

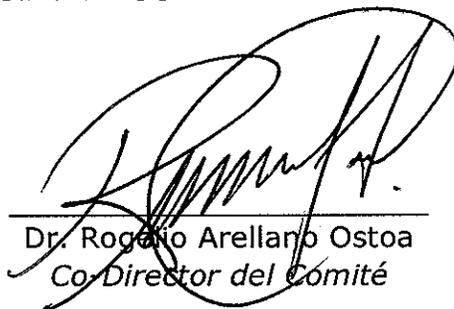
TESIS DEFENDIDA POR

Johanna Bernáldez Sarabia

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



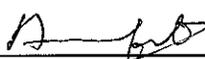
Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Co-Director del Comité



Dr. Rogelio Arellano Ostoa
Co-Director del Comité



Dr. Fernando Díaz Herrera
Miembro del Comité

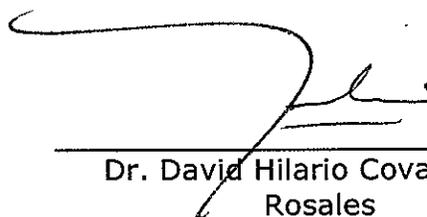


Dra. Anamaria Escófet Giansone
Miembro del Comité



Dr. Meritxell Riquelme Pérez

*Coordinador del programa de
posgrado en Ciencias*



Dr. David Hilario Covarrubias
Rosales

*Encargado del Despacho de la
Dirección de Estudios de
Posgrado*

29 de Febrero de 2008

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



CICESE

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

**CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE TOXINAS
PEPTÍDICAS DEL CARACOL MARINO *Conus californicus* EN
CANALES IÓNICOS DE CALCIO**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

JOHANNA BERNÁLDEZ SARABIA

Ensenada, Baja California, México, 29 de Febrero del 2008

RESUMEN de la tesis de **Johanna Bernáldez Sarabia**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** con orientación en **BIOTECNOLOGÍA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Febrero del 2008.

Caracterización Electrofisiológica de Toxinas Peptídicas del Caracol Marino *Conus californicus* en Canales Iónicos de Calcio

Resumen aprobado por:



Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro
Director de Tesis

Los caracoles marinos *Conus californicus* son una especie endémica de California y Baja California. De manera similar al resto del Género, *C. californicus* tiene un aparato venenoso especializado, que contiene una gran variedad de péptidos conocidos como conotoxinas. Se ha demostrado que estas conotoxinas son altamente selectivas a receptores y canales iónicos en Sistema Nervioso Central y Periférico en mamíferos.

En los últimos años, algunas enfermedades como epilepsia, ataxia cerebral y migraña, entre otras, han sido asociadas al mal funcionamiento de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Para comprender la fisiopatología de estas enfermedades, las investigaciones se han orientado preferentemente al estudio y desarrollo de nuevas moléculas moduladoras de canales iónicos como nuevas terapias farmacológicas.

En este trabajo, se determinó que en el veneno de *Conus californicus* existen toxinas que bloquean canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El efecto de las fracciones obtenidas por HPLC del veneno de estos organismos fue analizado electrofisiológicamente en canales de Ca^{2+} , empleando dos sistemas celulares. Primero, se realizó la transfección de ARNm de cerebros de ratas en ovocitos de *Xenopus laevis*, y segundo, se realizó un cultivo de neuronas ganglionares de la raíz dorsal de ratas. En el primer sistema, los resultados demostraron que el veneno de *C. californicus* contiene por lo menos una fracción, colectada en los primeros 15 minutos, con efecto modulador sobre las corrientes de Ca^{2+} , ya que se disminuye en un 70%, seguido de una recuperación parcial del 45%. Esta fracción fue re-purificada y se obtuvieron dos subfracciones que corresponden a los minutos: 5-10 y 10-15. En este caso, la fracción 10-15, disminuyó la corriente de Ca^{2+} en un 38% y mostró una recuperación de la corriente en un 82%. Posteriormente, el minuto 11 mostró una disminución de la corriente en un 66%, con una recuperación de la corriente de un 80%. Los resultados obtenidos al emplear el segundo modelo biológico mostraron ser similares.

Palabras clave: *Conus californicus*, Conotoxinas, Canales de Ca^{2+} , Electrofisiología, *Xenopus laevis*, Neuronas ganglionares de la raíz dorsal.

Abstract of the thesis presented by **Johanna Bernáldez Sarabia** as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE** degree with orientation in **MARINE BIOTECHNOLOGY**. Ensenada, Baja California, México. February 2008.

Electrophysiological Characterization of Peptidic Toxins of Marine Snail *Conus californicus* in Calcium Ion Channels

Abstract approved by:



Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Thesis Director

The Marine snail *Conus californicus* is an endemic specie from California and Baja California. Like all members of the conus Genus, *C. californicus* has a specialized venom apparatus, which contains a huge variety of small peptides called conotoxins. Some individual peptides are selectively targeted to specific receptor or ion channel isoforms, including voltage-dependent channel subtypes from mammalian Central and Peripheral Nervious Systems. A number of disorders have been associated with malfunction of voltage-dependent calcium channels, for example epilepsy, cerebellar ataxia, and migraine. Thus, calcium channels are crucial targets for pharmacological agents and discovery of novel drugs are subject of continuous research.

In the present study, we determinated that in the venom of *Conus californicus* there are toxins that blocks voltage-sensitive calcium channels. We purified different fractions of the venom of *Conus californicus* by HPLC. The fractionated venom was tested electrophysiologically on Ca^{2+} channels employing two celullar systems. The first one, was expressed in *Xenopus laevis* oocytes, using purified rat brain mRNA, and the second one, was using adult rat dorsal root ganglion neurones. On the first biological model, results demonstrated that the venom of *C. californicus* had at least one fraction collected in the first 15 minutes, which caused a significant decrease of Ca^{2+} current (70%), that was partially reverted after wash (45%). This fraction was purified, and 2 further fractions were collected corresponding to: 5-10 and 10-15 min. In this case, fraction 10-15, was able to decrease the Ca^{2+} current to 38%, with a current recovery after wash of 82%. We also analyze the individual minute 11 wich diminished the current of the Ca^{2+} channels in 66% with a current recovery of 80%. We observe similar results using the second biological model.

Keywords: *Conus californicus*, Conotoxins, Calcium channels, Electrophysiology, *Xenopus laevis*, Dorsal Root Ganglion Neurones

Este 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 Neurofisiología Celular del Instituto de Neurobiología de la U.N.A.M., bajo la co-dirección del Dr. Rogelio Arellano Ostoá. Se contó con la colaboración del Dr. Enrique Soto Eguibar del Instituto de Fisiología, U. A. P. Durante la realización de este proyecto la estudiante recibió una beca otorgada por el CONACYT con el número de registro 201532 y una extensión de beca gracias al apoyo del laboratorio Silanes al Dr. Licea.

DEDICATORIA

A mi *madre*
por su amor, enseñanza, comprensión y apoyo incondicional

a mi *padre*
por apoyarme en todo momento, por estar siempre a mi lado

a mi *hermana*
por ser mi niña, mi fortaleza

a mi *hermano*
por su cariño y apoyo

a mi *abuela*
que tanto quiero y extraño

a *Alejandra Sánchez Saavedra*
por ser mi amiga, por brindarme tu familia, por tu comprensión

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

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

Al **Dr. Alexei Licea Navarro**, por permitirme realizar este proyecto, por brindarme su dirección y apoyo en distintas circunstancias.

Al **Dr. Rogelio Arellano Ostoa**, por su dirección en la parte electrofisiológica de este proyecto.

A los miembros del comité tutorial, **Dr. Fernando Díaz Herrera** y **Dra. Anamaría Escofet Giansone**, por su excelente disposición en la revisión de este trabajo, por sus valiosos comentarios y por ser parte de este proyecto.

Al **Dr. Enrique Soto Eguibar** del Instituto de Fisiología, U. A. P. por su colaboración en la realización de este proyecto.

Al **Dr. Jesús García Valdés**, por permitirme hacer uso de su material de trabajo e instalaciones.

Al Laboratorio de **Dr. Heimer de la Cotera**, del Centro de Neurobiología en Juriquilla, Querétaro, por permitirme hacer uso de sus instalaciones en la purificación de venenos *C. californicus*.

A la **Dra. Edith Garay** y **Biol. Eunice Romero**, por su apoyo en la parte de Biología Molecular de este proyecto.

Al **M. en C. Ricardo Cruz Cruz**, por su paciencia y ayuda técnica en la parte electrofisiológica.

Al **M. en C. Eduardo Morales** y **Técnico Andrés Falcón** por estar dispuestos a ayudarme con las purificaciones en el HPLC.

A la **M. en C. Karla O. Juárez Moreno**, por su valiosa ayuda al coleccionar, extraer y purificar el veneno de los *Conus californicus*, empleado en este trabajo.

A **Horacio**, por su apoyo técnico en el desarrollo de mis ensayos electrofisiológicos.

A **Omar**, del Instituto de Fisiología, U. A. P., por su ayuda en la realización de algunos ensayos electrofisiológicos.

A **Ma. de Lourdes Lara**, por la disposición al realizar los enlaces Querétaro-Ensenada en las diferentes videoconferencias

A **Zaid Cabrera** por la ayuda en los enlaces Ensenada-Querétaro para la realización de mis tutoriales.

A **Dolores Carvajal**, por estar siempre dispuesta a ayudarme y sacarme de apuros en los trámites administrativos, por su eficiencia, gracias!

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá, por demostrarme a cada momento cuanto me quiere, por comprenderme, por esta mi lado cuando mas lo necesito. Te quiero.

A mi papá, por estar conmigo siempre, por solucionar mi vida. Te quiero.

A mi sista, por ser la enfadosa mas linda que he conocido.

A la Dra. Pilar Sánchez Saavedra, por su cariño y confianza, por permitirme convivir con su familia una de las mejores etapas de mi vida, GRACIAS!

A Ale y Alex, por hacerme sentir parte de su familia, por brindarme momentos inolvidables en Querétaro. A ti Ale, por ser tan linda conmigo, por escucharme a cualquier hora y hacerme cafecitos y desayunos los domingos; a ti Alex, por ser como un hermano para mi, los quiero y los extraño muchísimo.

Al Doc Alexei, por tantas enseñanzas... por permitirme realizar este trabajo con mis niños y la electro, por ser mi amigo en todo momento. Mil gracias por darme las fuerzas para realizar este proyecto y claro! Por apurarme con la escritura de mi tesis. Eres un jefazo.

Al Doc Rogelio, por su enorme paciencia al realizar los ensayos electrofisiológicos, por sus siempre atinados consejos en la parte experimental, en la escritura de mi tesis y en las presentaciones, GRACIAS.

A mi querido D-13, a **Eunice, Ricardo, Bere, Gina, Letty y Alex**, por ser más que compañeros de trabajo, por brindarme cada uno su amistad. GRACIAS por hacer de mi estancia en Querétaro una de las etapas mas bonitas de mi vida.

A mis compañeros del labo en CICESE, que estuvieron dispuestos a congelarse en la playa para coleccionar caracoles, a **Karla, Tania, Aidee, Omar, Michelle, Amanda, Montse, Diego y Silvia**.

Gracias...

A todos aquellos que contribuyeron a la realización de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
II.1 Los <i>Conus</i> en la historia humana.....	2
II.2 Biología del Género <i>Conus</i>	3
II.3 Aparato Venenoso de los <i>Conus</i>	6
II.4 Generalidades del Veneno de los <i>Conus</i>	9
II.5 Generalidades de las Conotoxinas.....	11
II.5.1 Precursor peptídico	12
II.5.2 Clasificación de las Conotoxinas.....	14
II.6 Características Generales de las ω -Conotoxinas.....	16
II.7 Generalidades de Canales Iónicos.....	19
II.8 Canales de Calcio Dependientes de Voltaje (CCDV)	21
II.9 Electrofisiología: Ventajas del Uso de Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> como Modelo de Estudio	24
II.10 Enfermedades Asociadas a Canales Iónicos	27
II.11 Toxinas Moduladoras de Canales de Calcio Dependientes de Voltaje ...	28
III. JUSTIFICACIÓN.....	32
IV. HIPÓTESIS.....	32
V. OBJETIVO GENERAL	33
V.1 OBJETIVOS PARTICULARES	33
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	34
VI.1 Obtención del veneno de <i>Conus californicus</i>	34
VI.2 Purificación del Extracto Total del Veneno de <i>Conus californicus</i> mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa ..	36
VI.3 Preparación de Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> para Ensayos Electrofisiológicos	37

ÍNDICE GENERAL (Continuación)

	Página
VI.4 Implementación del Sistema de Expresión Heteróloga de Canales de Calcio	37
VI.4.1 Extracción y Purificación de ARNm de Cerebro de Rata	37
VI.5 Tratamiento de Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> para Ensayos Electrofisiológicos	40
VI.6 Registro Electrofisiológico de Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	42
VI.6.1 Caracterización del ARNm de Cerebro de Rata mediante Expresión Funcional de Receptores de Membrana.....	43
VI.6.2 Caracterización del ARNm de Cerebros de rata mediante Expresión Funcional de Canales de Ca ²⁺	44
VI.6.3 Protocolo de activación de la corriente <i>Tout</i>	45
VI.7 Efecto de las Fracciones del Veneno de <i>C. californicus</i> sobre los Canales de Ca ²⁺ Expresados en Ovocitos.....	46
VI.8 Efecto de las Fracciones del Veneno de <i>C. californicus</i> sobre Canales de Ca ²⁺ de Neuronas de Ganglio de la Raíz Dorsal.....	47
VI.8.1 Cultivo Celular de Ganglio de la Raíz Dorsal de Ratas	47
VI.8.2 Registro Electrofisiológico de Neuronas Ganglionares de la Raíz Dorsal de Ratas mediante la Técnica de Control de Voltaje	48
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
VII.1 Obtención del veneno de <i>Conus californicus</i>	51
VII.2 Purificación del Extracto Total del Veneno de <i>Conus californicus</i> mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa	52
VII.3 Implementación del Sistema de Expresión Heteróloga de Canales de Calcio	56
VII.3.1 Extracción de ARN total de Cerebro de Rata	56
VII.3.2 Purificación de ARNm de Cerebro de Rata	59
VII.4 Caracterización del ARNm de Cerebros de Rata mediante Expresión Funcional de Receptores de Membrana	60
VII.5 Caracterización del ARNm de Cerebros de Mamífero mediante Expresión Funcional de Canales de Ca ²⁺	62
VII.6 Efecto de las Fracciones del Veneno de <i>Conus californicus</i> en los Canales de Ca ²⁺ utilizando la Técnica de Control de Voltaje con Dos Electroodos	65
VII.7 Efecto de las Fracciones del Veneno de <i>Conus californicus</i> colectadas cada 15 minutos sobre Canales de Ca ²⁺	66
VII.8 Efecto de las Fracciones del Veneno de <i>Conus californicus</i> colectadas cada 5 minutos	75

ÍNDICE GENERAL (Continuación)

	Página
VII.9 Efecto de las Fracciones del Veneno de <i>Conus californicus</i> Colectadas cada 1 Minuto	82
VIII. CONCLUSIONES	93
IX. PERSPECTIVAS	95
X. BIBLIOGRAFÍA	96
XI. ANEXOS	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diez conchas diferentes de caracoles marinos del Género <i>Conus</i> mostrando su diversidad de colores	2
2	Caracoles marinos de la especie <i>Conus californicus</i>	4
3	Clasificación general de los <i>Conus</i> en base a su tipo de alimentación...	5
4	Esquema general de la disposición del aparato venenoso de los caracoles del género <i>Conus</i>	6
5	Estructura general del aparato venenoso y diente radular de los caracoles marinos del género <i>Conus</i>	8
6	Esquema de la organización característica del precursor peptídico de las conotoxinas.....	13
7	Alineamiento de secuencias de aa que pertenecen a las ω conotoxinas GVIA y MVIIA.....	17
8	Representación de las estructuras tridimensionales de las ω -CTxs GVIA y MVIIA	17
9	Mecanismo de acción de conotoxinas en placa neuromuscular.....	18
10	Estructura de la subunidad α_1 , conformada por cuatro dominios homólogos (I-IV), los que a su vez están formados por 6 segmentos transmembranales (S1-S6)	23
11	Esquema general de la expresión heteróloga de proteínas en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	25
12	Esquema del dispositivo de Fijación de Voltaje por Dos Electrodo.....	26
13	Mecanismo de acción de Ziconotide.....	30
14	Fotografías que muestran el procedimiento en la obtención de ductos venenosos de <i>Conus californicus</i>	35
15	Descripción del Protocolo de pulsos cuadrados (<i>Tout</i>).....	45
16	Cromatograma del fraccionamiento por HPLC-RP del veneno total de <i>Conus californicus</i> , colectado en Noviembre del 2005.....	53
17	Cromatograma del fraccionamiento por HPLC-RP del veneno total de <i>Conus californicus</i> , colectado el mes de Noviembre del 2006.....	55
18	Fotografía de un gel de agarosa al 1.4%, teñido con bromuro de etidio (1 μ g/ μ L), cargado con 0.5 μ g de ARN total.....	58
19	Fotografía de un gel de agarosa al 1.4%, teñido con bromuro de etidio (1 μ g/ μ L), cargado con 0.5 μ g de ARNm.....	60
20	Expresión heteróloga de receptores de membrana de cerebro de rata en ovocitos de <i>X. laevis</i>	61
21	Registros típicos de corrientes de salida (<i>Tout</i>), en ovocitos inyectados con ARNm purificado de cerebro de rata.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
22	Efecto de la fracción F1 del veneno total de <i>C. californicus</i> colectado en Noviembre del 2005, utilizando el protocolo Tout para la generación de las corrientes.....	68
23	Gráfica de barras que indica en porcentaje el efecto de la fracción F1 del veneno de <i>C. californicus</i> colectado en Noviembre del 2005, sobre canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje.....	69
24	Efecto de la fracción F2 del veneno total de <i>C. californicus</i> colectado en Noviembre del 2005.....	71
25	Efecto de la fracción F3 del veneno total de <i>C. californicus</i> colectado en Noviembre del 2005.....	72
26	Efecto de la fracción F4 del veneno total de <i>C. californicus</i> colectado en Noviembre del 2005.....	73
27	Gráfica de barras que muestra la actividad de las fracciones del veneno de <i>C. californicus</i> obtenidas por HPLC-RP, colectadas cada 15 minutos, sobre los canales de Ca ²⁺	74
28	Efecto de la fracción F1.2 del veneno total de <i>C. californicus</i> colectado en Noviembre del 2005.....	76
29	Gráfica de barras que indica en porcentaje el efecto de la fracción F1.2 del veneno de <i>C. californicus</i> colectado en Noviembre del 2005, sobre canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje.....	77
30	Cromatograma correspondiente a los minutos 5 al 10 y las fracciones detectadas a 230 nm por HPLC-RP.....	78
31	Efecto de la fracción F1.3 del veneno total de <i>C. californicus</i> colectado en Noviembre del 2005.....	79
32	Gráfica de barras que indica en porcentaje el efecto de la fracción F1.3 del veneno de <i>C. californicus</i> colectado en Noviembre del 2005, sobre canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje.....	80
33	Cromatograma correspondiente a los minutos 5 al 10 y las fracciones detectadas a 230 nm por HPLC-RP.....	81
34	Curva IV que muestra el efecto de la fracción F1.3.1 del veneno total de <i>C. californicus</i> , colectado en Noviembre del 2005.....	83
35	Curva IV que muestra el efecto de la fracción F1.3.2 del veneno total de <i>C. californicus</i> , colectado en Noviembre del 2005.....	84
36	Gráfica de barras que indica en porcentaje el efecto de la fracción F1.3 del veneno de <i>C. californicus</i> colectado en Noviembre del 2005, sobre canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje.....	85
37	Cromatograma que muestra la fracción eluida en el minuto 10 y 11 detectada a 230 nm por HPLC-RP.....	86
38	Efecto de la fracción Fr 13 sobre las corrientes de Ca ²⁺	89

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
39	Gráfica de barras que muestra el porcentaje de corriente disminuida por efecto de las fracciones F1.3 (FN (10 al 15)) y por la fracción Fr13.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Determinación de la calidad de ARN total de cerebros de ratas por espectofotometría.....	57
II	Determinación de la calidad del ARNm por espectofotometría.....	59
III	Resumen del efecto de las fracciones del veneno total de <i>Conus californicus</i> obtenidas por HPLC sobre los canales de Ca ²⁺ sobre expresados en la membrana de los ovocitos.....	87

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, diversas enfermedades neuromusculares, cardíacas, ataxias, cáncer, alzheimer y epilepsias entre otras, han sido asociadas a disfunciones y mutaciones específicas de canales iónicos, conocidas como canalopatías (Herranz, 2002; Canzoniero, *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2004; Bidaud *et al.*, 2006). Han sido muchos los esfuerzos por comprender la fisiopatología de estas enfermedades, por lo que en los últimos años el estudio de éstas canalopatías se ha orientado preferentemente a la investigación de nuevas moléculas moduladoras de canales con la finalidad de entender la fisiopatología de las distintas enfermedades, así como el desarrollo de posibles fármacos como nuevas terapias farmacológicas.

Las toxinas de animales venenosos han resultado ser la mejor opción en el entendimiento de las distintas canalopatías. A este respecto, se ha dado gran relevancia al estudio de los componentes del veneno de organismos marinos como herramientas en el estudio y caracterización de una amplia variedad de canales iónicos.

Se ha demostrado que los caracoles marinos del Género *Conus* presentan en sus venenos una gran variedad de conotoxinas con capacidad moduladora sobre canales iónicos. Por lo tanto, es importante caracterizar el veneno de estos caracoles, para determinar el efecto que tienen sobre diferentes blancos moleculares.

II. ANTECEDENTES

II.1 Los *Conus* en la historia humana

La familia *Conidae* es uno de los grupos de organismos marinos que han logrado sobrevivir con gran éxito a lo largo de la historia. Se cree que la primer radiación de los *Conus* ocurrió después de la extinción de los dinosaurios y las amonitas, hace aproximadamente 50 millones de años (Kohn, 1990). Dada la variedad de colores y formas que presentan las conchas de éstos organismos, **figura 1**, los *Conus* han sido de gran valor para los coleccionistas de conchas desde civilizaciones antiguas (Terlau & Olivera 2004).

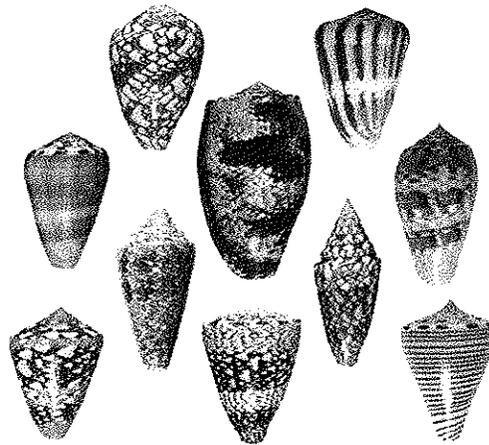


Figura 1. Diez conchas diferentes de caracoles marinos del Género *Conus* mostrando su diversidad de colores. En la fila superior, de izquierda a derecha, se muestra: *Conus textile* y *Conus magus*; en la segunda fila, de izquierda a derecha: *Conus circumcissus*, *Conus geographus* (especie responsable de la mayoría de las fatalidades humanas) y *Conus dusaveli*. En la tercer fila, de izquierda a derecha: *Conus gloriamaris*, *Conus milneedwardsi*. En la fila inferior, de izquierda a derecha, se muestra: *Conus ammiralis*, *Conus bandanus vidua* y *Conus hirasei* (Olivera, 1997).

Las diversas interacciones del humano con los *Conus* propiciaron los primeros reportes de envenenamientos causados por las picaduras de especies de *Conus* (Rumphius, 1705). De esta manera, surge el interés en la investigación de los componentes presentes en los venenos de estos caracoles.

Los primeros estudios enfocados en la farmacología de los venenos en los *Conus*, fueron realizados por Robert Endean, quien documentó que especies distintas de *Conus* podrían tener componentes biológicamente activos diferentes (Endean, 1974; 1976; 1977). Estudios más recientes, han revelado que existen de 100 a 200 componentes diferentes en el veneno de cada una de las aproximadamente 700 especies de *Conus*. De esta manera, se estima un repertorio de entre 70,000 y 140,000 componentes farmacológicamente activos en el género *Conus* (Norton y Olivera, 2006).

II.2 Biología del Género *Conus*

El hábitat preferente de los *Conus* son las comunidades arrecifales y el marino tropical a profundidades mayores de 100 m. Los hábitos alimenticios de estos organismos suelen ser nocturnos, mientras que de día son localizados generalmente entre la arena, cerca de corales o rocas. En la actualidad, el género *Conus* se destaca por ser uno de los principales depredadores en sus nichos ecológicos empleando diversas estrategias de caza (Olivera, *et al.*, 1990).

Una clasificación general de los *Conus*, se basa en su dieta principal, entre ellas se encuentran: 1) las especies vermívoras, que forman el grupo más grande, con preferencia por gusanos poliquetos; 2) las especies moluscívoras, o depredadores de otras especies de gasterópodos, y 3) las especies piscívoras, que depredan peces (Kohn, 1956; Olivera, 1997).

Por otro lado, la especie *Conus californicus* presenta características biológicas opuestas al resto del género. Estos moluscos, mostrados en la **Figura 2**, son localizados en climas fríos de las costas de California y Baja California, por lo que no interaccionan con otras especies del mismo género.

