

TESIS DEFENDIDA POR
Karla Oyuky Juárez Moreno
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Co-Director del Comité

Dr. José de Jesús García Valdés
Co-Director del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Miembro del Comité

Dra. Anamaría Escofet Giansone
Miembro del Comité

Dra. Ana Denise Re Araujo
Miembro del Comité

Dr. Facundo Joaquín Márquez Rocha

*Coordinador del programa de
posgrado en Acuicultura y
Biotecnología Marina*

**Dr. Raúl Ramón Castro
Escamilla**
**Director de Estudios de
Posgrado**

16 de Noviembre de 2005

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



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL VENENO DEL CARACOL
MARINO *Conus californicus* EN CANALES IÓNICOS DE POTASIO**

TESIS

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

Presenta:

KARLA OYUKY JUÁREZ MORENO

Ensenada, Baja California, México, 16 de Noviembre del 2005

RESUMEN de la tesis de **Karla Oyuky Juárez Moreno**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** con Orientación en **BIOTECNOLOGÍA MARINA**. Ensenada, Baja California. Noviembre del 2005.

Caracterización Electrofisiológica del Veneno del Caracol Marino *Conus californicus* en Canales Iónicos de Potasio

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Director de Tesis

Los caracoles del género *Conus*, tienen un aparato venenoso que les sirve para cazar y como defensa contra sus depredadores. El veneno de estos caracoles contiene péptidos ricos en cisteínas llamados conotoxinas. Éstas se organizan en cabales, que son toxinas de diferentes tipos que actúan de manera conjunta para generar el mismo efecto fisiológico final. Las conotoxinas se unen de forma específica y con gran afinidad a sus blancos, constituidos por canales iónicos y algunos receptores. Por ello algunas de estas toxinas están en pruebas clínicas para el tratamiento de enfermedades como el dolor crónico. Las conotoxinas que se unen a canales iónicos de potasio han sido poco estudiadas, a pesar de la amplia distribución y abundancia de este tipo de canales.

En este trabajo, se determinó que en el veneno de *Conus californicus* existen toxinas que afectan los canales iónicos de potasio: Shaker y Hslo expresados heterológicamente en ovocitos de las ranas de la especie *Xenopus laevis*. El efecto de distintas fracciones obtenidas por HPLC en Fase Reversa del veneno de *C. californicus* sobre los canales de potasio, fue medido con la técnica de Fijación del Voltaje por Dos Electrodo.

Los resultados obtenidos indican que en el veneno de *C. californicus* existen al menos tres fracciones que disminuyen de manera considerable la corriente del canal de potasio Shaker IR. Esta actividad se localiza en las fracciones obtenidas mediante HPLC que eluyen en los minutos 5, 28 y 44. El porcentaje de disminución de la corriente para la fracción del minuto 5 fue de 40%, para el minuto 28 fue de 55% y para el minuto 44 fue de 44%. En el caso del canal Hslo, hasta el momento se tiene precisado que en las fracciones obtenidas por HPLC que eluyen en los minutos 20-25 y 45-50 existió una disminución de la corriente del 20% y 12% respectivamente; sin embargo este efecto no pudo ser detectado al evaluar los minutos individuales de las fracciones debido a la baja concentración de las mismas.

También se determinó que el veneno de *C. californicus* varía dependiendo de la temporada del año en la cual se recolectaron los organismos.

Palabras clave: *Conus californicus*, κ -conotoxinas, canales iónicos de potasio, electrofisiología, Fijación del Voltaje por Dos Electrodo.

ABSTRACT of the thesis presented by **Karla Oyuky Juárez Moreno** as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE** degree with orientation in **MARINE BIOTECHNOLOGY**. Ensenada, Baja California, Mexico. November 2005.

Electrophysiological Characterization of the Venom of Marine Snail *Conus californicus* in Potassium Ion Channels

Abstract approved by:

Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro
Thesis Director

The marine snail *Conus californicus* has a venom apparatus used to kill its prey; the venom contains an unique set of 50 to 200 different peptides called conotoxins. Those have a highly targeting selectivity of voltage-gated and ligand-gated ion channels, acting as blockers of voltage-gated Ca^{2+} , Na^{+} and K^{+} channels. Due to the high selectivity and affinity of these toxins, several of them are in various stages of clinical development for treatment of human diseases. Despite of its variability, only few conotoxins acting on K^{+} channels have been identified and characterized, and were commonly called κ -conotoxins. Potassium channels are a big family of proteins greatly distributed among all the kingdoms, and have been implicated in relevant neurodegenerative pathologies such as Parkinson's and Alzheimer's diseases and chronic pain.

In this study we purified different fractions of the venom of *C. californicus* by RP-HPLC according to its retention time. We tested the effect of those fractions in heterologous expressed K^{+} channels as Shaker IR and Hslo channel in *Xenopus laevis* oocytes using the Two Electrode Voltage Clamp technique.

Up to date, our results indicated that in the venom of *C. californicus* there are at least three fractions in the minutes 5, 28 and 44, which caused a significant decrease of the current when were tested on the Shaker IR channel in 40%, 55% and 44% respectively. In the case of the Hslo channel, there are two fractions in the minutes 20 to 25 and 45 to 50, which diminished the current of the channel in 20% and 12% respectively, we tried to test the individual minutes but was unable because of its low concentration.

We stated that the venom of the marine snail *C. californicus* had a different activity according with the season in which the organisms were collected.

Keywords: *Conus californicus*, κ -conotoxins, Potassium Ion Channles, Electrophysiology, Two Electrode Voltage Clamp.

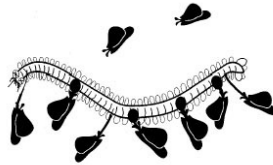
Llegué al norte guiada por una aventura, los conus me ayudaron a descubrir lo que más amo en este mundo y con cada razón dejaba atrás los miedos. Todos los días frente al mar, con cada ola, venían

las esperanzas que me motivaron a seguir mi camino... Como un eterno idilio, al despertar, renovaba mi amor por la ciencia, dejé de ser una galleta viajera y me convertí en una galleta de mar.

Y entonces, lentamente, sin que yo misma lo supiera, la vida me enseñó, que este también es un trabajo de sueños y anhelos, de esperanzas y pruebas. Por fortuna, nunca estuve sola y siempre tuve a mi lado gente valiosa que me enseñó y ayudó. Me es muy grato tener tantas personas y tanto que agradecerles, pero sobre todo, tener más gente a quien amar, servir y querer. Escribo este trabajo con mucha satisfacción, de cumplir con los sueños y haber llenado mi vida de nuevos anhelos, amigos, encantos, de cosas mágicas que rodearon mi vida en dos años de gratas experiencias, y que todo, absolutamente todo lo que sucedió fue para bien. Nuevamente la aventura valió la pena.

¡Por todo, Gracias!

Karla



Para el cielo basta la luna, y para el amor sólo basta una gotita de agua

DEDICATORIA

A mi **mamá**, porque lo mejor de la vida me lo has enseñado tú, TE AMO.
Este trabajo es todo tuyo.

A **Magda**, porque hiciste esta maestría conmigo y te tocó escuchar de canales, registros y mil cosas más, pero eso sí aguantaste de todo y con el mejor ánimo siempre, por todas las cosas que me has enseñado y por tu inmenso cariño, ¡gracias por todo!

A **Alán y Martín**, mi vida cambió cuando ustedes llegaron a la casa y aprendimos juntos como tratarnos... los amo. Mi confianza en ustedes siempre está vigente.

A todos los que de alguna manera se involucraron en este proyecto personal o académicamente, porque el trabajo es de todos, y el esfuerzo no se hubiese dado si no es por su presencia.

Porque con existir se transformaron en mi ejemplo de lucha y ánimo, son un recuerdo cariñoso en el corazón. En memoria de mis abuelos, **Yayo y Güica**, y de mis abuelos adoptivos **Chuyita y Chava**... estén donde estén...

A una pequeña gotita de agua que llegó para quedarse en nuestros corazones, cuando llueve siempre estás conmigo **Itito**...

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por otorgarme la beca para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Alexei Licea Navarro**, por permitirme realizar este proyecto que fue un gran aprendizaje, por su apoyo y ayuda en todas las circunstancias.

Al **Dr. Jesús García Valdés**, por toda su paciencia y apoyo en los momentos críticos, por su ayuda técnica y teórica en la parte electrofisiológica.

A la **Dra. Sobeida Sánchez** por permitirme hacer uso de sus instalaciones en la parte de Biología Molecular de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial, **Dr. Fernando Díaz Herrera**, **Dra. Anamaría Escofet** y **Dra. Ana Denise Re**, por su dedicación en la revisión de este trabajo y sus valiosos comentarios, por su apoyo en los comités y por ser parte de este proyecto.

Al **Dr. Facundo Márquez Rocha**, al **Dr. Fernando Díaz Herrera** y a la **Dra. Elizabeth Ponce** por su ayuda constante y su apoyo en distintas circunstancias, muchas gracias.

Al **M. en C. Eduardo Morales** por estar siempre dispuesto a ayudarme con las purificaciones en el HPLC.

A **Alejandrina y Dolores Carvajal**, por su ayuda en los trámites administrativos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A ti **Paz**, te admiro por ser mujer guerrera, ejemplo constante y ayuda incondicional. Por tu amor inmenso, tus consejos y buen humor. Por los días en que me enseñas que se aprende mejor de los pequeños detalles. Porque siempre me apoyas en cualquier locura, tu amor me empuja y alienta a seguir mis objetivos y aunque te duela, siempre me dejas volar... Me has enseñado los panoramas más amplios de la vida, siempre preocupada por dejarnos lo mejor. Gracias por darle la confianza y la independencia a esta hija rebelde que tienes, solo una mamá como tú la pudo aguantar... GRACIAS, porque nunca será suficiente lo que hagas, siempre quieres hacer más. Gracias por darme la vida y todo tu amor. Mil gracias por todo, ¡te amo mamá!

A mis aliados en esta experiencia, sé que cuento con ustedes en cada paso, han sido la motivación más importante para este proyecto, con respeto, admiración y cariño, gracias a mis maestros: **Saint Germain, Hilarión, Koot Hoomi, Rafael, María, Miguel, Vista, Cristal, Dr. José Gregorio Hernández, Asclepio, Higia, Atenea y Ling**, por ser la luz Verde que siempre guía mi vida. Los amo.

A **Magda**, por tu amistad y consejos. Porque a diario me enseñas que lo mejor de la vida está en la buena voluntad y la tolerancia, gracias por tu apoyo constante e incondicional. Te agradezco infinitamente todo tu cariño y solidaridad. Porque me ayudaste con los experimentos, y yo aprendí de Administración y tú de Biología, pero las dos aprendimos algo más de la vida. Eres mi mejor amiga y uno de los mejores regalos de la vida. Por estar en las buenas y en las malas, ¡Millones de Gracias, te quiero tanto!

A **Sayo** porque nunca te he dicho lo agradecida que estoy contigo, por ser mi segunda mamá, y aunque no lo digas también me has dejado volar, aún a costa de tu propio sentir, **Yeya** (gracias por ir a trabajar conmigo en las noches), **Mon, Jesús, Alán y Martín**, porque a pesar de las circunstancias, el amor nos hace estar juntos, sigamos siempre así y hacia delante, ¡pa' tras ni pa'tomar vuelo!, ¡los amo!

A **Caro**, porque eres una grandiosa amiga. Con orgullo me demuestras que la amistad sobrepasa el tiempo y la

distancia, por compartir comidas, conciertos, ballet y cines y caminar largas horas para ver un poco de Monet, Degas, Renoir y Varo. Gracias por compartir tu amistad todos estos años, ¡uff son un montón! Desde siempre sabes que te quiero.

A **Carlos**, siempre dispuesto a ayudar, gracias por sacarme de tantos aprietos y por tus valiosos consejos, no sólo eres mi mejor amigo, sino un gran ejemplo de perseverancia, te quiero tanto. Fuiste el apoyo constante en varias etapas de mi vida, sé que la vida nos recompensa a diario y lo confirmo porque me ha dado uno de los mejores regalos que es tu amistad y cariño.

A **Orestes**, gusano de mi alma, a pesar del tiempo, la distancia y de todos, siempre estas junto a esta galleta de mar. Gracias por compartir tus escritos, por dejarme saber de personas/libros, de Wagner y Rach, por las veces que disfruté de *Una furtiva lágrima*, aún sin que tú lo supieras - en cierta forma, te admiro-. A pesar de todo, sabes que te quiero, que confío y creo en ti, siempre estaré a tu lado para inventarte vidas, que es lo mejor que sé hacer.

A **Sebastián Wernicke** porque siempre tienes un consejo y una palabra de aliento no importando la distancia siempre estás conmigo dándome un momento de paz y reflexión a través de tus palabras. Porque la labor que realizas te la agradecemos muchos. Te quiero amigo y gracias por todo. Gracias también al grupo de Metafísica sobre todo a **Tere**, por su ayuda desinteresada.

Al **Doc Chucho**, porque además de ser asesor, fuiste psicólogo y amigo. Muchas gracias por confiar en mí y por tu solidaridad, por desvelarte conmigo para trabajar y a veces sólo para cuidarme. Siempre tuviste la paciencia y buena disposición de escucharme y enseñarme lo apasionante que es la electrofisiología. Este trabajo también es tuyo. Gracias por compartir ese tiempo conmigo, pero sobre todo por ser un gran amigo. Deseo que la vida nos vuelva a reunir una que otra vez.

A **Alexei**, gracias porque confiaste en mí, y me diste como regalo cumplir el sueño que me trajo a estas tierras del norte. Gracias aún más, por apoyarme y ayudarme en muchas circunstancias a pesar de todo y todos, porque aún con mis irreverencias siempre estás conmigo y me aguantas... porque me diste la fuerza para hacer este proyecto y soñar con él. Por ponerme de niñera de los veranos, sabes que me gusta y que yo también aprendo de ellos. Por tu amistad y los cafecitos que nos tocó compartir y los que nos faltan... Muchas gracias querido jefecito.

Al **Dr. Carlos Arias Ortiz**, porque a pesar de la distancia y del tiempo, siempre estás presente con tu apoyo y ejemplo. Sin tu ayuda no sería lo que soy ahora, me enseñaste que de nada sirve el conocimiento si no se sabe compartir, siempre has sido el mejor ejemplo que he tenido. Le agradezco a la vida haber sido tu alumna, pues siempre estuviste conmigo con tu enorme paciencia y sabiduría. Lástima que nuestros caminos tuvieron que separarse, espero que algún día se vuelvan a encontrar. Siempre tendrás mi admiración, cariño, respeto y agradecimiento.

A la colochita **Angélica**, querida amiga, gracias porque siempre te das tu tiempo para compartirlo conmigo. Gracias por darme asilo en el DF, porque no te importó desvelarte conmigo para platicar años de vivencias. Te quiero siempre.

A **Sujey**, porque has sido un gran apoyo y a pesar de la distancia sé que cuento contigo, fue un gusto conocerte en esta tierra dónde he tenido tan gratos momentos, muchas gracias por sacarme de los apuros. Por tu cariño y por los riquísimos cafecitos, estoy segura que nos veremos pronto.

A mis amigos: **Zen, Juan, Tzindilú, Yayoi, Gaby Morales y Berenice**. Con especial cariño a la **Cucha**, porque siempre estás dispuesta a recibirnos en tu casa no importando la hora ni el día, gracias por los cafecitos, las langostitas y un montón de gratos momentos que son de gran ayuda siempre, por toda tu ternura y cariño. A **Arturo, Sandra y Claudia**, gracias por compartir todo este tiempo conmigo, por las risas y el buen humor.

A la Familia **García Ramírez y García Agüero**, porque me recibieron como parte de ellos, y me apoyaron en las buenas y las malas. Muchas gracias **Gabinito** porque me diste buenos consejos, porque cuidas de mis niños como si fueran tuyos, por tu buen humor y esas pláticas tan interesantes por las tardes cuando ambos no queríamos trabajar, gracias también a **Tere, Karhen, Katy y Rosa**.

A mis compañeros del lab en el CICESE: **Sujey** (gracias por los consejos y los cafecitos), **Carlo** (un montón de gracias por enseñarme a coleccionar y disectar conus), a mis compañeros de colectas que les tocó la helada agua del mar del pacífico: **Alejandro y Alejandra, Mandy, Alejandro- "Chicana", Mario y Glenda, Alhelí**, y a los que no fueron pero les tocará ir **Omar, Pavel y Tanya** (muchas gracias por ser tan buena amiga en tan poco tiempo, me ha dado un gusto conocerte). A mis niños del verano y de las estancias cortas que siempre me hacen recordar de dónde vengo y por qué estoy aquí. A **Maricela**, y a **Edna**, por ayudarme a liofilizar mis muestras.

A mis compañeras del lab en la UNAM: en especial a **Roxana "La Rox"**, por tu solidaridad y compañerismo, te tocó desvelarte y quedarte conmigo todas las noches durante los cuatro meses que estuve en el DF, por los cafecitos y las comidas, a **Gaby** (gracias por tu ayuda con la electrofisiología), a **Rocío, Gloria y Zenaida** (gracias amiga por tus consejos y pláticas, la Zen de la vida y del amor, ojalá que nos volvamos a ver pronto). A **Ana Santacruz**, por ayudarme con el microinyector.

A **Nemesio y Juan Manuel**, por su hospitalidad en el DF y por ser tan lindos conmigo, porque me ayudaron demasiado. Los quiero y los recuerdo siempre.

A la **Sra. Anita Mauri**, por su amabilidad al darme hospedaje en el DF, por ser una excelente compañera y aguantarme mis horarios descabellados, gracias.

A mis niños, **Tadeo, Blanca, Ron, Oscar, Chiquito, Patria y Libertad** porque ¡ah como me divierto con ustedes! al llegar a casa por las tarde

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del C.I.C.E.S.E. bajo la dirección del Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro y en el laboratorio de Electroquímica y Bioelectroquímica Analítica en la Facultad de Química de la U.N.A.M., bajo la co-dirección del Dr. José de Jesús García Valdés. Durante la realización de este proyecto la estudiante recibió una beca otorgada por el CONACYT con el número de registro 179410.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Generalidades	2
II.2 Aparato Venenoso de los <i>Conus</i>	4
II.3 Organización del Veneno de los <i>Conus</i>	6
II.4 Generalidades de las Conotoxinas	7
II.5 Precursor Peptídico	9
II.6 Clasificación de las Conotoxinas	11
II.7 Efectos de las Conotoxinas en los Blancos Moleculares	12
II.8 Usos, Aplicaciones y Desarrollo de Nuevos Fármacos a Partir de las Conotoxinas	14
II.9 Ziconotide	15
II.10 Generalidades de los Canales Iónicos	21
II.11 Canales Iónicos Dependientes de Voltaje	24
II.12 Canales Iónicos de Potasio	25
II.13 Canales de Potasio Dependientes de Voltaje	27
II.14 Canales Iónicos de Potasio Modulados por Calcio	32
II.15 Estructura de los Canales Maxi K	33
II.16 Modulación de los Canales Maxi K por Calcio	38
II.17 Toxinas que Afectan Canales de Potasio	39
II.18 κ -Conotoxinas	41
II.19 κ A-Conotoxinas	43
II.20 κ M-Conotoxinas	44
II.21 Conotoxinas de la Superfamilia I	46
II.22 κ -conotoxina BtX	46
II.23 Conotoxina ViTx	47
II.24 Electrofisiología y Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	47
III. OBJETIVOS	50
III.1 Objetivo general	50
III.2 Objetivo específico	50
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	51
IV.1 Obtención de los especímenes	51
IV.2 Obtención del veneno del caracol marino <i>Conus californicus</i>	51
IV.3 Fraccionamiento del Veneno Total de <i>C. californicus</i> por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (HPLC-PR)	52

ÍNDICE GENERAL (Continuación)

	Página
IV.4 Expresión Heteróloga en Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> de los Canales Iónicos de Potasio	53
IV.5 Preparación de Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> para Ensayos Electrofisiológicos	54
IV.6 Caracterización de los Canales Iónicos de Potasio Shaker IR y Hslo ..	55
IV.7 Efecto de las Fracciones del Veneno de <i>C. californicus</i> en los Canales de Potasio Expresados en Ovocitos Mediante la Técnica de Fijación de Voltaje por Dos Electrodo	57
IV.8 Obtención de una Biblioteca de ADNc de Conotoxinas del Veneno Total de <i>Conus californicus</i>	59
V. RESULTADOS	61
V.1 Obtención y Disección de los Organismos	61
V.2 Fraccionamiento del Veneno Total de <i>Conus californicus</i> mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (HPLC-RP).....	61
V.3 Transcripción <i>in vitro</i> de los Canales Iónicos Shaker y Hslo	65
V.4 Expresión Heteróloga en Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> de los Canales Iónicos de Potasio	66
V4.1 Controles de Expresión del Canal Iónico de Potasio de Tipo Shaker IR	67
V4.2 Caracterización de la Identidad del Canal Iónico de Potasio de Tipo Shaker IR	68
V4.3 Controles de Expresión del Canal de Potasio Modulado por Calcio Hslo.....	70
V4.4 Caracterización de la Identidad del Canal de potasio Modulado por Calcio Hslo	74
V.5 Efecto de las Fracciones del Veneno de <i>Conus californicus</i> en el Canal de Potasio de Tipo Shaker IR Utilizando la Técnica de Fijación del Voltaje por Dos Electrodo	78
V5.1 Efecto de las fracciones del veneno de <i>C. californicus</i> colectadas cada 30 minutos	78
V5.2 Efecto de las Fracciones del Veneno de conus Colectadas cada 15 minutos	82
V5.3 Efecto de las Fracciones del Veneno de conus Colectadas cada 5 minutos	84
V5.4 Efecto de las Fracciones del Veneno de conus Colectadas cada 1 minuto.....	87

ÍNDICE GENERAL (Continuación)

	Página
V.6 Efecto de las Fracciones del Veneno de <i>Conus californicus</i> , en el Canal de Potasio Modulado por Calcio Hslo, Utilizando la Técnica de Fijación del Voltaje por Dos Electrodo	93
V.6.1 Efecto de las fracciones del veneno de <i>C. californicus</i> colectadas cada 15 minutos	96
V.6.2 Efecto de las fracciones del veneno de <i>C. californicus</i> colectadas cada 5 minutos	99
V.7 Obtención de la Biblioteca de ADNc de las Conotoxinas del Veneno de <i>C. californicus</i>	104
VI. DISCUSIÓN	108
VI.1 Variabilidad en los Componentes del Veneno de <i>Conus californicus</i>	109
VI.2 Pruebas con el Canal de Potasio Shaker IR	111
VI.3 Pruebas con el Canal de Potasio Modulado por Calcio Hslo	112
VI.4 Generación de una Biblioteca de ADNc de las Conotoxinas de <i>Conus californicus</i>	118
VII. CONCLUSIONES	124
VIII. PERSPECTIVAS	126
IX. LITERATURA CITADA	127
X. APENDICE 1	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Conchas características de algunas especies de <i>Conus</i>	2
2	Caracol de la especie <i>Conus geographus</i>	3
3	Estructura general del aparato venenoso y de la rádula de los caracoles del género <i>Conus</i>	4
4	Estructura de la disposición del aparato venenoso de los <i>Conus</i>	5
5	Organismo de la especie <i>Conus californicus</i>	6
6	Esquema de la organización característica del precursor peptídico de las conotoxinas	9
7	Blancos moleculares de las conotoxinas	13
8	Acción del Ziconotide	16
9	Tipos de canales iónicos	24
10	Esquema del canal de potasio dependiente de voltaje	28
11	Esquema de los tipos de inactivación N y C	31
12	Estructura de los canales de potasio modulados por calcio	34
13	Similitudes entre dos canales de potasio, el canal Shaker (A) y el Maxi canal (B)	37
14	Modelo de la unión de la κ -PVIIA conotoxina al canal de tipo Shaker (KcsA)	42
15	Comparación de la estructura secundaria de tres diferentes conotoxinas: κ M-RIIK conotoxina (rojo), μ -GIIIA conotoxina (azul) y la ψ -PIIF conotoxina (verde)	44
16	Potencial electrostático de los aminoácidos de superficie de la κ M-RIIK conotoxina.	45

Figura	ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)	Página
18	Esquema general de los pasos a seguir en la expresión heteróloga de proteínas en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .	49
19	Fraccionamiento por HPLC-RP del extracto total del veneno de <i>Conus californicus</i> .	62
20	Cromatograma del fraccionamiento por HPLC-RP del veneno total de <i>Conus californicus</i> colectados en Julio de 2004.	63
21	Cromatograma del fraccionamiento por HPLC-RP del veneno total de <i>Conus californicus</i> colectados en Noviembre de 2004.	64
22	Productos de la reacción de linearización enzimática de los plásmidos pcDNASHIR y pcDNAHslo M3N1.	65
23	Productos de la reacción de transcripción <i>in vitro</i> con la T7 ARN Polimerasa de los plásmidos pcDNASHIR y pcDNAHslo M3N1.	66
24	Caracterización de la Expresión del Canal de Potasio de Tipo Shaker IR.	67
25	Caracterización de la Identidad del Canal de Potasio de Tipo Shaker IR Mediante el Bloqueador TEA.	69
26	Efecto de la Acción Mecánica de la Inyección con Agua sobre Diferentes Ovocitos en Medio ND-96 (100 mM Calcio).	71
27	Caracterización de la Expresión del Canal Iónico Hslo Utilizando Diferentes Concentraciones de Calcio en el Medio.	73
28	Efecto del Ácido Niflúmico en Ovocitos Nativos.	74
29	Caracterización del Efecto del Ácido Niflúmico en Ovocitos Inyectados con ARNm de Hslo.	76
30	Caracterización del Efecto del Ácido Flufenámico en Ovocitos Inyectados con ARNm de Hslo.	77
31	Efecto del veneno de Julio de 2004 sobre el canal Shaker IR.	79

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
32	Efecto de las fracciones del veneno total de <i>C. californicus</i> colectados en Noviembre de 2004, sobre el canal Shaker IR.	81
33	Efecto de las fracciones del veneno total de <i>C. californicus</i> colectadas cada 15 minutos sobre el canal Shaker IR.	83
34	Efecto de las fracciones del veneno total de <i>C. californicus</i> colectadas cada 5 minutos sobre el canal Shaker IR.	86
35	Efecto de la fracción que contiene el minuto 5 del veneno total de <i>C. californicus</i> obtenido mediante HPLC sobre el canal Shaker IR.	90
36	Efecto de la fracción que contiene el minuto 28 del veneno total de <i>C. californicus</i> obtenido mediante HPLC sobre el canal Shaker IR.	91
37	Efecto de la fracción que contiene el minuto 44 del veneno total de <i>C. californicus</i> obtenido mediante HPLC sobre el canal Shaker IR.	92
38	Efecto del veneno total de <i>C. californicus</i> colectados en Julio de 2004 sobre el canal Hslo	94
39	Efecto de las fracciones del veneno total de <i>C. californicus</i> colectadas en el mes de Agosto del 2004, sobre el canal Hslo	95
40	Efecto de las fracciones del veneno total de <i>C. californicus</i> colectadas cada 15 minutos sobre el canal Hslo	98
41	Efecto de las fracciones del veneno total de <i>C. californicus</i> obtenidas por HPLC y colectadas en los minutos 20 al 25 sobre el canal Hslo	100
42	Efecto de las fracciones del veneno total de <i>C. californicus</i> obtenidas por HPLC y colectadas en los minutos 45-50 sobre el canal Hslo.	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Clasificación de las Conotoxinas en Familias	11
II	Clasificación de las Conotoxinas en Superfamilias	12
III	Actividad sobre el canal Shaker IR de las fracciones del veneno de conus obtenidas por HPLC y colectadas cada 15 minutos	84
IV	Resumen de la actividad sobre el canal Shaker IR de las fracciones del veneno de conus obtenidas por HPLC y colectadas cada 5 minutos	87
V	Resumen de la actividad sobre el canal Shaker IR de las fracciones del veneno de conus obtenidas por HPLC y colectadas cada minuto	88
VI	Resumen del efecto de las fracciones del veneno total de <i>Conus californicus</i> obtenidas mediante HPLC y colectadas cada 15 minutos sobre el canal Hslo	99
VII	Resumen del efecto de las fracciones del veneno total de <i>Conus californicus</i> obtenidas por HPLC y colectadas cada 5 minutos sobre el canal Hslo	100
VIII	Secuencias de algunas conotoxinas presentes en la biblioteca de ADNc	102-104

LISTA DE ABREVIATURAS

aa aminoácidos
ACh Acetil colina
AChRs Receptores de acetil colina nicotínicos
ACN Acetonitrilo
ADNc Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNc Ácido ribonucleico con cap
ARNm Ácido ribonucleico mensajero
ATP Adenosin trifosfato
B.C. Baja California
Ca²⁺ Ión calcio
cAMP Adenosina monofosfato cíclico
cGMP Guanosina monofosfato cíclico
CICESE Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada
CIK Canales iónicos de potasio
cm centímetros
COO⁻ Extremo carboxilo terminal
Cys Residuo del aminoácido cisteína
DO Densidad óptica
EDTA Ácido etilen-diamino-tetra-acético
E_m Potencial de Membrana
xg por gravedades
g Gramos
g/mol Gramos/ moles
h Hora
hrs Horas
HPLC Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HPLC-RP Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa
IC₅₀ Dosis media inhibitoria
IP₃ 3-Fosfatidil inositol
K⁺ ión potasio
K_{Ca} Maxi canal
kHz Kilo hertz
Km kilómetro
Kv Canales Iónicos de Potasio Dependientes de Voltaje
L litro
M Molar
mbar Milibars
mg mili gramos
min Minutos
mL mili litros
mm Milimolar
mV mili volts

MΩ Mega ohms
N⁻ Amino terminal
Na⁺ Ión sodio
nM Nanomolar
NMDA N-metil-D-aspartato
PM Peso molecular
RE Retículo endoplásmico
S Segmento
SB Medio Super broth
seg Segundo
SN Sistema Nervioso
ST Segmento Transmembranal
TBA Tetra butil antimonio
TEA Tetra etil amonio
TFA Ácido trifluoroacético
U Unidades de enzima

[Ca]_i Concentración intracelular de calcio
Å Amstrongs
α: Alfa
β: Beta
γ: Gamma
δ: Delta
ε: Epsilon
κ: Kappa
λ: Lambda
λ: Longitud de onda
μ: miu
μA: Micro amperios
μg: Microgramos
μL: Microlitros
μM: Micromolar
ρ: Rho
σ: Sigma
τ: Tau
φ: Phi
χ: Chi
ψ: Psi
ω: Omega

I. INTRODUCCIÓN

Fue desde 1935 que se realizaron los primeros reportes documentados de envenenamientos por picadura de caracoles marinos del género *Conus* (Hanna y Strong, 1949), pero no fue sino hasta hace poco más de 20 años con el descubrimiento de las toxinas provenientes de distintas especies de *Conus*, que se les dio la relevancia como herramientas en el estudio y caracterización de una amplia variedad de canales iónicos (Cruz *et al.*, 1978; Olivera y Cruz, 2001; Olivera *et al.*, 1985). Los canales iónicos de potasio están ampliamente distribuidos en todos los organismos y constituyen la familia más grande y diversa de este tipo de proteínas. Sus mutaciones y deficiencias están asociadas a enfermedades neurológicas, cáncer, ataxia, espasmos musculares, sordera e infartos al miocardio, por lo tanto, es importante obtener bloqueadores o activadores de estos canales que permitan entender estas canalopatías y generar nuevos fármacos para su tratamiento. Está comprobado que las conotoxinas sintéticas se utilizan como fármacos para el tratamiento de enfermedades cuyos medicamentos son poco eficientes o aún no existen. Sin embargo, se sabe muy poco sobre las conotoxinas que afectan los canales iónicos de potasio, por ello es importante analizar electrofisiológicamente el veneno de estos caracoles, para determinar el efecto que tienen sobre este tipo de canales.

II. ANTECEDENTES

II.1 Generalidades

Los caracoles del género *Conus* son un grupo de moluscos que tienen un aparato venenoso que les sirve para cazar, como defensa contra depredadores y competidores y para regular otras interacciones biológicas (Olivera *et al.*, 1990; Olivera, 1999).

Se cree que la primera radiación de los *Conus* ocurrió después de la extinción de los dinosaurios y las amonitas, hace aproximadamente 50 millones de años, actualmente se destacan como uno de los principales depredadores en las comunidades arrecifales y los hábitat marino tropicales (Olivera *et al.*, 1990). Los *Conus* se alimentan de gusanos poliquetos, moluscos y peces, en base a esto se clasifican en vermívoros, moluscívoros y piscívoros, respectivamente (McIntosh y Jones, 2001).

Existen aproximadamente 500 especies de *Conus*, todas venenosas (**Figura 1**).



Figura 1. Conchas características de algunas especies de *Conus*. (www.conus_shells.com).

Debido a su valor comercial para los coleccionistas de conchas, algunas especies han sido asociadas a envenenamientos humanos, las más frecuentes son *Conus textile* y *C. geographus*, siendo probablemente este último el más venenoso de los caracoles reportados (McIntosh y Jones, 2001; Olivera, 1999) (**Figura 2**).



Figura 2. Caracol de la especie *Conus geographus*. Probablemente éste caracol es el que se ha asociado a más envenenamientos humanos (McIntosh y Jones, 2001).

El envenenamiento por *Conus* difiere con la especie pues se ha observado que los síntomas producidos por toxinas de caracoles piscívoros (*C. geographus*), son muy diferentes de aquellos que presentan las toxinas de caracoles moluscívoros o vermívoros. En general, el dolor y la parálisis muscular son los síntomas más comunes (Olivera *et al.*, 1990). Hasta la fecha no existe un antiveneno, y en los casos de envenenamiento únicamente se administran primeros auxilios, prevenciones respiratorias y cardiovasculares (McIntosh y Jones, 2001).

II.2 Aparato Venenoso de los *Conus*

El aparato venenoso de los caracoles del género *Conus* (**Figura 3**) consiste de un bulbo que sirve como reservorio del veneno, ésta estructura consta de un tejido muscular desarrollado que es utilizado para expulsar el veneno a través del ducto venenoso.

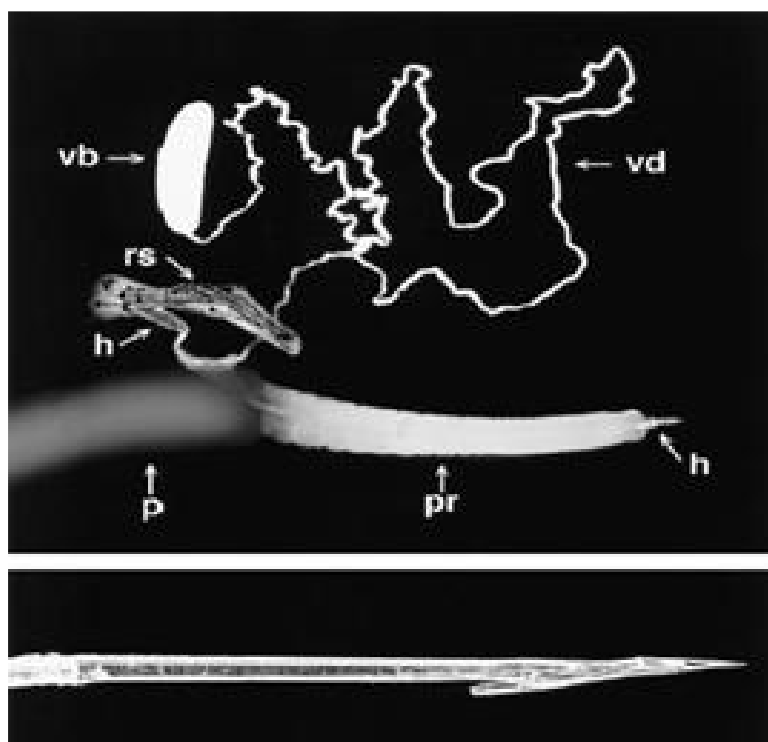


Figura 3. Estructura general del aparato venenoso y de la rádula de los caracoles del género *Conus*. La figura superior muestra la morfología general del aparato venenoso de los conus, el cual consta de las siguientes estructuras: **vb**, bulbo venenoso, **vd**, ducto venenoso, **rs**, saco radular, **h**, rádulas, **p**, faringe, **pr**, probóscide. La figura inferior muestra una micrografía electrónica de una rádula en forma de harpón del caracol *Conus purpurascens* (Olivera *et al.*, 1990)

El ducto venenoso desemboca en la faringe del organismo, mientras que el saco radular se une en la parte anterior de la faringe. Se cree que es en este sitio en donde

las rádulas se cargan con el veneno (Kohn *et al.*, 1972). El saco radular está compuesto por dos protuberancias, una larga que contiene aproximadamente 60 rádulas, y otra corta que contiene entre 10 a 12 rádulas. En el saco radular se observa un tejido ciliado en forma lineal, que posiblemente facilita la salida de las rádulas del saco radular hacia la faringe. Las rádulas tienen la forma de un harpón hueco y están constituidas por quitina. En la (**Figura 4**), puede observarse un esquema de la disposición del aparato venenoso de los caracoles del género *Conus*.

