CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA

Pruebas preclínicas de la conotoxina sintética xm1b con actividad contra tuberculosis en un modelo murino.

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:
Jorge Fernando Díaz Castillo

Ensenada, Baja California, México
2015

Tesis defendida por

Jorge Fernando Díaz Castillo

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedorovish Licea Navarro
Director del comité

Dra. Anamaría Escofet Giansone
Miembro del Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Miembro del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Julio, 2015

Resumen de la tesis que presenta **Jorge Fernando Díaz Castillo** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la vida con orientación en Biotecnología Marina.

Pruebas preclínicas de la conotoxina sintética xm1b con actividad contra tuberculosis en un modelo murino.

Resumen elaborado por:

_____

Jorge Fernando Díaz Castillo

Las pruebas preclínicas buscan definir los efectos farmacológicos y toxicológicos de las moléculas de interés, previo a su administración en humanos, mediante la realización de diversos ensayos sobre líneas celulares y modelos animales. Péptidos como las conotoxinas poseen un gran potencial para ser utilizados como fármacos en el tratamiento de condiciones médicas en las cuales se carece de una medicación eficaz. En esa línea, en trabajos previos en el grupo de investigación se identificó y caracterizó la conotoxina xm1b procedente de *Conus ximenes,* la cual demostró poseer propiedades inhibitorias contra *Mycobacterium tuberculosis* tanto *in vitro* como *in vivo.* En este trabajo, se realizaron las primeras pruebas preclínicas de dicha conotoxina usando un modelo murino. Los ensayos de toxicidad *in vitro* mostraron que xm1b presenta baja citotoxicidad sobre líneas celulares de hepatocitos y fibroblastos. Los ensayos de letalidad *in vivo* aplicando el método “Up And Down” determinaron que la DL_{50} por vía intraperitoneal fue mayor a 550 mg/kg. La cuantificación y el análisis farmacocinético realizado mediante un modelo no compartimental mostraron una posible pérdida en la detección de la conotoxina, implicando un efecto farmacológico de corta duración. Sin embargo, dicha pérdida fue confirmada experimentalmente mediante la cuantificación con sangre total enriquecida sugiriendo que existe algún tipo de afinidad entre xm1b y algún componente sanguíneo, que potencialmente puede ayudar a que el efecto farmacológico sea más prolongado. Hasta el momento, xm1b es la primera conotoxina aislada e identificada con actividad inhibitoria sobre *M. tuberculosis*, y los resultados obtenidos sugieren que dicha conotoxina es un candidato factible para ser considerado como un fármaco, y alientan a la continuación de los estudios correspondientes para una completa caracterización.

Palabras clave**: conotoxina, tuberculosis, farmacocinética, toxicidad**

Abstract of the thesis presented by **Jorge Fernando Díaz Castillo** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Preclinical trials of synthetic conotoxin xm1b with activity against tuberculosis in a murine model

Abstract elaborate by:

_____

Jorge Fernando Díaz Castillo

Preclinical trials aim to define the pharmacological and toxicological effects of the molecules of interest, prior to administration in humans, by performing several essays on cell lines and animal models. Peptides like conotoxins have great potential for use as drugs in the treatment of medical conditions in which there is a lack of an effective medication. On this way, in previous research in the group work we was identified and characterized the conotoxin xm1b from *Conus ximenes*, which proved to have inhibitory properties against *Mycobacterium tuberculosis in vitro* and *in vivo*. In this work, the first preclinical trials of such conotoxin using a mouse model were performed. *In vitro* toxicity assays xm1b showed low cytotoxicity on cells lines of hepatocytes and fibroblasts. The lethality *in vivo* tests using the "Up And Down" method determined that the intraperitoneal LD_{50} was greater than 550 mg/kg. Quantification and pharmacokinetic analysis using non-compartmental model showed a possible loss in detecting the conotoxin, implying a short pharmacological effect. However, such loss was confirmed experimentally by quantification whole blood enriched suggesting that there is some affinity between xm1b and a blood component that can potentially help the pharmacological effect be longer. Until now, xm1b is the first conotoxin isolated and identified with inhibitory activity on M. tuberculosis, and the results suggest that the conotoxin is a feasible candidate to be considered as a drug, and encourage the continuation of the corresponding studies for a complete characterization.

Keywords: **conotoxin, tuberculosis, pharmacokinetic, toxicity**

Dedicatoria

A mis padres y hermana por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través del programa de becas de maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por la oportunidad de ingresar al posgrado en Ciencias de la Vida, al Departamento de Biotecnología Marina y de Innovación Biomédica por todo el apoyo en mi formación académica.

Al Dr. Alexei Licea por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, brindarme su apoyo y orientación en la realización de esta investigación.

A los miembros del comité de tesis, Dra. Anamaría Escofet, Dra. Rosa Mouriño por brindarme su tiempo, ayuda y sugerencias en la realización de esta tesis.

Al Dr. Pavel Lugo por toda su ayuda y apoyo, a los técnicos del laboratorio Dra. Johanna Bernáldez, Dr. Ricardo González y especialmente a MC. Samanta Jiménez por su invaluable ayuda en masas.

A los investigadores de la DIB, Dr. Genaro Pimienta, Dr. Pierrick Fournier y la Dra. Patricia Juárez por su ayuda con tantas dudas y preguntas.

A todo el personal administrativo, especialmente Adriana Mejia, Viviana Oloño, Gabriela Altamirano y Guadalupe Martínez quienes sin duda hacen todo mucho más fácil.

A la Dra. Noemí Sánchez y Lic. Harumy Rivera por su ayuda en los tramites.

A mi familia. A mi papá por siempre ser un ejemplo y motivación para llegar hasta aquí y continuar. A mi mamá con quien voy a estar en deuda por siempre por todo lo que haz hecho por mi. A Karen por tu no deseada compañía y por todos esos momentos de risas que hicieron todo más ameno.

A Paola por todo tu amor y apoyo, y por esa valiosa ayuda en el laboratorio, por desvelarte y madrugar conmigo para tomar muestras, por tu compañía y por cada una de esas palabra que hicieron que nunca perdiera el rumbo.

Tabla de Contenido

Resumen en español ii

Resumen en inglés iii

Dedicatoria iv

Agradecimientos v

Lista de figuras ix

Lista de tablas x

1 Introducción 1

1.1 Antecedentes 1

1.1.1 Conotoxinas 1

1.1.2 Clasificación de las conotoxinas 2

1.1.3 α-Conotoxinas 4

1.1.4 Identificación y secuenciación de la conotoxina xm1b 5

1.1.5 Caracterización bioquímica y biológica de la conotoxina xm1b 6

1.1.6 Actividad in vivo de xm1b sintética en un modelo murino infectado con TB 7

1.2 Justificación 9

1.3 Hipótesis 10

1.4 Objetivos 11

1.4.1 Objetivo General 11

1.4.2 Objetivos Particulares 11

2 Metodología 12

2.1 Síntesis del péptido 12

2.2 Letalidad de la conotoxina xm1b 12

2.2.1 Toxicidad *in vitro* 12

2.2.1.1 Determinación de interferencia entre reactivos 12

2.2.1.2 Evaluación de la citotoxicidad 13

2.2.2 Dosis letal media (DL_{50}) 14

2.2.2.1 Selección, obtención y mantenimiento de los animales de experimentación 14

2.2.2.2 Determinación de la DL_{50} por vía intraperitoneal 15

Tabla de Contenido (continuación)

2.3 Farmacocinética de la conotoxina xm1b 16
2.3.1 Simplificación y evaluación del proteoma en geles de poliacrilamida 16
2.3.2 Estandarización para la cuantificación de xm1b usando cromatografía liquida de alta resolución fase reversa (RP-HPLC) 19
2.3.2.1 Curva de calibración en HPLC 19
2.3.2.2 Recuperación de xm1b después de la sedimentación de proteínas del suero..... 19
2.3.3 Estabilidad de xm1b en suero de ratón 20
2.3.4 Análisis farmacocinético empleando espectrometría de masas (MS) 20
2.3.4.1 Condiciones analíticas en HPLC-Chip/MS 20
2.3.4.2 Curva de calibración en MS..... 21
2.3.4.3 Colecta y procesamiento de muestras biológicas 21
2.3.4.4 Análisis farmacocinético 22
2.3.5 Afinidad de xm1b por componentes sanguíneos..... 22

3 Resultados 23
3.1 Letalidad de la conotoxina xm1b 23
3.1.1 Toxicidad in *vitro* 23
3.1.1.1 Determinación de interferencia entre los reactivos de los ensayos de citotoxicidad 23
3.1.1.2 Evaluación de la citotoxicidad..... 24
3.1.2 Determinación de la dosis letal media (DL_{50}) 25
3.2 Farmacocinética de la conotoxina xm1b 27
3.2.1 Evaluación de la simplificación del proteoma en geles de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE) 27
3.2.2 Estandarización de las condiciones para la cuantificación de xm1b usando cromatografía liquida de alta resolución fase reversa (HPLC-RP)..... 29
3.2.2.1 Curva de calibración en HPLC 29
3.2.2.2 Recuperación de xm1b después de remover las proteínas del suero 30
3.2.3 Estabilidad de xm1b en suero de ratón. 31
3.2.4 Análisis farmacocinético empleando espectrometría de masas (MS) 33
3.2.4.1 Curva de calibración en MS..... 33

Tabla de Contenido (continuación)

3.2.4.2 Análisis farmacocinético 33
3.2.5 Afinidad de xm1b por componentes sanguíneos 35

4 Discusión 36
4.1 Generalidades 36
4.2 Letalidad del péptido sintético xm1b 37
4.2.1 Toxicidad *in vitro* 37
4.2.2 Dosis letal media (DL50) 39
4.3 Farmacocinética 40
4.3.1 Simplificación del proteoma del suero 40
4.3.2 Recuperación de xm1b después de remover las proteínas del suero 41
4.3.3 Estabilidad de xm1b en suero de ratón 41
4.3.4 Análisis farmacocinético 42
4.3.5 Afinidad de xm1b por componentes sanguíneos 45

5 Conclusiones 46

Lista de Referencias 47

Lista de figuras

Figura		Página
1	Anatomía general de *Conus sp*……	2
2	Diagrama general del procedimiento realizado para la identificación y secuenciación de la conotoxina xm1b…….	6
3	Secuencia primaria del péptido xm1b…….…….	7
4	Resultado de la actividad *in vivo* de la conotoxina xm1b sobre la cepa de tuberculosis H37Rv…….……..	8
5	Esquemas de los procedimiento para obtención de suero de ratón y sedimentación de proteínas……..…….……..…	18
6	Absorbancia producida por las diferentes combinaciones entre los reactivos usados en los ensayos de citotoxicidad……..……...	23
7	Micrografía de los cultivos celulares de las líneas L929 y HepG2…..…	24
8	Dosis-respuesta de las células expuestas a diferentes concentraciones de xm1b durante 24 y 48 horas……..……	25
9	Análisis del suero de ratón mediante gel de poliacrilamida…...……..	27
10	Sedimentación de proteínas de suero en geles de poliacrilamida empleando etanol, acetonitrilo, metanol, acetona y TCA…….	28-29
11	Curva de calibración para la cuantificación de xm1b en HPLC…..……..	30
12	Recuperación de xm1b posterior a la eliminación de las proteínas del suero ……..…..	31
13	Cromatogramas de los diferentes tiempos de exposición de xm1b al suero de ratón.……..…….….	32
14	Estabilidad de xm1b en suero de ratón durante 24 horas.……..……	32
15	Curva de calibración para la cuantificación del péptido xm1b en MS…	33
16	Cuantificación plasmática de xm1b después de una administración intraperitoneal durante 24 horas ……..…….	34
17	Cromatogramas resultado de la exposición de xm1b a sangre total…..	35

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Patrones de cisteínas de las conotoxinas……..	3
2	Familias funcionales de las conotoxinas…….	4
3	Arreglos de cisteínas descritos para la familia de las α-conotoxinas…..	5
4	Condiciones evaluadas para determinar interferencia entre reactivos...	13
5	Esquema de las dosis seleccionadas de acuerdo al protocolo de la OECD para determinar la DL_{50}……..……..…….	15
6	Proporciones aplicadas de los reactivos sobre el suero de ratón….	17
7	Efecto de las diferentes dosis de xm1b en la supervivencia de ratones……...	26
8	Parámetros farmacocinéticos de xm1b con administración intraperitoneal……...…..	34

1 Introducción

El ambiente marino ha demostrado ser una valiosa fuente de productos naturales, los cuales poseen un diverso rango de actividades biológicas. Un ejemplo son los gasterópodos pertenecientes al género *Conus,* que representan el mayor grupo de invertebrados marinos con más de 700 especies (Luo et al., 2013). En las últimas décadas, el interés científico en estos organismos se ha incrementado debido a que poseen un veneno formado por un coctel único de toxinas farmacológicamente activas, que constituyen una gran familia de péptidos de entre 10 y 40 aminoácidos, la mayoría ricos en enlaces disulfuro (Lu, Yang, Xu, y Wang, 2014), caracterizados por poseer una elevada potencia y alta selectividad respecto a sus blancos moleculares (Koua et al., 2012). Los blancos moleculares de estas toxinas son una gama de canales iónicos y receptores del sistema nervioso que permiten a los organismos defenderse y alimentarse de peces, moluscos, o gusanos según la dieta de cada especie (Jin et al., 2013). Por ello, las conotoxinas tienen un gran potencial para ser utilizados como fármacos en el tratamiento de condiciones médicas en las que actualmente se carece de un tratamiento eficaz (Brady, Baell, y Norton, 2013).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Conotoxinas

Las toxinas producidas por los *Conus* son sintetizadas en el epitelio del ducto venenoso, de donde serán secretadas posteriormente mediante la inyección del veneno en la presa (Dobson et al., 2012), como se esquematiza en la figura 1.

Muchos de estos péptidos tienen la característica de poseer modificaciones postraduccionales como amidación, enlaces disulfuro, oxidación, bromación, (Olivera, 1997), hidroxilación (Craig et al., 1999) y glucosilación (Gerwig, Hocking, Stöcklin, Kamerling, y Boelens, 2013) entre otras, que pueden resultar esenciales para la maduración o para su función biológica (Buczek, Bulaj, y Olivera, 2005)

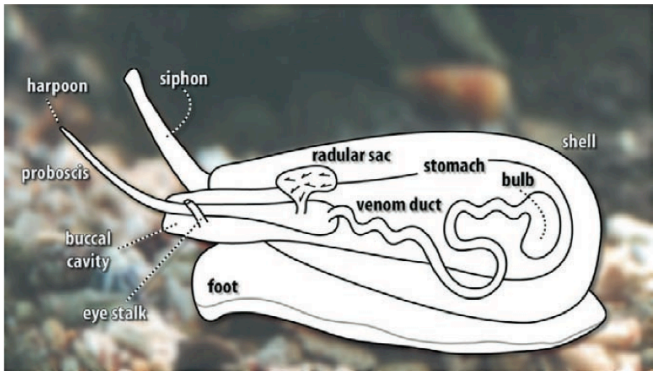


Figura 1. Anatomía general de Conus sp. Se observa el bulbo venenoso que ayuda a impulsar el veneno, el ducto venenoso donde se sintetizan las conotoxinas, el saco radular donde se almacenan los "arpones" usados para inyectar el veneno, y la probóscide mediante la cual se ingiere a la presa (Fusetani y Kem, 2009).

El mecanismo de acción de las conotoxinas consiste en unirse a diferentes receptores, como canales iónicos mediados por voltaje o ligando, receptores acoplados a proteínas G, y transportadores de neurotransmisores del sistema nervioso y muscular (Dobson et al., 2012), donde podrán actuar como agonistas o antagonistas. Durante muchos años se ha estimado que cada una de las más de 700 especie de *Conus* producen entre 100 y 200 conotoxinas diferentes, calculando que entre todas las especies existen más de 70,000 péptidos (Olivera, 2006). Sin embargo, basados en los resultados de otros estudios donde se comparó el veneno de organismos individuales, se demostró que la cantidad de péptidos es superior a la predicha, incrementando este número aproximadamente 10 veces, llegando a estimar que existen de 1,000 a 2,000 péptidos por especie (Davis, Jones, y Lewis, 2009). Pese a eso, actualmente menos de 2,000 de estas toxinas han sido identificadas satisfactoriamente en 92 especies, dejando un gran porcentaje de estos péptidos todavía sin caracterizar (Lu et al., 2014).

1.1.2 Clasificación de las conotoxinas

Las conotoxinas se clasifican de acuerdo a tres criterios. El primero se basa en la secuencia señal del péptido inmaduro, y corresponde a una secuencia corta de aproximadamente 20 aminoácidos, altamente conservada, utilizada para definir las superfamilias (Puillandre, Koua, Favreau, Olivera, y Stöcklin, 2012). Actualmente se considera la existencia de 26 superfamilias, las cuales se definen usando una letra

mayúscula, y según lo descrito en ConoServer (http://www.conoserver.org) son: A, B1, B2, B3, C, D, E, F, G, H, I1, I2, I3, J, K, L, M, N O1, O2, O3, P, S, T, V e Y.

El segundo criterio es la clasificación de las conotoxinas maduras de acuerdo al número y patrón de cisteínas (Puillandre et al., 2012) (tabla 1).

