



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO MODELO *IN VIVO* PARA EVALUAR
CONOTOXINAS CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA SOBRE CANALES DE POTASIO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUIS ÁNGEL MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.

DR. IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2016.



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO MODELO *IN VIVO* PARA EVALUAR
CONOTOXINAS CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA SOBRE CANALES DE POTASIO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUIS ÁNGEL MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.

DR. IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2016.



OFICIO FCIE/DEP/132/2016

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **30 de noviembre de 2015** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **MARTÍNEZ HERNÁNDEZ LUIS ÁNGEL** con número de cuenta **304099537** con la tesis titulada "**Drosophila melanogaster como modelo in vivo para evaluar conotoxinas con actividad antagónica sobre canales de potasio**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA:**

Presidente: DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO
Vocal: DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ
Secretario: DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR
Suplente: DRA. ELISA CARRILLO FLORES
Suplente: DR. IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de marzo de 2016

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría (No. de Becario 294546).

A mi tutor el Dr. Estuardo López Vera, así como a mi comité tutor, el Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar y el Dr. Ignacio López González, por la supervisión y sus valiosas aportaciones para la conclusión de este proyecto.

A la Dra. Elisa Carrillo Flores, por llevar a cabo la evaluación electrofisiológica de las múltiples muestras, sus acertadas observaciones y asesorías.

A la Dra. Magda Carvajal Moreno, por sus valiosísimas observaciones y recomendaciones, además de las extensas charlas sobre proyectos.

Al Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez, por la donación del material biológico y sus invaluable observaciones.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	01
LISTA DE TABLAS	07
RESUMEN	08
ABSTRACT	09
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	11
ANTECEDENTES	12
I. Canales iónicos	12
I.1 Canales de potasio	13
I.2 Canales de potasio activados por voltaje (Kv)	14
I.3 El canal de potasio EAG (Kv10.1)	17
II. Superfamilia Conoidea	19
III. El veneno de los caracoles <i>Conus</i>	21
IV. Farmacología de los péptidos de <i>Conus</i>	24
Conotoxinas con actividad sobre:	
IV.1 Canales iónicos activados por ligando	24
IV.2 Receptores acoplados a proteínas G	25
IV.3 Transportadores de neurotransmisores	26
IV.4 Canales de calcio activados por voltaje	26
IV.5 Canales de sodio activados por voltaje	27
IV.6 Canales de potasio activados por voltaje	29
IV.7 Conopéptidos y sus blancos moleculares	30
V. Especies de interés: <i>Conus spurius</i> y <i>Conus fergusonii</i>	32
VI. Bioensayos con el veneno de <i>Conus</i>	34
VII. <i>Drosophila melanogaster</i>	35
METODOLOGÍA	40
RESULTADOS	47
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIONES	86
PERSPECTIVAS	87
REFERENCIAS	98
ANEXOS	99

LISTA DE FIGURAS

N°	Título	Página
1	Estados conformacionales de los canales iónicos, canal de potasio. Tomado de Schmitt <i>et al.</i> , 2014.	12
2	Clasificación de los canales de potasio basado en la estructura de sus subunidades α . A) Canales con 6 segmentos transmembranales y un poro (6TM-1P); B) canales con 7 segmentos transmembranales y un poro (7TM-1P); C) canales con 2 segmentos transmembranales y 1 poro (2TM-1P); D) canales con cuatro segmentos transmembranales y dos poros (4TM-2P). Modificado de Benarroch, 2009.	14
3	Estructura del canal iónico de potasio activado por voltaje (Kv). A) Subunidad α con sus seis segmentos transmembranales (S1-S6). La secuencia de 22 aminoácidos del extremo N-terminal participa en la inactivación tipo N, mecanismo llamado de “bola y cadena”, ocluyendo el poro del canal. El segmento S4 es el sensor de voltaje, que está cargado positivamente, pues contiene residuos de Arginina y Lisina. B) Cuatro subunidades se ensamblan para formar el canal. Modificado de Flórez <i>et al.</i> , 2008.	17
4	Estructura de la subunidad α del canal de potasio Eag1 (Kv10.1). Seis segmentos transmembranales y los dominios amino y carboxilo que forman una subunidad α . Dominio de unión a calmodulina (domino CaM, rojo), el dominio Per-ARNT-Sim (dominio PAS, amarillo), un sitio de unión a nucleótidos cíclicos (dominio cNBHD, verde) y las uniones carboxilo y amino (azul). Modificado de Sahoo <i>et al.</i> , 2012.	18
5	Aparato venenoso de los caracoles de la superfamilia Conoidea. A) Conducto venenoso conectado al esófago y que se prolonga con la probóscide, órgano extensible el cual permite mantener y proyectar al diente radular con forma de arpón, que está cargado con veneno. Los dientes radulares se almacenan en el saco radular. B) Diente radular de la especie <i>Conus striatus</i> . Modificado de Favreau & Stöcklin, 2009.	20
6	Comparación del número de toxinas (izquierda) y especies (derecha) conocidas en las tres principales familias que integran a la superfamilia Conoidea. Modificado de Puillandre & Holford, 2010.	20
7	Distribución de los caracoles <i>Conus</i> en las zonas tropicales y subtropicales. La barra de colores de la parte inferior izquierda indica la diversidad de especies en el planeta. Tomado de Biodiversitymapping, 2015.	20
8	Clasificación de las conotoxinas en superfamilias y familias. Las superfamilias génicas se clasifican basándose en la secuencia señal de los precursores de las toxinas, altamente conservadas (sólo se muestran 16 de las 26 superfamilias descritas hasta el 2014). La clasificación en familias farmacológicas se basa en el blanco molecular por el cual presentan afinidad (se muestran 11 de las 12 familias descritas). Patrones de cisteínas que pueden presentar las superfamilias de conotoxinas (en número romano). Tomado de Akondi <i>et al.</i> , 2014.	22

9	Topología de las subunidades α que forman un canal de sodio (Nav). Los canales de sodio están formados por cuatro subunidades o dominios (D1, D2, D3 y D4). Cada una de ellas está conformada por seis segmentos transmembranales (S1-S6), el segmento 4 es el sensor de voltaje. Se muestran los sitios de unión de las conotoxinas pertenecientes a las familias μ (café), μO (azul) y δ (rojo) Heinemann & Leipold, 2007.	28
10	Distribución de los caracoles <i>Conus spurius</i> (izquierda) y <i>Conus fergusonii</i> (derecha). Tomado de Clinical Toxinology Resources, 2015.	32
11	Ciclo de vida de la mosca de la fruta <i>Drosophila melanogaster</i> . Modificado de FlyMove, 2015.	36
12	Estrategia experimental del proceso de inyección de las larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> .	42
13	Cuadro de <i>Punnett</i> de la cruce realizada. Se utilizaron hembras vírgenes C(1)DX, y^1 , f^1 y fueron cruzadas con machos de la cepa <i>eag</i> . Los únicos genotipos y con los que se trabajó fueron $X^{K+}Y$ (Machos) y $X^A X Y$ (Hembras), el superíndice $K+$ indica la mutación del canal de potasio. Los genotipos restantes no son viables, debido a que $X^A X X^{K+}$ muere durante el desarrollo en huevo y el genotipo YY no es posible.	43
14	Sobrevivencia de la cruce: C(1)DX, y^1 , f^1 X <i>eag</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> por sexo; hembras (azul) y machos (rojo) después de la inyección con las conotoxinas SrIB, PVIIA, y RIIIK con sus diferentes concentraciones. Cada punto representa la media \pm E.E., para SrIB (F=4.36, $p < 0.05$), PVIIA (F=6.23, $p < 0.05$) y RIIIK (F=0.47, $p > 0.05$). Además se incluyen los resultados de las inyecciones con los controles; solución salina 0.9%, albúmina 100 μM y saxitoxina (STX) 1 μM .	48
15	Efecto de la conotoxina PVIIA sobre los estadios de <i>Drosophila melanogaster</i> . Hembras (izquierda) y machos (derecha) producto de la cruce C(1)DX, y^1 , f^1 X <i>eag</i> , cada punto representa la Media \pm E.E.	50
16	Efecto de la conotoxina RIIIK sobre los estadios de <i>Drosophila melanogaster</i> después de su inyección. Hembras (izquierda) y machos (derecha) producto de la cruce C(1)DX, y^1 , f^1 X <i>eag</i> , cada punto representa la Media \pm E.E.	50
17	Efecto de la conotoxina SrIB sobre los estadios de <i>Drosophila melanogaster</i> . Hembras (izquierda) y machos (derecha) producto de la cruce C(1)DX, y^1 , f^1 X <i>eag</i> , cada punto representa la Media \pm E.E.	51
18	Efecto de la Saxitoxina [1 μM] sobre los estadios de <i>Drosophila melanogaster</i> . Hembras (izquierda) y machos (derecha) producto de la cruce C(1)DX, y^1 , f^1 X <i>eag</i> , cada punto representa la Media \pm E.E.	51
19	Perfil cromatográfico del veneno de <i>C. fergusonii</i> a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 5 a 100% de solución B en 95 minutos con un flujo de 1 mL/min ("línea roja"). Los corchetes (color azul) indican el tiempo de colecta de cada fracción, enumeradas de F0 a F8, iniciando la colecta a partir del minuto 5 al 10 para la F0, la colecta de cada fracción subsecuente por 10 minutos.	52

- 20** Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de las fracciones del veneno de *Conus fergusonii* a una concentración de 2.5 mg/mL. Se inyectó a [1.25 mg/mL] la fracción F4, y las fracciones F5 a F8 a la concentración que presentaron durante su cuantificación. **54**
- 21** Efecto de la inyección de las fracciones del veneno de *Conus fergusonii* sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster*. Todas las fracciones se inyectaron a una concentración de 2.5 mg/mL a excepción de la fracción F4 cuya concentración fue de 1.25 mg/mL y las fracciones F5 a F8 a la concentración que presentaron durante su cuantificación. **55**
- 22** Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de las fracciones F0 a F4 de *Conus fergusonii* con una concentración de ~0.83 mg/mL. **56**
- 23** Efecto de la inyección de las distintas fracciones del veneno de *Conus fergusonii* sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster* a una concentración de ~0.83 mg/mL. **57**
- 24** Perfil cromatográfico del veneno de *C. spurius* a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 5 a 100% de solución B en 95 minutos con un flujo de 1 mL/min (“línea roja”). Los corchetes (color azul) indican el tiempo de colecta de cada fracción, enumeradas de F0 a F8. Iniciando la colecta a partir del minuto 5 al 10 para la F0, la colecta de cada fracción subsecuente fue durante 10 minutos. **58**
- 25** Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de las fracciones del veneno de *Conus spurius* a una concentración de ~0.83 mg/mL para F2, F3, F4 y F5. Las fracciones F0, F1, F6, F7 y F8 se inyectaron a la concentración registrada durante su cuantificación. **60**
- 26** Efecto de la inyección de las distintas fracciones del veneno de *Conus spurius* en los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster*. Las fracciones 2, 3, 4 y 5 se inyectaron a una concentración de ~0.83 mg/mL y las fracciones 0, 1, 6, 7 y 8 a la concentración registrada durante su cuantificación. **61**
- 27** Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F2 del veneno de *C. fergusonii* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 15 a 35% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según su tiempo de retención. **62**
- 28** Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F3 del veneno de *C. fergusonii* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 25 a 45% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según su tiempo de retención. **63**
- 29** Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de las subfracciones 17-23 de la fracción F3 del veneno de *C. fergusonii* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 25 a 45% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según sus tiempos de retención. **64**

- 30** Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F5 del veneno de *C. fergusonii* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 40 a 60% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/ min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según sus tiempos de retención. **65**
- 31** Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F2 del veneno de *Conus spurius* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 15 a 35% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según su tiempo de retención. **66**
- 32** Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F3 del veneno de *C. spurius* monitoreado a una longitud de 220 nm. Con un gradiente lineal que va de 25 a 45% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/ min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según su tiempo de retención. **67**
- 33** Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F6 del veneno de *C. spurius* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 55 a 75% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según su tiempo de retención. **68**
- 34** Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de los componentes mayoritarios de las fracciones: F2 (T16+17), F3 (T17+18+19) y F5 (T4 y T14) del veneno de *Conus fergusonii*. Cada componente se resuspendió en 50 µL de solución salina 0.9%, a excepción del componente T16+17 que se resuspendió en 1.5 mL. **70**
- 35** Efecto de la inyección de los componentes mayoritarios de las fracciones; F2 (T16+17), F3 (T17+18+19) y F5 (T4 y T14) del veneno de *Conus fergusonii* sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster*. Cada componente se resuspendió en 50 µL de solución salina 0.9%, a excepción de T16+17 que se resuspendió en 1.5 mL. **71**
- 36** Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de los componentes mayoritarios de las fracciones; F2 (T12) y F3 (T11, T13 y T18) del veneno de *Conus spurius*. El componente T12 se resuspendió en 50 µL de solución salina 0.9%, y los componentes T11, T13 y T18 en 100 µL. **73**
- 37** Efecto de los componentes mayoritarios de las fracciones: F2 (T12) y F3 (T11, T13 y T18) del veneno de *Conus spurius* sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster*. El componente T12 se resuspendió en 50 µL de solución salina 0.9%, y los componentes T11, T13 y T18 en 100 µL. **74**
- 38** Corrientes del canal de potasio $K_v10.1$. (A) Las corrientes control de potasio (IK). (B) Las corrientes de mantenimiento desde un potencial de -80 mV, el pulso de prueba se generó desde -50 mV, con incrementos de 10 mV hasta 50 mV. La IK después de la aplicación de solución salina 0.9% fue generada como en A. **75**
- 39** Actividad del componente T16+17 de la fracción F2 del veneno de *Conus fergusonii*. (A) La corriente control de potasio (IK) (izquierda). Aplicación del componente T16+17 (en medio). Efecto reversible después del lavado (derecha). **76**

- (B) Gráfica de las corrientes contra el voltaje de los registros en A. La representación de los resultados de este componente es de un ensayo.
- 40** Actividad del componente T17+18+19 de la fracción F3 del veneno de *Conus fergusonii*. (A) La corriente control de potasio (IK) (izquierda). Aplicación del componente T17+18+19 (en medio). Efecto reversible después del lavado (derecha). (B) Gráfica de las corrientes contra el voltaje de los registros en A. La representación de los resultados de este componente es de un ensayo. **76**
- 41** Actividad del componente T4 de la fracción F5 del veneno de *Conus fergusonii*. (A) La corriente control de potasio (IK) (izquierda). Aplicación del componente T4 (en medio). Efecto irreversible después del lavado (derecha). (B) Gráfica de las corrientes contra el voltaje de los registros en A. La representación de los resultados es de tres ensayos. **77**
- 42** Actividad del componente T14 de la fracción F5 del veneno de *Conus fergusonii*. (A) La corriente control de potasio (IK) (izquierda). Posterior a la aplicación del componente T4 (en medio). Y la reversibilidad del efecto después del lavado (derecha). (B) Corrientes contra el voltaje de los registros en A. La representación de los resultados es de un ensayo. **77**
- 43** Actividad de la conotoxina PVIIA en canales Kv10.1. (A) La corriente control de potasio (IK) (izquierda). En presencia de la conotoxina PVIIA (derecha). Los registros fueron realizados como en la figura 36. (B) Gráfica de las corrientes contra el voltaje de los registros en A. La representación de los resultados de la conotoxina PVIIA es de un ensayo. **78**
- 44** Supervivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F2 de *Conus fergusonii*, con los cuales no se observó un efecto diferencial en la supervivencia igual o mayor al 13%. El volumen en el cual fueron resuspendidos cada uno de los componentes fue de 50 μ L de solución salina 0.9%. **100**
- 45** Efecto sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster* después de llevar a cabo la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F2 de *Conus fergusonii*, los cuales no presentaron un efecto diferencial en la supervivencia igual o mayor al 13%. El volumen en el cual fueron resuspendidos cada uno de los componentes fue de 50 μ L de solución salina 0.9%. **101**
- 46** Supervivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F3 de *Conus fergusonii*, con los cuales no se observó un efecto diferencial en la supervivencia igual o mayor al 13%. El volumen en el cual fueron resuspendidos cada uno de los componentes fue de 50 μ L de solución salina 0.9%. **101**
- 47** Efecto sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster* después de llevar a cabo la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F3 de *Conus fergusonii*, los cuales no presentaron un efecto diferencial en la supervivencia igual o mayor al 13%. El **102**

volumen en el cual fueron resuspendidos cada uno de los componentes fue de 50 μ L de solución salina 0.9%.

- 48** Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F5 de *Conus fergusonii*, con los cuales no se observó un efecto diferencial en la sobrevivencia igual o mayor al 13%. El volumen en el cual fueron resuspendidos cada uno de los componentes fue de 50 μ L de solución salina 0.9%. **102**
- 49** Efecto sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster* después de llevar a cabo la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F5 de *Conus fergusonii*, los cuales no presentaron un efecto diferencial en la sobrevivencia igual o mayor al 13%. El volumen en el cual fueron resuspendidos cada uno de los componentes fue de 50 μ L de solución salina 0.9%. **103**
- 50** Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de los componentes mayoritarios de las fracciones; F2 (T21), F3 (T5, T6, T8 y T24) y F6 (T7 y T8) de *Conus spurius*, con los cuales no se observó un efecto diferencial en la sobrevivencia igual o mayor al 13%. El volumen de solución salina 0.9% en que fueron resuspendidos fue de 50 μ L, pero T6 y T24 que fueron resuspendidos en 100 μ L y T8 que lo fue en 300 μ L con 5% de DMSO, todos ellos de la fracción F3. **104**
- 51** Efecto sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster* después de inyectar los componentes mayoritarios de las fracciones; F2 (T21), F3 (T5, T6, T8 y T24) y F6 (T7 y T8) de *Conus spurius*, sin un efecto diferencial en la sobrevivencia $\geq 13\%$. El volumen de solución salina 0.9% en que fueron resuspendidos fue de 50 μ L, pero T6 y T24 que fueron resuspendidos en 100 μ L y T8 que lo fue en 300 μ L con 5% de DMSO, todos ellos de la fracción F3. **105**
- 52** Muestra el efecto de la Saxitoxina (1 μ M) en la sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster*. Cada punto representa la media \pm E.E. **106**
- 53** Efecto sobre los estadios de las cepas *yw* y *eag* de *Drosophila melanogaster* cuando se inyectó la Saxitoxina (1 μ M). Cada punto representa la media \pm E.E. **106**

LISTA DE TABLAS

N°	Título	Página
1	Patrones de residuos de cisteínas en conotoxinas. De izquierda a derecha se muestra el nombre, la definición del patrón o esqueleto de residuos de cisteínas, el número y la conectividad de las cisteínas. Modificado de ConoServer, 2015.	23
2	Conopéptidos con uno o ningún puente disulfuro y el blanco molecular por el cual presentan afinidad (en caso de conocerse) (Lewis <i>et al.</i> , 2012; Robinson & Norton, 2014).	31
3	Péptidos caracterizados químicamente a nivel de toxina madura provenientes de la especie <i>Conus spurius</i> .	33
4	Cuantificación de proteína de las fracciones del extracto crudo del veneno de <i>Conus fergusonii</i> .	53
5	Cuantificación de proteína de las fracciones del extracto crudo del veneno de <i>Conus spurius</i> .	59
6	Control de la sobrevivencia y la mortandad de los bioensayos con DMSO 0.1%.	59
7	Componentes mayoritarios de las fracciones de interés de <i>C. fergusonii</i> que fueron elegidos para realizar los bioensayos en larvas de <i>D. melanogaster</i> .	69
8	Componentes mayoritarios de las fracciones de interés de <i>C. spurius</i> que fueron elegidos para realizar los bioensayos en larvas de <i>D. melanogaster</i> .	72
9	Sobrevivencia control de los bioensayos que involucraron el uso de DMSO 5%.	72
10	Resultados de la cuantificación de proteína (280 nm) de las fracciones obtenidas del extracto crudo del veneno de <i>Conus spurius</i> .	100

RESUMEN

Los caracoles marinos del género *Conus* son organismos capaces de sintetizar venenos muy característicos, los cuales están compuestos por una compleja mezcla de componentes, la gran mayoría de ellos de naturaleza peptídica y biológicamente activos. Tradicionalmente son conocidos como conopéptidos o conotoxinas. Estas conotoxinas presentan afinidad por diferentes tipos y subtipos de canales iónicos, lo cual ha permitido clasificarlos en familias farmacológicas. Existen familias como las k-conotoxinas que tienen como blanco molecular canales de potasio activados por voltaje, entre las más conocidas se encuentran las conotoxinas PVIIA y RIIIK, aisladas de los caracoles piscívoros *Conus purpurascens* y *Conus radiatus*, respectivamente. Algunas otras familias como las α -conotoxinas son conocidas por presentar afinidad sobre canales iónicos activados por ligando, un ejemplo es la SrIB (SpIB), aislada del caracol vermívoro *C. spurius* y que tiene como blanco molecular receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR).

En este trabajo se identificaron cuatro componentes del veneno de *Conus fergusonii* (T4, T14, T16+17 y T17+18+19), los cuales fueron obtenidos previamente mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). Estos cuatro componentes se identificaron con un sistema de microinyecciones en larvas de *Drosophila melanogaster*, empleando a las cepas *eag* y *yw*; e inhibieron a los canales de potasio Kv10.1 expresados heterológicamente. Adicionalmente se determinó que la conotoxina PVIIA, aislada de *Conus purpurascens*, presenta afinidad por el canal de potasio Kv10.1 y no sólo por el *Shaker*, como ha sido documentado en la literatura.

Palabras clave: conotoxinas, conopéptidos, *Conus fergusonii*, *Conus spurius*, *Drosophila melanogaster*, canales de potasio, RP-HPLC.

ABSTRACT

The marine snails of the genus *Conus* are organisms able to synthesize very characteristic venoms, which are composed of a complex mixture of components, mostly of peptidic nature and biologically active. Traditionally they are known as conopeptides or conotoxins. These conotoxins have affinity for different types and subtypes of ionic channels, which allows them to be classified into different pharmacological families. There are families like κ -conotoxins whose molecular target are voltage dependent potassium channels, among the best known are the PVIIA and RIIIK conotoxins isolated from fish-hunting snail *Conus purpurascens* and *Conus radiatus*, respectively. Some other families like the α -conotoxins are known to present affinity for ligand-gated ion channels, an example is the conotoxin SrIB (SpIB), isolated from vermivorous snail *Conus spurius* and whose molecular target is the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR).

In the present report four components from the venom of *Conus fergusonii* (T4, T14, T16+17 and T17+18+19), were obtained by high performance liquid chromatography in reverse phase (RP-HPLC). These four components were identified by means of microinjections system in larvae of *Drosophila melanogaster* using the *eag* and *yw* strains; all these toxin fractions inhibited the currents of Kv10.1 potassium channels. Additionally, it could be determined that the conotoxin PVIIA isolated from *Conus purpurascens*, showed affinity for the Kv10.1 potassium channel and not only for the *Shaker* type potassium channel, as it has been documented in the literature.

Keywords: conotoxins, conopeptides, *Conus fergusonii*, *Conus spurius*, *Drosophila melanogaster*, potassium channels, RP-HPLC.

INTRODUCCIÓN

En el planeta existen grupos de organismos que se caracterizan por sintetizar moléculas conocidas como metabolitos secundarios, los cuales comercialmente se conocen como “productos naturales”, mismos que han demostrado ser potenciales herramientas moleculares. Los estudios realizados con este tipo de moléculas se han centrado en los organismos terrestres, ya que la búsqueda de estas moléculas en los océanos es reciente. Para el año 2012 se describieron poco más de quince mil moléculas de origen marino, lo cual representa aproximadamente una décima parte de las moléculas de origen terrestre conocidas (Blunt *et al.*, 2012).

Los grupos de organismos marinos más ampliamente estudiados son; las esponjas, los cnidarios, los moluscos, los tunicados y los equinodermos. Estos organismos presentan una movilidad muy escasa e incluso algunos viven fijos al sustrato, y en su evolución han desarrollado la capacidad de producir moléculas que les permiten interactuar con sus depredadores, presas, competidores, etc. (Menéndez, 2005).

El estudio del grupo de los moluscos se ha centrado en los caracoles pertenecientes al género *Conus*, debido al efecto que causan sus picaduras en el humano (Hanna & Strong, 1949; Hermitte, 1946; Kohn, 1958; Rice & Halstead, 1968). En la década de los 60's inicia formalmente el estudio de sus venenos (Endean & Rudkin, 1965; Kohn *et al.*, 1960; Whysner & Saunders, 1966; Whyte & Endean, 1962), pero es hasta finales de los 70's que cobra fuerza su estudio, al descubrirse el efecto que causaban sus toxinas (Cruz *et al.*, 1978). Estas toxinas, que se conocen como conotoxinas o conopéptidos, han tenido gran relevancia en los últimos 30 años como herramientas en estudios farmacológicos, debido a su capacidad de discernir entre los distintos tipos y subtipos de canales iónicos (Lewis *et al.*, 2012; Lavergne *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Implementar a *Drosophila melanogaster* como modelo *in vivo* para la evaluación rápida de conotoxinas con actividad antagónica sobre canales de potasio.

Objetivos Particulares

- Obtener una craza de *D. melanogaster* altamente sensible a conotoxinas que presentan actividad en canales de potasio.
- Valorar la sensibilidad de los canales de potasio a las toxinas mediante la inyección de dos toxinas específicas y dos no específicas en larvas de *D. melanogaster*.
- Inyectar fracciones del veneno crudo de *C. spurius* y *C. fergusonii* obtenidas por cromatografía de líquidos en larvas de *D. melanogaster*.
- Repurificar y evaluar los componentes de la(s) fracción(es) que presenten efecto en la sobrevivencia de las larvas de *D. melanogaster*.
- Evaluar electrofisiológicamente a los componentes que presenten un efecto diferencial en la sobrevivencia de las cepas *yw* y *eag* de *D. melanogaster*, sobre el canal de potasio Kv10.1.

ANTECEDENTES

I. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el flujo de iones de forma selectiva y a favor de su gradiente electroquímico. Son responsables del mantenimiento del potencial de membrana y de funciones celulares como la contracción muscular, la excitabilidad, la regulación del ciclo celular, la expresión génica, la secreción hormonal e incluso se ha reportado su participación en procesos de aprendizaje y memoria (Alberts *et al.*, 2007).

Se puede clasificar a los canales iónicos en función del ion para el cual muestran permeabilidad, o bien por el estímulo o señal específica que provoca la apertura del canal (activación). En el primer grupo se encuentran aquellos que se activan en respuesta a la modificación del potencial de membrana, llamados “canales activados por voltaje” o “voltaje-dependientes”. El segundo grupo son los que se activan por ligando, “canales iónicos activados por ligando”, que como su nombre lo dice, se activan por la unión de ligandos extracelulares que interactúan con dominios específicos que conforman al canal. El tercer grupo lo conforman canales que se activan por elementos intracelulares, generados previamente por la acción de ligandos sobre sus receptores o por el mismo metabolismo de la célula, como es el caso de los segundos mensajeros, subunidades de proteínas G, ATP, etc. Finalmente en el cuarto grupo se incluyen a los canales que se activan por estímulos como la temperatura o la tensión (Flórez *et al.*, 2008).

Dependiendo del estímulo, los canales iónicos modificarán su conformación, manteniéndose en uno de los tres estados posibles; a) cerrado pero disponible para ser activado (en reposo), b) abierto (activo) o c) inactivado (estado no conductor), es decir, se encuentra en un estado desensibilizado (Figura 1) (Hille, 2001).

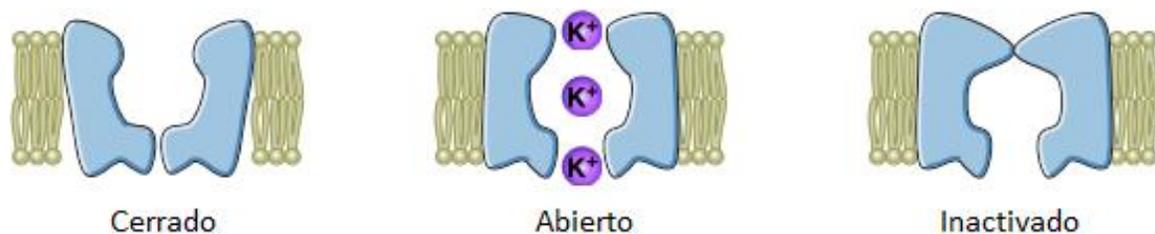


Figura 1. Estados conformacionales de los canales iónicos, canal de potasio. Tomado de Schmitt *et al.*, 2014.

Los canales activados por voltaje constituyen un grupo encargados de mediar la conductancia en células eléctricamente excitables, ya que son muy selectivos para cada ion y presentan una elevada conductancia (10^7 iones/s) (Lodish *et al.*, 2013). En este grupo se incluyen a los canales de sodio (Nav), los canales de potasio (Kv) y los canales de (Cav), que tienen como función primordial la propagación de potenciales de acción en células eléctricamente excitables, al tiempo que regulan el potencial de membrana y los cambios transitorios en la concentración de Ca^{2+} intracelular.

I.1 Canales de potasio

Conforman el grupo de canales más abundantes y diverso dentro de los canales iónicos, su actividad puede ser regulada por voltaje, calcio y neurotransmisores, principalmente. Son responsables de la repolarización de neuronas y células de músculo cardíaco, y están íntimamente involucrados en procesos como la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores y la memoria, etc. (Tian *et al.*, 2014). Estructuralmente presentan una subunidad α primaria (formadora del poro) y otra subunidad regulatoria asociada (Sandhiya & Dkhar, 2009). Además pueden estar asociadas a subunidades auxiliares, llamadas subunidades β , las cuales modifican las propiedades de activación del canal (Tian *et al.*, 2014).

Cada una de las familias descritas de canales de potasio recibe su nombre a partir del número de segmentos transmembranales (TM) y de poros (P) que presentan por subunidad. En la primer familia se encuentran los canales con seis segmentos transmembranales y un poro (6TM-1P), la segunda familia son los que presentan siete segmentos transmembranales y un poro (7TM-1P), la tercera familia incluye a los canales con dos segmentos transmembranales y un poro (2TM-1P) y la cuarta familia la conforman los canales que presentan cuatro segmentos transmembranales y dos poros (4TM-2P) (Figura 2) (Tian *et al.*, 2014). Adicionalmente, en organismos como las levaduras se ha reportado la existencia de una quinta familia, la cual presenta 8 segmentos transmembranales y dos poros (8TM-2P) (Choe, 2002; Robbins, 2001).

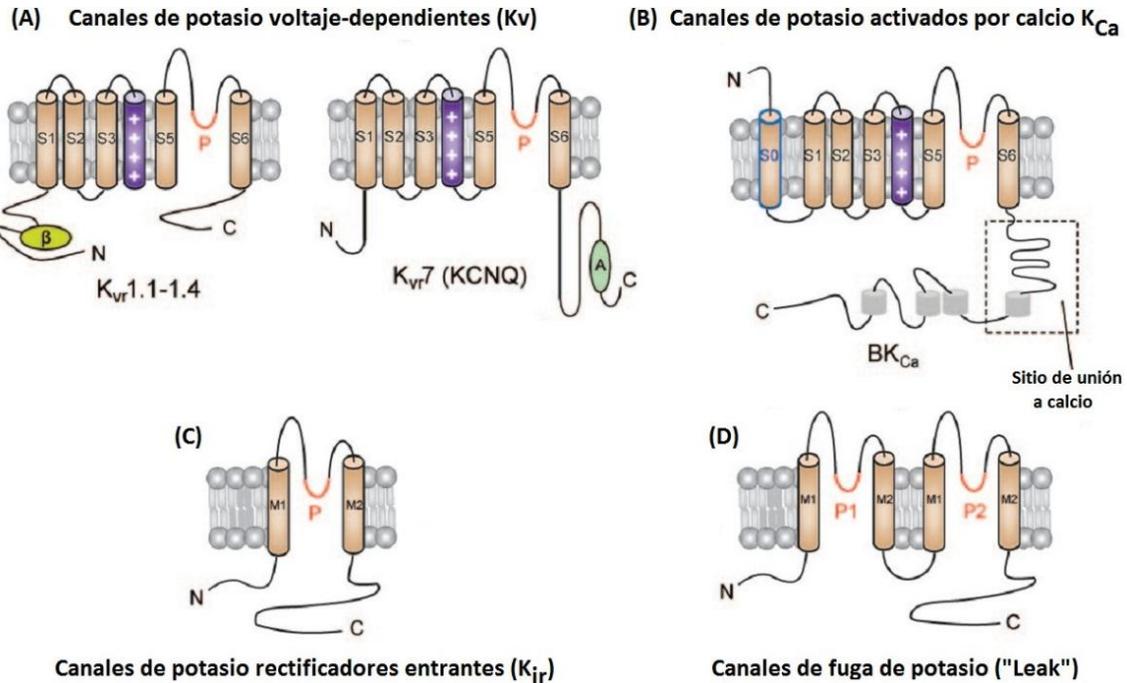


Figura 2. Clasificación de los canales de potasio basado en la estructura de sus subunidades α . A) Canales con 6 segmentos transmembranales y un poro (6TM-1P); B) canales con 7 segmentos transmembranales y un poro (7TM-1P); C) canales con 2 segmentos transmembranales y 1 poro (2TM-1P); D) canales con cuatro segmentos transmembranales y dos poros (4TM-2P). Modificado de Benarroch, 2009.

I.2 Canales de potasio activados por voltaje (Kv)

Históricamente el estudio de los canales de potasio inició con la clonación del gen que codifica para el canal tipo *Shaker* (Kv1 en mamíferos) de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Este primer estudio marcaría el inicio de la clonación de una gran cantidad de genes codificantes para canales de potasio (Warmke *et al.*, 1991). Estudios posteriores en *Drosophila melanogaster* permitieron identificar otros canales como *Shab*, *Shaw* y *Shal*, que tienen sus homólogos en mamíferos, nombrados Kv2, Kv3 y Kv4, respectivamente (Frolov *et al.*, 2012). En los seres humanos los canales de potasio activados por voltaje (Kv) están codificados por 40 genes y se dividen dentro de 12 subfamilias, entre los cuales se incluyen: Kv1 (KCNA), Kv2 (KCNB), Kv3 (KCNC), Kv4 (KCND), Kv5 (KCNF), Kv6 (KCNG), Kv7 (KCNQ), Kv8 (KCNV), Kv9 (KCNS), Kv10 (KCNH1 o EAG), Kv11 (KCNH2 o ERG) y Kv12 (KCNH o ELK). Los canales Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9 no son funcionales como homómeros y generalmente se tienen que coensamblar con las subunidades de Kv2, modificando su función (Tian *et al.*, 2014).

Estructuralmente los Kv están compuestos por cuatro subunidades α , que al ensamblarse en la membrana forman un poro central, mismo que va determinar las propiedades básicas de apertura y permeabilidad características del canal iónico. Cada subunidad contiene seis regiones hidrofóbicas transmembranales (S1-S6), con dominios amino y carboxilo terminales hacia la parte citoplasmática (Figura 3-A) (Yellen, 2002).

El poro está formado por el asa P (o dominio P) junto con los segmentos transmembranales de S5 y S6 y la región peptídica que une a los segmentos S4 y S5. El canal consta de un vestíbulo externo, una cavidad central, un vestíbulo interno y la compuerta de activación (Labro & Sanders, 2012). La primera es una región cóncava localizada del lado extracelular del canal, está formada por la mayoría de los residuos de aminoácidos del asa P y las regiones extracelulares de los segmentos S5 y S6. El vestíbulo interno se forma por las regiones citoplasmáticas de los segmentos S5 y S6 y la región peptídica que une a los segmentos S4 y S5 (Sansom *et al.*, 2002; Lainé *et al.*, 2003). La compuerta de activación se forma por el cruce de las hélices de los segmentos S6 y forman una barrera al flujo de iones cuando está cerrada (Labro & Sanders, 2012).

El filtro de selectividad de los canales de potasio está formado por una secuencia de aminoácidos altamente conservada (TXXVGYGD), la cual ha sido denominada como la secuencia característica o firma de los canales de potasio (Doyle *et al.*, 1998; Aiyar *et al.*, 1996).

El sensor de voltaje es el encargado de detectar las variaciones del potencial de membrana y posteriormente inducir un cambio conformacional que resulte en la activación del canal. Está formado principalmente por el segmento S4, el cual presenta en cada tercer posición un aminoácido cargado positivamente (Arginina o Lisina) que van a interactuar con las cargas negativas de los segmentos S2 y S3 (Aggarwal y MacKinnon, 1996; Lainé *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2014).

El dominio de tetramerización es el encargado del ensamblaje de las subunidades α , es una estructura globular citoplasmática (de aproximadamente 130 aminoácidos) a la que se le ha nombrado región T1. Este dominio es el responsable del ensamble de los tetrámeros (homo y heterotetrámeros), además es el sitio de unión para las subunidades β accesorias capaces de modificar las características de cinética de activación del canal (Papazian, 1999; Gulbis *et al.*, 2000).

En este tipo de canales el mecanismo de apertura implica movimientos de la hélice que forma el segmento S4 hacia el exterior de la membrana. En estado de reposo (polarizado o cerrado), el segmento S4 se encuentra casi totalmente inmerso en la membrana, presentando cinco de sus siete cargas positivas hacia el medio intracelular (Tamargo, 2004). Cuando hay una despolarización se provoca un desplazamiento de este segmento hacia el exterior, quedando así tres de estas cargas positivas expuestas al medio intracelular, tres en el espesor de la membrana y una en contacto con el medio extracelular. Posteriormente ocurre otro desplazamiento del segmento S4 hacia el medio extracelular, de modo que el residuo R365 queda totalmente expuesto (Lainé *et al.*, 2003). De tal manera, que cuando las cuatro subunidades presentan esta posición del segmento S4, el canal se encuentra abierto.