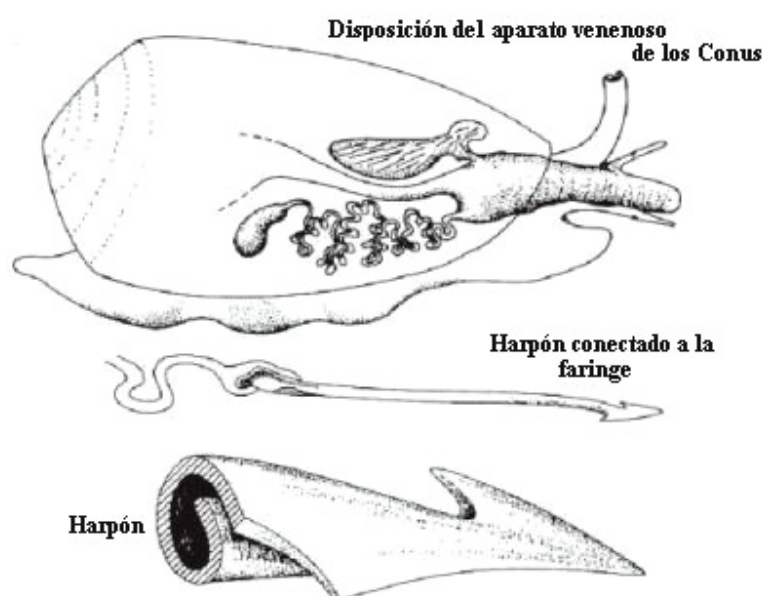


Figura 4. Estructura de la disposición del aparato venenoso de los *Conus*.

En el caso del caracol *Conus californicus* (**Figura 5**) existen evidencias que indican que las rádulas son cargadas con el veneno mientras se encuentran en el saco radular, a diferencia de otros grupos que parece que las rádulas se cargan con el veneno cuando llegan a la faringe, además los caracoles de la especie *C. californicus*, son de clima frío, tienen hábitos diurnos y alimentación generalizada, características

opuestas a los demás miembros del género (Kohn *et al.*, 1999; Marshall *et al.*, 2002; Saunders y Wolfson, 1961).



Figura 5. Organismo de la especie *Conus californicus*.
(http://www.divebums.com/FishID/Pages/california_cone.html) Paul Foretic.

II.3 Organización del Veneno de los *Conus*

El veneno de los *Conus* está organizado en cabales, que son grupos de péptidos que actúan de manera conjunta para lograr el mismo efecto fisiológico final (Terlau y Olivera, 2003). Existen varios cabales en *C. purpurascens* por ejemplo el “motor cabal” o cabal motriz que inhibe la transmisión neuromuscular y el “lightning-strike cabal” que ocasiona inmovilización tetánica inmediata, lo que permite que las toxinas de este cabal se difundan por todo el cuerpo de la presa hasta llegar a los axones motores y a las uniones neuromusculares, ocasionando una parálisis neuromuscular irreversible (Olivera y Cruz, 2001). Existe otro tipo de cabal denominado “cabal

nirvana”, está presente en *C. geographus* y provoca un estado de relajación corporal; los péptidos pertenecientes a este cabal como la Conantocina-G y la Contulacina-G, disminuyen la actividad de los circuitos neuronales (Olivera y Cruz, 2001).

El veneno de los *Conus* está constituido por proteínas (como fosfolipasas de tipo A₂), péptidos y componentes no peptídicos (como serotonina y ácido araquidónico) (McIntosh *et al.*, 1999). Los componentes peptídicos del veneno se pueden dividir en dos grupos:

- 1) Los que contienen múltiples enlaces disulfuro, comúnmente denominados conotoxinas
- 2) Aquellos péptidos con un enlace disulfuro o ninguno (conantocinas, contrifanos, contulacinas). Sin embargo, las conotoxinas han sido el grupo más estudiado (McIntosh y Jones, 2001).

II.4 Generalidades de las Conotoxinas

En general los componentes peptídicos de algunos venenos deben ser lo suficientemente estables para resistir la degradación enzimática inducida por proteasas presentes en el mismo veneno y aquellas que se encuentran en la presa; dicha estabilidad se consigue mediante modificaciones post-traduccionales y múltiples enlaces disulfuro que favorecen el plegamiento estable del péptido (Lewis y García, 2003).

Las conotoxinas son péptidos pequeños de entre 10 a 35 residuos de aminoácidos, ricos en cisteínas y enlaces disulfuro, lo que les proporciona gran estabilidad estructural (Conticello *et al.*, 2001). Se calcula que las conotoxinas presentan un contenido de cisteínas entre 22 al 50% y la mayoría forman tres enlaces disulfuro que les brinda una termo-estabilidad poco común a temperaturas de 100°C (Conticello *et al.*, 2001; McIntosh y Jones, 2001; Olivera, 1999; Olivera *et al.*, 1990). Las conotoxinas presentan modificaciones post-traduccionales numerosas e inusuales, inclusive algunas sólo se han descrito para esta clase de péptidos (Craig *et al.*, 1999).

Las modificaciones post-traduccionales presentes en las conotoxinas incluyen amidación del carboxilo terminal, sulfonación de tirosinas, bromación en triptofanos, glicosilación en treoninas, γ carboxilación en glutaminas, hidroxilación de prolinas, piroglutamación, ciclización de los extremos amino y carboxilo terminal e isomerización en aminoácidos de tipo D, estas modificaciones incrementan la bio-disponibilidad, potencia y estabilidad de los péptidos presentes en el veneno (Lewis y García, 2003).

Se estima que existen 50,000 secuencias únicas de conotoxinas presentes en las más de 500 especies de *Conus*, se ha reportado que en cada especie puede existir un repertorio de entre ~100 a 300 conotoxinas diferentes (Arias y Blanton, 2000; McIntosh *et al.*, 1999; Olivera, y Cruz, 2001). El ambiente cambiante y el amplio espectro de presas, competidores y depredadores, probablemente ejerció una fuerza

de presión selectiva para generar nuevos y más poderosos componentes del veneno (Olivera y Cruz, 2001).

II.5 Precursor Peptídico

Cada conotoxina es codificada por un ARN mensajero. El producto inicial de la traducción es un precursor denominado pre-propéptido de 70 a 120 residuos de aminoácidos en promedio (**Figura 6**). El precursor presenta una organización característica que consiste de una secuencial señal (región pre) en el amino terminal, con un tamaño aproximado de 20 aminoácidos, una secuencia llamada región pro, que contiene en promedio 40 aminoácidos y una secuencia de corte proteolítico que exhibe una tasa de mutación baja, y en el extremo carboxilo terminal se encuentra la toxina madura con un tamaño promedio de 10 a 35 residuos de aminoácidos (Arias y Blanton, 2000; Craig *et al.*, 1999; Olivera y Cruz, 2001).

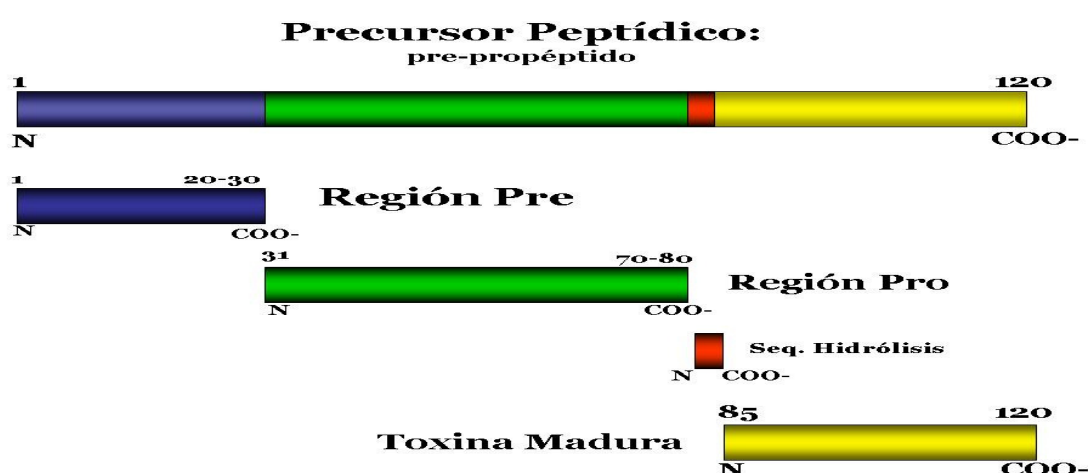


Figura 6 Esquema de la organización característica del Precursor Peptídico de las Conotoxinas.

El péptido señal es altamente conservado entre miembros de la misma familia de toxinas, al parecer juega un papel importante en las vías de secreción de cada conotoxina y contiene los aminoácidos determinantes para el correcto plegamiento del precursor peptídico. A diferencia del péptido señal, la toxina madura es hipervariable, permaneciendo únicamente constante el arreglo de los residuos de cisteína y los enlaces disulfuro que se forman entre ellas (Craiget *al.*, 1999; Olivera y Cruz, 2001). La gran diversidad de conotoxinas presentes en el veneno de los *Conus*, se debe precisamente a la hipermutación de la región de la toxina madura, conservando la estructura básica de arreglos de cisteínas y el péptido señal.

Se sabe que la diversidad de las conotoxinas está asociada a un proceso de duplicación de locus y una rápida divergencia, ya que las conotoxinas están estrechamente relacionadas con su capacidad de paralizar a presas, la rápida evolución adaptativa de estos loci, supone que las conotoxinas están bajo mecanismos de presión de selección en respuesta a los cambios en la disponibilidad y accesibilidad de presas particulares, puede entonces existir una coevolución de presa-depredador en donde los mecanismos de selección sean similares a los que se observan en las interacciones hospedero-patógeno, lo cual explica la rápida diversificación de los loci (Duda y Palumbi, 1999)

II.6 Clasificación de las Conotoxinas

Las conotoxinas se clasifican en familias basándose en el blanco molecular al que se unan.

Tabla I. Clasificación de las conotoxinas en Familias

FAMILIA DE CONOTOXINA	BLANCO MOLECULAR	ACCIÓN	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
α	Receptores acetil colina nicotínicos (AChRs)	Bloqueadores y antagonistas	Arias y Blanton, 2000; Lewis y García, 2003
δ	Canales iónicos de Na^+	Retardan inactivación	Shoon <i>et al.</i> , 1995; McIntosh y Jones, 2001
κ	Canales iónicos de K^+	Bloqueadores	Shoon <i>et al.</i> , 1998; Terlau <i>et al.</i> , 1996
λ	Aún no se conoce	Aún no se conoce	Balaji <i>et al.</i> , 2000
μ	Canales iónicos de Na^+ dependientes de voltaje	Bloqueadores	Olivera <i>et al.</i> , 1990
ε	Aún no se conoce	Reducen la liberación de ACh	Rugby <i>et al.</i> , 1999
ρ	adrenoreceptores de tipo α_1	Inhibidores no competitivos	Harvey, 2002; Lewis y García, 2003
σ	Receptores de serotonina	Antagonistas de la serotonina	McIntosh y Jones, 2001
τ	Canales iónicos de Ca^{2+}	Bloqueadores	McIntosh y Jones, 2001
χ	Transportadores de noradrenalina	Bloqueadores	Harvey, 2002
ψ	nAChRs	Antagonistas no competitivos de los nAChRs	McIntosh y Jones, 2001
ω	Canales iónicos de Ca^{2+} dependientes del voltaje	Bloqueadores	Olivera <i>et al.</i> , 1990

A su vez, cada familia está agrupada en una **Superfamilia** sus miembros comparten la secuencia señal del precursor peptídico (región pre). (Jiménez *et al.*, 2003; McIntosh y Jones, 2001). Así, existen siete superfamilias de las cuales se enlistan sus principales características a continuación:

Tabla II. Clasificación de las conotoxinas en Superfamilias.

SUPERFAMILIA	CONOTOXINAS QUE PERTENECEN A ESTA FAMILIA	PATRÓN DE ENLACES DISULFURO ENTRE CISTEÍNAS	REFERENCIA
A	α - αA - κA -	Cys1-Cys2 Cys 3-Cys4 Cys1-Cys5,Cys2-Cys3,Cys4-Cys6 Cys1-Cys4,Cys 2-Cys 3	Arias y Blanton, 2000; Balaji <i>et al.</i> , 2000.
M	μ - ψ - y κM - conotoxinas	Cys1-Cys4, Cys2-Cys5,Cys3-Cys6 Con un patrón de cisteínas CC-C-C-CC	McIntosh y Jones, 2001; Olivera <i>et al.</i> , 1990
O	ω -, κ -, δ - y μO - conotoxinas	Cys1-Cys4, Cys2-Cys5 y Cys3-Cys6 Con un patrón de cisteínas C-C-CC-C-C	McIntosh <i>et al.</i> , 1999
P	péptido espasmódico	No se ha determinado Se sabe que tiene 6 Cys	Jones y Bulaj, 2000.
I	κ -BtX y ViTx	No se ha determinado, Se sabe que contienen 8 Cys	Jiménez, <i>et al.</i> , 2003.
S	σ -conotoxinas	No se ha determinado, Se sabe que contienen 8 Cys	Jones y Bulaj, 2000.
T	Péptidos tx5a, p5a, au5a y au5b	Cys1-Cys 3, Cys2-Cys 4	Walker <i>et al.</i> , 1999

II.7 Efectos de las Conotoxinas en los Blancos Moleculares

Las α -conotoxinas inhiben los AChRs en las uniones neuromusculares en vertebrados, estas toxinas se han aislado principalmente de tres diferentes caracoles marinos piscívoros como *C. geographus*, *C. magus* y *C. striatus*, la α -conotoxina GI

es un potente bloqueador de los AChRs en las uniones neuromusculares de algunos vertebrados, mientras que las α -conotoxina SI y SII son potentes inhibidores de estos receptores en teleosteos (Hopkins *et al.*, 1995).

Las α A-conotoxinas actúan como antagonistas de los AChRs ocasionando parálisis instantánea; la primer conotoxina perteneciente a esta familia fue la α A-conotoxina PIVA aislada a partir de *C. purpurascens*, existe también otra α A-conotoxina MII que es capaz de diferenciar entre subtipos distintos de los AChRs (Cartier *et al.*, 1996; Hopkins *et al.*, 1995).

La δ -conotoxina PVIA fue la primera δ conotoxina en ser aislada a partir de los extractos crudos del veneno total de *C. purpurascens*, ocasiona un efecto de parálisis tetánica instantánea e incrementa la excitabilidad en las uniones neuromusculares, su blanco molecular son los canales de sodio dependientes de voltaje (Shoon *et al.*, 1995). Otros blancos moleculares se muestran en la (Figura 8).

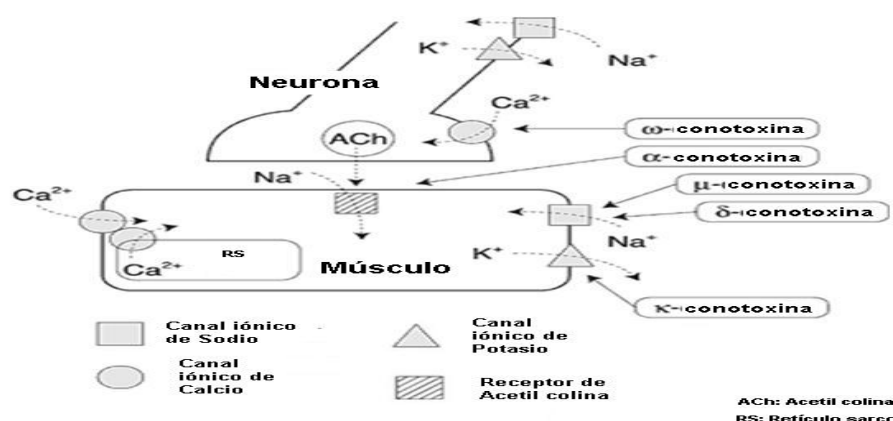


Figura 7 Blancos moleculares de las conotoxinas. Algunos de los blancos moleculares de estas toxinas lo constituyen los canales iónicos. (McIntosh y Jones, 2001).

II.8 Usos, Aplicaciones y Desarrollo de Nuevos Fármacos a Partir de las Conotoxinas

Las conotoxinas se utilizan en las neurociencias para seleccionar, discriminar y bloquear receptores y canales iónicos, para investigar la fisiología de un subtipo particular de canal iónico y para determinar el patrón de distribución de éstos en las membranas celulares al acoplar las conotoxinas a fluoróforos (McIntosh *et al.*, 1999; Nelson, 2004).

Las ventajas farmacológicas de las conotoxinas son su tamaño pequeño, síntesis relativamente sencilla, estabilidad estructural y especificidad de sus blancos (Lewis y García, 2003). De los 50,000 conopéptidos que se calcula que existen, menos del 0.1% han sido caracterizados farmacológicamente. Los conopéptidos que se han caracterizado son altamente específicos para ciertos canales iónicos y receptores asociados a las vías del dolor, incluyendo los AChRs, los transportadores de noradrenalina, los canales de calcio, los receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y los receptores de neurotensina (Lewis y García, 2003).

Una limitante del uso de péptidos para el tratamiento de algunas patologías es su incapacidad para cruzar las barreras epiteliales como la barrera hemato-encefálica. La bio-disponibilidad oral de los péptidos presentes en los venenos es generalmente baja debido a su tamaño y naturaleza hidrofílica; esto significa que los péptidos deben ser administrados en el sitio de acción ya sea de forma intravenosa, intratecal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o por medio de una inyección epidural

(Lewis y García, 2003). Sin embargo, si se combinan la disponibilidad de los péptidos con una distribución restringida de sus blancos puede ser de gran ventaja cuando lo que se desea es actuar sobre un blanco en particular (Lewis y García, 2003).

II.9 Ziconotide

Las conotoxinas son fuente de mejores y nuevos fármacos, actualmente existe en el mercado la conotoxina sintética Ziconotide, comercializada por *Prialt* y *Elan Corporation*; es una ω -conotoxina MVIIA aislada de *C. magnus*. Esta toxina es un bloqueador selectivo y específico de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo N (**Figura 8**), posee propiedades analgésicas y neuroprotectoras, que han sido atribuidas a la inhibición de la liberación de neurotransmisores excitatorios y a la supresión de los efectos secundarios del flujo de calcio después de una isquemia o un trauma cerebral. No tiene afinidad por otros canales iónicos y tampoco interacciona con receptores colinérgicos, monoaminérgicos y peptídicos (Rajendra *et al.*, 2004; Bowersox y Luther, 1998).

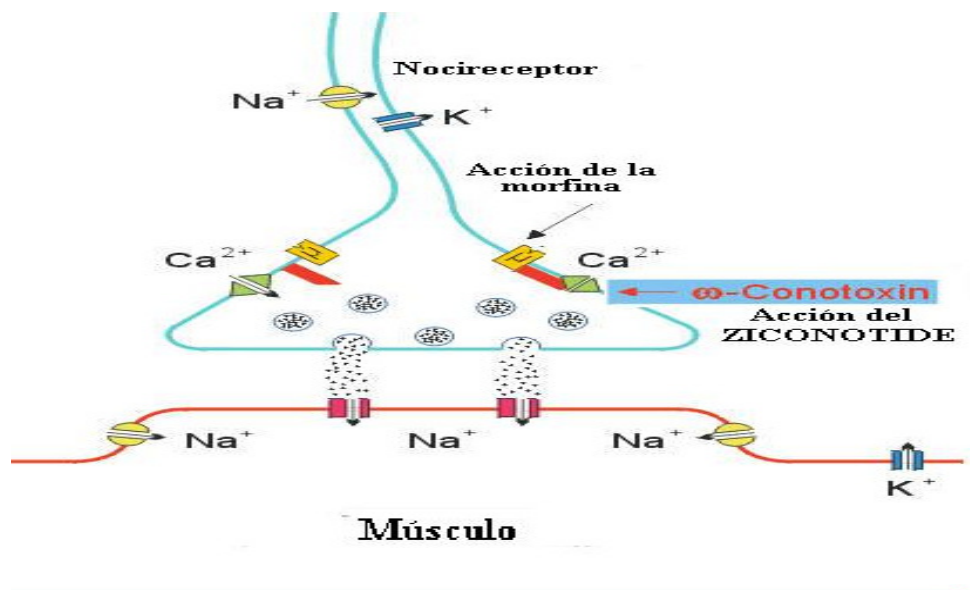


Figura 8 Acción del Ziconotide. La conotoxina sintética Ziconotide actúa en los receptores del dolor (nociceptores) bloqueando los canales de calcio dependientes del voltaje, su acción es mucho más potente que la de la morfina (que está involucrada en el bloqueo los canales de calcio dependientes del voltaje) además de que no causa tolerancia ni adicción (Bowersox y Luther, 1998).

La conotoxina SNX-111 es como también se le conoce, se une de una forma saturable y reversible a una sola clase de canal de calcio neuronal, su aparente constante de disociación (K_D) se ha determinado en preparaciones sinaptonémicas de cerebro de rata es de $\sim 10\text{pM}$, estos canales tienen como función regular la despolarización inducida por la entrada de calcio y mediante esta acción controlar una variedad de procesos intracelulares dependientes de calcio que incluyen la modulación de la excitabilidad neuronal, la liberación de neurotransmisores, activación de los sistemas de segundos mensajeros y la transcripción de genes (Bowersox y Luther, 1998).

La conotoxina sintética Ziconotide actualmente se encuentra en la fase clínica IV y es utilizada para el tratamiento de pacientes con SIDA, cáncer, dolor crónico, daño

cerebral traumático, isquemia cerebral y daño en la médula espinal; su principal ventaja es que es más potente que la morfina, no produce tolerancia, adicción, ni problemas colaterales ocasionados por todos los derivados opiáceos y exhibe actividad neuroprotectora (Bowersox y Luther, 1998; McIntosh y Jones, 2001; Olivera y Cruz, 2001; Rajendra *et al.*, 2004). Además se reportado que dosis sub-nanomolares aplicadas intratecalmente producen analgesia hasta por 24 horas en modelos biológicos inflamatorios y neuropáticos (Bowersox y Luther, 1998; Lewis y García, 2003).

También se sabe que otra ω -conotoxina, la ω -MVIIC bloquea la liberación inducida por potasio de algunos aminoácidos excitatorios como el ácido glutámico y el ácido aspártico en cortes histológicos de hipocampo de rata (McIntosh y Jones, 2001; Olivera y Cruz, 2001; Rajendra *et al.*, 2004).

Existen otras conotoxinas que se encuentran en fases clínicas para el tratamiento de enfermedades o procesos neuroquirúrgicos, por ejemplo:

- 1) La **ω -conotoxina GVIA** aislada de *C. geographus* actúa como antagonista de los canales de calcio de tipo N, al parecer tiene un papel neuroprotector contra los daños producidos por la isquemia cerebral. Inhibe la liberación excesiva de neurotransmisores incluyendo algunos aminoácidos exitatorios, su papel neuroprotector tiene efecto en el Sistema Nervioso Central y el Sistema Nervioso Periférico. La aplicación tópica de la ω -conotoxina GVIA en la

médula espinal inhibe considerablemente la liberación exocítica de neurotransmisores de las fibras aferentes y las conexiones interneuronales y por lo tanto, reduce la hiperexcitabilidad de las neuronas de la médula espinal durante la inflamación (Rajendra *et al.*, 2004).

- 2) La **ω -conotoxina CVID** aislada de *C. catus* y desarrollada por *AMRAD Operations Pty. Ltd.*, con el nombre de AM336, se encuentra actualmente en la fase clínica III para el tratamiento del dolor crónico (Lewis y García, 2003).
- 3) La **conotoxina α -GI** es un agonista de los nAChRs y funciona como analgésico, representa una alternativa viable para el uso de moléculas pequeñas como relajantes musculares utilizados durante procesos quirúrgicos, pero con la desventaja de que tienen periodos de recuperación lentos. Otro ejemplo es la **α conotoxina Vc1.1** que también tiene propiedades analgésicas (Arias y Blanton, 2000; Lewis y García, 2003).
- 4) Las **ρ -conotoxinas** son inhibidores no competitivos de los adrenoreceptores de tipo α_1 , y son consideradas como potentes candidatas para el desarrollo de nuevos fármacos contra la hipertensión y fibrilación atrial (Harvey, 2002; Lewis y García, 2003).
- 5) La **Contulacina-G** y la **Conantocina-G** (CGX-1007) aisladas de *C. geographus* y patentadas por *Cognetix Inc.* La Conantocina-G es un potente

antagonista de los receptores NMDA, bloqueando específicamente a los receptores que contienen la subunidad NR2B. Algunos estudios muestran que la Conantocina-G se une a la subunidad NR2B e incrementa los niveles intracelulares de calcio y la formación de GMPc en cultivos celulares de gránulos de cerebelo. Al parecer también funciona como potente agente antiepiléptico y neuroprotector en modelos animales de daño histológico, daño nervioso e inflamación (Lewis y García, 2003; Olivera y Cruz, 2001; Rajendra *et al.*, 2004).

- 6) Las **χ -conotoxinas** son inhibidores no competitivos del transporte de noradrenalina, su farmacología fue descrita inicialmente en los vasos deferentes de rata. Las aplicaciones intratecales de la conotoxina χ -MrIA producen analgesia en un ensayo de resistencia al calor en ratones, además esta toxina es más potente que la morfina en modelos de rata de dolor neuropático. Una variante de la χ -MrIA, la toxina sintética Xen2174 fue desarrollada por la compañía *Xenome Ltd* como un potente analgésico (Lewis y García, 2003).
- 7) La **Conantocina-R** aislada de *C. radiatus* actúa como un antagonista no competitivo de los receptores NMDA y se sabe que tiene uso potencial como agente anticonvulsiones (Arias y Blanton, 2000; Rajendra *et al.*, 2004).

- 8) La **Conantocina-L** aislada de *C. lynceus* muestra una homología a otras conantocinas y también se ha probado como un agente anticonvulsiones, aunque es menos eficiente que la Conantocina-R (Rajendra *et al.*, 2004).

La compañía *Xenome Ltd.* ha reportado la existencia de varias conotoxinas que están en fases preclínicas y que serán utilizadas para el tratamiento de dolor severo, depresión, epilepsia, cáncer, enfermedades cardiovasculares, infartos, desórdenes psiquiátricos, problemas motores, espasmos e incontinencia urinaria (McIntosh y Jones, 2001).

La característica excepcional de las conotoxinas es que combinan dos componentes importantes: una elevada afinidad y una delicada selectividad por sus blancos, que por lo general lo constituyen canales iónicos dependientes de voltaje, canales iónicos dependientes de ligando y en pocos casos receptores y canales iónicos acoplados a proteínas G (McIntosh *et al.*, 1999; Olivera y Cruz, 2001).

Las conotoxinas son capaces de discriminar entre receptores estrechamente relacionados y entre receptores tejido específicos, lo que les permite llegar a su blanco diferenciando todas aquellas moléculas similares y acelerando así, la acción de cada uno de los componentes del veneno (Olivera *et al.*, 1990).

Debido a que la mayoría de la señalización en el sistema nervioso está basada en la diversidad molecular de los canales iónicos, una de las características desde el punto

de vista neurobiológico y farmacológico más importante de las conotoxinas es su capacidad para discriminar entre miembros de una misma familia de canales iónicos (McIntosh *et al.*, 1999.).

II.10 Generalidades de los Canales Iónicos

Las señales eléctricas son esenciales para todos los organismos y están reguladas por la acción de proteínas de membrana especializadas, conocidas como canales iónicos (Lodish *et al.*, 2002; Minor, 2001). Los canales iónicos regulan una amplia gama de funciones fisiológicas como la señalización neuronal, la excitabilidad cardíaca y las respuestas del sistema inmune (Friederich, 2003). Estas proteínas modulan la excitabilidad eléctrica regulando el paso de iones a través de la membrana lipídica de una manera altamente regulable; se ha reportado que en general el flujo de iones a través de un canal es de $\sim 1 \times 10^6$ a 1×10^9 iones por segundo (Cooper y Jan, 1999; Minor, 2001).

El flujo de las corrientes iónicas a través de las membranas celulares está determinado por tres factores: el potencial de membrana, la composición electrolítica de los fluidos extra e intracelulares y el tipo de canales iónicos que se encuentren en las células. La diferencia en la composición electrolítica entre los fluidos intra y extracelulares determina la fuerza electroquímica impuesta a un ion particular por el potencial de membrana. Las proteínas de los canales iónicos responden a cambios en el potencial de membrana o en la concentración de alguna molécula, y alteran su

configuración tridimensional de un estado de no conducción a un estado conformacional que permite el paso de las corrientes iónicas (Friederich, 2003).

El ensamblaje de los canales iónicos es un proceso en donde las subunidades se pliegan y acoplan para dar lugar a un canal iónico funcional (Green, 1999). El mecanismo general de plegamiento que se ha propuesto incluye que el ARNm, sea llevado hacia la membrana del retículo endoplásmico (RE) donde inicia el ensamblaje, tales eventos son co-traduccionales e incluyen la inserción de las subunidades del canal en la membrana, así como una serie de procesos post-traduccionales como la adición de una secuencia de hidrólisis o glicosilaciones (Green, 1999). Debido que los eventos de ensamblaje de los canales iónicos son co-traduccionales, inician desde el amino hacia el carboxilo terminal estableciendo un patrón de ensamblaje, en donde los distintos dominios proteicos interaccionan unos con otros, y se forman enlaces disulfuro e isomerización de prolinas (Green, 1999).

Parece ser que el plegamiento post-traducciona, procesamiento y oligomerización de las principales subunidades del canal ocurren en el RE, sin embargo, el proceso de oligomerización de las subunidades auxiliares continúa después de su liberación del RE (Green, 1999).

Los canales iónicos tienen un poro acuoso transmembranal que contiene en su mayoría residuos hidrofóbicos, el poro está formado y rodeado por diferentes segmentos de las subunidades transmembranales del canal (Dascal, 2001). Los iones

atraviesan la membrana plasmática mediante difusión a través del poro, el cual contiene un filtro de selectividad por tamaño, carga o valencia de los iones (Dascal, 2001; Terlau y Stühmer, 1998). De todos los canales, el poro del canal de K^+ es del que se tienen más detalles (Dascal, 2001; Doyle *et al.*, 1998).

La conformación del canal iónico alterna dinámicamente entre dos estados generales: abierto y cerrado, a través de un proceso denominado apertura o “gating” en inglés, este mecanismo permite que el poro del canal se abra y cierre, mediante el movimiento de motivos estructurales específicos de los canales conocidos como compuertas (Dascal, 2001; Doyle *et al.*, 1998).

De manera general existen tres diferentes clases de canales iónicos (**Figura 9**):

- 1) Los canales iónicos dependientes de voltaje, cuyo funcionamiento depende del voltaje generado por los cambios en el potencial de membrana.
- 2) Los canales iónicos dependientes de ligando, que requieren la unión de neurotransmisores y hormonas para su apertura y cierre,
- 3) Los canales iónicos regulados por proteínas G, que pueden operar de tres formas: inhibiendo a proteínas efectoras, regulando el canal a través de segundos mensajeros o proteínas cinasas, y por la asociación física directa entre las subunidades de la proteína G y el canal iónico (Dascal, 2001).

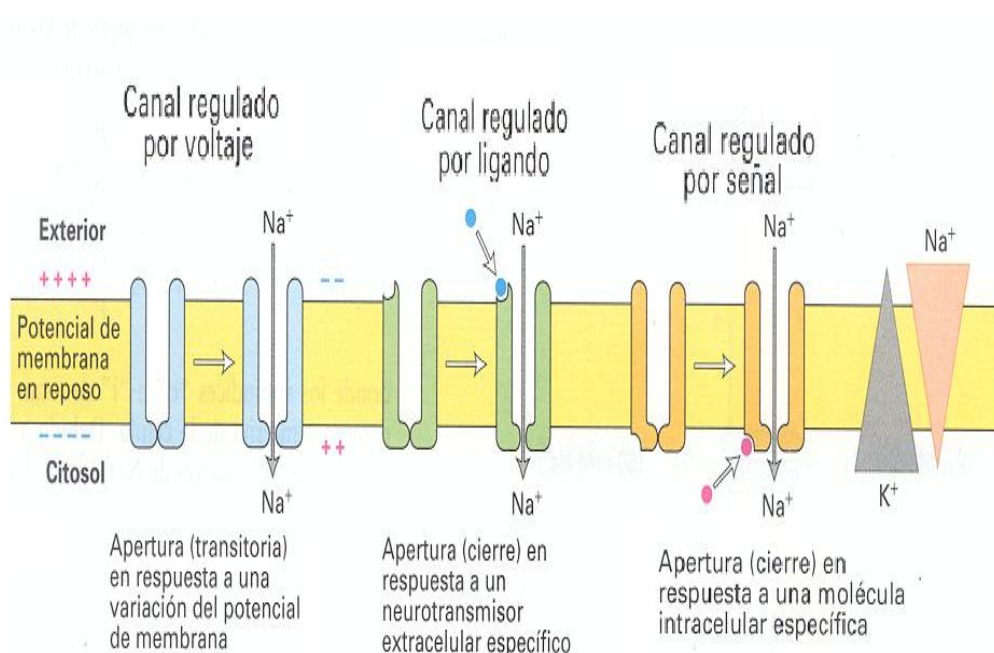


Figura 9 Tipos de canales iónicos. De forma general existen tres clases de canales iónicos: los canales dependientes de voltaje, dependientes de ligando y regulados por señales o proteínas G (Lodish *et al.*, 2002).

II.11 Canales Iónicos Dependientes de Voltaje

La superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje está compuesta por un gran conjunto de proteínas que son activadas por los cambios en el potencial de membrana, este cambio es monitoreado por algunos residuos de aminoácidos localizados en un motivo proteico sensible al voltaje (Terlau y Stühmer, 1998). Estas proteínas exhiben diferente selectividad para aniones y cationes mono y divalentes, por lo que son comúnmente divididos en canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} entre otros (Lehmann y Jurkat, 1999; Terlau y Olivera, 2003; Terlau y Stühmer, 1998).

El papel fisiológico más importante de los canales iónicos dependientes de voltaje es la generación, determinación y transducción de señales eléctricas en las células (Terlau y Olivera, 2003).

Casi todos los canales iónicos tienen subunidades múltiples, en muchos casos, un tipo específico de subunidad se puede asociar y formar varios canales iónicos funcionales que difieren entre ellos en la composición de subunidades y en las propiedades fisiológicas (McIntosh *et al.*, 1999).

Al activarse los canales iónicos dependientes de voltaje, exhiben un cambio conformacional, que se refleja como la permeabilidad selectiva de iones a través del poro (Terlau y Olivera, 2003). A partir de este estado de apertura, los canales iónicos dependientes de voltaje pueden ser inactivados por un cambio conformacional, estableciéndose un estado de no conducción o pueden ser desactivados regresando a su estado cerrado (Terlau y Olivera, 2003). De todas estas proteínas, los canales de potasio son los más abundantes y el grupo más diverso (Minor, 2001.).

II.12 Canales Iónicos de Potasio

Los canales iónicos de potasio (CIK) se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos: animal, vegetal, protista y procariota (Jan y Jan, 1997). La apertura de estos canales permite el control y movimiento rápido de los iones K^+ a través de la

membrana celular. Este mecanismo está relacionado con una gran variedad de procesos biológicos como: el establecimiento del potencial de reposo, la generación de potenciales de acción, la señalización eléctrica y decodificación en neuronas; el mantenimiento de actividad en músculos, cerebro, corazón y el sistema nervioso, regulación del volumen celular y turgencia, liberación de hormonas y neurotransmisores, crecimiento, gemación, transporte y almacenamiento de nutrientes, movimiento de las hojas, germinación, regulación de la apertura de los estomas, entre otras (Doyle *et al.*, 1998; Jan y Jan, 1997; Lodish *et al.*, 2002; Minor, 2001; Stocker *et al.*, 2004; Terlau y Stühmer, 1998).

La actividad de los CIK esta regulada por el estado metabólico de la célula, por hormonas y neurotransmisores y por cambios en el potencial de membrana (Dascal, 2001; Jan y Jan, 1997).

Se sabe que las disfunciones y mutaciones en los CIK están relacionadas con ciertas patologías comúnmente conocidas como canalopatías iónicas, entre las que destacan enfermedades neurológicas como Alzheimer, Parkinson, epilepsia, cáncer, invasión tumoral y metástasis, disfunciones neuromusculares, parálisis muscular, ataxias, sordera, arritmia cardiaca e infartos al miocardio (Cooper y Jan, 1999; Jan y Jan, 1997; Lehmann y Jurkat, 1999; Minor, 2001).

Los CIK son capaces de discriminar perfectamente entre los iones K^+ (1.33 Å) y Na^+ (0.95 Å) basándose en su tamaño. Los CIK son canales de poro largo multi-iónicos

pues albergan hasta cuatro iones en una sola fila y esto facilita su disociación de los sitios de unión mediante repulsión electrostática (Doyle *et al.*, 1998; Jan y Jan, 1997). El poro de los CIK puede ser bloqueado con iones de tetraetilamonio y algunas neurotoxinas. Al parecer existe una conservación estructural entre los CIK presentes en eucariotes y procariotes, pues se ha demostrado que tienen esencialmente la misma constitución del poro (Dascal, 2001; Doyle *et al.*, 1998; Jan y Jan, 1997; MacKinnon *et al.*, 1998). Los CIK contienen secuencias críticas de aminoácidos ya que mutaciones en estos residuos eliminan la capacidad del canal para discriminar entre los iones K^+ y Na^+ (Dascal, 2001; Doyle *et al.*, 1998; MacKinnon *et al.*, 1998).

Se han identificado algunas familias de los CIK como los: dependientes de voltaje Kv, que contienen seis segmentos transmembranales (6 ST), los rectificadores entrantes IRK, que contienen 2 ST y los modulados por calcio KCa; que contienen 6 ST y 11 ST (Dascal, 2001; Doyle *et al.*, 1998; Jan y Jan, 1997; Stefani *et al.*, 1997; Williams, 1997).

II.13 Canales de Potasio Dependientes de Voltaje (Kv)

Este tipo de canales contienen sensores de voltaje que permiten que su actividad sea regulada por el potencial de membrana (Jan y Jan, 1997). Los canales Kv son proteínas tetraméricas y cada subunidad α (formadora del poro) contiene 6 ST (de manera específica S1 a S6, como se detalla en la **(Figura 10)**, un segmento **P** que

reviste al poro y un segmento N que forma la esfera de inactivación la cual gira hacia el canal para inactivarlo (Lodish *et al.*, 2002; Terlau y Olivera, 2003). Las subunidades principales (α) interaccionan con las subunidades auxiliares (β) que no forman el poro del canal pero que modulan las propiedades del mismo (Terlau y Olivera, 2003).

