



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**REVISIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DE CARACOL DEL GÉNERO  
*Conus* CON ACCIÓN EN RECEPTORES TIPO AMPA**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS  
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:  
Q.F.B. LUCÍA ARELLANO ROMERO

TUTOR: DR. ESTUARDO LÓPEZ VERA  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
DR. DANIEL REYES HARO, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
DR. LEOVIGILDO QUIJANO, INSTITUTO DE QUÍMICA  
DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ, FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D. F. JUNIO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



# Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México

## REVISIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DE CARACOL DEL GÉNERO *Conus* CON ACCIÓN EN RECEPTORES TIPO AMPA

### TESIS

que para obtener el grado académico de:

**Maestro en Ciencias  
(Biología marina)**

presenta:

**Q.F.B. LUCÍA ARELLANO ROMERO**

Director de tesis: DR. ESTUARDO LÓPEZ VERA  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología

Comité Tutor: DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ  
DR. DANIEL REYES HARO  
DR. LEOVIGILDO QUIJANO,  
DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ

México, D.F. 2014

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Becario No. 425396

Agradezco de manera especial al Dr. Arturo Ortega del Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV; por la donación de los plásmidos: GluR1 (GluR-K1, p59/2), GluR2 (pRB14) y GluR4 (pK46)

Este trabajo fue financiado en parte por CONACYT (153915), PAPIIT-DGAPA-UNAM (IN213808-3) y por el presupuesto del Laboratorio de Toxinología Marina del ICML-UNAM (615)

# ÍNDICE

| Contenido  | pág. |
|--|------|
| <b>ÍNDICE GENERAL</b>  | i    |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>   | iii  |
| <b>ÍNDICE DE CUADROS</b>   | iv   |
| <b>Abreviaturas</b>  | v    |
| <b>Resumen</b>   | vii  |
| <b>Abstract</b>  | ix   |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>   | 1    |
| <b>II. ANTECEDENTES</b>  | 3    |
| <b>1. CARACOLES MARINOS DEL GÉNERO <i>CONUS</i></b>                  | 3    |
| 1.1 Especies de <i>Conus</i> en costas mexicanas                     | 3    |
| 1.1.2 <i>Conus spurius</i>   | 4    |
| <b>2. TOXINAS</b>  | 5    |
| 2.1 Síntesis de toxinas  | 5    |
| 2.2 Modificaciones post-traduccionales                               | 7    |
| 2.3 Conotoxinas  | 9    |
| 2.3.1 Nomenclatura   | 9    |
| a) Actividad farmacológica conocida.                                 | 9    |
| b) Actividad farmacológica desconocida                               | 9    |
| 2.4 Conopéptidos   | 11   |
| 2.4.1 Conantokinas   | 13   |
| 2.5 Conotoxinas y la modulación de receptores AMPA                   | 17   |
| 2.5.1 Con-ikot-ikot  | 18   |
| <b>3. GLUTAMATO</b>  | 19   |
| 3.1 Síntesis del L-glutamato   | 20   |
| 3.2 Receptores de glutamato  | 21   |
| 3.2.1 Receptores metabotrópicos                                      | 21   |
| 3.2.2 Receptores ionotrópicos  | 22   |
| 3.3 Estructura molecular de los receptores ionotrópicos de glutamato | 23   |
| 3.3.1 Receptores NMDA  | 23   |
| 3.3.2 Receptores Kainato   | 23   |
| 3.3.3 Receptores AMPA  | 24   |
| a) Diversidad de receptores AMPA                                     | 25   |
| b) Modulación alostérica positiva de los receptores AMPA             | 28   |
| c) Bloqueadores del poro de receptores AMPA                          | 29   |
| d) Proteínas reguladoras de receptores AMPA                          | 29   |
| 3.4. Plasticidad sináptica y excitotoxicidad                         | 29   |
| <b>III. JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA</b>                                  | 33   |
| <b>IV. HIPÓTESIS</b>   | 33   |
| <b>V. OBJETIVO GENERAL</b>   | 33   |
| <b>VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>                                     | 33   |

## ÍNDICE GENERAL

| Contenido  | pág. |
|--|------|
| <b>VII. METODOLOGÍA</b>                          | 34   |
| 1. EXTRACCIÓN DEL VENENO                         | 34   |
| 2. FRACCIONAMIENTO DEL VENENO                    | 34   |
| 3. PROPAGACIÓN DE SUBUNIDADES DE RECEPTORES AMPA | 35   |
| 4. EXTRACCIÓN DE ARN-TOTAL                       | 35   |
| 5. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE RECEPTORES AMPA       | 35   |
| 6. EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA                 | 36   |
| <b>VIII. RESULTADOS</b>                          | 37   |
| 1. FRACCIONAMIENTO DE VENENO                     | 37   |
| 2. PROPAGACIÓN DE SUBUNIDADES DE RECEPTORES AMPA | 40   |
| 3. EXTRACCIÓN DE ARN-TOTAL                       | 43   |
| 4. EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA                 | 44   |
| <b>IX. DISCUSION</b>                             | 47   |
| 1. FRACCIONAMIENTO DE VENENO                     | 47   |
| 2. PROPAGACIÓN DE SUBUNIDADES DE RECEPTORES AMPA | 48   |
| 3. EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA                 | 51   |
| <b>X. CONCLUSIONES</b>                           | 54   |
| <b>XI. PERSPECTIVAS</b>                          | 55   |
| <b>XII. BIBLIOGRAFÍA</b>                         | 57   |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Contenido  | pág. |
|--|------|
| <b>Figura 1.</b> <i>Conus spurius</i>  | 4    |
| <b>Figura 2.</b> Precursor de conotoxinas  | 6    |
| <b>Figura 3.</b> Síntesis de conotoxinas   | 6    |
| <b>Figura 4.</b> Clasificación de conotoxinas  | 10   |
| <b>Figura 5.</b> Clasificación de conopéptidos   | 12   |
| <b>Figura 6.</b> Evaluación electrofisiológica del veneno de <i>C. striatus</i> en homómeros de GluR1 (flip)         | 18   |
| <b>Figura 7.</b> Secuencia de aminoácidos del precursor de la Con-ikot-ikot  | 19   |
| <b>Figura 8.</b> Síntesis de L-glutamato   | 21   |
| <b>Figura 9.</b> Receptor AMPA   | 25   |
| <b>Figura 10.</b> Diversidad en las subunidades de AMPAR   | 27   |
| <b>Figura 11.</b> Permeabilidad del Ca <sup>2+</sup> en la subunidad GluR2   | 27   |
| <b>Figura 12.</b> Perfil cromatográfico del extracto crudo del veneno de <i>C. spurius</i> (1).                      | 38   |
| <b>Figura 13.</b> Perfil cromatográfico del extracto crudo del veneno de <i>C. spurius</i> (2).                      | 39   |
| <b>Figura 14.</b> Electroforesis diferentes subunidades de receptores AMPA.  | 41   |
| <b>Figura 15.</b> Electroforesis de la subunidad GluR4.  | 42   |
| <b>Figura 16.</b> Electroforesis de ARN-total de hipocampo de rata.  | 44   |
| <b>Figura 17.</b> Evaluación electrofisiológica de los receptores AMPA y ARN-total en ovocitos de <i>X. laevis</i> . | 46   |
| <b>Figura18.</b> Fraccionamiento del extracto crudo del veneno de <i>C.spurius</i>                                   | 47   |
| <b>Figura 19.</b> Mapa de restricción del plásmido pBS SK(-)   | 50   |
| <b>Figura 20.</b> Características electrofisiológicas de GluR2(Q)flip  | 51   |
| <b>Figura 21.</b> Características electrofisiológicas de GluR1(Q)flip  | 52   |
| <b>Figura 22.</b> Porcentaje de identidad entre las diferentes subunidades de receptores iGluRs                      | 53   |

## ÍNDICE DE CUADROS

| <b>Contenido</b>  | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>Cuadro 1.</b> Modificaciones post-traduccionales encontradas en conotoxinas        | 8           |
| <b>Cuadro 2.</b> Secuencias primarias de diferentes conantokinas                      | 16          |
| <b>Cuadro 3.</b> Rendimiento de las GluRs.  | 40          |
| <b>Cuadro 4.</b> Rendimiento de la subunidad GluR4.                                   | 42          |
| <b>Cuadro 5.</b> Rendimiento de ARN-total de diferentes regiones del cerebro de rata. | 43          |
| <b>Cuadro 6.</b> Conotoxinas con potencial uso terapéutico                            | 55          |



## ABREVIATURAS

**aa** = aminoácidos  
**ACN** = acetonitrilo  
**ADN** = ácido desoxirribonucleico  
**AMPA** = ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico,  
**AMPAR** = receptor de de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico  
**ARN** = ácido ribonucleico  
**ARNasas** = Enzimas ribonucleasas  
**ATF** = ácido trifluoroacético  
**C\*** = residuo amino terminal con amidación  
**C^** = residuo carboxilo terminal sin amidación  
**°C** = grado centígrado  
**Ca<sup>2+</sup>** = ión calcio  
**CaCl<sub>2</sub>** = cloruro de calcio  
**cADN** = ácido desoxirribonucleico complementario  
**cARN** = ácido ribonucleico complementario  
**cm** = centímetro  
**Con-** = Conantokina  
**CTZ** = ciclotiazida  
**DNQX** = 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona  
**EC<sub>50</sub>** = dosis efectiva media  
**g** = gravedades  
**G** = glicina  
**GABAR** = receptor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico.  
**Gla o  $\gamma$**  =  $\gamma$ -carboxiglutamato  
**Glu** = L-Glutamato  
**GluRs** = Subunidades de receptor AMPA  
**cGMP** = Guanosín monofosfato cíclico  
**HEPES** = Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico  
**iGluRs** = Receptores ionotrópicos de glutamato  
**K<sup>+</sup>** = ión potasio  
**KA** = ácido kaínico  
**KAR** = receptores de ácido kaínico  
**KAs** = subunidades de receptores de KA  
**KCl** = cloruro de potasio  
**kDa** = Kilodaltos  
**LTP** = Potenciación a largo plazo  
**LTD** = depresión a largo plazo  
**m** = metro  
**M** = molusquívoro  
**mARN o poly(A)<sup>+</sup>** = ácido ribonucleico mensajero  
**mg** = miligramo

## ABREVIATURAS

**Mg<sup>2+</sup>** = ión magnesio  
**MgCl<sub>2</sub>** = cloruro de magnesio  
**mGluRs** = Receptores metabotrópicos de glutamato  
**min** = minuto  
**ml** = mililitro  
**mm** = milímetro  
**mM** = milimolar  
**ms** = milisegundo  
**mV** = milivoltio  
**N** = normalidad  
**nA** = nanoamperio  
**Na<sup>+</sup>** = ión sodio  
**NaCl** = cloruro de sodio  
**NaOH** = hidróxido de sodio  
**ng** = nanogramo  
**nl** = nanolitro  
**nm** = nanómetro  
**NMDA** = N-metil-D-Aspartato  
**NMDAR** = Receptor de N-metil-D-Aspartato.  
**NRs** = Subunidades de receptor NMDA  
**NTD** = extremo amino terminal  
**O** = 4-*trans*-hidroxiprolina  
**P** = piscívoro  
**PKA** = proteína quinasa A  
**PKC** = proteína quinasa C  
**pS** = picosiemens  
**Q** = glutamina  
**R** = arginina  
**s** = segundo  
**SNC** = Sistema Nervioso Central  
**T<sup>s</sup>** = treonina glicosilada  
**V** = vermívoro  
**W<sup>+</sup>** = bromotriptofano  
**Zn<sup>2+</sup>** = ión zinc  
**μm** = micrómetro  
**μM** = micromolar

## Resumen

Diversas investigaciones han demostrado que algunas toxinas encontradas en el veneno de diferentes organismos pueden utilizarse como herramientas farmacológicas en el estudio de alteraciones funcionales y estructurales de algunos receptores, canales iónicos y/o transportadores neuronales; por ejemplo, la toxina Con-ikot-ikot, purificada a partir del veneno del caracol marino *C. striatus*, posee la capacidad de bloquear la desensibilización de los receptores neuronales de glutamato tipo AMPA.

En el presente proyecto de investigación se propuso determinar y aislar las toxinas del veneno de la especie mexicana *C. spurius*; así como establecer su papel en la modulación de los receptores de glutamato tipo AMPA mediante la realización de ensayos electrofisiológicos con la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos.

La primera etapa del proyecto consistió en realizar un primer fraccionamiento del veneno de *C. spurius* por cromatografía de alta resolución en Fase Reversa, los componentes del veneno fueron recolectados de forma manual en seis fracciones. La primera con un tiempo de elusión de 20 min, 5 minutos después se obtuvo la segunda fracción. La tercera y cuarta fracciones del veneno registraron los picos más altos de absorción y presentaron tiempos de elusión aproximados de 35 y 42 minutos respectivamente. La quinta y sexta fracción eluyeron aproximadamente a los 55 y 65 minutos.

La segunda etapa del proyecto consistió en realizar la expresión heteróloga de los receptores AMPA en ovocitos de *X. laevis* se utilizaron los plásmidos de las subunidades: GluR1 (GluR-K1, p59/2), GluR2 (pRB14) y GluR4 (pK46) insertados en el vector pBS SK(-), a través de la microinyección de cARN de las diferentes plásmidos.

De manera alternativa se realizó la extracción de ARN-total del hipocampo de la rata, y se utilizó para realizar la expresión de los receptores AMPA en los ovocitos, sin embargo, la expresión de los receptores no resultó exitosa, debido al bajo contenido de ARN mensajero que codifica para los receptores AMPA.

Los principales problemas que imposibilitaron la expresión los receptores ionotrópicos de glutamato tipo AMPA, a través de plásmidos o de ARN-total de hipocampo fueron:

1. No realizar la linearización de los plásmidos de las diferentes subunidades.
2. El utilizar un promotor incorrecto para realizar la transcripción in vitro, el promotor T7 no es el adecuado.
3. No realizar la purificación del ARN-mensajero del ARN-total de hipocampo de rata.

Para obtener una expresión exitosa del mRNA, bien de los receptores AMPA clonados o del ARN-mensajero de hipocampo, se recomienda:

1. Realizar la linearización de los plásmidos de las diferentes subunidades con la enzima de restricción Xho I.
2. Utilizar el promotor T3 para realizar la transcripción *in vitro*.
3. Realizar la purificación del ARN-mensajero del ARN-total, utilizando kits comerciales de oligonucleótidos (dT).

El Comité Tutorial determinó realizar una revisión bibliográfica como alternativa viable para la titulación y obtención del grado de Maestría. En esta revisión se abordan los problemas que imposibilitaron una expresión exitosa del de los plásmidos de las subunidades de los receptores AMPA, así como del ARN-mensajero total del hipocampo de rata. Por último, se proponen alternativas y soluciones para corregir estos problemas, con el fin de obtener una expresión exitosa en el futuro.

## Abstract

Diverse scientific research has shown that some toxins found in the venom of different organisms can be used as pharmacological tools in the study of functional and structural alterations of some receptors, ion channels and/or neuronal transporter, for example: the purified Con-ikot-ikot toxin from the venom of marine snail *C. striatus* that specifically disrupts the desensitization of AMPA receptors.

In this research project it was proposed to determine the presence of Conotoxins from the venom of the *C. spurius*, isolate fractions of the venom and test their effect on AMPA receptors. For this purpose, the *Xenopus* oocytes were used as a heterologous expression system where mRNA of the following AMPA subunits were injected: GluR1 (GluR-K1, p59/2), GluR2 (pRB14) and GluR4 (pK46), all of them inserted in the pBS SK(-) vector. In parallel, injection of mRNA from rat hippocampus was also tested. Nevertheless, functional expression of AMPA receptors was not accomplished since no consistent electrophysiological recordings were obtained. The main problems identified for lack of expression of AMPA receptors using plasmids or RNA- messenger were:

1. Linearization of plasmids was not performed wrong selection of the promoter.
2. The T7 promotor was not the right one for transcription
3. Purification of the of the mRNA from the total RNA was not performed

In order to give continuity to this project the following recommendations should be considered for proper expression of AMPA receptors:

1. Linearization of plasmids should be performed with the restriction enzyme Xho I
2. The T3 promotor should be used for successful transcription
3. The purification of mRNA should be performed with a commercial isolation kit, oligo (dT).

In order to obtain the Master degree, the Tutorial Committee of this project recommended a bibliographic review where the student explains the failures and propose alternatives to correct them.

## I. INTRODUCCIÓN

Existe en la naturaleza una gran variedad de organismos terrestres y marinos que son productores de toxinas, las cuales exhiben un amplio rango de complejidad química; desde el simple ácido fórmico, sintetizado por hormigas, hasta proteínas de origen bacteriano conformadas por varios miles de aminoácidos. La diversidad de estas toxinas está impulsada por la presión evolutiva en la mejora de la caza y/o defensa de los organismos.

Las denominadas neurotoxinas han demostrado ser excelentes herramientas farmacológicas, que han ayudado al entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes al funcionamiento del sistema nervioso, así como en el estudio de las alteraciones funcionales y estructurales de receptores, canales iónicos y/o transportadores neuronales.

Dentro de las neurotoxinas se encuentran las producidas por los caracoles marinos del género *Conus*, denominadas "Conotoxinas". Por su naturaleza proteica, bajo peso molecular (<5 kDa), relativa facilidad de síntesis, estabilidad estructural y alta especificidad por sus blancos moleculares, han demostrado ser una rica fuente de compuestos con potencial uso terapéutico.

Así, la  $\omega$ -conotoxina MVIIA obtenida de la especie *Conus magus*, bloquea específicamente a canales de calcio tipo N, implicados en la percepción del dolor. A partir de ésta se elaboró el fármaco **Prialt**; nombre que recibe por ser el **primer** compuesto **alternativo** a la morfina; para el tratamiento del dolor crónico en pacientes con cáncer terminal y SIDA; esta conotoxina ha demostrado ser mil veces más potente que este alcaloide.

En México se han caracterizado de forma química alrededor de 13 conotoxinas (Flores, 2009), en los venenos de *Conus* de especies que habitan en aguas mexicanas. Sin embargo, no hay evidencia de conotoxinas que tengan como blanco molecular a los receptores de glutamato tipo AMPA, que están asociados con los procesos de aprendizaje y memoria. Por lo tanto en este proyecto de investigación el objetivo general era determinar si existen conotoxinas presentes en el veneno del caracol marino *Conus spurius* que modulen la actividad de los receptores glutamatérgicos tipo AMPA expresados en ovocitos de *Xenopus leavis*.

Para la determinación de los blancos moleculares y la actividad biológica de las conotoxinas es necesario realizar estudios electrofisiológicos. En este proyecto se utilizó la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos y empleando como sistema de expresión heteróloga los ovocitos de *X. laevis*. Para la expresión de los receptores se utilizaron los plásmidos de las subunidades: GluR1 (GluR-K1, p59/2), GluR2 (pRB14) y GluR4 (pK46) insertados en el vector pBS SK(-); también se utilizó ARN-total de hipocampo de rata.

A pesar de diversos intentos no se logró la expresión heteróloga de los receptores AMPA a través de los plásmidos ni de ARN-total de hipocampo de rata, por lo que no fue posible determinar si las conotoxinas aisladas del veneno de *C. spurius* modulan a los receptores AMPA.

Por lo tanto el comité tutorial del proyecto propuso la elaboración de una revisión bibliográfica, que proponga alternativas experimentales que permitan, a futuro, comprobar la hipótesis de este proyecto investigación, así como generar un documento que me permita obtener el grado de Maestro en Ciencias.

## II. ANTECEDENTES

### 1. CARACOLES MARINOS DEL GÉNERO *CONUS*

Los caracoles marinos del género *Conus*, pertenecen a la familia Conidae y, junto con otras familias, entre ellas Turridae y Terebridae, constituyen el suborden Toxoglossa, que se caracterizan por poseer un aparato de veneno bien definido (Meyer, 2001). Los caracoles de las especies *Conus* sintetizan un veneno que utilizan en la captura de sus presas y como mecanismo de defensa, en contra de sus depredadores (Terlau y Olivera, 2004).

Estos caracoles son depredadores carnívoros y existen alrededor de 500 a 700 especies distribuidas en diferentes ambientes marinos tropicales; de este número aproximadamente el 60% habitan la región del océano Indo-Pacífico; de acuerdo a su alimentación se pueden clasificar en (Terlau y Olivera, 2004):

- Piscívoros: Se alimentan de peces
- Molusquívoros: Se alimentan de moluscos
- Vermívoros: Se alimentan de gusanos, (poliquetos, uroideos y hemicordados (Terlau y Olivera, 2004).

