

03040



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

---

---

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE EXTRACTOS DE  
GLÁNDULAS Y CONDUCTOS VENENOSOS DE GASTERÓPODOS  
MARINOS SOBRE LA CONTRACTILIDAD DEL MÚSCULO LISO  
INTESTINAL**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

**L. EN N. ANA ANGÉLICA FEREGRINO PÉREZ**

**DIRIGIDA POR:**

**Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera**

**Dra. Alejandra Rojas Molina**

*Campus Juriquilla, Querétaro  
Mayo del 2004*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Universidad Nacional Autónoma de México

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Ana Angélica Feregrino Pérez, cuyo título es: "Determinación del Efecto de Extractos Obtenidos de Glándulas y Conductos Venenosos de Gasterópodos Marinos sobre la Contractilidad del Músculo Liso Intestinal" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente Dr. Mauricio Díaz Muñoz

M Díaz Muñoz

Secretario Dr. Alejandra Rojas Molina

Alejandra Rojas M

Vocal Dr. Rogelio Arellano Ostoa

Rogelio Arellano Ostoa

Suplente Dr. César Ibarra Alvarado

César Ibarra Alvarado

Suplente Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera

Edgar P. Heimer

Aprobado por el Comité Académico

Raúl Gerardo Paredes Guerrero

Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero

Coordinador del Programa

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: ANA ANGÉLICA

FEREGRINO PÉREZ

FECHA: 03/14/2004

FIRMA: Raúl Gerardo Paredes Guerrero

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios por permitirme estar en este camino de la investigación, que aunque difícil, es lo que quiero hacer el resto de mi vida.**

**A Mis Padres Gonzalo Feregrino y Ana María Perez por su apoyo y solidaridad, así como por entenderme y comprenderme en la mayoría de los casos.**

**A toda mi familia en general porque siempre que los he necesitado están ahí para tenderme la mano.**

**A mis amigos y compañeros del Instituto de Neurobiología y de la Facultad de Química por los grandes momentos de aliento que siempre me brindan, los buenos ratos y sobre todo, por aguantarme cuando estoy a punto de la histeria.**

**A todos mis maestros porque con nada podré pagar los conocimientos que me han transmitido.**

**A mis directores de tesis, el Dr. Edgar y la Dra. Alejandra por inculcar en mí el amor a la investigación y por confiar en que puedo hacer bien las cosas, así como por siempre proporcionarme lo necesario para la realización de este proyecto. ¡Gracias!**

**A los Drs. Jesús García Colunga, Juan Riesgo Escobar, Mauricio Díaz Muñoz, Rogelio Arellano Ostoa, César Ibarra, Alejandra Rojas y Edgar P. Heimer, quienes se**

encargaron de la revisión del presente manuscrito y que con sus comentarios y sugerencias mejoraron la calidad de este trabajo.

**Al Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez por su colaboración y orientación en el manejo de los aparatos del laboratorio de Bioquímica Marina, así como por su apoyo, dedicación y sobre todo por su amistad.**

**Al Dr. César Ibarra por su asesoría en el análisis estadístico, las evaluaciones farmacológicas y sus valiosas aportaciones para este trabajo.**

**Al Biol. Andrés Falcón por su apoyo en la obtención de los extractos y su asesoría en las técnicas bioquímicas, además por ayudarme siempre que lo necesite tanto dentro como fuera del laboratorio de Bioquímica.**

**A la MVZ. Verónica Andrade por su apoyo en la manutención y manejo de los animales requeridos para la parte experimental de este trabajo, así como por su amistad y solidaridad.**

**Al Dr. Moustapha, a la Dra. Dora y a la Dra. Sandra por orientarme, auxiliarme y asesorarme siempre en el laboratorio de Fitoquímica.**

**Al M en C. Alejandro Zugasti por ser un gran amigo y por su gran ayuda en la búsqueda bibliográfica.**

**Además, mi más sincero agradecimiento a las Instituciones que me proporcionaron apoyo, tanto de forma económica, como permitiéndome el uso de sus instalaciones:**

**Laboratorio de Neurofarmacología Marina , del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se elaboró este trabajo.**

**Laboratorio de Farmacología y Química de Productos Naturales, de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, donde se realizó la parte experimental y el análisis farmacológico de las especies evaluadas en este proyecto.**

**Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro por su ayuda en la manutención de los animales requeridos para la parte farmacológica de este trabajo.**

**CONACYT por los apoyos recibidos por parte de los proyectos de *Conus*: # 41477; #30701-N responsable Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera.**

**CONCYTEQ por el apoyo recibido del proyecto de *Conus* # B-11, responsable Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera.**

**TWAS, por apoyo al proyecto de *Conus* # 99-127 RG/BIO/LA, responsable Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez.**

**PAPIIT-DGAPA-UNAM, por el apoyo recibido del proyecto de *Turridos* # ES206701, responsable Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez.**

**A todas estas instituciones ¡Gracias! ya que sin estos apoyos este proyecto de tesis no se podría haber realizado.**

**Al personal del Instituto de Neurobiología de la UNAM y de la UAQ, en especial a los miembros del Departamento de Posgrado, de la biblioteca y del bioterio, por su disposición que permitió que este trabajo se realizara. Gracias Pilar Galarza, Leonor Casanova, Carmen, Isabel, Yola, Elsa, Rafa, Ester, Javier, Chayito y Vero Andrade.**

**A mis compañeros de generación por ser como son y por ser la mejor generación de la maestría (2001-2003).**

**A los profesores y personal de la Facultad de Química y del CEACA por permitirme integrarme y convivir con ustedes, por sus consejos y sobre todo por su amistad. Gracias Mtro. Gustavo, Mtro. Raúl, Mtra. Carmelita Venegas, Norma, Mtro. Miguel Rico, Dr. Miguel Rea, Chela, Lety, Dra. Maricela, Mtra. Angélica, Mtra. Marú, Marigel, Dra. Chacha, Laurita, Sandy, Carmelita Molinero, Mtro. Salvador Lecona, Dra. Guadalupe García, Mtro. Sergio Pacheco, etc, etc. No es que olvide a alguien pero sería una lista muy grande para todos los que estuvieron conmigo y me echaron porras. ¡Gracias!**



## RESUMEN

Los extractos totales de las glándulas y los conductos venenosos obtenidos de *Comus austini*, *C. spurius* y *Polystira albida* (evaluados en un rango de 0.001 a 100 mg de proteína/ml) producen una inhibición dependiente de la concentración en las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. El extracto más potente fue el que se obtuvo de los conductos venenosos de *P. albida* ( $IC_{50} = 0.23 \pm 0.1$  mg de proteína/ml), el cual fue aproximadamente 86 veces menos potente que la tetrodotoxina ( $IC_{50} = 0.0027 \pm 0.001$  mg/ml). Estos resultados no proporcionaron información sobre el mecanismo de acción de los extractos, debido a que estos podrían actuar en diferentes sitios y niveles en el sistema nervioso entérico y/o la musculatura lisa intestinal. Por lo tanto, se decidió investigar la acción de los extractos sobre las contracciones inducidas por acetilcolina (ACh), nicotina, histamina y KCl en el íleon aislado de cobayo.

Los resultados derivados de estos experimentos mostraron que todos los extractos produjeron una inhibición de las contracciones inducidas por ACh, sugiriendo la presencia de compuestos anticolinérgicos en las glándulas y conductos venenosos obtenidos de las tres especies objeto de estudio. Esta hipótesis se confirmó cuando se encontró que la respuesta contráctil producida por la nicotina era reducida significativamente por los extractos preparados de los conductos y las glándulas de *C. austini* y *P. albida*. Por otra parte, aunque ambos extractos obtenidos de *C. spurius* también inhibieron las contracciones inducidas por ACh, estos no afectaron la respuesta a la nicotina. Esta carencia de antagonismo de la respuesta a la nicotina apoyó la hipótesis que las glándulas y los conductos de este caracol podrían contener compuestos antimuscarínicos.

Todos los extractos también inhibieron las contracciones evocadas por histamina. Estos hallazgos sugirieron la presencia de compuestos antihistamínicos en los conductos y glándulas de las tres especies. Los efectos inhibitorios más significativos fueron los mostrados por los extractos obtenidos de los conductos y las glándulas de *P. albida* y el extracto preparado de los conductos de *C. spurius*. Estos hallazgos representan el primer informe de actividad antihistamínica para un extracto obtenido de un caracol marino.

Finalmente, se evaluó el efecto de los extractos sobre las contracciones inducidas por KCl. En estos experimentos únicamente los extractos preparados a partir de las glándulas de *C. spurius* y *P. albida* inhibieron las contracciones inducidas por el KCl. Estos resultados apoyaron la hipótesis que las glándulas de ambas especies podrían producir compuestos que bloquean los canales de Na<sup>+</sup> y/o Ca<sup>2+</sup> voltaje dependientes localizados en las neuronas presinápticas entéricas o en las células del músculo liso intestinal.

## SUMMARY

The protein-containing extract prepared from the venomous ducts and glands obtained from *Comus austini*, *C. spurius* and *Polystira albida* (tested from 0.001 to 100 µg protein/ml) caused a concentration-dependent inhibition of spontaneous contractions of the guinea pig ileum. The most potent extract was that obtained from the venomous ducts of *P. albida* ( $EC_{50} = 0.23 \pm 0.1$  µg protein/ml), which was approximately 86-fold less potent than tetrodotoxin ( $EC_{50} = 0.0027 \pm 0.001$  µg/ml). These results did not provide any information on the mechanism of action of the extracts, since they could be acting on many different sites and levels in the enteric system. Therefore, we decided to investigate the antispasmodic action of the extracts by studying their influence on the contractions of the guinea pig ileum induced by ACh, nicotine, histamine and KCl.

The results derived from these experiments showed that all the extracts produced an inhibition of the contractions elicited by ACh, suggesting the presence of anticholinergic compounds in the venomous ducts and glands obtained from the three species under investigation. This hypothesis was further confirmed when it was found that the contractile response produced by nicotine was significantly reduced by the extracts prepared from the ducts and glands of *C. austini* and *P. albida*. On the other hand, although both extracts obtained from *C. spurius* also inhibited ACh-induced contractions, they did not affect the response to nicotine. This lack of antagonism of the response to nicotine support the hypothesis that the glands and ducts of this snail might contain antimuscarinic compounds.

All the extracts also inhibited the contractions evoked by histamine. These findings suggest the presence of antihistaminic compounds in the ducts and glands of the three species. The most remarkable inhibitory effects were those displayed by the extracts obtained from the ducts and glands of *P. albida* and the extract prepared from the ducts of *C. spurius*. In any case our findings represent the first report of antihistaminic activity for an extract or a pure compound obtained from a marine snail.

Finally, we examined the effect of the extracts of the contractions elicited by KCl. We found that only the extracts prepared from the glands of *C. spurius* and *P. albida* inhibited the KCl-induced contractions. These results support the hypothesis that the glands of both species might produce compounds that block voltage gated Na<sup>+</sup> and or Ca<sup>2+</sup> channels located in presynaptic enteric neurons or in the smooth muscle cells.

# ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	ii
SUMMARY	iv
ÍNDICE	vi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
1. Fundamentación teórica del modelo farmacológico	6
A. Modelo del íleon aislado de cobayo	6
B. Anatomía del íleon de cobayo	8
C. Innervación intrínseca y extrínseca en el íleon	13
D. Arreglo de los plexos nerviosos entéricos	13
E. Neurotransmisores en el Sistema Nervioso Entérico	14
F. Regulación de la contracción del músculo liso	15
G. Contracción espontánea del músculo liso intestinal	19
H. Acción de los fármacos en la motilidad del íleon	20
I. El modelo de íleon aislado de cobayo y su aplicación en la evaluación farmacológica de toxinas producidas por gasterópodos marinos	21
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	24

OBJETIVOS	25
SUJETOS, MATERIALES Y METODOS	26
1. Recolección y transporte de los caracoles	26
2. Aislamiento de las glándulas y los conductos venenosos	26
3. Preparación de los extractos	27
4. Evaluación farmacológica	27
A. Ensayo de íleon aislado de cobayo	27
B. Análisis de los datos farmacológicos	28
C. Caracterización farmacológica preliminar del mecanismo de acción de los extractos	28
RESULTADOS	30
1. Recolecta de especímenes y determinación de su contenido de proteína	30
2. Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de las especies de prueba sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo	32
2.1. Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de los especímenes de <i>C. austini</i> sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo	32
2.2. Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de los especímenes de <i>C. spurius</i> sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo	37
2.3. Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de los especímenes de <i>P. albida</i> sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo	41
3. Efecto relajante de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. austini</i> , <i>C. spurius</i> y <i>P. albida</i> , sometidos a condiciones desnaturalizantes	47
4. Caracterización farmacológica preliminar del mecanismo de acción de los extractos de glándulas y conductos venenosos de las especies de prueba	50

4.1. Determinación preliminar del mecanismo de acción de los extractos de glándulas y conductos venenosos de las especies de <i>C. austini</i>	50
4.2. Determinación preliminar del mecanismo de acción de los extractos de glándulas y conductos venenosos de las especies de <i>C. spurius</i>	56
4.3. Determinación preliminar del mecanismo de acción de los extractos de glándulas y conductos venenosos de las especies de <i>P. albida</i>	61
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	74
REFERENCIAS	76
ÍNDICE DE FIGURAS	92
ÍNDICE DE CUADROS	95

## INTRODUCCIÓN

Durante las últimas dos décadas se ha incrementado notablemente la investigación de compuestos naturales con actividad biológica, y aunque tradicionalmente la búsqueda de sustancias bioactivas se había concentrado en el estudio de plantas, la obtención de sustancias orgánicas con actividad biológica aisladas de organismos marinos, ha mostrado el gran potencial que presentan estos compuestos en el campo de la farmacología. Recientemente, el descubrimiento de compuestos bioactivos derivados de invertebrados marinos venenosos ha estimulado la exploración de un nuevo campo de investigación cuyo enfoque se centra en la búsqueda de fármacos provenientes del mar.

Entre los invertebrados marinos productores de compuestos con actividad biológica destacan los gasterópodos de la superfamilia Conacea, integrada por caracoles marinos de las familias Conidae, Turridae y Terebridae, cuyos miembros, todos carnívoros venenosos, se caracterizan por poseer un sofisticado sistema de inyección de veneno a la presa. Este veneno es de acción rápida, potente y específica. En los últimos veinte años, se han estudiado las toxinas de naturaleza peptídica de varias especies del género *Conus*, género único de la familia Conidae. Sin embargo, no existen reportes relacionados con la actividad farmacológica y muchos menos, con la caracterización de las toxinas producidas por especies de las familias Turridae y Terebridae. Asimismo, no se ha realizado ningún estudio químico sobre los posibles metabolitos secundarios de las especies de la superfamilia Conacea, de tal forma que se desconoce el tipo de metabolitos secundarios que sintetizan y la actividad biológica que puedan tener.

Las aguas territoriales mexicanas albergan una amplia variedad de especies marinas. Desafortunadamente, en México se han realizado muy pocos estudios sistemáticos tendientes a determinar el potencial farmacológico de organismos marinos. Asimismo, son muy escasas las investigaciones químicas realizadas con el objeto de aislar y caracterizar sus principios activos. De manera particular, los mares de los litorales mexicanos albergan un gran número de especies de gasterópodos, muchos de los cuales ni siquiera han sido identificados científicamente. Desde esta perspectiva, surgió la idea de desarrollar el



presente proyecto de tesis que tiene por objeto evaluar la actividad biológica de extractos preparados a partir de caracoles marinos pertenecientes a la superfamilia Conacea, recolectados en aguas territoriales de México. Los resultados obtenidos de este estudio, servirán como base para seleccionar caracoles cuyos compuestos serán objeto de estudios bioquímicos y químicos con la finalidad de obtener péptidos y metabolitos secundarios farmacológicamente activos.