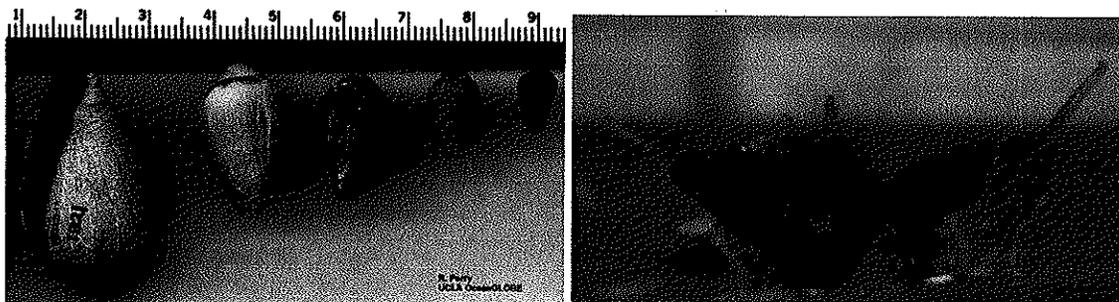


Figura 2. Caracoles marinos de la especie *Conus californicus*. La fotografía de la izquierda muestra las características morfológicas de *C. californicus*. Las conchas son de forma cónica, de 1 a 4 cm de longitud, con superficie lisa y coloración marrón amarillento. La parte anterior es angosta, casi puntiaguda mientras que la parte posterior suele ser amplia. En su parte posterior, presenta una espira muy baja y puntiaguda. El canal donde se localiza en pie del animal presenta una abertura larga y estrecha. El pie y el sifón son de color blanco con pequeños puntos negros. Habita en la zona intermareal, entre pastos a una profundidad máxima de 30 m. En la Fotografía de la derecha se muestra unos caracoles marinos *Conus californicus* www.msc.ucla.edu

Otra característica que hace a *C. californicus* una especie atípica, son sus hábitos alimenticios diurnos. Presenta una dieta generalizada, que comprende los tres tipos de presas reportados para este género, lo que sugiere una gran habilidad de adaptación de acuerdo a la disponibilidad de sus presas (Saunders y Wolfson, 1961; Stewart y Gilly, 2005), (**figura 3**).

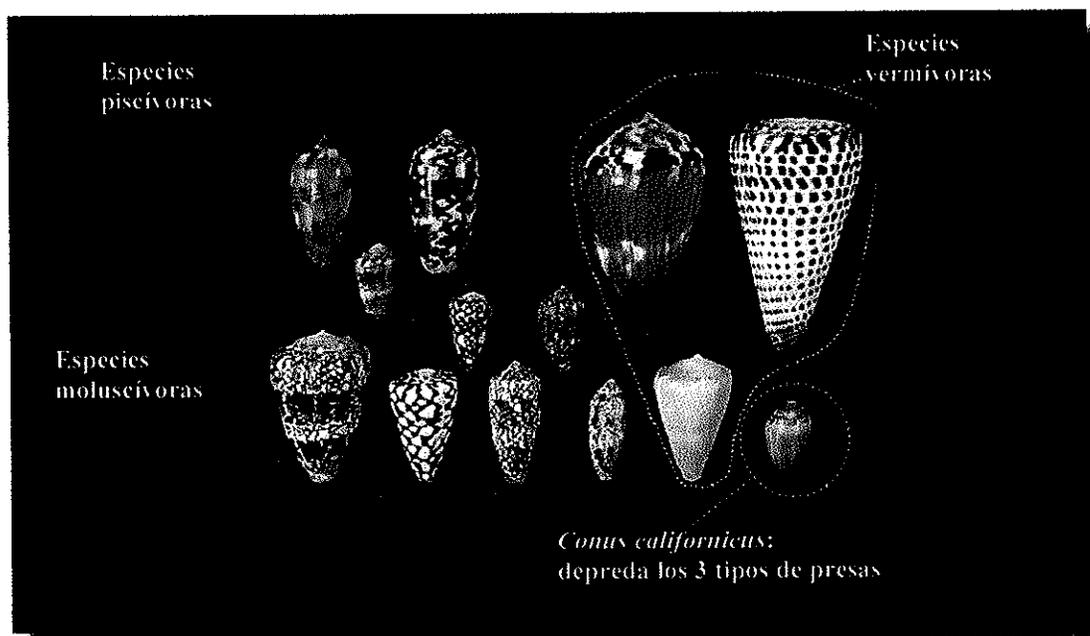


Figura 3. Clasificación general de los *Conus* en base a su tipo de alimentación. En la parte superior izquierda, se muestra un grupo de especies piscívoras que incluye más de 70 especies, como *C. geographus* y *C. magus*. En la parte superior derecha se muestra un grupo de especies vermívoras, donde se incluyen más de 150 especies, como *C. imperialis*. En la parte inferior izquierda se muestran las especies moluscívoras donde se incluyen más de 70 especies, como *C. textile*. En la parte inferior derecha, se muestra una única especie reportada, *Conus californicus*, que depreda los 3 tipos de dietas descritos para este género <http://gilly.stanford.edu/cone.html>.

Particularmente, *C. californicus* utiliza una combinación de estrategias al momento de cazar presas como peces. Estos comportamientos han sido previamente descritos para especies vermívoras y especies piscívoras (Stewart y Gilly, 2005).

Por otro lado, los síntomas ocasionados por envenenamientos de *Conus*, difieren de acuerdo a la especie, por ejemplo, se ha observado que los síntomas producidos por toxinas de caracoles piscívoros son muy diferentes de aquellos que presentan las toxinas de caracoles moluscívoros o vermívoros. El grupo de los *Conus* piscívoros son los que presentan los

venenos más potentes en mamíferos. En general, el dolor y la parálisis muscular son los síntomas más comunes (Olivera *et al.*, 1990).

II.3 Aparato Venenoso de los *Conus*

El suborden *Toxoglossa* comprende a la familia *Conidae*. Los miembros que pertenecen a este suborden se caracterizan por poseer un aparato venenoso especializado (**Figura 4**). Los *Conus* utilizan el veneno como arma fundamental en la captura de sus presas, empleando su aparato venenoso como un eficiente sistema de inyección y liberación del veneno (Terlau y Olivera, 2004).

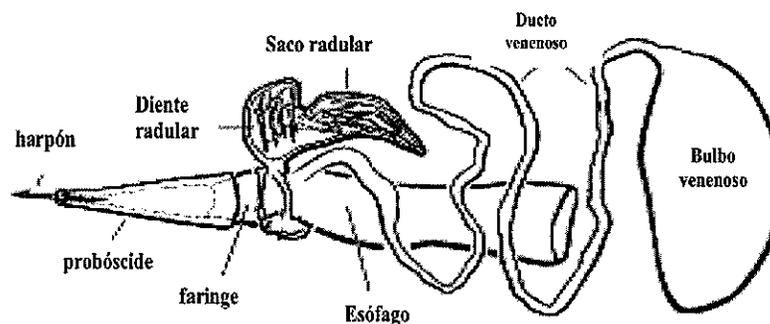


Figura 4. Esquema general de la disposición del aparato venenoso de los caracoles del género *Conus* descrito en el texto (Norton y Olivera, 2006).

El aparato venenoso consta de un ducto venenoso donde tiene lugar la síntesis y almacenamiento del veneno. La parte distal y proximal del ducto difieren en grosor y contenido de veneno. Este ducto desemboca en la faringe del organismo. En su parte proximal se encuentra equipado con un bulbo que es utilizado como reservorio del veneno.

El bulbo venenoso, es una estructura de tejido muscular desarrollado, que es utilizado para expulsar el veneno a través del ducto venenoso (Norton y Olivera, 2006). Sin embargo, se cree que la fuerza final para lograr la expulsión del veneno fuera del diente es provisto por la probóscide, al ejercer la presión necesaria para lograr su expulsión (Kohn y Hunter, 2001).

El saco radular localizado en la parte anterior de la faringe, está compuesto de un tejido ciliado en forma lineal, que posiblemente facilita la salida de las rádulas del saco radular hacia la faringe. En el saco radular se observan dos protuberancias, una larga, o brazo largo, que contiene aproximadamente 60 rádulas, y otra corta, o brazo corto, que contiene entre 10 a 12 rádulas. En el brazo largo es donde se manufacturan y almacenan los dientes. El brazo corto del saco radular contiene solo los dientes maduros que están listos para ser usados.

Las rádulas, mostradas en la **figura 5**, tienen la forma de un harpón hueco, constituidas por quitina, que sirven como agujas hipodérmicas al inyectar el veneno.

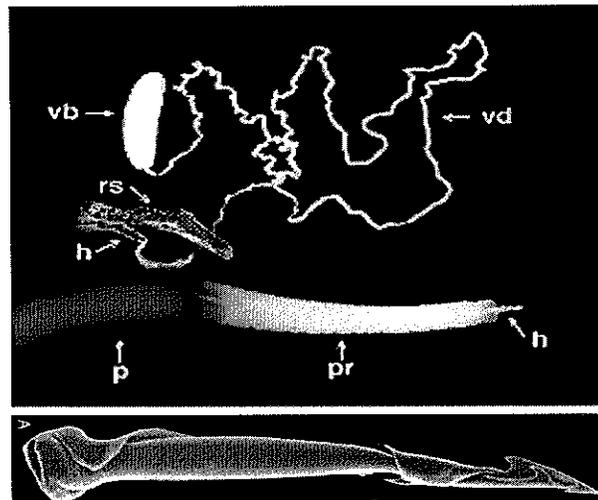


Figura 5. Estructura general del aparato venenoso y diente radular de los caracoles marinos del género *Conus*. En la figura superior se muestra una representación de la morfología general del aparato venenoso de los conus. El aparato venenoso en todos los conus comprende las siguientes estructuras: **vb**, vulvo venenoso; **vd**, ducto venenoso; **rs**, saco radular; **h**, rádulas; **p**, faringe; y **pr**, probóscide. El saco radular muestra un corte transversal para hacer visibles las rádulas (Olivera, 1997). La figura inferior muestra una micrografía electrónica de una rádula en forma de harpón de la especie *C. californicus* (Kohn *et al.*, 1999).

Estudios realizados por microscopía electrónica, muestran que en el aparato venenoso de la mayoría de las especies de *Conus*, las rádulas se cargan con el veneno cuando llegan a la faringe (Marshall *et al.*, 2002). Sin embargo, también existe evidencia histológica que indica que en el caso de *C. californicus*, las rádulas son cargadas con el veneno mientras se encuentran en el saco radular (Marshall *et al.*, 2002).

La producción y liberación del veneno en los *Conus* sigue tres pasos generales: (1) síntesis, procesamiento, y empaquetamiento de las toxinas peptídicas, (2) generación, almacenamiento de los dientes radulares y la transferencia de un diente a la extremidad de la probóscide; y finalmente, (3) la inserción del diente en la presa, seguido de la expulsión de su veneno.

II.4 Generalidades del Veneno de los *Conus*

La composición peptídica del veneno de los *Conus* se puede dividir en dos grupos (Terlau y Olivera 2004):

- 1) Conopéptidos con un enlace disulfuro (como conopresina y contrifano), o ningún enlace disulfuro (como contulacina, conantocina y conorfamida).
- 2) Conotoxinas, que son conopéptidos compuestos de múltiples enlaces disulfuro.

Además de los conopéptidos mencionados, el veneno de los *Conus* se encuentra constituido por proteínas (como fosfolipasas del tipo A₂) y componentes no peptídicos (como serotonina y ácido araquidónico) (McIntosh *et al.*, 1999). Sin embargo, los componentes peptídicos han sido los más estudiados.

La estrategia farmacológica que los *Conus* han desarrollado al interactuar con otros organismos, es la combinación de sus toxinas al momento de inyectar el veneno, para de esta manera, lograr una inmovilización rápida y contundente de la presa. Es decir, grupos de péptidos actúan de manera conjunta para lograr el mismo efecto fisiológico final, concepto conocido como “cabal”. Algunos de los factores que determinan qué tipo de cabal está presente en una especie de *Conus* es de acuerdo al tipo de presa y estrategia de caza (Olivera y Cruz, 2001).

El estudio de los cabales se inició con Craig Clark (1981), quien realizó bioensayos inyectando fracciones del veneno de *Conus*, directamente al Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos (ratones). Los bioensayos consisten, en la observación de los síntomas conductuales de los ratones, al momento de inyectar intra cranealmente (i.c.) varias dosis de fracciones del veneno.

Un ejemplo claro de la organización de los péptidos en cabales, es mostrado en una especie piscívora, *C. purpurascens*. Esta especie requiere de dos cabales para capturar a su presa, el “motor cabal” y el “lightning-strike cabal”. Cada uno de estos cabales, comprende un grupo de péptidos que actúan de manera sinérgica para lograr una parálisis neuromuscular irreversible en su presa. Los péptidos del “motor cabal” inhiben la transmisión neuromuscular, mientras que el “lightning-strike cabal” ocasiona inmovilización tetánica inmediata, lo que permite que las toxinas del “motor 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). Otro ejemplo es el “shaker cabal”, que está presente en especies como *C. magus* y *C. geographus*. Los síntomas conductuales en ratones inyectados i.c con esta fracción provoca temblores. Estudios posteriores demostraron que estos péptidos actúan específicamente en canales de calcio tipo N ($Ca_v2.2$), inhibiendo la transmisión sináptica (Olivera y Cruz, 2001).

II.5 Generalidades de las Conotoxinas

Las conotoxinas son ligandos que afectan principalmente la función de moléculas de señalización en la membrana plasmática de las células. La mayoría de los blancos moleculares son específicamente subtipos de canales iónicos, localizados principalmente en Sistema Nervioso Central y Sistema Nervioso Periférico. La característica más interesante de las conotoxinas es que logran combinar una elevada afinidad y una delicada selectividad por sus blancos moleculares. De esta manera, se ha demostrado que las conotoxinas son capaces de discriminar entre canales iónicos estrechamente relacionados y entre canales iónicos tejido-específicos, y lograr una rápida y eficiente interacción entre el ligando-receptor (Woodward *et al.*,1990).

Las conotoxinas son péptidos pequeños de entre 6-40 residuos de aminoácidos (aa). Se caracterizan por presentar en su secuencia primaria un alto porcentaje de residuos de cisteínas (22 al 50%), donde la mayoría corresponde a enlaces disulfuros (Terlau y Olivera 2004). Además, poseen numerosas e inusuales modificaciones post-transduccionales presentes en sus secuencias, que favorecen el plegamiento estable del péptido (Craig *et al.*, 1999). De esta manera, estos conopéptidos son lo suficientemente estables para resistir la degradación enzimática inducida por las proteasas presentes en los mismos ductos venenosos y las que se encuentran en la presa (Buczek *et al.*, 2005).

Las modificaciones post-transduccionales reportadas incluyen amidación del carboxilo terminal, γ carboxilación en glutaminas, sulfonación en tirosinas, bromación en triptófanos, epimerización de un aminoácido tipo L a tipo D, glicosilación en serinas y treoninas, algunas de ellas sólo han sido descritas para esta clase de péptidos (Buczek *et al.*, 2005). Las modificaciones postransduccionales descritas hasta el momento para *C. californicus* son 4-transhidroxiprolina, 6-bromotriptofano, γ -carboxiglutamato y amidación del carboxilo terminal (Biggs, comunicación personal).

La diversidad de conotoxinas, ha sido asociada a una rápida divergencia como posible estrategia en la captura de distintas presas, sumado a los cambios ambientales repentinos ocurridos en esos nichos ecológicos. Esto supone una presión selectiva en los componentes del veneno por contener toxinas que logren de manera rápida y eficiente una parálisis inmediata de la presa, valiéndose de la gran variedad de modificaciones post-traduccionales presentes en cada una de las conotoxinas (Buczek *et al.*, 2005).

II.5.1 Precursor peptídico

Cada conotoxina es codificada por un ARNm. El producto inicial de la traducción es un precursor llamado pre-propéptido, de 80 a 120 residuos de aminoácidos, como se muestra en la **Figura 6**. La organización del precursor es constante: una secuencia señal o región pre, altamente conservada en el amino terminal, con un tamaño aproximado de 20 aminoácidos; una secuencia denominada región pro, que contiene en promedio 40 aminoácidos; una secuencia donde ocurre una hidrólisis proteolítica llamada XR; y por último, en el carboxilo

terminal se encuentra lo que será la toxina madura, con un promedio de 6 a 40 aminoácidos (Buczek, *et al.*, 2005).

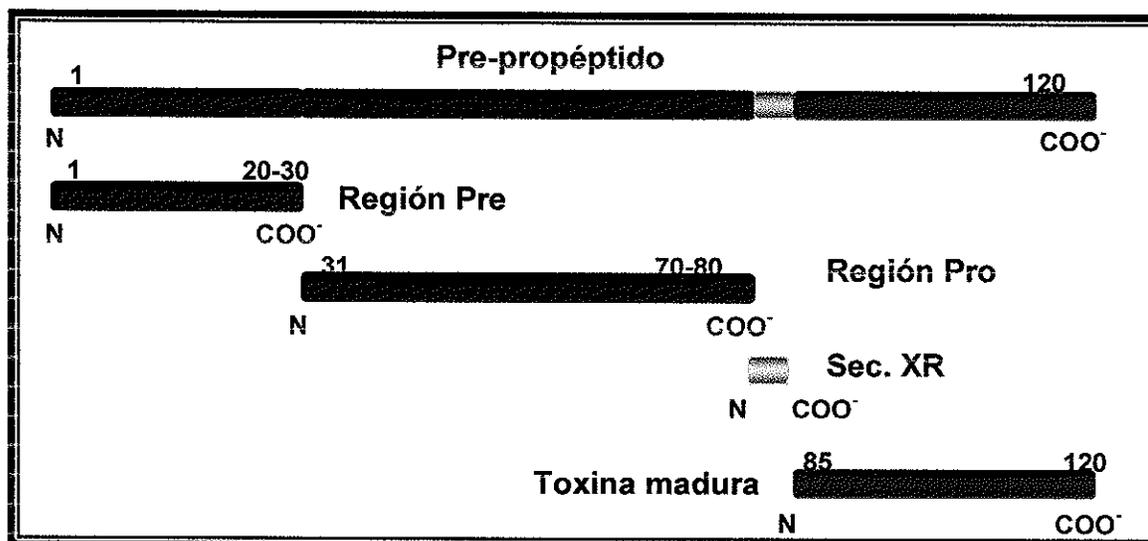


Figura 6. Esquema de la organización característica del precursor peptídico de las conotoxinas. Compuesto por una **región pre**, en el amino terminal, seguido de una **región pro**, una **región XR** donde ocurre una hidrólisis proteolítica y por último, en el carboxilo terminal se encuentra lo que será la **toxina madura**.

El péptido señal es altamente conservado entre los miembros de la misma superfamilia de conotoxinas. Por lo que la diversidad de péptidos en especies diferentes de *Conus* es aparentemente generada, por la hipermutación de la región de la toxina madura en el extremo carboxilo terminal; conservando solo la estructura básica de arreglos de cisteínas y los enlaces disulfuro que se forman entre ellas. La toxina biológicamente activa es producida por la hidrólisis proteolítica en la región-XR, paso clave en la maduración del conopéptido (Craig *et al.*, 1999; Olivera y Cruz, 2001).

II.5.2 Clasificación de las Conotoxinas

Las conotoxinas se encuentran organizadas en familias. La organización está basada en la interacción de la conotoxina con su blanco molecular, como canales iónicos y diferentes receptores de membrana. De esta manera, se conocen 12 familias de conotoxinas dirigidas a blancos moleculares como canales iónicos de Na⁺ dependientes de voltaje (CSDV), canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (CCDV), canales iónicos de K⁺ dependientes de voltaje (CPDV); y diferentes receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) y transportadores de noradrenalina, entre otros (Terlau y Olivera, 2004).

Cada familia de conotoxinas se encuentra organizada en superfamilias. Las características que definen a una superfamilia de conotoxinas, son la conservación de la secuencia señal del precursor peptídico (región pre) y el patrón de arreglos de cisteínas junto con los enlaces disulfuro que se forman entre ellas. Actualmente, han sido descritas 10 superfamilias de conotoxinas, donde destacan las superfamilias O-, A- y M-, por ser componentes predominantes en la mayoría de las especies de *Conus* (Terlau y Olivera 2004). Sin embargo, existen reportes de una nueva superfamilia solo descrita para las especies *C. litteratus* y *C. californicus* (Biggs, comunicación personal).

Los estudios más recientes de la literatura, han demostrado que *C. californicus* presenta en su veneno, solo el 50% de las secuencias señal que pertenecen a las superfamilias convencionales en la mayoría de las especies de *Conus*. A este respecto, de las superfamilias recién mencionadas como predominantes en las especies de *Conus*, solo se ha encontrado

evidencia de la presencia de la superfamilia O. Hasta el momento, no se ha encontrado una sola toxina de la superfamilia A, que generalmente codifica para la mayoría de los antagonistas de los receptores nicotínicos, tampoco se ha identificado ninguna toxina de la superfamilia M que codifica para los inhibidores de los canales de Na^+ , La presencia de una nueva superfamilia de conotoxinas en *C. californicus* combinado con la ausencia de otras superfamilias, aumenta el interés por el estudio en la caracterización bioquímica y los posibles blancos moleculares de los componentes peptídicos de esta especie (Biggs, comunicación personal).

En resumen, las conotoxinas presentan características idóneas en el uso, aplicación y desarrollo de nuevos fármacos, poseen las siguientes características 1) son péptidos pequeños con gran estabilidad estructural, 2) son ligandos específicos de canales iónicos dependientes de voltaje presentes en Sistema Nervioso Central y Sistema Nervioso Periférico; y 3) presentan gran afinidad por estos blancos moleculares (Lewis y Garcia, 2003). Debido a esto, las conotoxinas son ampliamente utilizadas en neurociencias como herramientas útiles en la investigación de la fisiología de subtipos específicos de canales iónicos, entre las que destacan las ω -conotoxinas como candidatos factibles en el desarrollo de nuevos fármacos, ya que estas están implicadas directamente en la acción moduladora de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en células neuronales.

II.6 Características Generales de las ω -Conotoxinas

Las ω -conotoxinas (ω -CTxs) son péptidos de 24-29 residuos de aminoácidos. Su secuencia primaria, presenta un arreglo de seis residuos de cisteínas (C-C-CC-C-C), estabilizados con tres enlaces disulfuro, en un patrón de enlaces 1-4/2-5/3-6. De esta manera, al igual que el resto de las conotoxinas, son moléculas estables y resistentes a altas temperaturas (Terlau y Olivera, 2004). Como grupo, las ω -CTxs se caracterizan por ser péptidos hidrofílicos, con no más de 3 aa hidrofóbicos en su secuencia (Saccomano, *et al.*, 1994). Las ω -CTxs funcionalmente homólogas, presentan gran diversidad en los aa componentes de su secuencia (**Figura 7**).

Las ω -CTxs mejor caracterizadas son: la ω -CTx GVIA, aislada de la especie *C. geographus* y la ω -CTx MVIIA, aislada de la especie *C. magus*, que bloquean selectivamente los CCDV tipo-N ($Ca_v2.2$). Tomando como ejemplo la **Figura 7**, las ω -conotoxinas tienen en común, la conservación de los 6 residuos de cisteínas y una glicina en la posición 5. Además, los residuos 2 y 24, usualmente son lisina o arginina y el residuo 18, una serina (Lew *et al.*, 1997).

El papel farmacológico de las ω -CTxs, como componentes del veneno de los *Conus*, está implicado en la acción bloqueadora de CCDV en células presinápticas, actúan en conjunto con otras toxinas que afectan canales pre- y post-sinápticos para interrumpir la conducción de los impulsos nerviosos, y así generar una parálisis motora en la presa, **Figura 9** (Olivera, *et al.*, 1997).

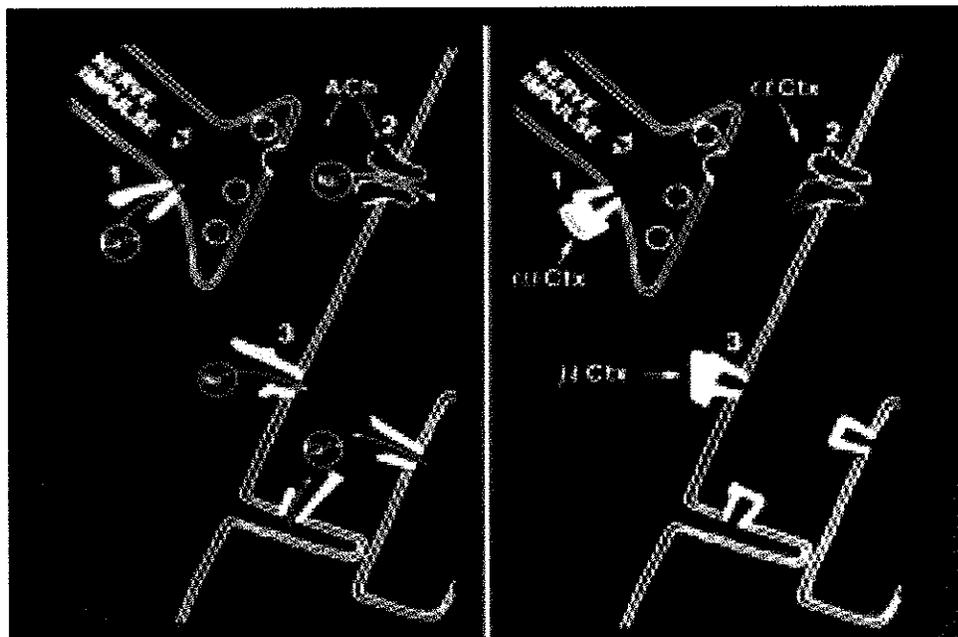


Figura 9. Mecanismo de acción de conotoxinas en placa neuromuscular. En la figura izquierda se muestra el mecanismo de acción normal para producirse una contracción muscular. En la figura derecha se observa la acción conjunta de 3 conotoxinas bloqueando sus blancos moleculares. (1) ω -CTx bloqueando los CCDV en membrana presináptica para inhibir la liberación de neurotransmisores. (2) α -CTxs y (3) μ -CTxs en membrana posináptica, bloqueando los nAChR y CSDV, respectivamente, para evitar la generación de un potencial de acción muscular. De esta manera se logra una parálisis por bloqueo neuromuscular de la presa (Olivera, 1997).