La inactivación que se presenta en estos canales se puede dar por dos mecanismos, principalmente: uno rápido o de tipo N y otro lento o de tipo C. La inactivación de tipo N implica una reducción completa de la corriente en respuesta a un estímulo despolarizante con duración corta, mientras que la inactivación de tipo C se da en células que fueron despolarizadas durante segundos o minutos. Sin embargo, los canales que se inactivaron por este último mecanismo se reactivan más rápido que los que se inactivaron por el de tipo N (Yellen, 2002).

La inactivación tipo N se presenta en familias como *Shaker* y se puede explicar por un mecanismo llamado “bola y cadena”, en que los primeros 22 aminoácidos del extremo amino-terminal forman una “bola de inactivación” y se unen a través de una cadena de aminoácidos a un receptor con carga negativa. Este receptor se localiza en la boca intracitoplasmática del canal, que puede ser ocupado tras la apertura del mismo, produciendo su inactivación rápida (Figura 3-B) (Tamargo, 2004). La inactivación tipo C es un mecanismo que está asociado con alteraciones de la boca extracelular, en donde se presenta una “dilatación” de la boca externa de manera que el ion K^+ no puede ser coordinado, y por consiguiente se imposibilita su flujo (Hoshi & Armstrong, 2013).

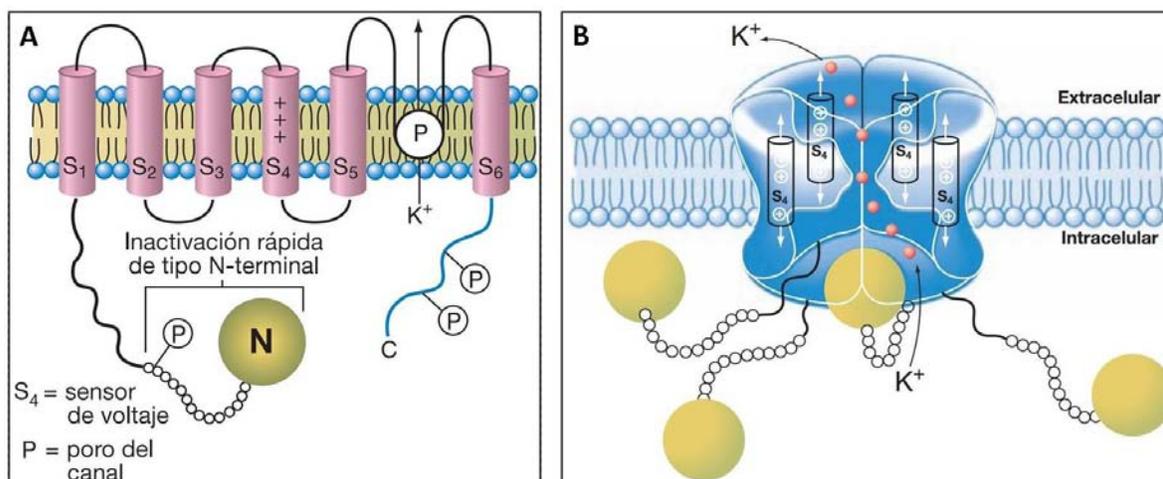


Figura 3. Estructura del canal iónico de potasio activado por voltaje (Kv). A) Subunidad α con sus seis segmentos transmembranales (S1-S6). La secuencia de 22 aminoácidos del extremo N-terminal participa en la inactivación tipo N, mecanismo llamado de “bola y cadena”, ocluyendo el poro del canal. El segmento S4 es el sensor de voltaje, que está cargado positivamente, pues contiene residuos de Arginina y Lisina. B) Cuatro subunidades se ensamblan para formar el canal. Modificado de Flórez *et al.*, 2008.

I.3 El canal de potasio EAG (Kv10.1)

Los canales de potasio EAG (*éter-a-go-go*) o Kv10.1, están codificados en humanos por el gen KCNH. Es un grupo de canales cuyo estudio permaneció olvidado hasta la década de los noventa, fecha en que se les implicó en la proliferación de células cancerosas (Pardo *et al.*, 1999). Estructuralmente son muy similares a los canales de potasio tipo *Shaker*, es decir, presentan seis segmentos transmembranales en sus subunidades α , dominios de tetramerización, un sensor de voltaje, etc. (Figura 4) (Wu & Ganetzky, 1992).

A diferencia con otros canales de potasio activados por voltaje, los canales de potasio Kv10.1 presentan características estructurales únicas, como lo son las regiones amino (N-terminal) y carboxilo (C-terminal) terminal que son muy largas. En el dominio N-terminal se presenta un sitio de unión a calmodulina (CaM) y un dominio Per-Arnt-Sim (PAS), el cual se encuentra generalmente en proteínas nucleares, funcionando como sensores de luz, hipoxia o de potencial redox (Bauer & Schwarz, 2001; Bruggemann *et al.*, 1993). La longitud del dominio C-terminal es casi del doble del de los canales tipo *Shaker*, y presenta un sitio de unión a nucleótidos cíclicos (cNBHD), un dominio de tetramerización y 2 sitios de unión a calmodulina (Ludwig *et al.*, 1997; Sahoo *et al.*, 2012).

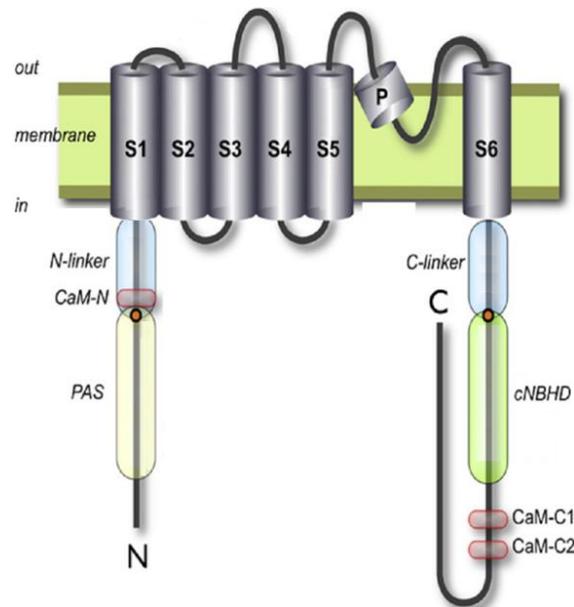


Figura 4. Estructura de la subunidad α del canal de potasio Eag1 (Kv10.1). Seis segmentos transmembranales y los dominios amino y carboxilo que forman una subunidad α . Dominio de unión a calmodulina (domino CaM, rojo), el dominio Per-ARNT-Sim (dominio PAS, amarillo), un sitio de unión a nucleótidos cíclicos (dominio cNBHD, verde) y las uniones carboxilo y amino (azul). Modificado de Sahoo *et al.*, 2012.

La caracterización electrofisiológica de Kv10.1 ha permitido atribuirle una identidad única a sus corrientes, lo cual facilita su identificación. Las corrientes son salientes y dependientes del voltaje, su activación es lenta, con un umbral de activación entre los -40 y -50 mV; además, la probabilidad de activación incrementa conforme la despolarización aumenta. Otras características de este canal son el no presentar inactivación y la influencia de la concentración de magnesio en su activación (Bauer & Schwarz, 2001).

II. Superfamilia Conoidea

La superfamilia Conoidea es un grupo de caracoles marinos distribuidos ampliamente en todo el planeta, principalmente en aguas tropicales y subtropicales. Se les puede encontrar desde la zona intermareal hasta los 1000 metros de profundidad, habitando en diversos tipos de sustratos, que incluyen fondos rocosos, arenosos, fangosos y arrecifes de coral, entre otros (Paredes *et al.*, 2010). Estos organismos son depredadores en sus ambientes, alimentándose de gusanos poliquetos, equiúridos, hermicordados, moluscos y peces (Aguilar *et al.*, 2009).

Tradicionalmente se suele dividir a esta superfamilia en tres familias: Conidae, Turridae y Terebridae, que se caracterizan por presentar un aparato venenoso, donde se sintetizan potentes venenos, para la captura de sus presas, así como mecanismo de defensa contra depredadores y competidores (Figura 5) (Puillandre & Holford, 2010). El aparato venenoso está constituido por tres partes principales; un bulbo venenoso, un conducto venenoso y un saco radular. El veneno se produce en el conducto venenoso, en donde células epiteliales especializadas expresan y secretan una gran variedad de toxinas, todas ellas de origen peptídico, posteriormente el veneno es empujado por el bulbo hasta el saco radular, en el cual se almacenan las rádulas o “dientes radulares” que tienen forma de arpón y que sirven para inyectar el veneno en las presas (Favreu & Stöcklin, 2009).

Para alimentarse estos organismos usan un diente con forma de arpón situado en la probóscide, la cual funciona de manera similar a un cordel de pesca. Un incremento en la presión hidrostática dentro de la probóscide impulsa al diente con forma de arpón, el cual penetra la piel de la presa, la sujeta e inmediatamente inyecta el veneno (Olivera, 2002).

Se ha estimado que la superfamilia Conoidea se encuentra integrada por poco más de 10, 000 especies vivientes, de las cuales más del 75% pertenecen a la familia Turridae y el 25% restante corresponde a las familias Conidae y Terebridae (Figura 6). A pesar de este hecho, la mayor parte de los estudios hasta la fecha se han realizado en la familia Conidae, integrada por 700 especies, que a su vez están englobadas principalmente dentro del género *Conus* (Bernaldez *et al.*, 2011). De estas 700 especies descritas en el género *Conus* aproximadamente el 10% habitan en costas mexicanas (Figura 7).

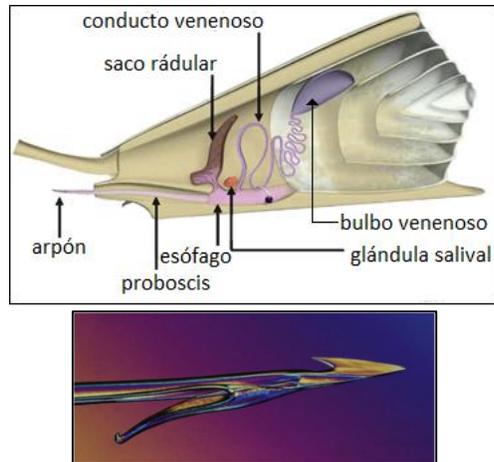


Figura 5. Aparato venenoso de los caracoles de la superfamilia Conoidea. A) Conducto venenoso conectado al esófago y que se prolonga con la probóscide, órgano extensible el cual permite mantener y proyectar al diente radular con forma de arpón, que está cargado con veneno. Los dientes radulares se almacenan en el saco radular. B) Diente radular de la especie *Conus striatus*. Modificado de Favreau & Stöcklin, 2009.

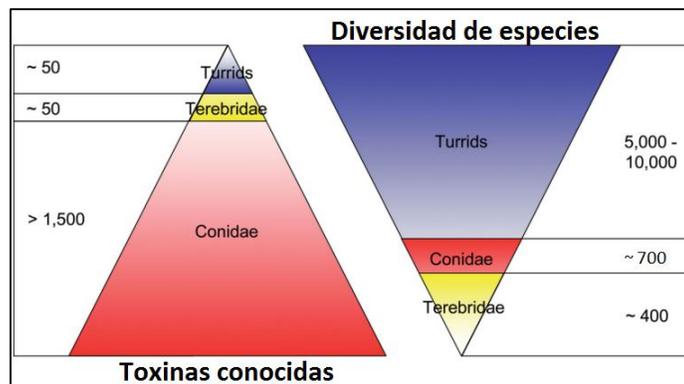


Figura 6. Comparación del número de toxinas (izquierda) y especies (derecha) conocidas en las tres principales familias que integran a la superfamilia Conoidea. Modificado de Puillandre & Holford, 2010.

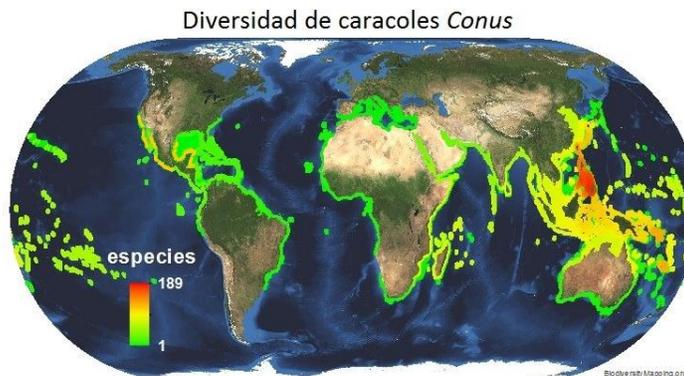


Figura 7. Distribución de los caracoles *Conus* en las zonas tropicales y subtropicales. La barra de colores de la parte inferior izquierda indica la diversidad de especies en el planeta. Tomado de Biodiversitymapping, 2015.

III. El veneno de los caracoles *Conus*

Los venenos de los caracoles *Conus* están compuestos por una compleja mezcla de moléculas, que son pequeños péptidos con alta actividad biológica (Spiezia *et al.*, 2012). El veneno de una especie de *Conus* está compuesto por 100 a 200 péptidos, y la mayoría de ellos constan de 7 a 40 residuos de aminoácidos (Olivera, 2006). La diversidad de péptidos producidos por las familias Terebridae y Turridae son similares a las de Conidae (*Conus*). Con base en este hecho es posible estimar que la superfamilia Conoidea contenga entre 400,000 y 2, 000,000 de péptidos diferentes (Puillandre & Holford, 2010).

Los péptidos de *Conus* se dividen en dos grupos, de acuerdo al número de puentes disulfuro en su estructura. El primer grupo son las conotoxinas, que son péptidos con dos o más puentes disulfuro, el segundo grupo, llamados conopéptidos, presentan uno o ningún puente disulfuro (Bernaldez *et al.*, 2011); en este escrito ambos términos se utilizan de manera indiferente.

La clasificación sistemática de las conotoxinas las agrupa en superfamilias génicas y en familias farmacológicas. La primera de ellas se basa en la similitud entre las secuencias señal de sus precursores, mientras que la segunda se debe al blanco molecular por el cual presentan afinidad (Akondi *et al.*, 2014). En ocasiones, el patrón de residuos de cisteína que presentan permite determinar a cuál de las superfamilias pertenece una conotoxina (Akondi *et al.*, 2014). Considerando dichos criterios de clasificación se han propuesto 26 superfamilias, 12 familias y 26 patrones de residuos de cisteínas (Figura 8, Tabla 1) (ConoServer, 2015).

Las conotoxinas exhiben como principal modificación postraduccional la formación de puentes disulfuro, que les confiere una alta estabilidad conformacional. Sin embargo, se han descrito otras modificaciones postraduccionales, entre las cuales se incluyen; la amidación en la región C-terminal, la hidroxilación de prolinas, la glucosilación en treoninas, la γ -carboxilación de glutamatos por mencionar algunas (Aguilar *et al.*, 2009; Violette *et al.*, 2012).

El grupo de los conopéptidos comprende a los péptidos con uno o ningún puente disulfuro. Las conopresinas y los contrifanos presentan un puente disulfuro, las conantokinas, contulakinas, conorfamidas, conolisinas (conolysins), conofanos (conophans), conomarfinas (conomarphins) y conomap no presentan puentes disulfuro (Tabla 2) (Robinson & Norton, 2014). Frecuentemente se presentan los residuos de γ -carboxiglutamato como principal modificación postraduccional, responsables de su estabilidad conformacional (Lin *et al.*, 1997).

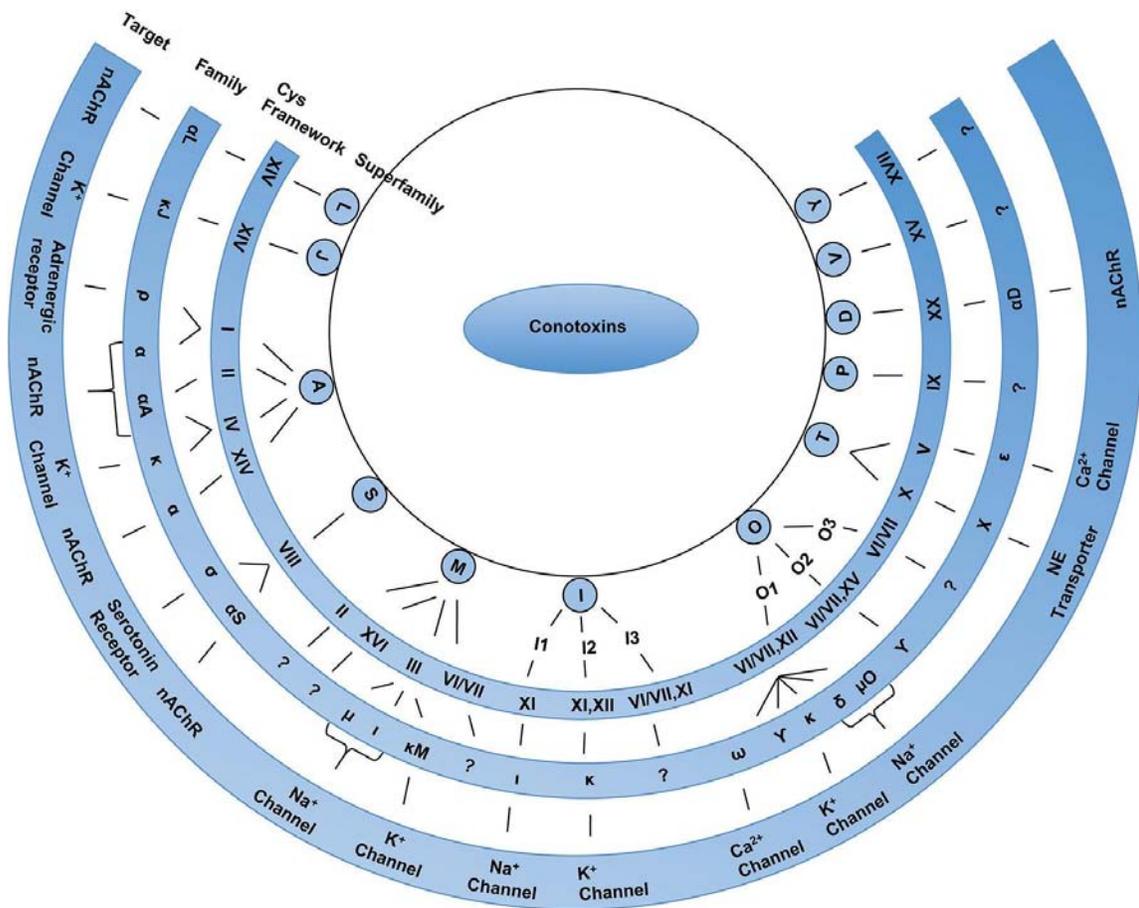


Figura 8. Clasificación de las conotoxinas en superfamilias y familias. Las superfamilias génicas se clasifican basándose en la secuencia señal de los precursores de las toxinas, altamente conservadas (sólo se muestran 16 de las 26 superfamilias descritas hasta el 2014). La clasificación en familias farmacológicas se basa en el blanco molecular por el cual presentan afinidad (se muestran 11 de las 12 familias descritas). Patrones de cisteínas que pueden presentar las superfamilias de conotoxinas (en número romano). Tomado de Akondi *et al.*, 2014.

Tabla 1. Patrones de residuos de cisteínas en conotoxinas. De izquierda a derecha se muestra el nombre, la definición del patrón o esqueleto de residuos de cisteínas, el número y la conectividad de las cisteínas. Modificado de ConoServer, 2015.

Nombre	Patrón de cisteínas	# cisteínas	Conectividad
I	CC-C-C	4	I-III, II-IV
II	CCC-C-C-C	6	¿?
III	CC-C-C-CC	6	¿?
IV	CC-C-C-C-C	6	I-V, II-III, IV-VI
V	CC-CC	4	¿?
VI/VII	C-C-CC-C-C	6	I-IV, II-V, III-VI
VIII	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	10	¿?
IX	C-C-C-C-C-C	6	I-IV, II-V, III-VI
X	CC-C.[PO]C	4	I-IV, II-III
XI	C-C-CC-CC-C-C	8	I-IV, II-VI, III-VII, V-VIII
XII	C-C-C-C-CC-C-C	8	¿?
XIII	C-C-C-CC-C-C-C	8	¿?
XIV	C-C-C-C	4	I-III, II-IV
XV	C-C-CC-C-C-C-C	8	¿?
XVI	C-C-CC	4	¿?
XVII	C-C-CC-C-CC-C	8	¿?
XVIII	C-C-CC-CC	6	¿?
XIX	C-C-C-CCC-C-C-C-C	10	¿?
XX	C-CC-C-CC-C-C-C-C	10	¿?
XXI	CC-C-C-C-CC-C-C-C	10	¿?
XXII	C-C-C-C-C-C-C-C	8	¿?
XXIII	C-C-C-CC-C	6	¿?
XXIV	C-CC-C	4	¿?
XXV	C-C-C-C-CC	6	¿?
XXVI	C-C-C-C-CC-CC	8	¿?

IV. Farmacología de los péptidos de *Conus*

Los péptidos de *Conus* se unen selectivamente a diferentes blancos moleculares, principalmente a canales iónicos activados por voltaje (Nav, Kv y Cav), canales activados por ligando (nAChR, 5-HT₃, NMDA, AMPA), receptores acoplados a proteínas G (receptores adrenérgicos, receptores de somatostatina, etc.) y transportadores de neurotransmisores (transportador de noradrenalina, receptor de vasopresina, receptor de neurotensina, etc.) (Figura 9, Tabla 2) (Lewis *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012).

IV.1 Conotoxinas con actividad sobre canales iónicos activados por ligando

Existen dos tipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en vertebrados: los de tipo muscular y los de tipo neuronal, el primer grupo se encuentran en la parte post-sináptica de la placa neuromuscular mientras que el segundo grupo se encuentran tanto en las terminales post y pre-sinápticas en el sistema nervioso central y periférico (López-Vera, 2010). Los nAChR son complejos proteicos formados de pentámeros de diferentes subunidades, los de tipo muscular se conforman de la combinación de dos subunidades α , una β , una γ y una δ en el músculo fetal y con una sustitución de la subunidad γ por una subunidad ϵ en el adulto. Los receptores neuronales están conformados por la combinación de subunidades α y β . En ambos tipos, el sitio de unión para la acetilcolina se encuentra en la interface de las subunidades α y β (Banerjee *et al.*, 2013).

α -conotoxinas

Esta familia de conotoxinas fue la primera en describirse y es la más estudiada, debido a que en los venenos de todas las especies de *Conus* que se han estudiado por lo menos existe una α conotoxina (Dutertre *et al.*, 2007). Su blanco molecular son los nAChR de las uniones neuromusculares, su forma de unión es competitiva, es decir, actúan en el sitio de unión del ligando natural (la acetilcolina). Otras α conotoxinas con actividad sobre nAChR son: las α C-conotoxinas, las α D-conotoxinas, las α S-conotoxinas, las α L-conotoxinas y las α J-conotoxinas (la letra mayúscula indica la Superfamilia a la cual pertenecen) (Lewis *et al.*, 2012).

ψ -conotoxinas

Las ψ -conotoxinas también presentan actividad sobre receptores nicotínicos de acetilcolina, pero la unión de éstas al receptor es de forma no competitiva, es decir, no se une al sitio de unión de la acetilcolina. La primera conotoxina en identificarse de esta familia fue la PIIIE, aislada de *Conus purpurascens* (Shon *et al.*, 1997).

σ-conotoxinas

Esta familia tiene una sola conotoxina, la GVIII A, aislada de *Conus geographus*, estructuralmente formada por 41 residuos de aminoácidos y 5 puentes disulfuro (10 residuos de cisteínas); es un inhibidor competitivo del receptor de serotonina (5-HT₃) y tiene como efecto la inhibición de la liberación de neurotransmisores en las sinapsis motoras y sensoriales (England *et al.*, 1998).

Con-ikot-ikot

Este grupo de conotoxinas se aislaron por primera vez del veneno de *Conus striatus*, es un polipéptido que consta de 86 residuos de aminoácidos en su estructura (13 residuos de cisteínas) y presenta afinidad por los receptores AMPA (α-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol) (Walker *et al.*, 2009). Tres años después se reportó la con-ikot-ikot-G1, en el veneno de *Conus geographus* la cual estructuralmente consta de 88 residuos de aminoácidos (10 residuos de cisteínas), siendo estas dos especies las únicas con este tipo de conotoxinas (Hu *et al.*, 2012).

IV.2 Conotoxinas con actividad sobre receptores acoplados a proteínas G

Las proteínas G son receptores de la superficie celular que actúan como transductores de señales: unen la molécula señal (el ligando) con una alta afinidad, transforma este evento extracelular en una o más señales intracelulares, las cuales alteran el comportamiento de las células blanco (González-Moran, 2004). Dependiendo de su estructura molecular, se van a clasificar en heterotriméricas o monoméricas. Las primeras están constituidas por tres subunidades distintas, denominadas αβγ; que son proteínas ancladas a la membrana, aunque no la integran. Las monoméricas, presentan sólo una subunidad y se encuentran libres en el citosol y en el plasma del núcleo celular (Kandel *et al.*, 2000).

ρ-conotoxinas

Esta familia se encuentra integrada por una sola conotoxina, la ρ-TIA, aislada del veneno de *Conus tulipa*. Es un péptido de 19 residuos de aminoácidos con 2 puentes disulfuro, del cual se reportó ser inhibidor de los receptores adrenérgicos (α₁) (Sharpe *et al.*, 2001). Este tipo de receptores participan en funciones como el control de la presión sanguínea, función pulmonar, contractilidad de miocardio, metabolismo y algunas funciones del sistema nervioso central (Kandel *et al.*, 2000). Dicho lo anterior, el interés en este péptido ha aumentado, principalmente por su potencial uso terapéutico (Lewis *et al.*, 2012).

T-conotoxinas

De esta familia actualmente sólo se conoce a la conotoxina CnVA, aislada de *Conus consors*, esta conotoxina se caracteriza por ser antagonista de receptores de somatostatina, que se encargan de regular e inhibir la liberación de otras hormonas secundarias como la insulina, el glucagón, la hormona del crecimiento, etc. (Kandel *et al.*, 2000). Debido a la afinidad de la conotoxina CnVa sobre el receptor sst3 de somatostatina, se ha propuesto como herramienta para el estudio del papel de este receptor en el desarrollo de tumores pancreáticos exocrinos y adenomas pituitarios inactivos (Petrel *et al.*, 2013).

IV.3 Conotoxinas con actividad sobre transportadores de neurotransmisores

γ-conotoxinas

Las dos conotoxinas que integran a esta familia son MrIA y MrIB, aisladas de *Conus marmoreus* y se caracterizan por ser inhibidores no competitivos de los transportadores de norepinefrina (NET) (Sharpe *et al.*, 2001). Debido al blanco molecular por el cual presentan afinidad se les ha considerado importantes herramientas para el desarrollo de fármacos; ejemplo de ello es el desarrollo de la variante sintética de la conotoxina MrIA, nombrado Xen2174 para su uso como analgésico (Lewis, 2012).

IV.4 Conotoxinas con actividad sobre canales de calcio activados por voltaje

Los canales de calcio son los responsables de mediar el flujo de calcio hacia el interior de las células, resultando en un aumento en la concentración intracelular de este ion. Este aumento de la concentración produce la despolarización de la membrana, que representa la señal de activación para muchas funciones celulares, siendo de las más importantes la liberación de neurotransmisores. Estructuralmente están formados por complejos proteicos heteroméricos con cuatro o cinco diferentes subunidades. La diversidad fisiológica y farmacológica de estos se debe principalmente a las propiedades de las subunidades $\alpha 1$ que forman el poro (Latorre *et al.*, 1996; Terlau & Olivera, 2004).

ω-conotoxinas

Estas conotoxinas son péptidos compuestos de 24 a 30 residuos de aminoácidos, presentan tres puentes disulfuro y un extremo carboxilo terminal amidado, el cual les confiere resistencia a la actividad de las carboxipeptidasas (Adams *et al.*, 2012). Estas últimas son proteasas que se caracterizan por hidrolizar un enlace peptídico en la región carboxilo terminal, permitiendo así la liberación del aminoácido situado al final de la cadena.

Las ω -conotoxinas son bloqueadores de canales de calcio, mismos que se encuentran involucrados en procesos como la transmisión sináptica en neuronas y la contracción muscular (Lewis *et al.*, 2012). Estas conotoxinas son capaces de discernir entre las distintas isoformas de canales de calcio, por ello se han utilizado como herramientas moleculares en el desarrollo de fármacos. El ejemplo más conocido es la conotoxina MVIIA (aislada de *Conus magus*), que es un péptido hidrofílico constituido de 25 residuos de aminoácidos y es el primer bloqueador específico de canales de calcio tipo N (Cav2.2). Dichos canales se distribuyen en el asta dorsal de la médula espinal y se ha reportado que son la base de estados prolongados de dolor, por lo que estas conotoxinas pueden tener uso terapéutico (Hannon y Atchison, 2013).

La conotoxina MVIIA es la primera conotoxina aprobada como medicamento, su variante sintética es conocida comercialmente como Ziconotide (Patente US 5364842) y fue aprobada en el 2004 por la Food and Drug Administration (FDA) y un año después por la European Medicines Agency (EMA) para su uso en el tratamiento del dolor crónico en pacientes con cáncer y SIDA (Bingham *et al.*, 2010; Valía-Vera *et al.*, 2007).

IV.5 Conotoxinas con actividad sobre canales de sodio activados por voltaje

Los canales de sodio son complejos heteroméricos que tienen un papel fundamental en la fisiología del sistema nervioso: transmiten impulsos eléctricos a través de células y redes celulares permitiendo la coordinación de un amplio rango de procesos fisiológicos que van desde la locomoción hasta la cognición (Salceda & Ortega, 2009). Estructuralmente están compuestos de diferentes subunidades α y una o más subunidades β (Latorre *et al.*, 1996). Actualmente se sabe que este tipo de canales son el blanco farmacológico de cuatro familias de conotoxinas, las cuales pueden producir inhibición (μ y μ O-conotoxinas) o activación del canal (δ y I-conotoxinas) (Lewis *et al.*, 2012).

μ -conotoxinas

Dentro de las conotoxinas que interactúan ocluyendo el poro de los canales de sodio (Nav) (Figura 9) es la familia más numerosa y mejor caracterizada. Hasta la fecha se han descrito 20 μ -conotoxinas (Lewis *et al.*, 2012). Son péptidos pertenecientes a la Superfamilia M, compuestas de 16 a 25 residuos de aminoácidos y 3 puentes disulfuro (Norton, 2010). Las primeras conotoxinas de esta familia en ser caracterizadas fueron la GIIIA y la GIIIB, ambas aisladas de *Conus geographus* y que mostraron tener especificidad en el bloqueo de canales de sodio Nav1.4 expresados en músculo esquelético (Terlau y Olivera, 2004).

μO-conotoxinas

Este grupo al igual que las δ-conotoxinas, pertenece a la superfamilia génica O1. Aunque son pocos los péptidos que se han caracterizado para esta familia, se sabe que modifican el mecanismo de apertura y cierre del canal (“gating”) al unirse a sitios cercanos al dominio del sensor de voltaje (Figura 9) (Brad *et al.*, 2014). La conotoxina mejor estudiada es la MrVIB (aislada de *Conus marmoreus*) a la cual se le atribuyen propiedades analgésicas en modelos animales y deben su efecto a la selectividad que presentan por el canal Nav1.8 (Brad *et al.*, 2014; Fedosov *et al.*, 2012).

δ-conotoxinas

Son péptidos de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos, se caracterizan por inhibir la inactivación rápida y modificar el potencial de activación de los canales de sodio (Leipold *et al.*, 2005). El sitio de unión de las δ-conotoxinas se ubica en el cuarto dominio de los canales de sodio, en la región extracelular que conecta al segmento tres (S3) con el cuatro (S4) (Figura 9) (Heinemann & Leipold, 2007).

I-conotoxinas

Es una familia de conotoxinas excitatorias, es decir, actúan sobre el mecanismo de activación de los canales de sodio. La primera en estudiarse fue la conotoxina RXIA (aislada de *Conus radiatus*), la cual induce potenciales de acción repetitivos en el nervio ciático de ratones, debido a su afinidad por canales de Nav1.6 (Fiedler *et al.*, 2008). Esta familia a diferencia de las δ-conotoxinas, no presentan efecto significativo en el mecanismo de inactivación (Knapp *et al.*, 2012).

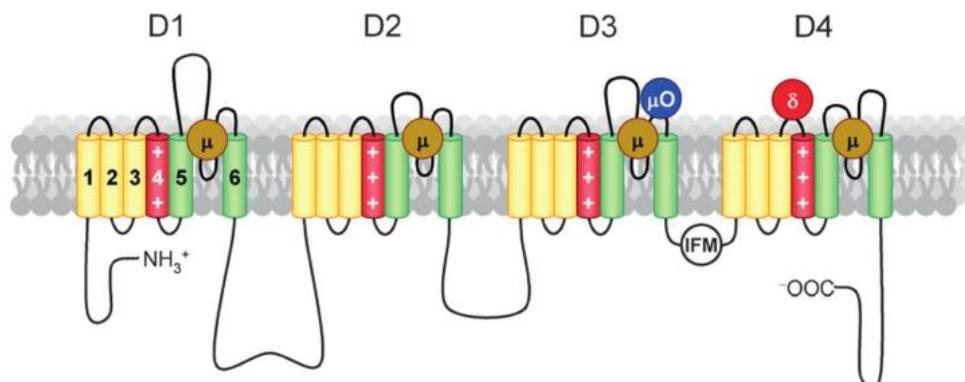


Figura 9. Topología de las subunidades α que forman un canal de sodio (Nav). Los canales de sodio están formados por cuatro subunidades o dominios (D1, D2, D3 y D4). Cada una de ellas está conformada por seis segmentos transmembranales (S1-S6), el segmento 4 es el sensor de voltaje. Se muestran los sitios de unión de las conotoxinas pertenecientes a las familias μ (café), μO (azul) y δ (rojo) Heinemann & Leipold, 2007.

IV.6 Conotoxinas con actividad sobre canales de potasio activados por voltaje

Los canales de potasio son el grupo de canales iónicos más abundante y diverso. Se encuentran distribuidos en la mayoría de los diferentes tipos de células, en donde se encargan de la regulación de una gran variedad de procesos celulares (punto uno de antecedentes).

κO-conotoxinas

Es la familia de conotoxinas bloqueadoras de canales de potasio más importante, la primera conotoxina en estudiarse pertenece a esta familia, la conotoxina PVIIA, aislada de *Conus purpurascens*. Es un péptido de 27 residuos de aminoácidos y presenta afinidad por el canal de potasio tipo *Shaker*, que fue el primer canal de potasio en clonarse del genoma de *D. melanogaster* (Shon *et al.*, 1998). Sorpresivamente, este péptido no presenta efecto sobre su homólogo en rata (Kv1), pero investigaciones en otros modelos animales (perros) han demostrado efectos de cardioprotección (Lubbers *et al.*, 2005; Terlau & Olivera, 2004).

κA-conotoxinas

Son péptidos O-glicosilados pertenecientes a la Superfamilia A, son bloqueadores de canales de potasio voltaje dependientes (Kv). La primer conotoxina identificada para esta familia fue la SIVA (aislada de *Conus striatus*) y al igual que PVIIA se demostró que bloquea canales tipo *Shaker* (Kv1 en mamíferos) (Terlau & Olivera, 2004).

κM-conotoxinas

Son péptidos que bloquean canales de potasio a pesar de presentar un patrón de cisteínas similar a las μ-conotoxinas (Terlau & Olivera, 2004). Las conotoxinas mejor estudiadas son la RIIIJ y la RIIIK, la primera de ellas al igual que PVIIA ha mostrado efectos de cardioprotección dada su alta afinidad por canales de potasio Kv1.2 (Chen *et al.*, 2010). La conotoxina RIIIK ha llamado la atención por presentar una forma de unión similar a la de PVIIA (unión al vestíbulo externo del canal) en canales de potasio tipo *Shaker*, a pesar de que estructuralmente son diferentes (debido a su patrón de las cisteínas) (Terlau y Olivera, 2004)

κJ-conotoxinas

Esta familia de conotoxinas presenta afinidad por dos tipos de canales y/o receptores. Actualmente sólo cuenta con una integrante, la conotoxina pI14 (aislada de *Conus planorbis*), compuesta de 25 residuos de aminoácidos y dos puentes disulfuro, presenta afinidad por canales de potasio Kv1.6 y por las isoformas neuronal y neuromuscular de receptores nicotínicos de acetilcolina (Imperial *et al.*, 2006).

kl(2)-conotoxinas

Esta familia pertenece a la clase 2 de la superfamilia I, se integra por tres péptidos moduladores selectivos de canales de potasio (Lewis *et al.*, 2012). La conotoxina ViTx (*aislada de Conus virgo*) inhibe canales Kv1.1 y Kv1.3 pero no afecta a Kv1.2, la SrXIA (*aislada de Conus spurius*) inhibe canales Kv1.2 y Kv1.6 pero sin efecto sobre Kv1.3 y la BtX (*aislada de Conus betulinus*) se une a canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}) incrementando su probabilidad de activación (Aguilar *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2003; Kaufenstein *et al.*, 2003).

Conkunitzinas

Son los péptidos más grandes descritos en el veneno de *Conus*, con 57 a 65 residuos de aminoácidos y de 2 a 4 puentes disulfuro en su estructura. Solamente se conocen 5 conkunitzinas, aisladas de las especies *Conus geographus* (conkunitzina-G1), *Conus pulicarius* (conkunitzinas Pu1 y Pu2) y de *Conus striatus* (Conkunitzina S1 y S2) (ConoServer, 2015). De estas cinco conkunitzinas, sólo de la conkunitzina-S1 se ha reportado que bloquea al canal de potasio tipo *Shaker* (Bayrhuber *et al.*, 2005).

