

Tesis defendida por
Jennifer Medina Elizalde
y aprobada por el siguiente comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro

Director del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez

Miembro del Comité

Dr. Ernesto García Mendoza

Miembro del Comité

M en C. Ma. Nieves Trujillo Tapia

Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez

*Coordinador del Programa de Posgrado
en Biotecnología Marina*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

30 de noviembre de 2012

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA



Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida
Orientación Biotecnología Marina

Efecto del veneno de *Conus princeps* y *Anthopleura* sp. sobre el canal TRPV1

Tesis

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

Presenta:

Jennifer Medina Elizalde

Ensenada, Baja California, México

2012

Resumen de la tesis de Jennifer Medina Elizalde, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. 2012.

Efecto del veneno de *Conus princeps* y *Anthopleura* sp. sobre el canal TRPV1

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro
Director de tesis

El receptor de potencial transitorio vaniloide 1 o TRPV1 por su siglas en inglés (Transient Receptor Potencial Vanilloid 1) es un canal catiónico tetramérico no selectivo con alta permeabilidad a Ca^{+2} . Se ha relacionado con procesos fisiológicos como la detección de estímulos dolorosos y diversas patologías. Por lo tanto, los moduladores de este canal son moléculas de interés para el diseño de fármacos que produzcan analgesia. En trabajos realizados previamente en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del CICESE, se encontraron péptidos con actividad analgésica en el veneno de las anémonas del género *Anthopleura*. Por otro lado, está ampliamente documentado que dentro del veneno de los caracoles marinos *Conus*, se encuentran toxinas con capacidad para bloquear canales iónicos. El objetivo de este trabajo fue analizar el veneno del caracol *Conus princeps* y de la anémona *Anthopleura* sp. para probar su efecto sobre el canal TRPV1. Se realizaron extracciones y separaciones del veneno de ambas especies. El veneno separado por HPLC-RP fue probado sobre el canal TRPV1 utilizando la técnica patch clamp. Se encontró una fracción de veneno de *Anthopleura* sp. y una de *Conus princeps* que activan al TRPV1.

Palabras clave: **anémona marina, canales iónicos, toxinas, patch clamp, dolor**

Abstract of the thesis presented by Jennifer Medina Elizalde as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Science of Life with orientation in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, 2011.

Effect of the venom of *Conus princeps* and *Anthopleura* sp. on the TRPV1 channel

Accepted summary by:

Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro
Thesis director

TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) is a non selective tetrameric cationic channel with a high permeability to Ca^{+2} . It is involved in several physiologic processes like painful stimuli detection and numerous pathologies. For these reasons, channel modulators are potential molecules to new design drugs capable to produce an analgesic effect. In previous studies done in the laboratory of Inmunología Molecular y Biotoxinas of CICESE, peptides with analgesic activity were isolated from the venom of the sea anemone *Anthopleura*. Also, is well known that in the venom of the marine snail *Conus* we can find toxins capable to block ionic channels. The aim of this work was to analyze the venom effect on TRPV1 channel of the marine snail *Conus princeps* and to the sea anemone *Anthopleura* sp. Extraction and venom purification of both species were done. The venom separated by HPLC-RP was tested on the TRPV1 channel using the patch clamp technique. One fraction from the *C. princeps* venom and one from *Anthopleura* sp. venom cause activation of TRPV1 channel.

Key words: **sea anemone, ionic channels, toxins, patch clamp, pain**

Dedicatoria

A Dios

A los que confían ciegamente en mí, mis mejores amigos, mis mayores apoyos, a quienes no quiero defraudar:

 Mi papa, mi mama
 mis hermanos Karen y Alan

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por el apoyo y las facilidades prestadas durante mi estancia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca que me permitió realizar los estudios de Maestría.

A mi director de tesis, Dr. Alexei F. Licea Navarro por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo, por compartir su tiempo y sus conocimientos, y por el apoyo para realizar este trabajo, sin importar la distancia.

A los miembros del comité de tesis: Dra. Rufina Hernández Martínez, Dr. Ernesto García Hernández, M. en C. Ma. Nieves Trujillo Tapia por su gran esfuerzo para leer este trabajo y realizar valiosos comentarios para mejorarlo.

A la M. en C. Ma. Nieves Trujillo Tapia por las gestiones para facilitar el uso de las instalaciones de la Universidad del Mar.

A la Universidad del Mar por permitirme el uso de las instalaciones y el equipo.

A la Dra. Tamara L. Rosenbaum Emir por aceptarme en su laboratorio, por las horas de trabajo, por presentarme a unos maravillosos canales y enseñarme lo que son capaces de hacer.

A los técnicos del laboratorio en el IFC Biol. Itzel Alejandra Llorente Gil y Félix Sierra por facilitarme material y equipo, y por todo su apoyo

A los compañeros de laboratorio en el IFC por tenerme paciencia, por enseñarme a usar el equipo, por convertirse en mis amigos en tan poco tiempo: Alejandra, Lorenzo, Giovanni, Félix, Abraham, Enrique y Sara.

Al M. en C. Alberto Montoya Márquez por ayudarme ampliamente con la estadística.

A los compañeros del laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de CICESE por compartir su conocimiento, tiempo y material: Pavel, Félix, Karla, Johana, Samantha, Erika, Andrea.

A David R. Navarro Apanco por soportarme todo este tiempo, por apoyarme, por escucharme, por ayudarme a sobrevivir LUAF.

Contenido

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Dedicatoria.....	4
Agradecimientos	5
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tablas.....	12
1. Introducción.....	13
1.1. Canales TRP	15
1.2. Canal TRPV1	16
1.3. Generalidades del género <i>Conus</i>	20
1.4. Aparato de veneno de <i>Conus</i>	21
1.5. Generalidades del veneno de <i>Conus</i>	23
1.6. <i>Conus princeps</i> (Linneo 1758).....	25
1.7. Generalidades del género <i>Anthopleura</i>	27
1.8. Cnidocitos	28
1.9. Generalidades del veneno de las anémonas.....	30
1.10. Patch clamp	32
2. Antecedentes	35
2.1. Toxinas con efecto sobre el canal TRPV1	35
2.2. Toxinas de <i>Conus</i> con efecto en la nocicepción.....	37
3. Justificación.....	39
4. Hipótesis	40

5. Objetivos	41
5.1. Objetivo general.....	41
5.2. Objetivos particulares	41
6. Materiales y métodos	42
6.1. <i>Conus princeps</i>	42
6.1.1. Colecta de organismos	42
6.1.2. Obtención del veneno.....	42
6.1.3. Cuantificación de veneno por diferencia de peso seco.....	43
6.1.4. Separación del veneno por HPLCRP	43
6.2. <i>Anthopleura</i> sp.....	44
6.2.1. Obtención de veneno.....	44
6.2.2. Diálisis del veneno total	44
6.2.3. Separación del veneno por cromatografía de exclusión molecular	45
6.2.4. Separación del veneno por HPLC-RP	45
6.2.5. Ensayo de formalina.....	46
6.2.6. Análisis de datos	48
6.3. Ensayos de electrofisiología	48
6.3.1. Expresión del canal TRPV1	48
6.3.2. Efecto del veneno de <i>Conus princeps</i> y <i>Anthopleura</i> sp. sobre el canal TRPV1	49
6.3.3 Análisis de datos	50
7. Resultados	52
7.1. <i>Conus princeps</i>	52
7.1.1. Obtención y separación de veneno	52

	8
7.1.2. Ensayos de electrofisiología	53
7.2. Anthopleura sp.....	65
7.2.1. Separación de veneno.....	65
7.2.2. Ensayo de formalina.....	66
7.2.3. Ensayos de electrofisiología	70
8. Discusión.....	74
8.1. <i>Conus princeps</i>	74
8.2. <i>Anthopleura sp.</i>	76
9. Conclusiones.....	79
10. Perspectivas.....	80
Referencias bibliográficas	81
Anexo. Formulación del medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	1

Lista de Figuras

Figura	Pag.
1 Canal TRPV1.....	19
2 Clasificación de las conotoxinas y conopéptidos.....	22
3 Aparato de veneno de <i>Conus</i>	24
4 Fotografía de la concha de <i>Conus princeps</i>	27
5 Anémonas de mar.....	28
6 Esquema de un nematocisto.....	29
7 Diagrama de tres configuraciones de la técnica patch clamp y como son obtenidas.....	34
8 Cromatograma de HPLC del veneno de <i>Conus princeps</i>	52
9 Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología para las 6 fracciones del veneno de <i>Conus princeps</i> (F1-F6), de acuerdo a los tratamientos: ‘inicial’, ‘fracción’, ‘fracción+capsaicina’ y ‘capsaicina’.....	54
10 Trazos de corrientes obtenidas con F1 del veneno de <i>Conus princeps</i>	56
11 Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología para 4 experimentos con la fracción 1 (F1) de <i>Conus princeps</i>	57
12 Cromatograma de HPLC-RP de las 3 subfracciones en que se dividió la fracción F1 de <i>Conus princeps</i>	58
13 Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología con la SF1 de <i>Conus princeps</i> de acuerdo a los tratamientos: ‘inicial’, ‘fracción’ y ‘capsaicina’ y las configuraciones inside-out y outside-out.....	59
14 Trazos de corrientes obtenidas con la SF1 de <i>Conus princeps</i> en las configuraciones inside-out y outside-out, con los tratamientos: ‘inicial’, ‘fracción’ y ‘capsaicina’.....	60

		10
Figura		Pag.
15	Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología para 3 experimentos con SF1 de <i>Conus princeps</i>	61
16	Cromatograma de HPLC-RP de los 7 picos en que se separó la SF1 de <i>Conus princeps</i>	62
17	Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología de 7 picos (P1-P7) de <i>Conus princeps</i> de acuerdo a los tratamientos: 'inicial', 'pico' y 'capsaicina'.....	63
18	Trazos de corrientes obtenidas con el P7 de <i>Conus princeps</i> con los tratamientos: 'inicial', 'pico' y 'capsaicina'.....	64
19	Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología para 2 experimentos con el P7 de <i>Conus princeps</i>	64
20	Cromatograma de exclusión molecular del veneno de <i>Anthopleura sp.</i>	65
21	Cromatograma de HPLC-RP del veneno de <i>Anthopleura sp.</i> obtenido a partir de la fracción 3 de la cromatografía de exclusión molecular.....	66
22	Gráfica de barras del ensayo de formalina fase 1 realizado con 3 picos del veneno de <i>Anthopleura sp.</i> , el control negativo PBS y los controles positivos KET y TRA.....	67
23	Gráfica de barras de formalina fase 2 realizado con 3 picos del veneno de <i>Anthopleura sp.</i> , el control negativo PBS y los controles positivos KET y TRA.....	69
24	Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología con la F1 del veneno de <i>Anthopleura sp.</i> , de acuerdo a los tratamientos: 'inicial', 'fracción', 'fracción+capsaicina' y 'capsaicina'.....	71
25	Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología para 3 experimentos con el P1 de <i>Anthopleura sp.</i>	72

Figura

Pag.

26 Trazos de corrientes obtenidas con P1A del veneno de *Anthopleura* sp con los tratamientos: 'inicial', 'pico' y 'capsaicina'.

73

Lista de Tablas

Tabla	Pag.
1 Características de las familias de TRP.....	17
2 Clasificación de conotoxinas en familias.....	26
3 Clasificación de algunas de las toxinas de anémonas.....	31
4 Conotoxinas en pruebas clínicas para el tratamiento del dolor.....	38
5 Solución amortiguadora de fosfatos 1X.....	47
6 Composición de la sustancia de registro.....	49
7 Prueba de Friedman para las 6 fracciones de veneno de <i>C. princeps</i> (F1-F6).....	54
8 Prueba de Wilcoxon para contrastar los tratamientos 'fracción+capsaicina' y 'capsaicina' de las 6 fracciones de veneno de <i>C. princeps</i> (F1-F6).....	55
9 Prueba de Wilcoxon para contrastar los tratamientos 'inicial' y 'fracción' de las 6 fracciones de veneno de <i>C. princeps</i>	56
10 Prueba de Wilcoxon para contrastar los tratamientos 'inicial' y 'pico' de los 7 picos del veneno de <i>C. princeps</i>	63
11 Valores de media y desviación estándar y prueba Tukey para el ensayo de formalina fase 1 realizado con 3 picos de veneno de <i>Anthopleura</i> sp., el control negativo PBS y los controles positivos KET y TRA.....	68
12 Valores de media y desviación estándar y prueba Tukey para el ensayo de formalina fase 2 realizado con 3 picos de veneno de <i>Anthopleura</i> sp., el control negativo PBS y los controles positivos KET y TRA.....	69

1. Introducción

Desde hace miles de años, el ser humano ha utilizado compuestos naturales como tratamiento para diversas enfermedades, siendo las plantas y otros organismos terrestres las fuentes más comunes. Pero no solamente el ambiente terrestre contiene moléculas que pueden utilizarse con esta finalidad. El mar es una inmensa fuente de recursos naturales que pueden ser aprovechados como una alternativa para ampliar el número de moléculas disponibles. Es por esto que en los últimos años han aumentado las investigaciones dedicadas a la obtención de compuestos naturales de origen marino que, aunado al potencial médico, pueden emplearse en la industria alimenticia y cosmética.

Además de los usos médicos, alimenticios y cosméticos, los compuestos naturales son herramientas importantes para el descubrimiento de blancos moleculares como receptores, enzimas o canales iónicos que están relacionados con procesos fisiológicos o patológicos; lo que permite ampliar el conocimiento sobre las enfermedades y como combatirlas.

Hace casi 40 años, mientras se estudiaba cómo la luz es percibida por el ojo, se descubrió un canal iónico que fue nombrado TRP. Con investigaciones más amplias se encontraron diversas formas de estos canales y se determinó que no solamente están relacionados con la percepción de la luz, sino con muchos otros procesos fisiológicos por ejemplo la sensación de dolor, de calor o frío, de sabores y de presión; y que se encuentran en muchos tipos de células y tejidos.

El presente trabajo se enfoca una de estas formas de canales, llamado TRPV1. El canal TRPV1 es el principal detector de la sensación de ardor o picor provocado por consumir chile; aunque no es el único estímulo que detecta. Se ha encontrado al TRPV1 en células y tejidos diversos, como neuronas detectoras de dolor, tejido muscular liso, vejiga, pulmones e hígado; y ahora se sabe que está involucrado en la detección de dolor y en ciertas enfermedades como la incontinencia urinaria, padecimientos de vías respiratorias y migraña. Considerando lo anterior, las moléculas que tienen algún efecto sobre el canal son

de gran importancia, ya que pueden ayudar a entender cómo funciona el canal en cada una de las células y tejidos en que se encuentra y como se relaciona con las enfermedades.

Este trabajo se realizó con la finalidad de encontrar algún compuesto de origen marino capaz de interactuar con el TRPV1 que, en un futuro, pueda ser una herramienta para comprender sus implicaciones en el cuerpo humano y sus patologías.

Se eligieron dos organismos marinos venenosos para realizar la búsqueda de compuestos: el caracol *Conus princeps* y la anémona *Anthopleura* sp.

Los caracoles del género *Conus* son un grupo de más de 500 animales que produce veneno peptídico con alrededor de 100 componentes. Desde hace más de 40 años comenzó el estudio del veneno de estos caracoles con resultados prometedores, pues muchos de los péptidos obtenidos denominados conotoxinas, se encuentran en fases clínicas en espera de ser aprobados como tratamientos para enfermedades, principalmente el dolor. De hecho, bajo el nombre de Prialt® se comercializa una conotoxina capaz de controlar el dolor agudo en pacientes con cáncer. El potencial de las conotoxinas es amplio debido a sus características de tamaño y forma. Además, si se toma en cuenta que cada una de las más de 500 especies sintetiza casi 200 componentes y no se ha encontrado el mismo péptido en dos especies diferentes, existe un gran número de moléculas disponibles para ser estudiadas. Por este potencial se eligió a *Conus princeps*, una especie que se distribuye en aguas cálidas del Pacífico mexicano (desde el Golfo de California y hasta Ecuador) y cuyo veneno no ha sido analizado.

Las anémonas marinas también producen veneno peptídico, el cual se sintetiza en células especializadas denominadas nematocistos, que se encuentran principalmente en los tentáculos. Hasta ahora se han caracterizado alrededor de 50 toxinas de anémonas que interactúan con canales iónicos, tres de las cuales bloquean al canal TRPV1 causando analgesia (supresión de sensación dolorosa). En el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de CICESE se ha analizado el veneno de la anémona *Anthopleura* sp. y se encontró que algunos de

sus componentes producen analgesia en ratones. Para observar si este mecanismo es debido al bloqueo del canal TRPV1 es que en el presente se trabajó con este veneno.

Para probar el efecto del veneno de las 2 especies elegidas sobre el canal, se empleó una técnica llamada patch clamp. En patch clamp se utilizan micropipetas de vidrio para aislar una pequeña parte de la membrana celular, que contiene los canales de interés. Una vez aislados los canales se ponen en contacto con los compuestos a analizar y se aplican pulsos eléctricos con los que se infiere el comportamiento de canal.

En este trabajo se describen las particularidades del canal TRPV1, del veneno de las 2 especies elegidas y de la técnica patch clamp. Posteriormente se detalla cómo fueron realizados los experimentos y se discute que resultados se obtuvieron.

1.1. Canales TRP

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que por medio de gradientes electroquímicos permiten el paso de iones en respuesta a determinados estímulos (Sergeev y Rhoten, 1998; Salazar *et al.*, 2009); estas proteínas tienen un papel importante en diversas funciones celulares, por ejemplo excitabilidad, contracción muscular y ciclo celular (Pardo, 1999).

Los canales receptor de potencial transitorio o TRP por su siglas en inglés (Transient Receptor Potencial) constituyen una superfamilia de canales selectivos para cationes mono o divalentes (Pedersen *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010) caracterizados por la presencia de un segmento altamente conservado denominado dominio TRP, importante en la oligomerización de las subunidades y la apertura del canal (Aguado-Llera *et al.*, 2012). Los TRP se encuentran en diferentes células y tejidos de organismos vertebrados e invertebrados, y tienen funciones muy diversas, por ejemplo, las levaduras los utilizan para percibir y

responder a la hipertonicidad, los nématodos para detectar y evitar estímulos químicos nocivos, los ratones machos emplean los TRP detectores de feromonas para distinguir a las hembras, y los humanos para detectar sabores dulce y amargo y para discriminar entre frío y caliente (Claphman, 2003).

Los TRP fueron descubiertos en 1969 por Cosens y Manning. Durante sus estudios de la fotorrecepción en *Drosophila melanogaster*, identificaron mutantes que en respuesta a luz intensa se comportaban como si estuvieran ciegas (Minke, 2010). Posteriormente, con electroretinografías (medición de la respuesta eléctrica de todo el ojo a la luz) y análisis intracelulares de las células fotorreceptoras, Minke *et al.* (1975), observaron que en presencia de luz intensa las *Drosophila* mutantes presentaban corriente transitoria¹, mientras que las silvestres corriente sostenida. Estos autores concluyeron que las moscas mutantes carecían del canal de entrada de calcio, que denominaron TRP.

Actualmente se conocen 28 TRP en ratones y 27 en humanos (Li *et al.*, 2010), que se dividen en seis familias: TRPC (canónica), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPP (policistina), TRPML (mucopolina) y TRPV (vaniloide) (Salazar *et al.*, 2009). Las principales características de estas familias se enlistan en la Tabla 1.

1.2. Canal TRPV1

La familia TRPV incluye a 6 miembros. Los canales TRPV1-TRPV4 son termo sensibles mientras que los TRPV5 y TRPV6 están implicados en la absorción de Ca^{+2} en los riñones y el intestino (Aguado-Llera *et al.*, 2012).

El canal TRPV1 fue clonado por primera vez y caracterizado por Caterina *et al.*, (1997). Es un canal catiónico no específico con alta permeabilidad a calcio (Cromer y McIntyre, 2008; Aguado-Llera *et al.*, 2012).

¹ Corriente transitoria: porción de la corriente en la que el flujo de cargas se extingue por cesar la causa que la produce o estabilizarse en un valor constante (Rudy y Iverson, 1997).

Tabla 1. Características de las familias de canales iónicos tipo TRP. Pedersen *et al.*, 2005.

Familia	Miembros en humanos	Características	Permeabilidad	Ejemplos de mecanismos de activación
TRPC: Canónica o clásico	6	3-4 repeticiones de anquirina N-terminal, contienen una secuencia constante EWKFAR en el C-terminal, pueden formar heterómeros	Canales permeables no selectivos a Ca^{+2}	Por estimulación de los receptores que activan diferentes isoformas de PLC y por el estado de los almacenes de Ca^{+2} intracelular
TRPM: Melastatina	8	Sin repeticiones de anquirina	Permeabilidad variable a Ca^{+2} y Mg^{+2}	TRPM4-M5 por concentraciones elevadas de Ca^{+2} . TRPM6-6 por decremento de las concentraciones de Mg^{+2}
TRPA: Anquirina	1	14 repeticiones de anquirina N-terminal	Permeable a cationes	Concentraciones de Ca^{+2} , estrés mecánico, frío nocivo
TRPP: Policistina	3	Sin repeticiones de anquirina	Permeables a cationes	Concentraciones de Ca^{+2}
TRPML: Mucopolina	3	Pequeños, de menos de 600 aminoácidos. TRPML1 tiene un dominio lipasa intracelular	TRPML1 permeable al Ca^{+2}	TRPML1 por incremento en las concentraciones de Ca^{+2}
TRPV: Vaniloide	6	3-5 repeticiones de anquirina N-terminal	Canales semipermeables no selectivos a Ca^{+2}	Por vaniloideos como la capsaicina. TRPV1-V4 son termosensibles

El canal funcional está compuesto por 838 aminoácidos; es un homotetrámero (Figura 1A), formado por subunidades con seis segmentos transmembranales y regiones amino (N-) y carboxilo (C-) terminales intracelulares. Los segmentos transmembranales cinco (S5) y seis (S6) de cada subunidad, junto con el asa que los conecta, dan lugar al poro de conducción iónica (Salazar *et al.*, 2009). El poro de conducción iónica contiene un filtro de selectividad, que determina el tipo de moléculas que pueden atravesarlo de acuerdo a sus propiedades estereoquímicas y electrostáticas (Gaudet, 2007).