Se conocen al menos 18 genes que codifican para la subunidad α de los Kv que se expresan en el sistema nervioso de mamíferos (Jan y Jan, 1997). Las subunidades β que se conocen, contienen motivos de unión para NADPH, pero carecen de secuencias transmembranales y son citoplasmáticas (Jan y Jan, 1997).

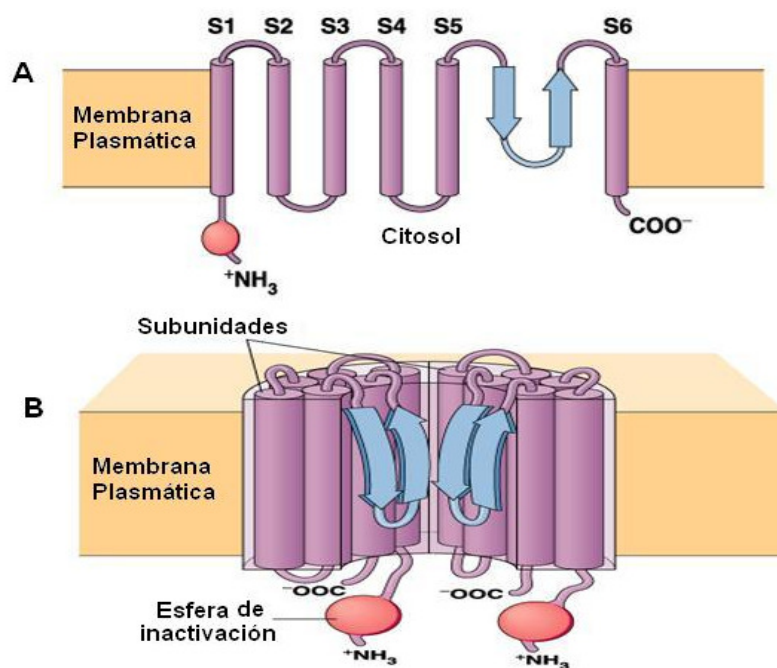


Figura 10. Esquema del Canal de K^+ Dependiente de Voltaje. Se muestran (A) los segmentos transmembranales de la subunidad α (S1 a S6); (B) el arreglo de dos de las cuatro subunidades del canal (Jan y Jan, 1997).

Los Kv contienen seis subfamilias, entre paréntesis se señalan los canales Kv de vertebrados, y con cursivas su contraparte en *Drosophila melanogaster* y son: *Shaker* (Kv1.1-1.7), *Shab* (Kv2.1, 2.2), *Shaw* (Kv3.1-3.4), *Shal* (Kv4.1-4.3), *ether-a-go-go* ó *eag* (HERG) y *slowpoke* ó *slo* (Maxi K) (Jan y Jan, 1997).

La activación de los canales Kv está mediada por cambios en el potencial de membrana (E_m) los cuales son monitoreados por sensores (el segmento S4 y algunos aminoácidos del S2) que originan un cambio conformacional del canal y que permite la permeabilidad de los iones potasio (Jan y Jan, 1997). Se reconoce como parte principal del sensor al segmento S4, la mayoría de los aminoácidos en este segmento son básicos cargados como Arginina y Lisina, los cuales se mueven hacia la parte extracelular y activan el canal (Jan y Jan, 1997). Estudios de mutagénesis han demostrado que las interacciones iónicas entre cargas positivas del segmento S4 y los residuos ácidos en las hélices S2 y S3, estabilizan la apertura del canal durante su activación (Fedida y Kesketh, 2001). Un modelo de la cinética de apertura del canal sugiere que las cuatro subunidades tienen movimientos idénticos e independientes. Esta cooperatividad es influenciada por residuos no cargados de las hélices S4 y S5, y su contacto entre las hélices puede estabilizar el estado abierto del canal. Durante la despolarización, el S4 gira como resultado de la transferencia de los cuatro residuos cargados del espacio intracelular al extracelular. Otros estudios sugieren que también rotan las hélices S5 y S6 para permitir el flujo iónico (Fedida y Kesketh, 2001).

El asa de los segmentos S4-S5 interaccionan con los iones entrantes y con la región de inactivación por lo tanto le permite ocluir el poro del canal (Jan y Jan, 1997), se ha propuesto que estos segmentos forman parte del receptor de inactivación que se encuentra cerca de la boca citoplasmática del poro (Isacoff *et al.*, 1991). Los residuos que afectan la conductancia del canal y su inactivación se encuentran en una de las caras de la hélice. Algunos estudios sugieren que S4-S5 forman el extremo citoplásmico del poro y el receptor de inactivación. Entonces, como respuesta a la despolarización de la membrana el S4 se mueve hacia arriba y ocasiona que el S5 también cambie su conformación, lo que explicaría la relación estrecha entre activación e inactivación (Isacoff *et al.*, 1991).

También se sabe que el segmento P constituye la parte medular del mecanismo de permeabilidad, pues la sustitución de aminoácidos en esta región, afecta la conductancia y la selectividad iónica (Isacoff *et al.*, 1991). El S6 también contribuye a formar la porción interna del poro del canal, y este segmento interacciona con las toxinas en la parte extracelular de la membrana (Jan y Jan, 1997).

La inactivación de algunos CIK se lleva a cabo por dos mecanismos conocidos como inactivación de tipo N y C (**Figura 11**). El primero se caracteriza porque un amino terminal de las subunidades del canal ocluye la región citoplasmática del poro ocasionando la inactivación de éste. En la inactivación de tipo C existe un arreglo conformacional que ocasiona que la parte extracelular del poro del canal sea más

estrecha, al parecer ocurre cuando el sitio de unión al ión potasio en la cara extracelular del canal está vacío (Baukrowitz y Yellen 1995, 1996; Jan y Jan, 1997).

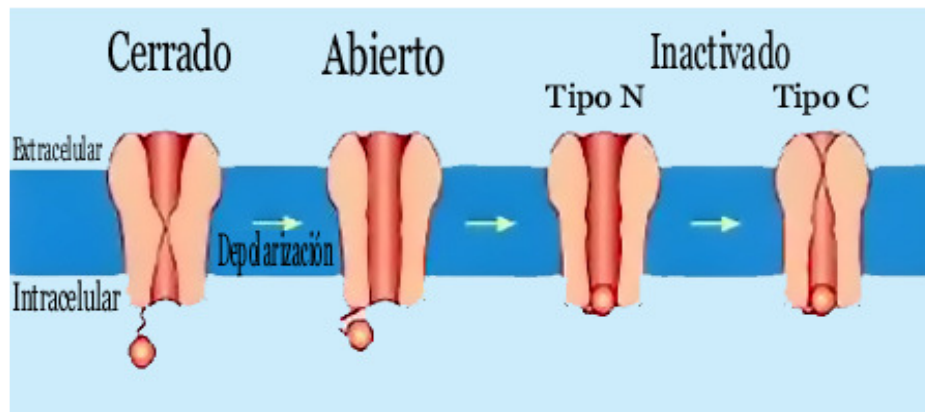


Figura 11 Esquema General de los Tipos de Inactivación N y C (tomado y modificado de Terlau y Stühmer, 1998).

La esfera de inactivación del canal de potasio de tipo *Shaker* está formado por los primeros 20 aa. del N-terminal de la subunidad α y está localizado en el lado intracelular de la membrana (Zhou *et al.*, 2001). Al parecer la esfera y algunos compuestos amonio cuaternarios (como el Tetrabutylamonio, TBA), se unen a la cavidad hidrofóbica central y esto explica algunas de las propiedades funcionales de la inactivación, como el que sólo se requiera un segmento de inactivación, que el TBA compita por el sitio de inactivación, que el potasio externo empuje al TBA fuera del canal, que la inactivación sea independiente del voltaje y que algunos canales de potasio exhiban un estado cerrado inactivado (Zhou *et al.*, 2001).

II.14 Canales Iónicos de Potasio Modulados por Calcio (K_{Ca})

La regulación dual tanto por voltaje como por calcio, permite que los canales MaxiK actúen como integradores moleculares del estado de los sistemas de transducción interna de la célula y, de las propiedades eléctricas de la membrana plasmática (Weiger *et al.*, 2002).

El papel fisiológico de los K_{Ca} incluye la transducción de señales, contracción muscular, generación y propagación del potencial de acción, modulación de las señales activadas por calcio, transmisión sináptica, liberación de neurotransmisores y hormonas, regulación del tono vascular, etcétera. (Wang *et al.*, 2003; Weiger *et al.*, 2002).

En general las corrientes de potasio moduladas por calcio han sido caracterizadas en distintos sistemas, y tienen en común su activación por calcio dando como resultado fisiológico la hiperpolarización del potencial de membrana (Stocker, *et al.*, 2004). De acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas, los K_{Ca} se clasifican en base a la conductancia y se dividen en canales de pequeña (SK), intermedia (IK) y de gran conductancia (MaxiK, Slo ó BK) (Jäger y Grissmer, 2004). Los canales MaxiK han sido nombrados genéricamente como “Slo”, pues son codificados por la familia de genes “*slowpoke*” y fueron los primeros canales K_{Ca} en caracterizarse (Stocker *et al.*, 2004).

Los MaxiK son activados por voltaje pero su probabilidad de apertura está modulada por el calcio (Stocker *et al.*, 2004; Weiger *et al.*, 2002). Los canales MaxiK son prácticamente ubicuos, exceptuando los miocitos en el corazón, experimentos electrofisiológicos han demostrado que estos canales son particularmente abundantes en el músculo liso (Toro *et al.*, 1998). Su participación es importante en células epiteliales por su localización polarizada (Wang *et al.*, 2003). El MaxiK varía en su sensibilidad al calcio, conductancia y cinética de apertura en diferentes tipos celulares (Wang *et al.*, 2003). Lo anterior obedece a la modulación por subunidades $\beta_{(1-4)}$. A nivel del ARNm, ambas subunidades coexisten en casi todos los tejidos, aunque en el cerebro la subunidad β es mucho menor la subunidad α , en músculo liso ambas son expresadas en los mismos niveles (Toro *et al.*, 1998).

Los bloqueadores del MaxiK, como la iberiotoxina, inducen actividades contráctiles en los músculos coronarios y uterinos (Toro *et al.*, 1998). Un incremento local en la concentración micromolar de calcio en la vecindad de los canales MaxiK, puede repercutir en un incremento en el flujo de iones potasio, siendo este un mecanismo para el mantenimiento del tono muscular en los músculos lisos (Toro, *et al.*, 1998).

II.15 Estructura de los Canales MaxiK

Una característica notoria del MaxiK es su capacidad de expresarse como dos dominios separados, uno lo constituye el núcleo y el otro la cola, ésta última es la

región más conservada y parece estar involucrada en la modulación por calcio (Toro *et al.*, 1998). Poseen un sensor de voltaje intrínseco cuya activación es obligatoria para la apertura del canal y concentraciones “elevadas” de calcio, transforman el canal de un estado independiente de calcio a un estado modulado por calcio que requiere menos voltaje para abrirse (Stefani *et al.*, 1997).

Su estructura (**Figura 12**) consiste de la subunidad α (formadora del poro) en combinación con la subunidades β . A pesar de que solamente un gen codifica para tal subunidad, existen variedades funcionales resultantes de la edición alternativa (splicing en inglés) del ARNm (Stocker *et al.*, 2004).

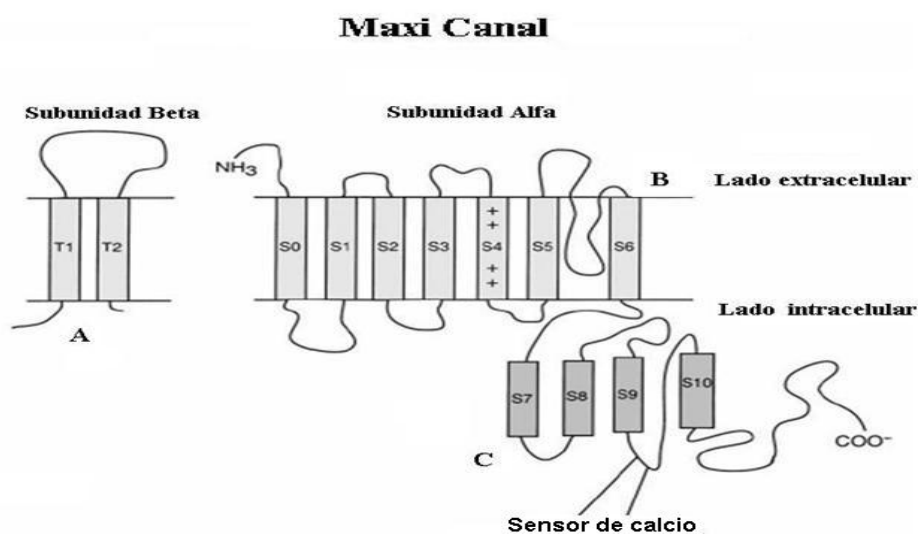


Figura 12. Estructura general del Maxi Canal. Se observa la estructura que forma la subunidad β (A), la cual contiene 2 ST (T1 y T2), nótese que ambos extremos amino y carboxilo terminal se encuentran en el lado citoplasmático. Se representa también los segmentos ST que forman a la subunidad α (B) S0 a S6, y los residuos de aminoácidos cargados positivamente en el segmento S4, que ayudan a la apertura del canal, y también se representa el sensor de calcio (C), que contiene los segmentos citoplásmicos S7 a S10, y en donde una pequeña región entre los segmentos S9 y S10 es probablemente el sensor de calcio (Sah y Faber, 2002).

La subunidad α tiene siete segmentos transmembranales (S0 a S6), las subunidades α de mamíferos comparten una similitud de aminoácidos mayor al 97%, mientras que la subunidad β muestra una semejanza de 82 a 85% (Toro *et al.*, 1998). La secuencia primaria de los segmentos S1-S6 es homóloga a las mismas regiones de los Kv, sin embargo el S0 es único para los canales MaxiK (Toro *et al.*, 1998). El N-terminal es exoplasmático y es fundamental para la apertura del canal, los procesos de tetramerización de las subunidades y la modulación de la subunidad β , este segmento es altamente conservado en todos los canales de tipo MaxiK incluyendo los que se encuentran en *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans*, (Toro *et al.*, 1998; Wallner *et al.*, 1996). Se sabe que los segmentos S4, S5, S6 y P son muy similares en cuanto a funcionamiento a los descritos para los canales Kv (**Figura 13**) (Toro *et al.*, 1998; Wallner *et al.*, 1996)

El C-terminal del MaxiK forma dos terceras partes de la proteína y contiene cuatro segmentos hidrofóbicos S7-S10, varios sitios de edición alternativa y una región cargada negativamente que está implicada con la unión del calcio y con la interacción de varias proteínas moduladoras como proteínas cinasas (Toro *et al.*, 1998; Wallner *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2003; Weiger *et al.*, 2002).

La fosforilación de proteínas es un mecanismo ubicuo que modula la actividad de algunas proteínas, en los canales MaxiK, los sitios de fosforilación forman parte del

canal. La fosforilación del MaxiK afecta su actividad disminuyendo o incrementándola, dependiendo de la proteína cinasa involucrada y del sitio de fosforilación (Weiger *et al.*, 2002).

Se sabe que el N-terminal y el C-terminal del MaxiK son sitios potenciales para la unión de otras proteínas reguladoras; por ejemplo, hay dos proteínas que se unen al canal dSlo, la primera llamada Slob que activa el canal haciendo que el voltaje que se requiere para la apertura sea más negativo, la otra proteína llamada 14-3-3 tiene el efecto contrario, hace que el voltaje necesario para activar el canal sea más positivo y por lo tanto, dificulta la apertura del canal (Weiger *et al.*, 2002).

Las subunidades β de los canales MaxiK están acopladas funcionalmente al amino terminal del canal y contienen dos segmentos transmembranales unidos por una gran asa extracelular que contiene dos sitios potenciales para la N-glicosilación (Meera *et al.*, 1996; Toro *et al.*, 1998; Wallner *et al.*, 1996; Weiger *et al.*, 2002). Hasta la fecha existen clonadas cuatro subunidades β : $\beta 1$ (KCNMB1), $\beta 2$ (KCNMB2), $\beta 3$ (KCNMB3) y $\beta 4$ (KCNMB4). La subunidad β modifica la farmacología, dependencia del voltaje para la apertura y la cinética de ensamblaje de la proteína (Stocker *et al.*, 2004). El canal dslo (de *Drosophila melanogaster*) carece de una modulación por la subunidad β y es el que mas difiere de los canales slo de mamíferos en su secuencia primaria.

En el canal de potasio de tipo *Shaker* las cargas positivas del segmento S4 y las cargas negativas del segmento S2 (ácido glutámico 293) contribuyen a la apertura del canal; en tanto que en el Maxi canal Hslo tiene tres cargas positivas Arg-207, 210 y 213, siendo las dos últimas las que contribuyen significativamente con las cargas de entrada del canal junto con dos aminoácidos hidrofóbicos en el segmento S4 y los aminoácidos cargados negativamente en el segmento S2 (**Figura 14**) (Díaz *et al.*, 1998; Stefani *et al.*, 1997).

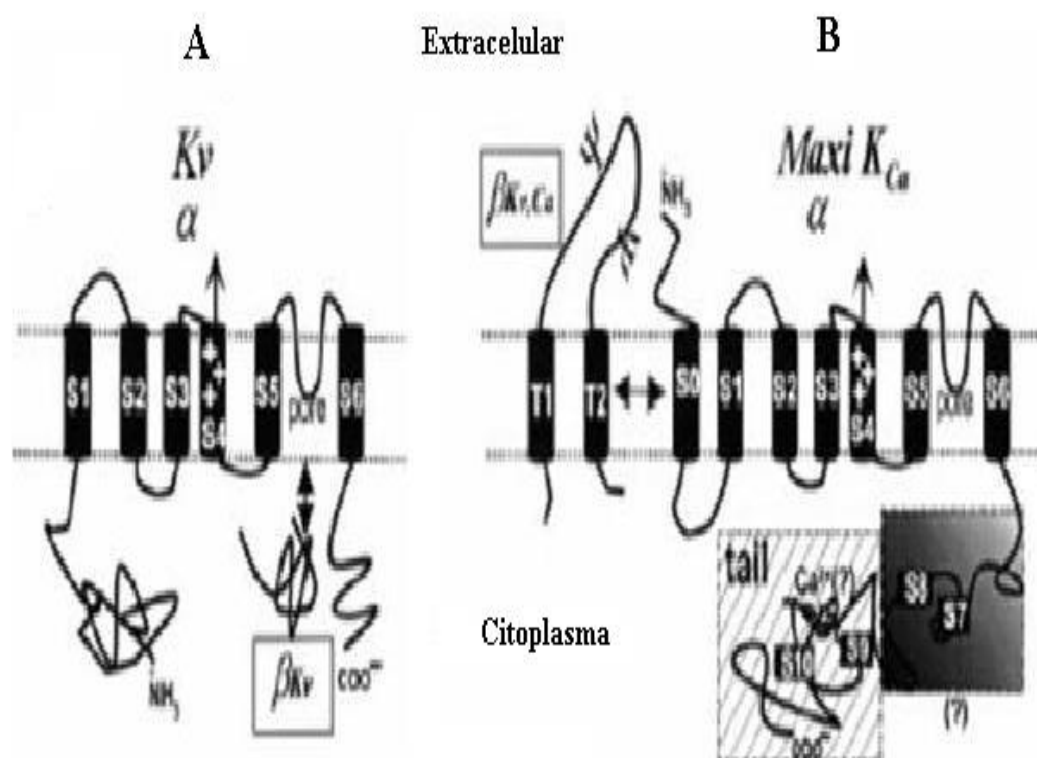


Figura 13. Similitudes entre dos canales de potasio el canal Shaker (A) y el Maxi canal (B). Se muestra en (A), que el canal Shaker tiene el amino, el carboxilo terminal y la subunidad beta (en recuadro), en el lado citoplasmático, además de la región con residuos cargados positivamente en el S4 y S5 (formador del poro). En el caso del Maxi Canal (B), se muestra las subunidades transmembranales alfa y beta, las regiones marcadas con ψ representan posibles sitios de glicosilación, en el recuadro oscuro están los segmentos S7 y S8, en el recuadro rayado se muestra la cola del canal con las regiones hidrofóbicas S9-S10 y el posible sitio de unión a calcio. Nótese que al igual que en el otro canal, el segmento S4 está cargado positivamente y también se localiza el segmento S5 y S6 formando el poro del canal (Toro *et al.*, 1998).

II.16 Modulación de los Canales MaxiK por Calcio

El MaxiK sólo depende del voltaje para su apertura, pero también está modulado por el incremento en $[Ca]_i$ ($>100nM$) facilitando así su apertura cuando la membrana se despolariza. Este canal se abre en ausencia de calcio ($<100nM$) (Meera *et al.*, 1996; Toro *et al.*, 1998), lo que sugiere que poseen un sensor de voltaje (el segmento S4). El calcio por lo tanto es un facilitador que disminuye el voltaje que se requiere para el canal (Meera *et al.*, 1996; Toro *et al.*, 1998; Stefani *et al.*, 1997).

Se propone que varios residuos de ácidos aspárticos en los segmentos S9 y S10 podrían estar involucrados en la unión y sensibilidad de calcio (Toro *et al.*, 1998).

Además del complejo mecanismo de apertura por voltaje y calcio, la actividad de los canales MaxiK puede ser modulada por una amplia variedad de mecanismos, las moléculas involucradas son tan diversas como; segundos mensajeros (cAMP, IP_3 , cGMP), proteínas (Slob, 14-3-3, cinasas), etanol, pH, ácidos grasos, diaminas, poliaminas, ácido nítrico, voltaje, potencial redox, electrostática de la superficie de la membrana, fosforilación, etcétera (Weiger *et al.*, 2002)

Los activadores de los canales MaxiK son blancos potenciales para el tratamiento y control de enfermedades como asma, enfermedades crónicas de los pulmones, daños neuronales resultantes de infartos y traumas (Weiger *et al.*, 2002).

II.17 Toxinas que Afectan Canales de K⁺

Los bloqueadores de los CIK que se unen a los epítomos externos representan una alternativa interesante para el desarrollo de nuevas drogas, algunas de ellas relacionadas con los tratamientos anticancerígenos pues se sabe que existen canales como el *ether-a-go-go* sobreexpresados en algunos tipos de tumores (Lewis y García, 2003).

Las toxinas de varios organismos se han utilizado para estudiar y diferenciar los CIK. Las toxinas utilizadas por excelencia han sido aisladas de veneno de alacrán: Caribdotoxina CTx, Iberiotoxina IbTx y Noxiustoxina NTx. Los péptidos que afectan los CIK se han agrupado en tres familias: α , β , y γ , y se abrevian KTx's (García *et al.*, 1991; Rodríguez de la Vega y Possani, 2004). Otro ejemplo clásico son las toxinas aisladas de serpiente como las Dendrotoxinas, de las cuales existen variantes denominadas como α , β , γ y δ -dendrotoxinas. Recientemente se destacan las toxinas aisladas del caracol marino del género *Conus*, como las κ -conotoxinas y las conotoxinas de la Superfamilia I (García *et al.*, 1991; Harvey, 1997; Kaufenstein *et al.*, 2003; Terlau y Olivera, 2003).

Las toxinas que actúan en los canales iónicos, se caracterizan porque son péptidos pequeños, estructuralmente pueden tener diferentes motivos, pero presentan convergencias moleculares y funcionales, como consecuencia se ha evidenciado que

los blancos de estas toxinas pueden tener orígenes evolutivos comunes (Jouirou *et al.*, 2004).

Se sabe que las toxinas que afectan los CIK contienen entre 20-60 aa., están estabilizadas por 2-4 enlaces de disulfuro, y algunas de ellas se unen en una región del canal que sólo está disponible cuando éste se abre (Jouirou *et al.*, 2004; Lewis y García, 2003). Estas toxinas han sido las más estudiadas por diferentes razones: son fáciles de caracterizar, de producir en forma sintética, tienen un alto valor terapéutico y además pueden ser muy distintas por la gran variedad estructural y funcional de los CIK (Jouirou *et al.*, 2004).

Debido a la gran diversidad de toxinas que afectan este tipo de canales, se ha hecho evidente que además de su plegamiento, deben de existir otros determinantes moleculares claves para la unión con estos canales como lo son: una díada funcional y un anillo de residuos de aminoácidos básicos (Jouirou *et al.*, 2004; Rodríguez de la Vega y Possani, 2004). La díada participa en la interacción del canal iónico con la toxina, favoreciendo su afinidad y contribuyendo al bloqueo del flujo de iones a través de la membrana celular (Jouirou *et al.*, 2004).

La díada está compuesta por una lisina (K), localizada en el poro, y un residuo aromático (tirosina o fenilalanina) o alifático (leucina) (Jouirou *et al.*, 2004). Se cree que la lisina está localizada en el centro de un anillo compuesto por grupos carbonilo y cuatro residuos ácidos (D o E) cada uno perteneciente a una de las subunidades α

que forman el canal (Jouirou *et al.*, 2004). En algunas toxinas existen triadas funcionales, en este caso, se presentan dos equivalentes hidrofóbicos, que junto con la lisina forman la triada (Jouirou *et al.*, 2004). Entonces, el plegamiento y la organización de los enlaces disulfuro juegan un papel importante en la distribución espacial de los residuos que componen la díada y el anillo de residuos básicos, estos dos últimos son los determinantes moleculares que favorecen la unión de las toxinas a los canales iónicos de K^+ (Jouirou *et al.*, 2004).

Se ha reportado que algunas conotoxinas contienen determinantes estructurales como la díada de aminoácidos y forman enlaces disulfuro, y que a pesar de ser péptidos pequeños (<27 aminoácidos) son estables y resistentes a altas temperaturas (Jacobsen *et al.*, 2000; Terlau y Olivera, 2003). Las conotoxinas que se unen a los CIK se les conoce como **κ -conotoxinas**, se sabe existen tres tipos: las κ -conotoxinas, κA -conotoxinas y κM -conotoxinas (McIntosh *et al.*, 1999; Terlau y Olivera, 2003).

II.18 κ -Conotoxinas

Pertenecen a la Superfamilia O de las conotoxinas. Se sabe que las κ -conotoxinas bloquean los CIK de la familia Kv (McIntosh *et al.*, 1999) uniéndose a la cara extracelular del poro del canal con una estequiometría de 1:1. La primera κ -conotoxina, fue aislada en 1996 del caracol *Conus purpurascens*, se conoce como **κ -conotoxina PVIIA (κ -PVIIA)**. Ésta juega un papel fundamental en la inmovilización rápida de peces y junto con la conotoxina δ -PVIA ocasionan una

inmovilización tetánica (Jacobsen *et al.*, 2000; Terlau *et al.*, 1996). La κ -PVIIA bloquea los CIK de tipo *Shaker* ($IC_{50}=70$ nM, Concentración Inhibitoria Media) pero es inactiva en canales Kv1 presentes en cerebro de rata (Terlau *et al.*, 1996, 1999). La κ -PVIIA contiene una tríada de residuos: R2, K7 y F9 que facilitan la unión con este tipo de canales iónicos. Se cree que la K7 ocluye el canal, mientras que la F9 forma interacciones hidrofóbicas con el canal *Shaker* (**Figura 14**) (Jacobsen *et al.*, 2000; Terlau *et al.*, 1996, 1999).

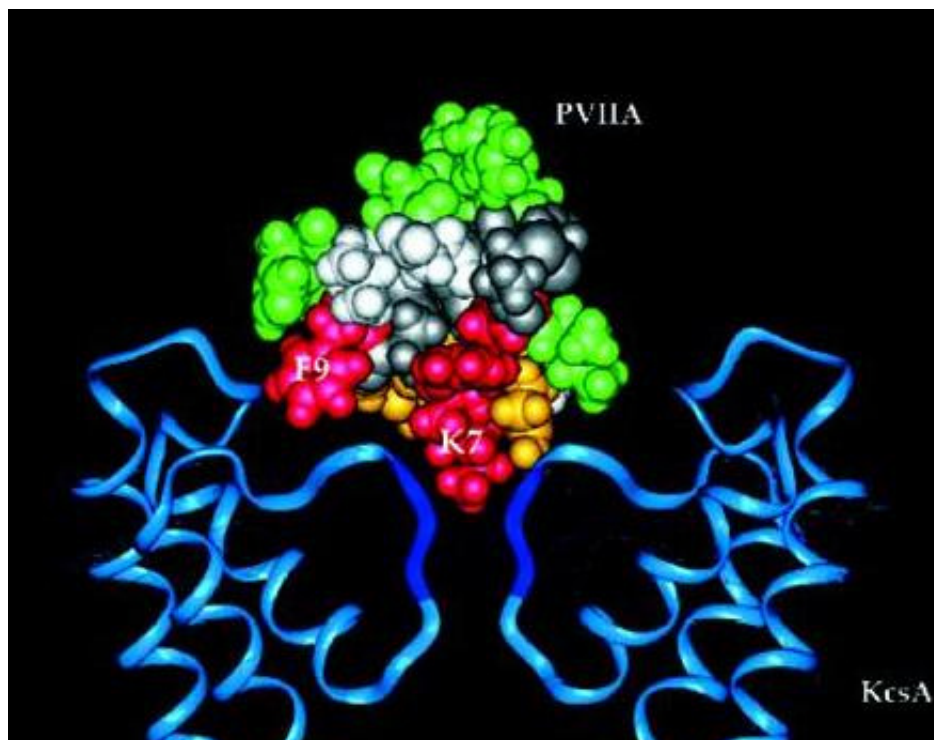


Figura 14. Modelo de la unión de la κ -PVIIA conotoxina al canal de tipo Shaker (KcsA). En este modelo se muestran en rojo los residuos involucrados en la tríada de aminoácidos, como los residuos de lisina 7 (K7) y fenilalanina 9 (F9) que facilitan la unión con este tipo de canales. Se cree que K7 ocluye al canal (en azul), mientras que la F9 forma interacciones hidrofóbicas con el canal *Shaker*. Los residuos de cisteínas se muestran en gris, y los residuos menos importantes para la unión en verde (Terlau y Olivera, 2004).

El bloqueo de la κ -PVIIA al canal Shaker depende de dos factores: el estado conformacional del canal y las fuerzas electrostáticas sobre la toxina. La κ -PVIIA es capaz de unirse únicamente al canal en el estado cerrado, la unión se afecta por la repulsión electrostática que ejercen los iones potasio en la cara extracelular del canal (Jacobsen *et al.*, 2000; Terlau *et al.*, 1996, 1999).

II.19 κ A-Conotoxinas

Son conotoxinas O-glicosiladas que pertenecen a la superfamilia A, el arreglo de los enlaces de disulfuro de estas toxinas es similar al que presentan las α A-conotoxinas (Tabla II).

La κ A-conotoxina SIVA (κ A-SIVA) fue aislado del veneno de *Conus striatus*. Bloquea los CIK de tipo *Shaker*. Al inyectarla en ratones ocasiona síntomas paralíticos sin embargo no se sabe cuál es el canal iónico que afecta en este organismo (Terlau y Olivera, 2003).

Esta toxina fue la primera evidencia de las O-glicosilaciones en conotoxinas pues tiene en la posición 7 una serina O-glicosilada (Terlau y Olivera, 2003).

II.20 κ M-Conotoxinas

Estas conotoxinas pertenecen a la superfamilia M. La primer conotoxina descrita fue la **κ M-conotoxina RIIIK (κ M-IIIIK)** aislada de *Conus radiatus*, es un péptido de 24 aminoácidos y aunque tiene un arreglo de cisteínas similar al de las μ y ψ -conotoxinas, la especificidad por sus blancos es distinta (**Figura 15**) (Terlau y Olivera, 2003). A diferencia de otras conotoxinas de tipo κ , la κ M-IIIIK no contiene la díada de aminoácidos importantes para la unión con sus blancos moleculares (Terlau y Olivera, 2003).

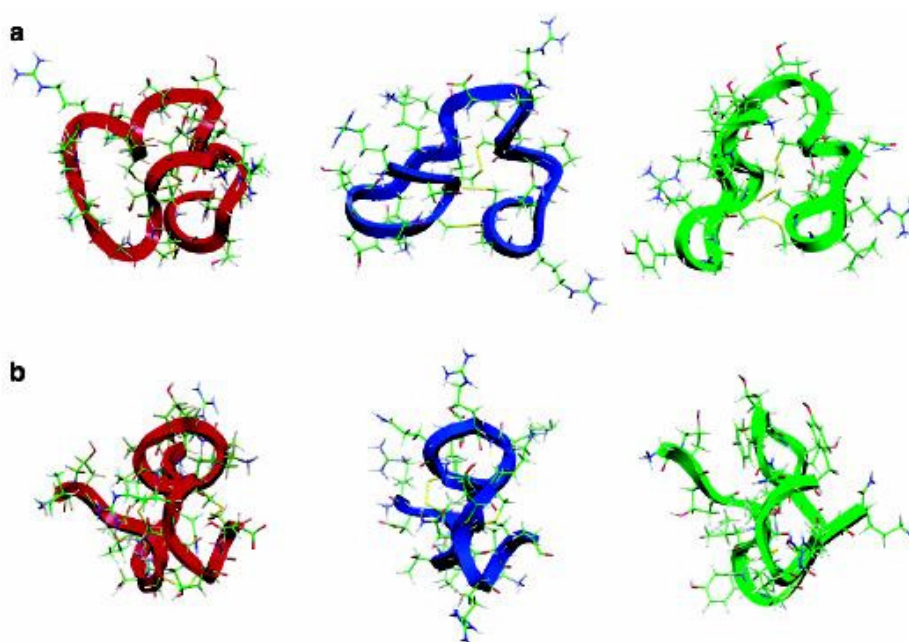


Figura 15. Comparación de la estructura secundaria de tres diferentes conotoxinas: κ M-IIIIK conotoxina (rojo), μ -GIIIA conotoxina (azul) y la ψ -PIIIF conotoxina (verde). Para los tres péptidos el amino terminal está del lado izquierdo y el carboxilo terminal está en el lado derecho de cada toxina. **(a)** La estructura de las tres toxinas es muy similar en el carboxilo terminal, mientras que en el amino terminal tienen diferencias más marcadas. **(b)** se muestran las toxinas vistas en un ángulo de 90° con el fin de resaltar las diferencias marcadas en el amino y las similitudes en el carboxilo terminal (Al-Sabi *et al.*, 2004).

La κ M-RIIK (**Figura 16**) es la primer conotoxina que bloquea un canal iónico en humanos: el canal Kv1.2, con una IC_{50} de 300 nM para el estado cerrado y 400 nM para el abierto, en rata también ocasiona los mismos efectos (Ferber *et al.*, 2004). Siendo entonces el canal Kv1.2 el primer blanco molecular en mamíferos que se describe para esta toxina (Ferber *et al.*, 2004). La κ M-RIIK también bloquea los canales de tipo *Shaker* con una IC_{50} de 1.21 μ M y el canal homólogo *TShal* de trucha con una IC_{50} de ~20 nM para el estado cerrado y ~60 nM para el estado abierto (Ferber *et al.*, 2003, 2004).

La κ M-RIIK interacciona con la parte extracelular del poro de los canales iónicos potasio de la familia Kv1, el bloqueo de esta conotoxina es electrostático, de estequiometría 1:1, la unión de la toxina depende del estado conformacional del canal (estado abierto o cerrado) (Ferber *et al.*, 2003; Terlau y Olivera, 2003).

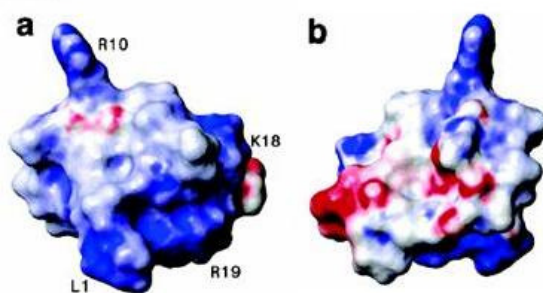


Figura 16. Potencial electrostático de los aminoácidos de superficie de la κ M-RIIK conotoxina. El color azul intenso corresponde a las áreas con carga positiva, mientras que las áreas rojas tienen potenciales negativos. Además se señalan algunos aminoácidos clave como la Leucina 1 (L1), Arginina 10(R10), Leucina 18(K18) y Arginina 19 (R19) (Al-Sabi *et al.*, 2004).

Se sabe que la κ M-RIIK tiene una mayor afinidad por los canales *TShal* y *Shaker* que la κ PVIIA (Ferber *et al.*, 2004). Sin embargo no presenta actividad en los CIK de tipo Kv1.1, Kv1.3, Kv1.4, Kv2.1, Kv3.4, Kv4.2, Kv10.1 (reag) y Kv11.1 (herg) (Ferber *et al.*, 2003).

Se piensa que esta conotoxina es parte del cabal denominado “lightning-strike cabal” y que ocasiona una despolarización masiva de los axones y una parálisis tetánica inmediata en los peces (Ferber *et al.*, 2003).

II.21 Conotoxinas de la Superfamilia I

La superfamilia I fue recientemente descrita a partir del aislamiento de cinco péptidos con actividad excitatoria del caracol *Conus radiatus*, lo que caracteriza a los miembros de esta superfamilia es el arreglo conservado de ocho residuos de cisteína: y cuatro enlaces de disulfuro (Jimenez *et al.*, 2003; Terlau y Olivera, 2003).

II.22 κ -conotoxina BtX

Esta conotoxina fue aislada del caracol vermívoro *Conus betulinus*, el péptido señal tiene aproximadamente 26 residuos de aminoácidos y la toxina madura consta de 31 aminoácidos y cuatro enlaces disulfuro. Se sabe que la **κ -conotoxina BtX (κ -BtX)** actúa como un modulador positivo específico de los canales de K^+ activados por Ca^{2+}

conocidos como canales Maxi K en células adrenales cromoafines de rata, la acción de la κ -BtX incrementa la probabilidad y el tiempo total de apertura de los canales Maxi K y se ha demostrado que esta actividad no afecta otro tipo de canales (Fan *et al.*, 2003).