#### 1.1 Especies de *Conus* en costas mexicanas

En México se encuentran distribuidas alrededor de 50 especies de caracoles *Conus*, en las llamadas provincias Panámica (costa del océano Pacífico) y Caribeña (costas del Golfo de México y Mar Caribe); sin embargo son pocos los estudios relacionados con aspectos ecológicos de estas especies, como son: distribución, abundancia, y en general, interacción con el ambiente (Flores Torres, 2009).

En la provincia Panámica se han identificado las especies: *C. brunneus*, *C. princeps*, *C. nux*, *C. purpurascens*, *C. archon*, *C. arcuatus*, *C. dalli*, *C. poormani*, *C. patricius*, *C. perplexus*, *C. regularis*, *C. scalaris*, *C. tornatus*, *C. virgatus* y *C. vittatus*; en la provincia caribeña se distribuyen las especies: *C. spurius*, *C. delessertii*, *C. austini*, *C. stimpsoni*, *C. mazei*, *C. villepini*, *C. armiger*, *C. sennottorum*, *C. floridanus*, *C. regius*, *C. granulatus*, *C. daucus* y *C. mus* (Flores Torres, 2009).

Los especies de *Conus* habitan en diferentes ambientes marinos como fondos rocosos (*C. brunneus*), lodosos (*C. armiger*) y arenosos (*C. purpurascens*);



así como en arrecifes coralinos (*C. nux*), desde zonas intermareales (*C. californicus*), aguas someras (*C. princeps*, < 25 m) y en aguas profundas (*C. delesserti*, 50-100 m; y *C. mazei*, >400 m). La mayoría de las especies son vermívoras, pero algunas como *C. purpurascens* y *C. ermineus* son piscívoras; *C. dalli* es molusquívora y se han identificado especies generalistas como *C. californicus* (Flores Torres, 2009).

### 1.1.2 *Conus spurius*

La especie vermívora *Conus spurius* fue descrita por Clench (Figura 1) en 1942. Se distribuye en las costas del Golfo de México y Florida, en zonas someras y arrecifes de coral. Su concha llega a medir entre 5 y 8 cm, es de superficie lisa y de color blanco, y presenta numerosas manchas de color anaranjado (Animal Diversity Web, University of Michigan Museum of Zoology. <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/index.html>).



**Figura 1.** *Conus spurius*  
(<http://www.jaxshells.org/spur.htm>).

## 2. TOXINAS

El veneno de los caracoles *Conus* es un fluido lechoso constituido por alrededor 100 a 200 péptidos, con un tamaño de entre 12 a 30 aminoácidos (aa) y estructuralmente compactos (Terlau y Olivera, 2004). Estos péptidos se dividen en dos clases: en aquellos que presentan múltiples enlaces disulfuro llamados “conotoxinas” y aquellos que solo presentan un enlace disulfuro o ninguno llamados “conopeptidos” (Halai y Craik, 2009).

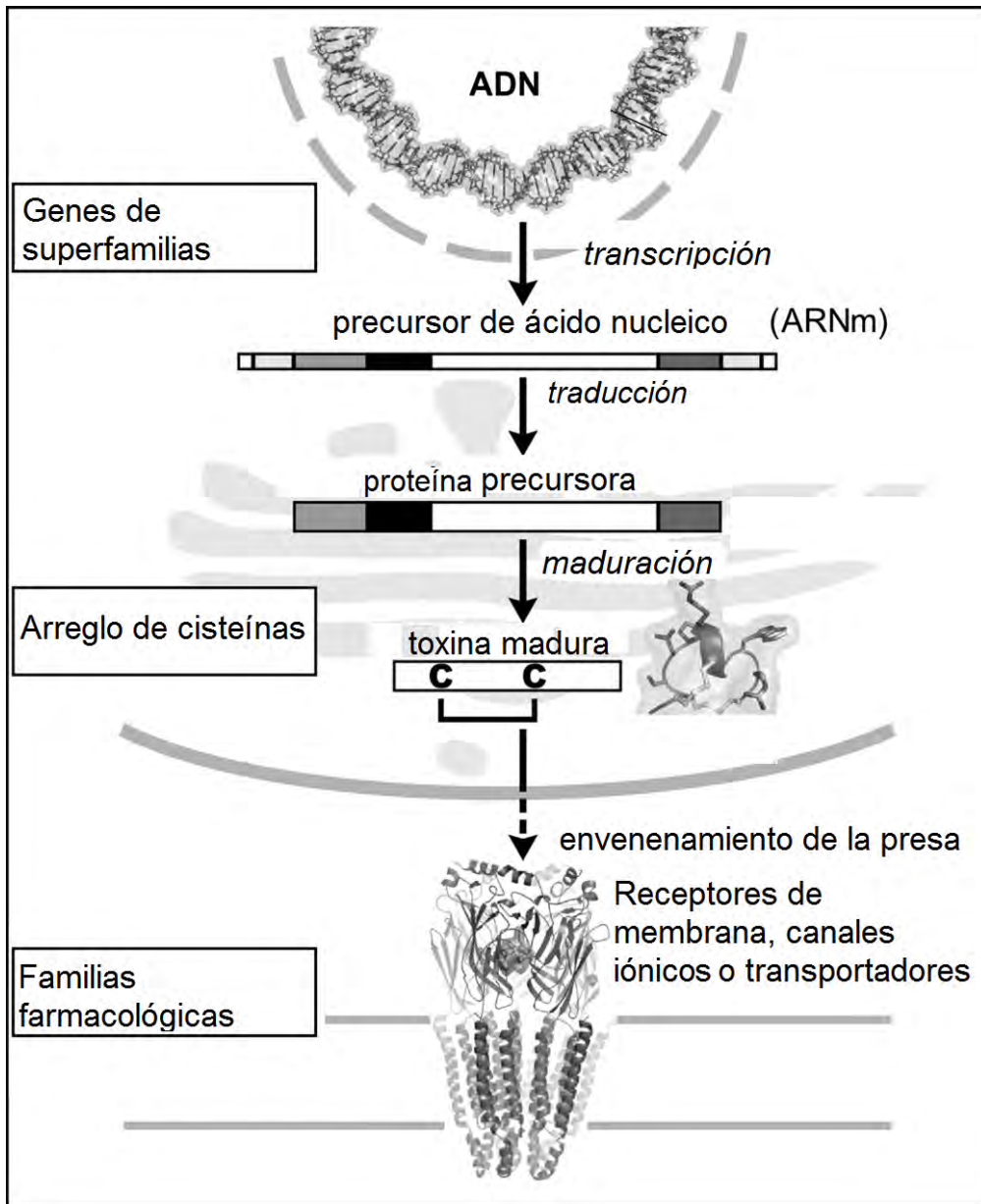
### 2.1 Síntesis de toxinas

Las toxinas de los venenos de los caracoles *Conus* son sintetizadas inicialmente en forma de precursores (“prepropéptidos”) (Figura 2) a través del mecanismo ribosomal convencional (Figura 3); estos precursores tienen alrededor de 70 a 120 aa en su estructura (Figura 2) (Olivera y Cruz, 2001). La organización de los prepropéptidos consiste en una secuencia señal típica, en el extremo amino (la región “pre” de 20 a 25 aa), seguida de la región intermedia denominada “pro” de 30 a 60 aa y finalmente se encuentra la región de la toxina madura en el extremo carboxilo, de 8 a 40 aa (Olivera, 2006).

La región “pre” tiene como función dirigir al precursor en su camino a la secreción y es ampliamente conservada entre diversas toxinas, lo que permite agruparlas en superfamilias génicas. La región “pro” está asociado a las modificaciones post-traduccionales presentes en las toxinas. Finalmente, la región de la toxina madura, que es el componente biológicamente activo del veneno, presenta un arreglo de residuos de cisteínas que es ampliamente conservado, mientras que los aminoácidos intercisteínas presentan una variabilidad de hasta un 70%. El corte proteolítico del prepropéptido es un paso obligatorio para la maduración de la toxina (Figura 3) (Conticello y cols., 2003; Kaas y cols., 2010).



**Figura 2.** Precursor de conotoxinas  
(<http://www.conoserver.org/?page=classification&type=genesuperfamilies>).



**Figura 3.** Síntesis de conotoxinas (Modificado de Kaas y cols., 2010)

## 2.2 Modificaciones post-traduccionales

Una de las características más sorprendentes de las toxinas del veneno de los caracoles *Conus* es la alta frecuencia de modificaciones post-traduccionales que presentan en su estructura (Cuadro 1), las cuales se han asociado a una mejora de la eficiencia funcional y/o especificidad de los péptidos en las que se encuentran, así como en su correcto plegamiento (Buczek y cols., 2005).

La distribución de las modificaciones post-traduccionales en los diferentes grupos de toxinas del veneno de *Conus* no es uniforme, ya que algunas toxinas no presentan ninguna modificación mientras que en otras se presentan varios tipos; por ejemplo: la toxina tx5a ( $\gamma$ CC $\gamma$ DGW<sup>+</sup>CCT<sup>S</sup>AAO), en el cual se identifican las siguientes modificaciones:  $\gamma$ -carboxilación de glutamato, bromación del triptófano, O-glicosilación de treonina e hidroxilación de prolina ( $\gamma$  =  $\gamma$ -carboxiglutamato, W<sup>+</sup> = bromotriptófano, T<sup>S</sup> = treonina glicosilada, O = 4-hidroxiprolina) (Walker y cols., 1999).

**Cuadro1.** Modificaciones post-traduccionales encontradas en conotoxinas (Buczek y cols., 2005).

| <b>Modificación</b>             | <b>Aminoácido modificado</b>              | <b>Enzima</b>  | <b>Aminoácido resultante</b>                                    | <b>Función</b>                                     |
|---------------------------------|---|--|---|--|
| Hidroxilación                   | Prolina, Valina, Lisina                   | Prolina hidroxilasa, D-aminoácido hidroxilasa, Lisil hidroxilasa | 4-trans-hidroxi prolina, $\gamma$ -hidroxivalina, 5-hidroxisina | Plegamiento oxidativo<br>Activación biológica      |
| Carboxilación                   | Ácido glutámico                           | $\gamma$ -Glutamylcarboxilasa                                    | $\gamma$ -Carboxiglutamato                                      | Plegamiento oxidativo en presencia de calcio       |
| Bromación                       | Triptófano                                | Bromoperoxidasa  | Bromotriptofano   |  |
| Epimerización                   | Triptófano, Fenilalanina, Leucina, Valina | Epimerasa  | D-triptófano, D-fenilalanina, D-leucina, D-valina               | Activación biológica                               |
| Ciclización                     | Glutamina                                 | Glutamylciclasa  | Piroglutamato   |  |
| Sulfatación                     | Tirosina                                  | Tirosilsulfotransferasa  | Sulfotirosina   |  |
| O-glicosilación                 | Serina, Treonina                          | Polipéptido HexNacTransferasa                                    | Serina glicosilada, Treonina glicosilada                        | Estabilización y activación biológica              |
| Procesamiento proteolítico      |   | Carboxipeptidasa Tex31   |   | Maduración de la toxina bioactiva                  |
| Formación de puentes disulfuro  | Cisteína                                  | Disulfuro isomerasa  |   | Formación de la estructura de la toxina bioactiva. |
| Amidación del extremo carboxilo |   | Aminoácido mono oxigenasa  |   |  |

## 2.3 Conotoxinas

En el grupo de péptidos denominados “Conotoxinas”, los residuos de cisteína permiten la formación de puentes disulfuro, que parecen ser ampliamente conservados a lo largo de la evolución del género, mientras que los aminoácidos intercisteínas restantes presentan una variabilidad de alrededor de 70%. Los blancos moleculares de las conotoxinas y su efecto sobre ellos han permitido clasificarlas en familias farmacológicas (Figura 4), y a su vez cada familia farmacológica puede pertenecer a distintas superfamilias genéticas; éstas últimas se definen en base a la secuencia señal a nivel del precursor. Por ejemplo, dentro de la superfamilia O se agrupan las  $\omega$  y  $\kappa$  conotoxinas cuyos blancos moleculares son canales de Calcio y Potasio, respectivamente (Halai y Craik, 2009; Terlau y Olivera, 2004).

### 2.3.1 Nomenclatura

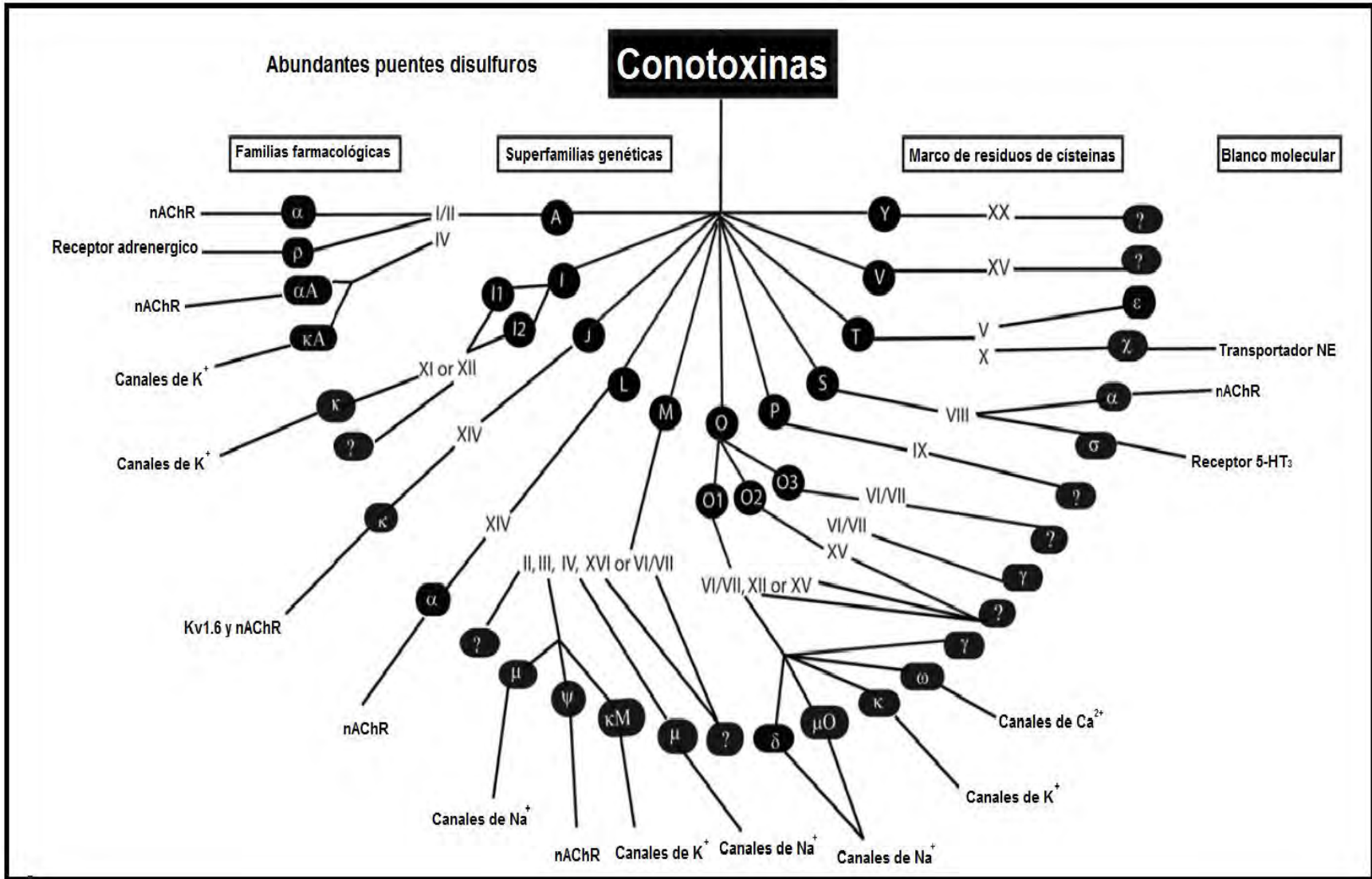
Un criterio para designar el nombre a las Conotoxinas está relacionado con el conocimiento de la actividad farmacológica del péptido; mientras que un segundo criterio es utilizado cuando se desconoce la actividad farmacológica de la toxina. (Gray y cols., 1988).

#### a) Actividad farmacológica conocida.

Se asigna una letra griega para designar la función farmacológica de la toxina, seguida por un guión y de la palabra “conotoxina”; posteriormente se asigna una o dos letras (la primera o única mayúscula y la segunda minúscula) para indicar la especie *Conus* de la que se caracterizó, además de un número romano para indicar el patrón de residuos de cisteína y finalmente una letra mayúscula para indicar la variante específica del péptido. Por ejemplo, de la  $\omega$ -conotoxina GVIA extraída del *C. geographus*, la “ $\omega$ ” indica que bloquea los canales de calcio, la “G” indica el nombre de la especie, el número VI el patrón de residuos de cisteína; y la A indica la variante del péptido.

#### b) Actividad farmacológica desconocida.

Se asignan una o dos letras minúsculas para designar la especie de la que se caracterizó la toxina, un número arábigo para designar el patrón de residuos de cisteínas y una letra minúscula para indicar una variante en particular. Por ejemplo, de la conotoxina tx5a obtenida del *C. textile*, las letras “tx” indican la especie, el número “5” indica el patrón de cisteínas y la letra “a” indica una variante del péptido.



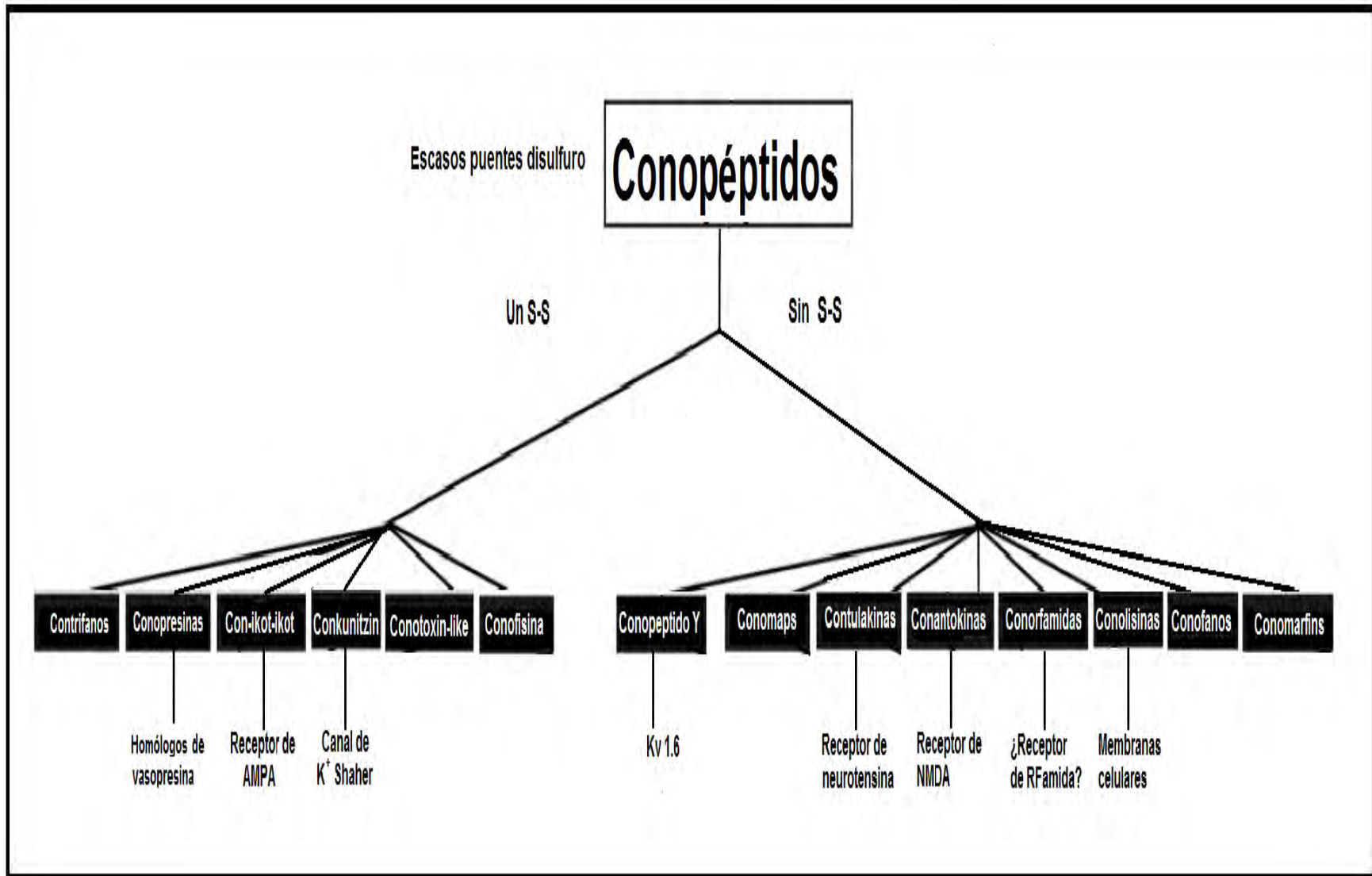
**Figura 4.** Clasificación de conotoxinas (Modificado de Halai y Craik, 2009).