Las hélices de los segmentos S1-S4 conforman el dominio sensor, que percibe las señales y transmite la información a la compuerta, el componente del canal que abre o cierra el poro (Gaudet, 2007). En los segmentos S2-S4 (Arg114, Tyr511, Ser512 Thr550 y Glu761) se encuentra el sitio de unión a capsaicina, el principal agonista del TRPV1 (Jara-Oseguera *et al.*, 2010).

En las porciones citosólicas del canal se encuentran componentes reguladores, entre ellos las repeticiones de anquirina y el dominio TRP (Figura 1B). En el amino terminal, el TRPV1 presenta seis repeticiones de anquirina que intervienen el anclaje al citoesqueleto y las interacciones con otras proteínas (Gohar, 2005). El dominio de repeticiones de anquirina es un motivo estructural que consta de 30-34 aminoácidos plegados en la conformación hélice-giro-hélice, con las hélices en sentido antiparalelo (Li *et al.*, 2010). En el carboxilo terminal del segmento transmembranal S6 se encuentra el dominio TRP, que incluye a 'la caja TRP', que es una secuencia hidrofóbica de cinco aminoácidos altamente conservado en las familias TRPV, TRPC y TRPM (Cromer y McIntyre, 2008).

El TRPV1 se expresa principalmente en neuronas del sistema nervioso periférico detectoras de dolor o nociceptores, como las del ganglio de la raíz dorsal (DRG) y de los ganglios trigeminales (GT). También se encuentra en el sistema nervioso central (SNC) y en tejidos no neuronales como los queratinocitos, los folículos pilosos, el tejido muscular liso, la vejiga, el hígado, los riñones, el bazo y los pulmones en donde se está estudiando su papel fisiológico (Calixto *et al.*, 2005; Cromer y McIntyre, 2008).

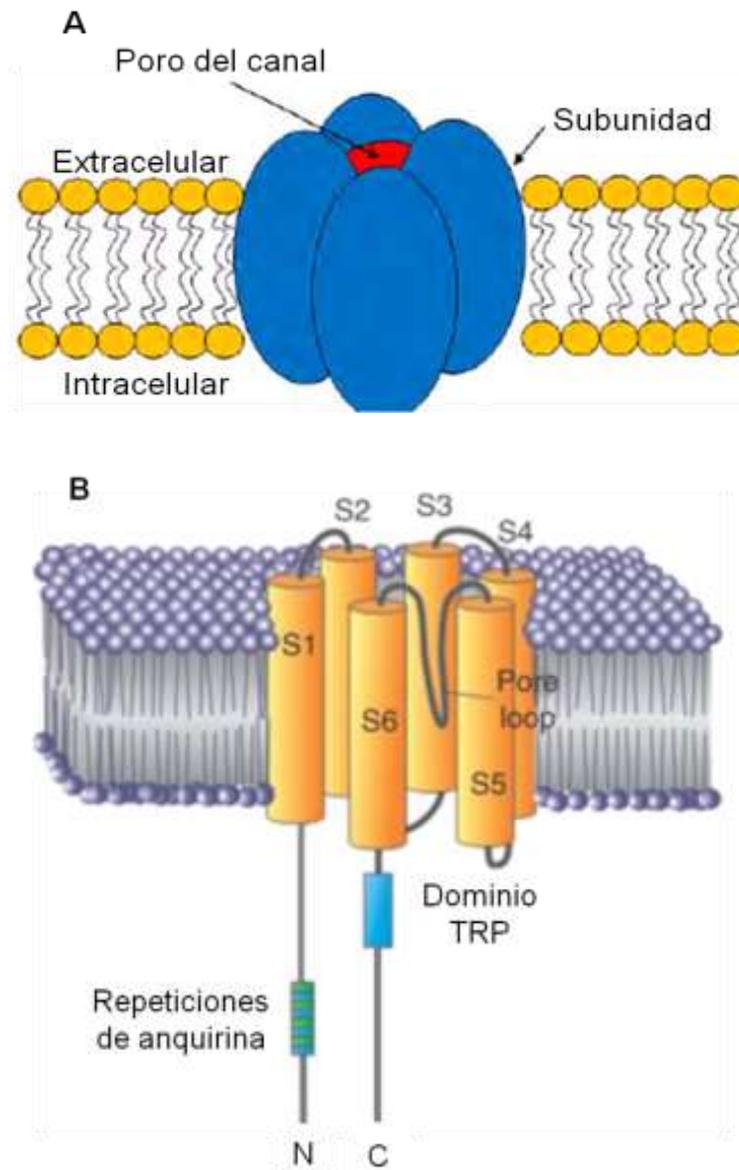


Figura 1. Canal TRPV1. A) Esquema del canal TRPV1, que está compuesto por 4 subunidades. Modificado de “El canal TRPV1 como diana para tratar el dolor” Salazar, H., Jara-Oseguera, A. y Rosenbaum, T., 2009. *Revista de Neurología* 48(7) p. 358. B) Esquema de una subunidad del canal formada por seis segmentos transmembranales (S1-S6) y regiones amino-terminal (N) y carboxilo-terminal (C) intracelulares. Los segmentos S5 y S6 y el asa que los conecta dan lugar al poro del canal. La región N-terminal contiene seis dominios de unión a anquirina. En la región C-terminal se encuentra el dominio TRP. Modificado de “Phototransduction mechanisms in *Drosophila* microvillar photoreceptors” Hardie, R.C., 2012, *WIREs Membrane Transport and Signaling* 1(2) p. 170.

El canal TRPV1 es regulado por diferentes estímulos, entre ellos: las altas temperaturas nocivas ($\sim 42^{\circ}\text{C}$), el voltaje, el pH (~ 5.3 extracelular y ~ 9 intracelular) (Salazar *et al.*, 2009), la anandamida (un neurotransmisor canadinoide), vaniloides como la capsaicina presente en los chiles del género *Capsicum* (familia Solanaceae) (Cromer y McIntyre, 2008), mediadores lipídicos, fosfolípidos, fosforilación y activación ligada a mediadores de inflamación (Calixto *et al.*, 2005).

La activación del canal TRPV1 puede generar potenciales de acción en los nociceptores, que transmiten las señales dolorosas al sistema nervioso central (Moran *et al.*, 2011).

El TRPV1 es un componente importante en diferentes procesos fisiológicos como dolor (inflamatorio, visceral, neuropático y debido a cáncer) y en enfermedades como la cistitis intestinal, enfermedad inflamatoria intestinal, incontinencia urinaria, enfermedades de vías respiratorias y migraña. Por lo anterior, se ha considerado este canal como un blanco relevante para el descubrimiento de agentes terapéuticos. (Immke y Gavva, 2006).

1.3. Generalidades del género *Conus*

Conus Linneo, 1758 es un extenso género de gasterópodos marinos venenosos que incluye a 619 especies actuales (Tucker, 2009) y a 841 especies fósiles (Duda y Kohn, 2005), por lo que es el género más numeroso de invertebrados marinos (Bandyopahyay *et al.*, 2008).

Varios eventos de radiación adaptativa en la historia del género han dado lugar a esta diversidad. Los primeros registros fósiles provienen del Eoceno Inferior (hace 55 millones de años), de depósitos de Inglaterra y Francia. Los análisis paleontológicos demostraron que los *Conus* se encontraban en los océanos tropicales de todo el mundo. De este periodo se conocen 40 especies. Durante el Oligoceno el número de especies en el mar de Tethys, el Atlántico este y del Indo-Pacífico disminuyó casi en un 50%. El género se diversificó durante el

Mioceno, época en que el número de especies aumentó a 150 para después, durante el Plioceno Inferior, reducirse en un 73%. Tras la extinción del Plioceno se presentó una segunda gran radiación adaptativa, en la que surgieron varios cientos de especies (Duda *et al.*, 2001; Duda y Kohn, 2005).

Actualmente, los *Conus* se distribuyen en los todos océanos tropicales, aunque alrededor del 60% de las especies se localizan en la región del Indo-Pacífico (Duda y Kohn, 2005). Estos caracoles se encuentran en zonas rocosas, arenosas y en arrecifes, desde el intermareal hasta profundidades superiores a los 1000 m (Díaz *et al.*, 2005).

El género *Conus* es el único de la familia Conidae. Conidae pertenece a la superfamilia Conoidea o Toxoglossa, junto con Turridae y Terebridae. La característica principal de los conoideos es la presencia de un aparato venenoso y una rádula modificada (Brusca y Brusca, 2003; Puillandre *et al.*, 2008)

1.4. Aparato de veneno de *Conus*

La mayoría de las especies de *Conus* son depredadores especializados de uno de tres grupos de presas: peces, moluscos o poliquetos. Sin embargo, hay otros *Conus* que se alimentan de hemicordados, equiueros o de más de un tipo de organismo (Duda *et al.*, 2001). Los *Conus* cazan inyectando a sus presas veneno peptídico, que se sintetiza en el aparato de veneno ubicado en la porción anterior del cuerpo del organismo, el veneno se inyecta a través de dientes quitinosos que tienen forma de aguja hipodérmica (Marshall *et al.*, 2002).

El aparato del veneno está constituido por un bulbo muscular, el ducto de veneno, el saco radular y la probóscide (Figura 2). La producción y liberación de veneno involucra tres pasos (Marshall *et al.*, 2002; Terlau y Olivera, 2004):

- 1) Síntesis y procesamiento de las toxinas, que se lleva a cabo en el ducto del veneno. El ducto distal está conectado a la faringe, en donde entra en contacto con los dientes radulares.
- 2) Generación y almacenaje de los dientes radulares y la transferencia de uno de ellos hacia la probóscide. Los dientes se generan en el brazo largo del saco radular y se almacenan en el brazo corto. El lumen del saco radular se abre hacia la faringe, anterior al ducto del veneno. Cuando una presa es detectada, un diente es transportado a la faringe, en donde se llena con el veneno, para después ser llevado a la punta de la probóscide.
- 3) Inserción final del diente y expulsión del veneno. Una vez que la probóscide extendida toca a la presa, el diente es expulsado y el veneno inyectado en la presa. Aún no se ha esclarecido totalmente el proceso de expulsión del diente, algunos autores consideran que el bulbo muscular provee la fuerza final para esto, pero lo más aceptado es que la probóscide ejerce la presión positiva necesaria para la expulsión del diente y la inyección del veneno.

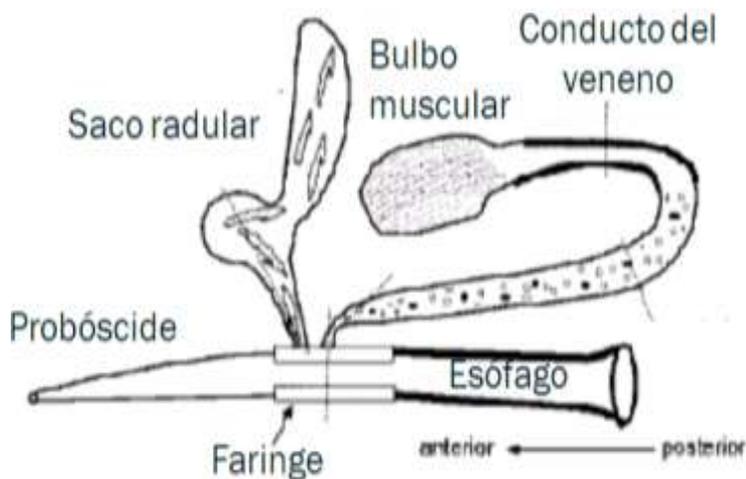


Figura 2. Aparato de veneno de *Conus*. El veneno se sintetiza en el ducto del veneno y entra en contacto con los dientes radulares en la faringe, los dientes llegan a la faringe desde el saco radular, donde son elaborados. Modificado de “Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus*” Marshall J., Kelley, W.P., Rubakhin, S.S., Bingham, J.P., Sweedler, J.V. y Gilly, W.F. 2002, *Biological Bulletin* 203(1) p. 28.

1.5. Generalidades del veneno de *Conus*

El veneno de *Conus* está compuesto por alrededor de 100 péptidos pequeños de menos de 5 kDa, que en su mayoría presentan cisteínas y enlaces disulfuro (Lewis, 2009). Estos péptidos son denominados conopéptidos si tienen uno o ningún enlace disulfuro y conotoxinas si tienen de dos a cinco enlaces (Terlau y Olivera, 2004).

En las conotoxinas, la mayoría de las cisteínas están separadas entre sí por 1-6 aminoácidos, aunque pueden encontrarse pares de cisteínas adyacentes (Norton y Olivera, 2006). Las conotoxinas son clasificadas en once marcos de lectura de acuerdo al número de cisteínas que contienen, a como están conectadas entre sí y al número de residuos entre ellas. Estos marcos de lectura, el blanco molecular de las conotoxinas y la secuencia altamente conservada del péptido señal dan lugar a una clasificación en siete superfamilias y doce familias (Figura 3) (Kaas *et al.*, 2010)

Los péptidos del veneno de *Conus* se unen a canales iónicos dependientes de voltaje (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), canales iónicos activados por ligando (5-HT₃R, NMDAR), receptores acoplados a proteína G (neurotensina, vasopresina) y transportadores de neurotransmisores (nAChR) en la membrana plasmática de nervios y células musculares de los organismos con los que estos moluscos interactúan; sin embargo, estos péptidos también pueden unirse a blancos en la superficie de células de mamíferos. En general, las toxinas se unen a sus blancos moleculares con alta afinidad y selectividad (Terlau y Olivera, 2004). Las conotoxinas son capaces de discriminar entre receptores estrechamente relacionados y entre receptores de tejido específicos, lo que les permite llegar a su blanco diferenciando todas aquellas moléculas similares y acelerando así, la acción de cada uno de los componentes del veneno (Olivera *et al.*, 1990). En la Tabla 2 se describe el mecanismo de acción de las doce familias de conotoxinas.

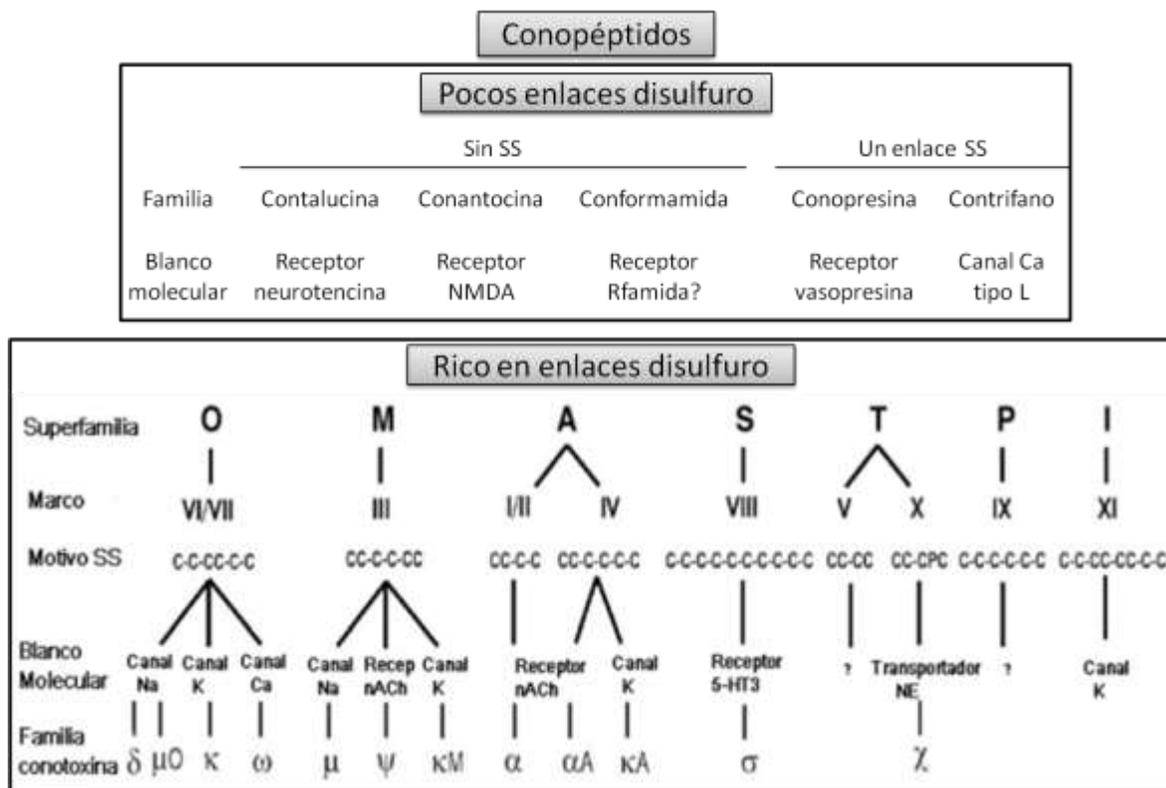


Figura 3. Clasificación de las conotoxinas y conopéptidos. Modificado de “Conotoxinas down under” Norton , R.S. y Olivera, B.M., 2006, *Toxicon* 48(7) p. 783.

Los péptidos de *Conus* son traducidos a partir de precursores que comprenden un péptido señal o región pre, una región pro y una región codificante de toxina. La toxina madura es generada por proteólisis y modificaciones postraduccionales a partir de dichos precursores (Terlau y Olivera, 2004).

Las conotoxinas presentan gran cantidad y diversidad de modificaciones postraduccionales. Algunas de estas modificaciones son: amidación del carboxilo terminal, sulfonación de tirosinas, bromación en triptofanos, glucosilación en treoninas, carboxilación en glutaminas, hidroxilación de prolinas, piroglutamación, ciclización de los extremos amino y carboxilo terminal e isomerización en aminoácidos tipo D. Estas modificaciones incrementan la biodisponibilidad, potencia y estabilidad de los péptidos presentes en el veneno (Lewis y García, 2003).

1.6. *Conus princeps* (Linneo 1758)

Esta especie se distribuye desde el Golfo de California hasta el Ecuador, habitando salientes rocosas. Presenta una concha llamativa y fácilmente distinguible, color anaranjado con líneas axiales onduladas color marrón oscuro que se extienden hasta la espira, que es baja y con corona. La abertura es del mismo color que el exterior pero sin líneas. El periostraco es grueso y oscuro con cerdas muy espaciadas y acomodadas en líneas espirales (Keen, 1971) (Figura 4).

C. princeps es una especie vermívora, se alimenta de poliquetos errantes de la familia Eunicidae (Nybakken, 1978). Sus dientes se caracterizan por tener un borde aserrado, el cual se extiende a más de la mitad de la longitud del diente. El eje es recto, con diámetro casi uniforme a lo largo del borde aserrado y alcanza su máximo cerca de la base. La punta del eje sostiene una pequeña barbilla en un lado y en el lado opuesto tiene una cuchilla corta que termina en un punto truncado. El borde aserrado termina en una cúspide prominentemente redondeada. Hay una ligera indicación de cintura posterior a la cúspide. La cintura termina en una base redondeada que sostiene un pequeño estribo agudo en un lado (Nybakken, 1970).

Tabla 2. Mecanismo de acción de las familias de conotoxinas

Familia	Blanco molecular	Mecanismo de acción	Referencia
α	Receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChRs)	Bloqueadores y antagonistas	Lewis y García, 2003
δ	Canales iónicos de Na ⁺	Retardan inactivación	McIntosh y Jones, 2001
κ	Canales iónicos de K ⁺	Bloqueadores	Terlau <i>et al.</i> , 1996
λ	Desconocido	Desconocido	Balaji <i>et al.</i> , 2000
μ	Canales iónicos de Na ⁺ dependientes de voltaje	Bloqueadores	Olivera <i>et al.</i> , 1990
ϵ	Desconocido	Reducen la liberación de ACh	Rigby <i>et al.</i> , 1999
ρ	Adrenoreceptores de tipo α -1	Inhibidores no competitivos	Lewis y García, 2003
σ	Receptores de serotonina	Antagonistas de la serotonina	McIntosh y Jones, 2001
τ	Canales iónicos de Ca ²⁺	Bloqueadores	McIntosh y Jones, 2001
χ	Transportadores de noradrenalina	Bloqueadores	Harvey, 2002
ψ	NACHR	Antagonistas no competitivos	McIntosh y Jones, 2001
ω	Canales iónicos de Ca ²⁺ dependientes del voltaje	Bloqueadores	Olivera <i>et al.</i> , 1990



Figura 4. Fotografías de la concha de *Conus princeps*

1.7. Generalidades del género *Anthopleura*

El phylum Cnidaria comprende alrededor de 11,000 especies de medusas, anémonas y corales. Los cnidarios poseen simetría radial, tentáculos y estructuras adhesivas o urticantes denominadas cnidocitos (Brusca y Brusca, 2003)

Las anémonas de mar son pólipos solitarios que viven adheridas a un sustrato como rocas, conchas o maderos sumergidos. La mayor parte de su cuerpo está formado por una gruesa columna muscular (Figura 5A), en el extremo aboral hay un disco aplanado para fijación denominado disco pedal y en el extremo oral la columna se ensancha para formar el disco oral que lleva a los tentáculos. En el centro del disco oral se sitúa la boca (Brusca y Brusca, 2003).