## ANTECEDENTES

Algunos animales venenosos utilizan sustancias tóxicas para capturar a sus presas. Los escorpiones, serpientes, arañas y algunos invertebrados marinos producen venenos que actúan rápidamente al ser aplicados a sus víctimas. Las toxinas de estos animales venenosos actúan rápidamente debido a que contienen compuestos cuyos blancos de acción son canales iónicos y receptores del sistema nervioso y/o muscular, los cuales son responsables de la regulación de un gran número de procesos fisiológicos en todo organismo. La potencia de muchas de estas toxinas se relaciona con su alta especificidad para interferir con los procesos celulares, por lo que muchas de ellas han sido utilizadas como herramientas experimentales para probar rutas y mecanismos bioquímicos de células excitables (Adams y Olivera, 1994) y como prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos (Miljanich, 1997).

Entre los animales venenosos productores de neurotoxinas naturales destacan los gasterópodos marinos de la superfamilia Conacea, la cual incluye las familias Conidae, Turridae y Terebridae (ver Figura 1) (Abott y Dance, 1990). La superfamilia Conacea está integrada por caracoles marinos carnívoros venenosos, que poseen órganos especializados para la aplicación del veneno a sus presas (Kohn *et al.*, 1972).

### SUPER FAMILIA CONACEA

---

*Turridae*



*Terebridae*



*Conidae*



**Figura 1.** Familias que conforman la Super Familia *Conacea*.

Hasta la fecha, la gran mayoría de las investigaciones realizadas con caracoles venenosos se restringe al estudio de especies piscívoras y molusquícivas del género *Comus* (familia Conidae). Este género contiene alrededor de 500 especies que se encuentran ampliamente distribuidas en aguas tropicales. Los caracoles pertenecientes al género *Comus* constituyen unas de las especies más dominantes de depredadores en los arrecifes coralinos (Olivera *et al.*, 1985). De hecho, las especies piscívoras del género representan los únicos caracoles conocidos que se alimentan de vertebrados (Kohn, 1956).

Los caracoles del género *Comus* se alimentan de noche y sus presas incluyen gusanos marinos, cefalópodos, otros gasterópodos, bivalvos, peces y crustáceos. Para alimentarse, envenenan a sus presas mediante la inyección de toxinas, a través de un diente hueco y desechable ubicado al final de la probóscis (Kohn *et al.*, 1972). Las toxinas actúan rápidamente y son muy específicas. La especificidad de las toxinas depende del tipo de organismo con el que se alimenta cada especie de tal forma que las especies piscívoras como *Comus purpurascens* producen venenos que paralizan a los peces de inmediato (Terlau *et al.*, 1996). En contraste, las toxinas de las especies molusquícivas, como el *C. textile*, inducen movimientos peristálticos en sus presas, lo que impide que el molusco pueda retraerse en su concha al ser atacado (McIntosh *et al.*, 1995).

Los venenos de las especies del género *Comus* contienen una gran variedad de péptidos solubles y neuroactivos conocidos como conotoxinas (Olivera *et al.*, 1990; Olivera *et al.*, 1991). De los venenos también se han aislado análogos a neuropéptidos, tales como la Lys-conopresina-G de *C. imperialis*, que interacciona con receptores de vasopresina-oxitocina (Nielsen *et al.*, 1994) y la contulakina-G, que es un análogo de neurotensina (Craig *et al.*, 1999a). Se especula que en algunos casos, la presencia de estos homólogos de neuropéptidos endógenos en el veneno de las especies de *Comus* facilita el proceso de envenenamiento (Olivera *et al.*, 1985). Recientemente, el grupo del Dr. Edgar Heimer del Instituto de Neurobiología de la UNAM., aisló a partir de *C. spurius* un nuevo tipo de neurotoxinas peptídicas, las conorfamidas, que son análogas de los FMRF amino péptidos (Maillo *et al.*, 2002), cuyos receptores están implicados en la mecanosensación, la

propiocepción, la percepción del dolor, la gametogénesis y el transporte de sodio epitelial (García-Añoveros *et al.*, 1997; Coscoy *et al.*, 1998; Marco *et al.*, 1995).

Las conotoxinas constituyen los principales compuestos neurotóxicos presentes en los venenos de los caracoles del género *Conus*. Estas toxinas son polipéptidos pequeños que contienen una alta proporción de cisteínas en su estructura, lo cual les confiere una conformación molecular rígida y estable (Gehrmann *et al.*, 1998). Las conotoxinas han sido clasificadas, con base en su estructura química y en su actividad farmacológica, en diferentes familias (Craig *et al.*, 1999b; Olivera y Cruz, 2000) que incluyen: a)  $\alpha$ -conotoxinas, que inhiben el receptor nicotínico, b)  $\omega$ -conotoxinas, que bloquean canales de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) neuronales presinápticos regulados por voltaje, evitando la liberación de neurotransmisores, c)  $\mu$ -conotoxinas, que bloquean canales de sodio en células musculares (Olivera, 1997), d)  $\delta$ -conotoxinas, las cuales bloquean canales de sodio, al igual que las  $\mu$ -conotoxinas, pero lo hacen en un sitio diferente del canal (Shon *et al.*, 1995), e)  $\kappa$ -conotoxinas, que inhiben los canales de potasio del tipo "Shaker" (Terlau *et al.*, 1996), f) conantokinas, que bloquean los receptores glutamatérgicos NMDA (Haack *et al.*, 1990), g)  $\sigma$ -conotoxinas, que inhiben el receptor serotoninérgico  $5\text{HT}_3$  (England *et al.*, 1998), h)  $\epsilon$ -conotoxinas, que posiblemente inhiben canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presinápticos activados por voltaje e interaccionan con receptores presinápticos acoplados a proteínas G (Rigby *et al.*, 1999), i)  $\alpha\text{A}$ -conotoxinas (Hopkins *et al.*, 1995) y  $\phi$ -conotoxinas (Shon *et al.*, 1997), bloqueadoras de los receptores nicotínicos de acetilcolina, j)  $\mu\text{O}$ -conotoxinas, que bloquean canales de sodio activados por voltaje (McIntosh *et al.*, 1995), k)  $\gamma$ -conotoxinas, agonistas de canales catiónicos de tipo marcapaso en neuronas (Fainzilber *et al.*, 1998) y l)  $\lambda$ -conotoxinas, cuyo sitio de acción es aún desconocido (Balaji *et al.*, 2000).

Las características estructurales de las conotoxinas (tamaño pequeño y rigidez) les confieren una alta afinidad y especificidad de unión a canales iónicos o receptores membranales, razón por la cual estos péptidos han resultado ser sumamente útiles como herramientas farmacológicas para el estudio de receptores y canales iónicos (Myers *et al.*, 1993). Asimismo, las conotoxinas constituyen prototipos estructurales muy promisorios

para el diseño de fármacos con efecto sobre los sistemas nervioso y muscular (Adams y Olivera, 1994; Miljanich, 1997; Olivera, 1997). A este respecto, es importante mencionar los casos de la  $\omega$ -conotoxina GVIA, aislada a partir de *C. geographus* y de la  $\omega$ -conotoxina MVIIA, obtenida del veneno de *C. magus*. La conotoxina GVIA se ha convertido en una herramienta usual para medir la inhibición de la liberación de neurotransmisores inducida por la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes. Este péptido bloquea los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipos L y N en las neuronas, pero solamente afecta los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N en las células musculares (Olivera *et al.*, 1985). Por otra parte, la  $\omega$ -MVIIA (conocida también como SNX-111 o Ziconotide) bloquea exclusivamente canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N y es de 100 a 1000 veces más potente que la morfina, la cual constituye el analgésico más potente usado en la actualidad. El ziconotide, a diferencia de la morfina, no causa adicción (Olivera *et al.*, 1985) y actualmente está siendo revisado por la FDA de E.E.U.U. en pruebas clínicas para el alivio del dolor intratable (Gibbs, 1996).

## **I.- FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DEL MODELO FARMACOLÓGICO QUE SE UTILIZÓ PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO**

El rastreo farmacológico de los extractos proteicos y orgánicos obtenidos a partir de los caracoles objeto de estudio, se realizó mediante la determinación de su efecto sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. Este modelo se empleó también en las evaluaciones preliminares del mecanismo de acción de los extractos.

### **A.- MODELO DEL ÍLEON AISLADO DE COBAYO**

Debido a la compleja innervación neuronal del tracto gastrointestinal el íleon aislado de cobayo es un modelo farmacológico que permite la detección de especies bioactivas que contienen compuestos con efecto sobre el sistema nervioso y/o la musculatura lisa (Williamson *et al.*, 1996).

El ensayo de íleon aislado de cobayo es ideal para biodirigir el aislamiento de compuesto activos y permite analizar pequeñas cantidades de sustancias de prueba, en un tiempo relativamente corto. Sin embargo, mediante el empleo de este ensayo resulta muy

difícil obtener información completa acerca del mecanismo por medio del cual un extracto o un compuesto puro induce una respuesta en el íleon, lo cual representa una desventaja. Esta limitación se hace más evidente cuando se pretende analizar un extracto crudo, el cual puede contener una mezcla de compuestos diferentes, en el que cada uno puede estar actuando en diferentes niveles. Sin embargo, mediante este ensayo es posible realizar experimentos que pueden sugerir o proporcionar alguna información con relación al mecanismo de acción de extractos o principios activos, mediante el empleo de diversos agonistas y/o antagonistas específicos (Samuelsson, 1991; Rojas *et al.*, 2002).

Además, es un hecho bien establecido que el tracto gastrointestinal está inervado por lo que se considera la tercera división del sistema nervioso autónomo (SNA), conocida como sistema nervioso entérico (SNE). Conjuntamente con el SNE, los otros sistemas en los que se divide el SNA (simpático y parasimpático), son los responsables del control de las secreciones y de la motilidad del tracto gastrointestinal (Gershon *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 2000; Holzer *et al.*, 2001).

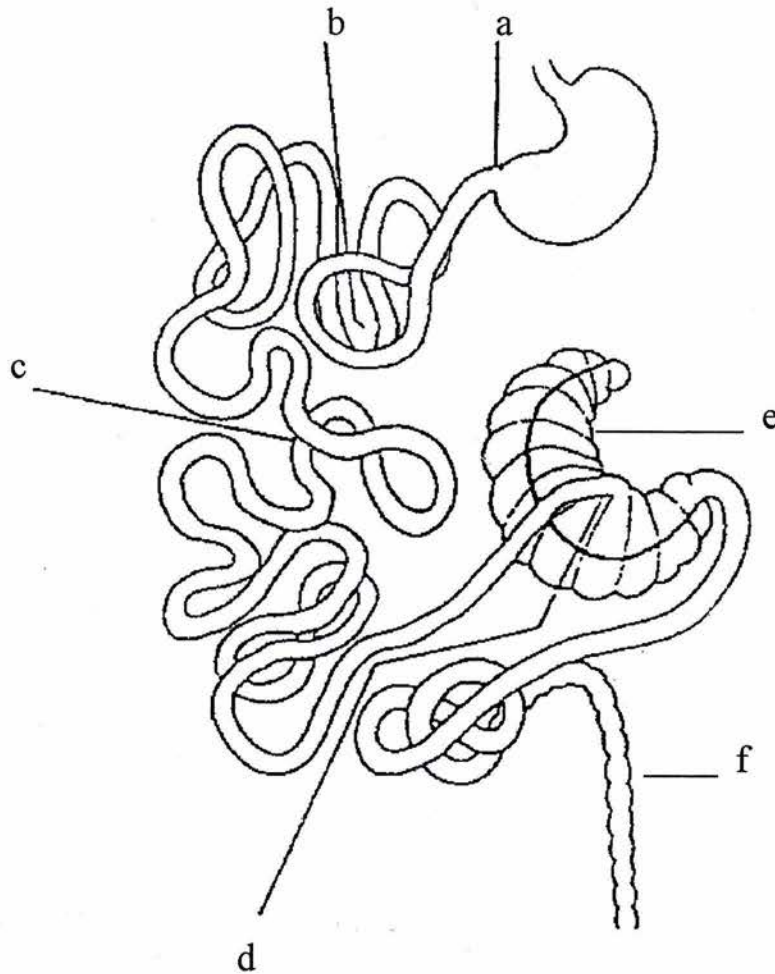
Se ha encontrado la presencia y acción en el SNE de numerosos neurotransmisores (Costa *et al.*, 1996; Furness, 2000; Galligan *et al.*, 2000). El hecho de que exista una gran variedad de sustancias neurotransmisoras en el SNE, permite compararlo farmacológicamente con el sistema nervioso central (SNC). Así, la musculatura lisa gastrointestinal inervada por el SNE constituye un tejido adecuado para la caracterización de compuestos con potencial actividad farmacológica a nivel del SNC.

Este modelo presenta ventajas adicionales como la relativa facilidad del bioensayo y el requerimiento de pequeñas cantidades de sustancia para inducir un efecto en el íleon. Por las razones antes mencionadas el modelo de íleon aislado de cobayo resulta muy apropiado, tanto en la evaluación farmacológica preliminar de los extractos crudos preparados a partir de diferentes organismos, como en el monitoreo de la actividad biológica durante el proceso de aislamiento de los principios activos (Samuelsson, 1990; Williamson *et al.*, 1996).

## B.- ANATOMÍA DEL ÍLEON DE COBAYO

El intestino del cobayo se extiende desde el píloro del estómago hasta el ciego del intestino grueso. Comenzando desde el píloro, el intestino delgado se divide en tres partes: el duodeno, el yeyuno y el íleon (Weisbrodt, 1987; Guyton y Hall, 1997). La longitud total del intestino delgado es de alrededor de 125 cm y su diámetro mide entre 4 y 6 mm (Samuelsson, 1991). Los bordes entre las distintas partes no se distinguen a simple vista, pero la unión entre el íleon y el ciego es fácil de observar; de este modo, el íleon puede ser identificado (ver Figura 2). El íleon constituye alrededor del 55% del intestino delgado (Weisbrodt, 1987; Costa *et al.*, 1996).

Un corte transversal del íleon de cobayo muestra varios estratos. El estrato seroso más externo está compuesto de mesotelio y tejido conectivo. Dicho estrato está conectado con el mesenterio. Bajo la capa serosa hay dos estratos de músculo liso. En el primer estrato, las células musculares están orientadas longitudinalmente, mientras que la orientación en el segundo estrato es circular. Bajo las capas musculares se extienden la submucosa y la mucosa; esta última se proyecta al interior del lumen del intestino por pequeñas proyecciones llamadas villi. En el íleon de muchos otros mamíferos, se encuentra un tercer estrato muscular, la mucosa muscular, la cual está situada entre la submucosa y la mucosa. Este estrato muscular no se encuentra en el íleon de cobayo (Gabella, 1987; Costa *et al.*, 1996; Guyton y Hall, 1997).



**Figura 2.** Esquema del tracto gastrointestinal del cobayo. Estómago (a), duodeno (b), yeyuno (c), íleon (d), ciego (e) y colon (f).

