

TESIS DEFENDIDA POR
ABIJAIL GUILLÉN LÓPEZ
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Director del Comité

Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Miembro del Comité

Dr. José Manuel Comejo Bravo
Miembro del Comité

Dra. Anamaría Escofet Giansone
Miembro del Comité

Dra. Rosa R. Mouriño Pérez
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 junio de 2011

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



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

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE TOXINAS DEL VENENO
DEL CARACOL MARINO *Conus californicus* QUE INTERACTÚAN
CON EL ANÁLOGO DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA
AChBP**

TESIS

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

Presenta:

ABIJAIL GUILLÉN LÓPEZ

Ensenada, Baja California, México, junio de 2011.

RESUMEN de la tesis de **Abijail Guillén López**, 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. Junio de 2011.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE TOXINAS DEL VENENO DEL CARACOL MARINO *Conus californicus* QUE INTERACTÚAN CON EL ANÁLOGO DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA AChBP

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro
Director de Tesis

Los caracoles marinos del género *Conus* sintetizan venenos como defensa contra sus depredadores o para la caza de sus presas. Estas toxinas son altamente potentes y específicas y se denominan conotoxinas. Estudios realizados con conotoxinas han demostrado que generan un efecto fisiológico modulador en canales iónicos de tipo inhibitorio, bloqueador y potenciador, siendo altamente selectivas para receptores de acetilcolina (AChR), los cuales están asociados al Sistema Nervioso Central y Parasimpático.

Formado de una oligoproteína, el receptor de acetilcolina nicotínico es un canal iónico regulado por ligando el cual es activado por el neurotransmisor de acetilcolina (ACh) y el alcaloide nicotina. Las α -conotoxinas compiten por los sitios de unión de ACh en los receptores nicotínicos y pueden antagonizar diferencialmente entre receptores nicotínicos musculares o cerebrales. Por esta razón, aunado a la facilidad de síntesis, las conotoxinas se convierten en un probable fármaco alternativo para el tratamiento de enfermedades como el dolor neuropático y la enfermedad de Alzheimer en la cual se involucran receptores nicotínicos.

El presente trabajo determinó el potencial modulador del veneno de *C. californicus*, usando como modelo un análogo del AChR mediante un método fluorométrico de unión y competencia, en el cual se emplearon fracciones obtenidas por HPLC-RP y se determinó la unión de ligandos (nicotina y epibatidina) a nivel nanomolar con las Proteínas de Unión a ACh de *Limnaea stagnalis* wt y *Aplysia californica* y55w (*Ls*-AChBP₁; *Ac*-AChBP₂). Estas emiten su máxima fluorescencia únicamente al fusionarse como complejo con anabaseína. En los datos resultantes por fluorimetría se localizaron 5 fracciones estadísticamente significativas. Sin embargo, con una adaptación de un ensayo de “centelleo de proximidad” se localizaron 10 fracciones con un comportamiento competitivo.

Palabras Clave: *Conus californicus*, conotoxinas, Proteínas de Unión a ACh, Receptores de acetilcolina.

ABSTRACT of the thesis presented by **Abijail Guillén López** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in life sciences with orientation in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México. June 2011.

BIOCHEMIST CHARACTERIZATION OF TOXINS FROM VENOM OF MARINE SNAIL *Conus californicus* THAT INTERACT WITH THE ACETYLCHOLINE RECEPTOR ANALOG OF AChBP.

Marine snails of the *Conus* genus synthesize venom as a defense against its predators or to hunt its prey. These toxins are highly potent and specific and they are denominated as conotoxins. Studies realized with conotoxins have shown that these generate a modulated physiological effect on ionic channels of inhibitory, enhancer and blocker type, being highly selective for acetylcholine receptors (AChR), which are associated with the central nervous and parasympathetic system.

Formed from an oligoprotein, the nicotinic acetylcholine receptor is a ligand-gated ion channel, which is activated by the neurotransmitter acetylcholine (ACh) and the nicotine alkaloid. The α -conotoxins compete for ACh binding sites of the nicotinic receptors and they can differentially antagonize between muscular or cerebral nicotinic receptors. For this reason, in addition to the ease of synthesis, conotoxins are converted to a probable alternative drug for the treatment of diseases such as neuropathic pain and Alzheimer's disease in which nicotinic receptors are involved. The current work determined *C. californicus* venom's modulator potential, an analogous model of the AChR was utilized through a fluorometric method of union and competency, in which obtained fractions were utilized by HPLC-RP and it was determined the binding of ligands (nicotine and epibatidine) to a nanomolar level with the ACh-binding protein of *Aplysia californica* wt and *Limnaea stagnalis* y55w (*Ls*-AChBP₁; *Ac*-AChBP₂). These emit its maximal fluorescence only when fusing as complex with anabaseine. In the data results by fluorometry 5 fractions were found statistically significant. However, with an adaptation of a "scintillation proximity" assay 10 fractions were located with a competitive behavior.

Keywords: *Conus californicus*, conotoxins, Acetylcholine-binding protein, acetylcholine receptors.

Escribí este trabajo con afabilidad de poder cumplir mis sueños y seguir por la vida acumulando experiencias profesionales y personales. Nacimos con un sentido para soñar y alguna misión como destino. Se cierra un ciclo de más de dos años, como ver la caída del ocaso e iniciaran otros mas como la puesta del alba en el horizonte.

Nuevamente una meta más realizada.

¡Simplemente, Gracias!

Abigail

“Daría todo lo que se, por la mitad de lo que ignoro”

René Descartes

DEDICATORIAS

A Dios:

Por darme la existencia, la capacidad para tener fe, esperanza y caridad para saber por dónde ir. La fortaleza, templanza, prudencia y justicia para elegir con serenidad. Por seguir aquí y disfrutar de los seres que amo mi familia, amigos y salud.

A mi madre:

Por proporcionarme su tiempo y amor, a la medida de sus posibilidades, por fomentar en mi valores morales, que hoy en día me convierten en la persona que soy, que me guían de como tomar la decisión correcta en los momentos adecuados, producto de su crianza.

A mi padre:

Por sus enseñanzas, sus característicos consejos, por su apoyo tan peculiar, fomentado en mí el deseo de superación y anhelo de triunfo de la vida, hoy que finalizó un logro de superación personal, me dispongo a conquistar nuevas metas, comparto esto hoy con usted...Gracias.

A mi hermana:

Por todo el apoyo que me has dado, para cumplir diversas metas en mi vida si no también por el ejemplo de vida, por ser el espejo en el que me quiero mirar y el cual me obligan a esforzarme día tras día más. Gracias por no solo ser mi hermana y amiga. Por todo esto y el futuro que vendrá solo tengo que decir de todo corazón y con gran respeto, que bien te has sabido ganar...con mucho amor.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme la beca para la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por darme la oportunidad de realizar los estudios de maestría.

Al Dr. Alexei Licea Navarro, por su ambición por dejar huella en la vida; por generar cambios positivos y motivación en las personas que se cruzan por su camino, por ser como es.

Al Dr. Taylor Palmer (Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, de la U.C.S.D en La Jolla, CA.) por las donaciones de material hecho a lo largo del proyecto así como la aceptación de la colaboración para este proyecto.

Al Dr. Todd Talley (Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, de la U.C.S.D en La Jolla, CA.) por su grata amabilidad y tiempo al acceder a corroborar los resultados experimentales con Radioactividad.

Al Dr. Marco Ramos, por permitirme hacer uso de sus instalaciones y equipos, en la parte experimental de fluorescencia, por su tiempo, buena disposición, consejos, a su excelente y acertada co-dirección y aportaciones a este proyecto.

Al Dr. Cornejo, por ser parte del enlace inicial para la colaboración con UCSD, obtener algunos materiales químicos que se necesitaron para este proyecto y parte del protocolo.

A la Dra. Beatriz Cordero, del departamento de acuicultura por su excelente labor como investigadora, sus comentarios, interés y tiempo para el proyecto.

Al M. en C. Eduardo Morales, por su profesionalismo al momento de las purificaciones en el HPLC-RP, por su amabilidad al explicar y sus conversaciones tan amenas.

A la M. en C. Dolores Sarracino, por su amabilidad en todo momento, por darme la confianza y oportunidad de ser parte de CICESE.

A Joannie Ho, del personal de investigación, (Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, de la U.C.S.D en La Jolla, CA.) por elaborar los ensayos experimentales con Radioactividad.

A Akos Nemecz, estudiante de posgrado (Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, de la U.C.S.D en La Jolla, CA.) por su amabilidad, tiempo y enlace para la realización de los ensayos con Radioactividad.

A Adriana Mejía Aguilar, por su gran eficacia al auxiliarnos durante los trámites administrativos trimestre tras trimestre.

A los miembros de este comité de tesis, Dra. Anamaría Escofet Giansome y Dra. Rosa R. Mouriño Pérez, por ser parte de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia

Por estar conmigo incondicionalmente, a mi tía Cecilia, a mi cuñado Pepe y a Luz, mil gracias.

A mis tutores académico

Al Dr. Marco, por adoptarme y contribuir a mi "formación" académica. Al Dr. Cornejo, al Dr. Olmos, por su tiempo, solidaridad y recursos para el término de este proyecto así como sus aportaciones personales. Al MC. Guereña y al Dr. Alexei.

A mis compañeros

De laboratorio de C.I.C.E.S.E, a Irasema, Ana Paola, que ayudaron en la recolección de *Conus* y muy en especial a mi amigo *Oscar*, así como a Mayra, Pilar, Carmen, Pavel y Hanna. Y a mis amigos de Laboratorio de Biotecnología de la U.A.B.C, *Alejandra*, Angélica, Zeila y Bibi.

¡A TODOS!

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Inmunología Molecular y Biotoxinas del C.I.C.E.S.E bajo la dirección del Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro y en el Laboratorio de Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Químicas en la U.A.B.C Campus Tijuana, bajo la supervisión del Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra. Además de la colaboración de los Drs. Palmer Taylor y Todd T. Talley así como al personal de investigación Joannie Ho y al estudiante de posgrado Akos Nemecz del laboratorio de Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences de la U.C.S.D en La Jolla, CA. Durante la realización del proyecto la estudiante recibió una Beca del C.O.N.A.C.Y.T con número de registro 268722 y una extensión de beca por proyecto externo de maestría por parte del DEP-CICESE al Dr. Licea Navarro.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Pensamiento.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Contenido.....	ix
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tablas.....	xv
Lista de abreviaturas.....	xvi
 I. INTRODUCCIÓN.....	 1
 II. ANTECEDENTES.....	 3
II.1 Generalidades del género <i>Conus</i>	6
II.2 Estructura general de la anatomía del género <i>Conus</i>	8
II.3 Generalidades del veneno del género <i>Conus</i>	8
II.4 Generalidades y clasificación de las conotoxinas.....	9
II.4.1 Precursor peptídico.....	11
II.5 Generalidades de las α -conotoxinas.....	11
II.5.1 Clasificación de las α -conotoxinas.....	13
II.6 Elaboración y liberación de las AChBPs.....	14
II.6.1 Las AChBPs caracterizadas en distintas especies.....	14
II.6.2 Clases de receptores nicotínicos.....	15
II.6.3 Comparación de las AChBPs con la secuencia de los CIRL.....	15
II.6.4 Farmacología de las AChBPs.....	16
II.7 Neurotransmisores.....	16
II.7.1 Características de la acetilcolina.....	16
II.8 Generalidades de los canales iónicos.....	17
II.8.1 Tipos de canales iónicos.....	18
II.8.2 Canales iónicos regulados por ligandos.....	18
II.8.3 Receptores colinérgicos.....	19
II.8.3.1 Clases de receptores nicotínicos de acetilcolina.....	20
II.9 Ligandos que afectan la función de unión de los nAChRs neuronales...	22
II.10 Distribución y localización anatómica cerebral humana de los nAChRs neuronales.....	24
II.11 Localización no cerebral de los receptores nicotínicos cerebrales.....	24
II.12 Participación y relación de los nAChRs neuronales en las patologías..	25

C O N T E N I D O (continuación)

II.12.1 Enfermedades neurológicas degenerativas que afectan al sistema nervioso dependiente de la edad.....	25
II.12.2 Enfermedades neurológicas degenerativas que afectan al sistema nervioso independiente de la edad.....	26
II.12.3 Enfermedades neurológicas degenerativas que afectan al sistema nervioso relacionada con la edad.....	27
II.13 Patologías en tejidos y células no neuronales.....	28
II.14 Enfermedades relacionadas con los nAChRs musculares.....	30
III. HIPÓTESIS.....	31
IV. OBJETIVOS.....	31
VII.1 Objetivos general.....	31
VII.2 Objetivos específicos.....	31
V. METODOLOGÍA.....	36
VII.1 Obtención de especímenes <i>Conus californicus</i>	32
VII.2 Manejo del caracol <i>Conus californicus</i>	32
VII.3 Obtención de los conductos venenosos.....	32
VII.4 Extracción del veneno de <i>Conus californicus</i>	33
VII.5 Separación de los componentes del veneno de <i>Conus californicus</i> mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP).....	34
VII.6 Repurificación de los componentes del veneno de <i>Conus californicus</i> mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP).....	34
VII.7 Propuesta de evaluación del potencial modulador de receptores de acetilcolina.....	35
VII.8 Determinación del potencial modulador de receptores de acetilcolina mediante un método fluorométrico de unión y competencia.....	35
VII.9 Análisis estadístico de los datos obtenidos mediante el método fluorométrico.....	37
VII.10 Determinación del potencial modulador de receptores de acetilcolina mediante un método radiométrico de unión y competencia.....	37
VI. RESULTADOS	39
VI.1 Fraccionamiento del veneno total del caracol marino <i>Conus californicus</i> por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP).....	39

CONTENIDO (continuación)

VI.2 Caracterización del método fluorométrico de unión y competencia para valorar el potencial modulador de moléculas sobre receptores de acetilcolina	40
VI.3 Análisis de las fracciones FI – FXIII del veneno de <i>Conus californicus</i> colectadas cada 5 minutos.....	41
VI.4 Análisis de las fracciones individuales FI, FV, FVII, FIX y FXI del veneno de <i>Conus californicus</i>	43
VI.5 Separación y análisis de las sub-fracciones FV.3, FVII.3, FIX.1 y FXI.1 del veneno de <i>Conus californicus</i>	45
VI.6 Análisis de las fracciones del veneno de <i>C. californicus</i> en un ensayo dosis-respuesta para evaluar el potencial modulador de AChR mediante un método fluorométrico de unión y competencia.....	48
VI.7 Análisis de las fracciones del veneno de <i>C. californicus</i> en un ensayo de centelleo de proximidad para evaluar el potencial modulador de AChR mediante un método radiométrico de unión y competencia.....	49
VII. DISCUSIÓN.....	51
VII.1 Ensayos sobre un modelo AChR <i>in vitro</i>	51
VII.2 Aplicación de una técnica fluorométrica.....	52
VII.2 Aplicación de una técnica radiométrica.....	52
VII.4 Variabilidad de los resultados en los ensayos.....	53
VIII. CONCLUSIONES.....	54
IX. PERSPECTIVAS.....	55
X. LITERATURA CITADA.....	56
XI. ANEXOS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Anatomía del caracol del género <i>Conus</i>	8
2	Diagrama de flujo de las superfamilias de conotoxinas del género <i>Conus</i> indicando patrones disulfuro y dianas farmacológicas.....	9
3	Vista superior de la estructura pentamérica de una AChBP.....	15
4	Estructura química tridimensional de la molécula de ACh.....	17
5	Subunidades de los nAChRs y dominios con sus cuatro hélices transmembrana por subunidad.....	19
6	Apertura de un canal iónico por la unión de un neurotransmisor a un nAChR.....	20
7	Estructura tridimensional del nAChR muscular.....	21
8	Estructura química tridimensional de la nicotina.....	23
9	Resumen de algunas patologías psiquiátricas y neurológicas en un corte sagital de cerebro donde se muestran las principales áreas de localización de las subunidades nicotínicas y su implicación en su etiología	28
10	Obtención del veneno de <i>C. californicus</i> a partir de ductos venenosos.....	33
11	Esquema del comportamiento esperado del método fluorométrico de unión y competencia.....	36
12	Fotografía de una microplaca con soluciones del ensayo de fluorescencia y veneno de <i>Conus californicus</i>	37

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
13	Esquema de una adaptación del ensayo de “centelleo de proximidad” SPA y comportamiento observado del método radiométrico.....	38
14	Perfil cromatográfico del fraccionamiento obtenido por HPLC-RP del extracto total del veneno de <i>Conus californicus</i> colectados en mayo-junio de 2009.....	39
15	Gráfica de comportamiento de la caracterización inicial de las concentraciones de los ligandos y AChBP.....	40
16	Gráfica normalizada de la caracterización del probable potencial modulador de las toxinas del veneno de <i>Conus californicus</i> que interactúan mediante fluorescencia.....	41
17	Perfil cromatográfico de HPLC-RP del extracto total del veneno de <i>Conus californicus</i> colectados en 2009.....	42
18	Gráfica normalizada de la caracterización del probable potencial modulador de las toxinas del veneno de <i>Conus californicus</i> que interactúan mediante fluorescencia.....	43
19	Perfil cromatográfico del <i>pool</i> del veneno obtenido por HPLC-RP de <i>Conus Californicus</i>	44
20	Gráfica normalizada de la caracterización del probable potencial modulador de las toxinas del veneno de <i>Conus californicus</i> que interactúan mediante fluorescencia.....	44
21	Cromatograma del fraccionamiento del <i>pool</i> del veneno de las sub-fracciones FV.3.4 y FV.3.5 obtenidas por HPLC-RP de <i>Conus Californicus</i>	45
22	Cromatograma del fraccionamiento del <i>pool</i> del veneno de la sub-fracción FVII.1.13 obtenida por HPLC-RP de <i>C. californicus</i>	45

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
23	Cromatograma del fraccionamiento del pool del veneno de las Sub-fracciones FIX.1.7 y FIX.1.13 obtenidas por HPLC-RP de <i>C. Californicus</i>	46
24	Cromatograma del fraccionamiento del <i>pool</i> del veneno de las sub-fracciones FXI.1.1 y FXI.1.6 obtenidas por HPLC-RP de <i>C. Californicus</i>	46
25	Gráfica normalizada de la caracterización del probable potencial modulador de las toxinas del veneno de <i>Conus californicus</i> que interactúan mediante fluorescencia.....	47
26	Gráfica normalizada del comportamiento característico del gradiente de la curva <i>dosis-respuesta</i>	48
27	Gráfica normalizada de la caracterización del probable potencial modulador de las toxinas del veneno de <i>Conus californicus</i> que interactúan mediante radioactividad.....	49
28	Gráfica normalizada de la caracterización del probable potencial modulador de las toxinas del veneno de <i>Conus californicus</i> que interactúan mediante radioactividad.....	50

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla</i>		<i>Página</i>
I	Clasificación de las conotoxinas de acuerdo a su configuración de cisteínas.....	10
II	Función y localización extraneuronal de las subunidades de los nAChRs.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRONIMOS, SIGLAS,
SIMBOLOS Y PALABRAS EXTRANJERAS

α-Bgtx	Alfa-bungaratoxina.
aa	Aminoácidos.
acetil CoA	Acetilcoenzima A.
ACh	Acetilcolina.
AChR	Receptor de acetilcolina.
AChBP	Proteína de unión a acetilcolina (Acetylcholine-binding protein).
Ac -AChBP₂ (wt)	Proteína de unión a acetilcolina de <i>Aplasia californica</i> silvestre.
Ac-AChBP₂ (mt)	Proteína de unión a acetilcolina de <i>Aplasia californica</i> mutante.
AMPA	α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato.
Anab	Anabaseina (anabaseina 4-aminobencilideno).
ATP	Adenosintrifosfato.
ACN	Acetonitrilo.
B.C.	Baja California.
Bt-AChBP	Proteína de unión <i>Bulinus truncatus</i> .
CA	California.
Ca²⁺	Ión calcio.
ct-AChBP	Proteína de unión a acetilcolina de <i>Capitella teleta</i> .
CICESE	Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
CIRL	Canales iónicos regulados por ligando.
CIDV	Canales iónicos dependiente de voltaje.
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
COO⁻	Extremo carboxilo terminal.
Cis	Residuo del aminoácido cisteína.
Cys-loop	Horquilla de cisteínas.
DEP	Departamento de estudios de posgrado.
DA	Neuronas dopaminérgicas.
ELIC	<i>Erwinia chrysanthemi</i> .
Epi	Epibatidina.

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRONIMOS, SIGLAS,
SIMBOLOS Y PALABRAS EXTRANJERAS (continuación)

^3H Epi	Epibatidina con tritio.
ECD	Dominio extracelular.
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos.
g/mol	Gramos/moles.
GABA	Ácido gamma-aminobutírico.
GABA_A	Ácido gamma-aminobutírico tipo A.
GABA_C	Ácido gamma-aminobutírico tipo C.
GLIC	<i>Gloeobacter violaceus</i> .
5-HT₃	Receptor de 5-hidroxitriptamina (serotonina) tipo 3.
h	Hora.
HPLC-RP	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.
K⁺	Ión potasio.
K_a	Constante de asociación.
K_d	Constante de disociación.
kainato	Ácido kaínico.
Ls-AChBP₁ (wt)	Proteína de unión a acetilcolina de <i>Limnae stagnalis</i> silvestre.
Loop	Ducto de inyección.
M	Molar.
mbar	Milibars.
mg	Mili gramos.
min	Minutos.
mM	Milimolar.
mL	Mililitros.
MG	Miastenia Gravis.
MLA	N-metilcaconitina.
Mt	Mutante.
nmol	Nanomol.
Nic	Nicotina.

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRONIMOS, SIGLAS,
SIMBOLOS Y PALABRAS EXTRANJERAS (continuación)

NH⁻	Amino terminal.
nAChRs	Receptores de acetilcolina nicotínicos musculares/neuronales.
nM	Nanomolar.
NMDA	N-metil-D-aspartato.
ppm	Partes por millón.
PV	<i>Pénfigo vulgaris</i> .
s	Segundo.
SNA	Sistema Nervioso Autónomo.
SNC	Sistema Nervioso Central.
SNP	Sistema Nervioso Periférico.
TFA	Ácido trifluoroacético.
UABC	Universidad Autónoma de Baja California.
UCSD	Universidad de California en San Diego.
UF	Unidades de fluorescencia.
Wt	Silvestre.
α:	Alfa.
β:	Beta.
γ:	Gamma.
δ:	Delta.
λ	Lambda-Longitud de onda.
μg:	Microgramos.
μL:	Microlitros.
μM:	Micromolar.

INTRODUCCIÓN

La actividad cerebral obedece a señales moleculares específicas entre las neuronas residentes (Fusetani y Kem, 2009). Los receptores ionotrópicos, que están localizados en las uniones neuromusculares, en el Sistema nervioso central (SNC), periférico (SNP) e inmunológico, modulan la neurotransmisión del sistema colinérgico y la liberación de neurotransmisores, como puede ser la Acetilcolina (ACh). Esta afecta las funciones fisiológicas como el aprendizaje y la memoria (Taylor *et al.*, 2000; Sixma y Smit, 2003; Gotti y Clementi, 2004; Talley *et al.*, 2006; Dutrerte *et al.*, 2007; Fusetani y Kem, 2009).