Anthopleura (Duchassaing de Fonbressin y Michelotti, 1860) es un género de anémonas marinas perteneciente a la clase Anthozoa (Figura 5B). Estas son especies solitarias, presentan estructuras especializadas en la columna como verrugas, pseudotentáculos o vesículas; los tentáculos orales son cónicos o digitiformes y se presentan en hexámeros (Brusca y Brusca, 2003). El género

incluye a 46 especies, 5 de las cuales se distribuyen en el Pacífico Nororiental: *A. artemisa*, *A. dowii*, *A. elegantissima*, *A. sola* y *A. xanthogrammica* (Fautin, 2011).

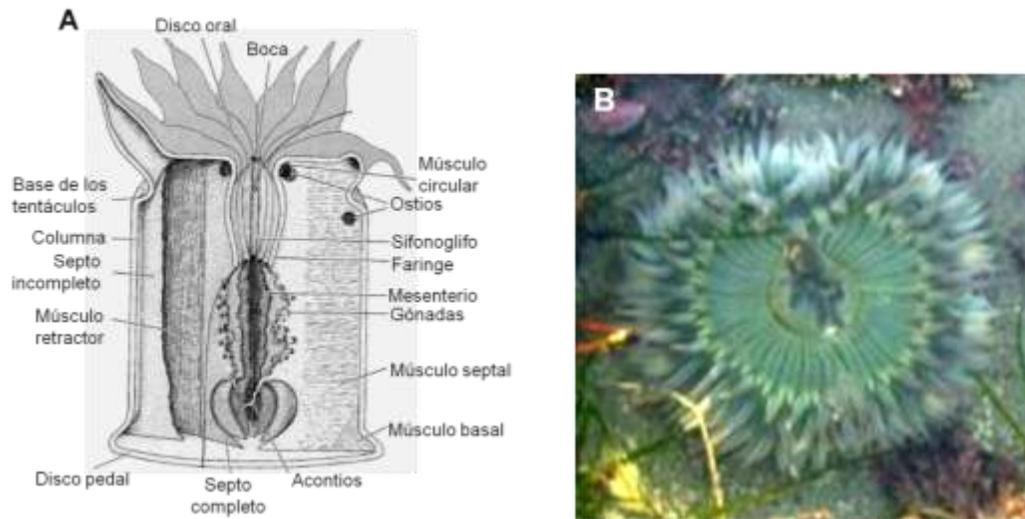


Figura 5. Anémonas de mar. A) Esquema de la anatomía interna de una anémona de mar. Modificado de “Invertebrates” 2º ed. Brusca, R. y Brusca, G., 2003, Sinauer, p. 229. B) Fotografía de *Anthopleura* sp.

1.8. Cnidocitos

Las anémonas marinas se alimentan de invertebrados o pequeños peces que son capturados por los tentáculos y paralizadas por las toxinas presentes en los cnidocitos. Además de la captura de presas, los cnidocitos están implicados en la defensa, la locomoción y la adhesión a sustratos (Brusca y Brusca, 2003).

Los cnidocitos son producidos en el interior de células denominadas cnidoblastos, que se desarrollan en la epidermis de los tentáculos. Los cnidocitos tienen forma ovoide y miden entre 5 y 100 μm . En su interior se encuentra una cápsula que contiene un tubo enrollado que se revierte cuando el cnidocito es estimulado a través de un cnidocilio mecanosensor (Figura 6). La descarga del cnidocito es uno de los procesos biológicos más rápidos y crea un impacto en el

tubo expulsado que permite que este penetre la piel de la presa (Brusca y Brusca, 2003).

La arquitectura de la cápsula de los cnidocitos varía entre las diferentes especies de cnidarios. Se han descrito alrededor de 30 tipos de cnidocitos, pero todos se clasifican en tres clases: nematocistos, spirocistos y pticocistos. Los nematocistos contienen diferentes toxinas peptídicas y fenoles y su tubo posee espinas y barbas para penetrar a la víctima e inyectarle las toxinas. Los spirocistos contienen mucoproteínas y glucoproteínas y sus tubos tienen espinas para adherirse a la presa. Los pticocistos son morfológica y funcionalmente muy diferentes a las otras dos clases, su tubo es liso y su única función es adherirse (Brusca y Brusca, 2003; Özbek, 2011).

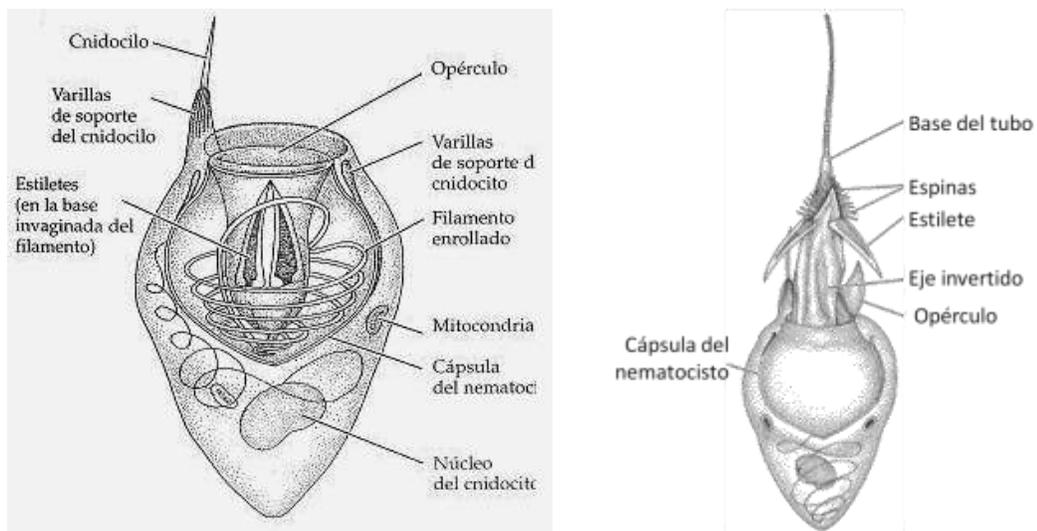


Figura 6. Esquema de un nematocisto antes (izquierda) y después (derecha) de la descarga. Modificado de "Invertebrates" 2º ed. Brusca, R. y Brusca, G., 2003, Sinauer, p. 242.

1.9. Generalidades del veneno de las anémonas

Las anémonas presentan nematocistos, a partir de los cuales se han aislado más de 50 toxinas peptídicas con actividad sobre canales iónicos. Hasta el momento se han buscado toxinas en 40 de las más de 800 especies de anémonas (Honma y Shiomi 2006). Las toxinas mejor caracterizadas de este grupo se han clasificado en 3 grupos: neurotoxinas, acuaporinas e inhibidores de proteasas (Norton, 2009; Shiomi, 2009).

El grupo de las neurotoxinas incluye a péptidos de menos de 5 kDa que interactúan con canales iónicos de potasio (K^+) y sodio (Na^+). Las toxinas que bloquean los canales de potasio se clasifican en una familia, mientras que las toxinas que actúan sobre los canales de sodio se dividen en tres (Norton, 2009). Las tres familias actúan manteniendo al canal de sodio abierto. Las toxinas de las familias tipo I y II se conocen como toxinas largas, ya que contienen entre 45 y 50 aminoácidos; mientras que las de tipo III como toxinas cortas ya que contienen entre 27 y 32 aminoácidos. En la Tabla 3 se presentan ejemplos de estas toxinas (Norton, 2009).

Tabla 3. Clasificación de algunas de las toxinas de anémonas Modificado de “Structures of sea anemone toxins” Norton, R.S., 2009. *Toxicon* 54(8) p. 1078.

Clase	Toxina	Especie	Blanco
Canal de Na⁺			
Largas Tipo 1	ATX I	<i>Anemonia sulcata</i>	Na _v 1
	Anthopleurina A	<i>Anthopleura xanthogrammica</i>	Na _v 1
	Anthopleurina B	<i>A. xanthogrammica</i>	Na _v 1
	CgNa	<i>Condylactis gigantean</i>	Na _v 1
Largas Tipo 2	ShI	<i>Stichodactyla helianthus</i>	Na _v 1 (crustáceo)
Cortas Tipo 3	ATX III	<i>A. sulcata</i>	Na _v 1 (crustáceo)
Otras	APETx2	<i>Anthopleura elegantissima</i>	ASIC3
Canal de K⁺			
	ShK	<i>S. helianthus</i>	Kv1, IKCa
	BgK	<i>Bunodosoma granulifera</i>	Kv1, IKCa (molusco)
	BDS-1	<i>A. sulcata</i>	Kv3.4
	APTEx1	<i>A. elegantissima</i>	HERG
Actinioporinas			
	Equinatoxina II	<i>Actinia equina</i>	Membranas con esfingomielina
	Sticholisina II	<i>S. helianthus</i>	
Inhibidoras de proteasa			
	ShPI	<i>S. helianthus</i>	Proteasas (inhibidor tipo Kunitz)
	AEI	<i>A. sulcata</i>	Proteasas (inhibidor tipo Kazal no clásico)

Las citolisinas o actinoporinas son proteínas básicas, de 18-20 kDa, cuya función es formar poros oligoméricos en las membranas celulares. Estos poros tienen un radio de 1nm aproximadamente y son permeables a pequeñas moléculas y solutos, lo que resulta en un desbalance osmótico que provoca lisis celular. La actividad de las actinoporinas aumenta en presencia de esfingomielina (Norton, 2009).

Los inhibidores de proteasas no son péptidos tóxicos, su función es prolongar el tiempo de vida de las otras toxinas inyectadas al bloquear el mecanismo de proteólisis en los tejidos de la presa (Norton, 2009).

1.10. Patch clamp

La técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o patch-clamp desarrollada en 1976 por Neher y Sakmann se ha convertido en una técnica muy importante para el estudio de los canales iónicos y para la descripción farmacológica de compuestos con actividad sobre ellos (Sunesen y Jacobson, 2011). La técnica involucra el uso de micropipetas para formar sellos de alta resistencia en pequeñas áreas de la membrana celular, lo que reduce y aísla la superficie de la membrana que está siendo estudiada y resulta en experimentos de alta fidelidad (Kornreich, 2007).

Para llevar a cabo la formación del sello de alta resistencia se utilizan pipetas de vidrio cuya punta es pulida con calor a resistencias de entre 1 y 10 M Ω , lo que corresponde a un diámetro de alrededor de 1 μ m. Durante el experimento, mientras la pipeta avanza hacia la célula, se monitorea su resistencia. Cuando la pipeta toca la célula, la resistencia incrementa ligeramente. La aplicación de succión al interior de la pipeta introduce una pequeña porción de membrana celular, la formación del sello se visualiza como un incremento repentino en la resistencia en el orden de G Ω (Cahalan y Neher, 1997).

Existen varias configuraciones de la técnica de patch-clamp, que varían con respecto a la integridad y orientación de la membrana, y a la continuidad entre el espacio intracelular y las soluciones dentro de la pipeta. Algunas de estas configuraciones son inside out, whole cell y outside out (Figura 7) (Kornreich, 2007).

Una vez formado el sello de alta resistencia, éste puede ser extraído de la célula al retirar la pipeta, lo que da lugar a la configuración inside out. La configuración inside out permite la medición de los canales iónicos localizados dentro del diámetro de la punta de la pipeta de registro, en estos experimentos el interior de la célula es expuesto al baño de solución y el exterior de la membrana a la solución dentro de la pipeta (Cahalan y Neher, 1997; Kornreich, 2007).

En la configuración whole cell el parche formado en la membrana se rompe dentro de la punta de la pipeta al aplicar una succión fuerte, por lo que el espacio intracelular queda continuo con la solución dentro de la pipeta. Debido a esta continuidad, se produce una diálisis de la solución de la pipeta en el interior de la célula, provocando que la composición intracelular y de la pipeta queden equilibradas (Kornreich, 2007). Esta configuración es empleada para investigar los efectos sobre los canales iónicos de moléculas reguladoras, como segundos mensajeros, proteínas reguladoras y fosforilación (Cahalan y Neher, 1997).

Al retirar lentamente la pipeta de registro a partir de una célula en la que se ha realizado un whole cell, una ampolla de la membrana se separa de la célula y forma un parche en la punta de la pipeta, con lo que el lado extracelular queda expuesto al baño de solución, esto es la configuración outside out (Kornreich, 2007).

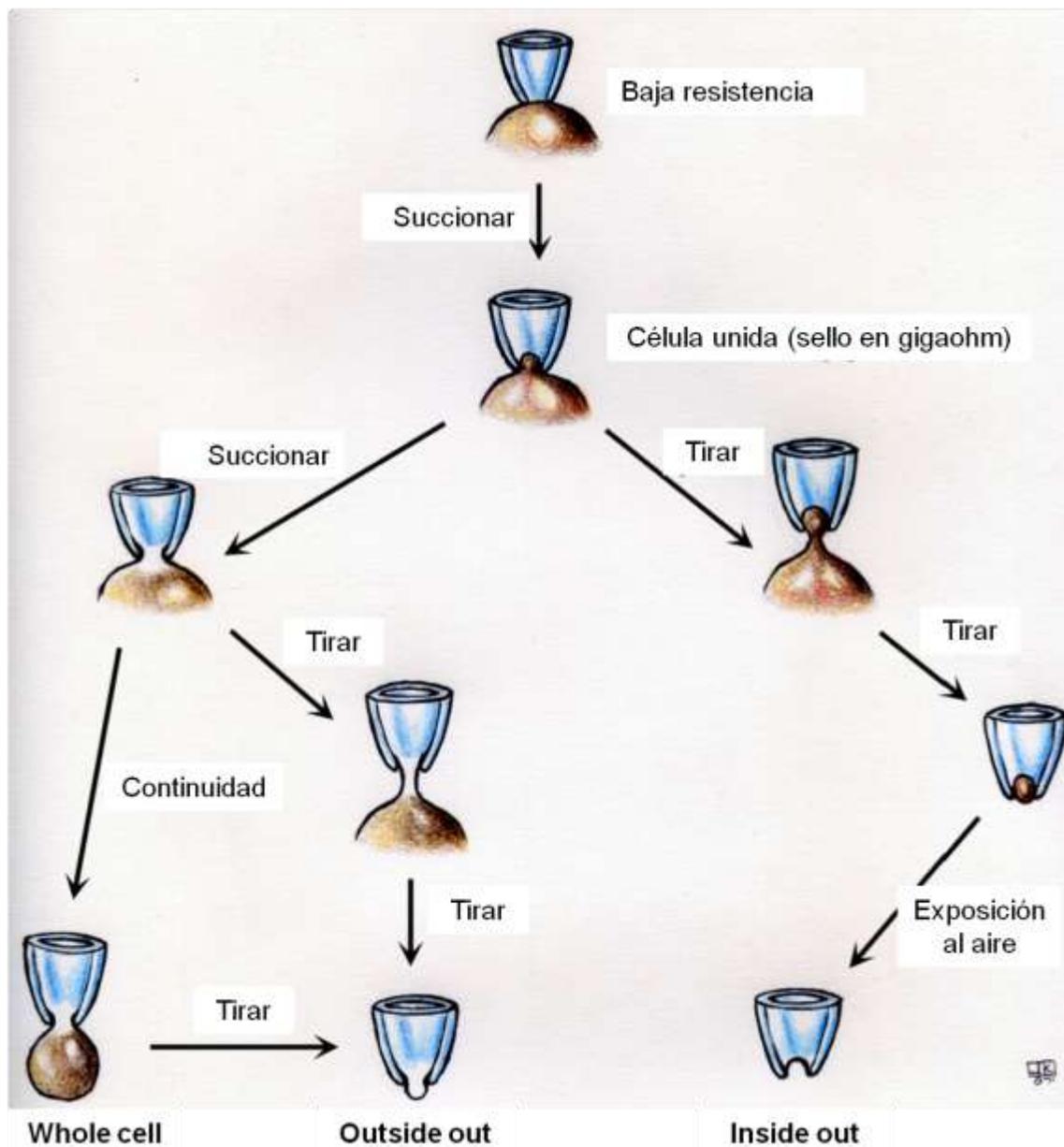


Figura 7. Diagrama de tres configuraciones de la técnica patch clamp y como son obtenidas. Modificado de "The patch clamp technique: Principles and technical considerations" Kornreich, B.G., 2007, *Journal of Veterinary Cardiology* 9(1) p. 33.

2. Antecedentes

2.1. Toxinas con efecto sobre el canal TRPV1

Se han descubierto diversos activadores y bloqueadores del canal TRPV1 a partir de compuestos naturales, muchos de los cuales se encuentran en fases clínicas en donde se evalúa su actividad para aliviar el dolor (Patapoutian *et al.*, 2009; Moran *et al.*, 2011).

La capsaicina presente en los chiles picantes del género *Capsicum* y la resiniferatoxina de la cactácea *Euphorbia resinífera*, son dos de los agonistas (activadores) mejor caracterizados y más utilizados del TRPV1 (Salazar *et al.*, 2009). La aplicación tópica de cremas con capsaicina ha sido utilizada clínicamente para aliviar el dolor crónico en enfermedades como la diabetes neuropática; y el uso de parches con alta concentración de esta molécula ha sido aprobado para el tratamiento de diferentes condiciones de dolor, su potencial analgésico ocurre al desensibilizar las neuronas nociceptivas. La aplicación intramuscular de resiniferatoxina está siendo evaluada como analgésico a largo plazo en pacientes con dolor crónico debido a cáncer (Patapoutian *et al.*, 2009; Moran *et al.*, 2011).

También se han descubierto compuestos peptídicos en animales que modulan este canal. Ejemplos de esto son tres péptidos ICK (Inhibidor cystine knot) denominados vanilotoxinas (VaTx), presentes en el veneno de la tarántula *Psalmopoeus cambridgei*, que son capaces de activar el canal (Siemens *et al.*, 2006) y dos toxinas de la araña, *Agelenopsis aperta*, AG489 y AG505, que son potentes inhibidores (Kitaguchi y Swartz, 2005).

Venenos provenientes de animales marinos también tienen efectos sobre la actividad del canal; por ejemplo, el veneno de los cnidarios *Aiptasia pulchella*, *Chironex fleckeri*, *Physalia physalis* y *Cyanea capillata* producen una respuesta dolorosa similar a la que se observa al aplicar capsaicina. Este efecto se revierte al aplicar un antagonista (bloqueador como la capsacepina) del TRPV1, lo que

demuestra que el dolor producido por la intoxicación con estos venenos se debe a este receptor (Cuypers *et al.*, 2006).

Mientras que las toxinas éter policíclicas, gambierol y brevetoxina, asociadas con el envenenamiento neurotóxico por mariscos, potencializan la activación del TRPV1 por capsaicina (Cuypers *et al.*, 2007)

En el veneno de la anémona *Heteractis crispa* se han identificado tres péptidos que interactúan con el canal TRPV1 (Andreev *et al.*, 2008; Kozlov *et al.*, 2009; Andreev *et al.*, 2012). Esta especie se distribuye en el Pacífico occidental y Océano Índico (Fautín, 2011).

Andreev *et al.* (2008) encontraron el primer inhibidor polipeptídico del canal TRPV1 y lo denominaron polipéptido analgésico HC1 (APHC1) debido a su efecto analgésico en experimentos *in vivo*. Esta toxina de *H. crispa* tiene una masa molecular de 6187 Da, su estructura primaria es homóloga a los inhibidores de tripsina tipo péptidos BPTI/Kunitz cuyas características principales son: alrededor de 60 aminoácidos, 6 cisteínas, la presencia de glicina en dos posiciones antes de la segunda cisteína y un triplete de residuos aromáticos. En experimentos *in vivo* realizados en ratones a los que se administró intramuscularmente el APHC1, se presentó un efecto analgésico entre 1 y 2 horas después de la inyección, y permaneció por 2 horas. En experimentos electrofisiológicos realizados sobre el canal TRPV1 expresados en ovocitos de rana *Xenopus leavis*, obtuvieron 32±9% de inhibición.

Kozlov *et al.* (2009) identificaron dos polipéptidos con efecto analgésico a los que denominaron APCH2 y APCH3. Estos polipéptidos son homólogos al APCH1 y forman parte del grupo de los inhibidores de tripsina tipo Kunitz. La masa molecular de APCH2 es de 6185 Da mientras que de APCH3 es de 6111 Da. En experimentos *in vivo* ambos péptidos redujeron el dolor provocado por calor, aunque APCH3 presentó el mayor potencial analgésico.

Después de observarse la actividad como analgésico, los polipéptidos recombinantes de APCH1 y APCH3 fueron analizados por Philyppov *et al.* (2012) sobre componentes del músculo liso de la vejiga sensibles a capsaicina. Ellos

encontraron que los polipéptidos actúan como inhibidores de la contracción de la vejiga, particularmente en ratones diabéticos.

Por otro lado, Jiménez Flores (2011) realizó la extracción y separación del veneno de la anémona *Anthopleura sp.* y evaluó la actividad analgésica de las fracciones obtenidas en dos ensayos (plancha caliente o hot plate y prueba de la formalina) efectuados en ratones. Ella encontró actividad analgésica periférica en una de las fracciones, lo que podría significar que está actuando sobre el canal TRPV1.