Las fibras musculares del tracto gastrointestinal están habitualmente asociadas en capas (o haces); cada una consta de hasta 1000 fibras musculares paralelas. En la capa muscular longitudinal, los haces se extienden en sentido longitudinal por el aparato digestivo, mientras que en la capa muscular circular se encuentran rodeándolo. Las membranas celulares de las fibras musculares se adhieren unas a otras en muchos puntos, de tal forma que la fuerza generada en una fibra muscular puede transmitirse a la siguiente. Además, la presencia de uniones intercelulares tipo “gap” permiten el flujo libre de iones de una célula a otra, de forma que los potenciales de acción o los iones simples pueden viajar de una fibra muscular a la siguiente y hacer que las fibras se contraigan de manera



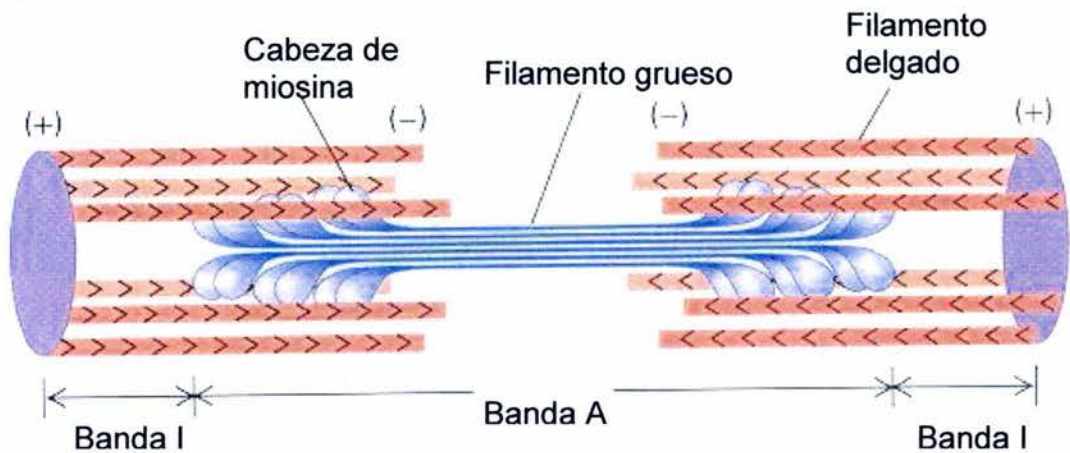
simultánea. Existen también interconexiones entre las capas musculares longitudinales y circular, por lo que la excitación de una de ellas suele estimular también a la otra (Guyton y Hall, 1997).

Las células del músculo liso tienen un solo núcleo, son fusiformes y tienen una longitud de 500 a 700  $\mu\text{m}$  cuando están en reposo. En las contracciones isotónicas, los miocitos pueden acortarse a menos de  $\frac{1}{4}$  de su longitud original. Las fibras musculares contienen múltiples filamentos de actina y miosina conocidos también como filamentos delgados y gruesos, respectivamente. La interacción entre ambos filamentos genera la fuerza necesaria para desencadenar el mecanismo de contracción muscular (ver Figura 3) (Huxley, 1969).

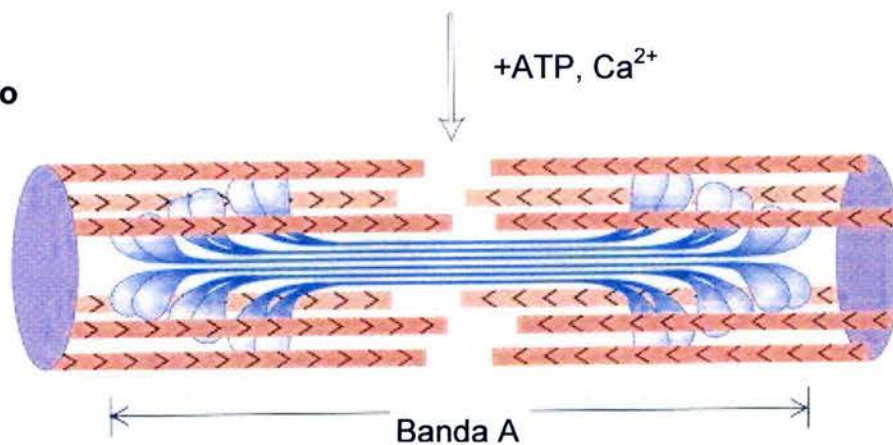
El retículo sarcoplasmático de la célula del músculo liso está involucrado en los procesos de síntesis de muchos lípidos y proteínas de membrana, pero su función más importante es el almacenamiento y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Haynes y Mandueno, 1987; Gabella, 2001). Adicionalmente, existen otros lugares de almacenamiento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso; sin embargo, su función no se conoce con claridad como en el caso de las fibras esqueléticas (Gabella, 1987; Costa *et al.*, 1996). Cuando el músculo liso es estimulado, el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el retículo sarcoplásmico es liberado por diferentes mecanismos, sin embargo la principal fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  es extracelular (Gabella, 1987).

En el músculo liso, los filamentos de actina están agrupados en haces laxos adosados a cuerpos densos en el citosol, los cuerpos densos son mantenidos en su posición por un armazón de proteínas estructurales que los mantienen unidos entre sí. El otro extremo de los filamentos de actina se conecta a placas de fijación, similares a los cuerpos densos, pero localizados en la membrana celular de la fibra muscular (Gabella, 2001). Cada filamento de actina está compuesto por una doble hebra de actina-F, la cual es un polímero filamentoso constituido por múltiples monómeros de actina-G ordenados linealmente. Las hebras de actina-F están enrolladas en espiral con la tropomiosina, una proteína que se encuentra conectada de forma laxa con las hebras de actina-F (Beckeile, 1998).

### Relajado



### Contraído

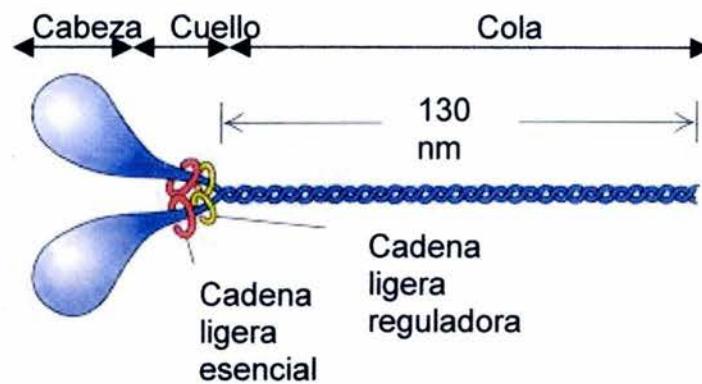


**Figura 3.** Interacción entre los filamentos de actina y miosina en el mecanismo de contracción muscular.

Entre los numerosos filamentos de actina, se intercalan algunos filamentos de miosina. Cada filamento de miosina está compuesto por 200 o más moléculas individuales de miosina II, cada una con un peso molecular de aproximadamente 480 kDa. Una molécula de miosina II está compuesta por seis cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas con un peso molecular de aproximadamente 200 kDa cada una y cuatro cadenas ligeras con pesos moleculares de aproximadamente 20 kDa cada una. Las cadenas pesadas están organizadas en tres dominios diferentes: el dominio de la cabeza, el dominio del cuello y el

dominio de la cola. El dominio globular de la cabeza contiene un sitio de fijación de actina y un sitio de fijación de ATP con actividad de ATPasa (Wendt *et al.*, 2001).

Adyacente al dominio de la cabeza se encuentra la región del cuello  $\alpha$ -helicoidal, que se asocia con las cadenas ligeras. El dominio de la cola es una porción elongada de la hélice que se enrolla con la cola de la otra cadena pesada para formar una doble hélice. Cada cadena pesada de miosina II contiene dos cadenas ligeras diferentes, denominadas cadenas ligeras esencial y reguladora, ambas son proteínas fijadoras de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las colas de todas las moléculas de miosina II están agrupadas para formar el cuerpo del filamento de miosina, mientras que muchas cabezas de las moléculas cuelgan hacia el exterior a los dos lados del cuerpo (Figura 4) (Rayment, 1996; Wendt *et al.*, 2001).



**Figura 4.** Composición de la Miosina II

## C.- INERVACIÓN INTRÍNSECA Y EXTRÍNSECA EN EL ÍLEON

La pared gastrointestinal contiene fibras nerviosas de origen extrínseco provenientes del SNC que llegan hasta el intestino vía el nervio vago, los nervios mesentéricos y los nervios pélvicos. Sin embargo, el intestino también contiene un sistema nervioso intrínseco que puede funcionar independientemente de los impulsos de origen extrínseco (Gershon *et al.*, 1994; Furness *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2000; Brookes, 2001). Esto fue reconocido por Langley en 1921, quien clasificó el SNE como una división específica del SNA junto con los sistemas Simpático y Parasimpático (Langley, 1921). Existen varias razones para considerar el SNE de manera independiente, entre las cuales podemos mencionar:

1.- el SNE es relativamente independiente del control del SNC. Si se interrumpe la inervación extrínseca del SNA, simpático y parasimpático, no se observan modificaciones significativas en las funciones digestivas,

2.- el número de neuronas en el SNE iguala al número total de neuronas en la médula espinal, por lo tanto este sistema es muy extenso y

3.- hay quizá 10 o más tipos diferentes de nervios en el SNE.

## D.- ARREGLO DE LOS PLEXOS NERVIOSOS ENTÉRICOS

Los nervios y ganglios del SNE están dispuestos en distintos plexos, distribuidos por todo el tubo digestivo que se extienden desde el músculo liso del estómago hasta el esfínter anal interno. Los dos plexos dominantes son el plexo mientérico (plexo de Auerbach), situado entre los estratos musculares longitudinal y circular y el plexo submucoso (Plexo de Meissner) que se encuentra en el tejido conectivo de la submucosa. La mayoría de los somas de las neuronas del SNE están en los ganglios del plexo mientérico. En el intestino del cobayo los ganglios del plexo mientérico contienen un promedio de 43 neuronas (rango 10-100). Los ganglios de los plexos submucosos son pequeños, contienen un promedio de 8 células por ganglio. El número total de neuronas es más pequeño en este plexo (Gershon *et al.*, 1994).

Paquetes de fibras nerviosas conectan los ganglios en los plexos y forman una red continua. Adicionalmente, los axones de las neuronas provenientes del simpático y del parasimpático, así como los axones y dendritas de neuronas sensoriales, penetran en los plexos y se conectan con las neuronas intrínsecas del SNE. La mayoría de los axones son, de cualquier modo, de origen intrínseco (Gabella, 1987).

#### E.- NEUROTRANSMISORES EN EL SNE

El SNE contiene diversas terminales nerviosas, con diferentes neurotransmisores y varios tipos de receptores, lo cual le proporciona una gran versatilidad a la preparación de íleon aislado de cobayo (Cuadro 1). Antes de 1965 se pensaba que la ACh y la noradrenalina (NA) eran los únicos neurotransmisores presentes en el sistema nervioso periférico (SNP), pero a partir de entonces, se han encontrado evidencias que indican la presencia en el SNE de otras sustancias neurotransmisoras que incluyen: la serotonina (5-HT), el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), el glutamato, el trifosfato de adenosina (ATP), el óxido nítrico (NO), péptidos endógenos (encefalinas, dinorfinas y endorfinas), la sustancia P y el polipéptido vasoactivo intestinal (Costa *et al.*, 1996; Furness, 2000, Galligan *et al.*, 2000). También se han encontrado somatostatina, bombesina y fragmentos terminales de colecistokinina, pero su papel como neurotransmisores no se ha establecido. De manera adicional, existen pruebas que indican la existencia en el SNE de una barrera plexohemotomioentérica a moléculas pequeñas, similar a la barrera hematoencefálica (Gershon *et al.*, 1994).

**Cuadro 1.** Principales neurotransmisores del SNE y sus receptores.

NEUROTRANSMISOR	RECEPTOR	REFERENCIA
Noradrenalina	$\alpha 1$ , $\alpha 2$ , y $\beta 2$	Furness, 2000; Galligan <i>et al.</i> , 2000
Acetilcolina	Nicotínico N <sub>M</sub> Muscarínico M2 y M3	Caufield, 1993; Sargent, 1993; Bertrand y Changeaux, 1995; Brown y Taylor, 1996;

Continuación del **Cuadro 1**. Principales neurotransmisores del SNE y sus receptores.

NEUROTRANSMISOR	RECEPTOR	REFERENCIA
<b>Histamina</b>	H1	Bade y Serafin, 1996
<b>Ácido <math>\gamma</math>-aminobutírico (GABA)</b>	GABA <sub>B</sub>	Gershon <i>et al.</i> , 1994; Costa <i>et al.</i> , 2000
<b>Polipéptido vasoactivo intestinal (VIP)</b>	VIP1 y VIP 2	Brookes, 2001
<b>Neuropéptido Y</b>	Y2	Furness, 1996; Costa <i>et al.</i> , 2000; Furness, 2000
<b>Somatostatina</b>	SST1 y SST2	Brookes, 2001
<b>Serotonina (5HT)</b>	5HT3 y 5HT4	Costa <i>et al.</i> , 2000
<b>Dopamina</b>	D1 y D2	Costa <i>et al.</i> , 2000; Brookes, 2001
<b>Glutamato</b>	NMDA	Hille, 1992; Nakanishi, 1992

## F.- REGULACIÓN DE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO

La unión de ligandos a sus respectivos receptores de superficie celular puede causar un incremento (o disminución) en las concentraciones de moléculas intracelulares de señalización denominadas segundos mensajeros. Estas moléculas de señalización de bajo peso molecular incluyen 3',5'-adenosina-monofosfato cíclico (AMPC), 3',5'-guanosina-monofosfato cíclico (GMPc), 1,2-diacilglicerol (DAG), 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>), distintos fosfolípidos de inositol y Ca<sup>2+</sup>. Los segundos mensajeros juegan un papel importante en la regulación de la contracción muscular (Kamm y Stull, 1989).

El Ca<sup>2+</sup> libre, bajo condiciones normales, se encuentra a una concentración intracelular relativamente baja (< 0.1  $\mu$ M), pero un aumento de la concentración de este ión en las fibras musculares desencadena la contracción muscular, al unirse el Ca<sup>2+</sup> a diversas proteínas que regulan la actividad de la actina y la miosina II (Ebashi *et al.*, 1967; Himpens

y Somlyo, 1988; Osaki *et al.*, 1988). Las fibras del músculo esquelético almacenan grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico y el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en él se libera para dar inicio a la contracción del músculo esquelético (Haynes y Mandveno, 1987). Sin embargo, el retículo sarcoplásmico está poco desarrollado en las fibras del músculo liso por lo que gran parte del incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se debe al ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  situados en la membrana celular (Ehrlich y Watrasm 1988).

El  $\text{Ca}^{2+}$  puede regular la contracción del músculo liso a través de proteínas como la calmodulina y sus proteínas efectoras, que son de gran importancia. El  $\text{Ca}^{2+}$ , mediante su interacción con la calmodulina, modula la función de proteínas efectoras que a su vez regulan la actividad de la actina y de la miosina. Con relación a la regulación de la actina, se sabe que el músculo liso contiene tropomiosina, pero carece de troponina. Sin embargo, en la célula del músculo liso, existe un sistema equivalente al complejo tropomiosina-troponina, en el cual interviene la proteína caldesmona (Szpacenko *et al.*, 1985). Cuando disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la caldesmona se une a la tropomiosina y el complejo caldesmona -tropomiosina se fija a los filamentos delgados de actina, impidiendo que esta se una a la miosina II, lo cual inhibe la contracción. Cuando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumentan, el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina se fija a la caldesmona, provocando que ésta se libere de la tropomiosina y en consecuencia, la actina puede interactuar con la miosina II y se produce la contracción del músculo (Smith *et al.*, 1987). Otra vía que impide la fijación de la caldesmona a la actina involucra la fosforilación de la caldesmona. Esta proteína fosforilada no se fija bien a los filamentos de actina y por lo tanto, es incapaz de inhibir la unión de actina y miosina. La fosforilación de la caldesmona se lleva a cabo por diferentes cinasas, entre las cuales se encuentra una proteína cinasa activada por mitógenos (Huang *et al.*, 2003).