IV.7 Conopéptidos y sus blancos moleculares

Al igual que con las conotoxinas, de este grupo también se ha buscado determinar el blanco molecular. Hasta la fecha sólo se conoce el blanco molecular de las conopresinas, los contrifanos, las conantokinas y las contulakinas. De las conorfamidas, conolisinas, conofanos, conomarfinas y conomap aún se desconoce su blanco molecular (Tabla 2).

Conopresinas

Son péptidos de entre 8 y 9 residuos de aminoácidos y un puente disulfuro. La conopresina-G fue la primera en aislarse (de *Conus geographus*) y es un agonista del receptor de vasopresina. Estructuralmente es muy similar a este neurotransmisor, implicado en procesos como la vasoconstricción y la reabsorción de agua en mamíferos (Cruz *et al.*, 1987).

Contrifanos

Este grupo pertenece a la clase 2 de la Superfamilia O, presentan de 7 a 12 residuos de aminoácidos y un puente disulfuro (Robinson & Norton, 2014). Actualmente se conocen 26 contrifanos, todos ellos con una gran cantidad de modificaciones postraduccionales (ConoServer, 2015). El contrifano-Vn, aislado de *Conus ventricosus*, es el único que se ha evaluado electrofisiológicamente y se determinó que bloquea canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}) (Massilia *et al.*, 2003).

Conantokinas

Las conantokinas son péptidos de 17 a 22 residuos de aminoácidos y se caracterizan por inhibir receptores de glutamato tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA). La conantokina-G, aislada de *Conus geographus*, fue la primera de esta familia en caracterizarse y actualmente su variante sintética, la CGX-1007 se encuentra en fase clínica I para su uso como analgésico (Brad *et al.*, 2014; Lewis *et al.*, 2012).

Contulakinas

Son péptidos formados de 14 a 18 residuos de aminoácidos y hasta la fecha se conocen cuatro contulakinas, mismas que fueron aisladas de; *Conus pulicarius* (contulakina-Pu), *Conus litteratus* (contulakina Lt1 y Lt2) y *Conus geographus* (contulakina-G) (Craig *et al.*, 1999; Lluisma *et al.*, 2012; Pi *et al.*, 2006). La contulakina-G fue el primer miembro de este grupo en describirse y del cual se reportó ser agonista de los receptores de neurotensina 1 y 2 (NTSR1 y NTSR2). Debido a la afinidad que presenta sobre estos receptores es que se desarrolló su variante sintética, la CGX-1160 con la finalidad de ser utilizada como un posible analgésico (fase clínica I) (Brad *et al.*, 2014; Craig *et al.*, 1999).

Tabla 2. Conopéptidos con uno o ningún puente disulfuro y el blanco molecular por el cual presentan afinidad (en caso de conocerse) (Lewis *et al.*, 2012; Robinson & Norton, 2014).

Familia	Puentes disulfuro	Blanco molecular
Conopresinas	s-s	Receptores de vasopresina
Contrifanos	s-s	Modulador de canales de potasio activados por calcio
Conantokinas		Receptores NMDA
Contulakinas		Receptores de neurotensina
Conorfamidas		¿?
Conolisinas		¿?
Conofanos		¿?
Conomarfinas		¿?
Conomap		¿?

V. Especies de interés; *Conus spurius* y *Conus fergusonii*

Conus spurius

Es un caracol que se alimenta de gusanos poliquetos y habita en aguas someras a moderadamente profundas. Se le puede encontrar en costas del Océano Atlántico, en América del Norte, América Central y América del Sur, desde Carolina del Norte y Florida, en el Golfo de México hasta costas Venezolanas (Figura 10) (Clinical Toxinology Resources, 2015).

Este organismo ha sido ampliamente estudiado en México, principalmente por el equipo de trabajo del Dr. Manuel B. Aguilar, adscrito al Instituto de Neurobiología de la UNAM. Hasta el año 2010 se habían caracterizado químicamente siete péptidos, de los cuales sólo de tres se conoce su blanco molecular (Tabla 3) (Clinical Toxinology Resources, 2015).

Conus fergusonii

Es un caracol del cual se conoce muy poco de su alimentación y de los componentes de su veneno. Se distribuye principalmente en América Central y América del Sur del lado del Océano Pacífico. Se le puede encontrar mayoritariamente en México, en aguas someras a moderadamente profundas, desde las islas del litoral del Golfo de California hasta el sur del Ecuador (Figura 10) (Clinical Toxinology Resources, 2015).



Figura 10. Distribución de los caracoles *Conus spurius* (izquierda) y *Conus fergusonii* (derecha). Tomado de Clinical Toxinology Resources, 2015.

Tabla 3. Péptidos caracterizados químicamente a nivel de toxina madura provenientes de la especie *Conus spurius*.

Péptido	Superfamilia	Blanco molecular
Conorfamida Sr1		Posiblemente canales de sodio activados por el neuropéptido FMRF amida (FaNaCs) (Maillo <i>et al.</i> , 2002).
Conorfamida Sr2		Posiblemente receptores acoplados a proteínas G, canales de sodio activados por el neuropéptido FMRF amida o canales iónicos sensibles a la acidez (ASICs) (Aguilar <i>et al.</i> , 2008).
Conotoxina SrIA	A	Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (López-Vera <i>et al.</i> , 2007).
Conotoxina SrIB	A	Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (López-Vera <i>et al.</i> , 2007).
Conotoxina Sr5A	T	Inyección intracraneal (2.0 nmol) en ratones causa depresión (Aguilar <i>et al.</i> , 2006).
Conotoxina Sr7A	O1	Inyección (250 pmol) intracraneal en ratones causa hiperactividad y parálisis en moluscos (Luna-Ramírez <i>et al.</i> , 2007).
Conotoxina SrXIA	I2	Canales de potasio activados por voltaje Kv1.2 y Kv1.6 (Aguilar <i>et al.</i> , 2007, 2010).

VI. Bioensayos con el veneno de *Conus*

El efecto del veneno completo o de sus componentes se ha evaluado en diversos modelos animales, para dilucidar un blanco molecular potencial o una posible aplicación. Unos modelos animales que han sido utilizados son *Deroceras reticulatum* y *Galleria mellonella*. *D. reticulatum* es una babosa que se considera plaga en la agricultura y en ella se ha probado el extracto crudo del veneno de *Conus textile* (Bruce *et al.*, 2011), de la misma manera, en *G. mellonella* conocida como la polilla de la cera, en sus larvas se han inyectado toxinas purificadas del veneno de *Conus ventricosus* (Spiezia *et al.*, 2012). La finalidad de ambos ensayos fue encontrar una posible aplicación como control biológico.

Los ratones son los modelos más utilizados en el estudio de los venenos de *Conus*, y según el efecto que cause su inyección se pueda determinar un posible blanco molecular sobre el cual actúen. El ejemplo mejor documentado son los ensayos con los componentes del veneno de *Conus geographus*, con efectos como: parálisis, falta de coordinación, depresión, hiperactividad, convulsiones, etc. (Olivera *et al.*, 1990). Otros efectos como la inducción del sueño se han reportado con componentes del veneno de *Conus parius* tras ser inyectados intracranealmente (Teichert *et al.*, 2007).

Drosophila melanogaster, un organismo tradicionalmente usado en genética, se ha utilizado recientemente en el año 2010, para estudiar el veneno de *Conus*. Dichos ensayos se realizaron con adultos en donde se evaluó el extracto crudo del veneno de *Conus brunneus* para identificar componentes con actividad en receptores nicotínicos de acetilcolina (Mejia *et al.*, 2010). Cinco años más tarde se retoma este estudio, ahora se utilizan α -conotoxinas previamente caracterizadas; MII, AulB, BuIA, EI, PeIA, y Iml, aisladas de *Conus magus*, *Conus aulicus*, *Conus bullatus*, *Conus ermineus*, *Conus pergrandis* y *Conus imperialis*, respectivamente (Heghinian *et al.*, 2015).

En el año 2012, en un ensayo se emplea un sistema de microinyecciones de conotoxinas con actividad en canales de potasio sobre larvas de *D. melanogaster*. Este sistema utilizó una cepa mutante para el canal de potasio *eag* (Kv10.1) para implementar a *Drosophila melanogaster* como modelo biológico para permita identificar componentes del veneno de *Conus* con actividad en canales de potasio (Martínez-Hernández, 2012).

VII. *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster es un importante modelo en la investigación, por el vasto conocimiento de su genoma y la cantidad de cepas mutantes que pueden ser utilizadas desde estudios genéticos hasta electrofisiológicos, su mantenimiento en condiciones de laboratorio es fácil (no necesita mucho espacio) y produce una gran cantidad de organismos en poco tiempo, por su ciclo de vida corto de 10 días a una temperatura de 25 °C y 60 % de humedad (Figura 11) (Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 2005).

Al ser un organismo holometábolo, va a presentar diferentes estadios de desarrollo durante su ciclo de vida, concluyendo con una metamorfosis. Los estadios son; huevo, larva, pupa y adulto. Una vez que se ha dado la fertilización del huevo, y un día posterior a la ovoposición, eclosionará una larva que pasará por tres estadios de desarrollo (L1, L2 y L3). Estos estadios larvarios duran cuatro días, los dos primeros estadios se caracterizan por presentar una elevada actividad (movilidad), enfocada en la búsqueda de alimento, mientras que en el tercer estadio larval cesa su actividad y se centra en encontrar un lugar en el cual pupar (Rincón *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2002).

Durante el desarrollo de *D. melanogaster* existen etapas o “picos” caracterizados por una elevada expresión de genes, que son los responsables del correcto desarrollo morfológico y del apropiado funcionamiento fisiológico y metabólico del organismo. El primer pico de expresión se da durante el proceso de embriogénesis (huevo) y se extiende hasta el primer estadio larvario (L1), durante el cual se van expresar genes homeóticos, la mayoría de los genes encargados de la síntesis de complejos proteicos de señalización (transportadores y canales iónicos), y genes responsables de la síntesis de enzimas involucradas en reacciones metabólicas (Arbeitman *et al.*, 2002).

Durante el tercer estadio larvario (L3), que se caracteriza por su gran talla (aprox. 4.5 mm) y por presentar dos grupos de estirpes celulares, correspondientes al tejido larvario y a las células de los discos imaginales (Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 2005), tiene lugar el segundo pico de expresión de genes, el cual se extiende hasta el estadio de prepupa (o pupa temprana). Durante este pico se van a expresar nuevamente otro grupo de genes encargados de la síntesis de complejos proteicos, principalmente canales iónicos involucrados en la señalización neuronal y en el proceso de diferenciación muscular (Arbeitman *et al.*, 2002).

En el estadio de pupa, ocurre un proceso de histólisis de la mayoría de los tejidos larvarios, al tiempo que continúa la diferenciación y organización de las estructuras del adulto a partir de los discos imaginales, principalmente (Herrera-Bazán, 2009). En la etapa final de este estadio, conocido como pupa tardía, tiene lugar el tercer y último pico de expresión de genes, encargados de la especialización del sistema nervioso central, el cual va a estar sincronizado con la diferenciación de los tejidos musculares y lograr la formación de las uniones neuromusculares (Arbeitman *et al.*, 2002).

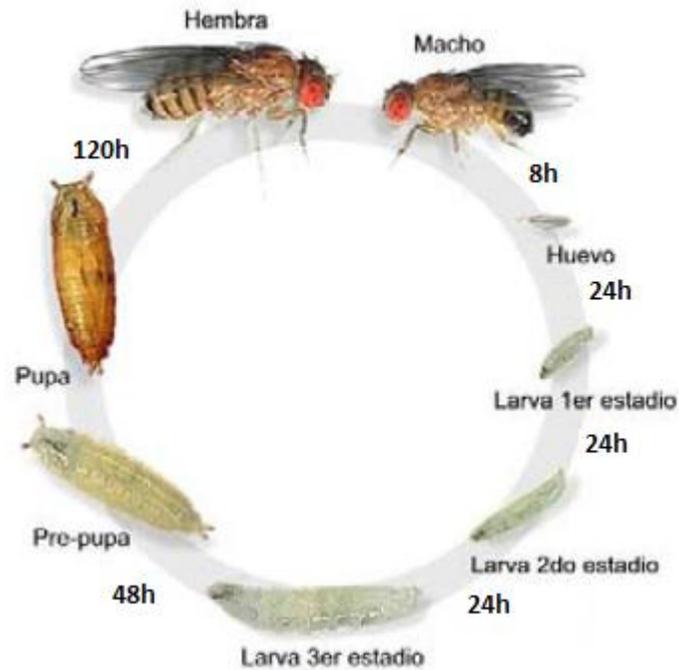


Figura 11. Ciclo de vida de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Modificado de FlyMove, 2015.

Drosophila melanogaster en cuanto a historia se refiere, ha sido un organismo clave en el estudio de los canales de potasio. En 1969 se produjeron varios mutantes por efecto del etil metano sulfonato (EMS), los cuales presentaban como característica principal la agitación de las patas bajo anestesia con éter, además de un temblor rítmico de pies, tal comportamiento fue asociado a mutaciones en canales de potasio (Xiang-Wu *et al.*, 2007). Posteriormente, estudios en uno de estos mutantes, la cepa *Shaker*, permitieron el aislamiento y clonación del locus *Sh*, que está encargado de la expresión de un canal de potasio (*Shaker*). Este hecho significó tan sólo el comienzo de la clonación de una gran cantidad de genes codificantes de canales de potasio, que a su vez permitiría conocer su funcionalidad y topología (Warmke *et al.*, 1991).

Estudios posteriores realizados en otras cepas de *Drosophila*, como la cepa *eag*, permitieron el aislamiento y clonación del locus *eag*, que codifica para un canal de potasio que participa en la repolarización de la membrana celular y que además puede modificar la actividad de otros canales de potasio activados por voltaje (Ganetzky *et al.*, 1999). Este canal de potasio, fue nombrado Eag1 y tiene su homólogo en mamíferos, llamado Kv10.1, del cual se reportó que el locus responsable de su expresión está ligado al cromosoma X (Drysdales *et al.*, 1991).

Una de las técnicas más utilizadas para el estudio de mutaciones ligadas al cromosoma X empleando a *Drosophila melanogaster* como modelo, ha sido el uso de cepas con cromosomas X ligados. Las cepas con cromosomas X compuestos o ligados, consisten de dos cromosomas X que comparten un centrómero en común (denotados X^X) de modo que siempre se heredan juntos. Por lo tanto un cromosoma X^X se hereda como una sola unidad, y los organismos que lleven este cromosoma serán hembras, que además van a presentar un cromosoma Y (X^XXY) y serán fértiles (Zhang & Woodruff, 2006). Por otra parte, los machos al tener un solo cromosoma X (llamados hemicingos para todos los genes ligados a X), van a expresar la mutación asociada con el cromosoma X (Baker & Woodard, 2007).

Entre las cepas más utilizadas y conocidas debido a su estabilidad y eficiencia para realizar experimentos de mutaciones ligadas al cromosoma X, es la cepa C(1)DX, que tiene un origen inducido por rayos X (Muller, 1943). Esta cepa a menudo se encuentra asociado a marcadores morfológicos de pigmentación del cuerpo como *y*¹ o de tricomas bifurcados como *f*¹. Además, para que la mutación de los cromosomas ligados se mantenga estable en la progenie, se acostumbra tenerlo como *Stock* con la cepa FM7i, dando lugar a una cepa compuesta (FM7i/C(1)DX, *y*¹, *f*¹) (Flybase, 2015).

JUSTIFICACIÓN

Los venenos de los caracoles *Conus* representan una fuente de péptidos biológicamente activos; desafortunadamente, no todos los péptidos que componen el veneno se encuentran en la misma concentración, y algunos son muy poco abundantes (Kaufenstein *et al.*, 2004).

El principal problema que existe en el estudio de los péptidos presentes en el veneno de *Conus*, es la pérdida significativa de las moléculas de interés durante el proceso de purificación y caracterización química (alquilación y digestión) (Becerra-Amezcuca, 2012). Dicha pérdida de material puede llegar a ser superior al 70% del material original después de unos cuantos pasos en el análisis químico para su cuantificación por cromatografía. Este problema podría resolverse si la cantidad de cada ejemplar de caracoles disponibles para la extracción de veneno fuera grande, lo cual normalmente no ocurre (Flores-Torres, 2009). Es por ello que el material que se logra purificar debe ser cuidadosamente utilizado para optimizar su uso. Especialmente cuando la cantidad de cierta fracción es mínima se tiende a recurrir a la realización de bioensayos que sean rápidos, sencillos y que necesiten una cantidad reducida de material para evaluar la toxicidad de las mismas (López-Vera *et al.*, 2004).

La optimización del uso de los péptidos extraídos de los venenos de *Conus* es de gran importancia para posibilitar la evaluación de los mismos. Por esta razón, en el presente proyecto nos enfocaremos en maximizar el uso de conotoxinas específicas para el canal de potasio *eag* (Kv10.1), mediante microinyecciones de conotoxinas parcialmente caracterizadas y de nuevos péptidos, utilizando como modelo *in vivo* a *Drosophila melanogaster*. Esto último, debido al amplio conocimiento de su genoma y la disponibilidad de cepas mutantes para canales de potasio, para así poder evaluar la sensibilidad utilizando como referencia el porcentaje de sobrevivencia. Además se planea obtener una craza que sea muy sensible a toxinas con actividad sobre canales de potasio y esto favorezca aún más la caracterización de conotoxinas mediante pruebas de toxicidad, con mayor poder discriminatorio.

HIPÓTESIS

- En la cruce C(1)DX, *y*, *f'* X *eag* la sobrevivencia de los machos es significativamente menor que la de las hembras cuando se inyectan las conotoxinas que presentan actividad en canales de potasio.
- Las conotoxinas con actividad antagónica en canales de potasio afectan diferencialmente la sobrevivencia de la cepa *eag* con respecto a la cepa *yw*.
- Las fracciones del veneno de *Conus fergusonii* y *Conus spurius* que presentan componentes con actividad en canales de potasio afectan diferencialmente la sobrevivencia de la cepa *eag* con respecto a la cepa *yw*.
- Los componentes mayoritarios de las fracciones de *Conus fergusonii* y *Conus spurius* que muestren un efecto diferencial en la sobrevivencia de la cepa *eag* con respecto a la cepa *yw*, bloquean las corrientes del canal de potasio Kv10.1.

METODOLOGÍA

I. Procesamiento de las especies *Conus fergusonii* y *Conus spurius*

Obtención de especímenes

Se emplearon caracoles de las especies *Conus fergusonii* y *Conus spurius*, mismos que fueron donados por el laboratorio de Neurofarmacología Marina a cargo del Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez del Instituto de Neurobiología, UNAM.

Extracción del veneno

Se utilizaron siete conductos venenosos de *C. fergusonii* y cuatro de *C. spurius*. Cada uno de los conductos venenosos se homogeneizó en solución de extracción: 40% de acetonitrilo (ACN) y 2% de ácido trifluoroacético (TFA). El homogenado se centrifugó a 12,000 g durante 30 min. El sobrenadante (extracto crudo) se separó, y el botón se desechó.

Separación y purificación de los componentes del veneno por HPLC

La separación de los péptidos del extracto crudo del veneno de ambas especies se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), utilizando una columna analítica C18 (Vydac, 218TP54, 4.6 mm x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, 300 Ångström tamaño de poro), provista con una precolumna (218TP54, 4.6 x 10 mm, 5 µm de tamaño de partícula). Se ocuparon diferentes gradientes de elusión entre la solución A (0.1 % de TFA) y la solución B (0.085 % de TFA y 90 % de ACN) para llevar a cabo el fraccionamiento y el subfraccionamiento. La detección se realizó con un espectrómetro de flujo ajustado a 220 y 280 nm de longitud de onda.

Las fracciones del veneno de *C. spurius* y *C. fergusonii* se colectaron en tubos de polipropileno de 1.5 mL. La colecta se llevó a cabo con base en el tiempo de retención, siendo la primera de ellas la fracción F0, tomada del minuto 5 al 10, a partir de esta cada una de las fracciones, que van de F1 a F8, se colectaron durante 10 minutos. Posteriormente, cada una de las fracciones fue llevada a sequedad con un evaporador centrífugo (*Thermo Savant SPD1010*), finalmente cada una se resuspendió en 1 mL de agua grado HPLC y se cuantificó la proteína con un espectrofotómetro (NanoDrop 2000/2000C) a una lectura de 280nm.

Durante la fase de subfraccionamiento de las fracciones de interés, la colecta de cada uno de los componentes se llevó a cabo utilizando tubos de polipropileno de 1.5 mL, mismos que se rotularon en orden ascendente con base en sus tiempos de retención.

II. Bioensayos en larvas de *Drosophila melanogaster*

Estrategia experimental para la inyección de las larvas

La recolección de las larvas de cada una de las cepas (proporcionadas por el Dr. Juan R. Riesgo Escovar, INB) se llevó a cabo utilizando un pincel, sólo se utilizó a aquellas que se encontraban en el tercer estadio de desarrollo. La estrategia experimental consistió de distintas etapas (Figura 12):

A.- Se realizó el sexado de las larvas con ayuda de un microscopio estereoscópico, solamente para el caso de la cruce C(1)DX, *y*, *f* X *eag*; posteriormente fueron colocadas en un portaobjetos que tenía cinta doble cara. Para los bioensayos con las cepas *yw* y *eag* se omitió el sexado de las larvas.

B.- Se utilizaron microagujas hechas con tubos capilares de vidrio (0.53 mm DI).

C.- Para llevar a cabo las inyecciones se utilizó un microscopio estereoscópico y un microinyector (nanoliter 2000), en el cual se colocaron las microagujas. Posteriormente fueron cargadas con aceite mineral y finalmente con el compuesto, toxina, fracción o componente mayoritario en cuestión.

D.- Las inyecciones fueron de un volumen de 9.2 nL entre el 7° y 8° segmento de cada una de las larvas.

E.- Posterior a las inyecciones, las larvas fueron despegadas con ayuda de agua y un pincel, para que pudieran ser colocadas en viales de polipropileno con medio de cultivo.

F.- El conteo de los organismos que sobrevivieron se comenzó a registrar desde el día 5 hasta el día 13 posterior a la inyección.

Cada ensayo de inyecciones consta de lotes de cien larvas, en total se realizaron 3 ensayos por cepa, sexo y concentración para los controles y las conotoxinas, mientras que para las fracciones y componentes mayoritarios se realizó un ensayo. Controles; solución de Ringer (solución salina 0.9%), albúmina (100 µM) y saxitoxina (1 µM). Conotoxinas; PVIIA, RIIIK y SrlB en sus distintas concentraciones (en µM): 0.5, 1, 5, 30, 50 y 100.

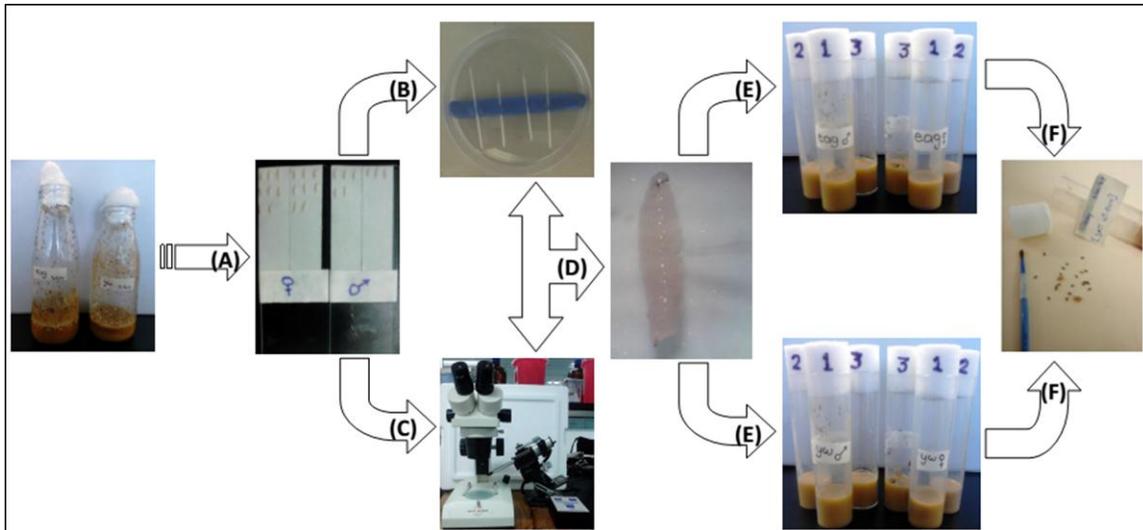


Figura 12. Estrategia experimental del proceso de inyección de las larvas de *Drosophila melanogaster*.

Cepas de *Drosophila melanogaster*

- *yw* (yellow-white) cepa control
- *eag* (ether-a-go-go)
- FM7i, P (act GFP)/ C(1)DX, y^1 , f^1

La cepa *yw* se caracteriza por presentar una coloración amarilla y ojos blancos. El marcador *y* (localización: 1-0.60) es el encargado del patrón de coloración amarilla en la cutícula. Esta coloración mutante puede ser total (y^1) o en ciertas regiones del cuerpo (y^2). El marcador *w* (localización: 1-1.5) es una mutación recesiva y se distingue por conferir una coloración blanca en los ojos de la mosca (Lindsley & Zimm, 1992).

La cepa *eag* (localización: 1.45.3) es una mutación inducida por etil metano sulfonato (EMS) y recibe su nombre porque bajo anestesia con éter mueve las patas rítmicamente (Lindsley & Zimm, 1992). Este efecto se debe a una hiperexcitabilidad asociada a la reducción de las corrientes de potasio, resultando en un aumento en la transmisión sináptica y con ello la agitación de las patas (Hodge, 2009; Warmke *et al.*, 1991).

En la cepa compuesta FM7i, P {act GFP}/C(1)DX, y^1 , f^1 se encuentra el genotipo FM7i, que es un cromosoma balanceador e impide la recombinación, además todas las hembras son estériles. El genotipo P {act GFP} indica que todos los machos van a presentar fluorescencia debido a la expresión de la proteína verde fluorescente bajo el promotor de la actina. Por otra parte el genotipo C(1)DX presenta dos cromosomas X ligados y lleva unidos a los marcadores

y^1 , f^1 , el primero indica un fenotipo con falta de pigmentación en alas y cuerpo, mientras que el segundo representa el fenotipo *forked*, en donde los tricomas mesotorácicos se encuentran bifurcados (Flybase, 2015).

Cruza de *Drosophila melanogaster*

En frascos con medio de cultivo se llevó a cabo una cruce en proporciones de 3:1 de hembras y machos. Se utilizó a las hembras vírgenes C(1)DX, y^1 , f^1 y a los machos de la cepa *eag*. A continuación se puede observar el cuadro de *Punnett* de la cruce llevada a cabo:

$\frac{FM7i, P\{act\ GFP\}}{C(1)DX, y^1, f^1} \times eag$	→	<table style="border-collapse: collapse; width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="border: none; padding: 5px;">♀ \ ♂</td> <td style="border: none; padding: 5px;">X^{K+}</td> <td style="border: none; padding: 5px;">Y</td> </tr> <tr> <td style="border: none; padding: 5px;">$\widehat{X}\widehat{X}$</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">$\widehat{X}\widehat{X}X^{K+}$</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">$\widehat{X}\widehat{X}Y$</td> </tr> <tr> <td style="border: none; padding: 5px;">Y</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">$X^{K+}Y$</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">YY</td> </tr> </table>	♀ \ ♂	X^{K+}	Y	$\widehat{X}\widehat{X}$	$\widehat{X}\widehat{X}X^{K+}$	$\widehat{X}\widehat{X}Y$	Y	$X^{K+}Y$	YY
♀ \ ♂	X^{K+}	Y									
$\widehat{X}\widehat{X}$	$\widehat{X}\widehat{X}X^{K+}$	$\widehat{X}\widehat{X}Y$									
Y	$X^{K+}Y$	YY									

Figura 13. Cuadro de *Punnett* de la cruce realizada. Se utilizaron hembras vírgenes C(1)DX, y^1 , f^1 y fueron cruzadas con machos de la cepa *eag*. Los únicos genotipos con los que se trabajó fueron $X^{K+}Y$ (Machos) y $X^{\wedge}XY$ (Hembras), el superíndice K^+ indica la mutación del canal de potasio. Los genotipos restantes no son viables, debido a que $X^{\wedge}XX^{K+}$ muere durante el desarrollo en huevo y el genotipo YY no es posible.

Compuestos Control

- Solución de Ringer (Solución Salina 0.9%)
- Albúmina Sérica Bovina (BSA) [100 μ M]

La solución de Ringer es lo que se conoce como solución salina normal de cloruros de sodio, potasio y calcio en agua destilada, es isotónica con el tejido animal y se usa tópicamente como suero fisiológico (Vergel *et al.*, 2009).

La BSA es una proteína que presenta un peso molecular de 66.43 kDa. Su estructura es una cadena polipeptídica simple, constituida por 583 residuos de aminoácidos. A pH 5-7 contiene 17 puentes disulfuro intracadena y 1 grupo sulfhídrico. Es ampliamente utilizada en la industria biomédica como componente importante en pruebas diagnósticas y estándar en pruebas de proteínas (Fedesa S. A., 2010).

Toxinas

- PVIIA (conotoxina sintética, idéntica a la aislada de *Conus purpurascens*)
- RIIIK (conotoxina sintética, idéntica a la aislada de *Conus radiatus*).
- SrIB (conotoxina sintética, idéntica a la aislada de *Conus spurius*).
- Saxitoxina (STX)

La conotoxina κ O-PVIIA (PVIIA) es un péptido compuesto por 27 residuos de aminoácidos y fue la primer toxina de *Conus* en describirse que presenta actividad sobre el canal de potasio tipo *Shaker* (Terlau & Olivera, 2004). Su interacción con el canal está dada por cuatro residuos de aminoácidos; Arg2, Lys7, Phe9 y Phe23 (Lewis *et al.*, 2012). Fue aislada del veneno del caracol piscívoro *Conus purpurascens* y tiene una IC₅₀ de 57 nM para canales de potasio tipo *Shaker* expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* (Jacobsen *et al.*, 2000).

La conotoxina κ M-RIIIK (RIIIK) presenta 27 residuos de aminoácidos en su estructura y fue el primer péptido de la familia kappa (κ) dentro de la superfamilia M del cual se demostró que tiene actividad sobre el canal de potasio tipo *Shaker* (Terlau & Olivera, 2004). Además, se reportó para esta toxina la ausencia de la diada Phe9 y Lys7, que es característica de las toxinas que interactúan con canales de potasio. Sin embargo, se ha documentado que los residuos de aminoácidos responsables de su interacción con los canales de potasio son Leu1, Arg10, Lys18 y Arg19 (Lewis *et al.*, 2012). Esta conotoxina fue aislada del veneno del caracol piscívoro *Conus radiatus*, presenta una IC₅₀ de 20 μ M para el canal de potasio tipo *Shaker* y una IC₅₀ de 20nM por el canal de potasio TSha1 de trucha (Fedosov *et al.*, 2012).

La α -conotoxina SrIB es un péptido de 18 residuos de aminoácidos y tiene como blanco molecular receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), fue aislada del veneno del caracol vermívoro *Conus spurius* y presenta una IC₅₀ de 46 nM (López-Vera *et al.*, 2007).

La saxitoxina (STX) es una ficotoxina producida por dinoflagelados y cianobacterias, es un potente alcaloide conocido como “la toxina paralizante de los moluscos”, aunque no la producen ellos. Es una perhidropurina tricíclica con un peso molecular de 299 Da, de la cual se han obtenido 30 variantes (Valério *et al.*, 2010). La producen dinoflagelados marinos del género *Alexandrium*, *Pyrodinium* y *Gymnodinium* y cianobacterias del género *Anabena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya* y *Planktithurx* (Estrada *et al.*, 2010; Valério *et al.*, 2010). Presenta afinidad por canales de sodio (Na_v) y de calcio (Ca_v²⁺) neuronales, con una IC₅₀ de 1.2 a 2.2 nM (Kulagina *et al.*, 2004; Thottumkara *et al.*, 2014).

Fracciones de *Conus fergusonii*

Para llevar a cabo la primera fase de inyección de cada una de las fracciones del veneno de *C. fergusonii* en las cepas *yw* y *eag*, se tomó de cada uno de los tubos donde fueron cuantificadas una cantidad de 2.5 mg/mL de proteína, posteriormente se llevaron a sequedad y se resuspendieron en 1 mL de solución salina (0.9%). Las fracciones que presentaron una concentración menor a 2.5 mg/mL fueron inyectadas a la concentración registrada durante su cuantificación. En la segunda fase de inyección de las fracciones de *C. fergusonii*, se utilizó el sobrante de la primera fase de inyección, de la cual se tomó el volumen necesario para alcanzar la concentración de ~0.83 mg/mL de proteína, posteriormente se agregó solución salina (0.9%) hasta llevar la muestra a 1 mL .

Fracciones de *Conus spurius*

Para llevar a cabo las inyecciones de cada una de las fracciones del veneno de *C. spurius* en las cepas *yw* y *eag*, se tomó de cada uno de los tubos donde fueron cuantificadas el volumen necesario para poder alcanzar la concentración de ~0.83 mg/mL de proteína, posteriormente se añadió solución salina (0.9%) hasta llevar la muestra a 1 mL.

Componentes mayoritarios de las fracciones de interés

Para la inyección de los componentes mayoritarios obtenidos durante el subfraccionamiento de las fracciones de interés, se dividió cada una de las muestras en dos tubos eppendorf y posteriormente se llevaron a sequedad. Una de las muestras fue destinada para realizar las microinyecciones y la otra para su posterior secuenciación en caso de que se obtuvieran resultados indicativos de una posible actividad sobre canales de potasio. Cada uno de los tubos destinados para las inyecciones fueron resuspendidos en volúmenes de 50 µL o superiores de solución salina 0.9%. Los ensayos para cada fracción y/o componentes mayoritarios consistieron de 100 larvas por cepa.

III. Ensayos electrofisiológicos con los componentes que mostraron efecto en la sobrevivencia

Expresión del canal de potasio Kv10.1

Se utilizó la línea celular HEK293 (células de riñón embrionarias humanas) transfectadas de manera estable con el canal Kv10.1. La línea celular se mantuvo en cultivo a 37°C, en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino y adicionado con zeocina (300 µg/mL). Las células previas al registro se sembraron en vidrios de 2x3 mm.

Registros electrofisiológicos

Se registraron las corrientes macroscópicas mediante la técnica de Patch-Clamp, en la modalidad de célula-completa (whole-cell), se utilizó un amplificador Axopatch 1D (Axon Instruments, USA), frecuencia de adquisición: 100 milisegundos por punto y filtro de 5KHz. Las corrientes se filtraron con el filtro del amplificador, y se muestrearon a frecuencias que cumplen el teorema de Nyquist, utilizando un convertidor A/D Digidata 1322 (Axon Instruments, USA). La resistencia en serie fue compensada con el circuito de compensación del amplificador. Se usaron electrodos de vidrio de Borosilicato (Kimax 52) con una resistencia de ~1MΩ. Entre el 70 y el 80 % de la resistencia en serie se compensó de manera electrónica. El potencial de reposo (HP) fue de -80 mV y los registros se realizaron a temperatura ambiente (20-25 °C).

Soluciones de registro

Las soluciones se prepararon usando agua ultrapura MilliQ.

Soluciones Internas (en mM, pH 7.2):

K_i: 90 KF, 30KCl, 2MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES-KOH.

Na_i: 90 NaF, 30NaCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES-NaOH

Soluciones externas (en mM, pH 7.2):

Na_o: 147NaCl, 2 CaCl₂, 5 KCl₂, 10 HEPES-NaOH.

RESULTADOS

I. Inyecciones en la craza C(1)DX, y^1 , f^1 X *eag*

Se llevó a cabo una craza de *D. melanogaster* empleando hembras vírgenes C(1)DX, y^1 , f^1 y machos de la cepa *eag*, con el objetivo de hacer más sensible y ágil los bioensayos de inyección y valoración de la sensibilidad a las conotoxinas con actividad sobre canales de potasio. Para ello se tomó en consideración la carga genética que presentarían las hembras y los machos como resultado de dicha craza, y que a su vez esto reflejaría un efecto diferencial en la sobrevivencia entre ambos sexos, siendo superior la sobrevivencia de las hembras con respecto a los machos cuando se inyectan las toxinas bloqueadoras de canales de potasio.

Sobrevivencia

La primera fase de bioensayos consistió en la inyección de las conotoxinas PVIIA, RIIIK y SrlB en volúmenes de 9.2 nL en larvas de tercer estadio de desarrollo. Las larvas utilizadas para la inyección de estas conotoxinas fueron tomadas a partir de la craza C(1)DX, y^1 , f^1 X *eag*, mismas que previamente habían sido diferenciadas por sexo. Las concentraciones que se inyectaron para cada una de las tres conotoxinas fue en el orden micromolar (μ M): 0.5, 1, 5, 30, 50 y 100. Para cada concentración se llevó a cabo tres ensayos, cada uno de ellos consistió de un lote de 100 larvas, las larvas fueron inyectadas una por una. De esta manera se obtuvieron las curvas dosis-respuesta de sobrevivencia trece días después de realizar su inyección, fecha en la cual se registró la máxima sobrevivencia.