El efecto del veneno del caracol marino *Conus* también ha sido evaluado sobre el canal TRPV1. Drew *et al.* (2007) probaron un análogo de la conotoxina ρ -TIA del caracol piscívoro *C. tulipa* en este canal. El análogo denominado NMB-1 (noxious mechanosensation blocker-1) es un péptido de 19 aminoácidos, con 4 cisteínas con el patrón [1,4], [2,3] en los enlaces disulfuro, con lo que se relaciona con las conotoxinas de la familia ρ . Estos autores midieron el efecto del NMB-1 en corrientes activadas mecánicamente en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de ratas de acuerdo a su cinética de activación, encontrando que es capaz de inhibir las corrientes de adaptación lenta e intermedia. Para comprobar la especificidad de éste péptido, se evaluó en diferentes canales iónicos, entre ellos el TRPV1 expresado en neuronas DRG. El NMB-1 no presentó efecto significativo sobre éste y ningún otro de los canales estudiados.

2.2. Toxinas de *Conus* con efecto en la nocicepción

Los primeros péptidos del veneno de *Conus* fueron caracterizados bioquímicamente a finales de 1970 y actualmente muchas de las toxinas de estos caracoles están siendo consideradas en el desarrollo de terapias para el tratamiento del dolor (Norton y Olivera, 2006). Prueba de esto es la ω -conotoxina MVIIA aislada a partir del veneno de *C. magus*, que fue aprobada en 2004 como analgésico y actualmente se comercializa con el nombre de Ziconotide, Prialt®. El

blanco molecular de ésta conotoxina son los canales de calcio tipo N ($Ca_v2.2$). Estos canales se encuentran principalmente localizados en el espacio presináptico, por lo que la acción de MVIIA resulta en el bloqueo de la transmisión sináptica (Becker y Terlau, 2008).

El efecto analgésico de las conotoxinas puede ser mediado a través de la interacción con diferentes blancos moleculares, incluidos canales de Ca^{+2} y Na^{+} activados por voltaje, receptores de acetilcolina, receptores de neurotensina, receptores de glutamato tipo NMDA y transportadores de norepinefrina (Olivera, 2006): lo que demuestra que las conotoxinas pueden intervenir en diferentes vías de señalización involucradas en la sensación del dolor. Además, la acción analgésica puede ayudar a entender los mecanismos moleculares involucrados en el dolor (Becker y Terlau, 2008). Algunas de las conotoxinas que se encuentran en pruebas clínicas como antinociceptivos se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4. Conotoxinas en pruebas clínicas para el tratamiento del dolor. Modificado de “*Conus Peptides: Biodiversity-based discovery and exogenomics*” Olivera, B.M., 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281(43) p. 31174.

Blanco molecular	Conotoxina	Compañía	Estado de desarrollo	Referencia
Canal de Ca^{+2} tipo N ($Ca_v2.2$)	ω -CVID (AM336)	Amrad	Fase I	Smith <i>et al.</i> , 2002
Receptor de neurotensina	Conuntalucina-G (CGX-1160)	Cognetix	Fase I	Allen <i>et al.</i> , 2007
Transportador de norepinefrina	γ -MrIA (derivado) (Xen-2174)	Xenoma	Fase I	Nielsen <i>et al.</i> , 2005
Receptor de nicotina	a-Vc1.1 (ACV-1)	Metabolic	Fase I	Satkunanathan <i>et al.</i> , 2005
Receptor NMDA	Conantocina-C (CGX-1007)	Cognetix	Fase I	Malmberg <i>et al.</i> , 2003
Canal de Na^{+}	mO-MrVIB (CGX-1002)	Cognetix	Preclínica	Bulaj <i>et al.</i> , 2006

3. Justificación

Debido a que el canal TRPV1 se ha relacionado con la detección de estímulos dolorosos, la generación de procesos de inflamación y a que está involucrado en diversas patologías, los moduladores de este canal son sustancias de interés para el diseño de fármacos. Si se considera que los compuestos naturales son una fuente importante en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y una herramienta útil para el estudio de blancos moleculares, que permita caracterizarlos y dilucidar su función en diversas patologías; resulta necesario el análisis de las interacciones entre diversos compuestos y el canal TRPV1.

Por lo anterior, en este trabajo se probó el efecto de una fracción del veneno de *Anthopleura sp.* sobre el canal TRPV1. Esta fracción ha demostrado actividad analgésica en experimentos previos (Jiménez Flores, 2011). Asimismo, se realizó la búsqueda de una toxina de *Conus* con efecto sobre este mismo canal.

4. Hipótesis

1. El veneno de *Conus princeps* contiene componentes capaces de activar el canal TRPV1.
2. El veneno de *Anthopleura* sp. contiene componentes capaces de activar el canal TRPV1.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del veneno de *Conus princeps* y *Anthopleura* sp. en el canal TRPV1

5.2. Objetivos particulares

1. Evaluar la activación del canal TRPV1 con fracciones de veneno de *C. princeps* por medio de ensayos de electrofisiología.
2. Evaluar el bloqueo del canal TRPV1 con fracciones de veneno de *C. princeps* por medio de ensayos de electrofisiología.
3. Evaluar la activación del canal TRPV1 con fracciones de veneno de *Anthopleura* sp. por medio de ensayos de electrofisiología.
4. Evaluar el bloqueo del canal TRPV1 con fracciones de veneno de *Anthopleura* sp. por medio de ensayos de electrofisiología.

6. Materiales y métodos

6.1. *Conus princeps*

6.1.1. Colecta de organismos

En diciembre de 2010 se recolectaron 50 individuos de *C. princeps*, mediante buceo libre cerca de la zona de arrecife y de rocas, entre 1 y 5 m de profundidad en la bahía Estacahuite, ubicada a 96°28'48 O y 15°40'03 N, en el municipio de San Pedro Pochutla, Oaxaca, México. Los ejemplares se trasladaron al laboratorio de Investigación de la Universidad del Mar campus Puerto Ángel en donde se congelaron a -70°C (ultracongelador Nuairé-NU6514).

Con ayuda de pinzas se extrajo al animal de la concha y se disecó para obtener el ducto del veneno. Grupos de cinco ductos se colocaron en un tubo de 2 ml, se congelaron a -70°C, se liofilizaron y se trasladaron al laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del CICESE

6.1.2. Obtención del veneno

La extracción y separación del veneno se realizó siguiendo la metodología estandarizada en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del CICESE, previamente reportada por Martínez Galván (2010) y Oroz Parra (2011).

El procedimiento de extracción de veneno consistió en macerar cada grupo de cinco ductos de veneno con un homogenizador de vidrio (Wheaton) en 1 ml de solución C (60% de acetonitrilo, 40% de agua destilada y 0.1% de ácido trifluoroacético). La muestra se centrifugó (minicentrífuga refrigerada Heraeus *biofuge pico*) a 10,000 g por 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. El precipitado volvió a macerarse en 1 ml de solución C, a centrifugarse a las condiciones anteriormente descritas, y se recuperó el sobrenadante. Los sobrenadantes obtenidos de las 20 extracciones fueron congelados a -70°C

(ultracongelador so-low U85-22) y liofilizados (Liofilizador Labconco FeeZone) por aproximadamente 24 h.

6.1.3. Cuantificación de veneno por diferencia de peso seco

La cantidad de veneno obtenida se calculó por medio de la diferencia de peso seco. Un tubo de 15 ml estéril fue mantenido a 37°C por 1 h con la finalidad de eliminar la humedad, posteriormente fue pesado. En ese tubo se colocó el veneno para ser liofilizado; inmediatamente después de terminada la liofilización, el tubo se pesó nuevamente. La diferencia entre los dos pesos del tubo corresponde al peso del veneno.

6.1.4. Separación del veneno por HPLC-RP

El veneno fue separado de acuerdo al tiempo de retención de sus componentes por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con separación en Fase Reversa (HPLC-RP). Se utilizó un cromatógrafo Agilent 1100, con una columna analítica Vydac C18 de fase reversa (Grace-Vydac 218TPS54, 4.6 x 250 mm, 300 Å), y una precolumna Zorbax C18 (Zorbax-Agilent Technology, 4.6 x 12.5mm, 5µm) equilibradas en solución polar A (0.12% de ácido trifluoroacético y 99.88% de agua). La solución apolar utilizada (solución B) estaba compuesta por 99.9% de Acetonitrilo y 0.1% de ácido trifluoroacético.

Una muestra de 6 mg de veneno disuelta en 200 µl de solución A fue eluida a temperatura ambiente (20°C) durante 65 minutos utilizando las siguientes condiciones:

- a) 0-5 min: 100% de solución A (0% de solución B)
- b) 5-65 min: gradiente lineal de 0-60% de solución B (100-40% de solución A)

La detección de los péptidos se realizó mediante luz UV a una longitud de onda de 230 nm. Los picos de los cromatogramas fueron numerados secuencialmente de acuerdo al orden de aparición. Se denominó 'fracción' a un conjunto de picos y, cuando los picos de una fracción en particular fueron reagrupados en conjuntos más pequeños se denominaron 'subfracción'.

6.2. *Anthopleura* sp.

6.2.1. Obtención de veneno

La colecta de los ejemplares de *Anthopleura* sp. y la extracción del veneno total utilizado en este proyecto fue realizado por Jiménez Flores (2011). La extracción consistió en colocar a las anémonas en etanol al 30% por 24 horas, periodo tras el cual se recuperó, filtró, centrifugó y liofilizó el sobrenadante. Debido a que el objetivo era probar una fracción de veneno que había mostrado actividad analgésica en la tesis de Jiménez Flores (2011), la separación de veneno fue dirigida para obtener esa fracción.

6.2.2. Diálisis del veneno total

Con la metodología utilizada para extraer el veneno, se recupera una gran cantidad de sales. Para eliminarlas, el veneno total liofilizado fue dializado con una membrana MWCO de 2 KDa (Spectra/Pro 6). El proceso de diálisis consistió en disolver 2 g del veneno total en 10 ml de agua destilada y colocarla en el interior de una bolsa formada con 15 cm de membrana.

La membrana se sumergió en 4 l de agua destilada y fue mantenida a 4°C por 3 horas con agitación constante. Transcurridas las 3 horas se realizó el recambio total del agua y se continuó con las mismas condiciones. El

procedimiento se repitió para tener 3 recambios. Al final, el contenido de la membrana fue recuperado, congelado a -70°C y liofilizado

6.2.3. Separación del veneno por cromatografía de exclusión molecular

El veneno dializado fue separado por cromatografía de exclusión molecular, en una columna de resina Biogel P100, usada para exclusión de proteínas de 5 a 100 kDa, de 45 cm de alto y 1 cm de diámetro. La resina se hidrató con acetato de amonio 20 mM a pH 4.7, 24 h antes de empacar la columna. El empacado se realizó a 20°C . La columna fue equilibrada con acetato de amonio 20 mM a pH 4.7. Se determinó que la columna estaba equilibrada cuando el pH del acetato de amonio de salida fue igual al de entrada.

El procesamiento de la muestra consistió en disolver 250 mg del veneno en 2 ml de agua destilada y centrifugarla 10 min a 13,000 rpm y 4°C , el sobrenadante fue inyectado en la columna. La fase móvil utilizada fue acetato de amonio pH 4.7. La separación se realizó a 20°C . Se colectaron fracciones de 1.5 ml cada 40 min y se midió su absorbancia a 280 nm en un espectofotómetro nanoVue (GE). Los datos de absorbancia fueron graficados con el software Microsoft Excel. De acuerdo a la gráfica obtenida se concentraron las fracciones en tres grupos, que fueron congelados a -70°C y liofilizados.

Por medición del peso seco (Sección 6.1.3) se determinó la cantidad de veneno de cada grupo.

6.2.4. Separación del veneno por HPLC-RP

El veneno se separó de acuerdo al tiempo de retención de sus componentes por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con separación en Fase Reversa (HPLC-RP, por sus siglas en inglés). Se utilizó un cromatógrafo Agilent

1100, con una columna analítica Vydac C18 de fase reversa (Grace-Vydac 218TPS54, 4.6 x 250 mm, 300 Å), y una precolumna Zorbax C18 (Zorbax-Agilent Technology, 4.6 x 12.5mm, 5µm) equilibradas en solución polar A (0.12% de ácido trifluoroacético y 99.88% de agua). La solución apolar utilizada (solución B) estaba compuesta por 99.9% de Acetonitrilo y 0.1% de ácido trifluoroacético.

Una muestra de 3 mg de veneno disuelta en 200 µl de solución A fue eluida a temperatura ambiente (20°C) durante 60 minutos utilizando las siguientes condiciones:

- a) 0-5 min: 100% de solución A (0% de solución B)
- b) 5-60 min: gradiente lineal de 0-60% de solución B (100-40% de solución A)

La detección de los péptidos se realizó mediante luz UV a una longitud de onda de 280 nm. Los picos de los cromatogramas fueron numerados secuencialmente de acuerdo al orden de aparición, y se agregó una 'A' para distinguirlos de los de *Conus princeps*. Se denominó 'fracción' a un conjunto de picos.

6.2.5. Ensayo de formalina

La prueba de formalina en ratones fue desarrollada por Hunskaar *et al.* (1985). Esta prueba es una observación del comportamiento de un analgésico que tiene 2 fases de evaluación, los cuales representan 2 tipos de dolor: por estimulación directa del nervio y por inflamación (Rosland *et al.*, 1990; Yoon *et al.*, 2009). La prueba consiste en inyectar una pequeña cantidad de formalina en concentraciones menores al 5% de manera subcutánea en la pata trasera de un ratón. La cuantificación del dolor provocado por este estímulo se basa en el tiempo que el animal levanta, lame, muerde o sacude la pata. Durante los 5 min posteriores a la inyección de la formalina se presenta la fase 1 de la prueba, que representa al dolor producido por estimulación directa del nervio. Después ocurre

un periodo de 5-10 min donde los animales presentan un comportamiento poco sugerente de nocicepción. La fase 2 refleja al dolor inducido por inflamación y comienza alrededor de 10 min después de la inyección y se mantiene entre 20 y 45 min (Tjolsen *et al.*, 1992).

La prueba de formalina se utilizó para medir la actividad analgésica de 3 picos del veneno de *Anthopleura* sp.

El control negativo empleado fue PBS 1X (Solución amortiguadora de fosfatos, Tabla 5); mientras que los controles positivos fueron ketorolaco (10 mg/kg peso ratón) y tramadol (5 mg/kg ratón) disueltos en PBS 1X. Los picos de veneno fueron denominadas AP1, AP2 y AP3 y se utilizaron 0.48 mg/g de peso de ratón disueltos en 200 μ l de PBS 1X.

Tabla 5. Solución amortiguadora de fosfatos 1X

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	137
KCl	2.7
Na ₂ HPO ₄	12
KH ₂ PO ₄	1.2
pH 7.4 con NaOH 1N	

Se utilizaron ratones machos silvestres que se mantuvieron en grupos de 6 en una caja de plexiglás a 20°C, con comida estándar de laboratorio y agua *ad libitum*. Para los experimentos, los ratones fueron colocados individualmente en una caja de plexiglás con espejos en 3 de las paredes para observar la reacción del animal desde todos los ángulos.

Se emplearon 3 ratones (23 \pm 2 g) por cada fracción de veneno y por cada control. El ensayo consistió en inyectar 200 μ l ya sea de los controles o de las fracciones intraperitonealmente, transcurridos 15 min se inyectaron 20 μ l de formalina 2.5% en la pata derecha trasera del ratón. A partir de ese momento se videograbó al ratón por 45 min. Los videos fueron analizados a fin de registrar el

tiempo durante el cual el ratón se lamió la pata trasera en cada fase del ensayo. La fase 1 comprendió los minutos 0-5 y la fase 2 los minutos 10-45.

6.2.6. Análisis de datos

Para describir los datos, se realizaron gráficas de barras de cada grupo (control negativo, controles positivos y fracciones) por fases, en el programa Igor Pro 6.2 (WaveMetrics, Inc.). Posteriormente, utilizando el software Statistica 7.0 (Statsoft, Inc.) se aplicó un ANOVA para buscar diferencias entre los grupos y la prueba *a posteriori* Tukey para determinar entre qué grupos se presentaron diferencias significativas.

6.3. Ensayos de electrofisiología

Los experimentos de electrofisiología se realizaron en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en el laboratorio a cargo de la Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir.

6.3.1. Expresión del canal TRPV1

Se utilizaron células embrionarias de riñón humano HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293) transitoriamente transfectadas con 2 plásmidos (BD, bioscience): TRPV1-pCDNA3 conteniendo el DNA codificante para el canal y pIRES-GFP que contiene el DNA codificante para la proteína fluorescente GFP. La fluorescencia se utilizó para identificar a las células que expresan el canal.

Las células fueron crecidas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium, Anexo 1) suplementado con NaHCO_3 (3.7 g/L), suero fetal bovino (10%),

L-glutamina (1%) y penicilina/eritromicina (1%); a 37°C, sobre cubreobjetos de vidrio un día antes de ser transfectadas. Estas células se utilizaron para experimentos entre 1 y 3 días después de la transfección.

6.3.2. Efecto del veneno de *Conus princeps* y *Anthopleura* sp. sobre el canal TRPV1

Para probar la actividad del veneno de *C. princeps* y *Anthopleura* sp. sobre el canal TRPV1, se utilizó patch-clamp en su configuración outside out.

Los registros se realizaron con un electrodo de plata clorado (un filamento de plata se sumerge en una solución de cloruro de plata para estabilizarlo y evitar ruido o fluctuaciones rápidas de la línea base) y un amplificador EPC10 (HEKA Elektronik GMBH) y se capturaron con el software Patchmaster (Heka Elektronik).

Se emplearon pipetas de registro, jaladas (P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instrument CO) y pulidas (MF-900 Microforge, Narishige Japan) a partir de capilares de vidrio de borosilicato, con una resistencia de 6-10 MΩ. Las pipetas y la cámara de perfusión se llenaron con una solución de registro simétrica cuya composición se detalla en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición de la sustancia de registro. HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetane ácido sulfónico, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	130
HEPES	3
EDTA	1
pH 7.2 con NaOH 1N	

Las fracciones de veneno se resuspendieron en solución de registro a una concentración de 100µg/ml o 200µg/ml y ajustadas a pH 7-7.5. Además se

preparó una solución de veneno a las concentraciones y pH ya descritos, a la que se agregó capsaicina a una concentración final 4 μM . La solución de veneno se utilizó para evaluar si las toxinas presentes tenían la capacidad de activar el canal, y la solución de veneno más capsaicina para evaluar si eran toxinas bloqueadoras del canal. Como agonista al canal se utilizó capsaicina (Sigma Aldrich) 4 μM en etanol, que es una concentración saturante, lo que provoca la máxima abertura del canal.

Para la preparación de la muestra se siguieron condiciones que previnieran la descomposición de las moléculas: se trabajó sobre hielo, se utilizó solución de registro fría a pH cuidadosamente ajustado y se mantuvo constante la temperatura del cuarto de trabajo. Para preparar la fracción F1D se utilizó una mezcla de inhibidores de proteasa de Sigma Aldrich P8340 el cual contiene inhibidores de serina-, cisteína- y aspártico-proteasas, y amonipeptidasas (pepstatina A, bestatina, leupeptina y aprotinina)

Los experimentos consistieron en formar un parche o sello de membrana con la pipeta de registro y exponerlos a soluciones con: a) solución de registro, b) solución de registro+capsaicina, c) solución de registro+veneno, d) solución de registro+veneno+capsaicina. Los parches de membrana fueron expuestos al veneno por 2 minutos antes de darse un pulso, esto con el objetivo de permitir a la interacción de las toxinas con el canal. Entre cada una de las soluciones se realizó un lavado con solución de registro para eliminar residuos. El protocolo de pulsos utilizado fue de -120 mV a 120 mV con un incremento de 10 mV cada 10 ms. Cada fracción de veneno fue probada en 5 células diferentes.

6.3.3 Análisis de datos

Los resultados fueron estandarizados con respecto al registro de capsaicina de cada experimento. Se realizaron graficas de caja y bigotes con el software IgorPro 6.2 (Wavemetrics Inc.) para describir los datos. Utilizando el software Statistica

7.0, se aplicó el análisis no paramétrico de Friedman para buscar diferencias entre los tratamientos: 'inicial', 'fracción', 'fracción+capsaicina' y 'capsaicina' de cada una de las fracciones. Se utilizó el análisis de Friedman porque los datos están relacionados, ya que los 4 tratamientos se probaron en una sola célula; además a causa de la estandarización, los registros de capsaicina no presentan distribución normal. Cuando se encontraron diferencias significativas, se utilizó la prueba de Wilcoxon para medidas pareadas para determinar los grupos diferentes.

7. Resultados

7.1. *Conus princeps*

7.1.1. Obtención y separación de veneno

Los 50 caracoles colectados y disecados tuvieron un promedio de 4.5 cm de largo de concha y 2.5 cm de diámetro; los ductos del veneno midieron 15 cm de longitud promedio.

De estos ejemplares se obtuvieron 208 mg de veneno total, que fue separado por HPLC-RP y se colectaron fracciones de la siguiente manera:

- a) 25 mg de veneno en 13 fracciones de 5 min
- b) 183 mg en 63 picos individuales

Para realizar los ensayos de electrofisiología, las 13 fracciones fueron combinadas a fin de obtener solo 6 fracciones. En la Figura 8 se observa el cromatograma obtenido, así como las 6 fracciones.