## 2.4 Conopéptidos

A diferencia de las conotoxinas, los conopéptidos solo presentan en su estructura un par de residuos de cisteínas o ninguno (Figura 5). Los conopéptidos son nombrados, en general, por el efecto que producen cuando son inyectados directamente en el cerebro de ratones, seguido de un guión y de una o dos letras para designar la especie de la cual fueron caracterizados. Un ejemplo de éstos, son las Conantokinas. La palabra “Conantokina” se deriva del vocablo filipino, *antokin*—que significa sueño—, ya que cuando estos péptidos son inyectados directamente en el cerebro de ratones jóvenes les producen un efecto de somnolencia (Olivera y Cruz, 2001).

Otro criterio para nombrar a los conopéptidos es por la homología que presentan con algunas proteínas de vertebrados; en este caso se escribe el nombre del péptido de vertebrados seguido de un guión y de una o dos letras para designar la especie de la cual fueron caracterizados, por ejemplo: el péptido CPY-PI1 purificado del veneno de *C. planorbis*, representa un nuevo grupo de conopéptidos denominado “Conopéptidos Y (CPY)”, que presentan un alto contenido de residuos de tirosinas (Tyr) en su secuencia, al igual que el neuropéptido Y presente en vertebrados (Imperial y cols., 2008).





**Figura 5.** Clasificación de conopeptidos (Modificado de Halai y Craik, 2009).

### 2.4.1 Conantokinas

Las Conantokinas es la única familia de las toxinas purificadas de los venenos de los caracoles *Conus sp.*, que inhiben la función de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) (Layer y cols., 2004). El papel que juegan las Conantokinas como estrategia de envenenamiento en la caza de peces, aun no es clara; sin embargo se ha demostrado que interactúan con las neuronas glutamatérgicas de los circuitos sensoriales periféricos de peces. En el Cuadro 2, se muestra que las Conantokinas son péptidos de alrededor de 17 a 27 aa, presentan una alta identidad en sus primeros cuatro aminoácidos, el C-terminal presenta amidación y contienen entre 4 y 5 residuos del aminoácido modificado  $\gamma$ -carboxiglutamato (Gla o  $\gamma$ ) (Lewis y cols., 2012).

Desde el descubrimiento y síntesis de la Conantokina-G (Con-G) se han realizados diversos estudios *in vivo*, con el objetivo de conocer los efectos antagonistas de las Conantokinas sobre los receptores NMDA (McIntosh y cols., 1984).

En células granulares obtenidas de cerebelo de ratón la Conantokina-G inhibe la neurotoxicidad por glutamato (Glu), el aumento del calcio intracelular y la acumulación de cGMP (guanosín monofosfato cíclico) inducidos por NMDA. En rebanadas de cerebelo de ratas la Conantokina-G inhibe el aumento de cGMP por NMDA y en ensayos electrofisiológicos inhibe las corrientes inducidas por NMDA en ovocitos de *X. laevis* inyectados con mARN (ácido desoxirribonucleico mensajero) de cerebro de ratón (Layer y cols., 2004).

En neuronas corticales de ratón, las Con-G y Con-R inhibieron completamente las corrientes inducidas por NMDA, pero no así las inducidas por el ácido kaínico (KA, agonista de receptores AMPA y KA) o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, agonista del receptor GABA<sub>A</sub>), mientras que la Con-R no inhibe las corrientes inducidas por Glu o KA en homómeros de receptores AMPA y de KA en ovocitos de *X. laevis* (Layer y cols., 2004).

Es importante señalar que las Conantokinas modulan a diferentes subpoblaciones de receptores NMDA; el primer indicativo de esto es la inducción de un estado de somnolencia en ratones jóvenes (10-13 días post-natales) y de

hiperactividad en ratones adultos (más de 32 días post-natales) cuando se inyectan directamente en el cerebro de los ratones las Con-G y Con-T. Al igual que la feniletanolamina, antagonista selectivo de receptores NMDA (ifenidropil), la Con-G ha demostrado bloquear selectivamente a los receptores NMDA que presenten la subunidad NR2B, permitiendo diferenciar entre las subunidades que conforman a los receptores. Recientemente la Con-G y el CI-1041 (análogo del ifendropil) demostraron inhibir las corrientes excitatorias pot-sinápticas de receptores NMDA en rebanadas de la zona CA1 del hipocampo de animales jóvenes (4-6 días post-natales), mientras que sólo la Con-G disminuyó las corrientes excitatorias post-sinápticas en rebanadas de animales adultos (Layer y cols., 2004).

Con el objetivo de determinar la interacción entre las Conantokinas y los receptores NMDA se han realizado estudios utilizando radioligandos, demostrando que la Con-G no inhibe la unión del [3H] ácido 5,7-dicloroquinurénico (antagonista del sitio de unión de la glicina) o del [3H] ifendropil, resultados que son complementados al determinar que la Con-G tampoco inhibe la unión del [3H]CGP-39653 (antagonista competitivo de NMDA) o del glutamato [3H]MK-801; por lo tanto, las Conantokinas se han clasificado como antagonistas no-competitivos de los receptores NMDA (Zhou y cols., 1996).

A diferencia de la mayoría de las conotoxinas que presentan varios enlaces disulfuro en sus estructuras proporcionándoles estabilidad, las Conantokinas se caracterizan por la presencia de 4 a 5 residuos de Gla, necesarios para su actividad biológica; estos residuos permiten que los péptidos adopten una conformación  $\alpha$ -helicoidal en presencia de cationes divalentes y les proporcionan resistencia a la degradación por peptidasas endógenas (Rigby y cols., 1997).

La Con-R contiene dos residuos de cisteínas en las posiciones 21 y 25 que forman un enlace disulfuro entre sí; sin embargo, la función de éste no es claro, ya que estudios un análogo de la Con-R que carece del enlace, inhibió las corrientes inducidas por NMDA en células HEK 293 en las que se expresaron receptores de NMDA. La funcionalidad de las Conantokinas en estudios realizados *in vitro* está asociada con los residuos Glu (posición 2), Gla (posición 4) y un aminoácido hidrofóbico en la posición 12. El residuo presente en la posición 5 parece determinar la selectividad sobre subtipos de receptores NMDA (Layer y cols., 2004).

Las Conatokinas al igual que otros antagonistas de los receptores NMDA, han demostrado tener un índice terapéutico favorable en el tratamiento de diversos trastornos neurológicos incluyendo: el dolor crónico, la epilepsia y los trastornos neurodegenerativos de Alzheimer y Parkinson (Layer y cols., 2004).

La Conantokina-G y la Conantokina-T son potentes anticonvulsivos y antinociceptivos. En contraste, la Conantokina-G es eficaz en modelos anti-parkinsonianos mientras que la conantokina-T no lo es. Sin embargo, la potencial selectividad farmacológica de las Conantokinas, junto con su eficacia *in vivo* y perfiles de seguridad favorables, indican que estos péptidos representan una clase importante de compuestos para la evaluación como agentes terapéuticos en humanos (Layer y cols., 2004).

**Cuadro 2.** Secuencias primarias de diferentes Conantokinas.

| Conantokina | Especie                        | Secuencia primaria   | Selectividad          | Autor                  |
|-------------|--------------------------------|--|-----------------------|------------------------|
| Con-G       | <i>C. geographus</i> (P)       | GE $\gamma\gamma$ LQ $\gamma$ NQ $\gamma$ LIR $\gamma$ KSN*              | NR2B>NR2C, NR2D       | McIntosh y cols., 1984 |
| Con-T       | <i>C. tulipa</i> (P)           | GE $\gamma\gamma$ YQKML $\gamma$ NLR $\gamma$ AEVKKNA*                   | NR2B, NR2A            | Haack y cols., 1990    |
| Con-R       | <i>C. radiatus</i> (P)         | GE $\gamma\gamma$ VAKMAA $\gamma$ LAR $\gamma$ NIAKGCKVNCYP <sup>^</sup> | NR2B, NR2A            | White y cols., 2000    |
| Con-L       | <i>C. lynceus</i> (V)          | GE $\gamma\gamma$ VAKMAA $\gamma$ LAR $\gamma$ DAVN*                     | ND                    | Jiménez y cols., 2002  |
| Con-Ca2     | <i>C. characteristicus</i> (V) | GY $\gamma\gamma$ R $\gamma$ IA $\gamma$ TVR $\gamma$ LEEA               | ND                    | Franco y cols., 2006   |
| Con- Gm     | <i>C. gloriamaris</i> (M)      | GAK $\gamma$ RNNA $\gamma$ AVR $\gamma$ RLEEI                            | ND                    | Franco y cols., 2006   |
| Con-Oc      | <i>C. orchroleucus</i> (V)     | GE $\gamma\gamma$ RKAMA $\gamma$ LEAKKAQ $\gamma$ ALKA                   | ND                    | Franco y cols., 2006   |
| Con-Qu      | <i>C. quercinus</i> (V)        | GY $\gamma\gamma$ R $\gamma$ VA $\gamma$ TVR $\gamma$ LDAA               | ND                    | Franco y cols., 2006   |
| Con-Pr1     | <i>C. parius</i> (P)           | GED $\gamma\gamma$ YA $\gamma$ GIR $\gamma$ YQLIHGKI <sup>^</sup>        | NR2B, NR2D            | Teichert y cols., 2007 |
| Con-Pr2     |                                | DEO $\gamma$ YA $\gamma$ AIR $\gamma$ YQLKYGKI <sup>^</sup>              | NR2B>NR2D             |                        |
| Con-Pr3     |                                | GEO $\gamma$ VAKWA $\gamma$ GLR $\gamma$ KAASN*                          | NR2B, NR2D            |                        |
| Con-P       | <i>C. purpurascens</i> (P)     | GE $\gamma\gamma$ HSKYQ $\gamma$ CLR $\gamma$ IRVNKVQQ $\gamma$ C*       | NR2B, NR2A            | Gowd y cols., 2008     |
| Con-E       | <i>C. ermineus</i> (P)         | GE $\gamma\gamma$ HSKYQ $\gamma$ CLR $\gamma$ IRVNNVQQ $\gamma$ C        | ND                    |                        |
| Con-Br      | <i>C. bretteinghami</i> (P)    | GD $\gamma\gamma$ YSKFI $\gamma$ RER $\gamma$ AGRLDLSKFP                 | NR2B, NR2D, NR2A>NR2C | Twede y cols., 2009    |

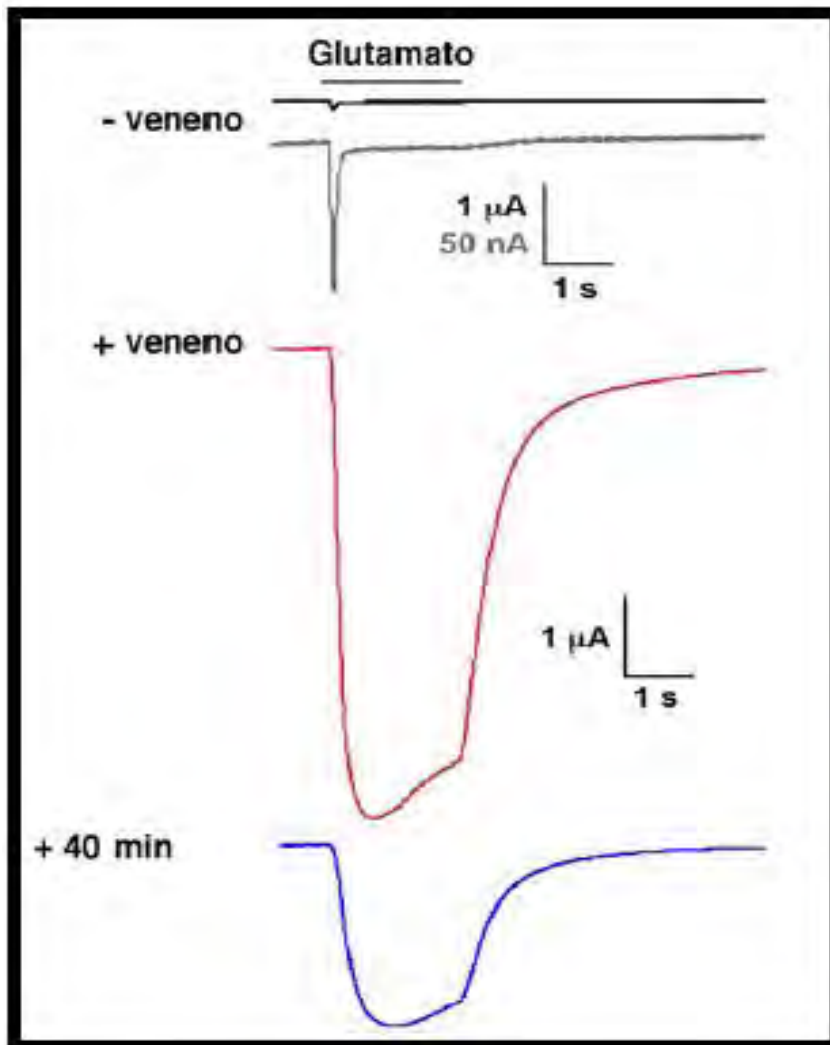
NR, subunidades de receptor NMDA; P, piscívoro; M, molusquívoro; V, vermívoro; O, 4-*trans*-hidroxiprolina;  $\gamma$ ,  $\gamma$ -carboxiglutamato; \*, amidación del residuo C-terminal; <sup>^</sup>, extremo C-terminal libre; ND, no determinado.

## 2.5 Conotoxinas y la modulación de receptores AMPA

En la constante búsqueda de nuevas Conotoxinas que pueden desempeñar un efecto modulador en diferentes blancos moleculares, Walker y colaboradores en 2009, purificaron y evaluaron electrofisiológicamente una nueva toxina del veneno de *Conus striatus*, que modula selectivamente a los receptores ionotrópicos de glutamato tipo AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico, AMPAR) (Walker y cols., 2009).

Para determinar el efecto modulador del veneno de *C. striatus* sobre los receptores AMPA, realizaron la expresión heteróloga de éstos, en ovocitos de *X. laevis*, inyectando 10 ng de cARN de plásmido de las diferentes subunidades: GluR1 (tanto en sus isoformas flip y flop), GluR2, GluR3 y GluR4. Realizaron la evaluación electrofisiológica del veneno, empleando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos a -70 mV, y una solución electrofisiológica, cuyo contenido en concentración (mM) era: 96.0 NaCl, 2.0 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 5.0 HEPES, pH a 7.1-7.7. Las corrientes se generaron con pulsos de 5 s de 1 mM Glu y 150  $\mu$ M ácido kaínico (Walker y cols., 2009).

Los registros electrofisiológicos que realizaron Walker y colaboradores en 2009 en homómeros GluR1 (flip), reportaron corrientes de ~ 80 nA (gris) (Figura 6). En color rojo se observa un aumento en la amplitud de corriente al aplicar 1 mM, esto debido a que se incubaron previamente los ovocitos en el veneno de *C. striatus*, efecto que persistió después de 40 min de la aplicación del veneno (azul).



**Figura 6.** Evaluación electrofisiológica del veneno de *C. striatus* en homómeros de GluR1 (flip) (Modificado de Walker y cols., 2009).

### 2.5.1 Con-ikot-ikot

La toxina purificada por Walker y colaboradores en 2009 recibió el nombre de “Con-ikot-ikot”, que deriva del vocablo filipino *ikot-ikot* -que significa dando vuelta o dar la vuelta- en referencia al fenotipo de natación observado en los peces inyectados con esta toxina, la cual inhibe la desensibilización de los receptores AMPA.

El precursor de la Con-ikot-ikot (Figura 7) consta de 123 aa, divididos en tres regiones: 18 en la región “pre”, 19 correspondiente a la región “pro” y 86 que comprenden a la toxina madura; esta última es la responsable de la modulación sobre los receptores AMPA y contiene en su estructura 13 residuos de cisteínas (Walker cols., 2009).



**Figura 7.** Secuencia de aminoácidos del precursor de la Con-ikot-ikot. En la parte superior en letras negras solo se ilustra la disposición de los residuos de cisteína (Walker cols., 2009).

La estequiometría propuesta para la Con-ikot-ikot es un dímero de dímeros, lo que sugiere que actúa manteniendo abierto el poro del canal, actuando en un sitio diferente al de la ciclotiazida (CTZ), compuesto utilizado para inhibir la desensibilización de los receptores AMPA y para la inhibición de los receptores de GABA (Ácido  $\gamma$ -aminobutírico, GABAR). La aplicación de la Con-ikot-ikot en rebanadas de hipocampo mostró un largo y rápido incremento de corriente llevando a las neuronas a una muerte celular (Walker y cols., 2009).

### 3. GLUTAMATO

El L-Glutamato (Glu) es el principal aminoácido neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (SNC) de vertebrados. La primera evidencia de que el Glu podía actuar como un agente excitador se remonta a los años 50 cuando se demostró que una inyección directa de glutamato monosódico en el cerebro de ratones y en corteza cerebral producía despolarización celular masiva (Verkhatsky y Kirchhoff, 2007).

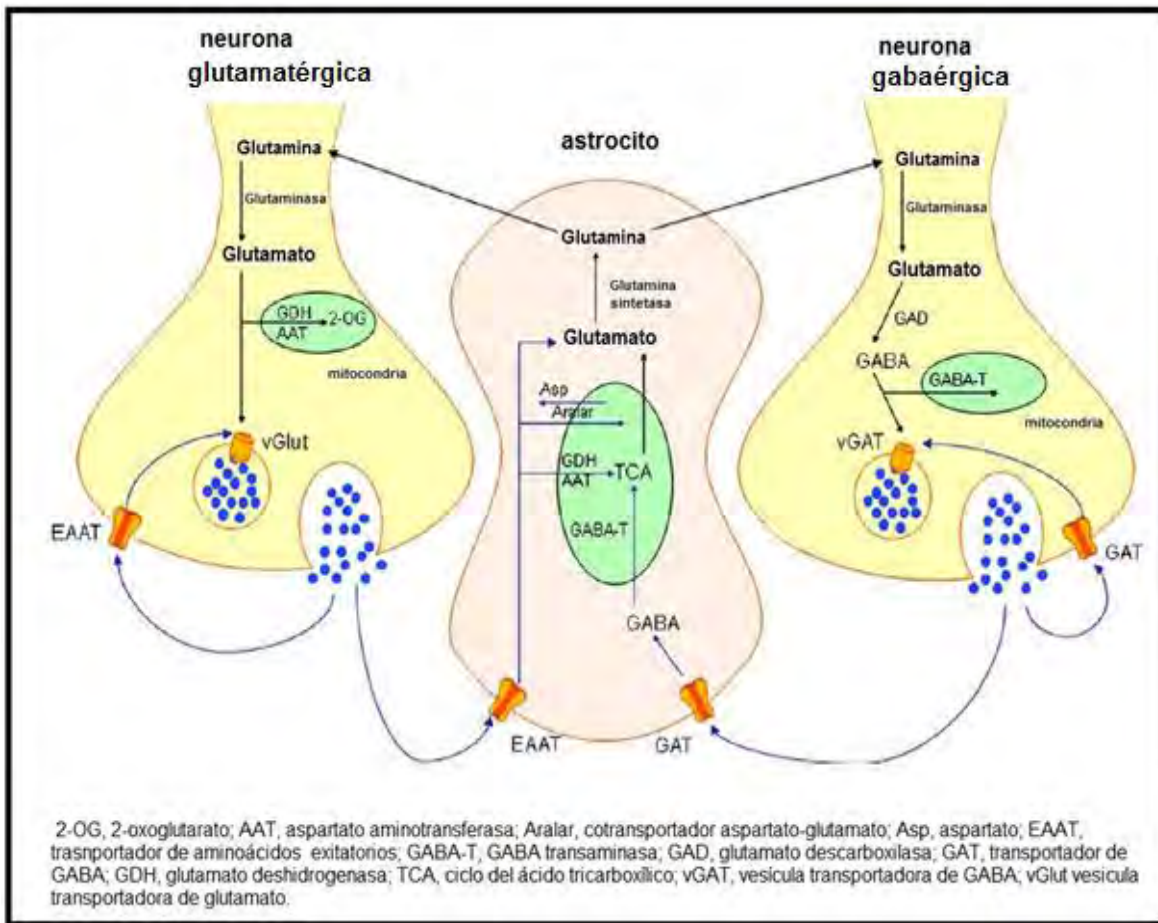


El Glu no se limita a mediar la neurotransmisión excitatoria, sino que está involucrado con un gran número de funciones adicionales, como las que se enlistan a continuación (Ashby y cols., 2008):

- Actúa como neurotransmisor excitador de acción rápida.
- Participa en la inducción y mantenimiento de cambios a medio y largo plazo en la excitabilidad neuronal (plasticidad sináptica), asociados con procesos de aprendizaje y memoria.
- Actúa como estímulo quimiotáctico durante la sinaptogénesis y el desarrollo embrionario.
- Actúa como desencadenante de procesos de migración neuronal.
- Modula el crecimiento axonal y la formación de sinapsis.
- Promueve la supervivencia de ciertas poblaciones neuronales.
- Produce cambios en la actividad metabólica, la expresión génica y la síntesis de proteínas.
- Presenta un papel destacado en procesos neurodegenerativos.

