



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



“Bloqueo de canales de potasio Kv1 por la conotoxina
sr11a”

T E S I S

que para obtener el grado académico de

MAESTRA EN CIENCIAS

(QUÍMICA MARINA)

p r e s e n t a

LILIANA IRENE PÉREZ REYES

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Laura I. Escobar Pérez

COMITÉ TUTORAL

Dr. Roberto Arreguín Espinosa

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Dra. Judith Sánchez Rodríguez

Dra. Alejandra Rojas Molina

ASESORES EXTERNOS

Dr. José Estuardo López Vera

Dr. José de Jesús García Valdés

México D. F., 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la UNAM.

A la Dra. Laura I. Escobar Pérez por su asesoría y apoyo imprescindibles en la planeación, desarrollo y buen término de esta Tesis la cual se llevó a cabo en el laboratorio 510 del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

A los miembros del Comité Tutorial, los Doctores Manuel B. Aguilar Ramírez, Roberto Arreguín Espinosa, Alejandra Rojas Molina y Judith Sánchez Rodríguez y a los Asesores Externos, los Doctores José Estuardo López Vera y José de Jesús García Valdés por las valiosas observaciones realizadas a este trabajo de Tesis.

A la M. en C. Carolina Salvador y a la M. en C. Zinaeli López del laboratorio 510 del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM por su apoyo técnico en biología molecular y en los registros electrofisiológicos, respectivamente.

A la Q. F. B. Beatriz Díaz Bello, a la Q. F. B. Claudia Rangel García, al estudiante de M. V. y Z. Camilo Tovar Pacheco y a la Q. Norma Vásquez por compartir el cuidado de las ranas *Xenopus laevis* y de sus ovocitos.

A los Doctores Edgar Heimer de la Cotera y Manuel B. Aguilar y al Biólogo Andrés Falcón del Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la UNAM por la donación del péptido sr11a.

Al Dr. Estuardo López Vera del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por la donación de la cámara de registro así como de sus valiosas sugerencias para su implementación.

Al Dr. Marcelo Galván de la Universidad Autónoma Metropolitana por realizar el modelo tridimensional de la toxina sr11a.

Al Dr. Olaf Pongs del Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Institut für Neurale Signalverarbeitung, Hamburg, Germany; por facilitarnos la adquisición de los cDNAs de los canales Kv1: hKv1.1, rKv1.2, rKv1.3, hKv1.4, rKv1.5 y hKv1.6.

A mis compañeros de laboratorio Rolando Carrisoza, Antonio Romano, Christian Escalona, Teresa Padilla y Ricardo Saldaña que con sus comentarios y observaciones enriquecieron este trabajo.

La alumna contó con una beca para estudios de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y una beca de la Dirección General de Estudios de Posgrado como apoyo para la graduación.

También a:

Dios.

Mis padres: Jesús y Ma. Soledad.

Mis hermanas: Carolina y Natalia.

Mis cuñados: Leonel y Adolfo.

Mi sobrina: Abigail

Mis compañeros de batalla que por no mencionar miles mil nombres mejor no menciono ninguno, bueno: Manuel, Martín, Bety, Abril, Josefina, Columba, Ofe, Mauri, Alain, Gregorio, Marisol, Delfina, Raquel, César, Nadia, Irene, Rubén, Ma. Elena, Ana Ma., Ana, Chayo, J. Antonio, Juanita, Alfredo, Citlalli, etc., etc., etc.

Í N D I C E

ÍNDICE	3
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	9
1 INTRODUCCIÓN	11
1.1 Phylum Mollusca	12
1.2 De la Clase Gastropoda a la Superfamilia Conoidea	15
1.3 Género <i>Conus</i>	16
1.3.1 Hábitat del Género <i>Conus</i>	17
1.3.2 Diferenciación sexual de los conos	18
1.3.3 Aparato venenoso	18
1.4 Conopéptidos	20
1.5 Canales iónicos	20
1.6 Propiedades eléctricas de las membranas celulares	23
1.6.1 Potencial de acción	25
1.6.2 Registro de las corrientes iónicas	26
1.7 Conopéptidos: Tipo de respuesta y clasificación	28
1.8 Toxinas con puentes disulfuro	30
1.8.1 Evolución	30
1.8.2 Estructura de las toxinas que actúan sobre los canales de K ⁺	33
1.8.2.1 Toxinas de alacrán	33
1.8.2.2 Toxinas de araña	36
1.8.2.3 Toxinas de anémona	37
1.8.2.4 Toxinas de víbora	37
1.9 Conotoxinas	38

1.10	I-conotoxinas	40
1.11	<i>Conus spurius</i>	41
1.12	Péptido sr11a	43
1.13	Superfamilia de los canales de potasio	44
1.14	Familia de los canales de potasio activados por voltaje Kv1	48
2	OBJETIVOS	52
2.1	Objetivo general	52
2.2	Objetivos particulares	52
3	METODOLOGÍA	53
3.1	Biología molecular	53
3.2	Inyección del RNA en los ovocitos de la rana <i>Xenopus laevis</i>	53
3.3	Obtención de la toxina	54
3.4	Registros electrofisiológicos	55
3.5	Análisis de datos	56
4	RESULTADOS	57
4.1	Biología molecular	57
4.2	Inyección del RNA en los ovocitos de la rana <i>Xenopus laevis</i>	58
4.3	Registros electrofisiológicos	59
4.3.1	Registros del canal Kv1.2	61
4.3.2	Registros del canal Kv1.3	63
4.3.3	Registros del canal Kv1.4 y Kv1.5	63
4.3.4	Registros del canal Kv1.6	65

5	DISCUSIÓN	67
5.1	Efecto experimental de la sr11a en los canales Kv1	68
5.2	Interacción toxina/canal iónico	70
5.2.1	Toxinas de anémona/Kv1	71
5.2.2	Toxinas de alacrán/Kv1	71
5.2.3	Conotoxinas/Kv1	73
5.2.4	Conotoxina sr11a/Kv1	74
6	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	78
7	BIBLIOGRAFÍA	80

A B R E V I A T U R A S

4AP	4-aminopiridina
α	alfa
A, Amp	amperios
β	beta
C	capacitancia (Sección 1.11)
C	<i>Conus</i>
C_m	capacitancia de la membrana
Ca^{2+}	ión calcio
Cl^-	ión cloruro
d	diferencias entre las corrientes
\bar{d}	media aritmética de las diferencias entre las corrientes
δ	delta
DE	desviación estándar
E_x	potencial de equilibrio del ión X
E_m	potencial de membrana
F	constante de Faraday
γ	gamma
g	conductancia
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia
I	corriente
I_i	corriente iónica
I_x	corriente debida al ión X
I_m	corriente total de la membrana
K^+	ión potasio
l	litro
LB	Luria-Broth
M	concentración molar

m	mili (10^{-3})
μ	micro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
Na ⁺	ión sodio
p	pico (10^{-12})
RMN	resonancia magnética nuclear
s	segundos
S	Siemens
T	tiempo
TEA	tetraetilamonio
V	voltio
[X] _e	concentración extracelular del ión X
[X] _i	concentración intracelular del ión X
z	número de cargas

TOXINAS

AgTX	agitoxina
BgK	toxina de <i>Bunodosoma granulífera</i>
BtX	toxina de <i>Conus betulinus</i>
ChTX	caribdotoxina
HgTX	hongotoxina
IbTX	iberiotoxina
KTX	kaliotoxin
MgTX	margatoxina
MTX	maurotoxina
ShK	toxina de <i>Stichodactyla helianthus</i>
ViTx	toxina de <i>Conus virgo</i>

AMINOÁCIDOS

A, Ala	alanina
C, Cys	cisteína
D, Asp	ácido aspártico
E, Glu	ácido glutámico
g	gamma-carboxiglutamato
F, Phe	fenilalanina
G, Gly	glicina
H, His	histidina
I, Ile	isoleucina
K, Lys	lisina
L, Leu	leucina
M, Met	metionina
N, Asn	asparagina
P, Pro	prolina
O, Hyp	hidroxiprolina
Q, Gln	glutamina
R, Arg	arginina
S, Ser	serina
T, Thr	treonina
V, Val	valina
W, Trp	triptófano
Y, Tyr	tirosina

RESUMEN

Los gasterópodos predadores del género *Conus* abarcan aproximadamente 700 especies y cada una de ellas produce hasta 200 péptidos llamados conopéptidos. Estos caracoles marinos se pueden clasificar según su presa en: piscívoros, molusquívoros y vermívoros. En los ecosistemas marinos tropicales y subtropicales de México habitan aproximadamente 50 especies del género *Conus*.

Los conopéptidos pueden presentar en su estructura primaria enlaces disulfuro. Aquellos que tienen dos o más enlaces disulfuro son nombrados “conotoxinas” las cuales se clasifican con base en la secuencia de su péptido señal. De esta manera actualmente se conocen 13 superfamilias de conotoxinas: T, A, J, O, M, P, I, S, L, D, C, V y G.

Del veneno del caracol vermívoro *Conus spurius* que habita en las aguas del Golfo de México y del Caribe Mexicano se aisló una I-conotoxina (péptido sr11a) cuya inyección intracraneal de esta conotoxina provoca una contractura general del ratón. La conotoxina sr11a pertenece a la superfamilia I, la cual se caracteriza por tener 8 cisteínas con el patrón C-C-CC-CC-C-C.

Hasta ahora se han identificado 15 I-conotoxinas, 6 de ellas pertenecen a la superfamilia I₂ y sólo dos de éstas se han estudiado farmacológicamente. La I-conotoxina BtX aumenta la actividad de los canales de potasio dependientes de voltaje y activados por calcio (BK), mientras que la ViTx bloquea los canales de potasio Kv1.1 y Kv1.3 con una IC₅₀ en el rango μM .

Por la semejanza entre el péptido sr11a y la toxina ViTx (31%), en este trabajo se estudió el efecto que tiene el péptido sr11a en varios de los canales Kv1. Debido a que la cantidad disponible del péptido fue escasa se trabajó con una concentración fija de 640 nM. A esta concentración la conotoxina bloqueó 66.0±10% de los canales Kv1.2, 51.4±6.2% de los Kv1.4 y 69.8±12.2% de los Kv1.6 (P<0.05 y n=3).

Este estudio es de gran relevancia en la identificación de nuevas herramientas farmacológicas de los canales Kv1. Cabe destacar que, en particular la sr11a constituye la

primera toxina de origen peptídico que bloquea el canal Kv1.4 (hasta este trabajo no se había reportado ninguna toxina de araña, alacrán, víbora o caracol que bloquee a este canal de potasio). El canal Kv1.4 es de gran relevancia fisiológica por participar en la corriente transitoria lenta (Ito) del potencial cardiaco y en la repolarización del potencial en las membranas presinápticas.

Este trabajo confirma que los venenos de las especies del género *Conus* son una fuente rica de nuevas herramientas farmacológicas.

1. INTRODUCCIÓN

México se encuentra entre los paralelos 32° y 14° latitud Norte y es atravesado por el Trópico de Cáncer, presenta una variedad de climas: tropical, templado, desértico y frío. Gracias a estas condiciones climáticas, cuenta con un gran número de especies vegetales y animales, por lo que es considerado un país megadiverso (Fig. 1).

Tabla 4.1 Riqueza de especies para distintos grupos taxonómicos en México

Grupo taxonómico	Especies
Invertebrados	
Artrópodos	≈ 85 740
Crustáceos	≈ 4 600
Insectos	≈ 77 900
Arácnidos	≈ 3 240
Subtotal	≈ 171 480
Vertebrados	
Peces	2 122
Anfibios	361
Reptiles	804
Aves	1 250
Mamíferos	478
Subtotal	5 015
Plantas	
Angiospermas	22 351
Gimnospermas	145
Pteridofitas	1 026
Briofitas (musgos y hepáticas)	1 480
Algas (macroalgas)	945
Subtotal	25 947
Hongos	6 000 - 120 000

Fuente:
Conabio. México. 2005.

Fig. 1 Diversidad de especies en México

México tiene cerca de 11,000 Km de litoral al limitar con el Océano Pacífico, el Golfo de México y el Caribe Mexicano, lo que da una superficie de 3 millones de km² de zona económica exclusiva. Podemos encontrar ecosistemas marinos tropicales y subtropicales con arrecifes coralinos, ventilas hidrotermales y zonas abisales.

Se estima que en los ecosistemas marinos mundiales habitan de 5 a 10 millones de especies, de las cuales se han registrado 7,728 en México. De estas, se han descrito 5,000 especies de moluscos, lo cual es el 10% a nivel mundial, también se tiene el 10% de los peces, mientras que de mamíferos marinos se cuenta con 50 especies que son el 40% del total mundial. [Ceballos, G. y Eccardi, F.; 1996]

Gracias a esta megadiversidad de los ecosistemas marinos mexicanos, aún hay mucho por conocer de ellos. Actualmente algunos grupos de investigación se han enfocado a conocer la composición de venenos producidos por especies como los caracoles marinos, los cuales constituyen una fuente importante de productos bioquímicos con posibles aplicaciones farmacológicas.

1.1 Phylum Mollusca

Los caracoles marinos pertenecen al phylum Mollusca, uno de los 11 phyla que forman el Reino Animal (Fig. 2) [Kimball, J. W.; 1986]. El phylum Mollusca es el segundo más grande en número de especies pues se estima que contiene a más de 100,000, clasificadas en 7 clases, cientos de familias y miles de géneros (Fig. 3), lo cual se debe gracias a que han evolucionado por más de 550 millones de años [Kimball, J. W.; 1986 y www.conchologistofamerica.org].

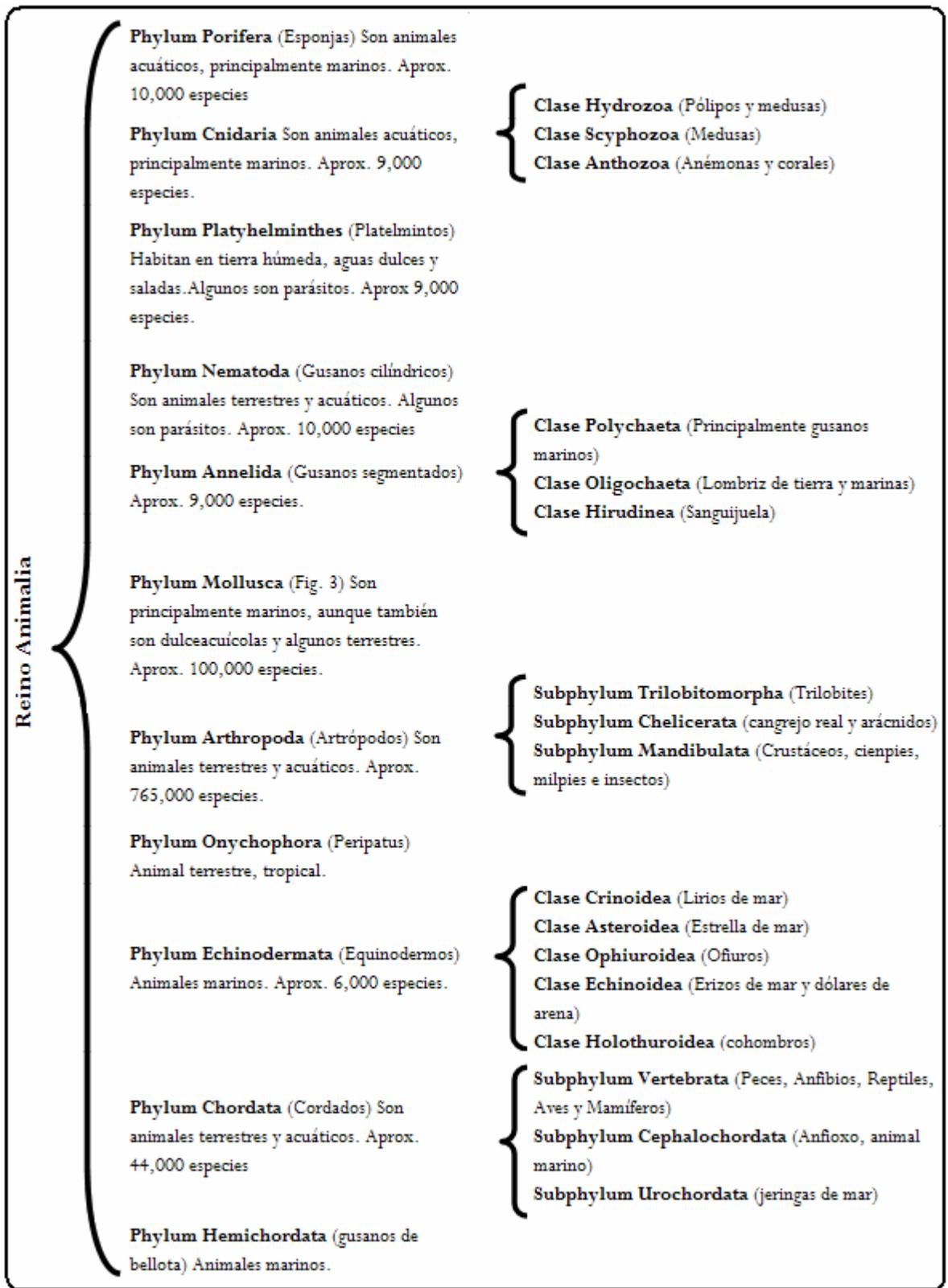


Fig. 2 Reino Animal y sus Phyla (Basado en [Kimball, J. W.; 1986]).

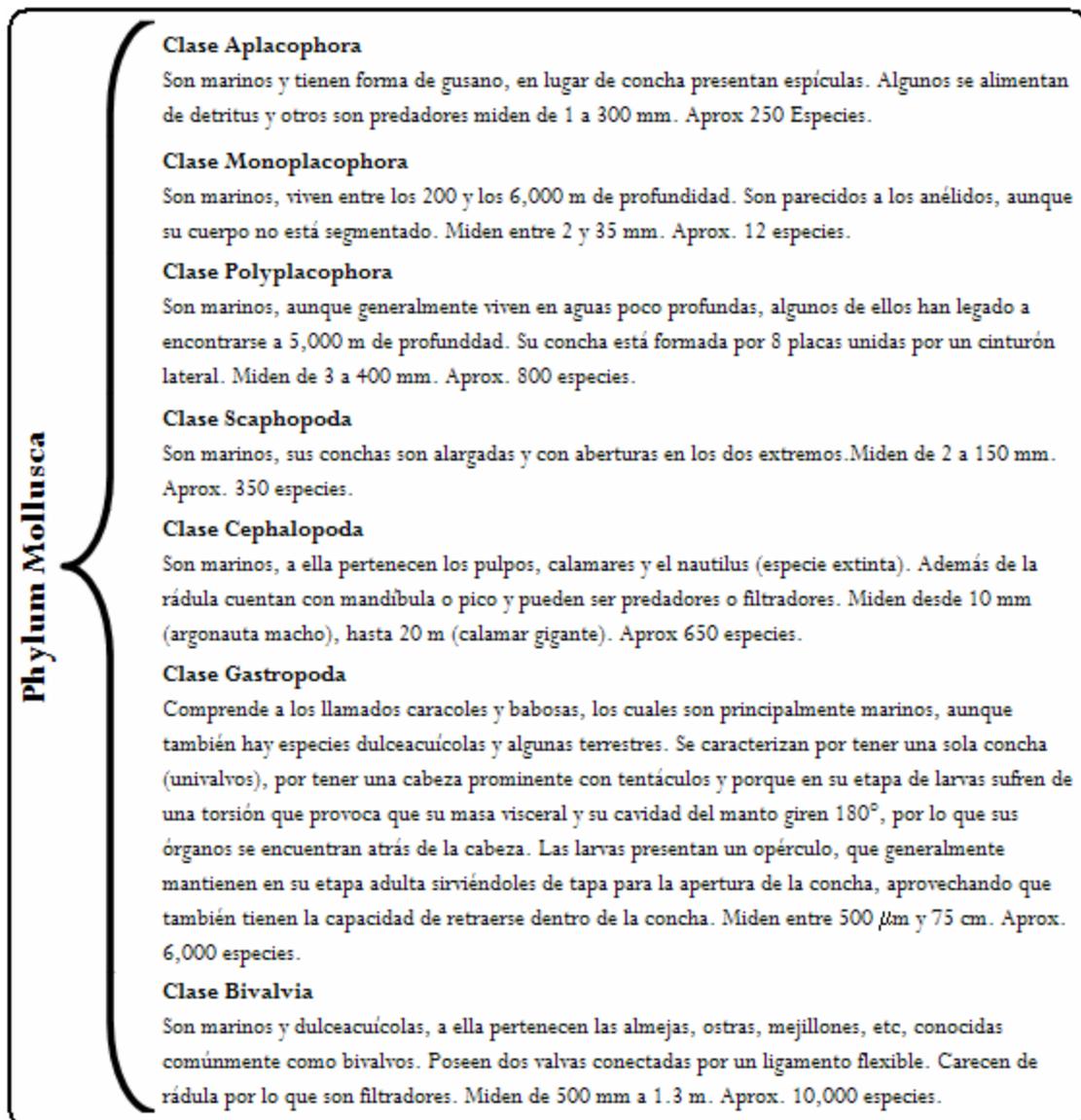


Fig. 3 Phylum Mollusca (Basado en [Kimball, J. W.; 1986 y www.conchologistofamerica.org]).

De manera general estos animales de cuerpo blando presentan (Fig. 4):

- Un manto que secreta carbonato de calcio dando origen a espículas o conchas.
- Una cavidad del manto en donde se realiza la respiración.
- El cuerpo dividido en tres regiones: la cabeza, el pie y la masa visceral.
- Tres espacios para el corazón, el riñón y la gónada.
- Una rádula, cinta o diente utilizado en su alimentación

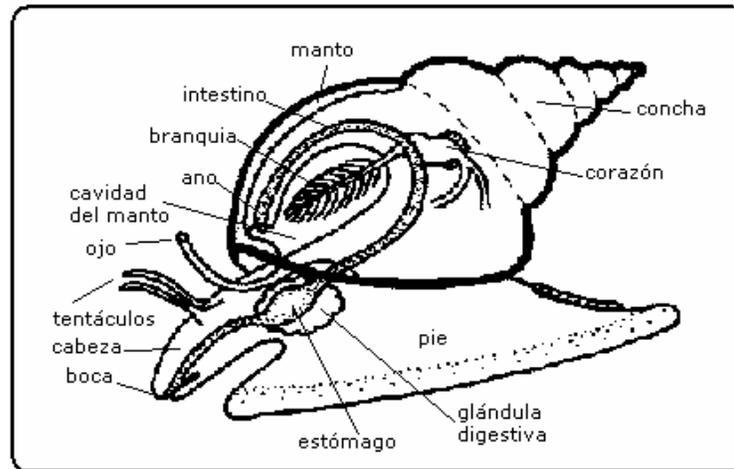


Fig. 4 Esquema representativo de la anatomía de los caracoles marinos que pertenecen al Phylum Mollusca (Tomado de [www.naturenotes.org/notes/dbiologia_mollusca.htm]).

1.2 De la clase Gastropoda a la superfamilia Conoidea

La clase Gastropoda es la más rica en especies de los moluscos, a ella pertenecen 40,000 especies que se encuentran repartidas en 6 subclases, de las cuales la Prosobranchia es la más numerosa e incluye a todos los individuos que respiran por branquias en los que la cavidad del manto, el manto, las branquias y el ano se encuentran situados en la parte anterior del cuerpo [Luna-Ramírez, K. S.; 2006]. De esta subclase se deriva el superorden Archaeogastropoda que incluye al orden Neogastropoda al cual pertenece la superfamilia Conoidea (Fig. 5).

