por fracción venenosa y por cada control. Se mantuvieron seis ratones por caja, con comida estándar de laboratorio y agua *ad libitum*, en condiciones controladas, con ciclo de luz-oscuridad 12/12 horas a 24 °C, iniciando el ciclo a las 6:00 hrs.

Los ratones se aclimataron durante una hora antes de su proceso. En una caja de plexiglás transparente se colocó a cada ratón de manera individual. En tres de las paredes de la caja se colocaron espejos, con la finalidad de observar la reacción del ratón desde todos los ángulos durante el ensayo.

Se inyectó vía IP 200 μ L de cada fracción venenosa de *Anthopleura* sp o de *Conus*; así como de cada control a utilizar. Como control negativo se utilizó PBS 1X (Anexo 4); como control positivo, ketorolaco 10 mg/kg peso ratón y tramadol 5

mg/kg ratón. Quince minutos post-inyección, se inyectaron de manera subcutánea, 20 μ L de formalina al 2.5% en la pata posterior derecha. El comportamiento de los organismos se registró en video desde el minuto 1 hasta los 45 minutos posteriores a la inyección de formalina. La latencia se midió durante el primer minuto, se registraron los segundos que el ratón se lamió el sitio de inyección. Posterior al primer minuto, se observó y midió la percepción de estímulo doloroso en intervalos de 5 minutos.

Los parámetros dolorosos en la prueba de la formalina tienen muchas maneras de interpretación, van desde contar las veces de lameteo, utilizar una escala de dolor del 0 al 3, contabilizar las veces que el ratón sacude la pata y cuantificar el tiempo que el ratón lame su pata en el sitio de inyección (Tjelsen *et al.*, 1992). Durante el presente trabajo se tomó en cuenta, el tiempo en segundos que el ratón se lamió la pata en el sitio de inyección. La cuantificación de la respuesta dolorosa se realizó visualmente, por lo tanto hay una probabilidad de que el conteo no sea cien por ciento exacto y efectivo. Para ello se observó detenidamente cada video y se repitió las veces necesarias, hasta obtener un conteo estandarizado.

VI.5.3. Disposición de los organismos utilizados en las pruebas biológicas.

La disposición de los ratones utilizados en las pruebas biológicas se llevó a cabo mediante las buenas prácticas y ética animal, se siguieron los protocolos establecidos por el Bioterio del IBT, campus Cuernavaca, Morelos. Se realizó la eutanasia. Los ratones se colocaron individualmente en una cámara de gas y se suministró dióxido de carbono (CO_2). Los ratones se envolvieron en papel secante y se colocaron en una bolsa amarilla, de residuos biológico-infecciosos. La bolsa fue recolectada por un especialista en manejo de residuos.

VI.6. Análisis de los datos

El análisis de los datos se realizó con ayuda del programa computacional Microsoft Office Excel 2007.

VI.6.1. "Hot-plate"

La actividad analgésica se determinó por el tiempo, latencia en segundos (s), que el ratón tarda en percibir el estímulo nocivo sobre la placa caliente. Se establecieron 30 s como límite máximo de exposición al estímulo nocivo, si durante ese tiempo, el ratón no manifestó signos de dolor, se tomó 30 s como la latencia.

La latencia de las fracciones del veneno de *Anthopleura* sp o de *Conus*, así como de los controles, se sometieron a un análisis. El resultado se mostró como la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de la latencia a los 30 y 45 min post-inyección. Se calcularon los intervalos de confianza (IC) para cada grupo, con esta información se tiene una aproximación, con un 95 % de confianza, de los valores reales que representan a cada grupo. Los intervalos de confianza de los grupos a evaluar y el control negativo, se compararon. Se consideró con actividad analgésica, aquel grupo que su IC sea diferente respecto al control negativo

VI.7.2. Prueba de la formalina

La actividad analgésica de las toxinas de *Anthopleura* sp y *Conus*, se evaluó en base a la latencia. La latencia (s) se determinó como el tiempo que el ratón se lamió el sitio de inyección. El análisis de los datos colectados se dividió en dos fases. La fase 1 corresponde del minuto 1 al minuto 5 post-inyección. La fase 2 corresponde del minuto 11 al 45 post-inyección.

Los datos obtenidos de la observación de los ratones, se mostraron como la media \pm el error estándar de la media (SEM) para las dos fases. Se calcularon los intervalos de confianza para cada grupo, y se hizo la comparación entre el control negativo y los grupos muestra. Con esta información se tiene una aproximación, con un 95 % de confianza, de los valores reales que representan a cada grupo. Los intervalos de confianza de los grupos a evaluar y el control negativo, se compararon. Se consideró con capacidad analgésica, aquel grupo en que sus IC sean diferentes respecto al control negativo.

VII. RESULTADOS

VII.1 *Anthopleura* sp

VII.1.1 Colecta de Organismos

Los organismos colectados se identificaron morfológicamente como *Anthopleura* sp. Para su colecta se tomó en cuenta el patrón radiado en la zona aboral, así como las verrugas adhesivas dispuestas en filas en el cuerpo de la anémona. Se eligieron los ejemplares aislados de 7 cm de diámetro como mínimo.

VII.1.2. Obtención y cuantificación de veneno total

El veneno total de *Anthopleura* sp se obtuvo a partir de la metodología descrita en el apartado VI.2.1 y VI.3.1.

De la colecta realizada en el mes de agosto del 2010, se obtuvo un total de 834.9 g de peso húmedo, a partir de los cuales se obtuvieron **11.27 g** de peso seco, llamado "Veneno crudo **As I.4**".

De la segunda colecta se procesaron un total de 1055.2 g de peso húmedo, de los cuales se obtuvieron **10.89 g** de peso seco, llamado "Veneno crudo **As I.5-A**". Durante la filtración del veneno de **As I.5-A** ocurrió un derrame del extracto, por tal motivo se obtuvo menor cantidad de extracto crudo.

En la Tabla II se observan las cantidades obtenidas durante la extracción del veneno de *Anthopleura* sp de las dos colectas realizadas, así como el veneno total dializado.

Tabla II. Veneno total obtenido a partir del extracto de veneno crudo para *Anthopleura* sp. Cuantificación del peso seco del veneno total.

Colecta	As I.4	As 1.5-A
P. húmedo	834.9 g	1055.2 g
Veneno Crudo	11.27 g	10.89 g
Veneno total *	1.408 g	1.36 g

- El veneno total corresponde al 12.5 % del veneno crudo (sin dializar). El 87.5 % del veneno crudo restante, podemos inferir pudieran ser, restos celulares, así como sales disueltas.

VII.1.3. Purificación y caracterización del veneno

VII.1.3.1 Cromatografía por Exclusión Molecular

Como primer paso para la purificación del veneno total, se realizó una cromatografía por exclusión molecular de acuerdo a la metodología descrita en el apartado VI.4.1.1. Se realizaron 2 corridas del extracto liofilizado As I.4 y 2 corridas del extracto As I.5-A.

Se obtuvieron 75 fracciones de 40 min, nombradas AsI.4 EMF1 a AsI.4 EMF75. La absorbancia de cada fracción se midió a $\lambda=280$ nm. Los datos obtenidos se graficaron con ayuda del programa computacional Microsoft Excel (Figura 11). Se realizaron diluciones 1:100 para las fracciones AsI.4 EMF21 a la EMF44 por haber obtenido valores de Abs por arriba de 2.50, salen del rango confiable de la concentración de compuestos.

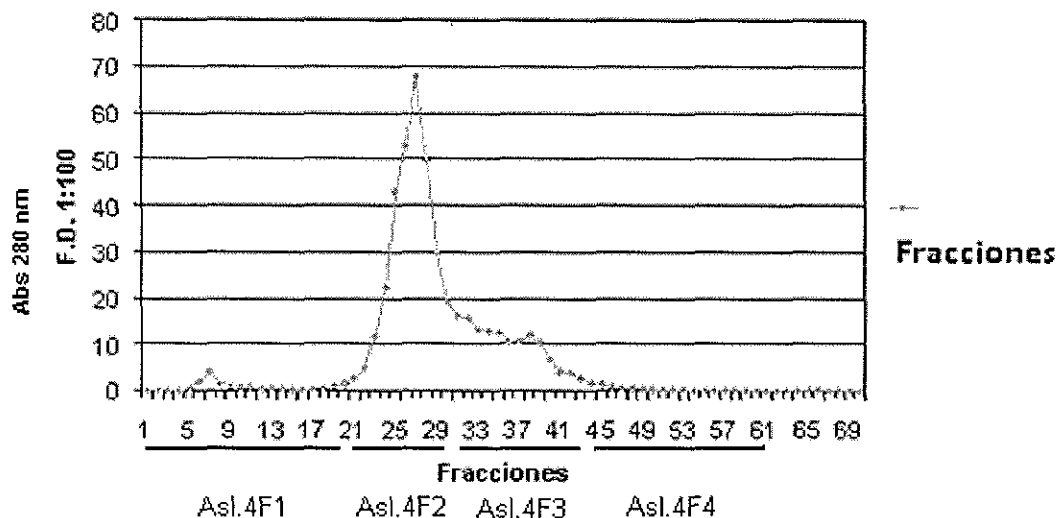


Figura 11. Cromatografía de Exclusión Molecular para As I.4. Columna Bio-Gel P 1000, acetato de amonio 20mM pH 4.7 como fase móvil, a flujo de ~ 2.5 ml/hr. Se colectaron fracciones de 40 min y se midió absorbancia a $\lambda=280$ nm. Recuperación del 36.72%

La Figura 11 es un cromatograma característico de las corridas C4 y C5 del veneno total As I.4. Podemos visualizar un pico mayoritario y tres menores. Las cuatro fracciones se concentraron y se nombraron Asl.4 F1 a F4 de acuerdo con el perfil cromatográfico. Las fracciones AsF1 a la F4 se cuantificaron (Tabla III).

Tabla III. Cuantificación péptica de las fracciones obtenidas durante las cromatografías (C4 y C5) de exclusión molecular, del veneno total de As I.4

Fracción.	Volumen	DO $\lambda=280$	mg
Asl.4 F 1	4.0 ml	1.91	7.64
Asl.4 F 2	4.0 ml	5.0	20.0
Asl.4 F 3	4.0 ml	3.76	15.04
Asl.4 F 4	4.0 ml	0.215	0.86

Para las 2 corridas del extracto venenoso As I.5-A el cromatograma fue similar al de la Figura 11. La cromatografía de exclusión molecular para As I.5-A se realizó bajo las mismas condiciones empleadas para el veneno total liofilizado As I.4.