### 3.1 Síntesis del L-glutamato

El Glu se encuentra distribuido por todo el SNC, desde la corteza cerebral hasta la médula espinal, así como en algunos sistemas periféricos. El Glu es sintetizado a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato formado en el ciclo de Krebs, mediante un proceso de transaminación en el que se le transfiere un grupo amino donado por un aminoácido (en cerebro, generalmente de la alanina) bajo la acción de la aminotransferasa. También puede ser sintetizado a partir de la glutamina bajo la acción de la enzima mitocondrial glutaminasa. La glutamina proviene de los astrocitos vecinos a partir del Glu liberado por la terminación glutamatérgica y que se transforma en glutamina mediante la acción de la glutamina sintetasa (Figura 8) (Rowley y cols., 2012).



**Figura 8.** Síntesis de L-glutamato (Rowley y cols., 2012).

### 3.2 Receptores de glutamato

El Glu actúa como neurotransmisor a través de la activación de receptores metabotrópicos (mGluRs) e ionotrópicos (iGluRs) (Verkhratsky y Kirchhoff, 2007).

#### 3.2.1 Receptores metabotrópicos

Los receptores metabotrópicos a glutamato están acoplados a un sistema de segundos mensajeros a través de la activación de proteínas G. Sus acciones son más lentas y duraderas (de segundos a minutos) que las de los receptores ionotrópicos (Hampson y cols., 2008).

Los mGluRs se localizan tanto a nivel pre-sináptico, donde se han relacionado con la modulación de las sinapsis mediante cambios en la liberación del neurotransmisor, como a nivel post-sináptico, modulando canales iónicos y

receptores ionotrópicos. Se ha demostrado que los mGluRs están implicados en cambios en la excitabilidad neuronal, en fenómenos de plasticidad sináptica, en las acciones tóxicas del Glu, etc. Están constituidos por una única subunidad proteica que varía de 884 a 1179 aminoácidos y presenta siete dominios transmembranales. Se han descrito ocho tipos de estos receptores (mGluR1, mGluR2, mGluR3, mGluR4, mGluR5, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) con pesos moleculares comprendidos entre 95 y 133 kDa (Hampson y cols., 2008).

Con base en la vía de señalización a la cual están acoplados, estos receptores se clasifican en tres grupos. El grupo I está constituido por los receptores mGluR1 y mGluR5 que estimulan a la fosfolipasa C y provocan un aumento de la concentración intracelular de inositol trifosfato (IP3) y de diacilglicerol (DAG), activando diversos de procesos mediados por segundos mensajeros intracelulares (Saugstad e Ingram, 2008).

El grupo II está formado por los receptores mGluR2 y mGluR3. El grupo III está constituido por los receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Tanto del grupo II como el III están acoplados a la adenilato ciclasa produciendo su inhibición, por lo que causan una disminución del AMP-cíclico (AMPC) intracelular y de aquellos procesos mediados por este segundo mensajero (actividad de proteína cinasa A (PKA)). Estos grupos se pueden diferenciar por el compuesto L-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP4), que actúa como agonista selectivo del grupo III (Neugebauer, 2008).

### 3.2.2 Receptores ionotrópicos

Los receptores ionotrópicos de glutamato forman un canal iónico tetramérico, y su activación induce un incremento en la permeabilidad de la membrana celular a los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , principalmente. Con base en sus propiedades farmacológicas, se dividen en 3 grupos (Verkhatsky y Kirchhoff, 2007):

Receptores **NMDA** (N-metil-D-aspartato), receptores **Kainato (KA)** (ácido kaínico), y receptores **AMPA** (ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico).

### 3.3 Estructura molecular de los receptores inotrópicos de glutamato

#### 3.3.1 Receptores NMDA

El nombre de los receptores NMDA (NMDAR) proviene del N-metil-D-aspartato (NMDA), que es su agonista exógeno principal; para el Glu presentan una dosis efectiva media ( $EC_{50}$ ) de 1  $\mu$ M (Dingledine y cols., 1999). Estos receptores se caracterizan por tener una respuesta y una desensibilización lenta (100 - 300 ms), debido a que cuando la célula se encuentra en su potencial de reposo, el canal está bloqueado en la región transmembranal por un ion  $Mg^{2+}$ ; este bloqueo voltaje-dependiente se elimina por la despolarización de la célula, generalmente provocada por la activación de los receptores AMPA/Kainato (Petralia y Wenthold, 2008).

Los receptores NMDA presentan varios sitios de regulación, entre ellos un sitio de unión a  $Zn^{2+}$  y un sitio de unión a glicina. La glicina es un cotransmisor del receptor, necesario para la activación y que se une con una alta afinidad. Los receptores NMDA presentan una alta permeabilidad (20 - 50 pS) al  $Ca^{2+}$ , aunque también son permeables a  $Na^+$  y  $K^+$ . Son receptores tetraméricos que se forman por la combinación de siete tipos de subunidades: NR1 (con ocho isoformas: NR1a - h), NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A y NR3B. Para la funcionalidad del receptor es indispensable la presencia de la subunidad NR1. Existen algunas variantes de la traducción del ARN mensajero que da lugar a distintas isoformas y según la combinación de las subunidades varía la permeabilidad a  $Ca^{2+}$ . (Dingledine y cols., 1999; Petralia y Wenthold, 2008).

#### 3.3.2 Receptores Kainato

Su nombre procede de su principal agonista exógeno, el ácido kaínico (KA). Los receptores de Kainato (KAR) se caracterizan por tener una baja afinidad por el Glu ( $EC_{50}$  de 400 - 500  $\mu$ M) (Dingledine y cols., 1999) y una rápida activación; se piensa que en el cerebro la mayoría no presenta desensibilización. Su papel funcional es poco conocido y su participación en la transmisión sináptica es objeto de debate (Contractor y Swanson, 2008).

Son receptores que forman un canal iónico permeable, fundamentalmente a  $Na^+$  y a  $K^+$  (3 - 15 pS), aunque algunos subtipos también son permeables a  $Ca^{2+}$ . Se forman por la combinación de cinco tipos de subunidades (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2), con tamaños comprendidos entre 93 y 109 kDa (Dingledine y cols., 1999).

Las subunidades GluR5 y GluR6 sufren un proceso de edición post-transcripcional en la molécula de ARN que provoca una sustitución del aminoácido Glutamina (Q) por una Arginina (R) (Contractor y Swanson, 2008).

### 3.3.3 Receptores AMPA

Los receptores de glutamato AMPA (AMPA) deben su nombre a su principal agonista exógeno, el ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA). Estos receptores median la mayor parte de la neurotransmisión excitatoria rápida en el SNC de mamíferos. Se caracterizan, por lo tanto, por tener una rápida activación de 1 – 4 ms y desensibilización de 2 - 14 ms (Ashby y cols., 2008; Dingledine y cols., 1999).

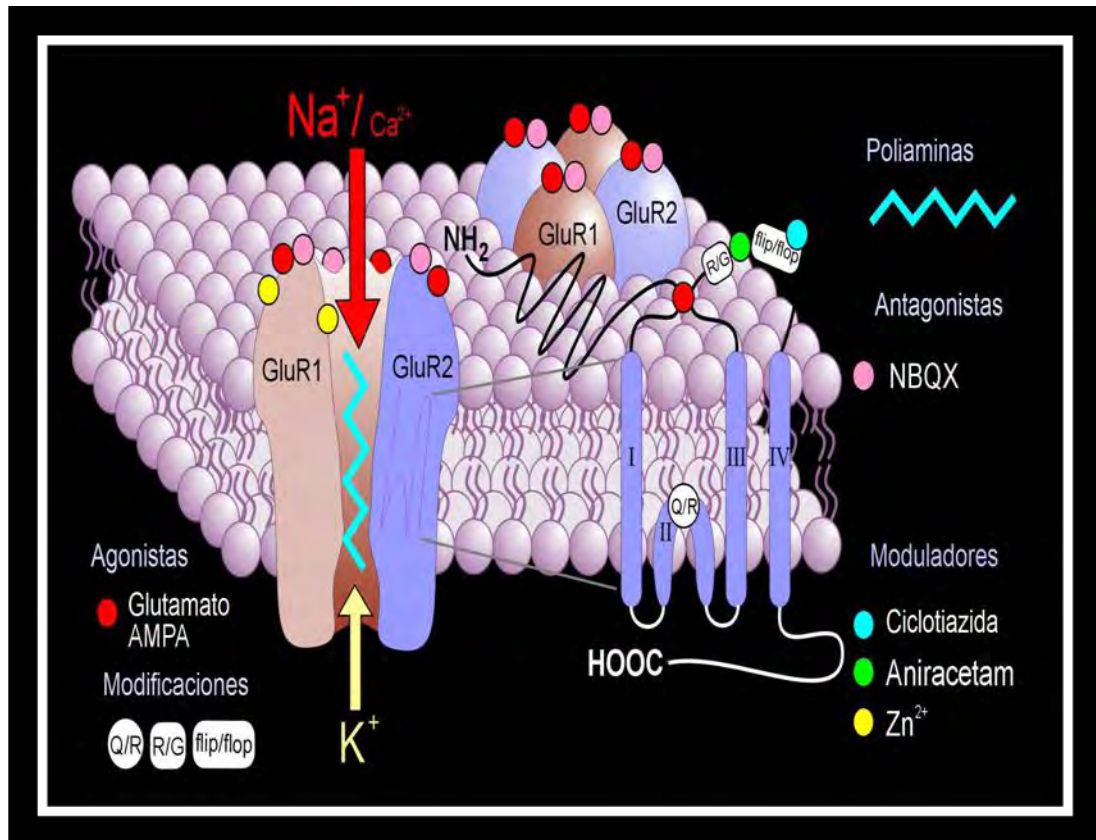
Estos receptores son permeables principalmente a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (7 - 30 pS), aunque algunos subtipos (los que no contienen GluR2) son permeables también a  $\text{Ca}^{2+}$ . Se forman por la combinación de cuatro diferentes tipos de subunidades (GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4), con tamaños comprendidos entre 96 y 101 kDa (Dingledine y cols., 1999).

En los mamíferos todas las subunidades de los receptores AMPA comparten una identidad de secuencia del ~70%, y del 20 al 40% con las otras subunidades de iGluRs. Los genes que codifican las subunidades GluR1-4 reciben el nombre de GRIA1-4. El tamaño general de los genes es >200 kilobases, y las subunidades contienen entre 850 - 900 aminoácidos (Kohler y cols., 1994).

Las subunidades de los receptores AMPA poseen cuatro segmentos hidrofóbicos (I a IV), de los cuales I, III y IV atraviesan la membrana celular, mientras que el segmento II no la atraviesa por completo y forma el poro del canal (Figura 9) (Ashby y cols., 2008).

El extremo amino (NTD) de las subunidades de ~ 400 - 450 aminoácidos presenta varios sitios de glicosilación que son determinantes para el ensamblado de las diferentes subunidades en la formación de receptores funcionales (Leuschner y Hoch, 1999).

El sitio de unión del ligando está formado por dos segmentos separados llamados S1 (NTD-I) y S2 (II-III), que se interrumpen por la formación del poro del canal y que son estructuralmente similares a la proteína bacteriana GluR0 (proteína de unión a Lisina-Arginina-Ornitina, LAOBP) que es permeable a  $\text{K}^+$ , por la activación del glutamato (Mayer, 2006).



**Figura 9. Receptor AMPA**  
 (<http://www.chrisparsons.de/Chris/glutamate.htm>).

a) Diversidad de receptores AMPA

La diversidad estructural y funcional de los receptores AMPA se debe al corte y acoplamiento alternativo del ARN mensajero para cada subunidad (Figura 10). Todas las subunidades de los receptores AMPA pueden presentar de igual manera las isoformas “flip” o “flop”, que es una variación de 9 a 11 aa de una porción de 38 aa dentro del segmento IV en su parte extracelular (Hume y cols., 1991).

Generalmente las variantes flip se encuentran presentes durante el desarrollo del individuo, mientras que las isoformas flop predominan en etapas adultas. La diferencia funcional entre estas variantes es la rápida desensibilización de las isoformas flop, relacionada con el cambio de los aminoácidos que participan en el sitio de unión del ligando (Sommer y Seeburg, 1992).

Dentro de la diversidad de las subunidades GluR2 y GluR4, se presentan dos variantes de acuerdo al largo del extremo carbonilo terminal. En el cerebro del adulto más del 90% de la subunidad GluR2 está en forma corta (GluR2c), mientras que la subunidad GluR4 larga está prácticamente distribuida en todo el cerebro. Las subunidades GluR1 y GluR3 no presentan estas variantes (Sommer y Seeburg; 1992).

Una de las variaciones más importantes de las modificaciones post-traduccionales es la que presenta la subunidad GluR2. Esta subunidad determina la permeabilidad del receptor al ion  $\text{Ca}^{2+}$  cuando forma parte del receptor (Figura 11). En el cerebro adulto la mayoría de las subunidad GluR2 presenta un cambio de glutamina por una arginina (**Q/R**). En la posición 607 del segmento II de la subunidad GluR2 está codificada genómicamente una Glutamina (**Q**), pero en la proteína se encuentra un residuo de Arginina (**R**); este cambio se efectúa mediante la edición hidrolítica de una sola base de adenosina por una inosina en el pre-ARN mensajero; el cambio es efectuado por la enzima adenosina desaminasa (ADAR2). Las subunidades GluR2 que presentan el residuo de Arginina son prácticamente impermeables a los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que introducen al poro del canal una carga neta positiva (Sommer y Seeburg; 1992).

Las subunidades GluR2, GluR3 y GluR4 presentan otro cambio de un aminoácido de arginina por una glicina (**R/G**), que se encuentra localizado antes de la región que determina las isoformas flip/flop. Este cambio también está determinado por la acción de la adenosina desaminasa (ADAR2) y está relacionado con la rápida recuperación de la desensibilización del receptor (Grosskreutz y cols., 2003).

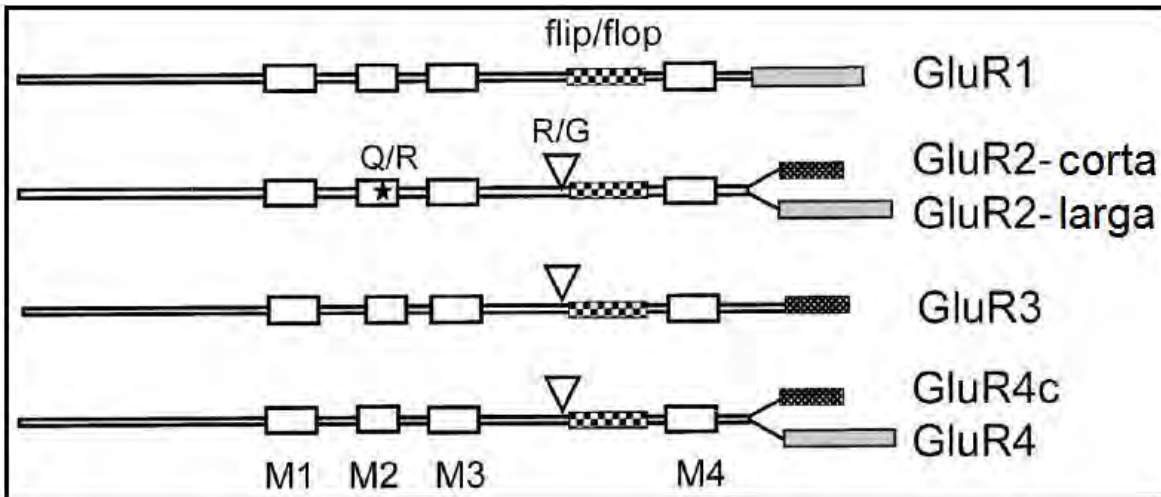


Figura 10. Diversidad en las subunidades de AMPAR (Dingledine y cols., 1999).



Figura 11. Permeabilidad del  $Ca^{2+}$  en la subunidad GluR2 (Hassel y Dingledine, 2006).

La mayoría de los receptores AMPA distribuidos en el SNC de adultos existen como heterómeros (tetrámeros formados por diferentes subunidades), aunque en diversos estudios *in vitro* se ha realizado de forma heteróloga la expresión de homómeros (tetrámeros formados por la misma subunidad) de las diferentes subunidades.



En general, la expresión de las subunidades GluR1 y GluR2 en forma del heterómero GluR1/2 es mayor en el hipocampo y corteza cerebral, mientras que, en el cerebelo, retina y tálamo es mayor la expresión del heterómero GluR2/4 (Ashby y cols., 2008; Wenthold y cols., 1996).

#### b) Modulación alostérica positiva de los receptores AMPA

Los moduladores alostéricos positivos, también conocidos como ampakinas, atenúan la desensibilización y/o desactivación del receptor. Se han descrito varios compuestos (Fleming y England, 2010):

- La concanavalia A es una lectina obtenida del germen de trigo (WGA). Se requiere un tiempo de incubación para el bloqueo de la desensibilización del receptor y su efecto es esencialmente irreversible (Yamada y Tang, 1993).
- El aniracetam es una benzodiazepina de bajo peso molecular que inhibe débilmente y de forma reversible la desensibilización de los receptores AMPA y KA (Yamada y Tang, 1993).
- La ciclotiazida (CTZ) es una benzotiazida que se une de manera reversible y dependiente de la concentración para reducir la rápida desensibilización de los receptores (Yamada y Tang, 1993).
- El zinc ( $Zn^{2+}$ ). Las corrientes inducidas por KA en homómeros de GluR3 en ovocitos son incrementadas cuando el ion  $Ca^{2+}$  es sustituido por  $Zn^{2+}$ , pero no así en los homómeros de GluR1. La sustitución del  $Ca^{2+}$  por  $Mg^{2+}$  en las soluciones electrofisiológicas y adicionadas con  $500 \mu M Zn^{2+}$ , presentaron incrementos en la amplitud de las corrientes en ambos homómeros (Dreixler y Leonard, 1997).

Estas moléculas suelen mostrar un nivel bajo a moderado de selectividad entre las diferentes subunidades de los receptores AMPA, así como en las isoformas flip/flop de las distintas subunidades de los receptores (Fleming y England, 2010).

#### c) Bloqueadores del poro de receptores AMPA

Las poliaminas son compuestos de bajo peso molecular que originalmente fueron identificados en los venenos de avispas y arañas. Las poliaminas se unen al poro del canal una vez que este se encuentra abierto por su ligando, inhibiéndolo. Actúan tanto en receptores ionotrópicos de glutamato y como en receptores nicotínicos en el sistema nervioso central (Fleming y England, 2010).

#### d) Proteínas reguladoras de receptores AMPA

Estudios recientes han demostrado que la mayoría de los receptores AMPA en mamíferos están asociados a diferentes proteínas auxiliaadoras llamadas proteínas reguladoras de receptores AMPA (TARPs, *Transmembrane AMPAR Regulatory proteins*) y se han descrito 6 isoformas en el cerebro ( $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ ,  $\gamma 5$ ,  $\gamma 7$  y  $\gamma 8$ ); de igual manera las proteínas Cornichon (CNIHs) con dos isoformas (CNIH-2 y CNIH-3) están implicadas en la regulación del transporte de los receptores AMPA, así como en su desensibilización y desactivación (Nicoll y cols., 2006).