Tabla 1. Patrones de cisteínas de las conotoxinas descritos hasta el momento. Recuperado y modificado de http://www.conoserver.org/?page=classification

Marco de Cisteínas	Patrón de Cisteínas	Número de Cisteínas
I	CC-C-C	4
II	CCC-C-C-C	6
III	CC-C-C-CC	6
IV	CC-C-C-C-C	6
V	CC-CC	4
VI/VII	C-C-CC-C-C	6
VIII	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	10
IX	C-C-C-C-C-C	6
X	CC-C.[PO]C *	4
XI	C-C-CC-CC-C-C	8
XII	C-C-C-C-CC-C-C	8
XIII	C-C-C-CC-C-C-C	8
XIV	C-C-C-C	4
XV	C-C-CC-C-C-C-C	8
XVI	C-C-CC	4
XVII	C-C-CC-C-CC-C	8
XVIII	C-C-CC-CC	6
XIX	C-C-C-CCC-C-C-C-C	10
XX	C-CC-C-CC-C-C-C-C	10
XXI	CC-C-C-C-CC-C-C-C	10
XXII	C-C-C-C-C-C-C-C	8
XXIII	C-C-C-CC-C	6
XXIV	C-CC-C	4
XXV	C-C-C-C-CC	6
XXVI	C-C-C-C-CC-CC	8

***O indica una 4-trans-hidroxiprolina**

El último criterio es la caracterización de acuerdo a los blancos moleculares, lo que se conoce como “familia funcional” (Puillandre et al., 2012). Estas familias se denotan usando una letra del alfabeto griego (tabla 2).

Tabla 2. Familias funcionales de las conotoxinas descritas hasta el momento. Recuperado y modificado de http://www.conoserver.org/?page=classification

Familia Funcional	Blanco Molecular
α (alfa)	Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)
γ (gamma)	Marcapasos neuronales de corriente catiónica (corriente catiónica hacia el interior)
δ (delta)	Canales de Na^+ regulados por voltaje (agonista, retrasa la inactivación)
ε (épsilon)	Canales de Ca^+ presinápticos o proteínas G acopladas a receptores presinápticos
ι (iota)	Canales de Na^+ regulados por voltaje (agonista, no retrasa la inactivación)
κ (kappa)	Canales de K^+ regulados por voltaje (bloquea)
μ (mu)	Canales de Na^+ regulados por voltaje (antagonista, bloquea)
ρ (rho)	Receptores adrenérgicos alfa 1 (GPCR)
σ (sigma)	Canales de Serotonina (GPCR)
τ (tau)	Receptores de somatostatina
χ (chi)	Transportadores neuronales de noradrenalina
ω (omega)	Canales de Ca^+ regulados por voltaje (bloquea)

1.1.3 α-Conotoxinas

Los miembros de ésta familia tienen un tamaño entre 12 y 19 aminoácidos de longitud, generalmente poseen 4 cisteínas (tabla 3), y es frecuente encontrar una Prolina entre la segunda y tercera cisteína (Arias y Blanton, 2000). Son péptidos altamente selectivos en su unión con los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Dutton y Craik, 2001). En los animales vertebrados es posible encontrar dos tipos de estos receptores, los musculares y neuronales, los cuales participan en una variedad muy amplia de procesos, incluidos la función cognitiva, movimiento, percepción de sonidos y la función inmune (Olivera et al., 2008).

Tabla 3. Arreglos de cisteínas descritos para la familia de las α-conotoxinas. Modificado de Arias y Blanton (2000)

Arreglo Cisteínas	Subfamilia
CC*X*$_3$-C*X*$_5$-C	$\alpha_{3/5}$
CC*X*$_4$-C*X*$_3$-C	$\alpha_{4/3}$
CC*X*$_4$-C*X*$_7$-C	$\alpha_{4/7}$

"X" corresponde al número de aminoácidos entre los residuos de cisteínas.

En general las α-conotoxinas compiten por los sitios de unión de acetilcolina actuando como agonistas, sin embargo también existen diferentes conotoxinas que inhiben la activación funcional de estos receptores de manera no competitiva, como PIIIE de *C. purpurascens* (Arias y Blanton, 2000). Por ello la identificación de un ligando con alta especificidad para ciertos subtipos de nAChR es de gran importancia en el desarrollo de nuevos fármacos, convirtiendo a las α-conotoxinas en una fuente importante de agentes terapéuticos.

1.1.4 Identificación y secuenciación de la conotoxina xm1b

El trabajo realizado por Bernáldez (2013) en el laboratorio de inmunología molecular y biotoxinas de CICESE, tenía por objetivo identificar y caracterizar toxinas que presentaran capacidad inhibitoria contra *Mycobacterium tuberculosis* a partir del venenos de caracoles marinos del género *Conus*. En los resultados de ese trabajo se identificó un péptido procedente de *C. ximenes* que demostró tener un alto potencial para servir como agente terapéutico frente a la tuberculosis. El resumen de éste trabajo se esquematiza en la figura 2.

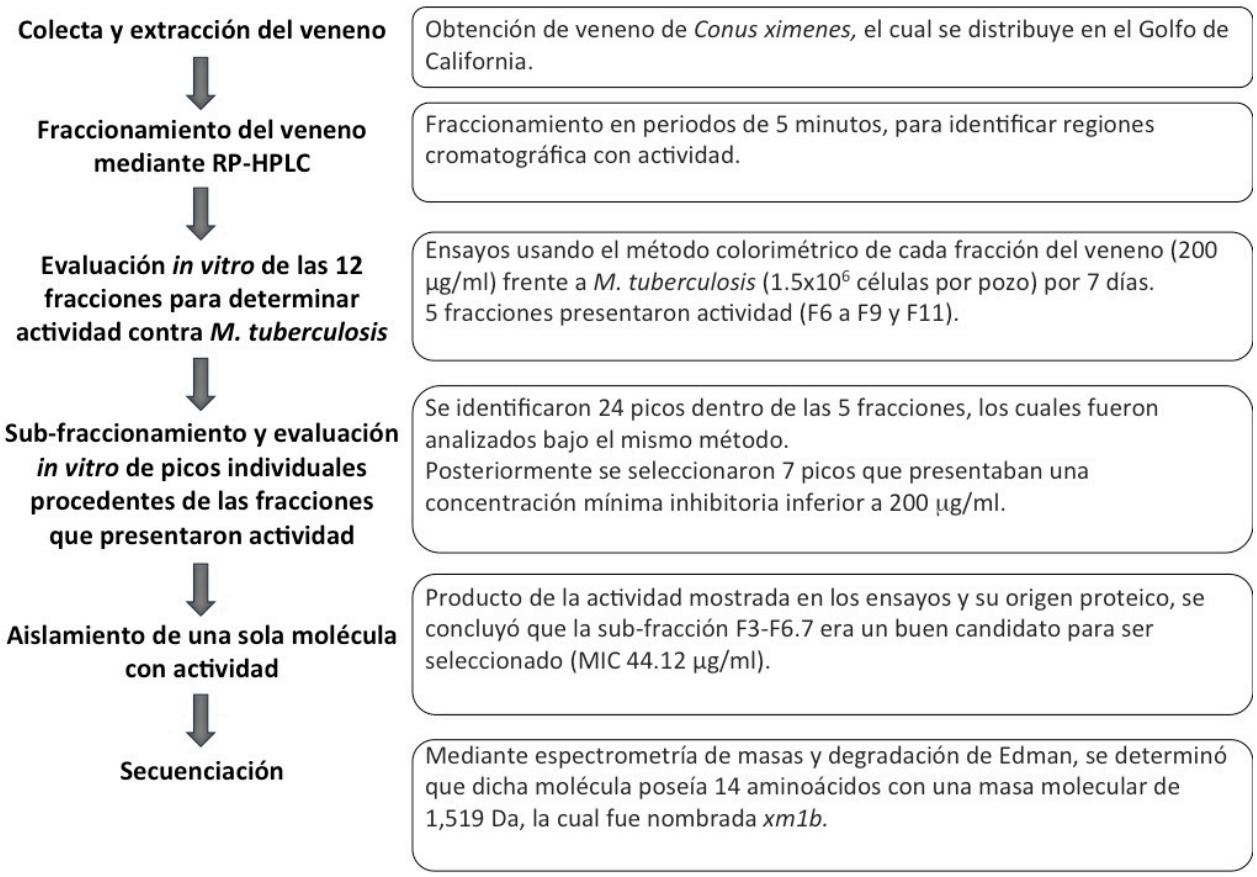


Figura 2. Diagrama general del procedimiento realizado para la identificación y secuenciación de la conotoxina xm1b.

1.1.5 Caracterización bioquímica y biológica de la conotoxina xm1b

De acuerdo con la estructura primaria observada en la figura 3, xm1b presenta un patrón de cisteínas CC-C-C reportado previamente para la familia α, k y ρ (Kaas, Westermann, y Craik, 2010). El espacio entre cisteínas corresponde al arreglo de la subfamilia $\alpha_{4/3}$ (tabla 3). Un alineamiento de secuencias reportado por Bernáldez (2013) encontró una homología del 83% con la conotoxina ImI de *C. imperialis*, la cual pertenece a la familia α y a la subfamilia $\alpha_{4/3}$, y es reconocida como antagonista de los nAChR. Una característica de diversas α-conotoxinas, es una prolina en la posición 6, lo que indica especificidad hacia las subunidades α7 de éstos receptores (Ellison, McIntosh, y Olivera, 2003). Las modificaciones postraduccionales de xm1b son enlaces disulfuro y la amidación del C-terminal, la cual en conjunto con la prolina se consideran esenciales para la correcta formación de los enlaces disulfuro, dado que la ausencia de estas características tiende a formar patrones de unión no activos (Craik y Adams,

2007). Por ello, considerando lo antes descrito, Bernáldez (2013) clasificó la toxina aislada de la fracción F3-F6.7 del veneno de *C. ximenes* y nombrada como xm1b como miembro de la familia de las α-conotoxinas, a reserva de corroborarse con ensayos posteriores.

Asp-Gly-**Cys**-**Cys**-Arg-Asp-Pro-Arg-**Cys**-Ala-Ile-Asn-**Cys**-Val

Figura 3. Secuencia primaria del péptido xm1b. Aislado de la fracción F3-F6.7 del veneno de *C. ximenes*.

Pese a que hasta el momento no existe suficiente evidencia que indique cuál es el blanco molecular de la conotoxina, se sabe que *M. tuberculosis* (TB) es un patógeno intracelular que afecta principalmente a macrófagos al reducir su capacidad microbicida. Considerando lo anterior, Cervantes (2013) demostró que xm1b favorece la transcripción de genes pro-inflamatorios como IL-1β y TNF-α, indicando que probablemente uno de los mecanismos de acción de la conotoxina sea la activación de macrófagos al actuar como inmunoestimulante.

1.1.6 Actividad in vivo de xm1b sintética en un modelo murino infectado con TB.

Para determinar si la conotoxina sintética xm1b era capaz de reducir la carga bacilar *in vivo*, se realizó un ensayo en el que se inoculó la cepa H37Rv de TB mediante una inyección intratraqueal a ratones Balb/c. Dos meses después de la inoculación, los animales se dividieron en tres grupos: Uno fue tratado con 50 μl solución salina vía subcutánea, otro con 3 mg/kg de nicotina (ad libitum) y el último fue tratado con 2.5 mg/kg de la conotoxina sintética xm1b. La administración en todos los casos fue cada tercer día por dos períodos, uno de un mes y otro de dos meses. Concluidos cada uno de éstos, los ratones fueron sacrificados y se utilizó uno de los pulmones para cuantificar el número de unidades formadoras de colonia (UFC). La figura 4 muestra los resultados de la cuantificación al primer y segundo mes de tratamiento (Bernáldez, 2013).

El experimento demostró que la conotoxina si era capaz de disminuir la carga bacilar en los pulmones de los ratones en comparación con el control de solución salina, presentado una diferencia significativa al segundo mes del tratamiento.

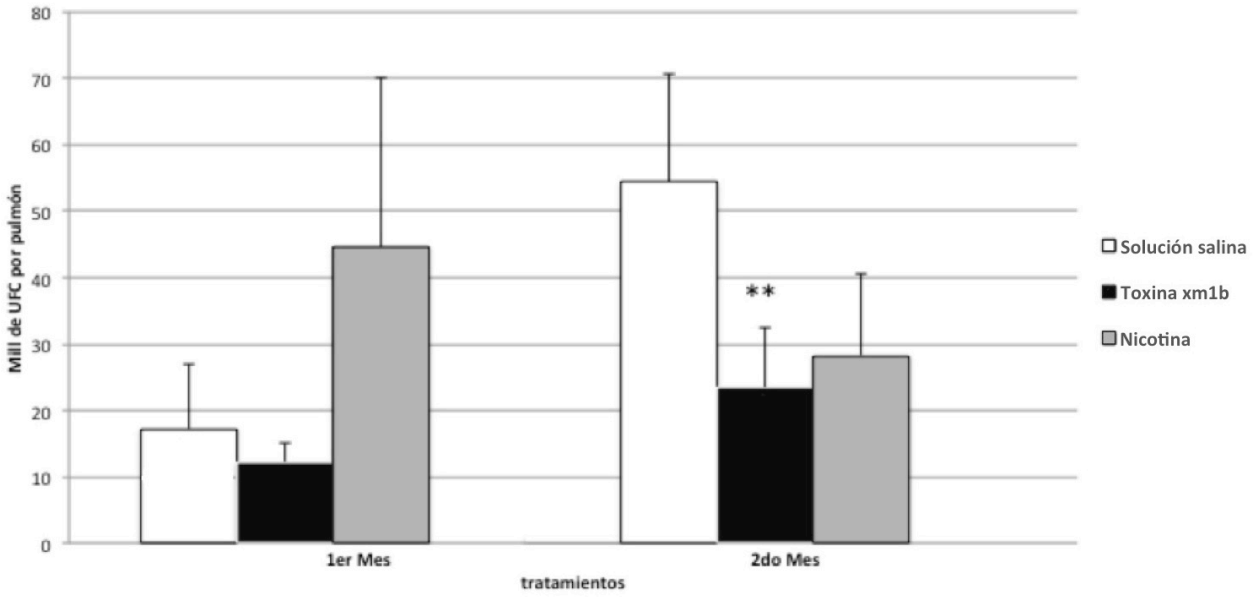


Figura 4. Resultado de la actividad *in vivo* de la conotoxina xm1b sobre la cepa H37Rv. El gráfico muestra la cuantificación de UFC al primer y segundo mes de la administración de los tratamientos (Bernáldez, 2013).

1.2 Justificación

La tuberculosis representa un problema sanitario en todo el mundo, y una de sus complicaciones radica en que el tratamiento toma al menos 6 meses usando múltiples antibióticos, lo cual resulta abrumador y generalmente conduce al abandono del mismo, trayendo como consecuencia la generación de resistencia por parte de la micobacteria. Otro problema es que la mayoría de los medicamentos de primera línea fueron lanzados antes de que la farmacocinética y posología fueran un requerimiento para determinar la relación entre la cantidad de medicamento administrado y la que alcanzaba el sitio de infección, conllevando a sub-optimizar la dosis (Dartois, 2014).

Por otro lado las conotoxinas han demostrado ser una fuente para el desarrollo de nuevos fármacos debido a su capacidad de proporcionar mecanismos de acción novedosos y mejorar los tratamientos para las cepas resistentes. Debido a esto, en el trabajo realizado por Bernáldez (2013) se reportó la identificación de una conotoxina nativa de *C. ximenes,* denominada xm1b*,* la cual al igual que su homologa sintética, demostraron poseer propiedades contra *M. tuberculosis*.

Sin embargo, los estudios de validación para que el péptido xm1b sea considerado un candidato a medicamento todavía no se han realizado. Por ello, en este trabajo se realizan las primeras pruebas preclínicas a dicha conotoxina con el fin de establecer si su administración es segura y realizar el modelado farmacocinético.

1.3 Hipótesis

Las pruebas preclínicas realizadas a la conotoxina xm1b la hacen un buen candidato para ser considerado un fármaco en el tratamiento de la tuberculosis.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Aportar los primeros datos preclínicos de la conotoxina sintética xm1b en un modelo murino.

1.4.2 Objetivos Particulares

- Evaluar la letalidad causada por la administración de diferentes dosis de la conotoxina sintética xm1b.
- Analizar el comportamiento farmacocinético de la conotoxina sintética xm1b.

2 Metodología

2.1 Síntesis del péptido

La síntesis fue realizada por la empresa GenicBio Limited. La pureza del péptido según el reporte fue del 95.75% con una masa molecular de 1,519.78 Da. La conotoxina fue sintetizada con la amidación en el C-terminal, y el patrón de enlaces disulfuro fue C1-C3 y C2-C4. El péptido fue mantenido liofilizado y a -80 ^{o}C para su preservación.

2.2 Letalidad de la conotoxina xm1b

Es imprescindible desde el punto de vista económico y práctico, tener que discriminar entre diversos compuestos a aquellos que posean las características apropiadas para servir como medicamentos. Uno de los principales factores en este sentido es el potencial tóxico, y por ello su evaluación *in vitro* e *in vivo* debe ser de los primeros elementos a valorar en el proceso de selección de nuevos fármacos (Wang, Shindoh, Inoue, y Horii, 2002).