Se realizó la curva dosis-respuesta con los resultados obtenidos con las conotoxinas que presentan actividad en canales de potasio; PVIIA y RIIIK (Figura 14), además se aplicó un análisis de varianza factorial (ANOVA) tomando en consideración el efecto de las variables; sexo, toxina y concentración y su efecto en la sobrevivencia. El resultado indica que no hay diferencias significativas en el porcentaje de sobrevivencia entre hembras y machos conforme aumenta la concentración de las conotoxinas, a excepción de la concentración 1 μ M con la conotoxina PVIIA (Figura 14). Por otra parte, al observar la curva dosis-respuesta obtenida con la conotoxina RIIIK es evidente la disminución en la sobrevivencia para ambos sexos dependiente de la concentración, obteniéndose porcentajes de sobrevivencia inferiores al 80% desde la primer concentración inyectada y disminuyendo a porcentajes por debajo del 50% con las concentraciones de 50 y 100 μ M (Figura 14).

La curva dosis-respuesta de los datos obtenidos con la conotoxina control, la SrIB, muestra que a diferencia de las otras dos conotoxinas, la sobrevivencia no disminuye considerablemente cuando se inyectan las concentraciones más bajas (0.5 μM y 1 μM), ya que al compararlas con los controles de solución salina 0.9% y albúmina 100 μM la sobrevivencia para ambos sexos se mantiene muy cerca al 90%, porcentaje que podría considerarse como el promedio de la sobrevivencia para los dos primeros controles utilizados; sin embargo ésta disminuye a valores inferiores al 80% a partir de la concentración de 5 μM (Figura 14).

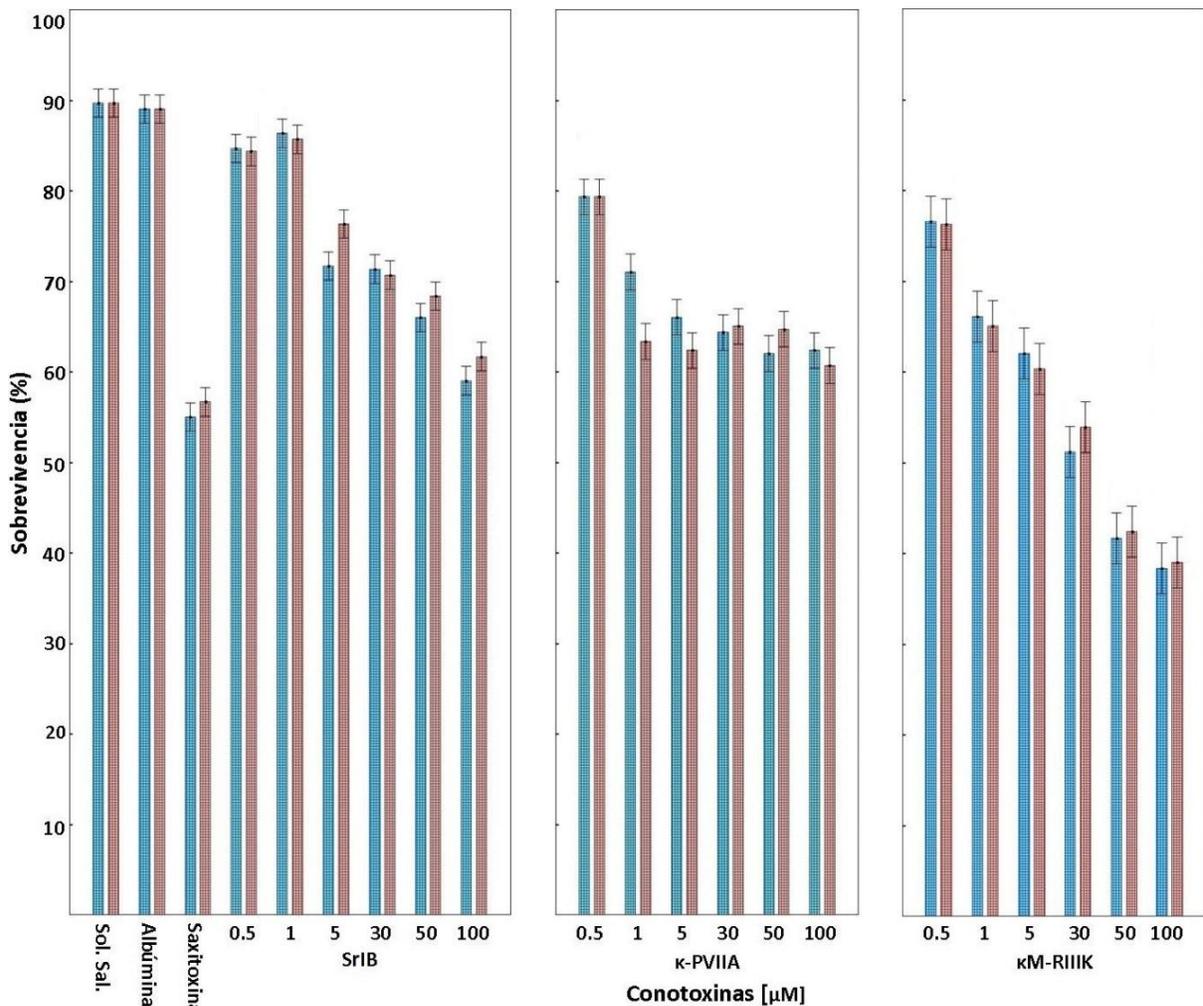


Figura 14. Sobrevivencia de la cruce: C(1)DX, y^1 , f^1 X *eag* de *Drosophila melanogaster* por sexo; hembras (azul) y machos (rojo) después de la inyección con las conotoxinas SrIB, PVIIA, y RIIK con sus diferentes concentraciones. Cada punto representa la media \pm E.E., para SrIB ($F=4.36$, $p<0.05$), PVIIA ($F=6.23$, $p <0.05$) y RIIK ($F=0.47$, $p >0.05$). Además se incluyen los resultados de las inyecciones con los controles; solución salina 0.9%, albúmina 100 μM y saxitoxina (STX) 1 μM .

Mortandad

Durante el proceso de inyección de las conotoxinas y posterior a este, se monitorearon las larvas. Se logró determinar aspectos conductuales y los estadios afectados por las conotoxinas. Los principales estadios afectados fueron larva y pupa, determinándose generalmente cinco causas responsables de la mortandad: 1) cuando los organismos sufren lisis posterior a la inyección, 2) la necrosis de la larva, 3) cuando la pupa presenta coloración anormal, 4) la lisis del organismo dentro del pupario y 5) cuando los organismos no eclosionan del pupario, a pesar de estar completamente desarrollados (Anexo 1). Además se observó que un porcentaje de las larvas se van al medio de cultivo y pupan, pero esto no se consideró como resultado de la inyección de las conotoxinas porque también se observó en un control en donde se tomaron 100 larvas para determinar el porcentaje de sobrevivencia promedio de la crusa, mismo en el que se obtuvo que entre 6% y 7% de las larvas tiende a irse al medio de cultivo y pupar (mueren en ese lugar).

El principal estadio afectado en todas las concentraciones de las conotoxinas PVIIA, RIIIK y SrlB fue el de pupa, principalmente cuando el organismo presenta lisis dentro del pupario, siendo en general superior al 10% para ambos sexos con la conotoxina PVIIA a partir de la concentración de 5 μM (Figura 15) y desde 0.5 μM para la conotoxina RIIIK (Figura 16). De la misma manera, con la conotoxina SrlB la lisis del organismo dentro del pupario fue el estadio afectado más frecuente en hembras a partir de la concentración de 5 μM . Este mismo efecto fue observado en los machos a partir de la concentración de 30 μM (Figura 17).

Para el caso en particular de la conotoxina PVIIA (5 μM), los organismos comenzaron a moverse activamente, pero pasados 15 minutos después de la inyección, alrededor del 10% se quedaron inmóviles y comenzaron a sufrir necrosis, siendo la causante de mortandad más frecuente para las hembras y el segundo para los machos. Por otra parte, con la conotoxina RIIIK no se observó ninguna otra forma causante de mortandad que fuera tan frecuente como lo fue la lisis del organismo dentro del pupario, ya que ninguno se presentó en frecuencias superiores al 16%. Finalmente, para el caso de la conotoxina SrlB, la lisis del organismo dentro del pupario, a pesar de ser el principal causante de mortandad para hembras y el segundo para machos, no fue superior al 10%, sino hasta alcanzar concentraciones de 50 μM y 100 μM para hembras y concentraciones de 30 μM y 100 μM para machos.

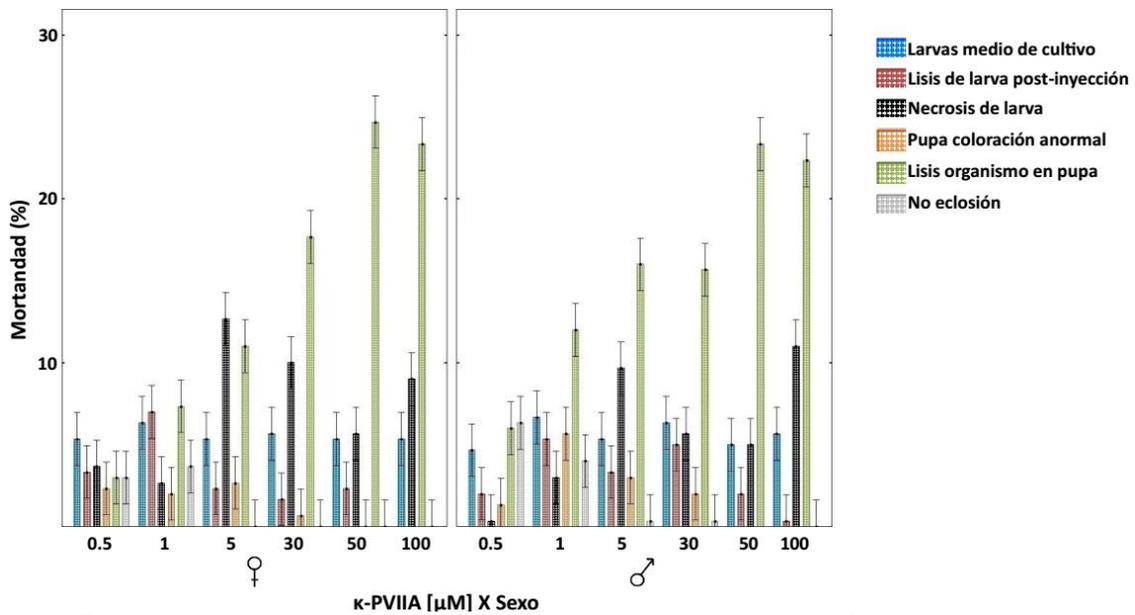


Figura 15. Efecto de la conotoxina PVIIA sobre los estadios de *Drosophila melanogaster*. Hembras (izquierda) y machos (derecha) producto de la cruce C(1)DX, y^1, f^1 X *eag*, cada punto representa la Media \pm E.E.

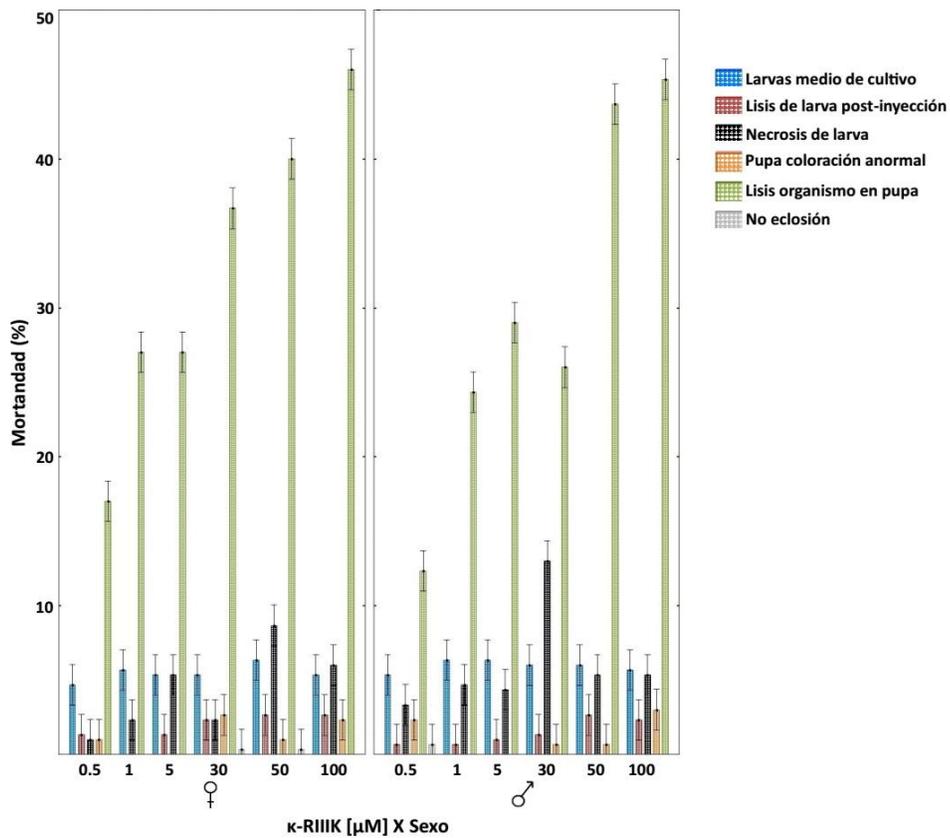


Figura 16. Efecto de la conotoxina RIIHK sobre los estadios de *Drosophila melanogaster* después de su inyección. Hembras (izquierda) y machos (derecha) producto de la cruce C(1)DX, y^1, f^1 X *eag*, cada punto representa la Media \pm E.E.

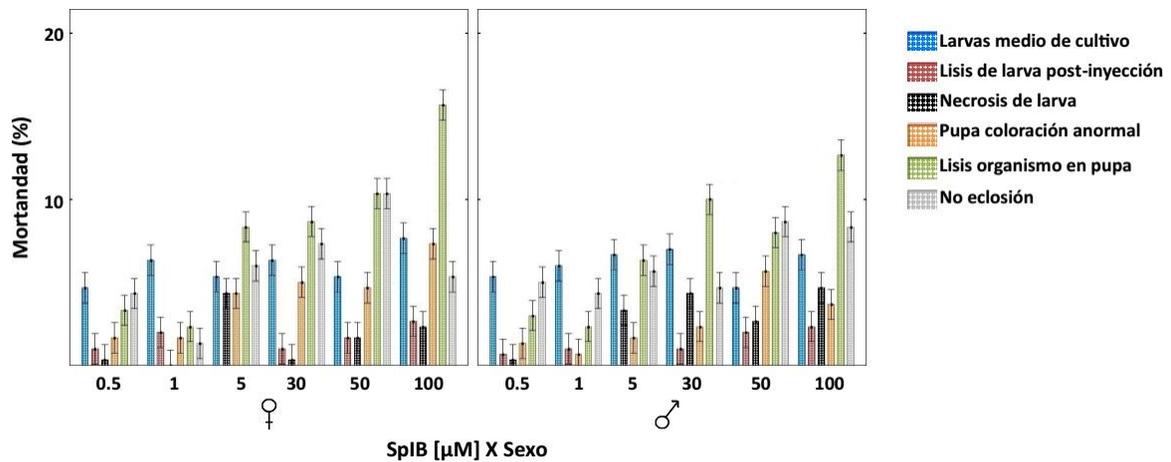


Figura 17. Efecto de la conotoxina SrIB sobre los estadios de *Drosophila melanogaster*. Hembras (izquierda) y machos (derecha) producto de la cruce C(1)DX, y^1, f^1 X *eag*, cada punto representa la Media \pm E.E.

De la misma manera que se hizo con las conotoxinas, también se analizaron los estadios afectados por la solución salina y albúmina 100 μ M, con las que se observó que la mortandad se debía principalmente a que las larvas mueren en el medio de cultivo ($\pm 7\%$ en ambos sexos). Para la saxitoxina a una concentración de 1 μ M, se observó que el principal causante de la mortandad es la lisis de los organismos en el pupario, que fue muy cercano al 30% en ambos sexos (Figura 18).

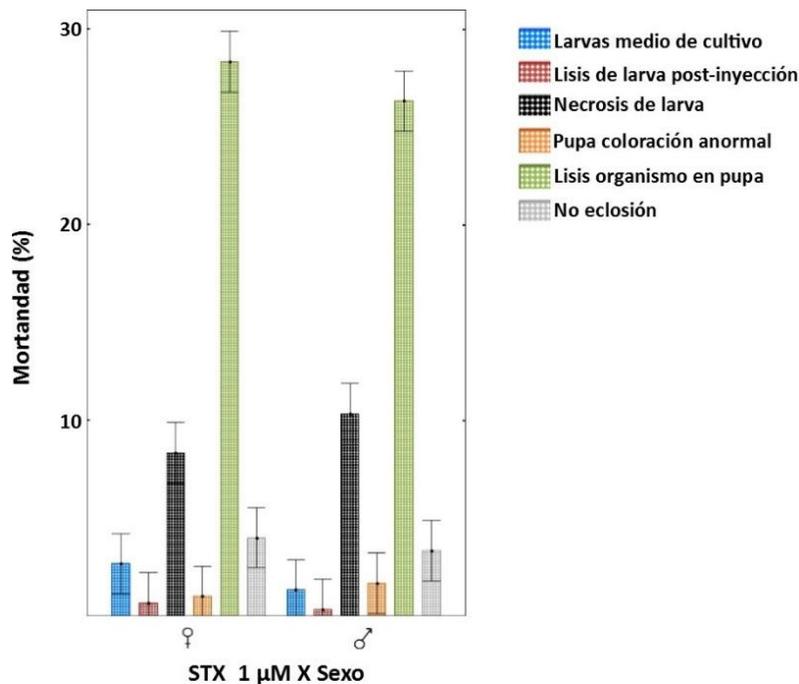


Figura 18. Efecto de la Saxitoxina [1 μ M] sobre los estadios de *Drosophila melanogaster*. Hembras (izquierda) y machos (derecha) producto de la cruce C(1)DX, y^1, f^1 X *eag*, cada punto representa la Media \pm E.E.

II. Fraccionamiento del veneno de *Conus fergusonii*

Durante la primera fase de fraccionamiento del veneno de *Conus fergusonii*, se colectó a cada una de las fracciones del veneno por tiempos (Figura 19), teniendo una duración de 10 minutos por fracción (F1 a F8) a excepción de la fracción F0, que la duración su colecta fue de 5 minutos. Posteriormente se cuantificó la proteína presente en cada una de las fracciones con ayuda de un espectrofotómetro (NanoDrop 2000/2000C) a una lectura de 280nm (Tabla 4).

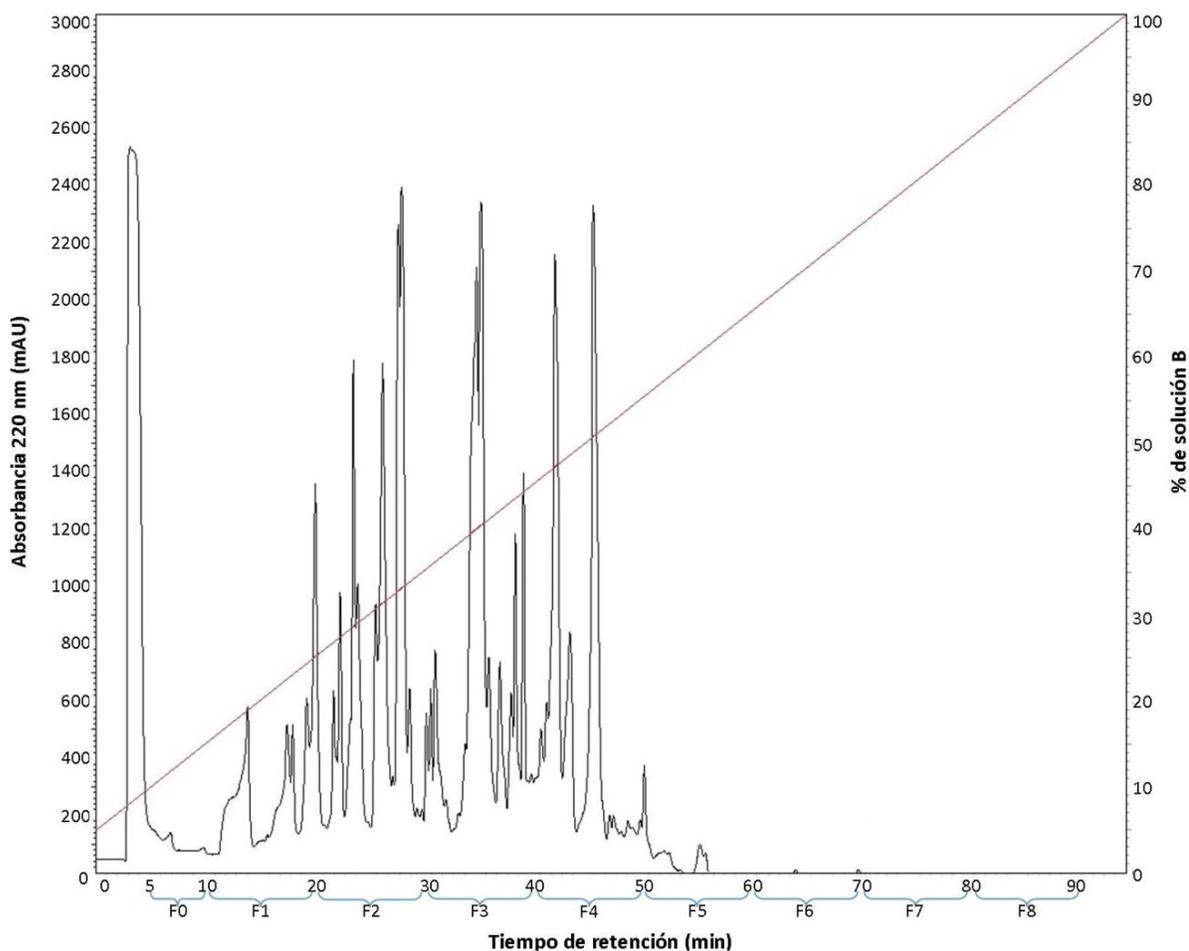


Figura 19. Perfil cromatográfico del veneno de *C. fergusonii* a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 5 a 100% de solución B en 95 minutos con un flujo de 1 mL/min (“línea roja”). Los corchetes (color azul) indican el tiempo de colecta de cada fracción, enumeradas de F0 a F8, iniciando la colecta a partir del minuto 5 al 10 para la F0, la colecta de cada fracción subsecuente por 10 minutos.

Tabla 4. Cuantificación de proteína de las fracciones del extracto crudo del veneno de *Conus fergusonii*.

Fracción	A280 (mg/mL)	260/280
Blanco	0.068	0.89
0	5.5	1.12
1	2.5	0.88
2	7.5	0.77
3	3.28	0.74
4	2.71	0.72
5	0.082	1.35
6	0.068	1.33
7	0.1	1.77
8	0.078	1.86

III. Inyección de las fracciones del veneno de *Conus fergusonii*

Tomando en consideración los resultados obtenidos con la cuantificación de proteína de cada una de las nueve fracciones, se decidió inyectar la concentración de 2.5 mg/mL presente en la fracción F1. Las fracciones F0, F2, F3 y F4 también fueron inyectadas a la concentración de 2.5 mg/mL, sin embargo, la F4 no se pudo inyectar a dicha concentración, ya que al resuspenderse en solución salina se precipitó, por lo tanto se inyectó a una concentración de 1.25 mg/mL. Por otra parte, se inyectaron las fracciones F5 a F8 a la concentración que presentaron durante su cuantificación. Finalmente, para llevar a cabo el bioensayo con las fracciones, se optó por realizarlos con las larvas de las cepas *yw* y *eag* debido a que con los resultados obtenidos previamente con la cruce: C(1)DX, y^1 , f^1 X *eag*, no se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia entre machos y hembras cuando se inyectaron las conotoxinas que bloquean canales de potasio (PVIIA y RIIIIK).

Sobrevivencia

Para realizar la curva dosis-respuesta y determinar una concentración con la cual se pudiera observar diferencia en la sobrevivencia entre las cepas *yw* y *eag* se decidió llevar a cabo solo un ensayo de 100 larvas por fracción y a partir de los resultados obtenidos considerar si es necesario disminuir la concentración. La curva dosis-respuesta realizada con los resultados de la concentración 2.5 mg/mL se pueden observar en la Figura 20, en donde se aprecia que la sobrevivencia de los organismos de la cepa *eag* generalmente es superior a la de la cepa *yw*, a excepción de las fracciones F6 y F8, sin embargo, la diferencia de la sobrevivencia entre ambas cepas no fue superior al 12% con ninguna de las fracciones.

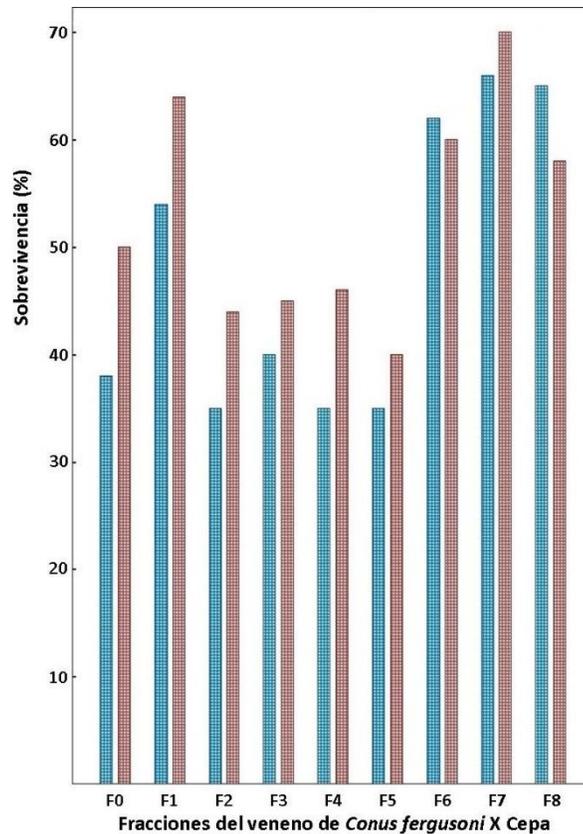


Figura 20. Supervivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de las fracciones del veneno de *Conus fergusonii* a una concentración de 2.5 mg/mL. Se inyectó a [1.25 mg/mL] la fracción F4, y las fracciones F5 a F8 a la concentración que presentaron durante su cuantificación.

Mortandad

De la misma manera que se hizo con las conotoxinas, se llevó a cabo el monitoreo de las larvas posterior a la inyección de cada una de las fracciones. Tal y como ya se había observado, los estadios afectados principalmente fueron larva y pupa, siendo las mismas cinco formas descritas anteriormente las responsables de la mortandad.

Cuando se inyectó la primer fracción, la F0 en las dos cepas de *D. melanogaster* se pudo observar que en la cepa *yw* el estadio más afectado fue el de pupa, cuando la eclosión no tiene lugar a pesar de que los organismos se encuentran completamente desarrollados, mientras que para la cepa *eag* fue la lisis del organismo en el pupario (Figura 21).

Por otra parte, la fracción F1 causó principalmente la lisis del organismo en estadio de pupa, sin embargo, ninguna forma causante de mortandad se presentó en porcentajes superiores al 22%. Para el caso de las fracciones F2 y F3 si se observaron porcentajes superiores al 30%, donde para ambas fracciones la principal causante de mortandad fue la

lisis del organismo en estadio de pupa en las dos cepas para la F2, y en la cepa *eag* para la fracción F3. El estadio más sensible para la cepa *yw* fue cuando los organismos no eclosionan a pesar de su completo desarrollo al aplicar la fracción F3 (Figura 21).

Al analizar la principal causa de muerte al aplicar la fracción F4 se determinó que en la cepa *yw* el estadio más sensible fue el de pupa; la lisis del organismo y la inhibición de la eclosión, ambas con porcentajes superiores a 25%; mientras que para la cepa *eag* la principal causa de la mortandad fue la lisis del organismo en el pupario, con un 40% (Figura 21).

En resumen, los resultados obtenidos con las fracciones inyectadas antes mencionadas a concentraciones menores a 2.5 mg/mL, indican que en general las formas causantes de mortandad se presentan en porcentajes inferiores al 17%; a excepción de la F5, en donde se observó un porcentaje superior al 35% de la lisis del organismo en el estadio de pupa para ambas cepas (Figura 21).

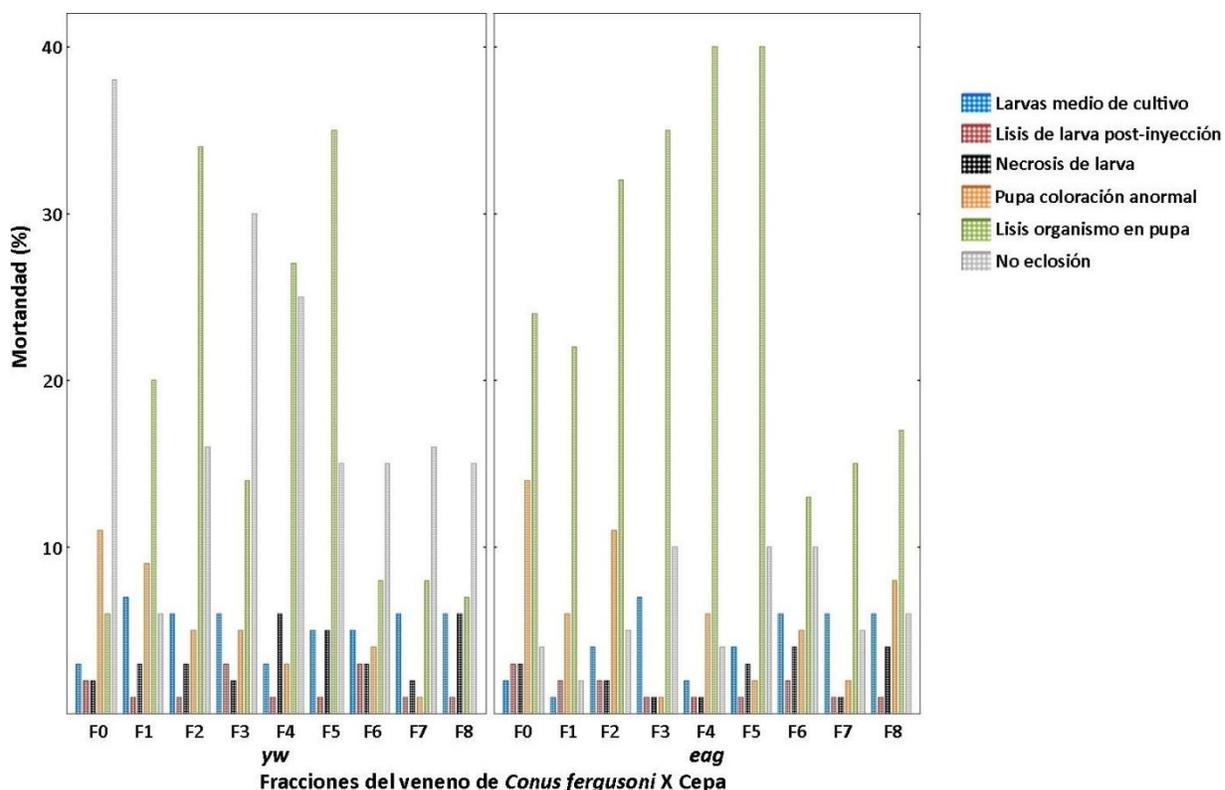


Figura 21. Efecto de la inyección de las fracciones del veneno de *Conus fergusonii* sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster*. Todas las fracciones se inyectaron a una concentración de 2.5 mg/mL a excepción de la fracción F4 cuya concentración fue de 1.25 mg/mL y las fracciones F5 a F8 a la concentración que presentaron durante su cuantificación.

III.1 Segunda fase de inyección de las fracciones de *Conus fergusonii*

Tomando en consideración que con los resultados obtenidos para las fracciones F0 a F4 al inyectar una concentración de 2.5 mg/mL no se pudo observar un marcado efecto diferencial en la sobrevivencia entre las cepas *yw* y *eag*, se decidió disminuir la concentración a una tercera parte (~0.83 mg/mL) y así proseguir con una nueva fase de bioensayos.

Sobrevivencia

Durante la segunda fase de inyección de las fracciones de *C. fergusonii* se observó una marcada diferencia en el porcentaje de sobrevivencia entre las cepas *yw* y *eag*. Esto se aprecia claramente con las fracciones F0, F1, F3 y F4, siendo del 28, 34, 19 y 21%, respectivamente. Además cabe destacar que la sobrevivencia de *yw* fue superior en las fracciones F2 y F3, mientras que la sobrevivencia de *eag* fue evidentemente superior con las fracciones F0, F1 y F4 (Figura 22). Cabe resaltar que con F0 a F4 los organismos de la cepa *eag* eclosionan a partir del octavo día posterior a la inyección y alcanzan su máximo al onceavo, mientras que la cepa *yw* comienza su eclosión a partir del séptimo día, alcanzando el máximo hasta el onceavo día, mientras que para el caso de la F3 se retrasa la eclosión hasta el treceavo día.

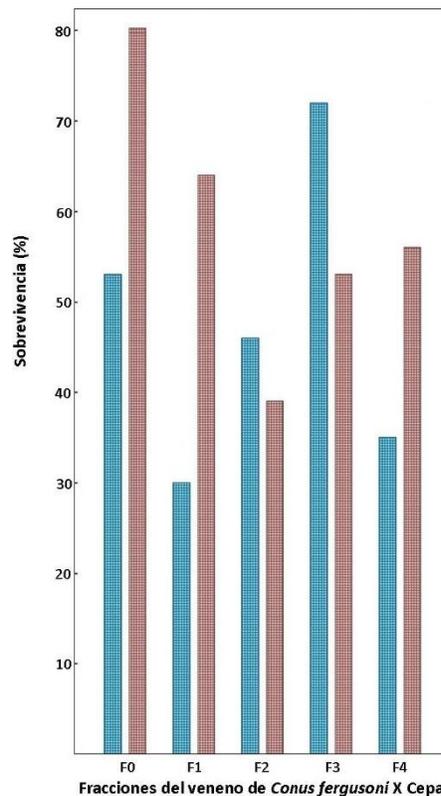


Figura 22. Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de las fracciones F0 a F4 de *Conus fergusonii* con una concentración de ~0.83 mg/mL.

Mortandad

Los resultados obtenidos con la fracción F0, indican que el porcentaje en que es afectado el estadio de pupa ya sea por lisis del organismo o la no eclosión son los más frecuentes para *yw* (18%), mientras que para *eag* ningún estadio es afectado en valores superiores al 10%. Para la fracción F1 las principales causantes de mortandad se deben a la lisis del organismo y a la falta de eclosión. Los porcentajes en que se presentan son superiores al 20% para *yw* y para *eag* sólo se observó la lisis del organismo en el pupario con un 16% (Figura 23). Durante el monitoreo se observó que al inyectar la fracción F2 en las larvas de la cepa *eag*, presentan inmediatamente un aumento en su actividad, mientras que en la cepa *yw* no se observa dicho efecto. Otro dato destacable para dicha fracción es que no se registró la lisis del organismo en el estadio pupa en la cepa *yw*, mientras que en la cepa *eag* fue el principal causante de mortandad, con un porcentaje del 34% (Figura 23).

Con la fracción F3 en la cepa *yw* se observó que ningún estadio fue afectado en porcentajes superiores al 10% de ninguna forma, mientras que para la cepa *eag* el único estadio afectado mayoritariamente con un 23% fue la lisis en estadio de pupa. Finalmente, los resultados de la fracción F4 indican que para ambas cepas la principal causante de mortandad es la lisis del organismo en el pupario, con un valor superior a 28%; mientras que *yw* fue la única que presentó la no eclosión con un porcentaje del 14% (Figura 23).

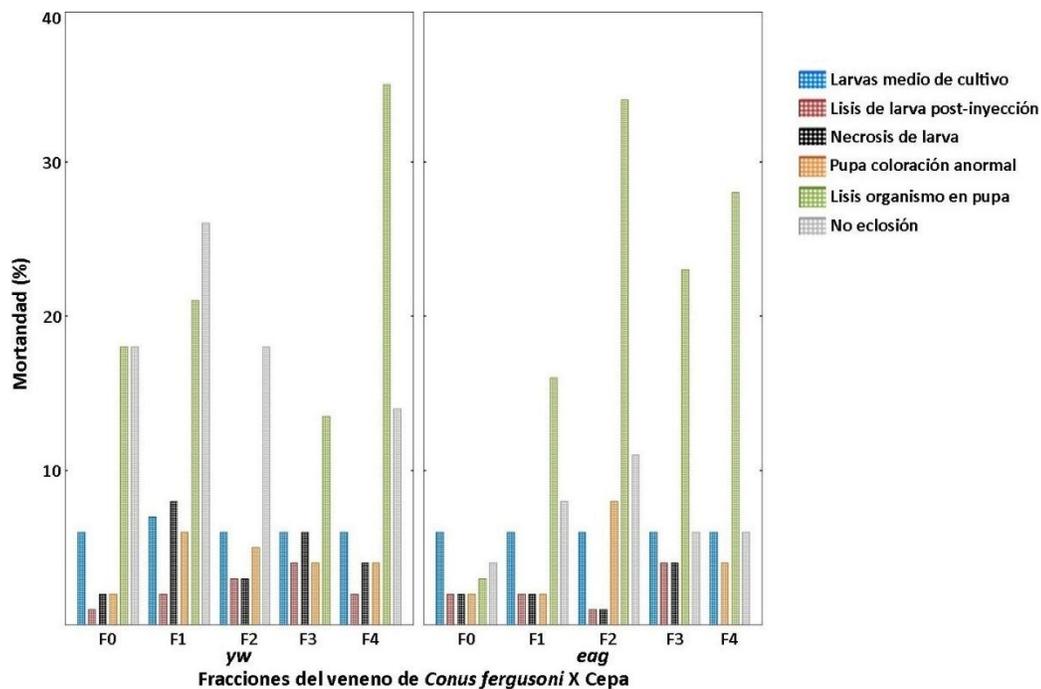


Figura 23. Efecto de la inyección de las distintas fracciones del veneno de *Conus fergusonii* sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster* a una concentración de ~0.83 mg/mL.