Ahora bien, considerando que las toxinas que actúan sobre canales iónicos presentan convergencias moleculares y funcionales, existe evidencia de que los blancos moleculares de estas toxinas pueden tener orígenes evolutivos comunes (Jouirou *et al.*, 2004). En este

contexto, desde el punto de vista neurobiológico y farmacológico, las ω -conotoxinas han resultado ser herramientas útiles para seleccionar, discriminar y bloquear específicamente subtipos de CCDV en células presinápticas de mamíferos. Además, se ha determinado que las ω -conotoxinas conocidas, se unen a los epítomos extracelulares de los canales de calcio, esto a sido de gran ayuda en neurociencias para la comprensión de la fisiología de los subtipos de Canales de Ca^{2+} y determinar el patrón de distribución de estos en las membranas plasmáticas.

II.7 Generalidades de Canales Iónicos

Las propiedades eléctricas de una célula derivan de su membrana. A su vez, la membrana adquiere sus propiedades eléctricas como consecuencia de sus componentes lipídicos y proteínas transmembranales facilitadoras del transporte a través de la membrana, como pueden ser proteínas cotransportadoras y canales iónicos. Los canales iónicos modulan la excitabilidad eléctrica regulando el flujo de iones a través del poro del canal, realizan esto de manera selectiva y a gran velocidad (hasta 10^6 iones por segundo), por lo que es considerado el sistema de transporte iónico más eficiente (Aidley *et al.*, 1996).

Los canales iónicos son esenciales en las células de todas las especies, su importancia fisiológica en mamíferos es la regulación de diversos procesos como la excitabilidad del nervio y el músculo, la secreción hormonal, la proliferación celular, la transducción sensorial,

el control del equilibrio del agua corporal y de los electrolitos, la regulación de la presión sanguínea e incluso procesos como el aprendizaje y la memoria.

El flujo iónico es una corriente eléctrica a través de la membrana ocasionando un efecto inmediato en el potencial de membrana (Hille *et al.*, 1992). Este flujo 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 ión particular por el potencial de membrana.

El concepto de canal iónico fue propuesto por Alan Hodgkin y Andrew Huxley (1952), en estudios sobre la naturaleza del impulso nervioso en el axón gigante de calamar, proponiendo que las corrientes de Na^+ y K^+ estaban localizadas en sitios particulares en la membrana a los cuales les llamaron “*parches activos*”. Actualmente, bien caracterizados como canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje.

Los canales iónicos poseen un poro transmembranal que está formado y rodeado por diferentes segmentos de las subunidades transmembranales del canal (Dascal, 2001). El mecanismo denominado apertura o “gating” en inglés, es referido a la propiedad de abrir o cerrar el poro. El poro abierto tiene la propiedad importante de tener permeabilidad selectiva, permitiendo el paso solo a una clase restringida de iones por difusión facilitada, esto se realiza a través del poro y a favor de su gradiente electroquímico (Hille *et al.*, 1992).

II.8 Canales de Calcio Dependientes de Voltaje (CCDV)

El ión Ca^{2+} juega un papel crucial en la regulación de una gran variedad de procesos intracelulares. El incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) es mediado por canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), que regulan el influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y/o canales de calcio dependientes de ligando (CCDL), que controlan la liberación del ión Ca^{2+} desde los almacenamientos intracelulares (Lodish *et al.*, 2005). De esta forma, los CCDV constituyen el enlace fundamental entre las señales eléctricas de la superficie de la membrana y las respuestas bioquímicas intracelulares, entre las que se incluyen, la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores, la expresión génica, la modulación de la excitabilidad de la membrana, la división celular y la muerte por apoptosis, entre otras (Lodish *et al.*, 2005; Terlau y Olivera, 2004).

De acuerdo a las propiedades básicas de los CCDV se conocen 6 tipos, los tipo-T, L, N, P, Q y R, que se distinguen por presentar diferente sensibilidad a bloqueadores farmacológicos, conductancia, cinética y dependencia de voltaje. Sin embargo, en base al rango de voltaje necesario para su activación, se clasifican en dos categorías: canales de Ca^{2+} de bajo umbral, como el canal tipo-T; mientras que los canales de tipo-L, N, P, Q y R han sido caracterizados como canales de alto umbral, por requerir grandes despolarizaciones para su activación (Mori *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que los CCDV poseen una localización del tipo tejido-específico. De esta manera, los canales tipo-T son localizados en músculo cardíaco y en algunos tipos de células de tejido nervioso. El canal tipo-L, es ampliamente distribuido en músculo esquelético, cardíaco y liso, en células endócrinas y otros tejidos. Mientras que los canales tipo N, P y Q son localizados en sistema nervioso y algunos tipos de células endócrinas. De esta manera, los CCDV tipo N están asociados directamente con la liberación de neurotransmisores en neuronas nociceptivas del sistema nervioso aferente, implicados en la transmisión del dolor nociceptivo y neuropático. Por lo que resulta atractivo a las industrias farmacéuticas, la búsqueda de moduladores específicos de estos canales como posibles fármacos analgésicos aplicados en diversas terapias farmacológicas.

La estructura general de un canal de Ca^{2+} consta de un complejo oligomérico de 4 subunidades, conocidas como α_1 , α_2 , β y δ , con un arreglo estequiométrico 1:1:1:1, y unidas por enlaces no covalentes. La subunidad α_1 es la responsable de la formación del poro hidrofóbico de conducción iónica y el plegamiento global del canal, por lo que ha sido asociada a las funciones más importantes del canal, como sensor de voltaje y receptor de la mayoría de los ligandos (Latorre *et al.*, 1996). Las subunidades auxiliares al coexpresar con la subunidad α_1 , presentan propiedades moduladoras del canal, aumentando la magnitud de la corriente iónica y modificando las propiedades cinéticas del canal.

La subunidad α_1 , como se muestra en la **Figura 10**, está compuesta por cuatro dominios homólogos (I al IV), cada uno con seis segmentos transmembranales (S1 al S6). Existe

evidencia experimental de que los segmentos transmembranales S4 son utilizados como sensores de voltaje para abrir o cerrar el canal y que las asas (o “loop” en inglés), entre los segmentos S5 y S6, forman las paredes del poro conductor (región P). Cada una de las regiones P contienen un glutamato, que forman un sitio de unión de alta afinidad para los iones Ca^{2+} (Latorre *et al.*, 1996).

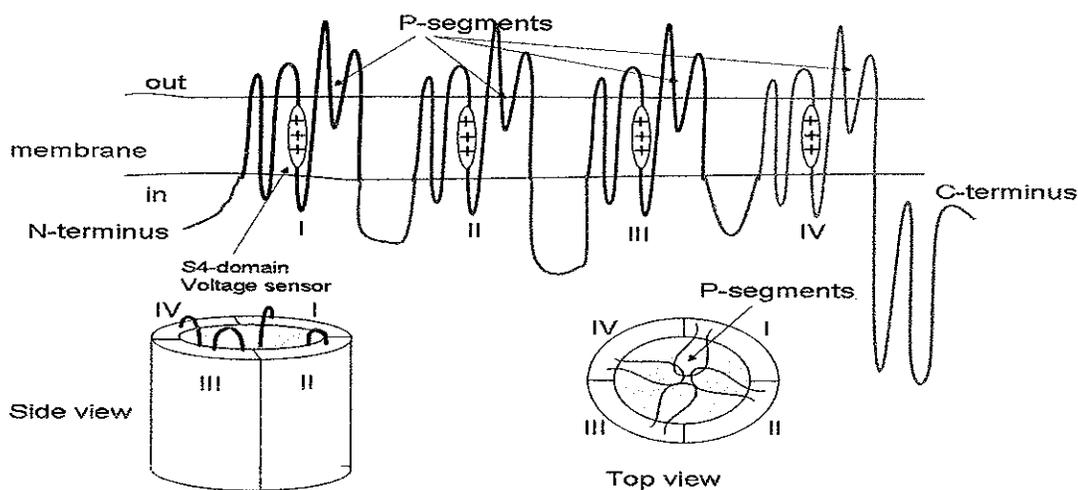


Figura 10. Estructura de la subunidad α_1 , conformada por cuatro dominios homólogos (I-IV), los que a su vez están formados por 6 segmentos transmembranales (S1-S6). En la parte inferior de la figura se muestra la formación del poro del canal. <http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/jacob/teaching/ionchan/ionchan5.html>

La heterogeneidad que caracteriza a los CCDV es atribuida a la diversidad de genes que codifican tan solo a la subunidad α_1 , sumado los múltiples tipos de subunidades accesorias y las posibles combinaciones que puedan existir entre ellas, resultando en canales funcionales con propiedades electrofisiológicas muy diversas. De esta manera, resulta de gran valor el encontrar y caracterizar ligandos que sean altamente específicos y de gran afinidad para las diferentes isoformas de canales de Ca^{2+} . Actualmente, se conocen técnicas diversas para

caracterizar ligandos y determinar una posible acción moduladora sobre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

II.9 Electrofisiología: Ventajas del Uso de Ovocitos de *Xenopus laevis* como Modelo de Estudio

En 1971 se demostró por primera vez que la inyección de ARNm de mamífero en ovocitos de *Xenopus laevis*, era correctamente incorporado a la maquinaria de síntesis proteica de la célula, de tal forma que grandes cantidades de la proteína codificada podía ser expresada por varios días en el citoplasma del ovocito (Gurdon *et al.*, 1971). A principios de la década de los 80's, se demuestra la expresión heteróloga de receptores, canales iónicos y otras proteínas del SN de mamíferos en la membrana del ovocito de *Xenopus* (Miledi *et al.*, 1982; Barnard *et al.*, 1982). Esta metodología ha permitido su aplicación en estudios electrofisiológicos, como la técnica de Control de Voltaje con Dos Electroodos. Esto ha permitido el estudio de una gran gama de moléculas expresadas en la membrana del ovocito. Se han empleado estímulos químicos para el análisis de moléculas receptoras (serotonina, GABA, acetilcolina, ácido glutámico, glicina, dopamina); o estímulos eléctricos con protocolos de pulsos para la activación de canales dependientes de voltaje (Na^+ , K^+ , Cl^- , y Ca^{2+}) (Arellano *et al.*, 1996). Otra aplicación de esta técnica, es la caracterización funcional de nuevas neurotoxinas, provenientes de distintos organismos, así como la identificación de sus blancos moleculares (Arellano *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 2001).

Los ovocitos se diferencian en seis etapas, de la etapa I a la etapa VI, donde las últimas dos etapas, V y VI, son las utilizadas para los ensayos electrofisiológicos y expresión heteróloga. Existen ventajas técnicas en el uso de ovocitos de *Xenopus laevis*. Las células maduras, correspondientes al estadio VI, llegan a alcanzar diámetros de 1.2 a 1.4 mm, por lo que son fáciles de manipular. Además, como normalmente estas células son depositadas en la naturaleza en ambientes poco favorables, son muy resistentes y están equipadas con todos los sustratos necesarios para su crecimiento y para la síntesis de proteínas. A continuación se muestra un esquema general de expresión heteróloga de proteínas en la membrana de ovocitos de *Xenopus laevis*, **Figura 11**.

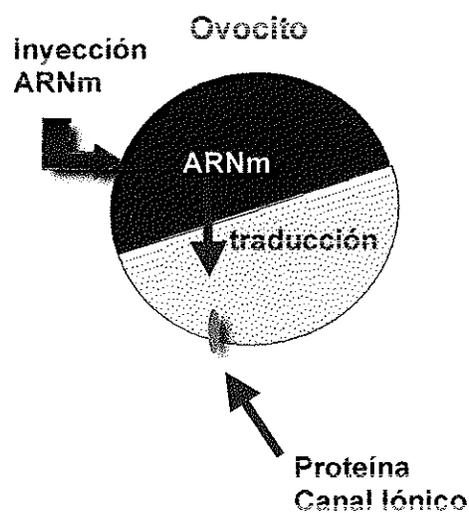


Figura 11. Esquema general de la expresión heteróloga de proteínas en ovocitos de *Xenopus laevis*.

La técnica de Control de Voltaje, es ampliamente utilizada en electrofisiología para registrar la corriente iónica transmembranal en diversas células. Debido a las características del ovocito de *Xenopus*, se utiliza la técnica de control con dos electrodos. En la **Figura 12**, se

muestra un esquema del dispositivo utilizado en esta técnica de registro. Este es un circuito eléctrico cerrado, donde son requeridos dos electrodos, uno de ellos, el electrodo 1 (E'), mide el voltaje de la célula (o potencial de la membrana); en función de este potencial, el electrodo 2 (I') inyecta una corriente eléctrica que lleva a la membrana de la célula a un potencial preestablecido. La corriente inyectada por el electrodo es controlada por un sistema de retroalimentación electrónica en el amplificador de registro, donde se mide la diferencia de potencial y se inyecta la corriente necesaria a la célula, para mantener el potencial deseado. Cualquier corriente iónica que cruce la membrana tenderá a cambiar el voltaje transmembranal y el circuito compensará este cambio inyectando corriente a través del electrodo I' . Finalmente, la corriente que cruza la membrana es medida a través de un amperímetro (I) localizado en el medio extracelular.

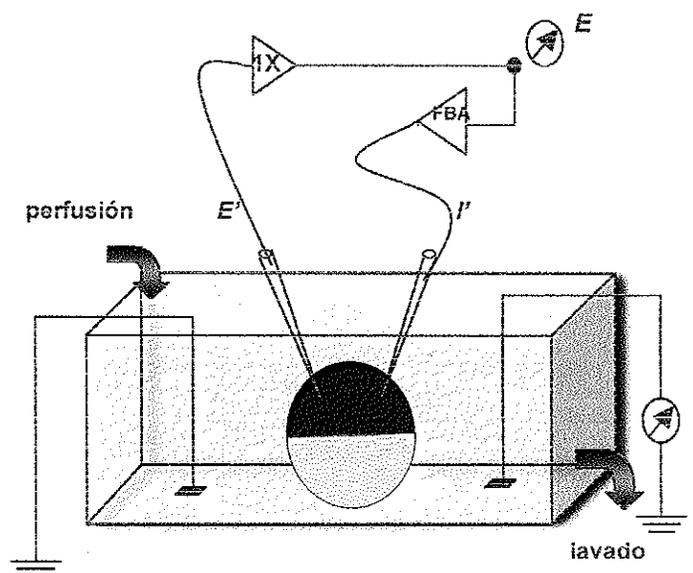


Figura 12. Esquema del dispositivo de Control de Voltaje con Dos Electrodos. Técnica utilizada para registrar la corriente iónica transmembranal en ovocitos de *Xenopus laevis*.

II.10 Enfermedades Asociadas a Canales Iónicos

En los últimos años, varias enfermedades neuromusculares, cardíacas, ataxias, cáncer, alzheimer y epilepsias entre otras, han sido asociadas a disfunciones y mutaciones específicas de canales iónicos. De esta manera, surge un nuevo concepto en la etiología de enfermedades, concepto nombrado como “canalopatías” (Herranz, 2002; Canzoniero, *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2004; Bidaud *et al.*, 2006).

Las canalopatías conocidas en las que están involucrados los canales de Ca^{2+} , incluyen desórdenes neurológicos, asociados a diferentes tipos de mutaciones en la subunidad α_1 de canales de Ca^{2+} tipo P/Q expresados en células neuronales y neuroendócrinas, como la migraña hemipléjica familiar (MHF) que se caracteriza por asociar los síntomas de una migraña (como mareo, vómito, fotofobia y fonofobia, entre otros) con parálisis corporal y en algunos casos, asociada con atrofia cerebral progresiva. La ataxia episódica tipo 2 (AE-2) es caracterizada por ataques intermitentes de ataxia cerebral, síntomas similares a una migraña y atrofia cerebral. Por otro lado, la ataxia espinocerebral tipo 6 (AEC-6), al igual que los otros desórdenes neurológicos, se caracteriza por atrofia cerebral sumado a una ataxia cerebral de progresión lenta (Mori *et al.*, 2004).

Otras canalopatías de Ca^{2+} incluyen distintos desórdenes musculares asociados a varias mutaciones en la subunidad α_1 de canales de Ca^{2+} tipo L, como la parálisis periódica hipocalcémica así como desórdenes del sistema inmunológico como el síndrome miasténico

Lambert-Eaton, miastenia grave y esclerosis lateral amiotrófica, entre otras (Mori *et al.*, 2004).

II.11 Toxinas Moduladoras de Canales de Calcio Dependientes de Voltaje

Las toxinas de animales venenosos han resultado ser la mejor opción en el entendimiento de las distintas canalopatías. Se han aislado péptidos y proteínas de animales terrestres como arañas (p. ej. ω -agatoxinas), tarántula (p. ej. SNX-482), escorpión (p. ej. kurttoxina), víbora (p. ej. calciseptina) y organismos marinos como los caracoles marinos del género *Conus*, de los cuales se han aislado más de 20 péptidos, pertenecientes a diferentes especies, con acción moduladora, altamente específica, sobre los subtipos $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ (McDonough, *et al.*, 2004)

La ω -CTx-GVIA, aislada de la especie *C. geographus*, también conocida como péptido “shaker”, es la primer conotoxina reportada con acción bloqueadora sobre CCDV en células neuronales y selectivo para canales tipo N ($Ca_v2.2$) (Olivera *et al.*, 1984). En neurociencias, el péptido GVIA es la toxina utilizada por excelencia en el estudio y comprensión de la función de los CCDV tipo N, al bloquear el canal de forma rápida, completa y permanente por varias horas bajo condiciones fisiológicas (Olivera *et al.*, 1994). La administración intratecal de GVIA, aparentemente tiene un efecto neuroprotector contra los daños producidos por una isquemia cerebral. Su papel neuroprotector tiene efecto en Sistema Nervioso Central y Periférico. Además, se ha demostrado el potencial terapéutico como

analgésico en modelos biológicos de dolor agudo y crónico (Norton *et al.*, 1999). Por otro lado, la aplicación tópica en la médula espinal, inhibe considerablemente la liberación 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).

La ω -CTx-MVIIA, aislada de la especie de *C. magus*, actúa como antagonista selectivo y específico sobre CCDV tipo N ($Ca_v2.2$); la toxina se une a su receptor de forma rápida, completa, y a diferencia de la ω -CTx-GVIA, de forma reversible transcurridos pocos minutos (Olivera *et al.*, 1985). La conotoxina sintética, Ziconotide o SNX-111, es un analgésico no opioide que actúa en los receptores del dolor (nociceptivos) bloqueando los CCDV tipo-N. En el año 2004, ziconotide fue aprobada por la FDA (siglas en inglés de Food and Drug Administration) y comercializada como *Prialt*® por *Elan Corporation* como analgésico contra el dolor crónico neuropático en pacientes con SIDA, cáncer, daño cerebral traumático, isquemia cerebral y daño en la médula espinal. La administración intratecal de Ziconotide produce analgesia bloqueando la liberación de los neurotransmisores en las vías aferentes nociceptivas primarias y previniendo la propagación de la señalización medular del dolor,

Figura 13.

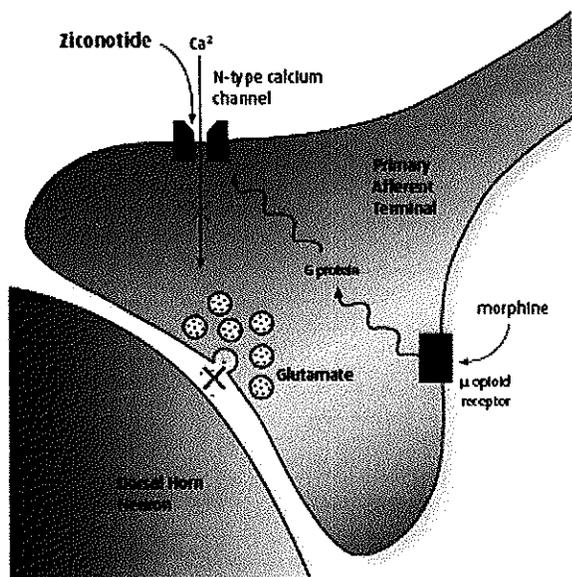


Figura 13. Mecanismo de acción de Ziconotide. La administración intratecal de la conotoxina sintética Ziconotide, actúa en los receptores nociceptivos, bloqueando los canales de Ca^{2+} y una subsecuente propagación de las señales del dolor neuropático. Ziconotide es 1000 veces más potente que la morfina además de que no causa tolerancia ni adicción. <http://www.azlink.be/>

Estudios clínicos han demostrado que una infusión intratecal continua a ≤ 100 ng/hr, produce analgesia hasta por 24 horas sin que el modelo biológico desarrolle tolerancia ni adicción, en contraste con los opioides, los cuales pierden su poder analgésico tras una infusión continua por varios días (Norton *et al.*, 1999). Hasta el momento, no se ha detectado que la toxina presente afinidad por otros canales iónicos ni interaccione con receptores colinérgicos, monoaminérgicos y peptídicos. Otra aplicación terapéutica de la conotoxina SNX-111, es su propiedad neuroprotectora. Esto se atribuye a la propiedad de la conotoxina de bloquear los CCDV neuronales e impedir el influjo excesivo de Ca^{2+} como efecto secundario después de una isquemia o trauma cerebral (Longo *et al.*, 1994).

Por otro lado, la ω -CTx-CVID, aislada de la especie *C. catus*, se encuentra en fase clínica III para el tratamiento de dolor crónico. Actualmente, la conotoxina esta siendo desarrollada por AMRAD Operations Pty. Ltd., con el nombre de AM336 (Lewis y García, 2003).

III. JUSTIFICACIÓN

En las conotoxinas se encuentran las características idóneas en la aplicación y desarrollo de nuevos fármacos. Son péptidos pequeños con gran estabilidad estructural, son ligandos específicos de canales iónicos y receptores de Sistema Nervioso Central y Periférico, y presentan gran afinidad por sus blancos moleculares.

Como se mencionó anteriormente, existe un gran número de canalopatías, para las cuales no se cuenta con ningún fármaco que actúe de manera específica. A este respecto, se ha demostrado que existen secuencias que podrían ser ω -conotoxinas en el veneno de *C. californicus*. Por tal motivo, es de suma importancia analizar electrofisiológicamente si en realidad se encuentran proteínas con la capacidad de modular los canales de Ca^{2+} para de esta manera poder analizar la factibilidad de que estas proteínas puedan funcionar como fármacos específicos en algunas de las canalopatías provocadas por el mal funcionamiento de los canales de Ca^{2+} .

IV. HIPÓTESIS

En el veneno de *Conus californicus* existe por lo menos un componente con efecto modulador sobre canales de Ca^{2+} de cerebros de ratas que son sobre expresados en la membrana de ovocitos de *Xenopus laevis* y en cultivos de neuronas ganglionares de ratas.

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar electrofisiológicamente el veneno del caracol marino *Conus californicus*, sobre canales iónicos de calcio dependientes de voltaje, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

V.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Fraccionar el extracto total del veneno de caracoles marinos *Conus californicus* por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (HPLC-RP).
 2. Implementar el sistema de expresión heteróloga de canales de calcio en ovocitos de *Xenopus laevis*.
 3. Caracterizar electrofisiológicamente las fracciones del veneno del caracol marino *Conus californicus* en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante la técnica de control de voltaje con dos electrodos.
 4. Caracterizar bioquímicamente las posibles fracciones que muestren efecto modulador sobre canales de Ca^{2+} .
-

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Obtención del veneno de *Conus californicus*

Los caracoles marinos de la especie *Conus californicus* fueron recolectados con base en las características morfológicas de la especie, en la zona costera colateral al Km 58 de la carretera Tijuana-Ensenada, Baja California, México. La colecta se realizó en la región intermareal de la zona costera (Juarez, 2005, Elliott *et al.*, 1979). Para determinar día y hora de la colecta se consultó un calendario de mareas. Los organismos recolectados fueron transportados en un contenedor con agua de mar a temperatura ambiente, para su inmediata disección.

La obtención del veneno se realizó mediante disección de los caracoles, rompiendo su concha para aislar el aparato venenoso y extraer el ducto venenoso de cada organismo (Figura 14).



Figura 14. Fotografías que muestran el procedimiento en la obtención de ductos venenosos de *Conus californicus*. En la primer fotografía, de izquierda a derecha, se observa el rompimiento de la concha de un caracol. En la segunda fotografía, de izquierda a derecha, se muestra el animal expuesto para realizar la disección del aparato venenoso. La última fotografía, de izquierda a derecha, se observa el aparato venenoso aislado, listo para ser extraído el ducto venenoso.

Los organismos utilizados en el desarrollo de este proyecto pertenecen a dos colectas diferentes. Las colectas se realizaron el mes de noviembre de los años 2005 y 2006. En cada una de las colectas se obtuvieron aproximadamente 40 especímenes.

La extracción del veneno se realizó adicionando 1 ml de solución A (**Anexo 1**) por cada 20 ductos, para después macerar los ductos venenosos con un homogenizador manual de vidrio (Wheaton). Durante la realización de esta parte del procedimiento, la muestra es mantenida en hielo. Posteriormente, la muestra se centrifugó dos veces a 10,000 x g durante 5 min, a temperatura ambiente para eliminar residuos de tejido. El sobrenadante recolectado, fue congelado a -70°C para ser liofilizado posteriormente.

El extracto total de veneno liofilizado se resuspendió en 1 ml de H_2O destilada y estéril, después fue centrifugado a 10,000 x g durante 10 min, a temperatura ambiente, recuperándose el sobrenadante. La cuantificación de proteína total se realizó por el método de Bradford-Coomasie, siguiendo las especificaciones de la casa comercial para

posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Farmacia Biotech, Ultrospec 3000).

VI.2 Purificación del Extracto Total del Veneno de *Conus californicus* mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa

El extracto total del veneno se fraccionó de acuerdo al tiempo de retención de sus componentes mediante HPLC en fase reversa, empleando 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 (**Anexo 1**). Después de equilibrar las columnas, se inyectaron de 400-500 µg de proteína total (Loop de inyección: 200 µl) del extracto total del veneno de *C. californicus*.