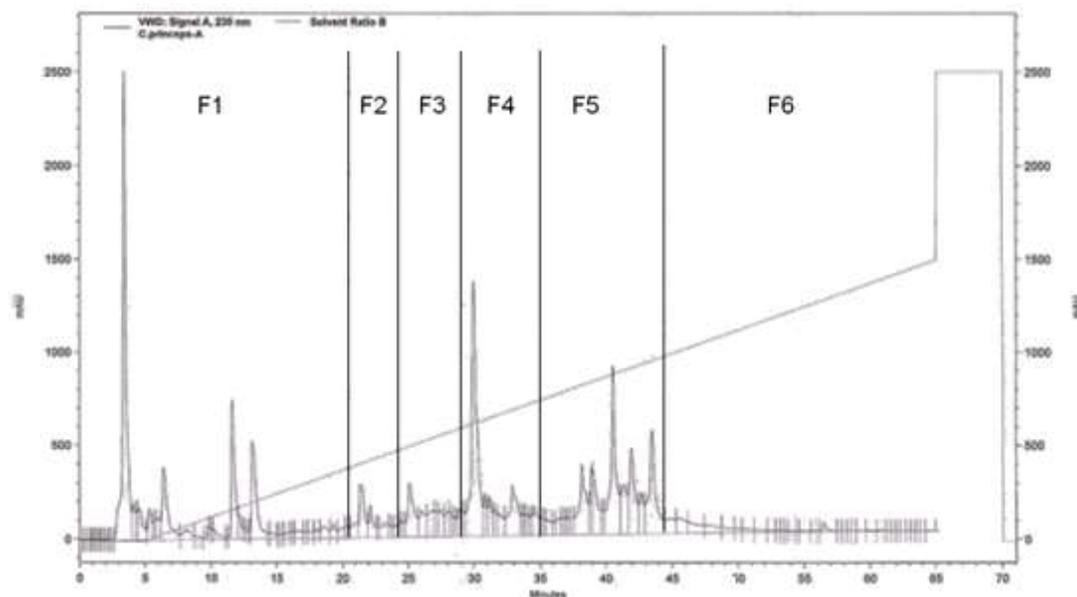


Figura 8. Cromatograma de HPLC-RP del veneno de *Conus princeps*. Se marcan las 6 fracciones que se utilizaron en los ensayos de electrofisiología.

7.1.2. Ensayos de electrofisiología

Para evaluar el efecto del veneno de *Conus princeps* como activador y como bloqueador del canal TRPV1, se probaron 6 fracciones (F1-F6) de este veneno, a una concentración 100 $\mu\text{g/ml}$, en cinco células HEK 293 que expresaban en canal, utilizando la técnica patch clamp en la configuración outside out. Se utilizaron las fracciones solas para determinar si el veneno activa al canal TRPV1 y mezcladas con capsaicina para determinar si lo bloquea. La Figura 9 corresponde a una gráfica de caja y bigotes en donde se muestran los registros de corriente obtenidos para cada una de las 6 fracciones, de acuerdo a los tratamientos: 'inicial', 'fracción', 'fracción+capsaicina' y 'capsaicina'. La capsaicina es el principal agonista (activador) del canal y se utilizó a concentración saturante 4 μM , por lo que la intensidad de corriente al aplicarla es la intensidad máxima. Los registros de corriente fueron estandarizados respecto al registro de capsaicina, con lo que el valor de capsaicina para todas las fracciones es 1. Debido a esta estandarización, los valores están graficados como intensidad de corriente sobre intensidad de corriente máxima (I/I_{max}).

En las gráficas de caja y bigotes, la línea que divide la caja es el valor de la mediana, en la parte inferior se incluye entre el 25% y 50% de los datos y en la superior entre el 50% y el 75%, mientras que los bigotes representan los valores mínimos y máximos de los datos. En la gráfica de la Figura 9 se observa que la mayoría de los datos tiene una alta dispersión, aunque es especialmente notoria en los valores iniciales.

El análisis Friedman mostró diferencias significativas entre los tratamientos de cada fracción (Tabla 7), por lo que se aplicó la prueba Wilcoxon a todas las fracciones.

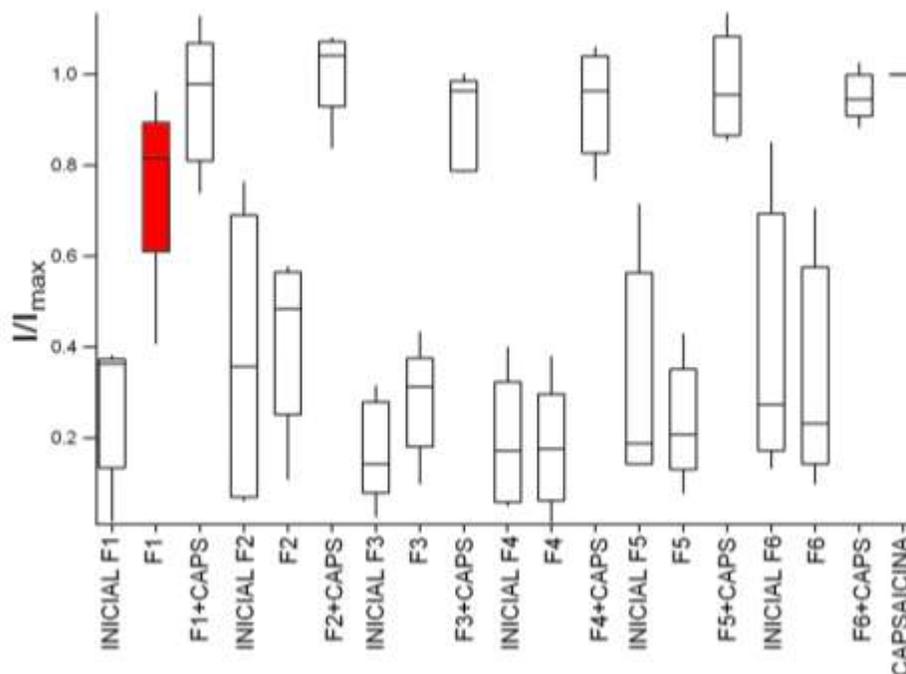


Figura 9. Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología para las 6 fracciones del veneno de *Conus princeps* (F1-F6), de acuerdo a los tratamientos: ‘inicial’, ‘fracción’, ‘fracción+capsaicina’ y ‘capsaicina’. A causa de la estandarización respecto a los registros con capsaicina, los datos están graficados como intensidad de corriente sobre intensidad de corriente máxima (I/I_{\max}). Se destaca la fracción F1 que tuvo diferencias con respecto a la condición inicial ($T=0$, $p=0.043$), lo que significa que activa el canal TRPV1. El resto de las fracciones no activa ni bloquea el canal.

Tabla 7. Prueba de Friedman para las 6 fracciones de veneno de *C. princeps* (F1-F6). Todas las fracciones presentaron diferencias significativas (valor de probabilidad $p < 0.05$)

Fracción	ANOVA χ^2	P
F1	11.88	0.0078
F2	12.6	0.0056
F3	13.08	0.0045
F4	12.12	0.0070
F5	12.12	0.0070
F6	13.08	0.0045

De acuerdo con la prueba Wilcoxon, al exponer los sellos a la mezcla fracción + capsaicina, preparada con cada una de las 6 fracciones, se registraron corrientes similares a las obtenidas solo con capsaicina, lo que significa que ninguna de las 6 fracciones bloquea el canal (Tabla 8, Figura 9).

Tabla 8. Prueba de Wilcoxon para contrastar los tratamientos 'fracción+capsaicina' y 'capsaicina' de las 6 fracciones de veneno de *C. princeps* (F1-F6). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos por fracción (valor de probabilidad $p > 0.05$)

Par de tratamientos	T	P
F1 y F1+Capsaicina	1	0.0796
F2 y F2+Capsaicina	5	0.5002
F3 y F3+Capsaicina	1	0.0796
F4 y F4+Capsaicina	4	0.3453
F5 y F5+Capsaicina	5	0.5002
F6 y F6+Capsaicina	1	0.0796

De acuerdo con la prueba Wilcoxon, al exponer los sellos a las fracciones de veneno 2 a 6, se registraron corrientes similares a las obtenidas en la condición inicial (solución de registro), lo que significa que ninguna de estas 5 fracciones activa al canal (Tabla 9, Figura 9). Sin embargo, si se encontraron diferencias entre la fracción 1 y la condición inicial, lo que implica que la F1 activa el canal.

Como se muestra en la Figura 8, la fracción 1 incluye los primeros 20 minutos de la separación de HPLC-RP, en que el porcentaje de solvente apolar (solución B) es de 0-15%, es decir, en esta fracción están contenidas moléculas hidrofílicas.

En la figura 10 se presentan los trazos de corrientes obtenidos con la F1, en donde se observa que en presencia de esta fracción el canal TRPV1 tuvo mayor corriente que en la condición inicial, y ésta fue cercana al valor en presencia de capsaicina, demostrándose así la activación. Al final del experimento con la F1 (célula 5) la corriente registrada fue menor que al inicio (I/I_{\max} inicial=0.82, I/I_{\max}

final=0.41) y cuando se probó esta fracción al siguiente día no hubo activación del TRPV1.

Tabla 9. Prueba de Wilcoxon para contrastar los tratamientos ‘inicial’ y ‘fracción’ de las 6 fracciones de veneno de *C. princeps*. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de las fracciones F2-F6 (valor de probabilidad $p > 0.05$), pero sí entre los tratamientos de la fracción F1 (en negritas).

Par de tratamientos	T	P
Inicial y F1	0	0.0431
Inicial y F2	5	0.5002
Inicial y F3	1	0.0796
Inicial y F4	4	0.3453
Inicial y F5	5	0.5002
Inicial y F6	1	0.0796

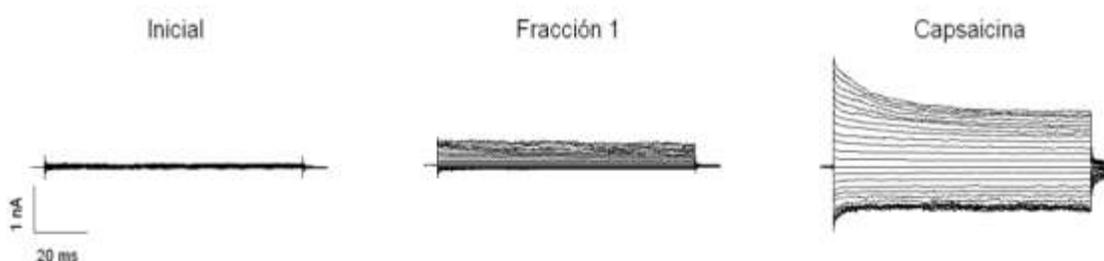


Figura 10. Trazos de corrientes obtenidas con la fracción 1 del veneno de *Conus princeps*. En presencia de ésta fracción se presentó más corriente que en la condición inicial, lo que demuestra que esta fracción es capaz de activar el canal. La capsaicina se usó en concentración 4 μ M.

Los experimentos realizados con la fracción 1 se repitieron tres veces más utilizando veneno de diferentes separaciones de HPLC-RP. En la Figura 11 se presentan los resultados distinguiéndolos con letras (F1A-F1D), la fracción F1A es la misma que la F1 de la Figura 9. De acuerdo con la prueba Friedman, en estos experimentos no se encontraron diferencias significativas (ANOVA $\chi^2=16$,

$p=0.238$), lo que demuestra que ninguna de las nuevas fracciones activó al canal TRPV1. Con el objetivo de prevenir la lisis de los péptidos presentes en la muestra, a la fracción F1D se agregó inhibidor de proteasas.

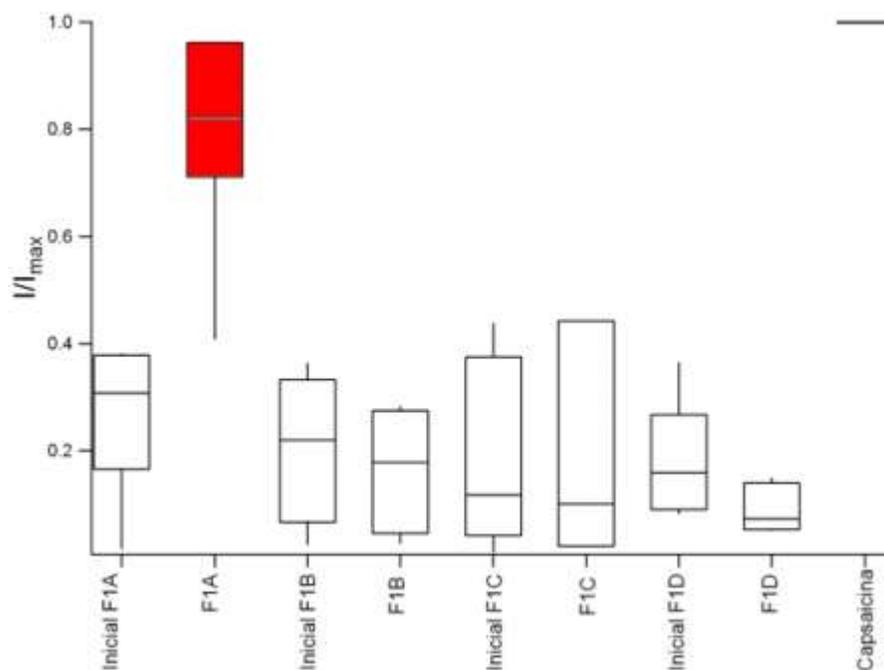


Figura 11. Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología para 4 experimentos con la fracción 1 (F1) de *Conus princeps*. A causa de la estandarización respecto a los registros con capsaicina, los datos están graficados como intensidad de corriente sobre intensidad de corriente máxima (I/I_{\max}). Se destaca la F1A que tuvo diferencias con respecto a la condición inicial ($T=0$, $p=0.043$), lo que significa que activó el canal TRPV1. Las fracciones F1B-F1D no activaron al canal (ANOVA $\chi^2=16$, $p=0.238$)

Considerando que inicialmente la fracción 1 presentó actividad sobre el canal TRPV1, se utilizó nuevo veneno de *C. princeps* para realizar su separación en 3 subfracciones (SF1-SF3); en la Figura 12 se muestra el cromatograma de las 3 subfracciones.

La subfracción F1 (SF1) se probó en las configuraciones outside out e inside out para observar si era capaz de activar al canal desde el lado extracelular

o intracelular respectivamente. Debido que no se pudieron repetir los resultados de activación con la fracción F1, se decidió duplicar la concentración de la SF1, por lo que se preparó a 200 $\mu\text{g/ml}$. En la Figura 13 se muestra la gráfica de caja y bigotes de ambas configuraciones de la SF1.

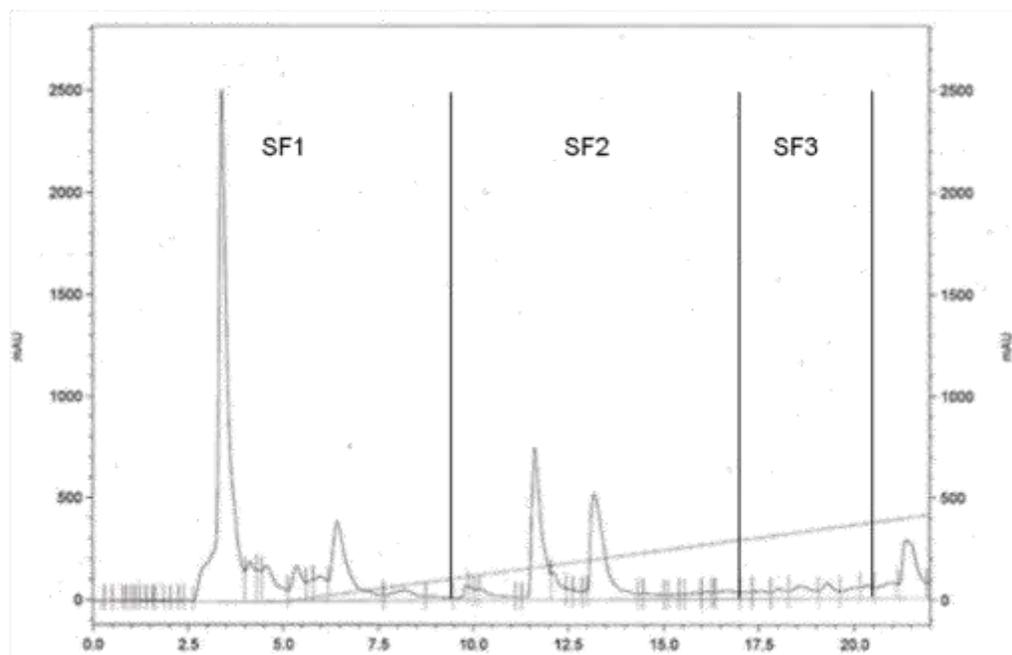


Figura 12. Cromatograma de HPLC-RP de las 3 subfracciones en que se dividió la fracción F1 de *Conus princeps*. La F1 incluye a los primeros 20 min de la separación.

El análisis Friedman mostró diferencias entre los tratamientos de los ensayos en outside out (ANOVA $\chi^2=16$, $p<0.05$) y entre los de inside out (ANOVA $\chi^2=20$, $p<0.05$). Con el análisis de Wilcoxon se encontraron diferencias entre la corriente inicial y la SF1 outside out ($T=0$, $p=0.012$), así como entre la corriente inicial y la SF1 inside out ($T=0$, $p=0.005$), lo que significa que la SF1 activó al canal desde ambos lados de la membrana, aunque hubo mayor corriente colocándola extracelularmente (mediana outside out=0.79, mediana inside out=0.71). Además, en esta configuración los valores de corriente mostraron menor dispersión que en

los ensayos en donde la SF1 interactuó con el canal desde el lado intracelular. Con la SF1 intracelular hubo un parche en que la corriente fue similar a la inicial. En la Figura 14 se presentan los trazos de corrientes obtenidos con SF1 en ambas configuraciones (inside out y outside out). En presencia de esta subfracción el canal TRPV1 tuvo mayor corriente que en la condición inicial (mediana outside out= 0.79, mediana inside out=0.71) y cercana al valor en presencia de capsaicina (1 en ambas configuraciones), demostrándose así la activación. La SF1 de este experimento se almacenó a 4°C y se probó al día siguiente y tres semanas después y siempre fue capaz de activar el canal.

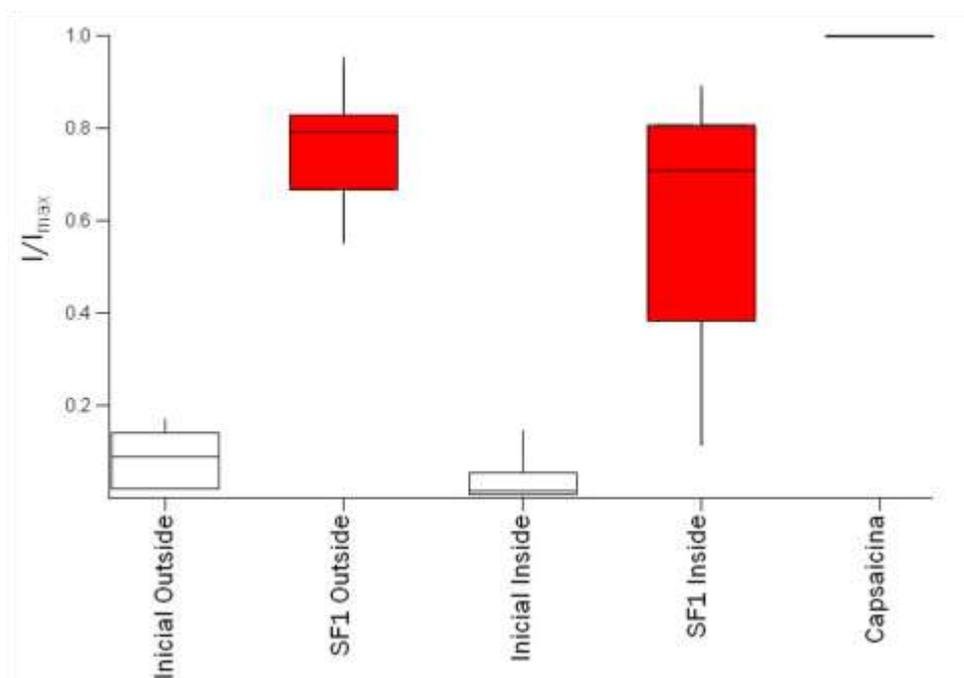


Figura 13. Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología con la SF1 de *Conus princeps* de acuerdo a los tratamientos: ‘inicial’, ‘fracción’ y ‘capsaicina’ y las configuraciones inside-out y outside-out. A causa de la estandarización respecto a los registros con capsaicina, los datos están graficados como intensidad de corriente sobre intensidad de corriente máxima (I/I_{max}). Se destaca que en ambas configuraciones la SF1 tuvieron diferencias con respecto a la condición inicial (inside out: $T=0$, $p=0.005$; outside out: $T=0$, $p=0.012$), lo que significa que activó el canal TRPV1.

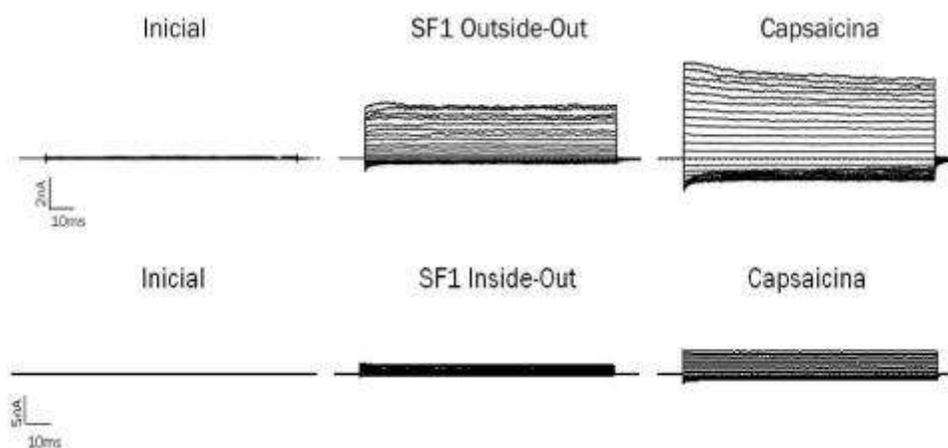


Figura 14. Trazos de corrientes obtenidas con la SF1 de *Conus princeps* en las configuraciones inside-out y outside-out, con los tratamientos: ‘inicial’, ‘fracción’ y ‘capsaicina’. En presencia de SF1 en ambas configuraciones se presentó más corriente que en la condición inicial, demostrando que esta fracción fue capaz de activar el canal intra y extracelularmente. La capsaicina se usó en concentración 4 μ M.