El incremento en una serie de enfermedades del SNC, orientó a investigaciones de biología molecular a determinar que existen mutaciones en los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChRs) neuronales de tipo funcional, afectando su ubicación y cantidad. Estas mutaciones pueden aparecer durante el desarrollo de la niñez, la adultez o envejecimiento, en las neurotransmisiones colinérgicas nicotínicas cerebrales y ganglionares, siendo esto una probable razón de la génesis de patologías neurodegenerativas como: Parkinson, Alzheimer, Epilepsia nocturna del lóbulo frontal, Esquizofrenia, síndrome de Tourette, Autismo, la depresión y la adicción a la nicotina (nic) y por otro lado, las patologías neuromusculares (nAChRs musculares) como la Miastenia Gravis (MG). Se ha propuesto que cuando los nAChRs neurales están situados extraneuronamente como en músculo, tejido linfoide, piel, tumores de pulmón y células neurosecretoras, es porque la ACh tiene la capacidad de dirigir funciones celulares moduladas por receptores, sin poseer relación alguna en la transmisión de señales nerviosas (Gotti *et al.*, 1997; Gotti y Clementi, 2004; Talley *et al.*, 2006).

Algunas especies de origen tanto marino como terrestre contienen péptidos, alcaloides, terpenoides o toxinas que interaccionan con receptores nicotínicos (Hansen y Taylor, 2007). Los nAChRs neurales son una diana farmacológica perfecta para el estudio de sus ligandos naturales o toxinas aisladas de los diferentes organismos (Gotti y Clementi, 2004). La obtención de bloqueadores o activadores sobre los canales iónicos regulados por ligandos (CIRL), permite un mejor entendimiento del funcionamiento de los tipos y subtipos específicos de los nAChRs musculares y neuronales.

Esto puede ser en estadios normales y patológicos aún poco entendidos (Dutrerte *et al.*, 2007). Con esta información, se pueden proponer la generación de nuevas terapias farmacológicas para las enfermedades mencionadas anteriormente.

Los estudios con los péptidos del veneno de los caracoles marinos del género *Conus*, han demostrado que las conotoxinas poseen una capacidad moduladora sobre distintos canales iónicos (Azam y McIntosh, 2009) o receptores, también pueden emplearse para la evaluación de la traducción celular, así como transportadores de las membranas plasmáticas de células musculares y nerviosas de vertebrados e invertebrados.

Por todo lo anterior, este trabajo se centra en la purificación, identificación y caracterización de las conotoxinas empleando un modelo que interactúa con el análogo del receptor de acetilcolina AChBP midiendo el cambio en la fluorescencia por el desplazamiento de un ligando que forma un complejo proteína-sustrato fluorescente.

II. ANTECEDENTES

En los comienzos del siglo XX ya se tenía la concepción de neurotransmisor químico, por Langley y Dale (Stephenson, 1956; Flores y Segura, 2005). Pero fue hasta 1921, que el fisiólogo alemán Otto Loewi probó la existencia de la ACh como mediador químico y caracterizada químicamente en 1929 (Kandel *et al.*, 2000; Flores y Segura, 2005). Aunque se tiene una escasa información sobre la estructura tridimensional del receptor de ACh, es el más caracterizado por sus propiedades bioquímicas y farmacológicas (Brisson y Unwin, 1984), fue lo que sentó las bases de la comunicación intercelular, para abrir el estudio de nuevos neurotransmisores y receptores (Kandel *et al.*, 2000).

La definición actual de receptor fue planteado por Raimond P. Ahlquist en 1948. El receptor colinérgico nicotínico de tipo muscular proveniente del órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata*, fue el primero en ser aislado y purificado (Briley y Changeux, 1977; Sobel *et al.*, 1977; Kubalek *et al.*, 1987; Ashcom y Stiles, 1997), este receptor heteropentámero de ~300 KDa posee la siguiente estequiometría ($\alpha_1\beta_1\gamma/\epsilon\delta$) (Grutter y Changeux, 2001), es una proteína pentamérica, igual a la del músculo esquelético humano ($\alpha_1\beta_1\gamma\delta$) que conforma un canal iónico cilíndrico ubicada en la transmembrana postsináptica (Ashcon y Stiles, 1997) y posee dos sitios diferentes de unión agonista formados por las interfases de las subunidades α - γ y α - δ para el receptor de *T. marmorata* (Grutter y Changeux, 2001; Andreeva *et al.*, 2006).

Las AChBPs son proteínas solubles en agua, secretadas por un grupo de células gliales del sistema nervioso de los moluscos (Banks *et al.*, 2009). Estas proteínas fueron aisladas y caracterizadas originariamente del caracol de agua dulce de *Lymnaea stagnalis* (Ls-AChBP) y posteriormente de *Aplysia californica* (Ac-AChBP) y *Bulinus truncatus* (Bt-AChBP), y del anélido *Capitella teleta* (ct-AChBP) que posee ~20-30% de identidad con las AChBPs de los moluscos (Yakel, 2010). Estas AChBPs son un homólogo estructural del dominio extracelular (ECD) de las proteínas pentaméricas transmembranales, con ligandos estequiométricos de alrededor de cinco sitios por pentámero de los nAChRs y aunque aún se desconoce a nivel estructural los subtipos de receptores en el ECD de unión al ligando, se sabe que estos dominios extracelulares modulan la unión selectiva de las moléculas.

Las AChBPs poseen del 15-28% de analogía en sus secuencias con las subunidades de las horquillas de cisteínas “cys-loop” en los CIRL. Para corroborar la funcionalidad de las AChBPs como nAChRs, así como el reconocimiento de agonistas y antagonistas, se transfecta ADNc sintético a células embrionarias de riñón humano (HEK) (Brejc *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2002; Bourne *et al.*, 2005; Talley *et al.*, 2006; Ulens *et al.*, 2006; Nury *et al.*, 2009; Armishaw *et al.*, 2009). Además se utilizan triptófanos marcados para corroborar que los residuos aromáticos reconocen al ligando entre otros (Hansen *et al.*, 2002).

Dentro de las propiedades que presentan las AChBPs como receptores al identificar e interactuar con ligandos, está involucrada la fluorescencia intrínseca del triptófano, la cual se “anula” por ligandos selectivos, además de la modificación de la constante de asociación (K_a) y constante de disociación (K_d) por acción de agonistas y neurotoxinas (Hansen *et al.*, 2002).

Por estas razones es que las AChBPs han sido ampliamente utilizadas a la hora de esclarecer los requerimientos mínimos de las subunidades nicotínicas que deben combinarse para constituir a los nAChRs funcionales, los cuales permiten llegar a dilucidar cuáles son las subunidades básicas que deben formar parte de los diferentes subtipos de nAChR nativos (Gotti *et al.*, 1997). Estas actuales herramientas nos permiten identificar en las conotoxinas del veneno de caracol marino *C. californicus* (Duterte *et al.*, 2007) un probable modulador potencial sobre los nAChRs *in vitro*.

El uso de la fluorescencia intrínseca del triptófano en ensayos con las AChBPs, ha contribuido a explicar los cambios conformacionales en la familia de los CIRL, a la cual pertenece la familia de los nAChRs y genes que se activan por la ACh. Y ambos a su vez a la familia de receptores con cys-loop (CLR), dentro de las que se encuentran los nAChRs, GABA (Ácido gamma-aminobutírico), GABA_A (Ácido gamma-aminobutírico Tipo A), GABA_C (Ácido gamma-aminobutírico Tipo C), el receptor de serotonina (5-HT₃), los receptores de glicina, los receptores de glutamato, que por lo general se dividen en NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato) y kainato (ácido kaínico), además de los receptores de ATP (adenosintrifosfato) que participan en la transmisión sináptica (Jones y Bulaj 2000; Smit *et al.*, 2001; Sixma y Smit, 2003; Terlau y Olivera, 2004; Loughnan *et al.*, 2006; Norton y Olivera, 2006; Armishaw *et al.*, 2009; Nasiripourdori *et al.*, 2009).

La simplicidad de efectuar ensayos empleando estas AChBPs, para examinar la modulación de la función de los nAChRs nos permite utilizarlas en modelos heterólogos de expresión (Duterte *et al.*, 2007), como por ejemplo, en los ovocitos de *Xenopus laevis*, en los cuales se pueden generar subtipos de los nAChRs neuronales y funcionales mediante la inyección de ARNm neuronal o ADNc que codifican para las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, ó $\alpha 4$, ó $\beta 2$ y $\beta 4$, con diferentes propiedades biofísicas y farmacológicas, que pueden coincidir con la estructura nativa de los nAChRs neurales (Gotti *et al.*, 1997; Gotti y Clementi, 2004).

Dentro del veneno de *Conus omaria*, fue purificada, aislada y caracterizada la α -conotoxina OMIA, un péptido de 17 aa y dos enlaces disulfuro, mismo que tiene una fuerte unión a las AChBPs de *Bt*-AChBP, *Ls*-AChBP y *Ac*-AChBP y en especial por *Ls*-AChBP, que bloquea potente, selectiva y antagónicamente los dos subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 2$ respectivamente de los nAChRs neuronales, siendo esta α -conotoxina única en su selectividad para estas dos subunidades, en comparación con $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$ y $\alpha 1\beta \delta \epsilon$, cuando se expresa en ovocitos de rana africana *Xenopus laevis* (Talley *et al.*, 2006).

Recientes investigaciones, han informado que las α -conotoxinas IMI y PnIA poseen como blanco a la subunidad $\alpha 7$ de los nAChRs de la *Ac*-AChBP. La α -conotoxina IMI posee una alta afinidad a concentración micromolar (μM), por las subunidades $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 6\beta 4$ de los nAChRs de las *Ls*-AChBPs y *Ac*-AChBP (Talley *et al.*, 2006).

Un derivado biológicamente activo de la mejor α -conotoxina caracterizada es GI del caracol *Conus geographus*, que bloquea la unión neuromuscular (Azam y McIntosh, 2010) se utilizó en ensayos de unión a los nAChRs purificados del pez *Torpedo californica*. Estudios de estructura y función con análogos de la α -conotoxina GI, compuesta de una horquilla de disulfuro, revelan distintas limitaciones conformacionales pero necesarias para una buena interacción de las toxinas con receptores o anticuerpos (Ashcom y Stiles, 1997).

Todas estas conotoxinas descritas anteriormente en combinación con las AChBPs, pueden servir como un modelo para entender las características fisicoquímicas de la unión con los nAChRs.

En la actualidad no sólo se caracterizan estos homólogos estructurales y funcionales de los nAChRs a partir de los moluscos anteriormente mencionados, sino también de microorganismos unicelulares como *Gloeobacter violaceus* (GLIC), una cianobacteria que ha revelado tener una secuencia de *cys-loop* y actividad como canal catiónico regulado por protones (Nury *et al.*, 2010) ó *Erwinia chrysanthemi* (ELIC), una bacteria con similitud en longitud y secuencia a su ortólogo GLIC compartiendo en un 18% de aa idénticos (Hilf y Dutzler, 2008).

II.1 Generalidades del género *Conus*

Con más de 700 especies de caracoles marinos del género *Conus* de la familia *Conidae*, estos contienen aproximadamente entre 100-200 péptidos diferentes en cada veneno por especie, suman aprox. >70,000 componentes distintos de conopéptidos bioactivos y sólo cerca del 0.1% están caracterizados (Ashcom y Stiles, 1997; Terlau y Olivera, 2004; Buczek *et al.*, 2005; Olivera, 2006; Fusetani y Kem, 2009). Desde los últimos 50 millones de años, los caracoles *Conus* vienen desarrollando una mezcla de péptidos y proteínas activas, además de una especificidad para distintos receptores que revela fuertes propiedades farmacológicas (Ashcom y Stiles, 1997).

Los caracoles del género *Conus* se localizan en hábitats tropicales como arrecifes de coral y a profundidades de >100 metros pero con mayor diversidad a menor profundidad, son depredadores carnívoros de hábitos alimentarios nocturnos. La especie de *Conus californicus* se ha adaptado a aguas más frías. Aún cuando cuentan con dos tallos como ojos, poseen una pobre visión para rastrear a sus presas (Fusetani y Kem, 2009).

Con su evolucionado aparato de caza, paralizan a sus presas en segundos, con una mezcla de pequeños péptidos unidos por enlaces disulfuro, el cual es producido por cada especie de caracoles *Conus*, cuya función es la inmovilización de sus diferentes especies que tiene como presas, éstas se clasifican en tres grupos de acuerdo a su dieta: que pueden ser cazadores de peces (piscívoras), de moluscos (moluscívoros) o de gusanos (vermívoros) (Terlau y Olivera, 2004).

Los péptidos del veneno de los caracoles del género *Conus*, se sintetizan en el conducto venenoso y estos son inyectados a través de una estructura similar a un arpón con púas de punta hueca (rádula modificada) en los tejidos blandos de los animales, utilizando una trompa muscular. Estos péptidos individuales del veneno de acuerdo a su mortandad en las presas, se designan como conotoxinas (letales) o conopéptidos (no letales) (Fusetani y Kem, 2009).

Los conopéptidos no son de un tamaño pequeño y las conotoxinas son de 12-30 aa (Terlau y Olivera, 2004; Buczek *et al.*, 2005) en comparación al promedio del tamaño de otras toxinas polipeptídicas que oscilan entre 40-80 aa. Característicamente, entre sus conopéptidos homólogos relacionados de la especie *Conus*, se encuentra una divergencia en las secuencias interespecíficas, además de modificaciones post-traduccionales como: hidroxiprolina, O-glicosilación, Serina (Ser) o Treonina (Tre) y unos menos comunes 6-Br-Trp, γ -carboxi-glu, D-aminoácidos y Tirosina sulfatada. Los conopéptidos se traducen a través del mecanismo ribosomal convencional y la codificación de los ARNm de cada péptido puede ser identificada en el conducto venenoso (Terlau y Olivera, 2004).

Los efectos de la bioactividad de los conopéptidos utilizados por los caracoles del género *Conus* como defensa o tranquilizantes no están delimitados aún, pero han otorgado el material necesario para la investigación de nuevos y potenciales agentes terapéuticos, como por ejemplo el conopéptido ω -MVIIA aprobado por la FDA en diciembre de 2004, comercialmente conocido como Prialt (Ziconitide ó SNX-111 como genérico), es tan sólo uno de los seis péptidos que se encuentran en fase clínica.

Genéticamente, las conotoxinas están codificadas como propéptidos que se fraccionan por endoproteasas específicas del veneno para crear su péptido maduro. Las conotoxinas se convierten en un modelo farmacológico por su relativa viabilidad de síntesis, estabilidad estructural, su tamaño pequeño (generalmente <5 KDa) y especificidad hacia sus blancos (Olivera, 2006; Fusetani y Kem, 2009).

II.2 Estructura general de la anatomía del género *Conus*

Los caracoles marinos del género *Conus* emplean su aparato venenoso como sistema de defensa y liberación de veneno (Terlau y Olivera, 2004), Figura 1:

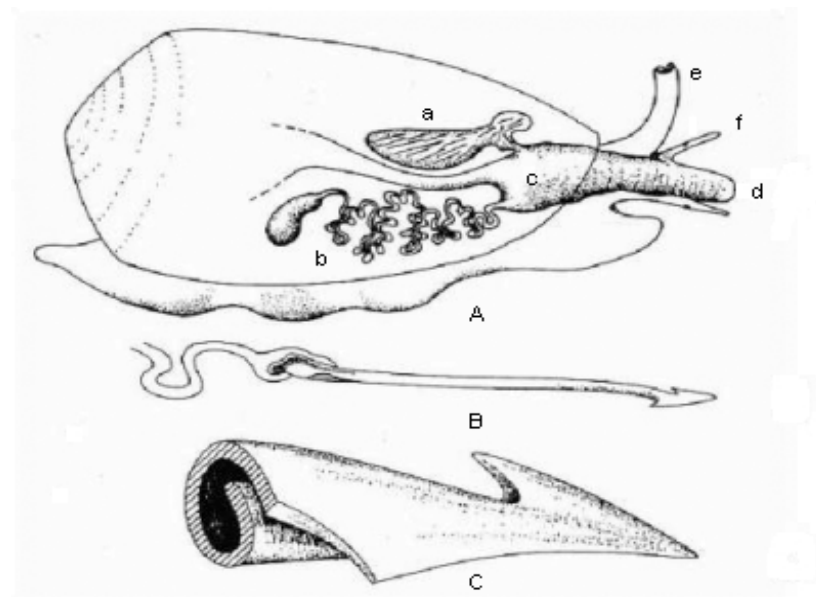


Figura 1. Anatomía del género *Conus*. A: Organización del aparato venenoso y órganos involucrados (a) Saco radular, (b) Bulbo y ducto venenoso, (c) Faringe, (d) Probóscide, (e) Sifón, (f) Pedúnculo ocular. B: Arpón. C: Acercamiento de un arpón. Imagen de <http://molluscs.at/gastropoda/sea/conotoxin.html>.

II.3 Generalidades del veneno del género *Conus*

Terlau y Olivera (2004) reportan una clasificación del veneno de *Conus* en dos grupos de acuerdo a su composición peptídica:

1. Conopéptidos: Con un enlace disulfuro (como conopresina y contrifano), o ningún enlace disulfuro (como contulacina, conantocina y conorfamida).
2. Conotoxinas: Conopéptidos compuestos de múltiples enlaces disulfuro.

En la Figura 2 se muestra un diagrama de flujo mostrando esta clasificación:

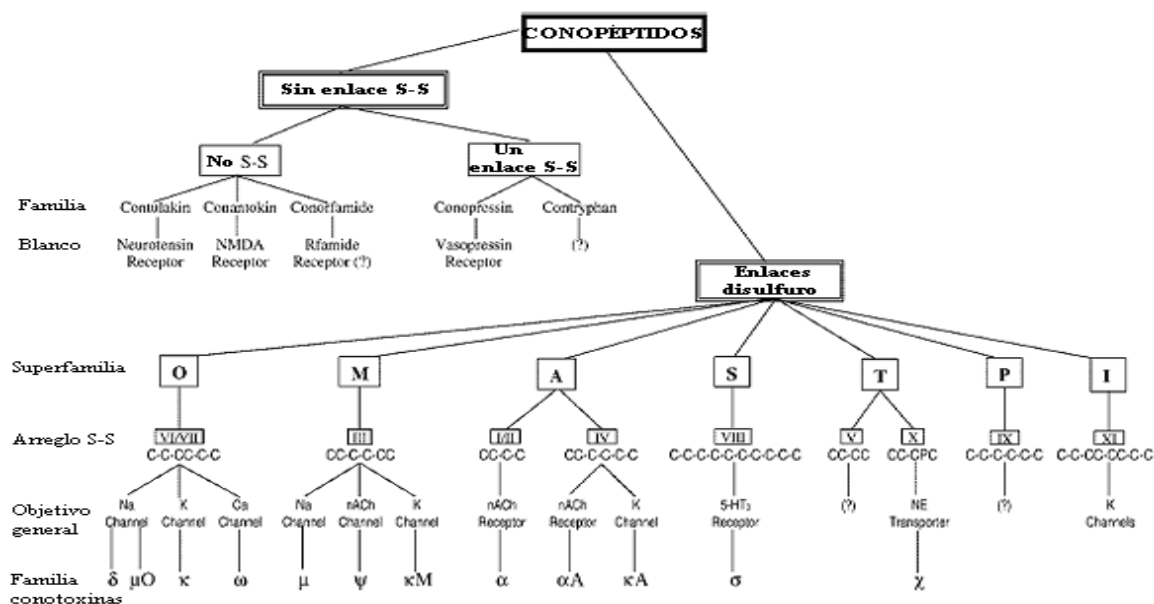


Figura 2. Diagrama de flujo de las superfamilias del género *Conus* indicando los patrones de enlace disulfuro y dianas farmacológicas, donde se dividen en dos clases: las conotoxinas con dos enlaces disulfuro y conopéptidos sin enlaces (no se muestran las familias), así como los patrones característicos de los residuos de cisteína (Terlau y Olivera, 2004).

II.4 Generalidades y clasificación de las conotoxinas

Los caracoles del género *Conus* producen conotoxinas, ésta son un grupo especializado pero estructural y funcionalmente distinto de los péptidos abundantes en enlaces disulfuro, cuyo objetivo es modular la función de determinados canales iónicos ó un receptor en particular (Buczek *et al.*, 2004). De esta manera están descritas hasta el momento cerca de 10 superfamilias de conotoxinas diferentes, las primeras tres tienen una predominancia en los conductos del veneno de la mayoría de las especies de *Conus*, codificando genes de péptidos *Conus* que contienen de 2-3 enlaces disulfuro (Biggs *et al.*, 2000; Terlau y Olivera, 2004; Luo *et al.*, 2010).

Y es más común poseer tres enlaces disulfuro para las conotoxinas paralizantes (piscívoros) (Ashcom y Stiles, 1997). Los péptidos de la misma superfamilia comparten una cisteína (cis) y una secuencia señal altamente conservada en sus precursores, los péptidos dentro de una misma familia tienen en común un único enlace disulfuro y la actividad farmacológica (Wang y Chi, 2004). De acuerdo a esto los péptidos se han agrupado en 12 superfamilias (Tabla I).

Tabla I. Clasificación de las conotoxinas de acuerdo a su configuración de cisteínas. Receptor de acetilcolina, AChR; Canales de potasio dependiente de voltaje, VGKC; Canales de sodio dependiente de voltaje, VGSC; Canales de calcio dependiente de voltaje, VGCC; 5- hidroxitriptamina, 5-HT; N-metil-D-aspartato, NMDA; Receptores acoplados a proteína G, GPCR (Wang y Chi, 2004).

Super familia	Configuración de Cisteínas	Familia	Actividad Farmacológica	Ejemplo
A	CC-C-C	α	AChR Antagonista competitivo	α -GI
	CCC-C-C-C	α	AChR Antagonista competitivo	α -SII
	CC-C-C	ρ	$\alpha 1$ Antagonista receptor adrenérgico	ρ -TIA
	CC-C-C-C-C	αA	AChR Antagonista competitivo	αA -EIVA
	CC-C-C-C-C	κA	bloqueador VGKC	κA -SIVA
M	CC-C-C-CC	μ	bloqueador VGSC	μ -GIIIA
	CC-C-C-CC	ψ	AChR Antagonista no competitivo	ψ -PIIIE
O	C-C-CC-C-C	ω	bloqueador VGCC	ω -GVIA
	C-C-CC-C-C	κ	bloqueador VGKC	κ -PVIIA
	C-C-CC-C-C	δ	Dilatador de la inactivación VGSC	δ -TxVIA
	C-C-CC-C-C	μO	VGSC bloqueador	μO -MrVIB
	C-C-CC-C-C	χ	Marcapasos-bloqueador de canal	χ -PnVIIA
P	C-C-C-C-C-C	Espático	?	gm9a, tx9a
S	C-C-C-C-C-C-C-C	σ	5-HT ₃ Receptor antagonista	σ -GVIIIA
I	C-C-CC-CC-C-C	Excitatorio	?	r11a, r11b
		κI	BK VGKC estimulador	κI -BtXA
T	CC-CC	τ	Bloqueador de canal de Ca ²⁺ presináptico	ϵ -TxIX
		χ	Transportista inhibidor de Noradrelina	χ -MrI
Sin asignación	C-C	Conopresina	Receptor agonista Vasopresina (GPCR)	Conopresina-S
Sin asignación	C-C	Contrifano	?	Contrifano-R
Sin cisteína	lineal	Conantocina	Receptor antagonista NMDA	Conantocinas-G
Sin cisteína	lineal	Contulacina	Receptor agonista de Neurotesina	Contulacina-G

Uno de los diferentes objetivos por parte de las diferentes familias de conotoxinas es la inhibición del dolor, esto posibilita la disección específica de los canales iónicos y receptores esenciales subyacentes del dolor, proporcionando ligandos inéditos con potencial terapéutico contra el dolor (Fusetani y Kem, 2009).