Las características de la estrategia empleada se describen a continuación: una vez inyectada la muestra, se realizó un lavado por 5 minutos con 100% de solución A. La muestra se eluyó a temperatura ambiente durante 60 minutos, empleando un gradiente lineal de 0 a 60% de solución B (**Anexo 2**). Se utilizó un incremento lineal de solución B de 1% por minuto con un flujo de colecta de 1 ml/min. La detección de los péptidos se realizó por absorbancia en el rango de luz UV a una longitud de onda de 230 nm. Las fracciones fueron colectadas de acuerdo a su tiempo de retención y se almacenaron a -70°C para su liofilización (liofilizadora Lyph-Lock 6, Labconco).

La estrategia experimental utilizada en el fraccionamiento del veneno total de los conus, consistió en coleccionar un conjunto de fracciones por períodos de 15 minutos (al conjunto de fracciones se le llamó “corrida”). En la segunda corrida se coleccionaron fracciones cada 5 minutos. La última corrida fue de fracciones individuales coleccionadas cada minuto.

VI.3 Preparación de Ovocitos de *Xenopus laevis* para Ensayos Electrofisiológicos

La metodología empleada en la preparación de ovocitos para ensayos electrofisiológicos fue dividida en dos partes: 1) Implementación del sistema de expresión heteróloga de canales de calcio y 2) Estudio de los ovocitos para ensayos electrofisiológicos.

VI.4 Implementación del Sistema de Expresión Heteróloga de Canales de Calcio

VI.4.1 Extracción y Purificación de ARNm de Cerebro de Rata

La extracción del ARN total de cerebro de rata se realizó utilizando el método de Chomczynski & Sacchi (1987). Los organismos fueron proporcionados por el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México (UNAM), campus Juriquilla, Querétaro. En los ensayos se utilizaron cerebros de ratas adultas (Sprague Dawley), sexo masculino y un peso aproximado de 250 g. La disección de los cerebros se realizó a partir de la decapitación de los organismos seguido inmediatamente del rompimiento de los cráneos con la ayuda de material quirúrgico. Los cerebros fueron colocados (un cerebro y medio) en tubos estériles de polipropileno de 50 ml.

Inmediatamente después, cada uno de los tubos fue sumergido en nitrógeno líquido, con la finalidad de evitar la degradación del ARN de los cerebros de rata por la acción de las ARNasas.

Los cerebros obtenidos, fueron expuestos a una solución desnaturalizante (solución D) (**Anexo 3**), adicionando 1 ml de solución por cada 100 mg de tejido, y homogenizados (homogenizador Ultraturax T25) por 1-2 minutos, a temperatura ambiente. Al homogenizado se le agregó 0.1 volumen de acetato de sodio (2M, pH 4), 1 volumen de fenol saturado con agua, y 0.2 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). La mezcla se homogenizó agitando vigorosamente el tubo por 10 segundos, seguido de incubación en hielo durante 15 minutos. La mezcla se centrifugó por 30 minutos a 9000 rpm a 4°C (centrifuga Beckman Allegra 21R, rotor C0650). La fase acuosa fue transferida a otro tubo estéril de polipropileno de 50 ml, para después adicionar un volumen igual de isopropanol. La muestra fue mezclada agitando el tubo durante 10 segundos, seguido de una incubación a -20°C por una hora. El ARN en suspensión fue recuperado por centrifugación (30 minutos/ 4°C/ 9000 rpm). Para lograr una mayor pureza del ARN extraído, la pastilla fue resuspendida en 10 ml de solución D (**Anexo 3**), agitándola vigorosamente. Una vez resuspendida la pastilla, se adicionaron 10 ml de isopropanol, mezclándose por inversión repetida del tubo, seguido de una incubación de una hora a -20°C. Nuevamente, el ARN en suspensión es recuperado por centrifugación (30 min/ 4°C/ 9000 rpm). La pastilla resultante fue lavada con etanol frío al 75% y centrifugada (30 min/ 4°C/ 9000 rpm). Una vez hecho esto, el etanol fue decantado y su remanente fue evaporado

a temperatura ambiente. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 1 ml de agua libre de ARNasas y se colocó en un tubo estéril de 2ml.

El ARN total obtenido se cuantificó por absorbancia a una longitud de onda de 260/280 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000). La muestra fue analizada cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.4 %, con tinción de bromuro de etidio. Después de su cuantificación, la muestra fue almacenada a -70°C hasta su posterior utilización.

Una vez corroborada la calidad del ARN total, se procedió a la purificación del ARNm mediante una columna de oligo (dT)-celulosa. El montaje de la columna para la purificación se describe a continuación: la columna (Poly-Prep Chromatography columns), conteniendo el oligo (dT)-celulosa (100 mg) hidratado, fue lavada sucesivamente con 4 ml de NaOH 0.5 M. En este paso, el lavado se realizó adicionando la solución de NaOH, permitiendo solo el paso de unas gotas para después sellar la columna por 30 minutos y después permitir su elusión. Posteriormente, se adicionaron aproximadamente 6-8 ml de amortiguador E (**Anexo 4**), eluyéndolo hasta lograr un de pH 7. Una vez ajustado el pH, se lavó la columna con 2 ml del amortiguador A (**Anexo 5**).

Una vez equilibrada la columna, se tomó una alícuota correspondiente a 1.2 mg de ARN total, se ajustó el volumen a 500 μL con agua libre de ARNasas y se adicionaron 500 μL de amortiguador Ax2 (**Anexo 6**) y fue calentada la muestra a 65°C por 3 min. Este proceso fue

repetido tres veces. Posteriormente, la columna se lavó de 2-3 veces con 0.5 ml de amortiguador A (**Anexo 5**). Una vez eliminado de la columna el amortiguador A, se pasaron 2 ml de amortiguador E (**Anexo 4**), en alícuotas de 500 μ l, donde se recuperó el ARNm en 4 tubos de 2 ml cada uno. A las muestras obtenidas en los tubos, se les adicionó 50 μ L de acetato de amonio 5M y 1 ml de etanol frío al 100%. Las muestras fueron incubadas a -20°C por 12 horas. Transcurrido este tiempo, las alícuotas fueron colectadas por centrifugación (Beckman Allegra 21R, rotor C0650) a 4°C/ 13,000 rpm/ 1h. El sobrenadante se decantó y fueron adicionados 200 μ l de etanol frío al 75%. Nuevamente, la muestra fue centrifugada (4°C/ 13,000 rpm/ 1h), para después decantar el etanol y evaporar su remanente. Las muestras fueron resuspendidas en 50 μ l de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). La calidad del ARNm se corroboró con los métodos descritos anteriormente para ARN total.

VI.5 Tratamiento de Ovocitos de *Xenopus laevis* para Ensayos Electrofisiológicos

Los ovocitos se obtuvieron por disección de ranas de la especie *Xenopus laevis*. La rana fue anestesiada por hipotermia, sumergiéndola en hielo por 30 minutos hasta observar pérdida de sus reflejos. Posteriormente, fue colocada en posición dorsal en una cama de hielo donde se le cubrió con el mismo, excepto en la parte baja del abdomen donde se llevó a cabo la cirugía. Los lóbulos ováricos fueron removidos quirúrgicamente, por medio de una incisión de ~1 cm y mantenidos en medio Barth (pH 7.4) (**Anexo 7**). Posterior a la cirugía, la rana fue suturada y colocada en agua para su recuperación de la anestesia e hipotermia

que le fue causada. Las ranas fueron mantenidas en estanques individuales hasta lograr su recuperación.

Los lóbulos ováricos fueron disgregados mecánicamente con pinzas de disección para exponer los ovocitos y permitir su remoción del epitelio y vasos sanguíneos. Se seleccionaron los ovocitos pertenecientes al estadio V y VI. Después de seleccionar los ovocitos, estos permanecieron incubados a 17°C en medio Barth durante un período de 12 horas.

Los ovocitos de apariencia normal fueron microinyectados con 50 ng de ARNm (~50 nl) o con agua estéril como control negativo. En este caso, fue utilizada una micropipeta de vidrio estéril (VWR International, Cat. 53432-921) adaptada a una microjeringa (Nanoliter 2000 WPI). Los ovocitos inyectados, fueron incubados a 16-18°C por un día en solución Barth (pH 7.4) para lograr su recuperación antes de ser tratados con colagenasa.

La utilización de los ovocitos para ensayos electrofisiológicos requiere que la membrana esté libre de tejidos adyacentes, células, membrana basal, y otros. Para retirar las células foliculares, se aplicó un tratamiento con colagenasa (tipo I de Sigma) a una concentración de 0.5 mg ml⁻¹ durante 40 minutos a temperatura ambiente, en solución Ringer pH 7 (**Anexo 8**) (Miledi, *et al.*, 1998). Para retirar el exceso de colagenasa, los ovocitos fueron lavados varias veces con solución Ringer y finalmente mantenidos en solución Barth (pH 7.4). En un tiempo no excedente a 24 horas, los ovocitos fueron removidos de sus capas

foliculares externas, utilizando pinzas de disección (Dumont #55, Fine Science Tools). Finalmente, los ovocitos fueron incubados nuevamente en solución Barth pH (7.4) hasta completar 4-5 días post-inyección.

VI.6 Registro Electrofisiológico de Ovocitos de *Xenopus laevis*

Los registros electrofisiológicos de ovocitos se realizaron mediante la técnica de control de voltaje. Los tubos capilares utilizados para el registro de los ovocitos (VWR International, Cat. 53432-921) con una resistencia de 1 a 1.2 M Ω fueron llenados con una solución de KCl 3M. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

Al realizar los ensayos electrofisiológicos fueron utilizados dos protocolos: 1) en la caracterización del ARNm de cerebros de ratas mediante la expresión funcional de receptores de membrana y 2) un protocolo de pulsos de voltaje diseñado para activar la corriente llamada *Tout* (o *Transient outward*) que brinda la posibilidad de determinar la expresión funcional de canales de Ca²⁺ sobre los cuales fue analizado el efecto de las fracciones del veneno de *C. californicus*.

Los registros electrofisiológicos consistieron en mantener a los ovocitos en una cámara de registro que fue perfundida continuamente con solución Ringer. Las corrientes de los ovocitos fueron registradas antes, durante y después de agregar cada una de las diferentes soluciones a probar. En todos los casos, se utilizaron ovocitos microinyectados con agua fueron utilizados como control negativo.

Para la generación de pulsos y la adquisición de los datos se utilizó el programa pClamp 8.0 (Axon Instruments). La interpretación de los datos se realizó graficando curvas de Corriente (I) contra Voltaje (V), conocidas como curvas IV, utilizando el programa Origin 7.0.

VI.6.1 Caracterización del ARNm de Cerebro de Rata mediante Expresión Funcional de Receptores de Membrana

Al inyectar el ARNm de cerebro de rata se obtiene la expresión de una gran cantidad de moléculas receptoras así como canales iónicos expresados en la membrana del ovocito (Arellano *et al.*, 1996). En este contexto, para corroborar la calidad del ARNm obtenido en los pasos anteriores (**Sección VI.4.1**), se realizó un control de expresión funcional de diversos receptores en los ovocitos inyectados con el ARNm proveniente de cerebros de ratas.

El procedimiento consistió en microinyectar un grupo de ovocitos con 50 ng de ARNm purificado. Los ovocitos fueron incubados a 17°C por un día en solución Barth (pH 7.4) para lograr su recuperación antes de ser tratados con colagenasa, como se describe en la **Sección VI.4.2**. Transcurridos 5 días post-inyección, los ovocitos fueron colocados de manera individual en la cámara de registro y sometidos a un potencial de mantenimiento de -60 mV. Posteriormente, se aplicaron diferentes agonistas de manera individual como serotonina (5-HT), GABA, acetilcolina (Ach), y ácido glutámico (GLUT). Cada uno de los agonistas fue administrado a una concentración de 1×10^{-4} M en solución Ringer por un

minuto, seguido de la perfusión de al menos 3 ml de solución Ringer para retirar los remanentes de los agonistas y determinar si la corriente inicial se recuperaba después de la perfusión. La respuesta se registró y se comparó con la corriente de los ovocitos que fueron microinyectados con 50 nl de agua.

VI.6.2 Caracterización del ARNm de Cerebros de rata mediante Expresión Funcional de Canales de Ca²⁺

Una vez corroborada la expresión funcional de receptores de membrana en los ovocitos microinyectados con el ARNm, estos fueron sometidos a un protocolo de pulsos cuadrados para registrar la corriente *Tout* (Miledi *et al.*, 1982), cuya amplitud depende de la expresión funcional de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (protocolo descrito más adelante).

El ensayo consistió en medir, en ovocitos microinyectados con ARNm de cerebro de rata, la generación de la corriente *Tout* en 3 soluciones conteniendo diferentes concentraciones de Ca²⁺, Ringer sin Ca²⁺, Ringer Normal, y Ringer con 5 mM Ca²⁺. En resumen, los ovocitos fueron perfundidos por lo menos con 3 ml de solución Ringer con una concentración de Ca²⁺ de 1.8 mM (**Anexo 8**), seguido de la aplicación del protocolo de *Tout* para realizar los registros de corriente generada en el ovocito en relación a los cambios de voltaje preestablecidos en el protocolo. En base al procedimiento anterior, también fueron registradas las corrientes generadas en el ovocito tras la aplicación de una solución Ringer con una concentración de Ca²⁺ de 5 mM (**Anexo 9**) y una solución Ringer

sin Ca^{2+} (**Anexo 10**). De esta manera fue analizada la variación en las amplitudes de las corrientes generadas a diferentes concentraciones de Ca^{2+} en la solución.

VI.6.3 Protocolo de Activación de la Corriente *Tout*

En el protocolo de pulsos de voltaje para activar la corriente *Tout* (**Figura 15**), la célula es mantenida en un potencial de -100mV (conocido como potencial de mantenimiento), seguido de la aplicación de pulsos que llevan consecutivamente el potencial desde -80 mV hasta $+60\text{ mV}$, en incrementos de 20 mV . Por lo tanto, este protocolo consta de 8 episodios con una duración de 4 segundos cada uno.



Figura 15. Descripción del Protocolo de pulsos cuadrados (*Tout*): potencial de mantenimiento de -100mV , con pulsos cuadrados de -80mV a $+60\text{mV}$, con incrementos de 20 mV , resultando en 8 episodios con una duración de 4 segundos cada uno

La generación de corriente transmembranal debido a la aplicación de este protocolo en el ovocito, se le llama *Tout*. La corriente es generada por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que permiten el influjo de este ión activando consecuentemente canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} (Miledi *et al.*, 1982). A este respecto, cabe hacer mención que la corriente mostrada en los registros obtenidos es debida, principalmente a las corrientes de salida de ión Cl^- dependientes de Ca^{2+} (ICl_{Ca}) ya que el mecanismo de activación de los canales de Cl^- funciona como una amplificación de las corrientes

acarreadas a través de los canales de Ca^{2+} , que por lo regular son de una amplitud mucho menor debido a la conductancia de los canales. Por lo tanto, la medición de la corriente Cl^- T_{out} es una manera indirecta de cuantificar la corriente generada por la activación de los canales de Ca^{2+} *per se*.

VI.7 Efecto de las Fracciones del Veneno de *C. californicus* sobre los Canales de Ca^{2+} Expresados en Ovocitos

Para probar las fracciones liofilizadas fue necesario resuspender las muestras en agua destilada y desionizada. Las fracciones fueron cuantificadas por el método de Bradford-Comassie, para conocer un estimado de la cantidad de proteína que existía en cada dilución. De esta manera, fueron perfundidas en la cámara de registro varias concentraciones de las fracciones del veneno.

El procedimiento para realizar este ensayo consistió en perfundir el ovocito con solución Ringer Normal (**Anexo 8**), y registrar la corriente T_{out} . Después, la corriente fue registrada nuevamente perfundiendo el ovocito con una solución Ringer con 5 mM de Ca^{2+} (**Anexo 9**). Un aumento considerable de la corriente (>100%) indica por lo regular que los canales responsables de la corriente de salida son efectivamente canales que acarrearán Ca^{2+} al medio intracelular y activan de esta forma los canales de Cl^- . En esta solución fueron entonces probadas las fracciones del veneno obtenidas por HPLC que fueron recolectadas cada 15 minutos, cada 5 minutos y finalmente cada minuto, para conocer de forma precisa qué fracción tenía actividad sobre las corrientes T_{out} y por lo tanto un posible efecto sobre los

canales de Ca^{2+} . En resumen, las corrientes de los ovocitos fueron registradas antes (con solución Ringer 5 mM de Ca^{2+}), durante (con solución Ringer 5 mM de Ca^{2+} más la fracción a probar) y después de agregar las fracciones del veneno de *C. californicus* (con solución Ringer 5 mM de Ca^{2+}).

VI.8 Efecto de las Fracciones del Veneno de *C. californicus* sobre los Canales de Ca^{2+} de Neuronas de Ganglio de la Raíz Dorsal

Fue utilizada otra preparación celular que expresa canales de Ca^{2+} con la finalidad de corroborar efectos de las fracciones del veneno sobre otra especie molecular. Esta preparación fue la de neuronas de ganglios de la raíz dorsal registradas con la técnica de control de voltaje en su configuración de célula completa. A continuación se describe la metodología empleada para realizar estos ensayos.

VI.8.1 Cultivo Celular de Ganglio de la Raíz Dorsal de Ratas

Los experimentos se realizaron en neuronas provenientes de los ganglios de raíz dorsal de ratas Wistar, de 5-9 días de edad, sin distinción de sexo, provenientes del Bioterio Claude Bernard de la Universidad Autónoma de Puebla. El cultivo celular se realizó en una cámara de cultivo equipada con una campana de flujo laminar seguridad I (Nuair) y una incubadora especializada con control de temperatura y CO_2 (Nuair). Todo el material utilizado en el procedimiento fue esterilizado previamente mediante su exposición a luz

ultravioleta. Las ratas fueron anestesiadas con éter y posteriormente sacrificadas por decapitación.

Para obtener las células, se realizó la disección de los ganglios de la raíz dorsal bajo microscopio estereoscópico (American Optical) utilizando técnicas quirúrgicas convencionales. Los ganglios aislados fueron mantenidos en el medio de cultivo de Leibovitz L-15 (L-15) (Invitrogen) (**Anexo 11**). Una vez obtenidos los ganglios, estos fueron depositados en un tubo estéril con 2 ml de solución de disociación (**Anexo 12**) en medio L-15. El tubo con los ganglios se incubó a 37°C en una atmósfera de CO₂ 5% durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de cultivo fresco. Posteriormente, las células fueron disociadas mecánicamente utilizando una pipeta Pasteur pulida a fuego. El producto de este procedimiento fue centrifugado durante dos minutos, seguido de un lavado con medio fresco; esta operación se efectuó tres veces. Luego del último lavado, el exceso de sobrenadante fue retirado y la suspensión celular se depositó en una caja para cultivo (Corning) con placas de vidrio de 12 x 10 mm (Corning) previamente cubiertas con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich). Las células se incubaron durante 4 a 6 horas en medio L-15 modificado (**Anexo 13**).

VI.8.2 Registro Electrofisiológico de Neuronas Ganglionares de la Raíz Dorsal de Ratas mediante la Técnica de Control de Voltaje

Cada uno de los vidrios con las neuronas adheridas a ellos fueron transportados a una cámara de perfusión montada en un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon

Diaphot). Las células se perfundieron con una solución extracelular (**Anexo 14**) diseñada para disecar eléctricamente las corrientes de Ca^{2+} . La osmolaridad de la solución fue monitoriada con un osmómetro de presión de vapor (Wescor) y ajustada con dextrosa, a 300 mOsm. Un sistema de perfusión por gravedad mantuvo constante el flujo de la solución extracelular a una tasa de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Además de este sistema de perfusión, se utilizó un sistema adicional construido con dos pipetas capilares que se ubicaron aproximadamente a 40 μm de la célula en estudio. Con este sistema la célula fue perfundida con solución extracelular o con solución extracelular más la fracción a probar, a una tasa de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Para el registro electrofisiológico, los cultivos celulares fueron observados al microscopio y fueron elegidas las células de forma redonda u ovoidea cuyo soma lucía refringente con el contraste de fases. El registro de las corrientes iónicas de Ca^{2+} se realizó a temperatura ambiente ($\sim 23\text{ }^\circ\text{C}$) usando la técnica de control de voltaje en su configuración de célula completa.

Las pipetas para registrar las células fueron fabricadas con capilares de vidrio de borosilicato (TW120-3; WPI) en un estirador horizontal (Sutter Instruments); para los experimentos se utilizaron sólo aquellas pipetas que una vez llenas, con solución intracelular, tuvieron una resistencia eléctrica entre 0.9 y 2 $\text{M}\Omega$. La solución de la pipeta (solución intracelular) fue diseñada para el registro de las corrientes de Ca^{2+} (**Anexo 15**) y

fue filtrada el día del experimento con un filtro de jeringa con diámetro de poro de 0.22 μm (Millipore).

Para los registros de corrientes iónicas de Ca^{2+} se utilizó un amplificador Axopatch-1D (Axon Instruments). La generación de pulsos y la adquisición de datos fueron controlados por el programa pClamp 8.0 (Axon Instruments), usando un sistema de adquisición de datos de 16 bits (Digidata 1320; Axon Instruments). Las señales fueron digitalizadas a 20 kHz y se filtraron a 5 kHz. La resistencia en serie se compensó electrónicamente al 80%. Fueron rechazados los experimentos para los cuales, en el pico máximo de la corriente, el error en el voltaje luego de la compensación de la resistencia en serie, excedió los 5 mV. No se realizó ninguna corrección para valores de error menores.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1 Obtención del veneno de *Conus californicus*

De acuerdo a la estrategia experimental, descrita en la **sección VI.1**, se obtuvieron 2.78 mg de proteína total de la primer colecta y 7.79 mg de proteína total de la segunda colecta, empleando el método de Bradford-Coomasie para la cuantificación bioquímica en ambos casos.

La variabilidad en la cantidad de proteína total obtenida en las dos colectas pudiera deberse, entre otras cosas, a la diferencia de tamaños de los especímenes colectados en cada caso. Debido a que en el año 2005, fueron colectados organismos que tenían conchas de 1.5 a 2 cm de longitud, mientras que en el año 2006, los organismos colectados presentaban conchas de 3.5 cm de longitud en promedio y por consecuencia, aparatos venenosos más grandes. A este respecto, los trabajos realizados previamente con esta especie, reportan especímenes colectados con conchas de 3 cm de longitud en promedio (Whysner *et al.*, 1966; Marshall *et al.*, 2002; Stewart y Gilly, 2005, Biggs, comunicación personal).

Por otro lado, considerando que una de las estrategias de caza reportadas por Olivera (1999) para esta especie, es la caza en grupo, podría inferirse que al haberse colectado organismos en etapa de vida adulta, estos realizan la mayoría de las cacería de presas

presentando una mayor producción y liberación del veneno. Sin embargo, no existen reportes que describan este tipo de comportamiento para *Conus* en relación a la etapa de vida del organismo.

VII.2 Purificación del Extracto Total del Veneno de *Conus californicus* mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa

En la purificación del veneno colectado en noviembre del 2005, como se muestra en la **Figura 16**, se obtuvieron 4 fracciones de 15 minutos cada una, que comprende los minutos: 5-15, 15-30, 30-45 y 45-60 (fracciones llamadas F1, F2, F3 y F4). El segundo conjunto de fracciones se colectó cada 5 minutos, obteniéndose 12 fracciones (muestras llamadas F1.1, F1.2, F1.3, F2.1, F2.2, F2.3, F3.1, F3.2 y F3.3). Por último, se colectaron fracciones cada minuto, de las cuales se obtuvieron aproximadamente 60 fracciones. Las muestras fueron nombradas empleando el criterio de las fracciones anteriores.

A continuación, se muestra el perfil cromatográfico del fraccionamiento del veneno total que pertenece a organismos colectados en noviembre del 2005, **Figura 16**.

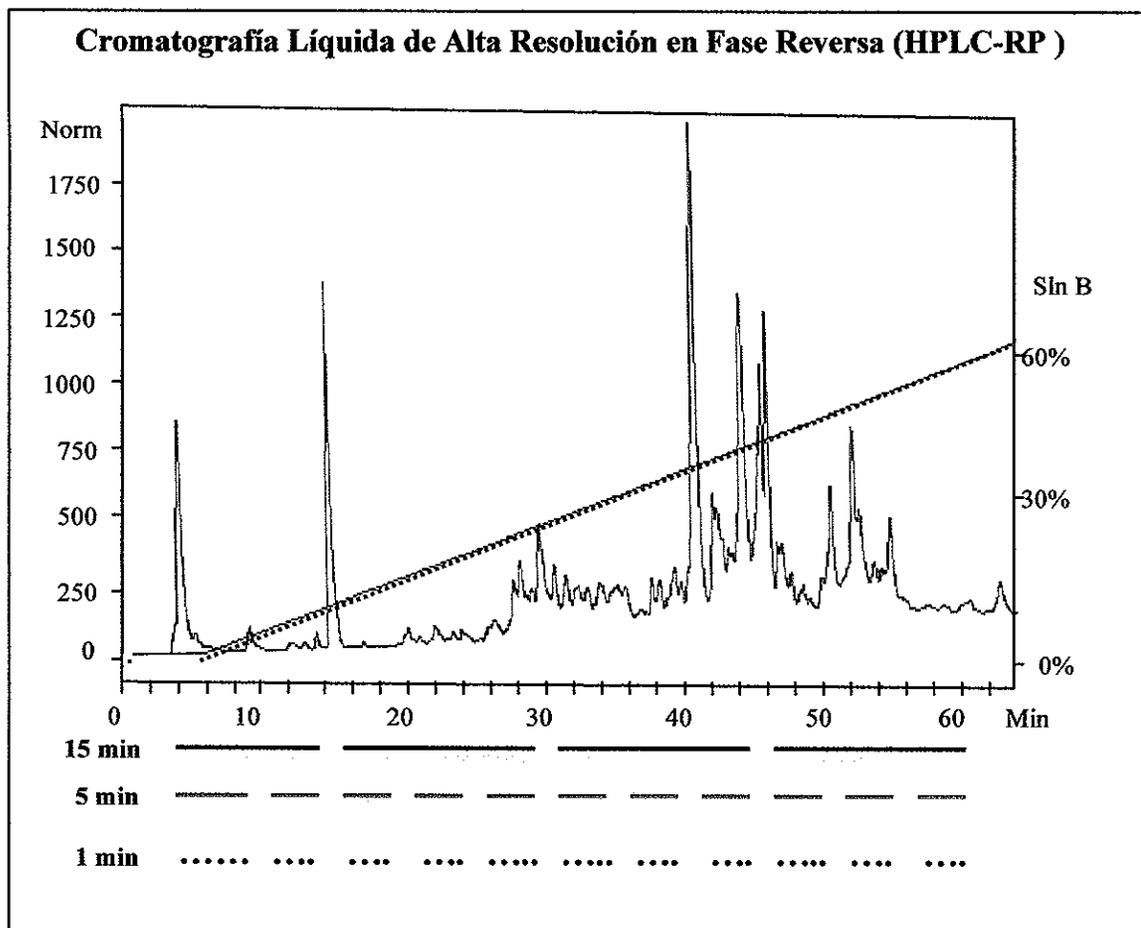


Figura 16. Cromatograma del fraccionamiento por HPLC-RP del veneno total de *Conus californicus*, colectado en Noviembre del 2005. El perfil cromatográfico corresponde a 500 μ g de proteína total inyectada en un cromatógrafo utilizando una columna C18 de fase reversa. Los primeros 5 minutos corresponden a una condición isocrática con solución A (**Anexo 1**), seguido de 60 minutos utilizando un gradiente lineal (línea punteada roja) de 0 a 60% de solución B o Sln B (**Anexo 2**) en proporción a la solución A. Los datos se presentan como la absorbancia obtenida a 230 nm (datos normalizados) contra el tiempo de retención de las fracciones obtenidas. En la parte inferior se muestra la estrategia experimental utilizada para coleccionar cada una de las fracciones.