### 3.4 Plasticidad sináptica y excitotoxicidad

Desde el punto de vista fisiológico, los procesos de aprendizaje y memoria son el resultado de las conexiones neuronales que se desarrollan en respuesta a las experiencias de cada individuo (plasticidad sináptica) y que mejoran la eficiencia de la transmisión del impulso nervioso. La consolidación de estos procesos se realiza en el hipocampo, a través de la transmisión excitatoria producida por los receptores de glutamato, que inducen y mantienen las nuevas vías de transmisión sináptica (Ashby y cols., 2008).

Los receptores de glutamato tipo AMPA participan en la inducción y mantenimiento de los cambios a medio y largo plazo de la plasticidad sináptica, a

través de los mecanismos de potenciación a largo plazo (LTP, *Long-Term Potentiation*) y de depresión a largo plazo (LTD, *Long-Term Depression*), que se han descritos ampliamente en la región CA1 del hipocampo y cerebelo (Collingridge y cols., 2010).

La potenciación a largo plazo (LTP) se define como un aumento en la respuesta sináptica a un estímulo sobre la línea base que se observa generalmente después de una ráfaga de estímulos de alta frecuencia. Los receptores de AMPA son el principal impulsor de la transmisión excitatoria, lo que equivale a un aumento en la respuesta funcional de los receptores AMPA en la sinapsis, a través de mecanismos pre-sinápticos que aumentan la liberación de glutamato (Derkach y cols., 2007).

El proceso de LTP se inicia con la liberación del Glu por la neurona pre-sináptica. El Glu se une a los receptores AMPA y NMDA que se encuentran en la misma sinapsis, lo que causa una ligera despolarización de la neurona post-sináptica causada por el flujo de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de los receptores AMPA. Cuando el Glu se une a los receptores NMDA, éstos presentan una baja conductancia al ion  $\text{Na}^+$ , debido al bloqueo del canal por iones  $\text{Mg}^{2+}$ ; cuando la despolarización de la neurona post-sináptica es lo suficientemente fuerte ocasiona la expulsión del ion  $\text{Mg}^{2+}$  de los receptores NMDA, permitiendo mayor flujo de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . El calcio actúa como segundo mensajero activando diferentes vías de señalización; por ejemplo, estimula a la enzima Calcio calmodulina Kinasa (CaMKII), responsable de la fosforilación de los receptores AMPA (GluR1, serina-831) y del aumento de la conductancia del ion  $\text{Na}^+$  a través de estos; además estimula la movilización de nuevos receptores AMPA hacia la membrana celular. Entre los efectos post-sinápticos, el  $\text{Ca}^{2+}$  puede facilitar la liberación del neurotransmisor Glu de la terminal pre-sináptica, a través de retroalimentación negativa utilizando moléculas como el óxido nítrico (Derkach y cols., 2007).

En contraparte, el mecanismo de LTD se define como la eliminación de receptores AMPA en la membrana post-sináptica en la transmisión glutamatérgica. El proceso es inducido por la débil activación de los receptores NMDA, que producen un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y que activan las enzimas fosfoproteína fosfatasa (PP1) y Calcineurina; esto conduce a la desfosforilación de subunidad GluR1 en la posición serina-485, sin afectar la fosforilación que se lleva a cabo durante el LTP (serina-831). Durante el LTD la subunidad GluR2 se fosforila en la posición serina-880 por la enzima PKC (proteína cinasa C), y estos cambios en la fosforilación de las subunidad conducen

a la endocitosis de los receptores, debilitando así la transmisión sináptica (Collingridge y cols., 2010).

Aunque el Glu desempeña diversas funciones en el SNC y participa el 70% de las sinapsis excitatorias, la activación excesiva de sus receptores produce excitotoxicidad, término utilizado para describir la neurotoxicidad causada por una activación masiva de receptores de glutamato, causando muerte neuronal (Ashby y cols., 2008).

La excitotoxicidad está asociada, tanto a los procesos agudos de isquemia cerebral como a enfermedades neurodegenerativas, que se caracterizan por una disminución en el número de células en determinadas poblaciones neuronales. Los mecanismos de la neurodegeneración producidos por Glu son diversos, aunque todos los receptores ionotrópicos de glutamato están involucrados (Shohami y Biegon, 2013).

En la enfermedad de Parkinson, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra provoca una sobreactivación de proyecciones glutamatérgicas corticales del cuerpo estriado, región cerebral implicada en el control del movimiento. Por otro lado, la enfermedad de Huntington es causada por la mutación en una proteína llamada huntingtina que promueve la degeneración de neuronas del núcleo estriado. En ambos casos, la excitotoxicidad se debe a una sobreactivación de receptores NMDA (Shohami y Biegon, 2013).

En la enfermedad de Alzheimer, la sobre excitabilidad de los receptores NMDA, que conlleva a un aumento en la concentración de iones de  $Ca^{2+}$  intracelular, provoca muerte celular y déficits en los procesos de aprendizaje y memoria (Shohami y Biegon, 2013). Mientras que la percepción del dolor neuropático está mediada por la sobre excitación de los receptores NMDA y AMPA, presentes en vías neuronales de la médula espinal, que se encuentran entre un 40-70% en las neuronas del asta dorsal; esta situación produce un estado de hiperexcitabilidad neuronal que facilita el mantenimiento de la transmisión nociceptiva (Youn y cols., 2013).

Uno de los ejemplos más claros de excitotoxicidad es el que se presenta en la isquemia cerebral, en la que la reducción del flujo sanguíneo conlleva a un déficit energético y a una disminución en la remoción del glutamato del espacio sináptico. La sobreexcitación de los receptores AMPA altera las concentraciones de iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , provocando edema celular y lisis. La despolarización masiva producida por los receptores AMPA induce el proceso de LTP, que conlleva al aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por los receptores NMDA (Shohami y Biegón, 2013). El aumento patológico de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células neuronales también se asocia a la reducción del cambio post-transcripcional Q/R, que se presenta en la subunidad GluR2, afectando la permeabilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores AMPA (Barbon y Barlati, 2011). Los receptores con subunidades GluR2(Q) son altamente permeables al ion  $\text{Ca}^{2+}$ ; mientras que los receptores con subunidades GluR2(R) no lo son. La elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activa una serie de enzimas-proteín cinasas: proteasas, endonucleasas, proteín fosfatasas y sintasa del óxido nítrico (NOS), así como la formación de radicales libres de oxígeno (RLO), ocasionando la muerte celular (Shohami y Biegón, 2013).

La modulación de receptores NMDA y AMPA puede ser de utilidad en el desarrollo de nuevas terapias que ofrezcan un beneficio terapéutico a pacientes con enfermedades neurodegenerativas causadas por excitotoxicidad. Sin embargo, se han de realizar los estudios correspondientes para determinar sus efectos secundarios.

### III. JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA

El uso de conotoxinas como herramientas farmacológicas ha ayudado al estudio de las características funcionales y estructurales de diferentes subtipos de receptores neuronales y/o canales iónicos, ya que se unen a éstos con una alta afinidad.

Algunos estudios han demostrado que las conotoxinas, obtenidas de diversas especies de caracoles del género *Conus*, actúan como antagonistas de los receptores NMDA; sin embargo, no hay evidencia de que las conotoxinas presentes en venenos de especies de caracoles *Conus* que habitan en aguas mexicanas tengan como blanco molecular a los receptores AMPA; dado que los receptores a glutamato tipo AMPA están asociados a los procesos de aprendizaje y memoria nos enfocaremos en determinar si hay componentes en el veneno de *Conus spurius* que actúen en la modulación de estos receptores.

### IV. HIPÓTESIS

Si las conotoxinas obtenidas de diversas especies del caracol marino *Conus* modulan la respuesta de los receptores glutamatérgicos NMDA, los compuestos presentes en el extracto crudo del veneno del caracol marino *Conus spurius* también modularán la actividad del receptor glutamatérgico AMPA.

### V. OBJETIVO GENERAL

Determinar si en el veneno del caracol marino *Conus spurius* existen toxinas que modulan la actividad de los receptores glutamatérgicos tipo AMPA expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

### VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fraccionar por cromatografía líquida de alta resolución en diversas fracciones del veneno de *C. spurius*.
- Expresar homómeros de receptores AMPA utilizando los plásmidos GluR1 (GluR-K1, p59/2), GluR2 (pRB14) y GluR4 (pK46) en ovocitos de *X. laevis*.
- Expresar receptores AMPA a partir de ARN-total de hipocampo rata.
- Evaluar la expresión de los receptores AMPA por medio de estudios electrofisiológicos utilizando un antagonista específico.
- Evaluar el efecto de las diversas fracciones del veneno de *C. spurius* sobre los receptores AMPA.

## VII. METODOLOGÍA

### 1. EXTRACCIÓN DEL VENENO

Se extrajo el veneno de 5 ejemplares de *C. spurius* que fueron proporcionados por el Dr. Manuel Aguilar del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Se descongelaron los ejemplares y se les rompió la concha para exponer el cuerpo de los moluscos. Se realizó la disección de los conductos venenosos que se extrajeron con ayuda de unas pinzas y tijeras.

Los conductos aislados se maceraron con un homogeneizador de vidrio y un émbolo de teflón en una solución de extracción (40%(v/v) de acetonitrilo (ACN) y 2% (v/v) de ácido trifluoroacético (ATF)) en una proporción 5:3. El homogenizado se centrifugó a 17,000 g por 15 minutos a 4°C, el botón se desechó y se conservó el sobrenadante que es la fracción rica en conotoxinas. Se liofilizó el sobrenadante y se almacenó a -60°C hasta su uso (López- Vera, 2005).

### 2. FRACCIONAMIENTO DEL VENENO

- Solución A: 0.1% (v/v) de ATF en agua
- Solución B: 0.085% (v/v) de ATF en 90% de ACN

El extracto liofilizado se resuspendió en una solución de ACN al 5% y ATF al 0.005%. El fraccionamiento de los péptidos del veneno de *C. spurius* se realizó mediante una cromatografía de alta resolución en fase reversa utilizando una columna Vydac® 218TP C<sub>18</sub> (218TP54, 5µm, 4.6X10mm, 300 Å), que por sus características fisicoquímicas se recomienda en la separación de péptidos de bajo peso molecular (4000–5000 MW), naturales o sintéticos, así como los que presentan varios anillos en su estructura química. ([http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Home/HPLCCols\\_VydacCols\\_p70to71\\_84to94.pdf](http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Home/HPLCCols_VydacCols_p70to71_84to94.pdf)).

La columna se acopló a una pre-columna Vydac C<sub>18</sub> (218GK54, 5 µm, 4.6X10mm, 300 Å). La elución de la columna se realizó con un gradiente lineal de solución B en 95 minutos, con un incremento del 1%/min de B, y con un flujo de 1mL/min. La detección de los componentes del extracto crudo se hizo con un espectrómetro de flujo ajustado a 220 nm, longitud de onda a la cual los enlaces péptidos absorben la luz ultravioleta. Todas las fracciones recolectadas se liofilizaron y se conservaron a -20°C hasta su uso (Aguilar y cols., 2008).

### 3. PROPAGACIÓN DE SUBUNIDADES DE RECEPTORES AMPA

Se utilizaron las subunidades: GluR1 (GluR-K1, p59/2), GluR2 (pRB14) y GluR4 (pK46) en isoformas flip, insertados en el vector pBluescript SK(-) o pBS SK(-), contenidos en células transformadas de la cepa Blue X1. Estos plásmidos fueron donados por al Dr. Arturo Ortega del Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV.

Para la propagación de los plásmidos se usaron 100  $\mu$ L de células transformadas en 5 mL de medio LB con ampicilina 80 mg/L. Se dejaron incubar por 24 h a 37°C. Se utilizó el kit comercial Promega SV Minipreps DNA Purification System para la extracción de los plásmidos y para la posterior transcripción *in vitro* el kit de Ambion mMESSAGING mMACHINE T7, obteniéndose el cARN de cada subunidad. Para la cuantificación del material génico se utilizó un Nano Drop 2000 UV-Vis Spectrophotometer de Thermo Scientific.

### 4. EXTRACCIÓN DE ARN-TOTAL

Se sacrificaron dos ratas machos Wistar y se realizó la disección del hipocampo. Se siguió el protocolo de Chomczynski y Sacchi (1987), para la extracción de ARN-total utilizando el reactivo comercial de Trizol Reagent de Ambion, hecho a base de una solución mono-fásica de fenol e isocianato de guanidina que durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del ARN, al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve los componentes celulares. El ARN-total obtenido se utilizó para realizar la expresión de los receptores AMPA en ovocitos de *X. laevis*. La cuantificación del ARN extraído se realizó mediante un Nano Drop 2000 UV-Vis Spectrophotometer de Thermo Scientific.

### 5. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE RECEPTORES AMPA

La expresión de los receptores AMPA se realizó inyectando ~10 ng de cARN de las diferentes subunidades de receptores AMPA o 100 nL de ARN-total, en ovocitos *X. laevis* con ayuda de un nanoinyector. La expresión de los receptores se evaluó de 4 a 8 días post-inyección (Walker y cols., 2009).



## 6. EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA

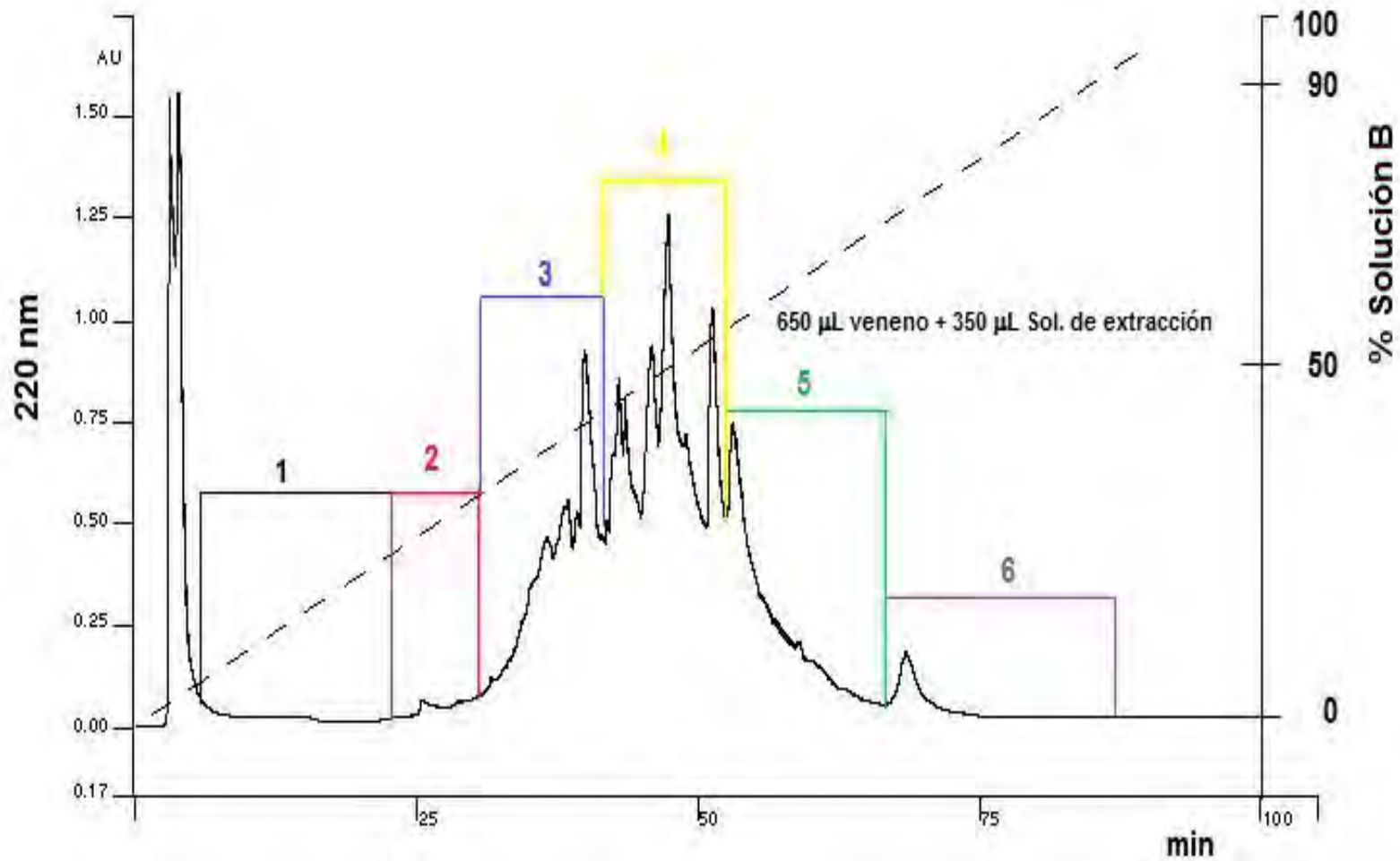
Para confirmar la presencia de receptores AMPA en los ovocitos de *X. leavis* se realizaron ensayos electrofisiológicos con la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos a -70 mV, con una solución electrofisiológica, cuyo contenido en concentración (mM) es: 96.0 NaCl, 2.0 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 5.0 HEPES, pH a 7.1-7.7 ajustado con 10 N NaOH (Walker y cols., 2009).

Las corrientes se generaron con pulsos de 5 s de 1 mM Glu y 150 μM ácido kaínico. A manera de control se utilizó 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX), antagonista específico de los receptores AMPA, a una concentración de 30 μM (Walker y cols., 2009; Limon y cols., 2007). Para minimizar la desensibilización de los receptores, se colocaron los ovocitos en un baño previo de Concanavalina A (0.3 mg/mL) por 2 minutos (Strutz-Seebohm y cols., 2003).

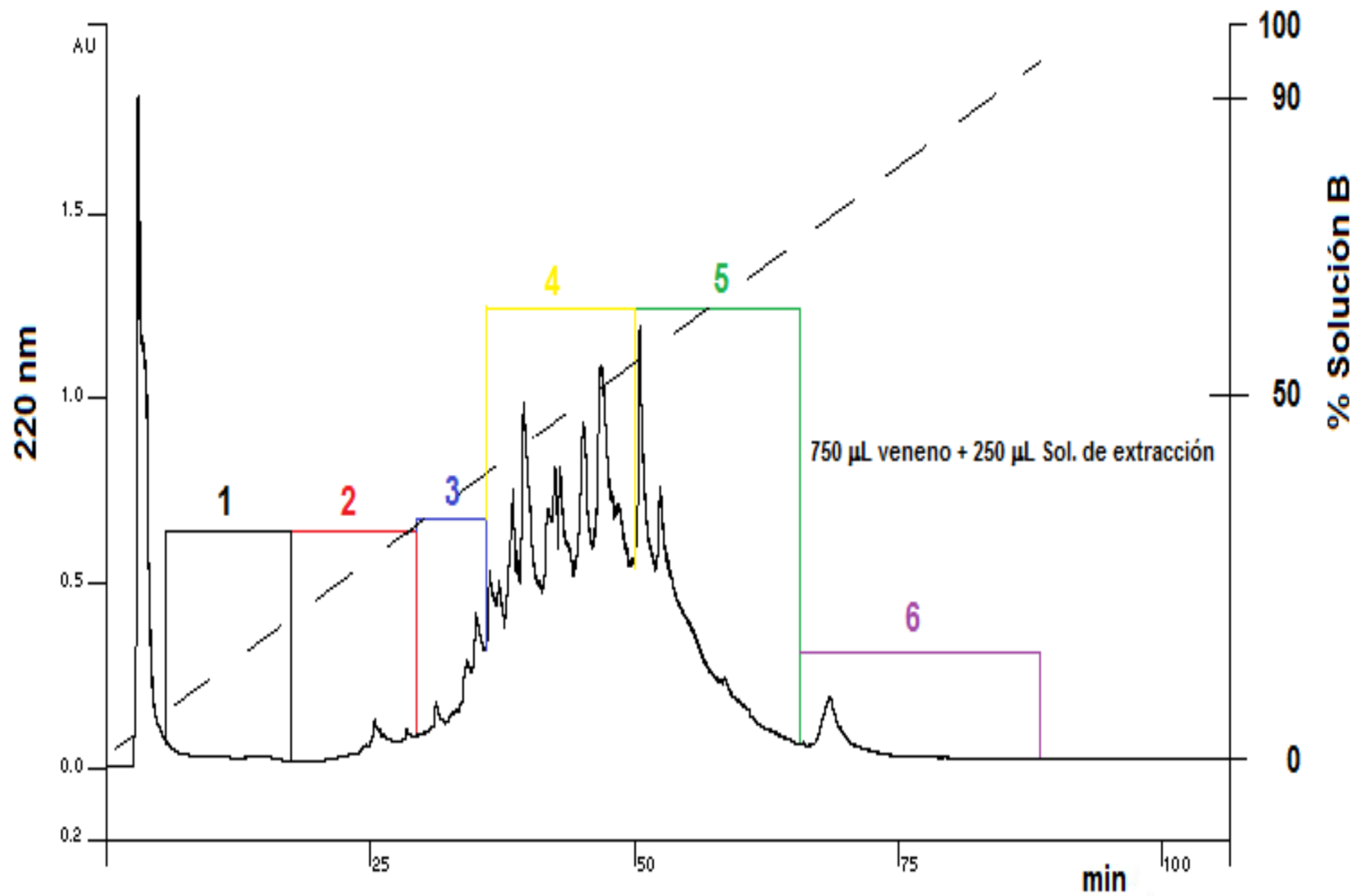
## VIII. RESULTADOS

### 1. FRACCIONAMIENTO DEL VENENO

Se fraccionó el veneno de *C. spurius*, obteniéndose 6 fracciones que se recolectaron manualmente en tubos de polipropileno de 1.5 mL, las cuales se llevaron a sequedad. Se realizó por duplicado el fraccionamiento del veneno, utilizándose volúmenes de 650  $\mu\text{L}$  y 750  $\mu\text{L}$  de veneno (Figuras 12 y 13, respectivamente) que se completaron con solución de extracción a un volumen final de 1000  $\mu\text{L}$ , debido al tamaño del asa de inyección del cromatógrafo. En los perfiles cromatográficos se observa que los componentes mayoritarios en ambas cromatografías eluyeron con tiempos de retención (min/ eje de abscisas) y con unidades de absorción (AU/ eje de ordenadas a 220 nm) similares. Los componentes de mayor absorbancia alrededor de 1.25 AU presentaron tiempos de retención similares de alrededor de 50 min, con condiciones de saturación de la columna cromatográfica al 50% de solución B (0.085% (v/v) de ATF en 90% de ACN).