II.23 Conotoxina ViTx

La **Conotoxina ViTx** fue aislada de *Conus virgo*, es una toxina de 35 aminoácidos que exhibe cuatro enlaces disulfuro. Aunque esta conotoxina presenta un único residuo de lisina en el carboxilo terminal no se conoce si contiene los aminoácidos que forman la díada funcional. Se sabe que la conotoxina ViTx inhibe específicamente los CIK de tipo Kv1.1 de rata (con una IC_{50} de 1.59 μ M) y Kv1.3 de humano (IC_{50} de 2.09 μ M), aunque la IC_{50} es bastante alta comparada con otras conotoxinas, sin embargo aún falta determinar si tiene otros blancos moleculares cuya unión sea mucho mejor (Kaufenstein *et al.*, 2003).

II.24 Electrofisiología y Ovocitos de *Xenopus laevis*

En 1971 se demostró que los ovocitos de las ranas africanas de la especie *Xenopus laevis* eran capaces de sintetizar hemoglobina después de inyectarles ARNm correspondiente a esta proteína (Wagner *et al.*, 2000).

Los ovocitos son fáciles de mantener, y por su diámetro de 1 a 1.5 mm los hacen fáciles de manejar (**Figura 17**)

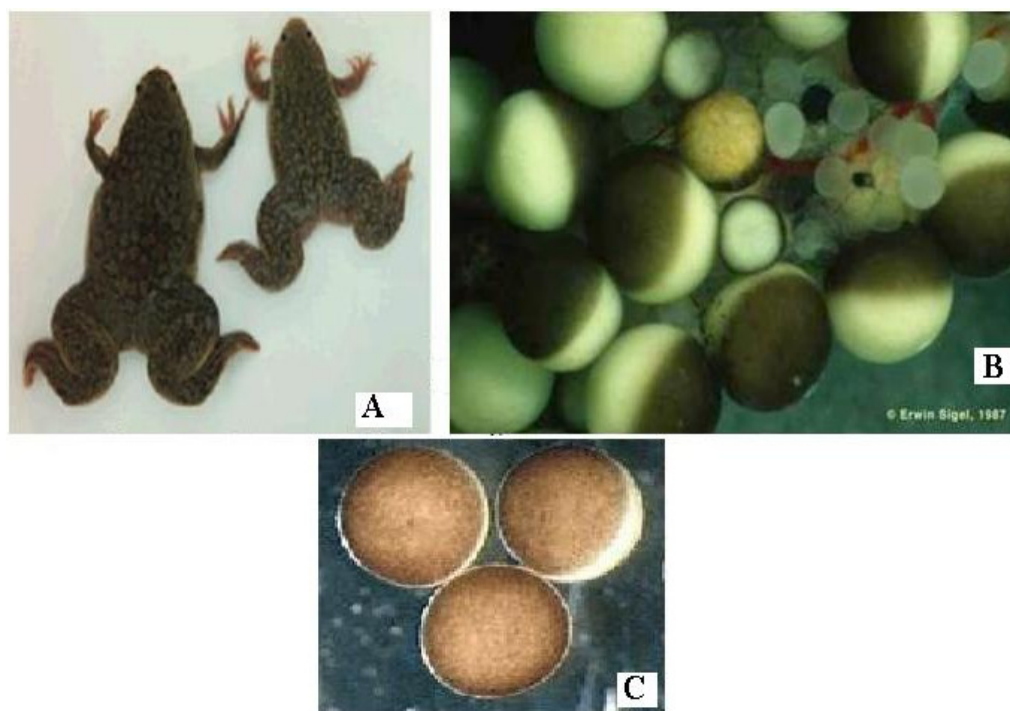


Figura 17. Ranas de la especie *Xenopus laevis* y ovocitos en diferentes estadios. Se presentan algunos ejemplares de las ranas africanas *Xenopus laevis* (A), y un ejemplo de los diferentes estadios en los que se encuentran los ovocitos en el lóbulo ovárico, en (C) se muestran tres ovocitos de los estadios V-VI, que son lo que se utilizan para los ensayos electrofisiológicos (Bigel, Edwin 1987).

Además como normalmente son depositados en ambientes poco favorables, son muy resistentes y están equipados con todos los sustratos que necesitan para su crecimiento y para la síntesis de proteínas, debido a esta independencia éstas células expresan sólo un pequeño número de sistemas de transporte endógeno lo que hace que el ruido de fondo de las proteínas con respecto a las proteínas expresadas de forma heteróloga sea pequeño, en la (**Figura 18**), se muestra un esquema general de

la expresión heteróloga de proteínas en ovocitos de *Xenopus laevis* (Wagner *et al.*, 2000).

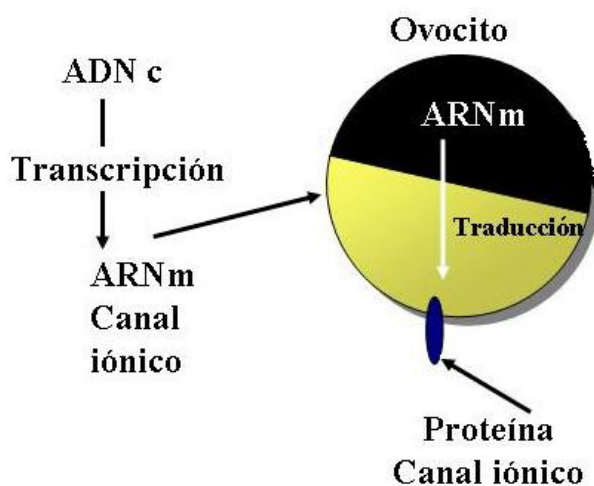


Figura 18. Esquema general de los pasos a seguir en la expresión heteróloga de proteínas en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Los ovocitos se diferencian en seis etapas, I a VI, los ovocitos de las etapas V y VI, varían muy poco en el tamaño y apariencia, y son las que se utilizan para los ensayos electrofisiológicos (Wagner *et al.*, 2000). Para utilizar estas células en electrofisiología es necesario hacer un tratamiento con colagenasa para remover la membrana folicular, los ovocitos se mantienen en medios especiales con gentamicina para prevenir las contaminaciones con algunas bacterias (Wagner *et al.*, 2000). El ARNc se sintetiza a partir de un plásmido que contiene el promotor fuerte de un bacteriófago en frente del inserto de ADNc (Wagner *et al.*, 2000). Para una buena eficiencia en la traducción de proteínas una inyección de 1 a 5 ng de ARNc es suficiente para una elevada expresión, de cualquier forma algunas proteínas requieren de la inyección de 50 ng de ARNc por ovocito (Wagner *et al.*, 2000).

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo General

Analizar electrofisiológicamente el veneno del caracol marino *Conus californicus* en canales iónicos de potasio expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

III.2 Objetivos Específicos

1. Fraccionar el extracto total del veneno de *C. californicus* mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (HPLC-RP).
2. Implementar el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* de los canales iónicos de K⁺ Shaker IR y Hslo.
3. Probar las fracciones del veneno de *C. californicus* en los canales de K⁺ expresados en ovocitos mediante la técnica de Fijación del Voltaje por Dos Electroodos.
4. Secuenciar las fracciones con actividad.
5. Obtener una biblioteca de ADNc de las conotoxinas presentes en el veneno total del caracol marino *Conus californicus*.
6. Secuenciar las clonas obtenidas de la biblioteca de ADNc de las conotoxinas de *C. californicus* y comparar las secuencias con las de las fracciones con actividad.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Obtención de los especímenes

Los caracoles de la especie *Conus californicus* se recolectaron en la zona en la región intermareal de la zona costera colateral al Km. 58 de la carretera Tijuana-Ensenada, Baja California, México. La fecha de las recolectas se determinó consultando un calendario de mareas. Los caracoles se recolectaron en base a la morfología y color de la concha, la cual está plenamente caracterizada para esta especie local, cada colecta variaba en el número de organismos, pero como mínimo se requerían de 40 caracoles. Los organismos fueron transportados al CICESE en un contenedor con agua de mar a temperatura ambiente, para su inmediata disección.

IV.2 Obtención del Veneno de *Conus californicus*

La obtención del veneno se realizó mediante una disección de los organismos, rompiendo la concha, aislando el aparato venenoso y extrayendo el ducto venenoso. Éste se maceró con un homogenizador manual de vidrio (Wheaton) con 2 mL de ácido trifluoroacético al 0.12% (Solución A, **Anexo 1**). La muestra se centrifugó a 10,000 xg por 5 min., dos veces, recolectando el sobrenadante que fue posteriormente congelado a -70°C para liofilizarlo.

El extracto total del veneno liofilizado se resuspendió en 1 mL de H₂O destilada y esterilizada, se centrifugó a 10,000 x g por 10 min., se recuperó el sobrenadante y se cuantificaron 100 µL de éste midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 280 y 230 nm, en un espectrofotómetro (SmatSpec, Biorad). Se calculó la cantidad de proteína total con la siguiente conversión: 1 Unidad de DO_{280nm}= 1mg/mL de proteína.

IV.3 Fraccionamiento del Extracto Total del Veneno de *C. californicus* por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (HPLC-RP)

El veneno de *C. californicus* se fraccionó de acuerdo al tiempo de retención de sus componentes mediante HPLC-RP en un cromatógrafo Agilent 110 (Agilent Technologies). Se utilizó una columna analítica Vydac C₁₈ (Grace-Vydac 218TP54, 4.6 x 250mm, 300 Å) con una pre-columna Zorbax C₁₈ (Zorbax-Agilent Technology, 4.6 x 12.5mm, 5µm), ambas fueron equilibradas con solución A : ácido trifluoroacético al 0.12% (**Anexo 1**).

Después de calibrar las columnas, se inyectaron 200 µL del extracto total del veneno de *C. californicus* previamente cuantificado por espectrofotometría. Inicialmente la muestra se lavó por 5 min., con 100% de solución A. La muestra se eluyó a temperatura ambiente por 60 min., con un gradiente lineal de 0 a 60% de solución B (**Anexo 1**):TFA al 0.12% y acetonitrilo al 99.88%, con un incremento lineal de solución B de 1% por minuto y una velocidad en el flujo de colecta de 1 mL/min. La

detección de los péptidos se realizó por absorbancia en la radiación de UV a una longitud de onda de 230 nm. Todas las corridas en el HPLC se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Las fracciones se colectaron según su tiempo de retención y se almacenaron a -70°C para su posterior liofilización (usando una liofilizadora Lyph-Lock 6, Labconco) a -40°C con 33×10^{-3} mbar por 24 hrs.

IV.4 Expresión Heteróloga en Ovocitos de *Xenopus laevis* de los Canales Iónicos de Potasio

Se utilizaron diferentes plásmidos que contienen el DNA de los canales iónicos de K⁺. Para el caso del canal ShakerIR (sin esfera de inactivación) se utilizó el plásmido pcDNA3ShIR y para el canal Hslo se empleó el plásmido pcDNA3-Hslo M3N1 (ambos donados por la Dra. Ligia Toro, UCLA). Se electroporaron bacterias de la cepa XL1-Blue, con los plásmidos de interés y posteriormente se purificaron con el Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAgen Cat. 27104). El ADN plasmídico de los canales se linearizó con diferentes enzimas de restricción, para el caso del canal Shaker se cortaron 3 µg de ADN plasmídico con 3U de la enzima EcoRI (New England Biolabs), mientras que el canal Hslo se digirió con 3U de la enzima NotI (New England Biolabs), ambas reacciones se precipitaron con 1/10 de acetato de sodio 5M, 1/20 EDTA 0.5M y 2 volúmenes de etanol absoluto. El ADN linearizado se utilizó

para realizar una transcripción *in vitro* utilizando el Kit mMessage mMachine con ARN Polimerasa T7 (Cat. 1344 Ambion Company).

El ARNm obtenido se cuantificó por absorbancia a una longitud de onda de 260/280 nm, se analizó cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez cuantificado, se inyectaron ~50 nL que contenían 20 ng del ARNm de los canales iónicos con un microinyector automático (Drummond) a ovocitos de *Xenopus laevis* previamente preparados para ensayos electrofisiológicos.

IV.5 Preparación de Ovocitos de *Xenopus laevis* para Ensayos Electrofisiológicos

Los ovocitos se obtuvieron mediante disección de ranas africanas de la especie *Xenopus laevis*. La rana se anestesió sumergiéndola en agua con hielo por 45 min., posteriormente, se le colocó en una cama de hielo y se le cubrió con el mismo a excepción del abdomen. Posteriormente se le realizó una incisión de ~1 cm en la parte baja del abdomen para extraer los lóbulos ováricos. Éstos fueron disgregados mecánicamente con pinzas de disección (Dumont #55, Fine Science Tools) hasta formar cúmulos de entre 4 a 6 ovocitos los cuales fueron depositados en una solución con medio ND-96 (**Anexo 1**), para seleccionar únicamente los ovocitos de la etapa IV-V.

Los ovocitos seleccionados se lavaron 4 a 6 veces en una solución con medio OR-2 libre de Ca^{2+} (**Anexo 1**) y posteriormente se incubaron en una solución de Colagenasa Tipo IV (1 mg/mL) de *Clostridium histolyticum* (Sigma C-5138) con medio OR-2 libre de Ca^{2+} en agitación continua por 45 min. Finalmente, los ovocitos se lavaron 4 veces con medio ND-96 y se mantuvieron a 17°C en medio ND-96 con Gentamicina (Genkova) a 50 µg/mL (concentración final) hasta su utilización, después de 2 a 24 horas post extracción.

Los ovocitos desfolículos se inyectaron con 20 ng del ARNm de los canales iónicos de K^{+} previamente obtenido. Los ovocitos inyectados fueron incubados en medio ND-96 con Gentamicina a una concentración final de 50 µg/mL, a 17°C por 1 ó 2 días. Posteriormente, a los ovocitos inyectados se les estimuló con un protocolo de pulsos mediante la técnica de Fijación de Voltaje por Dos Electrodo para determinar si el ARNm se expresó de forma correcta, los ovocitos se mantuvieron en una cámara de perfusión con 250 µL de medio ND-96, todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22-24°C).

IV.6 Caracterización de los Canales Iónicos de Potasio Shaker IR y Hslo

Para determinar si los canales iónicos se expresaban de manera correcta en la membrana de los ovocitos, se sometieron a cambios de voltaje conocidos como Protocolo de Pulsos, particulares para cada canal iónico.

Para el caso del canal de potasio de tipo **Shaker IR**, se utilizó el siguiente Protocolo de Pulsos:

Potencial de mantenimiento:	-60 mV
Primer potencial:	-20 mV
Último potencial:	80 mV
Variación de Potenciales:	-20 mV
Número de episodios:	8
Duración de la época A	2 ms
Duración de la época B	45 ms
Duración de la época C	2 ms
<i>Duración del tren de pulsos:</i>	<i>51.2 ms</i>

Para el canal de potasio **Hslo**, el Protocolo de Pulsos que se utilizó fue el siguiente:

Potencial de mantenimiento:	-60 mV
Primer potencial:	80 mV
Último potencial:	-60 mV
Variación de Potenciales:	-20 mV
Número de episodios:	8
Duración de la época A	2 ms
Duración de la época B	45 ms
Duración de la época C	2 ms
<i>Duración del tren de pulsos</i>	<i>51.2 ms</i>

Para confirmar la identidad de los canales iónicos, se utilizaron bloqueadores o activadores. Para caracterizar el canal Shaker IR se utilizó el bloqueador de canales de potasio tetra etil amonio (TEA), los ovocitos que sobre expresaron el canal Shaker fueron sometidos al protocolo de pulsos mencionado y posteriormente se agregaron 60 μ M de TEA a la cámara de perfusión. El efecto se registró y se comparó con la corriente de los ovocitos sin el reactivo.

Para caracterizar el canal Hslo, se utilizaron dos fenamatos activadores selectivos para este canal: el ácido flufenámico y el ácido niflúmico, que presentan la característica adicional favorable de que ambos bloquean las corrientes de cloro endógenas mejorando así las corrientes producidas por el canal. Los ovocitos que sobre expresaron de manera adecuada los canales Hslo, fueron sometidos a un protocolo de pulsos descrito y posteriormente se agregaron a la cámara de perfusión 100 μ M de cualquiera de los activadores, el efecto se registró para compararlo con los registros de los ovocitos sin reactivo.

IV.7 Efecto de las Fracciones del Veneno de *C. californicus* en los Canales de Potasio Expresados en Ovocitos Mediante la Técnica de Fijación de Voltaje por Dos Electrodo

Los ensayos electrofisiológicos se realizaron después de 1 a 2 días de la inyección del ARNm, mediante la técnica de Fijación de Voltaje por Dos Electrodo con un equipo CA-1B High Performance Oocyte Clamp (Dagan Corporation). Los ovocitos se mantuvieron en una cámara de perfusión con 250 μ L de medio ND-96, todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22-24°C).

Para hacer el registro de las corrientes de los ovocitos, se utilizaron dos capilares de vidrio (VWR International, Cat. 53432-921). Los capilares de registro se llenaron con una solución conductora de KCl 3M y con un electrodo de plata clorurado,

solamente se utilizaron los capilares cuya resistencia fuera de 0.3 a 0.5 M Ω para el electrodo del voltaje y 0.8 a 1.2 M Ω para el electrodo de la corriente.

Para probar las fracciones liofilizadas del veneno total de *C. californicus* obtenidas por HPLC-RP, éstas fueron resuspendidas en H₂O destilada y desionizada de forma tal que se conocía la cantidad de proteína que existía en cada dilución, se agregaron concentraciones conocidas de las fracciones del veneno directamente a la cámara de perfusión. Las corrientes de los ovocitos con los canales iónicos sobre expresados fueron registradas antes, durante y después de agregar las fracciones del veneno del caracol. Después de agregar las fracciones del veneno, se perfundió el ovocito con al menos 3 mL de medio ND-96, para retirar algún rastro de la fracción.

Los ovocitos fueron sometidos a un potencial de mantenimiento de -60mV y a un Protocolo de Pulsos específico para cada canal. Las mediciones de la corriente se realizaron a 2 KHz y se registraron utilizando un amplificador tipo CA-1B High Performance Oocyte Clamp (Dagan Corporation) y almacenados en computadora para analizarlos con los programas pCLAMP versión 6.0.3 (Axon Instruments), Microsoft Excel versión 2000 y Analysis Beta 2.

Primeramente se probaron las fracciones del veneno obtenidas por HPLC-RP y recolectadas cada 30 min., de éstas las que resultaron positivas fueron probadas en tiempos de colecta cada vez menores, es decir, se probaron las fracciones colectadas cada 15 min., cada 5 min., y finalmente cada minuto, para conocer de forma precisa

qué fracción tenía actividad sobre los canales iónicos. Las fracciones con actividad fueron enviadas al Instituto de Neurobiología (UNAM), para conocer la secuencia de aminoácidos de la fracción de interés.

IV.8 Obtención de una Biblioteca de ADNc de Conotoxinas del Veneno Total de *Conus californicus*

Debido a la falta de reportes que documenten cuáles son las conotoxinas presentes en el veneno de *Conus californicus*, se decidió generar una biblioteca de ADNc que nos permitirá conocer la secuencia de nucleótidos y aminoácidos que componen a cada una de las conotoxinas y considerar su posible expresión en un sistema heterólogo para obtener de manera ilimitada las toxinas recombinantes y evaluarlas en diferentes ensayos de bioactividad.

Para generar la biblioteca de ADNc de las conotoxinas presentes en el veneno de *Conus californicus*, se recolectaron en Abril del 2004, 10 organismos de esta especie. Para aislar ARN total se extrajeron los ductos venenosos, éstos se lavaron con agua tratada con Dietil-Pirocarbonato (H_2O -DEPC) al 0.1% y se maceraron en 2 mL de TRI-Reagent (Sigma Cat. T9424) con un homogenizador manual de vidrio (Wheaton). La muestra se incubó a temperatura ambiente por 5 min., posteriormente se mezcló con 200 μ L de Bromo-Cloro-Propano (Sigma, Cat. B9673) y se incubó por 15 min., a temperatura ambiente. Para separar las fases acuosa y orgánica, la muestra

se centrifugó a 12,000 xg por 15 min., a 4°C, una vez centrifugada, la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio para precipitarla con isopropanol. El precipitado se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 7,500 xg por 5 min., a 4°C, se descartó el etanol y el precipitado que contenía el ARN total se dejó secar. Posteriormente se solubilizó con 100 µL de H₂O-DEPC y se realizaron alícuotas del ARN total que se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Para sintetizar el ADNc, se utilizaron 500 ng del ARN total obtenido y se realizó una reacción de transcripción reversa (RT-PCR) con el kit SuperScript One Step RT-PCR with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Cat. 10928-034) utilizando oligonucleótidos específicos.

Para generar la biblioteca de ADNc, el producto de amplificación de la reacción de RT-PCR se clonó en el vector pBR322, la reacción se electroporó a células TOP-F'10 electrocompetentes, y se sembraron en medio SB con ampicilina (**Anexo 1**), se incubaron a 37°C por 12 hrs. La caracterización de la biblioteca se realizó por PCR de colonia, los productos de esta reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, y aquellos que resultaron positivos fueron secuenciados.

Las secuencias de la biblioteca de ADNc de las conotoxinas de *C. californicus*, fueron analizadas con el programa Mac Vector 7.2.

V. RESULTADOS

V.1 Obtención y Disección de los Organismos

Los organismos con los que se trabajó en este proyecto fueron recolectados en diferentes meses: Julio, Agosto y Noviembre del año 2004.

Todos los organismos se sacrificaron para extraer el veneno total a partir de los ductos venenosos. Se obtuvieron 1.787 mg de proteína total de la primer recolecta, 2.917 mg de proteína total en la segunda y en la tercer recolecta se obtuvieron 2.568 mg de proteína total.

V.2 Fraccionamiento del Veneno Total del Caracol Marino *Conus californicus* mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (HPLC-RP)

El extracto total de veneno de las tres colectas fue fraccionado de manera independiente mediante HPLC-RP.

Cada muestra uno de los venenos totales se colectó de acuerdo a su tiempo de retención (**Figura 19**). Primero se colectaron dos fracciones, del minuto 5 al 30, y del minuto 30 al 65 (al conjunto de fracciones que se obtuvieron se le llamó “corrida”), por lo tanto está representó la primer corrida que contiene dos fracciones de 30 min., cada una de ellas.

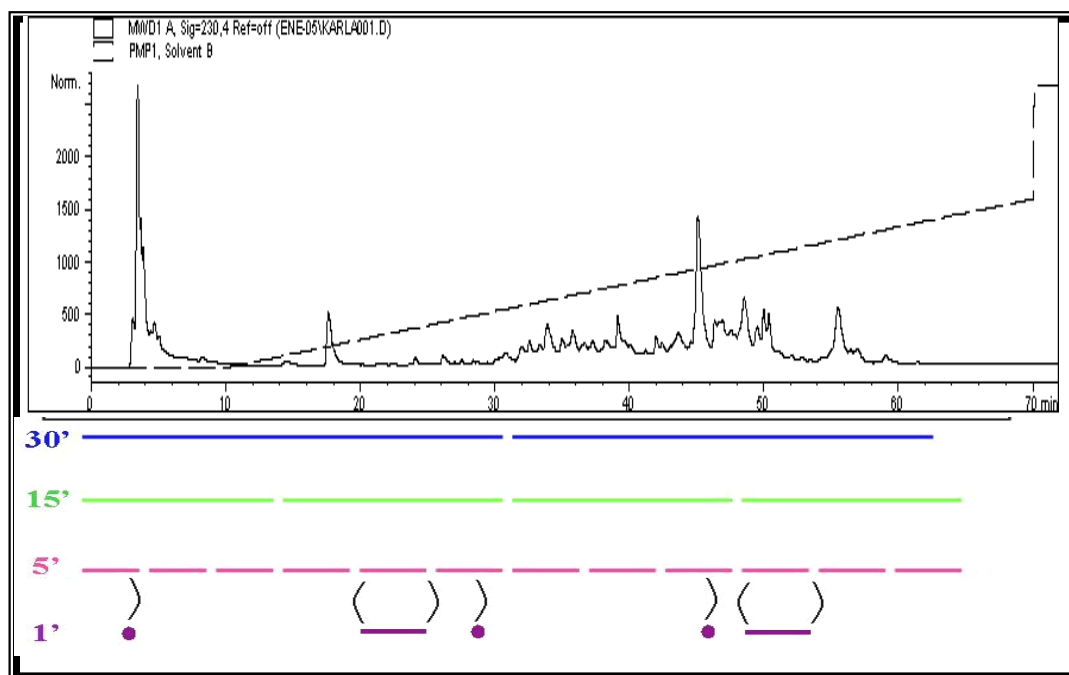


Figura 19. Fraccionamiento por HPLC-RP del extracto total del veneno de *Conus californicus*. Se muestra el cromatograma de las fracciones obtenidas de acuerdo a su tiempo de retención en relación con la absorbancia a 230 nm. En la parte inferior se observa la estrategia experimental para colectar las fracciones en las corridas de acuerdo a su tiempo de retención.

La segunda “corrida” se colectó cada 15 min., y por lo tanto contiene cuatro fracciones que van de los minutos 5-15, 15- 30, 30- 45 y 45- 60. La tercer corrida contiene las fracciones colectadas cada 5 min., de las cuales se obtuvieron 12 muestras y finalmente la última corrida fue de las fracciones colectadas cada minuto, en esta se obtuvieron alrededor de 60 muestras.

A continuación se presentan los cromatogramas de las fracciones del veneno total de *Conus californicus*, de organismos colectados en Julio (**Figura 20**) y Noviembre (**Figura 21**) del año 2004.

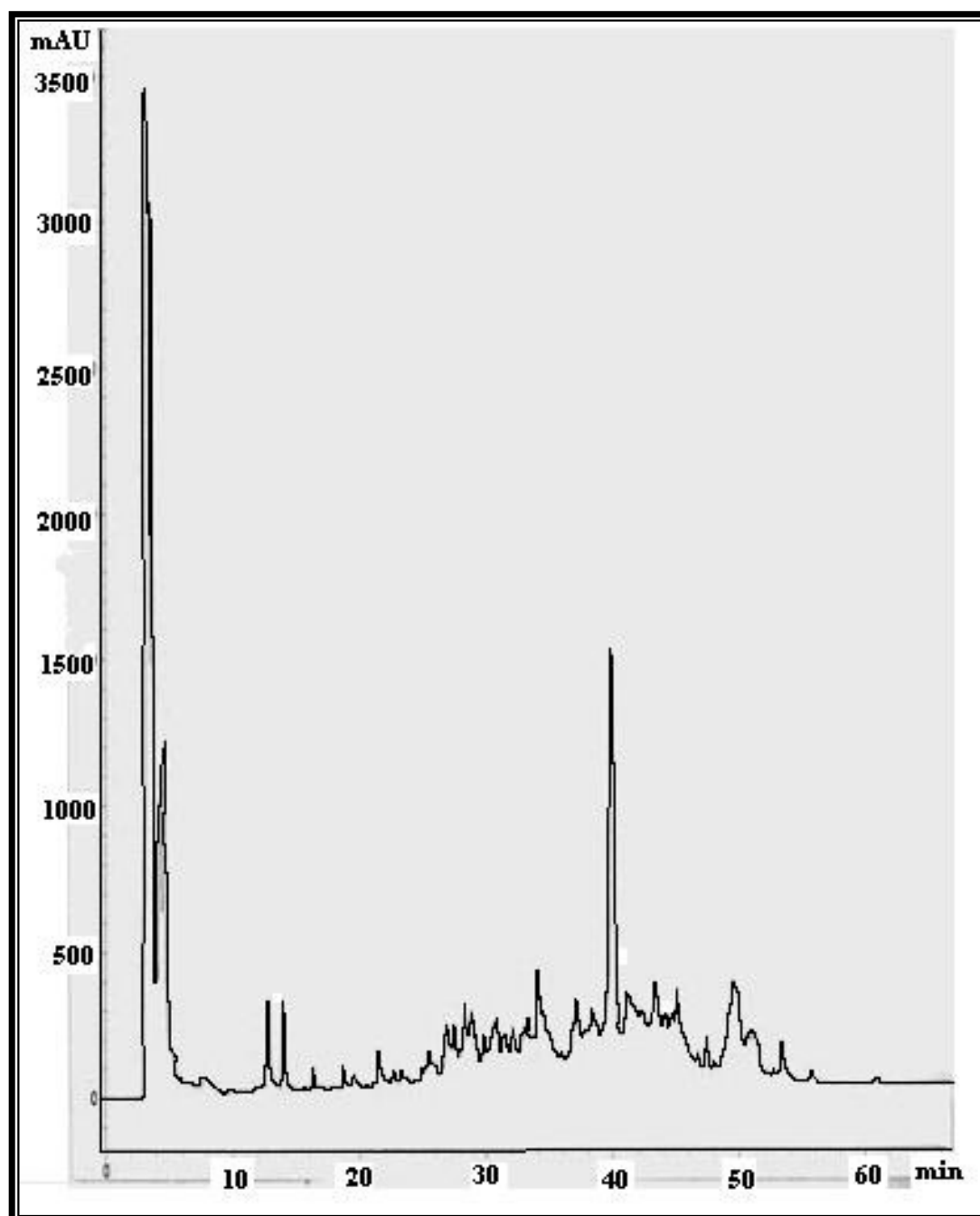


Figura 20. Cromatograma del fraccionamiento por HPLC-RP del veneno total de *Conus californicus* colectados en Julio de 2004. Los datos se presentan como la absorbancia obtenida a λ 230nm contra el tiempo de retención de las fracciones obtenidas.

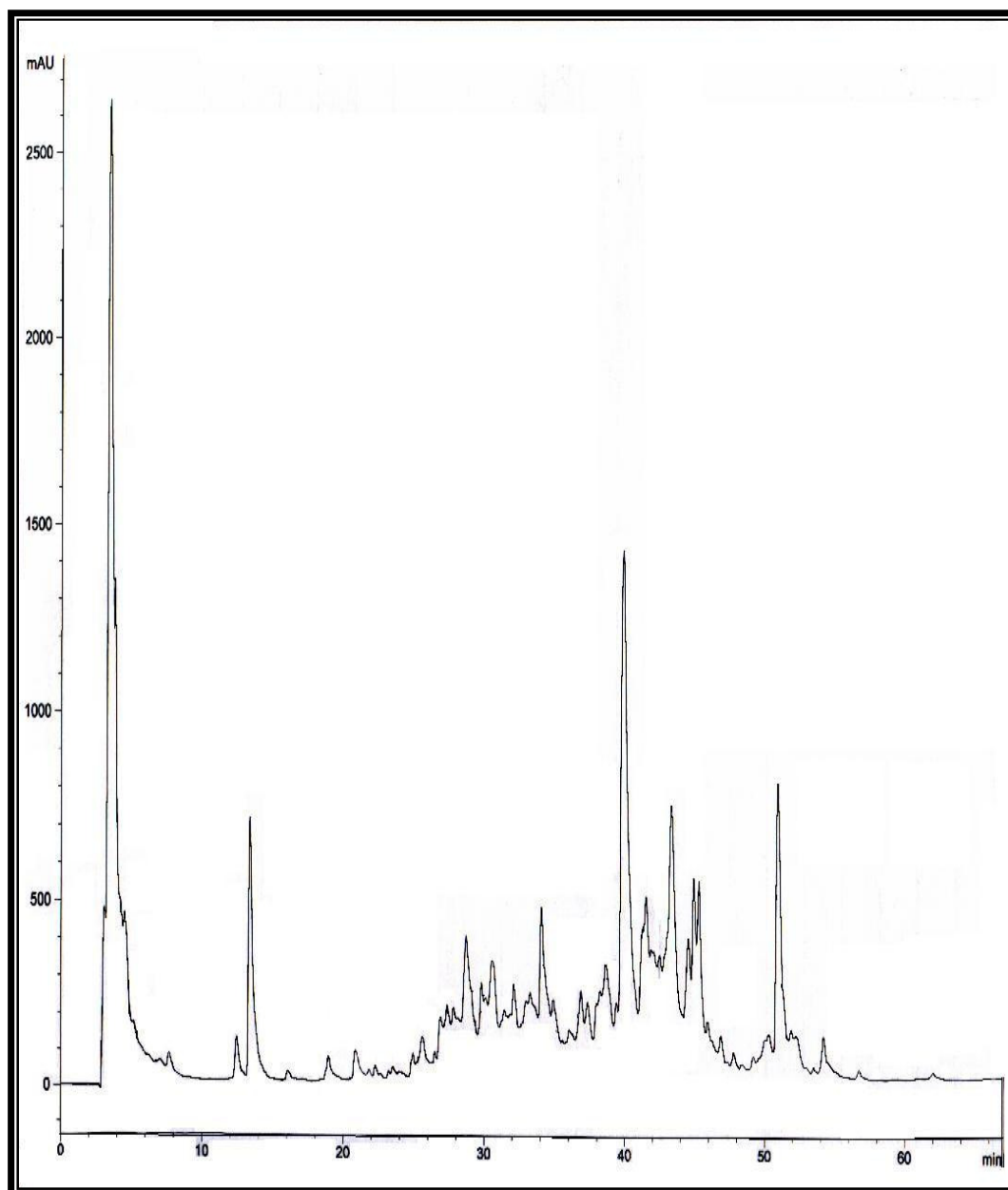


Figura 21. Cromatograma del fraccionamiento por HPLC-RP del veneno total de *Conus californicus* colectados en Noviembre de 2004. Los datos del cromatograma se presentan como la absorbancia obtenida a λ 230nm contra el tiempo de retención (en minutos) de las fracciones obtenidas.

V.3 Transcripción *in Vitro* de los Canales Iónicos Shaker y Hslo

Para obtener el ARNm de los canales iónicos Shaker y Hslo, es necesario realizar una transcripción *in vitro*. Para lograrlo, se linearizaron los plásmidos que contienen la secuencia de los canales iónicos Shaker IR y Hslo, con las enzimas EcoRI y NotI respectivamente. El producto de la reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se determinó cualitativamente si la reacción de linearización fue completa (**Figura 22**).

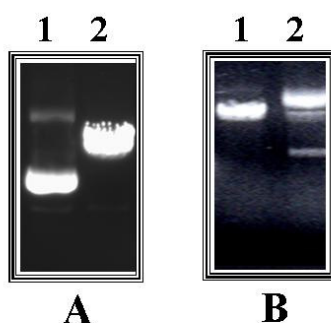


Figura 22. Productos de la reacción de linearización enzimática de los plásmidos pcDNASHIR y pcDNAHslo M3N1. (A) Linearización del plásmido que contiene la secuencia del canal Shaker **carril 1**. Plásmido pcDNAHslo M3N1 **carril 2** Plásmido linearizado con 3U de EcoRI. (B) Linearización del vector que contiene la secuencia del canal Hslo, **carril 1** plásmido sin linearizar, **carril 2** Plásmido linearizado con 3U de NotI.

Al analizar los resultados obtenidos en la (**Figura 22**), se determinó que la reacción de linearización de ambos plásmidos era correcta y que el ADN plasmídico es útil para los pasos subsecuentes.

El plásmido linearizado fue utilizado para realizar la reacción de transcripción *in vitro* mediante T7 ARN polimerasa, a través de la cual se obtiene cARNm. Éste se cuantificó por espectrofotometría a 260nm obteniéndose una cantidad de 640 µg/mL

del ARNm para Shaker y 350 µg/mL de ARNm para Hslo, también se analizó cualitativamente mediante un gel de agarosa al 1% (**figura 23**), para corroborar que no existiera degradación del ARNm.

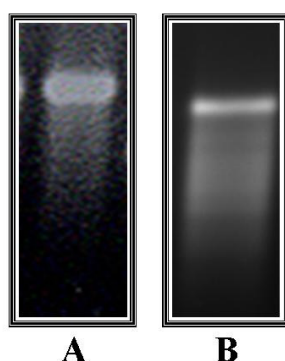


Figura 23. Productos de la reacción de transcripción *in vitro* con la T7 ARN Polimerasa de los plásmidos pcDNASHIR y pcDNAHslo M3N1. (A) ARNm del canal Shaker (B) ARNm del canal Hslo.

A través de estos análisis se determinó que la calidad y cantidad del ARNm de ambos canales era adecuada para ser utilizado en los pasos subsecuentes.

V.4 Expresión Heteróloga en Ovocitos de *Xenopus laevis* de los Canales Iónicos de Potasio

Los ovocitos que se utilizaron para la expresión heteróloga de los canales iónicos fueron tratados previamente con colagenasa, después de 24 hrs post tratamiento fueron inyectados con ARNm de los canales iónicos. Las inyecciones del ARNm se hicieron de forma aislada, en células individuales, se inyectaron 50 nL con ~20 ng de ARNm a cada célula, después de la inyección los ovocitos se mantuvieron a 17 °C hasta obtener registros de las corrientes de los canales estimulando las células

mediante un Protocolo de Pulsos específico para cada canal como se mencionó en los procedimientos experimentales.

V.4.1 Controles de Expresión del Canal Iónico de Potasio de Tipo Shaker IR

Para determinar si la expresión del canal de potasio de tipo Shaker fue adecuada, se compararon las corrientes registradas de los ovocitos inyectados con el ARNm del canal Shaker con las corrientes de los ovocitos nativos. En la (**Figura 24**) se muestran los registros de un ovocito nativo estimulado con el protocolo de pulsos específico para este canal (**A**), y en la (**B**) se muestran los registros de la corriente de los ovocitos inyectados con ARNm del canal Shaker.