En la purificación del veneno total, colectado en Noviembre del 2005, fueron separados 75 componentes en promedio, esto bajo las condiciones que se establecieron en el programa empleado en el HPLC. La aparente elución de pocos componentes del veneno de esta colecta, puede explicarse en relación directa con la metodología empleada, debido a que en

estudios de laboratorio realizados por Biggs, se reportan más de 150 componentes del veneno de *C. californicus* a partir de los ductos venenosos, sin embargo ellos utilizaron como método de detección del veneno, la espectrometría de masas (Biggs, comunicación personal). Por otro lado, los análisis realizados por Vargas en 2005, donde se obtuvieron aproximadamente 130 componentes del veneno empleando una purificación por HPLC-RP, fue mediante la extracción de por lo menos 3 tejidos del aparato venenoso (Vargas, 2005), nosotros solo utilizamos un tejido para la extracción del veneno.

En el momento de realizar la purificación del veneno total de los organismos colectados en noviembre del 2006, ya se contaba con algunos de los ensayos electrofisiológicos (datos mostrados más adelante) que sirvieron como resultados preliminares al momento de realizar la purificación siguiente. De esta manera, se decidió purificar el veneno colectando las fracciones que eran de interés para los diferentes ensayos electrofisiológicos en este proyecto, empleando la misma estrategia metodológica (descrita en la **sección VI.2**) para el fraccionamiento de los componentes del veneno.

A continuación se muestra el perfil cromatográfico de las fracciones del veneno total que pertenece a la colecta realizada en noviembre del 2006, **Figura 17**.

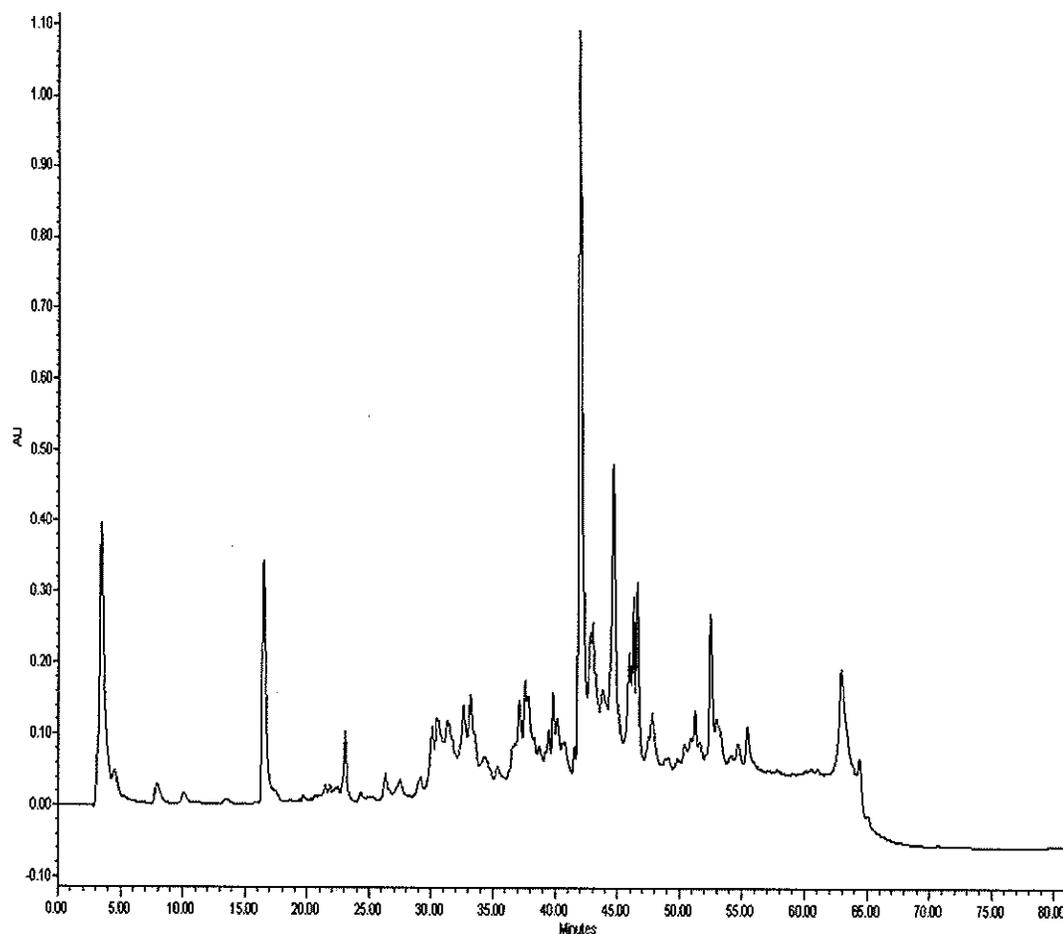


Figura 17. Cromatograma del fraccionamiento por HPLC-RP del veneno total de *Conus californicus*, colectado el mes de Noviembre del 2006. El perfil cromatográfico corresponde a 500 μ g de proteína total inyectada en un cromatógrafo utilizando una columna C18 de fase reversa. Los primeros 5 minutos corresponden a una condición isocrática con solución A (**Anexo 1**), seguido de 60 minutos utilizando un gradiente lineal (línea punteada roja) de 0 a 60% de solución B o Sln B (**Anexo 2**) en proporción a la solución A. Los datos se presentan como la absorbancia obtenida a 230 nm contra el tiempo de retención de las fracciones obtenidas.

En esta purificación realizada por HPLC del veneno total colectado en Noviembre del 2006 fueron separados 85 componentes en promedio del veneno a partir de los ductos venenosos. Para determinar la concentración de proteína presente en cada una de las fracciones

obtenidas, las muestras fueron cuantificadas nuevamente utilizando el método Bradford-Coomasie.

VII.3 Implementación del Sistema de Expresión Heteróloga de Canales de Calcio

VII.3.1 Extracción de ARN total de Cerebro de Rata

Para lograr la expresión heteróloga de canales de Ca^{2+} en las membranas de los ovocitos, se inició con la extracción del ARN total de los cerebros de ratas, empleando la técnica de Chomcynski y Sacchi (1987) como se describe en la **Sección VI.4.1**. A este respecto, es de suma importancia determinar bioquímicamente la calidad del ARN total extraído, por lo que fue cuantificada la concentración de las muestras obtenidas por espectrofotometría a una longitud de onda de 260/280 nm. De esta manera, el método nos permitió determinar además de la concentración estimada de la muestra, el grado de pureza del ARN obtenido (Sambrook y Russell, 2001). Los cálculos fueron realizados tomando en cuenta que un valor de 1 a DO_{260} corresponde aproximadamente a $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ARN.

A continuación se presenta una tabla que muestra algunas de las concentraciones obtenidas de las diferentes extracciones de ARN totales realizadas, en relación al peso del tejido (en gr) y el grado de pureza de la muestra (**Tabla I**).

Tabla I. Determinación de la calidad de ARN total de cerebros de ratas por espectofotometría. Por cada extracción se muestra el peso del tejido del que se partió para la extracción, la concentración de ARN total obtenido en mg y la pureza de la muestra. El valor de la pureza se obtiene de dividir las DO (densidades ópticas) medidas a una longitud de onda de 260/280nm, teniendo como valor igual a 2 (Sambrook y Russell, 2001).

No. de extracción	Peso del tejido (gr)	[ARNtotal] mg/ml	Pureza	Rendimiento (%)
1	1.43	1.203	1.830	0.139
2	1.48	3.696	1.942	0.451
3	1.42	2.344	1.840	0.246
4	1.52	1.913	1.897	0.132
5	1.56	5.045	1.914	0.278

Los resultados mostrados en la tabla anterior fueron analizados de acuerdo a lo descrito previamente por Sambrook y Russell en el protocolo de extracción y purificación de ARN (Sambrook y Russell, 2001). A este respecto, se considera que una muestra de ARN es pura cuando la relación es de 1.8 a 2. En relación al rendimiento esperado de las muestras, los resultados del laboratorio utilizando estos métodos de extracción, estiman un rendimiento promedio de 1mg de ARN total por 1 gr de tejido. De esta manera se logró determinar cuales muestras de los ARN totales obtenidos eran las idóneas para proseguir con la purificación del ARNm. Por lo que aquellas muestras que resultaron tener valores de pureza inferiores a 1.8 y rendimientos inferiores a los descritos, fueron descartadas para su utilización en los pasos subsecuentes.

Por otro lado, además de la cuantificación realizada a las diferentes extracciones, también fue analizada la integridad del ARN total en un gel de agarosa a una concentración de 1.4%, para corroborar que no existiera degradación de la muestra (**Figura 18**).

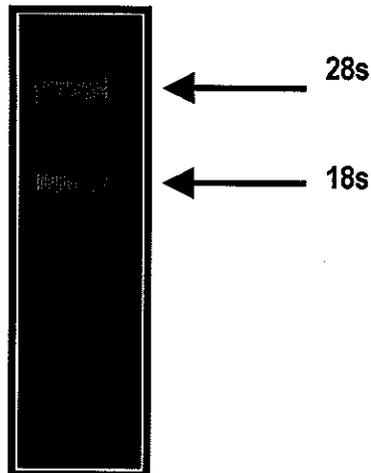


Figura 18. Fotografía de un gel de agarosa al 1.4%, teñido con bromuro de etidio ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$), cargado con $0.5\mu\text{g}$ de ARN total. En el gel se observan dos bandas bien definidas que corresponden a las subunidades 28s (banda superior) y 18s (banda intermedia) de los ARN ribosomales. En la parte inferior se observa otra banda (no tan bien definida) que corresponde a los ARN de transferencia y a ARN de pequeños nucleares (banda inferior). Estas bandas son las que ayudan a determinar si el ARN es de buena calidad.

Como se mostró en la figura anterior, el gel de agarosa cargado con $0.5\mu\text{g}$ de ARN total, no presentó degradación del material genético. Esto se pudo inferir al observar en el gel dos bandas bien definidas que corresponden a las subunidades 28s y 18s de los ARN ribosomales, seguido de una banda inferior que correspondió a los ARN de transferencia y a los ARN nucleares pequeños. De esta manera, los ARN totales que presentaron degradación de la muestra fueron descartados para los pasos subsecuentes. A través de estos análisis se determinó que la calidad y la cantidad de los ARN totales obtenidos eran adecuados para proseguir con la purificación del ARNm.

VII.3.2 Purificación de ARNm de Cerebro de Rata

Una vez corroborada la calidad de las muestras de ARN total obtenidas, se procedió a la purificación de los ARNm, mediante una columna de oligo (dT)-celulosa, empleando la metodología descrita anteriormente (**Sección VI.4.1**). La determinación de la calidad de los ARNm se realizó empleando los mismos métodos utilizados para las muestras de ARN total.

En la **Tabla II**, se presentan algunos de los resultados obtenidos, de las cuantificaciones por espectrofotometría, de las muestras de ARNm, así como el grado de pureza obtenido y el rendimiento en porcentaje:

Tabla II. Determinación de la calidad del ARNm por espectrofotometría. La tabla muestra el peso del tejido de donde se partió para la extracción del ARN total, la cantidad obtenida en μg de ARNm y su pureza. El valor de pureza del ARN se determina por el ratio de A_{260}/A_{280} igual a 2.

[ARNm] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Pureza	Rendimiento (%)
72.06	1.921	6.52
54.84	1.866	4.89
73.86	1.989	6.92
59.07	1.871	4.65
65.36	1.940	5.38

Al utilizar este método de purificación, se obtuvo un rendimiento aproximado de ARNm, del 2 al 5 % del ARN total aplicado a la columna (Sambrook y Russell, 2001). A este respecto, en los resultados mostrados en la **Tabla II**, se observa un rendimiento que oscila entre el 1.9 al 6.07 %. De esta manera, la caracterización bioquímica de los ARNm

purificados mostrados en la **Tabla II**, determinó que la cantidad y el grado de pureza de los ARNm obtenidos eran adecuados, por lo que se procedió a analizar la integridad de las muestras en un gel de agarosa al 1.4% (**Figura 19**).

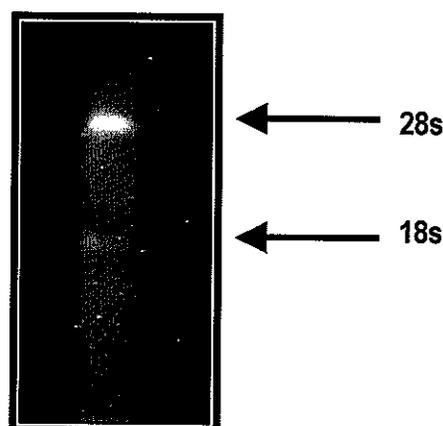


Figura 19. Fotografía de un gel de agarosa al 1.4%, teñido con bromuro de etidio ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$), cargado con $0.5\mu\text{g}$ de ARNm. En el gel se observa que aún continúan dos bandas bien definidas que corresponden a las subunidades 28s (banda superior) y 18s (banda intermedia) de los ARN ribosomales.

De esta manera, solo los ARNm de excelente calidad fueron microinyectados en los ovocitos para determinar la calidad funcional de dichos ARNm.

VII.4 Caracterización del ARNm de Cerebros de Rata mediante Expresión Funcional de Receptores de Membrana

Como se comentó anteriormente, al estar microinyectando $50\mu\text{g}$ de ARNm total de cerebros de ratas en los ovocitos, se obtiene la sobreexpresión de receptores de membrana así como de canales iónicos (Miledi *et al.*, 1989; Arellano *et al.*, 1996). En este contexto, se

realizó un control de expresión funcional de diversos receptores aplicando estímulos químicos, con diferentes agonistas.

En la **Figura 20A** se muestran las respuestas eléctricas registradas en ovocitos control inyectados con 50 nl de agua estéril, así como las respuestas eléctricas de los ovocitos inyectados con 50 ng de ARNm, que fueron expuestos a diferentes agonistas (**Figura 20B**). En este último caso, las corrientes generadas fueron originadas al aplicar estímulos químicos con acetilcolina (Ach), GABA, serotonina (5-HT) y glutamato.

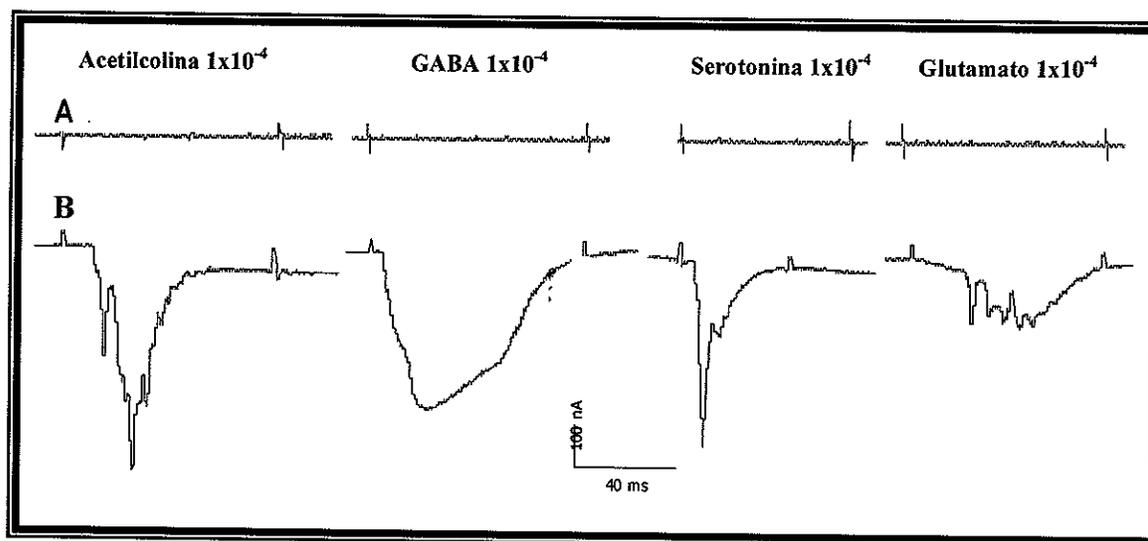


Figura 20. Expresión heteróloga de receptores de membrana de cerebro de rata en ovocitos de *X. laevis*. Corrientes generadas al ser aplicados diferentes agonistas (de izquierda a derecha) como acetilcolina (Ach), GABA, serotonina (5-HT), y ácido glutámico (Glut), en ovocitos inyectados, **inciso A**) con el ARNm purificado de cerebro o **inciso B**) con agua estéril. Los ovocitos control y los ovocitos microinyectados con ARNm pertenecen al mismo donador. (Arellano *et al.*, 1996).

En los ovocitos microinyectados con ARNm, se observaron diferencias muy marcadas en las amplitudes de las corrientes generadas con respecto a los ovocitos control, esto se

aprecia en la **Figura 20**. Estos resultados sugieren que la calidad del ARNm microinyectado en los ovocitos fue adecuado dado que las corrientes generadas al aplicar los diferentes agonistas lograron alcanzar amplitudes de μA . A este respecto, Gundersen *et al* (1983) demostraron que una expresión adecuada de receptores de membrana puede ser medida en base a la expresión heteróloga de receptores serotoninérgicos con amplitudes de corriente de μA . Esto es debido a la gran cantidad de copias de ARNm que codifican para receptores serotoninérgicos presentes en ciertas neuronas del Sistema Nervioso Central en mamíferos. De esta manera, los ARNm que mostraron amplitudes de corriente similares a las mostradas en la **Figura 20**, fueron utilizados en los ensayos electrofisiológicos subsecuentes.

VII.5 Caracterización del ARNm de Cerebros de Mamífero mediante Expresión Funcional de Canales de Ca^{2+}

Una vez corroborada la expresión funcional de receptores en la membrana de los ovocitos, se procedió a aplicar el protocolo *Tout* (descrito en la **Sección VI.6.3**) para determinar si existían corrientes generadas por canales de Ca^{2+} , por lo que fue necesario aplicar diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular (descrito en la **Sección VI.6.2**).

En la **Figura 21** se muestran registros típicos de las corrientes de salida *Tout*, en ovocitos inyectados con ARNm purificado, generados por la aplicación del protocolo de pulsos cuadrados *Tout*. El **inciso A** muestra el registro de las corrientes evocadas en la membrana

de un ovocito que fue perfundido con solución Ringer a 1.8mM de Ca^{2+} . La célula fue expuesta a 8 pulsos despolarizantes (de -80mV a +60mV) donde se observó una amplitud máxima de corriente de 2.5 μA en el sexto pulso aplicado, es decir, a un voltaje de +20mV. En el **inciso B** se muestra un registro del mismo ovocito que fue perfundido con solución Ringer 5 mM de Ca^{2+} , observándose una diferencia notoria en la amplitud de la corriente evocada. De igual manera que en el caso anterior, la corriente máxima fue generada a +20mV, pero a diferencia del registro anterior, este presentó corrientes robustas de 7 μA de amplitud. Por último en el **inciso C** se presenta un registro del mismo ovocito que fue perfundido con Ringer sin Ca^{2+} donde se observan corrientes de baja amplitud, corroborando que la corriente mostrada en el **inciso A** y **B** fue dependiente del influjo de Ca^{2+} .

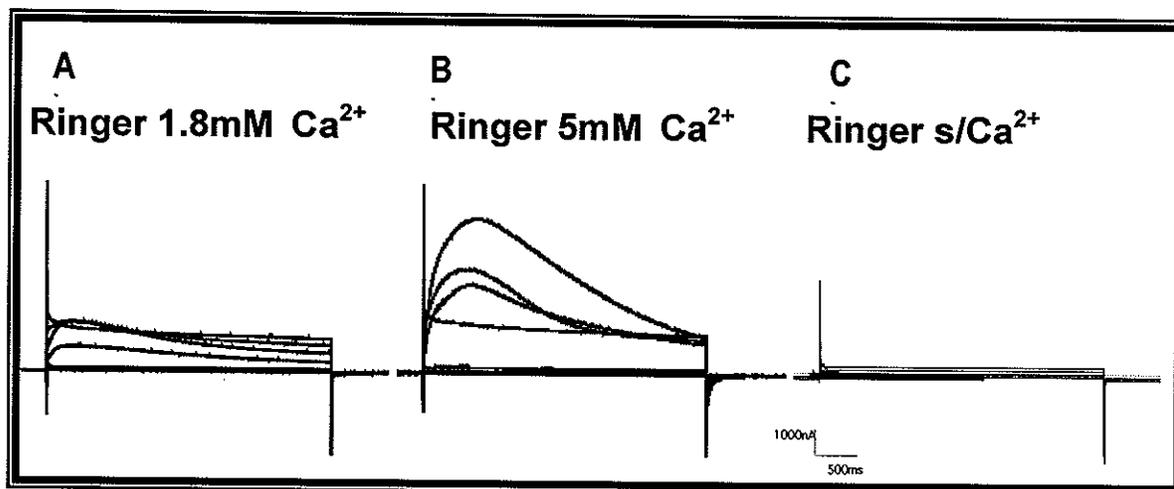


Figura 21. Registros típicos de corrientes I_{out} en ovocitos inyectados con ARNm purificado de cerebro de rata, cuya amplitud depende de la expresión de canales de Ca^{2+} expresados en la membrana del ovocito. Registros obtenidos perfundiendo soluciones con diferentes concentraciones de Ca^{2+} , **inciso A**, Ringer 1.8mM de Ca^{2+} , **inciso B**, Ringer 5mM de Ca^{2+} e **inciso C**, Ringer s/ Ca^{2+}

Como se observó en la **Figura 21**, al aplicar el protocolo *Tout* en la membrana de ovocitos microinyectados con ARNm, los registros mostraron variaciones muy notorias en las amplitudes de corriente a un potencial de +20mV, que fueron generadas por la perfusión de diferentes concentraciones de Ca^{2+} en el medio extracelular.

A este respecto, los estudios previos realizados por Leonard *et al* (1987), en ovocitos microinyectados con ARNm de cerebro de rata, determinaron que las corrientes máximas generadas por la activación de canales de Ca^{2+} se registraban a un potencial de +10mV y +20mV, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este ensayo. Por otro lado, Miledi (1982) determinó que la generación de esta corriente de salida (*Tout*), es debida a la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que permiten el influjo de este ión activando consecuentemente canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} . Por lo que los resultados mostrados permiten inferir, que el ARNm transfectado en los ovocitos fue expresado de manera correcta en la membrana de las células y que las corrientes obtenidas son generadas por la apertura de canales de Ca^{2+} .

De esta manera, el ARNm microinyectado en los ovocitos que mostraron un perfil de variaciones en las corrientes similar al descrito en la **Figura 21**, fueron el que se utilizó en los ensayos siguientes para determinar el efecto de las fracciones del veneno de *C. californicus* en estos mismos canales.

VII.6 Efecto de las Fracciones del Veneno de *Conus californicus* en los Canales de Ca^{2+} utilizando la Técnica de Control de Voltaje con 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 realizar una estimación teórica de las conotoxinas implicadas en la modulación de canales de Ca^{2+} . Para lograrlo, fueron analizadas las secuencias de 20 ω -conotoxinas, tomando en consideración la tabla descrita por McDonough (2004). De esta manera, se determinó que las 20 ω -conotoxinas analizadas, tuvieron en promedio 25 residuos de aminoácidos y una masa aproximada de 2794 g/mol. Una vez realizados los cálculos pertinentes, las fracciones liofilizadas fueron resuspendidas en agua destilada, conociendo así la concentración estimada de cada muestra.

Posteriormente, se realizaron los registros electrofisiológicos de las corrientes evocadas en los ovocitos sobre los canales de Ca^{2+} al aplicar el protocolo *Tout*, antes, durante y después de perfundir la fracción a probar en la cámara de registro.

VII.7 Efecto de las Fracciones del Veneno de *Conus californicus* colectadas cada 15 minutos sobre Canales de Ca^{2+}

De acuerdo a la estrategia experimental descrita en la **Sección VI.2**, fueron probadas las fracciones más grandes del veneno total de *Conus californicus*, sobre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, sobre expresados en la membrana de los ovocitos. Para lograrlo, primero fueron evaluadas las fracciones colectadas cada 15 minutos del veneno obtenido de los organismos recolectados en Noviembre del 2005.