Los experimentos realizados con SF1 se repitieron dos veces más, utilizando veneno de separaciones diferentes de HPLC-RP. En la Figura 15 se presentan los resultados distinguiéndolos con letras (SF1A-SF1C), la SF1A es la misma que la SF1 outside out de la Figura 13. De acuerdo con la prueba Friedman, en estos experimentos no se encontraron diferencias significativas (ANOVA $\chi^2=2.4$, $p=0.494$), lo que demuestra que ninguna de las nuevas fracciones activó al canal TRPV1.

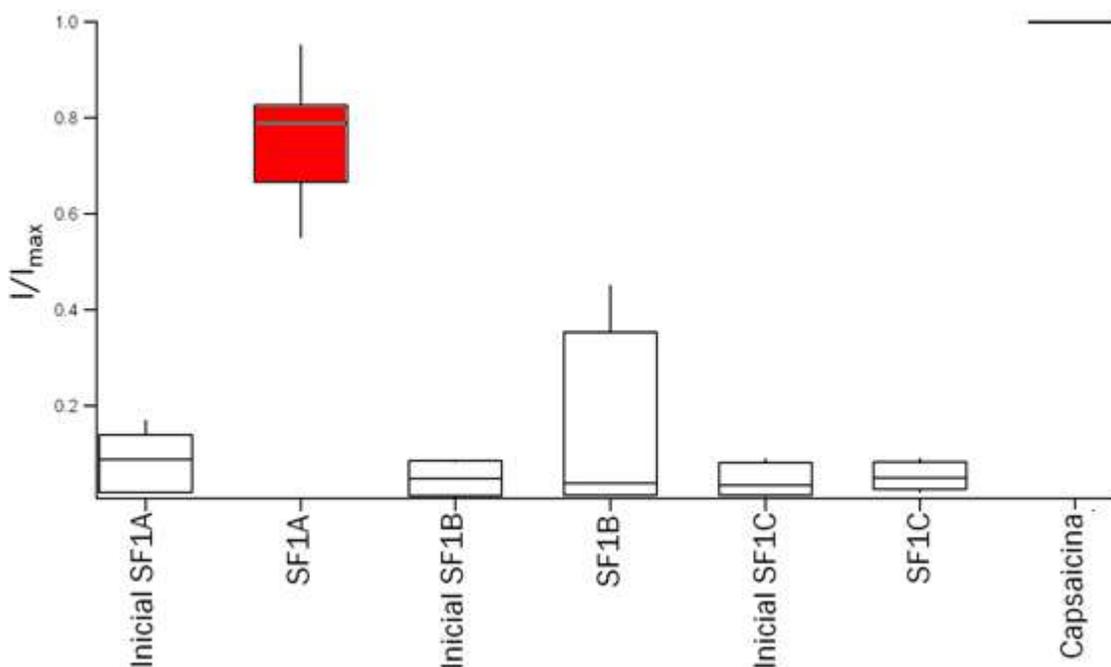


Figura 15. Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología para 3 experimentos con SF1 de *Conus princeps*. A causa de la estandarización respecto a los registros con capsaicina, los datos están graficados como intensidad de corriente sobre intensidad de corriente máxima (I/I_{\max}). Se destaca la SF1A que tuvo diferencias con respecto a la condición inicial ($T=0$, $p=0.012$), lo que significa que activó el canal. Las subfracciones SF1B y SF1C no activaron al canal (ANOVA $\chi^2=2.4$, $p=0.494$).

Debido a que inicialmente se obtuvo actividad con la SF1, se separó más veneno colectándose individualmente los 7 picos que conforman a la SF1, de acuerdo con el cromatograma de la Figura 16. En la Figura 17 se muestra la gráfica de caja y bigotes de estos ensayos, los resultados tienen una baja dispersión, excepto el P7. El análisis Friedman mostró diferencias significativas entre los registros iniciales y los siete picos de veneno (ANOVA $\chi^2=38.57$, $p<0.05$). Con el análisis de Wilcoxon no se encontraron diferencias significativas entre la corriente inicial y los picos 1-6, pero sí con el P7. Esto indica que el P7 activó al canal, no así el resto de los picos (Tabla 10). En la Figura 18 se muestran los trazos de corrientes obtenidos con el P7, el valor de la corriente con éste pico fue mayor que el inicial (mediana inicial=0.055, mediana P7=0.212), lo que implica que

el canal fue activado. El P7 contiene moléculas hidrofílicas, ya que eluye entre los minutos 8-10, en que el porcentaje de solvente apolar es del 4-5%.

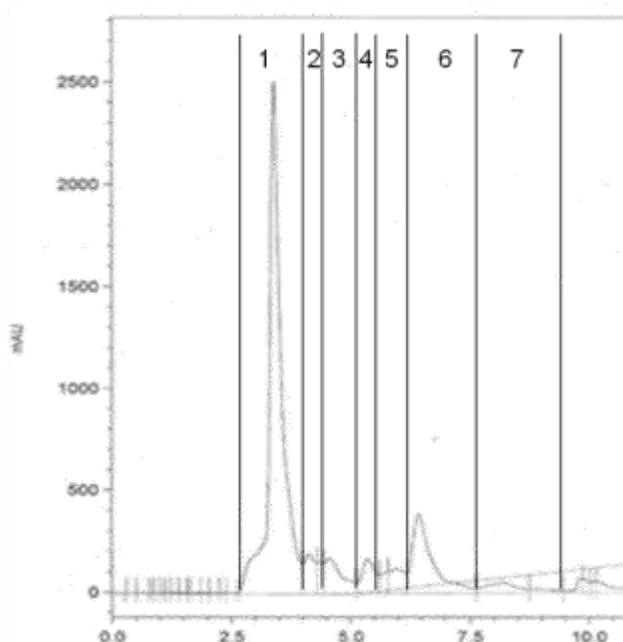


Figura 16. Cromatograma de HPLC-RP de los 7 picos en que se separó la SF1 de *Conus princeps*. La SF1 incluye a los primeros 10 min de la separación.

Para confirmar la actividad del pico 7, se repitió el experimento utilizando el P7 de una separación de HPLC-RP diferente. En la Figura 19 se presentan estos datos distinguiéndolos con letras (P7A y P7B), el P7A es el mismo que el P7 de la Figura 17. De acuerdo con la prueba Friedman, en estos experimentos no se encontraron diferencias (ANOVA $\chi^2=0.2$, $p=0.6547$), lo que significa que el nuevo pico no activó al canal.

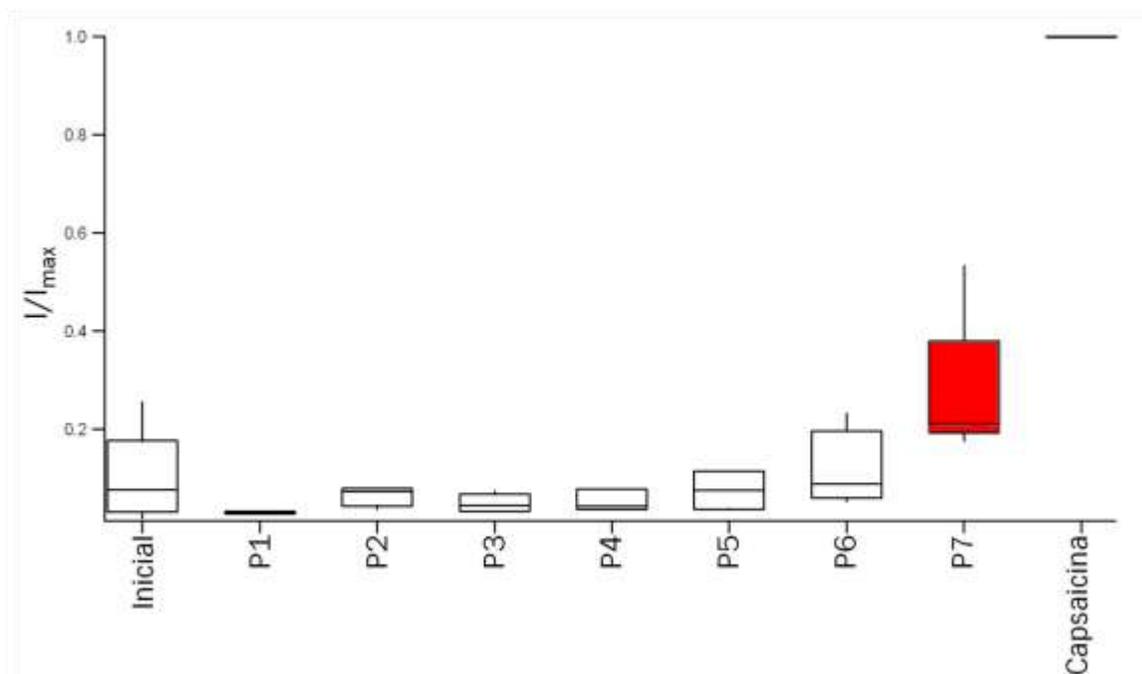


Figura 17. Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología de 7 picos (P1-P7) de *Conus princeps* de acuerdo a los tratamientos: ‘inicial’, ‘pico’ y ‘capsaicina’. A causa de la estandarización respecto a los registros con capsaicina, los datos están graficados como intensidad de corriente sobre intensidad de corriente máxima (I/I_{max}). Se destaca el P7 que tuvo diferencias significativas con respecto a la condición inicial ($T=0$, $p=0.0277$), lo que significa que activó el canal.

Tabla 10. Prueba de Wilcoxon para contrastar los tratamientos ‘inicial’ y ‘pico’ de los 7 picos del veneno de *C. princeps*. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de los picos P1-P6 (valor de probabilidad $p>0.05$), pero sí entre los tratamientos del P7 (en negritas).

Par de tratamientos	T	P
Inicial y P1	3	0.4652
Inicial y P2	1	0.1441
Inicial y P3	3	0.4652
Inicial y P4	0	0.1088
Inicial y P5	0	0.0679
Inicial y P6	0	0.0679
Inicial y P7	0	0.0277

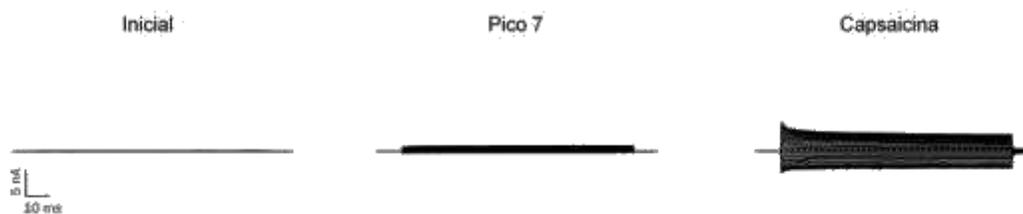


Figura 18. Trazos de corrientes obtenidas con el P7 de *Conus princeps* con los tratamientos: 'inicial', 'pico' y 'capsaicina'. En presencia del P7 se presenta más corriente que en la condición inicial, demostrando que este pico activó al canal. La capsaicina se usó en concentración 4 μ M.

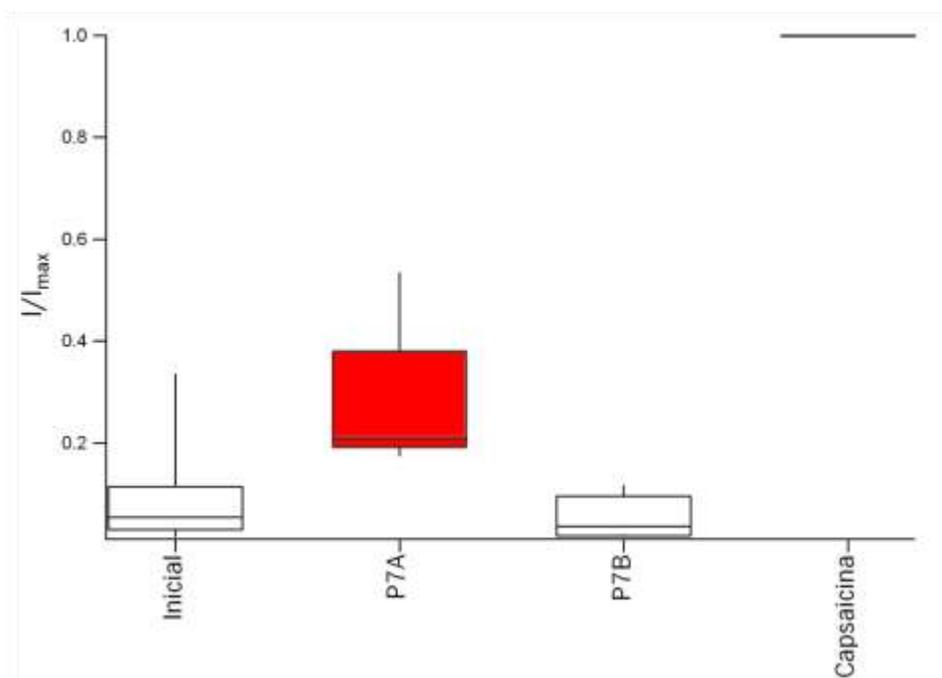


Figura 19. Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología para 2 experimentos con el P7 de *Conus princeps*. A causa de la estandarización respecto a los registros con capsaicina, los datos están graficados como intensidad de corriente sobre intensidad de corriente máxima (I/I_{max}). Se destaca el P7A que tuvo diferencias con respecto a la condición inicial ($T=0$, $p=0.0277$), lo que significa que activó el canal. El P7B no activó al canal (ANOVA $\chi^2=2.4$, $p=0.494$).

7.2. *Anthopleura* sp.

7.2.1. Separación de veneno

La separación del veneno de *Anthopleura* sp. estuvo dirigida a obtener la fracción que previamente mostró actividad analgésica (Jiménez Flores 2011). Para ello, se dializaron 5 g de veneno de anémona y se realizaron 5 cromatografías de exclusión molecular. El rendimiento total fue del 46.6% y se obtuvieron 75 mg de la fracción 3 de interés. En la Figura 20 se muestra el cromatograma obtenido y cada una de las fracciones colectadas.

Por HPLC-RP se separaron 40 mg de la fracción 3, colectándose más de 40 picos, la mayoría eluyeron en los primeros 30 min de separación, lo que indica la naturaleza hidrofílica del veneno de *Anthopleura* sp.

Para los ensayos de formalina se probaron 3 picos de la separación de HPLC-RP (AP1, AP2 y AP3), mientras que para los ensayos de electrofisiología se probó una fracción (AF1, conformada por esos 3 picos) y además el pico 1 (AP1) (Figura 21).



Figura 20. Cromatograma de exclusión molecular del veneno de *Anthopleura* sp. Se señalan las 3 fracciones colectadas

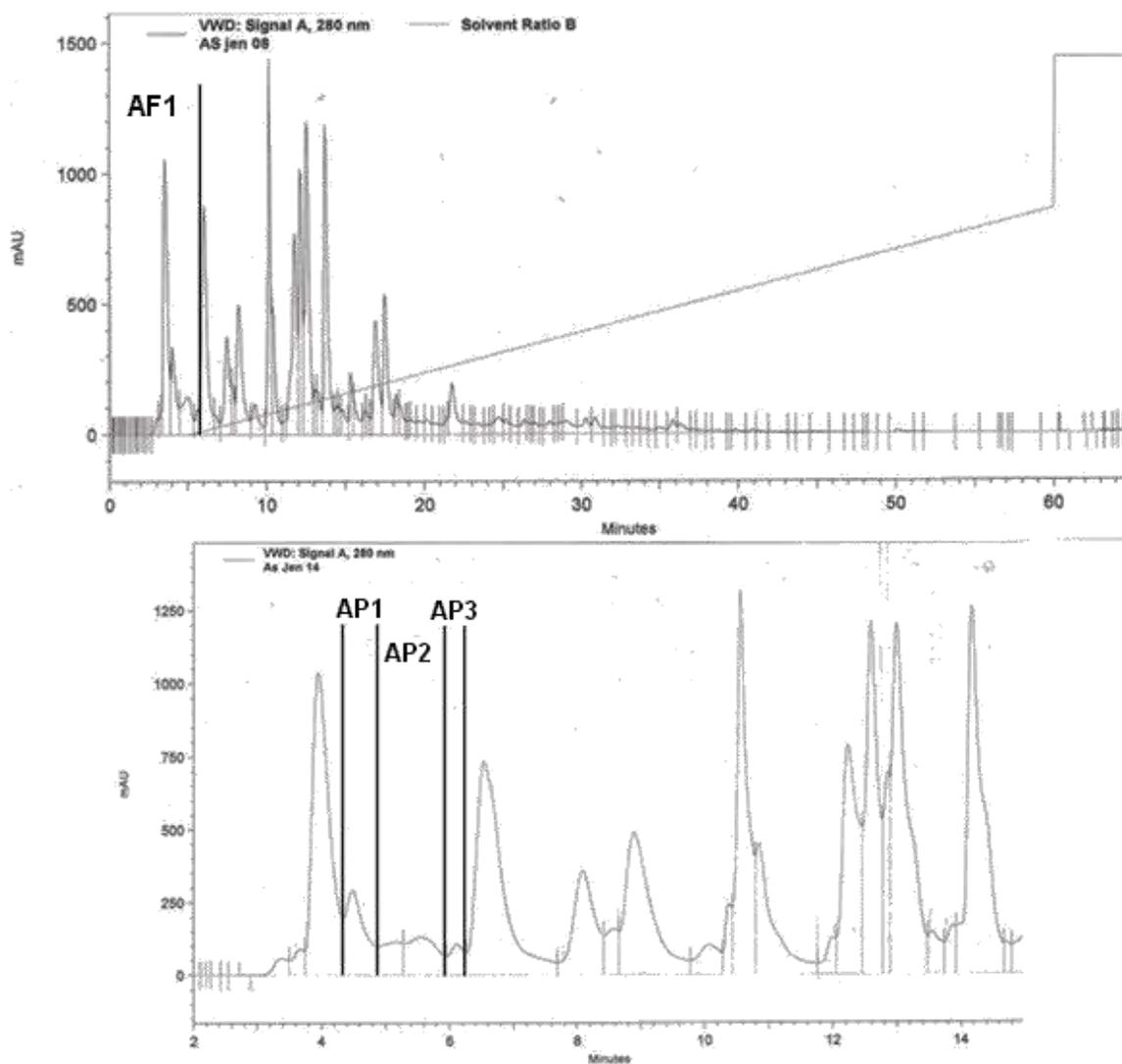


Figura 21. Cromatograma de HPLC-RP del veneno de *Anthopleura sp.* obtenido a partir de la fracción 3 de la cromatografía de exclusión molecular. Se marca la fracción (AF1) y los 3 picos utilizados en los ensayos de electrofisiología (AP1-AP3).

7.2.2. Ensayo de formalina

Se realizó el ensayo de formalina para medir la actividad analgésica de 3 picos (AP1-AP3) del veneno de *Anthopleura sp.*, que corresponden a aquellos que mostraron actividad analgésica en el trabajo de Jiménez Flores (2011).

En la Figura 22 se presenta la gráfica de barras de la fase 1 del ensayo de formalina. Los valores del control negativo PBS, los 3 picos de veneno utilizados y los controles positivos Ketorolaco y Tramadol están graficados respecto al total de segundos que los ratones lamieron su pata durante los primeros 5 minutos después de la inyección de formalina. El valor más alto lo presentó el AP1 y los valores más bajos, los controles positivos (Tabla 11).

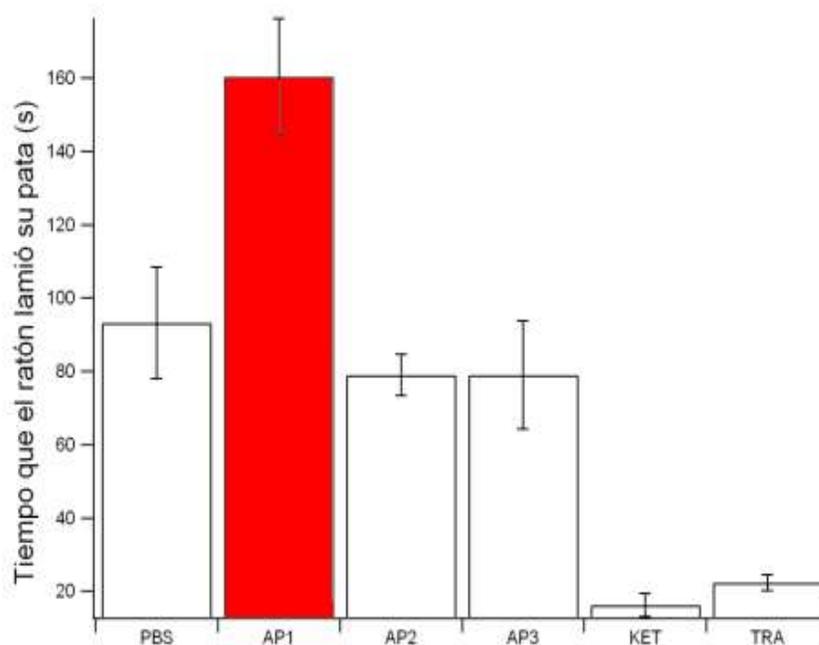


Figura 22. Gráfica de barras del ensayo de formalina fase 1 realizado con 3 picos del veneno de *Anthopleura* sp, el control negativo PBS y los controles positivos KET y TRA. Al inyectarse el AP1 los ratones lamieron su pata por más tiempo (160.33 ± 15.95 s) respecto a los controles y los otros picos, lo que significa que este pico causa dolor por estimulación directa. PBS: Solución amortiguadora de fosfatos, KET: Ketorolaco, TRA: Tramadol.