VII.1.3.2 Ensayo biológico "Hot-plate"

Las fracciones Asl.4 F2 y F3 de *Anthopleura* sp se analizaron mediante la prueba de la placa caliente o "Hot-plate" según la metodología descrita en VI.5.1. Para asegurar que las cuantificaciones pépticas fueran correctas, se realizaron nuevas mediciones. Las fracciones Asl.4 F2 y F3 se cuantificaron en un espectrofotómetro en el Laboratorio del IBT de la UNAM, campus Cuernavaca, Morelos (Tabla IV). Se observó una variación en la cuantificación, que pudo ocasionarse por el manejo de la muestra. Las dosis utilizadas durante la prueba de la placa caliente, se prepararon en base a las cantidades de la Tabla IV.

Tabla IV. Cuantificación de compuestos pépticos en las fracciones de *Anthopleura* sp Cuantificación de proteínas por el método BCA en un espectrofotómetro a $\lambda= 280$ nm, Se utilizó agua tetradestilada como blanco.

Fracción	mg
Asl.4 F2	18.22
Asl.4 F3	16.82

Se inyectaron 4.12 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal de ratón, tanto de la fracción Asl.4 F2 como de la fracción Asl.4 F3.

Se realizó el análisis de todos los datos obtenidos durante el ensayo de "Hot-plate". Para evaluar el efecto analgésico de cada fracción, se compararon los IC

contra el control negativo. Se consideró con capacidad analgésica, el grupo que sus IC sea significativamente diferente respecto al control negativo (Fig. 12).

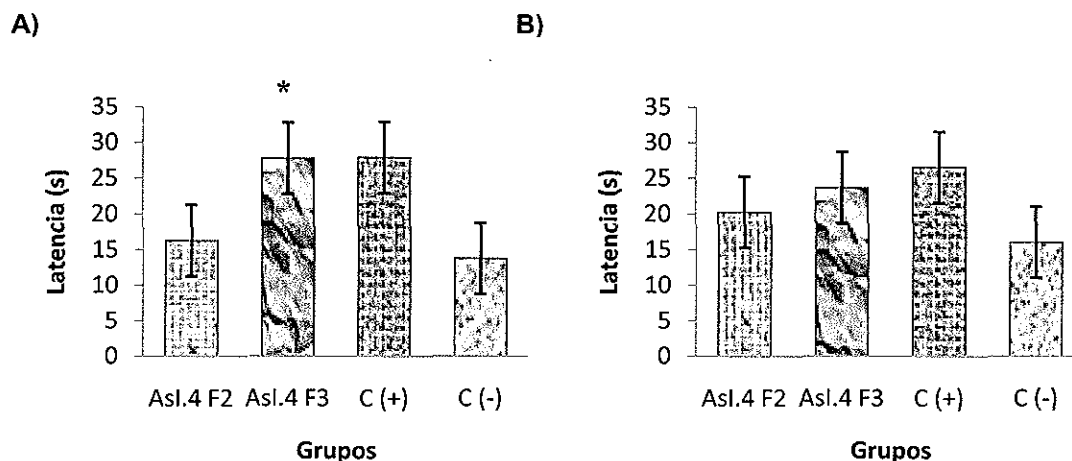


Figura 12. Análisis del efecto analgésico de *Anthopleura* sp durante el ensayo "Hot-plate". Se representa con barras, las medias \pm SEM $n=3$ ratones machos adultos CD1. Se inyectaron 200 μ l vía IP las fracciones y del control negativo C (-) PBS 1X (Anexo 4) y C(+) nalbufina 10 mg/kg peso ratón. A) Actividad biológica de las fracciones *Anthopleura* sp a los 30 min post-inyección. B) Actividad biológica de las fracciones de *Anthopleura* sp a los 45 min post-inyección. Al comparar los IC, se observó una diferencia significativa entre la fracción Asl.4 F3 con respecto al C (-) *.

Los datos obtenidos del análisis estadístico para el ensayo "Hot-plate" del veneno de *Anthopleura* sp, mostraron un efecto analgésico en la fracción Asl.4 F3. Se realizó una re-purificación de la fracción Asl.4 F3.

VII.1.3.3 Re-purificación de la fracción Asl.4 F3

Se realizó una re-purificación de la fracción Asl.4 F3 por HPLC-RP como se indicó en el apartado VI.4.1.3, trabajo realizado en el Laboratorio del IBT. En la Figura 13 tenemos el cromatograma de la re-purificación de la fracción Asl.4 F3 del veneno de *Anthopleura* sp. Se recuperaron 18 picos mayoritarios; de los cuales se utilizaron del pico Asp5 al pico Asp13 para el ensayo biológico de la placa caliente.

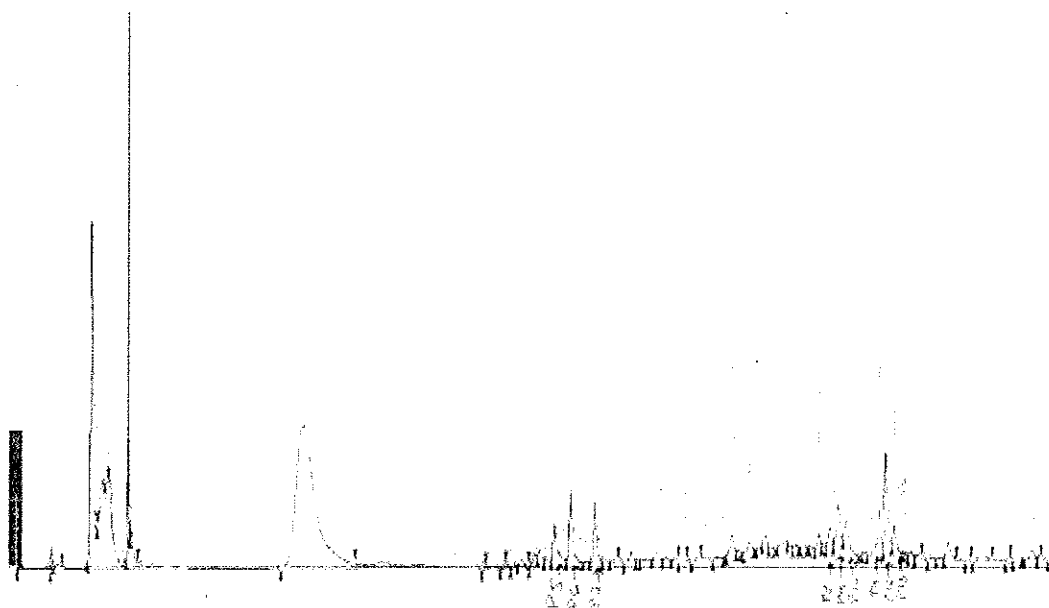


Figura 13. Cromatograma obtenido de la purificación de la fracción AsI.4 F3. Se realizó una cromatografía de alta presión de fase reversa en una columna C18 Perkin Elmer 5 μm (250 x 4.6 mm), se utilizó un gradiente de elución lineal de 10-60% AcN, con un tiempo de corrida de 40 minutos y flujo 1 ml/min. La columna se equilibró durante 15 min con 100% de sol. A (Anexo 1), se inyectaron 200 μL de AsI.4 F3 y al finalizar la corrida, se lavó con 100% de sol B (Anexo 2) $\lambda = 280 \text{ nm}$. Se colectaron, individualmente, los picos mayoritarios. Se nombró a cada pico obtenido AsP1 al AsP13 de acuerdo con su tiempo de retención en la columna.

La cuantificación de las sub-fracciones AsP5 hasta la P13 se realizó en el nanodrop del Laboratorio del IBT. En la Tabla V se muestran la cuantificación de compuestos pépticos de cada sub-fracción de AsI.4 F3.

Tabla V. Cuantificación de las sub-fracciones obtenidas por HPLC-RP de AsI.4 F3, mediante la medición de DO en nanodrop, utilizando agua tetradestilada como blanco.

Sub-fracción	Cantidad (μg)
AsP5	36.2
AsP6	63.3
AsP7	68.3
AsP8	26.7
AsP9	30.7
AsP10	55.7
AsP11	120.3
AsP12	113.4
AsP13	208.6

VII.1.3.4. "Hot-plate" para las sub-fracciones de AsI.4 F3

Los picos AsP5 al AsP13, obtenidos de la re-purificación de AsI.4 F3 mediante HPLC-RP, se utilizaron para un segundo ensayo de "Hot-plate", siguiendo la metodología del apartado VI.5.1. Se decidió inyectar cantidades distintas de cada sub-fracción (Tabla VI). Se tomó como parámetro inicial, las cantidades obtenidas durante el HPLC-RP, se prepararon 6 alícuotas en total, para dos ensayos, considerando un excedente.

Tabla VI. Dosis utilizadas en "Hot-plate" de las sub-fracciones de AsI.4 F3. Se utilizó PBS 1X (Anexo 4) como vehículo.

Sub-fracción	$\mu\text{g/g}$ ratón
AsP5	0.25
AsP6	0.45
AsP7	0.48
AsP8	0.19
AsP9	0.21
AsP10	0.39
AsP11	0.85
AsP12	0.80
AsP13	1.48

En la Figura 14 se observa el análisis del ensayo "Hot-plate" para las sub-fracciones AsP5 a la AsP13 de *Anthopleura* sp.