2.2.1 Toxicidad *in vitro*

2.2.1.1 Determinación de interferencia entre reactivos

Se realizaron dos ensayos de control con el objetivo de evaluar una posible interferencia química entre las sustancias que serían usadas subsecuentemente, y se llevaron a cabo probando cuatro concentraciones diferentes de DMSO (Dimetil sulfóxido) (Sigma-Aldrich) en presencia de cada uno de los dos medio de cultivo celular: DMEM (Medio Eagle Modificado de Dulbecco) (Corning) y MEM (Medio Mínimo Esencial) (Corning). En ambos experimentos también se añadió el reactivo CellTiter 96 Aq_{ueous} One Solution (Promega) a una concentración final de 317 µg/ml (Tabla 4).
Los ensayos se montaron en placas de 96 pozos (Costar), con un volumen final de 100 µl por pozo. Cada condición fue evaluada por triplicado, y el resultado fue analizado

mediante la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch) dos horas después de haber agregado el reactivo CellTiter 96.

Tabla 4. Condiciones evaluadas para determinar interferencia entre reactivos.

	DMSO (%)	Medio de cultivo (%)	CellTiter 96 (µl)
Condición 1	0	100	20
Condición 2	50	50	20
Condición 3	100	0	20

2.2.1.2 Evaluación de la citotoxicidad

Para esto se emplearon dos líneas celulares diferentes: L929 (fibroblastos) y HepG2 (hepatocitos) obtenidas de cultivos criopreservados. La células fueron descongeladas y se centrifugaron los tubos donde estaban contenidas por 5 minutos a 2,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el botón celular fue re-suspendido en el medio de cultivo correspondiente, en el caso de las L929 en DMEM, y para las HepG2 en MEM. Las células en suspensión fueron transferidas a una caja de cultivo con medio para ser incubadas a 37 ºC con 5% de CO_2. Los cultivos se mantuvieron en estas condiciones con recambios de medio hasta que se alcanzó una confluencia celular del 80%. Alcanzada la cantidad de células, el medio de cultivo de las cajas fue descartado y se realizaron lavados con PBS para eliminar cualquier resto. Posteriormente se agregó 1 ml de tripsina-EDTA 1X a cada caja, y se incubó por 5 minutos a 37 ºC para facilitar la separación de las células adheridas. Se adicionó PBS y mediante raspado mecánico se desprendieron las células para transferirlas a un tubo de 50 ml. Se centrifugó por 5 minutos a 3,500 rpm para después descartar el sobrenadante y re-suspender el botón de células en 1 ml del medio de cultivo correspondiente.

Para la cuantificación de las células, se mezclaron 10 µl de la suspensión celular con 10 µl de azul de tripano. Se tomaron 10 µl y se colocaron en una cámara Neubauer Bright Line Counting 3120 Chamber (Hausser scientific). El conteo celular se realizó de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante usando un microscopio óptico Evos XL (Life Technologies). El montaje del ensayo se realizó en placas de 96 pozos donde

se colocaron 50,000 células en cada uno los pozos seleccionado. Los tratamientos aplicados fueron: células con 0.1 mg/ml de xm1b*;* células con 1 mg/ml de xm1b; células con 3 mg/ml de xm1b*;* células con DMSO 10% como control positivo; y células sin tratamiento como control negativo. Cada tratamiento fue realizado por triplicado, y en todos los casos los pozos se llevaron a un volumen final de 100 µl. Las cajas se incubaron a 37 ºC con 5% de CO_2 durante dos períodos que concernieron a 24 y 48 horas. Transcurrido el tiempo establecido y para evaluar la viabilidad de las células, se agregó a cada pozo utilizado 20 µL del reactivo CellTiter 96 Aq_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay, y se dejó incubar por 2 horas bajo las mismas condiciones como lo señala el fabricante. Por último, se leyó la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro.

2.2.2 Dosis letal media (DL_{50})

2.2.2.1 Selección, obtención y mantenimiento de los animales de experimentación

Los roedores son recomendados para fines experimentales debido a su bajo costo, el poco espacio necesario para su mantenimiento y su fácil manejo. En los ensayos realizados para evaluar la letalidad y la farmacocinética de la conotoxina xm1b, se utilizaron ratones CD-1, recomendados para investigaciones en toxicología y estudios generales (Harlan Laboratories, 2009). Los organismos fueron adquiridos de laboratorios Harlan*,* en una edad comprendida entre las 3 y 5 semanas con un peso entre los 16 y 18 gramos. Los animales fueron mantenidos en un animalario Optimice® con agua y alimento *ad libitum,* dentro de un cuarto especial con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y temperatura entre 21 y 23 ^{O}C tal como se recomienda en la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals del National Research Council of the National Academies (2011). El sacrificio de los organismos se realizó mediante dislocación cervical manual (Bolant et al., 1990), lo que conlleva a una muerte instantánea y sin dolor (Close et al., 1997).

2.2.2.2 Determinación de la DL_{50} por vía intraperitoneal

En los años 20´s, cuando se introdujo el cálculo de la dosis letal media (DL_{50}) para determinar la toxicidad de un fármaco, lograr una alta precisión requería un gran número de animales (Zbinden y Flury-Roversi, 1981). Debido a esto, fue propuesto el método “Up-and-down” de Dixon en 1965, el cual minimiza el número de animales requeridos para estimar la toxicidad y es aceptado como una prueba estándar por la Sociedad Americana de Prueba de Materiales (ASTM) y por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD 2008).

Para la elaboración del esquema de dosificaciones, se siguió el protocolo de la OECD (2008), el cual establece que si no se cuenta con información preliminar que permita estimar la DL_{50} es conveniente iniciar con una dosis de 175 mg/kg, y a partir de ésta dosis se decidió utilizar un cuarto de unidad de logaritmo para calcular las dosis subsecuentes (un factor de progresión de 1.77 entre dosis), obteniendo como resultado el esquema de dosificación mostrado en la tabla 5. El límite inferior y el límite superior tienen una relación correspondiente a 2.4 y 220 veces respectivamente, la dosis probada *in vivo* por Bernáldez (2013) descrita en la sección 1.1.6. La administración de la conotoxina se realizó en solución acuosa por vía intraperitoneal en volúmenes constantes de 200 µl.

Tabla 5. Esquema de las dosis seleccionadas de acuerdo al protocolo de la OECD

Progresión de todas las posibles dosis a utilizar (mg/kg)	
550	⇦ Límite superior
310	
175	⇦ Dosis inicial
99	
56	
31	
18	
10	
6	⇦ Límite inferior

El procedimiento inició con la dosificación del primer organismo y fue mantenido en observación por 48 horas. Concluido este período y de acuerdo al protocolo, si el

organismo sobrevivió, la dosis del siguiente animal se incrementará 1.77 veces respecto a la dosis anterior; o por el contrario, si el organismo murió, el siguiente animal debe recibir una dosis 1.77 veces menor respecto a la dosis anterior, y en cualquier caso se debe mantener nuevamente en observación por 48 horas al organismo. Una vez finalizada la dosificación de todos los animales, el cálculo de la DL_{50} se realizó mediante la metodología de Dixon (1965), aplicando la siguiente fórmula:

$$DL_{50} = X_f + kd \quad (1)$$

Donde:

X_f es la última dosis administrada

k es al valor obtenido de la tabla de Dixon (1965)

d es el intervalo entre dosis.

2.3 Farmacocinética de la conotoxina xm1b

El uso de suero hemático para identificar y cuantificar péptidos ha resultado útil para el descubrimiento de nuevos fármacos. Sin embargo, el poder percibir cambios en la concentración de algún péptido por espectrometría de masas, está relacionado y limitado por la complejidad del proteoma del suero, haciendo compleja la detección de la molécula de interés sin algún pre-fraccionamiento previo (Kay et al., 2008).

2.3.1 Simplificación y evaluación del proteoma en geles de poliacrilamida

Con el fin de simplificar el proteoma se realizó la sedimentación de las proteínas del suero mediante la aplicación de diversas sustancias, y se evaluó cada una de ellas mediante geles de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE) con el objetivo de seleccionar la que mejor resultado presentara. Se utilizó un protocolo de sedimentación mediante la aplicación de solventes orgánicos o ácidos, lo cual permite la sedimentación de proteínas de alto peso molecular, dejando los péptidos de bajo peso molecular en solución (Kay et al. 2008). El objetivo era eliminar proteínas como: albumina con un peso molecular de 66 kDa, la cual constituye cerca del 50% de todas las proteínas del suero (Hooper et al., 2009); IgG con un peso molecular de 150 kDa, la cual es posible

disociarla en las cadenas ligeras con un peso de 25 kDa y las cadenas pesadas con un peso de 50 kDa (Boenisch, 2009); IgM con un peso molecular aproximado de 900 kDa. (Boenisch, 2009); y Transferrina que es un polipéptido de 80 kDa (Sarkar, 2002).

Para la obtención del suero se siguió el protocolo de Argmann y Auwerx (2006). Se colectó sangre de diversos ratones y se colocó en tubos de polipropileno estériles sin ningún tratamiento durante 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 4 ^{o}C por 15 minutos a 1,500 g, y el sobrenadante (suero) fue transferido a tubos nuevos y estériles para ser preservado a largo plazo a -80 ^{o}C (figura 5A). La sedimentación de las proteínas se realizó siguiendo lo establecido por Polson, Sarkar, Incledon, Raguvaran, y Grant (2003). Se seleccionaron 5 sustancias: etanol al 100%; acetonitrilo al 100%; metanol al 100%; acetona al 100%; y ácido tricloroacético (TCA) al 10% p/v. Cada una fue evaluada en 4 proporciones diferentes, tal como se detalla en la tabla 6. Es importante resaltar que un ensayo previo estableció que por cada 20 µl de sangre era posible obtener 4 µl de suero, por ello todos los ensayos fueron realizados empleando esta cantidad de suero.

Tabla 6: Proporciones aplicadas de los reactivos sobre el suero de ratón.

Reactivo	Proporciones evaluadas			
Etanol	1:1	2:1	3:1	4:1
Acetonitrilo				
Metanol				
Acetona				
TCA				

La sedimentación de las proteínas se llevó a cabo agregando a diferentes muestras de suero de ratón, cada una de las sustancias en las diferentes concentraciones establecidas. Después a cada muestra se agitó en vortex por 20 segundos para posteriormente dejar en reposo durante 1 hora a -20 ^{o}C. Finalmente las muestras fueron centrifugadas a 4^{o}C por 15 minutos a 3,500 rpm. El sobrenadante de cada muestra fue recuperado y transferido a un tubo nuevo para ser liofilizado (figura 5B).

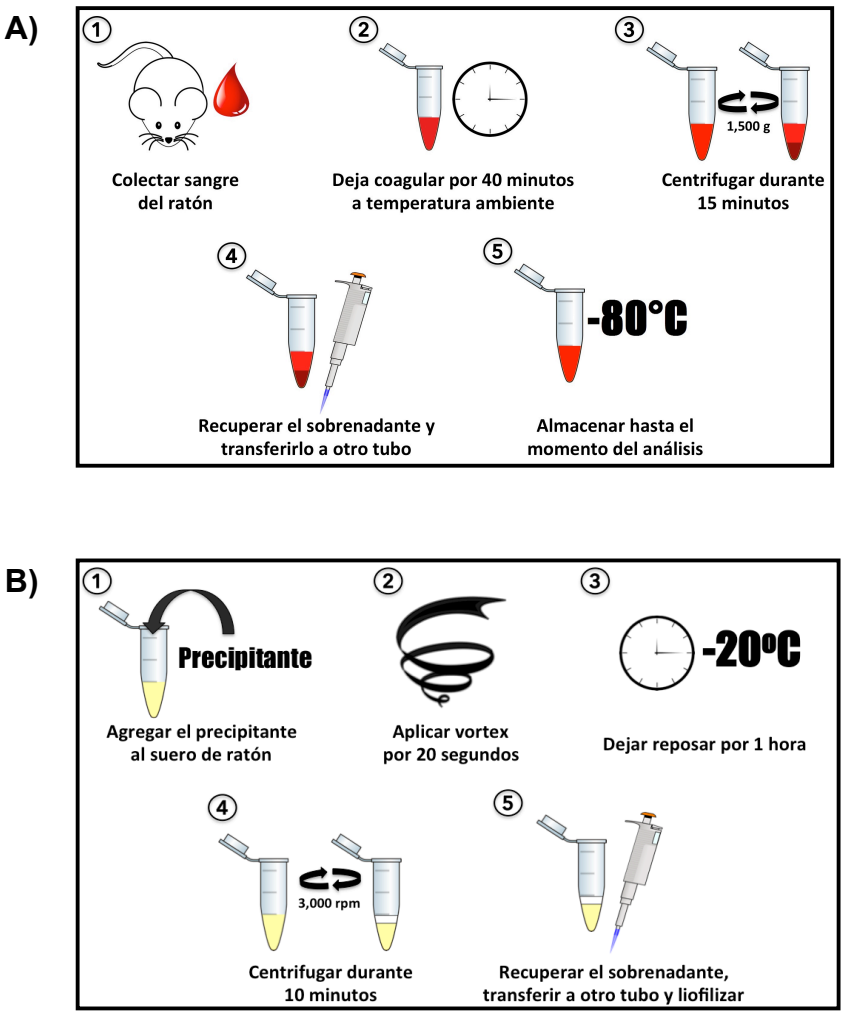


Figura 5. Esquemas de los procedimiento para: A) obtención de suero a partir de sangre de ratón; B) sedimentación de las proteínas presentes en el suero.

La evaluación del efecto de cada uno de los reactivos sobre el suero de ratón, se realizó usando geles de poliacrilamida siguiendo el protocolo descrito por Schägger (2006). Se usaron geles al 10% de 90 x 90 mm con un espesor de 0.9 mm. Las condiciones de electroforesis consistieron en una hora a 30 V y posteriormente dos horas y media a 150 V. Finalizada la electroforesis los geles fueron colocados por 20 minutos en solución fijadora (metanol 50%, ácido acético 10% y de acetato de amonio 100 mM), y después fueron transfirieron a solución de tinción (azul de Coomasie 0.025% y ácido acético 10%) durante toda la noche. Los geles fueron desteñidos con una solución al 10% de ácido acético por 20 minutos, y los resultados fueron foto-documentados digitalmente utilizando el equipo E-Gel® Imager (Life Technologies).

2.3.2 Estandarización para la cuantificación de xm1b usando cromatografía liquida de alta resolución fase reversa (RP-HPLC)

2.3.2.1 Curva de calibración en HPLC

La curva de calibración se realizó mediante la preparación y análisis de una serie de 6 puntos comprendidos entre 1 y 100 µg de la conotoxina para lograr establecer la relación entre la concentración y absorbancia. Las muestras fueron preparadas en solución acuosa y analizadas empleando un cromatógrafo Agilent 1220 con una columna analítica Vydac C18 (218TP54) y una pre-columna Zorbax C18. En la elución de las muestras se empleó un gradiente de eluyente B de 1% por minuto (eluyente A: H_2O 99.88% y TFA 0.12%; eluyente B: Acetonitrilo 99.9% y TFA 0.1%) durante 15 minutos con un flujo de 1 ml por minuto. La detección del péptido se realizó por absorbancia en el rango de luz UV, a una longitud de onda de 230 nm. La construcción de la curva de calibración se hizo mediante una regresión lineal, y con el fin de determinar la relación existente entre las variable se utilizó el coeficiente de determinación R^2.

2.3.2.2 Recuperación de xm1b después de la sedimentación de proteínas del suero.

Para determinar cuál de los reactivos presentaba el mejor rendimiento en cuanto a la cantidad de conotoxina que era posible recuperar posterior a la sedimentación de las proteínas, se prepararon diversas muestras compuestas por 4 µl de suero de ratón y 25 µg de la xm1b. A estas muestras se les adicionó la concentración óptima previamente seleccionada de cada uno de los reactivos (sección 3.2.1). Las muestras fueron tratadas de acuerdo a lo establecido en la figura 5B, y el sobrenadante de cada muestra analizado por HPLC siguiendo las condiciones cromatográfica de la sección anterior. Cada resultado fue comparado con el estándar de validación para obtener la cantidad recuperada del péptido en cada muestra.

2.3.3 Estabilidad de xm1b en suero de ratón

Los péptidos expuestos a proteasas suelen ser propensos a ser degradados, limitando su potencial para un uso terapéutico, pero en el caso de las conotoxinas, estas son generalmente estructuradas con enlaces disulfuro que les confieren estabilidad. Para evaluar esto, se realizaron dos ensayos donde se enriquecieron diferentes muestras de suero con dos concentraciones de la conotoxina, 35 y 25 µg. Estas muestras fueron colocadas en tubos "low binding" caracterizados por una débil adsorción de las proteínas. Los tubos fueron incubados a 37 ^{o}C durante 6 períodos que comprendieron 1, 3, 6, 12 y 24 horas y todas las muestras fueron realizadas por triplicado. Finalizado el tiempo de cada punto de evaluación, los tubos correspondientes se colocaron a -80^{o}C para su preservación, y una vez concluidas las 24 horas, todas las muestras fueron sedimentadas con etanol (figura 5B) y el sobrenadante proveniente de cada tubo fue analizado por HPLC.