IV. Fraccionamiento del veneno de *Conus spurius*

La colecta de las fracciones del veneno de *Conus spurius* se realizó siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó con *Conus fergusonii*, es decir, se colectó la fracción F0 del minuto cinco al diez y las subsecuentes durante 10 minutos, obteniéndose así nueve fracciones, que van de F0 a F8 (Figura 24). Posteriormente se cuantificó la proteína de cada una de las fracciones, sin embargo, a algunas de ellas se les tuvo que agregar solución de extracción ya que no se podían resuspender completamente en agua grado HPLC (Anexo 2, tabla 10). Los resultados de la cuantificación de proteína se muestran en la tabla 5.

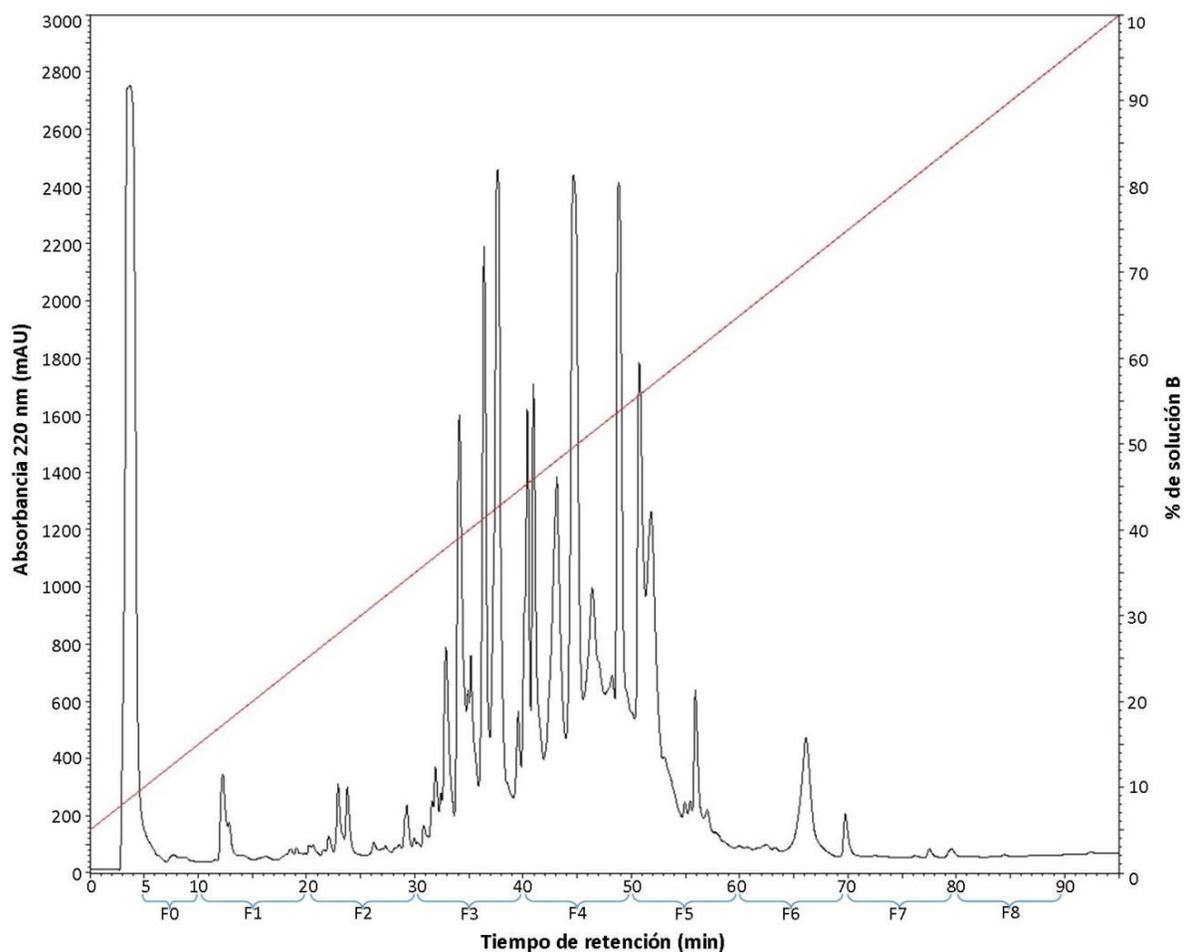


Figura 24. Perfil cromatográfico del veneno de *C. spurius* a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 5 a 100% de solución B en 95 minutos con un flujo de 1 mL/min ("línea roja"). Los corchetes (color azul) indican el tiempo de colecta de cada fracción, enumeradas de F0 a F8. Iniciando la colecta a partir del minuto 5 al 10 para la F0, la colecta de cada fracción subsecuente fue durante 10 minutos.

Tabla 5. Cuantificación de proteína de las fracciones del extracto crudo del veneno de *Conus spurius*.

Fracción	A280 (mg/mL)	260/280
Blanco	0.075	0.88
F0	0.125	1.29
F1	0.287	1.14
F2	1.376	0.77
F3	5.064	0.68
F3'	5.563	0.65
F4	5.834	0.68
F4'	6.235	0.66
F5	2.964	0.68
F6	0.706	1.03
F7	0.085	1.44
F8	0.125	1.27

V. Inyección de las fracciones de *Conus spurius*

Se llevó a cabo las inyecciones de las fracciones del veneno de *C. spurius* utilizando la concentración de ~0.83 mg/mL, misma que sólo se pudo alcanzar con las fracciones F2, F3, F4 y F5, mientras que las fracciones F0, F1, F6, F7 y F8 se inyectaron a la concentración que presentaron durante su cuantificación. Las fracciones F3, F4 y F7 no se pudieron resuspender completamente en solución salina 0.9%, por ello fue que se les tuvo que agregar DMSO, alcanzando un porcentaje al 0.1%. Para descartar un efecto diferencial en la sobrevivencia entre las cepas debido al DMSO, se realizó un control inyectando solución salina con 0.1% de DMSO, los resultados no indicaron diferencias en la sobrevivencia entre las cepas ni un efecto considerable en la afección de los estadios de desarrollo (Tabla 6).

Tabla 6. Control de la sobrevivencia y la mortandad de los bioensayos con DMSO 0.1%.

DMSO (%)	Estadio Cepa	Sobrevivencia	Larvas medio de cultivo	Lisis en pupa	No eclosión
0.1	<i>yw</i>	89	6	1	4
	<i>eag</i>	91	6	2	1

Sobrevivencia

Los resultados obtenidos en la sobrevivencia de las cepas *yw* y *eag* de *D. melanogaster* posterior a la inyección de cada una de las fracciones del veneno de *C. spurius*, indican un efecto diferencial considerable en la sobrevivencia obtenida con las fracciones F2, F3 y F6, con porcentajes de sobrevivencia de 30%, 20% y 25%, respectivamente (Figura 25). En los

resultados de las fracciones restantes no se observaron diferencias en la sobrevivencia que fueran superiores al 11% entre ambas cepas.

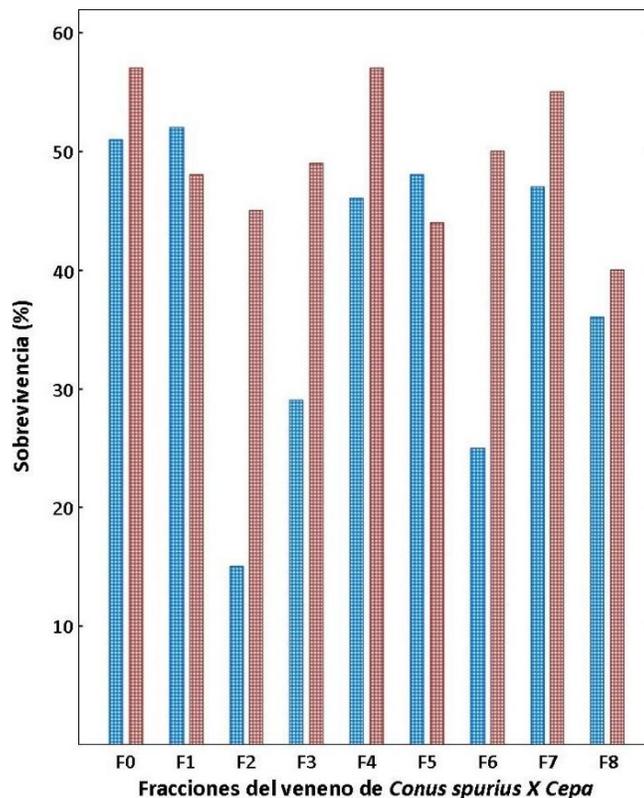


Figura 25. Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de las fracciones del veneno de *Conus spurius* a una concentración de ~0.83 mg/mL para F2, F3, F4 y F5. Las fracciones F0, F1, F6, F7 y F8 se inyectaron a la concentración registrada durante su cuantificación.

Mortandad

Durante el monitoreo de las larvas posterior a la inyección de las fracciones, se determinaron las características conductuales y las formas en que fueron afectados los estadios. En general fueron las mismas cinco formas descritas con anterioridad, siendo la principal causa de mortandad en las dos cepas la inhibición de la eclosión del pupario ($\geq 20\%$) a pesar de su completo desarrollo cuando se inyectaron las fracciones F0, F5 y F6 (Figura 26).

Con la fracción F1 se observó que el principal estadio afectado fue el de pupa, para la cepa *yw* cuando los organismos no eclosionan (33%) y para la cepa *eag* cuando se presenta la lisis del organismo (31%). La fracción F2 siguió la tendencia descrita anteriormente, en donde el porcentaje de inhibición de la eclosión de la cepa *yw* fue de 44% y para la cepa *eag* la principal causa de muerte fue la lisis en el pupario en un 24% de los casos (Figura 26). Con

esta misma fracción se observó que la eclosión inicia al séptimo día para ambas cepas, pero el porcentaje de eclosión desde un principio fue superior para la cepa *eag* y alcanza su máximo en el día 10 posterior a la inyección, mientras que la cepa *yw* lo alcanza hasta el día 11.

Al realizar el análisis de los resultados de la fracción F3 se determinó que en ambas cepas la principal causa de mortandad fue la lisis del organismo en el estadio de pupa, con un 38% para *yw* y 26% para *eag*. En el caso de las fracciones F4 y F7 estas afectaron a todos los estadios del desarrollo de la mosca en un 20% como valor máximo. Para la fracción F8 la principal causa de mortandad en *yw* fue la inhibición de la eclosión, mientras que para la cepa *eag* las principales causas de muerte fueron la lisis del organismo y la inhibición de la eclosión en estadio de pupa, presentándose en porcentajes similares (25%) (Figura 26).

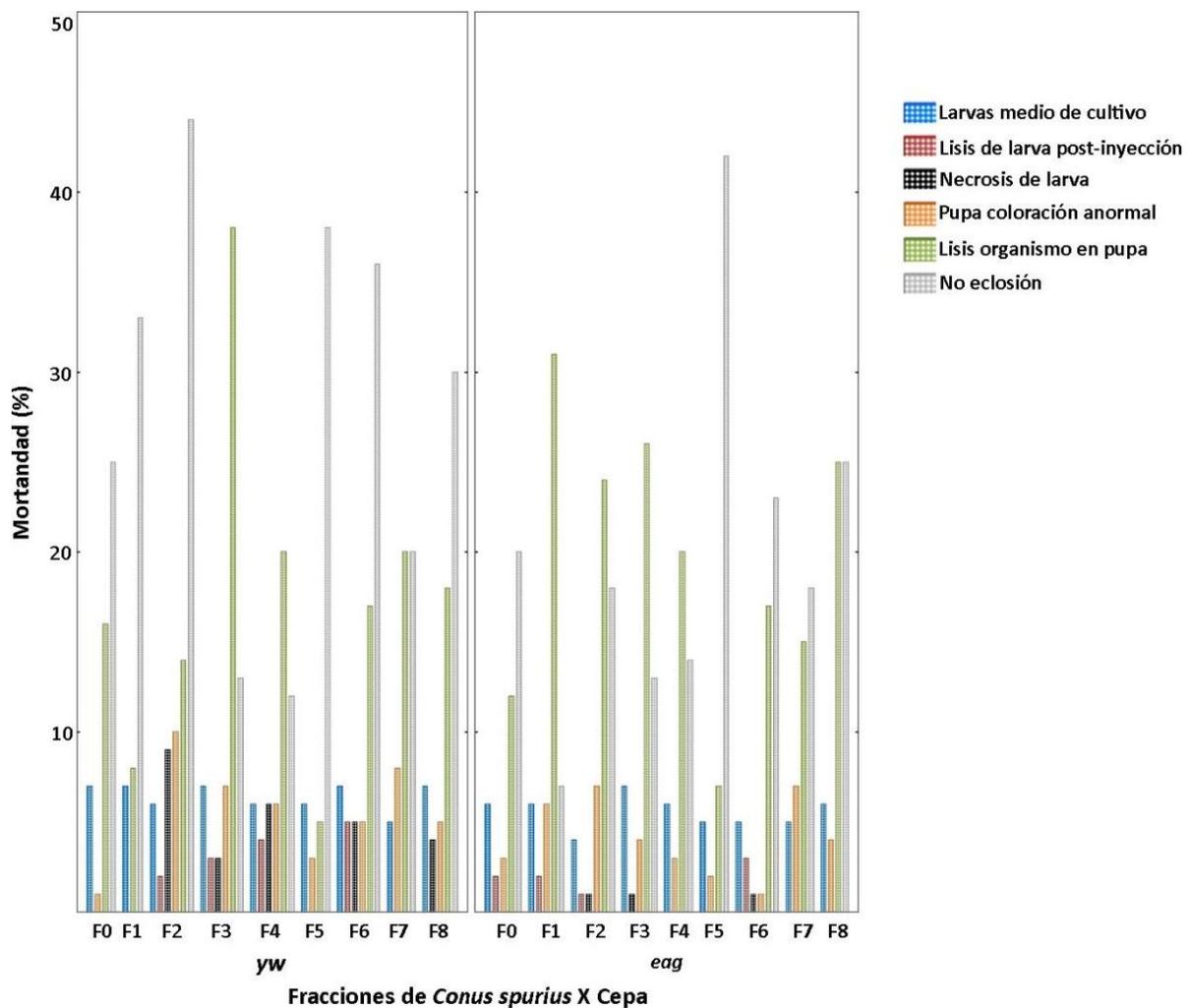


Figura 26. Efecto de la inyección de las distintas fracciones del veneno de *Conus spurius* en los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster*. Las fracciones 2, 3, 4 y 5 se inyectaron a una concentración de ~0.83 mg/mL y las fracciones 0, 1, 6, 7 y 8 a la concentración registrada durante su cuantificación.

VI. Subfraccionamiento de las fracciones de *Conus fergusonii*

Se llevó a cabo una segunda fase de fraccionamiento del veneno para poder disponer de una mayor concentración por fracción y así poder juntarlas con las obtenidas durante la primera fase de fraccionamiento. Posteriormente se llevó a cabo el subfraccionamiento de las fracciones F2, F3 y F5, las cuales fueron elegidas debido a los resultados observados en la sobrevivencia y mortandad (Figuras 27 a 30).

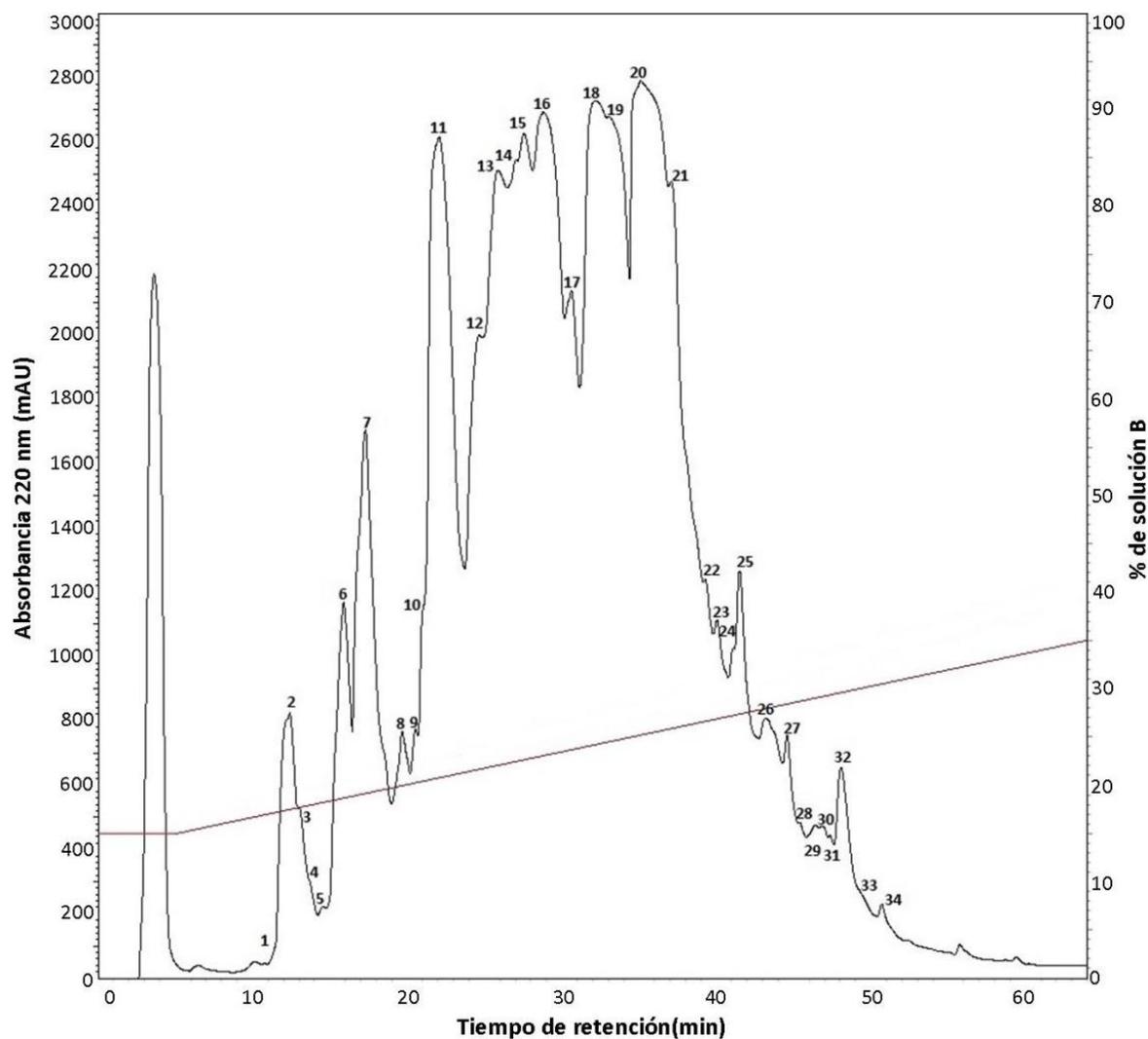


Figura 27. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F2 del veneno de *C. fergusonii* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 15 a 35% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según su tiempo de retención.

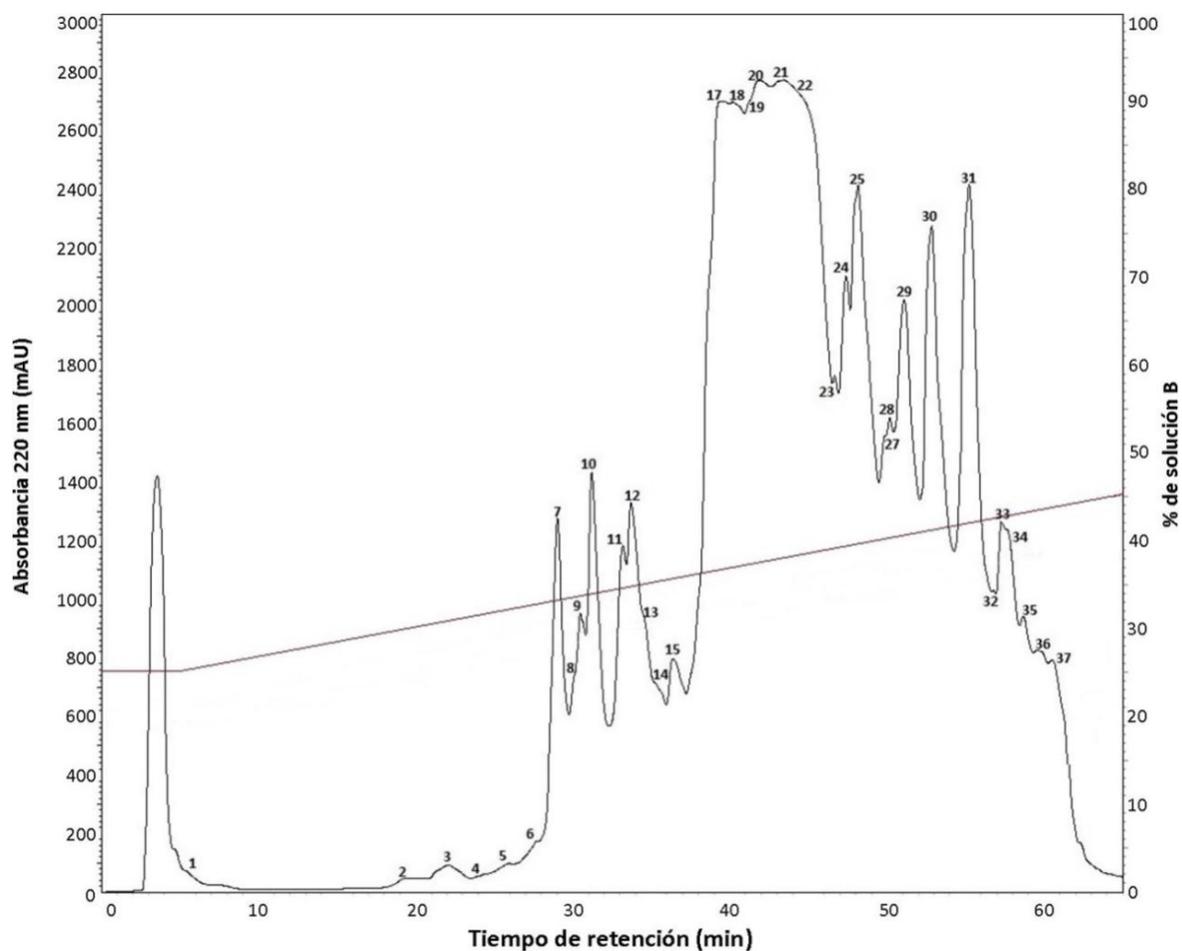


Figura 28. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F3 del veneno de *C. fergusonii* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 25 a 45% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según su tiempo de retención.

Es importante resaltar que durante el proceso de subfraccionamiento de la fracción F3 se suscitaron errores metodológicos, por lo que se decidió juntar los componentes 17 a 23 para llevar a cabo el subfraccionamiento de estos, utilizando el mismo gradiente empleado durante el subfraccionamiento de la fracción F3 (Figura 29).

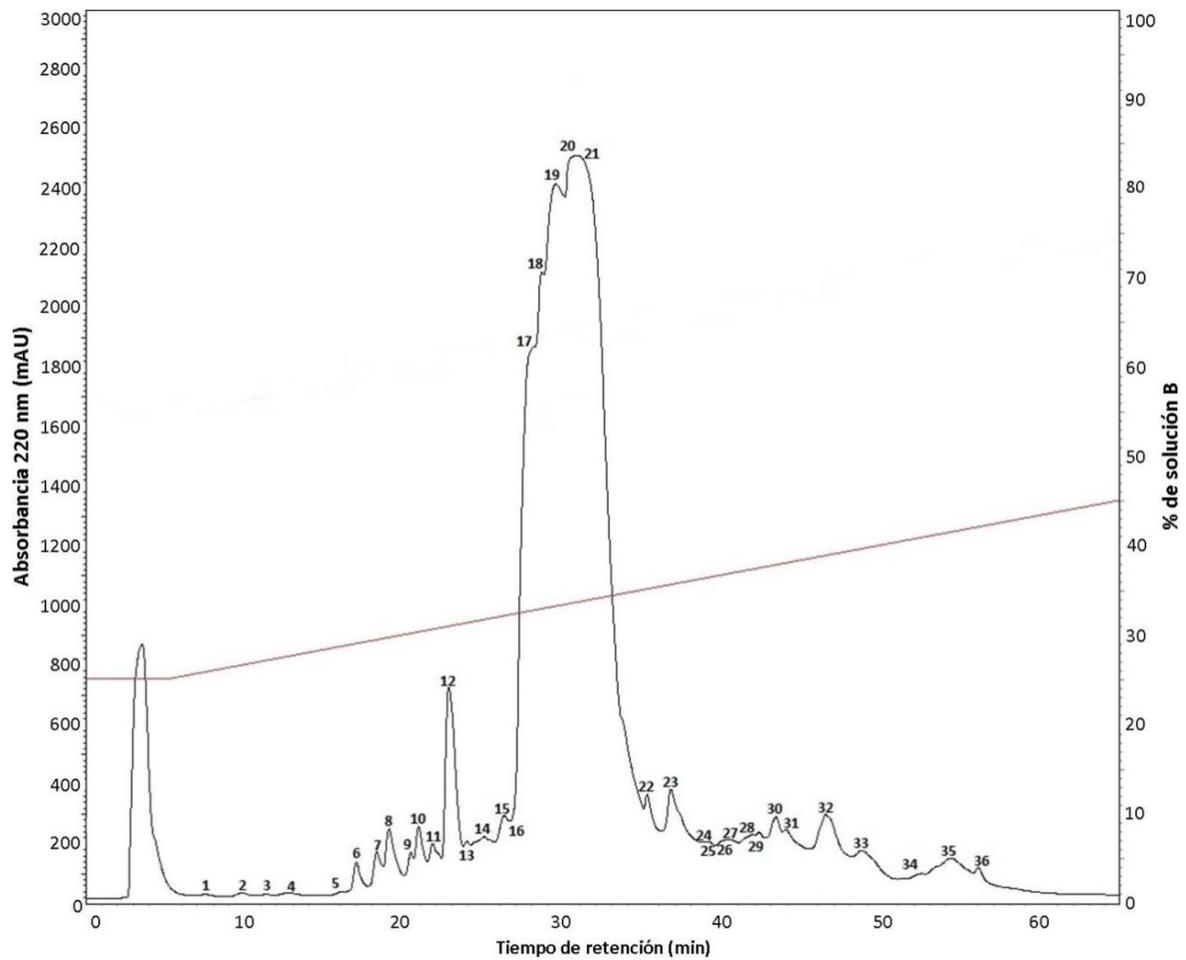


Figura 29. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de las subfracciones 17-23 de la fracción F3 del veneno de *C. fergusonii* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 25 a 45% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según sus tiempos de retención.

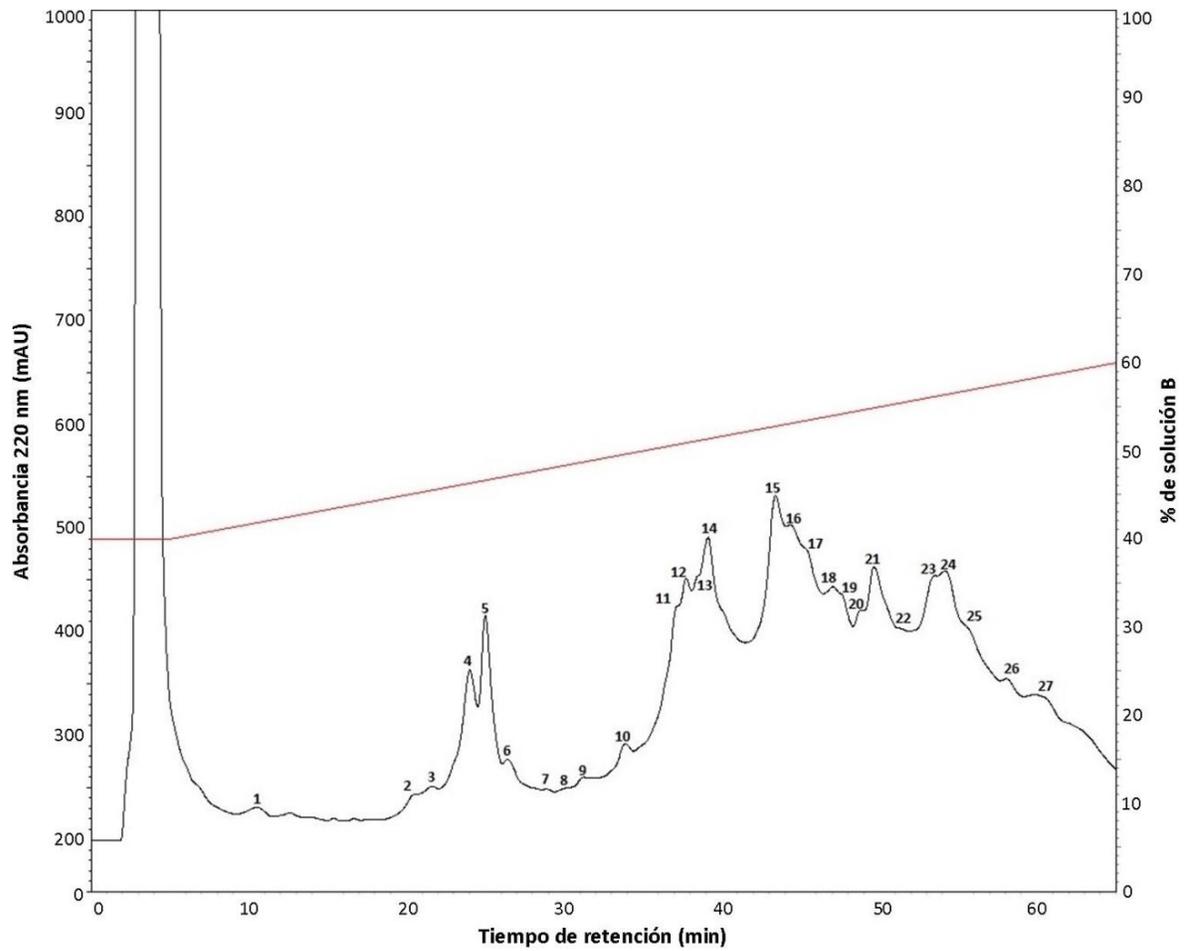


Figura 30. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F5 del veneno de *C. fergusonii* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 40 a 60% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/ min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según sus tiempos de retención.

VII. Subfraccionamiento de las fracciones de *Conus spurius*

Una vez que se analizaron los resultados de la sobrevivencia y la mortandad obtenidos con cada una de las fracciones del veneno de *C. spurius*, se optó por subfraccionar a las fracciones F2, F3 y F6, los perfiles cromatográficos del subfraccionamiento de cada una de estas fracciones se muestran en las Figuras 31 a 33.

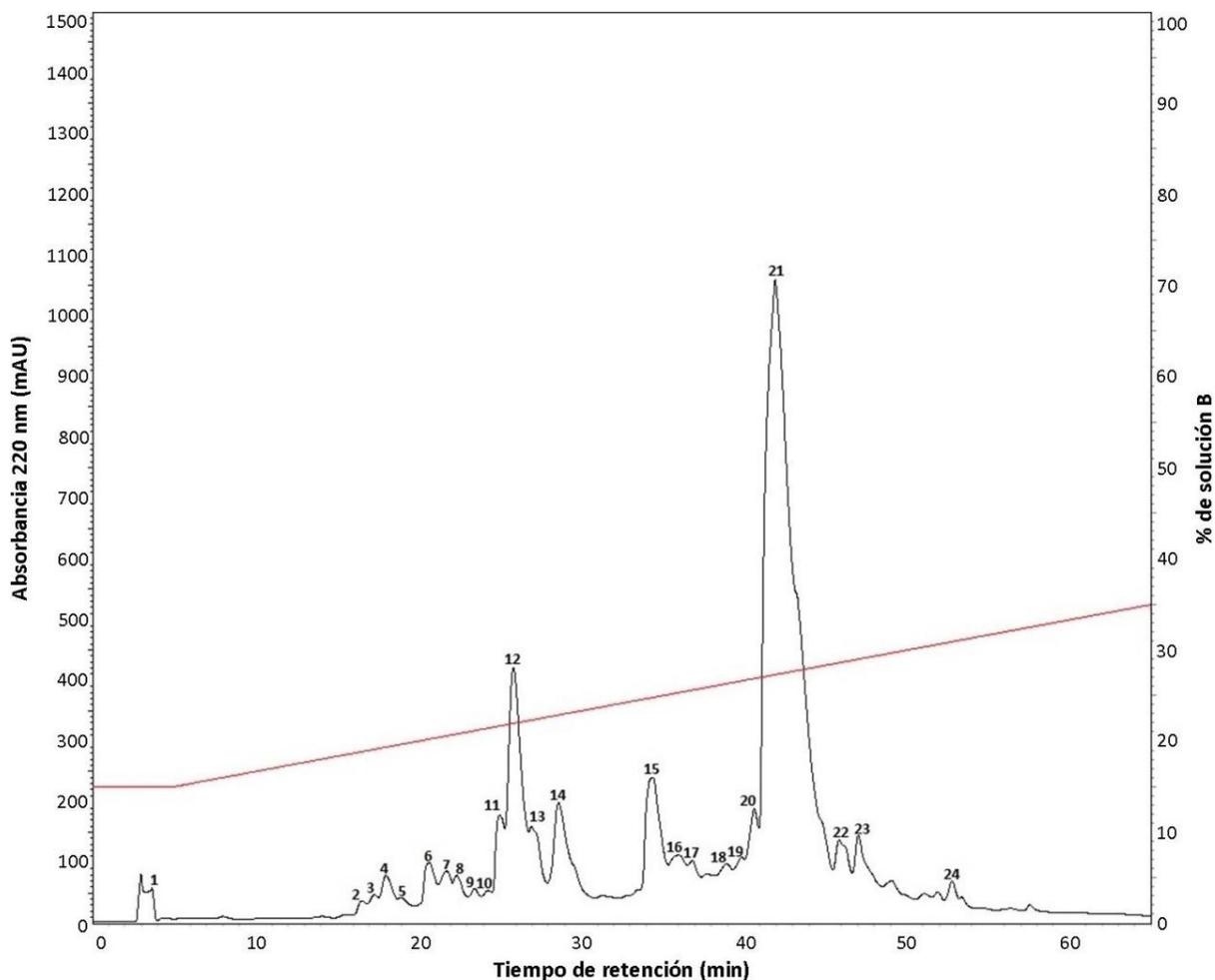


Figura 31. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F2 del veneno de *Conus spurius* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 15 a 35% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según su tiempo de retención.

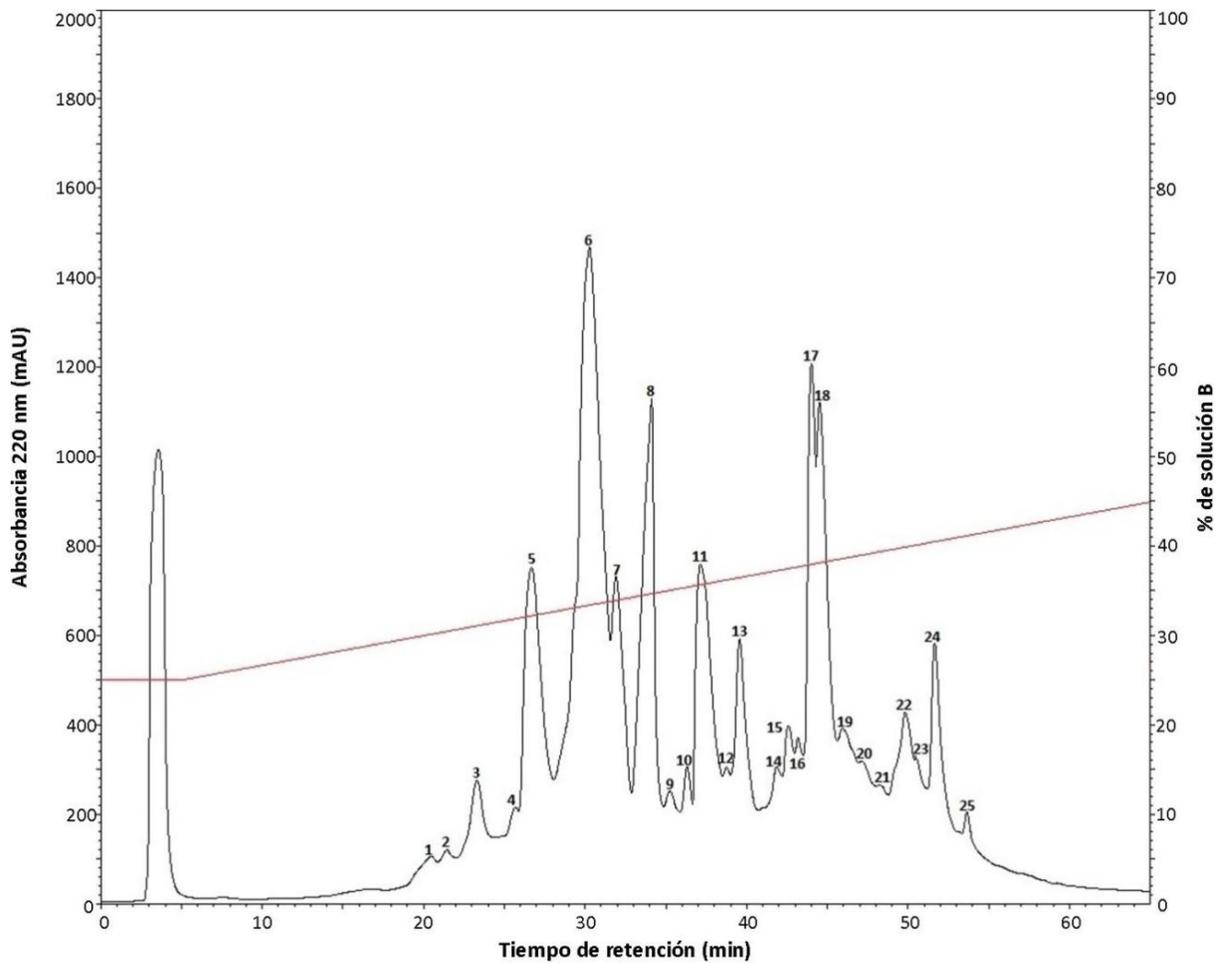


Figura 32. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F3 del veneno de *C. spurius* monitoreado a una longitud de 220 nm. Con un gradiente lineal que va de 25 a 45% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/ min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según su tiempo de retención.