Por otra parte, la contracción del músculo liso también está regulada por una vía compleja en la que participan las cadenas ligeras reguladoras de la miosina (RMLC). Cuando las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  son bajas, uno de los dos pares de cadenas ligeras de la miosina inhibe las interacciones entre las cabezas de miosina y los filamentos de actina. Cuando las RMLC se fosforilan por la enzima miosina LC cinasa, esta inhibición se

elimina y el músculo liso se contrae. Esta cinasa es activada por  $\text{Ca}^{2+}$  de manera indirecta. Cuando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumentan, este ión se une a la calmodulina (una proteína fijadora de  $\text{Ca}^{2+}$ ). El complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina se fija a la miosina LC cinasa y la activa. La unión de las cabezas de miosina a los filamentos de actina permite la activación de la ATPasa de la cabeza de miosina. La hidrólisis del ATP proporciona la energía necesaria para que se produzca la contracción del músculo liso (Kamm y Stull, 1985; Somlyo y Somlyo, 1994; Gallagher *et al.*, 1997; Highsmith, 1999; Kamm y Stull, 2001; Heller *et al.*, 2003).

Otra vía involucrada en el fenómeno de la contracción muscular incluye la participación de los fosfolípidos de inositol, el  $\text{IP}_3$  y el DAG. Los dos últimos compuestos derivan del fosfatidilinositol (PI) localizado en la membrana. El PI se fosforila en distintas posiciones por acción de diversas cinasas. La fosforilación del inositol del PI, produce fosfatidilinositol trifosfato ( $\text{PIP}_3$ ) el cual permanece anclado a la membrana plasmática. Este puede escindirse por acción de la fosfolipasa C (PLC), enzima asociada a membrana plasmática, la cual puede ser activada mediante la estimulación de receptores membranales acoplados a proteínas G. La ruptura del  $\text{PIP}_3$  genera el DAG, que permanece en la membrana, e  $\text{IP}_3$  capaz de difundir en el citosol (Berridge *et al.*, 1989). El  $\text{IP}_3$  se fija a un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  situado en la membrana del retículo sarcoplásmico. Esta unión induce la apertura del canal y permite la salida del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo hacia el citosol. El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induce la translocación de la proteína cinasa C (PKC) hacia la membrana plasmática. Por otra parte, el DAG puede activar a la PKC traslocada a la membrana debido a la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ehrlich y Watras, 1988; Nishizuka, 1988). La activación de PKC en distintas células produce un amplio espectro de respuestas celulares (Nishizuka, 1988); en el músculo liso puede inhibir a la enzima miosina LC fosfatasa (Li *et al.*, 1998), lo cual ayuda a desencadenar el mecanismo de contracción muscular.

El GMPc es sintetizado a partir de GTP por la acción de la enzima guanilato ciclasa (SGC). El GMPc es capaz de inducir la relajación del músculo liso debido a la activación de la proteína cinasa dependiente de GMPc, PKG (Lohmann *et al.*, 1997). La PKG bloquea o impide la contracción del músculo liso mediante la fosforilación de residuos de serina o



treonina de diversas proteínas funcionales (Orstavik *et al.*, 1996; Tamura *et al.*, 1996; Lohmann *et al.*, 1997). La PKG puede reducir la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inhibiendo los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes tipo L (Liu *et al.*, 1997; Ruiz-Velasco *et al.*, 1998) y activando otras proteínas de membrana: la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  (Yoshida *et al.*, 1992) y el intercambiador  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  (Furukawa *et al.*, 1991). El control de la fuerza de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula a través del intercambiador  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  depende de otros dos efectos mediados por GMPc: depleción de  $\text{Na}^+$  intracelular a través de la activación de la bomba  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  (Tamaoki *et al.*, 1997) e hiperpolarización de la membrana celular a través de la activación de canales de potasio dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Carrier *et al.*, 1997). La PKG reduce también la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediante la inducción del almacenamiento de éste ión en el retículo sarcoplásmico. Esto lo lleva a cabo mediante la activación de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  localizada en la membrana del retículo sarcoplásmico (Andriantsitohaina *et al.*, 1995; Sabine *et al.*, 1995). De manera adicional, la fosforilación de la PLC mediante la PKG inhibe la producción de  $\text{IP}_3$  y asimismo, la PKG puede activar mediante fosforilación a la miosina LC fosfatasa (Ruth *et al.*, 1993; Lee y Kitazawa, 1997).

El AMPc es un segundo mensajero que se sintetiza a partir de ATP por acción de la enzima adenilato ciclasa y ejerce sus efectos mediante la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc, PKA (Krebs, 1972). El AMPc induce la relajación de las células de músculo liso a través de un decremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediante mecanismos similares a los mencionados para el GMPc (Cumiskey y Feigenson, 1983; Murthy y Markhlouf, 1995; Ruiz-Velasco *et al.*, 1988). Además, varios estudios han demostrado que la PKA inactiva por fosforilación a la miosina LC cinasa (Silver y Disalvo, 1979; DeLanerolle *et al.*, 1984).

Existen otros mecanismos que participan en la regulación del fenómeno de la contracción muscular. Por ejemplo, la enzima Rho cinasa puede fosforilar a la enzima miosina LC fosfatasa e inhibir su actividad (Kymura *et al.*, 1996; Andrew *et al.*, 2003). La actividad de la fosfatasa es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y tiene la capacidad de desfosforilar la cadena ligera reguladora de la miosina, lo cual induce la relajación muscular. Cuando la

fosfatasa se inactiva, aumenta el nivel de fosforilación de la cadena ligera de miosina mediante la enzima miosina LC cinasa, de tal manera que se favorece la contracción. Además, la Rho cinasa activa de forma directa la miosina, al fosforilar la cadena ligera reguladora (Noda *et al.*, 1995; Andrew *et al.*, 2003).

## G.- CONTRACCIÓN ESPONTÁNEA DEL MÚSCULO LISO INTESTINAL

El músculo liso intestinal se contrae de manera espontánea cuando se estira y ésta contracción no depende de ninguna inervación extrínseca. Existen estímulos en el intestino, por ejemplo la presencia de alimentos, que generan la distensión de las paredes gastrointestinales, induciendo una actividad motora en las células del músculo liso intestinal. Esta actividad, que incluye los movimientos peristálticos, está controlada por circuitos nerviosos intrínsecos del SNE (Furness y Costa, 1987; Hasler, 1994;). Los circuitos nerviosos intrínsecos contienen neuronas intrínsecas aferentes primarias que responden a la distensión de las paredes del intestino y son las primeras en recibir la información sobre la naturaleza e intensidad del estímulo (Grider y Jin, 1994; Furness *et al.*, 1995; Kunze *et al.*, 1998).

Las neuronas intrínsecas aferentes primarias, son neuronas Dogiel tipo II que se encuentran distribuidas en ambos plexos (mientérico y submucoso) del SNE (Dogiel, 1899; Furness *et al.*, 1989). La respuesta de estas neuronas al estiramiento depende de la apertura de canales activados por estiramiento ("stretch activated channels") localizados en la membrana del músculo liso intestinal. La apertura de estos canales inicia la contracción de la célula muscular. El movimiento mecánico provocado por la contracción induce la distorsión de sitios específicos en las membranas de las neuronas intrínsecas aferentes, provocando la activación de canales iónicos en las membranas neuronales, con lo cual se generan y propagan potenciales de acción que se transmiten a otras neuronas y a otras células musculares. (Kunze 1998).

## H.- ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS EN LA MOTILIDAD DEL ÍLEON

Como se mencionó anteriormente, el SNE funciona independientemente de los impulsos de origen extrínseco (simpático y parasimpático). Las células musculares de un trozo aislado de íleon se encuentran bajo la influencia de impulsos controlados por este sistema intrínseco y su estado contráctil, en un momento determinado, depende del balance de la información controlada por los diferentes mensajeros químicos, ya sea estimuladores o inhibidores (neurotransmisores, hormonas, autocoides y sustancias parácrinas y otras fuentes). Este balance puede ser alterado por fármacos. Al adicionar un fármaco al baño donde se encuentra el trozo de íleon, se puede inducir un cambio en el estado contráctil de los músculos del íleon, causando una contracción o una relajación. Este cambio puede ser registrado, por lo cual es posible estudiar el efecto del fármaco (Samuelsson, 1990; Williamson *et al.*, 1996).

Los cambios en la contractilidad intestinal inducidos por un fármaco pueden ser el resultado de su interferencia con la síntesis, la liberación o la degradación de neurotransmisores. Pero también, pueden ser el resultado de la acción directa del fármaco con los receptores de neurotransmisores, de hormonas o de autocoides. Asimismo, el fármaco puede influir en la secreción de hormonas o de autocoides o puede producir sus efectos al interferir con la producción de segundos mensajeros, por ejemplo el AMP cíclico o el GMP cíclico, que influyen en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , el cual es importante para la contracción muscular. Adicionalmente, el fármaco puede actuar directamente en las células del músculo liso (Gershon *et al.*, 1994).

La presencia en el SNE de un gran número de terminales nerviosas con diferentes neurotransmisores y con muchos tipos de receptores, permite que el ensayo de íleon aislado constituya una buena herramienta para la detección de los efectos de los fármacos. Sin embargo, debido a la complejidad de los posibles sitios y mecanismos de acción, resulta difícil la elucidación exacta del mecanismo de acción de los fármacos, empleando únicamente este bioensayo (Gabella, 1987).

## I.- EL MODELO DE ÍLEON AISLADO DE COBAYO Y SU APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE TOXINAS PRODUCIDAS POR GASTERÓPODOS MARINOS

El íleon aislado de cobayo ha sido empleado ampliamente desde hace varios años por investigadores interesados en el estudio de toxinas producidas por organismos marinos. A continuación se mencionan algunos ejemplos de estudios realizados con caracoles marinos, en los que se ha utilizado el ensayo de íleon aislado de cobayo.

En investigaciones efectuadas por D. J. West en la Universidad de Londres, se empleó el ensayo de íleon aislado de cobayo para estudiar el efecto de toxinas producidas por algunas especies de caracoles marinos pertenecientes a las familias *Cymatiidae*, *Bursidae*, y *Costellariidae*, las cuales utilizan mecanismos de caza muy similares a los de las especies del género *Comus*. Dichos estudios demostraron que las toxinas estudiadas tienen un efecto farmacológico importante sobre el SNE (West *et al.*, 1996).

Otras investigaciones realizadas por el Dr. Kobayashi en Tokio demostraron que la myotoxina (MTX), purificada del veneno de *Comus magus*, produce contracciones en el íleon de cobayo, las cuales pueden ser inhibidas por TTX (Kobayashi *et al.*, 1982). En otras investigaciones realizadas por el Dr. Kobayashi se estudió el efecto del extracto de *C. striatus*, el cual produce un aumento en las contracciones del íleon de cobayo (Kobayashi *et al.*, 1981).

En el Centro de Bioquímica de Niza en Francia, el Dr. Schweitz estudió un polipéptido aislado del veneno de *C. tessulatus*, que también produce contracciones en el íleon de cobayo (Schweitz *et al.*, 1986).

Con base en los antecedentes presentados, es indudable que el ensayo de íleon aislado de cobayo representa una herramienta muy útil para la caracterización preliminar de los mecanismos de acción de neurotoxinas producidas por gasterópodos marinos.

## JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones realizadas sobre los venenos producidos por gasterópodos marinos de la superfamilia Conacea, se han centrado en el estudio de las toxinas de naturaleza peptídica sintetizadas por caracoles de la familia Conidae (género *Comus*). Aunque muy numerosos, dichos estudios han dejado algunos aspectos sin explorar. Por ejemplo, se desconoce si todas las toxinas contenidas en los venenos de los caracoles de este género son de naturaleza peptídica. Se desconoce también cuáles son los metabolitos secundarios de *Comus sp.* y qué papel desempeñan tales metabolitos secundarios en la toxicidad de los venenos producidos por los caracoles. Con relación a este aspecto, resulta sorprendente que no se hayan realizado estudios químicos enfocados específicamente a aislar metabolitos secundarios de las especies de éste género. Es cierto que se aisló serotonina a partir de *C. imperialis* (McIntosh *et al.*, 1993), sin embargo, el aislamiento de esta amina se llevó a cabo durante la purificación de las toxinas peptídicas del caracol.

Por otra parte, no se han realizado investigaciones sobre especies pertenecientes a las familias Turridae y Terebridae, las otras dos que conforman la superfamilia Conacea. La familia Turridae está constituida por caracoles carnívoros que se alimentan principalmente de gusanos marinos. Estos organismos, estrechamente relacionados filogenéticamente con las especies del género *Comus*, poseen un aparato venenoso muy eficiente (Miller, 1989), hecho por el cual es muy probable que produzcan toxinas que tengan efecto sobre el sistema neuromuscular de sus presas, lo que sugiere una acción sobre canales iónicos y receptores membranales. Una de las principales razones por las que no se han estudiado dichos caracoles es su localización a grandes profundidades. Sin embargo, se considera que la familia Turridae constituye el grupo más grande de caracoles venenosos que existe en la naturaleza, con más de 200 géneros (Olivera, 1999). Es obvio que estos organismos representan una fuente potencial muy rica de compuestos bioactivos.

Finalmente, vale la pena mencionar que aunque son muy numerosos los estudios efectuados sobre las toxinas producidas por caracoles del género *Comus*, son muy escasos los trabajos realizados sobre especies mexicanas. De hecho, no fué sino hasta hace 5 años,

que el Dr. Edgar Heimer del Instituto de Neurobiología de la UNAM, inició una línea de investigación relacionada con el estudio bioquímico y farmacológico de organismos marinos recolectados en mares mexicanos, entre los que se incluyen caracoles venenosos (Segura *et al.*, 1999; Maillo *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2002).

Considerando que los mares mexicanos albergan una biodiversidad muy rica de especies marinas, la gran mayoría de las cuales jamás ha sido estudiada científicamente, se decidió iniciar el presente proyecto de tesis con un enfoque interinstitucional e interdisciplinario que tiene por objeto realizar un rastreo farmacológico de gasterópodos marinos de las familias Conidae y Turridae, recolectados en aguas territoriales de México, con el fin de identificar candidatos idóneos para la obtención de compuestos con actividad sobre el sistema nervioso y/o muscular.

## **HIPÓTESIS**

Las especies de gasterópodos marinos pertenecientes a las familias Conidae y Turridae producen toxinas que tienen efecto sobre el sistema nervioso entérico o sobre la musculatura lisa intestinal.

## OBJETIVOS

El presente proyecto de investigación tiene los siguientes objetivos generales:

- 1) evaluar el efecto de extractos obtenidos a partir de glándulas y conductos venenosos de gasterópodos marinos pertenecientes a las familias Conidae y Turridae sobre la contractilidad de la musculatura lisa intestinal, con el objeto de identificar los candidatos más idóneos para la obtención de compuestos bioactivos y
- 2) realizar evaluaciones farmacológicas preliminares que permitan proponer el posible mecanismo de acción de los extractos activos.

Las especies de gasterópodos marinos seleccionadas para su estudio fueron:

Familia Turridae: *Polystira albida* y

Familia Conidae: *Conus austini* y *C. spurius*.

Es importante mencionar que se realizó la evaluación farmacológica de los extractos proteicos y orgánicos preparados a partir de los especímenes objeto de estudio. El estudio bioquímico de los extractos proteicos activos está siendo realizado por el grupo del Dr. Edgar Heimer. Por otra parte, el estudio químico de los extractos orgánicos de las especies más activas se llevará a cabo por el grupo de investigación de la Dra. Alejandra Rojas en el Departamento de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, Facultad de Química, U. A. Q. Evidentemente, la realización de los estudios bioquímicos y químicos de las especies más potentes será objetivo de otros proyectos de investigación.



## **ESPECÍMENES, MATERIAL Y MÉTODOS**

La metodología que se utilizó en este proyecto comprendió tres etapas que incluyeron: 1) recolección de los gasterópodos marinos, congelación de los especímenes y transporte a nuestros laboratorios; 2) preparación de los extractos y 3) evaluación farmacológica preliminar de los extractos.