La superfamilia Conoidea, también conocida como suborden Toxoglossa agrupa a todos los caracoles marinos venenosos o toxoglossos conocidos en la actualidad, los cuales son más de 3,000 especies [López-Vera, E.; 2005]. J. D. Taylor y otros, propusieron en el año 2003 clasificar a la superfamilia Conoidea en 6 familias tomando en cuenta la anatomía de la parte anterior del aparato digestivo de las especies que estudiaron [Taylor, J. D.; et. al.; 1993]. De acuerdo con esta clasificación, se lograron ubicar dentro de esta superfamilia dos grupos que no presentan un aparato venenoso:

- Subfamilia Perevicaciinae (De la familia Terebridae)
- Familia Strictispiridae

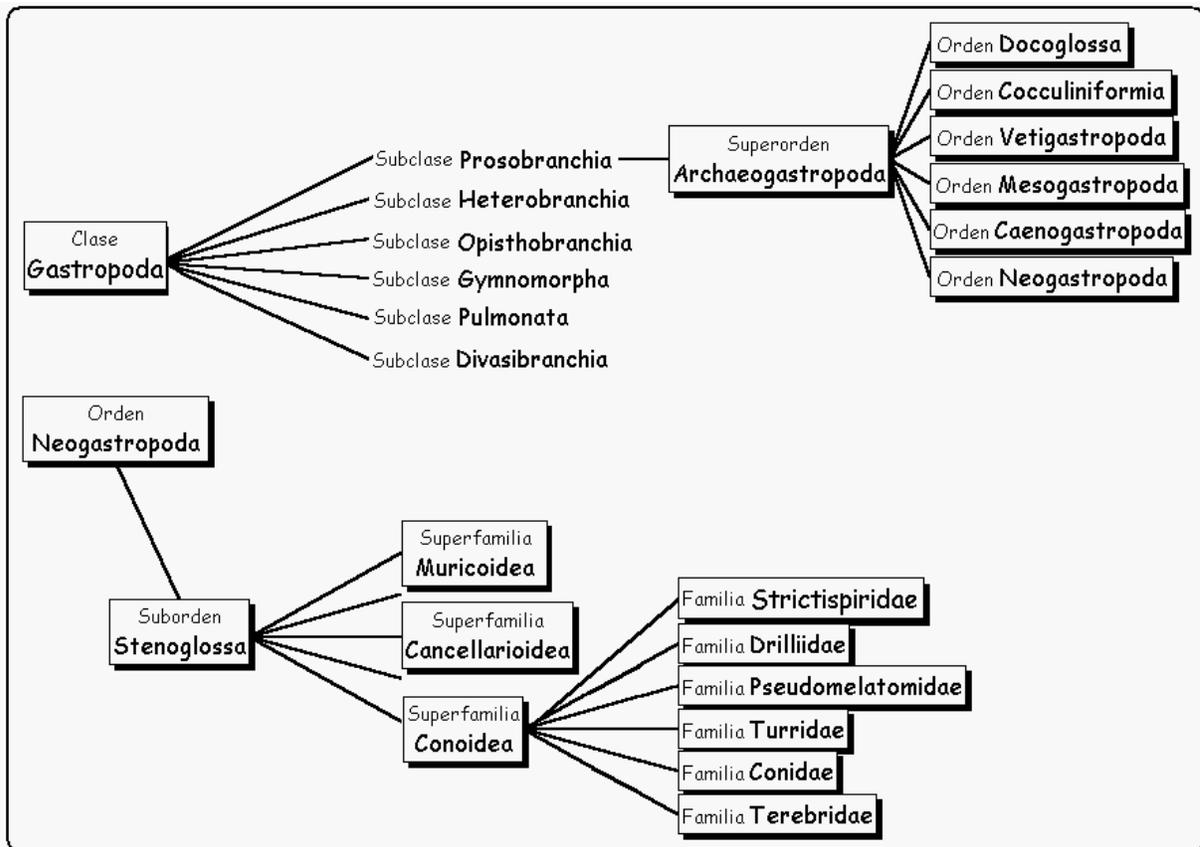


Fig. 5 Clase Gastropoda y Orden Neogastropoda (Modificada de [www.conchologistofamerica.org]).

1.3 Género *Conus*

A la familia Conidae (Fig. 6) pertenece el género *Conus* (caracoles cónicos o conos) (Fig. 6) la cual presenta una amplia distribución geográfica y gran diversidad de especies (más de 500 especies pertenecen a este género) lo cual se ha logrado a lo largo de millones de años. Los conos aparecen después de la extinción masiva del Cretáceo, después de la cual la expansión del género *Conus* se favorece pues algunos moluscos predadores como los amonites se extinguen. Una segunda expansión se da a partir del Mioceno y continúa hasta nuestros días [Terlau, H. y Olivera, B. M.; 2004].

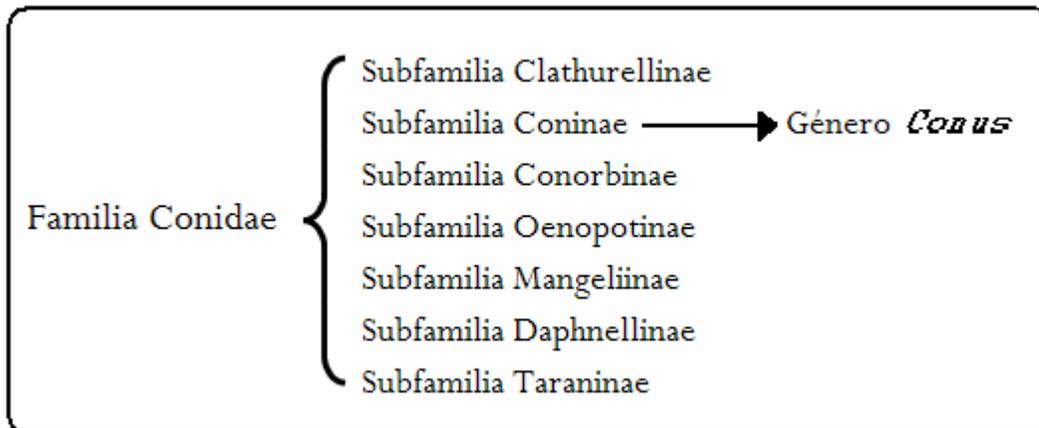


Fig. 6 Familia Conidae (Basada en [López-Vera, E.; 2005]).

1.3.1 Hábitat del género *Conus*

Las aguas oceánicas contenidas en el área latitudinal incluida entre los 40° Norte y los 40° Sur son el hábitat de la mayoría de los conos y se han dividido en 7 regiones para su estudio:

- Indo-Pacífica
- Panameña
- Caribeña
- Oeste de África
- Sudafricana
- Peruana
- Mediterránea

La región más poblada por estos caracoles (~ 60% del total de las especies) es la Indo-Pacífica, en donde se pueden encontrar hasta 30 especies diferentes en un mismo arrecife coralino. Por el contrario, las zonas Sudafricana y Mediterránea son las menos pobladas (con menos de 10 especies en cada una de ellas) [Duda, T. F. y Kohn, A. J.; 2005].

A pesar de que se han encontrado algunos conos a 400 m de profundidad, la mayoría de ellos habita las arenas, los arrecifes y los lodos de la zona epipelágica, generalmente a

menos de 100 m de profundidad (Fig. 7) [Terlau, H. y Olivera, B. M.; 2004 y www.coneshell.net].

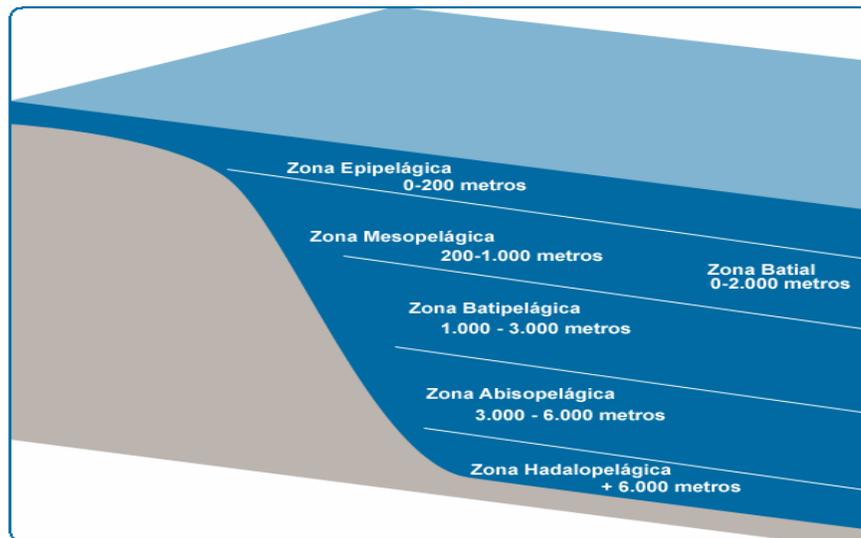


Fig. 7 Zonas marinas (Tomado de [www.pescaderiascorunesas.es/productos/ecosistemas_marinos.php]).

1.3.2 Diferenciación sexual de los conos

Los organismos del género *Conus* presentan sexos separados y en muchas especies se manifiesta cierto dimorfismo sexual en el tamaño, la forma y el color de la concha. El pene de los ejemplares macho se encuentra detrás del ojo derecho, y se utiliza para clasificar a las especies. La vagina de la hembra es un poro algunas veces rodeado por un anillo. Los testículos, los ovarios y los conductos reproductivos están colocados en la espiral interna de la concha [www.coneshell.net].

1.3.3 Aparato venenoso

La rádula y el sistema venenoso son un claro ejemplo de cómo se ha dado el proceso evolutivo. En la mayoría de los gasterópodos, la rádula está formada por un número variable de dientes quitinosos ubicados en la cámara anterior de la faringe, justo después de la probóscide.

En las familias *Conidae*, *Terebridae* y *Turridae* la rádula ha evolucionado hacia dientes puntiagudos y acanalados hechos para arponear e inyectar un potente veneno a su presa.

En los *Toxoglossa* primitivos, los dientes radulares estaban colocados en hileras para rasgar el alimento. Subiendo en la escala evolutiva, los dientes empiezan a ser cada vez más puntiagudos y pierden su función primitiva, además de que están en un saco sin conexión con la probóscide [www.coneshell.net].

El aparato venenoso del género *Conus* (Fig. 8) está compuesto por un ducto en donde se produce el veneno en estructuras llamadas gránulos. El impulso generado por un bulbo muscular provoca que el veneno pase de la parte distal del ducto a la faringe o al saco radular [Marshall, J.; et. al.; 2002]. En la sección conocida como el brazo largo del saco radular se producen los dientes que ya maduros, se almacenan en el brazo corto. Por medio de un mecanismo poco estudiado, los dientes pasan del brazo corto del saco radular a la faringe en donde el lumen del diente se carga con el veneno para luego ser impulsado a través de la probóscide y arponear a su presa. Se sabe que la estrategia para atrapar a la presa es específica para cada especie, en particular, algunos molusquívoros pueden usar hasta media docena de dientes para cazar a su presa [Terlau, H. y Olivera, B. M.; 2004].

Los caracoles marinos del género *Conus* producen un poderoso veneno que contiene de 100 a 200 péptidos diferentes para cazar a su presa y defenderse de sus predadores; estos caracoles se clasifican según su presa en piscívoros (peces), molusquívoros (otros moluscos), vermívoros (se alimentan de gusanos y es el grupo más numeroso ~75%) [Terlau, H. y Olivera, B. M.; 2004] y generalistas (peces, moluscos y gusanos, p. ej. *C. californicus* [Marshall, J.; et. al.; 2002]).

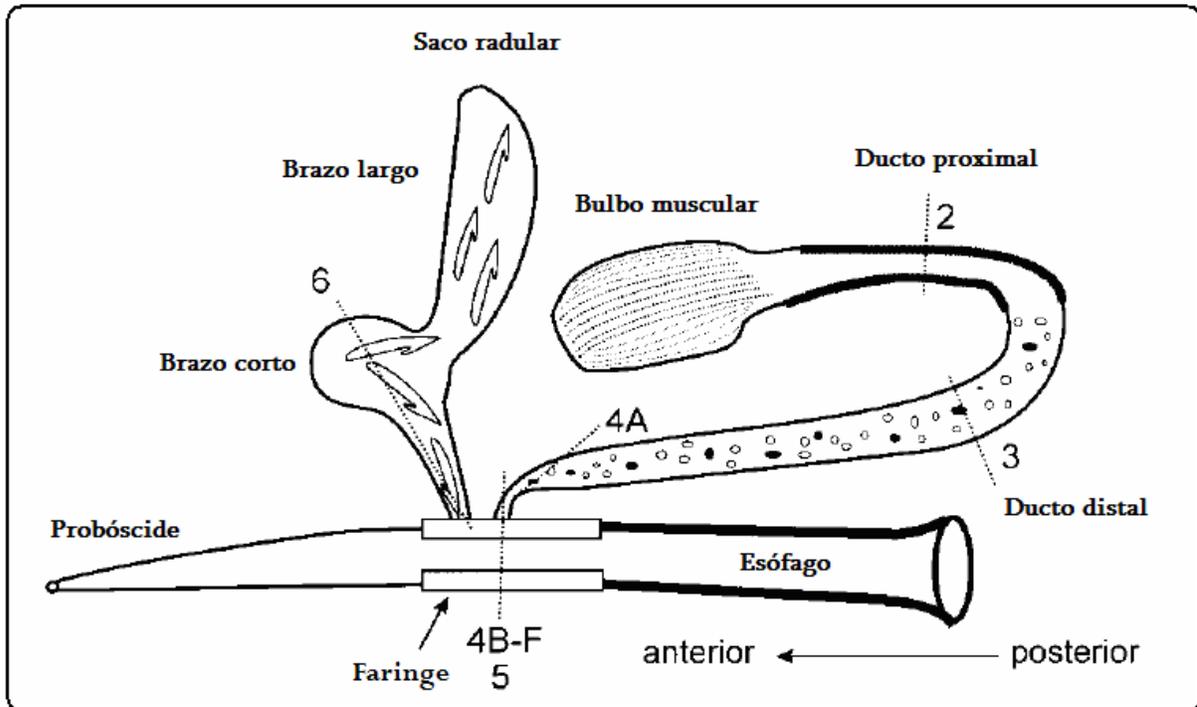


Fig. 8 Representación esquemática del aparato venoso de los caracoles del género *Conus* (Tomado de [Marshall, J.; et. al.; 2002]).

1.4 Conopéptidos

El veneno producido por cada una de las especies de *Conus* es específico y potente, algunos venenos son letales para el hombre (p. ej. *C. geographus*). Gracias a que cada una de las más de 500 especies pertenecientes a este género ha evolucionado de acuerdo a los factores particulares a los que ha sido expuesta en su ambiente, la variedad de péptidos con actividad biológica que han desarrollado estos caracoles llega a estimarse entre 50,000 y 140,000 [Olivera, B. M. y Teichert, R. W.; 2007]. Los venenos comprenden un coctel de hasta 200 péptidos diferentes llamados conopéptidos cuyos blancos moleculares principales son los canales iónicos.

1.5 Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas que forman poros hidrofílicos que atraviesan la membrana celular y permiten el paso selectivo de iones inorgánicos (Na^+ , K^+ , Cl^- , etc.) a gran velocidad (hasta 100 mil iones por milisegundo) a favor de su gradiente

electroquímico, como respuesta a un estímulo específico [Alberts, B.; et. al.; 1994]. Estas proteínas de transporte iónico en las membranas plasmáticas participan en: la regulación del potencial de acción cardiaco y neuronal, la liberación de neurotransmisores, la contractibilidad muscular, la secreción hormonal, la regulación del volumen celular y de la regulación de las vías de señalización, etc. [Kaczorowski, G. J y García M. L.; 1999]. Recientemente se reportó que las funciones de los canales de potasio no se limitan a aquellas en las que se involucra el paso de iones a través de ellos, sino que además pueden estar involucrados en interacciones intercelulares (p. ej., subunidades β de los canales de sodio dependientes de voltaje están relacionadas con la adhesión celular lo que permite una adecuada interacción con las cinasas necesarias en el desarrollo de las células nerviosas) y en la catálisis de reacciones intracelulares (p. ej.; subunidades β de canales de potasio activados por voltaje pueden actuar como cinasas o como oxidoreductasas) [Drahl, C.; 2008].

En general, los canales iónicos al abrirse y cerrarse pueden presentar por lo menos un estado abierto y más de un estado cerrado, aunque en los canales que se activan por voltaje se puede presentar además un estado inactivado, no conductor. En contraste, los canales activados por ligando (receptores ionotrópicos) presentan el fenómeno del estado desensibilizado.

La transición de un canal activado por el voltaje a estos estados recibe el nombre de “gating”, el cual se ha visualizado como una “compuerta” que se abre y se cierra (Fig. 9) [Kandel, E. C.; et. al.; 2000].

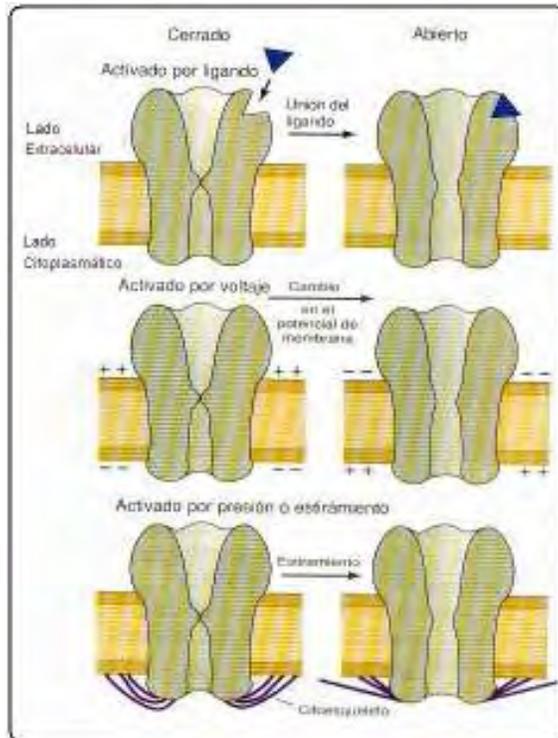


Fig. 9 Apertura de los canales iónicos por diversos estímulos (Tomado de [Kandel, E. C.; et. al.; 2000])

En resumen, los canales iónicos se activan de manera específica por alguno de los estímulos siguientes [Kandel, E. C.; et. al.; 2000]:

- **Ligando (intracelular o extracelular):** La energía de la unión del ligando impulsa al canal al estado abierto. El ligando puede ser un nucleótido cíclico, un neurotransmisor como el GABA, incluso pueden ser iones como el calcio.
- **Voltaje:** La energía de la regulación de apertura procede de una variación en el potencial que despolariza o hiperpolariza la membrana lo cual provoca un cambio conformacional en el sensor de voltaje.
- **Tensión mecánica:** La energía de regulación de la apertura y el cierre puede proceder de fuerzas mecánicas que se transmiten al canal a través del citoesqueleto por una variación en la tensión de la bicapa lipídica.

Los canales iónicos están formados por una o más proteínas “subunidades” en las que se encuentra una región llamada “filtro de selectividad”. Los aminoácidos de esta región se

encargan de seleccionar el tipo de ión que puede pasar a través de él. En el caso de los canales de potasio dependientes de voltaje, se ha identificado la secuencia GYG como la responsable de su selectividad. Gracias a esta propiedad los canales iónicos pueden clasificarse de acuerdo al ión que fluye a través de ellos:

- Catiónicos: permiten el paso de uno o más de los tipos de iones siguientes: sodio, potasio y calcio.
- Aniónicos: permiten el paso del ión cloruro, pero se les refiere común e incorrectamente como canales de cloro.

1.6 Propiedades eléctricas de las membranas celulares

Se puede pensar en las membranas celulares como capacitores eléctricos, pues son bicapas lipídicas entre dos soluciones conductoras. La presencia y apertura de los canales iónicos de sodio, potasio, calcio o cloruro, permite el paso de iones y, por ende, se producen corrientes a través de la membrana, lo cual se puede modelar con un circuito eléctrico, en donde los canales iónicos se representan como resistencias (Fig. 10).

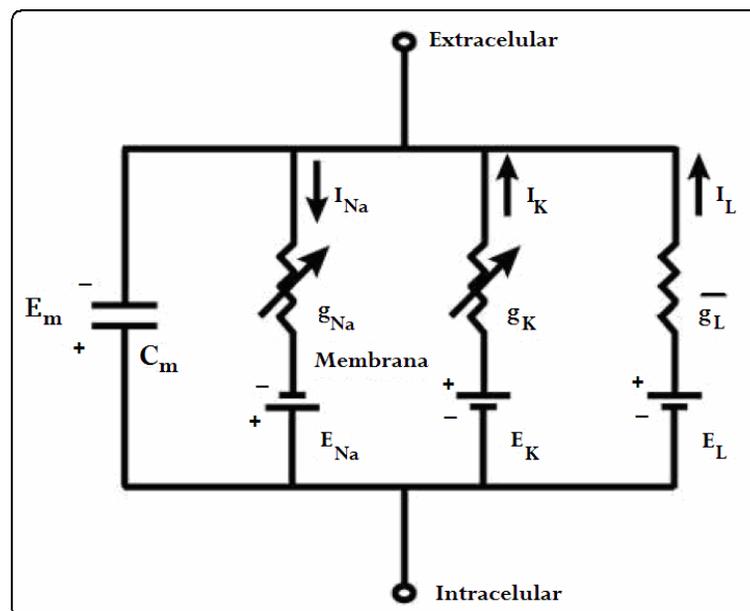


Fig. 10 Diagrama de circuitos de Hodgkin-Huxley para representar la membrana celular. En donde E_m , potencial de membrana; C_m , capacitancia de membrana; Na, sodio, K, potasio; L, "leak" fuga; I, corriente; g, conductancia y E, potencial (Tomada de [Rudy, Y. y Silva, J. R.; 2006]).

El potencial de membrana celular se puede calcular con base en la ecuación propuesta por Goldman, Hodgkin y Katz a mediados del siglo pasado:

$$E_m = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{P_K [K]_e + P_{Na} [Na]_e + P_{Cl} [Cl]_i}{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_e}$$

En donde E_m es el potencial de membrana en el reposo, R es la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta, Z es la valencia, F es la constante de Faraday, P_x es la permeabilidad del ión X , $[X]_e$ es la concentración extracelular del ión X y $[X]_i$ es la concentración intracelular del ión X [Pastor, J.; 2000]. De manera general, en el reposo hay más cargas negativas en el interior de la membrana celular que en su exterior, por lo que el capacitor membranal está polarizado. Por convención se dice que la membrana se **despolariza** cuando aumentan las cargas positivas en su superficie intracelular. Por el contrario, cuando las cargas positivas en el interior disminuyen con respecto al estado en reposo, se provoca que el potencial de membrana se haga más negativo, es decir la membrana se **hiperpolariza**.

La ecuación de Nerst se utiliza para conocer el potencial de equilibrio del ión X (E_x) dependiendo de su concentración en el medio intracelular y extracelular.

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_e}{[X]_i}$$

El potencial de equilibrio del ión X es el valor al que tendería el potencial de membrana en caso de ser permeable sólo a ese ión. Además refleja el gradiente electroquímico para cada uno de los iones, (Tabla 1) los cuales tienden a moverse a favor de estos gradientes; sin embargo, los gradientes se mantienen constantes gracias a mecanismos diversos [Aidley, D. J. y Standfield, P. R.; 1998]:

- Bombas de intercambio de iones. El ión sodio se expulsa del interior de la célula a razón de 3 iones sodio por dos iones potasio que entran, gracias a la bomba de

sodio-potasio ATP-asa, que como su nombre lo indica consume una molécula de ATP.

- Canales iónicos. Los iones potasio también pueden entrar a la célula de manera pasiva por el gradiente eléctrico a través de canales iónicos selectivos a potasio (canales de potasio rectificadores entrantes) que están abiertos a potenciales hiperpolarizantes.
- Captura por organelos. Los iones calcio son almacenados en la mitocondria y en el retículo endoplásmico.

IONES	INTRACELULAR	EXTRACELULAR	E_x
Na +	12 mM	145 mM	+67 mV
K -	155 mM	4 mM	-98 mV
Ca 2 +	0.1 mM	1.5 mM	+129 mV
Cl -	4.2 mM	123 mM	-90 mV

Tabla 1 Concentración intracelular (citoplasma) y extracelular (plasma) de los principales iones en células de mamífero (Tomada de [Hill, B.; 2001]).

1.6.1 Potencial de acción

Las células excitables (neurona, músculo y corazón) mantienen su potencial de reposo entre -50 y -90 mV. Estas células además presentan potenciales de acción.

Un potencial de acción ocurre cuando los iones Na⁺ fluyen al interior de la célula, observándose una despolarización que genera cambios espacio-temporales en el potencial de membrana de la célula excitable lo cual provoca la señal de disparo para la contracción muscular o para transmitir información en el sistema nervioso [Pastor, J.; 2000 y Bassani, R. A.; 2006].

En el potencial de acción cardiaco participan varios canales iónicos con propiedades de “gating” diferentes, que en conjunto dan lugar a las fases siguientes (Fig. 11) [Bassani, R. A.; 2006]:

- Fase 0 se activa cuando se despolariza la membrana y se alcanza el umbral de activación de los canales Nav, con lo cual se abren de manera instantánea generando una despolarización mayor de la membrana.
- Fase 1 Se activan los canales de potasio Kv4.3/4.2 y Kv1.4 y repolarizan de manera parcial la membrana.
- Fase 2 Participan canales de potasio Kv rectificadores salientes y canales de calcio tipo L, por lo que se observa una meseta y repolarización lenta.
- Fase 3 La participación de los canales Kir rectificadores entrantes genera una repolarización más rápida.

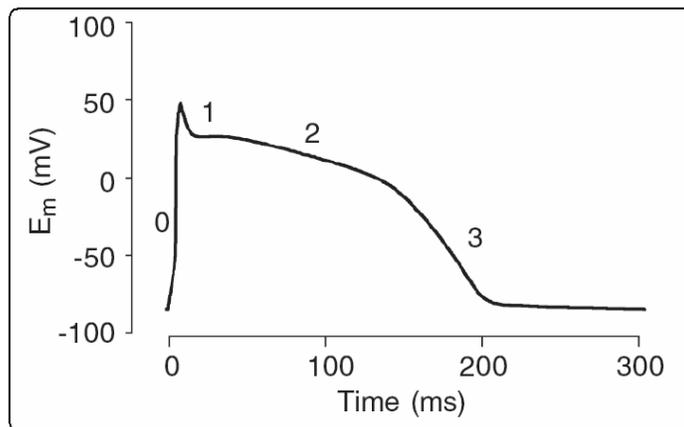


Fig. 11 Potencial de acción cardíaco, en donde se muestran las fases 0, 1, 2 y 3 (Tomada de [Bassani, R. A.; 2006]).