**Figura 12.** Perfil cromatográfico del extracto crudo del veneno de *C. spurius*(1). Los péptidos fueron separados con una columna C18, con un gradiente de 5 a 95% B en 90 min, con un incremento de B de 1%/min y un flujo de 1 mL/min.



**Figura 13.** Perfil cromatográfico del extracto crudo del veneno de *C. spurius*(2). Los péptidos fueron separados con una columna C18, con un gradiente de 5 a 95% B en 90 min, con un incremento de B de 1%/min y un flujo de 1mL/min.

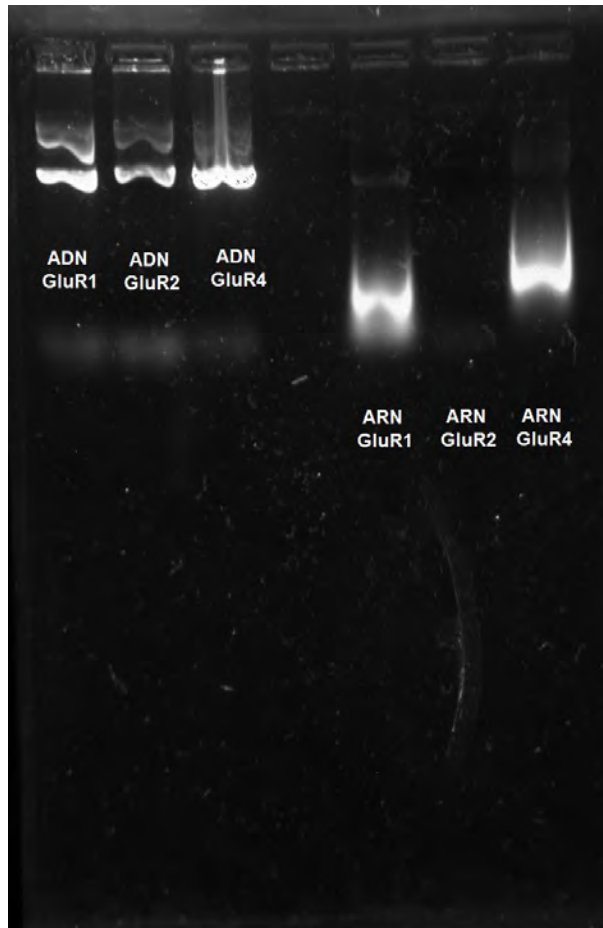
## 2. PROPAGACIÓN DE SUBUNIDADES DE RECEPTORES AMPA

Los rendimientos obtenidos de la purificación de los plásmidos de las diferentes subunidades de los receptores AMPA fueron superiores a los 300 ng/ $\mu$ L cADN (Cuadro 3). Por otro lado, por transcripción *in vitro*, los rendimientos del cARN obtenidos para la subunidades GluR1 y 4 fueron de 400 y 700 ng/ $\mu$ L, respectivamente, mientras para la subunidad GluR2 se cuantificaron 50 ng/ $\mu$ L.

**Cuadro 3.** Rendimiento de las GluRs.

| <b>Subunidad GluRs</b> | <b>cADN ng/<math>\mu</math>L</b> | <b>cARN ng/<math>\mu</math>L</b> |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| GluR1                  | 390                              | 400                              |
| GluR2                  | 300                              | 50                               |
| GluR4                  | 340                              | 700                              |

Se realizó una electroforesis con un gel de agarosa al 0.8 % para observar la presencia de material genético de las diferentes subunidades de los receptores AMPA. En la Figura 14 se observa de izquierda a derecha, las bandas correspondientes al cADN de las subunidades; GluR1, GluR2 y GluR4 respectivamente; seguidas de las bandas correspondientes al cARN de las subunidades. Sin embargo no se logró observar la banda correspondiente al cARN de la subunidad GluR2. Por lo tanto, solo el cARN obtenido de las subunidades GluR1 y GluR4 fue inyectado en ovocitos de *X. laevis* para realizar los ensayos electrofisiológicos posteriores.



**Figura 14.** Electroforesis diferentes subunidades de receptores AMPA.

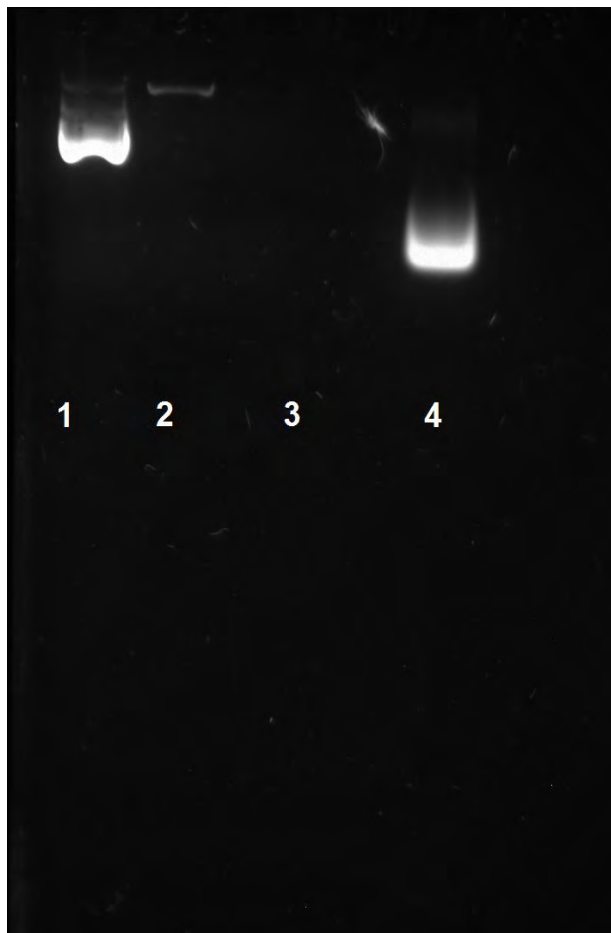
De forma independiente se realizó la linearización del plásmido de la subunidad GluR4 con la enzima de restricción Xho I, obteniéndose 6.0 ng/ $\mu$ L de plásmido linearizado, con el cual se realizó la transcripción *in vitro*, sin que se obtuviera cARN cuantificable.

En el Cuadro 4 se muestran los rendimientos obtenidos para la subunidad GluR4: el cADN (1), ADN linearizado por la enzima de restricción Xho I (2), el cARN obtenido por la transcripción del ADN linearizado (3), y por último el cARN obtenido sin la previa linearización del plásmido.

**Cuadro 4.** Rendimiento de la subunidad GluR4.

| <b>Subunidad GluR4</b>  |                 |
|-------------------------|-----------------|
| cADN (1)                | 340 ng/ $\mu$ L |
| ADN linearizado (2)     | 6.0 ng/ $\mu$ L |
| cARN linearizado (3)    | No detectado    |
| cARN sin linearizar (4) | 700 ng/ $\mu$ L |

En la Figura 15 se muestra el gel de agarosa al 0.8% correspondiente a la electroforesis de estas muestras (Cuadro 3). Se pueden observar claramente las bandas correspondientes al cADN (1) y al cARN sin linearizar (4), mientras que en el carril 2 se observa una banda tenue correspondiente a la muestra ADN linearizado (2); sin embargo no se observa la banda correspondiente al cARN linearizado (3), lo que al parecer indica que el cADN linearizado fue insuficiente para realizar la transcripción *in vitro* correspondiente.



**Figura 15.** Electroforesis de la subunidad GluR4

### 3. EXTRACCIÓN DE ARN-TOTAL

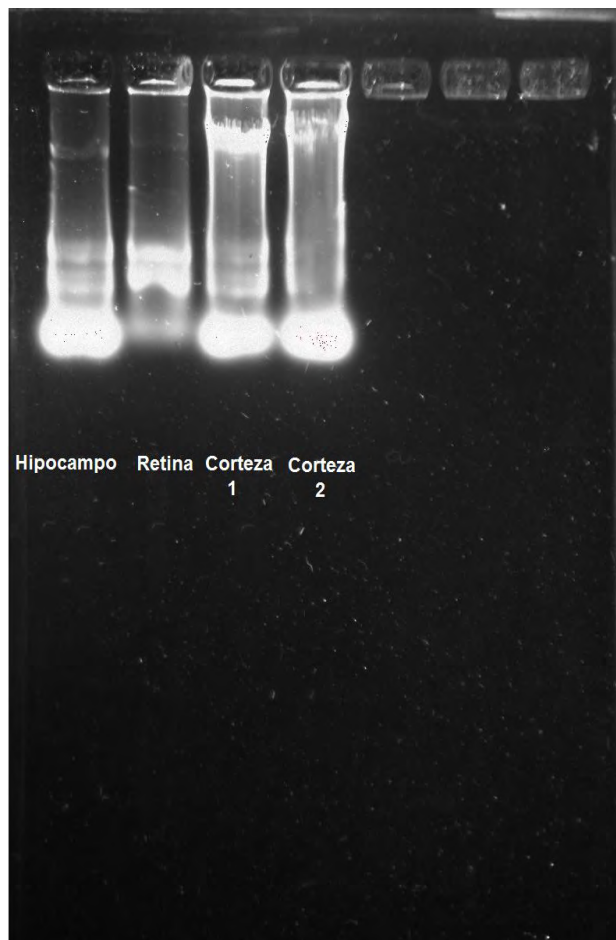
Con relación a la extracción de ARN-total de las diferentes regiones de cerebro de rata, en el cuadro 5 se muestra el rendimiento obtenido en cada región. El rendimiento más bajo obtenido fue de la retina (260 ng/ $\mu$ L); mientras que para el hipocampo fue 7 veces más (1830 ng/ $\mu$ L); los rendimientos a partir de corteza 1 y 2, fueron 27 y 14 veces más altos que en la retina, respectivamente (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Rendimiento de ARN-total de diferentes regiones del cerebro de rata.

| <b>ARN-total</b> | <b>ng/<math>\mu</math>L</b> |
|------------------|-----------------------------|
| Retina           | 260                         |
| Hipocampo        | 1830                        |
| Corteza 1        | 5600                        |
| Corteza 2        | 3800                        |

En la Figura 16 se muestra el gel al 0.8% de agarosa correspondiente a la electroforesis de las extracciones de ARN-total. Se observan bandas definidas para cada una de las muestras y de gran intensidad debidas a su alta concentración. Cada muestra exhibe el patrón característico de tres bandas que corresponden a los diferentes tipos de ARN presentes en las células eucariotas.





**Figura 16.** Electroforesis de ARN-total de hipocampo de rata.

#### **4. EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA**

Los registros electrofisiológicos para las diferentes subunidades de receptores AMPA y ARN-total de hipocampo de rata se muestran en la Figura 17, así como los registros electrofisiológicos de ovocitos control, los cuales fueron inyectados con agua libre de ARNasas (enzimas ribonucleasas), para cada lote de ovocitos empleados.

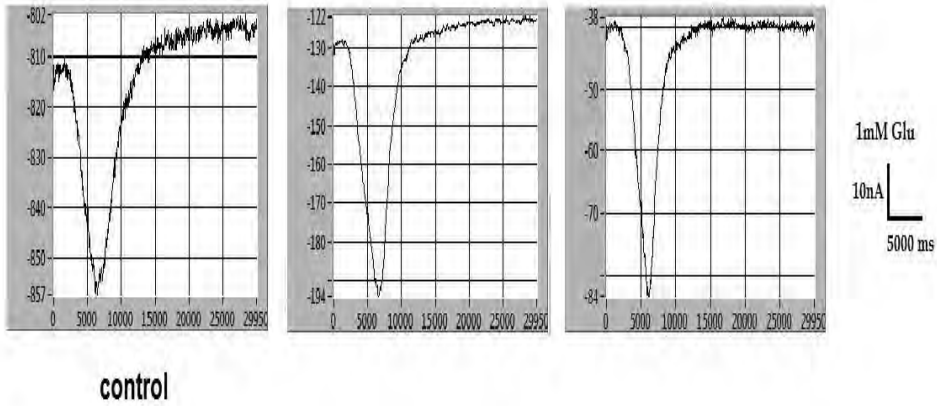
En la Figura 17a se muestran las corrientes generadas por la aplicación de 1 mM Glu/5s en ovocitos inyectados con cARN de GluR1, con amplitudes de alrededor de 50 nA; en ovocitos control para este lote se pueden observar corrientes endógenas de amplitudes similares, por lo cual se descarta que las corrientes obtenidas sean producto de receptores AMPA del cARN inyectado.

En la Figura 17b se muestran los registros electrofisiológicos de ovocitos inyectados con cARN de GluR4; se observa que tras la aplicación de 1 mM Glu/5s no hay generación de corrientes, mientras que para ovocitos control tampoco se observaron corrientes endógenas tras la aplicación del Glu.

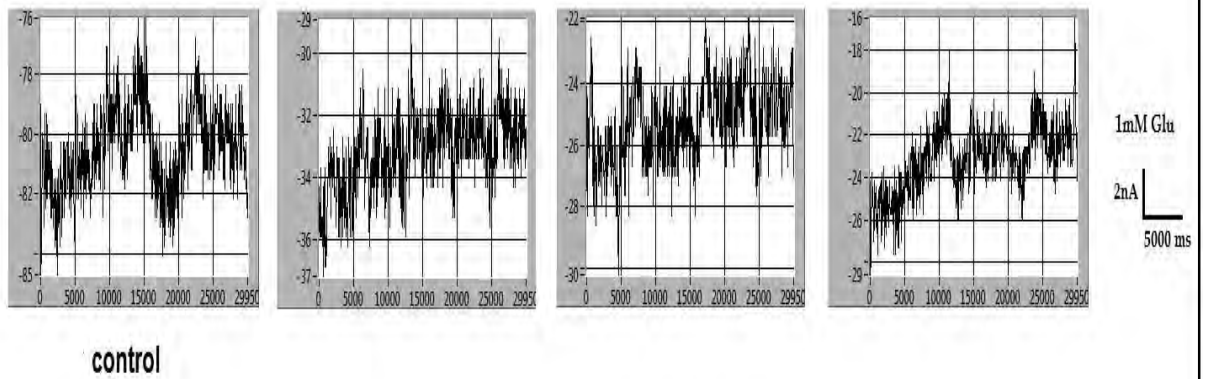
De los ovocitos inyectados con ARN-total de hipocampo se obtuvieron los registros que se muestran en la Figura 17c; se observa que no hay generación de corrientes tras la aplicación de 1 mM Glu/5s; al ser preincubados los ovocitos durante 5 min con DNQX (antagonista selectivo) no se observan modificaciones en los registros; en ovocitos control tampoco se observa la presencia de corrientes endógenas con la aplicación del 1 mM Glu/5s. Los receptores AMPA se encuentran distribuidos en todo el SNC, pero su expresión en las células del hipocampo es mayor; por lo tanto, se iniciaron los registros electrofisiológicos en ovocitos inyectados con ARN-total de esta región.

Los resultados obtenidos indican que no se logró la expresión de los receptores de glutamato tipo AMPA a partir del cARN de las diferentes subunidades ni del ARN-total de hipocampo de rata. Por lo tanto, no fue posible realizar la evaluación de las fracciones obtenidas por cromatografía de alta resolución en fase reversa del extracto crudo del veneno *C. spurius*.

a) GluR1



b) GluR4



c) ARN-total de hipocampo

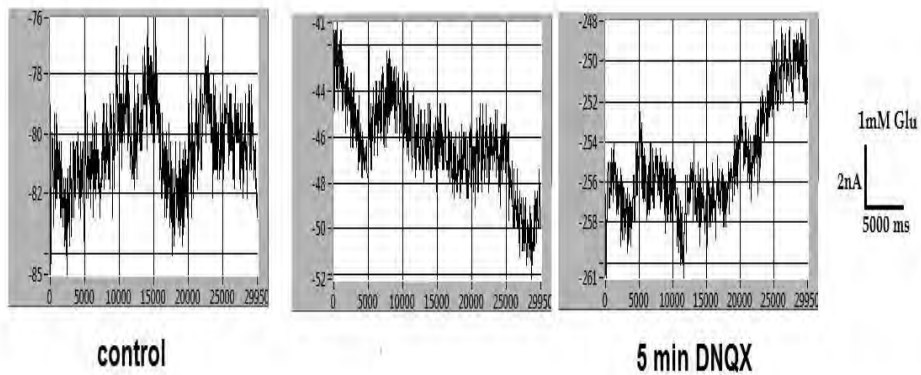


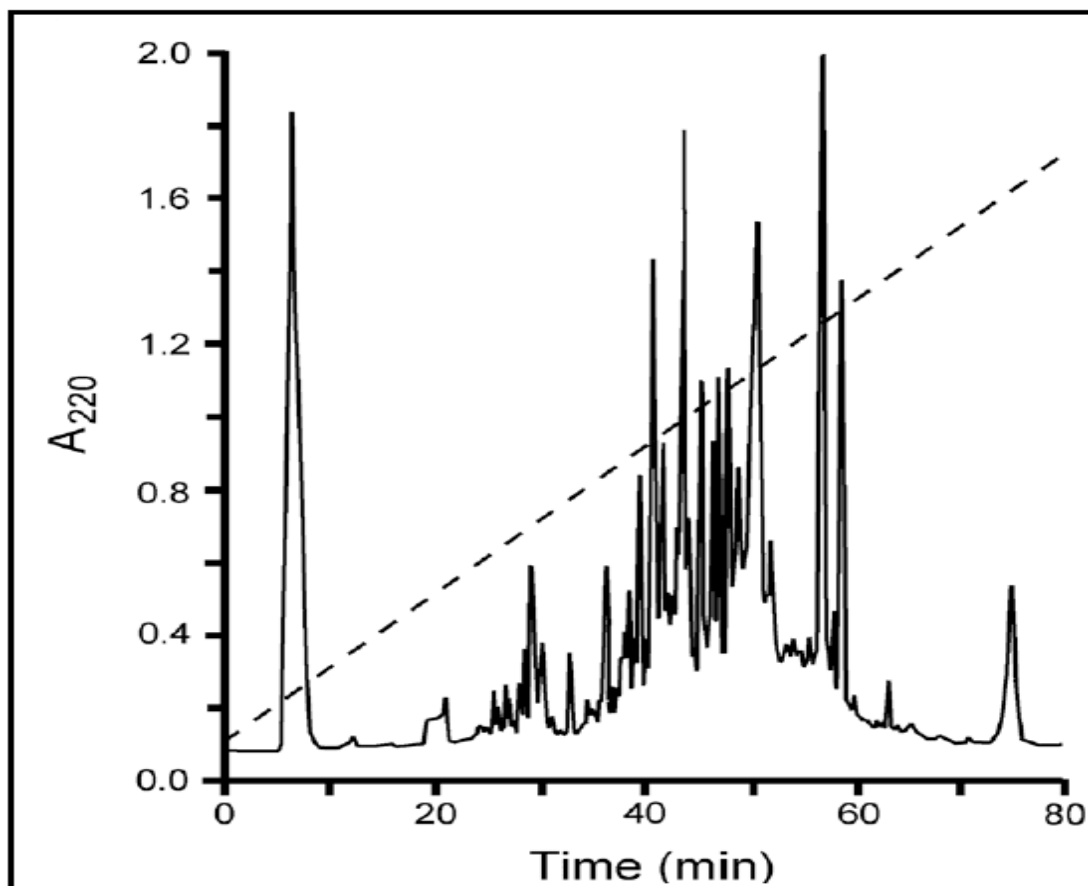
Figura 17. Evaluación electrofisiológica de los receptores AMPA y ARN-total en ovocitos de *X. laevis*.