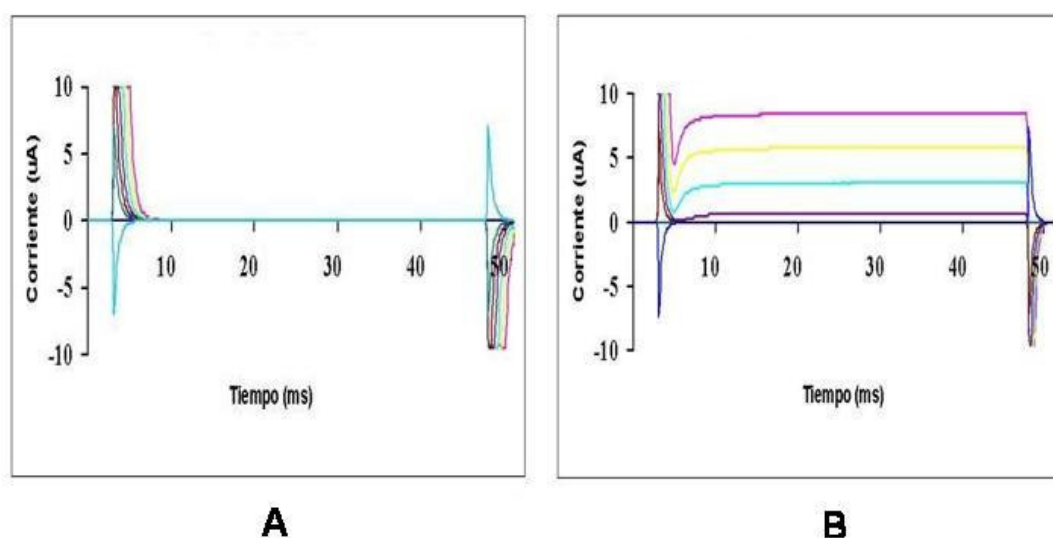


Figura 24. Caracterización de la Expresión del Canal de Potasio de Tipo Shaker IR. Registros de ovocitos nativos estimulados con el protocolo de pulsos para el canal Shaker IR (**A**) y los registros de las corrientes generadas por ovocitos inyectados con el ARNm del canal Shaker IR (**B**). Los ovocitos se mantuvieron a un potencial de mantenimiento de -60mV, con potenciales de -20 a -80 mV, con disminuciones de -20mV, el tiempo total del registro fue de 51.2 ms. Los registros se grafican como la corriente obtenida en μ A contra el tiempo total del protocolo de pulsos.

Comparando los registros de las (**Figuras 24 A y B**), se observa que existe una diferencia marcada entre las corrientes de los ovocitos nativos y aquellos que fueron inyectados con el ARNm del canal Shaker IR, en donde las corrientes superan los 5 μ A. Esto indica que hubo una expresión adecuada del ARNm que fue inyectado a la célula, de tal forma que al estimular el canal iónico con un protocolo de pulsos específico éste se abrirá permitiendo evaluar la apertura como una corriente específica.

V.4.2 Caracterización de la Identidad del Canal Iónico de Potasio de Tipo Shaker IR

Una vez que se determinó que la expresión del ARNm del canal fue adecuada, se procedió a corroborar la identidad del canal Shaker IR mediante el uso de bloqueadores. En este caso se utilizó el Tetra Etil Amonio (TEA) como un bloqueador del canal de potasio Shaker (Choi *et al.*, 1991 y Crouzy *et al.*, 2001). Se evaluaron las corrientes generadas por un ovocito inyectado con ARNm del canal Shaker IR y las corrientes generadas por este mismo ovocito en presencia de 60mM de TEA, posteriormente se midieron las corrientes del ovocito al retirar el TEA mediante perfusión con medio de mantenimiento ND-96.

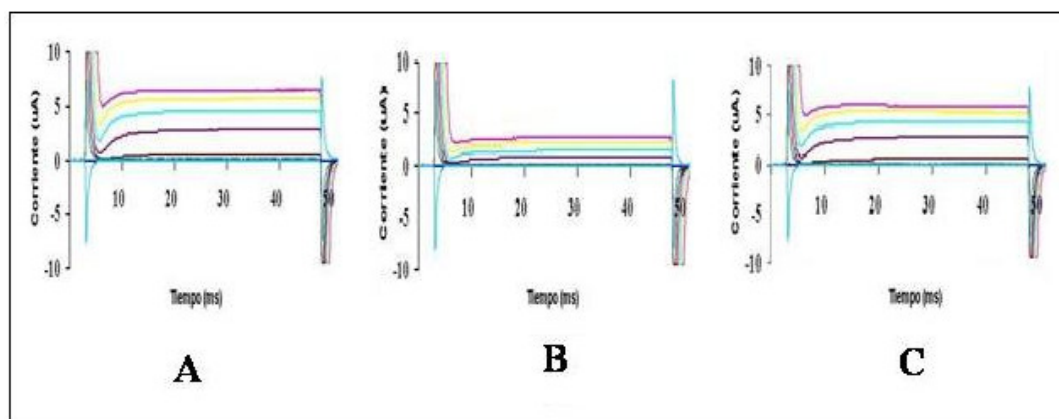


Figura 25. Caracterización de la Identidad del Canal de Potasio de Tipo Shaker IR Mediante el Bloqueador TEA. Se muestran los registros de las corrientes obtenidas de un ovocito inyectado con el ARNm del canal Shaker IR (A) y las corrientes de este mismo ovocito en presencia de 60mM de TEA (B). Después de registrar las corrientes en presencia del bloqueador, éste se retira mediante perfusión con medio de mantenimiento ND-96 (C). Los registros se grafican como la corriente obtenida en uA contra el tiempo total del protocolo de pulsos en milisegundos.

En la **Figura 25** se muestran las corrientes generadas por un ovocito inyectado con el ARNm del canal Shaker IR, al agregar 60 mM de TEA a la cámara de perfusión se observó que las corrientes del mismo ovocito disminuyeron significativamente por acción del bloqueador, al retirar el TEA, las corrientes volvieron a su estado inicial. Estos resultados indican que el canal que se está expresando en los ovocitos inyectados con ARNm es el canal iónico de potasio de tipo Shaker IR. Con ambos experimentos (**Figuras 24 y 25**) se determinó que la expresión e identidad del canal de potasio Shaker IR son correctas, por lo tanto se está trabajando con un canal funcional que permitirá valorar el efecto de las fracciones obtenidas por HPLC del extracto total del veneno de conus.

V.4.3 Controles de Expresión del Canal de Potasio Modulado por Calcio Hslo

Como se mencionó con anterioridad, los canales Maxi K tienen dos mecanismos de apertura dependientes del voltaje, pero el segundo mecanismo es modulado por la concentración de calcio intracelular. En concentraciones de calcio menores a 100 nM el canal se comporta como dependiente de voltaje, pero a concentraciones mayores de 100 nM la dependencia es modulada por la concentración de calcio ocasionando que el canal se abra a potenciales menores (Meera *et al.*, 1996; Stefani *et al.*; 1997; Toro *et al.*, 1998).

Por ello la caracterización de la expresión funcional del canal Hslo se realizó midiendo las corrientes generadas por un ovocito inyectado con el ARNm de Hslo en una serie de medios con concentraciones diferentes de calcio: sin calcio, 100 nM, 100 μ M y 100 mM de calcio.

Por otro lado fue necesario determinar que la acción mecánica de inyectar ARNm no afectaba a las células y por consiguiente se esperaba que las corrientes generadas por ovocitos nativos inyectados con agua fueran similares a las corrientes de ovocitos sin inyectar.

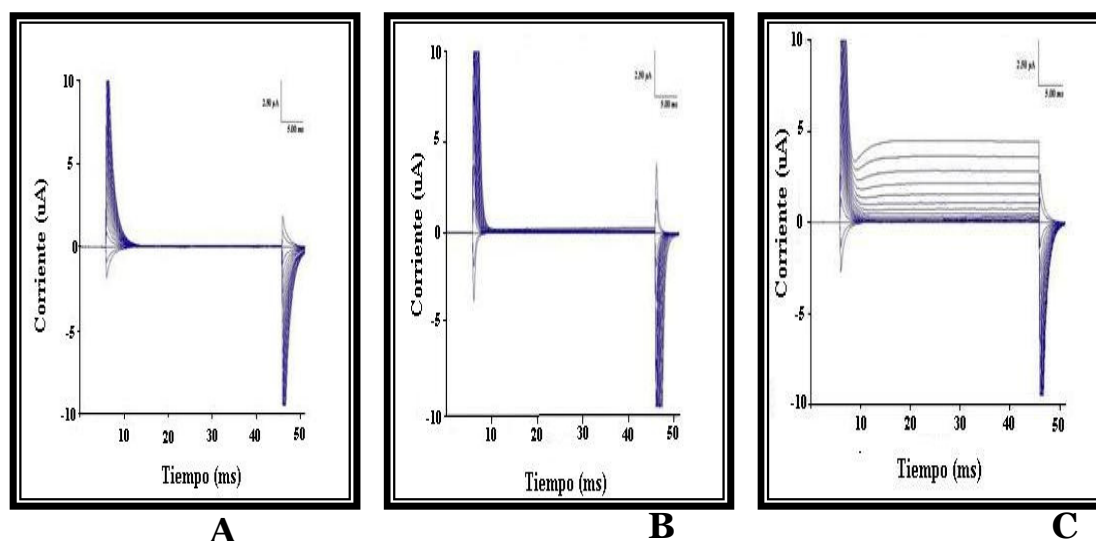


Figura 26. Efecto de la acción mecánica de la inyección con agua sobre diferentes ovocitos en medio ND-96 (100mM Calcio). Se muestran las gráficas de los registros de la corriente respecto al tiempo de (A) Ovocito nativo (B) Ovocito inyectado con agua y (C) Ovocito inyectado con ARNm de Hslo. Todos los ovocitos fueron sometidos a un protocolo de pulsos de 80mV a -60mV con decrementos de -20mV con un HP-60mV, la duración del protocolo fue de 51.2 ms en presencia de 100mM de Ca^{2+} en la cámara de perfusión.

En la **Figura 26** se muestran las corrientes generadas por diferentes ovocitos en medio ND-96 (100 mM Ca^{2+}), el primer registro (A) representa las corrientes generadas por un ovocito nativo, como se observa no existe ninguna corriente significativa pues la célula no se inyectó con ARNm de Hslo. En la figura (B) se observan las corrientes generadas por un ovocito nativo inyectado con agua, este control permitió determinar que la acción mecánica de inyectar ARNm no daña a la célula y por consiguiente las corrientes generadas son similares a las de un ovocito nativo (A). Los registros de las corrientes obtenidas de un ovocito inyectado con ARNm del canal Hslo se muestran en la figura (C) en donde éstas tienen un valor

superior a los 4 μ A y son claramente mayores a las corrientes de los controles de los ovocitos nativos (figuras A y B).

Los resultados de la (**Figura 27**) corresponden a la caracterización del canal Hslo con diferentes concentraciones de calcio en medio ND-96. Se sabe que este canal es dependiente de voltaje sólo en concentraciones de calcio menores a 100 nM, este comportamiento se observa claramente en las figuras **A**, **B** y **C**, en donde las corrientes generadas por el ovocito con Hslo son similares a pesar de la diferencia en la concentración de calcio en el medio (sin calcio para la figura **A**, con 100 nM (**B**) y 10 μ M (**C**) de calcio). Sin embargo, cuando la concentración de calcio en el medio incrementa a 100 mM (**D**), las corrientes registradas son mayores, debido a que la modulación por calcio permite que el canal se abra a potenciales menores.

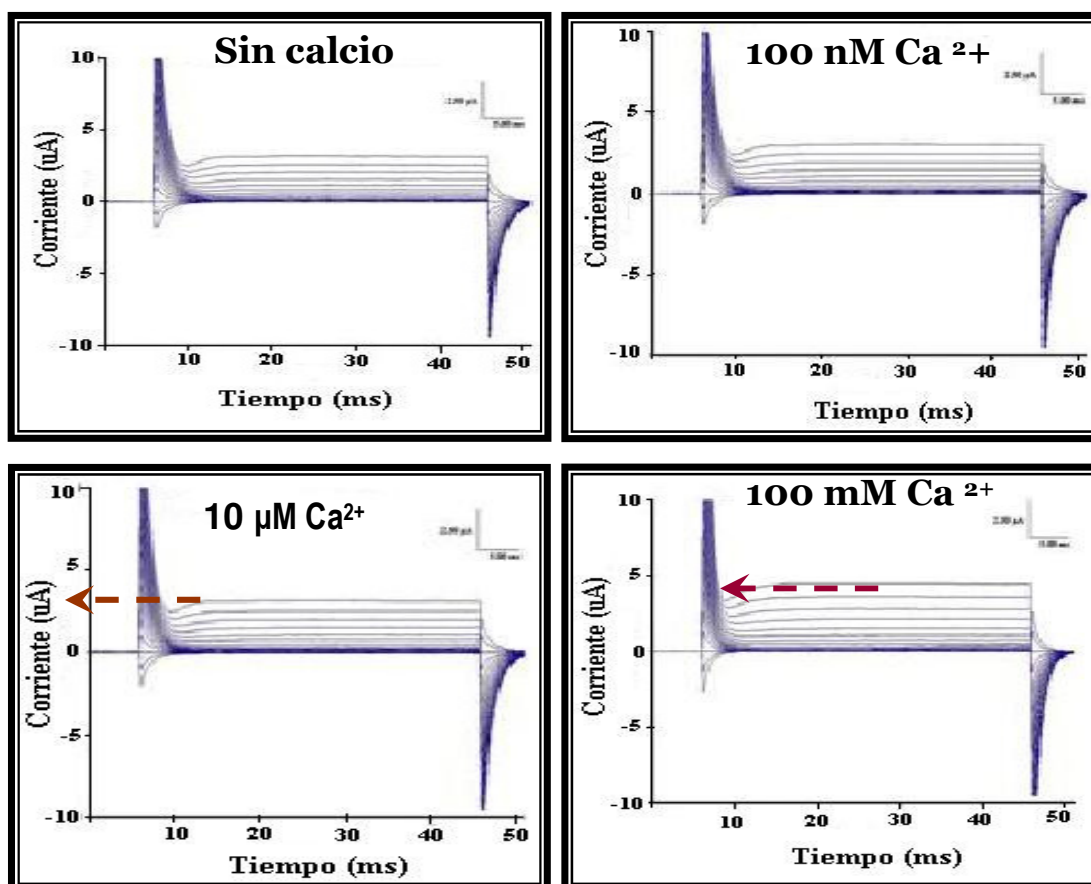


Figura 27. Caracterización de la Expresión del Canal Iónico Hslo Utilizando Diferentes Concentraciones de Calcio en el Medio. Se presentan los resultados de la caracterización de un mismo ovocito inyectado con ARNm del canal Hslo utilizando diferentes concentraciones de calcio en el medio. La gráfica de la figura (A), corresponde a las corrientes registradas de un ovocito inyectado con ARNm del canal Hslo en presencia de Medio ND-96 sin Calcio. La figura (B) muestra las corrientes del mismo ovocito en presencia de medio ND-96 con 100nM de Ca^{2+} , la figura (C) corresponde a los registros obtenidos de la misma célula en presencia de medio ND-96 con 10 μM de Ca^{2+} y finalmente en la figura (D) se presentan los datos que corresponde a las corrientes obtenidas en presencia de medio ND-96 con 100 mM de Ca^{2+} . Los ovocitos fueron sometidos a un protocolo de pulsos de 80mV a -60mV con decrementos de -20mV en un HP-60mV, la duración del protocolo fue de 51.2 ms. Las flechas rojas hacen más evidentes los cambios en la corriente.

Mediante los experimentos anteriores fue posible determinar que el canal Hslo se está expresando de una forma correcta, además fue posible verificar la modulación por calcio del canal cuando se somete a concentraciones nulas de calcio ó de 100 nM, 10 μM y 100 mM de éste catión en el medio.

V.4.4 Caracterización de la Identidad del Canal de Potasio Modulado por Calcio Hslo

Para corroborar la identidad del canal de potasio modulado por calcio Hslo, se utilizaron dos fenamatos: el ácido niflúmico y el ácido flufenámico, que son compuestos aromáticos antiinflamatorios no esteroideos. Se sabe que ambos ácidos activan a los canales de potasio de gran conductancia o canales Maxi K; y que inhiben la conductancia de cloro y de los canales no selectivos para estos cationes (Ottolia y Toro, 1994).

Para verificar que la actividad de los fenamatos no dañaba a los ovocitos, éstos fueron sometidos a un protocolo de pulsos para Hslo y posteriormente se agregaron 100 mM de ácido niflúmico a la cámara de perfusión que contenía medio ND-96 (100 mM de Ca^{2+}), se hicieron registros de las corrientes obtenidas de los ovocitos antes (A) y después de agregar el activador (B) (Figura 28).

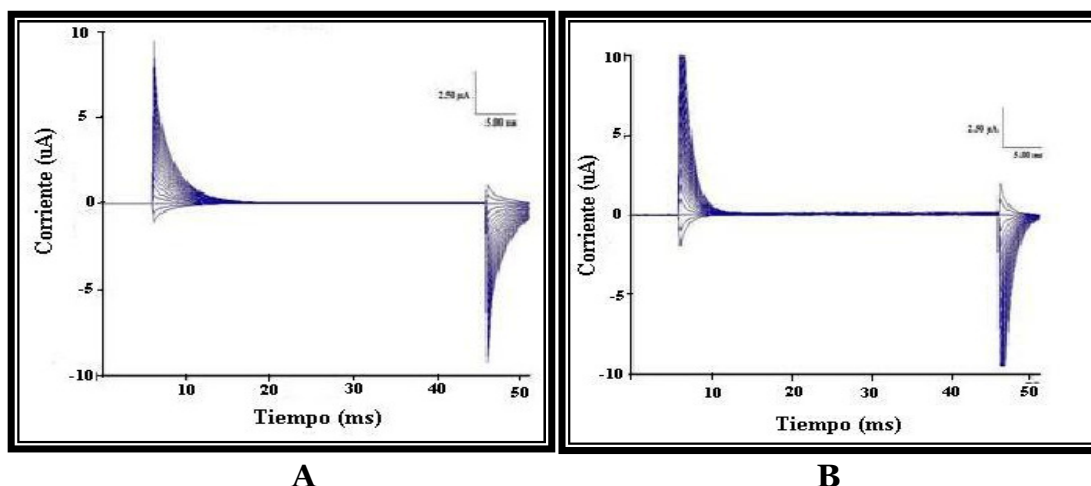


Figura 28. Efecto del Ácido Niflúmico en Ovocitos Nativos. Se muestran los registros obtenidos de ovocitos nativos sometidos a un HP-60 con potenciales de 80mV a -60mV por 51.2 ms en presencia de 100mM de Ca^{2+} en la cámara de perfusión. (A) Corrientes de un ovocito nativo. (B) Corrientes obtenidas del mismo ovocito en presencia 100mM de Ácido Niflúmico en la cámara de perfusión.

Los experimentos anteriores determinaron que los fenamatos no dañan a los ovocitos y por lo tanto no interfieren con las corrientes generadas por las células nativas, teniéndolo como referencia, se procedió a corroborar la identidad del canal Hslo mediante la acción de dos activadores.

Para corroborar la identidad del canal Hslo, se utilizaron dos fenamatos como activadores: el ácido niflúmico y el ácido flufenámico (**Figuras 29 y 30 respectivamente**). En ambos casos se registraron las corrientes generadas por un ovocito inyectado con el ARNm de Hslo y posteriormente se registraron las corrientes del mismo ovocito en presencia de 100 mM de cualquier activador.

En la (**Figura 29**) se representan las corrientes de un ovocito inyectado con ARNm de Hslo (**A**) y el efecto sobre esta misma célula al agregar 100 mM de ácido niflúmico (**B**), en este caso, se observa que las corrientes de los ovocitos incrementaron al agregar el ácido como consecuencia de la activación del canal Hslo.

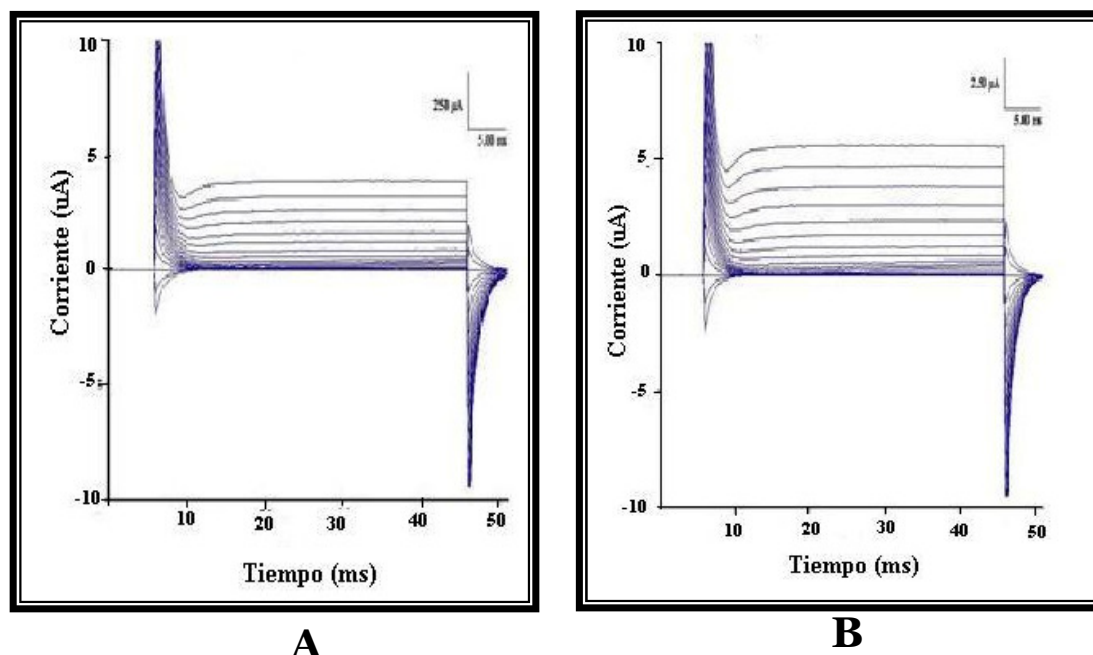


Figura 29. Caracterización del Efecto del Ácido Niflúmico en Ovocitos Inyectados con ARNm de Hslo. Se presentan las corrientes contra el tiempo total del protocolo de pulsos de (A) un ovocito inyectado con ARNm de Hslo y las corrientes generadas por esta misma célula al agregar 100mM de ácido niflúmico a la cámara de perfusión (B). Los ovocitos fueron sometidos a un HP-60 con un potencial inicial de 80mV hasta -60mV con decrementos de -20mV por 51.2 ms en presencia de 100mM de Ca^{2+} en la cámara de perfusión.

Para confirmar nuevamente la identidad del canal Hslo se evaluó el efecto de activación del canal por el ácido flufenámico, para ello se midieron las corrientes generadas por un ovocito inyectado con ARNm de Hslo (**Figura 30 A**) y posteriormente las corrientes generadas por esta misma célula en presencia de 100mM de ácido flufenámico (**Figura 30 B**).

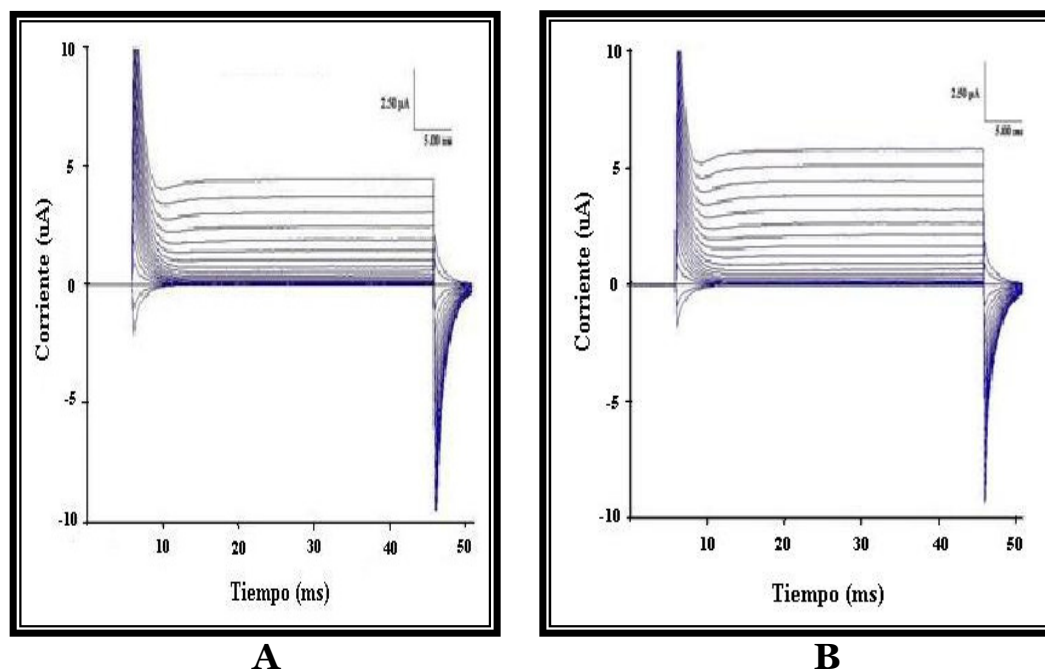


Figura 30. Caracterización del Efecto del Ácido Flufenámico en Ovocitos Inyectados con ARNm de Hslo. Se presentan las corrientes obtenidas de un ovocito inyectado con ARNm de Hslo (A) y las corrientes generadas por esta misma célula al agregar 100mM de ácido flufenámico a la cámara de perfusión (B). Los ovocitos fueron sometidos a un HP-60 con un potencial inicial de 80mV hasta -60mV con decrementos de -20mV por 51.2 ms en presencia de 100mM de Ca^{2+} en la cámara de perfusión; los datos se presentan como el tiempo total del protocolo de pulsos contra las corrientes registradas.

Tomando en consideración los experimentos anteriores fue posible determinar que el ARNm del canal se expresa de manera adecuada y la identidad corresponde a la de Hslo, por lo que se procedió a evaluar el efecto de las fracciones del veneno total de conus obtenidas por HPLC.

V.5 Efecto de las Fracciones del Veneno de *Conus californicus* en el Canal de Potasio de Tipo Shaker IR Utilizando la Técnica de Fijación del Voltaje por Dos Electrodo.

Para evaluar el efecto de las fracciones obtenidas por HPLC del veneno total de *C. californicus*, se requería conocer la concentración total de cada una de las fracciones que se iban a probar, por eso fue necesario estimar teóricamente el peso molecular promedio de las conotoxinas que afectan los canales iónicos de potasio, tomando en consideración las referencias existentes (Jacobsen *et al.*, 2000; McIntosh *et al.*, 1999; Terlau *et al.*, 1996) se determinó que las κ -conotoxinas tienen en promedio 29 residuos de aminoácidos y su peso aproximado es de 3190 g/mol.

Una vez realizados los cálculos pertinentes, las fracciones del veneno se solubilizaron en agua destilada, de tal forma que se conocía la concentración que existía en cada dilución. Posteriormente se registraron las corrientes de los ovocitos con el canal Shaker IR antes, durante y después de agregar las fracciones del veneno directamente a la cámara de perfusión. Los ovocitos se perfundieron con al menos 3 mL de medio ND-96, para retirar algún rastro de las fracciones y determinar si la corriente inicial se recuperaba después de la perfusión.

V.5.1 Efecto de las fracciones del veneno colectadas cada 30 minutos

Tomando en cuenta la estrategia experimental se prosiguió a probar el efecto de las fracciones del veneno total de *Comus californicus* en los canales de potasio Shaker

IR. Para ello se evaluaron inicialmente las dos fracciones más grandes colectadas cada 30 minutos de dos diferentes venenos obtenidos de organismos colectados en el mes de Julio (**Figura 31**) y en Noviembre (**Figura 32**).

En la (**figura 31 A**), se graficaron los datos de la corriente respecto al tiempo al agregar 10 μL (25 μM) de la fracción que contiene los minutos 0 al 30, como se observa la fracción no disminuye la corriente del canal Shaker IR, por lo que se consideró que no tiene ninguna actividad bloqueadora.

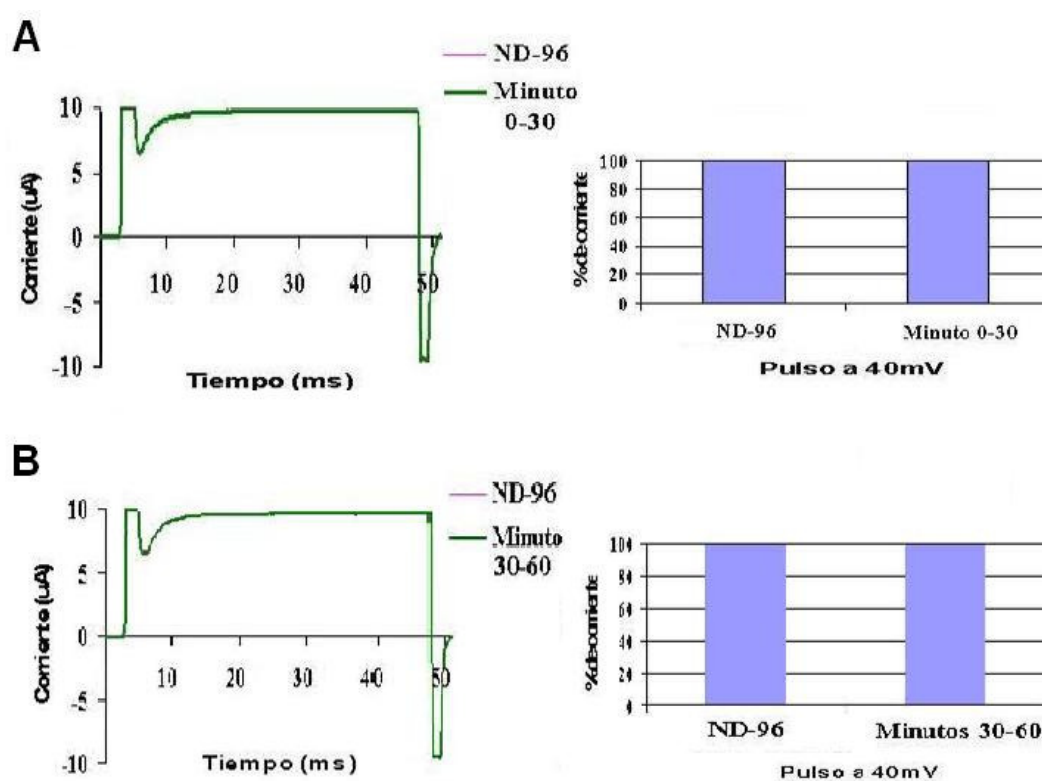


Figura 31. Efecto del veneno de Julio de 2004 sobre el canal Shaker IR. Se muestran los datos de la corriente respecto al tiempo y el porcentaje de disminución de la corriente en (A) Al agregar 10 μL (25 μM) de la fracción de los minutos 0 al 30 del veneno de Julio de 2004. (B) Al agregar 10 μL (25 μM) de la fracción de los minutos 30 a 60 del veneno.

Por otro lado, al evaluar el efecto de la fracción de los minutos 30 a 60 (**Figura 31 B**), se encontró que no presentaba ninguna actividad bloqueadora sobre el canal Shaker IR al agregar 10 μ L (25 μ M) de la fracción a la cámara de perfusión. Por lo tanto el porcentaje de la corriente inicial respecto de la lectura final es prácticamente el mismo.

En la (**Figura 32**) se presentan dos tipos de gráficas que muestran las corrientes registradas de los ovocitos con el canal Shaker IR y el porcentaje de la corriente en un potencial de 40mV antes, durante y después de agregar la fracción del veneno de organismos colectados en Noviembre del 2004. Como se observa en la (**Figura 32**) (**A**), al agregar 10 μ L (25uM) de la fracción que contiene los minutos 0 al 30 tiene un efecto de bloqueo del canal bastante notorio, pues disminuye la corriente en un 92.7%, después de retirar la fracción mediante perfusión, la corriente inicial se recupera en un 64%. Por otro lado, la fracción que contiene los minutos 30 al 60 (**B**), también presenta actividad bloqueadora en una concentración de 25 μ M, pues disminuye la corriente del canal en un 39%. Estos resultados indican que ambas fracciones presentan una actividad que disminuye las corrientes del canal Shaker IR, por lo que se procedió a evaluar las fracciones colectadas cada 15 minutos con la finalidad de delimitar los minutos con actividad bloqueadora.

Con los resultados anteriores, se puede afirmar que en el caso de las fracciones de 30 minutos del veneno total de organismos colectados en Julio del 2004, ninguna presentó actividad bloqueadora para el canal Shaker IR. Sin embargo las corridas de

los venenos obtenidos de organismos colectados en Agosto y Noviembre del 2004, sí bloquearon las corrientes del canal Shaker IR.

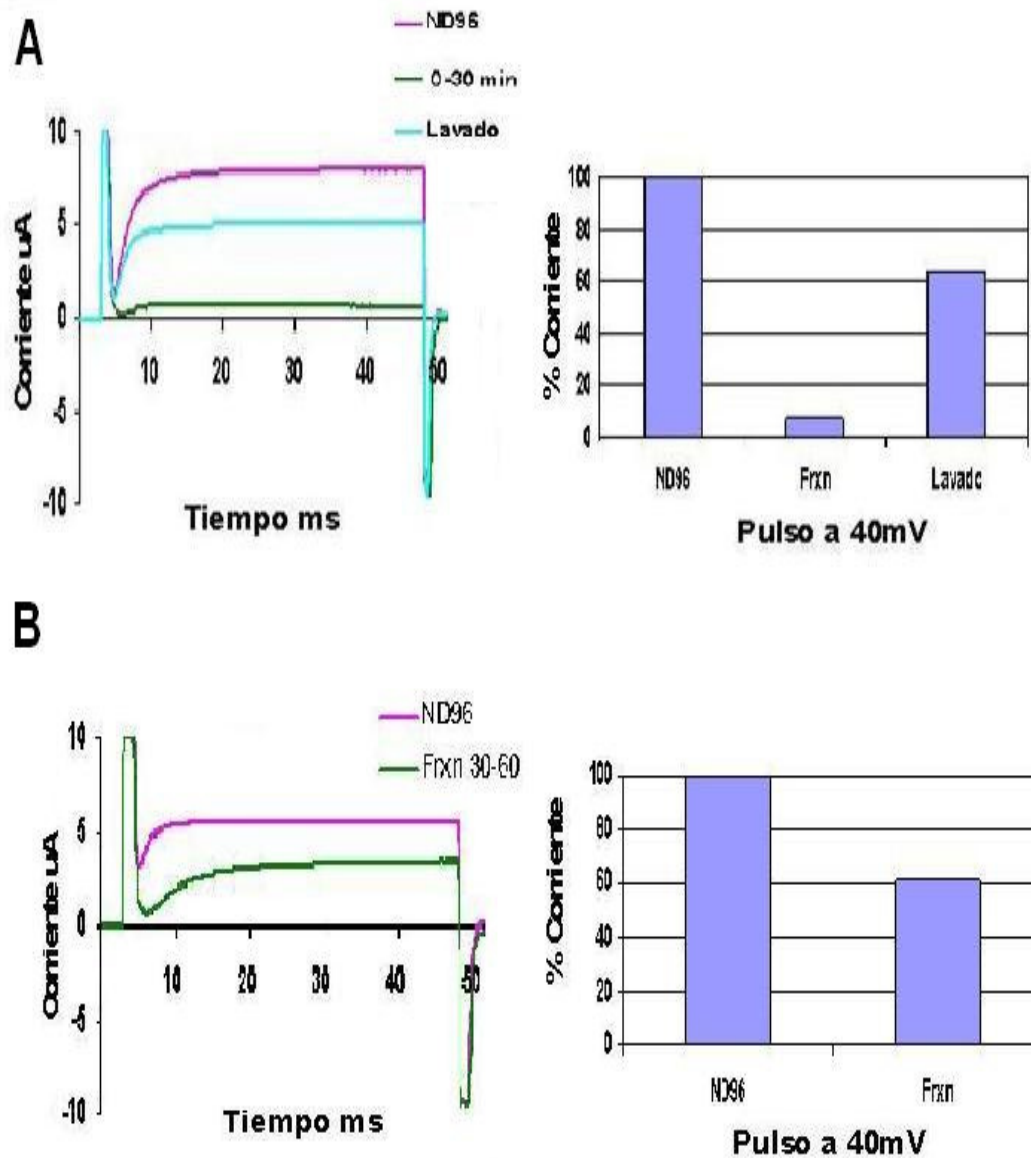


Figura 32. Efecto de las fracciones del veneno total de *C. californicus* colectados en Noviembre de 2004, sobre el canal Shaker IR. Se muestran los registros de las corrientes respecto al tiempo y el porcentaje de la corriente en un potencial de 40mV; antes, durante y después de agregar las fracciones de los minutos 0 al 30 (A) y 30 al 60 (B) del veneno total de conus. **ND-96:** condición inicial de la corriente, **Frnx:** representa la fracción del veneno, **Lavado:** representa la perfusión con medio para retirar rastros de la fracción previamente agregada.

V.5.2 Efecto de las Fracciones del Veneno de Conus Colectadas cada 15 minutos

Debido a que los minutos 0 al 30 y 30 al 60 tuvieron actividad bloqueadora en el canal Shaker, se procedió a evaluar las fracciones de los minutos 5-15, 15-30, 30- 45 y 45-60.

Como se observa en la (**figura 33**), en presencia de 25 μM de la fracción que contiene los minutos 5 al 15 (**A**), presenta actividad bloqueadora significativa, pues el porcentaje de la corriente que se registra en un potencial de 40mV es de 21%, por lo que esta fracción es capaz de reducir la corriente del canal en un 79%, después de retirar la fracción, la corriente se recupera en un 80% respecto de la inicial. Por otro lado, a concentraciones de 12.5 μM de la fracción que contiene los minutos 15 al 30 (**B**), la corriente del canal Shaker disminuye en un 39% y después de retirar la fracción la corriente inicial se recupera en un 94%. En la (**Figura 33 C**), se muestra que la corriente del canal Shaker a un pulso de 40mV, disminuye en un 59% a concentraciones de 75 μM de la fracción que contiene los minutos 30 al 45, es importante resaltar que la concentración utilizada en este experimento es mayor que en los anteriores. Finalmente, en concentraciones de 37.5 μM de la fracción que contiene los minutos 45 al 60, disminuye la corriente en un 49%, al retirar la fracción la corriente se recupera en un 96%. En la **Tabla III** se presenta un resumen de los resultados obtenidos para estas fracciones.