2.3.4 Análisis farmacocinético empleando espectrometría de masas (MS)

2.3.4.1 Condiciones analíticas en HPLC-Chip/MS

El sistema de cromatografía liquida (LC) consistió en un equipo Agilent 1260 con bombas binarias e inyector automático, el cual estaba acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6530 Q-TOF operado mediante ionización por electrospray (ESI) en modo positivo. Para el análisis e identificación de la conotoxina se utilizó un ProtID-Chip-43 (II) compuesto por una columna de enriquecimiento de 40 nL y una columna analítica de 75 µm x 43 mm preparada con material Zorbax 300SB-C18. Cada una de las muestras fue analizada por triplicado con una inyección de 4 µl. La fase móvil consistió de agua con 0.1% v/v de ácido fórmico para el eluyente A, y acetonitrilo con 0.1% v/v de ácido trifluoroacético para el eluyente B. El método del gradiente fue de 3% a 97% de B en 15 minutos con un flujo de 0.6 µl por minuto.

Los parámetros de operación fueron los siguientes: Voltaje del capilar, 1.9 - 2.2 kV; Rango de escaneo 50-3000 m/z; Velocidad del escaneo: 2 Hz; Temperatura del gas de desolvatación, 325°C; Flujo del gas 5 L/min. Los datos fueron guardados en centroide y

profile. Nitrógeno de alta pureza fue generado utilizando un equipo Peak Scientific y usado como gas de desolvatación. La solución calibrante empleada fue “ESI-L Low Concentration Tunning Mix”, y como estándar la solución “HSA Peptides standard”, ambas de Agilent. El programa de computo Data Acquisition Mass Hunter Workstation Software (Agilent Technologies) fue utilizado para operar el equipo y realizar la adquisición de los datos, mientras que para el análisis y cuantificación se utilizaron los programas Qualitative y Quantitative Analysis versión B.05.00 respectivamente. Las masas de referencia fueron 760.2998 m/z y 507.2014 m/z.

2.3.4.2 Curva de calibración en MS

Se elaboró una curva de calibración con 8 concentraciones diferentes realizadas en diluciones seriadas 1:10 que comprendieron un rango entre 1 y 1^{-7} µg/µl. Las muestras fueron preparadas en solución acuosa libre de suero, y analizadas bajo las condiciones previamente descritas en la sección anterior. La construcción de la curva de calibración se realizó mediante una regresión lineal, con el fin de determinar la relación existente entre la variable dependiente e independiente se utilizó el coeficiente de determinación R^2.

2.3.4.3 Colecta y procesamiento de muestras biológicas

Se realizó una dosificación única correspondiente a 500 µg (25 mg/kg) de la conotoxina por vía intraperitoneal a dos ratones. Posterior a la dosificación se inició la toma de 12 muestras de sangre en los puntos establecidos, que fueron: 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 5 horas, 9 horas, 13 horas, 18 horas y 24 horas. Las muestras de sangre fueron tomadas de la cola del ratón mediante un ligero corte de donde se colectaban 20 µl de sangre. Para el procesamiento de las muestras se siguieron los pasos establecidos en la figura 5, y posteriormente se realizó el análisis en el espectrómetro de masas utilizando las condiciones de la sección 2.3.5.1.

2.3.4.4 Análisis farmacocinético

Se realizó un análisis no compartimental con el programa PKSolver 2.0. La concentración máxima alcanzada (C_{max}) y el tiempo para alcanzar la máxima concentración (T_{max}) después de la administración intraperitoneal fueron registrados a partir de la observación de los resultados. Los parámetros farmacocinéticos determinados fueron la constante de eliminación (λz) calculada por regresión lineal de la fase terminal logarítmica, el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) determinado por la relación de 0.693/λ, el área bajo la concentración sérica del péptido frente a la curva de tiempo hasta el último punto de medición (AUC_{0-t}) calculada por el método trapezoidal, el área bajo la curva extrapolada al infinito ($AUC_{0-\infty}$) determinada por el AUC_{0-t} y la constante de eliminación (λ), el área bajo la curva del primer momento (AUMC), el tiempo de residencia media (MRT), el volumen de distribución aparente (Vz), y la depuración aparente (CL).

2.3.5 Afinidad de xm1b por componentes sanguíneos

Debido a que la cuantificación de las muestras empleadas para el análisis farmacocinético (sección 3.2.4.2) mostró que existía una perdida no identificada de la conotoxina (sección 4.3.4), se llevó a cabo un ensayo con fin de esclarecer en que punto estaba sucediendo esto. Se colectaron y enriquecieron muestras de 20 µl de sangre de ratón con 25 µg de la conotoxina. Estas muestras fueron procesadas para la obtención de suero y la sucesiva sedimentación de proteínas de acuerdo al procedimiento mostrado en la figura 5. Como control se elaboraron muestras que contenían la misma cantidad de conotoxina en solución acuosa sin someterse a ningún tratamiento. Tanto las muestras de sangre como los controles se realizaron por triplicado, y la evaluación se llevó a cabo por HPLC.

3 Resultados

3.1 Letalidad de la conotoxina xm1b

3.1.1 Toxicidad in *vitro*

3.1.1.1 Determinación de interferencia entre los reactivos de los ensayos de citotoxicidad

La evaluación de una posible interferencia química se realizó combinando DMSO y el reactivo CellTiter 96 con cada uno de los dos medios de cultivo celular. Los resultados se presentan en la figura 6, donde se puede observar que la absorbancia tiende a disminuir conforme la cantidad de medio de cultivo se reduce y consecuentemente la cantidad de DMSO aumenta. Este efecto está directamente relacionado con la cantidad de luz en una longitud de onda especifica que los medios de cultivo impiden que pase a través de ellos, y en el caso del DMSO al ser completamente transparente su efecto es mínimo. Esto dio la certidumbre de que no existía ningún tipo de reacción adversa entre los tres reactivos.

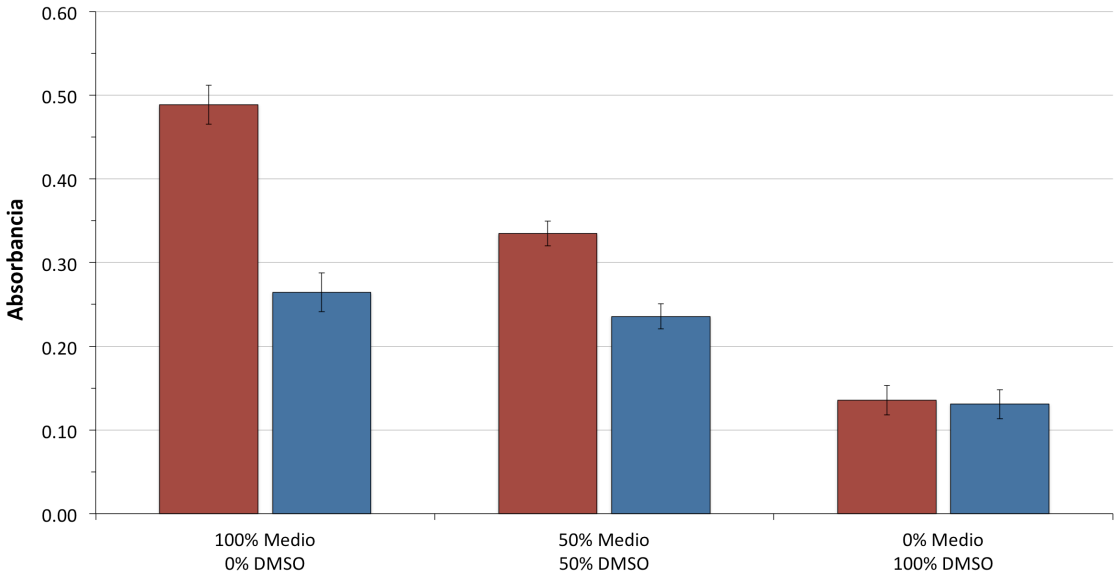


Figura 6. Absorbancia producida por las diferentes combinaciones entre los reactivos. La lectura se realizó a 490nm posterior a 24 horas de incubación a 37° con 5% de CO_2. Los símbolos representan cada uno de los dos medios evaluados: (■) Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM); (■) Medio Mínimo Esencial (MEM)

3.1.1.2 Evaluación de la citotoxicidad

El resultado del efecto que tenían las tres concentraciones de la conotoxina sobre los fibroblastos de la línea L929 (figura 7A), mostró que después de 24 horas las células expuestas a xm1b presentaron diferencias respecto al control negativo, pero no de manera significativa. En cuanto al resultado a las 48 horas, no existió ninguna diferencia entre las células que fueron sometidas al péptido y el control negativo, siendo los resultados de estos tratamientos muy similares. El control positivo en ambos casos presentó una mínima lectura, interpretándose como células totalmente inviables (figura 8A). Por otra parte las células hepáticas de la línea HepG2 (figura 7B) que estuvieron en contacto con la conotoxina por 24 horas, mostraron una gran similitud a los resultados de los fibroblastos durante el mismo período. Las células que se encontraron expuestas a las dos concentraciones más altas de la toxina (1 y 3 mg/ml) difirieron poco del control negativo, y la concentración más baja (0.1 mg/ml) presentó un resultado casi indistinguible del mismo control. Sin embargo, en el experimento llevado a cabo por 48 horas, los resultados fueron divergentes en comparación con el de las L929. En este caso las células con las dos concentraciones más bajas (0.1 y 1 mg/ml) presentaron una diferencia aproximada del 20% en relación al control negativo, con desviaciones estándar de alrededor del 10% para ambos casos. Las células de la concentración más alta (3 mg/ml) no presentaron ninguna diferencia respecto al control negativo (figura 8B).

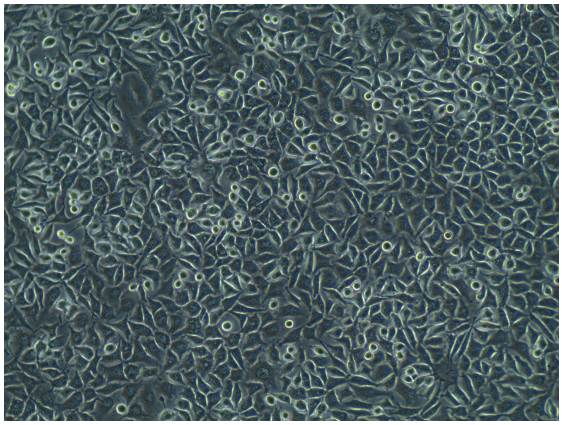
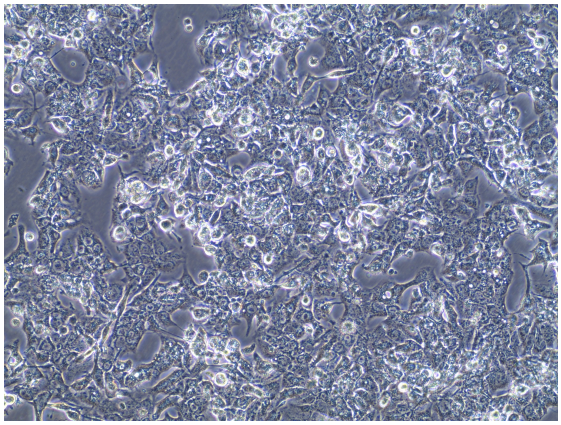
A)  **B)** 

Figura 7. Micrografía de los cultivos celulares. A) Línea L929 20x; B) Línea HepG2 20x.

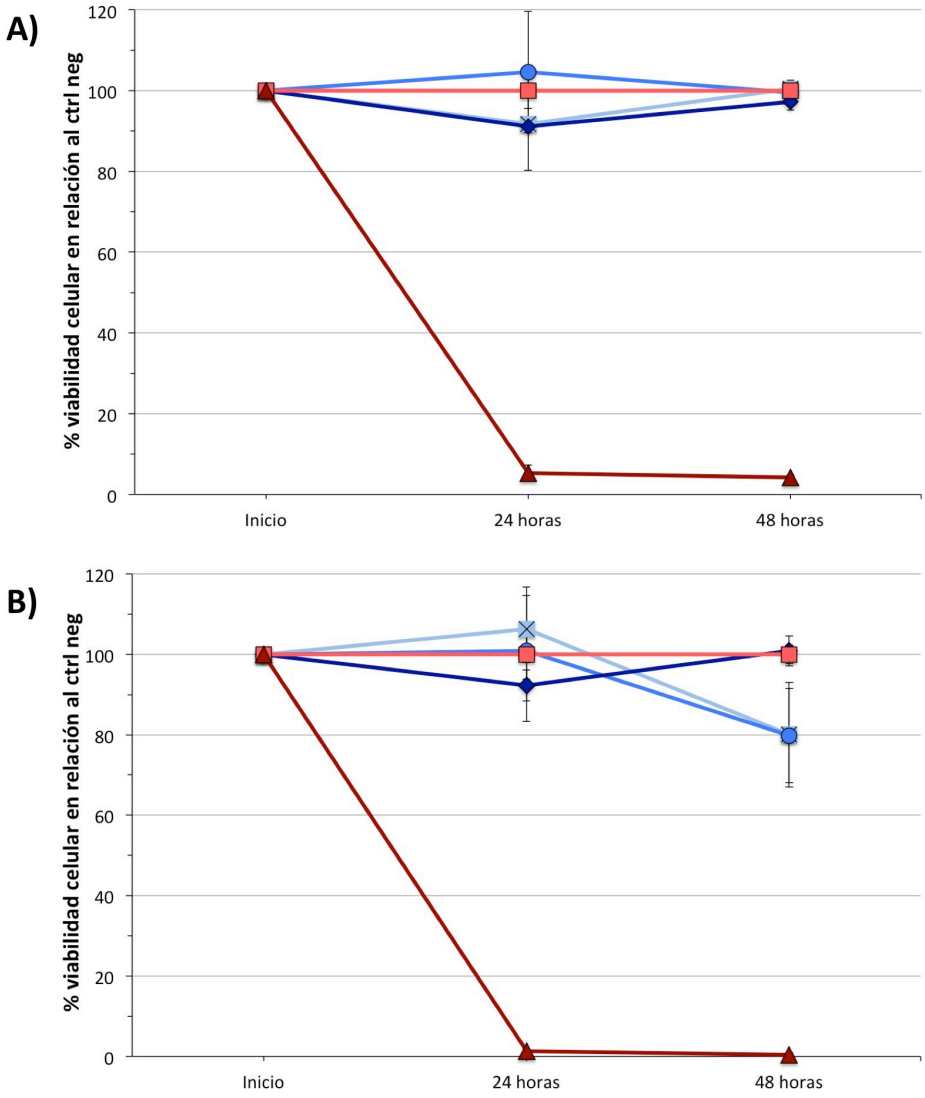


Figura 8. Dosis-respuesta de las células expuestas a diferentes concentraciones de xm1b durante 24 y 48 horas. A) resultado correspondiente a los fibroblastos de la línea L929. B) resultado correspondiente a los hepatocitos de la línea HepG2. Los datos corresponden a la media de cada una de las condiciones evaluadas por triplicado ± la desviación estándar. Los símbolos representan: (⊠) células expuestas a 0.1 mg/ml de la conotoxina; (●) células expuestas a 1 mg/ml de la conotoxina; (◆) células expuestas a 3 mg/ml de la conotoxina; (▲) control positivo aplicando 10% de DMSO a las células; (■) control negativo, células sin ningún tratamiento.

3.1.2 Determinación de la dosis letal media (DL_{50})

El procedimiento para la obtención de la DL_{50} por vía intraperitoneal fue realizado mediante un incremento progresivo de las dosis aplicadas a los ratones, cada uno de los cuales fue monitoreado por 48 horas después de la dosificación. Posterior a la inyección los organismos 1, 4, 6 que recibieron dosis de 175, 310 y 550 mg/kg

respectivamente, presentaron aletargamiento por entre 10 y 20 minutos, sin embargo se recuperaron y su actividad volvió a la normalidad sobreviviendo durante todo el período de observación. Los organismos 2 y 5 a los que se les aplicó una dosis de 310 y 550 mg/kg, no mostraron ninguna anormalidad en su comportamiento, y pasadas las 48 horas de observación no se registró deceso. Sin embargo, el organismo 3 que recibió una dosis de 550 mg/kg, sí presentó aletargamiento y su muerte fue registrada 24 horas después de recibir la dosis. De esta forma, el resultado del ensayo de acuerdo al método de Dixon fue OOXOOO (tabla 7).

Tabla 7. Efecto de las diferentes dosis de xm1b en la supervivencia de ratones.

Dosis (mg/kg)	Dosis logarítmica	Resultado
175	2.24	O
310	2.49	OO
550	2.74	XOO

El cálculo se realizó siguiendo la fórmula $DL_{50} = X_f + kd$

El valor de k = 0.299 obtenido de la tabla de Dixon

DL_{50} = 2.74 + (0.299 x 0.248) = 2.814

Antilog (2.814) = 652 mg/kg

`X´ representan organismos muertos

`O´ representan organismos que sobrevivieron

El cálculo de la DL_{50} presentó un valor más allá de la dosis usada como limite superior. En un caso como este, Rispin et al. (2002) indica que no es posible reportar dicho resultado como adecuado. Por ello frente a esta situación, deberá quedar establecida que la dosis letal media es más alta que la dosis más alta utilizada, reportándose como DL_{50} > 550 mg/kg.

3.2 Farmacocinética de la conotoxina xm1b

3.2.1 Evaluación de la simplificación del proteoma en geles de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE)

El protocolo de sedimentación empleado para remover las proteínas más abundantes del suero, es un método reproducible, económico y eficiente. En la figura 9 se presenta un ejemplo de la gran cantidad de proteínas que componen el suero, las cuales potencialmente pueden interferir con el análisis en el espectrómetro de masas.