1.6.2 Registro de las corrientes iónicas

Recordando que la membrana celular se comporta como un capacitor y que el paso de iones genera una corriente definida por la fórmula:

$$I = C \frac{dV}{dT}$$

donde C es la capacitancia y dV/dt es el cambio de voltaje con respecto al tiempo.

Podemos deducir que la corriente que se produce a través de la membrana celular está dada por la fórmula:

$$I_m = I_i + C_m \frac{dV}{dT}$$

donde I_m es la corriente total de la membrana, I_i es la corriente iónica y C_m es la capacitancia de la membrana. Por lo que si logramos mantener el potencial de la membrana constante, la corriente capacitiva se hace cero y la corriente de la membrana será igual a la corriente que pasa a través de los canales iónicos [Aidley, D. J. y Standfield, P. R.; 1998].

En la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (TEVC, por sus siglas en inglés Two Electrode Voltage Clamp), un microelectrodo fija el voltaje de la membrana celular, mientras que el otro microelectrodo registra y suministra la corriente transmembranal necesaria para mantener ese voltaje fijo, lo que indirectamente nos dice cual es la corriente iónica producida por la apertura de los canales iónicos [The Axon Guide; 1993] (Fig. 12).

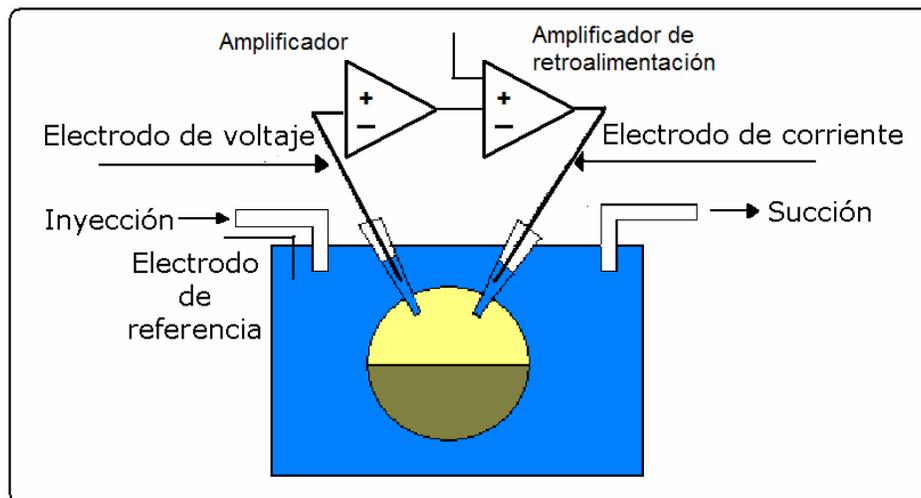


Fig. 12 Fijación de voltaje con dos microelectrodos en el ovocito de la rana *Xenopus laevis*.

Por convención, en los registros de las corrientes, los valores positivos indican que se trata de una corriente positiva saliente (por ejemplo de potasio), es decir el flujo de los iones positivos se da del interior al exterior de la célula. Los valores negativos nos dicen que se trata de una corriente positiva entrante (por ejemplo: de sodio o de calcio), indicando que el flujo de estos iones es hacia el interior de la célula.

Debido a que la inserción de los dos microelectrodos en una célula puede dañarla si es pequeña, esta técnica se emplea en células grandes, especialmente en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* [Ogden, D. C.; 1994]. Además de su tamaño, estos ovocitos tienen la ventaja de ser un excelente sistema de expresión heterólogo de canales iónicos y transportadores, pues el RNA de una proteína exógena en el citoplasma del ovocito se traduce [Bianchi, L. y Driscoll, M.; 2006].

1.7 CONOPÉPTIDOS: Tipo de respuesta y clasificación

Los conopéptidos pueden generar tres tipos de respuesta en la presa [Terlau, H. y Olivera, B. M.; 2004]:

- Excitabilidad celular. Genera en la presa un estado tetanizado inmediatamente después de la inyección del veneno. Esta respuesta es provocada por varios conopéptidos [Olivera, B. M. y Teichert, R. W.; 2007].
 - 1 δ -conotoxinas. Retrasan la inactivación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje [Terlau, H.; et. al.; 1996].
 - 2 κ -conotoxinas. Inhiben a los canales de K^+ dependientes de voltaje [Terlau, H.; et. al.; 1996].
 - 3 ι -conotoxinas. Reducen el umbral de activación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje [Buczek, O.; et. al.; 2007].
- Inhibición motora. El efecto de los conopéptidos es inhibir a los canales de Na^+ , de Ca^{2+} y a los receptores nicotínicos postsinápticos para provocar la inhibición total de la neurotransmisión. La inhibición total se da poco a poco y se logra después del efecto tetanizante.
- Inhibición Nirvana. Algunos *Conus* piscívoros atrapan a sus presas con su boca falsa en forma de red y se cree que un efecto anestésico en la presa facilita su caza.

Los conopéptidos se clasifican de acuerdo al número y al patrón de puentes disulfuro (unión covalente entre dos cisteínas) presentes en su estructura primaria (Tabla 2), de esta

manera hasta el día de hoy se conocen 5 familias de conopeptidos sin o con un puente disulfuro y 13 superfamilias de conotoxinas [Chen, P.; et. al.; 2008 y Yuan, D.; et. al.; 2008] con dos o más puentes disulfuro (conocidos como conotoxinas). De acuerdo al patrón de cisteínas y al número de aminoácidos entre ellas, se conocen 17 estructuras para las secuencias de las conotoxinas, identificadas con un número romano, la mayor de las veces una estructura corresponde a una superfamilia.

CONOPEPTIDOS	Pobres en puentes disulfuro	Sin enlace S-S	Familia de Contulakinas	Agonista de la Neurotensina
			Familia de Conantokinas	Inhibidor del receptor de NMDA
			Familia de Conofarmidas	¿Agonista del receptor de Rfamidas?
		Con un enlace S-S	Familia de Conopresinas	Agonista de la vasopresina
			Familiade Contrifanos	¿?
		Ricos en puentes disulfuro	Superfamilia O	Estructuras VI/VII
	Superfamilia M		Estructura III	Patrón CC-C-C-CC
	Superfamilia A		Estructuras I/II	Patrón CC-C-C
			Estructura IV	Patrón CC-C-C-C-C
	Superfamilia S		Estructura VIII	Patrón C-C-C-C-C-C-C-C-C
	Superfamilia T		Estructura V	Patrón CC-CC
	Superfamilia P		Estructura IX	Patrón C-C-C-C-C-C
	Superfamilia I		Estructura XI	Patrón C-C-CC-CC-C-C
	Superfamilia L		Estructura XIV	Patrón C-C-C-C
	Superfamilia J		Estructura XIV	Patrón C-C-C-C
	Superfamilia V		Estructura XV	Patrón C-C-CC-C-C-C-C
	Superfamilia C	Estructura X	Patrón C-C	
Superfamilia D	Estructura XII	Patrón C-CC-C-CC-C-C-C-C		
	Estructura XIII	Patrón C-C-C-CC-C-C-C		
	Estructura XVI	Patrón C-C-C-CCC-C-C-C-C		
	Estructura XVII	Patrón C-C-CC-C-CC-C		

Tabla 2. Clasificación genética y estructural de los conopeptidos y las conotoxinas [Terlau, H. y Olivera, B. M.; 2004; Chen, P.; et. al.; 2008; Yuan, D.; et. al.; 2008; Jiménez, E. C.; et. al.; 2007; Loughnan, M.; et. al.; 2000 y Peng, C.; et. al.; 2006].

Los conopéptidos se encuentran en el ducto venenoso como precursores o propéptidos, los cuales tienen una secuencia altamente conservada, específica para cada patrón de cisteínas en el extremo NH₂ terminal conocida como región “pre” o secuencia señal del precursor. En la región intermedia llamada “pro” se encuentran señales que son reconocidas por enzimas que catalizan modificaciones postraduccionales. En el extremo COOH terminal se localiza la región de la toxina madura que es la parte menos conservada del precursor (Fig. 13).

R11.4	MKLCLTFLLVIMILASVTG	EKSSKHTLSRAA	-RVKNRGP	SFCKADEKPKYHADCCNCLGGICKPSTSWIGCSTNVFLTR
R11.3	MKLCLTFLLVIMILASVTG	EKLSEQTLRRAA	-R-KNKGPRC	WVGRVHCTYHKDCCPSVCCFKGRCKPQSWGCSGPT
Ep11.1	MKLCLTFLLVILVILP	SVTGEKSSKRTLSGAALR	-GDWGC	SGIGQCGQDSNCCGDMCCYQICAMTFAACGP

Fig. 13 Secuencia del precursor de las conotoxinas de la superfamilia I, [Buczek, O.; et. al.; 2005b]. En rojo la secuencia señal, en negro la región pro y en azul la toxina madura. (Para identificar a cada uno de los péptidos se utilizan siglas características del *Conus* del cual provienen, seguidas del número que identifica la estructura primaria del péptido) R, *C. radiatus* y Ep, *C. episcopatus*.

De esta manera, para tener los péptidos activos que son las toxinas maduras es necesario que ocurra un corte proteolítico del precursor para liberar a la toxina funcional, la cual será inyectada a la presa [Terlau, H. y Olivera, B. M.; 2004]. Actualmente se desconoce en que región del aparato venenoso sucede este fenómeno, sin embargo, de acuerdo a estudios recientes, es probable que esto suceda en la zona en que convergen el conducto venenoso y la faringe [Marshall, J.; et. al.; 2002].

1.8 Toxinas con puentes disulfuro

Además de los caracoles marinos varias especies de animales marinos como las medusas y las anémonas, hasta de animales terrestres como las víboras, los alacranes, las arañas, etcétera, han desarrollado venenos para defenderse o cazar a su presa.

1.8.1 Evolución

En el caso de los caracoles marinos, a pesar de ser organismos de aparición más reciente (50 millones de años) que las arañas (400 millones de años) o los alacranes (420 millones de

años), su veneno tiene una mayor cantidad de péptidos activos, es decir, el veneno de las arañas puede tener hasta 50 péptidos, el veneno de los alacranes 70, mientras que el veneno de los caracoles marinos más de 100 péptidos activos [Sollod, B. L.; et. al.; 2005]. Se cree que esto se debe a que los caracoles marinos son principalmente predadores especialistas, mientras que los alacranes y las arañas son generalistas. Por lo que el éxito de los caracoles tal vez dependa de tener una toxina específica para cada tipo de canal iónico para un Phylum determinado. Sin embargo en el caso de los alacranes y arañas resulta más conveniente tener un coctel de toxinas funcionalmente homólogas capaz de afectar un receptor específico presente en organismos de diversos Phyla [Sollod, B. L.; et. al.; 2005]. Esto resalta la importancia del estudio de las conotoxinas por su alta especificidad.

La abundancia de los péptidos, de manera aproximada se estima que en los caracoles marinos es de 50,000 péptidos, en los alacranes de 100,000, en las arañas de hasta 4 millones de péptidos. [Sollod, B. L.; et. al.; 2005]

Así como en los caracoles marinos (Phylum Mollusca), las toxinas de otros animales también pueden clasificarse de acuerdo al patrón de cisteínas que presenta su secuencia primaria. De esta manera las toxinas de las víboras (Phylum Chordata) se pueden clasificar en 7 grupos [Tamiya, Y. y Fujimi, T. J.; 2006]:

- Sarafotoxinas. Presentan 21 aminoácidos con 2 puentes disulfuro.
- Miotoxinas. Presentan de 43 a 45 aminoácidos con 3 puentes disulfuro.
- Dendrotoxinas. Presentan de 57 a 60 residuos con 3 puentes disulfuro.
- Viperdesintegrinas. Presentan de 47 a 83 aminoácidos y con 4 a 7 puentes disulfuro.
- Estructura de tres dedos: Presentan de 60 a 74 residuos y con 4 a 5 puentes disulfuro.
- Fosfolipasa A2. Aproximadamente 120 aminoácidos y con 5 a 8 puentes disulfuro.
- Hemorraginas. Presentan de 200 a 800 residuos con varios puentes disulfuro.

En el caso de las toxinas de alacrán (Phylum Arthropoda), estas se clasifican en dos grandes grupos [Rodríguez de la Vega, R. C. y Possani, L. D.; 2005 y Rodríguez de la Vega, R. C. y Possani, L. D.; 2004]:

- De cadena larga. Secuencias de 58 a 76 aminoácidos y con 3 a 4 puentes disulfuro.
- De cadena corta. Secuencias de 20 a 40 aminoácidos y con 3 a 4 puentes disulfuro.

Las toxinas de arañas (Phylum Arthropoda) se dividen en tres grupos [Sollod, B. L.; et. al.; 2005]:

- Péptidos pequeños: menos de 35 aminoácidos, sin puentes disulfuro.
- Péptidos medianos: de 35 a 45 aminoácidos y con 3 a 5 puentes disulfuro.
- Péptidos grandes: más de 45 aminoácidos y con 4 o más puentes disulfuro.

Por otra parte, las toxinas de anémona (Phylum Cnidaria) se pueden agrupar de acuerdo al efecto molecular que provocan en su víctima en [Santamaría, A., et. al.; 2002 y Monroy-Estrada, H.; et. al.; 2007]:

- Neurotoxinas que afectan la actividad de los canales iónicos.
- Citolisinas que degradan la membrana celular.

A pesar de que estos animales venenosos pertenecen a Phyla distintos, se han encontrado algunas coincidencias en la estructura y efectos de sus toxinas. En el caso de las conotoxinas de caracoles marinos, las dendrotoxinas de víboras, las toxinas de cadena corta de alacranes, las toxinas de cadena mediana de arañas y las neurotoxinas de las anémonas, todas ellas consideradas como toxinas “medianas”, de 21 a 55 aminoácidos y que afectan a canales de potasio dependientes de voltaje K_v , se han encontrado las coincidencias siguientes:

- El proceso evolutivo para generar la gran diversidad de toxinas de caracoles marinos, de alacranes y de arañas es el mismo: duplicación genética a partir de un

gen ancestral e hipermutación puntual del propéptido y de la toxina madura [Sollod, B. L.; et. al.; 2005].

- Se unen a los canales de potasio en el vestíbulo externo del poro [Mondal, S.; et. al.; 2005; Gasparini, S.; et. al.; 2004 y Alessandri-Haber, N.; et. al.; 1999].
- Las toxinas presentan de 2 a 4 puentes disulfuro, los cuales son de gran importancia para comprender la interacción toxina-canal de potasio [Drakopolou, E.; et. al.; 1998 y Craik, D. J.; et. al.; 2001].
- De manera general presentan una diada conocida como lisina-residuo aromático (KY) que es determinante en el bloqueo de los canales de potasio, pues estudios con modelos tridimensionales posicionan a la lisina dirigida a la parte superior del poro, impidiendo así que pueda pasar el ión potasio, aunque existen algunos casos en que es un anillo de residuos básicos de arginina y/o lisina el que bloquea el paso de los iones K^+ [Rodríguez de la Vega, R. C. y Possani, L. D.; 2004; Gasparini, S.; et. al.; 2004; Dauplais, M.; et. al.; 1997 y Zhu, S.; et. al.; 2004].

Debido a que los Phyla de estos organismos son diversos, no se tiene un ancestro común del cual se hayan derivado los aparatos venenosos de cada uno de ellos. Sin embargo, a pesar de que sus procesos evolutivos han sido independientes, convergen hacia la producción de una gran cantidad de péptidos en los que su secuencia conserva patrones específicos de cisteínas.

1.8.2 Estructura de las toxinas que afectan canales de K^+

1.8.2.1. Toxinas de alacrán.

En el caso de las toxinas de alacrán que son las más estudiadas tanto en su evolución como en su estructura, se ha observado que la presencia del motivo “ α/β estabilizado por cisteínas” en el cual dos enlaces disulfuro, C_i-C_j y $C_{i+4}-C_{j+2}$ se unen de manera covalente a un segmento de la hélice α con una hebra de la hoja β de la misma toxina ($CS\alpha/\beta$)

[Rodríguez de la Vega, R. C. y Possani, L. D.; 2004]. Este motivo se encuentra tanto en las toxinas con tres enlaces disulfuro (por ejemplo: ChTx (caribdotoxina), KTx (kaliotoxina) y MgTx (Margatoxina) [Aiyar, J.; et. al.; 1995]), como en las que presentan cuatro (por ejemplo: BuTx (Butantoxina), HsTx1 (toxina de *Heterometrus spinifer*) y Pi1 (toxina de *Pandinus impirator*) [Zhu, S.; et. al.; 2004 y M'Barek, S.; et. al.; 2005]), sin embargo, toxinas como la MTx (Maurotoxina) no presentan este motivo [Zhu, S.; et. al.; 2004] (Fig. 14).

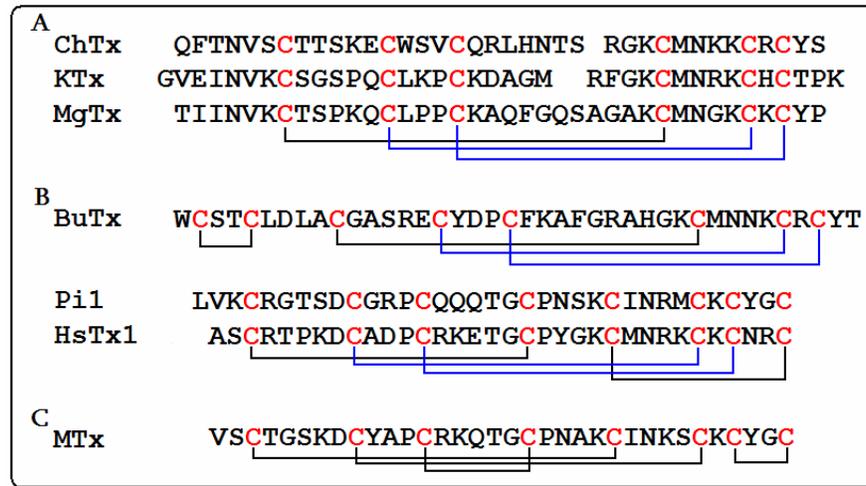


Fig. 14 Toxinas de alacrán que presentan 3 o 4 puentes disulfuro. A) Toxinas con tres puentes disulfuro y el motivo CS α / β . B) Toxinas con 4 puentes disulfuro y el motivo CS α / β . C) Toxina con cuatro puentes disulfuro sin el motivo CS α / β . Con líneas azules destaca el motivo de los dos puentes disulfuro.

También se observa que al modelar en tres dimensiones las toxinas con el motivo CS α / β se presentan estructuras diferentes (Fig. 15), y también que en las toxinas con un patrón de puentes disulfuro diferente se pueden presentar estructuras semejantes (Fig. 16).

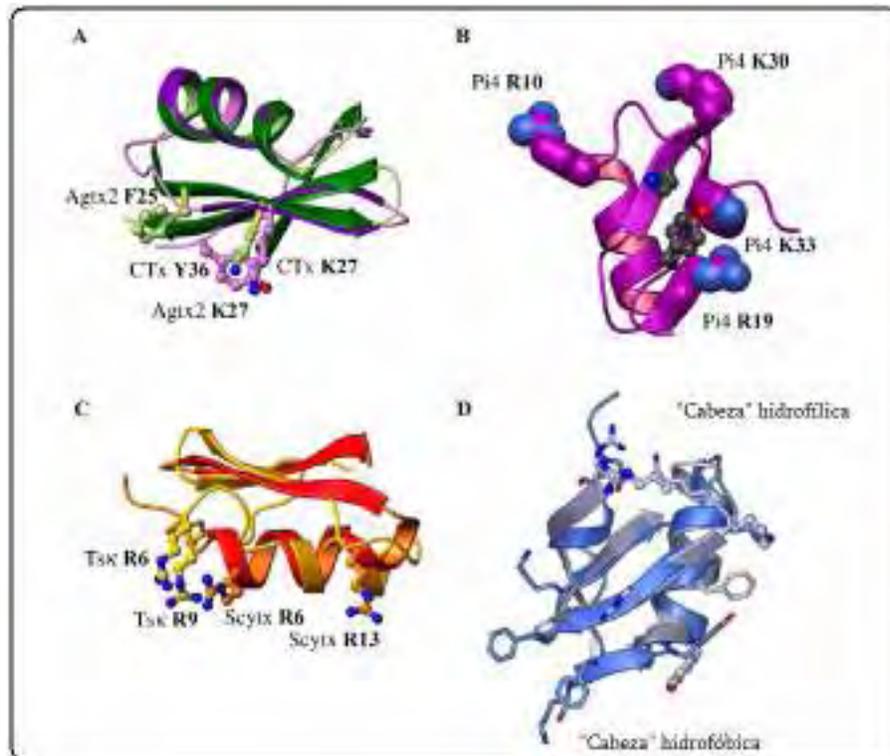


Fig. 15 Toxinas de alacrán específicas para canales de potasio. A) Toxinas con tres puentes disulfuro y que presentan la diada K27Y36 en la caribdotoxina (púrpura) y K27F25 en la Agitoxina2. B) Pi4 presenta un anillo de residuos básicos: R10, R19, K30 y K33. C) Residuos básicos R6 y R9 en la toxina Tsk (amarillo) y R6 y R13 en la Scyallotoxina (Scytix, en rojo) importantes en la interacción con canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} . D) Toxinas CnERG1 (azul) y BeKm-1 (gris) cuya actividad se ha observado en canales ERG. (Tomada de [Rodríguez de la Vega, R. C. y Possani, L. D.; 2004])

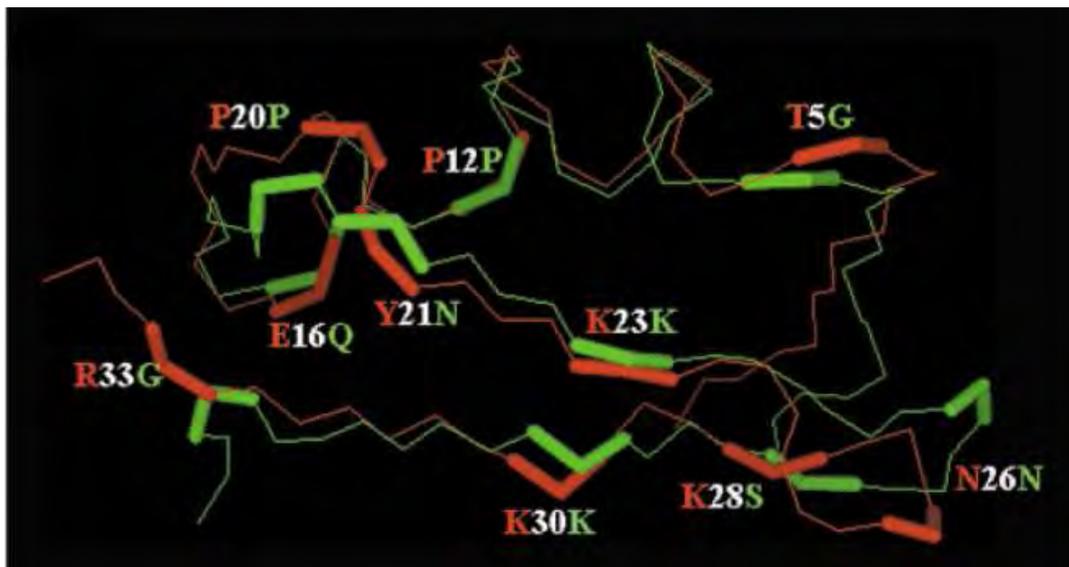


Fig. 16 Superimposición de las estructuras de las toxinas HsTx1 (rojo) y MTx (verde) ambas con cuatro puentes disulfuro, pero con diferentes patrones de unión entre las cisteínas (Tomado de [Zhu, S.; et. al.; 2004]).

1.8.2.2. Toxinas de araña.

Las toxinas de araña afectan canales de potasio de las familias Kv2 y Kv4, a diferencia de las toxinas de alacrán, víbora y caracoles marinos que afectan canales Kv1 y Kv3. Las secuencias de las toxinas conocidas hasta el momento, presentan de 6 a 8 cisteínas [Estrada, G.; et. al.; 2007] lo que coincide con las toxinas de los otros animales venenosos, sin embargo, a diferencia de las toxinas de alacrán, **no presentan** el motivo $CS\alpha/\beta$. Sin embargo en las toxinas de araña con 6 cisteínas se ha identificado el motivo **ICK** “**inhibitor cystine knot**” (nudo inhibidor de cisteínas) en el que el patrón de cisteínas CX₃₋₇CX₃₋₈CX₀₋₇CX₁₋₄CX₄₋₁₃C genera un patrón de puentes disulfuro **C^I-C^{IV}**, **C^{II}-C^V** y **C^{III}-C^{VI}**, que no es exclusivo para aquellas que tienen actividad sobre los canales de K⁺ [Craik, D. J.; et. al.; 2001] pues también se observa en toxinas que actúan sobre canales de Na⁺ y Ca²⁺. Este motivo se ha relacionado con la unión de estas toxinas de araña **al sensor de voltaje del canal**, lo cual no ocurre para este mismo motivo en toxinas de otros animales [Swatz, J. K.; et. al.; 2007]. También para las toxinas de araña con 8 cisteínas se ha identificado este motivo relacionado con su actividad sobre canales de potasio BK (J-Atracotoxinas [Wang, X.; et. al.; 2000]), aunque de la toxina PnTx3-1 no se ha determinado el patrón de puentes disulfuro porque su estudio se ve limitado por la cantidad de veneno disponible (Fig. 17) [Carneiro, A. M. D.; et. al.; 2003].