II.4.1 Precursor peptídico

La evolución de los genes de las nueve superfamilias A, M, O, T, S, P, I₁/I₂ y J referidas hasta el momento, cada uno de estos genes precursores codifica para los péptidos de *Conus*, con una secuencia señal NH⁺ terminal (Olivera, 2006). Básicamente, este proceso consta de un precursor pre-propéptido de ~80-100 aa. La organización del precursor es constante: una secuencia señal, una región pre de 20-25 aa altamente conservada en el extremo NH⁺ terminal, una región pro de ~20-40 aa (para la mayoría de las superfamilias) donde la toxina biológicamente activa es producida por corte proteolítico del precursor, un paso esencial en la duración post-traducciona del conopéptido será la toxina madura, de 6-40 aa en el extremo carboxilo terminal (COO⁻) (Buczek *et al.*, 2005; Olivera, 2006).

Se han caracterizado los genes y las modificaciones post-traduccionales de distintos péptidos del género *Conus* en distintos modelos, debido a la creencia de que los cambios post-traduccionales eran adaptaciones bioquímicas muy especializadas en la cascada de la coagulación de la sangre de los mamíferos.

II.5 Generalidades de las α -conotoxinas

Las α -conotoxinas son una familia de conopéptidos (Azam y McIntosh, 2009), de 13 $\pm$ 20 aa de largo (Ashcom y Stiles, 1997; McIntosh *et al.*, 2009). Presentan dos enlaces disulfuros (Ashcom y Stiles, 1997) y bloquean a los nAChRs. Las α -conotoxinas han sido las primeras en ser identificadas y caracterizadas (Hu *et al.*, 1996), se localizan en los caracoles del género *Conus* con alimentación piscívora (McIntosh *et al.*, 2009) y cuyo blanco particular son las distintas isoformas de los nAChRs del SNC y las uniones neuromusculares (Woodward *et al.*, 1990; Azam y McIntosh, 2009).

Basándose en la cantidad de aminoácidos entre los residuos de cis esta familia se ramifica en subfamilias. Por otra parte las isoformas de los nAChRs nativos caracterizados a partir de los subtipos de α -conotoxinas están relacionadas en la modulación de la liberación de los neurotransmisores, la nocicepción y el Parkinson (Azam y McIntosh, 2009).

Los estudios cristalográficos han proporcionado datos de las estructuras de α -conotoxinas y la interacción con los subtipos neuronales y musculares de los nAChRs, además de las transformaciones de las secuencias entre las α -conotoxinas, dan lugar a compuestos farmacéuticamente apropiados para utilizarlos como moléculas en el estudio de los subtipos de receptores (Ashcom y Stiles, 1997).

Las α -conotoxinas son un conjunto de toxinas estructuralmente más sencillas que las α -bungaratoxinas y distintos venenos de víbora, añadiendo que son estructuralmente semejantes a péptidos neurotóxicos y los más diminutos polipéptidos inhibitorios conocidos de los nAChRs, estas α -conotoxinas son bloqueadoras de la transmisión de la señal sináptica neuronal y competidoras por el sitio de unión de la ACh. La potente bioactividad de las α -conotoxinas se relaciona con su adecuada afinidad por las uniones de los nAChRs de *T. californica*, causando una parálisis muscular en ratón en dosis de sub-microgramos, por ejemplo, las α -conotoxinas GI and MI, aisladas de los venenos de *Conus geographus* y *Conus magus* respectivamente (Ashcom y Stiles, 1997).

Las α -conotoxinas poseen un sitio de menor contacto físico, indispensable para una unión eficaz en los nAChRs, por lo que las interacciones entre ligando-receptor se ven favorecidas por estas toxinas (Ashcom y Stiles, 1997). El desarrollo de análogos más potentes y altamente selectivos de las α -conotoxinas fue permitido por la estructura y caracterización de su función. Esto fue posible por el aditamento de fracciones lipofílicas, abriendo una disponibilidad terapéutica por vía oral. La utilización de las α -conotoxinas para la evaluación de los subtipos de los nAChRs es el resultado del progreso de la filogenia y exogenómica (Azam y McIntosh, 2009).

La literatura sugiere la hipótesis del mecanismo del “bloqueo y el muelle” en la cual, propone que las α -conotoxinas tienen dos superficies distintas de reconocimiento llamadas “acoplamiento y bloqueo” en donde existe una interacción con dos sitios de reconocimiento complementarios particularmente con los CIRL. Ya que las conotoxinas sufren breves cambios conformacionales, originando un reconocimiento de las horquillas de unión, estas pudieran participar en el reconocimiento molecular de sus correspondientes receptores (Burlaj, 2000).

II.5.1 Clasificación de las α -conotoxinas

Las α -conotoxinas, se dividen en cuatro grupos funcionales en base al número de residuos de su marco de cis del péptido maduro, por ejemplo: la $\alpha 2/3$ la $\alpha 3/5$, la $\alpha 4/3$ y la subfamilia $\alpha 4/7$ (Russell *et al.*, 2004; Kauferstein *et al.*, 2009). Los péptidos de estas subfamilias tienen como objetivo distintos nAChRs, por ejemplo las conotoxinas $\alpha 3/5$ y $\alpha 4/3$, así como las $\alpha 4/6$ y $\alpha 4/7$ bloquean los nAChRs musculares e inhiben los subtipos neuronales respectivamente por sus residuos entre cis (Jones y Burlaj, 2000; Kauferstein *et al.*, 2009).

De acuerdo a las propiedades estructurales de las α -conotoxinas fueron clasificadas en las siguientes superfamilias (No se muestran en la tabla I): S (α S-conotoxinas), que inhiben a los nAChRs musculares y algunos subtipos neuronales; C (α C-conotoxinas), que inhiben única y específicamente al músculo y la D (α -D-conopéptidos), descubierta recientemente, que se manifiesta en los conopéptidos VxXIIA, VxXIIB y VxXIIC del veneno de *Conus vexillum* inhibiendo selectivamente las subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$ neuronales (Jones y Bulaj, 2000; Russell *et al.*, 2004; Kauferstein *et al.*, 2009).

Los estudios proponen que las α -conotoxinas actúan sinérgicamente con los componentes ganglionares selectivos o que en realidad son un componente integral de una estrategia defensiva de los moluscos (Jones y Bulaj, 2000).

II.6 Elaboración y liberación de las AChBPs

Las proteínas AChBPs maduras son de 210 residuos de longitud, poseen la capacidad de formar un homopentámero estable (Brejc *et al.*, 2001) y codificar para una secuencia de la AChBP, que contiene dos enlaces disulfuro (Sixma y Smit, 2003). Los residuos de aminoácidos se alinean con los dominios pentaméricos N-terminal de los LGIC (Brejc *et al.*, 2001).

En la proteína madura existe una señal NH⁺ terminal que separa la secuencia. En la levadura *Pichia pastoris* se expresan las proteínas recombinantes de las AChBPs fusionándose en homopentámeros inalterables (Sixma y Smit, 2003).

En las células gliales del SNC situadas entre los ganglios y terminales de los axones de *Lymnaea stagnalis* se expresa exclusivamente el 50% del gen que codifica para las proteínas AChBPs reguladas por vía-secretoria, dado que se observaron en el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, en gránulos, vesículas y núcleos. Aún se ignora si la segregación de las AChBPs es resultado de la entrada de Ca²⁺, unido a la activación mediada de los nAChRs gliales producido por un estímulo dependiente de la exposición a la ACh (Sixma y Smit, 2003).

II.6.1 Las AChBPs caracterizadas en distintas especies

En el molusco de *Aplysia californica* y la sanguijuela *Haementeria ghilianii* se ubican genes vinculados con las AChBPs, en este par de especies se sabe que la secuencia de conservación y clonación de sus homólogas es baja y más distal entre las especies de *Caenorhabditis elegans*, *D. melanogaster* y humanos, que aún no reportan homólogos. Entre las AChBPs de *L. stagnalis* y *A. californica*, y *L. stagnalis* y *H. ghilianii* tienen un 33% y 18.2% de identidad de secuencia respectivamente (Sixma y Smit, 2003).

II.6.2 Estructura de las AChBPs

La cristalografía de la AChBP revela formas homopentaméricas formada por cinco protómeros, una estructura de anillo, con un radio de 80 Å y una altura de 62 Å y resolución a 2,7 Å vista perpendicularmente (Brejc *et al.*, 2001; Sixma y Smit, 2003). En la estructura de la AChBP la (Figura 3), se observa que cada protómero es un dominio proteínico sencillo, de forma asimétrica y tamaño aproximado de 62 x 47x 34 Å (Brejc *et al.*, 2001).

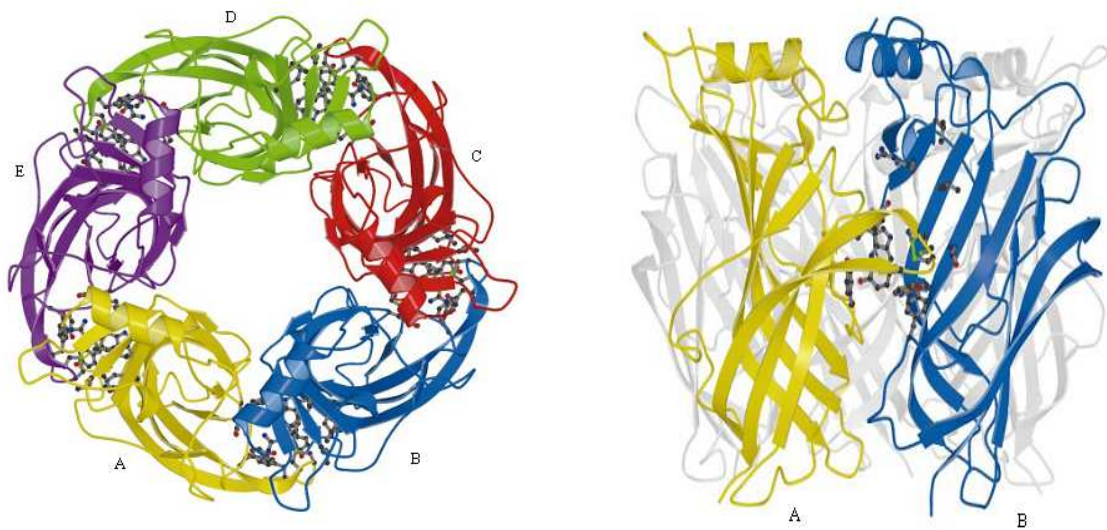


Figura 3. Vista superior de la estructura pentamérica de una AChBP. Cada color indica un protómero diferente, rotuladas con las letras A, B, C, D y E. Se observan los sitios principales y complementarias de unión al ligando con círculos y varas respectivamente (Brejc *et al.*, 2001).

II.6.3 Comparación de las AChBPs con la secuencia de los CIRL

En la estructura cristalizada de los residuos conservados de cis para el núcleo del monómero de la familia de los CIRL es diferente a las AChBPs debido al carácter hidrofóbico de los receptores e hidrófilo en las AChBPs. Identificándose en secuencia del 15%-28% con GABA, glicina y el receptor de serotonina 5HT₃, muestran una mayor similitud con las subunidades del receptor nicotínico entre un 20%-25% de identidad (Sixma y Smit, 2003; Todd *et al.*, 2006).

II.6.4 Farmacología de las AChBPs

Las AChBPs poseen un perfil farmacológico y una semejanza a un receptor nicotínico homopentamérico, como la subunidad neuronal $\alpha 7$ (25% identidad) y $\alpha 9$. Además tiene todos los aminoácidos necesarios para la unión del ligando, su afinidad por ACh es parcialmente débil y fuerte por nic y epi. Muchos de los antagonistas de los nAChRs y algunos muscarínicos, se unen a las AChBPs, tales como: la α -bungarotoxina, *d*-tubocurarina y galamina (Sixma y Smit, 2003; Todd *et al.*, 2006).

II.7 Neurotransmisores

Se estima que del 5% al 10% de las sinapsis en el SNC son de tipo colinérgico (Flores y Segura, 2005). En la literatura se reportan nueve transmisores de bajo peso molecular, de los cuales ocho son aminas; siete de estos son aminoácidos o sus derivados y el último es ATP o sus metabolitos. Por nombrar algunos transmisores de moléculas pequeñas se encuentran las aminas biógenas transmisoras compuestas por catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), serotonina e histamina (precursor-histidina), aminoácidos transmisores (glutamato más común en el SNC y glicina), ATP, adenosina y ACh (Kandel *et al.*, 2000).

II.7.1 Características de la acetilcolina

Probablemente la ACh es la molécula más antigua de señalización, apareciendo desde los inicios de la evolución antes que las células nerviosas, se ubica en las bacterias, algas, protozoos y plantas. También se encuentra relacionada en la comunicación de célula a célula en varios tejidos no neuronales y controla funciones celulares como la proliferación, adhesión, migración, secreción, la supervivencia y la apoptosis de manera autócrina, endócrina y parácrina (Gotti y Clementi, 2004). La ACh se caracterizó en el SNP y el SNC de mamíferos como el primer neurotransmisor en la periferia, es el neurotransmisor del SNP. Dado que no es un aminoácido ni procede directamente de alguno de estos, es un transmisor de bajo peso molecular. Independiente de su carácter como neurotransmisor, como se muestra en la (Figura 4) la ACh interviene en la regulación de funciones fisiológicas como la activación cortical, los procesos de sueño a vigilia y el desarrollo de la memoria y asociación (Flores y Segura, 2005).

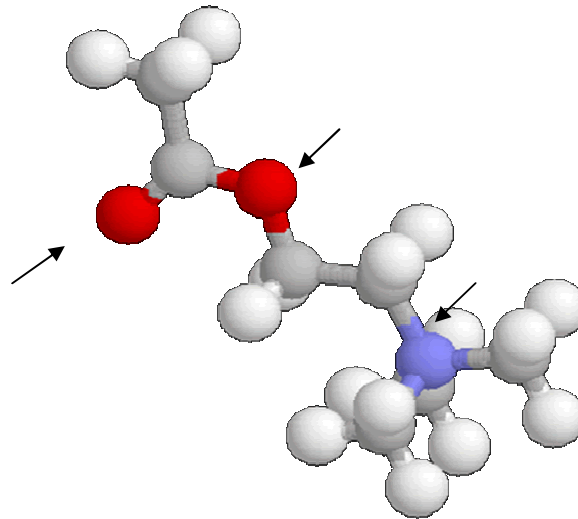


Figura 4. Estructura química tridimensional de la molécula de acetilcolina ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), compuesta de un éter del ácido acético y una colina. Las flechas señalan a los átomos claves implicado en el modelo farmacóforo de la unión del ligando nicotínico colinérgico (Ward, 1990). Sintetizada a partir de la acetilcoenzima A (acetyl CoA) y colina (Lodish *et al.*, 2005). Imagen de <http://www.javeriana.edu.co>.

II.8 Generalidades de los canales iónicos

Los cambios rápidos en la diferencia del potencial de membranas celulares dan como resultado la señalización neuronal. Estas diferencias del potencial de membrana están moderadas por canales iónicos, que se remontan desde finales del siglo XIX, los canales iónicos son una clase de proteínas integrales de membrana que se localizan en todas las células del cuerpo, estos canales conducen iones a elevadas velocidades a través de las membranas musculares y nerviosas.

Los canales iónicos poseen tres considerables propiedades: 1.- La conducción de iones, 2.- Reconocimiento y selección específica de iones y 3.- Apertura y cierre en réplica a señales eléctricas, mecánicas o químicas específicas. Por estos canales pueden llegar a pasar hasta 100 millones de iones por segundo, sin dejar de ser altamente selectivos (Kandel *et al.*, 2000).

II.8.1 Tipos de canales iónicos

Dado que no hay un criterio estandarizado de agrupación para la clasificación de los canales iónicos en la literatura, se puede encontrar de la siguiente manera:

- Canales Voltaje-dependientes.
- Canales regulados por ligandos (ionotrópicos).
- Canales activados por segundos mensajeros, a través de proteínas G (metabotrópicos).
- Otros canales (canales regulados mecánicamente, Gap junctions, canales iónicos en células del sistema inmune, canales iónicos en bacterias, hongos, protozoos y virus (Kandel *et al.*, 2000).

II.8.2 Canales iónicos regulados por ligandos

La rápida transmisión sináptica se encuentra modulada por los CIRL por medio de los *cys loop*. Esta superfamilia de CIRL posee una estructura altamente conservada de residuos de *cis* (Jones y Bulaj, 2000; Brejc *et al.*, 2001).

Estos CIRL forman una estructura (Figura 5) de pentámeros (heteroméricos u homoméricos) (Terlau y Olivera, 2004; Norton y Olivera, 2006) y cada subunidad (o monómero) del pentámero goza de un dominio extracelular amino terminal (NH⁺) conservado de unión al ligando, de 210 residuos de aminoácidos y cuatro hélices transmembranales con extremo carboxilo terminal (COO⁻) (M1-M4) (Jones y Bulaj, 2000; Sixma y Smit, 2003; Talley, 2006; Nasiripourdori *et al.*, 2009), también cada subunidad es específica y selectiva para cada ligando e iones permeables respectivamente (Norton y Olivera, 2004; 2006).

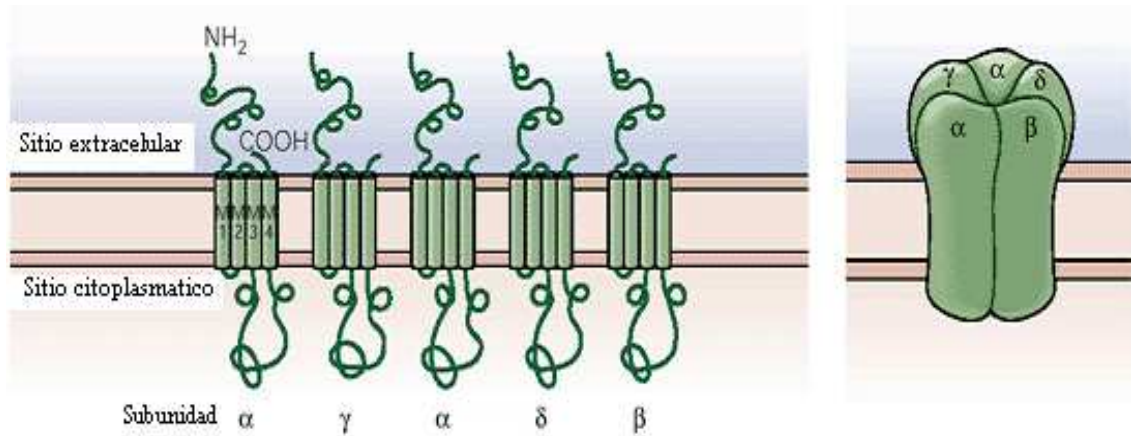


Figura 5. Subunidades de los nAChRs y dominios con sus cuatro hélices transmembrana por subunidad (modificado de Kandel *et al.*, 2000).

Las uniones de los ligandos se realizan en el dominio NH_2^+ y se transmite una señal a la hélice M2 transmembrana. Los canales de cationes o aniones son selectivos, dependiendo de los residuos en el dominio M2 (Sixma y Smit, 2003), la unión de un ligando endógeno al dominio extracelular produce un cambio conformacional para las hélices M2 dando como resultado la apertura del canal (Jones y Bulaj, 2000).

El *cys loop* M2/M3 extracelular tiene una probable función bloqueadora del canal, mientras que el *cys loop* M3/M4 tiene la función de regulación debido a su longitud citoplasmática variable por las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación o ubiquitinación (Sixma y Smit, 2003).

II.8.3 Receptores colinérgicos

En la actualidad se ha determinado por medio de técnicas de clonación molecular dos tipos de receptores: nicotínicos (ionotrópicos) y muscarínicos (metabotrópicos). Los nAChRs fueron purificados, clonados y denominados también como CIRL, la estructura mostrada en la Figura 6 de estos receptores abren sus canales al unirse el neurotransmisor dejando entrar abundantes iones, provocando el cambio súbito del potencial de membrana, generando una respuesta celular instantánea (Flores y Segura, 2005).

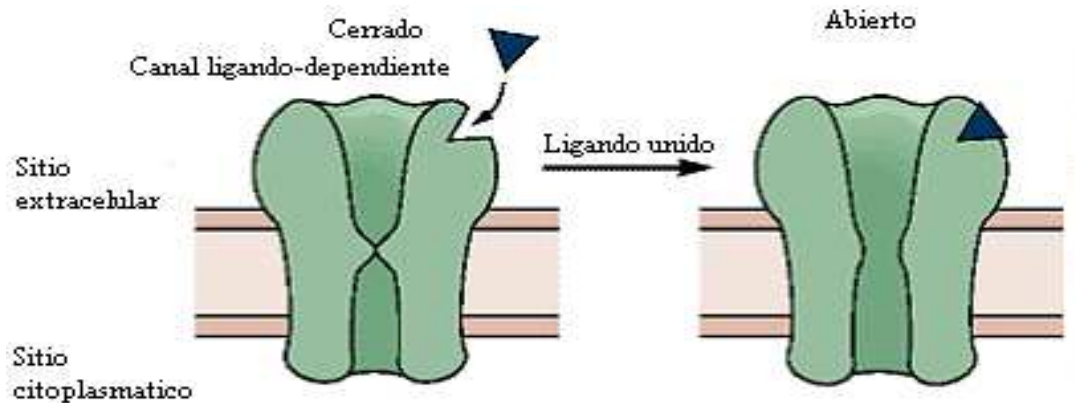


Figura 6. Se observa la apertura de un canal iónico por la unión de un neurotransmisor al nAChR (modificado de Kandel *et al.*, 2000).

II.8.3.1 Clases de receptores nicotínicos de acetilcolina

En diferentes áreas del SNC y SNP se localizan distribuidos los nAChRs, estos receptores muestran un patrón de expresión transitoria y espacial exclusivo, siendo estos causantes de múltiples acciones fisiológicas de la ACh (Flores y Segura, 2005). Se encuentran bien definidos dos subtipos de estructuras de nAChR: musculares (Figura 7a) y neuronales, las primeras están conformadas de dos subunidades $\alpha 1$ y una $\beta 1$, δ y γ ó ϵ . Cada grupo de subunidades está integrado por diversas proteínas altamente homólogas (35-40% Lodish *et al.*, 2005). Existen diez clases diferentes de subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), cuatro de las β ($\beta 1$ - $\beta 4$) y una de las γ , δ y ϵ respectivamente clonadas (McIntosh *et al.*, 2009). Distintos ligandos y la ACh interactúan con el ECD de ambas subunidades α , sin embargo cooperan importantemente las subunidades contiguas con propiedades únicas de unión.