En la **Figura 22** se presentan los resultados obtenidos al perfundir la fracción F1, que comprende de los minutos 5 al 15, en la cámara de registro. Los registros obtenidos fueron procesados en dos tipos de gráficas: **Figura 22A**, gráfica que muestra los registros de la corriente evocada (μA) en relación al tiempo (ms); y **Figura 22B**, gráfica de curva IV que permite la interpretación de los datos de la corriente generada (I) en relación al voltaje (mV).

De esta manera, en el **inciso A** se muestran tres trazos que corresponden (de mayor a menor amplitud) a la corriente máxima generada al aplicar el protocolo *Tout*, en este caso a un potencial de +20 mV. El primer trazo fue generado al perfundir solución Ringer 5 mM de Ca^{2+} . El segundo trazo (color rojo) fue obtenido al aplicar 1.2 ml (23 μM) de la fracción F1. En este trazo se observa una disminución notoria de la corriente con respecto al trazo

control (o corriente inicial). Por último, se presenta el trazo obtenido en presencia de solución Ringer sin Ca^{2+} generándose corrientes de poca amplitud.

En la **Figura 22B** se muestra la curva IV que correspondió a las corrientes generadas al aplicar: 1) solución Ringer con 5 mM de Ca^{2+} , 2) solución Ringer con 5 mM de Ca^{2+} más la fracción probada, 3) un lavado con solución Ringer con 5 mM de Ca^{2+} , y por último 4) solución Ringer sin Ca^{2+} . A este respecto, el lavado mencionado en el inciso 3, es realizado con la finalidad de retirar el remanente de la fracción previamente agregada y determinar si hubo recuperación de la corriente. Por otro lado, para fines prácticos sólo en esta curva IV se muestra el trazo generado al aplicar solución Ringer sin Ca^{2+} .

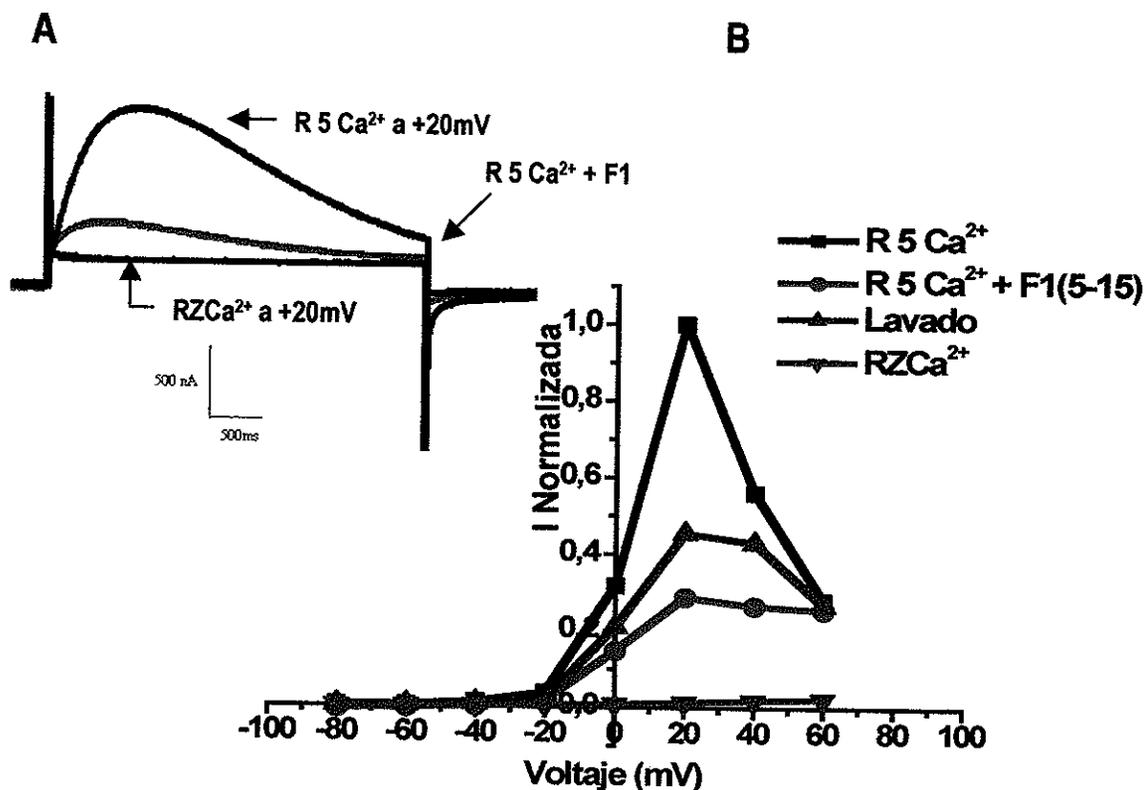


Figura 22. Efecto de la fracción F1 del veneno total de *C. californicus* colectado en Noviembre del 2005, utilizando el protocolo Tout para la generación de las corrientes. El inciso A muestra los registros de las corrientes evocadas a un potencial de +20 mV con respecto al tiempo (ms); el inciso B muestra la curva I/V del efecto de la fracción colectada en los minutos 5 al 15.

De acuerdo a lo mostrado en la **Figura 22**, se puede apreciar una disminución significativa de la corriente evocada al perfundir la fracción F1 que fue recuperada parcialmente tras lavar el ovocito con solución Ringer 5 mM de Ca²⁺. Por otro lado, con los resultados mostrados en la curva IV anterior, se pueden inferir las características electrofisiológicas presentes en los canales de Ca²⁺ sobre expresados en la membrana de los ovocitos; es decir, un umbral de activación presentado a -20 mV y una corriente máxima registrada en el sexto episodio del protocolo aplicado, a +20mV.

Para conocer los porcentajes de disminución y de recuperación de la corriente al aplicar la fracción F1, los resultados previamente mostrados en la **Figura 22**, fueron procesados de manera que se graficó la corriente evocada a un potencial de +20mV antes, durante y después de aplicar la fracción F1, **Figura 23**.

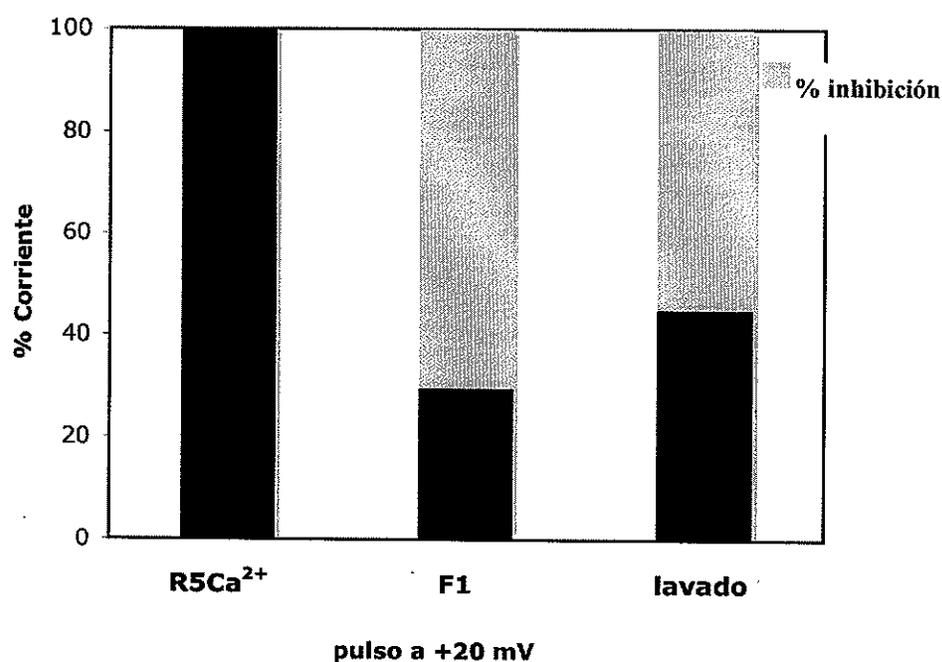


Figura 23. Gráfica de barras que indica en porcentaje el efecto de la fracción F1 del veneno de *C. californicus* colectado en Noviembre del 2005, sobre canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Las barras negras indican el porcentaje de corriente antes, durante y después de aplicar la Fracción F1, que comprende los minutos 5 al 15, en un potencial de +20 mV. Las barras grises están indicando el porcentaje de disminución de la corriente durante y después de haber aplicado la fracción.

Como se observa en la **Figura 23**, al agregar 23 μ M de la fracción que contiene los minutos 5 al 15 (F1), la corriente es disminuida en un 70.38% con respecto a la corriente inicial. Después de retirarse la fracción mediante perfusión de Ringer 5 mM de Ca²⁺, la corriente inicial es recuperada en un 45%. De esta manera se puede inferir que en la

fracción F1 que comprende los minutos 5 al 15, se encuentra por lo menos un componente que tiene acción moduladora sobre canales de Ca^{2+} . Por otro lado, al realizar el lavado de la fracción F1, la corriente es recuperada en un 45% lo que sugiere que la interacción del complejo ligando-receptor es reversible al menos de forma parcial.

A continuación se muestran los resultados obtenidos al analizar la fracción F2, que comprende los minutos 15 al 30. En la **Figura 24** se presentan los resultados procesados, de los registros obtenidos, al perfundir $23 \mu\text{M}$ de la fracción F2. El **inciso A** muestra claramente que en los registros obtenidos al perfundir esta fracción no se generó ninguna disminución de la corriente de los canales de Ca^{2+} .

Consecuentemente, en la curva IV mostrada en el **inciso B** se observa que la corriente evocada al aplicar la fracción F2 prácticamente es la misma a la corriente inicial, aún cuando permanece la fracción por 200 s en la cámara de registro. Sin embargo, como se observa en el trazo correspondiente al lavado (trazo verde), se muestra una disminución de la corriente con respecto a la corriente inicial, a pesar de que la cámara de registro fue lavada por varios minutos. Como la fracción permaneció 200 s en la cámara de registro, podría descartarse la posibilidad de un efecto de la fracción sobre la corriente generada en el lavado, ya que las características electrofisiológicas, como activación, conductancia e inactivación de los canales de Ca^{2+} , son realizadas en un tiempo mucho menor (Hille *et al.*, 1992). Por lo que este comportamiento podría deberse a un decaimiento de la corriente del ovocito *per se*. De esta manera, se consideró que en los minutos 15 al 30 no existe

ningún componente detectable con efecto modulador sobre los canales Ca^{2+} de cerebro de rata sobre expresados en la membrana de los ovocitos.

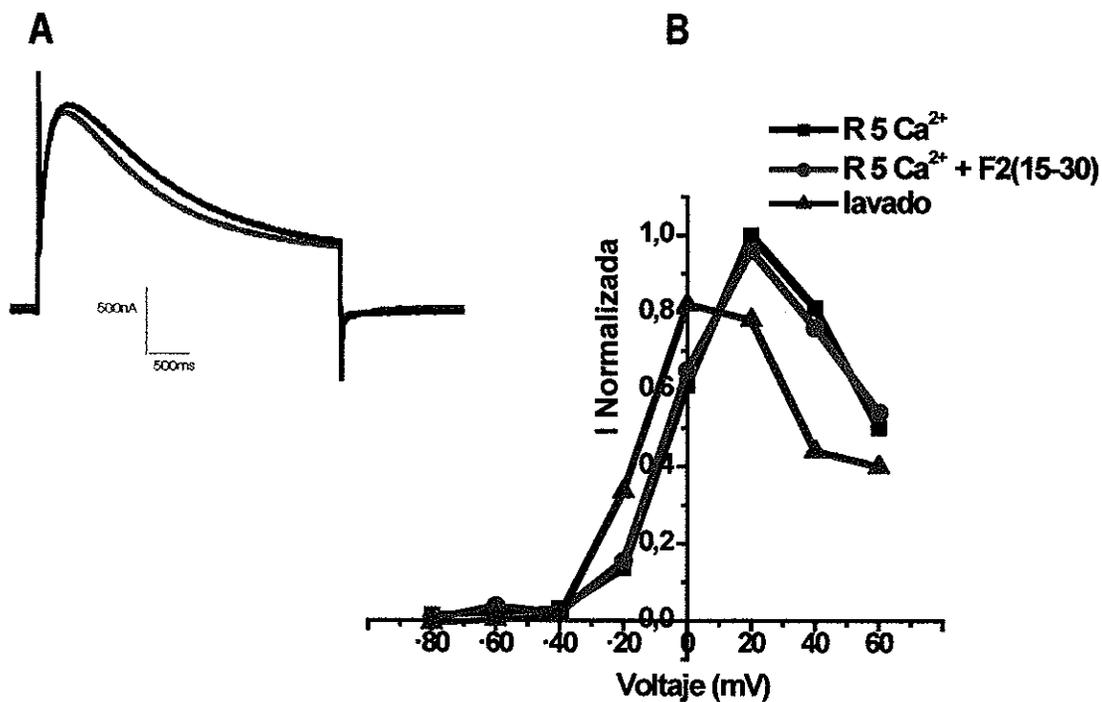


Figura 24. Efecto de la fracción F2 del veneno total de *C. californicus* colectado en Noviembre del 2005. El inciso A muestra los registros de las corrientes generadas a un potencial de +20 mV con respecto al tiempo (ms); el inciso B muestra la curva I/V del efecto de la fracción colectada en los minutos 15 al 30.

Posteriormente fue probada la fracción F3 que comprende los minutos 30 al 45. A este respecto, la **Figura 25** muestra las gráficas de los resultados obtenidos al agregar 62 μM de la fracción F3.

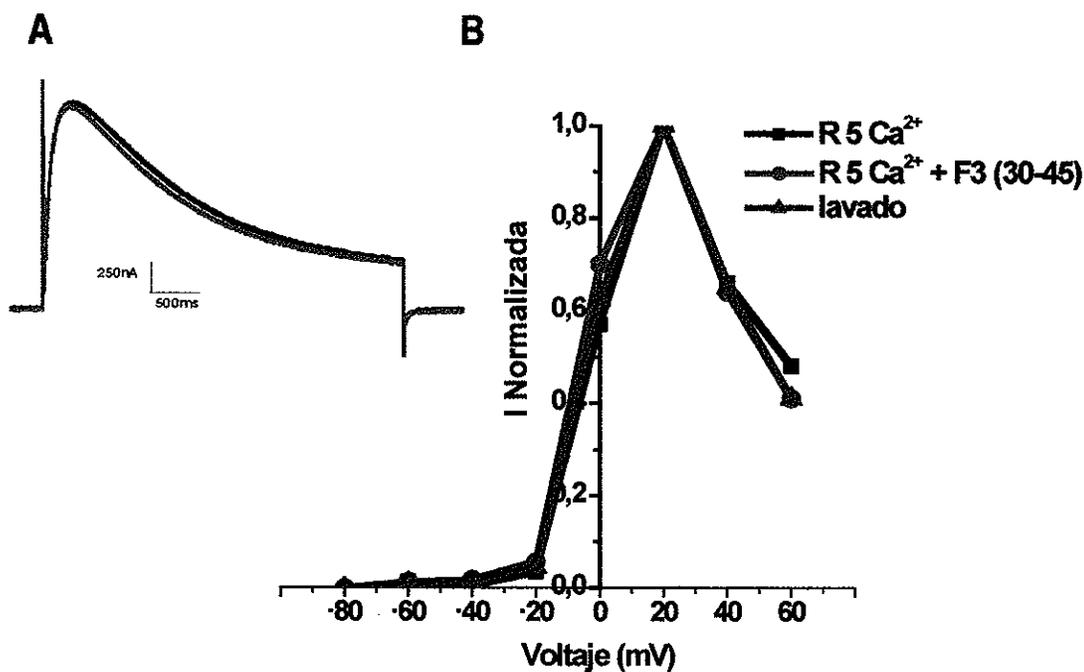


Figura 25. Efecto de la fracción F3 del veneno total de *C. californicus* colectado en Noviembre del 2005. El inciso **A)** muestra los registros de las corrientes generadas a un potencial de +20 mV con respecto al tiempo (ms); el inciso **B)** muestra la curva I/V del efecto de la fracción colectada en los minutos 30 al 45.

De acuerdo a lo mostrado en la **Figura 25**, la fracción F3 que comprende los minutos 30 al 45, no mostró disminución de la corriente de los canales de Ca^{2+} . De esta manera, se puede afirmar, que los componentes del veneno, colectados en entre los minutos 30 al 45, aparentemente no presentan ninguna actividad moduladora sobre canales de Ca^{2+} presentes en cerebro de rata.

Posteriormente, fue probada la última fracción de la primer corrida, es decir la fracción F4 comprendida entre los minutos 45 al 60. La **Figura 26** muestra los datos procesados de las corrientes generadas al aplicar 36 μM de la fracción F4.

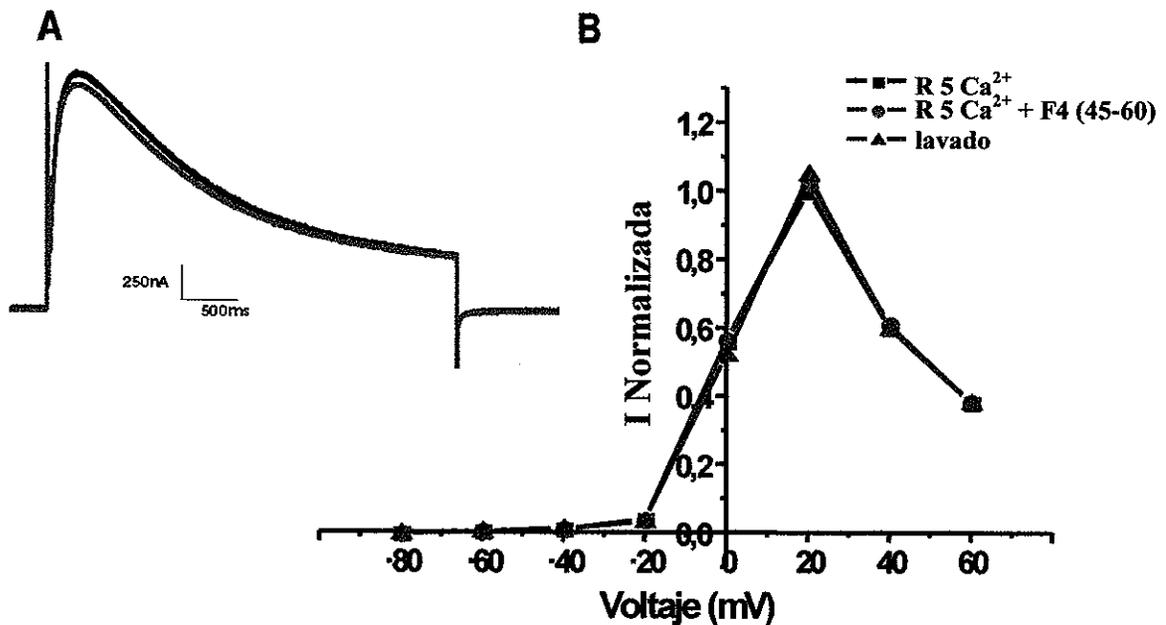


Figura 26. Efecto de la fracción F4 del veneno total de *C. californicus* colectado en Noviembre del 2005. El inciso A) muestra los registros de las corrientes generadas a un potencial de +20 mV con respecto al tiempo (ms); el inciso B) muestra la curva I/V del efecto de la fracción colectada en los minutos 45 al 60.

En las gráficas mostradas, se pudo observar que aparentemente en esta fracción tampoco se encuentra un efecto modulador sobre los canales de Ca²⁺. En la **Figura 27**, se presenta a manera de resumen una gráfica que indica en porcentaje el efecto obtenido de las fracciones colectadas cada 15 minutos sobre los canales de Ca²⁺.

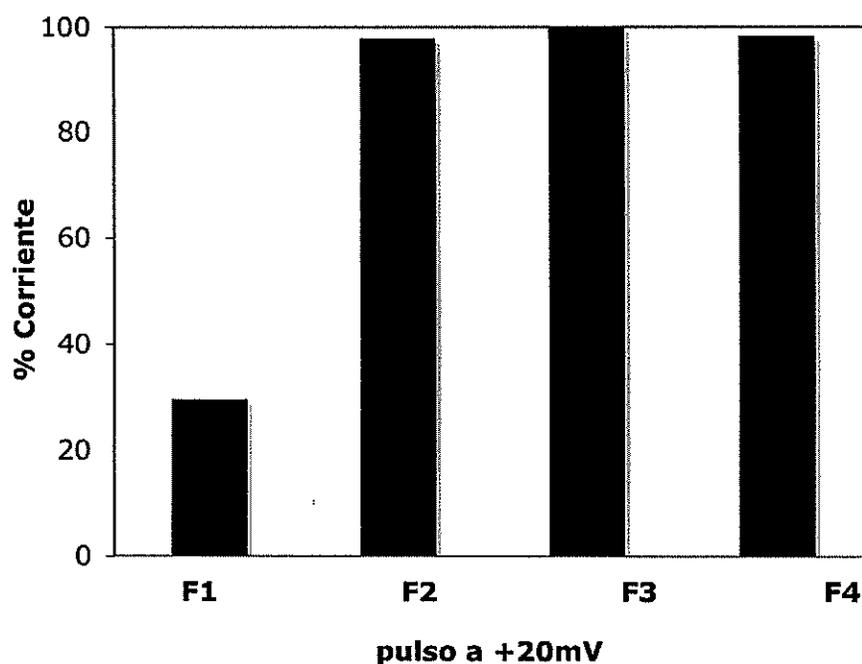


Figura 27. Gráfica de barras que muestra la actividad de las fracciones del veneno de *C. californicus* obtenidas por HPLC-RP, colectadas cada 15 minutos, sobre los canales de Ca^{2+} . En todos los casos, la corriente máxima fue evocada a un potencial de +20 mV.

Nuestros resultados indican que solo la primer fracción tiene efecto modulador sobre canales de Ca^{2+} , por lo que podríamos asumir que el resto de las fracciones no contienen toxinas que afecten estos canales. Sin embargo, de acuerdo a lo demostrado por Snuth (1990) y Leonard (1987), dentro de los cerebros de rata encontramos mayoritariamente, canales de los subtipos N, R, y P. Por lo que no se puede descartar la posibilidad de que dentro de las fracciones F2, F3 y F4 se encuentren toxinas moduladoras de canales de Ca^{2+} de subtipos diferentes a los encontrados en cerebro de rata.

En relación a la concentración utilizada en estos experimentos, como se mostró, fueron del orden μM para las 4 fracciones probadas. Los reportes previos han determinado que la Concentración Media Inhibitoria (IC_{50}) en las ω -conotoxinas, son del orden nM y en algunos otros casos pM. Esto podría hacer suponer que nuestras toxinas son de baja afinidad. Sin embargo, la mayoría de los ejemplos reportados se refieren a proteínas puras y sintéticas, por lo que no puede compararse la afinidad mostrada por una toxina sintética o expresada heterológicamente contra una mezcla de toxinas, como fue nuestro caso. Una mezcla de toxinas pueden afectar la interacción ligando-receptor, ya sea por fuerzas electrostáticas, efectos antagónicos o impedimento estérico (Chandy *et al.*, 2001; Chandy *et al.*, 2004). Por lo tanto, puede considerarse que las concentraciones utilizadas están subestimadas.

De acuerdo con los resultados mostrados, los ensayos subsecuentes corresponden al análisis de las subfracciones de la fracción F1, con la finalidad de delimitar los minutos con posible acción bloqueadora de CCDV.

VII.8 Efecto de las Fracciones del Veneno de *Conus californicus* colectadas cada 5 minutos

Para determinar con mayor precisión cuales son las fracciones que presentan la actividad moduladora sobre los canales de Ca^{2+} , fueron probadas las dos subfracciones (fracción F1.2 y fracción F1.3) que corresponden a la fracción F1. La **Figura 28A** muestra los registros

obtenidos al aplicar $3.7 \mu\text{M}$ de la fracción F1.2, comprendida por los minutos 5 al 10. La **Figura 28B** presenta la curva IV que contiene los trazos generados de las corrientes evocadas al aplicar el protocolo *Tout*.

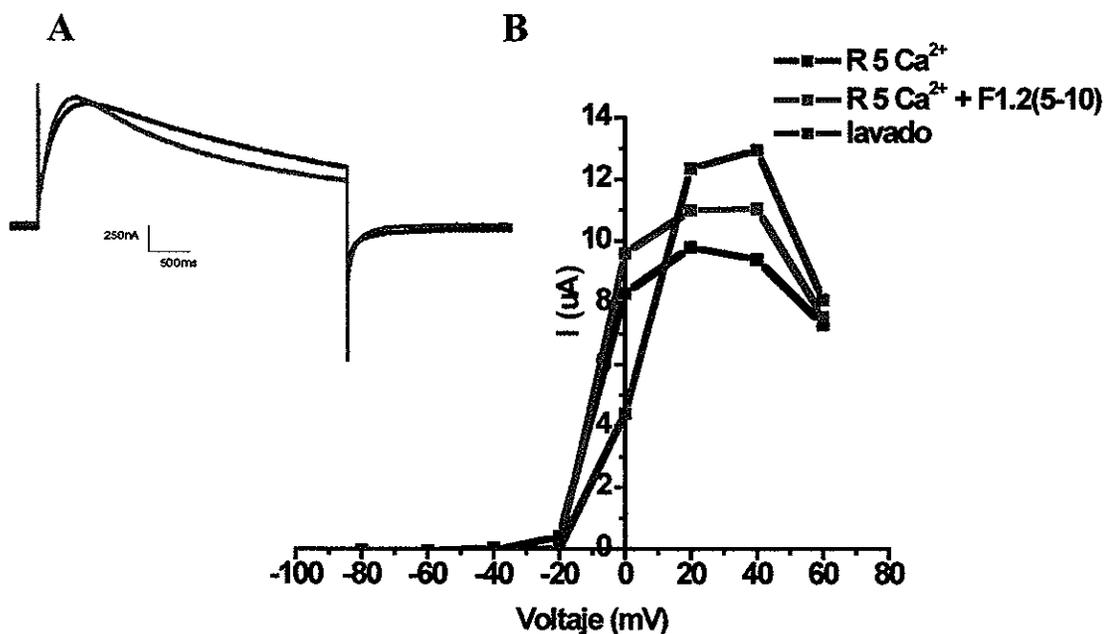


Figura 28. Efecto de la fracción F1.2 del veneno total de *C. californicus* colectado en Noviembre del 2005. El inciso **A**) muestra los registros de las corrientes generadas a un potencial de +40 mV con respecto al tiempo (ms); el inciso **B**) muestra la curva I/V del efecto de la fracción colectada en los minutos 5 al 10.