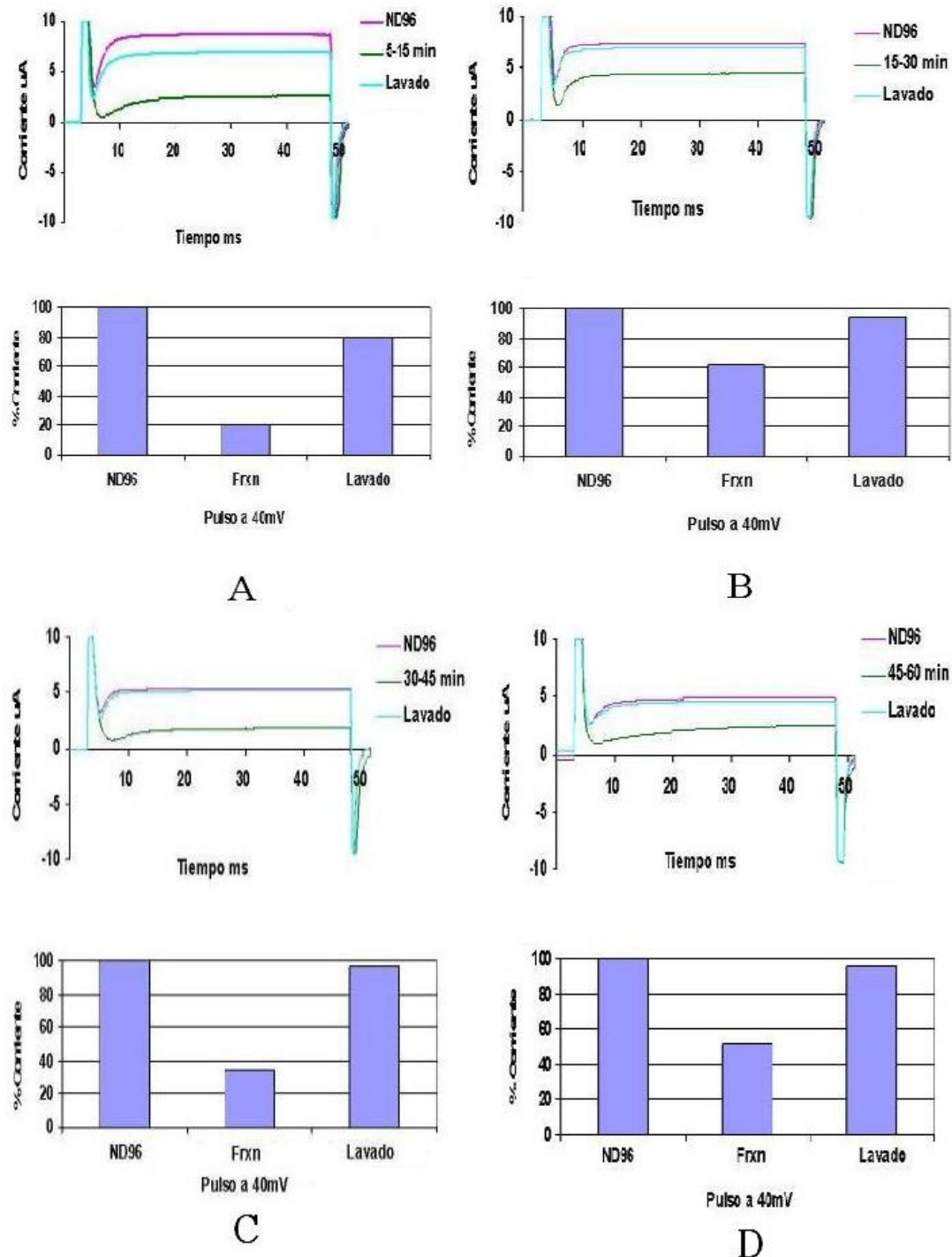


Figura 33. Efecto de las fracciones del veneno total de *C. californicus* colectadas cada 15 minutos sobre el canal Shaker IR. Se grafican los registros de las corrientes respecto al tiempo y el porcentaje de la corriente en un potencial de 40mV; antes, durante y después de agregar las fracciones de los minutos 5 al 15 (A) y 15 al 30 (B), 30 al 45 (C) y 45 al 60 (D) del veneno total de conus. **ND-96:** condición inicial de la corriente, **Frxn:** representa la fracción del veneno, **Lavado:** representa la perfusión con medio para retirar rastros de la fracción previamente agregada.

Tabla III. Actividad sobre el canal Shaker IR de las fracciones del veneno de conus obtenidas por HPLC y colectadas cada 15 minutos

FRACCIÓN (MINUTOS)	ACTIVIDAD BLOQUEADORA	CONCENTRACIÓN (mM)	% DE DISMINUCIÓN DE LA CORRIENTE
5-15	SI	25	79
15-30	SI	12.5	39
30-45	SI	75	59
45-60	SI	37.5	49

V.5.3 Efecto de las Fracciones del Veneno de conus Colectadas cada 5 minutos

Debido a que las cuatro fracciones anteriores tuvieron actividad bloqueadora, se prosiguió a evaluar las fracciones del veneno de conus obtenidas por HPLC y colectadas cada 5 minutos.

De las 12 fracciones que se evaluaron en este punto, algunas carecieron de actividad bloqueadora, para hacer más comprensible el análisis de los resultados, sólo se presenta un ejemplo de éstas (**Figura 34 B**); el resto de los resultados son únicamente de las fracciones que tuvieron actividad bloqueadora (**Figura 34 A, C y D**).

En la (**Figura 34 A**), se muestra que la corriente del canal Shaker disminuye drásticamente en un 98.7%, en concentraciones de 3.7 μM de la fracción que contiene los minutos 5 al 10; sin embargo la fracción que contiene los minutos 10 al 15 (en concentraciones de 12.5 μM), no se observa ningún efecto que modifique la corriente

del canal Shaker IR, por lo que esta fracción carece de actividad bloqueadora (**B**). Cabe mencionar que la variación en la corriente del canal Shaker por acción de alguna fracción es bastante notoria, por lo tanto las fracciones que no tienen ningún efecto en los canales no modifican la corriente, como se observa en la (**figura 34 B**), por lo que para facilitar el análisis de los resultados, los registros que se muestran a continuación serán únicamente de las fracciones con actividad bloqueadora.

Al agregar la fracción de los minutos 25 al 30 (a una concentración final de 12.5 μM), la corriente que se registra representa un 92.3%, por lo que la fracción sólo disminuye la corriente en un 7.7% (**Figura 34 C**), mientras que en concentraciones de 12.2 μM de los minutos 40 al 45, la corriente del canal Shaker IR disminuye en un 3.8%, en ambos casos la corriente después de retirar la fracción mediante perfusión se recupera casi en un 100% (95.3% para **C** y 96.7% para **D**). En la **Tabla IV**, se muestra un resumen de la actividad de cada una de las fracciones colectadas cada 5 minutos.

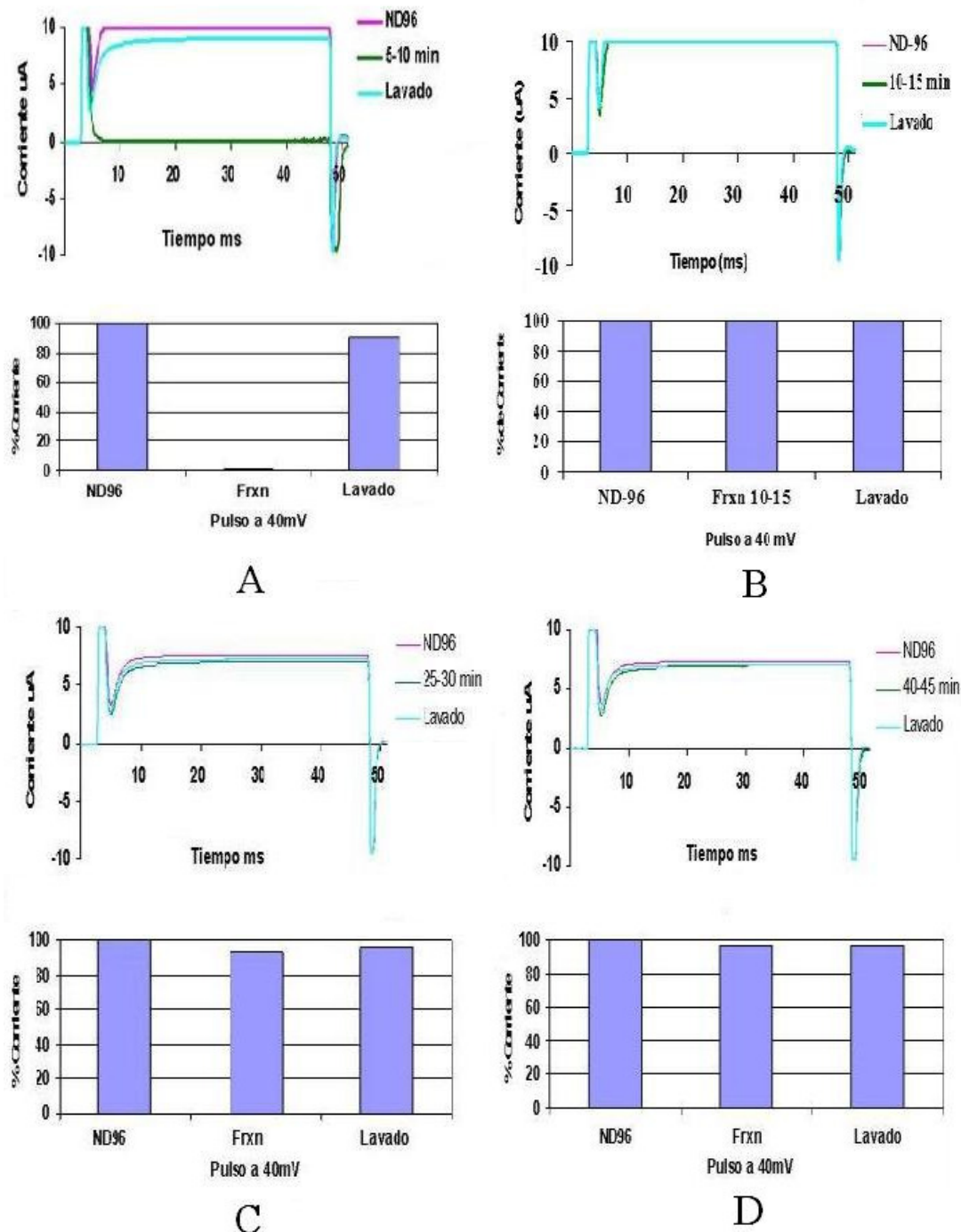


Figura 34. Efecto de las fracciones del veneno total de *C. californicus* colectadas cada 5 minutos sobre el canal Shaker IR. Se presentan los registros de las corrientes respecto al tiempo y el porcentaje de la corriente en un potencial de 40mV; antes, durante y después de agregar las fracciones de los minutos 5 al 10 (A), 10 al 15 (B), 25 al 30 (C) y 40 al 45 (D) del veneno total de conus obtenido por HPLC-RP. **ND-96:** condición inicial de la corriente, **Frnx:** representa la fracción del veneno, **Lavado:** representa la perfusión con medio para retirar rastros de la fracción previamente agregada.

Tabla IV. Resumen de la actividad sobre el canal Shaker IR de las fracciones del veneno de conus obtenidas por HPLC y colectadas cada 5 minutos.

Fracción (minutos)	Actividad Bloqueadora	Concentración (μM)	% de disminución de la corriente
5-10	SI	3.7	98.7
10-15	NO	12.5	0
15-20	NO	4.34	0
20-25	NO	8.9	0
25-30	SI	12.5	7.7
30-35	NO	25	0
35-40	NO	25	0
40-45	SI	12.2	3.8
45-50	NO	18.3	0
50-55	NO	25	0
55-60	NO	3	0
60-65	NO	0.6	0

V.5.4 Efecto de las Fracciones del Veneno de conus Colectadas cada 1 minuto

Al evaluar la actividad de las fracciones de conus colectadas cada 5 minutos, se determinó que los minutos 5 al 10, 25 al 30 y 40 al 45 tenían actividad bloqueadora sobre el canal de potasio de tipo Shaker IR, por lo que se decidió probar estos minutos de forma individual para determinar cuál de ellos era el responsable de la actividad bloqueadora.

Al igual que en los experimentos anteriores, fue necesario conocer la concentración de cada una de las fracciones, éste cálculo se realizó considerando el peso molecular promedio estimado de las κ -conotoxinas y la cantidad en masa de cada una de ellas según el reporte obtenido con el HPLC. Por esta razón, para algunas fracciones fue imposible determinar la concentración, pues en el reporte del HPLC no se detectó

ninguna fracción a 230 nm; sin embargo se resuspendieron en 10 μ L de agua destilada y se probó el volumen que se indica en la (**Tabla V**).

De todas las fracciones que se analizaron, sólo tres de ellas resultaron ser bloqueadores del canal Shaker IR, siendo éstas los minutos 5, 28 y 44. En la (**Tabla V**), se muestra un resumen de las fracciones que se evaluaron, así como también la actividad que presentaron, la concentración que se utilizó en cada una de ellas y el porcentaje de disminución de la corriente.

Tabla V. Resumen de la actividad sobre el canal Shaker IR de las fracciones del veneno de conus obtenidas por HPLC y colectadas cada minuto.

Fracción (minutos)	Actividad Bloqueadora	Concentración (μM)	% de disminución de la corriente
5	SI	4 μL**	37.1
6	NO	4 μ L**	0
7	NO	4 μ L**	0
8	NO	2.94	0
9	NO	4 μ L**	0
10	NO	0.37	0
11	NO	2.75	0
24	NO	0.91	0
25	NO	2.68	0
26	NO	3.6	0
27	NO	5.6	0
28	SI	12.9	55
29	NO	3.04	0
30	NO	8.71	0
40	NO	7 μ L**	0
41	NO	3.86	0
42	NO	13.12	0
43	NO	7 μ L**	0
44	SI	13.12	44
45	NO	2.1	0

** La concentración de estas fracciones no se determinó pues no fueron detectadas por el HPLC a 230 nm. Sin embargo, cada fracción se solubilizó en 10 μ L de agua y se evaluó el volumen que se indica en la tabla.

En la (**Figura 35 A**), se presenta la corriente registrada a un potencial de 40mV del canal Shaker IR en presencia de 4 μ L de la fracción que contiene el minuto 5, en la figura se observa la corriente respecto del tiempo obtenida en los ensayos electrofisiológicos, en donde se indica la disminución de la corriente cuando se agrega la fracción del minuto 5 (trazo verde), mientras que en la (**figura 35 B**) se presenta el porcentaje de la corriente antes, durante y después de agregar la fracción que contiene el minuto 5, como se muestra, la corriente del canal Shaker IR en presencia de la fracción es de 63%, lo que indica que ésta es capaz de disminuir la corriente del canal en un 37%, después de lavar la fracción mediante perfusión con medio ND-96, la corriente final se recupera al 100% respecto de la corriente inicial. En la (**Figura 35 C**), se presenta parte del cromatograma obtenido a partir de aislamiento de las fracciones mediante HPLC, en donde se indica con una flecha la posible fracción que eluye en el minuto 5 y el cual puede ser el responsable del bloqueo de la corriente del canal Shaker.

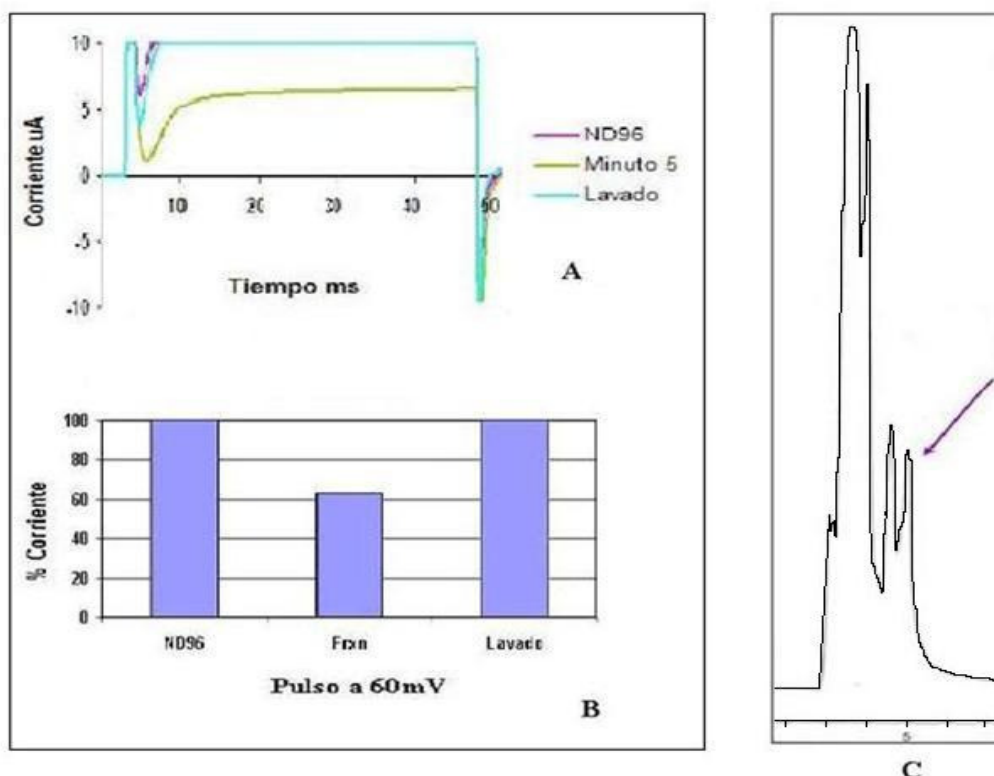


Figura 35. Efecto de la fracción que contiene el minuto 5 del veneno total de *C. californicus* obtenido mediante HPLC sobre el canal Shaker IR. Se presentan los registros de las corrientes respecto al tiempo (A) y el porcentaje de la corriente en un potencial de 40mV (B) antes, durante y después de agregar 4uL de la fracción que contiene el minuto 5 del veneno total de conus obtenido por HPLC-RP. En (C) se ilustra parte del cromatograma obtenido del aislamiento por HPLC de las fracciones del veneno total de conus, con una flecha se señala la posible fracción causante del bloqueo del canal Shaker. **ND-96:** condición inicial de la corriente, **Frxn:** representa la fracción del veneno, **Lavado:** representa la perfusión con medio para retirar rastros de la fracción previamente agregada.

En la (Figura 36 A), se muestra la corriente obtenida del canal Shaker IR en presencia de 12.92 μ M de la fracción que contiene el minuto 28, se observa que esta fracción disminuye la corriente del canal en un 55%, (B) además si se observa en el cromatograma que se obtiene del HPLC (C), se podrá notar que la flecha morada señala que en el minuto 28 existe una sola fracción, por lo que probablemente ésta sea la responsable de la actividad bloqueadora del canal Shaker.

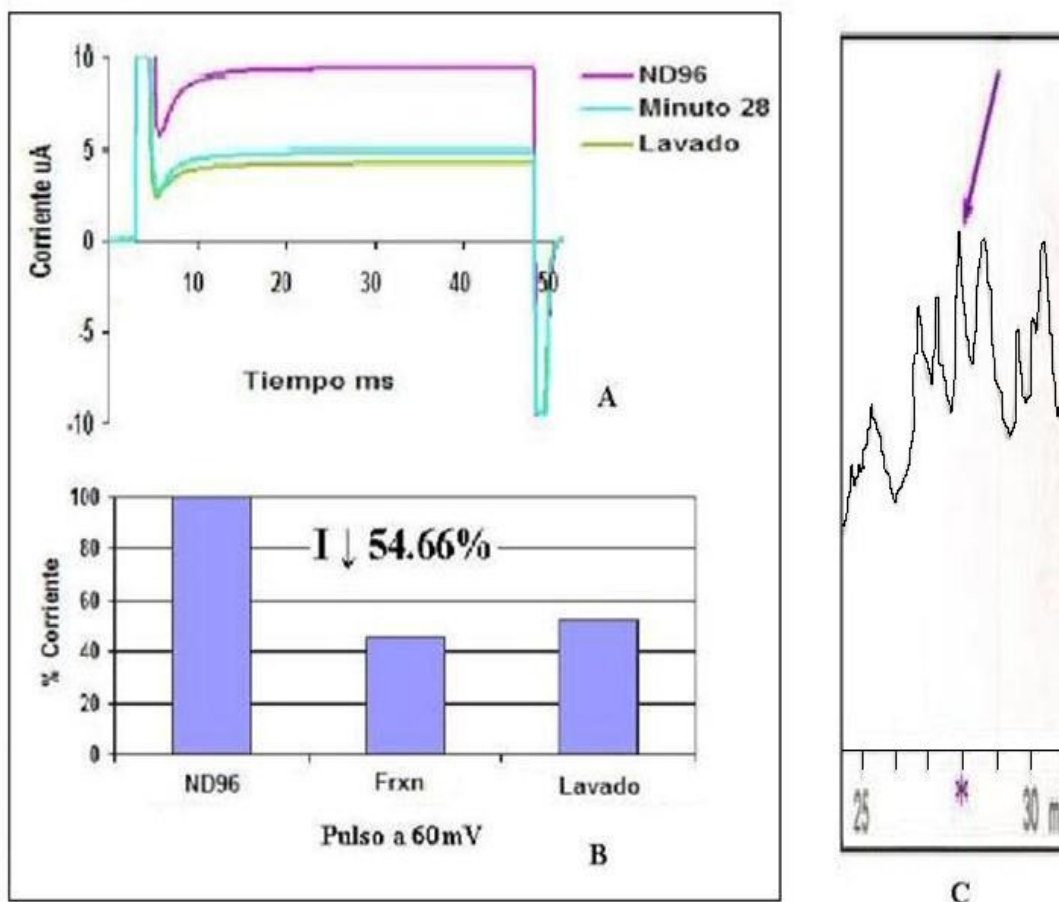


Figura 36. Efecto de la fracción que contiene el minuto 28 del veneno total de *C. californicus* obtenido mediante HPLC sobre el canal Shaker IR. Se presentan los registros de las corrientes respecto al tiempo (A) y el porcentaje de la corriente en un potencial de 40mV (B) antes, durante y después de agregar $12.92 \mu\text{M}$ de la fracción que contiene el minuto 28 del veneno total de conus obtenido por HPLC-RP. En (C) se ilustra parte del cromatograma obtenido por HPLC de las fracciones del veneno total de conus, con una flecha se señala la posible fracción causante del bloqueo del canal Shaker. **ND-96:** condición inicial de la corriente, **Frxn:** representa la fracción del veneno, **Lavado:** representa la perfusión con medio para retirar rastros de la fracción previamente agregada.

Para el caso del minuto 44, que fue la última fracción que presentó actividad bloqueadora, se muestra en la (Figura 37 A) los trazos de las corrientes en un potencial de 40 mV antes, durante y después de haber agregado la fracción que contiene el minuto 44, a una concentración de $13.12 \mu\text{M}$, como se puede observar en

(B) la corriente del canal Shaker disminuye en un 44%, después de lavar la fracción con medio ND-96, la corriente se recupera en un 76.27%. Si nos remontamos al número de fracciones que eluyen en el minuto 44, el reporte del HPLC muestra que en el cromatograma (C) solamente aparecen 2 fracciones en el minuto 44, las cuales están señaladas por dos flechas moradas.

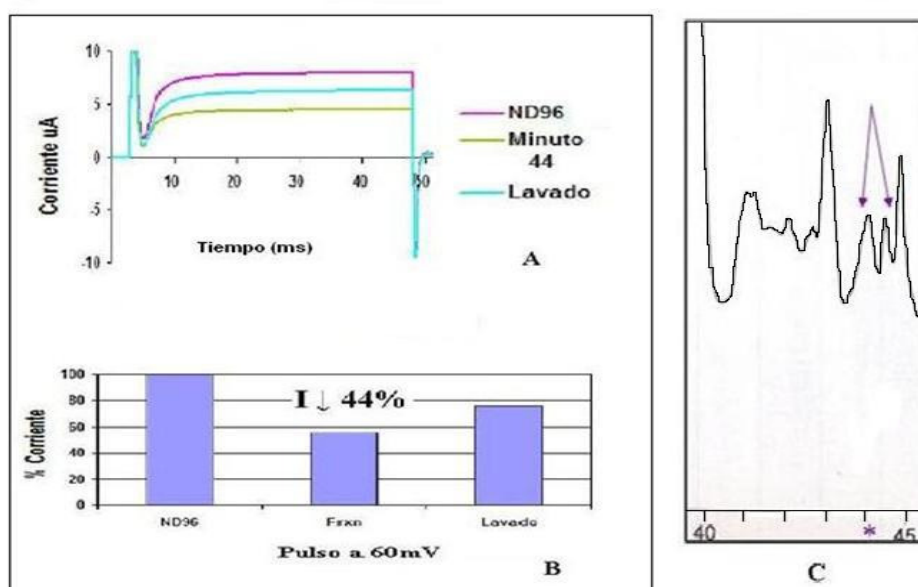


Figura 37. Efecto de la fracción que contiene el minuto 44 del veneno total de *C. californicus* obtenido mediante HPLC sobre el canal Shaker IR. Se presentan los registros de las corrientes respecto al tiempo (A) y el porcentaje de la corriente en un potencial de 40mV (B) antes, durante y después de agregar la fracción que contiene el minuto 44 del veneno total de conus obtenido por HPLC-RP a una concentración de 13.12 μ M. En (C) se ilustra el cromatograma obtenido del aislamiento por HPLC de las fracciones del veneno total de conus, con flechas se señalan las posibles fracciones causantes del bloqueo del canal Shaker. **ND-96:** condición inicial de la corriente, **Frxn:** representa la fracción del veneno, **Lavado:** representa la perfusión con medio para retirar rastros de la fracción previamente agregada.

Hasta este momento es posible determinar que en el caso del canal de potasio Shaker IR existen en el veneno de *Conus californicus*, al menos tres fracciones en los minutos 5, 28 y 44, que disminuyen la corriente del canal de una forma considerable, confirmando con ello su actividad bloqueadora. Además se determinó que el veneno

de los organismos colectados en el mes de Agosto y Noviembre del año 2004, presentan la misma actividad bloqueadora para el canal Shaker IR, y debido a que los resultados son similares, sólo se presentaron los obtenidos con el veneno de los organismos colectados en Noviembre del 2004.

V.6 Efecto de las Fracciones del Veneno de *Conus californicus*, en el Canal de Potasio Modulado por Calcio Hslo, Utilizando la Técnica de Fijación del Voltaje por Dos Electrodo.

Para determinar el efecto de las fracciones colectadas cada 30 minutos, se resuspendieron las fracciones en agua destilada para obtener concentraciones conocidas para cada fracción. Éstas se agregaron a la cámara de perfusión y se registraron las corrientes del canal Hslo, en presencia y ausencia de las fracciones.

En la **Figura 38**, se representa el efecto de la fracción que contiene los minutos 0 al 30 del veneno total (a una concentración de 25 μ M) de conus colectados en Julio del 2004, como se observa, no existe ningún cambio significativo en las corrientes antes y después de agregar la fracción, ya que éstas sólo disminuyen la corriente del canal en un 1%, por lo que se consideró que no tiene ninguna actividad bloqueadora sobre el maxicanal.

Para el caso de la fracción que contiene los minutos 30 al 60 del veneno total, se determinó que no tiene ninguna actividad bloqueadora. Como se puede apreciar en la

(Figura 38 B), pues al agregar la fracción a una concentración de 25 μM , la corriente del canal Hslo no cambia.

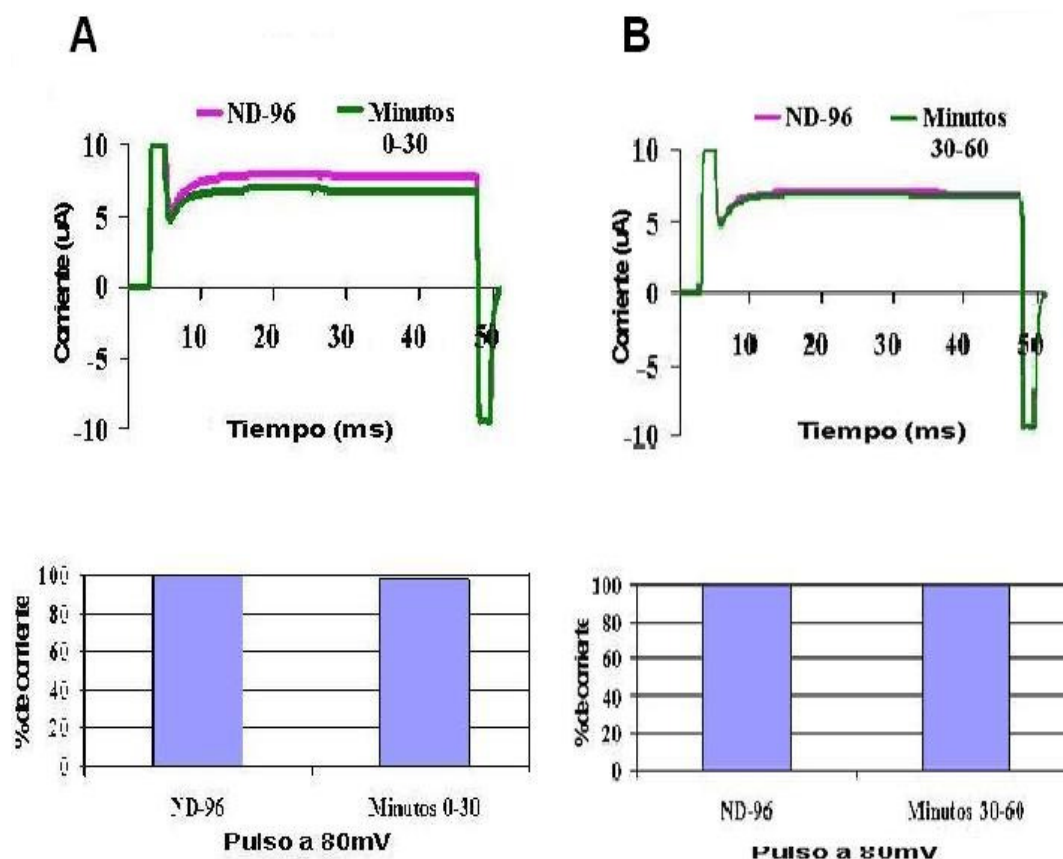


Figura 38. Efecto del veneno total de *C. californicus* colectados en Julio de 2004 sobre el canal Hslo. Se muestran los datos de la corriente respecto al tiempo y el porcentaje de disminución de la corriente en presencia de (A) 25 μM de la fracción de los minutos 0 al 30 del veneno y (B) de la fracción que contiene los minutos 30 al 60 a una concentración de 25 μM .

Ya que las fracciones del veneno total de organismos colectados en Julio del 2004 no bloqueaban las corrientes del canal Hslo, decidimos evaluar la actividad de otro

veneno proveniente de organismos colectados en el mes de Agosto del mismo año.

Estos resultados se muestran en la (Figura 39).

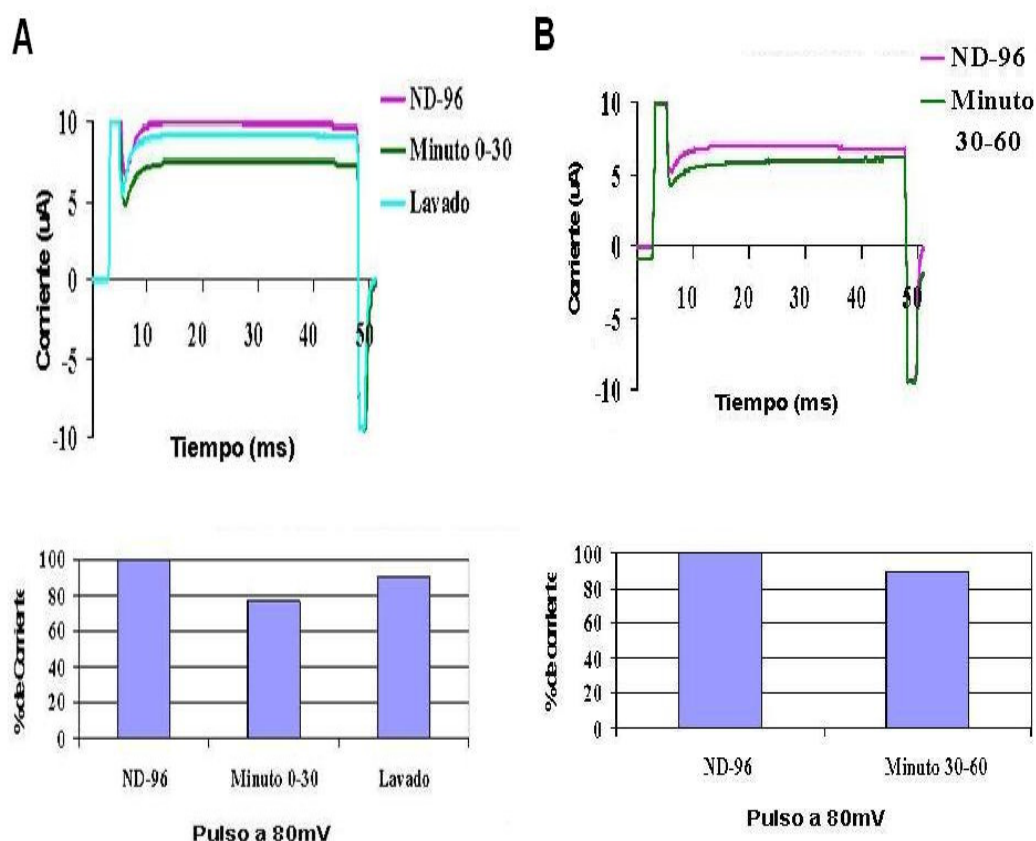


Figura 39. Efecto de las fracciones del veneno total de *C. californicus* colectados en el mes de Agosto del 2004, sobre el canal Hslo. Se muestran los registros de las corrientes respecto al tiempo y el porcentaje de la corriente en un potencial de 80mV; antes, durante y después de agregar las fracciones de los minutos 0 al 30 (A) y 30 al 60 (B) del veneno total de conus. **ND-96:** condición inicial de la corriente, **Minuto:** representa la fracción del veneno, **Lavado:** representa la perfusión con medio para retirar rastros de la fracción previamente agregada.

En la (Figura 39) se presentan dos tipos de gráficas que muestran las corrientes registradas de los ovocitos con el canal Hslo y el porcentaje de la corriente en un potencial de 80mV antes, durante y después de agregar la fracción del veneno. Como

se observa en la (figura 39 A), al agregar la fracción que contiene los minutos 0 al 30, a una concentración de 25 μ M, es capaz de disminuir la corriente en un 23.63%, teniendo un efecto de bloqueo del canal notorio, después de retirarla mediante perfusión, la corriente inicial se recupera en un 90.2%. Por otro lado, la fracción que contiene los minutos 30 al 60 (B), presenta una menor actividad bloqueadora a una concentración de 25 μ M, pues disminuye la corriente del canal en un 11%. Ambos resultados indican que las fracciones de los minutos 0 al 30 y 30 al 60, presentan una actividad que disminuye las corrientes del canal Hslo, por lo que se procedió a evaluar las fracciones colectadas cada 15 minutos con la finalidad de delimitar los minutos con actividad bloqueadora.

V.6.1 Efecto de las fracciones del veneno de *C. californicus* colectadas cada 15 minutos

Como ambas fracciones de la corrida de 30 minutos tuvieron actividad bloqueadora en el canal Hslo, se procedió a evaluar estos mismos minutos, pero ahora en fracciones más pequeñas colectadas cada 15 minutos.

En la **Figura 40**, se muestran los registros de la corriente contra el tiempo y del porcentaje de la corriente a un pulso de 80mV al agregar (A) la fracción que contiene los minutos 5-15, (B) la fracción que contiene los minutos 15 al 30, (C) los minutos 30 al 45 y (D) la fracción correspondiente a los minutos 45 al 60. Como se puede observar en (A), al agregar la fracción que contiene los minutos 5-15, a una concentración de 25 μ M, la corriente del canal Hslo disminuye en un 4.8%, lo cual no

es suficiente para considerar este resultado como un bloqueo, por lo que esta fracción carece de actividad bloqueadora. La fracción correspondiente a los minutos 15 a 30 cuyos resultados se muestran en **(B)**, destaca su actividad bloqueadora pues al agregar la fracción a una concentración de 25 μM , las corrientes del canal Hslo, disminuyen en un 13.1%, y después de retirar la fracción, se recupera en más del 100%.

Por otro lado, la fracción que corresponde a los minutos 30-45 **(C)**, presenta actividad bloqueadora sobre el canal Hslo, en una concentración bastante elevada: 75 μM , pues es capaz de reducir las corrientes en un 30%, el lavado de la fracción mediante perfusión hace que la corriente final se recupere en un 99.37% respecto de la corriente inicial.

Para el caso de la fracción que contiene los minutos finales 45-60 **(D)**, también presenta un ligero cambio en la corriente, pues al agregar 37.5 μM de la fracción a la cámara de perfusión, la corriente del canal Hslo disminuye en un 9%, el lavado de la fracción hace que la corriente se recupere en un 100%.