Por ejemplo, en los nAChRs las regiones α/δ y α/γ poseen una afinidad de unión distinta para las α -conotoxinas (Ashcom y Stiles, 1997). En las dos subunidades α se ubican los sitios de unión a la ACh (Figura 7b), que tienen dos residuos de cis próximos entre sí y necesarios para el reconocimiento del agonista, carentes en las subunidades restantes. Las diversas funciones fisiológicas, localizaciones y organización de las subunidades son producto de las dos distintas formas moleculares; la homopentamérica ($\alpha 7$ y $\alpha 9$) y la heteropentamérica ($\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 1\beta 1\gamma\epsilon$) de los nAChRs (Talley, 2006; Nasiripourdori *et al.*, 2009).

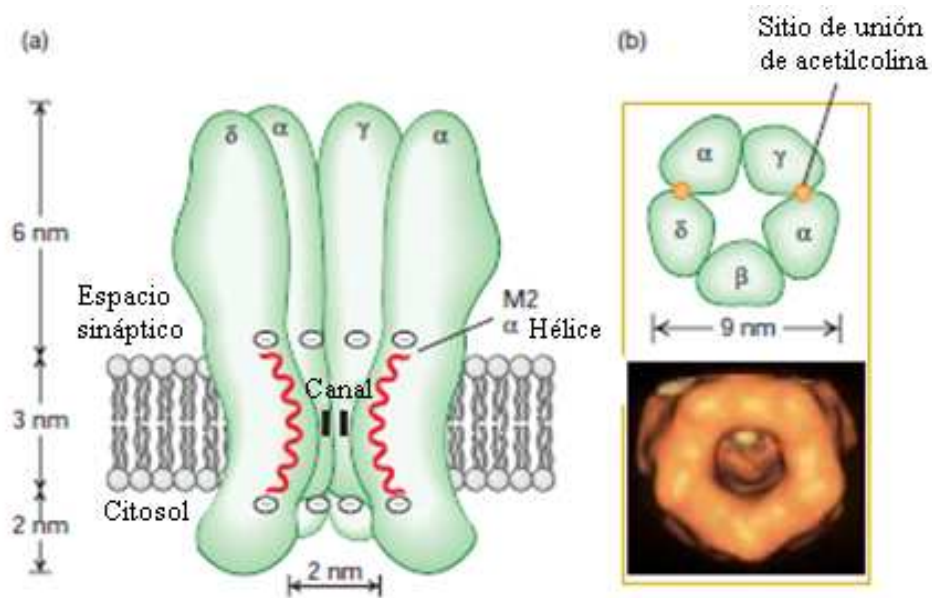


Figura 7. (a) Estructura de un modelo de un nAChR muscular. (b) Corte transversal de la cara exoplasmática del receptor, donde se observan las subunidades alrededor del poro central además de los dos sitios de unión de la acetilcolina; *abajo*: misma imagen por microfotografía electrónica (Lodish *et al.*, 2005).

Los nAChRs neuronales son menos complejos que los musculares y de estequiometría variable, también están formados por heteropentámeros de las subunidades α ($\alpha 2-10$) y β ($\beta 2-4$) (Sixma y Smit, 2003). Esta combinación α - β genera una gran diversidad de los nAChRs neuronales mostrando varias propiedades farmacológicas (Flores y Segura, 2005; Loughnan *et al.*, 2009), lo importante radica en conocer las combinaciones de los nAChRs más frecuentes en el SNC y cuál es su localización precisa, el cual permitirá saber el alcance de sus disfunciones y sus posibilidades terapéuticas (Flores y Segura, 2005).

Los nAChRs neuronales se ubican tanto pre como postsinápticamente en el SNC y SNP mientras que los nAChRs musculares sólo se ubican postsinápticamente en el músculo esquelético y uniones neuromusculares (Sixma y Smit, 2003; Luo *et al.*, 2010). Los nAChRs neuronales presinápticos sugieren, por su evidencia funcional, la regulación de la secreción de neurotransmisores en varias partes del cerebro liberando ACh, NA, DA, glutamato y GABA (Gotti *et al.*, 1997).

Uno de los principales problemas de los nAChRs neuronales además de la ubicación, función y distribución entre otros, son la aplicación de estudios preclínicos para una terapéutica adecuada, debido a la falta de antagonistas selectivos identificados y caracterizados, esto permitiría un conocimiento exacto sobre los efectos colaterales relacionados con las isoformas sutiles de los receptores (Jones y Bulaj, 2000). A partir de las estructuras de las AChBPs se han concebido diversos modelos de los nAChRs. Estos modelos son intrínsecamente imprecisos dado a su débil homología de <25% de identidad, estas similitudes al ser más altas, son parcialmente mejores (Sixma y Smit, 2003).

Por otra parte los receptores neurales se dividen en base a su comportamiento en dos grupos: en los inhibitorios como la α -bungarotoxina (veneno de la cobra *Bulgarus multicinctus*) y agonistas de la epi (Sixma y Smit, 2003). Además el 90% de todos los receptores neurales de alta afinidad contienen las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ (Vásquez-Palacios y Bonilla, 2004).

II.9 Ligandos que afectan la función de unión de los nAChRs neuronales

Anabaseína

Es un compuesto encontrado en algunas especies de hormigas y aislado originalmente de gusanos marinos (Kem *et al.*, 1997). Es un agonista de tipo muscular y para la subunidad $\alpha 7$ de los nAChRs (Hibbs *et al.*, 2009). Las diferencias entre la nic y Anab a nivel molecular se observan en esta última al tener un anillo tetrahidropiridil cuya imina es un enlace doble conjugado con el anillo de 3-piridilo (Gotti *et al.*, 1997; Kem *et al.*, 1997).

Epibatidina

La epibatidina (epi) es un potente neurotóxico que se aisló en 1992 (Daly, 2005) del veneno de la piel de la rana ecuatoriana *Epipedobates tricolor* (Gotti *et al.*, 1997; Flores y Segura, 2005; Carroll *et al.*, 2007). Es un poderoso alcaloide azabicyclo-heptano de acción acetilcolinérgico nicotínico de tipo agonista (Gotti *et al.*, 1997; Carroll *et al.*, 2010), además posee un átomo de Cl^- y tiene una similitud estructural con Nic (Flores y Segura, 2005; Gotti *et al.*, 1997).

Nicotina

Posselt y Reiman (1828), aislaron por primera vez la nicotina de las hojas de tabaco de *Nicotiana tabacum* cuya estructura se observa en la Figura 8 y fue utilizada desde 1746 en el uso de infusiones de hojas de tabaco para obtener Nic, como su inicial alcaloide naturalmente líquido que posee un $pK_a = 8.5$ activo en un 14% (Brunton *et al.*, 2006), además de contener nornicotina y anabasina (Foye, 1991). Al ser la nic un análogo de la ACh, sus acciones farmacológicas actúan sobre el SNP, aparato cardiovascular, tubos digestivos, glándulas exocrinas, absorción, destino y eliminación (Gotti *et al.*, 1997; Brunton *et al.*, 2006).

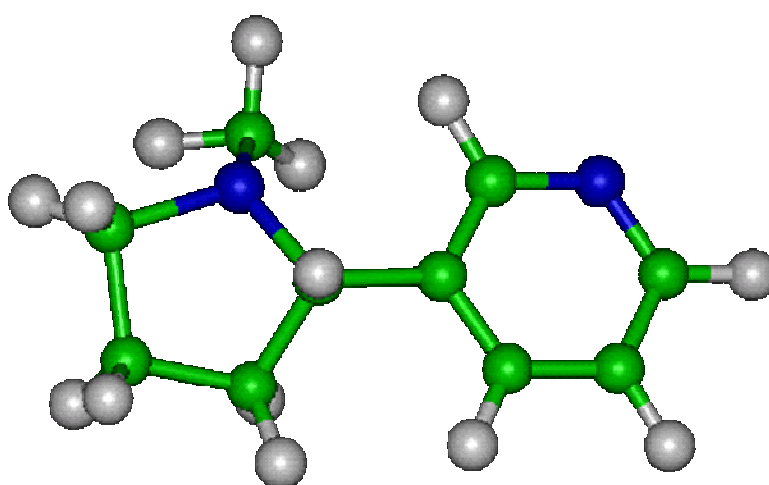


Figura 8. Estructura química tridimensional de nicotina ($C_{10}H_{14}N_2$), se muestra con color verde al carbono, de gris al oxígeno y de azul al Nitrógeno. Imagen de http://www.edinformatics.com/interactive_molecules/infor/nicotine.htm.

MLA

La N-metillicaonitina (MLA) es otro alcaloide bloqueador nicotínico presente en las semillas de *Delphinium brownii* como componente tóxico. Usadas sus hojas por sus cualidades de insecticida, se cree que su actividad surge del potente antagonismo de los nAChRs del insecto por MLA (Ward, 1990; Gotti *et al.*, 1997).

II.10 Distribución y localización anatómica cerebral humana de los nAChRs neuronales

La distribución de los receptores nAChRs neuronales no excluye la existencia de una disminución de los receptores con el factor de la edad. La localización subcelular y subunidades necesitan ser aclaradas por completo al igual que el sistema colinérgico del cerebro humano (ratas y monos). Los grupos más importantes de las neuronas colinérgicas se encuentran en el cerebro anterior basal, el diencéfalo, el cuerpo estriado, el tronco cerebral y la médula espinal (Gotti *et al.*, 1997).

II.11 Localización no cerebral de los receptores nicotínicos neuronales

La localización y la función extraneuronal de los nAChRs neuronales no son exclusivas de la transmisión sináptica, encontrándose distribuidos en distintas células (Gotti *et al.*, 1997) como se muestra en la Tabla II:

Tabla II. Función y localización extraneuronal de las subunidades de los nAChRs.

Localización	Subunidades	Función	Referencia
Astrocitos	$\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 3$ y $\beta 4$	Se ignora	Gotti <i>et al.</i> , 2004.
Músculo	$\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 4$, $\beta 2$ y $\alpha 3\beta 2$	Se ignora	Gotti <i>et al.</i> , 1997; 2004.
Piel	$\alpha 3$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$ y $\beta 4$	Mediar el desarrollo y la fisiología de la piel, como: proliferación de queratinocitos, la apoptosis, la diferenciación, la adhesión y motilidad.	Gotti <i>et al.</i> , 1997; 2004.
Tejido linfoide	$\alpha 4$ $\alpha 7$ $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$ $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$	Modular los nAChRs neuronales en el timo, células T y epiteliales. En el tejido linfoide humano se desconoce su función.	Gotti <i>et al.</i> , 1997; 2004.
Células pulmonares	¹ $\alpha 3$, $\alpha 5$ y ² $\alpha 7$ $\alpha 4$, $\alpha 7$ y ³ $\beta 2$	Procesar elevadas concentraciones de humo proveniente del cigarrillo.	Gotti <i>et al.</i> , 2004.
Macrófagos	$\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$	Modulación de la disminución de la liberación de TNF α e interleucinas 1, 6 y 12 inducida por el polisacárido endotoxina (LPS).	Kalamida <i>et al.</i> , 2007; Gotti <i>et al.</i> , 2004.
Tejido vascular	⁴ $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 4$, β y ⁵ $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 10$	Formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) y aumento de la proliferación de las células endoteliales.	Gotti <i>et al.</i> , 2004.

¹Bronquiales.

²Alveolares.

³Cuerpos epiteliales.

⁴Células endoteliales.

⁵Músculo liso vascular.

II.12 Participación y relación de los nAChRs neuronales en las patologías

El estudio de los sistemas y receptores colinérgicos del SNC ha generado gran interés, debido a que diversas alteraciones en las transmisiones colinérgicas han sido relacionadas directa o indirectamente con los nAChRs (Flores y Segura, 2005). El estudio de las funciones como la cognición, aprendizaje y desarrollo, la memoria y atención, demuestran la participación e implicación de los nAChRs neuronales. A diferencia de los nAChRs musculares, los neuronales no están caracterizados por completo (Gotti *et al.*, 1997; Gotti y Clementi, 2004; Flores y Segura, 2005; Kalamida *et al.*, 2007; Kauferstein *et al.*, 2009).

II.12.1 Enfermedades neurológicas degenerativas que afectan el sistema nervioso dependiente de la edad

Autismo

Este trastorno del desarrollo está coligado con estructuras del cerebro, estudios de neuropatología, han demostrado anomalías en dicho órgano. La pérdida de la función de los nAChRs de la corteza cerebral se ha asociado al sistema neurotransmisor colinérgico. Las subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 4\beta 2$ se han descubierto significativamente reducidas y aumentadas las $\alpha 7$ respectivamente (Gotti y Clementi, 2004; Kalamida *et al.*, 2007).

Déficit de atención con hiperactividad

Esta enfermedad se distingue por un patrón constante de falta de atención e hiperactividad o distracción a un alto grado. La sintomatología se presenta durante la infancia persistiendo en un 50% hasta la edad adulta, mostrando también una tendencia del 40% a fumar, a diferencia de un 23 a 30% en la población común (Kalamida *et al.*, 2007). En estudios *in vivo* con ratas, las subunidades $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ de los nAChRs resultaron involucradas con la función de la atención y la memoria respectivamente (Gotti y Clementi, 2004).

Esquizofrenia

Esta es una enfermedad con una alta predisposición genética e idiopática a nivel molecular. Es un trastorno mental que se caracteriza por alucinaciones y delirios, la fisiopatología en los pacientes esquizofrénicos señala una implicación directa de la subunidad $\alpha 7$ de los nAChRs neuronales y elevadas mutaciones funcionales en el mismo. Estudios de unión post-mortem con receptores nicotínicos revelan alteraciones de la expresión en las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ cerebrales (Gotti *et al.*, 1997; Gotti y Clementi, 2004; Kalamida *et al.*, 2007).

Síndrome de Tourette

Esta es una enfermedad crónica y de índole neuropsiquiátrico, el cual se caracteriza por persistentes perturbaciones de los movimientos extrapiramidales y vocalizaciones. Aunque no hay pruebas directas de la implicación de los nAChRs en este síndrome, el efecto positivo de la administración de nic sugiere que éstos pudieran tener una implicación en dicha enfermedad (Gotti *et al.*, 1997; Gotti y Clementi, 2004).

II.12.2 Enfermedades neurológicas degenerativas que afectan el sistema nervioso Independiente de la edad

Epilepsias

Se sabe que las epilepsias afectan al 2% de la población pero molecularmente son desconocidas. En estudios genéticos los canales iónicos han demostrado su participación en la patofisiología de las epilepsias idiopáticas (Gotti *et al.*, 1997; Gotti y Clementi, 2004).

- Epilepsia nocturna del lóbulo frontal. (cromosoma 20q13.2-q13.3, que contiene el gen que codifica la subunidad $\alpha 4$).
- Epilepsias hereditarias.

II.12.3 Enfermedades neurológicas degenerativas que afectan el sistema nervioso relacionado con la edad

Parkinson

La degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas (DA) en la enfermedad de Parkinson origina un predominio colinérgico, con hipertonía y rigidez (Flores y Segura, 2005). A quedado demostrada la participación de los nAChRs neuronales en esta enfermedad neurodegenerativa que involucra un trastorno del movimiento adicionando la pérdida bien establecida de las DA. Las subunidades $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 6\beta 3\beta 2$ de los nAChRs agonistas han demostrado tener resultados de protección por el consumo de tabaco (Gotti y Clementi, 2004; Kalamida *et al.*, 2007).

Alzheimer

En esta enfermedad se presentan trastornos psiquiátricos o neurológicos degenerativos. El número de los nAChRs neuronales en el cerebro se reduce, en ausencia de una disminución general del número de las neuronas (Gotti *et al.*, 1997; Gotti y Clementi, 2004).

Pénfigo vulgar

Es una enfermedad autoinmune de los queratinocitos, en la cual las células epidérmicas pierden adherencia, provocando ampollas en la piel o mucosa oral. Para la subunidad $\alpha 9$ de los nAChRs se han identificado una respuesta inmune y bajo nivel de queratinocitos en muchos subtipos (Kalamida *et al.*, 2007).

Se muestra un resumen en la Figura 9 de las patologías psiquiátricas y neurológicas degenerativas descritas, que afectan el sistema nervioso dependiente, independiente y relacionado con la edad.

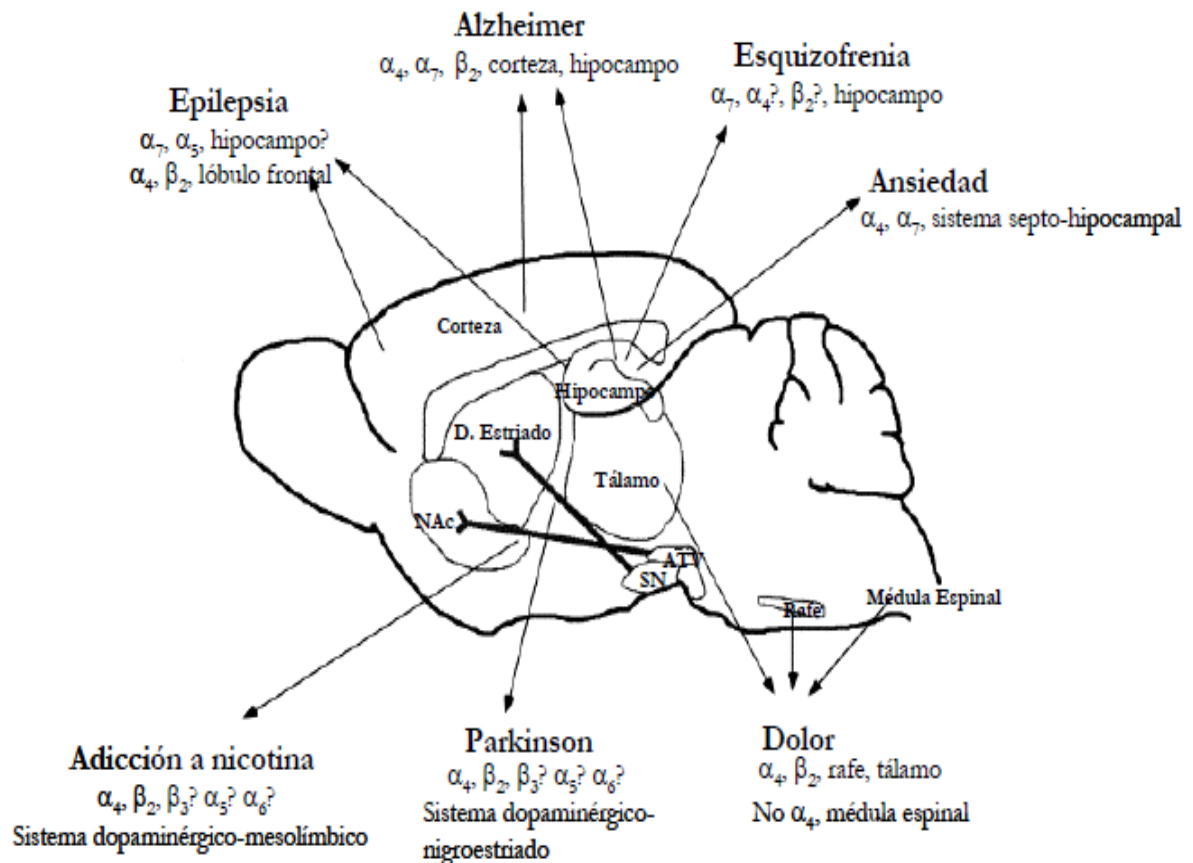


Figura 9. Resumen de algunas patologías psiquiátricas y neurológicas en un corte sagital de cerebro donde se muestran las principales áreas de localización de las subunidades nicotínicas y su implicación en su etiología. NAc: núcleo acumbens; ATV: área tegmental ventral; SN: sustancia nigra (Picciotto *et al.*, 2001).

II.13 Localización de los nAChRs neuronales en tejidos y células no neuronales.

La adicción a fumar

En el cerebro los subtipos $\alpha_4\beta_2$ y α_7 de los nAChRs neuronales, están asociados con la adicción a la nic ya que la exposición repetida a ésta sensibiliza a la subunidad $\alpha_4\beta_2$ y aumenta los receptores nicotínicos funcionales en el cerebro. En los cánceres de pulmón de células pequeñas se ha localizado la subunidad α_7 expresada, en experimentos *in vitro* que proponen el cese del tumor maligno mediante el bloqueo de estos receptores con α -neurotoxinas o α -conotoxinas (Gotti *et al.*, 1997).

Tumor de células de pulmón

Los nAChRs neuronales se han implicado en una serie de enfermedades caracterizadas por la proliferación celular, también se vincula el consumo de tabaco con carcinoma pulmonar de células pequeñas (CPCP). Este CPCP expresa las subunidades $\alpha 3$ - $\beta 4$ y $\alpha 7$ de los nAChRs, controlando probablemente a la subunidad $\alpha 7$ de forma autocrina la tasa de proliferación de estas líneas celulares. Entre los más de 2000 componentes del tabaco, la nic y alcaloides relacionados pueden unirse y estimular a los nAChRs (Gotti *et al.*, 1997; Gotti y Clementi, 2004).

Otras células del pulmón

Los nAChRs neuronales también están ubicados en las células epiteliales bronquiales humanas y de ratón. Estas células expresan las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 2$, $\beta 4$ y $\alpha 7$ formando canales iónicos permeables a Ca^{2+} . A altas concentraciones en el pulmón, la nic puede activar la subunidad $\alpha 7$ en los receptores de los macrófagos de dicho órgano, lo que inhibe la liberación de factor de necrosis tumoral (TNF α) y citocinas proinflamatorias (Gotti y Clementi, 2004).

Control presión arterial

Los nAChRs neuronales se han localizado en el núcleo del tracto solitario entre otros, esto sugiere su relación con la regulación de la presión sanguínea, PA e hipertensión. Esta relación fue demostrada en estudios con ratas hipertensas (SHR). Con una disminución de las subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 4$ de los nAChRs neuronales en la corteza cerebral, el tálamo, mesencéfalo, bulbo raquídeo y médula espinal (Gotti y Clementi, 2004).

Epitelio intestinal

La evidencia sugiere que los nAChRs neuronales están implicados en la enfermedad inflamatoria intestinal debido a la disminución de la secreción de $\text{TNF}\alpha$ y citotoxinas proinflamatorias por los macrófagos a través de la activación de la subunidad $\alpha 7$ y los efectos divergentes de nic en los niveles de citoquinas en la mucosa del colon (Gotti y Clementi, 2004).

II.14 Enfermedades relacionadas con los nAChRs musculares

Miastenia gravis (MG)

La presencia de anticuerpos en la Miastenia Gravis (MG) la convierte en una enfermedad de tipo autoinmune, caracterizada por la disminución de los nAChRs musculares (Gripo y Gripo, 2001), dado que la actividad sináptica no es absolutamente dependiente de la función cerebral. Pero también, la mayoría de los órganos están íntimamente controlados por la actividad sináptica (Fusetani y Kem, 2009).