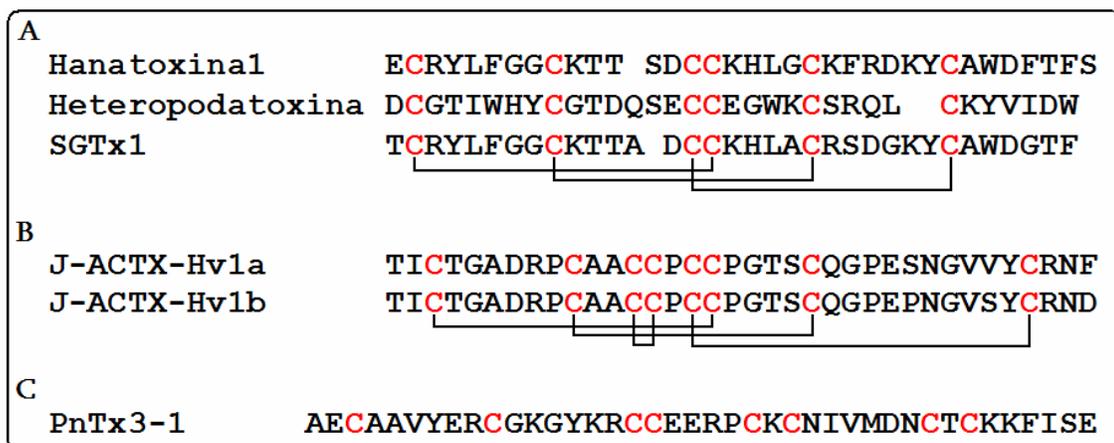


Fig. 17 Secuencias de aminoácidos de algunas toxinas de araña. A) Con tres puentes disulfuro que presentan el motivo ICK. B) J-atracotoxinas con 4 puentes disulfuro su patrón específico. C) Toxina con 8 cisteínas.

1.8.2.3. Toxinas de anémona.

Las toxinas de anémonas marinas Tipo 1 bloquean a los canales de K⁺ dependientes de voltaje Kv1 pero no presentan ninguno de los dos motivos anteriores en su patrón de puentes disulfuro [Honma, T. y Shiomi, K.; 2006 y Pennington, M. W.; et. al.; 1996] (Fig. 18) y aunque por el momento no se tiene definido el patrón de puentes disulfuro, las toxinas de anémona Tipo 3 no bloquean canales Kv1 pero bloquean canales Kv3 y ERG [Honma, T. y Shiomi, K.; 2006].



Fig. 18 Secuencias de aminoácidos de las toxinas de anémona que bloquean canales de potasio. A) Tipo 1. B) Tipo 2. C) Tipo 3 (Basado en [Honma, T. y Shiomi, K.; 2006]).

1.8.2.4. Toxinas de víbora.

Las dendrotoxinas son el grupo característico de las toxinas de víbora que bloquean los canales de potasio Kv1 y gracias a que su secuencia de aminoácidos es pequeña con respecto a la de otras toxinas de víbora (sección 1.8), se ha podido identificar su patrón de cisteínas que presenta el motivo CS α / β (Fig. 19) [Hollecker, M.; et. al.; 2002; Harvey A. L; 2002 y Mouhat, S.; et. al.; 2004a).

DTxI ZPLRKL**C**ILHRNPGR**C**YQKI PAFYYNQKKKQ**C**EGFTWSG**C**GGNSNRFKTIIE**C**RR**T**CIRK

Fig. 19 Secuencias de aminoácidos de la Dendrotoxina I (Basado en [Mouhat, S.; et. al.; 2004a]).

A partir del año 2000 se han reportado toxinas de víbora cuya estructura corresponde a las “proteínas secretadas ricas en cisteínas” CRISP-3 en que la secuencia de aminoácidos es más larga que la de las dendrotoxinas (de 220 a 222 aminoácidos con 10 o 16 puentes de cisteína) y que también bloquean canales de potasio [Yamazaki, Y.; et. al.; 2000], sin embargo, estudios de cristalografía revelan que la estructura no presenta la diada KY o los motivos CS α / β o ICK o el anillo de residuos básicos [Wang, F.; et. al.; 2006].

1.9 Conotoxinas

Hasta el momento, se ha determinado la estructura primaria de más de 100 conotoxinas las cuales presentan muy diversos patrones de cisteínas y de manera común se observa que un mismo patrón de cisteínas en ocasiones genera dos o más patrones de puentes disulfuro los cuales pueden contener los motivos CS α / β o ICK o ninguno de ellos [Bulag, G. y Olivera, B. M.; 2008]. Para su estudio sistemático se han clasificado en 13 superfamilias de genes (O, M, A, S, T, P, I, L, J, V, G, D y C [Aguilar, M. B.; et. al.; 2008a]) con base en la secuencia señal del prepropéptido [López-Vera, E.; et. al.; 2007].

Cada superfamilia se divide en una o más familias de acuerdo a su farmacología, es decir, dependiendo de la proteína transportadora de iones de la membrana plasmática que afecten: canales iónicos, receptores ionotrópicos o transportadores [Chen, P.; et. al.; 2008] (Tabla 3). En los últimos años ha ido en aumento la identificación de conotoxinas así como de sus blancos moleculares. También hay mucho interés por utilizarlas como fármacos. Actualmente se produce de manera comercial el medicamento conocido como Prial (de los laboratorios farmacéuticos Elan, Neurex) que obtuvo la aprobación de la FDA como droga para el dolor. Este medicamento es un análogo sintético de la ω -conotoxina MVIIA que se

aisló del veneno del caracol marino *Conus magus* y actúa bloqueando de manera específica los canales de calcio activados por voltaje Cav2.2 [Olivera, B. M.; 2006].

	Familia	Efecto
Superfamilia O	δ	Retarda la Inactivación de Canales de Sodio Activados por Voltaje
	μO	Inhibe Canales de Sodio Activados por Voltaje
	κ	Inhibe Canales de Potasio Activados por Voltaje
	ω	Inhibe Canales de Calcio Activados por Voltaje
Superfamilia M	μ	Inhibe Canales de Sodio Activados por Voltaje
	ψ	Inhibe Receptores Nicotínicos de Acetilcolina
	κM	Inhibe Canales de Potasio Activados por Voltaje
	γ	Activa canales marcapaso
Superfamilia A	α	Inhibe Receptores Nicotínicos de Acetilcolina
	αA	Inhibe Receptores Nicotínicos de Acetilcolina
	κA	Inhibe Canales de Potasio Activados por Voltaje
	ρ	Inhibe adrenoceptor $\alpha 1A$
Superfamilia S	σ	Inhibe receptor de 5-HT ₃
Superfamilia T	τ	Inhibe Canales de Calcio Activados por Voltaje
	χ	Inhibe al Transportador Neuronal de Noradrenalina
Superfamilia P		Es probable que afecte receptores a glicina [Miles, L. A. et. al.; 2002]
Superfamilia I₁	ι	Reduce el Umbral de Activación de Canales de Sodio [Olivera, B. M.; Teichert, R. W.; 2007]
Superfamilia I₂		Actúa en Canales de Potasio [Fan, C.; et. al.; 2003 y Kaufenstein, S.; et. al.; 2003]
Superfamilia L		-
Superfamilia J		Inhibe Receptores Nicotínicos de Acetilcolina y al canal Kv1.6 [Imperial, J. S. et. al.; 2006]
Superfamilia V		No se ha determinado [Peng, C. et. al.; 2008]
Superfamilia C		Inhibe Receptores Nicotínicos de Acetilcolina [Jiménez, E. C.; et. al.; 2007]
Superfamilia D		Inhibe Receptores Nicotínicos de Acetilcolina [Loughnan, M.; et. al.; 2006]
C-C-C-CC-C-C-C		No se ha determinado [Aguilar, M. B. et. al.; 2005]
C-C-C-CCC-C-C-C-C		No se ha determinado [Chen, P.; et. al.; 2008]
C-C-CC-C-CC-C		No se ha determinado [Yuan, D.; et. al.; 2008]

Tabla 3. Clasificación genética y farmacológica de las conotoxinas (Basada en [Armishaw, C. J. y Alewood, P. F.; 2005]).

1.10 I-conotoxinas

Se presentan en los tres tipos de predadores de *Conus* y se caracterizan por tener en su secuencia de aminoácidos un arreglo de 8 cisteínas -C-C-CC-CC-C-C-, conocido como la estructura XI que daría origen a 4 puentes disulfuro. Antes del descubrimiento de este patrón, se creía que a una superfamilia (grupo de conopéptidos que comparten la misma secuencia señal en el propéptido de la toxina) correspondían uno o dos patrones de cisteínas. Sin embargo, los patrones pertenecían exclusivamente a una superfamilia. En el caso de las I-conotoxinas, por primera vez el mismo patrón se encuentra en 2 superfamilias llamadas I₁ e I₂, que se definieron como superfamilias independientes al conocer su secuencia señal, la cual es muy diferente. Incluso, en los precursores de la superfamilia I₂ la región pro no existe, por lo que la secuencia de la toxina madura está unida a la secuencia señal. Además de esto, en esta misma superfamilia, existe una pequeña región (de 5 hasta 13 aminoácidos) en el COOH terminal que junto con la región pre se corta proteolíticamente para dar origen a la toxina madura (Fig. 20) [Buczek, O.; et. al.; 2005b; Aguilar, M. B.; et. al.; 2007 y Buczek, O.; et. al.; 2007].

```
Superfamilia I1
R11.4  MKLCLTFLLVIMILASVTGEKSSKHTLSRAA-RVKNRGPFCKADEKPKYHADCCNCLGGICKPSTSWIGCSTNVFLTR
R11.3  MKLCLTFLLVIMILASVTGEKLSEQTLRRAA-R-KNKGPRCQWVGRVHCTYHKDCCPSVCCFKGRCKPQSWGCSGPT
Ep11.1  MKLCLTFLLILVILPSVTGEKSSKRTLSGAALR-GDWGCSGIGQGGQDSNCCGDMCCYQGICAMTFAACGP
Superfamilia I2
Sx11.2  MMFRVTSVGCLLLIVVFLNVLVPTSA CRAEGTYCENDSQCLNECCWGGCGHPCRHPGKRSLQEFFRQR
Ep11.12 MMFRVTSVGCFLLVILSLNVLVLTNA CLSEGSPCSMSGSCCHKSCCRSTCTFPCLIPGKRAKLREFFRQR
BtX     MMFRVTSVGCLLLIVVFLNVLVPTSA CRAgGTYCgNDSQCCLNgCCWGGCGHOCRHPGKRSLQEFFRQR
```

Fig. 20 Secuencia del precursor de las conotoxinas de las superfamilias I₁ e I₂ [Buczek, O.; et. al.; 2005b]. En rojo la secuencia señal, en negro la región pro, en azul la toxina madura y subrayados los aminoácidos del COOH terminal que se pierden por un corte proteolítico (R, *C. radiatus*; Ep, *C. episcopatus*; Sx, *C. striolatus* y BtX toxina de *C. betulinus*).

Las I-conotoxinas también pueden clasificarse en tres grupos llamados A, B y C, con base en el número de aminoácidos presentes entre cada cisteína (Fig. 21) [Buczek, O.; et. al.; 2005b].

I-conotoxinas Estructura XI C-C-CC-CC-C-C	Superfamilia I₁ (A) — CX₆CX₅CCX₁CCX₄CX₈₋₁₀C—
	Superfamilia I₁ (B) — CX₆CX₅CCX₃CCX₄CX₆C—
	Superfamilia I₂ (C) — CX₆CX₅CCX₃CCX₃CX₃C—

Fig. 21 Patrón de cisteínas de las I-conotoxinas y de los grupos A, B y C. X es cualquier otro aminoácido (Basado en [Buczek, O.; et. al.; 2005b]).

Actualmente se han reportado estudios farmacológicos con tres I-conotoxinas:

- ι -RXIA (*C. radiatus*) perteneciente a la superfamilia I₁. Incrementa la corriente entrante de sodio de los canales de sodio dependientes de voltaje Nav1.6, por lo que induce potenciales de acción repetitivos en las células excitables y genera el efecto tetanizante del veneno de estos caracoles [Buczek, O.; et. al.; 2007].
- k-BtX (*C. betulinus*) perteneciente a la superfamilia I₂. Activa canales de potasio activados por Ca²⁺ de conductancia alta (canales BK) [Fan C. et. al.; 2003]. La entrada de iones K a la célula hiperpolariza su membrana, inhibiendo la generación de los potenciales de acción.
- ViTx (*C. virgo*) también pertenece a la superfamilia I₂. Inhibe los canales Kv1.1 y Kv1.3 pertenecientes a la subfamilia de canales de potasio tipo *Shaker*, Kv1 [Kaufenstein, S. et. al.; 2003]. Evita que se mantenga el potencial de reposo de la membrana celular, pues no permite que salgan los iones K⁺ de la célula cuando se encuentran en exceso.

1.11 *Conus spurius*

En aguas mexicanas podemos encontrar más de 60 especies de caracoles marinos pertenecientes al género *Conus*. En el Pacífico encontramos especies como: *C. arcuatus*, *C. bartschi*, *C. brunneus*, *C. californicus*, *C. gradatus*, *C. purpurascens*, *C. recurvus*, *C.*

virgatus, etc. En el Atlántico encontramos especies como: *C. austini*, *C. mus*, *C. nux*, *C. puncticulatus* y *C. spurius* [www.coneshell.net].

La concha en forma de cono de *C. spurius* presenta de 9 a 10 espiras, las tres primeras forman una espira larga y aplanada. La abertura es larga y estrecha, mientras que su canal sifonal forma sólo una muesca. El labio exterior es fino y su opérculo es córneo y pequeño. El color de la concha es crema con hileras de rombos colocados en espirales o en manchas moteadas, el interior de la apertura es blanco. Miden de 5 a 8 cm de largo. Se les encuentra en aguas próximas a los arrecifes del Golfo de México, del Caribe Mexicano y de Florida (Fig. 22) [Luna-Ramírez, K. S.; 2006].



Fig. 22 Concha de un ejemplar de *C. spurius* (Modificada de [www.coneshell.net]).

Los caracoles vermívoros son los más numerosos, sin embargo se ha estudiado el veneno de aproximadamente 60 especies de este grupo, lo que corresponde al 5% del total de especies vermívoras estimadas hasta el momento.

En particular, *C. spurius* es un caracol vermívoro cuyo veneno empezó a estudiarse recientemente y hasta el momento se han aislado y estudiado los conopéptidos siguientes:

- Conorfamida Sr1: Probable agonista de canales iónicos dependientes del neuropéptido FRMFamida y modulador de canales de sodio epiteliales [Maillo, M.; et. al.; 2002].

- Conorfamida Sr2: Es posible que actúe sobre receptores acoplados a proteínas G, sobre canales de Na⁺ activados por FRMFamida o sobre canales iónicos sensibles a la acidez [Aguilar, M. B.; et. al.; 2008b].
- Péptido sr5a: actúa en el sistema nervioso central de mamíferos y ha sido clasificado como perteneciente a la superfamilia T [Aguilar, M. B. et. al.; 2006].
- Péptido sr7a: provoca hiperactividad en ratones y parálisis en moluscos. Se ha clasificado como perteneciente a la superfamilia O [Luna-Ramírez, K. S.; et. al.; 2007].
- Péptidos SrIA y SrIB: Potencian la actividad de los receptores nicotínicos de acetilcolina, tanto los receptores de músculo como los del sistema nervioso central. Su patrón de cisteínas corresponde a la familia de α -conotoxinas [López-Vera, E.; et. al.; 2007].
- Péptido sr11a: Su patrón de cisteínas corresponde al de la superfamilia I₂ se ha propuesto que afecta canales de potasio [Aguilar, M. B.; et. al.; 2007]. En este trabajo de tesis se estudió su efecto sobre canales de potasio dependientes de voltaje de la subfamilia Kv1.

1.12 Péptido sr11a

La estructura primaria del péptido sr11a maduro, presenta el patrón de cisteínas que corresponde a la superfamilia I₂. Además, en su secuencia de aminoácidos podemos encontrar modificaciones postraduccionales presentes en la I-conotoxina k-BtX: dos γ -carboxiglutamatos en las posiciones 9 y 10 y el extremo carboxilo terminal amidado [Aguilar, M. B.; et. al.; 2007]. La semejanza del péptido sr11a con las I-conotoxinas k-BtX y ViTx es de 50% y 31%, respectivamente (Fig. 23).

Los ensayos electrofisiológicos por patch-clamp en cultivos de células cromafines de rata, han demostrado que la toxina BtX modula el comportamiento de los canales BK (canales de potasio dependientes de voltaje y activados por calcio) incrementando la corriente

2.51±0.47 veces con respecto al control, lo cual se debe a que la probabilidad de apertura del canal aumenta, lo cual significa que altera el “gating” de los canales [Fan C. et. al.; 2003].

Péptido	Secuencia	Semejanza
sr11a	CRTEGMS CggNQ ^Q CCWRSCCRGECEAPCRFGP*	
BtX	CRAGTY CgNDSQCCLNgCCWGGCGHOCRHP*	50%
ViTx	SRCFPPGIY CTSYLPCCWGIC ^C ST CRNVCHLRIGK	31%

Fig. 23 Comparación entre las conotoxinas sr11a, BtX y ViTx. En rojo el patrón de cisteínas. O= hidroxiprolina, g=gama-carboxiglutamato y * indica que el carboxilo terminal está amidado.

Es interesante subrayar que es poco común que una toxina de araña, alacrán o víbora sea activadora de un canal iónico. Por lo general bloquean la entrada de los iones al poro del canal o modifican sus propiedades de “gating” al unirse en algún sitio del canal. Incluso, en la revisión bibliográfica que se hizo para este trabajo, sólo la toxina k-BtX de caracol marino *C. betulinus* presenta este efecto.

Los ensayos de fijación de voltaje (voltage-clamp) en los ovocitos han demostrado que la toxina ViTx bloquea la actividad de los canales Kv1.1 en un 80% y Kv1.3 en un 36% aproximadamente [Kaufenstein, S. et. al.; 2003]. Para la toxina ViTx se ha reportado un modelo tridimensional basado en la estructura tridimensional de la atracotoxina J-AcTx-Hv1c de la araña *Hadronyche versuta*. Este modelo se comparó con otras toxinas de diversos orígenes (de alacrán la kaliotoxina KTX y la Agitoxina 2; de *Conus* la conotoxina κ-PVIIA) con lo cual se ha sugerido que son los residuos Arg26 y Arg32, ubicados en el extremo C-terminal de la toxina, los responsables de la inhibición de los canales Kv1 [Mondal, S.; et. al.; 2005].

1.13 Superfamilia de los canales de potasio.

Esta superfamilia es la más grande (casi 80 genes) y estudiada de los canales iónicos. Con base en el número de segmentos transmembranales y de regiones de poro es que se han clasificado los canales de potasio en 4 grupos generales:

- Activados por calcio (8 genes) K_{Ca}

En general presentan de seis a siete segmentos transmembranales, un motivo correspondiente al sensor de voltaje (identificado como S4) y una región de poro.

Este grupo está formado por dos árboles filogenéticos (Fig. 24). El árbol A engloba a los canales llamados de conductancia baja y al canal K_{Ca}3.1 de conductancia intermedia. Estos canales no dependen de voltaje, sólo del calcio intracelular que detectan a través de la calmodulina unida a su carboxilo terminal. Estos canales se encuentran en células excitables y no excitables en donde participan de procesos de señalización dependiente de calcio [Wei, A. D.; et. al.; 2005].

El árbol B contiene a los canales de conductancia alta de potasio (slo) y a los canales dependientes de sodio. Aunque sólo el canal K_{Ca}1.1 es dependiente de calcio, los otros 3 genes pertenecen a la misma rama filogenética en base a su relación estructural, pues dos unidades del gen K_{Ca}1.1 pueden unirse con dos unidades de cualquiera de los otros tres genes para dar origen a heterotetrámeros funcionales [Wei, A. D.; et. al.; 2005].

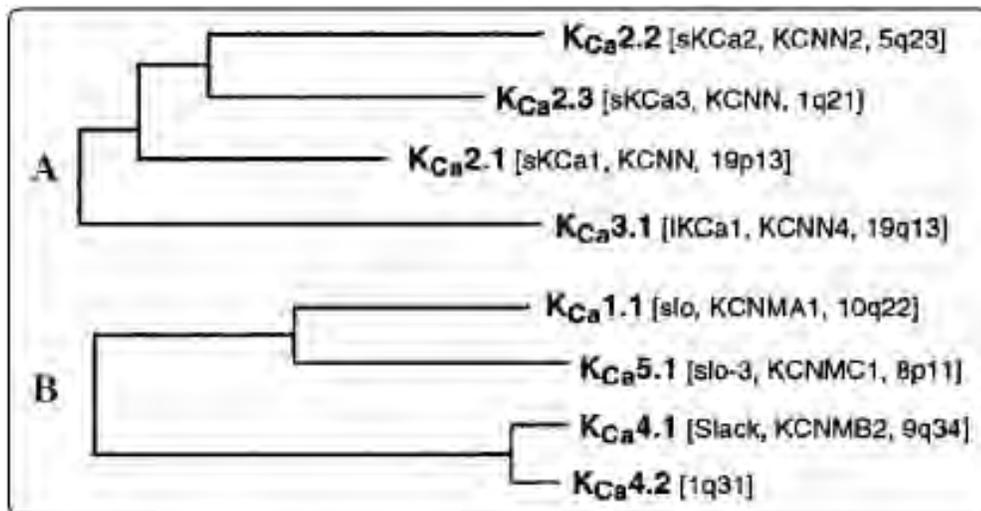


Fig. 24 Árboles filogenéticos para los canales de potasio activados por calcio (Tomada de [Wei, A. D.; et. al.; 2005]).

- Rectificadores entrantes (15 genes) Kir

En este árbol filogenético (Fig. 25) se incluyen a los canales de potasio rectificadores entrantes, a los acoplados a proteína G y a ATP. Están formados por unidades que presentan dos segmentos transmembranales y un poro. Cuatro de éstas unidades forman un tetrámero dando origen al canal funcional. Son importantes en la fisiología de diferentes órganos, como el cerebro, el corazón, los riñones, las células endocrinas, los oídos y la retina [Kubo, Y.; et. al.; 2005].

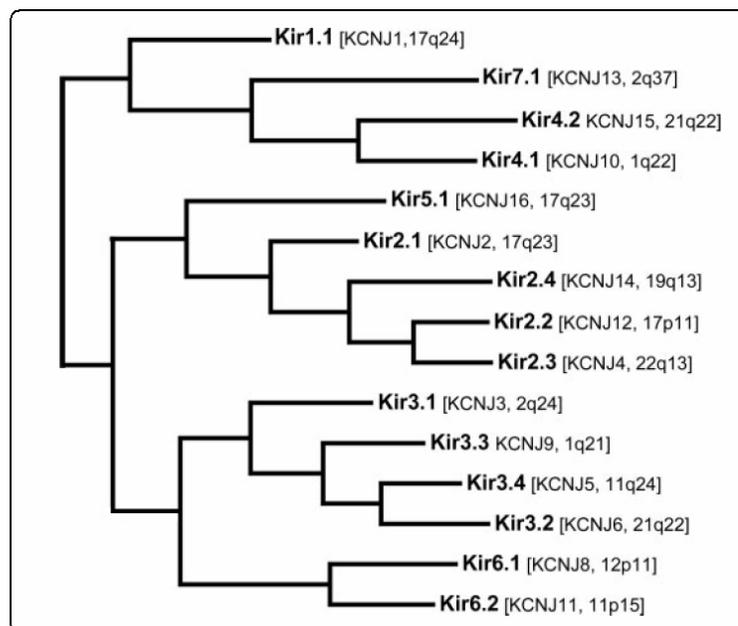


Fig. 25 Árbol filogenético para los canales de potasio rectificadores entrantes (Tomada de [Kubo, Y.; et. al.; 2005]).

- Dos poros por dominio (15 genes) K2P

El estudio de estos canales ha revelado que el “leak” identificado en los primeros trabajos de Hodgkin y Huxley es producido por un mecanismo altamente regulado para controlar la excitabilidad celular. Estos canales están formados por dímeros de unidades con cuatro u ocho segmentos transmembranales y 2 poros (Fig. 26). Estos canales pueden responder a una gran diversidad de estímulos como: pH, neurotransmisores,

lípidos, estiramiento y acoplamiento a proteínas G. Pueden llegar a comportarse como rectificadores o presentar dependencia al voltaje [Goldstein, S. A.; et. al.; 2005].