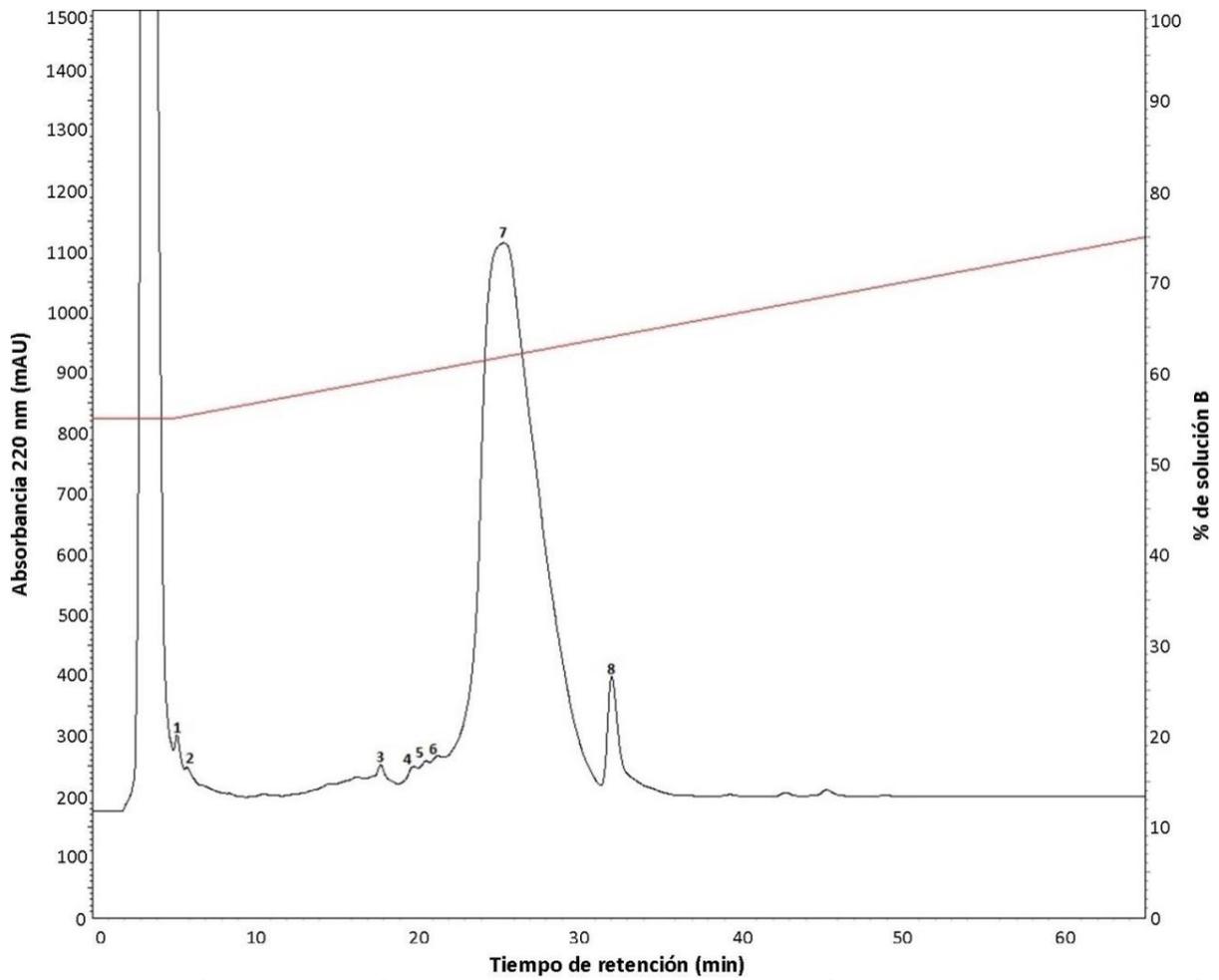


Figura 33. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F6 del veneno de *C. spurius* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Con un gradiente lineal de 55 a 75% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/min (“línea roja”). Cada componente fue colectado y numerado según su tiempo de retención.

VIII. Inyección de los componentes del subfraccionamiento de *Conus fergusonii*

Una vez obtenidos los componentes de cada una de las fracciones de interés del veneno de *C. fergusonii* (F2, F3 y F5), se llevó a cabo los bioensayos sólo con los componentes mayoritarios, cada uno de los cuales se dividió en dos muestras y posteriormente llevados a sequedad. Una de las muestras de cada componente se destinó para realizar los bioensayos y la otra para su futura secuenciación en caso de mostrar resultados que indiquen actividad en canales de potasio. Cada uno de los tubos destinados para las inyecciones fueron resuspendidos en 50 µL de solución salina, a excepción de los componentes T16+17 y T18+19 de la fracción F2 que se resuspendieron en 1.5 mL. Para cada cepa se llevó a cabo un solo ensayo de 100 larvas por componente. En la tabla 7 se enlistan los componentes mayoritarios que se decidió evaluar de cada una de las fracciones de interés:

Tabla 7. Componentes mayoritarios de las fracciones de interés de *C. fergusonii* que fueron elegidos para realizar los bioensayos en larvas de *D. melanogaster*.

F2	F3	F5
T7	T7	T4
T11	T10	T5
T12+13	T11+12	T14
T14+15	T17+18+19	T15
T16+17	T20+21	
T18+19	T24	
T20+21	T25	
	T29	
	T30	
	T31	

Sobrevivencia

Los resultados obtenidos después de realizar los bioensayos con los componentes mayoritarios de las fracciones F2, F3 y F5 del veneno de *C. fergusonii* se pueden observar en la Figura 34, en la cual sólo se muestran los resultados de aquellos componentes que mostraron un efecto diferencial igual o mayor al 13% en la sobrevivencia entre las dos cepas de *D. melanogaster* utilizadas. Los resultados de los componentes mayoritarios con los cuales no se observó un efecto diferencial igual o mayor al 13% en la sobrevivencia se muestran en las Figuras 44, 46 y 48 (Anexo 3).

Con los resultados de la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F2, se observó que con la mayoría de estos no hay un efecto diferencial en la sobrevivencia, ya que la diferencia en las sobrevivencias de las cepas *yw* y *eag* nunca fue superior al 7%, solamente se pudo observar una diferencia considerable cuando se inyectó el componente T16+17, en donde la sobrevivencia de *eag* es superior en un 24% con respecto a *yw* (Figura 34). De la misma manera, para el caso de la fracción F3, no se observó una diferencia considerable en las sobrevivencias con la mayoría de los componentes, siendo el componente T17+18+19 el único con el que se reportó que la sobrevivencia de *eag* fue superior a la de *yw* en un 14% (Figura 34). Finalmente, los resultados obtenidos con los componentes mayoritarios de la fracción F5, sólo se observaron diferencias en la sobrevivencia con los componentes T4 y T14, siendo del 13% (a favor de *eag*) y 14% (a favor de *yw*), respectivamente (Figura 34).

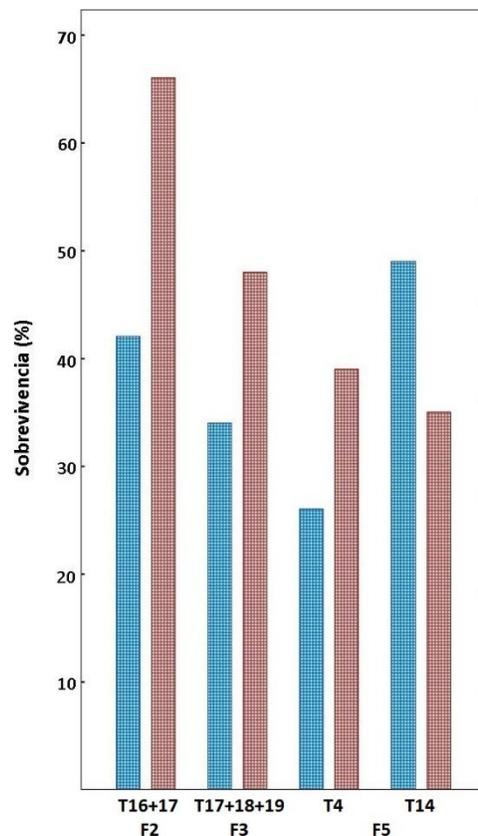


Figura 34. Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de los componentes mayoritarios de las fracciones: F2 (T16+17), F3 (T17+18+19) y F5 (T4 y T14) del veneno de *Conus fergusonii*. Cada componente se resuspendió en 50 μ L de solución salina 0.9%, a excepción del componente T16+17 que se resuspendió en 1.5 mL.

Mortandad

El análisis de la forma en que fueron afectados los estadios con la inyección de los componentes mayoritarios indica que para los componentes con un efecto diferencial en la sobrevivencia \geq a 13% el principal estadio afectado fue el de pupa. El principal causante de mortandad fue la lisis del organismo en el pupario para la cepa *eag* cuando se inyectaron los cuatro componentes, mientras que esta misma forma causante de mortandad fue la más frecuente en *yw* cuando se inyectó el componente T16+17 de la fracción F2 (Figura 35). Además, la inhibición de la eclosión del organismo fue la forma más frecuente en la cepa *yw* cuando se inyectaron los componentes T17+18+19 de la F3 y el T14 de la F5, mientras que con el componente T4, la cepa *yw* fue afectada en frecuencias similares tanto por la lisis del organismo, como por la no eclosión del organismo (30%) (Figura 35). Los resultados de la mortandad cuando se inyectan los componentes que no mostraron un efecto diferencial \geq a 13% en la sobrevivencia se muestran en el anexo 3 (Figuras 45, 47 y 49).

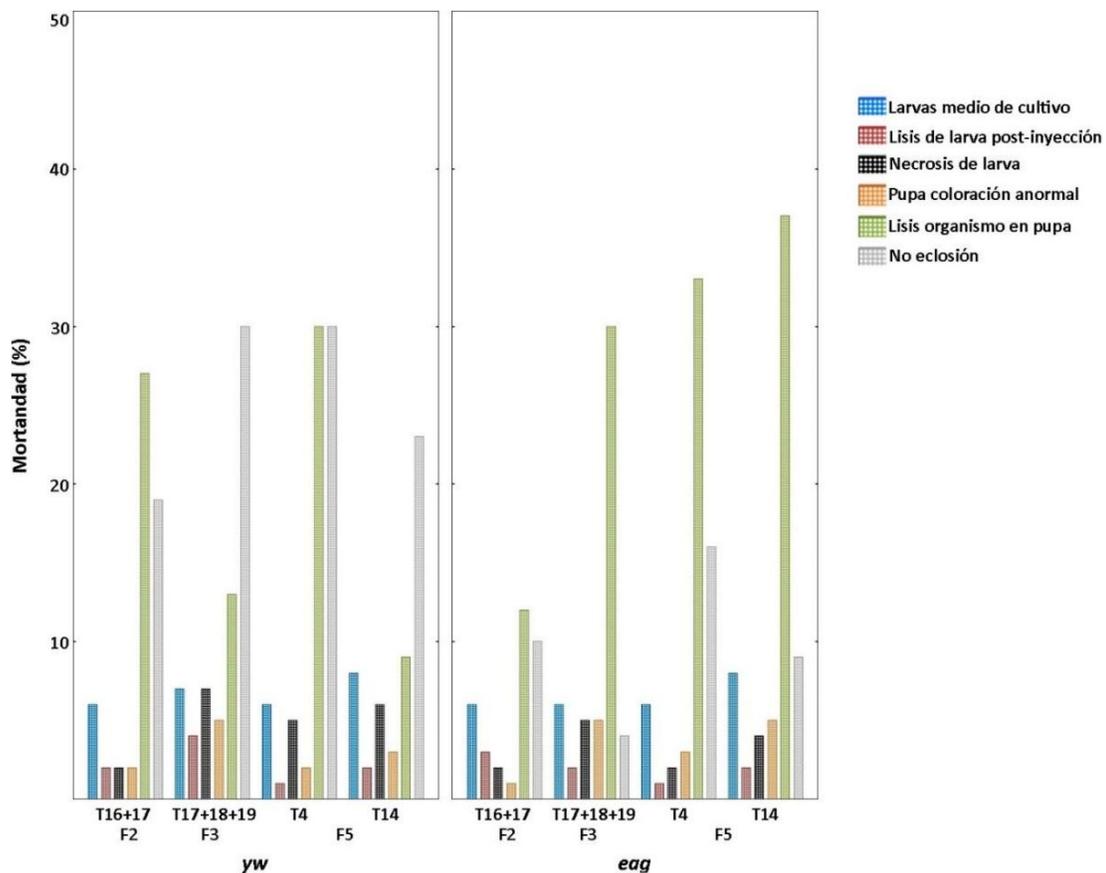


Figura 35. Efecto de la inyección de los componentes mayoritarios de las fracciones; F2 (T16+17), F3 (T17+18+19) y F5 (T4 y T14) del veneno de *Conus fergusonii* sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster*. Cada componente se resuspendió en 50 μ L de solución salina 0.9%, a excepción de T16+17 que se resuspendió en 1.5 mL.

IX. Inyección de los componentes del subfraccionamiento de *Conus spurius*

Una vez que se obtuvieron los componentes de cada una de las fracciones de interés del veneno de *C. spurius*, se llevó a cabo el mismo procedimiento para realizar los bioensayos con cada uno de los componentes mayoritarios utilizado con *C. fergusonii* (inyección y futura secuenciación). Para su inyección, cada uno de los componentes mayoritarios se resuspendió en 50 µL de solución salina 0.9%, a excepción de la fracción F3 en donde sólo el componente T5 pudo ser resuspendido en dicho volumen, mientras que los componentes T6, T11, T13, T18 y T24 lo fueron en un volumen de 100 µL para lograr su completa disolución. Por otra parte, el componente T8 fue llevado hasta un volumen de 300 µL con 5% de DMSO para lograr su máxima disolución, a pesar de ello se tuvo que centrifugar y utilizar únicamente el sobrenadante para realizar los bioensayos (no se cuantificó). A continuación se enlistan los componentes mayoritarios que se decidió probar de cada una de las fracciones de interés:

Tabla 8. Componentes mayoritarios de las fracciones de interés de *C. spurius* que fueron elegidos para realizar los bioensayos en larvas de *D. melanogaster*.

F2	F3	F6
T12	T5	T7
T21	T6	T8
	T8	
	T11	
	T13	
	T18 (17+18)	
	T24	

Se llevó a cabo un ensayo control para descartar algún efecto en la sobrevivencia o mortandad por parte del DMSO 5%, inyectando solución salina con el porcentaje de DMSO en cuestión, los resultados indican que no existe un efecto diferencial en la sobrevivencia ni en los estadios afectados entre ambas cepas (Tabla 9).

Tabla 9. Sobrevivencia control de los bioensayos que involucraron el uso de DMSO 5%.

DMSO (%)	Estadio Ceba	Sobrevivencia	Larvas medio de cultivo	Lisis en pupa	No eclosión
5	<i>yw</i>	84	5	0	11
	<i>eag</i>	87	6	1	6

Sobrevivencia

Al observar los resultados de la sobrevivencia para cada una de las cepas de *D. melanogaster* después de inyectar cada uno de los componentes mayoritarios de las fracciones F2, F3 y F6 de *C. spurius*, se registró un efecto diferencial del 13% entre la cepa *yw* y *eag* al inyectar el componente T12 de la fracción F2 (Figura 36). Por otra parte, para el caso de la fracción F3, que fue la fracción con la mayor cantidad de componentes a inyectar, los resultados de la sobrevivencia mostraron que sólo con los componentes T8, T11 y T18 se observó un efecto diferencial, siendo del 14%, 15% y 23%, respectivamente (Figura 36). Finalmente, todos los demás componentes mayoritarios de las fracciones F2, F3 y F6 que no mostraron efecto diferencial \geq a 13% en la sobrevivencia entre las cepas *yw* y *eag* se muestran en la Figura 50 (Anexo 4).

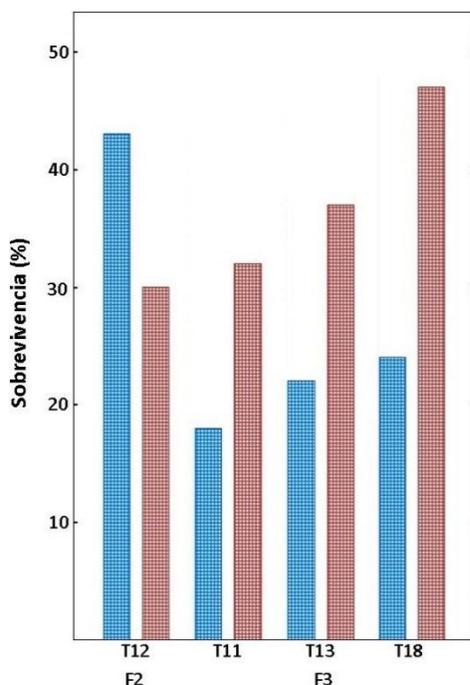


Figura 36. Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de los componentes mayoritarios de las fracciones; F2 (T12) y F3 (T11, T13 y T18) del veneno de *Conus spurius*. El componente T12 se resuspendió en 50 μ L de solución salina 0.9%, y los componentes T11, T13 y T18 en 100 μ L.

Mortandad

El monitoreo de los estadios afectados de las cepas *yw* y *eag* tras la inyección de los componentes mayoritarios, indica que para T12 perteneciente a la fracción F2, la lisis del organismo dentro del pupario fue la más frecuente en ambas cepas, siendo superior a 30% (Figura 37). En el caso de los componentes de la fracción F3 con los cuales se observó un efecto diferencial en la sobrevivencia, se determinó que la principal forma causante de la

mortandad en ambas cepas fue cuando se presenta la lisis del organismo en el estadio de pupa, y el segundo más frecuente cuando no eclosiona a pesar del completo desarrollo del adulto (Figura 37). Con respecto a los componentes de la fracción F6, dado a que estos no presentaron un efecto diferencial considerable en la sobrevivencia entre ambas cepas, el cual fuera \geq a 13%, se muestran en la Figura 51 (Anexo 4).

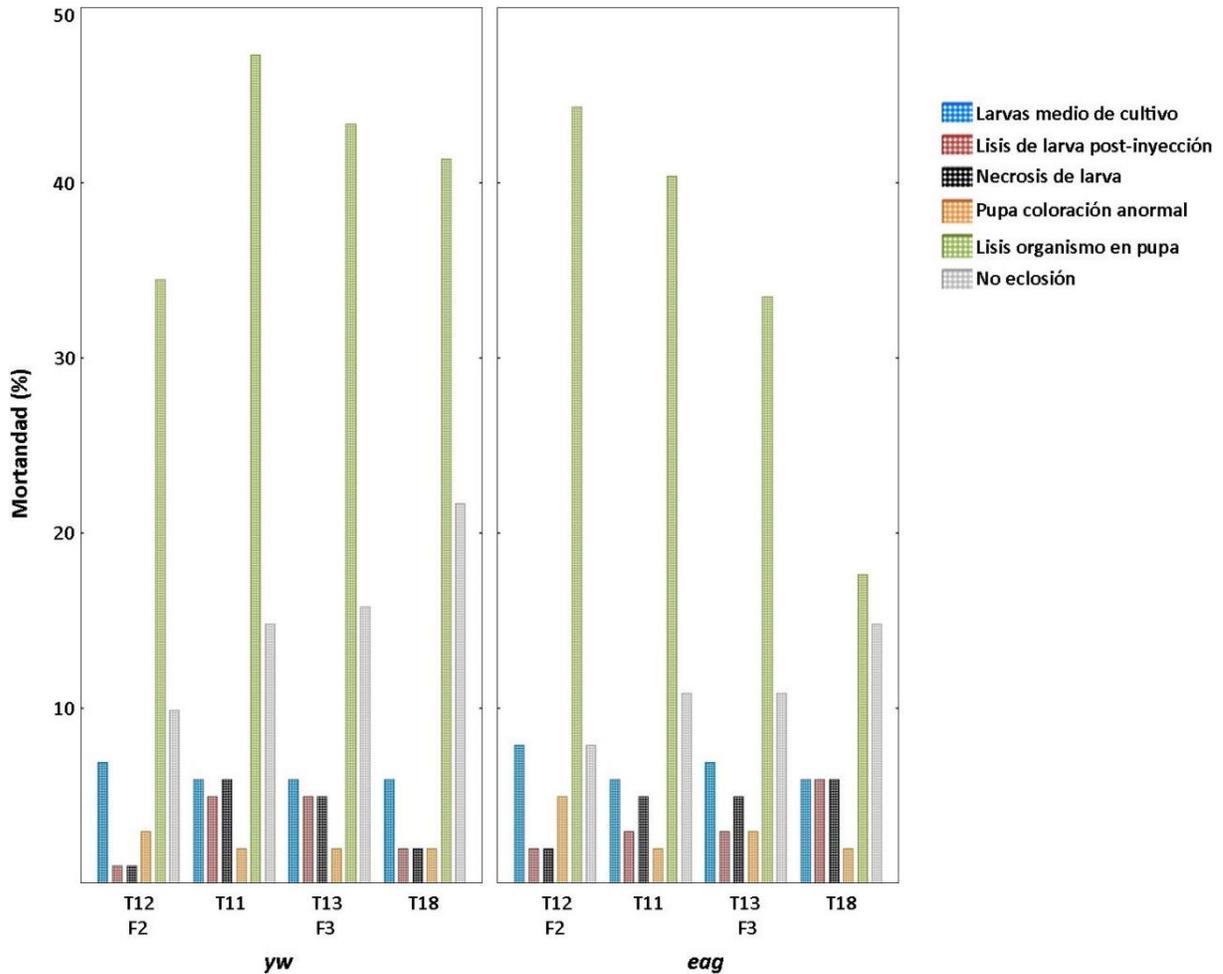


Figura 37. Efecto de los componentes mayoritarios de las fracciones: F2 (T12) y F3 (T11, T13 y T18) del veneno de *Conus spurius* sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster*. El componente T12 se resuspendió en 50 μ L de solución salina 0.9%, y los componentes T11, T13 y T18 en 100 μ L.

X. Evaluación electrofisiológica de los componentes de *Conus fergusonii* que presentan efecto diferencial en el bioensayo.

Una vez concluida la evaluación de los componentes mayoritarios de cada una de las fracciones de interés del veneno de *C. fergusonii* y *C. spurius* en las larvas de *D. melanogaster*, los componentes de *C. fergusonii* que causaron un efecto diferencial \geq a 13% en la sobrevivencia entre las cepas *yw* y *eag* fueron evaluados en canales de potasio Kv10.1.

Los canales Kv10.1 (Eag1), fueron transfectados de manera estable en la línea celular HEK293. En primera instancia evaluamos el efecto del vehículo (solución salina 0.9%), en el cual se encontraban resuspendidos los componentes de cada fracción, y se observó que la solución salina no presenta efecto alguno sobre las corrientes de este canal (Figura 38).

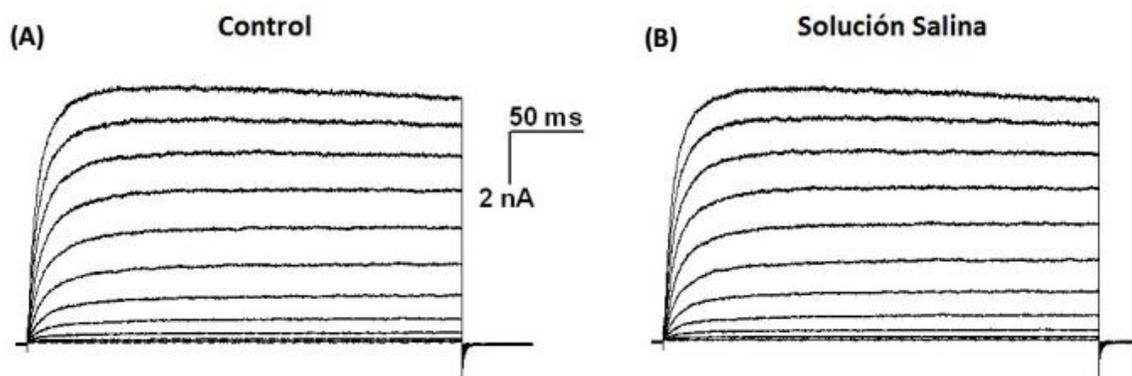


Figura 38. Corrientes del canal de potasio Kv10.1. (A) Las corrientes control de potasio (IK). (B) Las corrientes de mantenimiento desde un potencial de -80 mV, el pulso de prueba se generó desde -50 mV, con incrementos de 10 mV hasta 50 mV. La IK después de la aplicación de solución salina 0.9% fue generada como en A.

El primer componente del veneno de *C. fergusonii* en evaluarse fue el T16+17 perteneciente a la fracción F2. Se aplicaron 5 μ L del componente en la cámara de registro, obteniendo una inhibición reversible de la amplitud de las corrientes del 86% y un cambio en la cinética de activación del canal Kv10.1 (Figura 39).

El segundo componente que se evaluó fue el T17+18+19 de la fracción F3, del cual se aplicó 5 μ L en la cámara de registro, obteniendo como resultado una inhibición de las corrientes del 60% y con un efecto reversible tras la realización del lavado, siendo la recuperación del canal muy cercana al 100% (Figura 40).

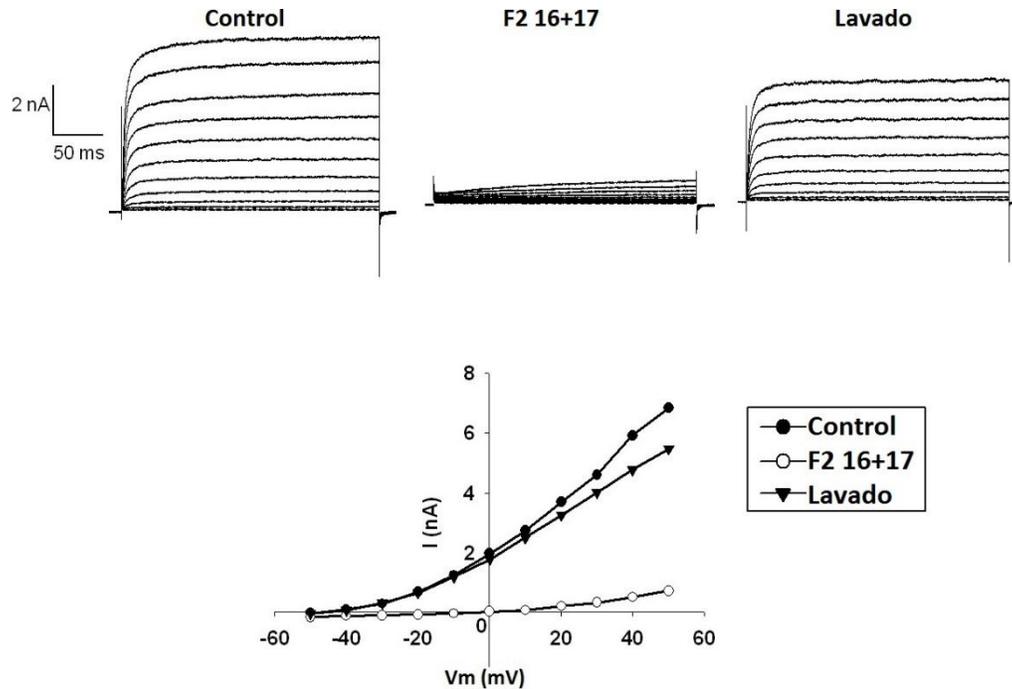


Figura 39. Actividad del componente T16+17 de la fracción F2 del veneno de *Conus fergusonii*. (A) La corriente control de potasio (IK) (izquierda). Aplicación del componente T16+17 (en medio). Efecto reversible después del lavado (derecha). (B) Gráfica de las corrientes contra el voltaje de los registros en A. La representación de los resultados de este componente es de un ensayo.

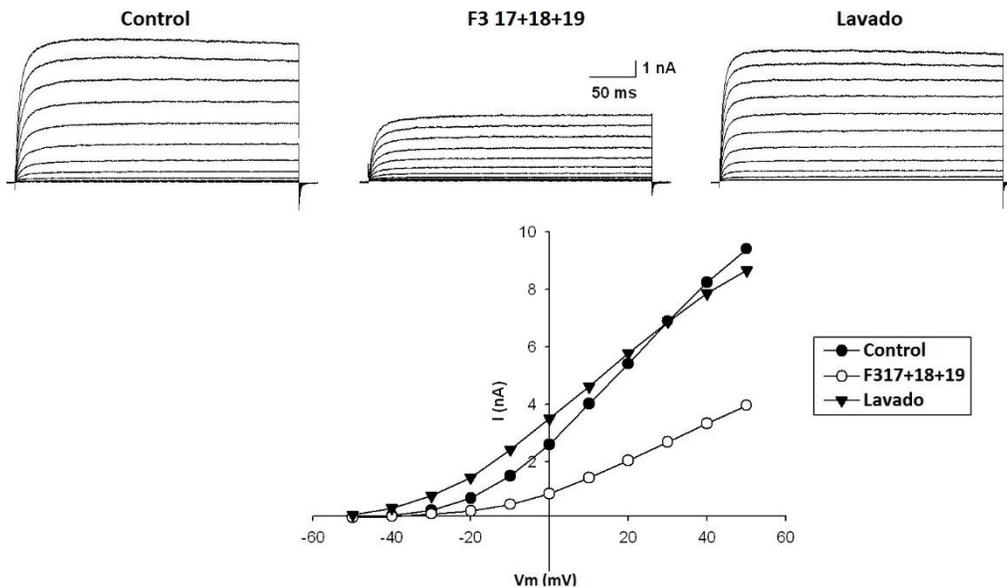


Figura 40. Actividad del componente T17+18+19 de la fracción F3 del veneno de *Conus fergusonii*. (A) La corriente control de potasio (IK) (izquierda). Aplicación del componente T17+18+19 (en medio). Efecto reversible después del lavado (derecha). (B) Gráfica de las corrientes contra el voltaje de los registros en A. La representación de los resultados de este componente es de un ensayo.

De la misma manera, para la evaluación electrofisiológica de los dos componentes de la fracción F5, se utilizaron 5 μ L de cada uno de ellos. Los resultados obtenidos con el componente T4 fue una inhibición irreversible de las corrientes del 55% (Figura 41), mientras que con el componente T14 la inhibición fue del 45% con un efecto reversible (Figura 42).

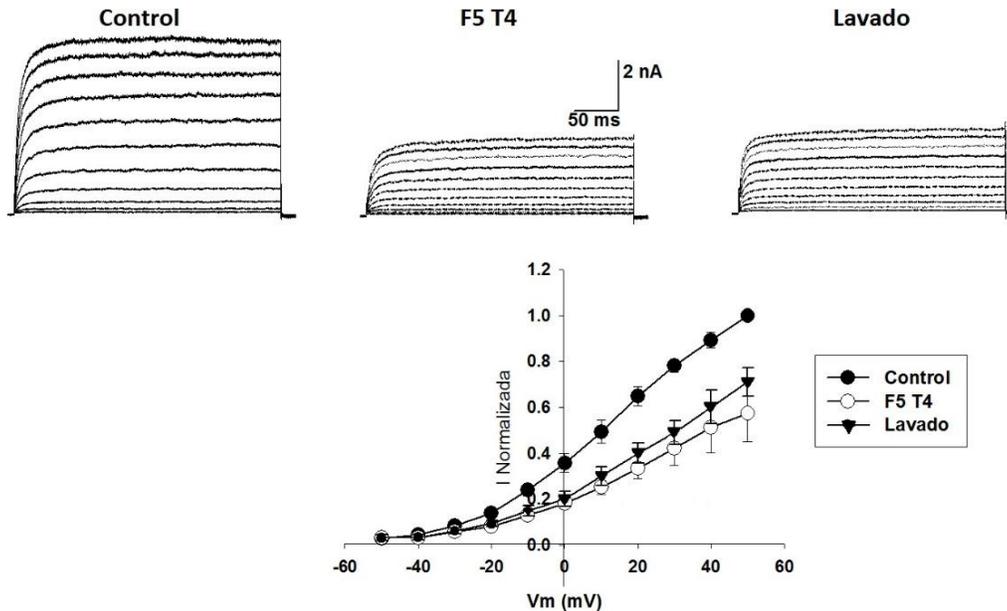


Figura 41. Actividad del componente T4 de la fracción F5 del veneno de *Conus fergusonii*. **(A)** La corriente control de potasio (IK) (izquierda). Aplicación del componente T4 (en medio). Efecto irreversible después del lavado (derecha). **(B)** Gráfica de las corrientes contra el voltaje de los registros en A. La representación de los resultados es de tres ensayos.

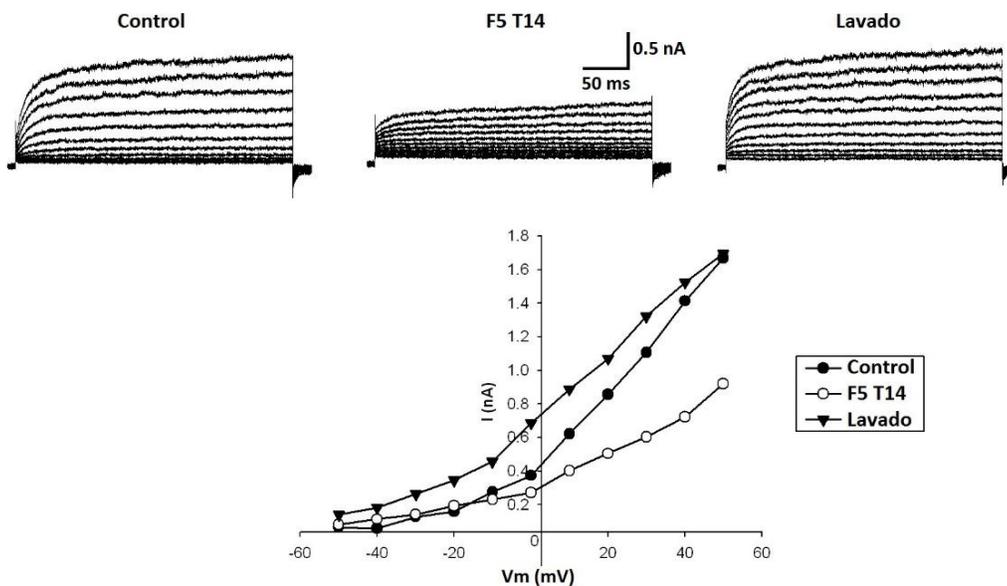


Figura 42. Actividad del componente T14 de la fracción F5 del veneno de *Conus fergusonii*. **(A)** La corriente control de potasio (IK) (izquierda). Posterior a la aplicación del componente T4 (en medio). Y la reversibilidad del efecto después del lavado (derecha). **(B)** Corrientes contra el voltaje de los registros en A. La representación de los resultados es de un ensayo.

Adicionalmente, se realizó la evaluación de la conotoxina PVIIA, aplicando 5 μL de esta a una concentración de 625 nM (concentración final de ~ 39.06 nM) en la cámara de registro (80 μL), obteniendo una inhibición de las corrientes del 40% (Figura 43).

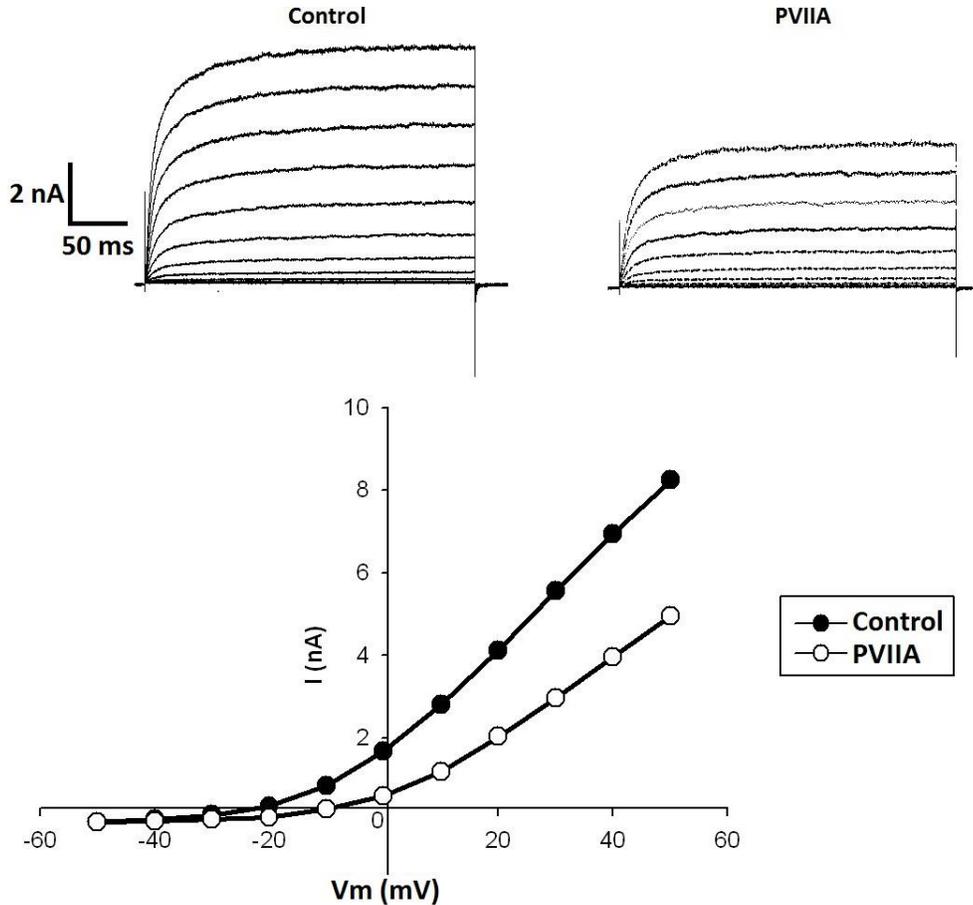


Figura 43. Actividad de la conotoxina PVIIA en canales Kv10.1. **(A)** La corriente control de potasio (I_K) (izquierda). En presencia de la conotoxina PVIIA (derecha). Los registros fueron realizados como en la figura 36. **(B)** Gráfica de las corrientes contra el voltaje de los registros en A. La representación de los resultados de la conotoxina PVIIA es de un ensayo.