En la **Figura 28B** se observa un aumento de la corriente al perfundir la subfracción F1.2, la cual aumenta aún después de ser lavada la fracción de la cámara de registro por varios minutos. Sin embargo, el ensayo fue realizado solo una vez, por lo que no se puede determinar si este efecto realmente fue producido por la fracción probada. Por lo que es necesario realizar más ensayos para evaluar de forma correcta el efecto mostrado en estos registros.

A continuación se muestra una gráfica de barras correspondiente a los datos obtenidos de la corriente generada a +40 mV al perfundir la fracción F1.2 (**Figura 29**) donde se muestra un aumento de la corriente de un 17.55% y después de ser lavada la fracción por varios minutos se sigue observando un aumento de la corriente en un 41.66%.

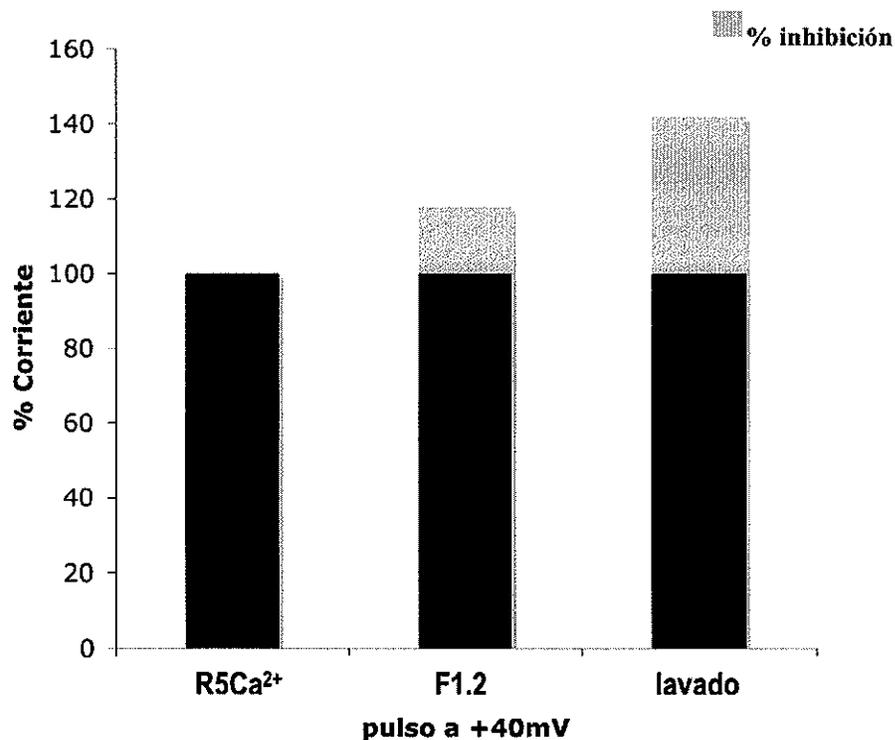


Figura 29. Gráfica de barras que indica en porcentaje el efecto de la fracción F1.2 del veneno de *C. californicus* colectado en Noviembre del 2005, sobre canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Las barras negras indican el porcentaje de corriente antes, durante y después de aplicar la Fracción F1.2, que comprende los minutos 5 al 10, en un potencial de +40 mV. Las barras grises están indicando el porcentaje de aumento de la corriente durante y después de haber aplicado la fracción.

A pesar de que este ensayo fue realizado solo una vez, no debería ser subestimado el efecto de esta subfracción, debido a que realmente pudiera encontrarse en esta fracción uno o varios componentes que tengan efecto potenciador de corrientes de Ca²⁺. Ya que se

conocen muy pocos ejemplos en la literatura de moléculas que ejerzan un efecto activador en las corrientes de Ca^{2+} . A continuación se muestra el cromatograma correspondiente a los minutos 5 al 10 y la fracción detectada a 230 nm por HPLC como posible implicada en la generación de este efecto (**Figura 30**).

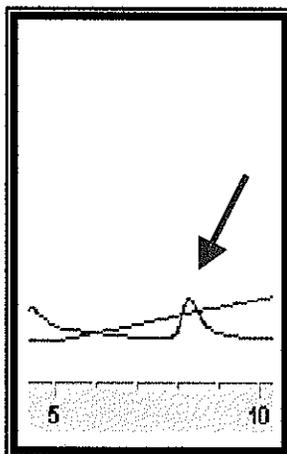


Figura 30. Cromatograma correspondiente a los minutos 5 al 10 y las fracciones detectadas a 230 nm por HPLC-RP

En el reporte generado por HPLC, se detectó a 230 nm una sola fracción que eluye en el minuto 8, que podría ser la responsable de la actividad mostrada. Sin embargo, la elución aparente de un solo componente de la fracción debe ser validado con una re-purificación de la muestra, sumado a la realización de los ensayos electrofisiológicos pertinentes.

Por otro lado, al evaluar el efecto de la subfracción F1.3 que comprende los minutos 10 al 15 (**Figura 31**) se encontró una actividad inhibitoria sobre los canales de Ca^{2+} al agregar 7.8 μM de la fracción a la cámara de registro. La **Figura 31A** muestra los trazos generados

de los registros obtenidos, de la corriente máxima obtenida a +40 mV, al perfundir solución Ringer 5 mM de Ca^{2+} (trazo negro) y la corriente disminuida considerablemente al perfundir la solución Ringer más la fracción F1.3 (trazo rojo). En la **Figura 31B** se puede corroborar que la corriente máxima fue generada a un potencial de +40mV, mientras que su umbral de activación es generado a -20 mV.

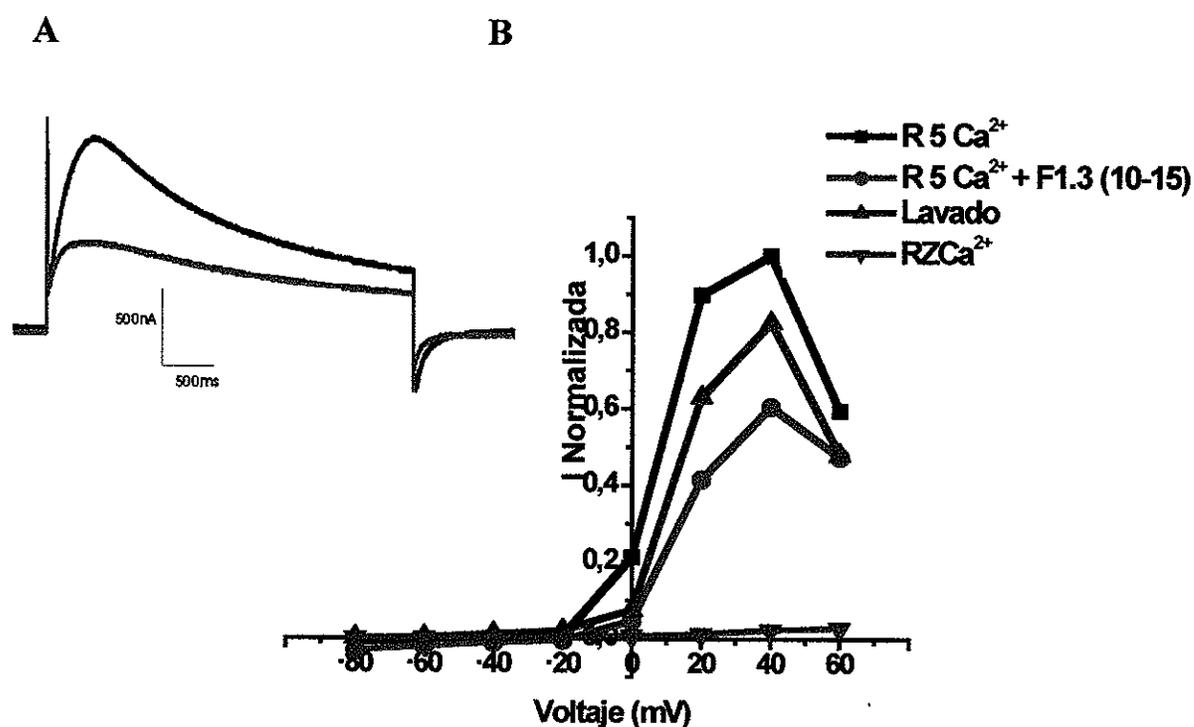


Figura 31. Efecto de la fracción F1.3 del veneno total de *C. californicus* colectado en Noviembre del 2005. El inciso A) muestra los registros de las corrientes generadas a un potencial de +40 mV con respecto al tiempo (ms); el inciso B) muestra la curva I/V del efecto de la fracción colectada en los minutos 5 al 15.

Para conocer los porcentajes de disminución de la corriente de la fracción aplicada, se procedió a realizar nuevamente una gráfica de barras mostrada en la **Figura 32**. De esta

manera, se pudo observar que al aplicar la fracción F1.3, la corriente fue disminuida en un 38.7% con respecto a la corriente inicial, mientras que al realizarse el lavado de la fracción, la corriente fue recuperada en un 82.3%

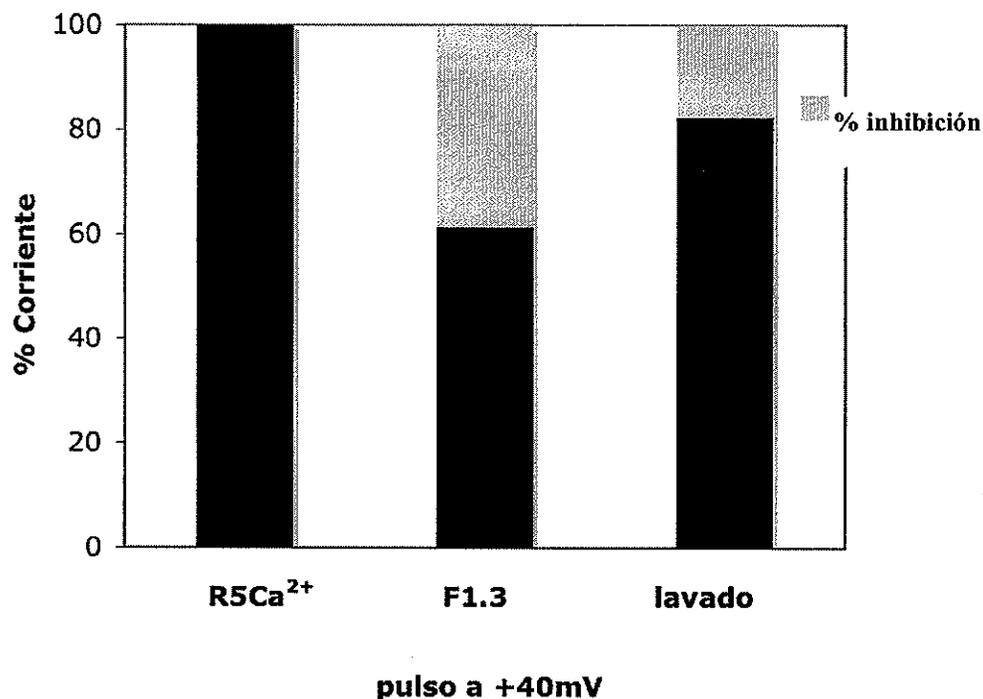


Figura 32. Gráfica de barras que indica en porcentaje el efecto de la fracción F1.3 del veneno de *C. californicus* colectado en Noviembre del 2005, sobre canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Las barras negras indican el porcentaje de corriente antes, durante y después de aplicar la Fracción F1.3, que comprende los minutos 10 al 15, en un potencial de +40 mV. Las barras grises están indicando el porcentaje de disminución de la corriente durante y después de haber aplicado la fracción.

En base a los resultados mostrados, se puede afirmar que en la fracción F1.3 se encuentra por lo menos un componente con posible acción bloqueadora de canales de Ca²⁺. De acuerdo con el aislamiento de esta fracción, que comprende los minutos 10 al 15 por el HPLC, en la **Figura 33** se observa el cromatograma correspondiente a esos minutos, en

donde fueron eluidas 4 subfracciones (señaladas con flechas rojas) que probablemente estén actuando como moduladores de los canales de Ca^{2+} .

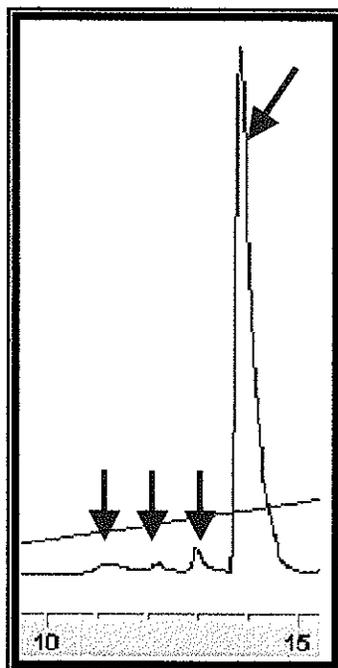


Figura 33. Cromatograma correspondiente a los minutos 5 al 10 y las fracciones detectadas a 230 nm por HPLC-RP.

La sección del cromatograma mostrada en la figura anterior, permite conocer posibles características bioquímicas de las 4 subfracciones mostradas, ya que estas podrían ser de naturaleza peptídica debido a que absorben a 230 nm y es en esta longitud de onda en donde absorben los enlaces peptídicos. Por otro lado, el que las fracciones eluyan en los primeros minutos del cromatograma permite inferir que presentan características hidrofílicas. Aunque evidentemente para dar validez a esas aceveraciones, es necesario conocer la secuencia de aminoácidos que componen a las fracciones.

Posteriormente, fueron analizados algunos de los minutos individuales, comprendidos en la fracción F1.3, para poder determinar con mayor exactitud cual fracción es la responsable del efecto inhibitor de la corriente de Ca^{2+} .

VII.9 Efecto de las Fracciones del Veneno de *Conus californicus* Colectadas cada 1 Minuto

Por último, fueron evaluados algunos de los minutos individuales que están presentes en la fracción F1.3, con la finalidad de determinar cual fracción es la implicada en los efectos moduladores sobre los canales de Ca^{2+} . Primero, fue evaluado el efecto de la fracción F1.3.1 que corresponde al minuto 10, según el reporte obtenido por HPLC. Al igual que en los experimentos anteriores los datos obtenidos, al perfundir 0.45 nM de la fracción F1.3.1, fueron graficados en una curva IV (**Figura 34**).

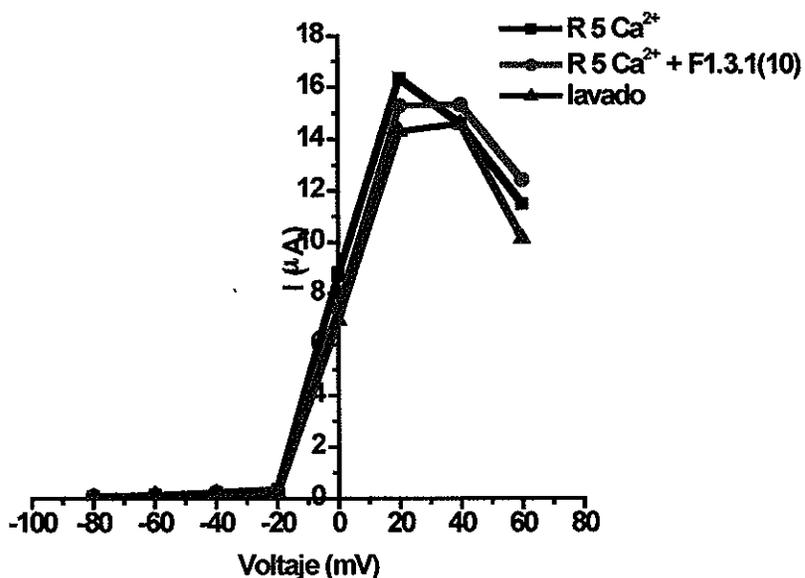


Figura 34. Curva IV que muestra el efecto de la fracción F1.3.1 del veneno total de *C. californicus*, colectado en Noviembre del 2005.

De acuerdo a la curva IV anterior, la fracción eluida en el minuto 10, al ser perfundida en la cámara de registro, no disminuyó la corriente evocada por los canales de Ca^{2+} que sobre expresaron en la membrana de los ovocitos. De esta manera, la fracción F1.3.1 fue descartada como responsable de la disminución de las corrientes de Ca^{2+} , por lo que se procedió a evaluar la siguiente fracción, nombrada F1.3.2, eluída en el minuto 11.

En la curva IV mostrada en la **Figura 35**, se puede observar que la corriente generada a un potencial de +40 es disminuida considerablemente al perfundir 3.25 nM de la fracción F1.3.2. De esta manera, podemos asumir que esta fracción eluida en el minuto 11, según el reporte obtenido por HPLC, es responsable de modificar la corriente de los canales de Ca^{2+} . También se pudo observar como la corriente evocada, después de retirar la fracción de la

cámara de registro, es recuperada considerablemente. De esta manera, se puede especular que el efecto de la fracción F1.3.2 sobre los canales de Ca^{2+} es reversible, ya que la aparente interacción del complejo fracción-canal, es disociada en minutos.

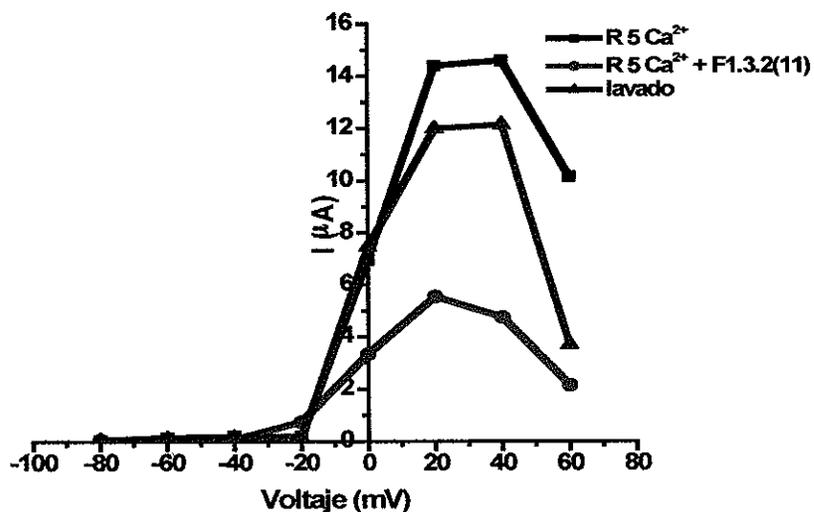


Figura 35. Curva IV que muestra el efecto de la fracción F1.3.2 del veneno total de *C. californicus*, colectado en Noviembre del 2005.

La **Figura 36** presenta una gráfica de barras que corresponde al porcentaje de disminución de la corriente al perfundir la fracción F1.3.2 y el porcentaje resultante del lavado de la fracción.

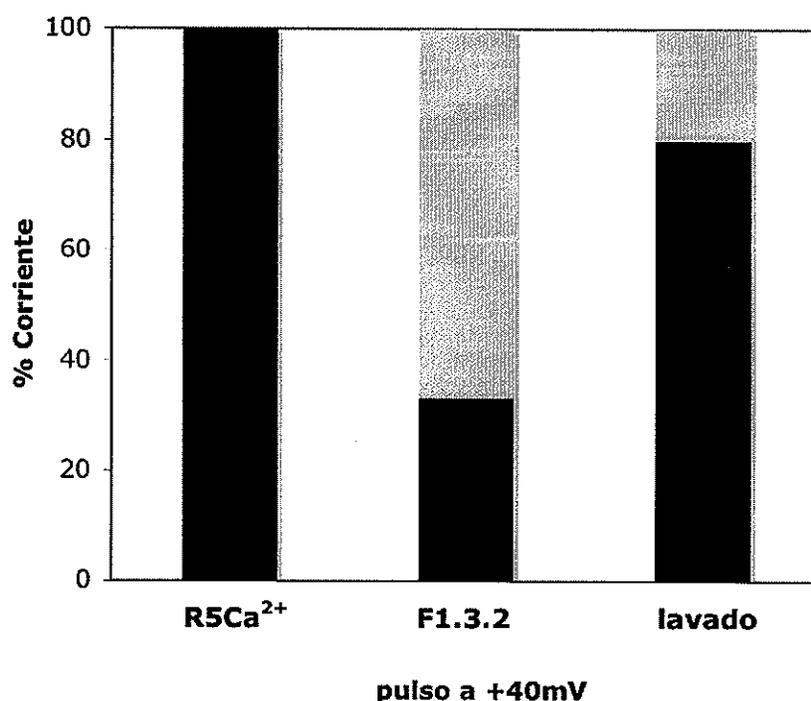


Figura 36. Gráfica de barras que indica en porcentaje el efecto de la fracción F1.3 del veneno de *C. californicus* colectado en Noviembre del 2005, sobre canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Las barras negras indican el porcentaje de corriente antes, durante y después de aplicar la Fracción F1.3, que comprende los minutos 10 al 15, en un potencial de +40 mV. Las barras grises están indicando el porcentaje de disminución de la corriente durante y después de haber aplicado la fracción.

En la **Figura 36** se muestra que la fracción F1.3.2 es capaz de disminuir la corriente de los canales de Ca²⁺ en un 66.67%, sin embargo cuando la fracción es retirada mediante el lavado de la cámara de perfusión, la corriente se recuperó hasta el 80% de la corriente inicial. En la **Figura 37** se presenta parte del cromatograma obtenido a partir del aislamiento de las fracciones mediante HPLC, en donde se indica con una flecha roja la posible fracción implicada en la modulación de la corriente de los canales de Ca²⁺. Sin embargo, como se pudo observar, parte de la fracción implicada es eluida desde el minuto 10. Esto nos sugiere que probablemente no se encuentre solo un componente dentro de esta fracción, ya que en el ensayo anterior, mostrado en la **Figura 34**, que comprende al minuto

10, no presentó efecto alguno sobre la corriente de los canales de Ca^{2+} . Esto sugiere la necesidad de re-purificar esta fracción para poder validar esta premisa y realizar los ensayos pertinentes con las posibles subfracciones.

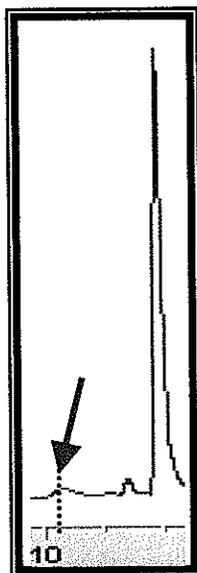


Figura 37. Cromatograma que muestra la fracción eluida en el minuto 10 y 11 detectada a 230 nm por HPLC-RP. La división de los minutos 10 y 11 eluidos esta indicado con una línea punteada verde.

A manera de resumen, la **Tabla III** muestra los resultados obtenidos de las diferentes fracciones evaluadas, así como también la actividad que presentaron (en porcentaje), la cantidad que se utilizó en cada una de ellas y el porcentaje de disminución de la corriente.

Tabla III. Resumen del efecto de las fracciones del veneno total de *Conus californicus* obtenidas por HPLC sobre los canales de Ca^{2+} sobre expresados en la membrana de los ovocitos. El veneno pertenece a la colecta de los especímenes de Noviembre del 2005. Los ensayos electrofisiológicos mostrados en la tabla fueron realizados utilizando la técnica de Control de Voltaje por dos Electrodo.

Fración (minutos)	Actividad Bloqueadora	Cantidad (μg^*) (ng*)	% de disminución de la corriente	% de recuperación de la corriente
F1 (5-15)	SI	23*	70.38	45
F2 (15-30)	NO	23*	0	0
F3 (30-45)	NO	62*	0	0
F4 (45-60)	NO	36*	0	0
F1.2 (5-10)	NO	3.7*	0	0
F1.3 (10-15)	SI	7.8*	38.7	82.3
F1.3.1 (10)	NO	0.45*	0	0
F1.3.2 (11)	SI	3.25*	66.67	80

Se ha determinado que las ω -conotoxinas presentan secuencias con altos porcentajes de aminoácidos hidrofílicos (Saccomano *et al.*, 1994; Lew *et al.*, 1997). Esto concuerda con nuestros resultados ya que la toxina que mostró efecto inhibitorio sobre los canales de Ca^{2+} fue eluida en los primeros minutos del cromatograma cuando el programa se encontraba con un incremento de acetonitrilo del 5 al 10%, por lo que puede inferirse que nuestra toxina de igual manera que las ω -conotoxinas, es de naturaleza hidrofílica.

Por otro lado, la fracción con efecto inhibitorio sobre canales de Ca^{2+} , mostró en todos los casos ser una molécula que presenta un efecto reversible con su receptor. Ya que la corriente fue recuperada en un 69.1% en promedio. Haciendo una analogía de este resultado, en las ciencias farmacéuticas, la reversibilidad del complejo ligando-receptor, es una característica muy importante en el desarrollo de moléculas con potencial para ser nuevos fármacos. Se cree que la lenta disociación del complejo ligando-receptor puede

provocar grandes efectos secundarios en ensayos preclínicos. Esta es una razón por lo que la ω -CTx-GVIA no es un buen candidato terapéutico y solo es utilizada para estudios de caracterización de canales de Ca^{2+} (Nielsen *et al.*, 2000). En el caso de la ω -CTx-MVIA, se ha demostrado que el efecto de reversibilidad del complejo ligando-receptor no es un efecto reproducible en todos los estudios, por lo que se especuló, que esta podría ser una razón de los efectos secundarios provocados en algunos pacientes con dicho tratamiento (Thompson *et al.*, 2006).