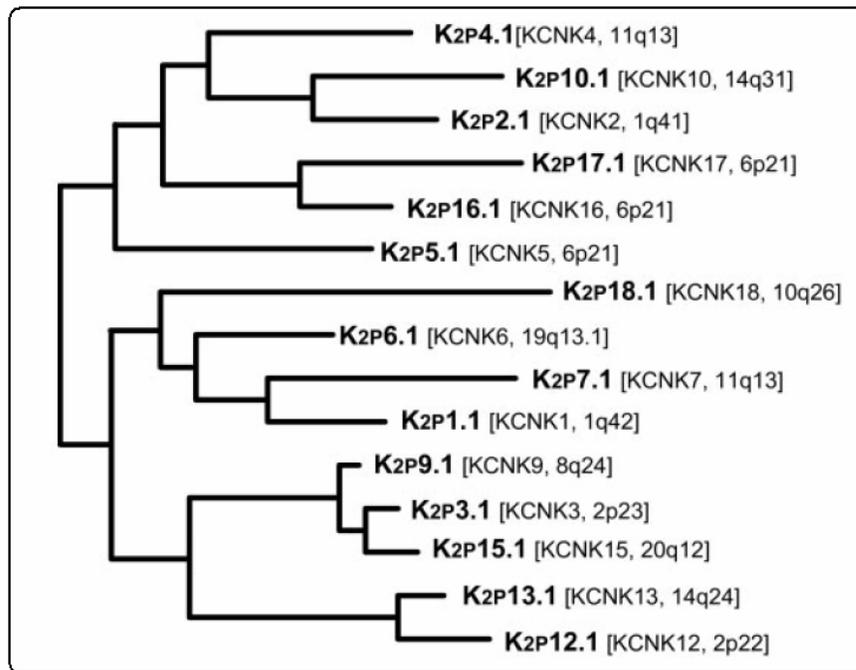


Fig. 26 Árbol filogenético para los canales de potasio con dos poros por dominio (Tomada de [Goldstein, S. A.; et. al.; 2005]).

- Dependientes de voltaje (40 genes) K_v

Es el grupo más grande y diverso, formado por tres árboles filogenéticos que agrupan a 12 familias. De manera general, la familia K_v1 es conocida como canales tipo *Shaker* (rectificadores tardíos), la familia K_v2 como tipo *Shab* (rectificadores tardíos), la K_v3 como *Shaw* (rectificadores tardíos), la K_v4 como *Shal* (corriente transitoria de potasio tipo A), la K_v10 como eag (ether à-go-go), la K_v11 como erg (ether à-go-go related genes) y la K_v12 como elk (ether-à-go-go like K channels genes) (Fig. 27) [Gutman, G. A.; et. al.; 2005].

Para formar un canal funcional pueden agruparse como homotetrámeros o como heterotetrámeros. De manera específica, los genes de las familias K_v5 , K_v6 , K_v7 , K_v8 y K_v9 no forman homotetrámeros, pero se unen a los genes de la familia K_v2 para dar

origen a heterotetrámeros funcionales. Además, los canales Kv pueden asociarse con proteínas accesorias como subunidades β (en Kv1 y Kv2), KCHIP1 (“K channel interacting proteins” en Kv4), calmodulina (en Kv10) y minK (en Kv11).

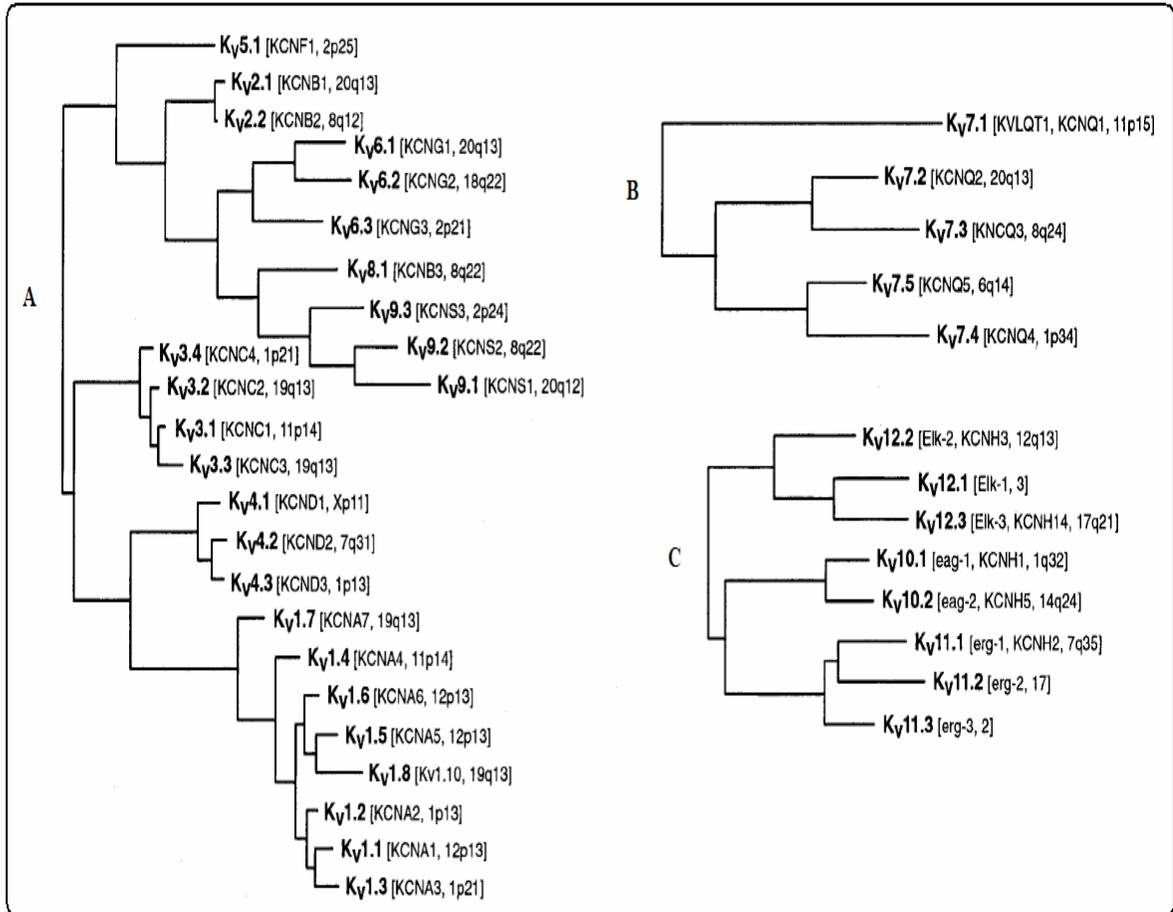


Fig. 27 Los tres árboles filogenéticos de los canales de potasio dependientes de voltaje (Tomada de [Gutman, G. A.; et. al.; 2005]).

1.14 Familia de los canales de potasio activados por voltaje Kv1

Los dominios de estos canales se caracterizan por tener seis segmentos transmembranales mientras que el carboxilo y el amino terminales son intracelulares. Como se mencionó en la sección 1.5, la selectividad al potasio se debe a la secuencia GYG conservada en estos canales y que se ubica en la región del poro entre los segmentos S5 y S6 [O’Grady, S. M. y Lee, S. Y.; 2005]. Estudios en el canal *Shaker* de *Drosophila melanogaster*, indican que el segmento transmembranal S4 es el que confiere la sensibilidad al voltaje, gracias a la

presencia de 7 residuos positivos de arginina y lisina, uno en cada tercera posición de este segmento. Además se determinó que el poro debe contener 13 cargas para su máximo desempeño [Bezanilla, F.; 2008] (Fig. 28).

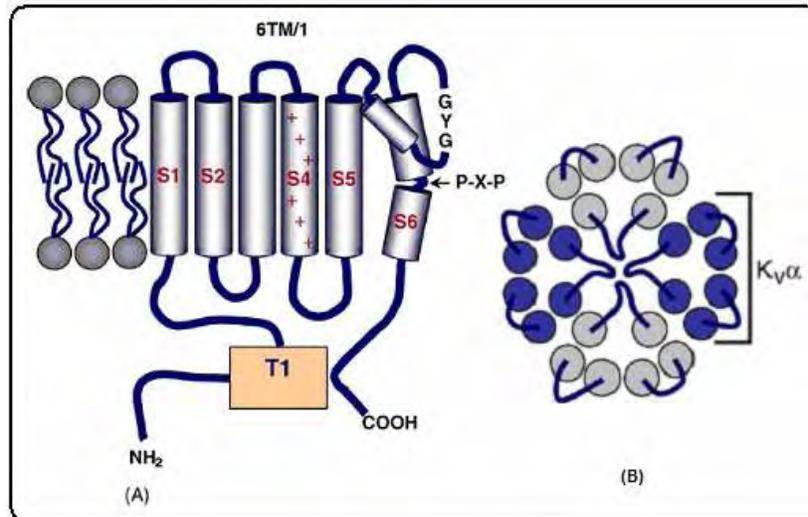


Fig. 28 A) Representación esquemática de un dominio de la subunidad α de un canal Kv1. B) Formación de un heterotetramero por dos tipos de subunidades α (Modificado de [O'Grady, S. M. y Lee, S. Y.; 2005]).

La subunidad α del canal funcional se forma cuando se unen 4 dominios ya sean iguales (homotetrameros) o de 2 tipos diferentes (heterotetrameros), de manera que si los dominios son iguales o combinados, las propiedades electrofisiológicas del canal varían.

Las propiedades electrofisiológicas de los homotetrameros se resumen en la tabla 4.

Las propiedades de los canales Kv1 también pueden regularse al interactuar con una de tres subunidades β . Por ejemplo, la co-expresión de las subunidades Kv β 1 o Kv β 3 con subunidades α Kv1.X generan la inactivación rápida de los canales de potasio [Patel, A. J. y Honoré, E.; 2001]. También se sabe que las subunidades Kv β promueven el tráfico intracelular de algunas subunidades Kv α [Zhu, J.; et. al.; 2003].

Los canales Kv1 se encuentran distribuidos en todo el organismo, por lo que son muy importantes en el funcionamiento de todo ser vivo (Tabla 5).

Canal	Conductancia	Selectividad	Activación	Función Fisiológica
Kv1.1	10 pS	K ⁺ >Rb ⁺ >NH ₄ ⁺	-32 mV	Mantiene el potencial de membrana, modula la excitabilidad eléctrica en las neuronas y el músculo.
Kv1.2	14-18 pS	K ⁺	-21 mV	Mantiene el potencial de membrana, modula la excitabilidad eléctrica en las neuronas y el músculo.
Kv1.3	13 pS	K ⁺ >Rb ⁺ >NH ₄ ⁺ >Cs ⁺ >Na ⁺	-35 mV	Regula el potencial de membrana y la señalización de calcio en los linfocitos y los oligodendrocitos.
Kv1.4	5 pS	K ⁺ >>Na ⁺	-22 mV	Participa en la corriente transitoria I _{to} lenta del potencial cardiaco.
Kv1.5	8 pS	K ⁺	-14 mV	Tiene propiedades parecidas a la de la corriente ultra-rápida del corazón. Mantiene el potencial de membrana de las neuronas modulando su excitabilidad eléctrica.
Kv1.6	9 pS	K ⁺	-20 mV	Regula el potencial de membrana de las neuronas.
Kv1.7	21 pS	K ⁺	-8 mV	Tiene propiedades parecidas a las de la corriente ultra-rápida del corazón.
Kv1.8	10-12 pS	K ⁺ >>Na ⁺	3.6 mV	Regula el potencial de membrana en el túbulo proximal del riñón.

Tabla 4 Propiedades electrofisiológicas de los canales Kv1 (Los datos se tomaron de [Gutman, G. A.; et. al.; 2005]).

Canal	Distribución
Kv1.1	Cerebro, corazón, retina, músculo esquelético, islotes pancreáticos.
Kv1.2	Cerebro, médula espinal, células de Schwann, atrio, ventrículo, retina, músculo liso, células PC12.
Kv1.3	Cerebro, pulmón, islotes, timo, nodo linfático, fibroblastos, linfocitos B y T, amígdala, microglia, plaquetas, testículo.
Kv1.4	Cerebro, pulmón carcinado, músculo esquelético, corazón, islotes pancreáticos.
Kv1.5	Aorta, colon, riñón, estómago, músculo liso, hipocampo, corteza, pituitaria, arteria pulmonar.
Kv1.6	Cerebro, cólon, células germinales, corazón, pulmón, oligodendrocitos.
Kv1.7	Placenta, saco amniótico, músculo esquelético, corazón, arterias pulmonares.
Kv1.8	Riñón, cerebro, corazón, músculo esquelético, glándula suprarrenal.
BK	Cerebro, músculo liso y esquelético, odontoblastos, células pancreáticas, epitelio del riñón.

Tabla 5 Distribución de los canales Kv1 (Los datos se tomaron de [Gutman, G. A.; et. al.; 2005]).

Estudios farmacológicos de los canales de potasio Kv1 han encontrado diversos fármacos y toxinas que los inhiben con una IC₅₀ que va del orden de pM a mM (Tabla 6).

En general los Kvs se bloquean con concentraciones mM de tetraetilamonio (TEA), bario (Ba²⁺), 4-amino piridina (4AP) y quinidina. En contraste, las toxinas peptídicas bloquean a los canales iónicos de manera específica y potente (IC₅₀ en el rango de pM a nM). En particular se conocen toxinas de alacrán, serpientes, arañas, medusas y abejas que bloquean a los canales Kv1, a excepción de los canales Kv1.4 y Kv1.5 [Gutman, G. A.; et. al.; 2005].

<u>Canal</u>	<u>TEA</u> <u>mM</u>	<u>4AP</u> <u>mM</u>	<u>ChTx</u> <u>nM</u>	<u>MgTx</u> <u>nM</u>	<u>HgTx</u> <u>nM</u>	<u>DTx</u> <u>nM</u>	<u>Otras</u> <u>Toxinas</u>
Kv1.1	0.3	290		0.144	0.031	20	ShK
Kv1.2	560	590	14	0.675	0.17	17	BgK
Kv1.3	10	195	3	0.230	0.086		BgK
Kv1.4	100	13					No
Kv1.5	330	270					Resinife- ratoxina
Kv1.6	7	1.5x10 ³			6	20	BgK
Kv1.7	150	150					No
Kv1.8	50	1.5x10 ³	100				No

Tabla 6 IC₅₀ de algunos fármacos y toxinas sobre canales Kv1. Fármacos: TEA, tetratilamonio y 4AP, 4-aminopiridina. Toxinas de alacrán: ChTx, caribdotoxina; MgTx, margatoxina y HgTx, Hongotoxina. Toxina de víbora: DTx, dendrotoxina. Toxinas de anémona: ShK toxina de *Stichodactyla heliantus* y BgK toxina de *Bunodosoma granulífera* (los datos se tomaron de [Gutman, G. A.; et. al.; 2005 y Koschak, A.; et al.; 1998]).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar si el péptido sr11a del veneno del caracol marino *Conus spurius* tiene actividad sobre los canales de potasio dependientes de voltaje Kv1 (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5 y Kv1.6).

2.2 Objetivos particulares

- Amplificar el DNA de los canales Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, y Kv1.6
- Obtener el RNA de los canales Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5 y Kv1.6.
- Registrar las corrientes eléctricas de los canales Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5 y Kv1.6 en ausencia y en presencia de 640 nM de la toxina sr11a.

3. METODOLOGÍA

3.1 Biología molecular

i) Amplificación de los cDNAs.

Los cDNAs (DNA complementario) de los canales hKv1.1, rKv1.2, rKv1.3, hKv1.4, rKv1.5 y hKv1.6 insertados en el vector pGEM, fueron adquiridos a través de un acuerdo de “Transferencia de Materiales” con el Dr. Olaf Pongs, Director del Instituto de Transducción de Señales Neurológica y Centro de Neurobiología Molecular de Hamburgo, Alemania. Se llevó a cabo la transformación de los DNAs en la cepa *Escherichia coli* DH-5 α por choque térmico. Las bacterias se incubaron en medio LB con ampicilina. Se purificó el DNA con el Plasmid Midi Prep Kit (QIAGEN), se utilizó la enzima de corte HindIII para los canales Kv1.1, Kv1.2 Y Kv1.3; la enzima NotI para el canal Kv1.4 y la enzima SalI para los canales Kv1.5 y Kv1.6.

ii) Transcripción *in vitro*.

A partir del DNA se sintetizó el mRNA (RNA mensajero) con el Kit mMessage mMachine (Ambion Corporation) de los canales hKv1.1, rKv1.2, rKv1.3, hKv1.4, rKv1.5 y hKv1.6 con la enzima T7 RNA polimerasa.

Para verificar la presencia de los DNA y RNA se utilizaron geles de agarosa. La concentración de las muestras se determinó por espectroscopia UV midiendo su absorbancia a 260 nm.

3.2 Inyección del RNA en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*

i) Cirugía.

La rana se anestesia por inmersión en hielo durante 1 hora. Después se le coloca boca arriba en una charola con hielo (para evitar que despierte) y se hace un corte de 1 cm de largo, primero de piel y luego de músculo en la parte baja del abdomen. Al quedar

expuestos los ovocitos, se extraen y se colocan en medio ND96 sin calcio calcio (en mM: 96 de NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 2.5 piruvato, pH= 7.4). Después de obtener los ovocitos se suturan el músculo y la piel para luego colocar a la rana en una pecera con agua fría, para que despierte poco a poco.

ii) Digestión del folículo de los ovocitos con una proteasa.

Los ovocitos obtenidos en la cirugía se colocan en un tubo de 45 ml con 15 ml de una solución de colagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich) en concentración de 1mg/ml, en medio ND96 sin calcio (pues el calcio inhibe a la colagenasa) y se agitan suavemente durante 45 min. Posteriormente se hacen lavados consecutivos con los medios ND96 sin calcio, ND96 con calcio (en mM: 96 de NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 2.5 piruvato, pH= 7.4) y ND96 con calcio más gentamicina (en mM: 96 de NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 2.5 piruvato, 0.05mg/ml pH= 7.4) con el fin de eliminar toda la colagenasa para que no maltrate a los ovocitos. Una vez libres de folículo, se mantuvieron a 18° C en la solución de ND96 con calcio más gentamicina antes y después de ser inyectados con el RNA.

iii) Microinyección del RNA.

Con la ayuda de un microinyector digital de 1 µl se inyectaron entre 0.5 y 20 ng de muestra de mRNA en cada ovocito. Se inyectan de 30 a 60 ovocitos por muestra de mRNA.

3.3 Obtención de la toxina

Se capturan los ejemplares de *C. spurius* con ayuda de redes camaroneras y se mantienen en congelación hasta su procesamiento. [López-Vera, E.; 2005] Se hace la disección del animal para obtener los conductos venenosos, estos se homogenizan y centrifugan para obtener el sobrenadante que contiene los péptidos. Por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High Pressure Liquid Chromatography) en fase reversa con una columna analítica C18 (Vydac 218TP54, tamaño de partícula de 5µm, tamaño de poro de

300 Å y de 4.6 x 250 mm) y una precolumna C18 (Vydac 218GK54, tamaño de partícula de 5µm, tamaño de poro de 300 Å y de 4.6 x 10 mm) se separan las diferentes fracciones para volver a purificarlas por la misma técnica analítica. [López-Vera, E.; 2005]

Se realizó la secuenciación automática del péptido nativo y del péptido piridiletalado por degradación de Edman, para después hacer una espectrometría de masas en modalidad MALDI (ionización por láser asistida por una matriz). Con estos estudios se pudo determinar la estructura primaria del péptido sr11a maduro. [Aguilar, M. B.; et. al.; 2007]

Este péptido fue purificado por el Biólogo Andrés Falcón bajo la dirección del Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez en el Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.4 Registros electrofisiológicos

Los ovocitos se registran con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos a partir de los dos y en ocasiones hasta los seis días después de haber sido inyectados; se utilizan ovocitos del mismo lote sin inyectar para obtener los registros control. Para el registro se utilizan dos cabezales (HS-2A-x1LU y HS-2A-x10MGU), un convertidor (DIGIDATA 1322A) y un amplificador (Gene Clamp 500B) analógico digitales y un software pClamp 8.0 (todos de Axon Instruments, Inc.). Se aplicó un protocolo de voltaje de -60 a 75 mV con pulsos de 2 s e incrementos de 15 mV, con un potencial de mantenimiento de -90 mV. Para realizar los registros se utilizan los medios ND96 (en mM: 96 de NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 2.5 piruvato, pH= 7.4) con albúmina al 0.1% [Lu, L.; et. al.; 1990 y Del Re, A. M.; et. al.; 2006].

Se utilizaron el TEA y la 4AP en diferentes concentraciones como bloqueadores inespecíficos para los canales Kv1. Por la cantidad limitada de la conotoxina, se utiliza el péptido sr11a en dos concentraciones: 640 nM y 1 µM para observar su efecto en los canales Kv1.

3.5 Análisis de datos

Con los resultados obtenidos para cada canal con el inhibidor (4AP o TEA) y con el péptido sr11a se sacaron los promedios (PROMEDIO) y la desviación estándar (DE) en cada caso de acuerdo a la ecuación:

$$DE = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - \text{PROMEDIO})^2}{n-1}}$$

en donde Y_i es el resultado i y n es el número total de resultados con valor de 3 en todos los casos. Además, los resultados obtenidos se sometieron a la prueba t pareada para muestras dependientes, en este caso se compararon los valores de la corriente antes de agregar y de la corriente después de agregar el inhibidor (4AP o TEA) o el péptido sr11a en un mismo ovocito. Se promedia la diferencia entre estos valores para obtener la media aritmética (\bar{d}), la cual nos da la desviación estándar (S) para las diferencias de acuerdo a la fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{(\bar{d} - d)^2}{n-1}}$$

Donde d es la diferencia en la corriente antes y después de agregar el bloqueador o péptido sr11a y $n = 3$ para todos los casos.

Calculada la media aritmética y la desviación estándar podemos obtener el valor de t con ayuda de la fórmula siguiente:

$$t = \frac{\bar{d}}{(S/\sqrt{n})}$$

El valor de t se compara con los valores críticos reportados para la distribución t, si es mayor a 2.920 entonces corresponderá a un $\alpha < 0.05$, lo que nos dirá que las diferencias observadas se deben de manera significativa al efecto del bloqueador o de la toxina, según corresponda [Naranjo-Rodríguez, E. B.; 2002].

Para determinar los valores de IC_{50} se utilizó la fórmula [Verdier, L.; et. al.; 2005]:

$$IC_{50} = \frac{fc}{1-fc} \times [Tx]$$

En donde fc es la fracción de corriente con respecto a la corriente registrada en el mismo ovocito antes de agregar el inhibidor o la toxina y TX es el promedio de la concentración del inhibidor o la toxina utilizada en cada caso.

RESULTADOS

4.1 Biología Molecular

Se amplificó el DNA de los canales hKv1.1, rKv1.2, rKv1.3, hKv1.4, rKv1.5 y hKv1.6 (Fig. 29) Los cDNAs fueron adquiridos a través del Dr. Olaf Pongs, Director del Instituto de Transducción de Señales Neurológica y Centro de Neurobiología Molecular de Hamburgo, Alemania. Las muestras se purificaron con minicolumnas de Qiagen y se determinó su concentración por UV a una λ de 260 nm y se guardaron a -20° C (Tabla 7).

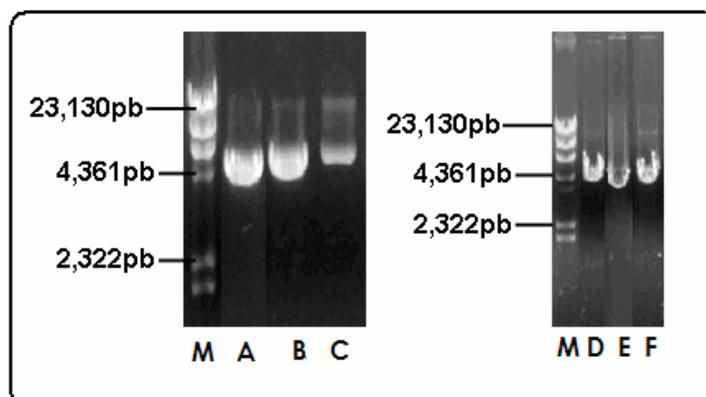


Fig. 29 Fotografías de los geles con el DNA de los canales Kv1: M, marcador; A, Kv1.1; B, Kv1.2; C, Kv1.3; D, Kv1.4; E, Kv1.5 y F, Kv1.6

Se transcribió el DNA de los canales hKv1.1, rKv1.2, rKv1.3, hKv1.4, rKv1.5 y hKv1.6 (Fig. 30) y se determinó la concentración de las muestras por UV a 260 nm, se distribuyeron en alícuotas de 1 μ L y se guardaron a -72°C (Tabla 7).