De acuerdo a la prueba ANOVA, se encontraron diferencias significativas ($F=66.52$; $p=0.00$), por lo que se realizó la prueba Tukey (Tabla 11). El AP1 mostró diferencias significativas con respecto a los otros picos y a todos los controles. Los AP2 y AP3 no fueron significativamente diferentes entre ellos, ni con respecto al control negativo, pero sí en relación al AP1 y a los controles positivos. Al inyectarse el AP1 los ratones lamieron su pata por más tiempo (160.33 ± 15.95 s)

que al inyectar el resto de los tratamientos (Tabla 11), lo que significa que este pico causa una mayor sensación de dolor por estimulación directa.

Tabla 11. Valores de media y desviación estándar y prueba Tukey para el ensayo de formalina fase 1 realizado con 3 picos de veneno de *Anthopleura* sp., el control negativo PBS y los controles positivos KET y TRA. En negritas están destacados los valores de segundos que el ratón lamió su pata con diferencias significativas. PBS: Solución amortiguadora de fosfatos, KET: Ketorolaco, TRA: Tramadol. SD: desviación estándar

	PBS	AP1	AP2	AP3	KET	TRA	media±SD
PBS		0.0002	0.6309	0.6309	0.0002	0.0002	93.33±15.28
AP1	0.0002		0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	160.33±15.95
AP2	0.6309	0.0002		1.0000	0.0003	0.0006	79±5.57
AP3	0.6309	0.0002	1.0000		0.0003	0.0006	79±14.73
KET	0.0002	0.0002	0.0003	0.0003		0.9836	16.33±3.22
TRA	0.0002	0.0002	0.0006	0.0006	0.9836		22.3±2.08

En la Figura 23 se muestra la gráfica de barras de la fase 2 del ensayo de formalina. Los valores del control negativo PBS, los 3 picos de veneno utilizados y los controles positivos Ketorolaco y Tramadol están graficados respecto al total de segundos que los ratones lamieron su pata durante los minutos 10-45 después de la inyección de formalina. El valor más alto lo presentó el pico AP3 y los valores más bajos, los controles positivos (Tabla 12).

De acuerdo con el análisis ANOVA, se encontraron diferencias significativas ($F=174.59$; $p=0.00$), por lo que se realizó la prueba Tukey (Tabla 12). Los picos AP1 y AP2 no fueron significativamente diferentes entre sí, ni con respecto al control negativo. El AP3 mostró valores más altos que todos los controles y que los AP1 y AP2 (Tabla 12). De acuerdo con estos resultados, al inyectarse el AP3 el ratón se lamió por más tiempo (283.33 ± 24.11 s), lo que significa que tiene una mayor sensación de dolor producido por inflamación.

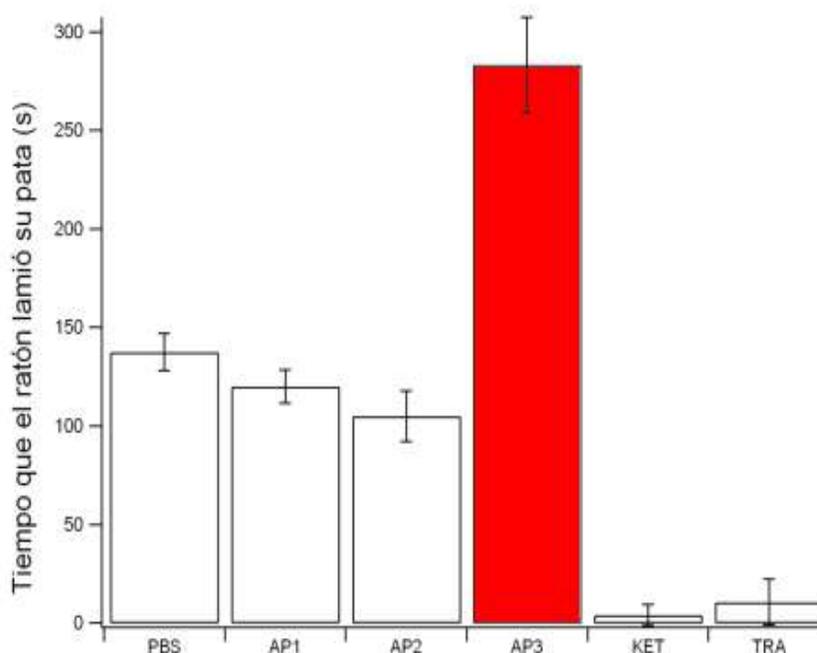


Figura 23. Gráfica de barras de formalina fase 2 realizado con 3 picos del veneno de *Anthopleura* sp, el control negativo PBS y los controles positivos KET y TRA. Al inyectarse el pico AP3 los ratones lamen su pata por más tiempo (283.33 ± 24.11) respecto a los controles y los otros picos, lo que significa que causa dolor por inflamación. PBS: Solución amortiguadora de fosfatos, KET: Ketorolaco, TRA: Tramadol.

Tabla 12. Valores de media y desviación estándar y prueba Tukey para el ensayo de formalina fase 2 realizado con 3 picos de veneno de *Anthopleura* sp., el control negativo PBS y los controles positivos KET y TRA. En negritas están destacados los valores de segundos en que el ratón lamio su pata con diferencias significativas. PBS: Solución amortiguadora de fosfatos, KET: Ketorolaco, TRA: Tramadol, SD: desviación estándar.

	PBS	AP1	AP2	AP3	KET	TRA	media±SD
PBS		0.6032	0.0919	0.0002	0.0002	0.0002	137.66±9.45
AP1	0.6032		0.7411	0.0002	0.0002	0.0002	120±8.54
AP2	0.0919	0.7411		0.0002	0.0002	0.0002	105±13
AP3	0.0002	0.0002	0.0002		0.0002	0.0002	283.33±24.11
KET	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002		0.9882	4±5.2
TRA	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0,9882		10.66±11.55

7.2.3. Ensayos de electrofisiología

Para evaluar el efecto del veneno de *Anthopleura* sp. como activador y como bloqueador del canal TRPV1, se probaron la fracción 1 (AF1) y el pico 1 (AP1) de este veneno, a una concentración 100 $\mu\text{g/ml}$, en cinco células que expresaban en canal, utilizando la técnica patch clamp en la configuración outside out. La fracción AF1 correspondió a la que mostró actividad analgésica en el trabajo de Jiménez Flores (2011), mientras que el pico AP1, que forma parte de esta fracción, se probó por separado puesto que presentó actividad en el ensayo de formalina y causó mayor sensación de dolor por estimulación directa. Se utilizaron la AF1 y el AP1 solos para determinar si el veneno activa al canal, y mezclados con capsaicina, para determinar si lo bloquean.

En la Figura 24 se muestra una gráfica de caja y bigotes con los resultados obtenidos al exponer los parches a la AF1, de acuerdo a los tratamientos: 'inicial', 'fracción', 'fracción+capsaicina' y 'capsaicina'. La capsaicina es el principal agonista (activador) del canal y se preparó a concentración saturante 4 μM , por lo que la intensidad de corriente al aplicarla es la intensidad máxima. Los registros de corriente fueron estandarizados respecto al registro de capsaicina, con lo que el valor de capsaicina es 1. Debido a esta estandarización, los valores están graficados como intensidad de corriente sobre intensidad de corriente máxima (I/I_{max}). Los datos presentaron una baja dispersión. La prueba Wilcoxon no mostró diferencias entre los tratamientos 'inicial' y 'F1' ($T=3$, $p=0.225$), lo que significa que la AF1 no activó al canal; ni entre 'AF1+capsaicina' y 'capsaicina' ($T=7$, $p=0.893$), lo que implica que tampoco bloqueó al canal.

El AP1 se probó en tres ocasiones, los resultados se muestran en la Figura 25. EL AP1B fue el mismo que el AP1A pero probado al día siguiente, el AP1C se preparó con veneno de una separación de HPLC-RP diferente. De acuerdo con el análisis Friedman se encontraron diferencias entre los tratamientos (ANOVA $\chi^2=18.64$, $p=0.00481$). El análisis Wilcoxon mostró que las diferencias se presentaron entre la condición inicial y el AP1A ($T=0.0$, $p=0.022$), lo que significa

que éste pico activó al canal. También entre la condición inicial y el AP1B se encontraron diferencias ($T=0.0$, $p=0.0179$), lo que significa que activó al canal, pero en la Figura 25 se observa que esta activación es menor que con el AP1A (3 de las 5 células activaron). El P1C no presentó diferencias respecto a su condición inicial ($T=5$, $p=1$), por lo que no activó al canal.

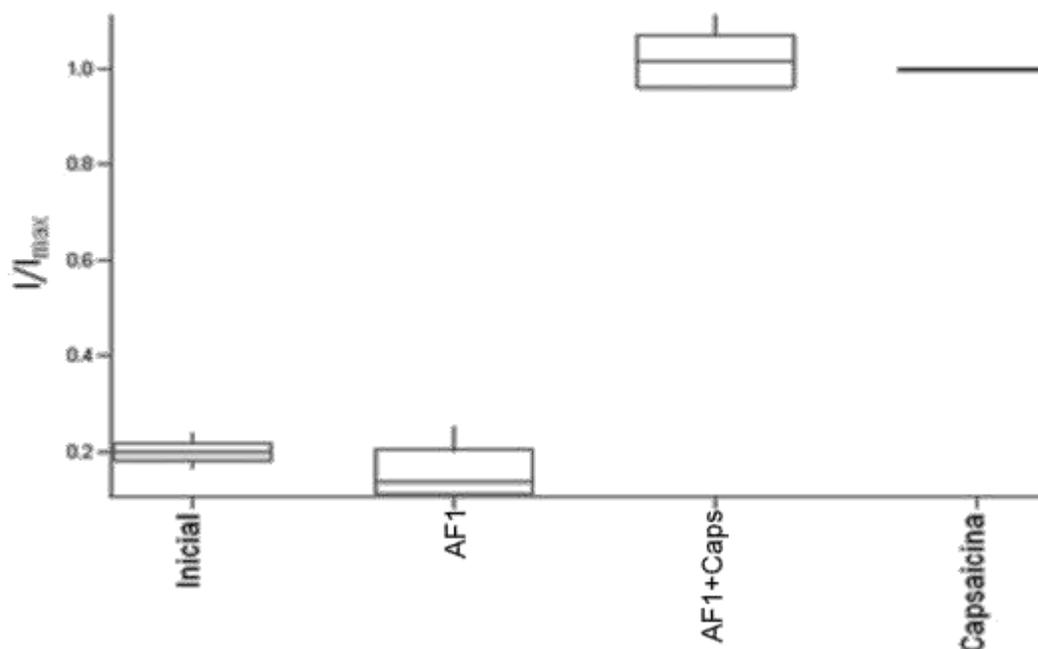


Figura 24. Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología con la AF1 del veneno de *Anthopleura* sp, de acuerdo a los tratamientos: ‘inicial’, ‘fracción’, ‘fracción+capsaicina’ y ‘capsaicina’. A causa de la estandarización respecto a los registros con capsaicina, los datos están graficados como intensidad de corriente sobre intensidad de corriente máxima (I/I_{max}). La AF1 no activó ni bloqueó al canal.

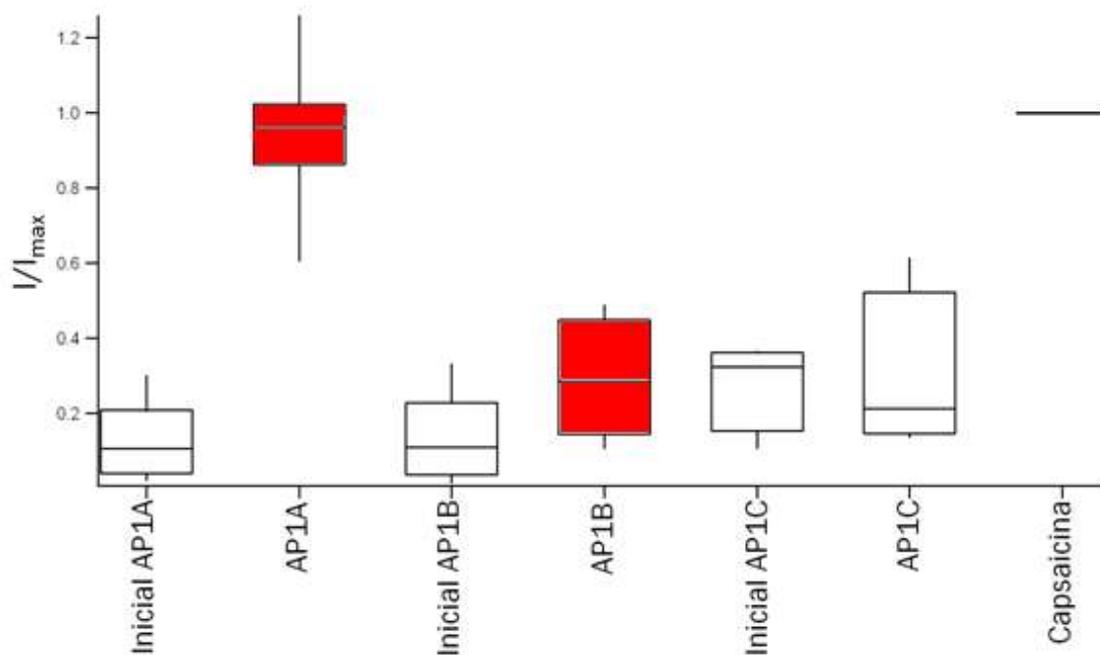


Figura 25. Gráfica de caja y bigotes de los ensayos de electrofisiología para 3 experimentos con el AP1 de *Anthopleura* sp. A causa de la estandarización respecto a los registros con capsaicina, los datos están graficados como intensidad de corriente sobre intensidad de corriente máxima (I/I_{\max}). Se destacan el AP1A ($T=0$, $p=0.022$) y el P1B ($T=0.0$, $p=0.0179$) que tuvieron diferencias con respecto a la condición inicial, lo que significa que activaron el canal.

En la Figura 26 se presentan los trazos de corrientes obtenidos con AP1A en donde se observa que, en presencia de esta fracción el canal TRPV1 tuvo mayor corriente que en la condición inicial y cercana a capsaicina, demostrándose así la activación.

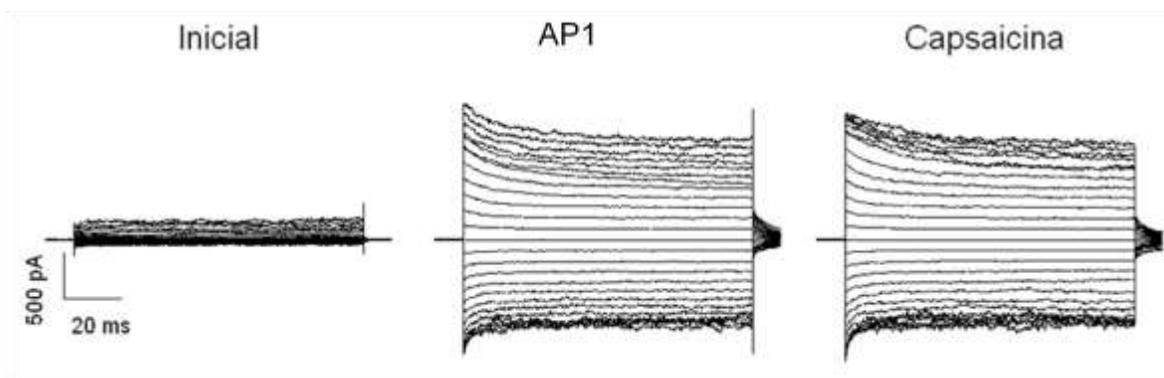


Figura 26. Trazos de corrientes obtenidas con AP1A del veneno de *Anthopleura* sp con los tratamientos: 'inicial', 'pico' y 'capsaicina'. En presencia del AP1 se presentó más corriente que en la condición inicial, demostrando que fue capaz de activar el canal. La capsaicina se encuentra en concentración 4 μ M.

8. Discusión

8.1. *Conus princeps*

El veneno de *C. princeps* separado por HPLC-RP y agrupado en seis fracciones (F1-F6), se probó sobre el canal TRPV1. Cinco de estas fracciones (F2-F6) no mostraron interacción con el canal, pero la fracción más hidrofílica (F1), constituida por los picos eluidos con menos del 15% de solvente apolar (SoluciónB), lo activó. En ensayos posteriores, estos picos fueron reagrupados para dar lugar a fracciones con menor número de ellos. De esta manera, se llegó a la obtención del pico denominado P7, que activó al canal TRPV1, con lo que se aceptó la hipótesis de la tesis. Se desconoce la naturaleza de la molécula responsable del efecto encontrado; sin embargo, el P7 fue eluido cuando el porcentaje del solvente apolar (solución B) era menor al 5%; por lo que el P7 es una molécula hidrofílica.

Los ensayos realizados con las fracciones F1-F6, especialmente en la condición inicial, mostraron una alta dispersión de datos de corriente, esto puede deberse a la cantidad de canales incluidos en el sello formado entre la pipeta de registro y la membrana celular. De acuerdo con Kornreich (2007), los sellos en las configuraciones utilizadas en esta tesis (inside out y outside out) incluyen un gran número de canales, número que puede variar dependiendo de la cantidad expresada en la célula. Para eliminar esta variable puede usarse la configuración single channel, que estudia la actividad eléctrica de un solo canal, pero por lo general, esta configuración se utiliza en análisis posteriores para probar una molécula conocida, no para estudios iniciales (Cahalan y Neher, 1997; Kornreich, 2007) como los de esta tesis.

Los ensayos con las fracciones capaces de activar al canal (F1, SF1 y P7) se repitieron con veneno colectado en diferentes separaciones de HPLC-RP, y no mostraron la misma actividad. Además, los ensayos realizados con F1 y P7 que mostraron actividad se repitieron utilizando las mismas soluciones, almacenadas a 4°C, y de nuevo el resultado fue negativo. Incluso, en la quinta célula probada en el experimento inicial con la F1, la corriente registrada fue menor (la mitad) que en

la célula uno y cuando se probó esta fracción al siguiente día no hubo activación del canal. Ya que la interacción entre un canal iónico y una molécula está influenciado por características de dicha molécula, como estructura, hidrofobicidad y tamaño (Lodish *et al.*, 2008). Es posible que los resultados inconstantes se deban a cambios en la estructura tridimensional de la molécula responsable de la activación, que pudo desnaturalizarse durante el manejo. Al no conocer la molécula responsable del efecto es difícil explicar que factor afectó su desnaturalización.

Las toxinas peptídicas que han demostrado actividad sobre el canal TRPV1, como las vanilotoxinas (VaTx) aisladas de arañas, se unen a sitios extracelulares del canal o se acomodan en la cara externa de la membrana plasmática para estar en contacto con los residuos transmembranales, sin atravesar la bicapa (Siemens *et al.*, 2006; Boholen *et al.*, 2010). Considerando la naturaleza peptídica de los componentes mayoritarios del veneno de los cónidos (Lewis, 2009), las fracciones del veneno de *C. princeps* se probaron en los ensayos de electrofisiología en la configuración outside-out, en la que la interacción de las moléculas ocurre con los residuos extracelulares del canal. La F1, SF1 y el P7 activaron en esta configuración. Además, la SF1 se probó en configuración inside out, en donde la interacción ocurre con los residuos citoplasmáticos del canal, para asegurar que no hubiera falsos positivos en la configuración outside out (si la corriente era igual en ambas configuraciones, lo más probable es que hubiera capsaicina mezclada con el veneno y la activación fuera debida a ella y no al veneno). La SF1 activó en inside out, aunque con menor corriente. Para que, de manera natural, una molécula active al canal desde el lado intracelular, ésta debe ser capaz de atravesar la bicapa lipídica. Andeev *et al.* (2008) y Kozlov *et al.* (2009), aislaron tres péptidos del veneno de la anémona *Heteratis crispera* capaces de inhibir al canal TRPV1, y los denominaron APHC1-APHC3. Posteriormente, Zelepuga *et al.* (2012) elaboraron modelos computacionales para predecir la interacción de esos péptidos con el canal TRPV1, encontrando que el péptido APHC1 interactúa de manera intracelular con el TRPV1. Otras moléculas atraviesan la membrana

celular y activan al canal TRPV1, por ejemplo la capsaicina, que es una vaniloide de naturaleza hidrófoba, interactúa intracelularmente con los segmentos S2-S4 del canal (Arg114, Tyr511, Ser512 Thr550 y Glu761) (Jara-Oseguera *et al.*, 2010). Hay que considerar que muchas otras moléculas proteicas (toxina botulínica A, RNAsa, etc.) y no proteicas de diversa naturaleza química, peso molecular, blanco molecular y mecanismo de acción, son internalizadas al citoplasma por mecanismos de endocitosis (Zelepuga *et al.*, 2012). Para determinar como ocurre la interacción entre el canal y el P7, se requiere de la caracterización bioquímica del P7 y de análisis posteriores de estructura-función.