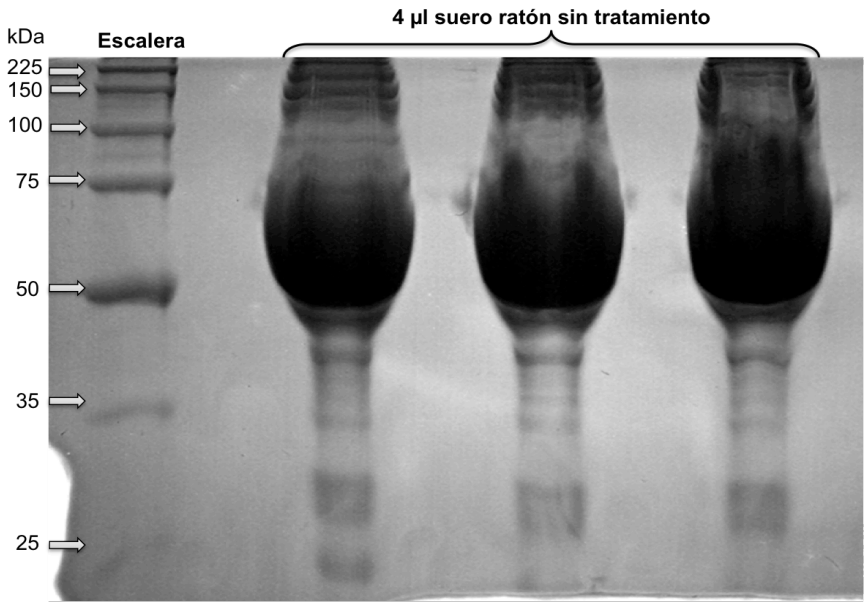
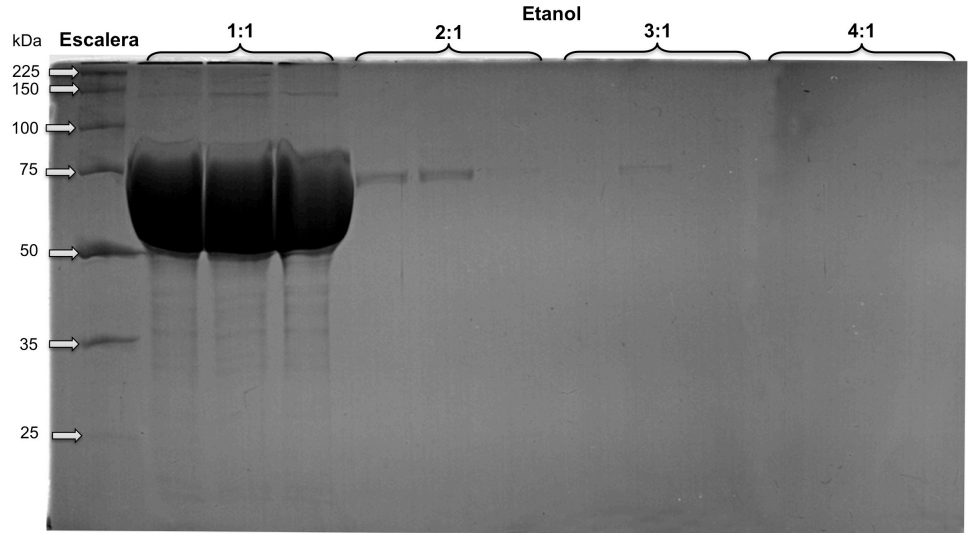


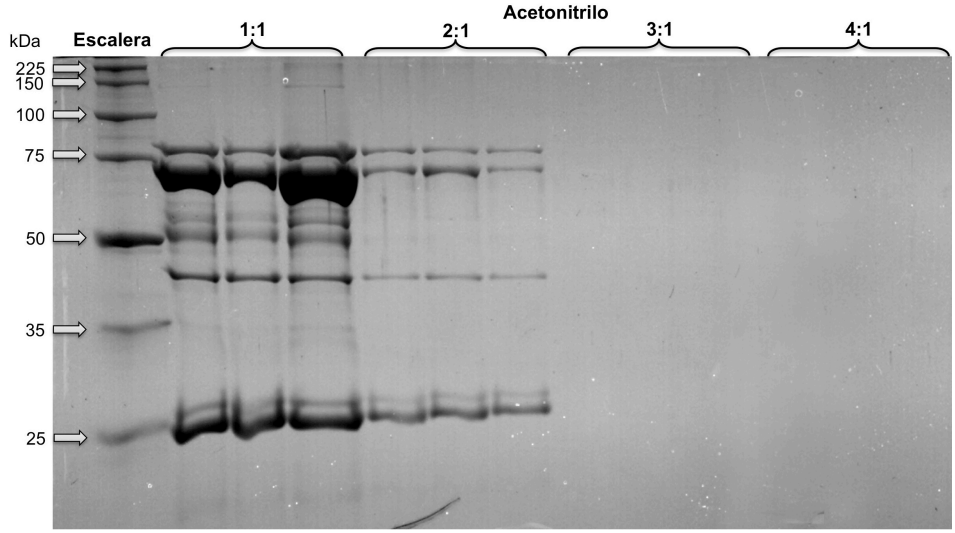
Figura 9. Análisis de suero de ratón mediante gel de poliacrilamida. La tinción se realizó con azul de Coomassie. El marcador molecular usado fue Promega V8491.

De los cinco reactivos seleccionados, la evaluación cualitativa de los resultados mostró que una proporción 1:1 de etanol, acetonitrilo, metanol y acetona no fue efectiva en disminuir de manera considerable la cantidad de moléculas presentes en las muestras de suero, sin embargo el TCA si demostró una alta eficiencia. En el caso del etanol y acetonitrilo el resultado óptimo se alcanzó con una relación de 3:1, un 4:1 para el metanol, 2:1 fue ideal para la acetona y 1:1 en el TCA como se puede constatar en la figura 10. Estas relaciones reactivo-suero fueron elegidas como las mejores, ya que la cantidad de proteínas remanentes en el suero posterior a la depleción fue cualitativamente inferior al 90% en comparación con el control sin tratamiento (figura 9).

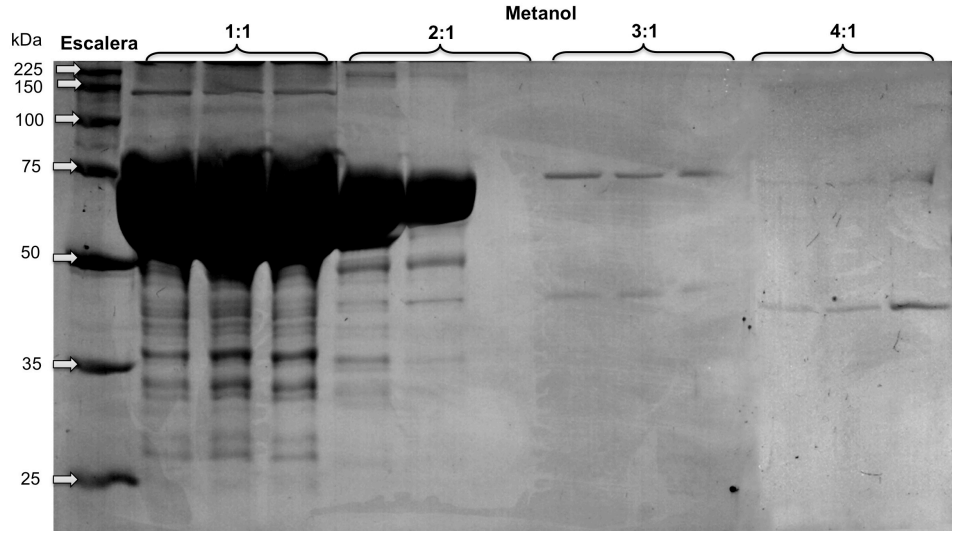
A)


Etanol
kDa
Escalera
1:1
2:1
3:1
4:1
225
150
100
75
50
35
25

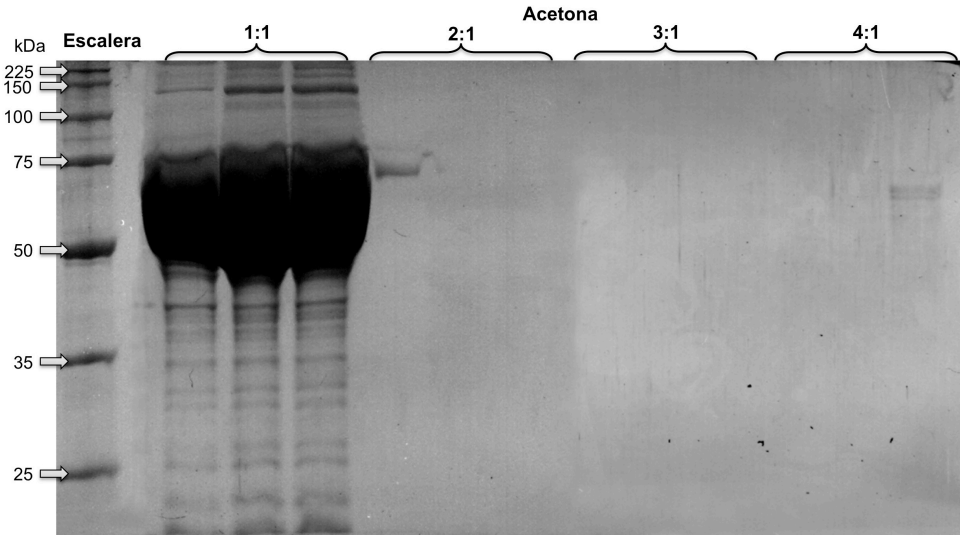
B)


Acetonitrilo
kDa
Escalera
1:1
2:1
3:1
4:1
225
150
100
75
50
35
25

C)


Metanol
kDa
Escalera
1:1
2:1
3:1
4:1
225
150
100
75
50
35
25

D)



E)

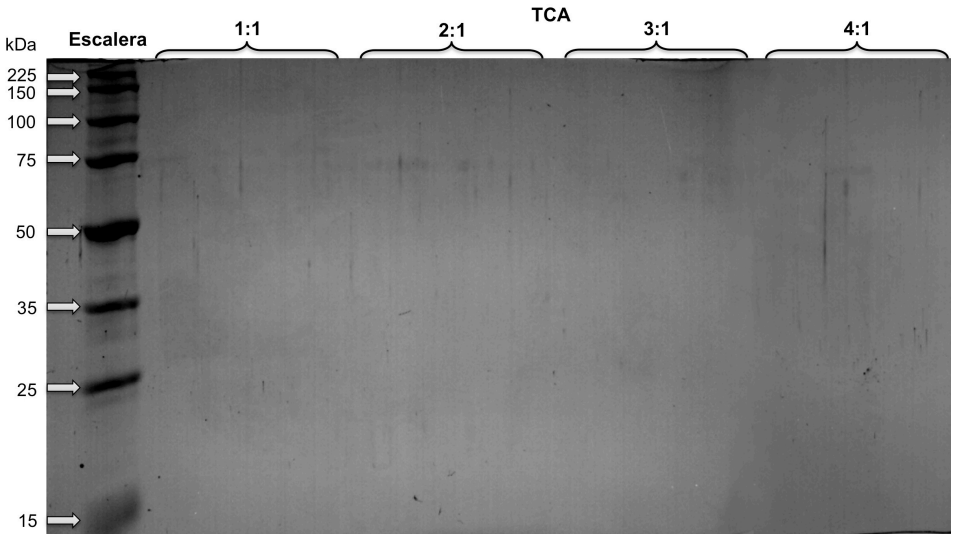


Figura 10. Sedimentación de proteínas de suero de ratón en geles de poliacrilamida. Las imágenes presentan la sedimentación con etanol (A), acetonitrilo (B), metanol (C), acetona (D) y TCA (E). Cada evaluación se realizó por triplicado. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y el marcador molecular usado fue Promega V8491.

3.2.2 Estandarización de las condiciones para la cuantificación de xm1b usando cromatografía liquida de alta resolución fase reversa (HPLC-RP)

3.2.2.1 Curva de calibración en HPLC

Para la realización de una evaluación cuantitativa, fue necesaria la elaboración de un estándar de calibración que permitiera determinar la recuperación del péptido una vez que los reactivos fueron aplicados. La curva de calibración se realizó con seis puntos

comprendidos entre 1 y 100 µg, siendo el límite de cuantificación la concentración más baja. La preparación de todas las muestras se realizó en eluyente A libre de suero, para ser posteriormente analizada mediante HPLC.

El resultado de la curva de calibración presentó buena linealidad dentro del rango establecido para realizar la cuantificación. La ecuación de la regresión linear corresponde a y = 0.2301x - 4.186 con un coeficiente de determinación R^2 de 0.98 (figura 11).

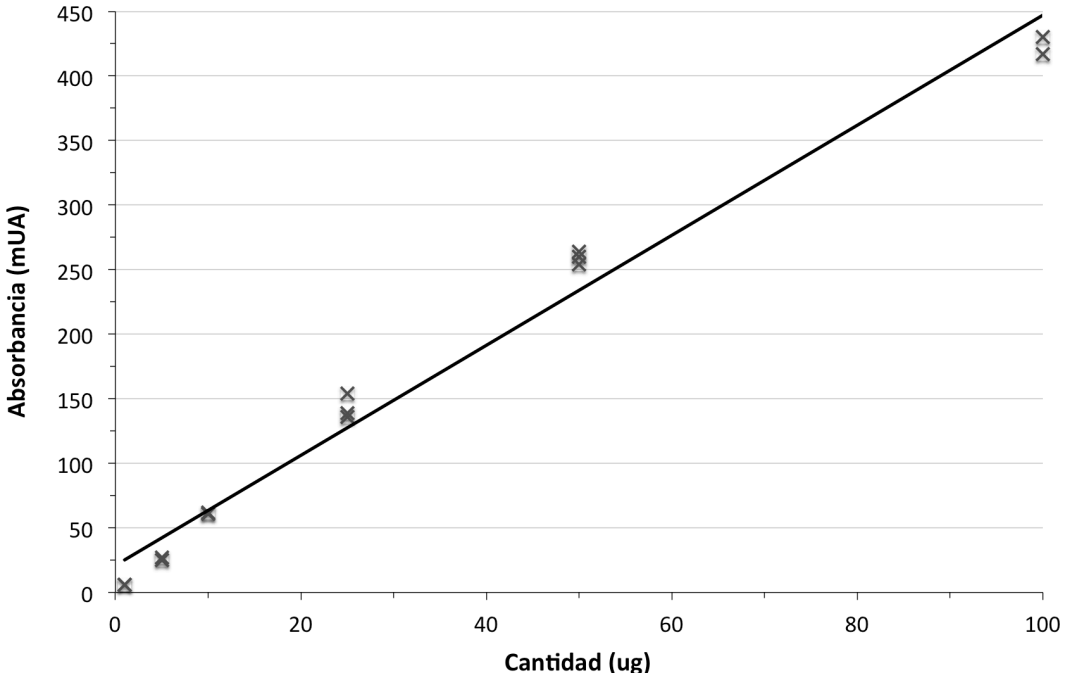


Figura 11. Curva de calibración en HPLC. La absorbancia se midió a 230 nm. Cada punto fue evaluado por triplicado.

3.2.2.2 Recuperación de xm1b después de remover las proteínas del suero

Determinar la cantidad de péptido que cada uno de los reactivos permitían recuperar fue fundamental para la elección del más óptimo en cuanto a rendimiento. El resultado de esta evaluación se presenta en la figura 12 donde se muestra la eficiencia de cada uno de estos reactivos respecto a la conotoxina.

Se determinó que la mejor condición para realizar la sedimentación de las proteínas del suero proporcionando la mayor recuperación del péptido sintético, corresponde a una proporción 3:1 de etanol. Por ello, ésta fue la relación que se consideró para los ensayos posteriores, al demostrar el mejor rendimiento en cuanto a la simplificación de la muestra afectando en la menor medida la perdida de la conotoxina.

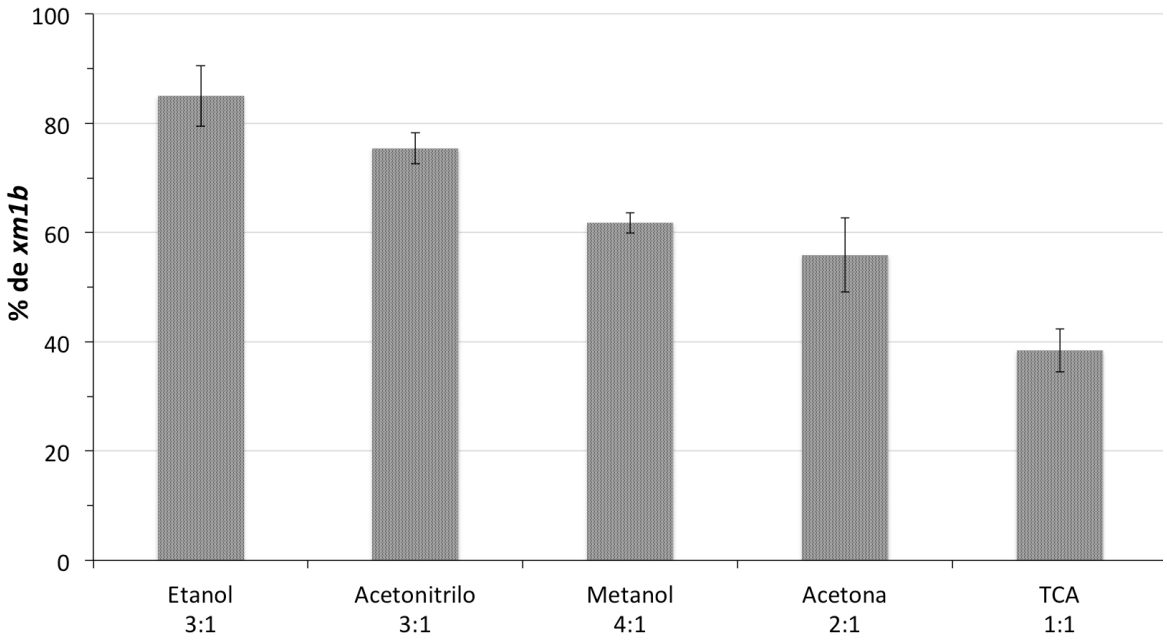


Figura 12. Recuperación de xm1b posterior a la eliminación de las proteínas del suero.