Tanto el timo como las células B del sistema inmune se activan provocando la destrucción de los nAChRs prosinápticos en la unión neuromuscular (Gripo y Gripo, 2001). En un 80-90% de los casos con MG se han encontrado (Ferrer, 2000) anticuerpos antinucleares, antitiroides y anti-gammaglobulina. La MG es caracterizada por una debilidad muscular fluctuante y fatiga en diversos grupos musculares, desde la facial hasta la musculatura deglutoria, del tronco y extremidades ptosis palpebral y episodios de diplopía ocasional, así como afectación respiratoria en las formas con afectación bulbar importante, en los casos más severos (Martin *et al.*, 2002).

III. HIPÓTESIS

En el veneno de *Conus californicus* existe un componente modulador específico que interactúa con el análogo del receptor de acetilcolina Ac-AChBP₂.

IV. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general:

Identificar mediante ensayos de unión a la proteína análoga Ac-AChBP₂, un componente del veneno del caracol marino *Conus californicus* con actividad moduladora sobre los receptores de acetilcolina.

III.2 Objetivos específicos:

III.2.1 Separar los componentes de la fracción soluble del veneno total del caracol marino *Conus californicus*, mediante HPLC-RP.

III 2.2 Determinar la actividad moduladora de las fracciones del veneno de *C. californicus*, mediante ensayos de unión y competencia sobre el análogo del receptor de acetilcolina Ac-AChBP₂ empleando fluorescencia.

III 2.3 Determinar el potencial modulador de las fracciones del veneno de *C. californicus*, mediante ensayos de unión y competencia sobre el análogo del receptor de acetilcolina Ac-AChBP₂ empleando radioactividad.

V. METODOLOGÍA

V.1 Obtención de los especímenes de *Conus californicus*.

Los caracoles marinos *Conus californicus* fueron recolectados a una distancia intramareal de la zona costera en una socavación producida por el oleaje en el suelo rocoso de la playa, sobre la arena y bajo pastos marinos, en el Km 103 de la carretera Tijuana-Ensenada y Km 39 de la carretera Tijuana-Rosarito B.C., México. El calendario de recolecciones (día y hora) fue realizado considerando el programa de predicción de mareas del C.I.C.E.S.E. (<http://oceanografia.cicese.mx/predmar/>).

V.2 Manejo del caracol *Conus californicus*.

Después de la caracterización morfológica en el sitio de la recolección, los caracoles fueron trasladados y mantenidos en las instalaciones del C.I.C.E.S.E. bajo las siguientes condiciones: peceras con una cama de arena en el fondo, con un flujo constante de agua de mar, a una salinidad de 32 ppm, aeración en un sistema abierto y una temperatura de 22 °C. Inicialmente, los caracoles fueron alimentados semanalmente con poliquetos y posteriormente, con camarones y peces.

V.3 Obtención de los conductos venenosos

El veneno total fue obtenido a partir de 225 caracoles, procedentes de tres colectas realizadas en el periodo mayo-junio de 2009, mediante la disección y aislamiento de los conductos venenosos. Brevemente, las conchas fueron fragmentadas en forma mecánica (Figura 10a), una vez liberados los organismos de la concha, se procedió a la disección de la parte anatómica denominada “pie” para extraer (con ayuda de unas pinzas y tijeras) los conductos venenosos y descartar el bulbo venenoso. Todo el procedimiento se realizó a una temperatura ambiente de 22-24 °C, con los cuerpos de los organismos sobre una superficie plana y previamente sanitizada (Figura 10b).

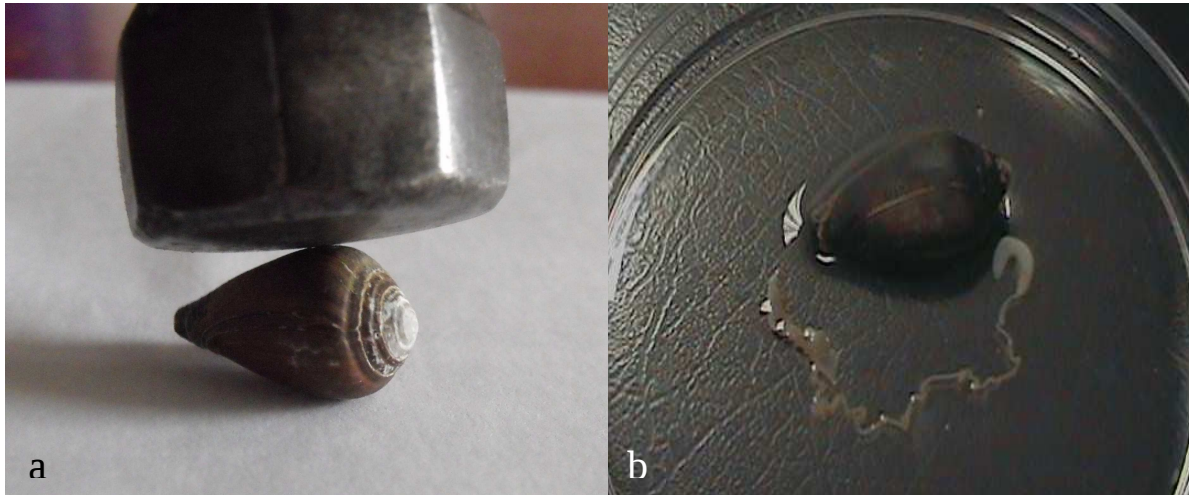


Figura 10. Fotografía del proceso de obtención del veneno de *Conus californicus*, a partir de la extracción de ductos venenosos. (a) Fraccionamiento de la concha del caracol por acción de fuerza mecánica. (b) Ducto venenoso del caracol. Se aprecia el cuerpo del organismo y algunas de las partes, tales como el ducto, el bulbo venenoso y la faringe. Imágenes cortesía del M. en C. Oscar Martínez y del Dr. Alexei Licea respectivamente.

V.4 Extracción del veneno de *Conus californicus*

Una vez separadas y extraídas las rádulas del caracol, los ductos venenosos se homogenizaron en frío, utilizando un homogenizador de vidrio (Wheaton), empleando una relación de 500 μ L de la solución C (**Ver anexo 2**) por cada 20 ductos venenosos. Enseguida, se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm durante 10 min y -5°C , recolectándose la fracción soluble de veneno total (extracto crudo) para su conservación a -80°C (Revco).

Posteriormente, Las fracciones solubles congeladas se liofilizaron utilizando una liofilizadora Lyph-Loc 6 (Labconco) a -52°C y una presión constante de 0.140 mbar durante 24 h. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta la separación de sus componentes mediante HPLC-RP. La cuantificación del veneno se llevó a cabo por el método de diferencia de peso (en una balanza analítica). Después de cuantificado, se resuspendió en solución A (**Ver anexo 2**), se separó en alícuotas de 20 mg y se volvió a liofilizar (utilizando las condiciones anteriores).

V.5 Separación de los componentes del veneno de *Conus californicus* mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (HPLC-RP)

Los componentes de la fracción soluble del veneno de *C. californicus* se fraccionaron de acuerdo a sus tiempos de retención, obtenidos por HPLC-RP utilizando el cromatógrafo Agilent Technologies 1100. Se utilizó la columna analítica Vydac 218TP54 (C₁₈, 4.6 mm i.d. x 250 mm, 300 Å) con la pre-columna Zorbax C₁₈ (Zorbax-Agilent Technologies). Las columnas se equilibraron durante una hora con la solución A (**Ver anexo 1**) y se empleó un ducto de inyección (*loop*) de 200 µL, equivalentes a 4-5 mg de la muestra.

Se inyectaron la muestras y fueron purificadas utilizando las siguientes condiciones cromatográficas, a temperatura ambiente: un lavado inicial de 5 min con 100% de la solución A, seguido de una separación durante 60 min utilizando un gradiente lineal de 0 a 60% de la solución B (**Ver anexo 1**), con un incremento de 1 % por minuto y una velocidad de flujo de 1 mL/min. El contenido peptídico de cada fracción fue determinado mediante espectrofotometría UV a una longitud de onda de 230 nm. Las fracciones colectadas se congelaron a -80 °C, inmediatamente se liofilizaron y se almacenaron a -4 °C.

V.6 Repurificación de los componentes del veneno de *Conus californicus* mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (HPLC-RP)

La repurificación se realizó mediante HPLC-RP, a partir de las primeras corridas purificadas de las fracciones del veneno de *C. californicus*. Los gradientes de repurificación se diseñaron considerando el porcentaje de solución B presente al momento de la elución de cada fracción, calculado a partir de su tiempo de retención. Una vez calculadas las condiciones cromatográficas de la repurificación, se procedió a resuspender la fracción a repurificar. Para las repurificaciones, se utilizó la columna analítica Vydac 218TP51 (C₁₈, 1.0 mm i.d. x 250 mm, 300 Å) con la misma pre-columna. Las columnas se equilibraron durante media hora con la solución A y se empleó un *loop* de 20 µL, equivalentes a 0.2 mg de la muestra. Las condiciones cromatográficas fueron similares a las anteriores, a excepción del incremento lineal y la velocidad de flujo (0.1 mL/min). El contenido peptídico y las condiciones de almacenamiento fueron similares a las descritas anteriormente.

V.7 Propuesta de evaluación del potencial modulador de receptores de acetilcolina

Para identificar componentes del veneno de *Conus californicus* con potencial modulador de receptores de acetilcolina, se realizaron dos variantes de un ensayo de unión y competencia utilizando las proteínas solubles de unión a acetilcolina del molusco marino *Aplysia californica* (Ac-AChBP₂-mt) de tipo mutante la cual posee una mejor expresión pero con la misma funcionalidad que una Ac-AChBP₂-wt de tipo silvestre y *Ls*-AChBP₁-wt durante el proyecto, por lo cual se detalla el tipo de proteína de unión en cada ensayo. Para este fin, se utilizó a (nic), (epi) y fracciones del veneno total como controles de competencia y al análogo de anab DMXBA (3-[2,4-dimetoxibencilideno]-anabaseína o epibatidina radiomarcada con tritio (³H-Epi) como ligandos de proximidad y desplazamiento (todos éstos fueron proporcionados amablemente por el Dr. Palmer Taylor, UCSD).

Inicialmente, se realizó un tamizado de las fracciones del veneno de *C. californicus* en dos partes: 1) empleando un método fluorométrico de unión y competencia y 2) empleando una adaptación del ensayo de “centelleo de proximidad” (SPA) de unión y competencia que utiliza ligandos radioactivos (Hibbs *et al.*, 2009; Talley *et al.*, 2006) para evaluar el potencial modulador mediante un método radiométrico.

V.8 Determinación del potencial modulador de receptores de acetilcolina mediante un método fluorométrico de unión y competencia

Inicialmente, el método fluorométrico fue validado, considerando la disponibilidad de filtros del equipo lector de microplacas (485/538 nm: excitación y emisión, respectivamente) con respecto a los valores de longitud de onda reportados para Anab (474/525 nm). Para esto, se realizó un ensayo preliminar considerando una concentración 10 µM de AChBP₂ y diferentes relaciones ligando: receptor, ya que la respuesta no es linealmente proporcional al número de receptores ocupados (Sthepson, 1956). Habiéndose observado lo esperado (Figura 11) y validado el ligando Anab en el método fluorométrico, se establecieron los ensayos para evaluar el posible potencial modulador de las fracciones del veneno de *Conus californicus*. Antes de cada ensayo, se determinó la cantidad de muestra obtenida en cada fracción (mediante el cálculo del área bajo la curva) y la concentración de las fracciones fue normalizada, debido a la dispersión de valores (en mg) de la muestra.

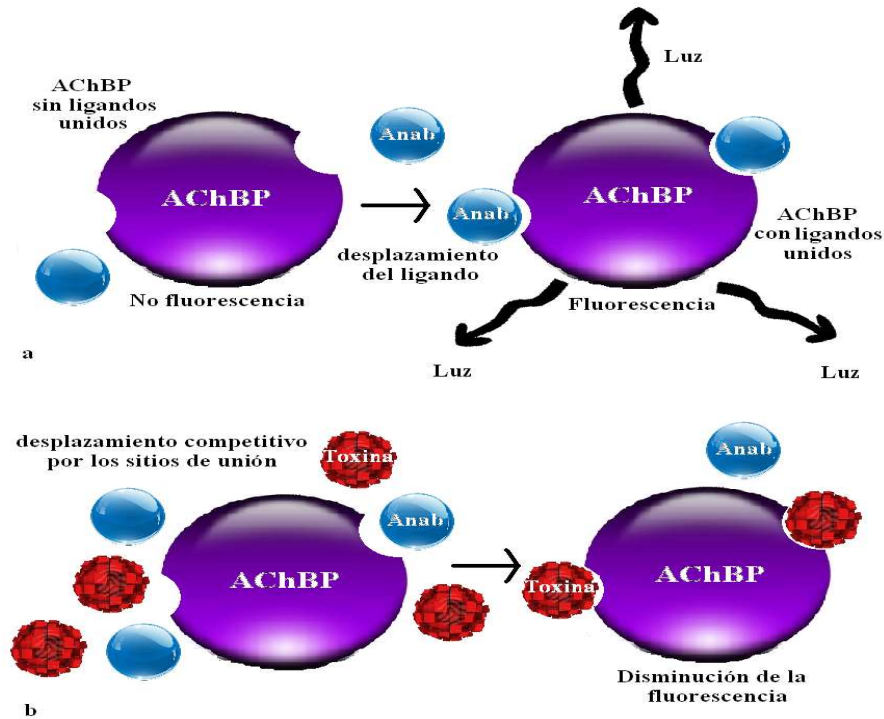


Figura 11. Esquema del comportamiento esperado del método fluorométrico de unión y competencia. a) Se observa únicamente emisión de fluorescencia al formarse el complejo AChBP-Anab. b) Y un desplazamiento de los sitios de unión en la AChBP del fluoróforo anab por otro ligando (ej. toxina).

Las fracciones fueron redisueltas en solución D-PBS 1X (amortiguador salino de fosfatos, modificación Dulbecco, de Hyclone) estéril y filtrada (0.1 μm). Finalmente, se llevó a cabo el ensayo en pocillos de tiras de una microplaca de fluorescencia White Microtiter Assembly Strip 1 x 8 (Thermo Scientific) (Figura 12), considerando la concentración de cada fracción. Además, se estimó teóricamente el PM promedio de las conotoxinas de *C. californicus*, pues afecta tomando en consideración las referencias existentes (McIntosh *et al.*, 1999).

1 nmol de proteína Ac-AChBP₂ (10 μM final) fue mezclado con las fracciones del veneno de *C. californicus*. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente (22-27 °C) para lograr el equilibrio ligando-receptor; es decir, las moléculas de ligando se unen al receptor a una velocidad proporcional a la cantidad de moléculas ligando y el número de receptores libres. El complejo resultante se disocia a un ritmo proporcional al número de complejos (Sthepson, 1956). Posteriormente, 5 μL de Anab (ligando fluorescente) fueron adicionados a cada pocillo. Inmediatamente, la señal fluorescente fue registrada a los 0, 5, 10 y 15 min.

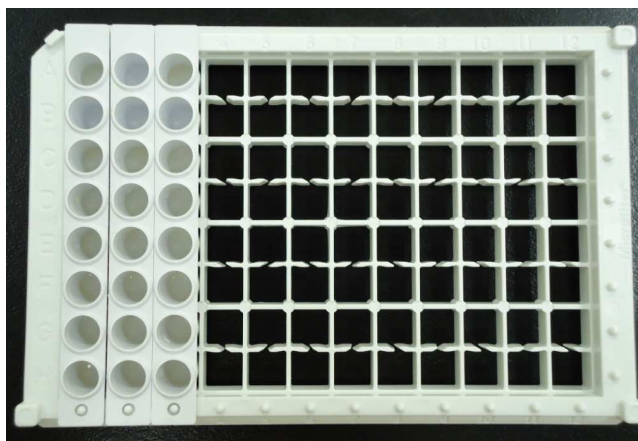


Figura 12. Fotografía de una microplaca con soluciones del ensayo de fluorescencia y veneno de *Conus californicus*. Se observan tres líneas de tiras en la parte extrema derecha tres filas y nombradas de forma vertical de la A-H y horizontalmente desde el 1-12.

V.9 Análisis estadístico de los datos obtenidos mediante el método fluorométrico

Los valores de media y desviación estándar (de los ensayos realizados por duplicado o triplicado) al igual que la prueba estadística *t-student* fueron obtenidos utilizando el programa Prism v5.0 (GraphPad). Por otro lado, la representación gráfica se realizó usando el programa Excel® del paquete computacional MS Office 2007.

V.10 Determinación del potencial modulador de receptores de acetilcolina mediante un método radiométrico de unión y competencia

Las condiciones experimentales para el ensayo radiométrico fueron: 12 μL de una dilución de 100 μL con amortiguador de fosfatos (PB) de las muestras liofilizadas con 12 μL de la mezcla BP/SPA/Ab y 24 μL de ^3H Epi a 40 nM convirtiéndolo a 20 nM final epi bloqueado por $\frac{1}{4}$ de la concentración de las muestras FPLC cuando se resuspenden a 100 μL (UCSD).

Los ensayos de radioligandos competitivos radica en una adaptación del ensayo de “centelleo de proximidad” SPA (Figura 13) éste permite un rendimiento moderadamente alto ensayo y utilizar radioligandos de unión solubles, cuya finalidad es medir las constantes de disociación (K_d) para anab y competencia por equilibrio con [^3H -Epi] (Talley *et al.*, 2006).

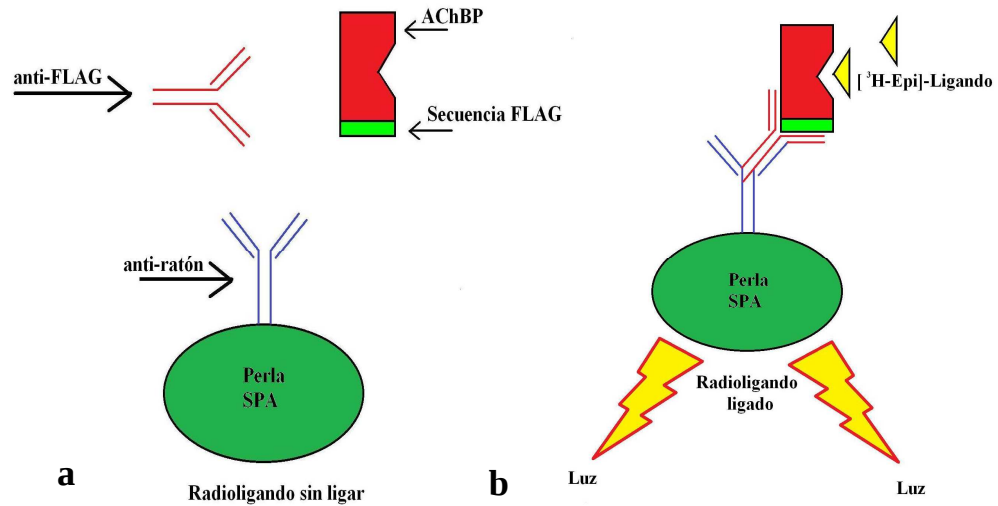


Figura 13. Esquema de una adaptación del ensayo de “centelleo de proximidad” SPA y comportamiento observado del método radiométrico. a) No se observa emisión de destellos luz por radiación en ausencia de la formación de un complejo. b) La unión de $^3\text{H-Epi}$ marcada en el receptor con la secuencia FLAG como a los anticuerpos correspondientes activan la emisión de radiación produciendo pequeños destellos luminosos. Modificado de <http://www.currentprotocols.com/protocol/ns0715>.

El ensayo consiste en la incubación de una mezcla a temperatura ambiente y equilibrada mínimo durante 2 h antes del análisis en un contador de centelleo líquido LS 6500 (Beckman Científico). Con una concentración de AChBP (500 pM en los sitios de unión), perlas SPA de poliviniltolueno anti-ratón (0.1 mg/mL, Amersham Biosciences), anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 de anticuerpos de ratón (Sigma) y $^3\text{H-Epi}$ (a una concentración final de 5 nM para *Ls* y *Bt* y 20 nM para *Ac-AChBP*).

Las concentraciones del ligando compiten en un amortiguador de fosfatos NaPO_4 0,1 M, pH 7,0 en un volumen final de 100 μL . La unión total y no específica es respectivamente determinada en ausencia y en presencia de una saturación de la concentración (15 mM) del antagonista nicotínico de MLA (Hibbs *et al.*, 2004; 2006; 2009; Talley *et al.*, 2006).

VI. RESULTADOS

VI.1 Fraccionamiento del veneno total del caracol marino *Conus californicus* mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP)

A partir de 225 caracoles de la especie *Conus californicus* se obtuvieron 207 mg de proteína total. El veneno fue fraccionado y separado mediante HPLC-RP (Figura 14). Las fracciones fueron colectadas de acuerdo a su tiempo de retención: inicialmente (dos corridas) cada 5 min (de 0 a 65 min), obteniéndose 13 fracciones; y posteriormente (dos corridas) de fracciones individuales (de 0 a 64 min), obteniéndose un promedio de 49 fracciones. En las dos primeras corridas se inyectaron 4.5 y 4.25 mg del veneno y en las dos corridas posteriores, se inyectaron 4.125 y 4.5 mg de las corridas colectadas individualmente.

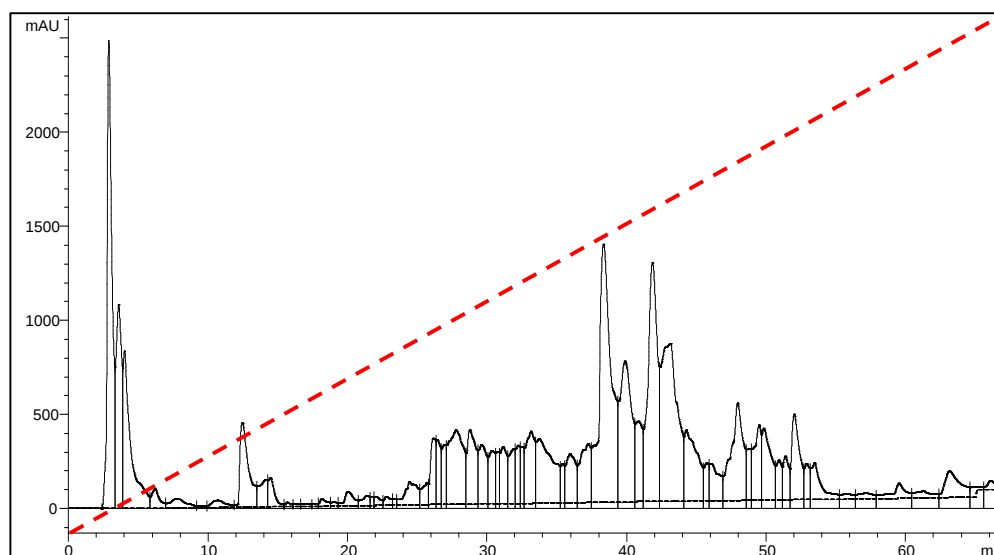


Figura 14. A partir de este perfil cromatográfico del fraccionamiento obtenido por HPLC-RP del extracto total del veneno de *Conus californicus* colectados en mayo-junio de 2009. Se colectaron las fracciones observadas, obtenidas de acuerdo a sus diferentes tiempos de retención (min) en relación con la absorbancia a 230 nm. También se observa el procedimiento experimental de colecta para cada una de las fracciones de Sep-09.