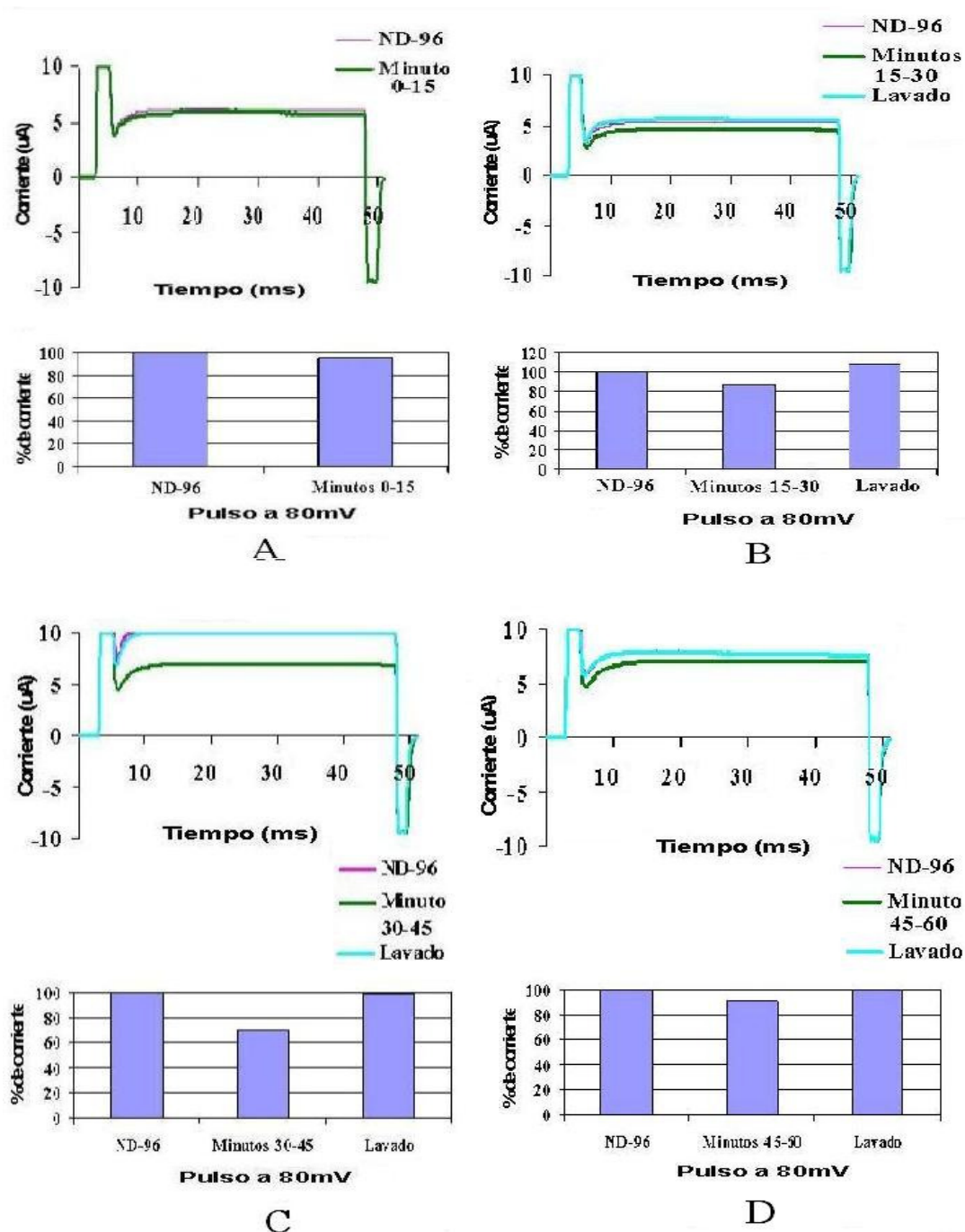


Figura 40. Efecto de las fracciones del veneno total de *C. californicus* colectadas cada 15 minutos sobre el canal Hslo. En este figura se presentan los registros electrofisiológicos de las corrientes respecto al tiempo y el porcentaje de la corriente en un potencial de 80mV; antes, durante y después de agregar las fracciones de los minutos 5 al 15 (A), 15-30 (B), 30 al 45 (C) y 45 al 60 (D), del veneno total de *C. californicus*. **ND-96:** condición inicial de la corriente, **Minuto:** representa la fracción del veneno, **Lavado:** representa la perfusión con medio para retirar rastros de la fracción previamente agregada.

En la (**Tabla VI**), se presenta un resumen de la actividad bloqueadora para cada fracción, la concentración que se utilizó y el porcentaje de disminución de la corriente para dicha concentración.

Tabla VI. Resumen del efecto de las fracciones del veneno total de *Conus californicus* obtenidas mediante HPLC y colectadas cada 15 minutos sobre el canal Hslo.

Fracción (minutos)	Actividad Bloqueadora	Concentración (μM)	% de disminución de la corriente
5-15	NO	25	4.8
15-30	SI	25	13.1
30-45	SI	75	30
45-60	SI	37.5	9

V.6.2 Efecto de las fracciones del veneno de *C. californicus* colectadas cada 5 minutos

Debido a que los minutos 15-30, 30-45 y 45-60 tuvieron actividad bloqueadora sobre el canal Hslo, se procedió a probar el efecto de estos mismos minutos pero en fracciones colectadas cada 5 minutos, para determinar con mayor precisión cuales son las fracciones que presentan la actividad bloqueadora y en qué minutos se localizan.

Como se evaluaron un número grande de fracciones, sólo se muestran las gráficas de aquellas que presentaron actividad bloqueadora, el resto de los resultados se encuentran resumidos en la (**Tabla VII**).

En la (**Figura 41 A**) se puede observar el efecto que tiene la fracción que contiene los minutos 20 al 25 sobre el canal Hslo. Al agregarse a la cámara de perfusión la

fracción con los minutos 20-25 (a una concentración de 37.66 μM), la corriente de Hslo, disminuye cerca de un 20%, y al ser retirada la fracción mediante perfusión se observa que la corriente se recupera en un 96% (B), en el reporte obtenido por el HPLC, se detectaron 8 subfracciones a 230nm, por lo que cualquiera de éstas podría ser la responsable de la actividad bloqueadora (C).

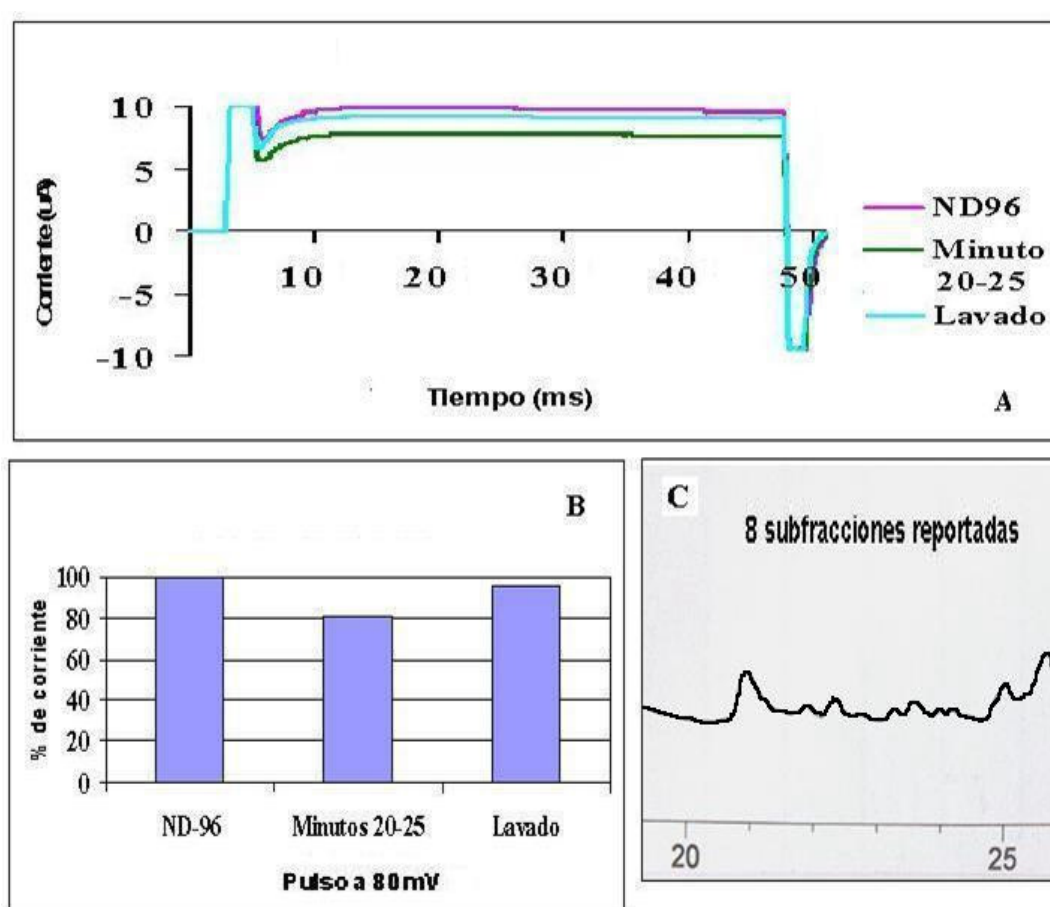


Figura 41. Efecto de las fracciones del veneno total de *C. californicus* obtenidas por HPLC y colectadas en los minutos 20 al 25 sobre el canal Hslo. En este figura se presentan en (A) los registros electrofisiológicos de las corrientes respecto al tiempo y (B) el porcentaje de la corriente en un potencial de 80mV; antes, durante y después de agregar la fracción que contiene los minutos 20-25 a una concentración de 37.66 μM . En (C) se presentan el cromatograma correspondiente a los minutos 20-25 y las 8 subfracciones detectadas a 230nm por el HPLC. **ND-96:** condición inicial de la corriente, **Minuto:** representa la fracción del veneno, **Lavado:** representa la perfusión con medio para retirar rastros de la fracción previamente agregada.

Mientras que en la (**Figura 42 A**), se muestran los registros electrofisiológicos respecto del tiempo, cuando se agregaron 46 μ M de la fracción con los minutos 45-50 del veneno total de conus. En (**B**), se presenta que ésta fracción es capaz de disminuir la corriente del canal Hslo en un 12% debido a su actividad bloqueadora, sin embargo cuando la fracción es retirada de la cámara de perfusión la corriente se recupera en un 102% respecto de la corriente inicial. De acuerdo con el aislamiento de esta fracción de los minutos 45-50 por el HPLC, se observa en (**C**), el cromatograma correspondiente a estos minutos, en donde se reporta la existencia de 8 subfracciones que probablemente estén actuando como bloqueadores del canal Hslo.

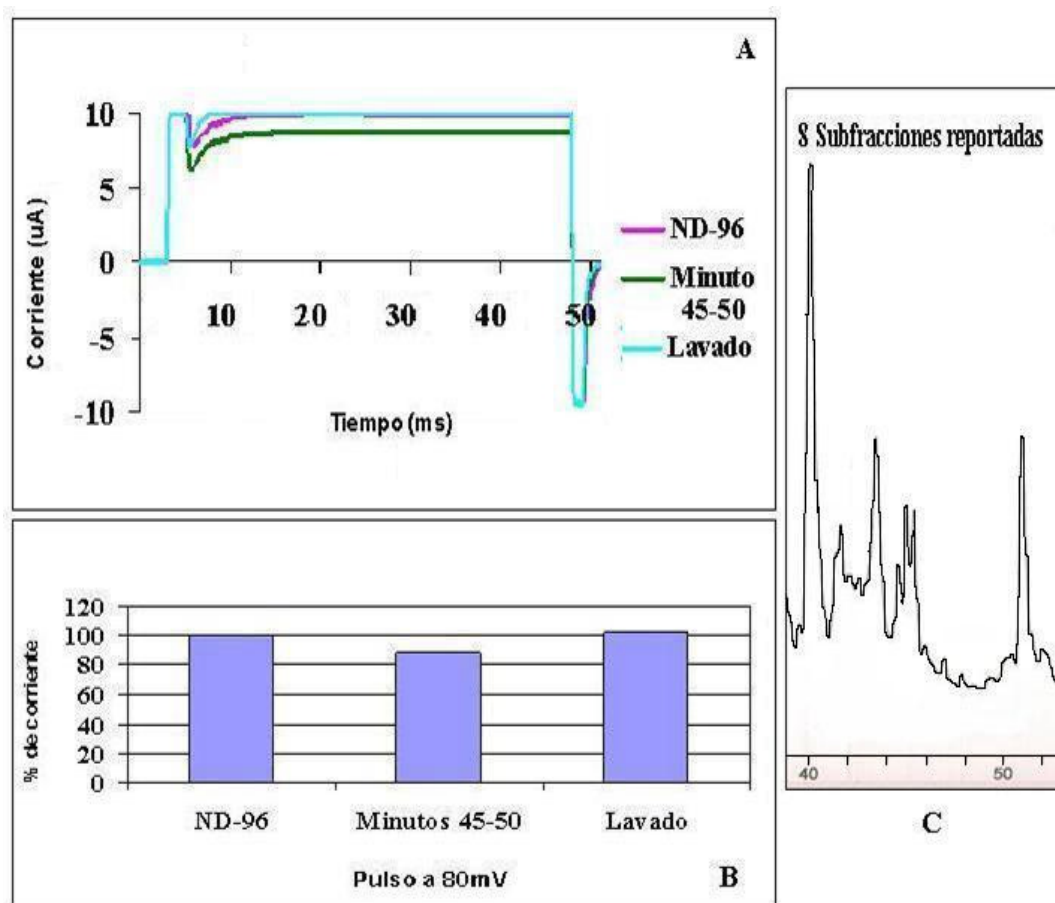


Figura 42. Efecto de las fracciones del veneno total de *C. californicus* obtenidas por HPLC y colectadas en los minutos 45-50 sobre el canal Hslo. En este figura se presentan en (A) los registros electrofisiológicos de las corrientes respecto al tiempo y (B) el porcentaje de la corriente en un potencial de 80mV; antes, durante y después de agregar la fracción que contiene los minutos 20-25, a una concentración de 46 μ M. En (C) se presentan el cromatograma correspondiente a los minutos 45-50 y las 8 subfracciones detectadas a 230nm por el HPLC. **ND-96:** condición inicial de la corriente, **Minuto:** representa la fracción del veneno, **Lavado:** representa la perfusión con medio para retirar rastros de la fracción previamente agregada.

Tabla VII. Resumen del efecto de las fracciones del veneno total de *Conus californicus* obtenidas por HPLC y colectadas cada 5 minutos sobre el canal Hslo

Fracción (minutos)	Actividad Bloqueadora	Concentración (μM)	% de disminución de la corriente
15-20	NO	9.7	0
20-25	SI	37.66	20
25-30	NO	25	0
30-35	NO	50	0
35-40	NO	25	0
40-45	NO	9.12	0
45-50	SI	46	12
50-55	NO	1.2	0
55-60	NO	1.2	0

Con los resultados obtenidos hasta este momento es posible determinar que las fracciones bloqueadoras de las corrientes del canal Shaker IR y Hslo, se encuentran en los venenos de los organismos colectados en Agosto y Noviembre del 2004, y que el veneno del mes de Julio, carece de cualquier actividad sobre ambos canales.

Hasta ahora, se sabe que los minutos 20 al 25 y 45 al 50, presentan actividad bloqueadora que disminuye las corrientes del canal Hslo, sin embargo debido a las grandes concentraciones que fueron utilizadas para los experimentos (37 μM para el caso de los minutos 20-25 y 46 μM para los minutos 45-50), no fue posible determinar cuáles eran los minutos individuales responsables del bloqueo, pues las fracciones correspondientes a cada uno de los minutos individuales, no tenían éstas concentraciones.

Por lo tanto de acuerdo con el reporte del HPLC se sabe que en los minutos 20-25 existen 8 subfracciones que en conjunto disminuyen la corriente del canal Hslo en un 20% en concentraciones cercanas a los 38 μM ; mientras que para los minutos 45 al 50 fueron detectadas a 230 nm, 8 subfracciones que actúan en grupo como bloqueadores del canal Hslo disminuyendo la corriente del mismo en un 12% cuando se agregan 46 μM de estos minutos, sin embargo pese a que la concentración de las fracciones del veneno sólo nos permitieron evaluar el efecto de las fracciones colectadas cada 5 minutos, éste es significativo y notorio para las dos que resultaron positivas.

V.7 Obtención de la Biblioteca de ADNc de las Conotoxinas del Veneno de *C. californicus*.

Se obtuvo una biblioteca de ADNc de las conotoxinas presentes en los ductos venenosos de 10 organismos de la especie *C. californicus*, colectados en el mes de Abril del 2004.

A partir de los ductos venenosos se aisló ARN total con el cual se realizó una reacción de RT-PCR, el producto se clonó en el vector pBR322. La ligación se electroporó a células electrocompetentes para obtener una biblioteca de ADNc. Las clonas que se obtuvieron se analizaron mediante un PCR de colonia para definir cuáles eran las clonas positivas, los productos del PCR se secuenciaron y se obtuvieron los siguientes resultados presentados en la (Tabla VIII).

Tabla VIII. Secuencias de algunas conotoxinas presentes en la biblioteca de ADNc

Toxina	Secuencia de aminoácidos	Tipo de toxina
Cl6.1	GCKSKGSFCWNGIECCGGNCFFACIY	ω
Cl6.2	NCIPKNHFCGLLHHSRNCCTPTCLIVCF	δ
Cl6.3	DGEEFPCAGTMADCRGLADNSVCCDTGKCIGEVCIYY	δ
Cl6.4	DCKTKGSVCFASSECCIQDCWFVCLY	δ
Cl6.5	GCKTKGTWCWASRECCLKDCLFVCVY	δ
Cl6.6	DDKSNCPISHPNYCSFTPVCCKHECLSNNKCSSSEFIPGQ	γ
Cl6.7	CLAGSARCEFHKPSSCCSGHCIFWWCA	δ
Cl6.8	ECSESGEWCGLDPALCCGSSCFFTCN	δ
Cl6.9	YCSDSGGWCGLDPELCCNSSCFVLCG	δ
Cl6.10	GLSRPSKGCIGGGDPCEFHRGYTCCSEHCIIWVCA	δ
Cl6.11	CLAGSARCEFHRPSTCCSGHCIFWWCA	δ
Cl6.12	CIPDHHGCGLLHHSRYCCNGTCFFVCIP	δ
Cl6.13	YCVPKSGLCTIFQPGKCCSGWCLIYRCT	δ
Cl6.14	GCKSKGSFCWNGIECCGGNCFFACVY	ω
Cl13.1	GDCPPWCVGARCRAEKC	Z
Cl13.2	DCPPWCPTSHCNAGTC	Z
Cl13.3	GDCPPWCVGARCRAEKC	Z
Cl13.4	QCPPWCSGEPCKRGTC	Z

Tabla VIII Continuación		
CI13.5	ECPPWCPTSHCNAGTC	Z
CI13.6	ECPPRCPTSHCNAGTC	Z
CI8.1	SDPQACEPTISGGEMICRDEVCASTGCNCGYNIKAHCYCACP	Π
CI11.1	FNENLSELNSACDDAWETCAWSRTCCSRNCCRGICVSRYIECP	I
CI1.1	DWNWGRCCFLSGCFECW	τ-Map
CIX.1	DVCDSLVDGRCIHNGCFCEESKPNGNCCDTGGCVWWWCPGT KWD	?
CIX.2	DVCDSLVGGNCIHNGCWCDQEAPHGNCCDTDGCTAAWWCPG TKWD	?
CIX.3	GVCSTPEGSCVHNGCICQNAPCCHPSGCNWANVCPGYLWDKN	?
CIX.4	GVCSTPEGSCVHNGCICQNAPCCHASGCNWANVCPGFLWDKN	?
Cal21	QGQSQFGEQCTGHLDCFGDLCCFDGYCIMTSWIWPCNW	O
Cal25	DCGPWCWGQNKCCPDESCRSLHESCT	O
Cal32	CLAGSARCEFHRPSTCCSGHCIFWWCA	O
Cal83	GWWGPPSNCWVCTGFNKCCEHESHCMTFPTQYNRECK	O
CF08	GCPAECPDTCSSSGSCAPDFIG	?
CF44	GCVANCQANQTGIDCIKYCGIGIGRRDITQQ	?
Cal12	DCGRCGLGQICDAGACRPSTMM	?
Cal26	HVTCFYVKFGCKHTECITTIVFCWQTASDISSV	?
Cal64	CFGRGGLCTWFDPSVCCSGIRTFVDYW	?
Cal91	ACECDRSTHFCCGDLNDD	?
Cal27	CCRQGPVCFIPLNEWPCSRM	?
CF24	CTTMNCLKGHCGCSPDCGSC	?
CF26	FPCNAGNCACLPLDSYSYTCQSPTSSTANCEGNECRSEADW	?
Cal46	FPCNPGGCACRPLDSYSYTCQSPSSSTANCEGNECVSEADW	?

Tabla VIII Continuación		
CF83	TFPCSSGLCACLPLDSYSYICLSPSSSTANCENDECISEDW	?
CF34	DAPYCSQEEVRECHDDCSGNPVRDACQCAYPDAGSPACDCYC VEPWRR	?
Cal01	ADCSSLPNTMASCEPDELCAVQEYGETQCTKQCICQGGKTCSE AIKIIANGGTHRYFSCESLGNGTEFTAASVSLTGCGSGDYRKVNH KCRSYGLSGGVPYCTS	?
Cal65	TCDYHDIIRVQYPDGRVLSGDYCYCPHRSLQVALQVSKGCCA YRQYLEVIVCDSLVGVGCKFSLVARYDPSNGEKDPGMWCRCS TYSFFGNSRRWKIQCGSPC	?

En total se obtuvieron 46 secuencias diferentes, de 19 de ellas, se desconoce la familia a la cual pertenecen. La gran mayoría de las conotoxinas que han sido asignadas a algunas familias pertenecen a las δ -conotoxinas, que actúan retardando la inactivación de los canales de sodio dependientes de voltaje, seguidas de 4 secuencias que pertenecen a la superfamilia O, que pueden ser de tipo ω , κ , δ ó μ O-conotoxinas, que actúan sobre canales de calcio, potasio y sodio (retardando la inactivación o bloqueándolos) respectivamente. Las conotoxinas menos abundantes están representadas por las que pertenecen a la superfamilia I, de las cuales se sabe que bloquean canales de potasio dependientes de voltaje y las conotoxinas de tipo ω que bloquean canales de calcio dependientes de voltaje.

VI. DISCUSIÓN

A pesar de que los canales iónicos de potasio constituyen la familia más grande de este tipo de proteínas, y que sus disfunciones y mutaciones han sido asociadas a procesos fisiológicos y patológicos importantes (Lehmann y Jurkat, 1999), sólo se han aislado 5 conotoxinas que bloquean este tipo de canales.

Basándonos en estas evidencias, se decidió realizar este trabajo con el propósito de determinar si en el veneno del caracol marino *Conus californicus*, existían toxinas que actuaran sobre los canales iónicos de potasio. Para cumplir con este objetivo se fraccionó el veneno de acuerdo a su tiempo de retención mediante HPLC en fase reversa. El efecto de las fracciones se evaluó electrofisiológicamente en dos canales de potasio: Shaker IR y Hslo, utilizando la técnica de fijación de voltaje por dos electrodos (Two Electrode Voltage Clamp, TEV).

Para evaluar el efecto de las fracciones del veneno sobre los canales fue necesario conocer la concentración de cada una, sin embargo, se desconocía el peso molecular de las κ -conotoxinas (κ -cTx) de *C. californicus*; éste se calculó mediante una estimación teórica del número de aminoácidos promedio presentes en todas las κ -cTx reportadas hasta la fecha (Jacobsen *et al.*, 2000; McIntosh *et al.*, 1999; Terlau, *et al.*, 1996). Se consideró que en promedio existen 29 aminoácidos en estas toxinas y por lo tanto el peso promedio estimado fue de 3190 g/mol. Para conocer la cantidad en

masa de cada fracción, se tomaron en cuenta los datos generados por el reporte del HPLC para cada componente detectado a 230 nm.

En este trabajo se obtuvieron 3 fracciones bien identificadas de minutos individuales que bloquean el canal Shaker y 2 fracciones para el canal Hslo. Su naturaleza podría ser peptídica ya que absorben a 230 nm, aunque evidentemente se requiere la secuencia de aminoácidos que las compone para asegurar lo anterior. Los reportes sugieren que las κ -cTx son componentes minoritarios en el veneno de los conus, ya que de las más de 250 conotoxinas reportadas sólo 2% son κ -cTx.

VI.1 Variabilidad en los Componentes del Veneno de *Conus californicus*

El encontrar tres fracciones activas sobre el canal Shaker nos sugiere que en el veneno de *Conus californicus*, la presencia de κ -cTx es más abundante que en el de otras especies. Probablemente esto se deba a que ostentan hábitos muy distintos del resto, pues son diurnos, viven en zonas frías y sobre todo, tienen una dieta variada (peces, gusanos especialmente poliquetos y moluscos). Esta variabilidad en la ingesta, puede generar un repertorio más amplio de toxinas capaces de paralizar a cualquiera de sus presas, por el contrario, aquellos conus con una alimentación restringida, pudiesen tener un reservorio de toxinas menos variadas pero más potentes que les aseguren la caza de presas particulares.

Por otro lado, las fracciones del veneno que tuvieron actividad bloqueadora sobre ambos canales, provienen de organismos que fueron colectados en los meses de Agosto y Noviembre del 2004, pero al evaluar el veneno que provenía de organismos colectados en el mes de Julio de ese mismo año, éste carecía de alguna actividad tanto bloqueadora como activadora de los canales Shaker y Hslo.

La diferencia en la actividad del veneno sobre ambos canales puede deberse a que la composición del veneno puede cambiar de acuerdo a la temporada en que se colecten los organismos. Este parámetro podría estar relacionado con otros aspectos, como el estadio de los organismos que son colectados, el sexo, la temporada de reproducción (aunado a factores físicos externos como la temperatura del agua) y el tipo de alimento que hubieran ingerido antes de su colecta, el cual está estrechamente relacionado con las presas que estén disponibles en esa temporada del año. Todos estos parámetros en conjunto podrían influir en el cambio de los componentes del veneno y por consiguiente en la variación de la actividad bloqueadora, aunque estas variaciones no han sido reportadas todavía, este comportamiento se ha observado también en *C. purpurascens* (Nelson, 2004).

Hasta este momento sólo nos es posible establecer que el veneno de los caracoles de la especie *Conus californicus* cambia en relación a la temporada en la cual se colectan los organismos, esta información es muy importante pues no debe pasarse por alto que al realizar ensayos de bioactividad deberían de ser evaluados al menos dos venenos provenientes de organismos colectados en temporadas distintas. La

implicación de esta información, hace que la cantidad del veneno que se obtiene de una colecta sea valiosa aunque también puede ser una limitante, pues ocasiones la cantidad con la que se dispone no es suficiente para realizar los ensayos de bioactividad. Esto nos impulsó a generar una biblioteca de ADNc de las conotoxinas presentes en el veneno de *Conus californicus*, con el propósito de expresalas de manera ilimitada, los resultados relacionados con este punto se discutirán más adelante.

VI.2 Pruebas en el Canal de Potasio Shaker IR

Para el caso del canal Shaker IR se detectó que en el veneno de *C. californicus* existen tres fracciones con actividad bloqueadora, que eluyen en los minutos 5, 28 y 44. Para el minuto 5, la corriente del canal disminuye en un 37.1%, después de retirar la fracción mediante perfusión con medio la corriente final se recupera en un 100%; esto nos sugiere que la disociación del complejo fracción-canal es completa y se facilita por la perfusión con medio. Sin embargo, mediante HPLC no se detectó ninguna fracción en el minuto 5, pero sí una en el minuto 4.46 que termina de eluir en los primeros segundos del minuto 5, por lo que es probable que esta fracción sea la responsable de la actividad bloqueadora sobre el canal Shaker IR.

Al agregar la fracción contenida en el minuto 28, la corriente del canal Shaker disminuye un 55%, a pesar de que se realizaron varios lavados por un lapso total de 18 minutos, la disociación del complejo fracción-canal no fue completa, pues la

corriente final sólo se recuperó en un 50%, esto puede sugerir que el componente del minuto 28 tiene una afinidad grande por el canal, ya que sólo la mitad de la fracción es capaz de disociarse. En el reporte generado por el HPLC, se detectó a 230 nm una sola fracción que eluye en este minuto, por lo que con certeza es la fracción bloqueadora del canal.

Para el minuto 44 se detectaron por HPLC dos fracciones que eluyen en los minutos 44.445 y 44.812; y que en una concentración final en la cámara de perfusión de 13 μ M disminuyen la corriente del canal en un 44%, después de varios lavados, la corriente se recupera en un 80% respecto de la lectura inicial, lo cual sugiere que la disociación del complejo fracción-canal se favorece por la perfusión con medio, aunque aparentemente su disociación no es total. Sin embargo, se requieren de otros experimentos para dar validez a esta premisa, además de que aún no es posible determinar cual de los dos componentes es el responsable de la actividad bloqueadora, para lograrlo, se requiere re-purificar ambas fracciones en cantidad suficiente para evaluar algún tipo de efecto bloqueador sobre el canal Shaker.

VI.3 Pruebas en el Canal de Potasio Modulado por Calcio Hslo

Al evaluar el efecto del veneno sobre el canal Hslo, sólo fue posible determinar que las fracciones contenidas en los minutos 20-25 y 45-50 existía actividad bloqueadora. Utilizando la fracción que contiene los minutos 20-25 a una concentración final de 38 μ M, es capaz de disminuir la corriente del canal Hslo en un 20%, mientras que al

retirarla por perfusión, la corriente se recuperó en un 96% respecto de la inicial. Por otro lado, los minutos 45-50 del veneno de conus, disminuyeron la corriente en un 12% (en concentraciones de 46 μM). Sin embargo, la cantidad de material obtenido en las fracciones colectadas cada minuto no fue suficiente ($<1 \mu\text{M}$) y por lo tanto, no se registró ninguna actividad.

Por otro lado, al evaluar las fracciones con actividad, fue notorio que para el canal Shaker las concentraciones finales utilizadas siempre fueron menores que para Hslo: la concentración final para el canal Shaker fue de 13 μM y para Hslo fue de 46 μM . Aparentemente ambas concentraciones pueden parecer elevadas, sin embargo, en estudios realizados con κ -cTx sintéticas en donde se evaluó la actividad sobre el canal Shaker, la concentración media inhibitoria va desde los 70 nM para la κ -PVIIA, hasta 1.21 μM para la κ M-RIIIK (Ferber *et al.*, 2003; Terlau *et al.*, 1996), en ambos reportes utilizan toxinas sintéticas, en donde la gran mayoría de éstas se encuentran como péptidos puros. Considerando que en el presente trabajo se manejaron fracciones obtenidas por HPLC, de ninguna manera se puede comparar la pureza que brinda la síntesis o la expresión heteróloga de una sola proteína, pues los extractos totales contienen no sólo la fracción de interés, si no una mezcla de diferentes componentes que pueden afectar la unión de la fracción al canal debido a fuerzas electrostáticas, impedimento estérico o efectos antagónicos. El utilizar concentraciones elevadas de las toxinas sintéticas para evaluar el efecto en los canales de potasio, nos indica que las κ -cTx tienen una afinidad menor que muchas de las

toxinas de alacrán, que se utilizan en órdenes nanomolares para caracterizar este tipo de canales (Chandy *et al.*, 2001, 2004; Sands *et al.*, 1989).

Además no existen referencias en las cuales se evalúe el efecto de fracciones del extracto total de veneno de conus con las que podamos comparar si las concentraciones utilizadas en este trabajo fueron adecuadas, porque únicamente hay reportes de los efectos de las conotoxinas sintéticas.

Por lo tanto, los resultados obtenidos para el canal Hslo no deberían subestimarse, pues es probable que al evaluar el efecto de las fracciones de los minutos individuales, no sea necesario utilizar concentraciones tan elevadas, ya que el componente que actúa como bloqueador se encontraría en mayor cantidad; sin embargo una de las limitantes para continuar con esta evaluación, fue que las fracciones de los minutos individuales tenían concentraciones menores a 1 μM y al evaluar su actividad no se observó ningún efecto.

Gracias al enorme conocimiento de la estructura molecular, diversidad y función de los canales iónicos de potasio, ha sido posible asociar un número mayor de mutaciones genéticas en estos canales a diversas enfermedades, como las asociadas al riñón, páncreas, cáncer, ataxia, miocimia, epilepsia e isquemia cardiaca, estas patologías también pueden tener su origen en alteraciones funcionales y regulatorias de estos canales. Por ejemplo, algunos estudios han relacionado al gen de la ataxia episódica 1 (AE1) al cromosoma 12p, donde está el gen que codifica para el canal de

potasio Kv1.1, éste pertenece a la misma familia que el canal Shaker (Bretschneider *et al.*, 1999; Litt *et al.*, 1994). Las familias de individuos que presentan la AE1 tienen mutaciones sin sentido en el gen *KCNA1*, éstas alteran la función del canal, haciendo que se reduzca la expresión del mismo, se alteren las propiedades de apertura recorriendo el umbral de 10 a 40mV en dirección despolarizante (positiva) o bien se incrementa su desactivación o la velocidad de inactivación de tipo C (Adelman *et al.*, 1995; Boland *et al.*, 1999; Jäger *et al.*, 1998; Shieh *et al.*, 2000).

Por lo visto la gran familia de canales iónicos de potasio no sólo está involucrada en una amplia gama de procesos fisiológicos, si no en patologías de relevancia actual. Por ello el uso de bloqueadores específicos para estos canales está asociada al tratamiento y en algunos casos a la reversión de ciertas enfermedades (Chandy *et al.*, 2004; Shieh *et al.*, 2000). Se han utilizado bloqueadores de los canales de potasio para pacientes con anemia, pues bloquean los canales que son responsables de controlar el volumen y la pérdida de agua y cloro de los eritrocitos evitando que éstos se deshidraten y deformen (Lewis y García, 2003). En la encefalomiелitis autoinmune existe una elevada expresión de canales de potasio Kv1.3, el uso de toxinas bloqueadoras de éste canal como la toxina ShK aislada de una anémona, revierte los síntomas de la enfermedad, sugiriendo un posible papel de estos bloqueadores como inmunosupresores (Lewis y García, 2003; Wanner *et al.*, 1999). En este sentido los bloqueadores de los canales de potasio Kv1.3 han demostrado ser inmunosupresores potenciales, como en el caso de la Margatoxina, aislada del alacrán *Centruroides margaritatus*, misma que bloquea los canales Kv1.1, 1.2, y 1.3, su

utilización en ensayos *in vitro* ocasiona que la proliferación de los linfocitos T se inhiba debido al bloqueo de los canales Kv1.3, lo que también ha permitido establecer el papel de este canal en la activación y proliferación de linfocitos T (Cahalan y Chandy, 1997; Chandy *et al.*, 2004; Koo *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 2000).

Los canales de la familia Kv1, pertenecen a la misma familia que el canal Shaker el cual fue el primer canal de potasio en ser clonado y del que se conoce con mayor detalle su estructura, muchos experimentos se realizan en este canal modelo y se extrapola su aplicación en los canales homólogos de la familia Kv1 (Chandy *et al.*, 2004; Jäger *et al.*, 1998). Por esta razón, las 3 fracciones obtenidas en este trabajo pueden ser candidatas potenciales para utilizarse como inmunosupresores y bloqueadores de otros canales de potasio de la familia Kv, que estén involucrados en patologías como la ataxia, miocimia y cáncer.

En este sentido, algunos compuestos químicos han sido utilizados como bloqueadores de canales iónicos de potasio para el tratamiento de enfermedades, un ejemplo es la 4-aminopiridina que se utiliza en pacientes con arterioesclerosis múltiple mejorando las funciones motoras y sensitivas de los pacientes, en el tratamiento de la diabetes tipo 2 se utilizan las sulfonil ureas que bloquean los canales de potasio dependientes de ATP en las células β del páncreas, la doferilida (*Ticosyn, Pfizer*) se utiliza para el tratamiento de pacientes con fibrilación atrial, además algunos bloqueadores se utilizan como activadores del aprendizaje y la memoria, muchos actúan en los canales

de potasio KCNQ, por el momento estos resultados se obtienen sólo de modelos biológicos en ratones (Lewis y García, 2003; Shieh *et al.*, 2000).

Por otro lado, la presencia de canales iónicos de potasio se ha relacionado con el ciclo celular, apoptosis y oncogénesis (Pardo *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1999,). En el proceso de muerte celular programada, se lleva a cabo una degradación de macromoléculas mediante diversas enzimas como nucleasas y caspasas, ambas dependen de algunos canales iónicos de potasio para su funcionamiento (Bortner *et al.*, 1997; Hughes y Cidiowski, 1999). Se ha demostrado que la inhibición del canal Kv1.3 induce apoptosis a partir de Fas (Szabo *et al.*, 1996); y en *Drosophila*, la expresión de los genes *reaper*, *grim* o *hid*, provoca apoptosis dependiente de caspasas, el bloqueo del canal Shaker con los péptidos codificados por estos genes induce a que las células inicien con el proceso de apoptosis (Avdovin *et al.*, 1998; Shieh *et al.*, 2000).