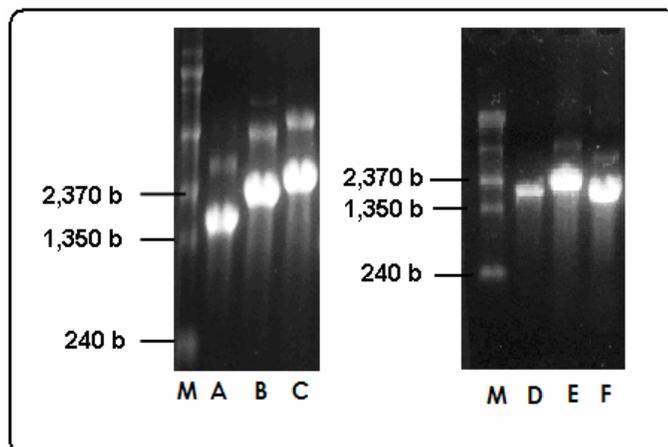


Fig. 30 Fotografías de los geles con el RNA de los canales Kv1: M, marcador; A, Kv1.1; B, Kv1.2; C, Kv1.3; D, Kv1.4; E, Kv1.5 y F, Kv1.6

Canal	μ L DNA	Conc. DNA μ g/ μ L	μ L RNA	Conc. RNA μ g/ μ L
Kv1.1	300	0.5	30	1.73
Kv1.2	400	0.46	25	2.55
Kv1.3	400	0.125	20	3.03
Kv1.4	400	0.575	23	0.37
Kv1.5	100	1.76	30	1.62
Kv1.6	400	0.5	30	1.63

Tabla 7. DNA y RNA obtenido de cada uno de los canales Kv1.

4.2 Inyección del RNA en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*

En un inicio se inyectaron de 4 a 6 ng por ovocito para saber cómo respondían los ovocitos al RNA inyectado. En particular, de los canales Kv1.1 **no** se observó expresión en los ovocitos, aún después del 5° día después de inyectar hasta 15 ng por ovocito. En contraste, el canal Kv1.3 se expresó desde el primer día inclusive inyectando sólo 0.3 ng de la muestra (Tabla 8).

Para poder expresar y estudiar el efecto del péptido sr11a sobre el canal Kv1.1, se inyectó de manera simultánea el RNA del canal Kv1.3 para favorecer la expresión de los heterotetrámeros. A pesar de que se logró su expresión funcional, los ovocitos no fueron estables el tiempo suficiente para realizar las pruebas con el péptido.

Canal	RNA/Ovocito	Día de Registro
Kv1.1	4, 10 o 15 ng	No hubo expresión al 5to. Día
Kv1.2	5, 4 o 2.5 ng	2° o 3er. día
Kv1.3	5, 2.5, 0.5 o 0.3 ng	1er. o 2° día
Kv1.4	6 ng	2° o 3er. día
Kv1.5	6 ng	2° o 3er. día
Kv1.6	6 o 3 ng	1er. o 2° día
Kv1.1/Kv1.3	0.5/0.5, 0.4/0.4 o 0.25/0.25 ng	2° o 3er. día

Tabla 8. Inyección de RNA en los ovocitos de *Xenopus laevis*

4.3 Registros electrofisiológicos

Se registraron ovocitos inyectados con el RNA de los canales Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5 y Kv1.6. Por cada lote se registraron ovocitos sin inyectar los cuales se designaron ovocitos control. En el caso de los lotes utilizados para estudiar el efecto de la toxina, los ovocitos control presentaron siempre corrientes menores a $1\mu\text{A}$ (Fig. 31).

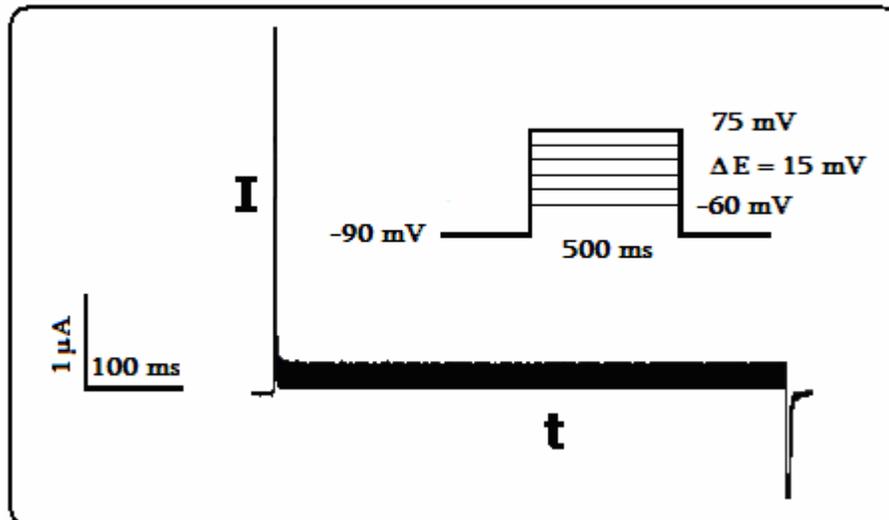


Fig. 31 Registro característico de un ovocito sin inyectar

Se realizaron 35 cirugías para hacer posible este trabajo de Tesis. Con base en los resultados obtenidos, podemos decir que no fue el mejor periodo de trabajo, pues de 928 ovocitos en los que se observó la expresión funcional de los canales Kv1, sólo se pudieron realizar 38 registros con los bloqueadores 4AP o TEA o con el péptido sr11a (Tabla 9). Cabe señalar tres factores que influyeron en la eficiencia del ensayo:

- La cinética de bloqueo por la sr11a es lenta: en los canales Kv1.4 se observaba el efecto entre los primeros 10 minutos, con el Kv1.2 y con el Kv1.6 se observaba el efecto entre los 15 y los 25 min después de agregar la toxina.
- La calidad de los ovocitos está determinada por el lote de ovocitos y la temporada estacional.
- La cámara de perfusión en la que se realizaron los ensayos con la toxina es tan solo de 30 μL de capacidad, lo cual requiere de destreza para poderla utilizar de manera adecuada.

No. Ranas	35
Ovocitos Inyectados	1860
Ovocitos registrados	928
Experimentos con TEA, 4AP o sr11a	73
Éxitos	38

Tabla 9. Experimentos con los Kvs.

4.3.1 Registros del canal Kv1.2

Se pudo observar que el canal Kv1.2 cuya IC₅₀ reportada para 4AP es de 590 μ M [Gutman, G. A.; et. al.; 2005], presenta una inhibición del 45.5 ± 2.3 % al agregar 4AP 600 μ M con una n= 3, semejante a la IC₅₀ reportada. El mismo canal presenta una inhibición del 66.0 ± 10.1 % con una n= 3 por el péptido sr11a a una concentración de 640 nM (Tabla 10). De acuerdo al tratamiento estadístico la inhibición se debe de manera significativa al efecto de la 4AP y del péptido sr11a, este último con una IC₅₀ estimada por regresión lineal en 427 nM.

Ovocito	% inhibición Kv 1.2 con 4AP [600 μM]	% inhibición Kv 1.2 con sr11a [640 nM]
1	43.2	54.4
2	47.8	58.9
3	45.5	73.2
Promedio	45.5	66.0
DE	2.3	10.1
\bar{d}	0.6	0.5
S	0.2	0.14
t	5.1	5.9

Tabla 10. Efecto del bloqueador 4AP y del péptido sr11a en el canal Kv1.2 expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*.

El curso temporal ($I(\mu\text{A})/t(\text{ms})$) (A) de la corriente control y de la corriente bloqueada por 4AP a 0 mV (se utiliza este voltaje para poder comparar con los datos reportados del efecto de otras toxinas con los canales Kv1) y (B) la curva I/V bajo las mismas condiciones de -50 a 50 mV en un ovocito representativo se observan en la figura 32.

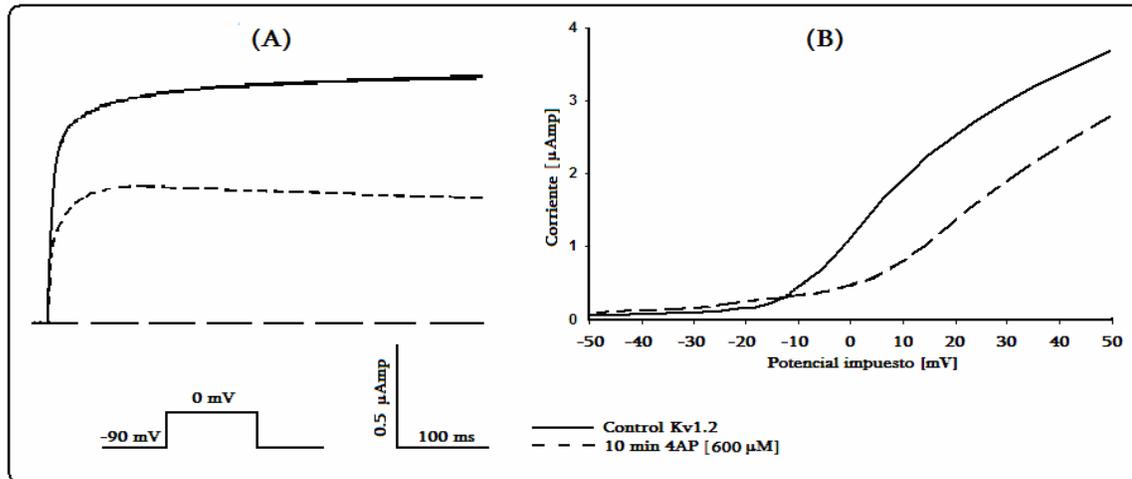


Fig. 32 (A) Curso temporal de la corriente control del Kv1.2 y de la corriente bloqueada con 4AP a 0 mV. (B) Curvas I/V de las corrientes control del Kv1.2 y bloqueada con 4AP.

Se obtuvieron los gráficos equivalentes para el canal Kv1.2 en presencia del péptido sr11a. (A) Curso temporal de la corriente control del canal Kv1.2 y de la corriente bloqueada por sr11a con 640 nM a 0 mV y (B) la curva I/V bajo las mismas condiciones de -50 a 50 mV (Fig. 33) en un ovocito representativo.

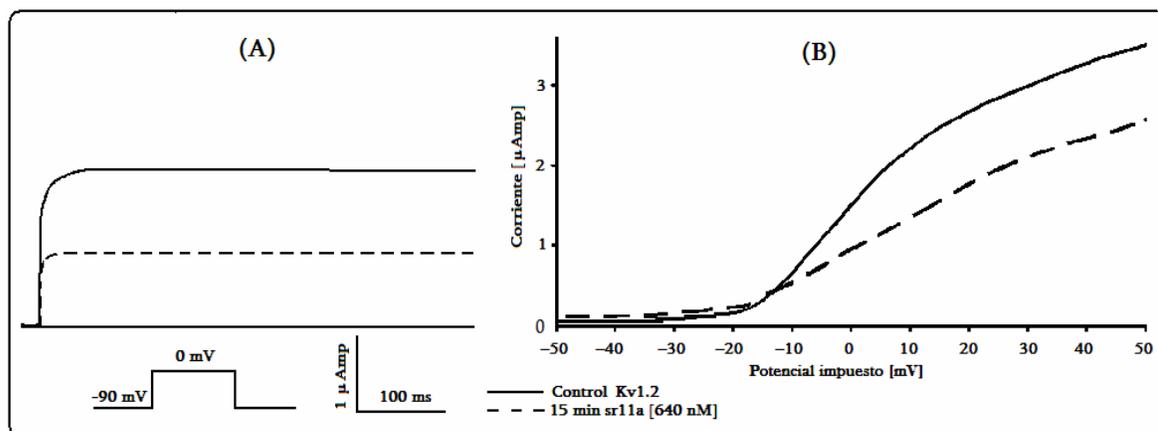


Fig. 33 (A) Curso temporal de la corriente control del Kv1.2 y de la corriente bloqueada con el péptido sr11a a 0 mV. (B) Curvas I/V de las corrientes control del Kv1.2 y bloqueada con el péptido sr11a.

4.3.2 Registros del canal Kv1.3

En el caso de los canales Kv1.3 por los experimentos en los que se pudo agregar la toxina parecen indicar que pueden afectar el “gating” del canal Kv1.3, aunque es necesario realizar más experimentos (Fig. 34).

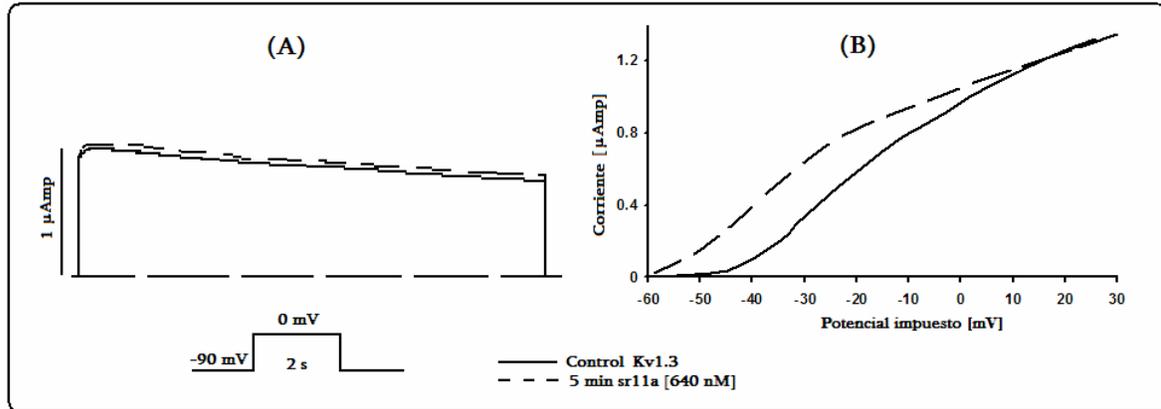


Fig. 34 (A) Curso temporal de las corrientes para los canales Kv1.3 antes y después de agregar el péptido sr11a a 0 mV. (B) Curvas I/V de las corrientes control y bloqueada con el péptido sr11a. Experimentos realizados en un mismo ovocito.

4.3.3 Registros de los canales Kv1.4 y Kv1.5

En el caso del canal Kv1.4 se observó una inhibición del $49.9 \pm 3.8 \%$ en presencia de 4AP 13 mM con una $n=3$, lo que coincide con la IC_{50} reportada = 13 mM [Gutman, G. A.; et. al.; 2005]. El mismo canal, en presencia del péptido sr11a en una concentración 640 nM, presenta una inhibición del $51.4 \pm 6.2 \%$ con una $n=3$ (Tabla 11). Por la prueba t pareada para muestras dependientes que se aplicó a estos resultados, la inhibición que se observa con la 4AP y con el péptido sr11a es generada con un nivel de significancia $\alpha < 0.05$. Se estimó por regresión lineal que el péptido sr11a tiene una $IC_{50} = 605$ nM.

El bloqueo del canal Kv1.4 por la conotoxina sr11a es un hallazgo notable, ya que hasta el momento no se ha reportado ninguna toxina (sin importar el origen animal) que inhiba este canal.

De los registros de las corrientes macroscópicas para el canal Kv1.4 (Fig. 35), se presentan (A) el curso temporal de la corriente control y de la corriente bloqueada por 4AP a 0 mV y (B) la curva I/V bajo las mismas condiciones de -50 a 50 mV en un ovocito representativo.

Ovocito	% inhibición Kv 1.4 con 4AP [13 mM]	% inhibición Kv 1.4 con sr11a [640 nM]
1	50	47.5
2	46.2	58.5
3	53.73	48.2
Promedio	49.9	51.4
DE	3.8	6.2
\bar{d}	1.1	1.47
S	0.65	0.83
t	2.94	3.03

Tabla 11. Efecto del bloqueador 4AP y del péptido sr11a en el canal Kv1.4 expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*.

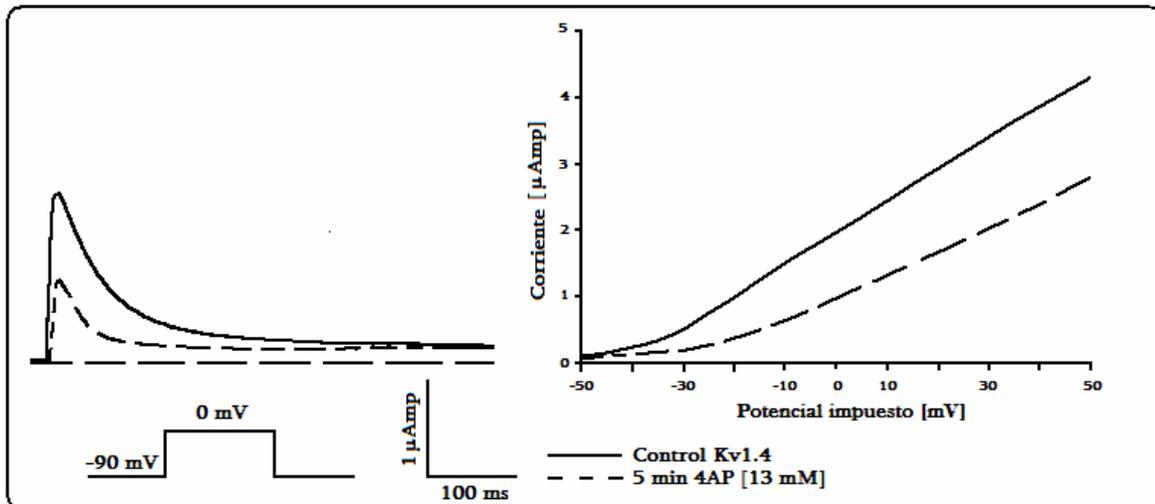


Fig. 35 (A) Curso temporal de la corriente control del Kv1.4 y de la corriente bloqueada con 4AP a 0 mV. (B) Curvas I/V de las corrientes control del Kv1.4 y bloqueada con 4AP.

De la misma manera, se presentan los gráficos para el canal Kv1.4 en presencia del péptido sr11a. (A) Curso temporal de la corriente control del canal Kv1.4 y de la corriente

bloqueada por sr11a 640 nM a 0 mV y (B) la curva I/V bajo las mismas condiciones de -50 a 50 mV (Fig. 36) en un ovocito representativo.

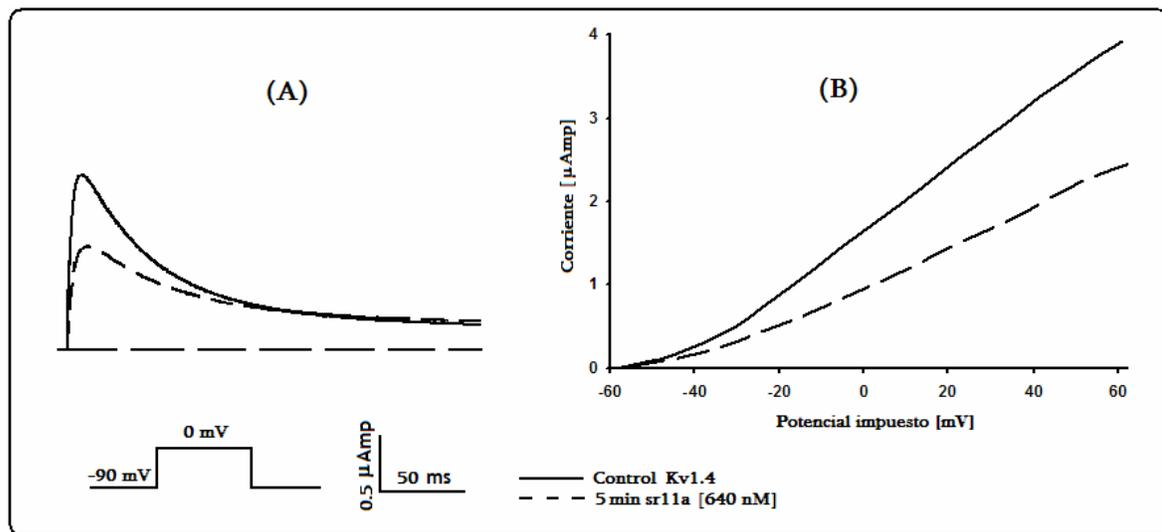


Fig. 36 (A) curso temporal de la corriente control del Kv1.4 y de la corriente bloqueada con el péptido sr11a a 0 mV. (B) Curvas I/V para observar el efecto del péptido sr11a en el canal Kv1.4.

Del canal Kv1.5 no se pudieron realizar experimentos con el péptido sr11a, pues no se lograron registrar más de 10 minutos.

4.3.4 Registros del canal Kv1.6

Al realizar los experimentos con el canal Kv1.6 (IC_{50} reportada con el TEA es de 7 mM [Gutman, G. A.; et. al.; 2005]) se observó una inhibición de 66.4 ± 12.4 % en presencia de TEA 7.5 mM con una $n= 3$. El mismo canal, en presencia del péptido sr11a en una concentración 640 nM, presenta una inhibición del 58.03 ± 5.5 % con una $n= 3$ (Tabla 12). Los resultados estadísticos confirman que el efecto observado se debe de manera significativa al TEA y al péptido sr11a. La IC_{50} estimada por regresión lineal para el péptido sr1a resultó ser 463 nM para este caso.

Ovocito	% inhibición Kv 1.6 con TEA [7.5 mM]	% inhibición Kv 1.6 con sr11a [640 nM]
1	47.2	56.5
2	56.7	80.7
3	57.1	72.1
Promedio	53.7	69.8
DE	5.6	12.2
\bar{d}	0.6	1.76
S	0.2	0.55
t	4.9	5.4

Tabla 12. Efecto del bloqueador 4AP y del péptido sr11a en el canal Kv1.6 expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Se obtuvieron para el canal Kv1.6 (A) el curso temporal de la corriente control y de la corriente bloqueada por TEA a 0 mV y (B) la curva I/V bajo las mismas condiciones de -50 a 50 mV (Fig. 37) en un ovocito representativo.

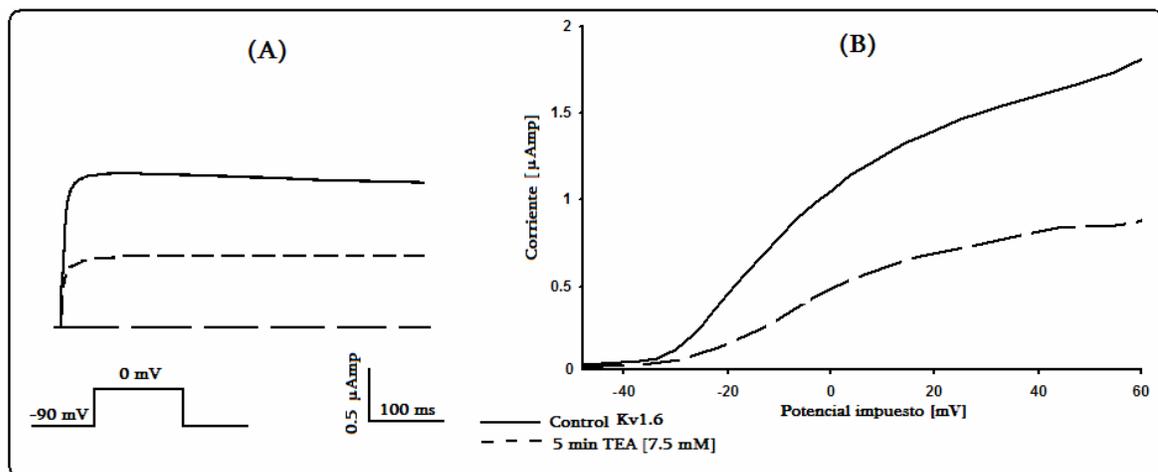


Fig. 37 (A) Curso temporal de las corrientes para los canales Kv1.6 antes y después de agregar TEA a 0 mV. (B) Curvas I/V de las corrientes control y bloqueada con TEA.

Se presentan los gráficos para el canal Kv1.6 en presencia del péptido sr11a. (A) Curso temporal de la corriente control del canal Kv1.6 y de la corriente bloqueada con sr11a 640 nM a 0 mV y (B) la curva I/V bajo las mismas condiciones de -50 a 30 mV (Fig. 38) en un ovocito representativo.

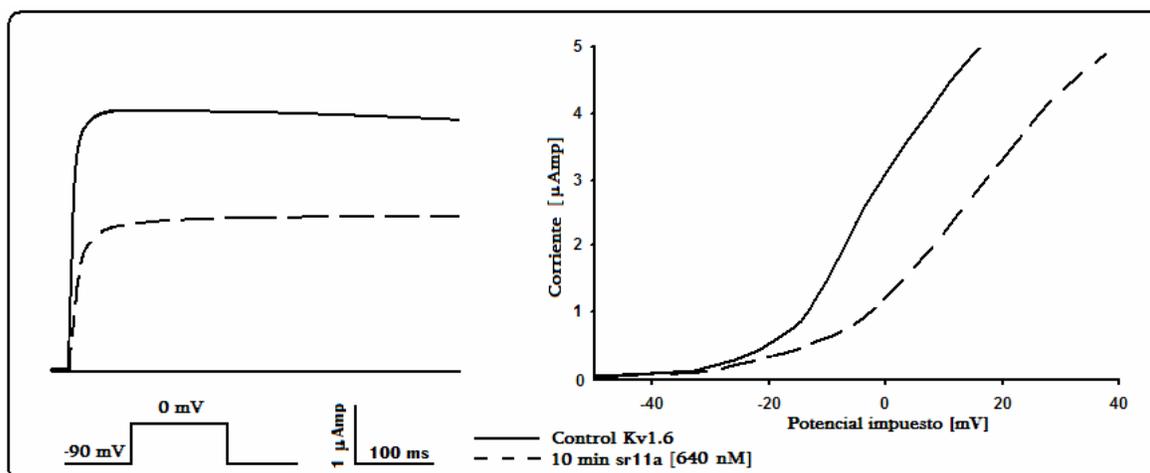


Fig. 38 (A) Registro de las corrientes para los canales Kv1.6 antes y después de agregar el péptido sr11a a 0 mV. (B) Curvas I/V de las corrientes control y bloqueada con el péptido sr11a.