## IX. DISCUSIÓN

### 1. FRACCIONAMIENTO DEL VENENO

Los perfiles cromatográficos de las Figuras 12 y 13 muestran tiempos de retención similares en los componentes mayoritarios del veneno de *C. spurius* obtenidos por Aguilar y colaboradores en 2008 (Figura 18), utilizando las mismas condiciones de elución, columna, precolumna y de espectroscopía UV.

Del veneno de *C. spurius* se han purificado los conopéptidos Conorfamida-Sr1 (GPMGWVPVFYRF-NH<sub>2</sub>) y Conorfamida-Sr2 (GPM $\gamma$ DPL $\gamma$ IIRI-NH<sub>2</sub>) (Maillo y cols. 2002; Aguilar y cols., 2008, respectivamente), nombre que reciben por presentar alrededor de un 75% de identidad de secuencia con la FMRFamida de moluscos. Las Conorfamidas son péptidos de 12 aa que no presentan en su estructura residuos de cisteínas; sin embargo, la Conorfamida-Sr2 contiene dos residuos de Glu. Los perfiles cromatográficos obtenidos sugieren la presencia de Conorfamidas en el veneno de *C. spurius* utilizado durante el proceso experimental.



**Figura18.** Fraccionamiento del extracto crudo del veneno de *C.spurius* (Aguilar y cols., 2008).

## 2. PROPAGACIÓN DE SUBUNIDADES DE RECEPTORES AMPA

La expresión heteróloga de proteínas exógenas en la membrana de ovocitos de *X. laevis* ha demostrado ser una herramienta versátil en el estudio de la estructura y función de receptores neuronales; que se realiza inyectando cADN o mRNA que codifique para el receptor de interés (Terhag y cols., 2010).

Otra técnica para expresar receptores neuronales en ovocitos de *X. laevis*, consiste en trasplantar membranas aisladas (sinaptosomas) de células neuronales que presenten dichos receptores. Presumiblemente estos receptores mantienen su estequiometría original, características estructurales y el conjunto de lípidos y proteínas asociados a su funcionamiento (Miledi y cols., 2002).

Como se ha mencionado con anterioridad, para la expresión heterológica de los receptores AMPA se utilizaron los plásmidos de las subunidades: GluR1 (GluR-K1, p59/2), GluR2 (pRB14) y GluR4 (pK46) insertados en el vector pBluescript SK(-). Durante el desarrollo experimental, los plásmidos fueron extraídos y purificados con el uso de kits comerciales; para la obtención de cARN se utilizó el promotor T7, sin la previa linearización del cADN correspondiente (Cuadro 3, Figura 14). Se inyectaron, en ovocitos de *X. laevis*, 10 ng de cARN de las subunidades GluR1 y GluR4. Los resultados de los ensayos electrofisiológicos (Figura 17a y b) sugieren que no se logró la expresión de los receptores AMPA a partir del material genético inyectado.

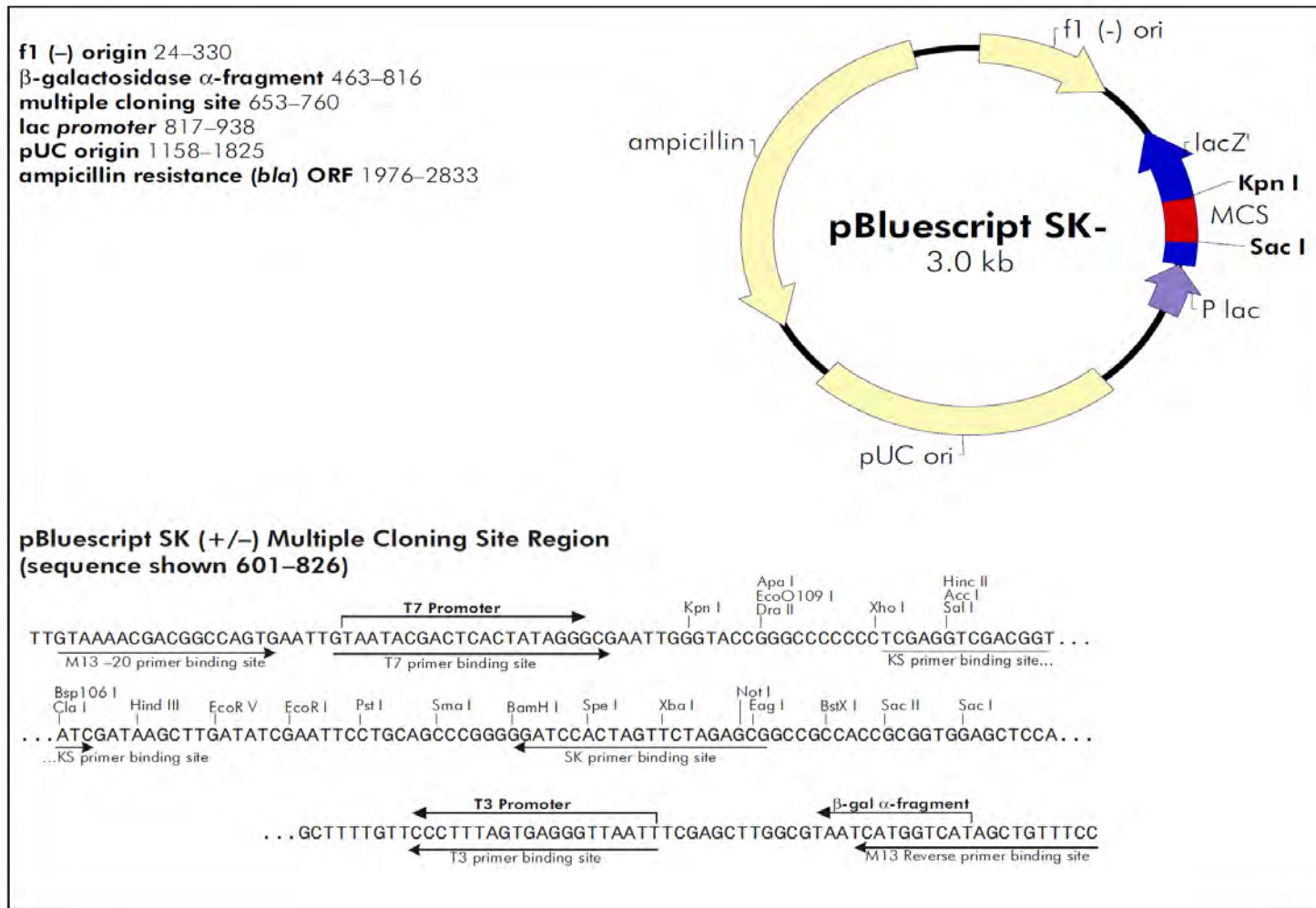
Sin embargo, desde que en 1989 Hollmann y colaboradores clonaron y expresaron heterológamente en ovocitos de *X. laevis* los receptores AMPA, al construir el plásmido pGluR1-K1 (subunidad GluR1), se han realizado de forma independiente estudios electrofisiológicos de fijación de voltaje de la expresión de receptores AMPA en ovocitos; en estos trabajos se reportaron corrientes de ~100 a 400 nA de amplitud, en homómeros de las diferentes subunidades, tras la aplicación de 1 mM Glu y/o 100 - 300  $\mu$ M KA. En el plásmido pGluR1-K1 se insertaron los promotores de transcripción universales T7 y T3, así como los sitios de unión para la enzima de restricción de Xho I. Realizaron la transcripción *in vitro* a partir de 1  $\mu$ g de ADN linearizado con Xho I, y para la transcripción utilizaron el kit comercial Stratagene con el promotor T3.

En la Figura 19 se presenta el mapa de restricción del vector pBluescript SK(-) o pBS SK(-), que corresponde al plásmido construido originalmente por Hollmann y colaboradores; la figura es la recopilación: del número, el orden y distancia entre los sitios de corte para las enzimas de restricción en un segmento clonado de ADN; así como los sitios de unión para promotores de transcripción, información necesaria para subclonar fragmentos del gen de interés; el mapa muestra la estructura general del plásmido:

- Origen de replicación pUC ori, necesario para replicarse dentro de células competentes de la cepa XL 1 Blue.
- Gen de resistencia al antibiótico ampicilina.
- Sitio múltiple de clonación (MCS), secuencia de varios sitios de corte para enzimas de restricción.
- Operón lacZ, que es un grupo de genes que ejercen la autorregulación de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, y que en combinación con los compuesto IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido), distinguen las células en que se ha insertado el gen de interés.
- Promotores universales de transcripción T7 y T3.

Al no lograr experimentalmente la expresión de los receptores AMPA GluR1 en los ovocitos de *X. laevis*, se realizó la linearización el cADN de GluR4 con la enzima de restricción Xho I, obteniéndose 6.0 ng/ $\mu$ L. La transcripción *in vitro* se realizó con el kit para el promotor T7 y no con kit para el promotor T3 como lo indica el mapa de restricción (Figura 19), por lo que no se obtuvo cARN de GluR4 (Cuadro 4). En la Figura 15 se aprecia que en el carril 3, no se observa la banda correspondiente al cARN de GluR4, de tal manera no se realizaron ensayos electrofisiológicos de este material genético.

Sin embargo antes de realizar la propagación y traducción de las diferentes subunidades de los preceptores AMPA, se debió realizar la secuenciación de cada una de estas; con finalidad de determinar el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) del ADN y verificar que la secuencia obtenida codifique para las diferentes subunidades de los receptores AMPA (Hayes, 2010).



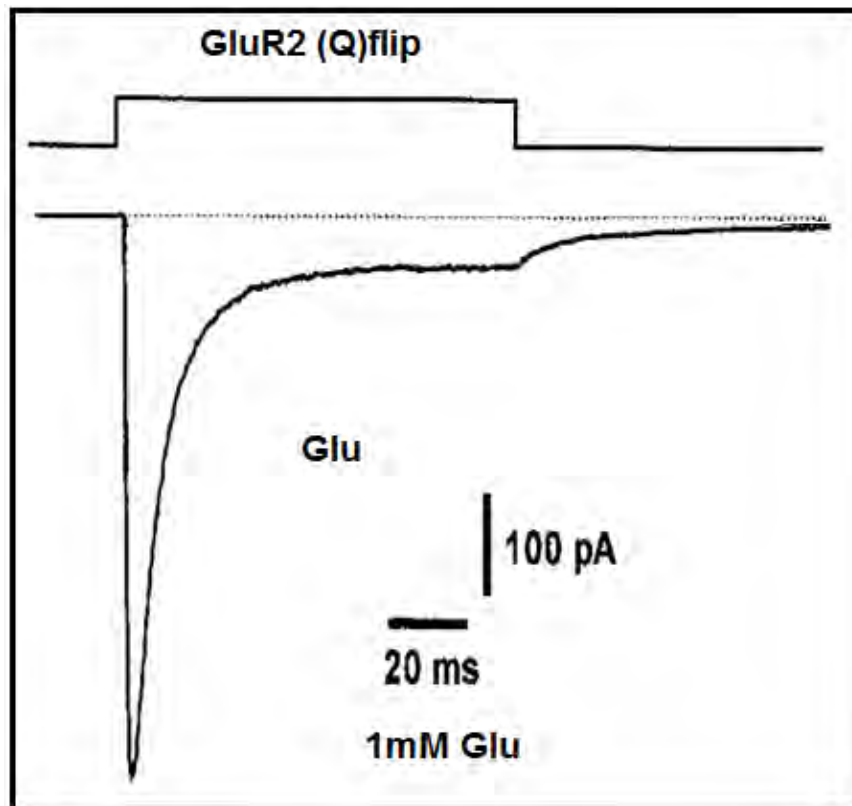
**Figura 19.** Mapa de restricción del plásmido pBS SK(-)  
([http://www.genomics.agilent.com/files/Vectors/Maps/pdf/pBluescript\\_SK\\_minus.pdf](http://www.genomics.agilent.com/files/Vectors/Maps/pdf/pBluescript_SK_minus.pdf)).

### 3. EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA

En los registros electrofisiológicos obtenidos experimentalmente (Figura 17a y b) se puede apreciar que, tanto en ovocitos inyectados con cARN de GluRs y ovocitos control, las amplitudes de corriente generadas por 1 mM Glu/5s presentan valores similares, por lo que se descarta que estas amplitudes de corrientes sean generadas por la apertura de canales sintetizados a partir del material genético inyectado.

A continuación, en las Figuras 20 y 21, se describen los registros electrofisiológicos de la expresión heteróloga de las subunidades GluR2 y GluR1, respectivamente, en ovocitos de *X. laevis*, obtenidos por dos grupos de investigación independientes.

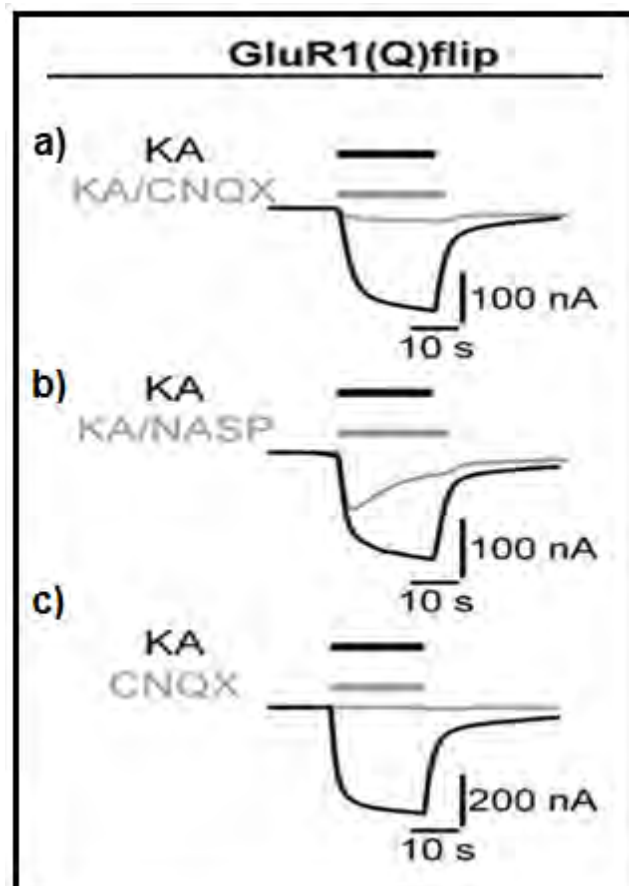
En la Figura 20, se muestra el registro electrofisiológico de homómeros de GluR2(Q)flip obtenido por Koike y colaboradores en 2000, donde se puede observar que la amplitud de corriente es de ~500 pA; además se aprecia la rápida cinética de apertura y desensibilización del receptor, tras la aplicación constante de 1 mM Glu.



**Figura 20.** Características electrofisiológicas de GluR2(Q)flip (Modificado de Koike y cols., 2000).



De forma independiente, Schmidt y colaboradores en 2009 realizaron la evaluación electrofisiológica del homómero de la subunidad GluR1(Q)flip (Figura 21) expresado en ovocitos de *X. laevis*. Se puede observar en la Figura 21a que tras la aplicación de 300  $\mu\text{M}$  KA por 20 s se generan corrientes de  $\sim 200$  nA, mismas que son prácticamente inhibidas por la coaplicación de 300  $\mu\text{M}$  KA y 10  $\mu\text{M}$  CNQX (antagonista selectivo de los receptores AMPA del grupo de las quinoxalina-2,3-dionas). En la Figura 21b se observa nuevamente una corriente de  $\sim 200$  nA con la aplicación de de 300  $\mu\text{M}$  KA por 20 s, que es inhibida parcialmente por la coaplicación de 300  $\mu\text{M}$  KA y 5  $\mu\text{M}$  NASP (naftil-acetil espermina), poliamina que actúa bloqueando el poro del canal. En la Figura 21c se observa la generación de corrientes de  $\sim 400$  nA que son inhibidas en su totalidad por la aplicación de 10  $\mu\text{M}$  CNQX.



**Figura 21.** Características electrofisiológicas de GluR1(Q)flip (Modificado de Schmidt y cols., 2009).

Al observar los resultados obtenidos experimentalmente (Figura 17a y b), se puede determinar que las amplitudes de corrientes que se muestran en los registros electrofisiológicos no concuerdan con los valores bibliográficos antes citados (Figura 20 y 21), así como con las características electrofisiológicas de la cinética de apertura y desensibilización del receptor en homómeros de GluR2 y GluR1 respectivamente.

Los registros de las corrientes de las Figura 17a y 17b, inducidas por 1 mM Glu/5s se pueden explicar por la presencia endógena de los receptores AMPA; esto es posible ya que en 2009 Schmidt y colaboradores demostraron que las 18 subunidades que forman la familia de iGluRs de mamíferos (cuatro subunidades AMPA, cinco subunidades KA, dos subunidades delta, y siete subunidades NMDA) se encuentran de forma endógena a nivel de mRNA en los ovocitos de *X. laevis*. La comparación de las secuencias de las subunidades de mamíferos (iGluRs) y de *X. laevis* (*XenGluRs*) mostró una identidad mayor al 80% (Figura 22).

Así mismo, Schmidt y colaboradores en 2009 reportaron las amplitudes de corrientes endógenas en ovocitos de *X. laevis*, tras la aplicación de agonistas glutamatérgicos, que variaban fuertemente no sólo entre distintos lotes de ovocitos, sino también en ovocitos del mismo lote, desde valores no detectables hasta corrientes de ~30 nA.

**Table 1.** Sequence identities between the amino acid sequences of glutamate receptor subunits from rat and the amino acid sequences encoded by cloned *X. laevis* glutamate receptor cDNA fragments

| PCR fragment     | Length [bp] | Sequence identity [%] |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
|------------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                  |             | GluR1                 | GluR2       | GluR3       | GluR4       | GluR5       | GluR6       | GluR7       | KA1         | KA2         | NR3A        | NR3B        | Delta1      | Delta2      |
| <i>XenGluR1</i>  | 530         | <b>82.4</b>           | 67.0        | 66.3        | 64.2        | 44.6        | 42.0        | 42.9        | 43.7        | 46.0        | 26.4        | 28.2        | 28.8        | 30.6        |
| <i>XenGluR2</i>  | 602         | 67.0                  | <b>90.0</b> | 68.3        | 68.5        | 36.2        | 40.5        | 40.7        | 41.4        | 44.0        | 25.3        | 25.3        | 27.6        | 31.2        |
| <i>XenGluR3</i>  | 551         | 69.9                  | 70.5        | <b>87.4</b> | 70.5        | 46.2        | 43.2        | 42.3        | 42.9        | 42.3        | 27.6        | 29.3        | 29.8        | 30.3        |
| <i>XenGluR4</i>  | 490         | 63.6                  | 69.1        | 72.7        | <b>85.8</b> | 49.7        | 47.5        | 47.2        | 45.6        | 43.1        | 28.8        | 30.8        | 32.7        | 35.9        |
| <i>XenGluR5</i>  | 541         | 39.9                  | 36.5        | 34.5        | 35.4        | <b>84.4</b> | 76.1        | 73.3        | 41.8        | 43.5        | 27.2        | 27.2        | 32.8        | 34.5        |
| <i>XenGluR6</i>  | 463         | 43.4                  | 44.7        | 43.7        | 40.8        | 73.2        | <b>89.6</b> | 75.8        | 44.7        | 44.0        | 27.6        | 28.9        | 36.7        | 35.4        |
| <i>XenGluR7</i>  | 489         | 59.3                  | 56.8        | 59.3        | 59.9        | 88.9        | 88.9        | <b>93.2</b> | 58.6        | 61.7        | 22.8        | 24.1        | 40.8        | 46.9        |
| <i>XenKA1</i>    | 507         | 47.6                  | 50.0        | 48.5        | 46.4        | 52.4        | 52.4        | 51.2        | <b>84.5</b> | 66.7        | 30.7        | 28.9        | 45.2        | 37.2        |
| <i>XenKA2</i>    | 416         | 45.7                  | 44.2        | 42.8        | 42.0        | 46.4        | 43.5        | 42.8        | 61.6        | <b>81.9</b> | 26.3        | 27.7        | 34.3        | 35.1        |
| <i>XenNR3A</i>   | 509         | 28.0                  | 21.9        | 21.3        | 27.8        | 22.5        | 29.0        | 32.0        | 29.0        | 28.4        | <b>60.3</b> | 27.4        | 30.2        | 24.3        |
| <i>XenNR3B</i>   | 482         | 32.5                  | 36.2        | 33.8        | 33.8        | 32.5        | 33.1        | 33.8        | 34.4        | 35.6        | <b>80.0</b> | <b>80.0</b> | 26.9        | 31.2        |
| <i>XenDelta1</i> | 485         | 26.9                  | 28.2        | 27.1        | 26.3        | 31.6        | 25.5        | 29.8        | 23.7        | 28.8        | 25.5        | 31.1        | <b>85.7</b> | 62.7        |
| <i>XenDelta2</i> | 507         | 36.3                  | 36.3        | 35.1        | 34.5        | 39.3        | 39.3        | 46.4        | 36.3        | 45.2        | 19.6        | 26.8        | 51.8        | <b>94.6</b> |

**Figura 22.** Porcentaje de identidad entre las diferentes subunidades de receptores iGluRs (Schmidt y cols., 2009).

Al no lograrse la expresión de receptores AMPA a partir del cARN de las diferentes subunidades, se realizó la extracción de ARN-total de hipocampo, material que se inyectó en ovocitos de *X. laevis* para inducir la expresión de receptores AMPA. Sin embargo, como se muestra en Figura 17c, no se generaron corrientes tras la aplicación de los agonistas glutamatérgicos, debido a la escasa proporción de mARN que codifica receptores AMPA en el ARN-total.