DISCUSIÓN

Los caracoles marinos del género *Conus* presentan una amplia cantidad de componentes en sus venenos, la gran mayoría de origen peptídico. Tales componentes, llamados conotoxinas o conopéptidos han sido considerados valiosas herramientas para el estudio de canales iónicos, porque la probabilidad de encontrar componentes específicos en una sola especie es alta. Durante el estudio de los venenos de *Conus*, el uso de *Drosophila* como modelo biológico comienza a cobrar fuerza, ya que en antes del año 2010 no se tenía registro de su uso, y sólo se había reportado para el aislamiento de neurotoxinas de artrópodos (Escoubas *et al.*, 1995).

La principal aportación de este trabajo es la implementación de *Drosophila melanogaster* como modelo biológico para una rápida identificación de componentes del veneno de *Conus* que presenten afinidad sobre canales de potasio. Lo anterior se logró mediante un sistema de microinyecciones en el orden de nanolitros de compuestos comerciales, toxinas, fracciones y componentes mayoritarios del veneno de dos especies de *Conus*, en larvas del tercer estadio de desarrollo de las cepas *eag* y *yw*. La cepa *eag* se tomó en consideración por ser la mutante para el canal de potasio *eag* (Kv10), mutación que está ligada al cromosoma X (Drysdale *et al.*, 1991), mientras que la cepa *yw* fungiría como control positivo al no presentar mutaciones en canales de potasio. No obstante en primera instancia se llevó a cabo una cruce con la finalidad de obtener un modelo biológico sensibilizado para facilitar el reconocimiento de toxinas con efectos sobre canales de potasio.

La cepa *eag* fue utilizada en este bioensayo como portadora de la mutación para canales de potasio, con la finalidad de realizar una cruce que permitiera agilizar la identificación de componentes con actividad en dichos canales, teniendo como base un fondo genético específico. Para ello, se cruzaron machos de *eag* con hembras vírgenes con carga genética C(1)DX, y^1 , f^1 , con el objetivo de que en la progenie la mutación para canales de potasio se restringiera a los machos y que las hembras carecieran de ella (ver metodología).

Con relación a la cruce realizada (C(1)DX, y^1 , f^1 X *eag*), las inyecciones de cada conotoxina indicaron un decremento en la sobrevivencia por igual para machos y hembras, lo cual fue inesperado, debido a que esperábamos una menor sobrevivencia en los machos por presentar la mutación para el canal de potasio *eag* (Kv10.1), es decir, un fondo genético sensibilizado. El resultado anterior se corroboró con un análisis de varianza factorial (ANOVA) poniendo en cuestión la interacción entre las variables: sexo, toxina y concentración, y su

efecto en la sobrevivencia. La prueba indicó que no existen diferencias significativas en la sobrevivencia por la interacción de las tres variables en cuestión ($F=1.29$, $p > 0.05$), se deduce que la sensibilidad a las toxinas a partir de la mutación del canal de potasio *eag* no está en función del sexo (fondo genético).

No obstante, tomando en cuenta la prueba de ANOVA y la afinidad que presentan las conotoxinas PVIIA y RIIIK sobre los canales de potasio tipo *Shaker* y *TSha1*, IC_{50} 57nM y IC_{50} 20 nM, respectivamente, es posible explicar el bajo porcentaje de sobrevivencia (< 75%) observado en la cruce desde la concentración de 1 μ M, el cual es significativamente menor al de los controles de albúmina y solución salina ($p < 0.05$). Lo anterior se puede explicar de dos formas, la primera, si se toma en consideración que una larva de tercer estadio tiene de 50-300 nL de hemolinfa (Piyankarage *et al.*, 2008), y al considerar un factor de dilución cuando se inyecta cualquier concentración, siendo para la concentración de 1 μ M una concentración final de 30 nM, tal concentración es muy cercana a la cual actúan estas conotoxinas cuando se evalúan en canales tipo *Shaker* expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* (Fedosov *et al.*, 2012; Jacobsen *et al.*, 2000). Segundo, a pesar de que la conotoxina PVIIA sólo se ha reportado con afinidad por canales tipo *Shaker*, este trabajo demostró que presenta afinidad por el canal de potasio Kv10.1 a una concentración de ~39 nM, con una reducción de las corrientes en un 40% (Figura 43), por lo cual, la disminución en la sobrevivencia podría deberse, al menos, a la acción sobre dos canales de potasio: los canales *Shaker* y/o Kv10.1.

Al comparar los resultados de la curva dosis-respuesta de la conotoxina SrIB con las de las conotoxinas PVIIA y RIIIK, no hubo diferencia en la sobrevivencia entre los sexos conforme aumenta la concentración. Sin embargo, a diferencia de las toxinas PVIIA y RIIIK, la conotoxina SrIB es menos potente pues la sobrevivencia en ambos sexos decae por debajo del 75% hasta la concentración de 30 μ M (920 nM considerando el factor de dilución), mientras que con PVIIA o RIIIK se observa este mismo efecto desde la concentración de 1 μ M.

Por otra parte, los resultados obtenidos con los compuestos control; solución salina 0.9% y albúmina (100 μ M), no indican diferencias significativas en la sobrevivencia entre hembras y machos (Figura 14), además de ser muy elevada (~90% en promedio), por lo cual podría descartarse un efecto considerable debido a la acción mecánica de la microinyección. Lo anterior se apoya en el alto porcentaje de sobrevivencia obtenido con la solución salina 0.9%, similar al que obtuvo Mejía *et al.* (2010) quienes reportaron que sólo una de quince moscas (6.66%) que inyectaban con 23 nL de dicha solución afectaba la capacidad de vuelo,

pero no causaba la muerte (Mejia *et al.*, 2010). Asimismo, los resultados cuando se inyectó albúmina son comparables a los obtenidos por López-Vera y colaboradores (2004), con sobrevivencias cercanas a 85% cuando se inyecta 4.6 nL de esta proteína a concentraciones de 1 mM; por lo tanto se puede descartar un efecto de osmolaridad.

Hubo una sobrevivencia promedio de 55% con la saxitoxina a una concentración de 1 μ M para ambos sexos, siendo mucho menor a la obtenida con cualquier conotoxina inyectada a la misma concentración e incluso menor que cualquiera de las concentraciones inyectadas con las conotoxinas SrIB y PVIIA (Figura 14). Sin embargo, el valor obtenido es muy similar al reportado por López-Vera y colaboradores (2004), cuando evaluó una concentración de 100 μ M en larvas de *D. melanogaster* obteniendo una sobrevivencia promedio del 50%.

Debido a que los resultados obtenidos con la cruce C(1)DX, y^1 , f^1 X *eag*, no indicaron que su uso pudiera mejorar la sensibilidad de los organismos durante el bioensayo cuando se prueban conotoxinas con actividad sobre canales de potasio, se decidió continuar con los experimentos utilizando a las cepas *yw* y *eag*, tomando en consideración que estudios previos basados en microinyecciones con las conotoxinas PVIIA y RIIIK arrojan resultados de un efecto diferencial en la sobrevivencia de estas dos cepas dependiente de la concentración, y que además dicho efecto no se observa cuando se inyecta a la conotoxina SrIB (Martínez-Hernández, 2012). Adicionalmente se realizaron microinyecciones con saxitoxina 1 μ M en ambas cepas con la finalidad de tener un control de sobrevivencia, los resultados indican que no existen diferencias significativas en el porcentaje de sobrevivencia (Anexo 5, Figura 52).

Durante la primera fase de inyección de las fracciones de *C. fergusonii* a la concentración de 2.5 mg/mL (F0-F4) en las cepas *eag* y *yw*, no hubo resultados que permitieran inferir la presencia de algún componente con actividad sobre canales de potasio, con base en la sobrevivencia. Cuando se inyectó la fracción F5, a pesar de que el efecto diferencial en la sobrevivencia no fue superior al 5%, se observó una elevada frecuencia de la lisis del organismo en estadio de pupa, muy similar al observado con la conotoxina RIIIK a concentraciones de 50 μ M y 100 μ M, siendo superior incluso al de PVIIA a la concentración de 100 μ M. Por las razones anteriores se decidió realizar el subfraccionamiento con la finalidad de poder identificar los componentes responsables de tal efecto.

Cuando se llevaron a cabo las microinyecciones a la concentración de ~0.83 mg/mL, fue más evidente el efecto diferencial en la sobrevivencia entre las cepas utilizadas, dicho

efecto fue observado principalmente con las fracciones F0, F1, F3 y F4. Siendo la fracción F3 la única que mostró mayor sobrevivencia por parte de la cepa *yw* con respecto a *eag*, similar a lo reportado por Martínez-Hernández (2012), en donde al inyectar a las conotoxinas PVIIA y RIIIK con sus respectivas concentraciones se observó que la sobrevivencia de la cepa *eag* decae significativamente respecto a la de *yw*, motivo por el cual la fracción F3 fue elegida para llevar a cabo su subfraccionamiento.

Al evaluar la fracción F2, cuando se inyectaba a las larvas de la cepa *eag*, aumentaban considerablemente su movilidad, la cual terminaba aproximadamente 15 minutos después de la inyección, en algunos casos con necrosis. Este dato también fue observado cuando se inyectó la concentración de 5 μ M de la conotoxina PVIIA en la cruce C(1)DX, *y*¹, *f*¹ X *eag* en ambos sexos. Por lo tanto se tomó en consideración a esta fracción, ya que tal comportamiento pudiera ser determinante para la localización de un posible componente con actividad similar a la de PVIIA. El aumento de la movilidad en las larvas se consideró pues se ha reportado que la actividad de la cepa *eag* es menor con respecto a cepas como *Shaker* (*Sh*). Considerando lo anterior, si un componente presentara efecto sobre el canal de potasio *Shaker*, causando una disminución de la función de dicho canal como en la cepa mutante *Sh*, podría ser el responsable del aumento de la movilidad. Tal hipótesis sería válida si se considera el aumento de la movilidad del doble mutante *sh/eag* con respecto a la mutante *eag* tal como fue reportado por Wang y colaboradores en el 2002, quienes concluyen que cada subunidad de los diferentes canales de potasio contribuyen de forma específica en la locomoción larvaria (Wang *et al.*, 2002).

Con los resultados obtenidos de las fracciones de *C. spurius* fue evidente el efecto diferencial en la sobrevivencia entre ambas cepas con las fracciones F3 y F6 (20 y 25%), y aún más claro con la fracción F2 (30%), observándose que la sobrevivencia de *eag* siempre fue superior respecto a *yw* (Figura 25). El efecto observado con la fracción F2 pudiera deberse a la presencia de la conotoxina SrXIA, que presenta actividad en canales de potasio activados por voltaje Kv1 y que además presenta un tiempo de retención similar al de la fracción F2, entre los minutos 15 y 30 con un porcentaje que va del 20 al 35 de solución B (Aguilar *et al.*, 2007, 2010).

Para elegir las fracciones con posibles componentes con actividad sobre canales de potasio, además de considerar el efecto diferencial en la sobrevivencia, y el aumento en la actividad de las larvas (similar al observado con PVIIA), también se consideró la frecuencia

con la cual se presenta la lisis del organismo en el estadio de pupa, ya que esto permitiría tener una mejor caracterización de los efectos de las toxinas. Lo anterior se sustenta con los resultados obtenidos, en donde la lisis del organismo en estadio de pupa fue la causa de muerte más frecuente a la concentración de 30 μM para PVIIA ($\geq 15\%$) y de 0.5 μM para RIIK (≥ 12), dicha forma de mortandad con SrlB sólo fue equiparable con las observadas con las otras dos conotoxinas cuando se inyectó la concentración de 100 μM (Figuras 15-17).

Si bien es cierto, considerar la lisis del organismo en el pupario pudiera ser un factor un tanto descartable si se tomara en cuenta que se presenta en un porcentaje promedio del 30% cuando se inyecta a la saxitoxina 1 μM en la craza C(1)DX, y^1 , f^1 X *eag* (Figura 18), pero por otra parte, tal efecto no se observa cuando se inyecta en las cepas *yw* y *eag* a la misma concentración, en donde los resultados obtenidos en promedio fueron $\leq 12\%$ (Anexo 5, Figura 53). Por lo tanto el considerar el efecto del alto porcentaje de la lisis del organismo en estadio de pupa podría ser indicador de un efecto sobre canales de potasio, ya que se ha reportado la expresión de genes codificantes de canales tipo *Shaker* y *eag* (Kv10.1) al final del tercer estadio larvario hasta la prepupa, que es cuando se comienza a observar el efecto de la lisis del organismo (Flybase, 2015).

Se decidió evaluar sólo los componentes mayoritarios del subfraccionamiento, con el supuesto de que el efecto observado se debiera a estos principalmente. Sin embargo, no se descarta un importante efecto por parte de los componentes minoritarios. En primera instancia se evaluaron los componentes de *C. fergusonii* (Tabla 7), comenzando con los de la fracción F2. Los resultados indicaron que de los siete componentes evaluados, sólo con el componente T16+17 se pudo observar un efecto diferencial considerable en la sobrevivencia entre las cepas *yw* y *eag*, en donde la sobrevivencia de la cepa *eag* fue superior en un 24% con respecto a *yw* (Figura 34). Ninguno de los demás componentes inyectados de esta fracción presentó un efecto diferencial en la sobrevivencia entre ambas cepas que fuera mayor a 7% (Anexo 3, Figura 44) y además no se volvió a observar que la actividad de las larvas aumentara, posiblemente el componente responsable de causar tal efecto pudiera ser uno de los minoritarios.

De la misma manera que con la fracción F2, de los 10 componentes evaluados de la fracción F3 (Tabla 7), sólo con el componente T17+18+19 se observó un efecto diferencial del 14% en la sobrevivencia entre ambas cepas; siendo superior la sobrevivencia de *eag* (Figura 34). Un efecto similar fue observado con T4 perteneciente a la F5, en donde la sobrevivencia

de *eag* fue superior en un 13% con respecto a la de *yw*, mientras que el único componente en donde se observó que la sobrevivencia de la cepa *yw* fuera superior en un 14% fue T14 (Figura 34).

Al evaluar los componentes mayoritarios de las fracciones de *C. spurius* (Tabla 8), se encontró que para la fracción F2, sólo con el componente T12 se observó un efecto diferencial en la sobrevivencia, siendo superior para la cepa *yw* en un 13% con respecto a *eag* (Figura 36). Tomando en consideración que el efecto máximo diferencial obtenido fue de 13% con este componente y con la fracción completa fue de un 30%, se deduce que el componente SrXIA que tiene como blanco farmacológico canales de potasio Kv1 se perdiera durante el subfraccionamiento o corresponda a uno de los componentes minoritarios.

El análisis de los resultados obtenidos con los ocho componentes de la fracción F3 indica que tres componentes presentan efecto diferencial en la sobrevivencia, siendo en general superior al 14%. Estos componentes fueron T11, T13 y T18 (Figura 36), con los cuales se observó que la sobrevivencia de *eag* siempre fue superior a la de *yw*. Finalmente, con los resultados obtenidos de los componentes de la fracción F6, no se encontró un efecto diferencial superior al 10% en la sobrevivencia entre las cepas *yw* y *eag* (Figura 50); por lo tanto se considera que el componente causante del efecto diferencial de 25% observado con la fracción completa pudiera haberse perdido durante el fraccionamiento o que corresponda a alguno de los minoritarios.

De la misma manera en que se observó con las fracciones completas, la mortandad causada por la lisis del organismo en estadio de pupa se presenta en frecuencias muy elevadas, en la mayoría de los casos en ambas cepas, tal efecto pudiera deberse a la afinidad de estos componentes por el canal de potasio *eag* que se expresa al final del tercer estadio larvario y en prepupa (Flybase, 2015), lo cual puede ser respaldado tomando en consideración el efecto antagónico que ejercen sobre dicho canal, tal y como fue observado cuando se realizaron los ensayos electrofisiológicos de estos componentes sobre el canal de potasio Kv10.1 (Figuras 39-42).

Tomando en consideración la expresión de los canales de potasio *eag* durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* se podría explicar porque en la mayoría de los casos la sobrevivencia de la cepa *eag* es superior a *yw*, a excepción de los componentes T14 de *C. fergusonii* y T12 de *C. spurius*. Una posible explicación pudiera ser que otros canales de potasio

como *Shaker* pudieran estarse expresando en mayor cantidad en la cepa *yw* con respecto a la cepa *eag*, debido a que el canal de potasio Kv10.1 (*eag*) no presenta afección por parte de una mutación, como lo es el caso de la cepa *eag*. Lo anterior sería válido si tomamos en consideración que el canal *eag* (Kv10.1) regula la expresión del canal tipo *Shaker* (Flybase, 2015), por lo tanto pudiera estar aumentando su expresión y por consiguiente cada péptido podría estar afectando dos canales de potasio en lugar de uno y con ello disminuir la sobrevivencia de la cepa *yw* con respecto a la cepa *eag*.

Finalmente, una posible explicación de la inhibición de la eclosión de la pupa al aplicarse las subfracciones del veneno podría ser la siguiente: durante el estadio de pupa se expresan dos diferentes canales de potasio, el canal *Shaker* y el canal *eag* (Kv10.1); este último incrementa su nivel de expresión en la etapa de pupa tardía, en particular en la región cefálica. Sin embargo, los antecedentes indican que es el canal *Shaker* el que está directamente involucrado en el proceso de eclosión (Flybase, 2015). Por lo tanto, los efectos observados en la sobrevivencia, en la lisis del organismo en el pupario y más aún en la inhibición de la eclosión, se pudieran deber no solamente al bloqueo del canal de potasio *eag* (Kv10.1), sino también al bloqueo de canal *Shaker*.

CONCLUSIONES

- *Drosophila melanogaster* potencialmente es un buen modelo *in vivo* para un primer tamizaje de componentes del veneno de *Conus* con actividad sobre canales de potasio.
- Para la identificación de fracciones que pudieran tener componentes con actividad sobre canales de potasio se debe considerar cualesquiera de los tres siguientes efectos:
 1. Un efecto diferencial en la sobrevivencia entre las cepas *eag* y *yw*, superior al 19%.
 2. Un aumento en la actividad de las larvas de la cepa *eag* posterior a la inyección.
 3. Un alto porcentaje de lisis del organismo en estadio de pupa, superior al 30% en ambas cepas.
- Para la identificación de componentes con actividad potencial sobre canales de potasio se debe considerar lo siguiente:
 1. Un efecto diferencial en la sobrevivencia entre las cepas *eag* y *yw*, superior al 13%.
 2. Porcentajes de lisis del organismo en el estadio de pupa \geq a 12% en cualquiera de las cepas.
 3. El porcentaje de inhibición de la eclosión en la cepa *yw* debe de ser \geq a 19%, siempre superior al de *eag* por lo menos en un 9%.
- Se logró la identificación de cuatro componentes en el veneno de *C. fergusonii* con actividad sobre el canal de potasio Kv10.1 a partir del bioensayo de microinyecciones en *Drosophila melanogaster*.
 - T16+17
 - T17+18+19
 - T4
 - T14
- La conotoxina PVIIA presenta actividad sobre el canal de potasio Kv10.1.

PERSPECTIVAS

- Repurificar los componentes T16+17 y T17+18+19 y evaluarlos de manera independiente en los canales de potasio Kv10.1 y *Shaker*, expresados heterológamente.
- Caracterizar bioquímicamente los componentes de *C. fergusonii* que mostraron actividad sobre los canales de potasio Kv10.1.
- Evaluar los componentes de *C. spurius* que mostraron un efecto diferencial en la sobrevivencia entre las cepas *eag* y *yw* en los canales de potasio Kv10.1 y *Shaker*, expresados heterológamente.
- Con base en lo que se obtenga con la evaluación de los componentes de *C. spurius* en Kv10.1, evaluar si la inhibición de la eclosión del organismo en estadio de pupa se puede considerar o no como un factor determinante para la identificación de componentes con actividad en canales de potasio.

Referencias

- [1] Adams D. J., Callaghan B., Berecki, G. (2012). Analgesic conotoxins: block and G protein-coupled receptor modulation of N-type (Cav2.2) calcium channels. *British journal of pharmacology*, 166(2): 486–500.
- [2] Aggarwal S. K., MacKinnon R. (1996). Contribution of the S4 segment to gating charge in the *Shaker* K⁺ channel. *Neuron*, 16(6): 1169–1177.
- [3] Aguilar M. B., de la Rosa R. A. C., Falcón A., Olivera B. M., Heimer de la Cotera E. P. (2009). Peptide pal9a from the venom of the turrid snail *Polystira albida* from the Gulf of Mexico: Purification, characterization, and comparison with P-conotoxin-like (framework IX) conoidean peptides. *Peptides*, 30(3): 467–476.
- [4] Aguilar M. B., Flores-Torres A., Batista C. V. F., Falcón A., López-Vera E., Heimer de la Cotera E. P. (2009). Structural characterization of five post-translationally modified isomorphs of a novel putative δ -conotoxin from the vermivorous snail *Conus delessertii* from the Mexican Caribbean Sea. *Peptides*, 30(3): 458–466.
- [5] Aguilar M. B., Luna-Ramírez K. S., Echeverría D., Falcón A., Olivera B. M., Heimer de la Cotera E. P., 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.
- [6] Aguilar M., Lezama-Monfil L., Maillo M., Pedraza-Lara H., López-Vera E., Heimer de la Cotera E. (2006). A biologically active hydrophobic T-1-conotoxin from the venom of *Conus spurius*. *Peptides*, 27(3): 500–505.
- [7] Aguilar M. B., López-Vera E., Heimer de la Cotera E., Falcón A., Olivera B. M., Maillo M. (2007). I-conotoxins in vermivorous species of the West Atlantic: Peptide sr11a from *Conus spurius*. *Peptides*, 28(1): 18–23.
- [8] Aguilar M. B., Pérez-Reyes L. I., López Z., Heimer de la Cotera E., Falcón A., Ayala C., Galván M., Salvador C., Escobar L. (2010). Peptide sr11a from *Conus spurius* is a novel peptide blocker for Kv1 potassium channels. *Peptides*, 31(7): 1287–1291.
- [9] Aiyar J., Rizzi J. P., Gutman G. A., Chandy G. K. (1996). The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. *Journal of Biological Chemistry*, 271(49): 31013–31016.
- [10] Akondi K. B., Muttenthaler M., Dutertre S., Kaas Q., Craik D. J., Lewis R. J., Alewood P. F. (2014). Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of conotoxins. *Chemical Reviews*, 114(11): 5815-5847.
- [11] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2007). *Molecular Biology of the Cell* (Fifth ed.). Garland Science, New York.
- [12] Arbeitman M. N., Furlong E. E. M., Imam F., Johnson E., Null B. H., Baker B. S., Krasnow M. A., Scott M. P., Davis R. W. White K. P. (2002). Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 297(5590): 2270–2275.

- [13] Baker L. & Woodard C. T. (2007). Genetics and molecular biology. Laboratory Manual: Howard Hughes Medical Institute (HHMI).
<https://www.mtholyoke.edu/courses/cwoodard/biol210/biol210labman.html>
- [14] Banerjee J., Yongye B. A., Yin-Pin C., Gyanda R., Medina-Franco J. L., Armishaw C. J. (2013). Design and synthesis of α -conotoxin G1D analogues as selective $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor antagonists. *Biopolymers (Pept Sci)*, 12: 78-88.
- [15] Bauer C. K., Schwarz J. R. (2001). Physiology of EAG K⁺ channels. *Journal of Membrane Biology*, 182(1): 1–15.
- [16] Bayrhuber M., Vijayan V., Ferber M., Graf R., Korukott J., Imperial J., Garret J. E., Baldomero M. O., Terlau H., Zweckstetter M., Becker S. (2005). Conkunitzin-S1 is the first member of a new Kunitz-type neurotoxin family: Structural and functional characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 23766–23770.
- [17] Becerra-Amezcuca M. P. (2012). Purificación y caracterización estructural de dos proteínas de 10 kDa del veneno del caracol marino *Conus spurius*. Tesis profesional de maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 97 pp.
- [18] Benarroch E. E. (2009). Potassium channels: brief overview and implications in epilepsy. *Neurology*, 72(7): 664–669.
- [19] Bernaldez J., López O., Licea A., Salceda E., Arellano R. O., Vega R., Soto E. (2011). Electrophysiological characterization of a novel small peptide from the venom of *Conus californicus* that targets voltage-gated neuronal Ca²⁺ channels. *Toxicon*, 57(1): 60–67.
- [20] Bingham J.-P., Mitsunaga E., Bergeron Z. L. (2010). Drugs from slugs-past, present and future perspectives of ω -conotoxin research. *Chemico-Biological Interactions*, 183(1): 1–18.
- [21] Blunt J. W., Copp B. R., Keyzers R. A., Munro M. H. G., Prinsep M. R. (2012). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 30(2): 237–323.
- [22] Brad G. R., Bulaj G., Norton R. S. (2014). Structure and function of μ -conotoxins, peptide-based sodium channel blockers with analgesic activity. *Future Medicinal Chemistry*, 6(15): 1677–1698.
- [23] Bruce C., Fitches E. C., Chougule N., Bell H. A., Gatehouse J. A. (2011). Recombinant conotoxin, TxVIA, produced in yeast has insecticidal activity. *Toxicon*, 58(1): 93–100.
- [24] Bruggemann A., Pardo L. A., Stühmer W., Pongs O. (1993). Ether-à-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. *Nature*, 365(6445): 445–448.
- [25] Chen P., Dendorfer A., Finol-Urdaneta R. K., Terlau H., Olivera B. M. (2010). Biochemical characterization of κ M-R111J, a Kv1.2 channel blocker: Evaluation of cardioprotective Effects of κ M-conotoxins. *Journal of Biological Chemistry*, 285(20): 14882–14889.

- [26] Choe P. (2002). Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience*, 3 (2): 115-121.
- [27] Craig A. G., Norberg T., Griffin D., Hoeger C., Akhtar M., Schmidt, K., Low W., Dykert J., Richelson E., Navarro V., Mazella J., Watkins M., Hillyard D., Imperial J., Cruz L. J., Olivera B. M. (1999). Conulakin-G, an O-Glycosylated invertebrate neurotensin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20): 13752–13759.
- [28] Cruz L. J., de Santos V., Zafaralla G. C., Ramilo C. A., Zeikus R., Gray W. R., Olivera B. M. (1987). Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs: Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus straitus* venoms. *Journal of Biological Chemistry*, 262(33): 15821–15824.
- [29] Cruz L. J., Gray W. R., Olivera B. M. (1978). Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 190(2): 539–548.
- [30] Doyle D. A., Morais C. J., Pfuetzner R. A., Kuo A., Gulbis J. M., Cohen S. L., Chait B. T., MacKinnon R. (1998). The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280(5360): 69–77.
- [31] Drysdale R., Warmke J., Kreber R., Ganetzky B. (1991). Molecular characterization of *eag*: A gene affecting potassium channels in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 127(3): 497–505.
- [32] Dutertre S., Ulens C., Büttner R., Fish A., van Elk R., Kendel Y., Hopping G., Alewood P. F., Schroeder C., Nocke A., Smit A. B., Sixma T. K., Lewis R. J. (2007). AChBP-targeted α -conotoxin correlates distinct binding orientations with nAChR subtype selectivity. *The EMBO Journal*, 26(16): 3858–3867.
- [33] Endean R., Rudkin C. (1965). Further studies of the venoms of Conidae. *Toxicon*, 2(4): 225–249.
- [34] England L. J., Imperial J., Jacobsen R., Craig A. G., Gulyas J., Akhtar M., Rivier J., Julius D., Olivera B. M. (1998). Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science*, 281(5376): 575–578.
- [35] Escoubas P., Palma M. F., Nakajima T. (1995). A microinjection technique using *Drosophila melanogaster* for bioassay-guided isolation of neurotoxins in arthropod venoms. *Toxicon*, 33(12): 1549–1555.
- [36] Estrada N., Rodríguez-Jaramillo C., Contreras G., Ascencio F. (2010). Effects of induced paralysis on hemocytes and tissues of the giant lions-paw scallop by paralyzing shellfish poison. *Marine Biology*, 157(6): 1401–1415.
- [37] Fan C.-X., Chen X.-K., Zhang C., Wang L.-X., Duan K.-L., He L.-L., Cao Y., Liu A.-Y., Zhong M.-N., Ulens C., Tygat J., Chen J.-S., Chi C.-Wu., Zhou Z. (2003). A novel conotoxin from *Conus betulinus*, κ -BtX, unique in cysteine pattern and in function as a specific BK channel modulator. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 12624–12633.

- [38] Favreau P., Stöcklin R. (2009). Marine snail venoms: use and trends in receptor and channel neuropharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(5): 594–601.
- [39] Fedosov A. E., Moshkovskii S. A., Kuznetsova K. G., Olivera B. M. (2012). Conotoxins: from the biodiversity of gastropods to new drugs. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry*, 6(2): 107–122.
- [40] Fiedler B., Zhang M.-M., Buczek O., Azam L., Bulaj G., Norton R. S., Olivera B. M., Yoshikami D. (2008). Specificity, affinity and efficacy of iota-conotoxin RXIA, an agonist of voltage-gated sodium channels Na_v1.2, 1.6 and 1.7. *Biochemical Pharmacology*, 75(12): 2334–2344
- [41] Flores-Torres A. (2009). Purificación y caracterización de péptidos del veneno de caracol marino *Conus delesserti*. Tesis profesional de maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 108 pp.
- [42] Flórez J., Armijo J. A., Mediavilla A. (2008). *Farmacología Humana (5a Edición)*. España: Editorial Masson.
- [43] Frolov R. V., Bagati A., Casino B., Singh S. (2012). Potassium channels in *Drosophila*: Historical breakthroughs, significance, and perspectives. *Journal of Neurogenetics*, 26(3-4): 275-290.
- [44] Ganetzky B., Robertson G. A., Wilson G. F., Trudeau M. C., Titus S. A. (1999). The Eag Family of K⁺ Channels in *Drosophila* and Mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868(1): 356-369.
- [45] González-Moran M. (2004). Comunicación celular. Transducción de señales acopladas a proteínas G heterotriméricas. *Educación Química*, 16: 208-216.
- [46] Gulbis J. M., Zhou M., Mann S., MacKinnon R. (2000). Structure of the cytoplasmic β subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science*, 289(5476): 123-127.
- [47] Hanna G. D., Strong A. M. (1949). West American mollusks of the genus *Conus*. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 26: 247-322.
- [48] Hannon H. E., Atchison W. D. (2013). Omega-conotoxins as experimental tools and therapeutics in pain management. *Marine Drugs*, 11(3): 680–699.
- [49] Heghinian M. D., Mejia M., Adams D. J., Godenschwege T. A., Mari F. (2015). Inhibition of cholinergic pathways in *Drosophila melanogaster* by α -conotoxins. *The FASEB Journal*, 29(3): 1011–1018.
- [50] Heinemann S. H., Leipold E. (2007). Conotoxins of the O-superfamily affecting voltage-gated sodium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(11): 1329–1340.
- [51] Hermitte L. C. D. (1946). Venomous marine molluscs of the genus *Conus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 39(6): 485–512.
- [52] Herrera-Bazán J. J. H. (2009). Comparación de los niveles de enzimas antioxidantes y la frecuencia de alteraciones somáticas de moscas (*Drosophila melanogaster*)

expuestas a concentraciones bajas de genotóxicos. Tesis profesional de maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 75 pp.

- [53] Hille B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes* (3rd ed.) Sunderland, MA: Sinauer.
- [54] Hodge J. J. L. (2009). Ion channels to inactivate neurons in *Drosophila*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2(13): 1-10.
- [55] Hoshi T., Armstrong C. M. (2013). C-type inactivation of voltage-gated K⁺ channels: Pore constriction or dilation? *The Journal of General Physiology*, 141(2): 151–160.
- [56] Hu H., Bandyopadhyay P. K., Olivera B. M., Yandell M. (2012). Elucidation of the molecular envenomation strategy of the cone snail *Conus geographus* through transcriptome sequencing of its venom duct. *BMC Genomics*, 13(284): 1-12.
- [57] Imperial J. S., Bansal P. S., Alewood P. F., Daly N. L., Craik D. J., Sporning A., Terlau H., López-Vera E., Bandyopadhyay P. K., Olivera B. M. (2006). A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry*, 45(27): 8331–8340.
- [58] Jacobsen R. B., Koch E. D., Lange-Malecki B., Stocker M., Verhey J., Van Wagoner R. M., Vyazovkina A., Olivera B. M., Terlau H. (2000). Single amino acid substitutions in κ -conotoxin PVIIA disrupt Interaction with the *Shaker* K⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32): 24639–24644.
- [59] Kandel R. E., Schwartz H. L., Jessell M. T. (2000). *Principles of Neural Science* (Fourth Ed). McGraw-Hill. New York, USA.
- [60] Kaufenstein S., Huys I., Kuch U., Melaun C., Tytgat J., Mebs D. (2004). Novel conopeptides of the I-superfamily occur in several clades of cone snails. *Toxicon*, 44(5): 539–548.
- [61] Kaufenstein S., Huys I., Lamthanh H., Stöcklin R., Sotto F., Menez A., Tytgat J., Mebs D. (2003). A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. *Toxicon*, 42(1): 43–52.
- [62] Knapp O., McArthur J. R., Adams, D. J. (2012). Conotoxins targeting neuronal voltage-gated sodium channel subtypes: Potential analgesics? *Toxins*, 4(11): 1236–1260.
- [63] Kohn A. J. (1958). Cone shell stings; recent cases of human injury due to venomous marine snails of the genus *Conus*. *Hawaii Medical Journal*, 17(6): 528–532.
- [64] Kohn A. J., Saunders P. R., Wiener S. (1960). Preliminary studies on the venom of the marine snail *Conus**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 90(3): 706–725.
- [65] Kulagina N. V., O’Shaughnessy T. J., Ma W., Ramsdell J. S., Pancrazio J. J. (2004). Pharmacological effects of the marine toxins, brevetoxin and saxitoxin, on murine frontal cortex neuronal networks. *Toxicon*, 44(6): 669–676.

- [66] Labro A. J., Snyders D. J. (2012). Being flexible: voltage-controllable activation gate of Kv channels. *Frontiers in Pharmacology*, 3(168): 1-12.
- [67] Lainé M., Lin M. A., Bannister J. P. A., Silverman W. R., Mock A. F., Roux B., Papazian D. M. (2003). Atomic proximity between S4 segment and pore domain in *Shaker* potassium channels. *Neuron*, 39(3): 467–481.
- [68] Latorre R., López-Barneo J., Bezanilla F., Llinás R. (1996). *Biofísica y fisiología celular*. Sevilla: Universidad de Sevilla, España.
- [69] Lavergne V., Dutertre S., Jin A., Lewis R. J., Taft R. J., Alewood P. F. (2013). Systematic interrogation of the *Conus marmoreus* venom duct transcriptome with ConoSorter reveals 158 novel conotoxins and 13 new gene superfamilies. *BioMedCentral Genomics*, 14(1): 1-12.
- [70] Leipold E., Hansel A., Olivera B. M., Terlau H., Heinemann S. H. (2005). Molecular interaction of δ -conotoxins with voltage-gated sodium channels. *FEBS Letters*, 579(18): 3881–3884.
- [71] Lewis R. J., Dutertre S., Vetter I., Christie M. J. (2012). *Conus* venom peptide pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 64(2): 259–298.
- [72] Lewis R. J. (2012). Discovery and development of the χ -conopeptide class of analgesic peptides. *Toxicon*, 59(4): 524–528.
- [73] Lin C. H., Chen C. S., Hsu K. S., King D. S., Lyu P. C. (1997). Role of modified glutamic acid in the helical structure of conantokin-T. *FEBS Letters*, 407(2): 243-248.
- [74] Lindsley L. D., Zimm G. G. (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster* (Fourth Ed.). Academic Press, USA.
- [75] Liu Z., Li H., Liu N., Wu C., Jiang J., Yue J., Jing Y., Dai Q. (2012). Diversity and evolution of conotoxins in *Conus virgo*, *Conus eburneus*, *Conus imperialis* and *Conus marmoreus* from the South China Sea. *Toxicon*, 60(6): 982–989.
- [76] Lluisma A. O., Milash B. A., Moore B., Olivera B. M., Bandyopadhyay P. K. (2012). Novel venom peptides from the cone snail *Conus pulicarius* discovered through next-generation sequencing of its venom duct transcriptome. *Marine Genomics*, 5: 43–51.
- [77] Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh, H., Amon A., Scott, M. P. (2013). *Molecular Cell Biology* (Seventh Ed.). New York, USA.
- [78] López-Vera E. (2010). Los receptores nicotínicos de acetilcolina y las α -conotoxinas. *Revista de educación Bioquímica*, 29(1): 8-12.
- [79] López-Vera E., Aguilar M. B., Schiavon E., Marínzi C., Ortiz E., Restano C. R., Batista C. V. F., Possani L. D., Heimer de la Cotera E. P., Peri F., Becerril B., Wanke E. (2007). Novel α -conotoxins from *Conus spurius* and the α -conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. *The FEBS Journal*, 274(15): 3972–3985.