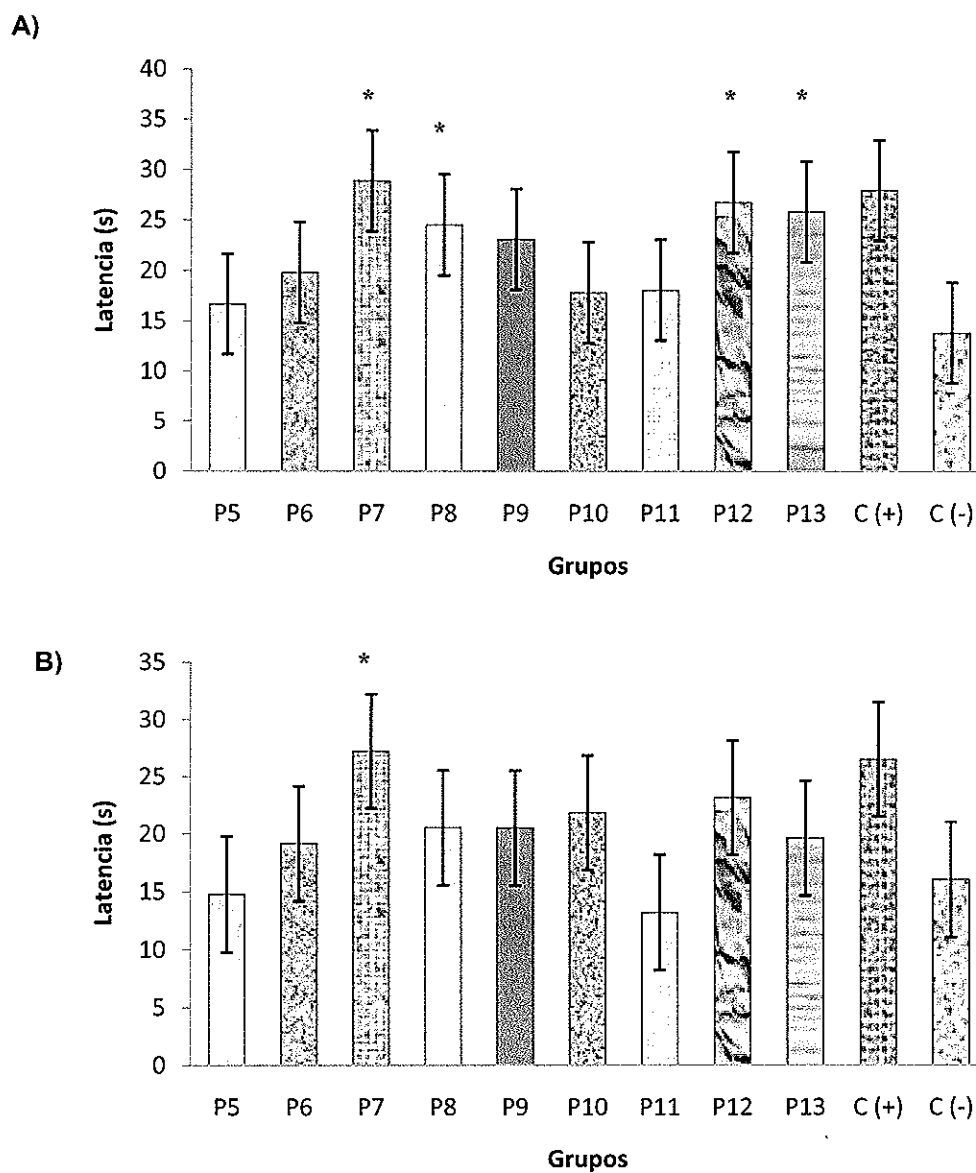


Figura 14. Análisis del efecto analgésico de las sub-fracciones AsI.4 F3 durante el ensayo de "Hot-plate". Se muestran con barras las medias \pm SEM $n=3$ ratones machos CD1. Se inyectó 200 μ l vía IP cada sub-fracción, así como de los controles negativo PBS 1X (C-) y positivo (C+) nalbufina 10 mg/kg. A) "Hot-plate" a los 30 minutos post-inyección. B) "Hot-plate" a los 45 minutos post-inyección. La actividad analgésica se demostró, obteniendo diferencias significativas, respecto al C(-), en las sub-fracciones P7 a los 30 y 45 min y para P8, P12 y P13 a los 30 minutos únicamente *.

Con el análisis comparativo de los IC, se observó la actividad analgésica significativa, de la sub-fracción AsP7 sobre la placa caliente a los 30 y 45 minutos post-inyección. Para las sub-fracciones AsP8, P12 y P13, se observó un efecto analgésico únicamente a los 30 min post-inyección. Se continuó la evaluación del efecto analgésico, con la sub-fracción AsP7, debido a que mostró actividad antinociceptiva durante los dos tiempos de muestreo.

VII.1.3.5 Prueba de la formalina para la sub-fracción AsP7

La capacidad analgésica de la fracción AsP7 se evaluó mediante un segundo ensayo biológico. La prueba de la formalina se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado VI.5.2.

Se colectaron los datos y se realizó un análisis que se dividió en dos fases como se indica en el apartado VI.7.2.

Para evaluar el efecto analgésico de la fracción AsP7, se realizó una prueba comparativa de los IC del péptido contra el control negativo PBS 1X (Anexo 4). (Figura 15).

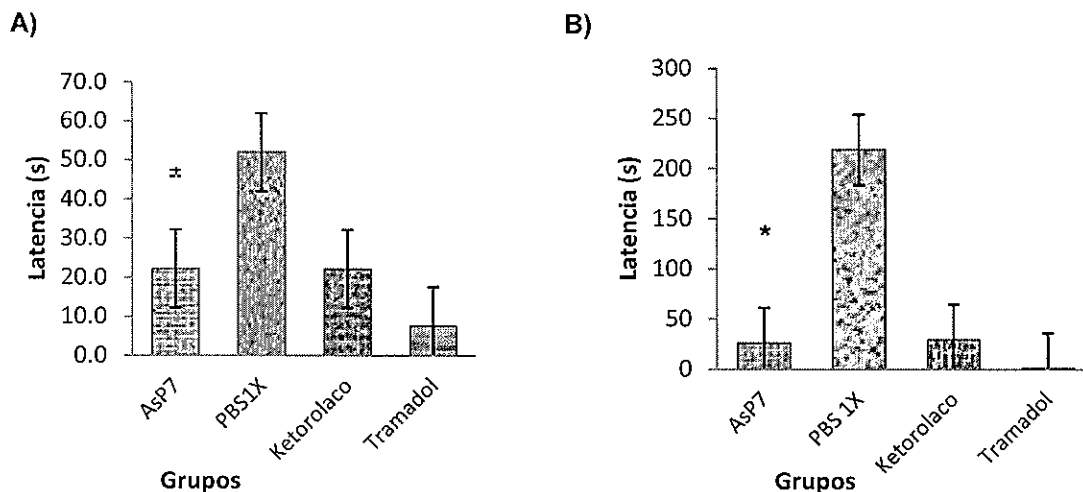


Figura 15. Análisis del efecto analgésico de AsP7 durante la prueba de la formalina. Se muestra con barras la media \pm SEM $n=3$ ratones machos CD1. A) Actividad analgésica de AsP7 fase 1. B) Actividad analgésica de AsP7 fase 2. Se observó una diferencia significativa comparada con el control negativo PBS 1X (Anexo 4) *.

De acuerdo el análisis de los datos, se observó un efecto analgésico significativo de la sub-fracción AsP7 con respecto al control negativo durante el dolor persistente de la fase 1 y 2 en la prueba de la formalina. Se observa una disminución del 57.3% en la percepción del dolor durante la fase 1 y un 88% durante la fase 2.

VII.2. *C. ximenes*

VII.2.1. Colecta de organismos, obtención y cuantificación de veneno total

La colecta fue realizada por el equipo de Biotoxinas del CICESE. Los 70 organismos colectados, se identificaron morfológicamente como *C. ximenes*.

Para la obtención del veneno total de *C. ximenes* se siguió la metodología descrita en el apartado VI.2.2. Se obtuvieron por diferencia de peso seco 38 mg de veneno total de *C. ximenes*.

VII.2.2. Purificación y caracterización del veneno

VII.2.2.1. HPLC-RP

La purificación del veneno total de *C. ximenes* se realizó en base al apartado VI.4.2.1. Se colectaron fracciones de 5 minutos, obteniendo 13 fracciones que se rotularon como CXF1 a CXF13 (Figura 16).

En el cromatograma de la purificación por HPLC-RP del veneno total de *C. ximenes*, podemos observar la presencia de aproximadamente 45 componentes, que coincide con lo reportado por el Laboratorio de Biotoxinas del CICESE en purificaciones anteriores.

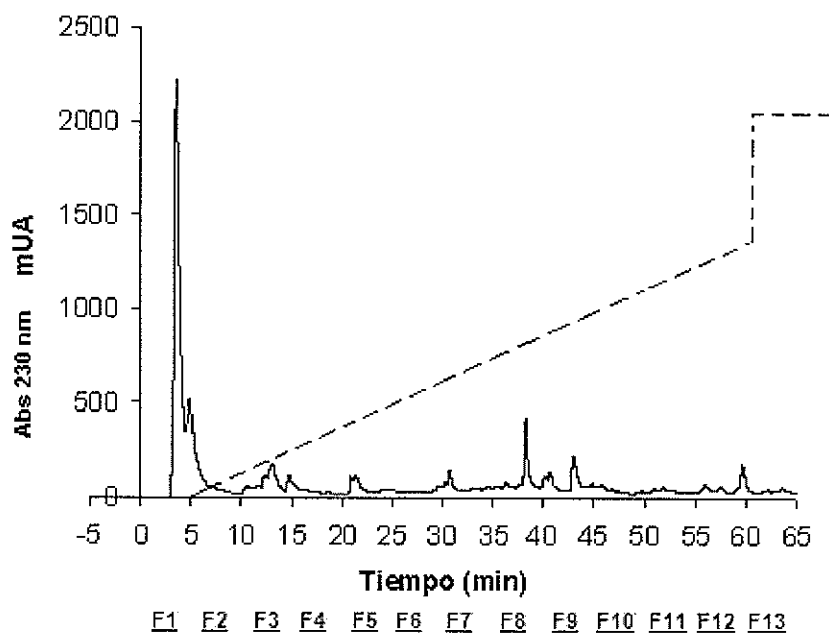


Figura 16. Cromatograma de la purificación del veneno total de *C. ximenes*. Se realizó un HPLC-RP, se inyectaron 6 mg de veneno total de *C. ximenes* en una columna C18 Grace-Vydac 218TP54 (250 x 4.6 mm, 300 Å) y una pre-columna Zorbax- Agilent C18 (Agilent Technology, 4.6 x 12.5 mm, 5 µm). Se utilizó un gradiente lineal de elución de 0-60% de AcN con un tiempo de corrida de 60 minutos y flujo de 1 mL/min. Se midió la absorbancia de los componentes pépticos a $\lambda=230$ nm. Se colectaron fracciones de 5 minutos y se rotularon como CXF1 a CXF13.

La cuantificación de las fracciones obtenidas durante la purificación del veneno de *C. ximenes*, se llevó a cabo de dos maneras como se mencionó en el apartado VI.4.2.3. Se estableció que la cuantificación calculada por el método de área bajo la curva, estaba sobreestimada y se descartó su validez para el cálculo de dosis en los ensayos biológicos.

En la Tabla VIII se muestra la cuantificación de las proteínas presentes en las fracciones de *C. ximenes*, obtenidas por la medición de DO de los compuestos pépticos a $\lambda=280$ nm en el nanodrop propiedad del Laboratorio del IBT, campus Cuernavaca, Morelos.