En las siguientes seis corridas, se colectaron las fracciones individuales, del minuto 0-62, se obtuvieron en promedio 57 fracciones. Con la finalidad de elaborar un *pool* del veneno total de *C. californicus* para sustraer las sub-fracciones con un probable potencial modulador sobre los receptores de acetilcolina midiendo fluorescencia.

VI.2 Caracterización del método fluorométrico de unión y competencia para valorar el potencial modulador de moléculas sobre receptores de acetilcolina

Se realizaron ensayos analíticos con el fin de caracterizar el método. La señal fluorescente fue valorada en pocillos conteniendo la mezcla: Anab + diluyente (D-PBS) y los complejos con Ac-AChBP₂ + Anab + diluyente (**sección V.8**).

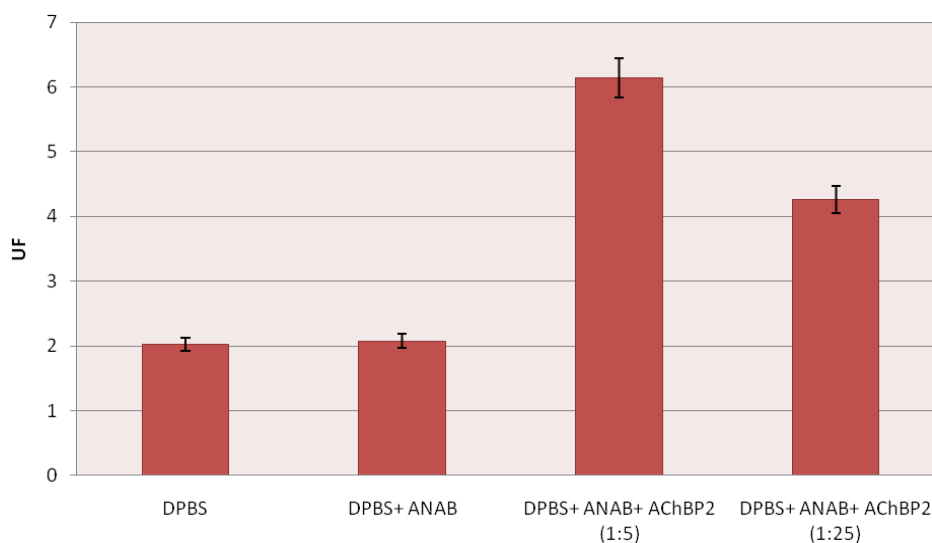


Figura 15. Gráfica de comportamiento de la caracterización inicial de las concentraciones de los ligandos y AChBP como controles en un modelo que interactúa con el análogo del receptor de acetilcolina AChBP₂ mediante fluorescencia. Se observan las absorbancias emitidas por la unión fármaco-receptor (Anab-AChBP₂) como control vs UF.

En la Figura 15 se muestran los valores de la señal fluorescente (Unidades de fluorescencia “UF”) obtenida en los pocillos conteniendo las mezclas: D-PBS = 2.0265; D-PBS + Anab = 2.079; D-PBS + Anab + AChBP₂ (1:5) = 6.1395 y D-PBS + Anab + AChBP₂ (1:25) = 4.2595 UF. Se observó un aumento significativo de la señal fluorescente en la relación 1:5 (Ac-AChBP₂: Anab), la cual disminuye en la relación 1:25, lo que sugiere que el complejo Ac-AChBP₂-Anab manifiesta su máxima fluorescencia cuando se une a la proteína en condiciones no saturantes, que de acuerdo al segundo y tercer postulados de Clark, los cuales dicen: El efecto de un fármaco es proporcional al número de receptores ocupados y La respuesta máxima se alcanza cuando todos los receptores están ocupados (Brunton, *et al.*, 2006).

VI.3 Análisis de las fracciones FI – FXIII del veneno de *Conus californicus* colectadas cada 5 minutos

Inicialmente, el potencial modulador de las fracciones del veneno de *C. californicus* sobre la proteína análoga al receptor de acetilcolina ($Ac-AChBP_2$) fue evaluado en las trece fracciones de la primera corrida de separación por HPLC-RP (0 al 65 min, colectadas cada 5 min). Como se puede observar en la Figura 16, algunas de las fracciones muestran comportamientos moderadamente competitivos, aunque no estadísticamente significativos ($p > 0.05$). Sin embargo, es de llamar la atención el resultado de las fracciones FI (0-5.6), FV (20.7-25.4), FVII (30.2-35.3), FVIII (35.3-40.6), FIX (40.6-45.6), FX (45.6-50.8) y FXI (50.8-55.4) ya que se observó una variación notoria en su respuesta, comparada con el resto de las fracciones.

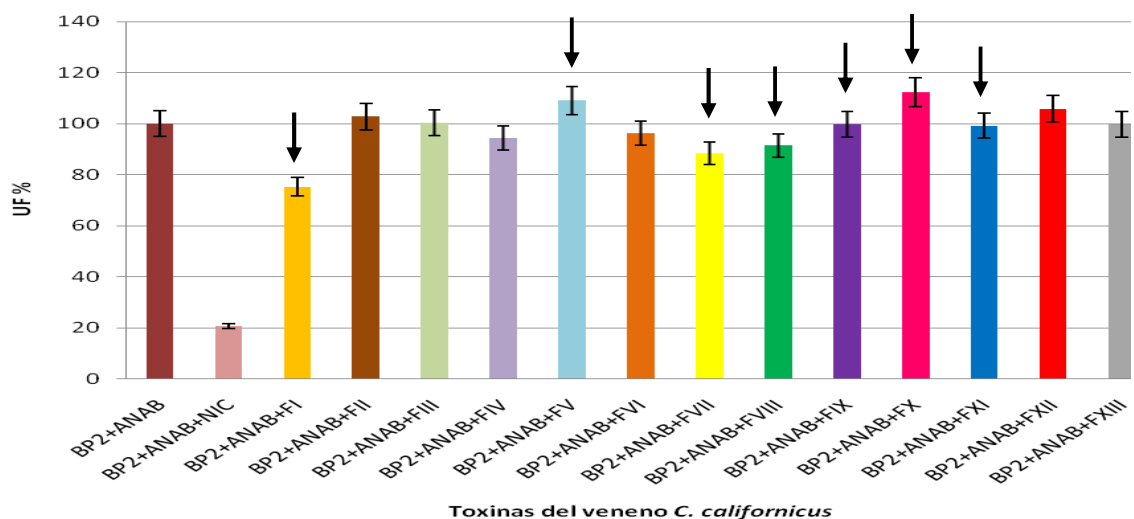


Figura 16. Gráfica normalizada de la caracterización del potencial modulador de las toxinas del veneno de *C. californicus* que interactúan mediante fluorescencia. Se observan las absorbancias obtenidas de acuerdo al comportamiento de la unión fármaco-receptor ($AChBP_2$ -Anab) como control negativo. Se les realizó la prueba estadística *t-student*. Las fracciones no hubo diferencia significativa con respecto al control (nic) positivo. Los resultados son el promedio de un experimento por triplicado con $n = 13$. Las flechas indican las fracciones seleccionadas de las Toxinas vs UF.

Considerando lo anterior, se procedió a evaluar su efecto en un segundo ensayo con las siete fracciones seleccionadas. Las cuales se indican en el siguiente cromatograma (Figura 17).

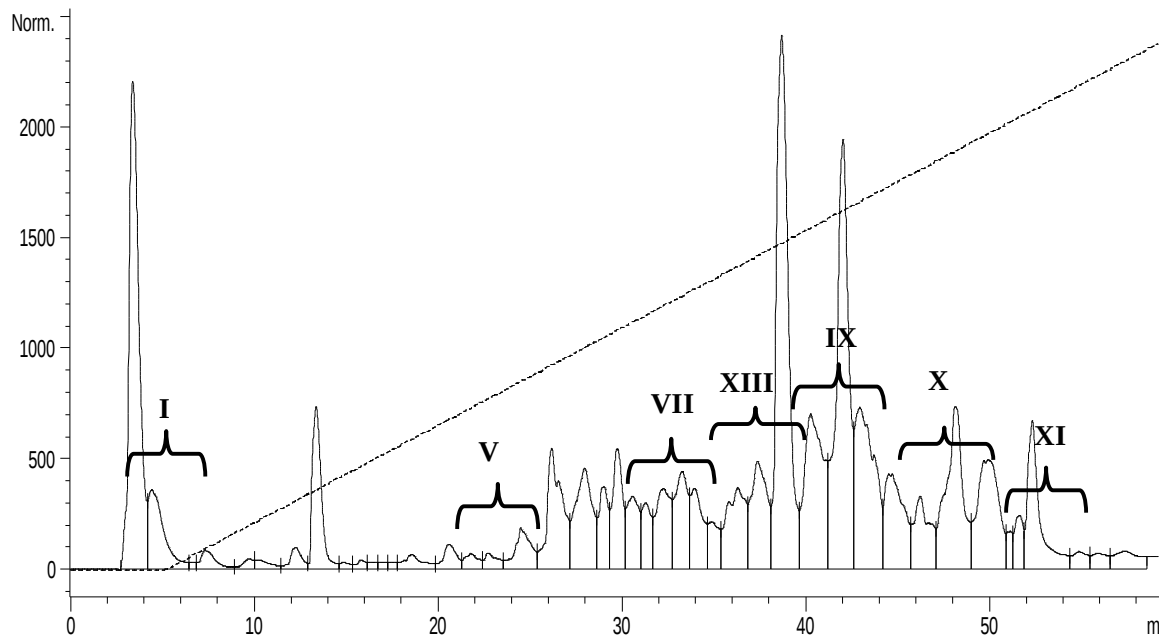


Figura 17. Perfil cromatográfico de HPLC-RP del extracto total del veneno de *C. californicus* colectados en 2009. Las llaves indican las fracciones FI, FV, FVII, XIII, FIX, FX y FXI (de izquierda a derecha respectivamente) utilizadas con un probable potencial modulador que interactúa con un análogo del receptor de ACh AChBP₂ midiendo fluorescencia obtenidas de acuerdo a su tiempo de retención (min) en relación con la absorbancia a 230 nm.

La Figura 18 muestra la gráfica con los resultados del segundo análisis de las fracciones previamente seleccionadas. Como se puede observar, todas las fracciones muestran una disminución de la señal fluorescente (representada en porcentaje); sin embargo, solamente las fracciones FI, FVII, FVIII, FIX y FX mostraron una significancia estadística (* $p < 0.05$ ** $p > 0.01$ y *** $p > 0.001$), cuando fueron analizadas con la prueba *t-student*. Además, considerando que la concentración de péptido (posible conotoxina) era pequeña en algunas fracciones, sólo se consideraron las **FI, FV, FVII, FIX y FXI** para los estudios posteriores.

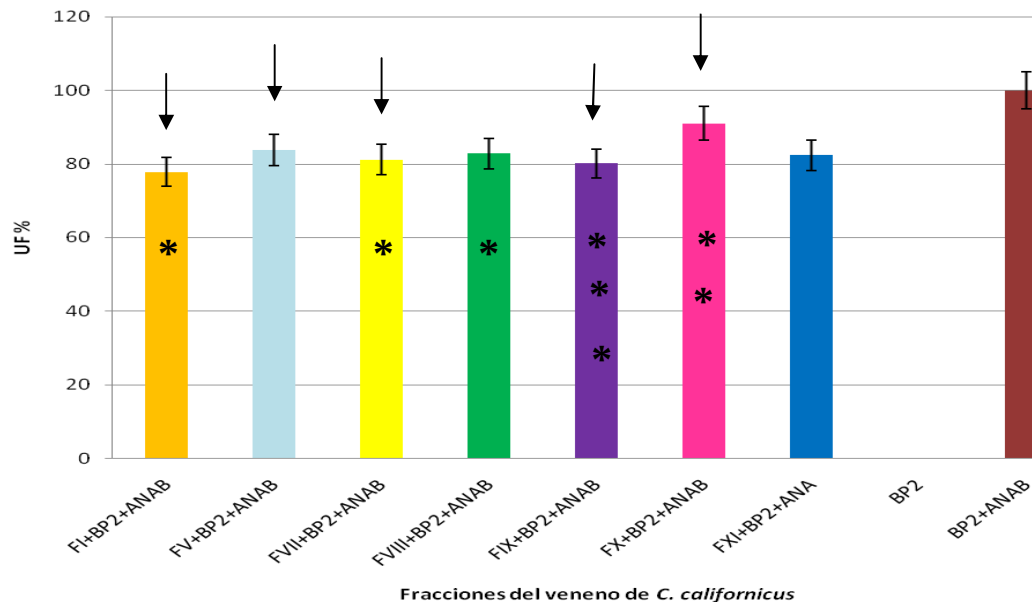


Figura 18. Gráfica normalizada de la caracterización del probable potencial modulador de las toxinas del veneno de *C. californicus* que interactúan mediante fluorescencia. Se observan las absorbancias obtenidas de acuerdo al comportamiento de la unión fármaco-receptor (AChBP₂-Anab) como control. Al tipo de muestra graficados vs URF. Las fracciones con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (nic) se señalan con un asterisco (*). Los resultados son el promedio de un experimento por triplicado con n=7. Al ensayo se le realizó la prueba estadística *t-student* *p<0.05 **p>0.01 y ***p>0.001.

VI.4 Análisis de las fracciones individuales de la FI, FV, FVII, FIX y FXI del veneno de *Conus californicus*

Las fracciones individuales de FI, FV, FVII, FIX y XI fueron obtenidas mediante HPLC-RP (Figura 19). Cada fracción individual fue redisuelta en 40 µL de amortiguador D-PBS y analizadas mediante el método fluorométrico, utilizando una concentración a 10 µM de Ac-AChBP₂. Los resultados se muestran en la Figura 20. Como se puede observar, un número limitado de fracciones individuales mostró posible actividad moduladora. Aunque ninguna de estas mostró significancia estadística, las sub-fracciones individuales FI.1, FV.3, FVII.3, FIX.1, FXI.1 fueron seleccionadas para su estudio. Cabe mencionar que la sub-fracción FX.2 se descartó por su perfil cromatográfico; de igual manera, sucedió con la sub-fracción FI.1, debido a que su composición química no es totalmente peptídica.

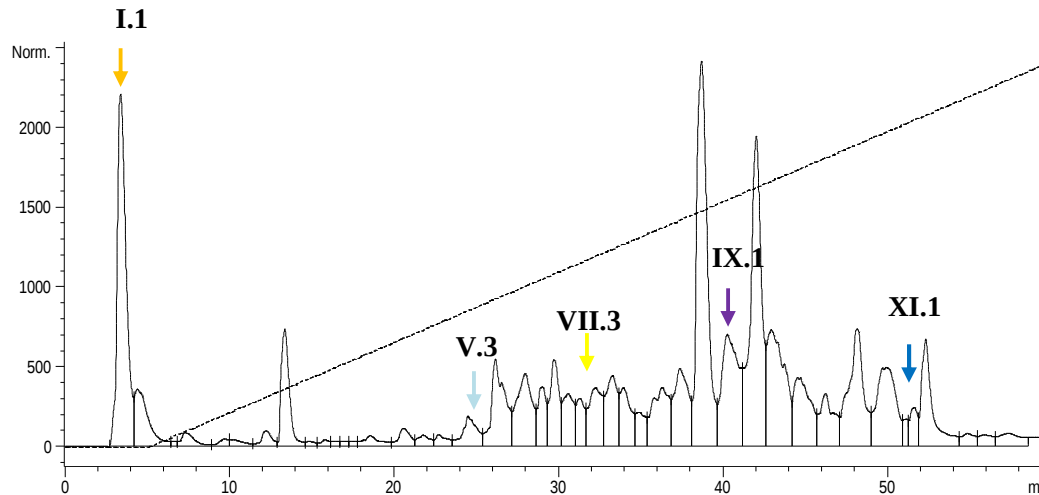


Figura 19. Perfil cromatográfico del pool del veneno obtenido por HPLC-RP de *Conus californicus*. Las flechas observadas indican las sub-fracciones FI.1, FV.3, FVII.3, FIX.1 y FXI.1 (de izquierda a derecha respectivamente) con un probable potencial modulador y obtenidas de acuerdo a su tiempo de retención (min) en relación con la absorbancia a 230 nm.

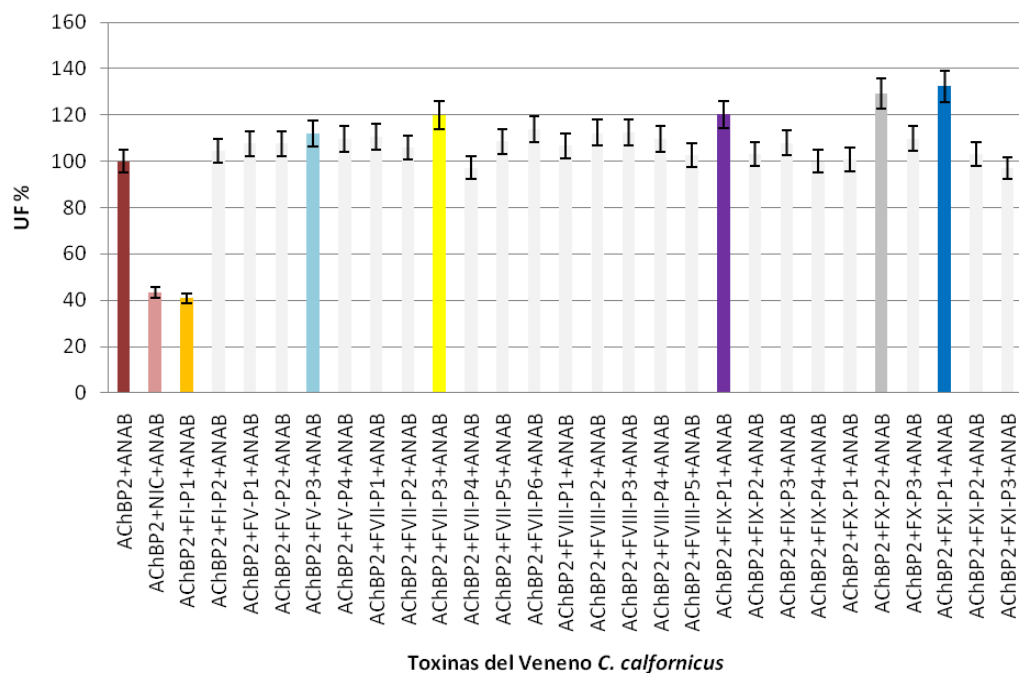


Figura 20. Gráfica normalizada de la caracterización del probable potencial modulador de las toxinas del veneno de *C. californicus* que interactúan mediante fluorescencia. Se observan las absorbancias obtenidas de acuerdo al comportamiento de la unión fármaco-receptor (AChBP₂-Anab) como control negativo. Se les realizó la prueba estadística *t-student*. Las fracciones no tuvieron diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (nic) positivo. Los resultados son el promedio de un experimento sencillo con n= 29. Las barras con colores indican las fracciones seleccionadas de las Toxinas vs UF.

VI.5 Separación y análisis de las sub-fracciones FV.3, FVII.3, FIX.1 y FXI.1 del veneno de *Conus californicus*

Los componentes individuales de las sub-fracciones seleccionadas FV.3, FVII.3, FIX.1 y FXI.1 fueron separadas mediante HPLC-RP. Los perfiles cromatográficos se muestran en las Figuras 21 a 24.

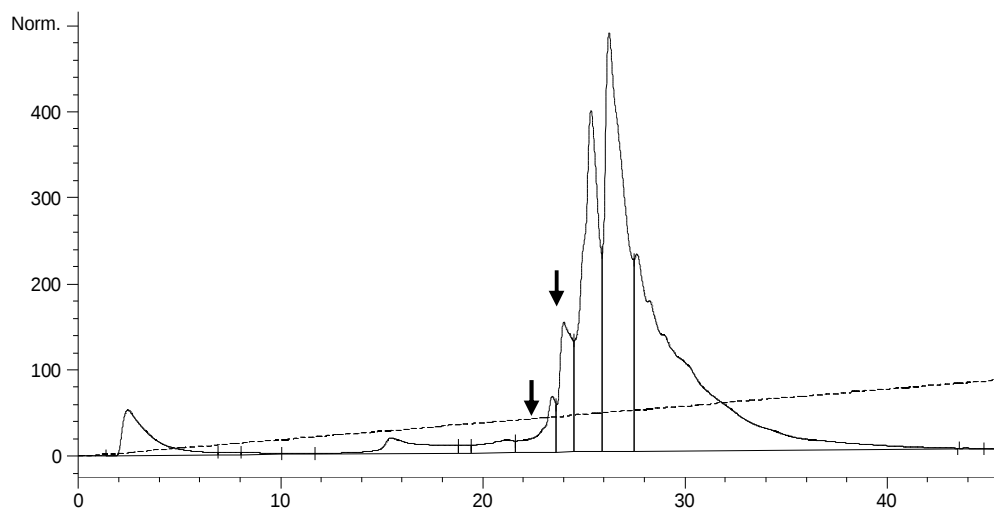


Figura 21. Cromatograma del fraccionamiento del *pool* del veneno de las sub-fracciones FV.3.4 y FV.3.5 (de izquierda a derecha respectivamente) obtenidas por HPLC-RP de *Conus californicus*. Corrida con 169.064 μg de proteína inyectada. Las flechas observadas indican las fracciones con un mejor probable potencial modulador, obtenidas de acuerdo a su tiempo de retención (min) en relación con la absorbancia a 230 nm (datos normalizados), 22/marzo/2010.

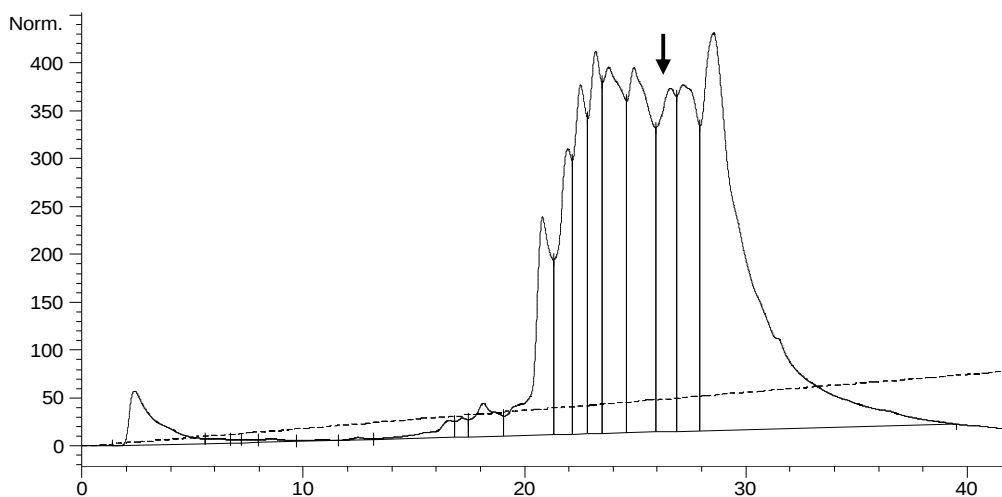


Figura 22. Cromatograma del fraccionamiento del *pool* del veneno de la subfracción FVII.3.13 obtenida por HPLC-RP de *Conus californicus*. Corrida con 210.36 μg de proteína inyectada. La flecha observada indica la fracción con una probable bioactividad, obtenida de acuerdo a su tiempo de retención (min) en relación con la absorbancia a 230 nm (datos normalizados), 23/marzo/2010.