### **1.- RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LOS CARACOLES OBJETO DE ESTUDIO**

Los trabajos de muestreo y recolección se llevaron a cabo en varias costas de la República Mexicana, en diferentes épocas del año. Los especímenes se recolectaron por arrastre, a través de redes camaroneras y por buceo a diferentes profundidades.

Una vez recolectados, los especímenes fueron almacenados en hielo seco y se transportaron, mediante un servicio de mensajería rápida, al Laboratorio de la Unidad de Bioquímica Analítica y Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

### **2.- AISLAMIENTO DE LAS GLÁNDULAS Y LOS CONDUCTOS VENENOSOS**

El cuerpo de los caracoles se separó de sus conchas, mediante centrifugación de los especímenes enteros a 19,000 g durante 2 minutos en una centrífuga de mesa. Posteriormente, se disectaron las glándulas y los conductos venenosos con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras. Una vez aislados, las glándulas y los conductos se colocaron por separado en un amortiguador de extracción con una composición de 40% (v/v) de acetonitrilo (ACN), 2% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) y 58% (v/v) de agua destilada (H<sub>2</sub>O).

### **3.- PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE LAS GLÁNDULAS Y LOS CONDUCTOS VENENOSOS DE LOS CARACOLES**

La extracción de las toxinas presentes en el veneno de los caracoles se realizó mediante la homogenización de las glándulas y los conductos venenosos en 5 ml de amortiguador de extracción a 4°C, utilizando un homogenizador Brinkmann Politron (Modelo PT 10/35). El homogenado resultante se centrifugó a 17,000 g por 30 minutos con el fin de separar el tejido restante. Se colectó la fase superior del centrifugado y se determinó la cantidad de proteína total por medio del método de Lowry.

### **4.- EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA**

#### **A.- ENSAYO DE ÍLEON AISLADO DE COBAYO**

Para el registro de íleon aislado, se utilizaron cobayos machos adultos (600-800 gr); los animales se sacrificaron por dislocación cervical y el intestino delgado disecado se colocó en solución Krebs (mM): NaCl 119, KCl 4.6, NaHCO<sub>3</sub> 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.5 y glucosa 11.4 (pH 7.4), burbujeando constantemente con una mezcla gaseosa 5% de CO<sub>2</sub> en O<sub>2</sub>.

Se separó la porción correspondiente al íleon y se hicieron cortes transversales para obtener anillos de aproximadamente 1 cm de longitud. Estos se colocaron posteriormente en cámaras de incubación con solución Krebs a 37°C y con el burbujeo constante de la mezcla de CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>. Las contracciones mecánicas se registraron isométricamente por medio de transductores de fuerza Grass Modelo FT03 acoplados a un polígrafo Grass de 4 canales Modelo 7D.

La actividad espontánea del íleon se mantuvo a una tensión de un gramo. Después de un período de estabilización de 30 minutos, se registró la actividad espontánea durante 10 minutos. Estos registros se utilizaron como control. Al cabo de este período, se

evaluaron los efectos de los diferentes extractos de prueba durante 10 minutos. Los resultados obtenidos se compararon con el control (Rojas *et al.*, 1995).

## B.- ANÁLISIS DE LOS DATOS FARMACOLÓGICOS

El efecto de los extractos se determinó comparando el área bajo la curva obtenida a partir del registro gráfico de la frecuencia y la amplitud de las contracciones del íleo, antes y después de la aplicación de las muestras. Las áreas de los registros gráficos obtenidos a partir del polígrafo se calcularon mediante el empleo de una tarjeta analógica-digital (CPLAB-10) y un programa computacional diseñado especialmente para este fin. Los valores se expresaron como el porcentaje de aumento o inhibición, según sea el caso, de la respuesta contráctil, calculado a partir del promedio de 6 experimentos  $\pm$  el error estándar (SE). Las diferencias entre las medias de dos grupos se estimaron mediante una prueba de t de Student.

Las curvas concentración-respuesta obtenidas para los extractos se graficaron y los datos experimentales se ajustaron a una curva mediante un programa de ajuste no lineal PRISMA 3.0 (GraphPad Software) y se calcularon las  $IC_{50}$  (concentración a la cual se obtiene el 50% del efecto máximo).

## C.- CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA PRELIMINAR DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Con la finalidad de iniciar la caracterización farmacológica del mecanismo de acción de los principios activos presentes en los extractos de glándula y conducto venenoso de *C. austini*, *C. spurius* y *P. albida*, se investigó su efecto sobre las contracciones del íleon inducidas por diferentes agentes espasmógenos (acetilcolina, nicotina, histamina y KCl). Para la realización de estas evaluaciones se llevo acabo el proceso metodológico descrito en el punto No. 4, con las siguientes modificaciones: 1) después del periodo de estabilización de 30 minutos, se agregan los extractos de glándulas y conductos de las especies de prueba (10  $\mu$ g proteína/ml). 2) se incubo el íleon con los extractos durante un

periodo de 5 minutos y posteriormente se agregan los espasmógenos a sus respectivas concentraciones mínimas que producen un máximo efecto excitatorio y 3) finalmente, el efecto de los compuestos se determina comparando las áreas bajo la curva de los registros correspondientes a la respuesta control, con las áreas de los registros obtenidos de la adición de las sustancias de prueba (Granger, 1986).

# RESULTADOS

## 1. RECOLECTA Y CONTENIDO DE PROTEÍNAS DE LOS ESPECÍMENES OBJETO DE ESTUDIO

En primer término, se evaluó el efecto de los extractos preparados a partir de las glándulas y conductos venenosos obtenidos de seis especímenes de cada una de las tres especies seleccionadas para el presente trabajo. Los caracoles se recolectaron en litorales mexicanos durante los meses de abril, julio, agosto, noviembre y diciembre del 2001 y 2002. La recolecta se realizó en diferentes estaciones del año con el objeto de tener muestras, más o menos representativas, que permitieran observar variaciones en el contenido de compuestos bioactivos, resultantes de diferencias entre individuos o de la fecha de recolecta. En los Cuadros 2, 3 y 4 se muestran las dimensiones y el contenido de proteínas de glándulas y conductos venenosos de los especímenes de *C. austini*, *C. spurius* y *P. albida* seleccionados para su estudio.

**Cuadro 2.** Longitud y contenido de proteínas de glándulas y conductos venenosos de los especímenes de *C. austini* evaluados.

Caracol #	Longitud de la concha (cm)	Longitud de la glándula (cm)	Longitud del conducto (cm)	Proteína total (µg)	
				Glándula	Conducto
1CA	5.5	1.0	5.9	1,766.8	10,212.5
2CA	4.5	0.9	5.4	1,022.5	883.57
3CA	4.3	0.8	5.5	705.40	860.25
4CA	4.5	0.8	5.5	577.13	1,235.0
5CA	4.6	0.8	5.5	479.12	936.34
6CA	4.7	1.0	5.7	553.5	1,064.3

**Cuadro 3.** Longitud y contenido de proteínas de glándulas y conductos venenosos de los especímenes de *C. spurius* evaluados.

Caracol #	Longitud de la concha (cm)	Longitud de la glándula (cm)	Longitud del conducto (cm)	Proteína total (µg)	
				Glándula	Conducto
1CS	9.0	2.6	45	6,983.23	20,614.31
2CS	8.3	2.3	37	5,526.00	28,500.02
3CS	6.5	1.8	20	3,260.56	11,395.00
4CS	6.5	1.6	19	3,511.83	5,511.95
5CS	6.7	2.0	22	4,414.77	4,110.48
6CS	6.0	1.9	17	3,453.03	12,026.02

**Cuadro 4.** Longitud y contenido de proteínas de glándulas y conductos venenosos de los especímenes de *P. albida* evaluados.

Caracol #	Longitud de la concha (cm)	Longitud de la glándula (cm)	Longitud del conducto (cm)	Proteína total (µg)	
				Glándula	Conducto
1PA	8.5	0.5	3.0	85.285	122.482
2PA	7.5	0.7	4.5	115.34	138.866
3PA	8.2	0.5	4.0	81.774	140.224
4PA	7.0	0.5	3.5	129.797	321.868
5PA	6.0	0.4	3.4	87.643	110.608
6PA	5.8	0.4	3.0	82.70	112.174

## **2. EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE LOS ESPECÍMENES DE PRUEBA SOBRE LAS CONTRACCIONES ESPONTÁNEAS DEL ÍLEON AISLADO DE COBAYO.**

### **2.1 EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE GLÁNDULAS Y CONDUCTOS VENENOSOS DE LOS ESPECÍMENES DE *C. austini* SOBRE LAS CONTRACCIONES ESPONTÁNEAS DEL ÍLEON AISLADO DE COBAYO.**

Los extractos totales obtenidos a partir de las glándulas y de los conductos venenosos de *C. austini*, evaluados en un rango de concentraciones de 0.001 a 1000  $\mu\text{g}$  proteína/ml, produjeron una inhibición, dependiente de la concentración, de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. El efecto inhibitorio presentado por ambos extractos se presentó de manera inmediata después de la aplicación del extracto y se caracterizó por una disminución en la amplitud y en el tono basal de las contracciones normales del íleon (Figura 5).

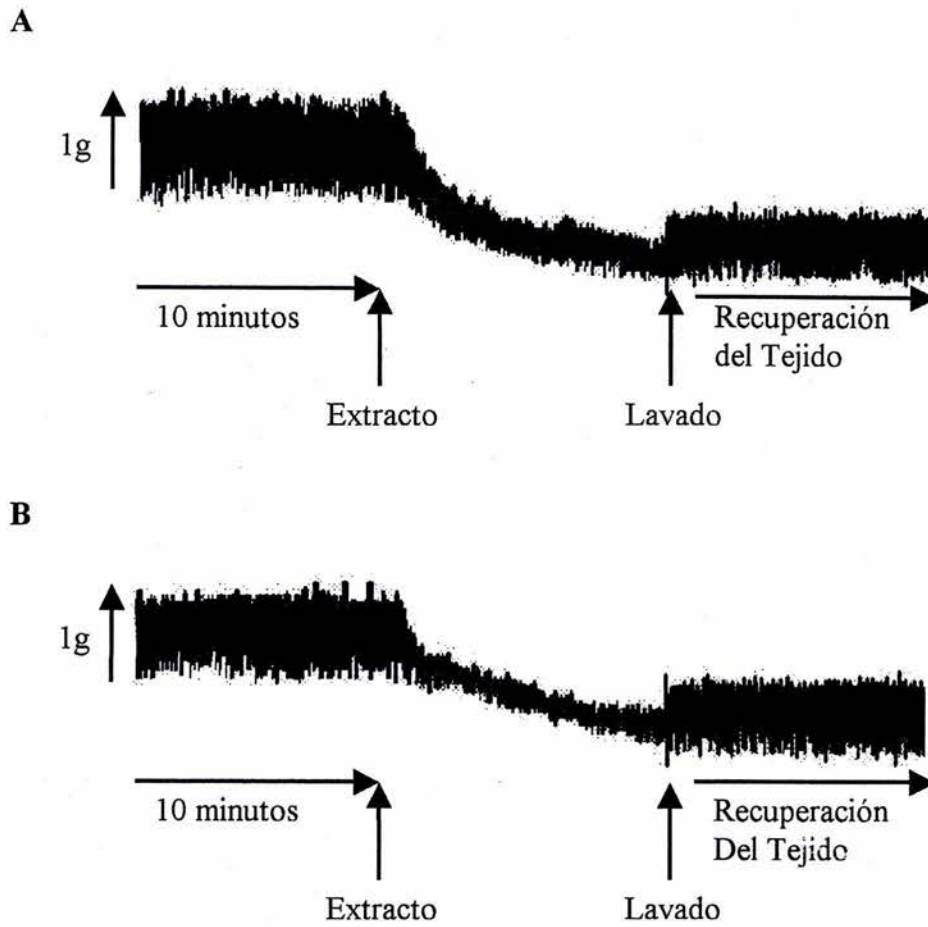
La respuesta máxima inhibitoria se observó aproximadamente a los 8.5-9 min después de la aplicación del extracto de los conductos, independientemente de la concentración aplicada. En tanto que el efecto presentado por el extracto de las glándulas indujo una inhibición máxima aproximadamente 7 min después de la aplicación del extracto, también de manera independiente de la concentración. El efecto relajante de la musculatura lisa intestinal producido por ambos extractos fue reversible después de lavar el íleon con la solución de Krebs-Henseleit. De tal forma que después de 8 lavados, se observó una recuperación de un 70 a un 80% de las contracciones normales del íleon en el caso de los dos extractos (ver Figura 6).

La tetrodotoxina (TTX) ( $1 \times 10^{-5}$  a 100  $\mu\text{M}$ ), un bloqueador de canales de  $\text{Na}^+$  voltaje-dependientes se empleó como control positivo. Este compuesto también produjo una inhibición de las contracciones espontáneas del íleon (ver Figura 5).

**Falta página**

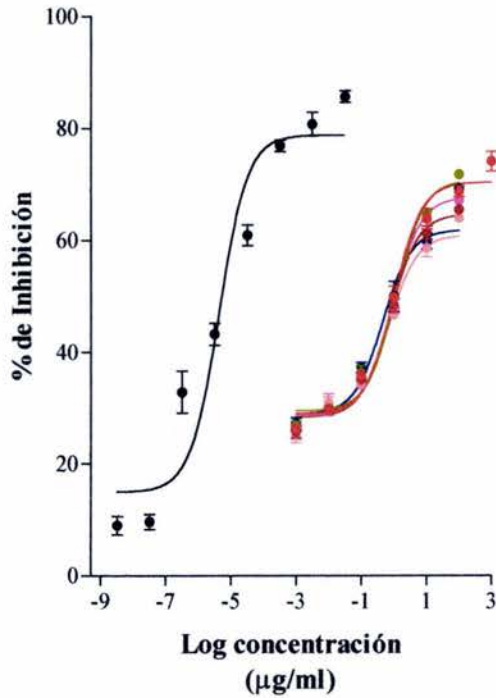
**N° 33**



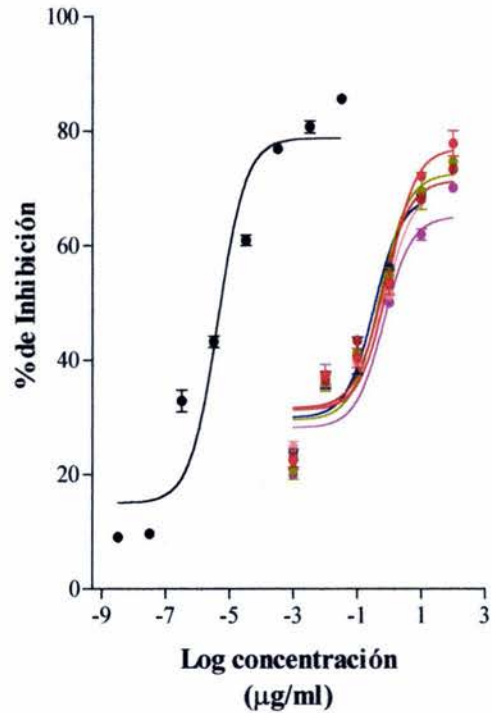


**Figura 6.** Recuperación de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo después del lavado de los extractos de **A)** conductos venenosos y **B)** glándulas de *C. austini*

La figura 7 muestra las respectivas curvas concentración-respuesta obtenidas para el efecto inhibitorio producido por los extractos de las glándulas y conductos provenientes de los seis especímenes de *C. austini* y la curva concentración-respuesta inhibitoria de TTX.

**A**

● TTX  
 ● Caracol # 1  
 ● Caracol # 2

**B**

● Caracol # 3  
 ● Caracol # 4  
 ● Caracol # 5  
 ● Caracol # 6

**Figura 7.** Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de los extractos totales de: **A)** conductos (6 especímenes) y **B)** glándulas (6 especímenes) de la especie *Conus austini* sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo. Los valores están expresados en % de inhibición de la respuesta contráctil y están calculados a partir del promedio de 6 experimentos  $\pm$  SE.