Tabla VII. Cuantificación de las fracciones obtenidas durante la purificación del veneno total de *C. ximenes*.

Fracción	Cantidad (μg)
CXF2	361.29
CXF3	549.05
CXF4	309.774
CXF5	384.79
CXF6	98.09
CXF7	187.10
CXF8	75.13
CXF9	247.06
CX10	78.54
CXF11	105.01
CXF12	87.08
CXF13	25.71

A partir de las cantidades de la Tabla VII, se realizaron los cálculos para elaborar las dosis que se utilizaron en los ensayos biológicos.

VII.2.2.2. "Hot-plate"

Los ensayos biológicos de dolor agudo en modelo murino, se realizaron como se describió en la sección VI.5.1. En la Tabla VIII se muestra la cantidad inyectada por la vía IP de cada fracción. Se inyectaron cantidades no equiparables de cada fracción.

Tabla VIII. Dosis inyectada vía IP de las fracciones de veneno total de *C. ximenes* durante el ensayo de "Hot-plate". Se utilizó PBS 1X como vehículo.

Fracción	µg/gr ratón
CXF2	2.34
CXF3	1.73
CXF4	1.04
CXF5	1.12
CXF6	0.67
CXF7	0.4
CXF8	0.11
CXF9	0.4
CXF10	0.33
CXF11	0.37
CXF12	0.2
CXF13	0.1

En la Figura 17 se muestra la respuesta de los ratones inyectados con las fracciones de veneno de *C. ximenes* durante el ensayo "Hot-plate". Para determinar la actividad analgésica, se compararon las medias \pm el error estándar de la media (SEM), de cada fracción con el control negativo. Se tomó como referencia los IC y se consideró un efecto analgésico significativo, cuando estos son diferentes respecto al control negativo.

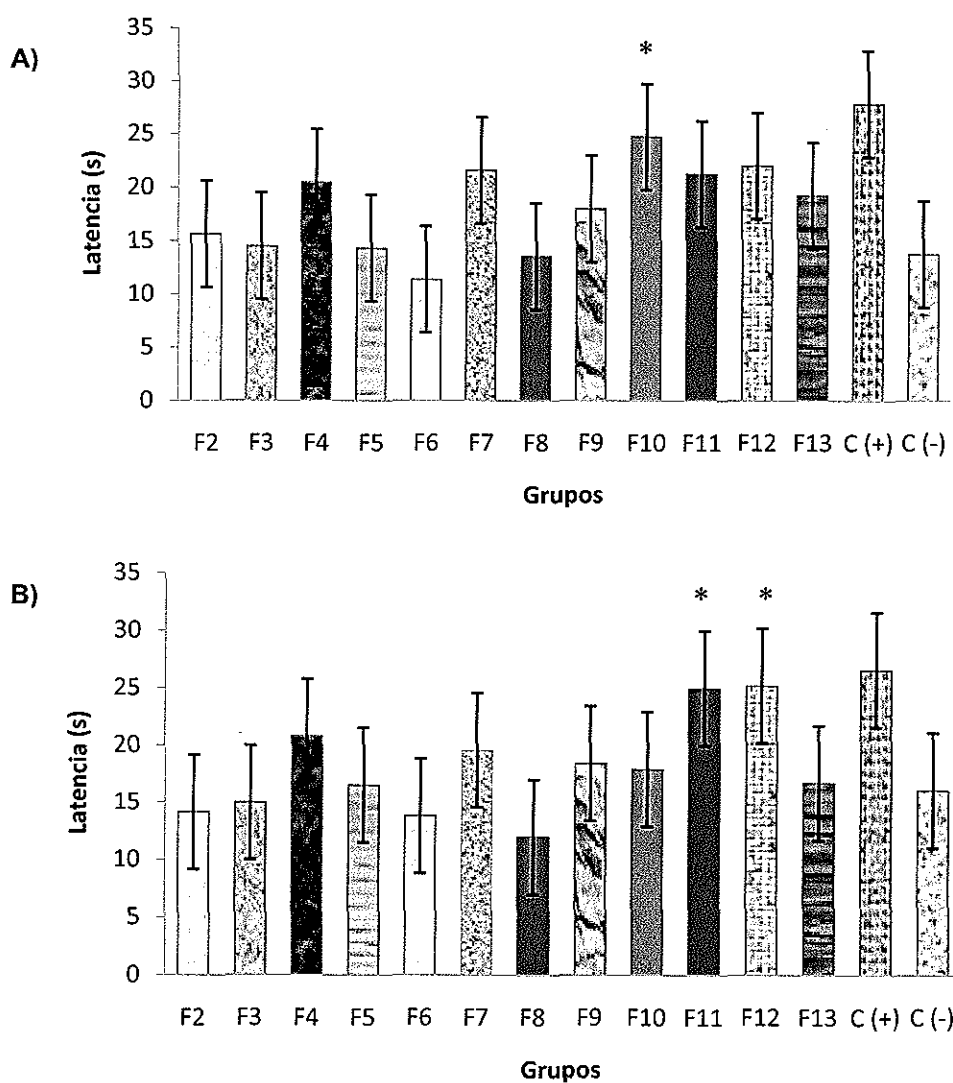


Figura 17. Actividad analgésica de las fracciones de veneno de *C. ximenes* durante "Hot-plate". Se muestran con barras las medias \pm SEM $n=3$ machos CD1. Se inyectó 200 μ L vía IP cada fracción, así como los controles negativo, PBS 1X (C-) y positivo (C+) nalbufina 10 mg/kg. **A)** Actividad analgésica a los 30 min post-inyección. Se observó una diferencia significativa con respecto al C (-) para la F10. **B)** Actividad analgésica a los 45 min post-inyección. Se observó una posible actividad analgésica en la fracción F11 y F12 del veneno de *C. ximenes* *.

La fracción CXF10 mostró actividad analgésica a los 30 minutos post-inyección, mientras que la fracción CX11 y CX12 a los 45 minutos post-inyección, se encuentran en el límite considerado como efecto analgésico. Se eligió la fracción CXF10 fracción por ser la de mejor perfil cromatográfico. Se realizó una re-

purificación de la fracción CXF10 en colaboración con el Laboratorio de Biotoxinas del CICESE. Las sub-fracciones se analizaron con el ensayo de la formalina.

VII.2.2.3. Re-purificación de la fracción CXF10

En la Figura 18 se muestra el cromatograma de la re-purificación de la fracción CXF10 de donde se obtuvieron 4 sub-fracciones principales. Trabajo realizado por el Laboratorio de Biotoxinas del CICESE

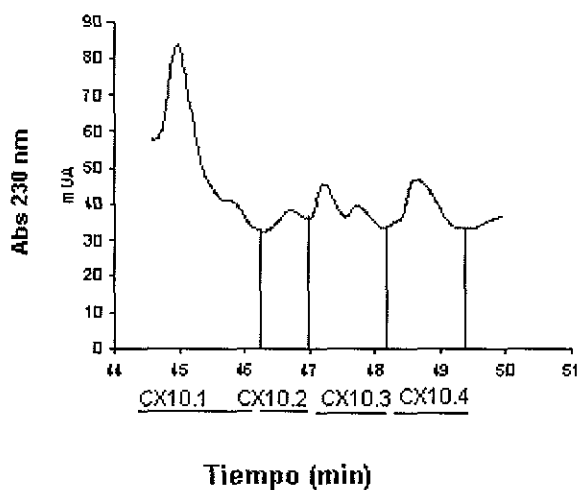


Figura 18. Cromatograma de la re-purificación de la fracción CXF10 de *C. ximenes*. HPLC-RP de veneno total de *C. ximenes*.

Las sub-fracciones obtenidas de la re-purificación de la fracción CXF10 se nombraron CX10.1 a CX10.4 de acuerdo a su tiempo de retención en la columna de HPLC-RP.

VII.2.2.4. Prueba de la formalina para las sub-fracciones de CXF10

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo al protocolo que se estableció en el apartado VI.5.2. En la Tabla IX se muestra la cantidad inyectada de las sub-fracciones de CXF10.

Tabla IX. Dosis inyectadas de las sub-fracciones CXF10 durante la prueba de la formalina

Sub-fracción	$\mu\text{g/gr ratón}$
CX10.1	0.33
CX10.2	0.33
CX10.3	0.33
CX10.4	0.33

Los datos obtenidos durante el ensayo se colectaron y se realizó un análisis. Para evaluar la capacidad analgésica se compararon los IC de cada sub-fracción y el control negativo (Fig.19). Se consideró como significativo, aquellos grupos que su IC mostrara diferencia respecto al control negativo.

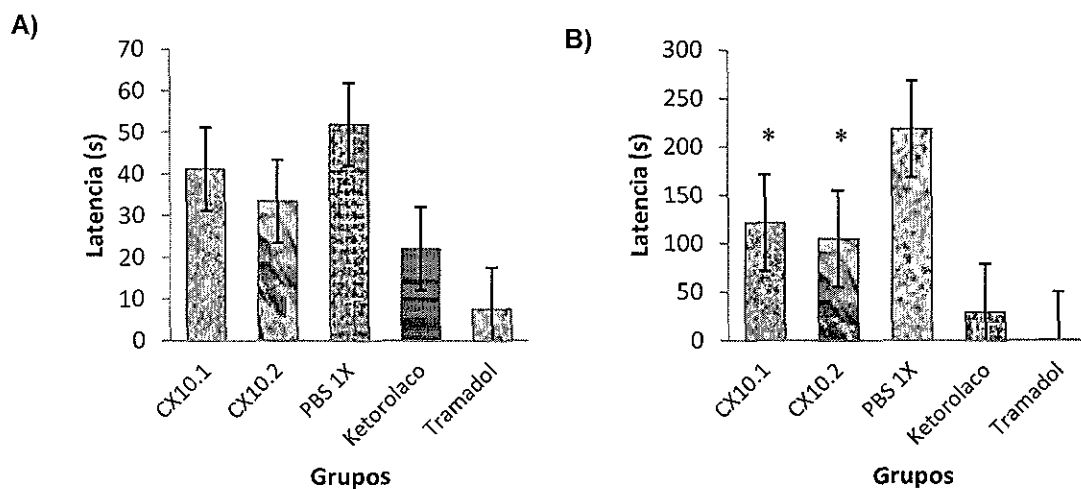


Figura 19. Análisis de los datos de las sub-fracciones de CX10 durante la prueba de la formalina. Las barras representan la media \pm SEM n=3 ratones machos CD1. A) Actividad analgésica de las sub-fracciones CX10 durante la fase 1. B) Actividad analgésica de las sub-fracciones CX10 durante la fase 2. Se observó actividad analgésica para las sub-fracciones CX10.1 y CX10.2 durante la fase 2 *.