En contraste con los resultados de la presente tesis en que se identificó una fracción del veneno de *C. princeps* con capacidad para activar el canal TRPV1, Drew *et al.* (2007) probaron un análogo de la conotoxina ρ -TIA del caracol piscívoro *C. tulipa* denominado NMB-1 (noxious mechanosensation blocker-1) y encontraron que el péptido no tiene efecto significativo sobre el canal TRPV1.

Esta tesis es uno de los primeros reportes de análisis del veneno del caracol marino *Conus princeps*, y de los primeros en que se estudia el efecto del veneno de estos organismos sobre los canales TRP.

8.2. *Anthopleura* sp.

El veneno total de *Anthopleura* sp. se dializó, separó a través de cromatografía de exclusión molecular (CEM) y a través de HPLC-RP. Con la separación por HPLC-RP se obtuvieron más de 40 picos, la mayoría de estos eluyeron en los primeros 30 min de separación, lo que indica la naturaleza hidrofílica del veneno de *Anthopleura* sp. Se siguió una metodología de HPLC-RP estandarizada en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de CICESE, sin embargo, considerando que la mayoría de los analitos eluyeron en los primeros 30 minutos de separación, podrían modificarse las condiciones de gradiente de la solución B para tener una mejor resolución (Kazakevich y LoBrutto, 2007).

Se llevó a cabo el ensayo de formalina para observar el efecto de tres picos de veneno separados por HPLC-RP que fueron denominadas AP1, AP2 y AP3. Una variante sobre el ensayo de formalina se realizó en trabajos en los que se analiza la interacción de péptidos obtenidos de venenos con el canal TRPV1. La modificación consiste en inyectar capsaicina en lugar de formalina como inductor del dolor, de tal manera que el dolor provocado está asociado al canal TRPV1 (Cuypers *et al.* 2006; Andreev *et al.*, 2008). En los trabajos que prosigan al presente podría utilizarse esa modificación para tener una mejor aproximación a las fracciones de veneno con actividad sobre el canal TRPV1, pues, de acuerdo con Andreev *et al.* (2008) el lamer la pata se deberá a activación directa de los TRPV1 locales.

Posterior al ensayo de formalina, la fracción de veneno denominada AF1 fue probada sobre el canal TRPV1 utilizando la técnica patch clamp. Debido a que el AP1 provocó sensación de dolor por estimulación directa en el ensayo de formalina, también se probó este pico individualmente sobre el canal. La AF1 no tuvo efecto sobre el canal, pero sí el AP1, que causó la activación con valores similares a la capsaicina en concentración saturante. Se desconoce la naturaleza del AP1, sin embargo se realizó una separación de veneno dirigida a la obtención de moléculas de menos de 5 kDa. Por otro lado, en HPLC-RP el AP1 fue eluido entre los minutos 4 y 5, cuando aún no comienza el flujo del solvente apolar (solución B); por lo que el P1 es una molécula pequeña (de menos de 5 kDa) e hidrofílica.

Los ensayos con el AP1 se repitieron un día después utilizando el mismo veneno y con veneno colectado en una separación de HPLC-RP diferente. Al día siguiente la activación del canal fue menor y con veneno diferente no se presentó efecto. Ya que la interacción entre un canal iónico y una molécula está influenciado por características de dicha molécula, como estructura, hidrofobicidad y tamaño (Lodish *et al.*, 2008), es posible que estos resultados se deban a cambios en la estructura tridimensional de la molécula responsable de la activación, que pudo desnaturalizarse durante el manejo. Al no conocer la

molécula responsable del efecto es difícil explicar que factor afectó su desnaturalización.

Las toxinas peptídicas que han demostrado actividad sobre el canal TRPV1, como las vanilotoxinas (VaTx) aisladas de arañas, se unen a sitios extracelulares del canal o se acomodan en la cara externa de la membrana plasmática para estar en contacto con los residuos transmembranales, sin atravesar la bicapa (Siemens *et al.*, 2006; Boholen *et al.*, 2010). Considerando la naturaleza peptídica de los componentes mayoritarios del veneno de las anémonas marinas (Norton, 2009; Shiomi, 2009), las fracciones del veneno de *Anthopleura* sp. se probaron en los ensayos de electrofisiología en la configuración outside-out, en la que la interacción de las moléculas ocurre con los residuos extracelulares del canal. El AP1 activó al canal TRPV1 en esta configuración. Para determinar como ocurre la interacción entre el canal y el AP1 y su potencial como molécula activa en el tratamiento de diferentes padecimientos, se requiere de la caracterización bioquímica del AP1 y de análisis posteriores de estructura-función.

9. Conclusiones

- Se evaluó el efecto del veneno de *Conus princeps* sobre el canal TRPV.
- Se identificó una fracción del veneno de *C. princeps* con la capacidad de activar el canal TRPV1. La fracción, con características hidrofílicas, se denominó P7.
- Se evaluó el efecto del veneno de *Anthopleura* sp. sobre el canal TRPV1.
- Se identificó una fracción del veneno de *Anthopleura* sp. con la capacidad de activar el canal TRPV1. La fracción, con características hidrofílicas, se denominó AP1.

10. Perspectivas

- Obtener la estructura del P7 de *C. princeps* y realizar ensayos de estructura-función para determinar la naturaleza de la interacción entre el P7 y el canal TRPV1.
- Obtener la estructura del AP1 de *Anthopleura* sp. y realizar ensayos de estructura-función para determinar la naturaleza de la interacción entre el AP1 y el canal TRPV1.

Referencias bibliográficas

- Aguado-Llera, D., Bacarizo, J., Gregorio-Teruel, L., Taberner, F.J., Cámara-Artiga, A. y Neira, J.L. (2012). Biophysical characterization of the isolated C-terminal region of the transient receptor potential vanilloid 1. *FEBS Letters* 586(8):1154–1159.
- Allen, J. W., Herbertsson, K., McCumber, D., Wagstaff, J.D., Layer, R.T., McCabe, R.T. y Yaksh T.L. (2007). An assessment of the antinociceptive efficacy of intrathecal and epidural contulakin-G in rats and dogs. *Anesthesia y Analgesia* 104(6):1505-1513.
- Andreev, Y.A., Mosharova, I.V., Kozlov, S.A., Korolkova, Y.V. y Grishin, E.V. (2012). Sea anemone peptides modulate TRPV1 activity and produce analgesia without hyperthermic effect. *Toxicon* 60(2):109.
- Andreev, YA, Kozlov, S.A., Koshelev, S.G., Ivanova, E.A., Monastyrnaya, M.M. y Kozlovskaya, E.P. (2008). Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *The Journal of Biological Chemistry* 283(35):23914-23921.
- Balaji, A.R., Ohtake, A., Sato, K., Gopalakrishnakone, P., Kini, M. R., Tong, S. K., y Bay, B.H. (2000). Conotoxins, a new family of Conotoxins with unique disulfide pattern and protein folding. *The Journal of Biological Chemistry* 275(50):39516-39522.
- Bandyopadhyay, P.K., Stevenson, B.J., Ownby, J.-P., Cady, M.T., Watkins M. y Olivera, B.M. (2008). The mitochondrial genome of *Conus textile*, *coxI*–*coxII* intergenic sequences and Conoidean evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46(1):215–223.
- Becker, S. y Terlau, H. (2008). Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *Applied Microbiology Biotechnology* 79(1):1–9.
- Bohlen, C.J., Priel, A., Zhou, S., King, D., Siemens, J. y Julius, D. (2010). A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer Pore domain. *Cell* 141(5):834–845
- Brusca, R. y Brusca, G. (2003). *Invertebrates*. 2^a ed. Sinauer.
- Bulaj, G., Zhang, M.M., Green, B.R., Fiedler, B., Layer, R.T., Wei, S., Nielsen, J.S., Low, S.J., Klein, B.D., Wagstaff, J.D., Chicoine, L., Harty, T.P., Terlau, H., Yoshikami, D. y Olivera, B.M. (2006). Synthetic muO-conotoxin MrVIB blocks TTX-resistant sodium channel Na_v1.8 and has a long-lasting analgesic activity. *Biochemistry* 45(23):7404–7414.

- Cahalan, M. y Neher, E. (1997). Patch clamp techniques: An overview. En: Rudy, B. y Iverson, L.E. (eds.). *Methods in enzymology, Ion Channels*. USA, Academic Press Inc.
- Calixto, J.B., Kassuya, C.A.L., André, E. y Ferreira, J. (2005). Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacology y Therapeutics* 106(2):179–208.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J. y Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389(6653):816–824.
- Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426(6966):517–524.
- Cromer, B.A. y McIntyre, P. (2008). Painful toxins acting at TRPV1. *Toxicon* 51(2):163-173.
- Cuypers, E., Yanagihara, A., Karlsson, E. y Tytgat, J. (2006). Jellyfish and other cnidarians envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels. *FEBS Letters* 580(24):5728-5732.
- Cuypers, E., Yanagihara, A., Rainier, J.D. y Tytgat, J. (2007). TRPV1 as a key determinant in ciguatera and neurotoxic shellfish poisoning. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361(1):214–217.
- Díaz, J.M., García, A.M y Cantera, J.R. (2005). Checklist of the cone shells (Mollusca: Gastropoda: Neogastropoda: Conidae) of Colombia. *Biota Colombiana* 6(1):73-86.
- Drew, L.J., Rugiero, F., Cesare, P., Gale, J.E., Abrahamsen, B., Bowden, S., Heinzmann, S., Robinson, M., Brust, A., Colless, B., Lewis, R.J. y Wood, J.N. (2007). High-Threshold mechanosensitive ion channels blocked by a novel conopeptide mediate pressure-evoked pain. *PLoS ONE* 2(6):515.
- Duda Jr., T.F. y Kohn, A.J. (2005). Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Conus*. *Molecular Phylogenetic. and Evolution* 34(2):257–272.
- Duda Jr., T.F., Kohn, A.J. y Palumbi, S.R. (2001). Origins of diverse feeding ecologies within *Conus*, a genus of venomous marine gastropods. *Biological Journal of the Linnean Society* 73(4):391–409.

- Fautin, D. G. (2011). Hexacorallians of the World. <http://geoportal.kgs.ku.edu/hexacoral/anemone2/index.cfm>. Consultado el 20 de noviembre de 2011.
- Gaudet, R. (2007). Structural insights into the function of TRP channels. En: Liedtke, W.B. y Heller, S. (edits.). *TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades*. CRS Press.
- Gohar, O. (2005). The Transient Receptor Potential (TRP) ion channels: A remarkable multifunctional Superfamily. *Modulator* 20(1):20-22.
- Hardie, R.C. (2012). Phototransduction mechanisms in *Drosophila* microvillar photoreceptors. *WIREs Membrane Transport and Signaling* 1(2):162-187.
- Harvey, A.L. (2002). Toxins “R” Us: more pharmacological tools from nature’s superstone. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 23(5):201- 203.
- Honma, T. y Shiomi, K. (2006). Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects. *Marine Biotechnology* 8(1):1–10.
- Hunskar, S., Fasmer, O.B. y Hole, K. (1985). Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of Neuroscience Methods* 14(1):69-76.
- Immke N. y Gavva, R. (2006). The TRPV1 receptor and nociception. *Seminars in Cell y Developmental Biology* 17(5):582–591.
- Jara-Oseguera, A., Nieto-Posadas, A., Szallasi, A., Islas, L.D. y Rosenbaum, T. (2010). Molecular mechanisms of TRPV1 channel activation. *The Open Pain Journal* 3(3):68-81.
- Jiménez Flores, S.M. (2011). Aislamiento y caracterización de toxinas de *Anthopleura* sp. y tres caracoles marinos del género *Conus* con efecto en la respuesta nociceptiva. Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, Ensenada, México.
- Kaas Q, Westermann, J.C. y Craik, D.J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer. *Toxicon* 55(8):1491-509.
- Kazakevich, Y. y LoBrutto, R. (2007). *HPLC for pharmaceutical scientists*. Wiley-Interscience.
- Keen, A.M. (1971). *Sea shells of Tropical West America*. 2ª ed. University Press.
- Kitaguchi, T. y Swartz, K.J. (2005). An inhibitor of TRPV1 channels isolated from funnel web spider venom. *Biochemistry* 44(47):15544-15549.

- Kornreich, B.G. (2007). The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology* 9(1):25-37.
- Kozlov, S.A., Andreev, Y.A., Murashev, A.N., Skobtsov, D.I., D'yachenko, I.A. y Grishin, E.V. (2009). New polypeptide components from the *Heteractis crispa* sea anemone with analgesic activity. *Bioorg Khim* 35(6):789–98.
- Lewis, R.L. (2009). Conotoxins: molecular and therapeutic targets. En: Fusetani, N. y Kem, W. (eds.). *Marine toxins as research tools*. USA, Springer.
- Lewis, R.L. y García, M.L. (2003). Therapeutic potencial of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery* 2(10):790-802.
- Li, M., Yong, Y. y Yang, J. (2010). Structural biology of TRP channels En: Islam, M.S. (ed.). *Transient Receptor Potential Channels*. Springer.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A. Ploegh, H. y Matsudaira, P. (2008). *Molecular cell biology*. 6ª ed. W.H. Freeman & Co.
- Malmberg, A.B., Gilbert, H., McCabe, R.T. y Basbaum, A.I. (2003). Powerful antinociceptive effects of the cone snail venom-derived subtype-selective NMDA receptor antagonists conantokins G and T. *Pain* 101(1-2):109–116.
- Marshall J., Kelley, W.P., Rubakhin, S.S., Bingham, J.P., Sweedler, J.V. y Gilly, W.F. (2002). Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus*. *Biological Bulletin* 203(1):27–41.
- Martínez Galván, O. (2010). Caracterización bioquímica del veneno del caracol marino *Conus regularis*. Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, Ensenada, México. Recuperada de: <http://www.biblioteca.cicese.mx>
- McIntosh, J.M. y Jones, R.M. (2001). Cone venom-from accidental stings to deliberate injection. *Toxicon* 39(10):1447-1451.
- Minke B., Wu, C. y Pak, W.L. (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258(5530):84–87.
- Minke, B. (2010). The history of the *Drosophila* TRP channel: The birth of a new channel superfamily. *Journal of Neurogenetics* 24(4):216–233.
- Moran, M.M., McAlexander, M. A., Biró, T. y Szallasi, A. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 10(8):601-620.

- Nielsen, C.K., Lewis, R.J., Alewood, D., Drinkwater, R., Palant, E., Patterson, M., Yaksh, T.L., McCumber, D. y Smith, M.T. (2005). Anti-allodynic efficacy of the chi-conopeptide, Xen2174, in rats with neuropathic pain. *Pain* 118(1-2):112–124.
- Norton, R.S. (2009). Structures of sea anemone toxins. *Toxicon* 54(8):1075-1088.
- Norton, R.S. y Olivera, B.M. (2006). Conotoxins down under. *Toxicon* 48(7):780–798.
- Nybakken, J. (1978). Population characteristics and food resource utilization of *Conus* in the Galapagos Islands. *Pacific Science* 32(3):271-280.
- Nybakken, J. (1970). Radular anatomy and systematics of the West American Conidae (Mollusca, Gastropoda). *American Museum Novitates* 2414(1):1-29.
- Olivera, B.M. (2006). *Conus* Peptides: Biodiversity-based discovery and exogenomics. *Journal of Biological Chemistry* 281(43):31173–31177.
- Olivera, B.M., Rivier, J., Clark, C., Ramilo, C.A., Corpuz, G.P., Abogadie, F.C., Mena, E.E., Woodward, S.R., Hillyard D.R. y Cruz L.J. (1990). Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science* 249(4966):257-263.
- Oroz Parra, I. (2011). Aislamiento e identificación de agentes citotóxicos provenientes del caracol marino *Conus ximenes* con actividad contra una línea celular de cáncer de colon (LIM-1215). Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, Ensenada, México. Recuperada de: <http://www.biblioteca.cicese.mx>
- Özbek S. (2011). The cnidarian nematocyst: a miniature extracellular matrix within a secretory vesicle. *Protoplasma* 248(4):635–640.
- Pardo, L. A., Camino, D. del, Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S. y Stühmer, W. (1999). Oncogenic potencial of EAG K⁺ channels. *The EMBO Journal* 18(20):5540-5547.
- Patapoutian, A., Tate, S. y Woolf, C.J. (2009). Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nature Reviews Drug Discovery* 8(1):55-68.
- Pedersen, S.F., Owsianik, G. y Nilius, B. (2005). TRP channels: An overview. *Cell Calcium* 38(3-4):233-252.

- Philyppov I.B., Paduraru, O.N., Andreev, Y.A., Grishin, E.V. y Shuba, Y.M. (2012). Modulation of TRPV1-dependent contractility of normal and diabetic bladder smooth muscle by analgesic toxins from sea anemone *Heteractis crispa*. *Life Sciences* 91(19-20):912-920
- Puillandre, N., Samadi, S., Boisselier, M.C., Sysoev, A.V., Kantor, Y.I., Cruaud, C., Couloux, A. y Bouchet, P. (2008). Starting to unravel the toxoglossan knot: Molecular phylogeny of the “turrids” (Neogastropoda: Conoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47(3):1122–1134.
- Rigby, A.C., Lucas-Meunier, E., Kalume, D.E., Czerwiec, E., Hambe, B., Dahlqvist, I., Fossier, P., Baux, G., Roepstorff, P., Baleja, J. D., Furie, B. C., Furie, B. y Stenflo, J. (1999). A Conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca^{2+} influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96(10):5758-5763.
- Rosland, J.H., Tjlsen, A., Maehle, B. y Hole, K. (1990). The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 42(2):235-242.
- Rudy, B. y Iverson, L.E. (1997). *Methods in enzymology, Ion Channels*. Academic Press.
- Salazar, H., Jara-Oseguera, A. y Rosenbaum, T. (2009). El canal TRPV1 como diana para tratar el dolor. *Revista de Neurología* 48(7):357-364.
- Satkunanathan, N., Livett, B., Gayler, K., Sandall, D., Down J. y Khalil, Z. (2005). Alpha-conotoxin Vc1.1 alleviates neuropathic pain and accelerates functional recovery of injured neurons. *Brain Research* 1059(2):149–158.
- Sergeev, I.N. y Rhoten, W.B. (1998). Regulation of intracellular calcium in breast cancer cells. *Endocrine* 9(3):321-327.
- Shiomi, K. (2009). Novel peptide toxins recently isolated from sea anemones. *Toxicon* 54(8):1112-1118.
- Siemens, J, Zhou, S., Piskorowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E.A. y Basbaum, A.I. (2006). Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* 444(7116):208-212.
- Smith, M.T., Cabot, P.J., Ross, F.B., Robertson, A.D. y Lewis, R.J. (2002). The novel N-type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose-dependent antinociception after intrathecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices. *Pain* 96(1-2):119–127.

- Sunesen, M. y Jacobsen, R.B. (2011). Study of TRP channels by automated patch clamp systems En: Islam, M.S. (ed.). *Transient Receptor Potential Channels*. Springer.
- Terlau, H. y Olivera, B.M. (2004). Conus Venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews* 84(1):41-68.
- Terlau, H., Shon, K.J., Grilley, M., Stocker, M., Stühmer, W. y Olivera, B.M. (1996). Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature* 381(6587):148-151.
- Tjolsen, A., Berge, O.-G., Hunnskaar, S., Rosland, J.H. y Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51(1):5-17.
- Tucker, JK. (2009). Recent cone species database En: Appeltans, W.; Bouchet, P., Boxshall, G.A., Fauchald, K., Gordon, D.P., Hoeksema, B.W., Poore, G.C.B., Soest, R.W.M. van, Stöhr, S., Walter, T.C. y Costello, M.J. (eds). *World Register of Marine Species*. <http://www.marinespecies.org>. Consultado el 1 abril 2010.
- Yoon, S-Y., Roh, D-H., Kwon, Y-B., Kim, H-W., Seo, H-S., Han, H-J., Lee, H-J., Beitz, A.J. y Lee, J-H. (2009). Acupoint stimulation with diluted bee venom (apipuncture) potentiates the analgesic effect of intrathecal clonidine in the rodent formalin test and in a neuropathic pain model. *The Journal of Pain* 10(3):253-263.
- Zelepuga, E.A., Tabakmakher, V.M., Chausova, V.E., Monastyrnaya, M. M., Isaeva, M.P. y Kozlovskaya, E.P. (2012). Interaction of sea anemone *Heteractis crispa* Kunitz Type Polypeptides with pain vanilloid receptor TRPV1: In silico investigation. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 38(2):159–170.

Anexo. Formulación del medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)

Constituyente	g/L
Sales inorgánicas	
Cloruro de calcio	0.2
Nitrato férrico • 9H ₂ O	0.0001
Sulfato de magnesio (anhídrido)	0.09767
Cloruro de potasio	0.4
Bicarbonato de sodio	3.7
Cloruro de sodio	6.4
Fosfato monobásico de sodio (anhídrido)	0.109
Aminoácidos	
L-Arginina • HCl	0.084
Glicina	0.03
L-Histidina • HCl • H ₂ O	0.042
L-Isoleucina	0.105
L-Leucina	0.105
L-Lisina • HCl	1.46
L-Fenilalanina	0.066
L-Serina	0.042
L-Treonina	0.095
L-Triptófano	0.016
L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	0.10379
L-Valina	0.094
Vitaminas	
Cloruro de colina	0.004
Ácido fólico	0.004
<i>myo</i> -Inositol	0.0072
Niacinamida	0.004
D-ácido Pantoténico (hemicalcio)	0.004
Piridoxina • HCl	0.004
Riboflavina	0.0004
Tiamina • HCl	0.004
Otros	
D-Glucosa	4.5
Fenol rojo • Na	0.0159
Ácido pirúvico • Na	0.11