El procesamiento estadístico de los datos, empleando el análisis de varianza (one-way ANOVA) y la prueba de Tukey, indicó que no hubo una diferencia significativa entre las diferentes curvas concentración-respuesta obtenidas para los extractos de las glándulas provenientes de los diferentes especímenes de prueba. Tampoco se observó una diferencia significativa entre las curvas concentración-respuesta obtenidas para el efecto de los conductos. A partir de estas curvas se obtuvieron los valores de las concentraciones inhibitorias medias ( $IC_{50}$ ) y los efectos máximos ( $E_{max}$ ) para cada uno de los extractos de glándulas y conductos venenosos (Cuadro 5 y Cuadro 6). El valor promedio de la  $IC_{50}$  calculado para el efecto de las glándulas fue de  $0.593 \pm 0.094 \mu\text{g/ml}$ . En tanto que el valor promedio de la  $IC_{50}$  calculado para los conductos venenosos fue de  $0.972 \pm 0.068 \mu\text{g/ml}$ . Estos datos indicaron que el extracto de las glándulas es aproximadamente 1.6 veces más potente que el extracto obtenido de los conductos venenosos. Asimismo, se observó que el extracto de las glándulas resultó ser aproximadamente 215 veces menos potente que TTX para inducir un efecto relajante de la musculatura lisa intestinal. Por otra parte, el extracto de los conductos fue aproximadamente 352 veces menos potente que el control positivo.

**Cuadro 5.** Inhibición de las contracciones espontáneas de íleon aislado de cobayo inducida por los extractos totales de los conductos de 6 especímenes de *C. austini*.

Espécimen	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$E_{max}$
DCA1	$0.978 \pm 0.235$	$70.26 \pm 2.049$
DCA2	$0.7323 \pm 0.162$	$64.55 \pm 1.880$
DCA3	$1.131 \pm 0.339$	$70.61 \pm 2.457$
DCA4	$0.91 \pm 0.46$	$60.81 \pm 3.072$
DCA5	$0.8946 \pm 0.275$	$67.55 \pm 2.337$
DCA6	$0.449 \pm 0.4$	$61.76 \pm 2.788$

Sustancia o Extracto de prueba	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$E_{max}$	Potencia
TTX	$0.002763 \pm 0.0019$	$78.71 \pm 4.978$	1.00
DCA	$*0.97265 \pm 0.06834$	$65.9233 \pm 1.7203$	0.00284

**Cuadro 6.** Inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducida por los extractos totales de las glándulas de 6 especímenes de *C. austini*.

Espécimen	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	E <sub>max</sub>
GCA1	0.914 ± 0.3074	76.88 ± 5.566
GCA2	0.5655 ± 0.3839	71.21 ± 5.578
GCA3	0.3338 ± 0.4133	69.25 ± 6.782
GCA4	0.754 ± 0.4167	69.79 ± 8.385
GCA5	0.6591 ± 0.5816	64.98 ± 9.893
GCA6	0.332 ± 0.4222	68.46 ± 6.919

Sustancia o Extracto de prueba	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	E <sub>max</sub>	Potencia
TTX	0.002763 ± 0.0019	78.71 ± 4.978	1.00
GCA	*0.59307 ± 0.09476	70.095 ± 1.60128	0.00465

Los valores son los promedios ± SE; n = 6 (95% intervalo de confianza).

La potencia se obtuvo mediante la fórmula: Potencia = IC<sub>50</sub> TTX/ IC<sub>50</sub> extracto, asumiendo un valor de 1.00 para TTX.

\*El valor corresponde al promedio obtenido de las IC<sub>50</sub> de los 6 especímenes evaluados.

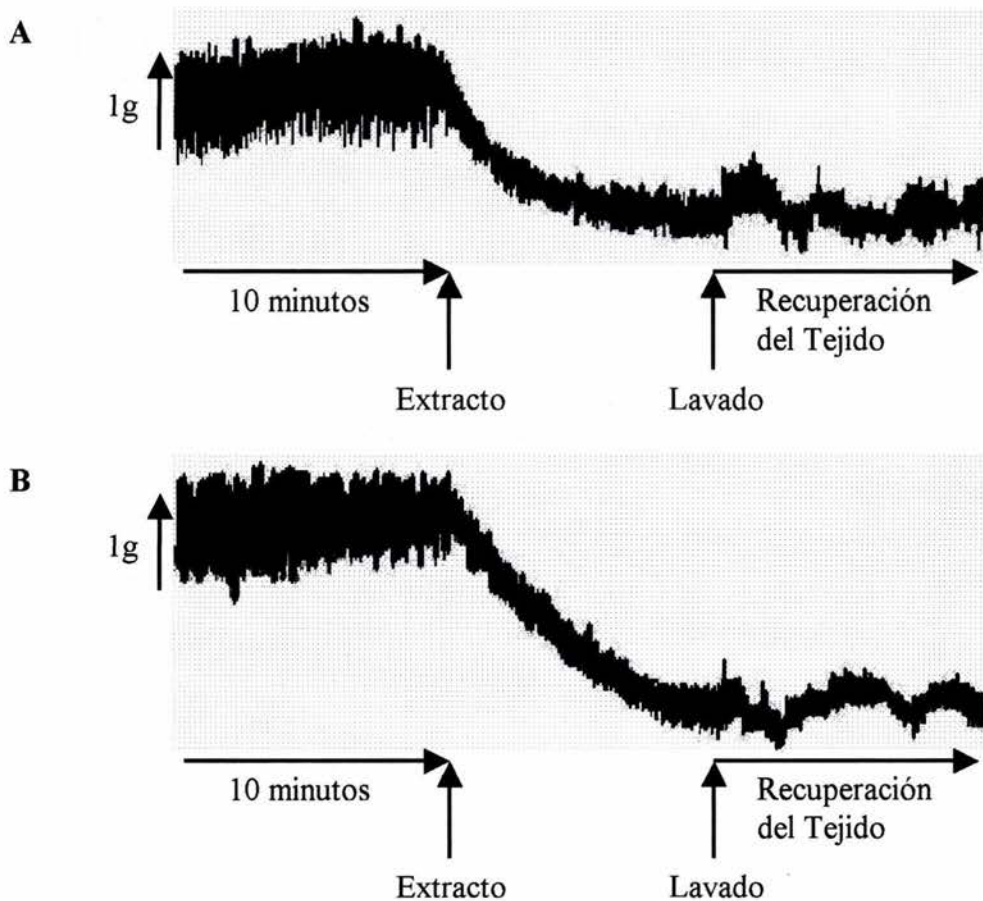
## 2.2. EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE GLÁNDULAS Y CONDUCTOS VENENOSOS DE LOS ESPECÍMENES DE *C. spurius* SOBRE LAS CONTRACCIONES ESPONTÁNEAS DEL ÍLEON AISLADO DE COBAYO.

La evaluación de los extractos de las glándulas (0.001 a 100 µg proteína/ml) y los conductos venenosos (0.001 a 1000 µg proteína/ml) de los seis especímenes de *C. spurius* en el modelo de íleon aislado de cobayo permitió determinar que los extractos, tanto de glándulas como de conductos indujeron una disminución en la amplitud y el tono de las contracciones espontáneas del íleon (Figura 5). En ambos casos, el efecto inhibitorio apareció inmediatamente después de la aplicación de las diferentes concentraciones de los extractos de prueba y fue dependiente de la concentración.

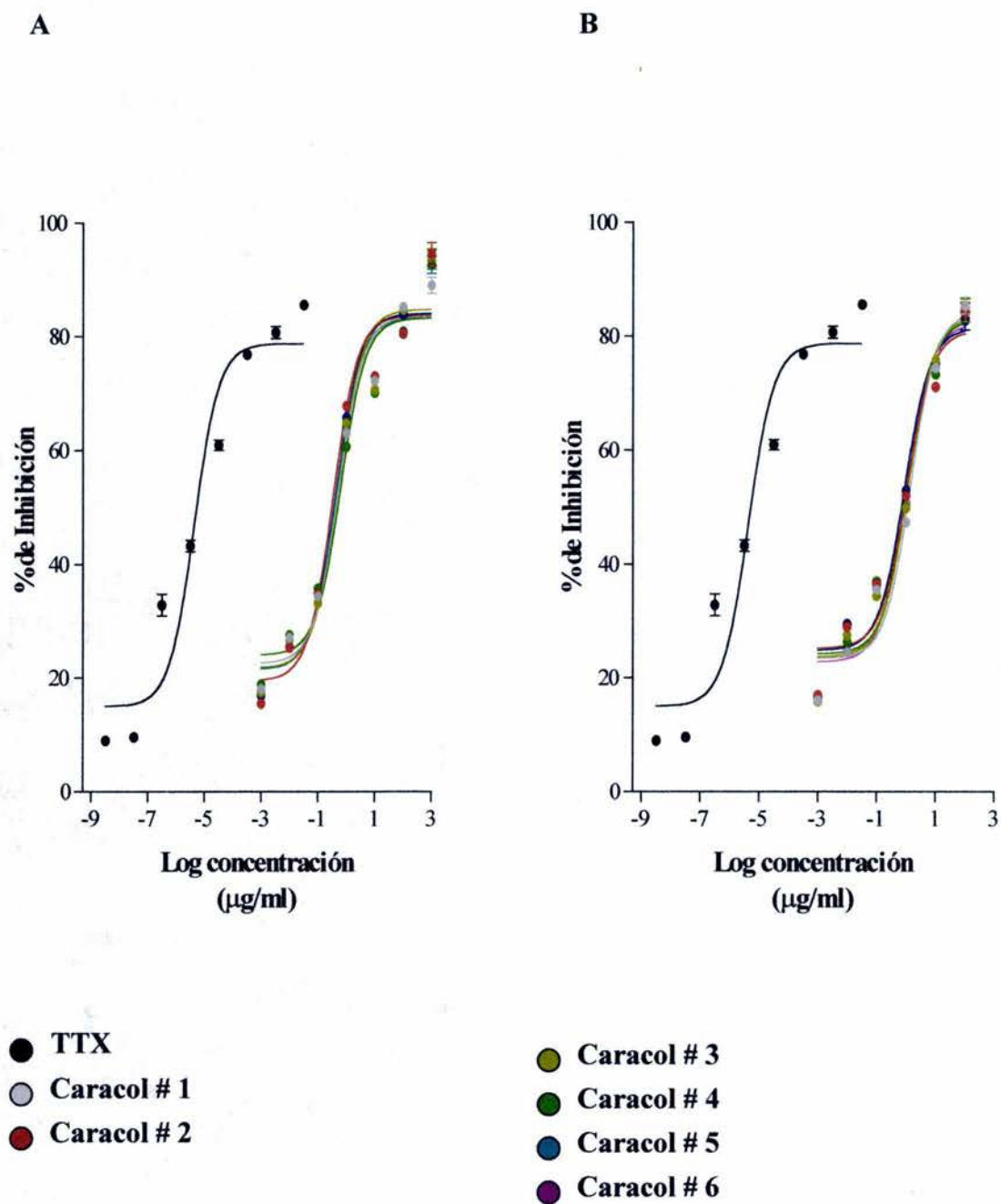
El máximo efecto relajante inducido por los extractos de las glándulas y los conductos se observó de 7 a 7.5 min, después de la adición de los extractos a la cámara de

tejido aislado. En el caso del efecto producido por los extractos de las glándulas, se observó una recuperación casi total del tono de las contracciones después de 8 lavados. En contraste con esta observación, la amplitud de la respuesta contráctil solamente alcanzó de un 40 a un 50% de la amplitud de las contracciones normales. Este mismo comportamiento se observó cuando se lavaron los trozos de íleon que habían sido expuestos al efecto de los extractos de los conductos (Figura 8).

En la Figura 9 se presentan las curvas concentración-respuesta obtenidas para el efecto relajante presentado por los extractos de glándulas y conductos obtenidos de los diferentes especímenes de *C. spurius* que se evaluaron.



**Figura 8.** Recuperación de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo después del lavado de los extractos de **A)** conductos venenosos y **B)** glándulas de *C. spurius*.



**Figura 9.** Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de los extractos totales de: **A)** conductos (6 especímenes) y **B)** glándulas (6 especímenes) de la especie *Conus spurius* sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo. Los valores están expresados en % de inhibición de la respuesta contráctil y están calculados a partir del promedio de 6 experimentos  $\pm$  SE.

No se observó una diferencia significativa entre las respectivas curvas concentración-efecto relajante de los extractos preparados a partir de las glándulas obtenidas de los diferentes individuos de prueba ( $P > 0.05$  en el análisis de varianza ANOVA y la prueba de Tukey). Tampoco se observó una diferencia significativa entre las diferentes curvas concentración-respuesta obtenidas para los extractos de los conductos venenosos.

En los Cuadros 7 y 8 se muestran los valores calculados para las  $IC_{50}$  y los efectos máximos ( $E_{max}$ ) para cada uno de los extractos de conductos venenosos y glándulas. El valor promedio de la  $IC_{50}$  calculado para el efecto de las glándulas fue de  $1.116 \pm 0.078$   $\mu\text{g/ml}$ . En tanto el valor promedio de la  $IC_{50}$  calculado para los conductos venenosos fue de  $0.478 \pm 0.040$   $\mu\text{g/ml}$ . Estos datos mostraron que el extracto de los conductos venenosos es aproximadamente 2.4 veces más potente que el extracto obtenido de los glándulas. De manera adicional, se observó que el efecto relajante del extracto de los conductos resultó ser aproximadamente 174 veces menos potente que el efecto de TTX, utilizado como control positivo. Por su parte, el extracto de las glándulas fue aproximadamente 404 veces menos potente que TTX.

**Cuadro 7.** Inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducida por los extractos totales de los conductos de 6 especímenes de *C. spurius*.

Espécimen	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$E_{max}$
DCS1	$0.5149 \pm 0.3$	$83.49 \pm 3.623$
DCS2	$0.3368 \pm 0.38$	$83.67 \pm 4.547$
DCS3	$0.5102 \pm 0.51$	$84.71 \pm 4.779$
DCS4	$0.6338 \pm 0.61$	$83.19 \pm 4.903$
DCS5	$0.4404 \pm 0.39$	$83.21 \pm 4.019$
DCS6	$0.4369 \pm 0.5$	$84.03 \pm 4.865$

Sustancia o Extracto de prueba	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$E_{max}$	Potencia
TTX	$0.00276 \pm 0.00195$	$78.71 \pm 4.978$	1.00
DCS	$*0.47883 \pm 0.04071$	$83.7166 \pm 0.23612$	0.00576

**Cuadro 8.** Inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducida por los extractos totales de las glándulas de 6 especímenes de *C. spurius*.

Espécimen	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	E <sub>max</sub>
GCS1	1.432 ± 0.2325	84.22 ± 5.834
GCS2	1.031 ± 0.2726	80.95 ± 6.115
GCS3	1.176 ± 0.2173	83.44 ± 5.288
GCS4	1.182 ± 0.2602	82.97 ± 6.23
GCS5	0.9961 ± 0.2181	82.15 ± 5.19
GCS6	0.8822 ± 0.2446	81.39 ± 5.462

Sustancia o Extracto de prueba	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	E <sub>max</sub>	Potencia
TTX	0.00276 ± 0.00195	78.71 ± 4.978	1.00
GCS	*1.11655 ± 0.07833	82.52 ± 0.5104	0.0024

Los valores son los promedios ± SE; n = 6 (95% intervalo de confianza).

La potencia se obtuvo mediante la fórmula: Potencia = IC<sub>50</sub> TTX/ IC<sub>50</sub> extracto, asumiendo un valor de 1.00 para la TTX.