Las sub-fracciones CX10.1 y CX10.2 mostraron una reducción del dolor del 20.7 y 35.6 % respecto al control negativo durante la fase 1. Las sub-fracciones CX10.1 y 10.2 presentaron una reducción del dolor de un 44.5 y 51.9%, respectivamente, durante la fase 2.

VII.3. Caracterización de toxinas de *C. regularis*

VII.3.1. "Hot-plate" para CRP20a

El ensayo del péptido CRP20a se realizó según la metodología descrita en el apartado VI.5.1. En este ensayo la cantidad de péptido inyectado fue de 0.85 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal del ratón. En la Figura 20 se presenta el análisis del efecto analgésico del péptido CRP20a durante la prueba de la placa caliente.

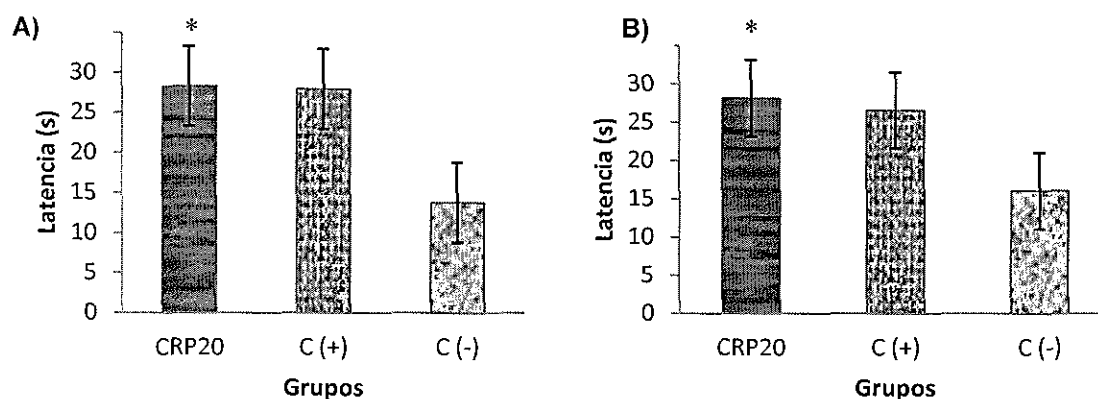


Figura 20. Análisis de la actividad analgésica del péptido CRP20a durante la prueba "Hot-plate". Las barras indican las medias \pm SEM n=3 ratones machos CDI. Se inyectaron vía IP 200 μl del péptido, del control negativo PBS 1X (C-) y control positivo nalbufina 10 mg/Kg (C+). A) Actividad analgésica de CRP20a 30 minutos post-inyección. B) Actividad analgésica de CRP20a 45 minutos post-inyección. Se observó una diferencia significativa de la actividad analgésica de CR20a con respecto al C(-) a los 30 y 45 min post-inyección *.

La actividad analgésica del péptido CRP20a se mostró equiparable a la actividad del control positivo.

VII.3.2. Prueba de la formalina

La actividad analgésica del péptido CRP20a se siguió evaluando, mediante la prueba de la formalina. La prueba de la formalina se llevó a cabo como se indicó en el apartado VI.5.2, se inyectó la misma dosis que se utilizó durante el "Hot-plate".

En la Figura 21 se muestra el análisis de los datos obtenidos durante la prueba de la formalina para CRP20a. Los datos se agruparon en dos fases, como fase 1(1-5 min) y del minuto 11 al 45 post-inyección como la fase 2.

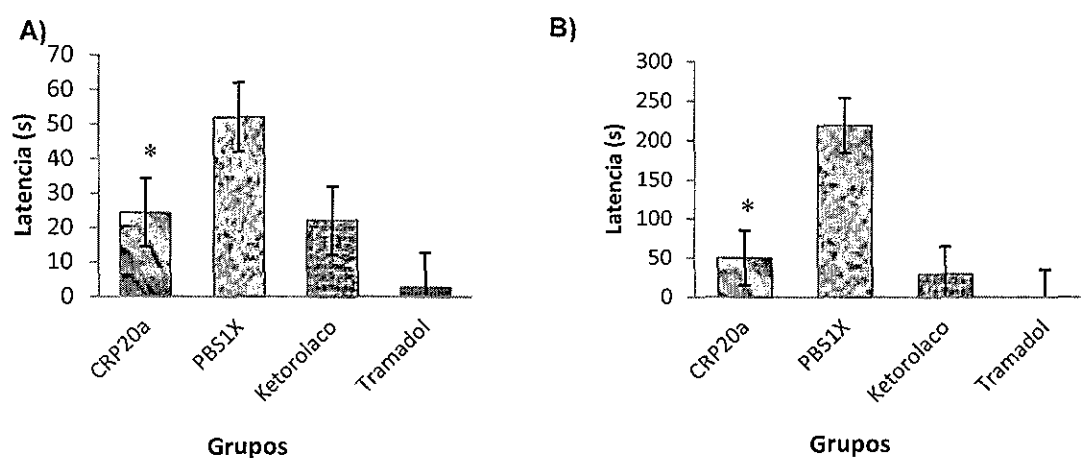


Figura 21. Análisis del efecto analgésico de *C. regularis* durante la prueba de la formalina. Se representan con barras las medias \pm SEM $n=3$ ratones machos CD1. A) Actividad analgésica durante la Fase 1. B) Actividad analgésica durante la Fase 2. Se observó actividad analgésica del péptido CRP20a en ambas fases. Se realizó una prueba comparativa de los IC de CRP20a y el control negativo PBS 1X (Anexo 4) *.

El péptido CRP20a redujo en un 53.3% la percepción del dolor durante la fase 1. En base al análisis comparativo, el CRP20a y el grupo control negativo, el

CRP20a mostró una analgesia significativa durante la fase 2 de la prueba de la formalina, con una reducción del dolor en un 77%.

VII.4. Caracterización de toxinas de *C. californicus*

VII.4.1. "Hot-plate"

La actividad biológica de los péptidos sintéticos de *C. californicus* nombrados CCP1 y CCP2 se evaluó mediante "Hot-plate". La metodología que se siguió fue la descrita en el apartado VI.5.1. La dosis que se utilizó fue 0.85 µg/g de peso corporal de ratón. En la Figura 22 se muestra la actividad de los péptidos CCP1 y CCP2 de *C. californicus* durante el ensayo.

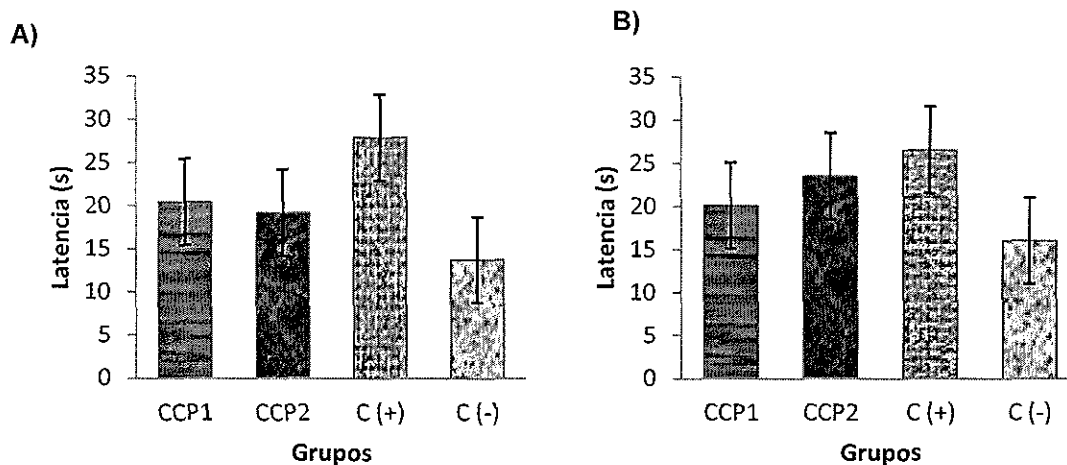


Figura 22. Análisis del efecto analgésico de los péptidos CCP1 y CCP2 durante el ensayo "Hot-plate". Las barras representan la media \pm SEM $n=3$ ratones machos CD1. Se inyectó vía IP 200 µl de los péptidos CCP1, CCP2, así como de los controles, negativo (C-) PBS 1X y control positivo (C+) nalbufina 10 mg/kg. A) "Hot-plate" 30 min post-inyección. B) "Hot-plate" 45 min post-inyección. No se observó actividad analgésica de CCP1 y CCP2.

No se observó actividad analgésica evidente de los péptidos purificados CCP1 y CCP2 provenientes del veneno de *C. californicus*, en ninguno de los tiempos de

medición de la respuesta al estímulo nocivo (30 y 45 min post-inyección), durante el ensayo biológico "Hot-plate". Los análisis comparativos de los IC de CCP1 y CCP2 con el control negativo, muestran que no existe diferencia significativa entre ellos.

No se evaluó la actividad analgésica de CPP1 y CPP2 con la prueba de la formalina, debido a que no se obtuvo un indicador de actividad analgésica periférica con la prueba de la placa caliente.

VIII. DISCUSION

VIII.1 Colecta de *Anthopleura* sp

Debido a que existe una gran similitud morfológica entre las especies de anémonas que habitan en la costa de Baja California, se decidió nombrarla únicamente por el género, dejando abierta la posibilidad de especie. Las especies que están relacionadas con el organismo colectado son, *Anthopleura sola* (Pearse y Francis, 2000), *Anthopleura elegantissima* (Brandt 1835) y *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt 1835).

Es necesario realizar una identificación más detallada de la especie, mediante un análisis de extracción de ADN comparando con las tres especies relacionadas.

VIII.1.2. Caracterización de toxinas de *Anthopleura* sp con efecto analgésico

La obtención del extracto venenoso crudo de *Anthopleura* sp, se realizó siguiendo la técnica utilizada previamente en el Laboratorio de Biotoxinas del CICESE, donde se eliminó el paso desnaturizante en la metodología descrita por Ständker y colaboradores (2006). Esta modificación se realizó para optimizar la obtención de compuestos tóxicos en su forma nativa.