3.2.3 Estabilidad de xm1b en suero de ratón.

Con el fin de determinar la susceptibilidad a la degradación de xm1b, el péptido fue mezclado con suero de ratón y puesto a temperatura fisiológica por 24 horas. Los cromatogramas resultado del HPLC se presentan en la figura 13, y el resultado gráfico obtenido a partir de la cuantificación se muestra en la figura 14. Dado que los resultados de ambos ensayos realizados tuvieron un comportamiento muy similar, remarcando que en los cinco puntos de evaluación, la cuantificación de las muestras de ambos experimentos concordaron en el resultado, se determinó que a 24 horas es posible confirmar que aunque existe una perdida del 80% en la señal del péptido, aún es factible realizar el análisis farmacocinético para este período, considerando que la estabilidad de la conotoxina la hace favorable para poder ser detectada.

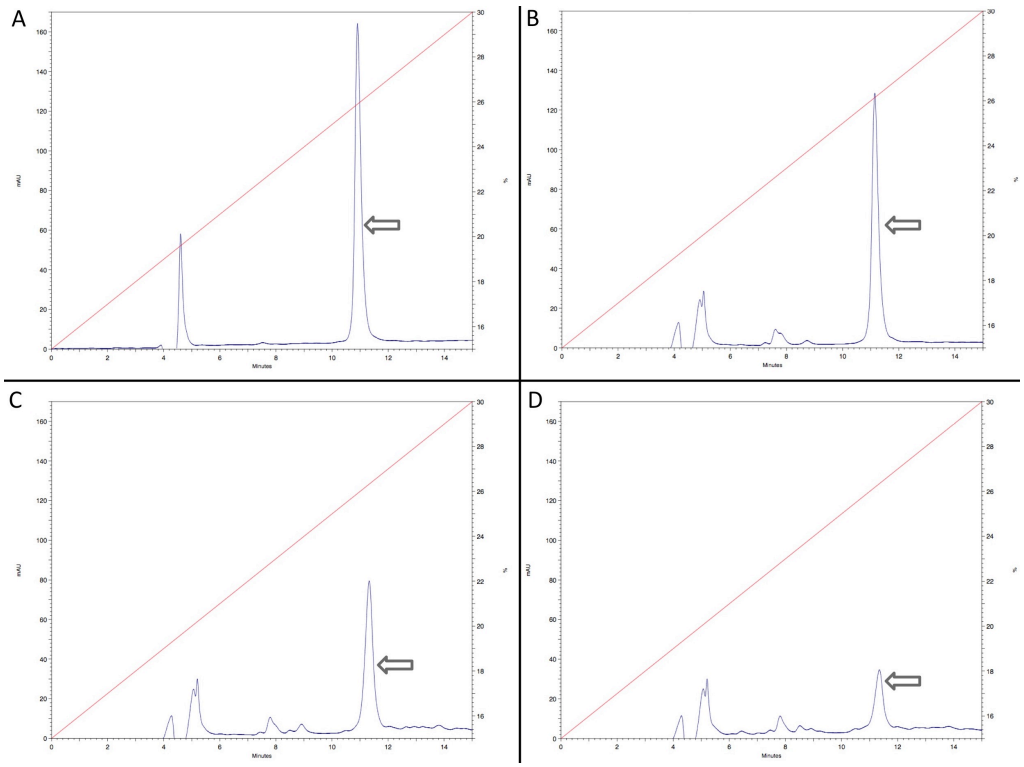


Figura 13. Cromatogramas de los diferentes tiempos de exposición del péptido al suero usando 35 µg de xm1b. (A) control de xm1b en solución libre de suero por 8 horas a 37 °C, (B) péptido en suero mantenido 1 hr a 37 °C, (C) péptido en suero mantenido 6 hr a 37 °C, (D) péptido en suero mantenido 24 hr a 37 °C. La flecha señala el pico de elución de la conotoxina.

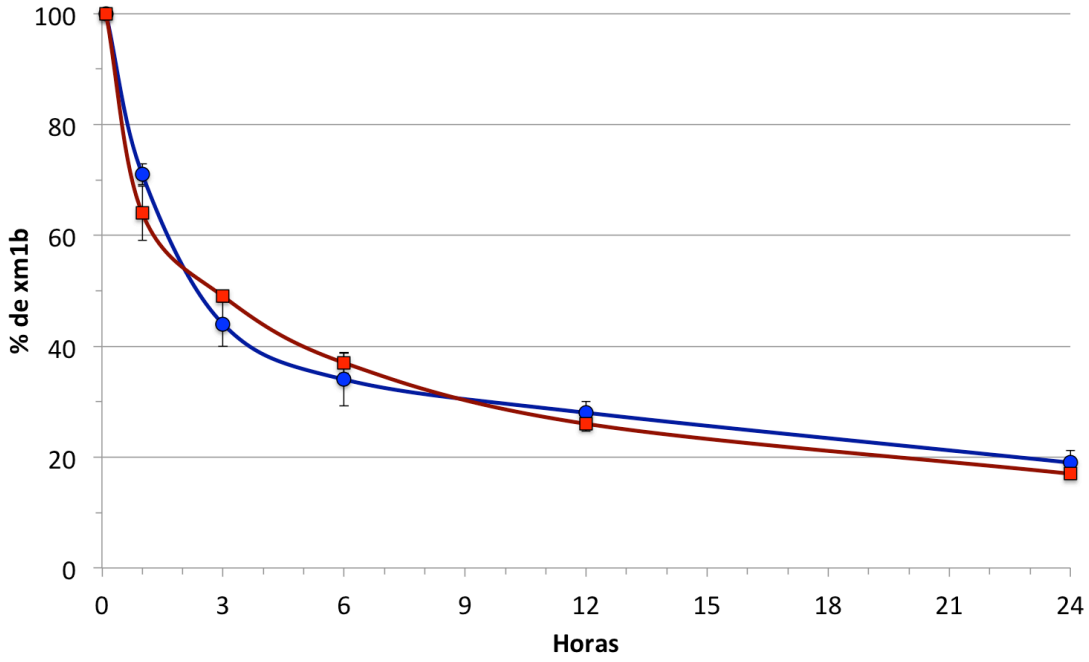


Figura 14. Estabilidad de xm1b en suero de ratón durante 24 horas. Los símbolos representan: (●) experimento llevado a cabo con 35 µg de toxina; (■) experimento llevado a cabo con 25 µg de toxina.

3.2.4 Análisis farmacocinético empleando espectrometría de masas (MS)

3.2.4.1 Curva de calibración en MS

Debido a que la espectrometría de masas al igual que el HPLC no proporcionan resultados cuantitativos, una opción viable para poder cuantificar es usar una curva de calibración. El resultado de la regresión lineal aplicada al análisis de las muestras, presentó buena linealidad, con la ecuación de la regresión linear correspondiente a y = 0.2301x - 4.186 y un coeficiente de determinación R^2 de 0.99 (figura 15).

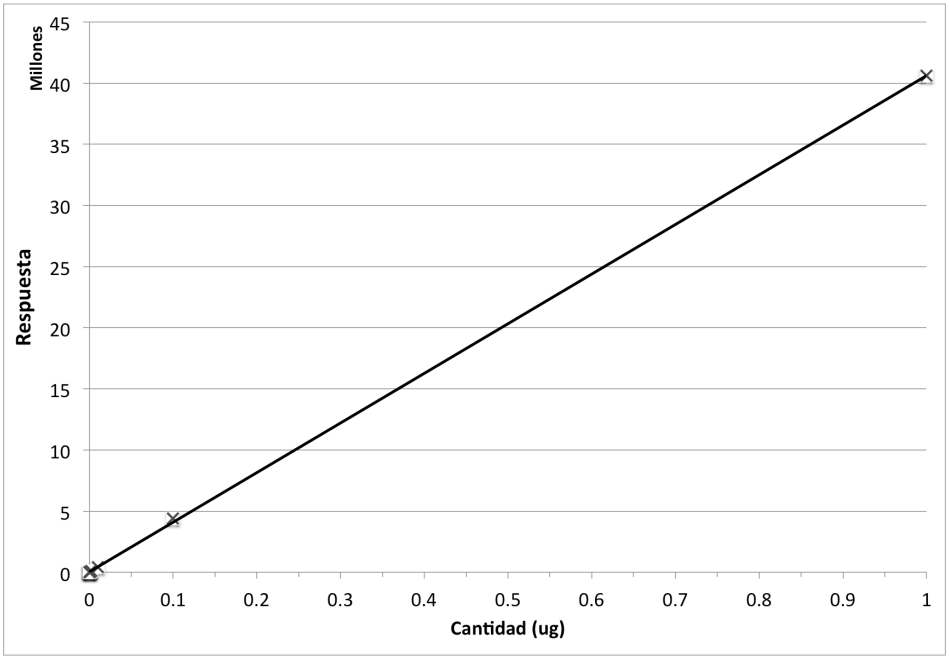


Figura 15. Curva de calibración para la cuantificación de xm1b en MS.

3.2.4.2 Análisis farmacocinético

La detección de la concentración de xm1b estuvo en un rango de entre 5.04 y 0.002 µg/ml en un tiempo comprendido entre 0.033 y 24 horas después de la administración intraperitoneal en ratones (figura 16). Los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de los muestreos sanguíneos se muestran en la tabla 8.

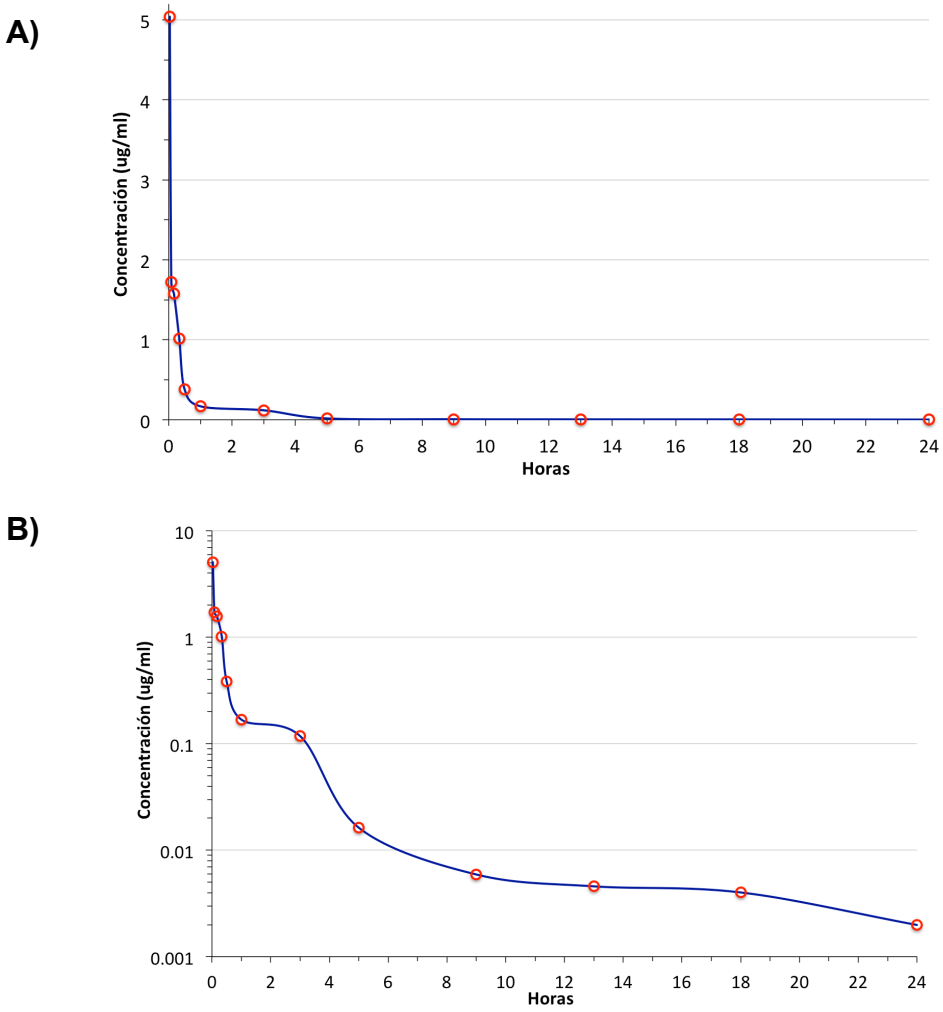


Figura 16. Cuantificación plasmática de xm1b después de una administración de 500ug vía intraperitoneal durante 24 horas (n = 12) cuantificado por MS. A) resultado en escala lineal; B) resultado en escala semi-logarítmica

Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos de mx1b determinados por un análisis no compartimental.

Parámetro	Unidad	Valor
T_{max}	h	0.03
C_{max}	µg/ml	5.04
λz	h	0.07
$t_{1/2}$	h	10
AUC_{0-t}	µg h/ml	1.39
$AUC_{0-\infty}$	µg h/ml	1.41
AUMC	µg h^2/ml	3.46
MRT	h	2.44
Vz	ml	101.97
Cl	**ml/h**	7.07

3.2.5 Afinidad de xm1b por componentes sanguíneos

Se encontró que posterior a que la conotoxina es puesta en contacto con sangre de ratón, la cantidad del péptido que es posible recuperar es de solo un 12%, indicando la existencia de una interacción entre xm1b y algún componente aún no dilucidado. En la figura 17 se presentan los cromatogramas representativos a partir de los cuales se realizó la cuantificación.

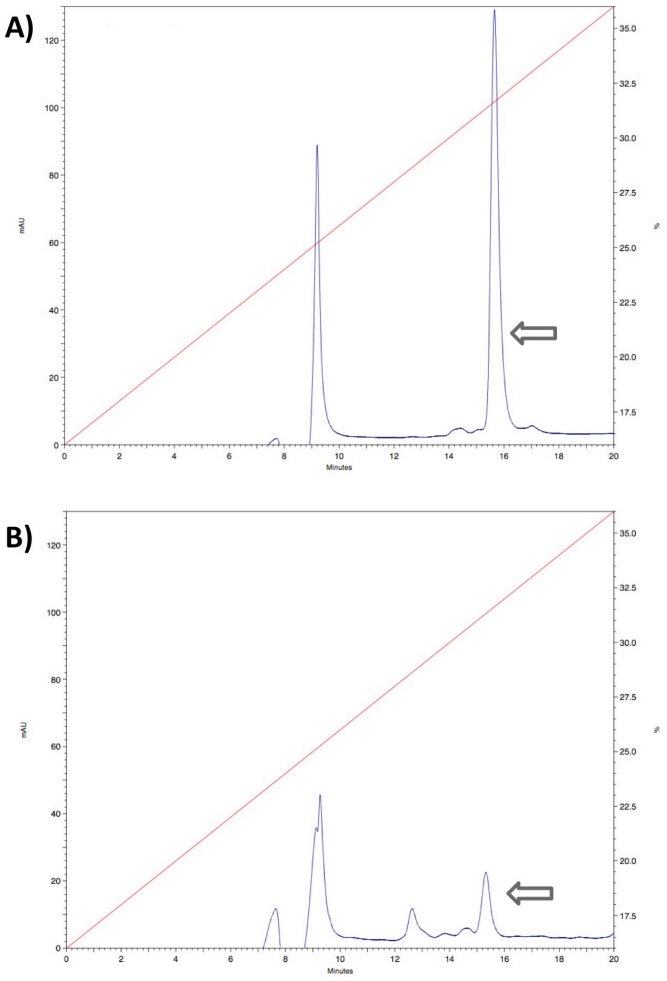


Figura 17. Cromatogramas resultado de exponer 35 µg de xm1b a sangre total. (A) control de xm1b en solución acuosa sin tratamiento; (B) recuperación de xm1b después de ser mezclado en sangre. La flecha señala el pico de elución de la conotoxina.

4 Discusión

4.1 Generalidades

La comercialización de un fármaco conlleva numerosos estudios que inician con las pruebas preclínicas. Éstas tienen por objetivo definir los efectos farmacológicos y toxicológicos antes de la administración en humanos, mediante diferentes pruebas *in vitro* e *in vivo* con el fin de evaluar los efectos en líneas celulares y actividad farmacológica en modelos animales, y proporcionar soporte al fármaco para su uso en estudios clínicos (ICH (International Conference on Harmonization), 1997).