Debido a la importancia de corroborar en otro sistema celular el efecto observado sobre canales de Ca^{2+} , se utilizó neuronas en cultivo de ganglios de la raíz dorsal de ratas y registros electrofisiológicos de corrientes de Ca^{2+} . A este respecto, se analizó la fracción que corresponde a los minutos 10 al 15, y la fracción individual correspondiente al minuto 13. La decisión de analizar esta última fracción es debido a que aparentemente, como se muestra en el cromatograma, es una fracción individual de alta concentración.

Se registraron un total de 21 células, de las cuales a 12 se le perfundió la fracción 10-15 a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$. Y a 9 se les aplicó la fracción 13 a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$.

La fracción 10-15 aplicada sobre 12 células mostró un efecto modulador sobre la corriente de Ca^{2+} al bloquear parcialmente esta corriente, con una reducción promedio de la amplitud de la corriente de 26.4% y seguido de una recuperación de la corriente del 92%

aproximadamente (datos no mostrados). Posteriormente, fue probada la fracción 13 sobre la corriente de Ca^{2+} . En la **Figura 38** muestra el efecto generado en la corriente de Ca^{2+} al reducir su amplitud en un 31% con respecto al control. La fracción 13 fue aplicada a 9 células donde en promedio se redujo la corriente un 21.8%, observándose una recuperación parcial después de ser lavada la fracción.

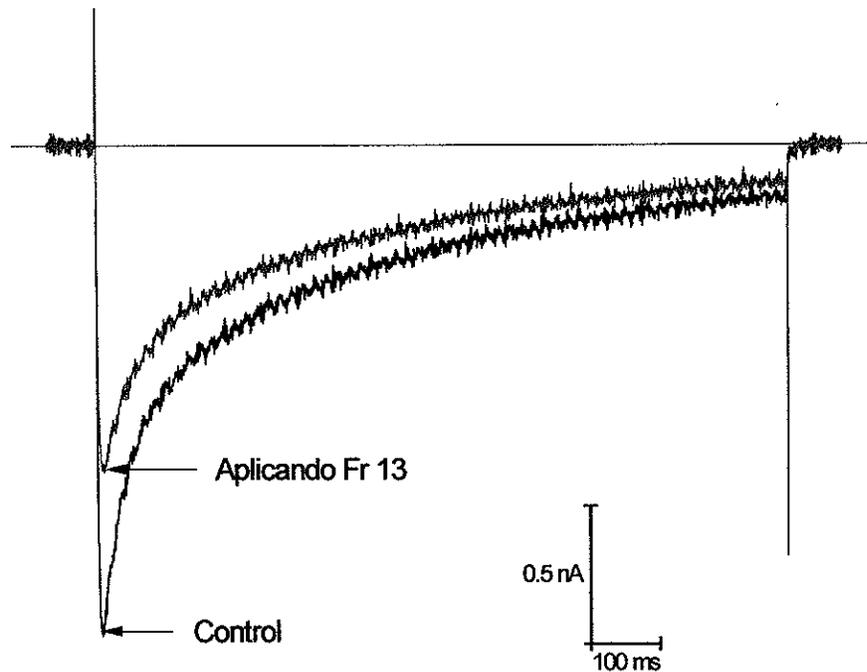


Figura 38. Efecto de la fracción Fr 13 sobre las corrientes de Ca^{2+} . La figura muestra un trazo típico de la corriente de Ca^{2+} . El trazo negro corresponde al control y el trazo rojo corresponde a la corriente generada tras aplicar la fracción.

En la **Figura 39**, se muestra el porcentaje de disminución de la corriente con respecto al control, donde se evidencia el efecto inhibitorio de la corriente de Ca^{2+} producido tras la

perfusión de la fracción F1.3 y la fracción individual correspondiente al minuto 13, según el reporte obtenido por HPLC.

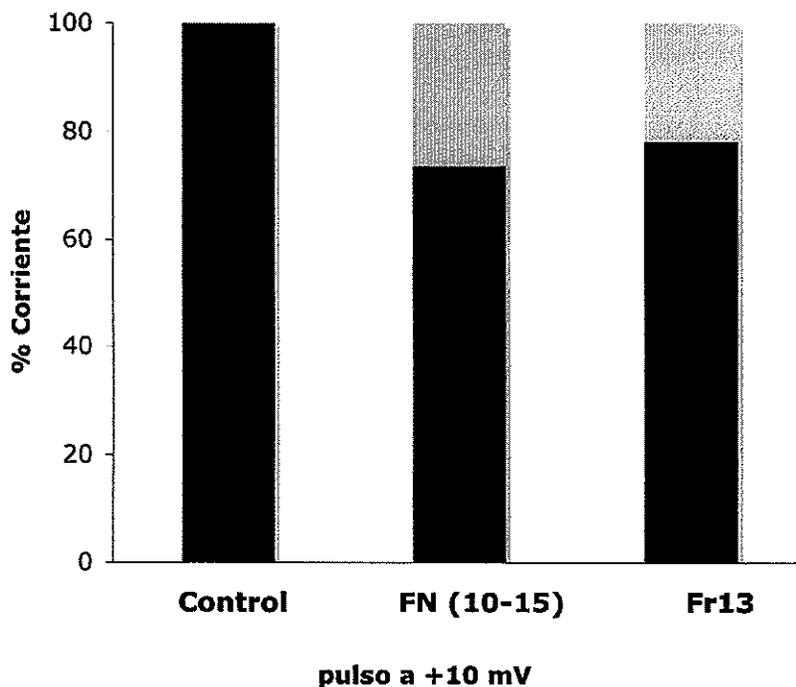


Figura 39. Gráfica de barras que muestra el porcentaje de corriente disminuida (en color gris) por efecto de las fracciones F1.3 (FN (10 al 15)) y por la fracción Fr13, aplicadas de forma individual a la cámara de registro.

Las **Figuras 38** y **39** muestran que las fracciones del veneno total de *Conus californicus*, conservan el efecto bloqueador de corrientes de canales de Ca^{2+} en ambos sistemas. Sin embargo, en el segundo modelo, el efecto modulador de las fracciones evaluadas mostró ser inferior al observado en el primer modelo. Cabe mencionar que los venenos utilizados no pertenecen a la misma colecta. Para el modelo de ovocito se empleó un veneno colectado en 2005 y para el modelo de ganglio de la raíz dorsal se utilizó un veneno

colectado en 2006. A este respecto, Juárez en 2005, relacionó las posibles diferencias en la composición de los venenos, a aspectos como el estadio de los organismos colectados, el sexo, la temporada de reproducción (aunado a factores físicos externos como la temperatura del agua) y el tipo de alimento que pudieron haber ingerido los organismos antes de su colecta. 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 (Juárez 2005).

Por otro lado, no podemos descartar la posibilidad de que los canales expresados en ambos modelos sean diferentes, aún cuando en ambos casos se trate de canales de Ca^{2+} . También existe la posibilidad de una variación en la coexpresión de la subunidad α_1 en relación con las subunidades accesorias, lo que estaría proporcionando características electrofisiológicas diferentes en los canales de Ca^{2+} expresados en cada uno de los sistemas celulares empleados. Además, como se explicó en la **sección VI.6.3**, las corrientes acarreadas a través de los canales de Ca^{2+} son por lo regular de poca amplitud (del orden de nA) como se muestra en la **Figura 38**, mientras que al emplear el primer sistema celular utilizando el protocolo de activación de los canales de Cl^- se está amplificando las corrientes acarreadas a través de los canales de Ca^{2+} (del orden de μA). Esto podría explicar la disminución aparente en la actividad en la F1.3.

Por otro lado, los estudios realizados por Biggs y colaboradores, determinaron las secuencias de algunas fracciones de los componentes del veneno de *Conus californicus*. De

acuerdo a las características en la metodología descrita por ellos, al realizar la purificación por HPLC de los componentes del veneno es muy probable que la fracción Fr13 aquí caracterizada electrofisiológicamente, sea una de las secuencias presentadas en su trabajo (Biggs, comunicación personal). Por lo que a continuación se presenta la secuencia probable de la fracción eluida en el minuto 13 de nuestro reporte obtenido por HPLC.

NCPAGCRSQGCCM

Evidentemente, las características mostradas de este péptido de 13 aminoácidos (sin modificaciones post-transduccionales) difiere totalmente de lo previamente descrito como características generales de las ω -conotoxinas. Por lo que puede inferirse que se trata de una nueva familia de conotoxinas, tal vez específica para la especie *Conus californicus*.

VIII. CONCLUSIONES

La forma empleada para fraccionar los componentes del veneno de *Conus californicus*, es rápida y eficiente para la identificación de la toxina con efecto inhibitorio sobre canales de Ca^{2+} . Si las fracciones se hubieran colectado minuto por minuto, hubiera sido un proceso muy largo y poco práctico para poder llegar a nuestros resultados.

El uso de ovocitos de *Xenopus laevis* como modelo de estudio para evaluar corrientes de Ca^{2+} , es una opción viable dada la complejidad que presenta la expresión heteróloga de canales de Ca^{2+} unitarios. Estas células presentan grandes ventajas al ser manipuladas, por lo que nos fue fácil realizar la transfección del ARNm de cerebros de rata al ovocito y así lograr la expresión heteróloga de canales de Ca^{2+} en los diferentes ensayos.

La caracterización electrofisiológica del veneno de *Conus californicus* es una parte fundamental al evaluar los efectos posibles de sus toxinas sobre canales iónicos, ya que esta es una forma certera de determinar las interacciones de los complejos fracción-canal, y así evaluar las propiedades de las toxinas probadas. Esto permite identificar varias fracciones con la capacidad para modular los canales de Ca^{2+} .

La caracterización bioquímica de la toxina con efecto inhibitorio sobre canales de Ca^{2+} sirve para conocer la secuencia de aminoácidos que conforman la secuencia primaria, y permite realizar una comparación con las secuencias de las ω -conotoxinas ya descritas en

la literatura. Esto nos ayudo en gran manera para poder inferir que probablemente hayamos encontrado una nueva familia de conotoxinas que bloqueen canales de Ca^{2+} .

IX. PERSPECTIVAS

Para comprobar que la toxina caracterizada posee realmente un efecto modulador sobre canales de Ca^{2+} , se realizará la síntesis química. Debido a que no se conoce el patrón de enlaces disulfuro, se unirá la Cys 1 con la Cys 3 y la Cys 2 con la Cys 4. Paralelamente, deberá sintetizarse con un patrón de enlaces disulfuro 1-4 y 2-3. Con estas dos proteínas sintéticas, se realizarán ensayos electrofisiológicos.

Realizar mutaciones sitio dirigidas en la conotoxina bloqueadora de canales de Ca^{2+} y evaluarla electrofisiológicamente para determinar los aminoácidos clave en la interacción toxina-canal.

Caracterizar electrofisiológicamente los canales de Ca^{2+} presentes en el ARNm de cerebros de ratas así como los encontrados en ganglios de la raíz dorsal de rata.

Realizar más ensayos electrofisiológicos a la fracción F1.2 para dar validez a la premisa de una nueva toxina activadora de corrientes de Ca^{2+} . Asimismo, obtener la secuencia de este péptido para realizar ensayos en modelos biológicos para determinar si tienen alguna actividad *in vivo*.

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

X. BIBLIOGRAFÍA

- Aidley J. D. y Stanfield R. P. 1996. **Ion Channels. Molecules in Action.** Cambridge University Press. 1ra edición (1): 9-23
- Arellano, R. O., Woodward, R. M. y Miledi, R. 1996. **Ion Channels and Membrane Receptors in Follicle-Enclosed *Xenopus* Oocytes.** En: *Ion Channels, Volume 4* (T. Narahashi, ed.). *Plenum Press, New York.* pp. 203-259.
- Barnard E. A., Miledi R., y Sumikawa K. 1982. **Translation of Exogenous Messenger RNA Coding for Nicotinic Acetylcholine Receptors Produces Functional Receptors in *Xenopus* Oocytes.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 215(1199): 241-6.
- Bidaud, I., Mezghrani, A., Swayne L. A., Monteil, A. y Lory P. 2006. **Voltage-gated Calcium Channels in Genetic Diseases.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1763:1169-1174.
- Buczek O., Burlaj G. y Olivera B. M. 2005. **Conotoxins and the Posttranslational Modification of Secreted Gene Products.** *Cell. Mol. Life Sci* 62: 3067-3079.
- Cazoniero Lorella M. T. y Snider, B. J. 2005. **Calcium in Alzheimer's Disease Pathogenesis: Too much, Too little or in the Wrong Place?** *Journal of Alzheimer's Disease* 8:147-154.
- 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.
- Chomczynski P. y Sacchi N. 1987. **Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction.** *Analytical Biochemistry* 162:156-159.
- Clark, C., Olivera, B.M. y Cruz, L.J., 1981. **A Toxin from *Conus geographus* Venom which Acts on the Vertebrate Central Nervous System.** *Toxicon* 19: 691-699.
- Craig, A. G., Bandyopadhyay, P. y Olivera, B. M. 1999. **Post-Translationally Modified Neuropeptides from *Conus* Venoms.** *European Journal of Biochemistry* 264: 271-275.
-

- Dascal, N. 2001. **Ion-Channel Regulation by G Proteins.** *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 12(9):391-398.
- Endean, R., Gyr, P. y Surridge, J., 1977. **The Pharmacological Actions on Guinea-pig Ileum of Crude Venoms from the Marine Gastropods *Conus striatus* and *Conus magus*.** *Toxicon* 15: 327.
- Endean, R., Parrish, G. y Gyr, P. 1974. **Pharmacology of the Venom of *Conus geographus*.** *Toxicon* 12:131
- Endean, R., Williams, H., Gyr, P. y Surridge, J., 1976. **Some Effects on Muscle and Nerve of Crude Venom from the Gastropod *Conus striatus*.** *Toxicon* 14: 267
- Gundersen C. B., Miledi R., F.R.S. y Parker I. 1983. **Glutamate and Kainate Receptors Induced by Rat Brain Messenger RNA in *Xenopus* Oocyte.** *Proc. R. Soc. Lond. B.* 221:127-143.
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R. y Mairbaix, G. 1971. **Use of Frog Eggs and Oocytes for the Study of messenger RNA and its Translation in Living Cell.** *Nature* 233:177-182.
- Herranz J.L. 2002. **Canalopatías: un nuevo Concepto en la Etiología de las Epilepsias.** *Bol. Pediatr.* 42:20-30.
- Hille B. 1992. **Ionic Channels of Excitable Membranes.** Segunda edición. Sinauer Associates Inc. 1: 21-25.
- Hodgkin, A. L. y Huxley, A. F. 1952. **Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*.** *Journal of physiology* 116: 449-72.
- 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.
- Juarez M. K. 2005. **Caracterización Electrofisiológica del Veneno del Caracol Marino *Conus Californicus* en Canales Iónicos de Potasio.** Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, B.C. Mexico. 107 pp.
- Kohn, A. J., 1956. **Piscivorous Gastropods of the Genus *Conus*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42: 168-171.
- Kohn, A. J. 1990. **Tempo and Mode of Evolution in Conidae.** *Malacologia.* 32:55-67.
-

- Kohn, A. J. y Hunter, C. 2001. **The feeding Process in *Conus imperialis***. *Veliger*. 44: 232-234.
- 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.
- Latorre, R., López, B. J., Bezanilla, F. y Linás, R. 1996. **Biofísica y Fisiología Celular**. Universidad de Sevilla. pp 313.
- Leonard J. P., Nargeot J., Snutch T. P, Davidson N. y Lester H. A. 1987. **Ca Channels Induced in xenopus Oocyte by Rat Brain mRNA**. *The Journal of Neuroscience*. 3:875-881.
- Lew M. J., Flinn J. P., Pallaghy P. K., Murphy R., Whorlow S. L., Wright C. E., Norton R. S. y Angus J. A. 1997. **Structure-Function Relationships of ω -Conotoxin GVIA**. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (18): 12014-12023.
- Lewis, R. L. y Garcia, M. L. 2003. **Therapeutic Potential of Venom Peptides**. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2:790-802.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser A. C., Krieger M., Scott P. M., Zipursky L. S. y Darnell J. 2005. **Biología Celular y Molecular**. 5ta Edición. Editorial Médica Panamericana 7:245-300.
- Longo R., Sagratella S. y Scotti de Carolis A. 1994. **Effects of Calcium Antagonists on Hypoxic and NMDA Injury in Rat Hippocampal Slices**. *Life Sci*. 55:455-462.
- Marshall J., Kelley P. W., Rubakhin S.S., Bingham J. P., Sweedler V. J. y Gilly F.W. 2002. **Anatomical Correlates of Venom Production in *Conus californicus***. *Biol. Bull*. 203: 27-41.
- Miledi R., Parker I., y Sumikawa K. 1982. **Properties of Acetylcholine Receptors Translated by Cat Muscle mRNA in *Xenopus* Oocytes**. *EMBO J*. 1(11): 1307-1312.
- Miledi, R. y Woodward R. M. 1989. **Effects of Defolliculation on Membrane Current Response of *Xenopus* Oocytes**. *Journal of Physiology* 416:601-621.
- McDonough S. I. 2004. **Calcium Channel Pharmacology**. *Editorial Kluwer Academic/Plenum Publishers* 9: 95-131.
- 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.
-

Mori Y., Itsukaichi Y., Nishida M. y Oka H. 2004. **Calcium Channel Mutations and Associated Diseases.** *Calcium Channel Pharmacology. Edited by McDonough Kluwer Academic/Plenum Publishers*, 9: 303-323.

Nielsen J. K., Schroeder T. y Lewis R. 2000. **Structure-Activity Relationships of ω -conotoxins al N-type Voltage-Sensitive Calcium Channels.** *Journal of Molecular Recognition*. 13:55-70.

Norton S.R. y Olivera, B. M. 2006. **Conotoxins Down Under.** *Toxicon* 48: 780-798.

Norton S. R., Pallaghy K. P., Baell B. J., Wright E. C., Lew J. M., y Angus A. J. 1999. **Polypeptide ω -Conotoxin GVIA as a Basis for New Analgesic and Neuroprotective Agents.** *Drug Development Research* 46:206-218.

Olivera, B. M. 1997. **Conus Venom Peptides, Receptor and Ion Channel Target, and Drugs Desing: 50 Million Years of Neuropharmacology.** *Molecular Biology of the Cell*. 8: 2101-2109.

Olivera, B. M., Cruz L. J. y Yoskikami D. 1999. **Effects of Conus peptides on the Behavior of Mice.** *Curr Opin Neurobiol* 9: 772-777.

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.

Olivera, B. M., Miljanich, G., Ramachandran, J. y Adams, M. E. 1994. **Calcium Channel Diversity and Neurotransmitter Release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins.** *Ann. Rev. Biochem.* 63:823-867.

Olivera, B. M., 2006. **Conus Peptides, Biodiversity- Based Discovery and Exogenomics.** *The Journal of Biological Chemistry*. 281(42): 31173-31177.

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

Olivera, B. M., McIntosh, J. M., Cruz, L. J., Luque, F. A. y Gray, W. R. 1984. **Purification and Secuence of a Presynaptic Peptide Toxin from *Conus geographus* Venom.** *Biochemistry* 23:5087-5090.

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.

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

- Rumphius, G.E., 1705. *D'Amboinsche Rariteikamer*, Fr. Halma, Amsterdam.
- Saccomano N. A. y Ahlijanian M. K. 1994. **Ca²⁺ Channel Toxins: Tools to Study Channel Structure and Function.** *Drug Development Research* 33:319-343.
- Saunders, P. R. y Wolfson, F. 1961. **Food and feeding Behavior in *Conus californicus* Hinds, 1844.** *Veliger* 3:73-76.
- Sambrook J. y Russell D. W. 2001. **Molecular Cloning A Laboratory Manual.** Tercera Edición. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 2: 7.21-7.23
- Snutch T. P., Leonard J. P., Gilbert M. M., Lester H. A. y Davidson N. 1990. **Rat Brain Expresses a Heterogeneous Family of Calcium Channels.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:3391-3395.
- Stewart, J. y Gilly F. W. 2005. **Piscivorous Behavior of a Temperate Cone Snail *Conus californicus*.** *Biol. Bull.* 209: 146-153.
- Terlau, H. y Olivera, B. M. 2004. ***Conus* Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides.** *Physiol. Review.* 84:41-68.
- Thompson J. C., Dunbar E. y Laye R. R. 2006. **Treatment Challenges and Complications with Ziconotide Monotherapy in Established Pump Patients.** *Pain Physician* 9:147-152.
- Torres M, Aguilar M. B., Falcón A., Sánchez L., Radwan F. F., Burnett J. W., Heimer-de la Cotera E. P. y Arellano R. O. 2001. **Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*.** *Toxicon* 39(9): 1297-307.
- Vargas, G. C. 2005. **Identificación y Aislamiento de Dos Agentes Citotóxicos Provenientes del Caracol Marino *Conus californicus*.** Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, B.C. México. 120 pp.
- Whysner J.A. y Saunders P.R. 1996. **Purification of the Lethal Fraction of the Venom of the Marine Snail *Conus Californicus*.** *Toxicon* 4: 177-181.
- Woodward R. S., Cruz J. L., Olivera M. B. Y Hillyard R. S. 1990. **Constant and hypervariable Regions in Conotoxin Propetides.** *The EMBO Journal* 9(4): 1015-1020.
-

PÁGINAS WEB:

www.msc.ucla.edu (Febrero, 2008).

<http://gilly.stanford.edu/cone.html> (Febrero, 2008).

<http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/jacob/teaching/ionchan/ionchan5.html>
(Diciembre, 2007).

<http://www.azlink.be/> (Enero, 2008).

ANEXO 1

Solución	Compuesto	Porcentaje final en la solución
A	Ácido trifluoroacético	0.12
	H ₂ O destilada	99.88

ANEXO 2

Solución	Compuesto	Porcentaje final en la solución
B	Ácido trifluoroacético	0.1
	Acetonitrilo	99.9

ANEXO 3

Solución	Compuesto	Concentración
D	Tiocianato de guanidina	4 M
	Citrato de sodio	25 mM
	sarcosyl	5%
	β-mercaptoetanol	0.1M
	Agua tratada con dietil pirocarbonato	

ANEXO 4

Solución	Compuesto	Concentración
Amortiguador	Tris-HCl	10mM
E (pH 7.6)	Agua tratada con dietil pirocarbonato	

ANEXO 5

Solución	Compuesto	Concentración
Amortiguador A (pH 7.6)	Tris-HCl	10mM
	NaCl	0.5M
	Agua tratada con dietil pirocarbonato	

ANEXO 6

Solución	Compuesto	Concentración
Amortiguador Ax2	Tris-HCl (pH 7.6)	20 mM
	NaCl	1 M
	Agua tratada con dietil pirocarbonato	

ANEXO 7

Solución	Compuesto	Concentración
Medio Barth pH 7.4	NaCl	88 mM
	KCl	1 mM
	NaHCO ₃	2.4 mM
	Ca(NO ₃) ₂	0.33 mM
	CaCl ₂	0.41 mM
	MgSO ₄	0.82 mM
	HEPES	5 mM
	gentamicina	70 µg/ml

ANEXO 8

Solución	Compuesto	Concentración
Ringer Normal pH 7	NaCl	115 mM
	KCl	2 mM
	CaCl ₂	1.8 mM
	HEPES	5 mM

ANEXO 9

Solución	Compuesto	Concentración
Ringer 5mM pH 7	NaCl	115 mM
	KCl	2 mM
	CaCl ₂	5 mM
	HEPES	5 mM

ANEXO 10

Solución	Compuesto	Concentración
Ringer s/ Ca ²⁺	NaCl	115 mM
	KCl	2 mM
	HEPES	5 mM

ANEXO 11

Solución	Compuesto	Concentración mg/ L
Medio de cultivo de Leibovitz	Glicina	200
	L-alanina	225
	L-arginina	500
	L-asparagina	250
	L-cisteina	120
	L-glutamina	300
	L-histidina	250
	L-isoleucina	250
	L-leucina	125
	L-lisina	75
	L-metionina	75
	L-fenilalanina	125
	L-serina	200
	L-treonina	300
	L-triptofano	20
	L-tirosina	300
	L-valina	100
	cloruro de colina	1
	pantotenato de calcio	1
acido fólico	1	

inositol	2
niacinamida	1
hidrocloruro de piridoxina	1
riboflavina	0.1
monofosfato de tiamina	1
CaCl ₂	140
MgCl ₂	93.7
KH ₂ PO ₄	97.67
KCl	400
KH ₂ PO ₄	60
NaCl	8000
Na ₂ HPO ₄	190
D-galactosa	900
piruvato de sodio	550

ANEXO 12

Solución	Compuesto	Concentración
Solución de disociación	colagenasa	0.125 mg/ml
	tripsina	0.125 mg/ ml

ANEXO 13

Solución	Compuesto	Concentración
Medio de cultivo de Leibovitz modificado	suero fetal bovino	10%
	penicilina	500 UI
	fungizone	2.5 µl/ml
	NaHCO ₃	15.7 mM
	HEPES	15.8 MM

ANEXO 14

Solución	Compuesto	Concentración
extracelular		
pH 7.4	CaCl ₂	10mM
ajustado	CsCl	5mM
con HCl	MgCl ₂	1.2 mM
	HEPES	10 mM
	TEA-Cl	125 mM
	4-AP	10 mM

ANEXO 15

Solución	Compuesto	Concentración
intracelular		
pH 7.2	CaCl ₂	0.134 mM
ajustado	CsCl	140 mM
con CsOH	HEPES	5 mM
	TEA-Cl	10 mM
	EGTA	10 mM
	MgATP	2 mM
	NaGTP	1 mM