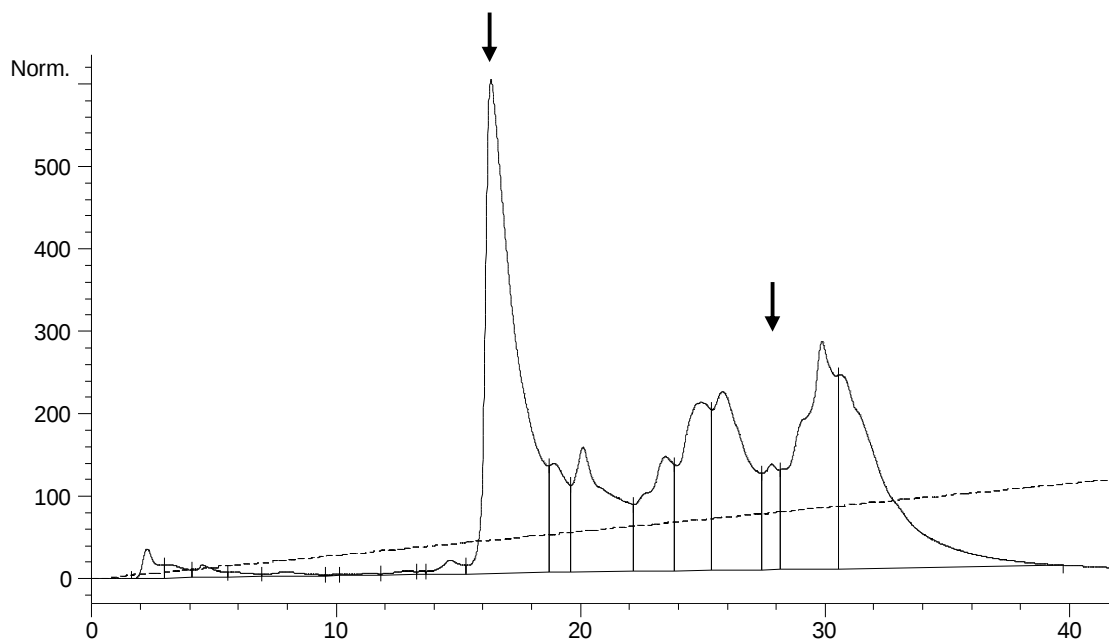


Figura 23. Cromatograma del fraccionamiento del *pool* del veneno de las sub-fracciones FIX.1.7 y FIX.1.13 (de izquierda a derecha respectivamente) obtenidas por HPLC-RP de *Conus californicus*. Corrida con 21.36 μ g de proteína inyectada. Las flechas observadas indican las fracciones con una probable bioactividad, obtenidas de acuerdo a su tiempo de retención (min) en relación con la absorbancia a 230 nm (datos normalizados), 06/abril/2010.

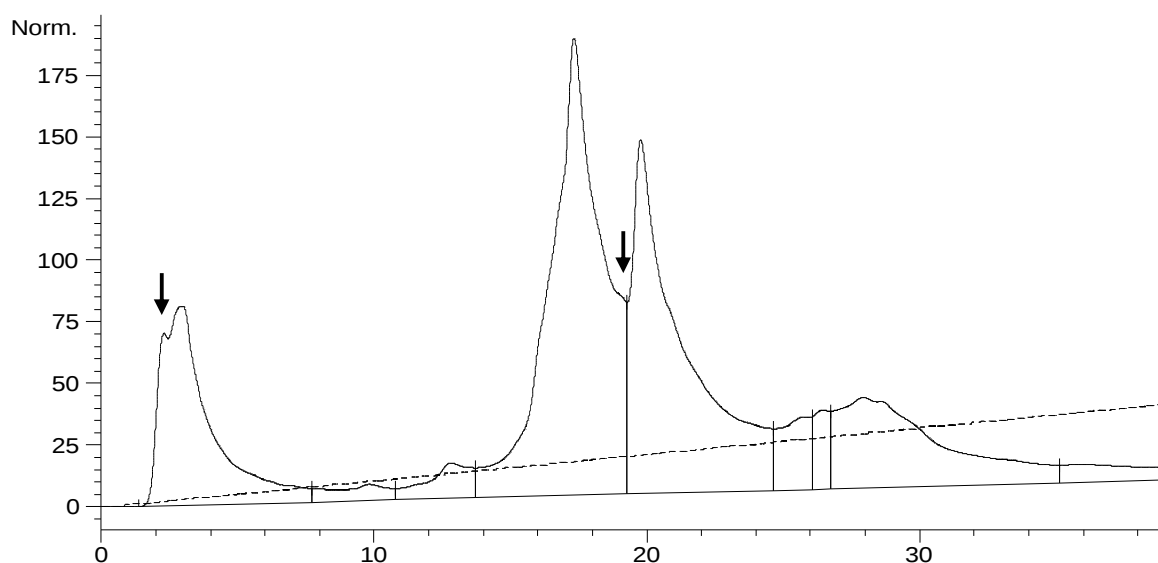


Figura 24. Cromatograma del fraccionamiento del *pool* del veneno de las sub-fracciones FXI.1.1 y FXI.1.6 (de izquierda a derecha respectivamente) obtenidas por HPLC-RP de *Conus californicus*. Corrida con 21.36 μ g de proteína inyectada. Las flechas observadas indican las fracciones con una probable bioactividad, obtenidas de acuerdo a su tiempo de retención (min) en relación con la absorbancia a 230 nm (datos normalizados), 06/abril/2010.

Los resultados del cuarto análisis (Figura 25) de las sub-fracciones seleccionadas de los perfiles cromatográficos (Figuras 21-24) fueron: FV.3.4 =5.6915 UF; FV.3.5 =10.573 UF; FIX.1.7 =8.473 UF; FIX.1.13 =10.6995 UF; FXI.1.1 =12.0205 UF; FXI.1.6 =11.4785 UF, junto con AChBP₂ (mt) =2.2705 UF y AChBP-anab =9.656 UF como blanco y control respectivamente. Algunas de las sub-fracciones muestran comportamientos ligeramente competitivos, aunque no estadísticamente significativos, a una concentración a 10 μ M y redisueltas con 30 μ L de amortiguador D-PBS.

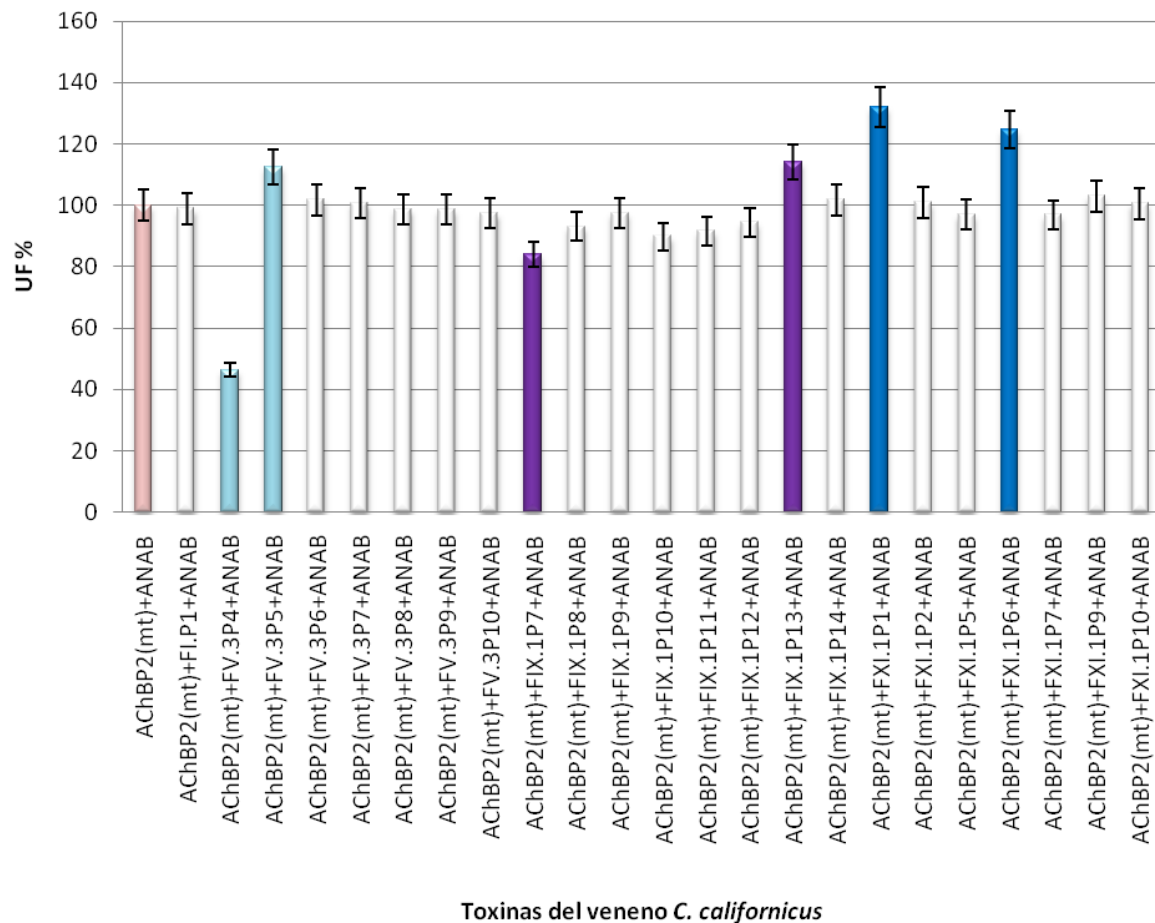


Figura 25. Gráfica normalizada de la caracterización del probable potencial modulador de las toxinas del veneno de *C. californicus* que interactúan mediante fluorescencia. Se observan las absorbancias obtenidas de acuerdo al comportamiento de la unión fármaco-receptor (AChBP₂-Anab) como control negativo. Se les realizó la prueba estadística *t-student*. Las fracciones no tuvieron diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (nic) positivo. Los resultados son el promedio de un experimento por duplicado con n= 29. Las barras con colores indican las fracciones seleccionadas de las Toxinas vs UF.

VI.6 Análisis de las fracciones FI - FXIII del veneno de *Conus californicus* en un ensayo *dosis-respuesta* para evaluar el potencial modulador de receptores de acetilcolina mediante un método fluorométrico de unión y competencia.

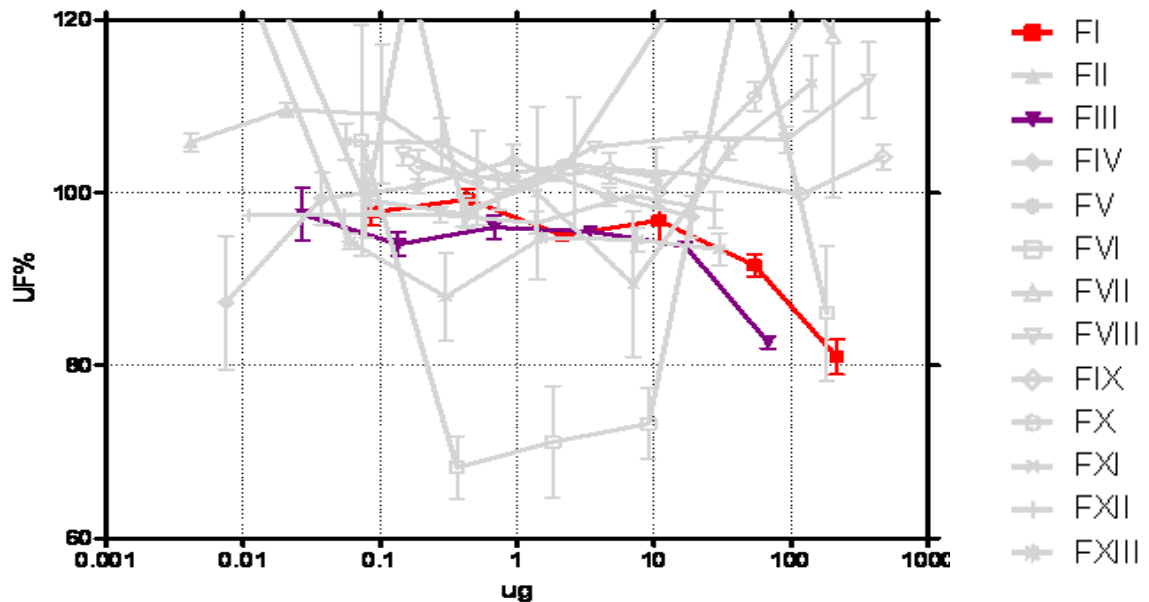


Figura 26. Gráfica normalizada del comportamiento característico del gradiente de la curva *dosis-respuesta* de las trece fracciones de toxinas del veneno de *C. californicus* mediante fluorescencia. Se observan las absorbancias obtenidas de acuerdo al comportamiento de la unión fármaco-receptor (AChBP₂-Anab). De color rojo y morado se observan las fracciones FI y FV.

En la presente gráfica (Figura 26) se observa una curva *dosis-respuesta* para cada una de las trece fracciones y repitiéndose por triplicado para cada una, con las siguientes diluciones: 1: 5, 1: 25, 1: 125, 1: 625 y 1: 3,125 a una concentración a 10 µM y redisueltas con 35 µL de amortiguador D-PBS.

La obtención de una curva *dosis-respuesta* se utiliza para el estudio de la acción farmacológica de una sustancia y se define como la relación que existe entre la cantidad de tóxico y la magnitud del efecto. Los resultados de este ensayo indican que a través de la disminución de las concentraciones (diluciones) de las fracciones, permite observar un descenso hacia la derecha.

VI.7 Análisis de las fracciones FI – FXIII e individuales del veneno de *Conus californicus* en un ensayo de “centelleo de proximidad” para evaluar el potencial modular de receptores de acetilcolina mediante un método radiométrico de unión y competencia.

Para corroborar los ensayos y resultados obtenidos con el método fluorométrico se enviaron dos corridas purificadas de veneno total de *C. californicus* al Laboratorio (U.C.S.D. Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences) ubicado en el 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093 San Digo, C.A. (Figuras 27 y 28). Las condiciones para este ensayo se describe en metodología (sección V.10).

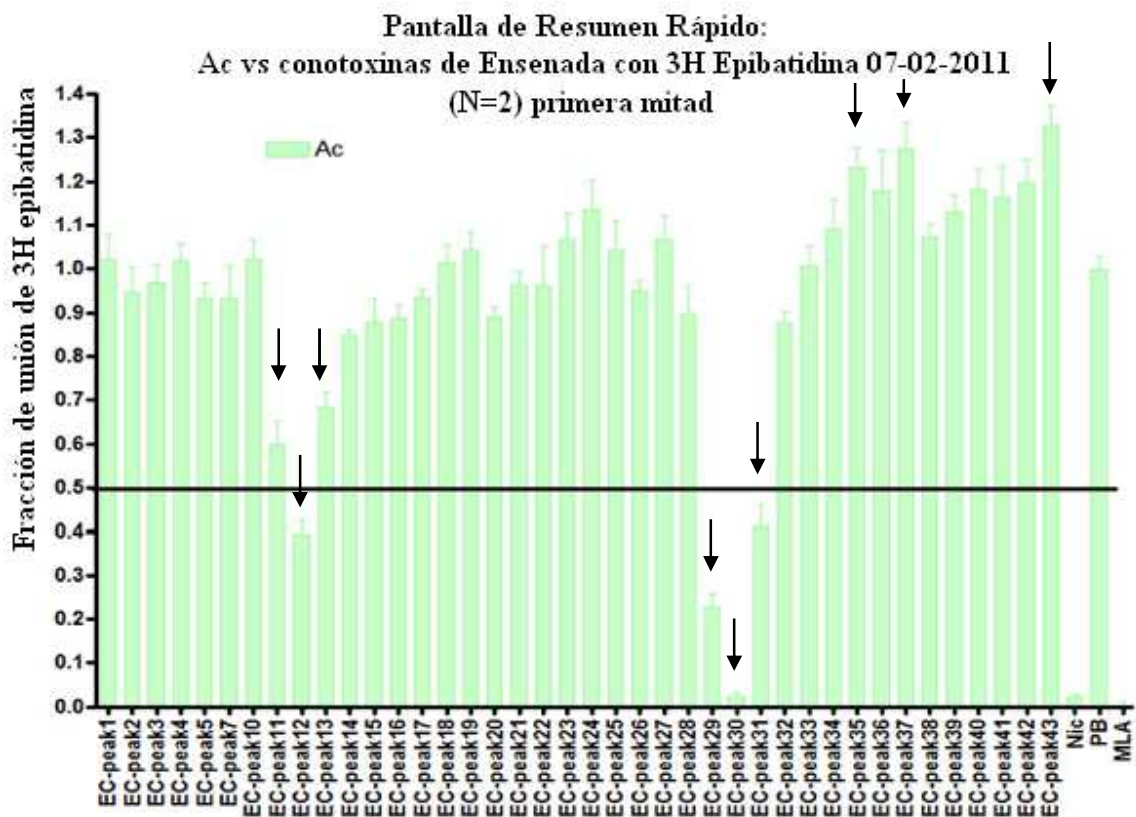


Figura 27. Gráfica normalizada de la caracterización del probable potencial modulador de las toxinas del veneno de *C. californicus* que interactúan mediante radioactividad. Se observan las absorbancias obtenidas de acuerdo al comportamiento de la unión fármaco-receptor (AChBP₂-Anab) como control negativo. Los resultados son el promedio de un experimento triplicado con n =43 (primera mitad). Las barras con flechas indican un grafico de las fracciones seleccionadas de Toxinas vs ³H Epi.

Los resultados de este análisis, como se puede observar, arrojó un número de 10 fracciones individuales (indicadas con flecha) que mostraron actividad moduladora dada la disminución de la señal de luz (representada por $^3\text{H-Epi}$).

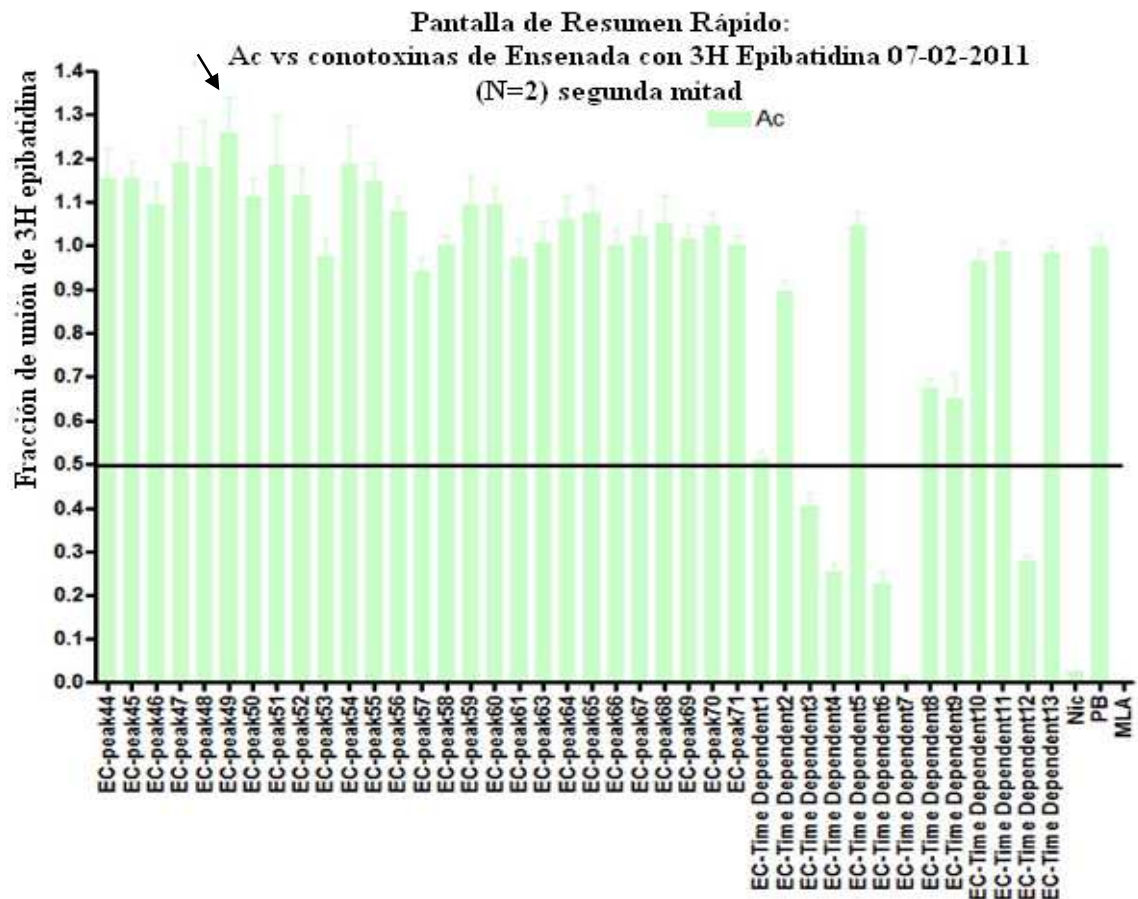


Figura 28. Gráfica normalizada de la caracterización del probable potencial modulador de las toxinas del veneno de *C. californicus* que interactúan mediante radioactividad. Se observan las absorbancias obtenidas de acuerdo al comportamiento de la unión fármaco-receptor ($\text{AChBP}_2\text{-Anab}$) como control negativo. Los resultados son el promedio de un experimento por triplicado con $n=40$ (segunda mitad). Las barras con flecha indican un gráfico de las fracciones seleccionadas de Toxinas vs ^3H Epi.

VII. DISCUSIÓN

VII.1 Ensayos sobre un modelo receptor de ACh *in vitro*

A pesar de que los nAChRs están vinculados con diversas patologías del SNC y procesos fisiológicos a diferencia de los nAChRs musculares los neuronales no están caracterizados perfectamente (Kalamida *et al.*, 2007). Incluso los nAChRs están estrechamente relacionados en la transducción de señales cerebrales y en las uniones neuromusculares además de ser CIRL (Jones y Bulaj, 2000; Flores y Segura, 2005).

Se decidió, en base a lo mencionado anteriormente, realizar este proyecto con el propósito de determinar si en el veneno de *Conus californicus* está presente un componente modulador específico que interactúa con el análogo del receptor de acetilcolina Ac-AChBP₂. En el presente trabajo demostró una evidencia farmacológica de la afinidad de las fracciones probadas de *C. californicus* sobre el modelo funcional *in vitro*, debido a la respuesta de unión del complejo Ac-AChBP₂-Anab, que se observó en la emisión de fluorescencia.