A partir del veneno de *Conus* se han identificado diversas moléculas con un alto potencial para servir como medicamentos. Un ejemplo es la ω-conotoxina MVIIA, la cual fue aprobada por la FDA en 2004 para tratamientos de dolor neuropático y se comercializa bajo el nombre de Prialt (Williams, Day, y Heavner, 2008). Otras moléculas en estudios son para dolor neuropático: α-Vc1.1 en fase clínica I; α-RgIA en fase preclínica; μ-MrVIB en fase preclínica; χ-MrIA en fase clínica I; ω-CVID en fase preclínica; y Contalukina-G en fase clínica I. Para dolor inflamatorio se encuentra en fase clínica I la μ-SIIIA. La conotoxina κ-PVIIA está en fase preclínica como cardioprotector. Como antinociceptivo se encuentra la ρ-TIA en fase preclínica, y la Conantokina-T en fase clínica II. Y como neuroprotector para epilepsia la Conantokina-G en fase clínica II (Martínez, López, y Aguilar, 2014).

Sin embargo, existen pocos reportes de conotoxinas con actividad antifímica. Dos de ellos son el trabajo ya citado de Bernáldez (2013), y el trabajo de Munro (2005). En este último se encontró que el extracto crudo del veneno de *C. californicus* presentaba actividad contra tuberculosis con una MIC de 7.5 mg/ml, y también se identificó una fracción purificada por HPLC del mismo veneno con una MIC de 400 μg/ml. Diversos trabajos también reportan que moléculas de origen vegetal actúan como agentes terapéuticos pudiendo inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis*. Lall y Meyer (1999) demostraron que 14 extractos de diferentes plantas usadas tradicionalmente en África, tuvieron actividad *in vitro* contra cepas sensibles de tuberculosis como H37Rv, y resistentes como CCKO28469V. Por otra parte Xie et al. (2003) reportó la identificación

de un péptido de 60 aminoácidos aislado a partir del veneno de la serpiente *Naja atra*, y designado como vgf-1 con capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de cepas multidrogoresistentes de *M. tuberculosis*.

4.2 Letalidad del péptido sintético xm1b

4.2.1 Toxicidad *in vitro*

En la determinación de reacciones no deseadas por la interacción entre reactivos, se puede observar una diferencia en las condiciones donde se evaluó el 100% y 50% de los medios DMEM y MEM. Estas diferencias son atribuibles al grado de oxidación que presentaba cada uno de los medios previo al ensayo. El DMEM tenía un color más intenso que el MEM, resultando en lecturas más altas. Esto se corrobora con el resultado de DMSO al 100%, ya que al ser estas lecturas iguales indican que el único componente que producía variabilidad era el medio. Pese a esto, el comportamiento de las graficas de ambos medios fue el esperado, disminuyendo la lectura conforme el medio disminuía, sin mostrar indicios de algún comportamiento anómalo.

Para la evaluación de la citotoxicidad *in vitro* inicialmente se utilizaron cultivos primarios de células extraídas de hígado de ratón. Sin embargo, en estos ensayos no se pudo alcanzar con éxito el resultado esperado para el control positivo, lo que resultaría en conclusiones no válidas a partir de esos datos. Debido a esto se optó por el uso de líneas celulares. En el caso de la línea celular HepG2, éstas han sido ampliamente usadas en investigaciones para evaluar toxicidad de una variedad de agentes como: colorantes textiles industriales (Tsuboy et al., 2007), herbicidas (Tuschl y Schwab, 2003), interacciones entre medicamentos (Nicod, Viollon, Regnier, Jacqueson, y Richert, 1997), y exploración farmacológica de alto rendimiento (Hamid et al., 2004). De la misma forma la línea celular L929 se ha utilizado en estudios de citotoxicidad documentados en trabajos como los de: Liu et al. (2006) en la evaluación de clorofenoles; Al-Nazhan y Spangberg (1990) en materiales para endodoncia; Masoud, Vijayasarathy, Fernandez-Cabezudo, Petroianu, y Saleh (2003) con un insecticida sintético; y Schmidt, Chung, Andrews, y Turner (1993) aplicando ácido ascórbico.

La viabilidad celular posterior a la exposición con la conotoxina en la línea L929, no se vio disminuida de manera considerable ni a las 24 ni a las 48 horas. Los resultados mostraron que ninguna de las tres concentraciones evaluadas de la toxina presentaron diferencia distintiva respecto al control negativo, por lo que se considera que no hubo un efecto adverso. Por otra parte, las células HepG2 tampoco presentaron una respuesta negativa posterior a estar en contacto con la conotoxina luego de 24 horas, pudiendo comparar el resultado con el de las L929 durante el mismo período, ya que presentan gran similitud. Es de resaltar que la variación en las desviaciones estándar presentadas en todos los tratamientos incluyendo el control negativo en estas primeras 24 horas, puede ser atribuible al estrés provocando por el manejo y el contacto con tripsina de las células. Sin embargo a las 48 horas, las células que fueron expuestas a la concentración de 0.1 y 1 mg/ml de la toxina presentaron una disminución de cerca del 20% ± 10 de viabilidad respecto al control negativo. Esta diferencia pese a que no es tan grande para considerarse en este momento como un efecto negativo, si muestra disimilitud con respecto a los otros resultados, sin embargo los datos obtenidos hasta este momento no permiten un análisis más amplio que permita dilucidar si éste efecto se debió al tratamiento o fue producto del manejo experimental.

Resultados similares a los encontrados fueron reportados por Sun et al. (2011) quienes estudiaron la toxicidad de una conotoxina y un análogo de ésta misma. La toxina fue la α-lt14a de 13 aminoácidos derivada de *C. litteratus*. Su blanco molecular son los nAChR presentando propiedades analgésicas. La evaluación de la citotoxicidad se hizo en dos líneas celulares de hepatocitos, células de Chang y HepG2, mediante un ensayo colorimétrico usando MTT. Las células fueron expuestas por 24 horas a dos concentraciones, 0.1 mg/ml y 0.5 mg/ml. Sus resultados mostraron que la conotoxina lt14a y el análogo [K7A]-lt14a, presentaban una muy baja toxicidad para las células de la línea de Chang. Sin embargo en la línea HepG2, la conotoxina lt14a redujo cerca de un 10% la viabilidad y [K7A]-lt14a un 20% aproximadamente. Su reporte concluye que no hubo una diferencia significativa entre las dos concentraciones ensayadas, y que ambas moléculas presentaron muy baja toxicidad.

4.2.2 Dosis letal media (DL50)

La selección del método “Up and Down” (UDP) para la evaluación de la toxicidad aguda se basó en que es el protocolo que requiere el menor número de animales, necesitando usualmente solo entre 6 y 10. Esto fue esencial, pues la cantidad de péptido disponible hubiera resultado insuficiente en el caso de aplicar otro método como el tradicional (Trevan 1928) o el de dosis fija (British Toxicology Society 1984) los cuales requieren entre 30 y 40 animales.

La confiabilidad y precisión del método UPD ha sido puesta a prueba en diversos trabajos como el de Lipnick et al. (1995) donde sus resultados mostraron que el método UPD produce un estimado de la DL_{50} similar al alcanzado por el método convencional de toxicidad aguda. Otro ejemplo es el estudio de Bruce (1987) el cual comparó la DL_{50} de diez sustancias tanto por el método clásico como por el UDP encontrando valores muy similares entre ambos métodos. De la misma manera en el trabajo de Choi (1990) se reconoce que el método UDP puede ser tan eficiente como el método de dosis fija al estimar la DL_{50}. Por lo cual se considera un método bien establecido y aceptado para proveer información sobre las características tóxicas de la sustancia en una exposición aguda.

Debido a que los antecedentes sobre de la dosificación de xm1b en animales se limitan a lo reportado en el trabajo de Bernáldez (apartado 1.1.6), donde la máxima dosis aplicada a ratones fue de 2.5 mg/kg, la comparación de la DL_{50} entre diversas conotoxinas reveló que existe gran diversidad en los modelos animales usados, las vías de administración, y los métodos usados para este cálculo. Por ejemplo en ratones la DL_{50} de la α-Ac1.1b fue de 0.038 mg/kg por vía I.V. (L. Liu, Chew, Hawrot, Chi, y Wang, 2007) y de la ω-SO fue de 313.4 mg/kg con administración intracerebral (F. Liu et al., 2000). En peces dorados por vía intraperitoneal la DL_{50} de la ω-GVI A producida por *C. geographus* fue de 0.015 mg/kg (Adeyemo et al., 1991), y las α-conotoxinas MIC y MI provenientes de *C. magus* presentaban una DL_{50} de 0.023 mg/kg y 0.012 mg/kg respectivamente sobre peces *Xiphophorus helleri* vía intramuscular, pero ambas toxinas no presentaron letalidad en una concentración limite de 0.1 mg/kg en gusanos *Perionyx excavatus* y en moluscos *Pomacea diffusa* (Kapono et al., 2013).

Por ello el conjunto de datos obtenidos a partir de los ensayos de citotoxicidad, aunado a los resultados experimentales de DL_{50} proporcionan la certidumbre para afirmar que existe un riesgo bajo de que xm1b pueda ser letal en roedores, en concentraciones tan altas como 550 mg/kg. Este resultado deberá ser confirmado en un futuro en algún otro modelo animal previo a la administración en humanos.

Los aspectos específicos relacionados con el único organismo que murió durante el ensayo se desconocen, sin embargo no se descarta que el deceso fuese producido debido a la inyección o a una cuestión relacionada con la sensibilidad especifica de ese organismo a la conotoxina, aspecto que no fue presentado por el resto de los organismos.

4.3 Farmacocinética

4.3.1 Simplificación del proteoma del suero

Las dos tipos de sedimentación usados en este trabajo, solventes orgánicos y reactivos ácidos, tienen diferentes mecanismos de acción. Los solventes orgánicos bajan la constante dieléctrica (capacidad de un líquido de disolver un soluto) del suero, produciendo que las interacciones hidrofóbicas se minimicen y las interacciones electroestáticas entre proteínas se vuelvan predominantes conduciendo a la agregación y sedimentación. Los reactivos ácidos forman sales insolubles con los grupos amino cargados positivamente de las proteínas en pHs por debajo del punto isoeléctrico. Estas sales se hidratan provocando que las moléculas de agua disponible disminuyan, y propiciando que las regiones hidrofóbicas de las proteínas interactúen formando agregaciones proteína-proteína (Polson et al., 2003).

Los resultados cuantitativos de la sedimentación de proteínas en el trabajo de Polson et al. (2003) mostraron que: el etanol en proporción 3:1 logró una eficiencia de 96.4%; el acetonitrilo en proporción 3:1 alcanzó una eficiencia de 98.4%; el metanol en proporción 4:1 logró una eficiencia de 96.3%; y el TCA en proporción 1:1 una eficiencia de 96.2%. Sin embargo, aunque una comparación directa no es posible debido a que la evaluación

realizada en este trabajo solo fue cualitativa, los resultados fueron los esperados al alcanzar una alta eficiencia en cuanto a la remoción de proteínas. En el caso de la acetona que no fue evaluada por Polson, su uso está bien documentado en diversos trabajos como el de Jiang, He, y Fountoulakis (2004).

4.3.2 Recuperación de xm1b después de remover las proteínas del suero

Los resultados mostraron que la eficiencia de los reactivos en la eliminación de las proteínas, no está relacionado con la cantidad de conotoxina que es posible recuperar una vez que ésta es mezclada en suero. El TCA por ejemplo mostró ser muy eficiente, al requerir la menor proporción respecto al suero (1:1) para lograr un resultado adecuado, sin embargo fue el que permitió la menor recuperación del péptido después de ser aplicado. Este motivo fue el que llevó a la selección del etanol como el apropiado para nuestros objetivos.

Adicionalmente a las condiciones evaluadas y descritas previamente, se realizó un esfuerzo adicional por lograr un aumento en el porcentaje de recuperación de xm1b. Para ello se emplearon diferentes combinaciones entre etanol y acetonitrilo, los cuales habían demostrado los porcentajes más altos en la recuperación de la conotoxina, sin embargo, en los resultados obtenidos (datos no mostrados), solo se logró una recuperación que osciló entre 62 y 68%, por lo que estas opciones fueron descartadas ya que no superaron el porcentaje antes mostrado por estos solventes orgánicos.

Comparando estos resultados con los de reportes para otras conotoxinas, se encontraron ciertas similitudes y diferencias con lo obtenido por Clark et al. (2005), quienes evaluaron la recuperación de la α-Conotoxina MII a partir de suero humano. La sedimentación de las proteínas fue realizada con TCA, y la recuperación del péptido fue mayor al 90% analizado por RP-HPLC.

4.3.3 Estabilidad de xm1b en suero de ratón

Tras estar en contacto la conotoxina xm1b por un día con los diversos componentes del suero de ratón a 37^{o}C, se obtuvo un remanente de péptido intacto de aproximadamente

20%. En comparación con otros experimentos realizados usando diferentes conotoxinas, estos encontraron que la α-MII proveniente de *C. magus*, presentó un remanente cuantificable por RP-HPLC de aproximadamente 60% del péptido, luego de ser expuesta a suero humano por 24 horas a 37^{o}C (Clark et al., 2005). En el caso de la α-conotoxina AuIB de *C. aulicus,* se determinó que después de 24 horas de encontrarse mezclada con plasma de rata, fue posible encontrar cerca de un 50% del péptido aún en las muestras (Muttenthaler et al., 2010). Y en el caso de χ-MrIA de *C. marmoreus*, la cual fue colocada en plasma de rata por 24 horas, solo se detectó alrededor de un 5% del péptido intacto (Dekan, Wang, Andrews, Lewis, y Alewood, 2012).

Esta variedad en los resultados muestra la diversidad en las propiedades de los péptidos de *Conus,* incluso al comparar conotoxinas relacionadas como aquellas de la misma familia funcional. Sin embargo, pese a que la capacidad de xm1b de resistir a la degradación no es tan alta en comparación con otras conotoxinas, existen alternativas que pueden permitir incrementar sus propiedades farmacológicas a futuro. Una de ellas es la ciclación de la cadena de aminoácidos, lo cual puede proveer una mejora en la estabilidad preservando la actividad de la molécula, como en los casos de las alfa conotoxinas MII, ImI y Vc1.1., en donde se logró la creación de análogos ciclados de estos péptidos, incrementando en todos los casos su estabilidad frente a proteasas (Clark, Akcan, Kaas, Daly, y Craik, 2012). Otras aproximaciones que proveen a las conotoxinas de estabilidad es la generación de análogos mediante la sustitución de aminoácidos, la generación de peptidomiméticos (Craik y Adams, 2007) o la PEGilación, que consiste en unir a los péptidos moléculas de polietilenglicol lo que da protección contra enzimas y mejora la farmacocinética (Harris y Chess, 2003).

4.3.4 Análisis farmacocinético

La elección de un análisis no compartimental para el estudio de los datos, está estrechamente relacionado con las implicaciones que conllevan los modelos compartiméntales encargados de describir el comportamiento de un fármaco después de su administración. Estos modelos son altamente dependientes de la frecuencia y tiempo designados para la toma de muestras, es decir, los resultados están muy ligados

al diseño experimental empleado. Sin embargo, los modelos no compartiméntales no presentan ésta dificultad, y su aplicación a datos preliminares como los obtenidos en este trabajo los hace adecuados. Estos modelos pueden mostrar el conjunto de propiedades que caracterizan la evolución temporal de un fármaco de forma numérica y simple, sin la necesidad de tener que seleccionar un modelo en especifico (Aguilar, Caamaño, Martín, y Montejo, 2014).

Entre los parámetros obtenidos, los primeros son los descriptivos, como los valores de T_{max} y C_{max} obtenidos directamente de los resultados, y muestran que el primer muestreo a los 2 minutos fue el que registró la concentración más alta de todas, tal como es apreciable en la figura 16.

Otros parámetros como la constante de eliminación (λz) que fue del 0.07, indica que posterior a la administración de la conotoxina, ésta se eliminaba de la sangre en un 7% del remanente por hora.

Las 10 horas calculadas para el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), indican el período que fue necesario para que la concentración sanguínea de la conotoxina disminuyera a la mitad. Este valor está directamente relacionado con la constante de eliminación ya que su determinación se realiza mediante la operación ln2/λz (Aguilar et al., 2014).

El área bajo la curva (AUC) es el parámetro que permite cuantificar la exposición a la conotoxina. Su importancia radica en que proporciona la información necesaria en caso de querer comparar diferentes fármacos, lo que resulta de gran interés ya que en el estudio de las conotoxinas la creación de análogos que mejoren sus propiedades es frecuente. También resulta de importancia para algunos antibióticos, donde su eficiencia está relacionada con mantener una concentración por encima de la MIC. Adicionalmente también es un parámetro necesario para la determinación de la depuración y el tiempo medio de residencia. La diferencia entre AUC_{0-t} y $AUC_{0-\infty}$ es que la primera se obtiene en base a las mediciones realizadas desde el tiempo cero hasta las 24 horas, y en la segunda se extrapola el cálculo más allá del último muestreo para incluir el remanente de la conotoxina que no fue medido (DiPiro, 2010).

El tiempo de residencia media (MRT) indica que cada molécula de la conotoxina estuvo en promedio 2.44 horas en el organismos antes de ser eliminada. Su información resulta útil para interpretar la duración del efecto de algún fármaco debido a que se considera que el comportamiento de cada molécula una vez que es introducida en el cuerpo es aleatorio, produciendo que algunas de ellas permanezcan poco tiempo y otras en cambio duren más (Rowland y Tozer, 2011).