Los resultados obtenidos con el péptido sr11a se resumen en la tabla 13.

Canal	IC ₅₀ para el péptido sr11a
Kv1.1	no se expresó el canal
Kv1.2	427 nM
Kv1.3	faltan experimentos para corroborar el efecto activador
Kv1.4	605 nM
Kv1.5	los ovocitos vivieron poco tiempo en la cámara
Kv1.6	463 nM

Tabla 13. Resultados obtenidos para el péptido sr11a.

5. DISCUSIÓN

Las toxinas de origen peptídico presentes en los venenos de los animales son un claro ejemplo de las estrategias evolutivas en la biología.

Actualmente, el estudio de las interacciones moleculares entre las toxinas y sus blancos en las membranas celulares, concretamente: la unión toxina/transportador iónico y/o

toxina/canal iónico, es de gran relevancia en el desarrollo de herramientas farmacológicas específicas [Gilquin, B.; et. al. 2005].

5.1 Efecto experimental de la sr11a en los canales Kv1

En la actualidad hay 6 conotoxinas de la superfamilia I2, de las cuales sólo de dos se ha determinado su efecto sobre dos familias de canales de potasio que dependen del voltaje y se abren con la despolarización de la membrana. La I-conotoxina de *C. betulinus*, BtX, aumenta la actividad de los canales de potasio dependientes de voltaje y activados por calcio (BK). Los canales BK se encuentran distribuidos en el sistema nervioso central y son muy abundantes en el músculo esquelético [Wei, A. D.; et. al.; 2005]. Por otra parte la conotoxina ViTx de *C. virgo* tiene un efecto bloqueador de los canales de potasio de mamífero de la subfamilia Kv1: Kv1.1 y Kv1.3. Los canales de potasio participan en la repolarización de la membrana plasmática después de que se lleva a cabo un potencial de acción y se liberan los neurotransmisores al espacio sináptico [Al-Sabi, A.; et. al.; 2004].

En este trabajo demostramos por primera vez que la conotoxina sr11a de *C. spurius* bloquea tres canales de potasio de la subfamilia Kv1 de mamíferos: Kv1.2, Kv1.4 y Kv1.6.

A pesar de que inyectamos hasta 15 ng de RNA/ovocito de los canales Kv1.1, no se observó expresión funcional del homotetrámero. Al respecto, llama la atención que con la ViTx de *C. virgo* reporten el registro de corrientes Kv1.1 y su inhibición por esta conotoxina en los ovocitos de *Xenopus laevis* [Kaufenstein, S. et. al.; 2003], pues se ha determinado que este canal se encuentra de manera endógena como homotetrámero de manera específica en el retículo endoplásmico de células de fibroblasto de riñón de mono (COS-1), de riñón de embrión humano (HEK-293), células epiteliales de riñón canino (MDCK) y cultivos de hipocampo de rata; mientras que como heterotetrámero o unido a subunidades β se ve en la membrana celular de los tipos celulares mencionados anteriormente [Manganas, L. N. y Trimmer, J. S.; 2000 y Leung, Y. M.; et. al.; 2007].

Además, Thornhill ha estudiado la expresión del canal Kv1.1 nativo o con mutaciones de residuos específicos en un sistema heterólogo (células de ovario de hamster chino, CHO, que no tienen canales Kv1 ni subunidades Kv β 1 o Kv β 2) confirmando que este canal no llega a la membrana plasmática salvo como heteromultímero con otro Kv1 [Zhu, J.; et. al.; 2003 y Watanabe, I.; et. al.; 2004] debido a que los residuos Ser520 y Tyr532 (de acuerdo a la numeración en la Fig. 37) favorecen que este canal sea retenido en el retículo endoplásmico [Zhu, J.; 2005] por lo cual es dudoso que se reporte una expresión exitosa de los canales Kv1.1.

Por otra parte, los canales Kv1.3 tienen una expresión funcional muy eficiente en los ovocitos ya que fue posible registrar sus corrientes un día después de inyectar su mRNA con tan sólo 0.3 ng/ovocito. Con el Kv1.3 sólo fue posible hacer algunos ensayos con la conotoxina sr11a y no observamos una disminución de la corriente, por el contrario, la sr11a tuvo un efecto activador (Fig. 32). Son necesarios más ensayos para confirmar este resultado.

Se ha reportado que los canales Kv1.1 y Kv1.3 se bloquean por la I-conotoxina ViTx. La farmacología de estos canales ha sido muy estudiada por toxinas de alacrán (KTX) y anémona (ShK). El canal Kv1.6 también se bloquea por toxinas de anémona (ShK) y de alacrán (HgTX) [Gutman, G. A.; et. al.; 2005].

Los canales Kv1.2, Kv1.3 y Kv1.6 al igual que todos los canales Kv se encuentran en los linfocitos T, en el sistema nervioso central y en el corazón, en donde participan en la regulación del potencial de membrana y en los potenciales de acción cardíaco y nervioso. [Gutman, G. A.; et. al.; 2005] También presentan otras funciones muy importantes, por ejemplo se ha demostrado que los canales Kv1.3 transportan potasio en los túbulos renales [Escobar, L. I.; et. al.; 2004].

Un hecho notable es que hasta este trabajo, NO se conocen bloqueadores de origen peptídico del canal Kv1.4 [Gutman, G. A.; et. al.; 2005]. Esto es de gran importancia pues el canal Kv1.4 se encuentra principalmente en el corazón y en el cerebro. El canal participa

en la corriente transitoria lenta (I_{to}) del potencial cardiaco y junto con el Kv1.2, se localiza exclusivamente en las membranas presinápticas en el SNC [Lee, J.; et. al.; 2008 y Liu, H.; et. al.; 2006]. En las neuronas se ubica en los axones y terminales presinápticas en donde su función principal es regular el potencial de acción y la liberación de neurotransmisores, por lo que al bloquear este canal, las neuronas serán más excitables y se provocaría una mayor liberación de neurotransmisores [Lee, J.; et. al.; 2008 y Liu, H.; et. al.; 2006]. En el corazón el Kv1.4 participa en la corriente Ito del potencial de acción cardiaco, por lo que el péptido sr11a constituye una herramienta farmacológica novedosa para estudiar el impacto de la disminución de este componente transitorio [Judge, S. I. V.; et. al.; 1999 y Judge, S. I. V.; et. al.; 2002].

Cabe señalar que hasta el momento además de las dos I-conotoxinas a las que se les han realizado estudios farmacológicos, existen dos conotoxinas que afectan este tipo de canales: la κ -PVIIA (de *C. purpurascens*) [Savarin, P.; et. al.; 1998] y la κ M-RIIIK (de *C. radiatus*) [Verdier, L.; et. al.; 2005] que han afectado canales tipo *Shaker* de invertebrados o peces pero no de mamíferos.

5.2 Interacción toxina/canal iónico

En general se sabe que hay tres características en la interacción entre una toxina (sea esta de alacrán, víbora, anémona o caracol marino) y un canal de potasio activado por voltaje Kv1 [Gilquin, B.; et. al. 2002]:

- A pesar de las estructuras diferentes de las toxinas, algunas pueden bloquear el paso de los iones por el vestíbulo externo del poro del mismo tipo de canal Kv1.
- Las toxinas presentan una diada compuesta por un residuo de lisina (K con carga positiva) y un residuo hidrofóbico (Y o F) que son cruciales para que la toxina se una a un canal Kv1.

- Hay de 7 a 11 residuos “funcionales” en las toxinas para su interacción con los canales Kv1 [Gasparini, S.; et. al.; 2004] y puede haber un solo residuo que determine su especificidad por uno de los canales Kv1 [Gilquin, B.; et. al. 2005].

5.2.1 Toxinas de anémona/Kv1

Gracias a estudios con mutantes tanto de los canales como de diversas toxinas y a través de experimentos de “ciclos termodinámicos”, se ha encontrado que para dos toxinas de anémona, la BgK y la ShK, son de gran importancia los residuos Ser-23, Lys-25 y Tyr-26 (de acuerdo a la secuencia de la BgK) en la interacción con los canales Kv1 [Gilquin, B.; et. al.; 2005 y Gilquin, B.; et. al.; 2002]. Se ha demostrado que el residuo Phe-6 en la BgK le confiere especificidad sobre el Kv1.1, mientras que en la ShK la Arg-11 es la responsable de la especificidad de esta toxina por el canal Kv1.3. (Fig. 39) [Gilquin, B.; et. al. 2005]

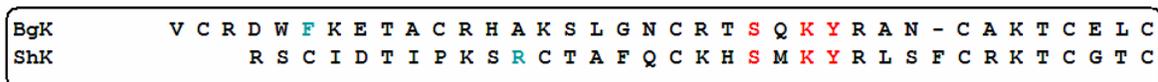


Fig. 39 Secuencia de las toxinas de anémona BgK y ShK, señalando en verde los residuos responsables de su especificidad y en rojo aquellos importantes para bloquear el poro de los canales Kv1 de acuerdo a lo reportado en [Gilquin, B.; et. al. 2005].

5.2.2 Toxinas de alacrán/Kv1

En el caso de las toxinas de alacrán AgTX2, ChTX e IbTX, se ha corroborado la importancia de la diada lisina-residuo hidrofóbico (Lys-27 en la ChTX), pero además se ha demostrado que el residuo Asn-30 en la ChTX y su equivalente en la AgTX2 les confieren especificidad sobre los canales Kv1, mientras que la presencia del residuo Gly-30 en la IbTX le confiere a ésta su especificidad por otra familia de canales, los canales de potasio activados por calcio, BK (Fig. 40) [Gao, Y. y García, M. L.; 2003 y Schroeder, N.; et. al.; 2002].

Sin embargo hay toxinas que bloquean a los canales Kv1 y no muestran esas características, por ejemplo para la toxina Pi1 que presenta la diada en sus residuos Lys-24 y Tyr-33, dos toxinas análogas sin la diada (la análoga [A24, A33]-Pi1 en la cual se sustituye la diada por residuos de alanina y la análoga Tyr-33 (P-Pi1) en donde la tirosina de la diada es

fosforilada) sí bloquean a los canales de potasio activados por voltaje. En este caso, al “romperse la regla de la diada” el bloqueo lo explican al plantear que los residuos básicos de Arg-5, Arg-12, Arg-28 y Lys-31 forman un anillo con carga positiva que por interacciones electrostáticas reconocería, y colocaría a la toxina sobre el canal Kv1.2 [Mouhat, S.; et. al.; 2004b]. En general para todas las toxinas y en particular para el caso de la toxina nativa Pi1, después de la unión electrostática se forman puentes de hidrógeno con por la Tyr-33 (uno de los residuos de la diada) y de la Ile-26. El otro residuo de la diada, Lys-24, bloquearía el paso de los iones K^+ al estabilizarse de manera electrostática por los 4 residuos negativos de aspartato D379 contiguos a la secuencia GYG (filtro de selectividad) en el canal Kv1.2 [Mouhat, S.; et. al.; 2004b].

A pesar de que en la toxina Tc32 la diada se pierde completamente según la alineación propuesta con base en la secuencia de cisteínas (Tc32a en la Fig. 40), ésta presenta una alta afinidad por los canales Kv1.3 [Batista, C. V. F.; et. al.; 2002]. Sin embargo, al alinearlas de manera que la Lys-21 coincide con la Lys-27 de la ChTx sí se observa diada Lys-residuo hidrofóbico. En este momento no se puede decir de manera contundente si la diada Lys-residuo hidrofóbico en esta toxina es funcional. Para ello se deben realizar análisis de ciclos termodinámicos de dobles mutantes, en los cuales dos moléculas que interactúan (A y B) se mutan en un sitio específico para generar las mutantes A^* y B^* . Finalmente se determinan las energías libres de los enlaces en cada una de las combinaciones A-B, A^* -B, A - B^* y A^* - B^* para determinar cuáles son los enlaces que determinan la interacción entre A y B [Verdier, L.; et. al.; 2005].

	1	15	27	35
ChTx	Q F T N V S C T T S K E C W S V C Q R L H N T S R G	K C M N K K C R C	Y S	
IbTx	Q F T D V D C S V S K E C W S V C K D L F G V D R G	K C M G K K C R C	Y Q	
AgTX2	V P I N V S C T G S P Q C I K P C K D A G M R F G	K C M N R K C H C	T P K	
MTX	V S C T G S K D C Y A P C R K Q T G C P N A	K C I N K S C K C	Y G C	
Pi1	L V K C R G T S D C G R P C Q Q Q T G C P N S	K C I N R M C K C	Y G C	
Tc32a	T G P Q T T C Q A A M C E A G C K G L G K S M E S C Q G D T C K C K A			
Tc32b	T G P Q T T C Q A A M C E A G C K G L G	K S M E S C Q G D	T C K C K A	

Fig. 40 Secuencia de las toxinas de alacrán ChTx, IbTX, AgTX2, MTX, Pi1, Tc32(a) y Tc32(b), señalando en azul los residuos responsables de su especificidad y en rojo aquellos importantes para bloquear los poros de los Kv1 de acuerdo a los trabajos mencionados en esta discusión.

5.2.3 Conotoxinas/Kv1

Hasta el momento se han analizado estructuralmente sólo tres conotoxinas que actúan sobre canales de potasio activados por voltaje (Fig. 41). Estas conotoxinas no presentan una diada como la que se encuentra en las toxinas de alacrán o anémona:

- κ -PVIIA pertenece a la superfamilia O y se identificó en el veneno de *C. purpurascens*. Los estudios de modelaje tridimensional permiten concluir que la Lys-7 es la responsable de bloquear el poro de los canales *Shaker* (Fig. 41) [Savarin, P.; et. al.; 1998].
- ViTx pertenece a la superfamilia I2 y se aisló del veneno de *C. virgo*. En este caso también por estudios de modelaje tridimensional teórico se concluyó que los residuos Arg-26 y Arg-32 (R26 y R32) son importantes para bloquear el paso de iones potasio a través del poro de los canales Kv1.1 y Kv1.3 (Fig. 41) [Mondal, S.; et. al.; 2005]. La toxina ViTx tiene poca afinidad por los canales Kv1.1 y Kv1.3 (IC50 de 1.59 y 2.09 μ M, respectivamente; [Kaufenstein, S. et. al.; 2003]), por lo que no se descarta que tenga mayor actividad por otros canales Kv1 (sólo probaron la toxina sobre los canales Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.3).
- κ M-RIIIK, pertenece a la superfamilia M y se obtuvo del veneno del caracol marino *C. radiatus*. En este caso el residuo hidroxiprolina Hyp-15 es el responsable del bloqueo del canal *Shaker* (marcado con la letra O en la secuencia de la κ M-RIIIK en la Fig. 41) [Verdier, L.; et. al.; 2005]. Se reporta para esta toxina un anillo de carga positiva como responsable de la interacción con el canal de potasio *TSha1*, formado por los residuos Arg-10, Lys-18 y Arg-19, además de que la participación de la Leu-1 también es importante para estabilizar su unión [Al-Sabi, A.; et. al.; 2004].

		5		15		30																													
sr11a	C	R	T	E	G	M	S	C	g	g	N	Q	Q	C	C	W	R	S	C	C	R	G	E	C	E	A	P	C	R	F	G	P*			
ViTx	S	R	C	F	P	P	G	I	Y	C	T	S	Y	L	P	C	C	W	G	I	C	C	S	T	C	R	N	V	C	H	L	R	I	G	K
kM-RIIIK			L	O	S	C	C	S	L	N	L	R	L	C	O	V	O	A	C	K	R	N	O	C	C	T*									
Pi1	L	V	K	C	R	G	T	S	D	C	G	R	P	C	Q	Q	Q	T	G	C	P	N	S	K	C	I	N	R	M	C	K	C	Y	G	C*

Fig. 42 Secuencias de aminoácidos de las toxinas ViTx, kM-RIIIK y Pi1 señalando en magenta los aminoácidos propuestos para formar un anillo de cargas positivas de acuerdo a los trabajos mencionados en esta discusión. En la secuencia de la conotoxina sr11a se resaltan en magenta sus 4 argininas. O= hidroxiprolina, g=gamma-carboxiglutamato y * indica que el carboxilo terminal está amidado.

En la actualidad es importante el estudio que se ha desarrollado para identificar los aminoácidos modificados postraduccionalmente, pues se ha demostrado que pueden ser cruciales en la interacción con los canales. Por ejemplo, en la conotoxina κ M-RIIIK se ha identificado a la hidroxiprolina (Hyp-15) como el residuo importante en la interacción con el canal *Shaker*. [Verdier, L.; et. al.; 2005]

De manera general, los aminoácidos en la naturaleza presentan una configuración L (L de levógira pues al hacer pasar un haz de luz a través de un cristal de un aminoácido, se desvía hacia la izquierda, mientras que cuando la luz se desvía hacia la derecha, la configuración es dextrógira, D; [Voet, D. y Voet, J. G.; 1992]). Es de llamar la atención que las I-conotoxinas tienen D-aminoácidos en su estructura primaria como una modificación postraduccional y son de gran importancia en la unión de la toxina a los canales. Como ejemplo, se ha demostrado que la conotoxina ι -RXIA que contiene el residuo D-Phe44 de manera nativa, al ser sintetizado con el residuo L-Phe44, su actividad excitotóxica disminuye más de 250 veces al probarse en una preparación neuro-muscular de rana [Buczek, O.; et. al.; 2005a y Buczek, O.; et. al.; 2007].

El péptido sr11a tiene tres modificaciones postraduccionales: presenta su carboxilo terminal amidado y dos gamma-carboxiglutamatos en las posiciones 9 y 10. Por otra parte, es poco probable que los gamma-carboxiglutamatos, por su carga negativa, sean importantes en la unión con el canal. Sin embargo, será importante estudiar el efecto de la conotoxina sr11a sobre los canales Kv1 sin los residuos con modificaciones postraduccionales. Aún más, la sr11a es la única I-conotoxina con una secuencia diada: la

R29F30. Serán necesarios estudios posteriores donde se pueda confirmar si esta diada es funcional.

Es importante señalar que la conotoxina ViTx es la única que se ha demostrado que actúa sobre canales de potasio dependientes de voltaje Kv1 y que no presenta modificaciones postraduccionales en su secuencia. Además es la única conotoxina de la superfamilia I2 que al estudiarse de manera teórica y por la semejanza que presenta con la con la J-ACTX-Hv1c se propone que presente un patrón de puentes disulfuro en el cual se observa el motivo ICK, además de un anillo de residuos básicos (Arg26, Arg32 y Lys35) (Fig. 43) [Mondal, S.; et. al.; 2005].

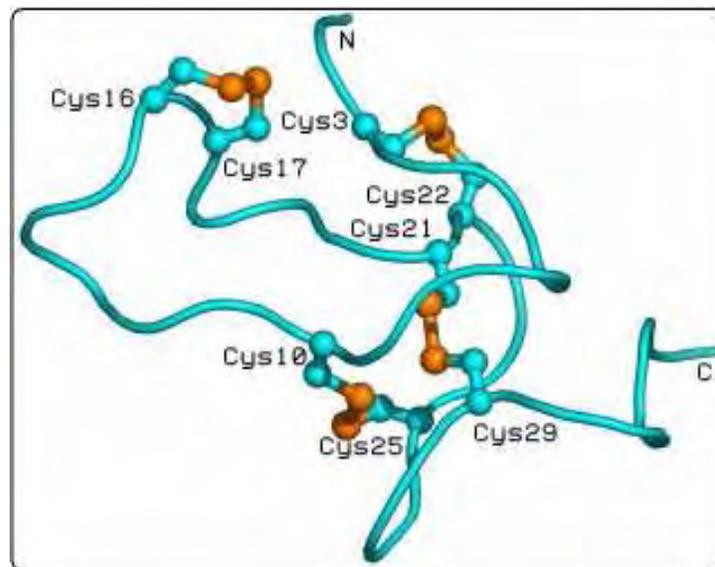


Fig. 43 Modelo tridimensional propuesto para la toxina ViTx en el que se asume que los puentes disulfuro presentan la misma conectividad que en la J-ACTX-Hv1c (Tomado de [Mondal, S.; et. al.; 2005]).

De acuerdo a estas evidencias tanto teóricas como experimentales podemos sugerir para el péptido sr11a que las 4 argininas (R) presentes en su secuencia de aminoácidos se perfilan como responsables de la afinidad de la toxina por los canales Kv1, quedando por confirmar de qué manera las modificaciones postraduccionales afectan su comportamiento con los canales Kv1.

Este trabajo es de gran relevancia pues por primera vez se demuestra que el canal Kv1.4 se bloquea por una toxina de origen peptídico. Los estudios con toxinas de anémona y de

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Estos resultados confirman la importancia de la estructura primaria y el patrón de cisteínas en la predicción del efecto de la conotoxina sobre los canales iónicos de potasio, pues hasta el momento, las dos I-conotoxinas de la superfamilia I₂ a las que se han realizado estudios electrofisiológicos han resultado tener efecto sobre canales de potasio activados por voltaje Kv1.

La conotoxina sr11a de *C. spurius* bloqueó los canales de potasio dependientes de voltaje rKv1.2, hKv1.4 y hKv1.6. De acuerdo a las IC₅₀ estimadas, (427 nM, 605 nM y 463 nM, respectivamente) su afinidad es parecida pero mayor por el hKv1.6 > rKv1.2 > hKv1.4. Estas IC₅₀ son muy razonables, ya que la conotoxina κ-PVIIA presenta una IC₅₀ de 50 a 200 nM dependiendo del estado abierto o cerrado del canal iónico [Terlau, H.; et. al.; 1999], mientras que la conotoxina κM-RIIIK presenta una IC₅₀ = 76 ± 10 nM por el canal TSha1 de la trucha [Verdier, L.; et. al.; 2005].

Como una primera aproximación para conocer la estructura tridimensional del péptido sr11a, el Dr. Marcelo Galván de la Universidad Autónoma Metropolitana, ayudó a modelar la conotoxina sr11a por su homología con el alergénico 1bbg de *Ambrosia trifida* V, con el programa Modeller (Fig. 45). Se pueden observar en color verde las cuatro argininas (R) de carga positiva junto con un triptófano W (aminoácido no polar) colocadas hacia el mismo lado, lo cual sugiere que forman un anillo de carga positiva que se une al poro de los Kv1 como se planteó en la discusión.

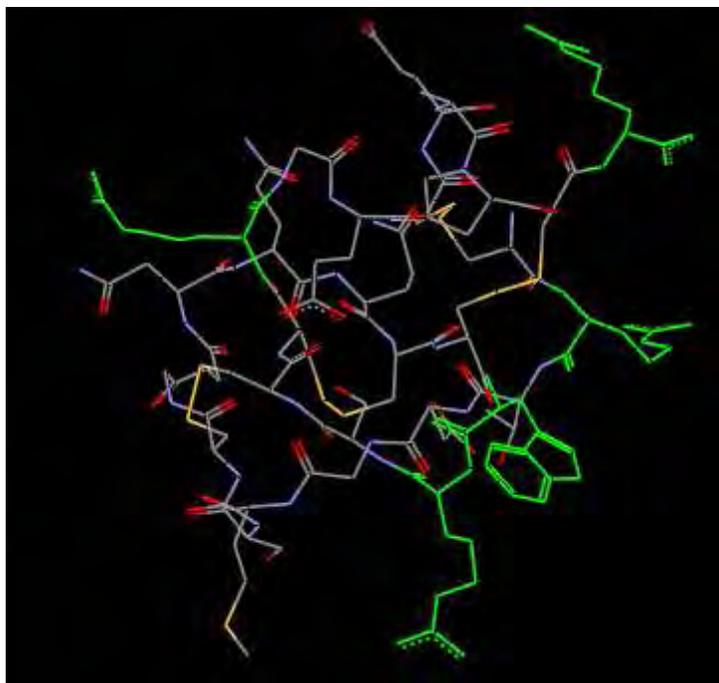


Fig. 45 Modelo tridimensional del péptido sr11a. Se muestra sólo la región modelada de 29 aminoácidos.

Por ser la sr11a la primera toxina que bloquea al canal Kv1.4, canal de potasio de gran relevancia en la fisiología cardíaca y neuronal, se plantean las perspectivas siguientes:

- Sintetizar el péptido o purificar más péptido nativo para determinar su patrón de puentes disulfuro y para realizar curvas dosis respuesta que permitan determinar en forma correcta la IC₅₀ y si el bloqueo depende del estado del canal (abierto y/o cerrado).
- Completar los experimentos con la familia de los canales Kv1 y realizar experimentos con otro tipo de canales de potasio (como el BK dependiente de calcio) y de sodio para conocer la especificidad del péptido.
- Continuar el estudio del posible efecto activador del péptido sr11a sobre el canal Kv1.3.
- A partir del modelo de la conotoxina sr11a y de la estructura de rayos X del canal Kv1.2 [Long, S. B.; et. Al.; 2005], proponer los residuos que serían relevantes de estudiar por ensayos de ciclos termodinámicos donde se mutan en forma

simultánea residuos del vestíbulo del canal y de la toxina para determinar los residuos involucrados en la unión toxina/canal Kv1.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, M. B.; Chan de la Rosa, R. A.; Falcón, A.; Olivera, B. M. y Heimer de la Cotera, E. P.; Peptide pal9a from the venom of the turrid snail *Polystira albida* from the Gulf of Mexico: purification, characterization and comparison with P-conotoxin-like (Framework IX) conoidean peptides. *Peptides*, 2008a, doi:10.1016/j.peptides.2008.09.016.