Este estudio no representa la primera demostración del género de *Conus* en diferentes ensayos con AChBP y fluorescencia para el reconocimiento de ligandos para los nAChRs (Talley *et al.*, 2006). Pero es el primero para la especie de *C. californicus*.

Se observó que las propiedades como análogo del nAChR de Ls-AchBP₂ se conservaron, sin embargo, se percibió una disminución de las UF. Posiblemente por una degradación protéica debido a su tiempo de vida media. Este modelo de fluorescencia no permite la caracterización biofísica de las fracciones del veneno de *C. californicus*, pero si la farmacológica de la unión por competencia por parte de los ligandos y fracciones.

La eficacia que poseen diferentes fármacos radica en iniciar una respuesta biológica ocupando diferentes sitios en los receptores (Stephenson, 1956). Las fracciones del veneno de *C. californicus* llevan a cabo una función similar, por lo cual se produjeron cambios notables en la fluorescencia.

VII.2 Aplicación de una técnica fluorométrica

Se empleó de una técnica fluorescente debido a su sencillez y el uso de pequeñas concentraciones, por estas razones se utilizó esta técnica como modelo para la medición de unión de ligandos, sin embargo no permitió confirmar con plena seguridad los datos debido a la diferencia de resultados entre los tratamientos.

Los resultados de este trabajo bajo el método fluorométrico se resumen en la obtención de 4 fracciones competitivas estadísticamente significativas (**sección VI.4**) y 4 fracciones individuales ligeramente competitivas (**sección VI.5**) Se demostró la existencia de un componente modulador específico que interactúa con el análogo del receptor de acetilcolina Ac-AChBP₂, mediante la técnica ya mencionada, estos resultados no deberán subestimarse, pues es probable que estas fracciones sean excelentes candidatas para evaluarse y utilizarse en diferentes modelos *in vivo*.

El encontrarse 4 fracciones de 5 minutos moduladoras se sugiere que en el veneno de *Conus californicus* posee la presencia de α -conotoxinas probablemente por su alimentación variada y sin restricciones, aunque no hay nada reportado aún. Aunque no se ha reportado aún que las α -conotoxinas del caracol *Conus californicus* modulen un receptor nicotínico, con una afinidad farmacológica igual a la del género *Conus*.

La naturaleza de estas 10 fracciones podría ser de origen peptídico debido a que se leen a 230 nm aunque evidentemente se requiere de la secuenciación de los aminoácidos que las componen para aseverar lo anterior y definir a que clasificación del veneno pertenecen estas fracciones.

VII.3 Aplicación de una técnica radiométrica.

Los resultados de este trabajo en una adaptación del ensayo de "centelleo de proximidad" por su alta sensibilidad y exactitud se resumen también en la obtención de 10 fracciones individuales competitivas (Figuras 27 y 28). Se demostró la existencia de un componente potente modulador específico que interactúa con el análogo del receptor de acetilcolina Ac-AChBP₂, mediante la técnica mencionada anteriormente.

VII.4 Variabilidad de los resultados en los ensayos

En cuanto a los resultados divergentes entre los tratamientos de los ensayos, estos fueron corroborados al aplicar las pruebas estadísticas (*t-student*), las pruebas con las fracciones de 5 min e individuales no expresaron una uniformidad en las emisiones de las UF. Es posible que debido a la escasa concentración o afinidad de las fracciones en los ensayos con respecto al complejo Ac-AChBP₂ (mt)-Anab no se observe un desplazamiento competitivo adecuado de los ligandos afines.

En un intento de evitar la saturación del receptor nicotínico, en la mayoría de los experimentos se trabajaron con bajas concentraciones de las fracciones del veneno. Dado que un efecto máximo puede producirse por un agonista al ocupar sólo una pequeña proporción de los receptores (Stepson, 1956). En estos experimentos de unión y competencia se ha demostrado que la unión fármaco-receptor sigue la ley de acción de masas (Kalant, 2003).

Hasta el momento no existen referencias en las cuales se evalúe el efecto de fracciones del extracto total de veneno de *Conus californicus*, con las que podamos comparar si las concentraciones utilizadas en este trabajo fueron adecuadas, tan solo hay reportes de los efectos de otras conotoxinas (Talley *et al.*, 2006; Hibbs *et al.*, 2009). Pueden ser fluctuaciones normales del ensayo (comunicación directa UCSD). O sitios alostéricos desconocidos hasta el momento para el complejo AChBP₂-Fracción.

En el ensayo de *dosis-respuesta*, también se observó desigualdades para todas las fracciones, excepto para las FI y FIII que coinciden con el ensayo de radioactividad. Se puede inferir de acuerdo a las observaciones, que las concentraciones de las fracciones pudieran ser un factor importante para el desplazamiento de Anab de la Ac-AChBP₂ (mt), pudiendo no ser las diluciones correctas, es decir: una cantidad suficiente de sustancia antagonista desplazará a la sustancia agonista de los sitios de unión, que resulta en la baja de la emisión de fluorescencia. La presencia de un antagonista competitivo hará variar hacia la derecha la curva *dosis-respuesta*.

VIII. CONCLUSIONES

En conjunto, los datos obtenidos en este estudio soportan la idea de que en el veneno de *Conus californicus* se encuentran presentes componentes moduladores específicos que interactúan con el análogo del receptor de acetilcolina Ac-AChBP₂, (mt) sin estructura química o secuencia conocida.

1. La purificación de los componentes de la fase soluble del veneno total del caracol marino *Conus californicus*, obtenido mediante HPLC-RP, resulta viable para las purificaciones de 5 min y fracciones individuales, dejando de ser eficiente y rápido para las repurificaciones, debido a la pérdida y baja concentración de muestra para las fracciones, resultando en cantidades insuficientes y limitantes para los ensayos. Las repurificaciones son un punto clave para encontrar la fracción donde se encuentran los ligandos para las AChBPs
2. Utilizando la técnica fluorométrica se obtienen las fracciones I, V, VII, IX y XI del veneno total de caracol marino *C. californicus* en el cual existe un componente modulador específico de tipo competitivo que interactúa con el análogo del receptor de acetilcolina Ac-AChBP₂.
3. Para el método radiométrico utilizando ³H Epi como radioligando confirma que las fracciones individuales (**sección VI.7**) provocaron una disminución por debajo del 50% de UF, estas fracciones poseen un efecto de tipo competitivo sobre la respuesta.
4. El uso de análogos estructurales y funcionales como las AChBP₂s como modelo de estudio para evaluar la unión de diferentes ligandos a los nAChR, presenta grandes ventajas para evaluar la unión y afinidad fármaco-receptor por su sencilla manipulación, preparación y prolongada conservación de sus propiedades fisicoquímicas.

IX. PERSPECTIVAS

Se plantean las perspectivas siguientes originadas por este trabajo:

- Determinar cuáles son los factores que ocasionan la variabilidad de la intensidad de emisión de fluorescencia de los ensayos realizados con el veneno de *C. californicus*, que interactúan con el análogo AChBP evaluando otros parámetros.
- Iniciar una producción de las AChBPs para una disponibilidad propia y optimizar el costo, tiempo, además del nivel de afinidad por los ligandos para realizar ensayos en otros modelos *in vitro*.
- Probar las fracciones que presentaron un potente efecto modulador en el ensayo de radioactividad en un modelo *in vivo* para observar su efecto sobre los nAChR.
- Fraccionar, purificar y secuenciar los componentes peptídicos de las fracciones (**sección VI.7**) del ensayo radiométrico para poder identificar las sub-fracciones, que posean un potente efecto modulador sobre los nAChR en modelos *in vitro* o *in vivo*.
- Comparar la secuencia de las sub-fracciones con potencial modulador con las toxinas de la biblioteca para verificar si están contenidas en ella.
- Producir una conotoxina recombinante con el fin de realizar ensayos y evaluar su probable efecto como potencial modulador específico en otros modelos biológicos.
- Realizar mutaciones sitio dirigidas en las sub-fracciones identificadas y probadas del veneno del caracol *C. californicus* provenientes del ensayo de radioactividad con potencial modulador sobre los receptores de acetilcolina y evaluarlas en un modelo *in vitro* o *in vivo* para determinar los aminoácidos clave en la unión toxina-ligando-receptor.

X. LITERATURA CITADA

- Andreeva, I.E., Nirthanan, S., Cohen, J.B., Pedersen, S.E. 2006. **Site Specificity of Agonist-Induced Opening and Desensitization of the *Torpedo californica* Nicotinic Acetylcholine Receptor.** *Biochemistry*. 45:195-204.
- Armishaw, C., Jensen, A.A., Balle, T. 2009. **Rational Design of α -Conotoxin Analogues targeting $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors.** *The journal of biological chemistry*. 284(14):9498-9512.
- Ashcom, J.D., Stiles, B.G. 1997. **Characterization of α -conotoxin interactions with the nicotinic acetylcholine receptor and monoclonal antibodies.** *Biochem. J.* 328:245-250.
- Azam, L., McIntosh, J.M. 2009. **Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors.** *Acta Pharmacol Sin.* 30(6):771-1038.
- Banks, G., Kemenes, I., Schofield, M., O'Shea, M., Korneev, S.A. 2009. **Acetylcholine binding protein of mollusks is unlikely to act as a regulator of cholinergic neurotransmission at neurite-neurite synaptic sites *in vivo*.** *The FASEB Journal* Doi: 0892-6638/09/0023-3030.
- Biggs, J.S., Watkins, M., Puillandre, N., Ownby, J.P., López-Vera, E., Christensen, S., Juarez-Moreno, K., Licea-Navarro, A.F., Corneli, P.S., Olivera, B.M. 2010. **Evolution of *Conus* peptide toxins: Analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56:1-12.
- Buczek, O., Burlaj, G y Olivera, B.M. 2005. **Conotoxins and the Posttranslational Modification of Secreted Gene Products.** *Cell. Mol. Life Sci.* 62:3067-3079.
- Brejc, K., van Dijk, W.J., Klaassen, R.V., Schuurmans, M., van der Oost, J., Smit, A.B., Sixma, T.K. 2001. **Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors.** *Nature*. 411:269-276.
- Briley, M.S., Changeux, J.P. 1977. **Isolation and purification of the nicotinic acetylcholine receptor and its functional reconstitution into a membrane environment.** *Int Rev Neurobiol.* 20:31-63.

- Brisson, A., Unwin, P.N.T. 1984. **Tubular Crystals of Acetylcholine Receptor.** *The journal of cell biology.* 99:1202-1211.
- Brunton, L.L., Parker, K., Blementhal, D., Buxton, I. 2006. **Goodman & Gilman Manual of Pharmacology and Therapeutics.** McGraw-Hill. 11va Ed. Madrid, España. 956 pp.
- Bourne, Y., Talley, T.T., Hansen, S.B., Taylor, P., Marchot, P. 2005. **Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake alpha-neurotoxins and nicotinic receptors.** *Embo J.* 24:1512-1522.
- Carroll, F.I., Ma, W., Deng, L., Navarro, H.A., Damaj, M.I., Martin, B.R. 2010. **Synthesis, Nicotinic Acetylcholine Receptor Binding, and Antinociceptive Properties of 3'-(Substituted Phenyl) epibatidine Analogues.** Nicotinic Partial Agonists. *J. Nat. Prod.* 73:306-312.
- Daly, J.W. 2005. **Nicotinic agonists, antagonists, and modulators from natural sources.** *Cell Mol Neurobiol.* 25:513-552.
- Dutertre, S., Ulens, C., Büttner, R., Fish, A., van Elk, R., Kendel, Y., Hopping, G., Alewood, P.F., Schroeder, C., Nicke, A., Smit, A.B., Sixma, T.K., Lewis, R.J. 2007. **AChBP-targeted a-conotoxin correlates distinct binding orientations with nAChR subtype selectivity.** *The EMBO Journal.* 26:3858-3867.
- Foye, W.O.1991. **Principios de química farmacéutica.** 2da ed. Reverté, S.A tomo II 494 pp.
- Flores, Soto M.E., Segura Torres, J.E. 2005. **Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico.** *Rev Mex Neuroci.* 6(4):315-326.
- Fusetani, N., Kem, W. 2009. **Marine Toxins as Research Tools.** Springer- Verlag. 1ra Ed. Berlin Heidelberg. 259 pp.
- Grippo, J y Grippo, T. 2001. **Canalopatías en neurología.** *Rev Neurol.* 33(7):643-647.
- Gotti, C., Fornasari, D., Clementi, F. 1997. **Human neuronal nicotinic receptors.** *Prog Neurobiol.* 53:199-237.
- Gotti, C., Clementi, F. 2004. **Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology.** *Prog Neurobiol.* 74:363-396.

- Grutter, T., Changeux, J.P. 2001. **Nicotinic receptor in wonderland.** *Trends in Biochemical Sciences.* (26):8.
- Hilf, R.J., Dutzler, R. 2008. **X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel.** *Nature.* 452:375-379.
- Hansen, S.B., Taylor, P. 2007. **Galanthamine and non-competitive inhibitor binding to Ach binding protein: evidence for a binding site on non α -subunit interfaces of heteromeric neuronal nicotinic receptors.** *J Mol Biol.* 369(4):895-901.
- Hansen, S.B., Radic, Z., Talley, T.T., Molles, B.E., Deerinck, T., Tsingelny, J., Taylor, P. 2002. **Tryptophan fluorescence reveals conformational changes in the acetylcholine binding protein.** *J Biol Chem.* 277:41299-41302.
- Hibbs, R.E., Talley, T.T., Taylor, P. 2004. **Acrylodan-conjugated Cysteine Side Chains Reveal Conformational State and Ligand Site Locations of the Acetylcholine-binding Protein.** *The journal of biological chemistry* 279(27):28483-28491.
- Hibbs, R.E., Radic, Z., Taylor, P., Johnson, D.A. 2006. **Influence of Agonists and Antagonists on the Segmental Motion of Residues near the Agonist Binding Pocket of the Acetylcholine-binding Protein.** *The journal of biological chemistry.* 281(51):39708-39718.
- Hibbs, R.E., Sulzenbacher, G., Shi, J., Talley, T.T., Conrod, S., Kem, W.R., Taylor, P., Marchot, P., Bourne, Y. 2009. **Structural determinants for interaction of partial agonists with acetylcholine binding protein and neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor.** *The EMBO Journal.* 28:3040-3051.
- Hu, S.H., Gehrmann J., Guddat, L.W., Alewood, P.F., Craik, D.J., Martin, J.L. 1996. **The 1.1 Å crystal structure of the neuronal acetylcholine receptor antagonist, α -conotoxin PnIA from *Conus pennaceus*.** *Structure.* 4:417-423.
- Jones, R.M., Bulaj, G. 2000. **New Vistas for Peptide Therapeutics.** *Current Pharmaceutical Design.* 6:1249-1285.
- Kalant, H., Walter, H.E., Roschlau. 2003. **Principios de Farmacología Médica.** Oxford University Press. 6ta Ed. D.F., Mex. 958-1052 p.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jesell, T.M. 2000. **Principles of Neural Science.** 4ta Ed. New York USA: McGrawHill. 1277pp.

- Kaufmann, H. 2003. **Disautonomías más comunes.** *Rev Neurol.* 36(1):93-96.
- Kauferstein, S., Kendel, Y., Nicke, A., Coronas, FIV. 2009. **New conopeptides of the D-superfamily selectively inhibiting neuronal nicotinic acetylcholine receptors.** *Toxicon.* 54:295-301.
- Kem, W., Mahnir, V.M., Papke, R.L., Lingle, C.J. 1997. **Anabaseine Is a Potent Agonist on Muscle and Neuronal Alpha-Bungarotoxin-Sensitive Nicotinic Receptors.** *The journal of pharmacology and experimental therapeutics JPET.* 283:979-992.
- Kubalek, E., Ralston, S., Lindstrom, J., Unwin, N. 1987. **Location of Subunits within the Acetylcholine Receptor by Electron Image Analysis of Tubular Crystals from *Torpedo marmorata*.** *The Journal of Cell Biology.* 105:9-18.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaria, P., Kaiser, A.C., Krieger, M., Scott, P.M., Zipursky, L.S. y Darnell, J. 2005. **Biología Celular y Molecular.** Médica Panamericana. 5ta Ed. Buenos Aires, Argentina. 245-300 p.
- Loughnan, M., Nicke, A., Jones, A., Schroeder, C.I., Nevin, S.T., Adams, D.J., Alewood, P.F., Lewis, R.J. 2006. **Identification of a Novel Class of Nicotinic Receptor Antagonists.** *The journal of biological chemistry.* 281(34): 24745-24755.
- Luo, S., Akondi, K.B., Zhangsun, D., Wu, Y., Zhu, X., Hu, Y., Cristensen, S., Dowell, C., Daly, N.L., Craik, D.J., Wang, C.I.A., Lewis, W.R., Alewood, P.F., McIntosh, M. 2010. **Atypical α -Conotoxin LtIA from *Conus litteratus* Targets a Novel Microsite of the $\alpha 3\beta 2$ Nicotinic Receptor.** *The journal of biological chemistry.* 285(16):12355-12366.
- McIntosh, J.M., Santos, A.D. y Olivera, B.M. 1999. ***Conus* Peptides Targeted to Specific Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes.** *Annual Review of Biochemistry.* 68:59-88.
- McIntosh, J.M., Absalom, N., Chebib, M., Elgoyhen, A.B., Vincler, M. 2009. **Alpha9 nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain.** *Biochemical Pharmacology.* 78:693-702.
- Nasiripourdori, A., Ranjbar, B., Naderi-Manesh, H. 2009. **Binding of long-chain α -neurotoxin would stabilize the resting state of nAChR: A comparative study with α -conotoxin.** *Theoretical Biology and Medical Modelling.* 6:3 doi: 10.1186/1742-4682-6-3.

- Nury, H., Poitevin, F., Renterghem, C.V., Renterghem, C.V., Chanfeux, J.P., Corringer, P.J., Delarue, M., Baaden, M. 2010. **One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue.** *PNAS*. 107(14):6275–6280.
- Norton, R.S., Olivera, B.M. 2006. **Conotoxins down under.** *Toxicon*. 48(7):780-98.
- Olivera, B.M. 2006. **Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics.** *J Biol Chem*. 281:31173-31177.
- Picciotto, M.R., Caldarone, B.J., Brunzell, D.H., Zachariou, V., Stevens, T.R., King, S.L. 2001. **Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications.** *Pharmacol Ther*. 92:89-108.
- Smit, A.B., Syed, N.I., Schaap, D., Mnnen, J.V., Klumperman, J., Kits, K.S., Lodder, H., van de Schors, R.C., van Elk, R., Sorgendrager, B., Brejc, K., Sixma, T.K., Geraerts, W.P.M. 2001. **A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission.** *Nature*. 411:261-268.
- Stephenson, R.P.A. 1956. **Modification of receptor theory.** *Brit. J. Pharmacol*, 11:379-385.
- Sixma, T.K., Smit, A.B. 2003. **Acetylcholine Binding Protein (AChBP): A Secreted Glial Protein That Provides a High-Resolution Model for the Extracellular Domain of Pentameric Ligand-Gated Ion Channels.** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32:311-334.
- Sobel, A., Weber, M., Changeux, J.P. 1977. **Large-Scale Purification in Its Membrane-Bound of the Acetylcholine-Receptor Protein and Detergent-Extracted Forms from *Torpedo marmorata* Electric Organ.** *Eur. J. Biochem*. 80:215-224.
- Taylor, P.W., Osaka, H., Bolles, B., Keller, S.H., Malany, S. 2000. **Contributions of Studies of the Nicotinic Receptor from Muscle to Defining Structural and Functional Properties of Ligand-Gated Ion Channels.** In, *Neuronal Nicotinic Receptors*. (Clementi, F., Fornasari, D., and Gotti, C., eds.) Springer-Verlag, Berlin, 79–100 p.

- Talley, T.T., Olivera, B.M., Han, K.H., Christensen, S.B., Dowell, C., Tsingenlly, I., Ho, K.Y., Taylor, P., McIntosh, M. 2006. **Alpha-conotoxin OmIA is a potent ligand for the acetylcholine-binding protein as well as $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors.** *J Biol Chem.* 281:24678-24686.
- Terlau, H., Olivera, B.M. 2004. **Conus Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides.** *Physiol Rev.* Doi: 84: 41–68; 10.1152.
- Ulens, C., Hogg, R.C., Celie, P.H., Bertrand, D., Tsetlin, V., Smit, A.B., Sixma, T.K. 2006. **Structural determinants of selective alpha-conotoxin binding to a nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP.** *Proc Natl Acad Sci.* 103:3615-3620.
- Vázquez-Palacios, G y Bonilla-Jaime, H. 2004. **Receptores nicotínicos cerebrales y trastornos neuropsiquiátricos.** *Rev Neurol.* 39(12):1146-1160.
- Wang, C.Z y Chi, C.W. 2004. **Conus Peptides-A Rich Pharmaceutical Treasure** *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 36(11):713–723.
- Ward, J.M., Cockcroft, V.B., Lunt, G.G., Lunt, F.S., Smillie, Wonnacott, S. 1990. **Methyllycaconitine: a selective probe for neuronal a-bungarotoxin binding sites.** 270(1,2):45-48.
- Woodward, S.R., Cruz L.J., Olivera, B.M., Hillyard, D.R. 1990. **Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides.** *The EMBO Journal.* 9(4):1015-1020.
- Yakel, J.L. 2010. **Gating of nicotinic ACh receptors: latest insights into ligand binding and function.** *J Physiol.* 588(4):597–602.

PÁGINAS ELECTRÓNICAS:

<http://molluscs.at/gastropoda/sea/conotoxin.html> (Octubre, 2009).

<http://www.javeriana.edu.co> (Enero, 2010).

http://www.edinformatics.com/interactive_molecules/infor/nicotine.htm (Febrero, 2010).

<http://oceanografia.cicese.mx/predmar/> (Abril, 2009).

<http://www.currentprotocols.com/protocol/ns0715> (Junio, 2011).

XI. A N E X O S

Anexo 1. Soluciones para HPLC.

SOLUCIÓN	COMPUESTO	PORCENTAJE FINAL EN LA SOLUCIÓN	VOLUMEN REQUERIDO PARA 500 mL DE SOLUCIÓN
A	Ácido trifluoroacético	0.12%	600 µL
	H ₂ O destilada	99.88%	499.4 mL

SOLUCIÓN	COMPUESTO	PORCENTAJE FINAL EN LA SOLUCIÓN	VOLUMEN REQUERIDO PARA 250 mL DE SOLUCIÓN
B	Ácido trifluoroacético	0.1%	250 µL
	Acetonitrilo	99.9%	249.75 mL

Anexo 2. Soluciones para extracción.

SOLUCIÓN	COMPUESTO	PORCENTAJE FINAL EN LA SOLUCIÓN	VOLUMEN REQUERIDO PARA 200 mL DE SOLUCIÓN
C	Ácido trifluoroacético	0.01%	200 µL
	H ₂ O destilada	59.99%	119.8 mL
	Acetonitrilo	40%	80 mL