Se analizaron las fracciones 2 y 3, se eligieron estas fracciones por su tiempo de retención en la columna de exclusión molecular. La resina utilizada en la cromatografía de exclusión molecular, Bio-gel P100 tiene capacidad de exclusión de moléculas con pesos de 5 kDa hasta de 100 kDa (www.bio-rad.com). Por lo que podemos inferir que el tamaño de las fracciones elegidas es de aproximadamente 5 kDa, lo que corresponde con lo encontrado en la literatura,

donde las toxinas de anémoma del género *Anthopleura* con tamaños aproximados de 5 kDa, corresponden a aquellas con actividad sobre canales iónicos (Wanke *et al.*, 2009; Norton, 2009).

La sub-fracción AsP7, mostró una eficiente disminución de la percepción de dolor agudo en la prueba de la placa caliente, que se representa como un aumento en la latencia (s) respecto al C (-), durante las dos mediciones realizadas, lo que nos indica que el efecto analgésico persiste durante al menos 45 minutos. En el presente trabajo, a diferencia de análisis anteriores, con toxinas de anemonas en modelos nociceptivos, la vía de administración se realizó de manera IP, logrando una penetración sistémica de la toxina con efecto analgésico en dolor agudo. El efecto analgésico coincide con lo reportado para una toxina de anémoma, APETx2, donde se realizó una aplicación localizada y con ello, se aumentó significativamente la latencia durante la prueba de la placa caliente (Deval *et al.*, 2008).

La sub-fracción AsP7, durante la fase 1 en la prueba de la formalina disminuyó en un 57.3% la percepción del dolor. El dolor por inflamación durante la fase 2, disminuyó considerablemente en un 88%, con la administración IP de AsP7. El resultado obtenido era de esperarse, ya que se ha demostrado la actividad analgésica de otras toxinas aisladas de anémoma, inyectadas de manera IT, IV y localizada, en modelos de dolor post-operatorio, así como en dolor por inflamación y el provocado por acidez en los tejidos (Deval *et al.*, 2011; Deval *et al.*, 2008; Yaroslav *et al.*, 2008 y Karszczewski *et al.*, 2010). No se tiene conocimiento del blanco de acción de la fracción AsP7. Con base en las observaciones realizadas, se puede inferir que tiene actividad sobre canales implicados en la percepción del dolor térmico, como los canales TRPV, o por inflamación, como los canales ASIC. La toxina AsP7 se une a la lista de herramientas en el estudio y comprensión de la neurotransmisión, a través de los canales iónicos. Debido a que se trata de una

toxina con efecto analgésico sistémico, AsP7 es entonces candidata en la búsqueda de alternativas para la terapia del dolor.

VIII.2. Caracterización de toxinas de *C. ximenes* con efecto analgésico

En la purificación del veneno total de *C. ximenes*, se obtuvieron alrededor de 45 componentes. Los trabajos realizados anteriormente en el Laboratorio de Biotoxinas del CICESE, reportaron una cantidad similar de componentes (Oroz, 2011; Pitones, 2008).

En el presente trabajo se evaluaron las 12 fracciones purificadas del veneno total de *C. ximenes*. En el ensayo "Hot-plate" se observó un efecto analgésico de la fracción CXF10 mediante la administración IP durante los primeros 30 minutos. Este resultado es prometedor, ya que se demostró que la fracción CXF10 actúa sobre el dolor agudo de manera periférica. Contrario a lo encontrado en ensayos anteriores, donde se ha evaluado la capacidad anti-nociceptiva de péptidos provenientes de diversos *Conus* (McIntosh *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2010), durante el dolor agudo sobre la placa caliente, la analgesia se muestra solo con la administración intratecal (IT) o intra-cerebroventricular (ICV). Las fracciones CXF11 y CXF12, también mostraron actividad en "Hot-plate" a los 45 min post-inyección, sin embargo en base a la comparación de los IC, se encuentran en el límite detectable como efecto analgésico, por lo que es necesario continuar evaluando dichas fracciones. Se tomó la fracción CXF10 para realizar un segundo ensayo que evaluara la capacidad analgésica, debido a que el efecto analgésico a los 30 min fue evidente, no obstante, el efecto disminuyó a los 45 min, pudo deberse a que la dosis utilizada para esta fracción fue baja. Si bien las dosis de las fracciones de veneno total, utilizadas durante "Hot-plate" no son equiparables, la dosis que se utilizó de CXF10 es una de las más bajas, lo cual amerita validez al resultado.

Durante la prueba de la formalina, se evaluaron 4 sub-fracciones de CXF10. A la fecha se tienen analizadas las fracciones CX10.1 y 10.2. Durante la fase 1 del estudio de la formalina, no se encontró una diferencia significativa del efecto de las sub-fracciones CX10.1 y CX10.2 y el control negativo. Sin embargo CX10.1 y CX10.2 disminuyeron la percepción del dolor en un 44.5 y 51.9%, el dolor por inflamación durante la segunda fase, comparado con el control negativo. Contrario a lo encontrado en el presente estudio, se tiene reportado para la μ -conotoxina KIIIA, inhibición durante las dos fases de la prueba de la formalina, con la administración de la toxina vía IP (Zhang *et al.*, 2007). Si tomamos en cuenta, que ambas sub-fracciones se encuentran contiguas en el cromatograma y muestran una actividad similar, podríamos pensar que estas dos sub-fracciones actúan de manera aditiva para provocar el efecto analgésico que presentó CXF10 durante la prueba "Hot-plate". En los trabajos previos realizados dentro del Laboratorio de Biotoxinas del CICESE, es la primera vez que se evalúa la capacidad analgésica de las toxinas del veneno de *C. ximenes*. Las fracciones que presentaron actividad analgésica, sin embargo, no han presentado ningún otro efecto en mamíferos; lo cual es alentador y nos da la pauta para continuar con los trabajos, dentro de esta línea de investigación.

VIII.3. Caracterización de toxinas de *C. regularis* con efecto analgésico

Previo a este trabajo, se realizaron ensayos electrofisiológicos para CRP20a y se encontró que tiene actividad sobre canales de calcio, por tal motivo y en base a la participación de dichos canales en la nocicepción, se evaluó el efecto analgésico.

El péptido CRP20a tuvo actividad analgésica evidente durante la prueba de "Hot-plate" a los 30 y 45 minutos post-inyección, el efecto fue comparable con el que mostró el control positivo, nalbufina, un fármaco de tipo opioide. Debido a que la prueba del "Hot-plate" nos indica actividad analgésica de tipo opioide sobre receptores de calcio tipo N y el efecto de CRP20a es comparable al de nalbufina,

podemos inferir actividad analgésica de intensidad similar a la que muestran los fármacos opiodes, tal como sucede con Ziconotide, pero en este caso con la administración periférica (Thongpradichote *et al.*, 1998; South y Smith, 1998 y Muñoz *et al.*, 2009). El efecto de la conotoxina CRP20a durante la prueba de "Hot-plate", se diferencia a lo reportado para la conotoxina It14a, en la vía de administración; It14a administrado de manera ICV y mostró una duración de la analgesia hasta las 5 horas post-inyección (Sun *et al.*, 2010). Durante el presente trabajo se midió la respuesta analgésica hasta los 45 minutos posteriores a la inyección del péptido, CRP20 mantiene el efecto analgésico durante este tiempo. Teniendo como referencia el tiempo de analgesia de It14a, se puede extender el tiempo de observación y hacer una comparación de ambas toxinas.

Con el efecto analgésico de CRP20a obtenido en "Hot-plate" se esperaba obtener un efecto analgésico en la prueba de la formalina. La prueba de la formalina nos permite analizar un dolor persistente bifásico. Durante la primera fase que inicia en el momento de la inyección de la formalina hasta los 5 minutos, se detecta el dolor agudo provocado por la invasión mecánica del tejido. Durante la fase 2, se detecta el dolor periférico persistente provocado por la inflamación del tejido circundante a la inyección de la formalina (Hunskaar y Hole, 1987). En base al análisis comparativo de los IC, se mostró actividad analgésica de CRP20a durante la fase 1 de la prueba de la formalina. El efecto analgésico de dicho péptido se hace más evidente durante la fase 2 de la prueba de la formalina, podemos pensar que este resultado se atribuye a que la actividad se alcanza a los 30 minutos post-inyección. Cabe mencionar que el efecto analgésico de las toxinas aquí descritas, es sobre el dolor nociceptivo. Por otra parte, se han analizado toxinas provenientes de *Conus* con potencial analgésico durante el dolor neuropático y se han obtenido resultados prometedores, mediante la administración de manera periférica (Daly *et al.*, 2011; Clark *et al.*, 2010; McIntosh *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007).

VIII.4. Caracterización de toxinas de *C. californicus* con efecto analgésico

Los péptidos sintéticos CCP1 y CCP2 se sometieron a pruebas electrofisiológicas y se determinó actividad sobre canales de calcio (Bernáldez *et al.*, 2010), por esta razón se decidió evaluar la capacidad analgésica de estos péptidos.

En los ensayos biológicos realizados en el presente trabajo se probó la actividad analgésica periférica, inyectando los péptidos CCP1 y CCP2 de manera intraperitoneal. No se observó actividad analgésica periférica significativa, para los péptidos CCP1 y CCP2, pero esto no descarta una posible actividad analgésica a nivel medular. Así como la conotoxina MVIIA (McIntosh *et al.*, 1982) posee efecto analgésico mediante la administración intratecal, es probable que los péptidos CCP1 y CCP2 tengan efecto analgésico vía sistema nervioso central (SCN), esto en base a que la analgesia de las conotoxinas, sobre SNC ha sido reportada por varios autores (Lee *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Hama y Sagen, 2009).

IX. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en la caracterización biológica de las toxinas presentes en el veneno de *Anthopleura* sp, se identificó la sub-fracción **AsP7** con efecto analgésico durante el dolor agudo y un efecto analgésico provocado por inflamación, de manera periférica. Las características químicas de AsP7 que se obtuvieron son, el peso molecular, que se encuentra dentro del rango de 5kDa y se observaron características hidrófobas, de acuerdo a lo obtenido durante las cromatografías.

Durante la caracterización biológica de las fracciones obtenidas a partir del veneno de *C. ximenes*, se logró identificar las fracciones **CXF10**, **CXF11** y **CXF12** con efecto analgésico periférico durante la prueba de la placa caliente. La característica química que se observó para las fracciones CXF10, CXF11 y CXF12 es hidrofobicidad, de acuerdo a lo observado en el cromatograma. Sin embargo, es necesario continuar con la purificación de la fracción CXF10 y caracterizar la actividad analgésica de cada sub-fracción, siguiendo los ensayos biológicos de "Hot-plate".