\* El valor corresponde al promedio obtenido de las IC<sub>50</sub> de los 6 especímenes evaluados.

### 2.3. EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE GLÁNDULAS Y CONDUCTOS VENENOSOS DE LOS ESPECÍMENES DE *P. albida* SOBRE LAS CONTRACCIONES ESPONTÁNEAS DEL ÍLEON AISLADO DE COBAYO.

Los extractos totales obtenidos a partir de las glándulas y los conductos venenosos de los seis especímenes de *P. albida* se evaluaron en un rango de concentraciones de 0.001 a 100 µg de proteína/ml en el ensayo de íleon aislado de cobayo. Los resultados de esta evaluación demostraron que los dos grupos de extractos producen una relajación de la musculatura lisa intestinal, de una manera dependiente de la concentración. Esta relajación se manifestó mediante una disminución en la amplitud y el tono de las contracciones espontáneas del íleon, al igual que TTX que sirvió como control positivo (Figura 5), los



efectos se presentaron cuanto los extractos se agregaron al medio de la cámara de tejido aislado.

El máximo efecto relajante inducido por los extractos de las glándulas se observó de 8.5 a 9 min después de la aplicación de los extractos, mientras que el máximo efecto relajante inducido por los extractos de los conductos se observó de 6.5 a 7 min, después de la adición de los extractos a la cámara de tejido aislado. La respuesta producida por los dos grupos de extractos presentó una recuperación parcial del tono, después de lavar 8 veces el íleon con la solución de Krebs-Henseleit. Por otra parte, la amplitud de la respuesta contráctil se recuperó de un 60 a un 80 % después del lavado exhaustivo (ver Figura 10).

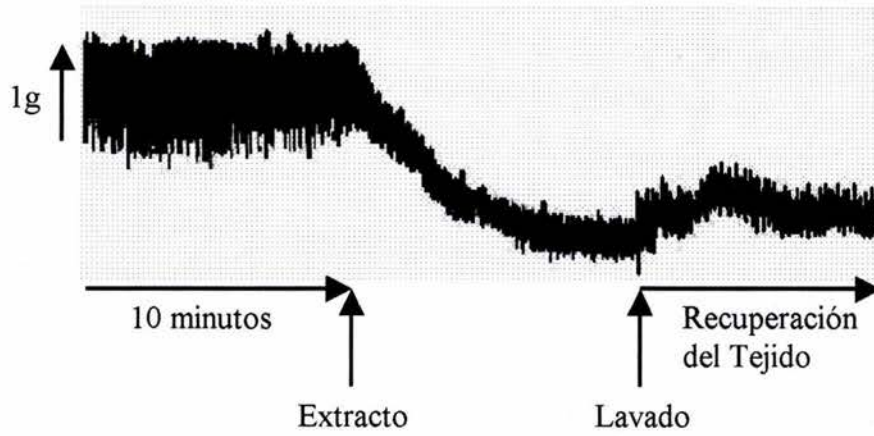
La Figura 11 muestra las curvas concentración-respuesta obtenidas para el efecto relajante presentado por los extractos de glándulas y conductos obtenidos de los diferentes especímenes de *P. albida* que se evaluaron.

No se observó una diferencia significativa entre las respectivas curvas concentración-efecto relajante de los extractos preparados a partir de los conductos obtenidos de los diferentes individuos de prueba ( $P > 0.05$  en el análisis de varianza ANOVA y la prueba de Tukey). Sin embargo, la gráfica de las curvas concentración-respuesta de los extractos de las glándulas mostró dos grupos de curvas, entre los cuales sí se observó una diferencia significativa.

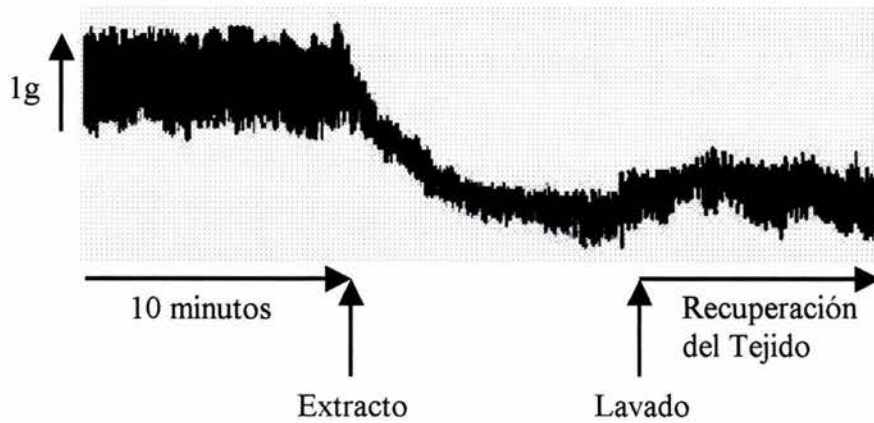
Los Cuadros 9 y 10 muestran los valores calculados para las  $IC_{50}$  y los efectos máximos ( $E_{max}$ ) para cada uno de los extractos de glándulas y conductos venenosos de los especímenes evaluados. El valor promedio de la  $IC_{50}$  de los especímenes evaluados para el efecto de los conductos fue de  $0.237 \pm 0.128 \mu\text{g/ml}$ . El valor promedio de la  $IC_{50}$  calculado para las glándulas fue de  $0.620 \pm 0.283 \mu\text{g/ml}$ . Estos datos indicaron que el extracto de los conductos es aproximadamente 2.6 veces más potente que el extracto obtenido de las glándulas. Asimismo, se observó que el extracto de las glándulas resultó ser aproximadamente 225 veces menos potente que TTX para inducir un efecto relajante de la

musculatura lisa intestinal. Por otra parte, el extracto total de los conductos es aproximadamente 86 veces menos potente que el control positivo.

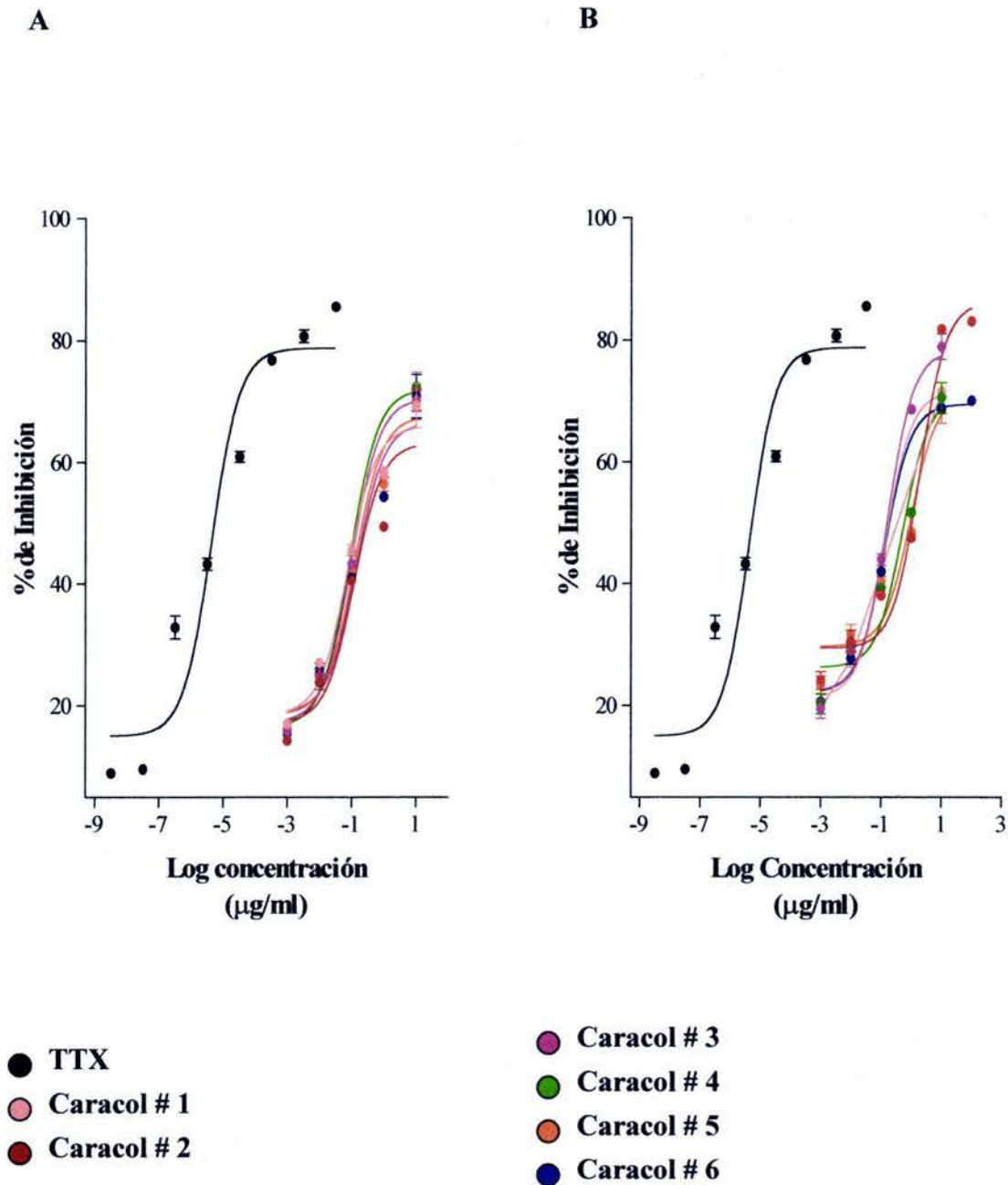
**A**



**B**



**Figura 10.** Recuperación de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo después del lavado de los extractos de **A)** conductos venenosos y **B)** glándulas de *P. albida*.



**Figura 11.** Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de los extractos totales de: **A)** conductos (6 especímenes) y **B)** glándulas (6 especímenes) de la especie *Polystira albida* sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo. Los valores están expresados en % de inhibición de la respuesta contráctil y están calculados a partir del promedio de 6 experimentos  $\pm$  SE.

**Cuadro 9.** Inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducida por los extractos totales de los conductos de los 6 especímenes de *Polystira albida*.

Espécimen	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	E <sub>max</sub>
DPA1	0.07496 ± 0.2278	65.87 ± 3.893
DPA2	0.1179 ± 0.4209	63.13 ± 7.456
DPA3	0.09857 ± 0.1443	70.47 ± 3.569
DPA4	0.08765 ± 0.1215	71.97 ± 5.432
DPA5	0.1192 ± 0.2741	67.62 ± 5.198
DPA6	0.134 ± 0.3319	66.49 ± 6.156

Sustancia o Extracto de prueba	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	E <sub>max</sub>	Potencia
TTX	0.00276 ± 0.0019	78.71 ± 4.978	1.00
DPA	*0.23685 ± 0.1282	67.591 ± 1.3107	0.0116

**Cuadro 10.** Inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducida por los extractos totales de las glándulas de 6 especímenes de *Polystira albida*.

Espécimen	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	E <sub>max</sub>
GPA1	0.09688 ± 0.30	60.9 ± 3.83
GPA2	1.869 ± 0.229	86.2 ± 9.445
GPA3	0.16 ± 0.1529	78.26 ± 8.217
GPA4	0.5151 ± 0.388	70.87 ± 3.372
GPA5	0.9493 ± 0.4095	71.34 ± 10.32
GPA6	0.1315 ± 0.1143	69.44 ± 5.468

Sustancia o Extracto de prueba	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	E <sub>max</sub>	Potencia
TTX	0.00276 ± 0.0019	78.71 ± 4.978	1.00
GPA	*0.6203 ± 0.28304	72.832 ± 3.5029	0.00445

Los valores son los promedios ± SE; n = 6 (95% intervalo de confianza).

La potencia se obtuvo mediante la fórmula: Potencia = IC<sub>50</sub> TTX/ IC<sub>50</sub> extracto, asumiendo un valor de 1.00 para TTX.

\* El valor corresponde al promedio obtenido de las IC<sub>50</sub> de los 6 especímenes evaluados.

A manera de resumen, en el Cuadro 11 se muestran los valores promedios obtenidos de las  $IC_{50}$  y los efectos máximos ( $E_{max}$ ) de cada uno de los extractos de glándulas y conductos venenosos de las especies evaluadas. Estos valores indican que el extracto de conductos venenosos obtenido de *P. albida* es el más potente, mientras que el extracto de glándulas obtenido de *C. spurius* es el menos potente de los extractos de las especies evaluadas. Asimismo, se puede observar que el extracto de conductos venenosos obtenido de *P. albida* es 86 veces menos potente que el control positivo y que el extracto de glándulas obtenido de *C. spurius* es 404 veces menos potente que TTX para inducir un efecto relajante en la musculatura lisa.

**Cuadro 11** Promedios de las inhibiciones de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducidas por los extractos totales de las glándulas y conductos venenosos de las tres especies evaluadas.

Sustancia o Extracto de prueba	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$E_{max}$	Potencia
<b>TTX</b>	$0.00276 \pm 0.0019$	$78.71 \pm 4.978$	1.00000
<b>DCA</b>	$0.97265 \pm 0.06834$	$65.9233 \pm 1.7203$	0.00284
<b>GCA</b>	$0.59307 \pm 0.09476$	$70.095 \pm 1.60128$	0.00465
<b>DCS</b>	$0.47883 \pm 0.04071$	$83.7166 \pm 0.23612$	0.00576
<b>GCS</b>	$1.11655 \pm 0.07833$	$82.52 \pm 0.5104$	0.00247
<b>DPA</b>	$0.23685 \pm 0.1282$	$67.591 \pm 1.3107$	0.01160
<b>GPA</b>	$0.6203 \pm 0.28304$	$72.832 \pm 3.5029$	0.00445

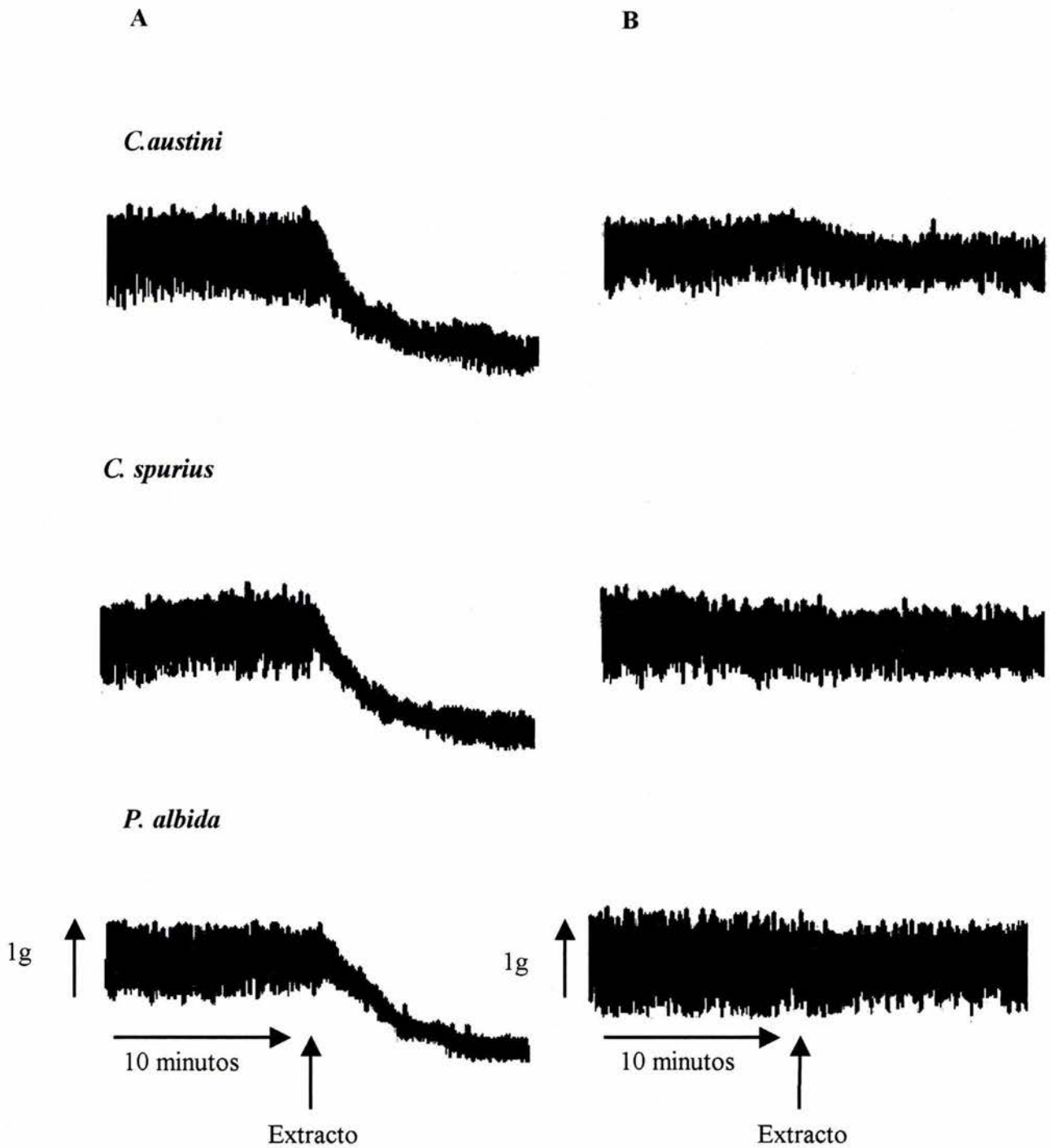
Los valores son los promedios  $\pm$  SE;  $n = 6$  (95% intervalo de confianza).