También ha sido posible determinar que algunos canales de potasio aislados de *Drosophila*, en base al fenotipo de movimientos involuntarios anormales de las patas de las moscas bajo la influencia de éter como anestésico, conocidos como canales *ether-a-go-go* (EAG) y su contraparte en humanos el hERG, tienen un papel relevante no sólo en la expresión durante el desarrollo neuronal sino en los procesos oncogénicos, la inhibición de estos canales ocasiona que se reduzca la proliferación celular (Pardo *et al.*, 1999) como con el péptido aislado del alacrán *Centruroides noxius* Hoffman, el cual inhibe específicamente los canales EAG de diferentes especies y tejidos. Estos resultados abren la posibilidad de utilizar toxinas de origen

animal para ser utilizadas como bloqueadores de los canales EAG y hERG (Arcangeli *et al.*, 1997; Bianchi *et al.*, 1998; Gurrola *et al.*, 1999; Pardo *et al.*, 1999, Shieh *et al.*, 2000). Dado que nosotros hemos obtenido fracciones que se unen al canal Shaker, y puesto que éste proviene del mismo organismo que el EAG, las fracciones con actividad podrían ser consideradas candidatas para su evaluación como posibles bloqueadoras de canales iónicos de potasio en líneas celulares y modelos animales de distintos tipos de cáncer

Algunos canales iónicos de potasio están involucrados en el ciclo celular, por ejemplo, los canales de potasio dependientes de ATP (Klimatcheva y Wonderlin, 1999). La activación de canales Maxi K, está relacionada con el incremento en la actividad del ciclo celular en células tumorales, algunos estudios han reportado el uso de bloqueadores del canal Maxi K como la Iberiotoxina para inhibir la expansión de los gliomas (Bordey *et al.*, 2000; Ransom *et al.*, 2001), en este sentido, es importante determinar cuales son las fracciones de los minutos 20-25 y 45-50 del veneno de *Conus californicus* que ocasionan un bloqueo en el canal Hslo (Maxi K), ya que podrían ser probadas como inhibidores potenciales de la proliferación celular en líneas celulares de cáncer.

VI.4 Generación de una Biblioteca de ADNc de las Conotoxinas de *Conus californicus*

La obtención de la biblioteca de ADNc de las conotoxinas de este caracol, nos permitirá comparar la secuencia de las fracciones con actividad bloqueadora

obtenidas en este trabajo, contra las secuencias de las clonas de la biblioteca. Una vez comparadas, puede ser posible clonaras en un sistema de expresión heterólogo adecuado y obtenerlas en cantidades suficientes para los bioensayos, sin embargo, el alto número de modificaciones post-traduccionales y la rareza de las mismas, hacen que la búsqueda de vectores sea mucho más limitada, a pesar de ello es una opción que actualmente se está evaluando.

Como se presentó en la (**Tabla VIII**), la mayoría de las conotoxinas hasta ahora secuenciadas apartir de la biblioteca pertenecen a las δ -conotoxinas que se unen a canales de sodio dependientes del voltaje retardando su inactivación, seguidas de las toxinas que pertenecen a la superfamilia O, la cual contiene a cuatro tipos de conotoxinas las ω , κ , μ O y δ , que bloquean canales de calcio, potasio y sodio (en el caso de las δ 'conotoxinas, retardan la inactivación de los canales); sin embargo aún no se ha definido con exactitud la familia a la cual pertenecen. Las conotoxinas menos abundantes son las ω , que bloquean canales de calcio y las que pertenecen a la superfamilia I, que bloquean canales de potasio dependientes de voltaje.

De las secuencias obtenidas de la biblioteca, sólo una pertenece a la Superfamilia I. Los miembros reportados que pertenecen a esta superfamilia son las conotoxinas ViTx y κ -BtX; se sabe que la primera fue aislada de *Conus virgo*, consta de 35 aminoácidos y 4 enlaces disulfuro e inhibe específicamente los canales de potasio de tipo Kv1.1 de rata (Kauferstein *et al.*, 2003). La conotoxina κ -BtX, se aisló de *Conus betulinus*, consta de 31 aminoácidos y 4 enlaces disulfuro, actúa como un modulador

positivo específico de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} en células adrenales cromoafines de rata (Fan *et al.*, 2003; Harvey, 1997; Jiménez *et al.*, 2003; Terlau y Olivera, 2003).

La secuencia de la conotoxina de *C. californicus*, que pertenece a la superfamilia I (CI 11.1), es la siguiente:

FNENLSELNSACDDAWETCAWSRTCCSRNCCRGICVSRYYECP, como se observa, consta de 43 aminoácidos y 8 residuos de cisteínas que podrían formar 4 enlaces disulfuro; el patrón del arreglo de las cisteínas concuerda con las secuencias previamente reportadas para la superfamilia I (Jiménez *et al.*, 2003).

Se sabe que las toxinas que se unen a canales iónicos de potasio contienen entre 20 a 60 aminoácidos y forman de 2 a 4 enlaces disulfuro, a pesar de su plegamiento tienen en común determinantes moleculares como la díada funcional de aminoácidos, que contribuye a la eficiencia en la unión de la toxina con el canal (Jouirou *et al.*, 2004; Mouhat *et al.*, 2004; Rodríguez de la Vega y Possani, 2004). La díada, contiene una lisina y un residuo aromático (tirosina o fenilalanina) o alifático (leucina) separados entre sí por ~7 amstrongs (Jouirou *et al.*, 2004; Mouhat *et al.*, 2004). Si se analiza la secuencia de la conotoxina **CI 11.1**, se puede notar que carece de la lisina, la cual es uno de los residuos clave para la formación de la díada funcional, sin embargo, contiene los aminoácidos tirosina, fenilalanina y leucina, que también conforman este determinante molecular, sin embargo se ha reportado que la toxina Pi7 del alacrán *Pandius imperator*, contiene una díada funcional en la cual la lisina es sustituida por

un residuo de arginina (Delepierre *et al.*, 1999), y sí se analiza la secuencia de la clona **Cl 11.1**, se notará que contiene 4 residuos de arginina, por lo tanto no sería sorprendente que éstos pudieran formar parte de la díada funcional de aminoácidos. Sin embargo, es necesario conocer la estructura tridimensional de la conotoxina **Cl 11.1** para asegurar la premisa anterior.

Sin embargo sí la conotoxina **Cl 11.1**, careciera de uno de los aminoácidos clave para la formación de la díada funcional, existen reportes de que la conotoxina κ M-RIIK (de *Conus radiatus*) tampoco contiene la díada funcional. A pesar de esto, la conotoxina κ M-RIIK se une al canal Kv1.2 en su estado cerrado, con una IC_{50} de 300 nM, también bloquea los canales *Shaker* con una IC_{50} de 1.21 μ M y el *TShal* de trucha con una IC_{50} de ~20 nM (para el estado cerrado) (Ferber *et al.*, 2003, 2004). Lo cual nos indica que aunque este determinante molecular constituye uno de los componentes importantes para la unión de las toxinas que se unen a canales de potasio, no es indispensable para ello; lo que implica que si la conotoxina **Cl 11.1**, careciera de la díada funcional, podría ser capaz de unirse a los canales de potasio cerrados.

Sería importante, determinar el tipo de canal de potasio sobre el que actúa la conotoxina **Cl 11.1**, y establecer mediante mutaciones sitio-dirigidas los posibles aminoácidos claves para la unión, esto nos podrían aclarar la importancia de la díada de aminoácidos para este mecanismo. También es relevante definir la familia a la que pertenecen las conotoxinas de la Superfamilia O (Clonas **Cal 21, 25, 32 y 83**),

presentes en el veneno de *C. californicus*, ya que como se ha documentado pueden ser toxinas que bloqueen canales de potasio.

Por otro lado, la biblioteca de ADNc de las conotoxinas presentes en el veneno de *C. californicus*, que obtuvimos, nos permite inferir los blancos moleculares a los cuales se unen las toxinas de este caracol, evidentemente se requiere validar esta información mediante ensayos electrofisiológicos, sin embargo, algunos experimentos obtenidos en el laboratorio señalan que existen varias fracciones del veneno de *C. californicus* que bloquean los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje. Algunos experimentos del laboratorio, relacionan la actividad del veneno total a procesos de retracción del pie en caracoles de tierra *Helix aspersa*, otros experimentos sugieren que el veneno puede estar asociado a efectos citotóxicos y de proliferación celular en líneas celulares de cáncer de próstata (DU-145) y mama (SKBR-3) (Vargas, 2005). Además, existen 25 secuencias de conotoxinas que no ha sido posible determinar la familia a la cual pertenecen, pues probablemente estas toxinas pueden pertenecer a una nueva familia de conotoxinas que no ha sido reportada.

Los resultados de este trabajo se resumen en la obtención de 3 fracciones bloqueadoras del canal de potasio Shaker (minutos 5, 28 y 44) y 2 para el canal de potasio modulado por calcio Hslo (minutos 20-25 y 45-50). Los agentes bloqueadores del canal Shaker podrían utilizarse para determinar su capacidad de bloquear otros canales de la familia Kv1 que estén implicados en las patologías que

se describieron con anterioridad y además, puedan usarse en bioensayos con modelos animales de alguna de estas patologías. En el caso de las fracciones que bloquean el canal Hslo, es necesario conocer los minutos individuales que tienen un efecto bloqueador para considerar utilizarlas en estudios que evalúen su papel como agentes citotóxicos en células cancerígenas.

El determinar la secuencia de aminoácidos de las fracciones obtenidas, permitirá definir si ambos componentes son de origen peptídico, la familia a la cual pertenecen y realizando otro tipo de experimentos a futuro será posible establecer el posible patrón de enlaces disulfuro que las agrupe en alguna de las superfamilias conocidas de conotoxinas o bien definir si constituyen una nueva familia hasta ahora no reportada. Los resultados de este trabajo representan las primeras evidencias electrofisiológicas sobre la actividad del veneno de *C. californicus* en canales iónicos de potasio además, la obtención de la biblioteca contribuye en la determinación de la identidad de los componentes del veneno de este caracol que hasta ahora se desconocían.

VII. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir lo siguiente:

1.- El veneno de *Conus californicus* varia en relación a la temporada del año, esto sugiere que la caracterización temporal de los componentes del veneno deber ser prioritaria al realizar futuros estudios.

2.- Las 3 fracciones del veneno total de *Conus californicus* que bloquean parcialmente el canal Shaker IR están contenidas en los minutos 5, 28 y 44:

- a) La del minuto 5 disminuye 37.1% la corriente del canal. La recuperación de la corriente en un 100% después de retirar la fracción, sugiere que la disociación del complejo fracción-canal es completa y que se facilita por la perfusión con medio.
- b) La del minuto 28 disminuye 55% la corriente del canal. A pesar de que se realizaron varios lavados, la disociación del complejo fracción-canal no fue completa, pues la corriente final sólo se recuperó en un 50% respecto de la inicial. Esto sugiere que la fracción tiene una afinidad grande por el canal Shaker, pues sólo la mitad es capaz de disociarse.

- c) La del minuto 44 disminuye 44% la corriente del canal. La recuperación en un 80% después de varios lavados sugiere que la disociación del complejo fracción-canal se favorece por la perfusión con medio, aunque aparentemente su disociación no es total.

3.- En el veneno del caracol marino *Conus californicus* existen 2 subfracciones contenidas en los minutos 20-25 y 45-50, que disminuyen las corrientes del canal Hslo, 20% y 12% respectivamente.

4.- A partir de la biblioteca de ADNc, es posible determinar que en el veneno de *C. californicus*:

- a) Existe una toxina que pertenece a la Superfamilia I, la cual podría actuar sobre canales de potasio.
- b) Hay al menos 11 conotoxinas que pertenecen a la familia δ , que probablemente actúa sobre canales de sodio.
- c) Existe al menos una toxina que pertenece a la familia ω , la cual podría bloquear los canales de calcio dependientes de voltaje.
- d) Están presentes 4 conotoxinas que pertenecen a la Superfamilia O, pero aún no se determina cuál es el blanco al que se unen.

VIII. PERSPECTIVAS

Las perspectivas generadas a partir de los resultados de este trabajo son:

Obtener la secuencia de aminoácidos de las fracciones de los minutos 5, 28 y 44 que bloquean al canal Shaker IR.

Comparar la secuencia de las fracciones bloqueadoras, con las toxinas de la biblioteca para verificar si están contenidas en ella.

Expresar y purificar las conotoxinas obtenidas de la biblioteca de ADNc.

Evaluar el efecto de las conotoxinas recombinantes en el canal Shaker IR.

Realizar mutaciones sitio dirigidas en las conotoxinas bloqueadoras del canal Shaker y evaluarlas electrofisiológicamente para determinar los aminoácidos clave en la unión al canal.

Evaluar el efecto de las conotoxinas heterólogas en:

Canales de potasio de la familia Kv, implicados en algunas de las canalopatías mencionadas en este trabajo.

Canales iónicos de sodio y calcio.

En diferentes líneas celulares de cáncer.

En modelos biológicos para determinar si tienen alguna actividad *in vivo*.

Determinar cuáles son los factores que ocasionan la variabilidad en el veneno de *C. californicus*, evaluando parámetros como el sexo, alimentación y temporada del año en que se colecten los organismos.

IX. LITERATURA CITADA

Adelman, J. P., Bond, C. T., Pessia, M. y Maylie, J. 1995. **Episodic Ataxia Results from Voltage-Dependent Potassium Channels with Altered Functions.** *Neuron*. 15: 1449-1454.

Al-Sabi, A., Lennartz, D., Ferber, M., Gulyas, J., Rivier, J. E. F., Olivera, B. M., Carlomagno, T. y Terlau, H. 2004. **κ M-Conotoxin RIIK, Structural and Functional Novelty in a K^+ Channel Antagonist.** *Biochemistry*. 43: 8625-8635.

Arcangeli, A., Rosati, B., Cherubini, A., Crociani, O., Fontana, L., Ziller, C., Wanke, E. y Olivotto, M. 1997. **HERG- and IRK-like Inward Rectifier Currents are Sequentially Expressed During Neuronal Development of Neural Crest Cells and Their Derivates.** *European Journal of Neurosciences*. 9: 2596-2604.

Arias, H. R. y Blanton, M. P. 2000. **α -Conotoxins.** *The International Journal of Biochemistry y Cell Biology*. 32: 1017-1028.

Avdonin, V., Kasuya, J., Ciorba, M. A., Kaplan, B., Hoshi, T. y Iverson, L. 1998. **Apoptotic Proteins Reaper and Grim Induce Stable Inactivation in Voltage-Gated K^+ Channels.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 11703-11708.

Balaji, A.R., Ohtake, A., Sato, K., Gopalakrishnakone, P., Kini, M. R., Tong, S. K., y Bay, B.H. 2000. **λ -Conotoxins, a New Family of Conotoxins with Unique Disulfide Pattern and Protein Folding.** *The Journal of Biological Chemistry*. 275(50): 39516-39522.

Baukrowitz T, y Yellen G. 1995. **Modulation of KC current by frequency and external [KC]: a tale of two inactivation mechanisms.** *Neuron*. 15:951-60.

Baukrowitz T, Yellen G. 1996. **Use-dependent blockers and exit rate of the last ion from the multi-ion pore of a KC channel.** *Science*. 271:653-56.

Bianchi, L., Wible, B., Arcangeli, A., Tagliatela, M., Morra, F., Castaldo, P., Crociani, O., Rosati, B., Faravelli, L., Olivotto, M. y Wanke, E. 1998. **herg Encodes a K^+ Current Highly Conserved in Tumors of Different Histogenesis: A Selective Advantage for Cancer Cells?.** *Cancer Research*. 58: 815-822.

Boland, L. M., Price, D. L. y Jackson, K. A. 1999. **Episodic Ataxia/Myokymia Mutations Functionally Expressed in the Shaker Potassium Channel.** *Neuroscience*. 91: 1557-1564.

Bordey, A., Sontheimer, H. y Trouslard, J. 2000. **Muscarinic Activation of BK Channels Induces Membrane Oscillations in Glioma Cells and Leads to Inhibition of Cell Migration.** *The Journal of Membrane Biology*. 176: 31-40.

Bortner, C. D., Hughes, F. M. y Cidlowski, J. A. 1997. **A Primary Role for K⁺ and Na⁺ Efflux in the Activation of Apoptosis.** *Journal of Biological Chemistry*. 272: 32436-32442.

Bowersox, S. S. y Luther, R. 1998. **Pharmacotherapeutic Potential of Omega Conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-Type Neuronal Calcium Channel Blocker Found in the Venom of *Conus magus*.** *Toxicon*. 36(11): 1651-1658.

Bretschneider, F., Wrisch, A., Lehmann-Horn, F. y Grissmer, S. 1999. **Expression in Mammalian Cells and Electrophysiological Characterization of Two Mutant Kv1.1 Channels Causing Episodic Ataxia Type 1 (EA-1).** *Eur. J. Neurosci*. 11: 2403-2412.

Cahalan, M. D. y Chandy, K. G. 1997. **Ion Channels in the Immune System as Targets for Immunosuppression.** *Curr. Opin. Biotechnol*. 8: 749-756.

Cartier, G. E., Yoshikami, D., Gray, W. R., Luo, S., Olivera, B. M. y McIntosh, M. 1996. **A New α -Conotoxin which Targets $\alpha 3\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors.** *The Journal of Biological Chemistry*. 271(13): 7522-7528.

Chandy, K. G., Cahalan, M., Pennington, M. Norton, R. S., Wulff, H. y Gutman, G. A. 2001. **Potassium Channels in T Lymphocytes: Toxins to Therapeutic Immunosuppressants.** *Toxicon*. 39: 1269-1276.

Chandy, K. G., Wulff, H., Beeton, C., Pennington, M., Gutman, G. A. y Cahalan, M. D. 2004. **K⁺ Channels as Targets for Specific Immunomodulation.** *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 25: 281-289.

Choi, K. L., Aldrich, R. W. y Yellen, W. 1991. **Tetraethylammonium Blockade Distinguishes Two Inactivation Mechanism in Voltage-Activated K⁺ Channels.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 88: 5092-5095.

Conticello, S. G., Y. Gilad, N. Avidan, E. Ben-Asher, Z. Levy y M. Fainzilber. 2001. **Mechanism for Evolving Hypervariability: The Case of Conopeptides.** *Molecular Biology Evolution*. 18(2):120-131.

Cooper, E. C., y Jan, L.Y. 1999. **Ion Channel Genes y Human Neurological Disease: Recent Progress, Prospects, and Challenges.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:4759-4766.

- Craig, A. G., Bandyopadhyay, P. y Olivera, B. M. 1999. **Post-Translationally Modified Neuropeptides from *Conus* Venoms.** *European Journal of Biochemistry*. 264: 271-275.
- Crouzy, S., Bernéche, S. y Roux, B. 2001. **Extracellular Blockade of K⁺ Channels by TEA: Results from Molecular Dynamics Simulation of the KcsA Channel.** *Journal of General Physiology*. 118: 207-.217.
- Cruz, L. J., Gray, W. R. y Olivera, B. M. 1978. **Purification and Properties of a Myotoxin from *Conus geographus* venom.** *Arch. Biochem. Biophys.* 190: 539-548.
- Dascal, N. 2001. **Ion-Channel Regulation by G Proteins.** *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 12(9):391-398.
- Delepierre, M., Prochnicka-Chalufour, A., Boisbouvier, J. y Possani, L. D. 1999. **Pi7, an Orphan Peptide from the Scorpion *Pandinus imperator*: A ¹H-NMR Analysis Using a Nano-NMR Probe.** *Biochemistry*. 38: 16756-16765.
- Díaz, L., Meera, P., Amigo, J., Stefani, E., Alvarez, O., Toro, L. y Latorre, R. 1998. **Role of the S4 Segment in a Voltage –Dependent Calcium-Sensitive Potassium (*hSlo*) Channel.** *The Journal of Biological Chemistry*. 273(49):32430-32436.
- Duda, T. F. y Palumbi, S. R. 1999. **Molecular Genetics of Ecological Diversification: Duplication and Rapad Evolution of Toxin Genes of the Venomous Gastropod *Conus*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 6820-6823.
- Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. y MacKinnon, R. 1998. **The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity.** *Science*. 280: 69- 77.
- Fan, C. X., Chen, X. K., Zhang, C., Wang, L. X., Duan, K. L., He, L. L., Cao, Y., Liu, S. Y., Zhong, M. N., Ulens, C., Tytgat, J., Chen, J. S., Chi, C. W., y Zhou, Z. 2003. **A Novel Conotoxin from *Conus betulinus*, κ-BtX, Unique in Cysteine Pattern and in Function as a Specific BK Channel Modulator.** *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (15): 12624-12633.
- Fedida, D. y Kesketh, J. C. 2001. **Gating of Voltage–Dependent Potassium Channels.** *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 75: 165-199.
- Ferber, M., Al-Sabi, A., Stocker, M., Olivera, B. M., y Terlau, H. 2004. **Identification of a Mammalian Target of κM-Conotoxin RIIK.** *Toxicon*. 43: 915-921.

Ferber, M., Sporning, A., Jeserich, G., Delacruz, R., Watkins, M., Olivera, B. M., y Terlau, H. 2003. **A Novel *Conus* Peptide Ligand for K⁺ Channels.** *The Journal of Biological Chemistry*. 278(4): 2177-2183.

Friederich, P. 2003. **Basic Concepts of Ion Channel Physiology and Anaesthetic Drug Effects.** *European Journal of Anaesthesiology*. 20: 343-353.

García, M. L., Galvez, A., García-Calvo, M., King, V. F., Vázquez, J., y Kaczorowski, G. J. 1991. **Use of Toxins to Study Potassium Channels.** *Journal of Bioenergetic Biomembranes*. 23(4): 615-646.

Green, W. N. 1999. **Ion Channel Assembly: Creating Structures that Function.** *Journal of General Physiology*. 113: 163-169.

Gurrola, G. B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza, A., Arcangeli, A., Olivotto, M., Possani, L.D. y Wanke, E. 1999. **A Toxin to Nervous, Cardiac and Endocrine ERG K⁺ Channels Isolated from *Centruroides noxius* Scorpion Venom.** *FASEB Journal*. 13: 953-962.

Hanna, G. D. y Strong, A. M. 1949. **West American Mollusks of the Genus *Conus*.** *Proceedings of the California Academy of Sciences*. 9: 247-322.

Harvey, A. L. 1997. **Recent Studies on Dendrotoxins and Potassium Ion Channels.** *Gen. Pharmac.* 28(1):7-12.

Harvey, A. L. 2002. **Toxins “R” Us: More Pharmacological Tools from Nature’s Superstone.** *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 23(5): 201- 203.

Hopkins, C., Grilley, M., Miller, C., Shoon, K. J., Cruz, L. J., Gray, W. R., Dykert, J., Rivier, J., Yoshikami, D. y Olivera, B. M. 1995. **A New Family of *Conus* Peptides Targeted to the Nicotinic Acetylcholine Receptor.** *The Journal of Biological Chemistry*. 27(38): 22361-22367.

Hughes, F. M. Jr. y Cidlowski, J. A. 1999. **Potassium is a Critical Regulator of Apoptotic Enzymes in vitro and in vivo.** *Advances in Enzyme Regulation*. 39: 157-171.

Isacoff, E. Y., Jan, Y. N. y Jan, L. Y. 1991. **Putative Receptor for the Cytoplasmic Inactivation Gate in the *Shaker* K⁺ Channel.** *Nature*. 353:86-90.

Jäger, H. y Grissmer, S. 2004. **Characterization of the Outer Pore Region of the Apamin-Sensitive Ca²⁺-Activated K⁺ Channel rSK2.** *Toxicon*. 43: 951-960.

Jäger, H., Rauer, H., Nguyen, A. N., Aiyar, J., Chandy, K. G. y Grissmer, S. 1998. . **Regulation of Mammalian Shaker-Related K⁺ Channels: Evidence for Non-Conducting Closed and Non-Conducting Inactivated States.** *Journal of Physiology*. 506: 291-301.

Jan, L.Y., y Jan N.Y. 1997. **Cloned Potassium Channels from Eukaryotes and Prokaryotes.** *Annual Review of Neurosciences*. 20: 91-123.

Jacobsen, R. B., Koch, E. D., Lang-Malecki, B., Stocker, M., Verhey, J., Van Wagoner, R. M., Vyazovkina, A., Olivera, B. M., y Terlau, H. 2000. **Single Amino Acid Substitutions in κ -Conotoxin PVIIA Disrupt Interaction with the Shaker K⁺ Channel.** *J. Biol. Chem.* 275: 24639-24644.

Jimenez, E. C., Shetty, R. P., Lirazan, M., Rivier, J., Walker, C., Abogadie, F. C., Yoshikami, D., Cruz, L. J., y Olivera, B. M. 2003. **Novel Excitatory Conus Peptides Define a New Conotoxin Superfamily.** *Journal of Neurochemistry*. 85:610-621.

Jones, R. M. y Bulaj, G. 2000. **Conotoxins- New Vistas for Peptide Therapeutics.** *Current Pharmaceutical Design*. 6: 1249-1285.

Jouirou, B., Mouhat, S., Andreotti, N., De Waard, M., y Sabatier, J.M. 2004. **Toxin Determinants Required for Interaction with Voltage-Gated K⁺ Channels.** *Toxicon*. 43:909-914.

Kaufenstein, S., Huys, I., Lamthanh, H., Stöcklin, R., Sotto, F., Menez, A., Tytgat, J., y Mebs, D. 2003. **A Novel Conotoxin Inhibiting Vertebrate Voltage-Sensitive Potassium Channels.** *Toxicon*. 42: 43-52.

Klimatcheva, E. y Wonderlin, W. F. 1999. **An ATP-Sensitive K⁺ Current that Regulates Progression Through Early G1 Phase of the Cell Cycle in MCF-7 Human Breast Cancer Cells.** *The Journal of Membrane Biology*. 171: 35-46.

Kohn, A. J., Nishi, M. y Pernet, B. 1999. **Snail Spears and Scimitars: A Character Analysis of Conus Radular Teeth.** *Journal of Mollusk Studies*. 65: 461-481..

Kohn, A. J., Nybakken, J. W. y Mool, V. 1972. **Radula Tooth Structure of the Gastropod *Conus imperialis*.** *Science*. 176: 49-51.

Koo, G. C., Blake, J. T., Talento, A., Nguyen, M., Lin, S., Sirotina, A., Shah, K., Mulvany, K., Hora, D. Jr., Cunningham, P., Wunderler, D. L., McManus, O. B., Slaughter, B., Bugianesi, R., Felix, J., García, M., Williamson, J., Kaczorowski, G., Sigal, N. H., Springer, M.S. y Feeny, W. 1997. **Blockade of the Voltage-**

Gated Potassium Channel Kv1.3 Inhibits Immune Response *in vivo*. *J. Immunol.* 158: 5120-5128.

Lehmann, H. F., y Jurkat, R. K. 1999. **Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease.** *Physiological Reviews.* 79(4):1317-1372.

Lewis, R. L. y García, M. L. 2003. **Therapeutic Potencial of Venom Peptides.** *Nature Reviews Drug Discovery.* 2: 790-802.

Litt, M., Kramer, P., Browne, D., Gancher, S., Brunt, E. R., Root, D., Phromchotikul, T., Cubay, C. J. y Nutt, J. 1994. **A Gene for Episodic Ataxia/Myokymia Maps to Chromosome 12p13.** *Am. J. Hum. Genet.* 55: 702-709.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S., Matsudaira, P., Baltimore, D., y Darnell, J. 2002. **“Células Nerviosas”.** En: *Biología Molecular y Celular.* Ed. Médica Panamericana. España. p. 912-967.

MacKinnon, R., Cohen, S. L., Kuo, A., Lee, A., y Chait, B. T. 1998. **Structural Conservation in Prokaryotic and Eukaryotic Potassium Channels.** *Science.* 280: 106-109.

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 calioformicus*.** *Biology Bulletin.* 203 (1): 27-41.

McIntosh, J. M., Santos, A. D. y Olivera, B. M. 1999. ***Conus* Peptides Targeted to Specific Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes.** *Annual Review of Biochemistry.* 68: 59-88.

McIntosh, J. M. y Jones, R. M. 2001. **Cone Venom-from Accidental Stings to Deliberate Injection.** *Toxicon.* 39: 1447-1451.

Meera, P., Wallner, M., Jiang, Z. y Toro, L. 1996. **A Calcium Switch for the Functional Coupling Between α (*hslo*) and β subunits ($K_{V,Ca}\beta$) of Maxi K Channels.** *FEBS Letters.* 382: 84-88.

Minor, D. L. Jr. 2001. **Potassium Channels: Life in the Post-Structural World.** *Current Opinion in Structural Biology.* 11: 408-414.

Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M. y Sabatier, J. M. 2004. **Diversity of Folds in Animal Toxins Acting on Ion Channels.** *Biochem. J.* 378: 717-726.

Nelson, L. 2004. **Venomous Snails: One Slip and You're dead...** *Nature*. 429: 798-799.

Olivera, B. M. 1999. **Conus Venom Peptides: Correlating Chemistry and Behavior.** *J. Comp. Physiol A*. 185: 353-359.

Olivera, B. M. y Cruz, L. J. 2001. **Conotoxins, in Retrospect.** *Toxicon*. 39: 7-14.

Olivera, B. M., Gray, W. R., Zeikus, R. McIntosh, J. M., Varga, J. Rivier, J. De Santos, V. y Cruz, L. J. 1985. **Peptide Neurotoxins from Fish-Hunting Cone Snails.** *Science*. 230: 1338-1343.

Olivera, B. M., Rivier, J., Clark, C., 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.

Pardo, L. A., del Camino, D., Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S. y Stühmer, W. 1999. **Oncogenic Potencial of EAG K⁺ Channels.** *The EMBO Journal*. 18: 5540-5547.

Rajendra, W., Armugam, A. y Jeyaseelan, K. 2004. **Neuroprotection and Peptide Toxins.** *Brain Research Reviews*. 45: 125-141.

Ransom, C. B. y Sontheimer, H. 2001. **BK Channels in Human Glioma Cells.** *Journal of Neurophysiology*. 85: 790-803.

Rigby, A. C., Lucas-Meunier, E., Kalume, D. E., Czerwiec, E., Hambe, B., Dahlqvist, I., Fossier, P., Baux, G., Roepstorff, P., Baleja, J. D., Furie, B. C., Furie, B. y Stenflo, J. 1999. **A Conotoxin from *Conus textile* with Unusual Posttranslational Modifications Reduces Presynaptic Ca²⁺ Influx.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 5758-5763.

Rodríguez de la Vega, R. C. y Possani, L. D. 2004. **Current Views on Scorpion Toxins Specific for K⁺ Channels.** *Toxicon*. 43: 865-875.

Sah, P. y Faber, L.E.S. 2002. **Channels Underlying Neuronal Calcium-Activated Potassium Currents.** *Progress in Neurobiology*. 66: 345-353.

Sands, S. B., Lewis, R. S. y Cahalan, M. D. 1989. **Charybdotoxin Blocks Voltage-Gated K⁺ Channels in Human and Murine T Lymphocytes.** *Journal of General Physiology*. 93: 1061-1074.

Saunders, P. R. y Wolfson, F. 1961. **Food and Feeding Behavior in *Conus californicus* Hinds, 1844.** *Veliger*. 3: 73-76.

Shieh, C. C., Coghlan, M., Sullivan, J. P. y Gopalakrishnan, M. 2000. **Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic opportunities.** *Pharmacology Review*. 52: 557-593.

Shoon, K. J., Grilley, M. M., Marsh, M., Yoshikami, D., Hall, A. R., Kurz, B., Gray, W. R., Imperial, J. S., Hillyard, D. R. y Olivera, B. M. 1995. **Purification, Characterization, Synthesis and Cloning of the Lockjaw Peptide from *Conus purpurascens* Venom.** *Bochemistry*. 34: 4913-4918.

Shoon, K. J., Stocker, M., Terlau, H., Stühmer, W., Jacobsen, R., Walker, C., Grilley, M., Watkins, M., Hillyard, D. R., Gray, W. R., y Olivera, B.M. 1998. **κ -Conotoxin PVIIA Is a Peptide Inhibiting the *Shaker* K^+ Channel.** *The Journal of Biological Chemistry*. 273(1): 33-38.

Stefani, E., Ottolia, M., Noceti, F., Olcese, R., Wallner, M., Latorre, R. y Toro, L. 1997. **Voltage-Controlled Gating in a Large Conductance Ca^{2+} -Sensitive K^+ Channel (hsl0).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:5427-5431.

Stocker, M., Hirzel, K., D'hoedt, D. y Pedarzani, P. 2004. **Matching Molecules to Function: Neuronal Ca^{2+} - Activated K^+ Channels and Afterhyperpolarizations.** *Toxicon*. 43: 933-949.

Szabo, I., Gulbins, E., Apfel, H., Zhang, X., Barth, P., Busch, A. E., Schlottmann, K., Pongs, O. y Lang, F. 1996. **Tyrosine Phosphorylation-Dependent Supression of a Voltage-Gated K^+ Channel in T Lymphocytes upon Fas Stimulation.** *Journal of Biological Chemistry*. 271: 20465-20469.

Terlau, H., Boccaccio, A., Olivera, B. M., y Conti, F. 1999. **The Block of *Shaker* K^+ Channels by κ -Conotoxin PVIIA Is State Dependent.** *J. Gen. Physiol.* 114: 125-140.

Terlau, H. y Olivera, B. M. 2003. ***Conus* Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides.** *Physiol. Review*. 84: 41-68.

Terlau, H., Shon, K. J., Grilley, M., Stocker, M., Stühmer, W. y Olivera, B. M. 1996. **Strategy for Rapid Immobilization of Prey by a Fish-Hunting Marine Snail.** *Nature*. 381: 148-151.

Terlau, H. y Stühmer, W. 1998. **Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels.** *Naturwissenschaften Review Articles*. 85: 437-444.

Toro, L., Wallner, M., Meera, P. y Tanaka, Y. 1998. **Maxi-KCa a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily.** *News Physiol. Sci.* 13: 112-117.

Vargas, G. C. 2005. **Identificación y Aislamiento de Dos Agentes Citotóxicos Provenientes del Caracol Marino *Conus californicus***. Tesis de Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología Marina. CICESE. Ensenada, B.C. México. 120 pp.

Wagner, C. A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, I. Y Bröer, S. 2000. **The Use of *Xenopus laevis* Oocytes for the Functional Characterization of Heterologously Expressed Membrane Proteins.** *Cellular Physiology and Biochemistry*. 10: 1-12.

Walker, C. S., Steel, D., Jacobsen, R. B., Lirazan, M. B., Cruz, L. J., Hooper, D., Shetty, R., DelaCruz, R. C., Nielsen, J. S., Zhou, L. M., Bandyopadhyay, P., Craig, A. G. y Olivera, B. M. 1999. **The T Superfamily of Conotoxins.** *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 30664-30671.

Wallner, M., Meera, P. y Toro, L. 1996. **Determinant for β -Subunit Regulation in High-Conductance Voltage-Activated and Ca^{2+} -Sensitive K^+ Channels: An Additional Transmembrane Region at the N Terminus.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14922-14927.

Wang, S. X., Ikeda, M. y Guggino, W. R. 2003. **The Cytoplasmic Tail of Large Conductance, Voltage-and Ca^{2+} -Activated K^+ (MaxiK) Channel is Necessary for Its Cell Surface Expression.** *The Journal of Biological Chemistry*. 278(4): 2713-2722.

Wanner, S. G., Glossmann, H., Knaus, H. G., Baker, R., Parsons, W., Rupprecht, K. M., Brochu, R., Cohen, C. J., Schmalhofer, W., Smith, M., Warren, V., García, M. L. y Kaczorowski, G. J. 1999. **WIN 17317-3, A New High-Affinity Probe for Voltage-Dependent Sodium Channels.** *Biochemistry*. 38: 11137-11146.

Weiger, T. M., Hermann, A. y Levitan, I. B. 2002. **Modulation of Calcium-Activated Potassium Channels.** *J. Comp. Physiol. A*. 188: 79-87.

Williams, K. 1997. **Modulation and Block of Ion Channels: A New Biology of Polyamines.** *Cell. Signal*. 9(1): 1-13.

Yu, S. P., Yeh, C. H., Gottron, F., Wang, X., Grabb, M. C. y Choi, D. W. 1999. **Role of the Outward Delayed Rectifier K^+ Current in Ceramide-Induced Caspase Activation and Apoptosis in Cultured Neurons.** *Journal of Neurochemistry*. 73: 933-941.

Zhou, M., Morais-Cabral, J. H., Mann, S. y MacKinnon, R. 2001. **Potassium Channel Receptor Site for the Inactivation Gate and Quaternary Amine Inhibitors.** *Nature*. 411: 657-661.

Páginas electrónicas:

<http://www.cbwinfo.com/Biological/Toxins/Conotox.html#Con1> (Agosto 2005).

<http://grimwade.biochem.unimelb.edu.au/cone/main.htm> (Agosto 2005).

http://www.divebums.com/FishID/Pages/california_cone.html (Agosto 2005).

http://www.conus_shells.com (Octubre 2004).

X. APÉNDICE 1

Preparación de Medios para Electrofisiología:

MEDIO ND-96

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN FINAL mM	CANTIDAD EN GRAMOS PARA 1L
NaCl	100	5.845g
KCl	2	0.1491
CaCl ₂	1.8	0.2646
MgCl ₂	1	0.2033
HEPES	5	1.191
pH 7.0 con NaOH 1M		
Con Gentamicina	50ug/mL	

MEDIO OR-2 LIBRE DE CALCIO

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN FINAL mM	CANTIDAD EN GRAMOS PARA 1L
NaCl	82.5	4.82
KCl	2	0.149
MgCl ₂	1	0.203
HEPES	5	1.1191
pH 7.0 con NaOH 1M		

SOLUCIONES PARA HPLC

SOLUCIÓN	COMPUESTO	PORCENTAJE FINAL EN LA SOLUCIÓN	VOLUMEN REQUERIDO PARA 500 mL DE SOLUCIÓN
A	Ácido trifluoroacético	0.12	600 µL
	H ₂ O destilada	99.88	599.4 mL
B	Acetonitrilo	0.1	500 µL
	Ácido trifluoroacético	99.9	499.5 mL

MEDIO SUPER BROTH (SB)

COMPUESTO	CANTIDAD EN GRAMOS PARA 1L
Ácido 3(N-Morfolino) Propano sulfónico (MOPS)	10
Tryptona	30
Extracto de Levadura	20
pH 7.0 con NaOH 1M	
Esterilizar en autoclave por 20 minutos a 15 psi	