El análisis del péptido puro **CRP20a** obtenido del veneno de *C. regularis*, presentó actividad analgésica de manera sistémica durante la percepción del dolor agudo en la prueba de la placa caliente y un efecto analgésico provocado por inflamación, con la prueba de la formalina.

Los péptidos sintéticos **CPP1** y **CPP2** aislados a partir del veneno de *C. californicus*, no mostraron actividad analgésica de manera sistémica.

X. PERSPECTIVAS

Para señalar la especie de anémona que se utilizó, se debe continuar con la caracterización por medio de extracción de ADN.

Es necesario realizar la purificación y la secuenciación de AsP7. Es primordial caracterizar la toxina AsP7 electrofisiológicamente y encontrar el blanco molecular sobre el que actúa. Se debe evaluar el efecto analgésico mediante otros modelos, para robustecer los resultados presentados y ampliar la caracterización biológica de esta toxina aislada del veneno de *Anthopleura* sp.

Se recomienda evaluar mediante el modelo de la placa caliente, el efecto analgésico de las sub-fracciones de CXF10, CXF11 y CX12, así como continuar con el análisis de la actividad de las toxinas de *C. ximenes*, durante la prueba de la formalina. Se debe realizar la purificación y secuenciación de las toxinas con efecto analgésico. Es recomendable continuar con la caracterización electrofisiológica de las toxinas con efecto analgésico y de esta manera conocer el blanco molecular sobre el cual actúan.

Es de gran interés continuar con la evaluación de la actividad analgésica del péptido CRP20a. Se sugiere utilizar otro sistema de dolor agudo térmico, como la prueba del movimiento de la cola o "tail flick", que evalúa la capacidad analgésica a nivel espinal (South y Smith, 1998). La prueba de los filamentos de Von-Frey, es ampliamente recomendada, esta prueba evalúa la alodinia mecánica que provoca un dolor agudo y puede ser causa de una hipersensibilidad de los canales de calcio tipo N (Duarte-Dalmilín *et al.*, 2011). Es necesario realizar un análisis del efecto dosis-respuesta, dosis letal media, así como llevar a cabo la farmacodinamia y farmacocinética del péptido, en mamíferos.

La caracterización del efecto biológico de los péptidos provenientes de *C. californicus*, debe continuar con otra línea de investigación. Se puede iniciar con la administración IT y utilizar los mismos modelos aquí descritos. Se puede evaluar el efecto analgésico en el dolor neuropático, administrando IT sobre el modelo de ligación del nervio o por el modelo de lesión por constricción crónica (CCI por sus siglas en inglés) en dolor neuropático.

XI. REFERENCIAS

- Bao, J., Li, J.J. y Perl, E.R., 1998. **Differences in Ca²⁺ channels governing generation of miniature and evoked excitatory synaptic currents in spinal laminae I and II.** *Journal of Neuroscience* 18: 8740-8750.
 - Bèress, L., Bèress, R., Wunderer, G., 1975. **Purification of three polypeptides with neuro-and cardiotoxic activity from the sea anemone *Anemonia sulcata*.** *Toxicon* 13: 359-367.
 - Becker, S. y Terlau, H., 2008. **Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production.** *Microbiology Biotechnology* 79: 1-9.
 - Bernáldez, J., López, O., Licea, a., Salceda, E., Arellano, R.O., Vega, R. y Soto, E., 2010. **Electrophysiological characterization of a novel small peptide from the venom of *Conus californicus* that targets voltage-gated neuronal Ca_v2p channels.** *Toxicon* 1-8.
 - Brusca, R.C., Brusca, G.J., 2003. **Invertebrates.** *Editorial Sinauer Associates, Inc., Publishers.* Segunda edición, pp 936.
 - Bulaj, G., Buczek, O., Goodsell, I., Jimenez, E.C., Kranski, J., Nielsen, J.S., Garret, J.E. y Olivera, B.M., 2003. **Efficient oxidative folding of conotoxins and the radioation of venomous cone snails.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14562-14568.
 - Cestèle, S., Catterall, W.A., 2000. **Molecular mechanism of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels.** *Biochimistry* 82: 883-892.
 - Chagot B., Escoubas, P., Diochot, S., Bernard, C., Lazdunski, M. y Darbon H., 2005. **Solution structure of APETx2, a specific peptide inhibitor of ASIC3 proton gated channels.** *Protein Science*, 14(8): 2003-2010.
 - Clark, R.J., Jensen, J., Nevin, S.T., Callaghan, B.P., Adams, D.J. y Craik, D.J., 2010. **The engineering of an orally active conotoxin for the treatment of neuropathic pain.** *Angewandte Chemie*, 49: 6545-6548.
-

- Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U., Gutiérrez-Salmerón, C., Betancour-Sandoval, J.A. y Córdova-Domínguez, J.A., 2010. Epidemiología del dolor crónico en México. *Revista Mexicana de Anestesiología* 33(4):207-213.
 - Craig, A.G., Bandyopadhyay, P. y Olivera, B.M., 1999. *European Journal of Biochemistry* 264: 271-275.
 - Deer, T., Krames, E.S., Hassenbusch, S., 2008. **Future directions for intrathecal pain management: a review and update from the Interdisciplinary Polyanalgesic Consensus Conference 2007** 11: 92-97.
 - De los Ríos, V., Mancheño, J.M., Lanio, M.E. Oñaderra, M., Gavilanes, J.G., 1998. **Mechanism of the leakage induced on lipid model membranes by the homolytic protein sticholysin II from the sea anemone *Stichodactyla helianthus***. *European Journal of Biochemistry* 252: 284-289.
 - Deval, E., Noël, J., Gasull, X., Delaunay, A., Valérie, F., Eschalier, A., Lazdunski y Lingueglia, E., 2008. **Acid-sensing ion channels in postoperative pain**. *The Journal of neuroscience* 31(16): 6059–6066
 - Diaz, J.M., Gracia, A.M. y Cantera, J.M., 2005. **Checklist of the cone shells (Mollusca: Gastropoda: Neogastropoda: Conidae) of Colombia**. *Biota Colombiana* 6(1): 73-86.
 - Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., Laddunski, M., 2004. **A new sea anemone peptide, APETx2, inhibit ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons**. *EMBO J.* 23: 1516-1515.
 - Doan, Lisa, 2010. **Voltage-gated calcium channels and pain**. *Techniques in regional anesthesia and pain management* 14: 42-49.
 - Duda, T.F., Kohn, Alan J., Jr., 2005. **Especies-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Conus***. *Molecular phylogenetics and evolution* 34: 257-272.
 - González-Villarreal, L.M., 2005. **Guía ilustrada de los gasterópodos marinos de la Bahía de Tenacatita, Jalisco, México**. *Scientia-CUCBA* 7(1): 1-84.
 - Grimsley G.R. y Pace C.N., 2003. **Current Protocols in Protein Science**. 3.1.1-3.1.9.
-

- Hamma, A. y Sagen, J., 2009. **Antinociceptive effect of the marine snail peptides conantokina-G and conotoxina MVIIA alone and in combination in rat models of pain.** *Neuropharmacology* 56(2): 556-563
 - Han, T.S., Teichert, R.W., Olivera, B.M., Bulaj, G., 2008. **Conus venoms a rich source of peptide-based therapeutics.** *Current Pharmacology Des.* 14:2462-2479.
 - Heinke, B., Balzer, E., Sandkuhler, J., 2004. **Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca²⁺ channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons.** *European Journal of Neuroscience* 19: 103-111.
 - Hunskaar, S., Fasmer, O.B. y Hole, K., 1985. **Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics.** *Journal of Neuroscience Methods* 14: 69-76.
 - Hunskaar S. y Hole, K., 1987. **The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain.** *Pain* 30:103-114.
 - Jakubowski, J.A., Kelley, W.P., Sweedler, J.V., Gilly, W.F. y Shulz, J. R., 2005. **Intraspecific variation of venom injected by fish-hunting Conus snails.** *The Journal of Experimental Biology* 208: 2873-2883.
 - Keen, A.M., 1971. **Sea shells of tropical west America: Marine mollusks from Baja California to Peru.** *Stanford University Press.* Segunda Edición pp. 1064.
 - Kerstitch, A. y Berstch, H., 2007. **Sea of Cortez marina invertebrates, a guide for the Pacific Coast, Mexico to Peru.** *Sea challengers.* Segunda Edición pp. 100.
 - Kohn, A.J., Saunders, P.R., Weiner, S., 1960. **Preliminary studies on the venom of the marine snail, Conus.** *Ann. NY Academy Science* 90: 706-725.
 - Kohn, A.J., 1966. **Food specialization in Conus in Hawaii and California.** *Ecology* 47: 1041-1043.
 - Kohn, A.J. y Hunter, C., 2001. **The feeding process in Conus imperialis.** *Veliger* 44: 232-234.
-

- Lawson, E.F., Wallace, M.S., 2010. **Current developments in intraspinal agents for cancer and noncancer pain.** *Current Pain Headache Rep* 14: 8-16.
 - Lee, S., Kim, Y., Back, S.K., Choi, H-W., Lee, J.Y., Jung, H.H., Suh, H-W., Na, H.S., Kim, H.J., Rhim H. y Kim J.II, 2010. **Analgesic effect of highly reversible ω -conotoxin FVIA of N-type Ca^{++} channels.** *Molecular Pain* 6: 97
 - Lui, F.Y., Dai, Q.Y., Li, J.J., Li, X.L. Zhou, Y.R., Huang, P.T., 2001. **SO3 a new type of conotoxin with analgesic activity.** *Bull Acad Military Med. Sci.* 25: 174-177.
 - Liu, J., Wu, Q., Zhao, Y., Zhou, M., Pi, C., Zhou, M., Wang I, Chen, S. y Xu, A., 2007. **Isolation and characterization of a T-superfamily conotoxin from *Conus litteratus* with targeting tetrodotoxin-sensitive sodium channels.** *Peptides* 2313-2319
 - Malmberg, A.B. y Bannon, A.W., 1999. **Current Protocols in Neuroscience.** 8.9.1-8.9.15.
 - Massensini, A.R., Romano-Silva, M.A., Vinicius Gomez, M., 2003. **Sodium channels toxins and neurotransmitter release.** *Neurochemical research* 28: 1607-1611.
 - Martínez-Galván, O. **Caracterización bioquímica del veneno del caracol marino *Conus regularis*.** Tesis de Maestro. *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.* 2010.
 - Marsh, H., 1977. **The radular apparatus of *Conus*.** *Journal Molluscan Studie* 43: 1-11.
 - Marshall, J., Kelley, W.P., Rubakhin, S.S., Bingham, J-P., Sweedler, J.V. y Gilly, W.F., 2002. **Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus*.** *The Biological Bulletin* 203: 27-41.
 - McIntosh M.J., Cruz LJ, Hunkapiller MW, Gray WR, Olivera BM, 1982. **Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*.** *Arch. Biochem. Biophys.* 218: 329-334.
 - McIntosh, M.J., Absalom, N., Chebib, M., Elgoyhen, A.B. y Vincler, M., 2009. **Alpha9 nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain.** *Biochem. Pharmacol* 78(7): 693-702.
-