Aguilar, M. B.; Lezama-Monfil, L.; Maillo, M.; Pedraza-Lara, H.; López-Vera, E. y Heimer de la Cotera, E. P.; A biologically active hydrophobic T-1-conotoxin from the venom of *Conus spurius*. *Peptides*, 2006, 27: 500-505.

Aguilar, M. B.; López-Vera, E.; Heimer de la Cotera, E. P.; Falcón, A.; Olivera, B. M. y Maillo, M.; I-conotoxins in vermivorous species of the West Atlantic: peptide sr11a from *Conus spurius*. *Peptides*, 2007, 28: 18-23.

Aguilar, M. B.; López-Vera, E.; Ortiz, E.; Becerril, B.; Possani, L. D.; Olivera, B. M. y Heimer de La Cotera, E. P.; A novel conotoxin from *Conus delessertii* with posttranslationally modified lysine residues. *Biochemistry*, 2005, 44: 11130-11136.

Aguilar, M. B.; Luna-Ramírez, K. S.; Echevarría, D.; Falcón, A.; Olivera, B. M.; Heimer de la Cotera, E. P. y Maillo, M.; Conorfamide-Sr2, a gamma-carboxyglutamate-containing FMRFamide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks. *Peptides*, 2008b, 29: 186-195.

Aidley D. J.; Standfield P. R.; Ion channels molecules in action. *Cambridge University Press*, 1998, United Kingdom, pp.: 1-57 y 225-262.

Aiyar, J.; Withka, J. M.; Rizzi, J. P.; Singleton, D. H.; Andrews, G. C.; Lin, W.; Boyd, J.; Hanson, D. C.; Simon, M.; Dethlefs, B.; Lee, C.; Hall, J. E.; Gutman, G. A. y Chandy, K. G.; Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron*, 1995, 15: 1169-1181.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J. D.; Molecular Biology of The Cell Third Edition. *Editon Garland Publishing Inc.*, 1994, USA, pp.: 478-549.

Alessandri-Haber, N., Lecoq, A.; Gasparini, S.; Grangier-Macmath, G.; Jacquet, G.; Harvey, A. L.; de Medeiros, C.; Rowan, E. G.; Gola, M.; Menez, A. y Crest, M.; Mapping the functional anatomy of BgK on Kv1.1, Kv1.2 and Kv1.3. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 35653-35661.

Al-Sabi, A.; Lennartz, D.; Ferber, M.; Gulyas, J.; Rivier, J. E. F.; Olivera, B. M.; Carlomagno, T. y Terlau, H.; kM-conotoxin RIIK, structural and functional novelty in a K⁺ channel antagonist. *Biochemistry*, 2004, 43: 8625-8635.

Armishaw, C. J. y Alewood, P. F.; Conotoxins as research tools and drug leads. *Current Protein and Peptide Science*, 2005, 6: 221-240.

Bassani, R. A.; Transient outward potassium current and Ca²⁺ homeostasis in the heart: beyond the action potential. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2006, 39: 393-403.

Batista, C. V. F.; Gómez-Lagunas, F.; Rodríguez de la Vega, R. C.; Hajdu, P.; Panyi, G.; Gáspár, R. y Possani, L. D.; Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and *Shaker* B K⁺ channels with distinctly different affinities. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1601: 123-131.

Bezanilla, F.; How membrane proteins sense voltage. *Nature Reviews*, 2008, 9: 323-332.

Bianchi, L. y Driscoll, M.; Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook, edition. The C. elegans Research Community*, 2006.

Buczek, O.; Wei, D.; Babon, J. J.; Yang, X.; Fiedler, B.; Chen, P.; Yoshikami D.; Olivera, B. M.; Bulaj, G. Y Norton, R. S.; Structure and sodium channel activity o an excitatory I1-Superfamily conotoxin. *Biochemistry*, 2007, 46: 9929-9940.

Buczek, O.; Yoshikami, D.; Bulaj, G.; Jiménez, E. C. y Olivera, B. M.; Post-translational amino acid isomerization: a functionally important D-amino acid in an excitatory peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005a, 280: 4247-4253.

Buczek, O.; Yoshikami, D.; Watkins, M.; Bulaj, G.; Jiménez, E. C. y Olivera, B. M.; Characterization of D-amino-acid-containing excitatory conotoxins and redefinition of the I-conotoxin superfamily. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 2005b, 272: 4178-4188.

Carneiro, A. M. D.; Kushmerick, C.; Koenen, J.; Arndt, M. H. L.; Cordeiro, M. N.; Chavez-Olortegui, C.; Diniz, C. R.; Gomez, M. V.; Kalapothakis, E.; Prado, M. A. M. y Prado, V. F.; Expression of a functional recombinant Phoneutria nigriventer toxin active on K⁺ channels. *Toxicon*, 2008, 41: 305-313.

Ceballos, G. y Eccardi, F.; Diversidad de fauna mexicana. *Editorial CEMEX*, 1996, México, pp.: 15-17, 35-51, 77-95, 116-117, 125 y 165-167.

Chen, P.; Garret, J. E.; Watkins, M y Olivera, B. M.; Purification and characterization of a novel excitatory peptide from *Conus distants* venom that defines a novel gene superfamily of toxins. *Toxicon*, 2008, 52: 139-145.

Craik, D. J.; Daly, N. L. y Waive, C.; The cysteine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon*, 2001, 39: 43-60.

Dauplais, M.; Lecoq, A.; Song, J.; Cotton, J.; Jamin, N.; Gilquin, B.; Roumestand, C.; Vita, C.; de Medeiros, C. L. C.; Rowan, E. G.; Harvey, A. L. y Menez, A.; On the convergent evolution of animal toxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 4302-4309.

Del Re, A. M.; Dopico, A. M. y Woodward, J. J.; Effects of the abused inhalant toluene on ethanol-sensitive potassium channels expressed in oocytes. *Brain Research* 2006, 1087: 75-82.

Drahl, C.; More than just pores. *Chemical and Engineering News*. 2008, 89: 34-35.

Drakopolou, E.; Vizzavona, J.; Neyton, J.; Aniot, V.; Bouet, F.; Virelizier, H.; Menez, A. y Vita, C.; Consequence of the removal of evolutionary conserved disulfide bridges on the structure and function of charybdotoxin and evidence that particular cysteine spacings govern specific disulfide bond formation. *Biochemistry*, 1998, 37: 1292-1301.

Duda, T. F. y Kohn, A. J.; Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Conus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 34: 257-272.

Escobar L.I.; Martínez-Téllez, J. C.; Salas, M.; Castilla, S. A.; Carrizosa, R.; Tapia, D.; Vázquez, M.; Bargas, J. y Bolívar, J. J.; A voltage-gated K⁺ current in renal inner medullary collecting duct cells. *American Journal Physiology Cell Physiology*, 2004, 286: C965-C974.

Estrada, G.; Villegas, E. y Corzo, G.; Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Natural Products Reports*, 2007, 24: 145-161.

Fan, C.; Chen, X.; Zhang, C.; Wang, L.; Duan, K.; He, L.; Cao, Y.; Liu, S.; Zhong, M.; Ulens, C.; Tytgat, J.; Chen, J.; Chi, C. y Zhou, Z.; A novel conotoxin from *Conus betulinus*, κ-BtX, unique in cysteine pattern and in function as a specific BK channel modulator. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 12624-12633.

Gao, Y. y García, M. L.; Interaction of agitoxin2, charybdotoxin and iberiotoxin with potassium channels: selectivity between voltage-gated and BK channels. ***PROTEINS: Structure, Function and Genetics***, 2003, 52: 146-154.

Gasparini, S.; Gilquin, B. y Menez, A.; Comparison of sea anemone and scorpion toxins binding to Kv1 channels: an example of convergent evolution. ***Toxicon***, 2004, 43: 901-908.

Gilquin, B., Braud, S.; Eriksson, M. A. L.; Roux, B.; Bailey, T. D.; Priest, B. T.; García, M. L.; Ménez, A. y Gasparini, S.; A variable residue in the pore of Kv1 channels is critical for the high affinity of blockers from sea anemones and scorpions. ***The Journal of Biological Chemistry***, 2005, 280: 27093-27102.

Gilquin, B.; Racapé, J.; Wrisch, A.; Visan, V.; Lecoq, A.; Grissmer, S.; Ménez, A. y Gasparini, S.; Structure of the BgK-Kv1.1 complex based on distance restraints identified by double mutant cycles. ***Journal of Biochemical Chemistry***, 2002, 277: 37406-37413.

Goldstein, S. A. N.; Bayliss, D. A.; Kim, D.; Lesage, F.; Plant, L. D. y Rajan, S.; International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. ***Pharmacological Reviews***, 2005, 57: 527-540.

Gutman, G. A.; Chandy, K. G.; Adelman J. P.; Aiyar, J.; Bayliss, D. A.; Clapham, D. E.; Covarrubias, M.; Desir, G. V.; Furuichi, K.; Ganetzky, B.; García, M. L.; Grissmer, S.; Jan, L. Y.; Karschin, A.; Kim, D.; Kuperschmidt, S.; Kurachi, Y.; Lazdunski, M.; Lesage, F.; Lester, H. A.; Mackinnon, D.; Nichols, C. G.; O'Kelly, I.; Robbins, J.; Robertson, G. A.; Rudy, B.; Sanguinetti, M.; Susumo, S.; Stuhmer, W.; Tamkun, M. M; Vandenberg, C. A.; Wei, A.; Wulff, H. y Wymore, R. S.; International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. ***Pharmacological Reviews***, 2003, 55: 583-586.

Gutman, G. A.; Chandy, K. G.; Grissmer, S.; Lazdunski, M.; Mackinnon, D.; Pardo, L. A.; Robertson, G. A.; Rudy, B.; Sanguinetti, M. C.; Stuhmer, W. y Wang, X.; International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. ***Pharmacological Reviews***, 2005, 57: 473-508.

Harvey, A. L.; Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. ***General Pharmacology***, 1997, 28: 7-12.

Hille, B.; Ionic channels of excitable membranes. ***Sinauer***, 2001, Sunderland Mass.; USA, Págs: 2-4, 13-18 y 131-160.

Hollecker, M.; Vincent, M.; Gally, J.; Ruyschaert, J. y Goormaghtigh, E.; Insight into the factors influencing the backbone dynamics of three homologous proteins, Dendrotoxins I and K, and BPIT: FTIR and time-Resolved Fluorescence investigations. *Biochemistry*, 2002, 41: 15267-15276.

Honma, T. y Shiomi, K.; Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects. *Marine Biotechnology*, 2006, 8: 1-10.

Imperial, J. S.; Bansal, P. S.; Alewood, P.F.; Dally, N. L.; Craik, D. J.; Sporning, A.; Terlau, H.; López-Vera, E.; Bandyopadhyay, P. K. y Olivera, B. M.; A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry*, 2006, 45: 8331-8340.

Jimenez, E. C.; Olivera, B. M. and Teichert, R. W.; α C-Conotoxin PrXA: a new family of nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonists. *Biochemistry*, 2007, 46: 8717-8724.

Judge, S. I. V.; Monteiro, M. J.; Yeh, J. Z. y Bever, C. T.; Inactivation gating and 4-AP sensitivity in human brain Kv1.4 potassium channel. *Brain research*, 1999, 831: 43-54.

Judge, S. I. V.; Yeh, J. Z.; Goolsby, J. E.; Monteiro, M. J. y Bever, C. T.; Determinants of 4-Aminopyridine sensitivity in a human brain Kv1.4 K⁺ channel: phenylalanine substitutions in leucine heptad repeat region stabilize channel closed state. *Molecular Pharmacology*, 2002, 61: 913-920.

Kaczorowski, G. J. y García, M. L.; Pharmacology of voltage-gated and calcium activated potassium channels. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999, 3: 448-458.

Kandel, E. C.; Schwartz, J. H. Y Jessel, T. M.; Principles of Neural Science, Fourth Edition. *Editorial McGraw-Hill*, 2000, USA, pp. 106-169.

Kaufenstein, S.; Huys, I.; Lamthanh, H.; Stöcklin, R.; Sotto, F.; Menez, A.; Tytgat, J. y Mebs, D.; A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. *Toxicon*, 2003, 42: 43-52.

Kimball, J. W.; Biología Cuarta Edición. *Editorial Addison-Wesley Iberoamericana*, 1986, E. U. A., pp.: 694-379.

Koschak, A.; Bugianesi, R. M.; Mitterdorfer, J.; Kaczorowski, G. J.; García, M. L. y Knaus, H.; Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by Hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom. ***The Journal of Biological Chemistry***, 1998, 273: 2639-2644.

Kubo, Y.; Adelman, J. P.; Clapham, D. E.; Jan, L. Y.; Karschin, A.; Kurachi, Y.; Lazdunski, M.; Nichols, C. G.; Seino, S. y Vandenberg, C. A.; International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channel. ***Pharmacological Reviews***, 2005, 57: 509-526.

Lee, J.; Lee, B.; Choi, S.; Yoon, I.; Pyo, M.; Shin, T.; Choi, W.; Lim, Y.; Rhim, H.; Won, K.; Lim, Y.; Choe, H.; Kim, D.; Kim, Y. y Nah, S.; Ginsenoside Rg3 inhibits human Kv1.4 channel currents by interacting with the Lys531 residue. ***Molecular Pharmacology***, 2008, 73: 619-626

Leung, Y. M.; Kwan, E. P.; Ng, B.; Kang, Y. y Gaisano, H. Y.; SNAREing voltage-gated K⁺ and ATP-sensitive K⁺ channels: Tuning β -cell excitability with Syntaxin-1A and other exocytotic proteins. ***Endocrine Reviews***, 2007, 28: 653-663.

Liu, H.; Danthi, S. J. y Enyeart, J. J.; Curcumin potently blocks Kv1.4 potassium channels. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, 2006, 344: 1161-1165.

Long, S. B.; Campbell, E. B. y Mackinnon, R.; Cristal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. ***Science***, 2005, 309: 897-903.

Lopez-Vera, E., Actividad biológica de péptidos de caracoles de la superfamilia Conoidea. 2005, ***Tesis UNAM***, Doctorado en Ciencias Biomédicas, pp.: 10-44.

López-Vera, E.; Aguilar, M. B.; Schiavon, E.; Marini, C.; Ortiz, E.; Restano-Cassulini, R.; Batista, C. V. F.; Possani, L. D.; Heimer de La Cotera, E. P.; Peri, F.; Becerril, B. y Wanke, E.; Novel α -conotoxins from *Conus spurius* and the α -conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. ***Federation of European Biochemical Societies Journal***, 2007, 274: 3972-3985.

Loughnan, M.; Nicke, A.; Jones, A.; Schroeder, C. I.; Nevin, S. T.; Adams, D. J.; Alewood, P. F. y Lewis, R. J.; Identification of a novel class of nicotinic receptor antagonist. ***The Journal of Biological Chemistry***, 2006, 281: 24745-24755.

Lu, L.; Montrose-Rafizadeh, C. y Guggino, W. B.; Ca²⁺-activated K⁺ channels from rabbit kidney medullary thick ascending limb cells expressed in *Xenopus laevis*. ***Journal of Biological Chemistry***, 1990, 265: 16190-16194.

Luna-Ramírez, K. S., Purificación y caracterización química y biológica de péptidos del veneno de *Conus spurius*. *Tesis UNAM*, Maestría en Ciencias (Química Marina), 2006, pp.: 15-44.

Luna-Ramírez, K. S.; Aguilar, M. B.; Falcón, A.; Heimer de la Cotera, E. P.; Olivera, B. M. y Maillo, M.; An O-conotoxin from the vermivorous *Conus spurius* active on mice and mollusks. *Peptides*, 2007, 28: 24-30.

Maillo, M.; Aguilar, M. B.; López-Vera, E.; Craig, A. G.; Bulaj, G.; Olivera, B. M. y Heimer de la Cotera, E. P.; Conorfamide, a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides. *Toxicon*, 2002, 40: 401-407.

Manganas, L. N. y Trimmer, J. S.; Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface expresión. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 29685-29693.

Marshall, J.; Kelley, W. P.; Rubakhin, S. S.; Bingham, J.; Sweedler, J. V. y Gilly, W. F.; Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus*. *Biological Bulletin*, 2002, 203: 27-41.

M'Barek, S.; Chagot, B.; Andreotti, N.; Visan, V.; Mansuelle, P.; Grissmer, S.; Marrakchi, M.; El Ayebe, M.; Sampieri, F.; Darbon, H.; Fajloun, Z.; De Waard, M. y Sabatier, J.; Increasing the molecular contacts between Maurotoxin and Kv1.2 channel augments ligand affinity. *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics*, 2005, 60: 401-411.

Miles, L. A.; Dy, C. Y.; Nielsen, J.; Barnham K. J.; Hinds, M. G.; Olivera, B. M.; Bulaj, G. y Norton, R. S.; Structure of a novel P-superfamily spasmodic conotoxin reveal an inhibitory cystine knot motif. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 43033-43040.

Mondal S., Vijayan R., Shichina K., Babu R. M., Ramakumar S.; I-superfamily conotoxins: sequence and structure analysis. *In Silico Biology*, 2005, 5: 557-571.

Monroy-Estrada, H.; Segura-Puertas, L.; Galván-Arzate, S.; Santamaría, A. y Sánchez-Rodríguez, J. The crude venom from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* induces haemolysis and slight peroxidative damage in rat and human erythrocytes. *Toxicology In Vitro*, 2007, 21: 398-402.

Mouhat, S.; Jouirou, B.; Mosbah, A., De Waard, M. y Sabatier, J.; Diversity of Folds in animal toxins acting on ion channels. *Journal of Biochemistry*, 2004a, 378: 717-726.

Mouhat, S.; Mosbah, A.; Visan, V.; Wulff, H.; Delepierre, M.; Darbon, H.; Grissmer, S.; De Waard, M. y Sabatier J.; The “functional” dyad of scorpion toxin Pi1 is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels. *Biochemical Journal*, 2004b, 377: 25-36.

Naranjo-Rodríguez, E. B.; Un interesante contenido farmacológico para sesiones experimentales. *UNAM*, 2002, pp.: 12-20.

O’Grady, S. M. y Lee, S. Y.; Molecular Diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2005, 37: 1578-1594.

Ogden, D. C.: Microelectrode techniques, the Plymouth workshop handbook 2nd edition. *Company of biologist*, 1994, Cambridge, UK.

Olivera, B. M. y Teichert, R. W.; Diversity on the neurotoxic *Conus* peptides. *Molecular Interventions*, 2007, 7: 251-260.

Olivera, B. M.; *Conus* peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 31173-31177.

Pastor, J.; Fundamentos biofísicos de la actividad neuronal. *Revista de Neurología*, 2000, 30: 741-755.

Patel, A. J. y Honoré, E.; Molecular physiology of oxygen-sensitive potassium channels. *European Respiratory Journal*, 2001, 18: 221-227.

Peng, C., Liu, L.; Shao, X.; Chi, C. y Wang, C.; Identification of a novel class of conotoxins defined as V-conotoxins with a unique cysteine pattern and signal peptide sequence. *Peptides*, 2008, 29: 985-991.

Peng, C.; Tang, S.; Pi, C.; Liu, J.; Wang, F.; Wang, L.; Zhou, W. y Xu, A.; Discovery of a novel class of conotoxin from *Conus literatus*, lt14a, with a unique cysteine pattern. *Peptides*, 2006, 27: 2174-2181.

Pennington, M. W.; Mahnir, V. M.; Krafte, D. S.; Zaydenberg, I.; Byrnes, M. E.; Khaytin, I.; Crowley, K. y Kem, W. R.; Identification of three separate binding sites on ShK Toxin, a potent inhibitor of voltage-dependent potassium channels in human T-lymphocytes and rat brain. *Biochemical and Biophysical research Communications*, 1996, 219: 696-701.

Rodríguez de la Vega, R. C. y Possani, L. D.; Current views of scorpion toxins specific for K⁺- channels. *Toxicon*, 2004, 43: 865-875.

Rodríguez de la Vega, R. C. y Possani, L. D.; Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*, 2005, 46: 831-844.

Rudy, Y. y Silva, J. R.; Computational biology in the study of cardiac ion channels and cell electrophysiology. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2006, 39: 57-116.

Santamaría, A.; Sánchez-Rodríguez, J.; Zugasti, A.; Martínez, A.; Galván-Arzate, S. y Segura Puertas, L. A venom extract from the sea anemone *Bartholomea annulata* produces haemolysis and lipid peroxidation in mouse erythrocytes. *Toxicology*, 2002, 173: 221-228.

Savarin, P.; Guenneugues, M.; Gilquin, B.; Lamthanh, H.; Gasparini, S.; Zinn-Justin, S. y Ménez, A.; Three-dimensional structure of k-conotoxin PVIIA, a novel potassium channel-blocking toxin from cone snails. *Biochemistry*, 1998, 37: 5407-5416.

Schroeder, N.; Mullmann, T. J.; Schmalhofer, W. A.; Gao, Y.; García, M. L. y Giangiacomo, K. M.; Glycine 30 in iberitoxin is a critical determinant of its specificity for BK versus Kv channels. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2002, 527: 298-302.

Sollod, B. L.; Wilson, D.; Zhaxybayeva, O.; Gogarten, J. P.; Drinkwater, R. y King, G. F.; Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides*, 2005, 26: 131-139.

Swartz, K. J.; Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon*, 2007, 49: 213-230.

Tamiya, T. y Fujimi, T. J.; Molecular evolution of toxin genes in Elapidae snakes. *Molecular Diversity*, 2006, 10: 529-543.

Taylor, J. D.; Kantor, Y. I. y Sysoev A. V.; Foregut anatomy, feeding mechanism, relationships and classification of the Conoidea (=Toxoglossa)(Gastropoda). *Bulletin Natural History Museum London (Zoology)*, 1993, 59: 125-170.

Terlau, H. y Olivera, B. M.; *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-target peptides. *Physiological Reviews*, 2004, 84: 41-68.

Terlau, H.; Boccaccio, A.; Olivera, B. M. y Conti, Franco; The block of *Shaker* K⁺ channels by k-conotoxin PVIIA is state dependent. *Journal of Genetic Physiology*, 1999, 114: 125-140.

Terlau, H.; Shon, K. J.; Grilley, M.; Stocker, M.; Stuhmer, W. y Olivera, B. M.; Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature*, 1996, 381: 148-151.

The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics laboratory techniques. *Axon Instruments, Inc.*, 1993, USA, pp.: 1-80.

Verdier, L.; Al-Sabi, A.; River, J. E. F.; Olivera, B. M.; Terlau, H. y Carlomagno, T.; Identification of a novel pharmacophore for peptide toxins interacting with K⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 21246-21255.

Wang, F.; Li, H.; Liu, M.; Song, H.; Han, H.; Wang, Q.; Yin, C.; Zhou, Y.; Qi, Z.; Shu, Y.; Lin, Z. y Jiang, T.; Structural and functional analysis of natrin, a venom protein that targets various ion channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 351: 443-448.

Wang, X.; Connor, M.; Smith, R.; Maciejewski, M. W.; Howden, M. E. H.; Nicholson, G. M.; Christie, M. J. y King, G. F.; Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge. *Nature Structural Biology*, 2000, 7: 505-513.

Watanabe, I.; Zhu, J.; Recio-Pinto, E. y Thornhill, W. B.; Glycosylation affects the protein stability and cell surface expression of Kv1.4 but not Kv1.1 potassium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 8879-8885.

Wei, A. D.; Gutman, G. A.; Aldrich, R.; Chandy, K. G.; Grissmer, S. y Wulff, H.; International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 2005, 57: 463-472.

www.conchologistofamerica.org. Página consultada en noviembre de 2008.

www.coneshell.net Página consultada en noviembre de 2008.

www.naturenotes.org/notes/dbiologia_mollusca.htm Página consultada en noviembre de 2008.

www.pescaderiascorunesas.es/productos/ecosisistemas_marinos.php Página consultada en noviembre de 2008.

www.uam.es/personal_pdi/medicina/algvilla/fundamentos/nervioso/nervioso.htm Página consultada en noviembre de 2008.

Yamazaki, Y.; Hyodo, F. y Morita, T.; Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: Isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 412: 133-141.

Yuan, D.; Liu, L.; Shao, X.; Peng, C.; Chi, C. y Guo, Z.; Isolation and cloning of a conotoxin with a novel cysteine pattern from *Conus characteristicus*. *Peptides*, 2008, 29: 1521-1525.

Zhu, J.; Gomez, B.; Watanabe, I. y Thornhill, W. B.; Amino acids in the pore region of Kv1 potassium channels dictate cell-surface protein level: a possible trafficking code in the Kv1 subfamily. *Journal of Biochemistry*, 2005, 388: 355-362.

Zhu, J.; Watanabe, I.; Gómez, B. y Thornhill, W. B.; Heteromeric Kv1 potassium channel expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 25558-25567.

Zhu, S.; Huys, I.; Dyason, K.; Verdonck, F. y Tytgat, J.; Evolutionary trace analysis of scorpion toxins specific for K-channels. *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics*, 2004, 54: 361-370.