- [80] López-Vera E., Heimer de la Cotera E. P., Maillo M., Riesgo-Escovar J. R., Olivera B. M., Aguilar M. B. (2004). A novel structural class of toxins: the methionine-rich peptides from the venoms of turrid marine snails (Mollusca, Conoidea). *Toxicon*, 43(4): 365-374.
- [81] Lubbers N. L., Campbell T. J., Polakowski J. S., Bulaj G., Layer R. T., Moore J., Gross G. J., Cox B. F. (2005). Postischemic administration of CGX-1051, a peptide from cone snail venom, reduces infarct size in both rat and dog models of myocardial ischemia and reperfusion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 46(2), 141–146.
- [82] Ludwig J., Owen D., Pongs O. (1997). Carboxy-terminal domain mediates assembly of the voltage-gated rat ether-à-go-go potassium channel. *The EMBO Journal*, 16(21): 6337–6345.
- [83] Luna-Ramírez K. S., Aguilar M. B., Falcón A., Heimer de la Cotera E. P., Olivera B. M., Maillo M. (2007). An O-conotoxin from the vermivorous *Conus spurius* active on mice and mollusks. *Peptides*, 28(1), 24–30.
- [84] Maillo M., Aguilar M. B., López-Vera E., Craig A. G., Bulaj G., Olivera B. M., Heimer de la Cotera E. P. (2002). Conorfamide, a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides. *Toxicon*, 40(4): 401–407.
- [85] Martínez-Hernández L. Á. (2012). Microbioensayo para la evaluación de conotoxinas en larvas de *Drosophila melanogaster*. Tesis profesional de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 53 pp.
- [86] Massilia G. R., Eliseo T., Grolleau F., Lapied B., Barbier J., Bournaud R., Molgó J., Cicero D. O., Paci M., Schininà, Ascenzi P., Polticelli F. (2003). Contryphan-Vn: a modulator of Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(1): 238-246.
- [87] Mejia M., Heghinian M. D., Busch A., Armishaw C. J., Marí, F., Godenschwege T. A. (2010). A novel approach for *in vivo* screening of toxins using the *Drosophila* Giant Fiber Circuit. *Toxicon*, 56(8): 1398–1407.
- [88] Menéndez J. C. (2005). Nuevos antitumorales de origen marino. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 71(2): 341–363.
- [89] Muller HJ (1943) A stable double X chromosome. *Drosophila Information Service* 17: 61–62.
- [90] Norton R. S. (2010). μ -Conotoxins as leads in the development of new analgesics. *Molecules*, 15(4): 2825–2844.
- [91] Olivera B. M. (2002). *Conus* venom peptides: Reflections from the biology of clades and species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33: 25–47.
- [92] Olivera B. M. (2006). *Conus* peptides: Biodiversity-based discovery and exogenomics. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42): 31173–31177.

- [93] Olivera B. M., Rivier J., Clark C., Ramilo C. A., Corpuz G. P., Abogadie F. C., Mena E. E., Woodward S. R., Hillyard D. R., Cruz L. J. (1990). Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science*, 249(4966): 257–263.
- [94] Papazian D. M. (1999). Potassium channels: Some assembly required. *Neuron*, 23(1): 7–10.
- [95] Pardo L., del Camino D., Sánchez A., Alves F., Brüggemann A., Beckh S., Stühmer W. (1999). Oncogenic potential of EAG K⁺ channels. *The EMBO Journal*, 18(20): 5540–5547.
- [96] Paredes C., Cardoso F., Altamirano K., Baltazar P., Romero L. (2010). La familia Conidae en el mar peruano. *Revista Peruana de Biología*, 17(1): 65-73.
- [97] Petrel C., Hocking H. G., Reynaud M., Upert G., Favreau P., Biass D., Paolini-Bertrand M., Peigneur S., Tygat J., Gilles N., Hartley O., Boelens R., Stocklin R., Servent D. (2013). Identification, structural and pharmacological characterization of τ -CnVA, a conopeptide that selectively interacts with somatostatin sst3 receptor. *Biochemical Pharmacology*, 85(11): 1663–1671.
- [98] Pi C., Liu J., Peng C., Liu Y., Jiang X., Zhao Y., Tang S., Wang L., Dong M., Chen S., Xu A. (2006). Diversity and evolution of conotoxins based on gene expression profiling of *Conus litteratus*. *Genomics*, 88(6): 809–819.
- [99] Piyankarage S. C., Augustin H., Grosjean Y., Featherstone D. E., Shippy S. A. (2008). Hemolymph amino acid analysis of individual *Drosophila larvae*. *Analytical Chemistry*, 80(4): 1201–1207.
- [100] Puillandre N., Holford M. (2010). The Terebridae and teretoxins: Combining phylogeny and anatomy for concerted discovery of bioactive compounds. *BMC Chemical Biology*, 10 (7): 1-12.
- [101] Rice R., Halstead B. W. (1968). Report of fatal cone shell sting by *Conus geographus* linnaeus. *Toxicon*, 5(3): 223–224.
- [102] Rincón L. D. E., Fernández F. P., Reséndez P. D. (2009). De la genética de la mosca a la salud humana. *Ciencia UANL*, 12(1): 83–89.
- [103] Robbins J. (2001). KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*, 90(1): 1-19.
- [104] Robinson S. D., Norton R. S. (2014). Conotoxin gene superfamilies. *Marine Drugs*, 12(12): 6058–6101.
- [105] Rodríguez-Arnaiz R., Becerra A., Castañeda-Partida L., Castañeda-Sortibrán A. N., Delaye L. J., Ordaz-Telléz M. G., Valadéz-Graham V., Vázquez-Cuevas M. J. (2005). *Manual de Prácticas de Genética y Cuaderno de Trabajo*. México, Distrito Federal: Las Prensas de Ciencias (UNAM).

- [106] Sahoo N., Schönherr R., Hoshi T., Heinemann S. H. (2012). Cysteines control the N- and C-linker-dependent gating of KCNH1 potassium channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818(5): 1187–1195.
- [107] Salceda E., Ortega A. (2009). Neurotoxinas: significado biológico y mecanismos de acción. *Elementos: Ciencia y cultura*, 16(74): 29–37.
- [108] Sandhiya S., Dkhar S. A. (2009). Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *The Indian Journal of Medical Research*, 129(3): 223–232.
- [109] Sansom M. S. P., Shrivastava I. H., Bright J. N., Tate J., Capener C. E., Biggin P. C. (2002). Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1565(2): 294–307.
- [110] Schmitt N., Grunnet M., Olesen S. (2014). Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol. Rev.*, 94: 609-653.
- [111] Sharpe I. A., Gehrman J., Loughnan M. L., Thomas L., Adams D. A., Atkins A., Palant E., Craik D. J., Alewood P. F., Lewis R. J. (2001). Two new classes of conopeptides inhibit the α 1-adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nature Neuroscience*, 4(9): 902–907.
- [112] Shon K.-J., Grille M., Jacobsen R., Cartier E., Hopkins C., Gray W. R., Watkins M., Hillyard D. R., Rivier J., Torres J., Yoshikami D., Olivera B. M. (1997). A Noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry*, 36(31): 9581–9587.
- [113] Shon K.-J., Stocker M., Terlau H., Stühmer W., Jacobsen R., Walker C., Grille M., Watkins M., Hillyard D. R., Gray W. R., Olivera B. M. (1998). κ -conotoxin PVIIA is a peptide inhibiting the *Shaker* K⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry*, 273(1): 33–8.
- [114] Spiezia M. C., Chiarabelli C., Polticelli F. (2012). Recombinant expression and insecticidal properties of a *Conus ventricosus* conotoxin-GST fusion protein. *Toxicon*, 60(5): 744–751.
- [115] Tamargo M. J. (2004). Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 70(1): 9–31.
- [116] Teichert R. W., Jimenez E. C., Twede V., Watkins M., Hollmann M., Bulaj G., Olivera B. M. (2007). Venom are specific antagonists of N-Methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 282(51): 36905–36913.
- [117] Terlau H., Olivera B. M. (2004). *Conus* venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, 84(1): 41–68.
- [118] Thottumkara A. P., Parsons W. H., Du Bois J. (2014). Saxitoxin. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(23): 5760–5784.
- [119] Tian C., Zhu R., Zhu L., Qiu T., Cao Z., Kang T. (2014). Potassium channels: Structures, diseases, and modulators. *Chemical Biology & Drug Design*, 83(1): 1–26.

- [120] Valério E., Chaves S., Tenreiro R. (2010). Diversity and Impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: A review. *Toxins*, 2(10): 2359–2410.
- [121] Valía-Vera J. C., Villanueva V. L., Asensio-Samper J. M., López-Alarcón M. D., de Andrés J. A. (2007). Ziconotide: una alternativa innovadora en el dolor crónico neuropático intenso. *Revista de Neurología*, 45(11): 665–669.
- [122] Vergel Rivera G. M., Tasé Martínez M. J., Groning Roque, E. (2009). *Farmacología: Proceso de Atención en Enfermería* (Primera ed). La Habana, Cuba: Ciencias Médicas.
- [123] Violette A., Leonardi A., Piquemal D., Terrat Y., Biass D., Dutertre S., Noguier F., Ducancel F., Stöcklin R., Križaj I., Favreau P. (2012). Recruitment of glycosyl hydrolase proteins in a cone snail venomous arsenal: further insights into biomolecular features of *Conus* venoms. *Marine Drugs*, 10(2): 258–80.
- [124] Walker C. S., Jensen S., Ellison M., Matta J. A., Lee W. Y., Imperial J. S., Duclos N., Brockie P. J., Madsen D. M., Isaac J. T. R., Olivera B., Maricq A. V. (2009). A Novel *Conus* snail polypeptide causes excitotoxicity by blocking desensitization of AMPA receptors. *Current Biology*, 19(11): 900–908.
- [125] Wang J. W., Humphreys J. M., Phillips J. P., Hilliker A. J., Chun-Fang W. (2000). A novel leg-shaking *Drosophila* mutant defective in a voltage-gated K⁺ current and hypersensitive to reactive oxygen species. *The Journal of Neuroscience*, 20(16): 5958-5964.
- [126] Wang J. W., Soll D. R., Wu C.-F. (2002). Morphometric description of the wandering behavior in *Drosophila* larvae: a phenotypic analysis of K⁺ channel mutants. *Journal of Neurogenetics*, 16(1): 45–63.
- [127] Warmke J., Drysdale R., Ganetzky B. (1991). A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila eag* locus. *Science*, 252(5012): 1560–1562.
- [128] Whysner J. A., Saunders P. R. (1966). Purification of the lethal fraction of the venom of the marine snail *Conus californicus*. *Toxicon*, 4(3): 177–181.
- [129] Whyte J. M., Edean R. (1962). Pharmacological investigation of the venoms of the marine snails *Conus textile* and *Conus geographus*. *Toxicon*, 1(1): 25–31.
- [130] Wu C.-F., Ganetzky B. (1992). Neurogenetic studies of ion channels in *Drosophila*. In T. Narahashi (Ed.), *Ion Channels SE - Ion Channels* (pp. 261–314). Springer US.
- [131] Xiang-Wu D., Juan-Juan Y., Ping A., Peng L., He-Sheng L. (2007). Aberrant expression of ether à go-go potassium channel in colorectal cancer patients and cell lines *World Journal of Gastroenterology*, 13(8): 1257-1261.
- [132] Yellen G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419(6902): 35–42.
- [133] Zhang M., Woodruff R. C. (2006). Teaching Notes. *Dros. Inf. Ser.*, 89: 143 - 149.

Referencias electrónicas

- [134] Biodiversitymapping.org. (Fecha de acceso 05/09/2015). <http://biodiversitymapping.org/>
- [135] Clinical Toxinology Resources. (Fecha de acceso 01/09/2015). <http://www.toxinology.com/>
- [136] ConoServer (Fecha de acceso 10/09/2015). <http://www.conoserver.org/>
- [137] Fedesa S. A. (Fecha de acceso 02/11/2013). <http://www.fedesasa.com.ar/>
- [138] Flybase: A Database of *Drosophila* Genes & Genomes. (Fecha de acceso 20/09/2015). <http://flybase.org/>.
- [139] FlyMove. (Fecha de acceso 15/11/2015). <http://flymove.uni-muenster.de/>
- [140] Flystocks: Bloomington *Drosophila* stock center at Indiana University. (Fecha de acceso 26/02/2016). http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/aberration/compound_x_overview.htm

ANEXOS

Anexo 1. Estadios de *D. melanogaster* afectados después de inyectar las conotoxinas y/o componentes del veneno de *C. fergusonii* y *C. spurius* en las larvas.



Larva tercer estadio
(normal)



Lisis posterior a la inyección
(larva)



Necrosis (larva)



Pupa (normal)



Pupa con coloración anormal



Lisis del organismo
dentro del pupario



Pupa tardía
(normal)



Organismo completamente desarrollado
(no hay eclosión)

Anexo 2. Resuspensión y cuantificación de las fracciones del veneno de *Conus spurius*.

Tabla 10. Resultados de la cuantificación de proteína (280 nm) de las fracciones obtenidas del extracto crudo del veneno de *Conus spurius*.

Fracción	Resuspendido en:	A280 (mg/mL)	260/280
F0	100 μ L H ₂ O	0.125	1.29
F1	100 μ L H ₂ O	0.287	1.14
F2	200 μ L H ₂ O	1.376	0.77
F3	1 mL H ₂ O + 200 μ L solución de extracción	5.064	0.68
F3'	1 mL H ₂ O + 500 μ L solución de extracción	5.563	0.65
F4	1 mL H ₂ O + 200 μ L solución de extracción	5.834	0.68
F4'	1 mL H ₂ O + 200 μ L solución de extracción	6.235	0.66
F5	1 mL H ₂ O + 500 μ L solución de extracción	2.964	0.68
F6	500 μ L H ₂ O	0.706	1.03
F7	100 μ L H ₂ O	0.085	1.44
F8	100 μ L H ₂ O	0.125	1.27

Anexo 3. Gráficas de los componentes mayoritarios de las fracciones F2, F3 y F5 de *Conus fergusonii* que no presentaron un efecto diferencial en la sobrevivencia de las cepas *yw* y *eag*.

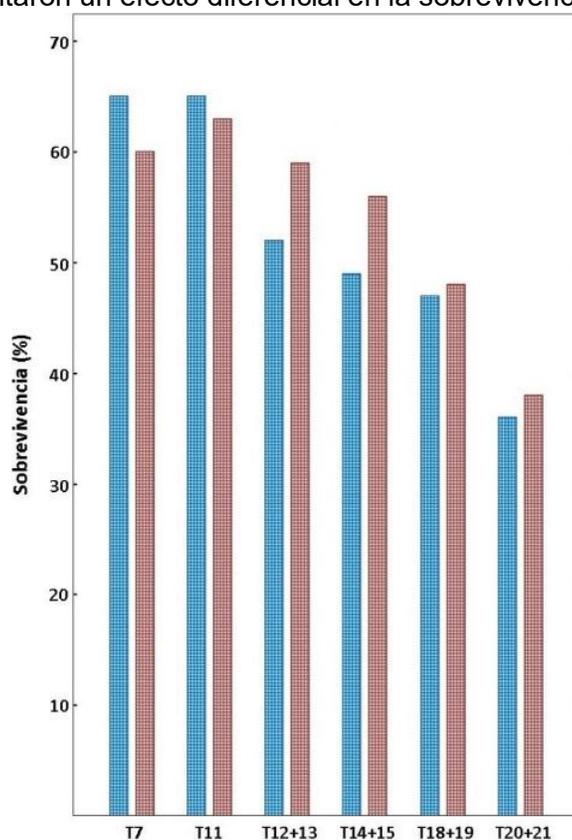


Figura 44. Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F2 de *Conus fergusonii*, con los cuales no se observó un efecto diferencial en la sobrevivencia igual o mayor al 13%. El volumen en el cual fueron resuspendidos cada uno de los componentes fue de 50 μ L de solución salina 0.9%.

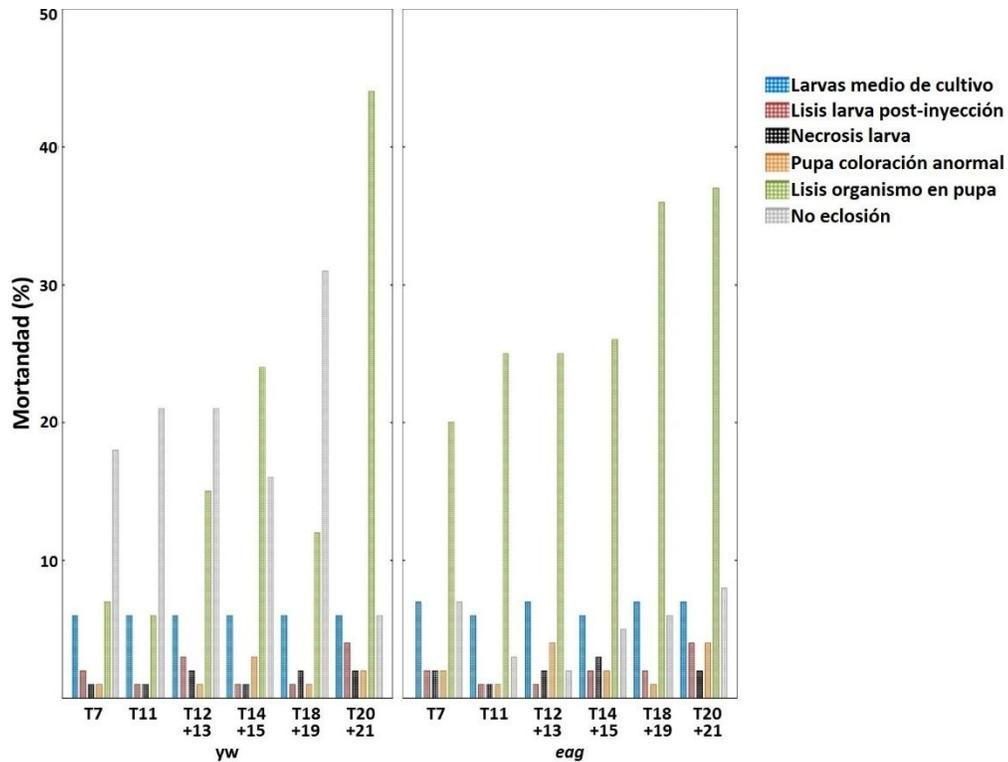


Figura 45. Efecto sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster* después de llevar a cabo la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F2 de *Conus fergusonii*, los cuales no presentaron un efecto diferencial en la sobrevivencia igual o mayor al 13%. El volumen en el cual fueron resuspendidos cada uno de los componentes fue de 50 μ L de solución salina 0.9%.

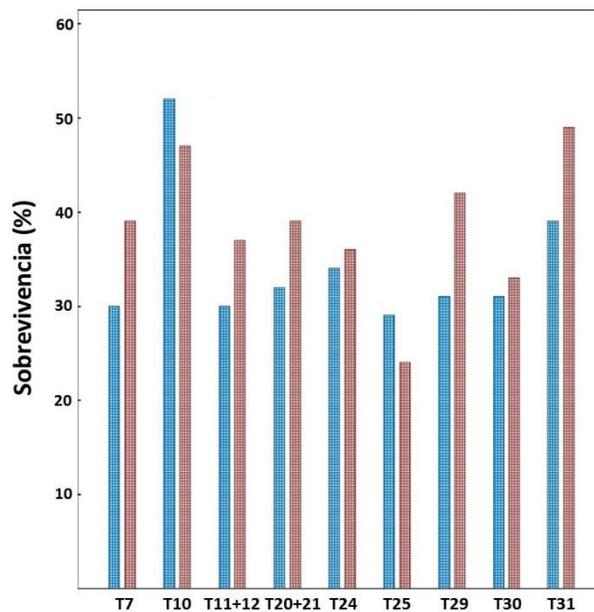


Figura 46. Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F3 de *Conus fergusonii*, con los cuales no se observó un efecto diferencial en la sobrevivencia igual o mayor al 13%. El volumen en el cual fueron resuspendidos cada uno de los componentes fue de 50 μ L de solución salina 0.9%.

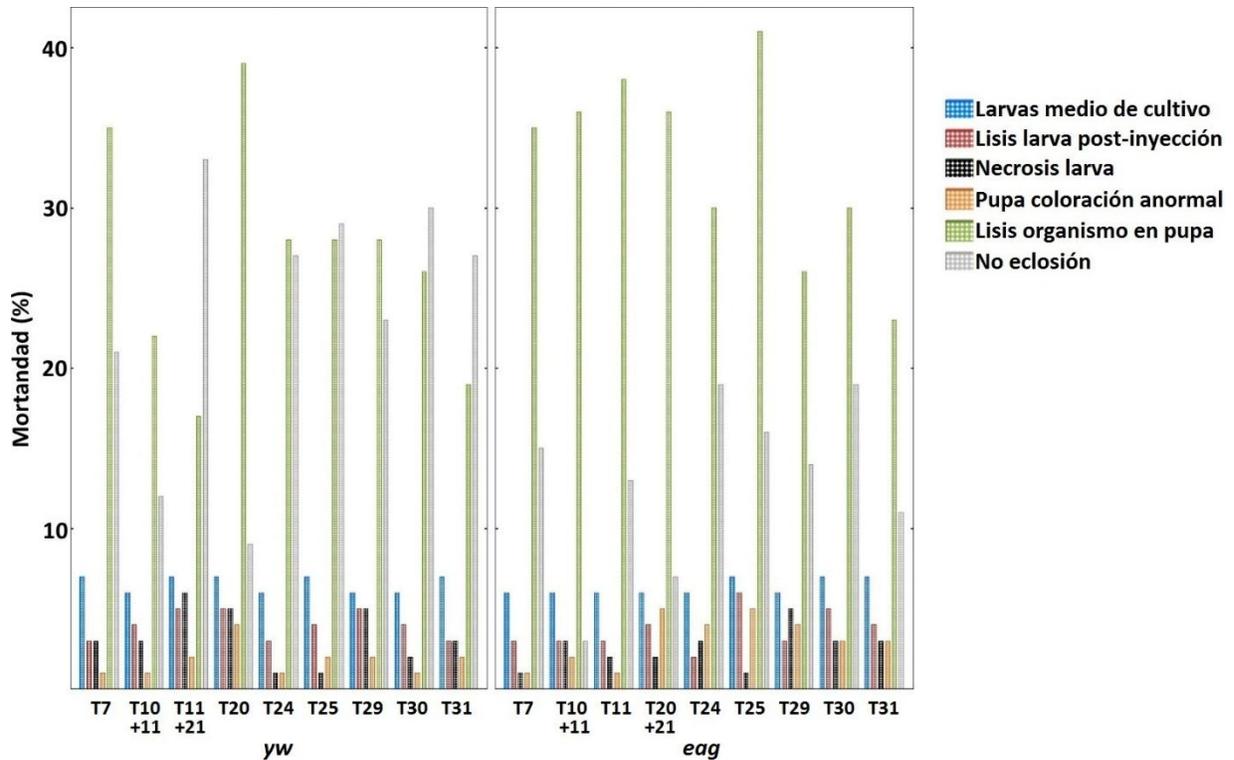


Figura 47. Efecto sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster* después de llevar a cabo la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F3 de *Conus fergusonii*, los cuales no presentaron un efecto diferencial en la sobrevivencia igual o mayor al 13%. El volumen en el cual fueron resuspendidos cada uno de los componentes fue de 50 μ L de solución salina 0.9%.

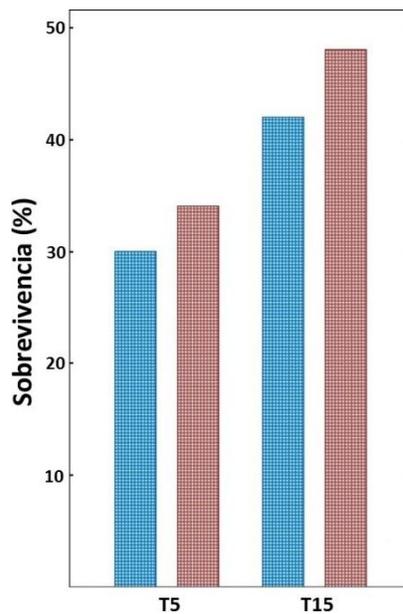


Figura 48. Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F5 de *Conus fergusonii*, con los cuales no se observó un efecto diferencial en la sobrevivencia igual o mayor al 13%. El volumen en el cual fueron resuspendidos cada uno de los componentes fue de 50 μ L de solución salina 0.9%.

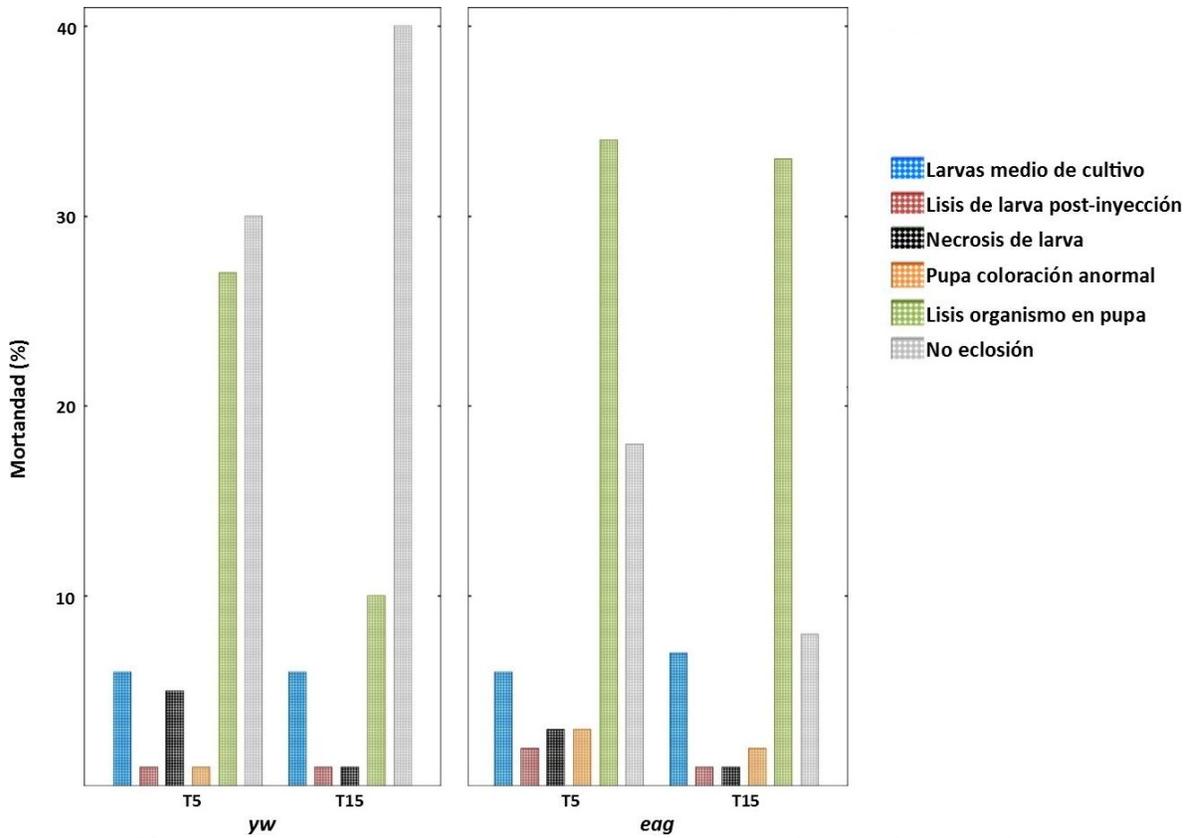


Figura 49. Efecto sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster* después de llevar a cabo la inyección de los componentes mayoritarios de la fracción F5 de *Conus fergusonii*, los cuales no presentaron un efecto diferencial en la sobrevivencia igual o mayor al 13%. El volumen en el cual fueron resuspendidos cada uno de los componentes fue de 50 μ L de solución salina 0.9%.

Anexo 4. Gráficas de los componentes mayoritarios de las fracciones F2, F3 y F5 de *Conus spurius* que no presentaron un efecto diferencial en la sobrevivencia de las cepas *yw* y *eag*.

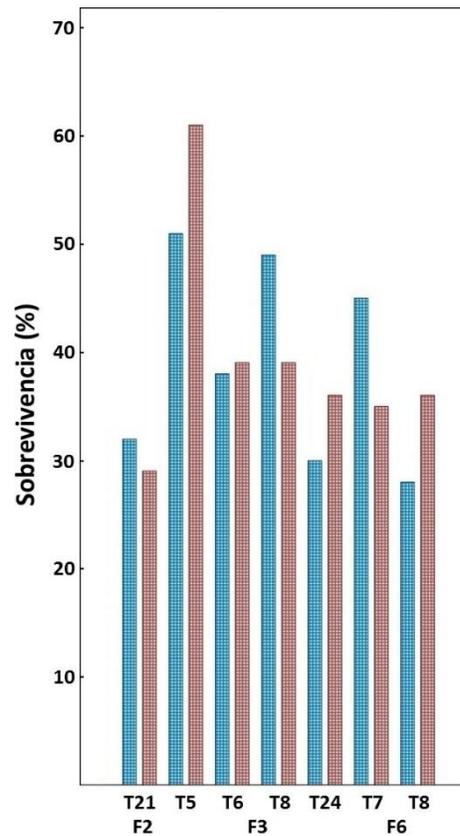


Figura 50. Sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster* posterior a la inyección de los componentes mayoritarios de las fracciones; F2 (T21), F3 (T5, T6, T8 y T24) y F6 (T7 y T8) de *Conus spurius*, con los cuales no se observó un efecto diferencial en la sobrevivencia igual o mayor al 13%. El volumen de solución salina 0.9% en que fueron resuspendidos fue de 50 μ L, pero T6 y T24 que fueron resuspendidos en 100 μ L y T8 que lo fue en 300 μ L con 5% de DMSO, todos ellos de la fracción 3.

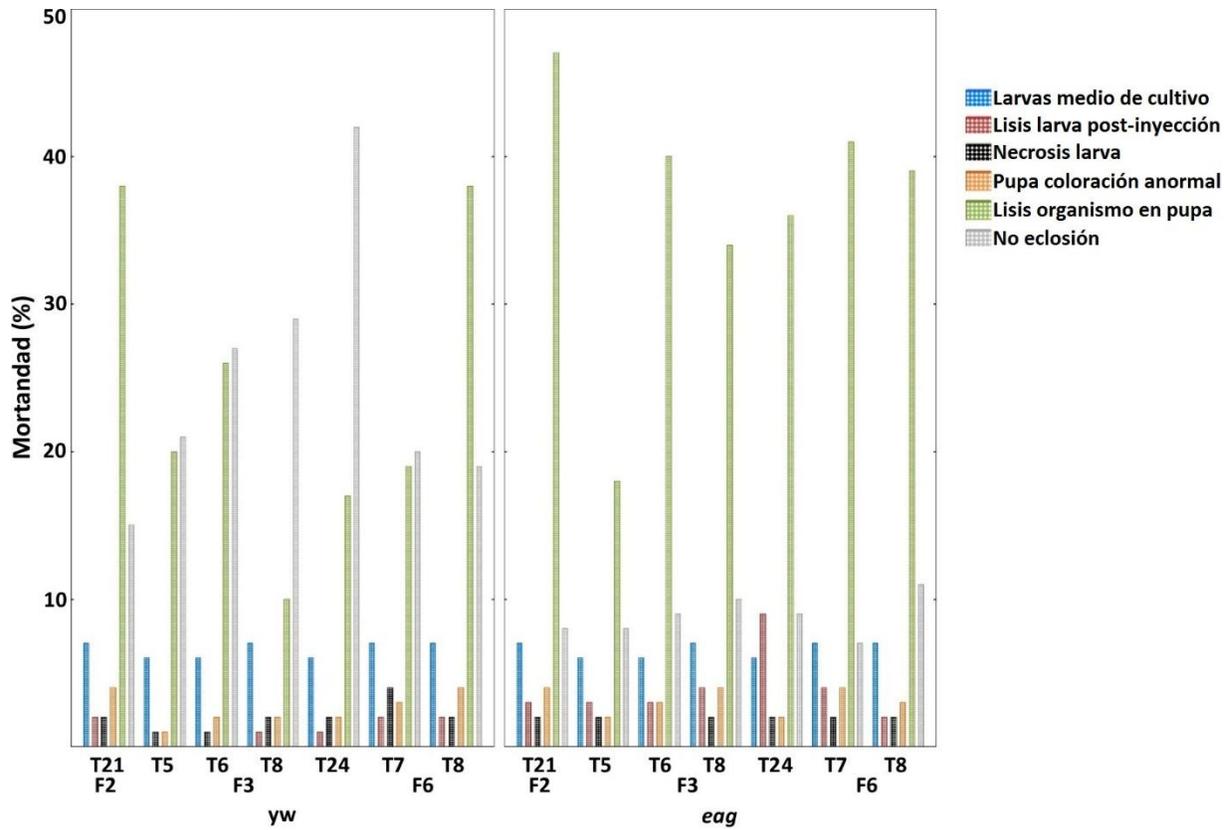


Figura 51. Efecto sobre los estadios de las cepas *yw* (izquierda) y *eag* (derecha) de *Drosophila melanogaster* después de inyectar los componentes mayoritarios de las fracciones; F2 (T21), F3 (T5, T6, T8 y T24) y F6 (T7 y T8) de *Conus spurius*, sin un efecto diferencial en la sobrevivencia $\geq 13\%$. El volumen de solución salina 0.9% en que fueron resuspendidos fue de 50 μL , pero T6 y T24 que fueron resuspendidos en 100 μL y T8 que lo fue en 300 μL con 5% de DMSO, todos ellos de la fracción F3.

Anexo 5. Resultados obtenidos con las microinyecciones de la Saxitoxina a la concentración 1 μM en las cepas *yw* y *eag*.

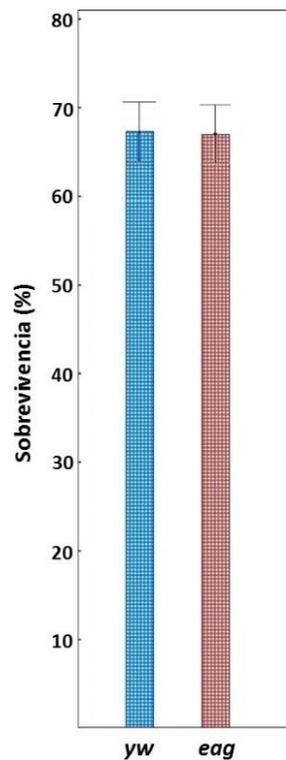


Figura 52. Muestra el efecto de la Saxitoxina (1 μM) en la sobrevivencia de las cepas *yw* (azul) y *eag* (rojo) de *Drosophila melanogaster*. Cada punto representa la media \pm E.E.

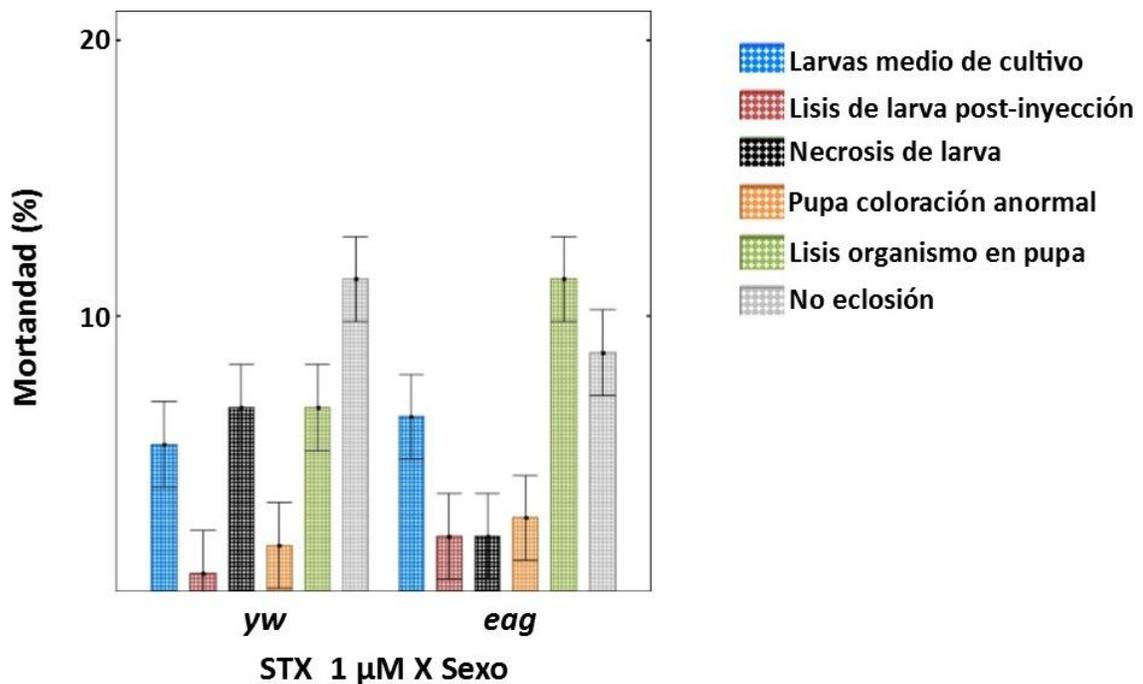


Figura 53. Efecto sobre los estadios de las cepas *yw* y *eag* de *Drosophila melanogaster* cuando se inyectó la Saxitoxina (1 μM). Cada punto representa la media \pm E.E.