- Moran, Y., Gordon, D., Gurevitz, M., 2009. **Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels, molecular and evolutionary features.** *Toxicon* 54: 1089-1101.
 - Motin, L., Adams, D.J., 2008. **ω -Conotoxin inhibition of excitatory synaptic transmission evoked by dorsal root stimulation in rat superficial dorsal horn.** *Neuropharmacology* 55: 860-864.
 - Murayama, K., Abbott, N.J, Narahashi, T. y Shapiro, B.I., 1972. **Effects of allethrin and condylactis toxin on the kinetics of sodium conductance of cray fish giant axon membranes.** *Comp. Gen. Pharmacology* 3: 391-400.
 - Murray, C.W., Porreca, F. y Cowan, A., 1988. **Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain.** *Journal Pharmacology Methods* 20: 175-186.
 - Munro-Rojas, D.A. **Análisis del efecto de toxinas de *Anthopleura elegantísima*, *Conus californicus* y *Auroctonus phaiodatylyus* en *Mycobacterium tuberculosis*.** Tesis de Maestro en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 2005.
 - Muñoz, C.E., Vergel, N.E., Aragon, D.M y Ospina, L.F., 2009. **Efecto anti-nociceptivo de *Critoniella acuminata*, *Physalis peruviana* y *Salvia rubescens*.** *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* Vol. 38 (1), 31-41.
 - Myers R.A., McIntosh J.M., Imperial J., Williams R.W., Oas T., Haack J.A., Hernandez J.F., Rivier J., Cruz L.J., y Olivera B.M., 1990. **Peptides from *Conus* venoms which affect Ca^{2+} entry into neurons.** *Journal Toxicology Toxin Rev* 9: 179–202.
 - Nieto, M. J. y Cruciani, R.A., 2006. **Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes.** *Revista de la Sociedad Española del Dolor* 13: 312 – 327
 - Norton, R.S. y Olivera B.M., 2006. **Conotoxins down under.** *Toxicon* 48: 780-798.
 - Norton, R.S., 2009. **Structures of sea anemone toxins.** *Toxicon* 54: 1075-1088.
 - Pearse, V. y Francis, L., 2000. ***Anthopleura sola*, a new species, solitary sibling species to the aggregating sea anemone *A. elegantissima***
-

(Cinadaria: Anthozoa: Actinaria: Actiniidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* Volume 113, Issue 3, 596-608.

- Prior-Mier y Terán, A.G. **Aislamiento y caracterización de toxinas peptídicas de *Anthopleura xanthogrammica***. Tesis de Maestro en Ciencias. *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California*. 2002.
- Olivera B.M., Rivier J. Clark, Ramilo C.A., Corpuz G.P., Abogadie F.C., Mena E.E., Woodward S.R., Hillyard D.R. y Cruz L.J., 1990. **Diversity of *Conus* neuropeptides**. *Science* 249: 257–263.
- Olivera, B.M., 1997. E.E. ***Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology**. *Molecular Biology Cell* 8: 2101–2109.
- Olivera, B.M. y Cruz, L.J., 2001. **Conotoxins, in retrospect**. *Toxicon* 39: 7-14.
- Oman, T.J. y Van der Donk, W.A., 2010. **Follow the leader: The use of leader peptides to guide natural product biosynthesis**. *Nature Chemical Biology* 6: 1-18.
- Pi, C., Liu, J., Peng, C., Liu, Y., Jiang, X., Zhao, Y., Tang, S., Wang, L., Dong, M., Chen, S. y Xu, A., 2006. **Diversity and evolution of conotoxins based on gene expression profiling of *Conus literatus***. *Genomics* 88: 808-819.
- Poggi, M.L, Ibarra, Ch. O., 2007. **Manejo del dolor agudo pos quirúrgico**. *Acta médica peruana* 24(2): 39-45.
- Romero, J., Gálvez, R. y Ruiz, S., 2008. **¿Se sostiene la escalera analgésica de la OMS?** *Revista de la Sociedad Española del Dolor* 15 (1): 1-4.
- Romano-Silva, M.A., Gomez, .V. Brammer, M., 1994. **Modulation of Ca⁺ stimulated glutamate release from synaptosomes by Na⁺ entry through tetrodotoxin-sensitive channels**. *Biochem Journal*. 304: 353-357.
- Röckel, D., Korn, W. y Kohn, A.J., 1995. **Manual of the living Conidae. Vol. 1. Indo-Pacific Region**. *Verlag Cshista Hemmen, Wiesbaden, Germany*. 517pp.

- Sánchez, J., Bruhn, T., Aneiros, A., Wachter, E., Béress, L., 1996. **A simple biochemical method in the search for bioactive polypeptides in a sea anemone (*Anemonia sulcata*)**. *Toxicon* 34: 1361-1366.
 - Schweitz, H., Bruhn, T., Guillermare, e., Moiner, D., Lancelin, J.M., Bèress, L., Lazdunski, M., 1995. **Kalicludines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels**. *Journal of Biological Chemistry* 270: 25121-25126.
 - Smith, B., Potts, D., 1987. **Clonal and solitary anemones (*Anthopleura*) of wester North America: population genetics and systematics**. *Marine Biology* 94: 537-546.
 - Soeda, H., Tatsumi, H., Kozawa, Y., Mishima, H., Imai, K. y Katayama, Y., 2002. **Functional characterization of calcium channels localized on the growth cones of cultured rat dorsal root ganglion cells**. *Neuroscience Letters* 325: 5-8.
 - Sun, D., Ren, A., Zeng, X., you, Y., Pan, W., Zhou, M., Wang, L. y Xu, A. 2010. **Structure-function relationship pf conotoxin It14a, a potencial analgesic with low cytotoxicity**. *Peptides* 32:300-305.
 - Šuput, Dušan, 2009. **In vivo effects of cnidarian toxins and venoms**. *Toxicon* 54: 1190-1200.
 - Ständker, L., Béress, L., Garateix, A., Christ, T., Ravens, U., Salceda, E., Soto E., John, H., Forssmann, W.G., Aneiros, A., 2006. **A next toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation**. *Toxicon* 48: 211-220.
 - Stewart, J. y Gilly, W.F., 2005. **Piscivorous behavior of a temperate cone snail, *Conus californicus***. *The Biological Bulletin* 209: 146-153.
 - Terlau H. y Olivera B.M., 2004. **Conus venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides**. *Physiology revs* 84: 41-68.
 - Thongpradichote, S., Matsumoto, K., Tohda, M., Takayama, H., Aimi, N., Sakai, S. y Watanabe H., 1998. **Identification ot opioid receptors subtype in antinociceptive actions of supraspinally-administered mitragynine in mice**. *Life Sciences* 62(16): 1371.1378.
 - Tudor, J.E., Pallaghy, P.K, Pennington, M.W., Norton, R.S., 1996. **Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from a sea anemone**. *Natural Structure Biology* 3: 317-320.
-

- Tj&en, A., Berge, O-G., Hunskaar, S., Rosland, J.H. y Hole, K., 1992. **The formalin test: an evaluation of the method.** *Pain* 51: 5-17.
- Waldmann, R. y Lazdunski, M., 1998. **H(+)-gated catión channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels.** *Current Opinion in Neurobiology.* 8 (3): 418-424.
- Wanke, E., Zaharenko, A.J., Redaelli, E., Schiavon, E., 2009. **Action of sea anemone type 1 neurotoxins on valtage-gated sodium channel isoforms.** *Toxicon* 54: 1102-1111.
- Westernbroek R.E., Hoskins L., Catterall W.A., 1998. **Localization of Ca²⁺ channel subtypes on ratspinal motor neurons, internuerons and nerve terminals.** *Journal of Neuroscience* 18:63, 19–30.
- Zhang, M-M., Green, B.R., Catlin, P., Fiedler, B., Azam, L., Chadwick, A., Terlau, H., McArthur, J., French, R.J., Gulya, J., rivier, J.E., Smith, B.J., Norton, R.S., Olivera, B.M., Yoshikami, D. y Bulak, G., 2007. **Structure/function characterization of μ -conotoxin Killa an analgesic, nearly irreversible blocker or neuronal mammalian sodium channels.** *The Journal of biological chemistry.*

Páginas web

<http://www.asturnatura.com> fecha de consulta 14 de octubre de 2011.

<http://www.beim.us.es> fecha de consulta 14 de octubre de 2011.

<http://www.revistaciencia.amc.edu.mx>

<http://www.dfarmacia.com>

<http://www.herramientas.educa.madrid.org>

<http://www.invemar.org.co>

[www.biochem.arizona.edu/classes/bioc463a/Info/lecture notes/Column%20Chromatography.pdf](http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc463a/Info/lecture_notes/Column%20Chromatography.pdf) fecha de consulta 14 de octubre de 2011.

www.bio-rad.com fecha de consulta 14 de octubre de 2011.

XII. ANEXOS

SOLUCIONES PARA EL HPLC

Anexo 1

Solución A

Compuesto	Porcentaje en solución 100%
Ácido trifluoracético (TFA)	0.12
Agua desionizada	99.88

Anexo 2

Solución B

Compuesto	Porcentaje en solución 100%
Acetonitrilo (AcN)	0.1
Ácido trifluoracético (TFA)	99.99

Anexo 3

Solución C

Compuesto	Porcentaje en solución 100%
AcN	40
TFA	0.12
Agua destilada	59.88

VEHÍCULO EXCIPIENTE UTILIZADO EN LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS

Anexo 4

PBS 1X (Solución amortiguadora de sales)

Compuesto	Concentración	Cantidad (mg)
NaCl	137	80
KCl	2.7	2
Na ₂ HPO ₄	12	17
KH ₂ PO ₄	1.2	1.63

Las sales se mezclaron y se aforó a 1000 ml con agua destilada, se esterilizó. Se ajustó el pH a 7.4 con HCl o NaOH según sea el caso.

“ El viaje no termina jamás. Solo los viajeros terminan. Y también ellos pueden subsistir en memoria, en recuerdo, en narración.el objetivo de un viaje es solo el inicio de otro viaje ”

José Saramago