El volumen de distribución (Vz) obtenido cercano a los 102 ml, no debe interpretarse como un factor físico de volumen, es un factor de proporcionalidad que relaciona la cantidad de fármaco en el cuerpo con la concentración determinada en el suero. En términos generales un Vz alto significa que la sustancia o molécula permanece principalmente en tejidos, por otra parte un valor pequeño está relacionado con el confinamiento al sistema circulatorio (DiPiro, 2010).

La depuración (Cl) al igual que el Vd, tampoco es un parámetro fisiológico, es un factor de proporcionalidad que indica que fracción del Vd es purificado por unidad de tiempo, siendo el resultado obtenido de 7 ml/h. Si bien la definición para el Cl es que es el conjunto de procesos metabólicos y de eliminación responsables de remover la conotoxina del cuerpo, también define si el comportamiento de un fármaco es lineal o no, en relación a la comparación en la administración de dosis diferentes mediante la misma vía.

En relación con la distribución y cuantificación de la conotoxina, los valores obtenidos presentan un comportamiento que no permite un análisis más detallado, esto aunado a la carencia de datos de un ensayo por vía intravenosa que permita obtener mayor certeza, nos lleva a pensar que parámetros como el Vd, el $t_{1/2}$, y el Cl estén indicando un escenario donde el péptido está siendo almacenado en algún compartimiento del organismo, o en su defecto existe alguna perdida que hasta este momento no fue percibida. Sin embargo, la comprobación sobre si existe una alta afinidad por algún compartimiento específico requiere un análisis de biodistribución donde el marcaje del péptido es fundamental, lo que hasta este momento no ha sido posible. Como alternativa y con el fin de descartar la segunda opción, se realizó el ensayo mostrado en la sección 2.3.5 con sus respectivos resultados en la sección 3.2.5.

4.3.5 Afinidad de xm1b por componentes sanguíneos

Los datos mostraron una variación evidente entre la recuperación del péptido cuando es mezclado únicamente con suero, en donde previamente se había establecido un valor medio de 85%, y la recuperación a partir de mezclar la conotoxina con sangre total, donde el resultado fue del 12%. Esto apunta a que la información mostrada por el análisis farmacocinético, corresponde con alguna interacción aún no determinada. Este resultado deberá confirmarse con los estudios pertinentes para corroborar si dicho efecto es producto del planteamiento de Bernáldez (2013) sobre que el mecanismo de acción de la conotoxina para la eliminación de *M. tuberculosis* es a través de la activación de macrófagos, los cuales expresan receptores nicotínicos (Cormier et al., 2004) o se debe a algo adicional.

Además es interesante resaltar que esta posible afinidad de xm1b por algún componente en la sangre puede resultar valiosa en la interpretación de estudios farmacocinéticos futuros, ya que puede ser lo que influya en el comportamiento, distribución y eliminación del péptido, propiciando incluso que el efecto farmacológico sea más duradero o intenso dependiendo de la naturaleza de esta interacción (Jusko y Gretch, 1976).

5 Conclusiones

Los procedimientos seguidos en este trabajo fueron adecuados, ya que permitieron obtener resultados que apoyan la hipótesis de que las pruebas preclínicas realizadas a la conotoxina xm1b la hacen un buen candidato para ser considerada un fármaco en el tratamiento de la tuberculosis.

La administración de las diferentes dosis de la conotoxina sintética xm1b en ratones fue apropiada para los fines perseguidos, obteniendo como resultado una letalidad muy baja.

Los resultados del análisis farmacocinético y la cuantificación de la conotoxina en sangre total enriquecida fueron cruciales para identificar que existe algún tipo de afinidad entre la conotoxina y algún componente sanguíneo, que potencialmente puede ayudar a que el efecto farmacológico sea más prolongado.

Hasta el momento, xm1b es la primera conotoxina aislada e identificada con actividad inhibitoria sobre *M. tuberculosis*. Los resultados obtenidos sugieren que dicha conotoxina es un candidato factible para ser considerado como un fármaco, y alientan a la continuación de los estudios correspondientes para una completa caracterización.

Lista de Referencias

Adeyemo, O. M., Shapira, S., Tombaccini, D., Pollard, H. B., Feuerstein, G., y Siren, a. L. (1991). A goldfish model for evaluation of the neurotoxicity of ω-conotoxin GVI A and screening of monoclonal antibodies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *108*(3), 489–496.

Aguilar, A., Caamaño, M., Martín, F. R., y Montejo, M. C. (2014). *Biofarmacia y Farmacocinética. Ejercicios y Problemas Resueltos* (2da ed.). Madrid: Elsevier Inc.

Al-Nazhan, S., y Spangberg, L. (1990). Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: an electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *Journal of Endodontics*, *16*(3), 129–34.

Argmann, C., y Auwerx, J. (2006). Collection of Blood and Plasma from the Mouse. *Current Protocols in Molecular Biology*, *29A.3*, 1–4.

Arias, H. R., y Blanton, M. P. (2000). α-Conotoxins. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *32*(10), 1017–1028.

Bernáldez, J. (2013). *Aislamiento y caracterización de toxinas de caracoles marinos del género Conus con actividad en Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 106 pp.

Boenisch, T. (2009). Antibodies. In G. Kumar y R. Lars (Eds.), *Immunohistochemical Staining Methods* (5th ed., pp. 1–11). California: Dako North America.

Bolant, B., Calvo, M. A., Cejalvo, D., Gimeno, L. O., Gimeno, L., y Lloris, J. M. (1990). La Eutanasia en los Animales de Laboratorio. *Reseach in Surgery. Suplemento*, 45–56.

Brady, R. M., Baell, J. B., y Norton, R. S. (2013). Strategies for the development of conotoxins as new therapeutic leads. *Marine Drugs*, *11*(7), 2293–313.

Bruce, R. D. (1987). A Confirmatory Study of the Up-and-Down Method for Acute Oral Toxicity Testing. *Fundamental an Applied Toxicology*, *8*(1), 97–100.

Buczek, O., Bulaj, G., y Olivera, B. M. (2005). Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *62*(24), 3067–3079.

Cervantes, K. (2013). *Aislamiento y caracterización de péptidos inmunomoduladores presentes en el veneno de caracoles marinos del género Conus*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Baja California. 67 pp.

Choi, S. C. (1990). Interval Estimation of the Ld50 Based on an Up-and-Down Experiment. *Biometrics*, *46*(2), 485–492.

Clark, R. J., Akcan, M., Kaas, Q., Daly, N. L., y Craik, D. J. (2012). Cyclization of conotoxins to improve their biopharmaceutical properties. *Toxicon*, *59*(4), 446–455.

Clark, R. J., Fischer, H., Dempster, L., Daly, N. L., Rosengren, K. J., Nevin, S. T., … Craik, D. J. (2005). Engineering stable peptide toxins by means of backbone cyclization: stabilization of the alpha-conotoxin MII. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(39), 13767–13772.

Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E.-M., Broomage, N., Bunyan, J., … Warwick, C. (1997). Recomendaciones para la Eutanasia de los Animales de Experimentación : Parte 2. *Laboratory Animals*, *31*(1), 1–32.

Cormier, A., Paas, Y., Zini, R., Tillement, J.-P., Lagrue, G., Changeux, J.-P., y Grailhe, R. (2004). Long-term exposure to nicotine modulates the level and activity of acetylcholine receptors in white blood cells of smokers and model mice. *Molecular Pharmacology*, *66*(6), 1712–1718.

Craig, a G., Norberg, T., Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., … Olivera, B. M. (1999). Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(20), 13752–13759.

Craik, D. J., y Adams, D. J. (2007). Chemical modification of conotoxins to improve stability and activity. *ACS Chemical Biology*, *2*(7), 457–68.

Dartois, V. (2014). The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. *Nature Reviews. Microbiology*, *12*(3), 159–167.

Davis, J., Jones, A., y Lewis, R. J. (2009). Remarkable inter- and intra-species complexity of conotoxins revealed by LC/MS. *Peptides*, *30*(7), 1222–1227.

Dekan, Z., Wang, C.-I. A., Andrews, R. K., Lewis, R. J., y Alewood, P. F. (2012). Conotoxin engineering: dual pharmacophoric noradrenaline transport inhibitor/integrin binding peptide with improved stability. *Organic y Biomolecular Chemistry*, *10*(30), 5791–5794.

DiPiro, J. T. (2010). *Concepts in Clinical Pharmacokinetics*. (ASHP, Ed.) (5th ed.). American Society of Health-System Pharmacists.

Dixon, W. J. (1965). The Up-and-Down Method for Small Samples. *Journal of the American Statistical Association*, *60*(312), 967–978.

Dobson, R., Collodoro, M., Gilles, N., Turtoi, A., De Pauw, E., y Quinton, L. (2012). Secretion and maturation of conotoxins in the venom ducts of Conus textile. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, *60*(8), 1370–1379.

Dutton, J. L., y Craik, D. J. (2001). alpha Conotoxins Nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonists as Pharmacological Tools and Potential Drug Leads. *Current Medicinal Chemistry*, *8*(4), 327–344.

Ellison, M., McIntosh, J. M., y Olivera, B. M. (2003). α-Conotoxins ImI and ImII. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(2), 757–764.

Fusetani, N., y Kem, W. (2009). *Marine Toxins as Research Tools*. (N. Fusetani y W. Kem, Eds.) (46th ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Gerwig, G. J., Hocking, H. G., Stöcklin, R., Kamerling, J. P., y Boelens, R. (2013). Glycosylation of conotoxins. *Marine Drugs*, *11*(3), 623–642.

Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., y Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, *18*(5), 703–710.

Harlan Laboratories. (2009). *Hsd:ICR (CD-1)*. Indianapolis. USA.

Harris, J. M., y Chess, R. B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *2*(3), 214–221.

Hooper, C., Pinteaux-Jones, F., Fry, V. a H., Sevastou, I. G., Baker, D., Heales, S. J., y Pocock, J. M. (2009). Differential effects of albumin on microglia and macrophages; implications for neurodegeneration following blood-brain barrier damage. *Journal of Neurochemistry*, *109*(3), 694–705.

ICH (International Conference on Harmonization). (1997). *Guidance for industry: S6 preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals*.

Jiang, L., He, L., y Fountoulakis, M. (2004). Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A*, *1023*(2), 317–320.

Jin, A., Dutertre, S., Kaas, Q., Lavergne, V., Kubala, P., Lewis, R. J., y Alewood, P. F. (2013). Transcriptomic messiness in the venom duct of Conus miles contributes to conotoxin diversity. *Molecular y Cellular Proteomics : MCP*, *12*(12), 3824–33.

Jusko, W. J., y Gretch, M. (1976). Plasma and tissue protein binding of drugs in pharmacokinetics. *Drug Metabolism Reviews*, *5*(1), 43–140.

Kaas, Q., Westermann, J.-C., y Craik, D. J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, *55*(8), 1491–1509. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211197

Kapono, C. a., Thapa, P., Cabalteja, C. C., Guendisch, D., Collier, A. C., y Bingham, J. P. (2013). Conotoxin truncation as a post-translational modification to increase the pharmacological diversity within the milked venom of Conus magus. *Toxicon*, *70*, 170–178.

Kay, R., Barton, C., Ratcliffe, L., Matharoo-ball, B., Brown, P., Roberts, J., … Creaser, C. (2008). Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *22*(20), 3255–3260.

Koua, D., Brauer, A., Laht, S., Kaplinski, L., Favreau, P., Remm, M., … Stöcklin, R. (2012). ConoDictor: a tool for prediction of conopeptide superfamilies. *Nucleic Acids Research*, *40*(W1), 238–241.

Lall, N., y Meyer, J. J. M. (1999). In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of Mycobacterium tuberculosis by ethnobotanically selected South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *66*(3), 347–354.

Lipnick, R. L., Cotruvo, J. a, Hill, R. N., Bruce, R. D., Stitzel, K. a, Walker, a P., … Springer, J. a. (1995). Comparison of the up-and-down, conventional LD50, and fixed-dose acute toxicity procedures. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *33*(3), 223–231.

Liu, F., Dai, Q., Li, J., Li, X., Zhou, Y., y Huang, P. (2000). SO3-a new type of conotoxin with analgesic activity. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, *25*(3), 174–176.

Liu, L., Chew, G., Hawrot, E., Chi, C., y Wang, C. (2007). Two potent α3/5 Conotoxins from Piscivorous Conus achatinus. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *39*(6), 438–444.

Liu, X., Chen, J., Yu, H., Zhao, J., Giesy, J. P., y Wang, X. (2006). Quantitative structure activity relationship (QSAR) for toxicity of chlorophenols on L929 cells in vitro. *Chemosphere*, *64*(10), 1619–1626.

Lu, A., Yang, L., Xu, S., y Wang, C. (2014). Various conotoxin diversifications revealed by a venomic study of Conus flavidus. *Molecular y Cellular Proteomics : MCP*, *13*(1), 105–118.

Luo, S., Christensen, S., Zhangsun, D., Wu, Y., Hu, Y., Zhu, X., … McIntosh, J. M. (2013). A novel inhibitor of α9α10 nicotinic acetylcholine receptors from Conus vexillum delineates a new conotoxin superfamily. *PloS One*, *8*(1), 1–10.

Martínez, L., López, E., y Aguilar, M. (2014). El veneno de los caracoles marinos y su paradójico uso médico. *Revista Digital Universitaria*, *15*(11), 1–11.

Masoud, L., Vijayasarathy, C., Fernandez-Cabezudo, M., Petroianu, G., y Saleh, a. M. (2003). Effect of malathion on apoptosis of murine L929 fibroblasts: A possible mechanism for toxicity in low dose exposure. *Toxicology*, *185*(1-2), 89–102.

Munro, D. A. (2005). *Análisis del efecto de toxinas de Anthopleura elegantisima, Conus californicus y Auronoctonus phaiodactylus en Mycobacterium tuberculosis.* Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 101 pp.

Muttenthaler, M., Nevin, S. T., Grishin, A. a., Ngo, S. T., Choy, P. T., Daly, N. L., … Alewood, P. F. (2010). Solving the α-conotoxin folding problem: Efficient selenium-directed on-resin generation of more potent and stable nicotinic acetylcholine receptor antaqonists. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(10), 3514–3522.

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8th editio.).

Nicod, L., Viollon, C., Regnier, A., Jacqueson, A., y Richert, L. (1997). Rifampicin and isoniazid increase acetaminophen and isoniazid cytotoxicity in human HepG2 hepatoma cells. *Human y Experimental Toxicology*, *16*(1), 28–34.

OECD. (2008). 425, Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, *Section, 4*.

Olivera, B. (1997). Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Molecular Biology of the Cell*, *8*(11), 2101–2109.

Olivera, B. (2006). Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(42), 31173–31177.

Olivera, B., Quik, M., Vincler, M., y Mcintosh, M. (2008). Subtype-selective conopeptides targeted to nicotinic receptors. *Channels*, *2*(2), 143–152.

Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvaran, V., y Grant, R. (2003). Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B*, *785*(2), 263–275.

Puillandre, N., Koua, D., Favreau, P., Olivera, B. M., y Stöcklin, R. (2012). Molecular phylogeny, classification and evolution of conopeptides. *Journal of Molecular Evolution*, *74*(5-6), 297–309.

Rispin, A., Farrar, D., Margosches, E., Gupta, K., Stitzel, K., Carr, G., … McCall, D. (2002). Alternative methods for the median lethal dose (LD(50)) test: the up-and-down procedure for acute oral toxicity. *ILAR Journal*, *43*(4), 233–243.

Rowland, M., y Tozer, T. N. (2011). *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Concepts and Applications*. *Pharmaceutical Sciences* (4th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

Sarkar, B. (2002). *Heavy Metals in the Environment*. New York: CRC Press.

Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, *1*(1), 16–22.

Schmidt, R., Chung, L., Andrews, A., y Turner, T. (1993). Toxicity of L-ascorbic acid to L929 fibroblast cultures: Relevance to biocompatibility testing of materials for use in wound management. *Journal of Biomedical Materials Research*, *27*(4), 521–530.

Sun, D., Ren, Z., Zeng, X., You, Y., Pan, W., Zhou, M., … Xu, A. (2011). Structure-function relationship of conotoxin lt14a, a potential analgesic with low cytotoxicity. *Peptides*, *32*(2), 300–305.

Tsuboy, M. S., Angeli, J. P. F., Mantovani, M. S., Knasmüller, S., Umbuzeiro, G. a., y Ribeiro, L. R. (2007). Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. *Toxicology in Vitro*, *21*(8), 1650–1655.

Tuschl, H., y Schwab, C. (2003). Cytotoxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, *41*(3), 385–393.

Wang, K., Shindoh, H., Inoue, T., y Horii, I. (2002). Advantages of in vitro cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines. *The Journal of Toxicological Sciences*, *27*(3), 229–237.

Williams, J. a, Day, M., y Heavner, J. E. (2008). Ziconotide: an update and review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *9*(9), 1575–1583.

Xie, J. P., Yue, J., Xiong, Y. L., Wang, W. Y., Yu, S. Q., y Wang, H. H. (2003). In vitro activities of small peptides from snake venom against clinical isolates of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *22*(2), 172–174.

Zbinden, G., y Flury-Roversi, M. (1981). Significance of the LD50-Test for the Toxicological Evaluation of Chemical Substances. *Archives of Toxicology*, *47*(2), 77–99.