El mARN total debió ser purificado a partir del ARN-total utilizando kits comerciales de oligonucleótidos de Timina (oligo dT) en soportes de celulosa, ya que solo entre 1 y 5% del conjunto ARN-total, representa mARN. La purificación del mARN es posible debido a que en células eucariotas esta molécula presenta en su extremo 3' una extensión relativamente grande, de entre 200 a 300 nucleótidos de Adenina; esta secuencia conocida como poli(A<sup>+</sup>), se une al oligo dT permitiendo que se separe el mARN del resto del ARN-total, por cromatografía de afinidad (Hayes, 2010).

## **X. CONCLUSIONES**

Durante el desarrollo de este proyecto de investigación se lograron obtener los siguientes resultados:

- ✓ Fraccionar el veneno de 5 ejemplares de *C. spurius*, mediante una cromatografía de alta resolución en fase reversa.
- ✓ Propagar y purificar los plásmidos: GluR1 (GluR-K1, p59/2), GluR2 (pRB14) y GluR4 (pK46).
- ✓ Extraer de ARN- total de diversas zonas del cerebro de rata.

Al no lograr la expresión de receptores AMPA en ovocitos de *X. laevis* ni la evaluación de los componentes del veneno de *C. spurius*, no fue posible la comprobación de la hipótesis experimental. Por lo tanto y a sugerencia del Comité tutor, se realizó una investigación bibliográfica con el fin de proponer alternativas para la continuidad del proyecto y dar una respuesta a nuestra pregunta de investigación, las cuales se describen en el siguiente apartado de perspectivas.

## XI. PERSPECTIVAS

La diversidad química de los compuestos naturales con potencial uso terapéutico sigue siendo el motor de la industria farmacéutica en el descubrimiento de nuevos compuestos, que en su mayoría suelen ser metabolitos secundarios. Sin embargo, compuestos peptídicos han demostrado ser una fuente sustentable para el desarrollo de nuevas terapias, debido a las diversas complicaciones en la síntesis química de metabolitos secundarios.

Estos péptidos se encuentran en los venenos de: anémonas, medusas, ciempiés, arañas, escorpiones, caracoles del género *Conus*, cefalópodos, equinodermos, serpientes, lagartos, peces, ornitorrincos, y posiblemente en pulgas, mosquitos, sanguijuelas, garrapatas y en murciélagos vampiro. La gran diversidad de los péptidos está dada por la presión evolutiva en la mejora de la caza y/o defensa de los animales y ha sido acompañada con el desarrollo de mecanismos especializados para la inyección intravenosa de estos; estos mecanismos involucran el uso de colmillos, barbas, dientes modificados, arpones, nematocistos, espinas o aerosoles (Fry y cols., 2009).

Como anteriormente se ha descrito, las toxinas purificadas del veneno de los caracoles *Conus sp.* han demostrado ser una fuente para el desarrollo de nuevas herramientas de investigación y potenciales agentes terapéuticos. Solo 0.1% de péptidos de los caracoles *Conus sp.* se han caracterizado farmacológicamente, y algunos de ellos presentan un potencial uso terapéutico como se muestra en el Cuadro 6 (Lewis y cols., 2012).

**Cuadro 6.** Conotoxinas con potencial uso terapéutico (Modificado de Lewis y cols., 2012).

| Clase        | Blanco molecular (efecto de la toxina)     | Nombre  | Potencial uso terapéutico                  |
|--------------|--|---------|--|
| $\omega$     | Ca <sub>v</sub> 2.2 (inhibidor)            | MVIIA   | Dolor crónico (Vía intratecal; fase IV)    |
| $\mu$        | Na <sub>v</sub> (inhibidor)                | SIIIA   | Dolor crónico (Vía intravenosa)            |
| $\mu$ O      | Na <sub>v</sub> 1.8 (inhibidor)            | MrVIB   | Dolor crónico (Vía intratecal/intravenosa) |
| $\kappa$     | K <sub>v</sub> (inhibidor)                 | PVIIA   | Reperusión cardiaca                        |
| $\chi$       | NET (inhibidor)                            | Xen2174 | Dolor crónico (Vía intratecal; fase II)    |
| $\alpha$     | nAChR (inhibidor)                          | Vc1.1   | Dolor crónico (Vía intravenosa)            |
| $\rho$       | A <sub>1</sub> -Adrenoreceptor (inhibidor) | TIA     | Cardiovascular                             |
| Conantokina  | NMDAR (antagonista)                        | Con-G   | Dolor crónico (Vía intratecal)             |
| Conopresina  | Receptor a Vasopresina ( $\zeta$ ?)        | Cono-G  | Cardiovascular                             |
| Contulankina | Receptor Neurotensina (agonista)           | Cont-G  | Dolor crónico (Vía intratecal; fase IV)    |

Para conocer el blanco molecular y la actividad biológica de las conotoxinas es indispensable realizar estudios electrofisiológicos. En el caso particular de este proyecto es necesario incluir diversas técnicas de biología molecular que permitan la expresión heteróloga de los AMPAR en ovocitos de *X. laevis* (a continuación se enlistan), con el fin de determinar si dentro del veneno de *C. spurius* hay compuestos que modulen a los AMPAR.

- i. Secuenciar los plásmidos de las diferentes subunidades de los receptores AMPA.
- ii. Linearizar los plásmidos de las diferentes subunidades de receptores AMPA con la enzima de restricción Xho I, y realizar la transcripción *in vitro* utilizando el promotor T3 y no T7; como lo indica el mapa de restricción del vector pBS SK(-)(Figura 19).
- iii. Purificar el mRNA de hipocampo, utilizando kits comerciales de oligonucleótidos de Timina (oligo dT) en soportes de celulosa, mediante cromatografía de afinidad (Hayes, 2010).
- iv. Realizar la expresión heteróloga de AMPAR en ovocitos de *X. laevis* y evaluar las propiedades electrofisiológicas de los AMPAR, utilizando agonistas (150  $\mu$ M KA) y antagonistas (10  $\mu$ M DNQX) selectivos para estos receptores.
- v. Comparar la cinética de apertura y desensibilización de los receptores AMPA con las descritas en la bibliografía, de tal forma que se confirme que las corrientes producidas sean por los receptores AMPA sintetizados a partir del material exógeno y no se confundan con las corrientes endógenas que presenten los ovocitos (Koike y cols., 2000; Schmidt y cols., 2009).
- vi. Evaluar las fracciones obtenidas del veneno de *C. spurius*, siguiendo los protocolos antes descritos en la sección de metodología.

Los experimentos antes descritos, pudieran ser una alternativa para la expresión de los receptores AMPA en ovocitos de *X. laevis*, y evaluar sobre estos los componentes del veneno de *C. spurius*, permitiendo así que se realice la comprobación de la hipótesis experimental, en un nuevo proyecto de investigación.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar MB, Luna-Ramírez KS, Echeverría D, Falcón A, Olivera BM, Heimer de la Cotera EP, Maillo M. 2008. Conorfamide-Sr2, a gamma-carboxyglutamate-containing FMRFamide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks. *Peptides*. 29(2): 186–195.

Ashby MC, Daw MI, Isaac JTR. 2008. AMPA Receptors. (Gereau RW y Swanson GT, eds.), 1-44. Humana Press Inc.

Barbon A, Barlati S. 2011. Glutamate receptor RNA editing in health and disease. *Biochemistry*. 76(8): 882-889.

Buczek O, Bulaj G, Olivera BM. 2005. Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cell. Mol. Life Sci*. 62: 3067–3079.

Clench W. J. 1942. The genus *Conus* in the western Atlantic. *Johnsonia*. 1(6):1-40

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 162(1): 156-159.

Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT. 2010. Long-term depression in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci*. 11(7):459-473

Conticello SG, Kowalsman ND, Jacobsen C, Yudkovsky G, Sato K, Elazar Z, Peterse CM. 2003. The prodomain of secreted hydrophobic mini-protein facilitates its export from the endoplasmic reticulum by hitchhiking on sorting receptors. *J. Biol. Chem*. 278: 26311-26314.

Contractor A, Swanson GT. 2008. Kainate Receptors. (Gereau RW y Swanson G T. eds.), 99-158. Humana Press Inc.

Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR. 2007. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci*. 8: 101-113.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptors ion channels. *Pharmacol. Rev*. 51: 7-61.

Dreixler JC, Leonard JP. 1997. Effects of external calcium on zinc modulation of AMPA receptors. *Brain Res*. 752: 170-174.

Fleming J, England P. 2010. Developing a complete pharmacology for AMPA receptors: A perspective on subtype-selective ligands. *Bioorg. Med. Chem.* 18: 1381-1387.

Flores Torres, A. 2009. Purificación y caracterización de péptidos del veneno del caracol marino *Conus delesserti*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Marina. UNAM.

Franco A, Pisarewicz K, Moller C, Mora D, Fields GB, Marí F. 2006. Hyperhydroxylation: a new strategy for neuronal targeting by venomous marine molluscs. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 43: 83–103.

Fry BG, Roelants K, Champagne DE, Scheib H, Tyndall JD, King GF, Nevalainen TJ, Norman JA, Lewis RJ, Norton RS. 2009. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10: 483–511.

Gowd KH, Twede V, Watkins M, Krishnan KS, Teichert RW, Bulaj G, Olivera BM. 2008. Conantokin-P, an unusual conantokin with a long disulfide loop. *Toxicon* 52: 203–213.

Gray WR, Luque A, Olivera BM, Barrett J, Cruz LJ. 1988. Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *J. Biol. Chem.* 256: 4734–4740.

Grosskreutz J, Zoerner A, Schlesinger F, Krampfl K, Dengler R, Bufler J. 2003. Kinetic properties of human AMPA-type glutamate receptors expressed in HEK293 cells. *Eur. J. Neurosci.* 6: 1173-1178.

Haack J, River J, Parks T, Mena E, Cruz L, Olivera BM. 1990. A  $\gamma$ -carboxyglutamate containing peptide with N-methyl-D-aspartate antagonist activity. *J. Biol. Chem.* 265: 6025-6029.

Halai R, Craik DJ. 2009. Conotoxins: natural product drug leads. *Nat. Prod. Rep.* 26: 526-536.

Hampson DR, Rose EM, Antflick JE. 2008. The Structures of Metabotropic Glutamate Receptors. (Gereau RW y Swanson GT, eds.), 363-386. Humana Press Inc.

Hassel B, Dingledine R. 2006. Glutamate. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Capítulo 15. 7<sup>ed</sup>. ED. Elsevier.

Hayes. 2010. The Function and Organization of Plasmids. *E. coli* plasmid vectors. Methods and Applications. (Casali N and Preston A, eds.), 1-17, Humana Press Inc.

Hollmann M, O'Shea-Geenfield A, Rogers S W, Heinemann S. 1989. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. Nature. 342: 643-648.

Hume R, Dingledine I, Heineman R. 1991. Identification of site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. Science. 235:1028-1032.

Imperial JS, Chen P, Sporning A, Terlau H, Daly NL, Craik DJ, Alewood PF, Olivera BM. 2008. Tyrosine-rich conopeptides affect voltage-gated K channels. J. Biol. Chem. 283 (34): 23026–23032.

Jimenez EC, Donevan S, Walker C, Zhou LM, Nielsen J, Cruz LJ, Armstrong H, White HS, Olivera BM. 2002. Conantokin-L, a new NMDA receptor antagonist: determinants for anticonvulsant potency. Epilepsy Res. 51:73-80.

Kaas Q, Westermann JC, Craik DJ. 2010. Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer. Toxicon. 55(8): 1491-1509.

Kohler M, Kornau HC, Seeburg PH. 1994. The organization of the gene for the functionally dominant alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor subunit GluR-B. J. Biol. Chem. 269(26):17367–17370.

Koike M, Tsukada S, Tsuzuki K, Kijima H, Ozawa S. 2000. Regulation of kinetic properties of GluR2 AMPA receptor channels by alternative splicing. J. Neurosci. 20(6): 2166-2174.

Layer RT, Wagstaff JD, White HS. 2004. Conantokins: peptide antagonists of NMDA receptors. Curr. Med. Chem. 11: 3073-3084.

Leuschner WD, Hoch W. 1999. Subtype-specific assembly of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits is mediated by their N-terminal domains. J. Biol. Chem. 274(24): 16907–16916.

Lewis JR, Dutertre S, Vetter I, MacDonald JC. 2012. *Conus* venom peptide pharmacology. Pharmacol. Rev. 62(2): 260-298.



Limon A, Reyes-Ruiz JM, Eusebi F, Miledi R. 2007. Properties of GluR3 receptors tagged with GFP at the amino or carboxyl terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 39: 15526-15530.

López-Vera JE. 2005. Actividad biológica de péptidos de caracoles de la superfamilia Conoidea. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. UNAM.

Maillo M, Aguilar MB, López-Vera E, Craig AG, Bulaj G, Olivera BM, Heimer de la Cotera EP. 2002. Conorfamide, a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides. *Toxicon.* 40(4):401-407.

Mayer ML. 2006. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature.* 440(7083): 456-462.

McIntosh JM, Olivera BM, Cruz LJ, Gray WR. 1984.  $\gamma$ -Carboxyglutamate in a neuroactive toxin. *J. Biol. Chem.* 259: 14343-14346.

Meyer L. 2001. Characterization of the venom of the marine snail *Conus delessertii*. Diplomarbeit. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Miledi R, Eusebi F, Martínez-Torres A, Palma E, Trettel F. 2002. Expression of functional neurotransmitter receptors in *Xenopus* oocytes after injection of human brain membranes. *Neuroscience.* 99(20): 13238-13242.

Neugebauer V. 2008. Group III Metabotropic Glutamate Receptors (mGlu4, mGlu6, mGlu7, and mGlu8) (Gereau RW y Swanson G T.eds.), 489-508. Humana Press Inc.

Nicoll RA, Tomita S, Brecht DS. 2006. Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. *Science.* 311(5765): 1253-1256.

Olivera BM, Cruz L. 2001. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon.* 39: 7-14.

Olivera B.M. 2006. *Conus* peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *J. Biol. Chem.* 281: 31173-31177.

Petralia RS, Wenthold RJ. 2008. NMDA Receptors (Gereau RW y Swanson G T.eds.), 45-98. Humana Press Inc.

Rigby A, Baleja JD, Furie BC, Furie B. 1997. Three-dimensional structure of a gamma-carboxyglutamic acid-containing conotoxin, conantokin G, from the marine snail *Conus geographus*: the metal-free conformer. *Biochemistry*. 36(23): 6906-6914.

Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, White HS. 2012. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem. Int.* 61(2012): 546–558.

Saugstad JA, Ingram SL. 2008. Group I Metabotropic Glutamate Receptors (mGlu1 and mGlu5) (Gereau RW y Swanson GT, eds.), 387-464. Humana Press Inc.

Schmidt C, Klein C, Hollman M. 2009. *Xenopus laevis* oocytes endogenously express all subunits of the ionotropic glutamate receptors family. *J. Mol. Biol.* 390: 182-195.

Shohami E, Biegon A .2013. Novel approach to the role of NMDA receptors in traumatic brain injury. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. PMID: 24168367

Sommer B, Seeburg PH. 1992. Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *TIPS*.13: 291-296.

Strutz-Seebohm N, Werner M, Madsen DM, Seebohm G, Zheng Y, Walker CS, Maricq AV, Hollmann M. 2003. Functional analysis of *Caenorhabditis elegans* glutamate receptor subunits by domain transplantation. *J. Biol. Chem.* 278(45): 44691–44701.

Teichert RW, Jimenez EC, Twede V, Watkins M, Hollmann M, Bulaj G, Olivera BM. 2007. Novel conantokins from *Conus parius* venom are specific antagonists of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* 282: 36905–36913.

Terhag J, Cavara NA, Hollmann M. 2010. Cave Canalem: How endogenous ion channels may interfere with heterologous expression in *Xenopus laevis*. *Methods*. 51: 66-74.

Terlau H, Olivera BM. 2004. *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* 84: 41-68.

Twede VD, Teichert RW, Walker CS, Gruszczyński P, Kaźmierkiewicz R, Bulaj G, Olivera BM. 2009. Conantokin-Br from *Conus brethinghami* and selectivity determinants for the NR2D subunit of the NMDA receptor. *Biochemistry.* 48: 4063–4073.

Verkhratsky A, Kirchhoff F. 2007. Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *J. Anat.* 210: 651-660.

Walker CS, Jensen S, Ellison M, Matta JA, Lee WY, Imperial JS, Duclos N, Brockie PJ, Madsen D, Isaac JTR, Olivera B, Maricq AV. 2009. A novel *Conus* snail polypeptide causes excitotoxicity by blocking desensitization of AMPA receptors. *Curr. Biol.* 19: 900-908.

Walker C, Steel D, Jacobsen RB, Lirazan MB, Cruz LJ, Hooper D, Shetty R, De la Cruz RC, Nielsen JS, Zhou LM, Bandyopadhyay P, Craig AG, Olivera BM. 1999. The T-superfamily of conotoxins. *J. Biol. Chem.* 274: 30664-30671.

Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J II, Niedzielski AS. 1996. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J. Neurosci.* 16(6): 1982–1989.

White S, McCabe RT, Armstrong H, Donevan SD, Cruz LJ, Abogadie C, Torres J, Rivier JE, Paarmann I, Hollmann M, Olivera BM. 2000. In vitro and in vivo characterization of Conantokin-R, a selective NMDA receptor antagonist isolated from the venom of the fish-hunting snail *Conus radiatus*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 425-432.

Yamada K, Tang C-M. 1993. Benzothiadiazides inhibit rapid glutamate receptor desensitization and enhance glutamatergic synaptic currents. *J Neurosci.* 13: 3904-3915.

Youn DH, Gerber G, Sather WA. 2013. Ionotropic glutamate receptors and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in long-term potentiation of spinal dorsal horn synapses and pain hypersensitivity. *Neural Plast.* 2013: 654257.

Zhou LM, Szendrei GI, Fossom LH, Maccacchini ML, Skolnick P, Otvos L Jr. 1996. Synthetic analogues of conantokin-G: NMDA antagonists acting through a novel polyamine-coupled site. *J. Neurochem.* 66(2): 620-628.

Animal Diversity website, University of Michigan Museum of Zoology.  
<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/index.html>

ConoServer, a database for conopeptides.  
<http://www.conoserver.org/?page=classification&type=genesuperfamilies>

<http://www.chrisparsons.de/Chris/glutamate.htm>

[http://genomics.agilent.com/files/Vectors/Maps/pdf/pBluescript\\_SK\\_minus.pdf](http://genomics.agilent.com/files/Vectors/Maps/pdf/pBluescript_SK_minus.pdf)

[http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Home/HPLCCols\\_VydacCols\\_p70to71\\_84to94.pdf](http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Home/HPLCCols_VydacCols_p70to71_84to94.pdf)

<http://www.jaxshells.org/spur.htm>