La potencia se obtuvo mediante la fórmula:  $\text{Potencia} = IC_{50} \text{ TTX} / IC_{50} \text{ extracto}$ , asumiendo un valor de 1.00 para TTX.

### **3. EFECTO RELAJANTE DE LOS EXTRACTOS DE GLÁNDULAS Y CONDUCTOS VENENOSOS DE *C. austini*, *C. spurius* y *P. albida* SOMETIDOS A CONDICIONES DESNATURALIZANTES.**

Con el objeto de determinar, de manera preliminar, si los compuestos responsables de la relajación inducida por los extractos de glándulas y conductos venenosos de las especies objeto de estudio eran de naturaleza peptídica, se incubaron los extractos (10 µg proteína/ml) a 98°C durante 30 min y posteriormente fueron evaluados.

Los resultados derivados de estos experimentos demostraron que la inhibición inducida por los extractos de los conductos venenosos de *C. austini*, *C. spurius* y *P. albida* se redujo de manera significativa (inhibición máxima < 5%), cuando los extractos son sometidos a condiciones desnaturalizantes (98°C por 30 min) (Figura 12). Un comportamiento similar se observó en el caso de los extractos provenientes de las glándulas (Figura 13). Estos resultados sugieren que los compuestos que producen la inhibición de las contracciones del músculo liso intestinal son péptidos y/o proteínas.



**Figura 12.** Efecto de los extractos de conductos venenosos de las tres especies evaluadas sobre la musculatura lisa antes y después de ser sometidos a condiciones desnaturalizantes (98°C por 30 min). **A)** antes y **B)** después de la incubación de los extractos a 98°C por 30 minutos.

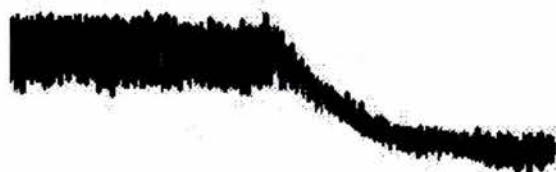
A

B

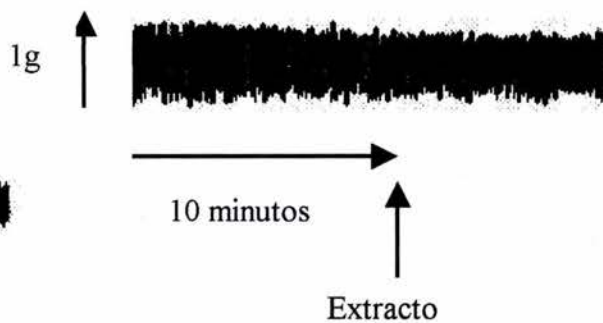
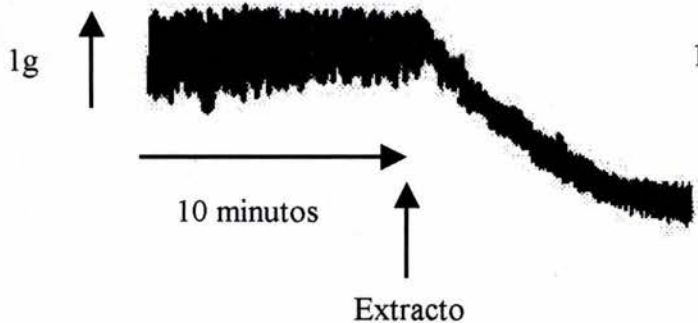
*C. austini*



*C. spurius*



*P. albida*



**Figura 13.** Efecto de los extractos totales de glándulas de las tres especies evaluadas sobre la musculatura lisa antes y después de ser sometidos a condiciones desnaturalizantes (98°C por 30 min). **A)** antes y **B)** después de la incubación de los extractos a 98°C por 30 minutos.



#### 4.- CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA PRELIMINAR DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE GLÁNDULAS Y CONDUCTOS VENENOSOS DE LAS ESPECIES DE PRUEBA.

El efecto inhibitorio de las contracciones espontáneas del íleon de cobayo inducido por los extractos de glándulas y conductos venenosos de las tres especies de caracoles evaluadas, no proporciona gran información con relación al mecanismo de acción involucrado en el efecto relajante de los extractos. Por tal motivo, con la finalidad de iniciar la caracterización farmacológica del mecanismo de acción de los extractos, se investigó su efecto sobre las contracciones del íleon de cobayo inducidas por diferentes agentes espasmógenos que incluyeron: la acetilcolina (ACh), la nicotina, la histamina y el KCl. En esta serie de experimentos, todos los extractos se evaluaron a una concentración de 10 µg proteína/ml.

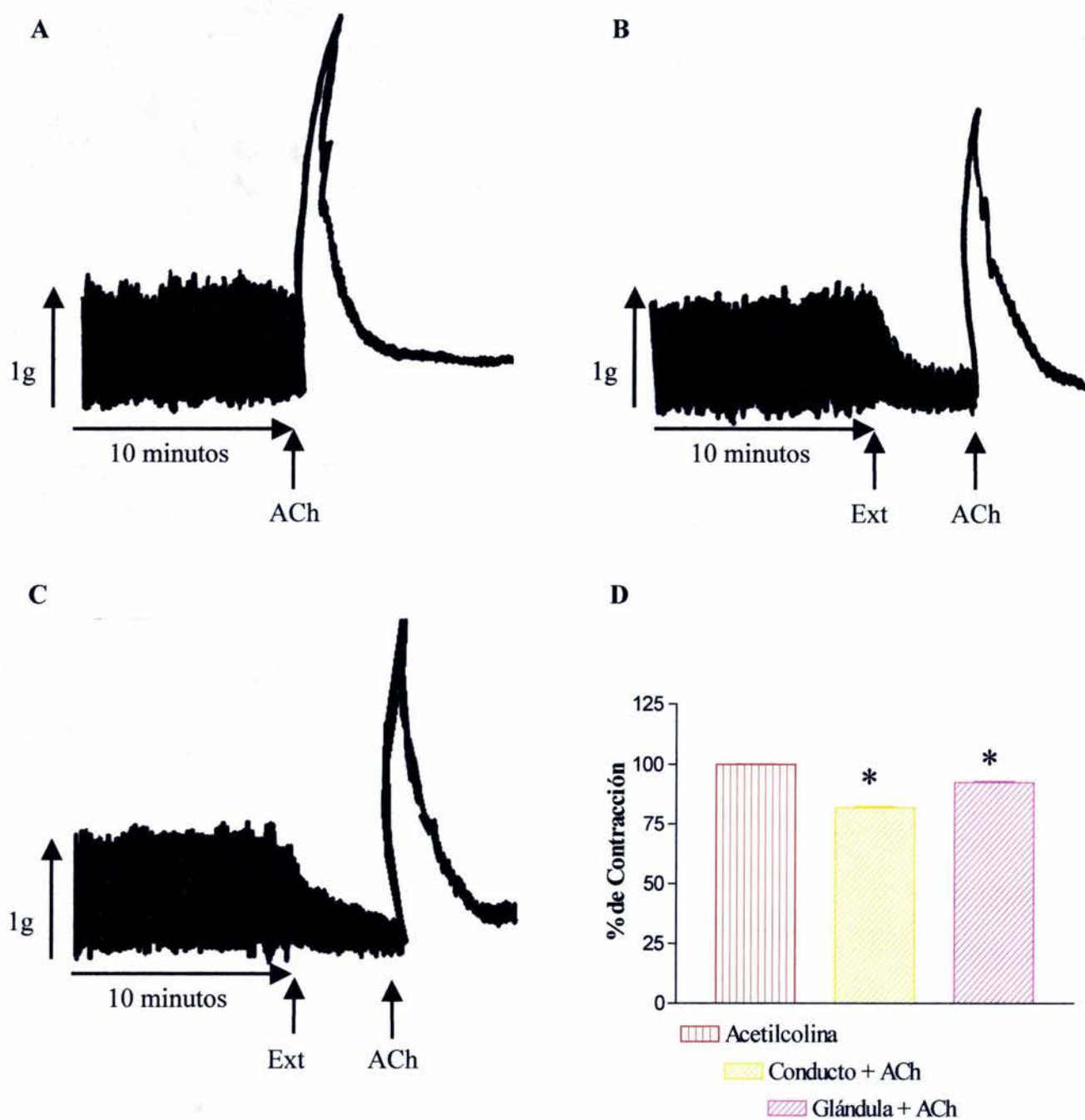
##### 4.1 DETERMINACIÓN PRELIMINAR DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE GLÁNDULAS Y CONDUCTOS VENENOSOS DE *C. austini*.

Con el objeto de detectar si la actividad de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *C. austini* involucraba un componente anticolinérgico, se determinó la influencia de los dos extractos sobre las contracciones inducidas por ACh y nicotina. Estas evaluaciones demostraron que el extracto obtenido a partir de glándulas de *C. austini* produce una disminución de aproximadamente un  $7\% \pm 0.402$  ( $n = 6$ ) en las contracciones inducidas por ACh (Fig. 14) y una inhibición significativa de un  $29.8\% \pm 0.353$  ( $n=6$ ) en las contracciones producidas por nicotina (Fig 15). Por su parte, el extracto de conductos venenosos también disminuyó significativamente las contracciones inducidas por ACh y nicotina con porcentajes de inhibición de  $17.01\% \pm 0.565$  ( $n = 6$ ) y  $22.28\% \pm 0.698$  ( $n = 6$ ), respectivamente (Figuras 14 y 15).

En otros experimentos, se evaluó el efecto de los extractos sobre las contracciones del íleon generadas por histamina. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 16. Como se puede observar, los extractos de glándulas y de conductos venenosos

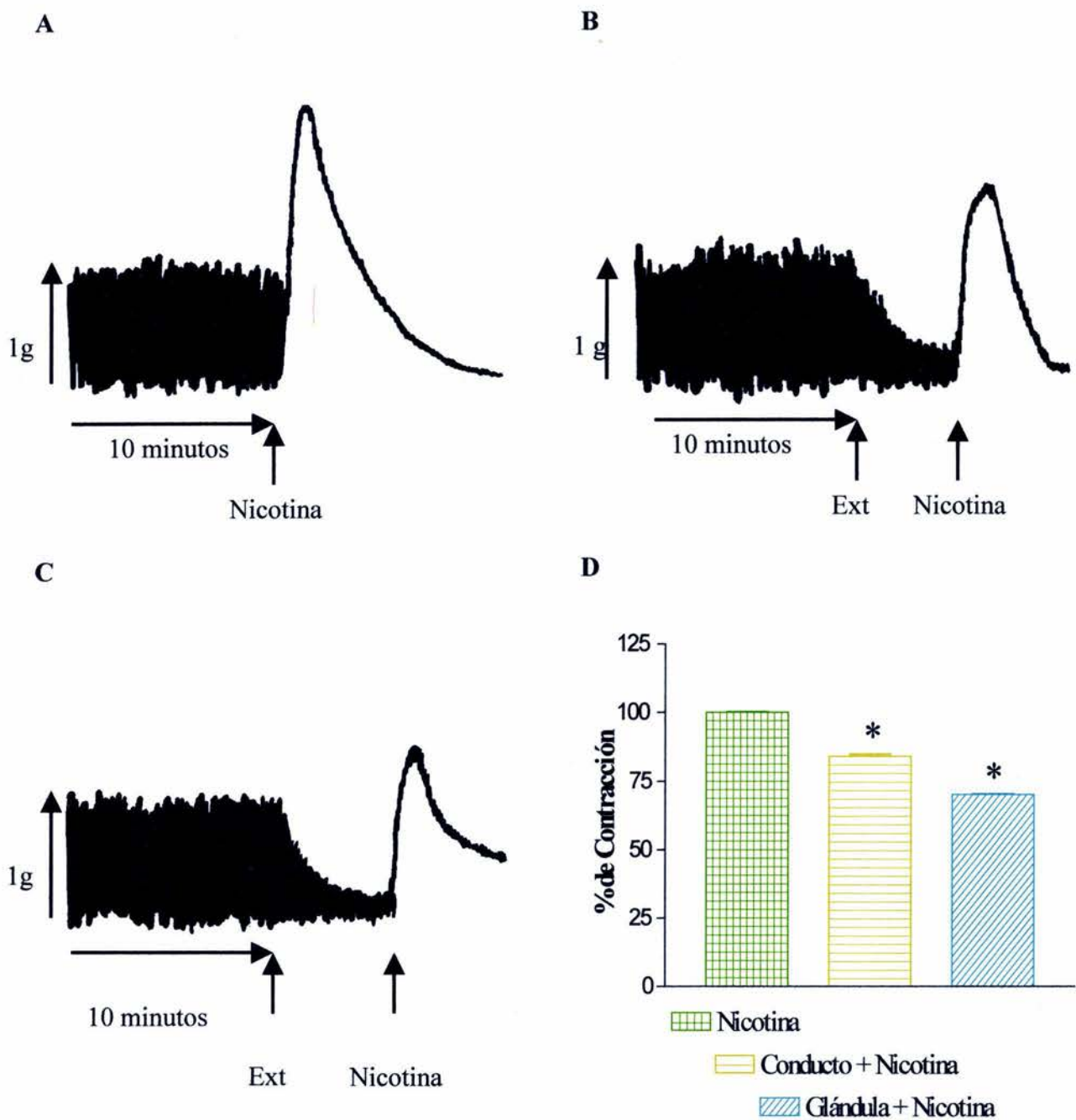
inhibieron de una manera significativa ( $57.44\% \pm 0.328$  y  $28.19\% \pm 0.133$  respectivamente) las contracciones provocadas por histamina.

Finalmente, se determinó el efecto de los extractos sobre las contracciones generadas por KCl, con el objeto de evaluar una posible interacción con canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes localizados en la membrana de las células del músculo liso. En estos experimentos, ninguno de los dos extractos evaluados inhibió las contracciones producidas por KCl (Fig 17) y más bien se observó que el extracto de conductos produjo un aumento ( $23.28\% \pm 0.642$ ) y los extractos de las glándulas un aumento ( $7.07\% \pm 0.756$ ) en las contracciones inducidas por KCl en el íleon.



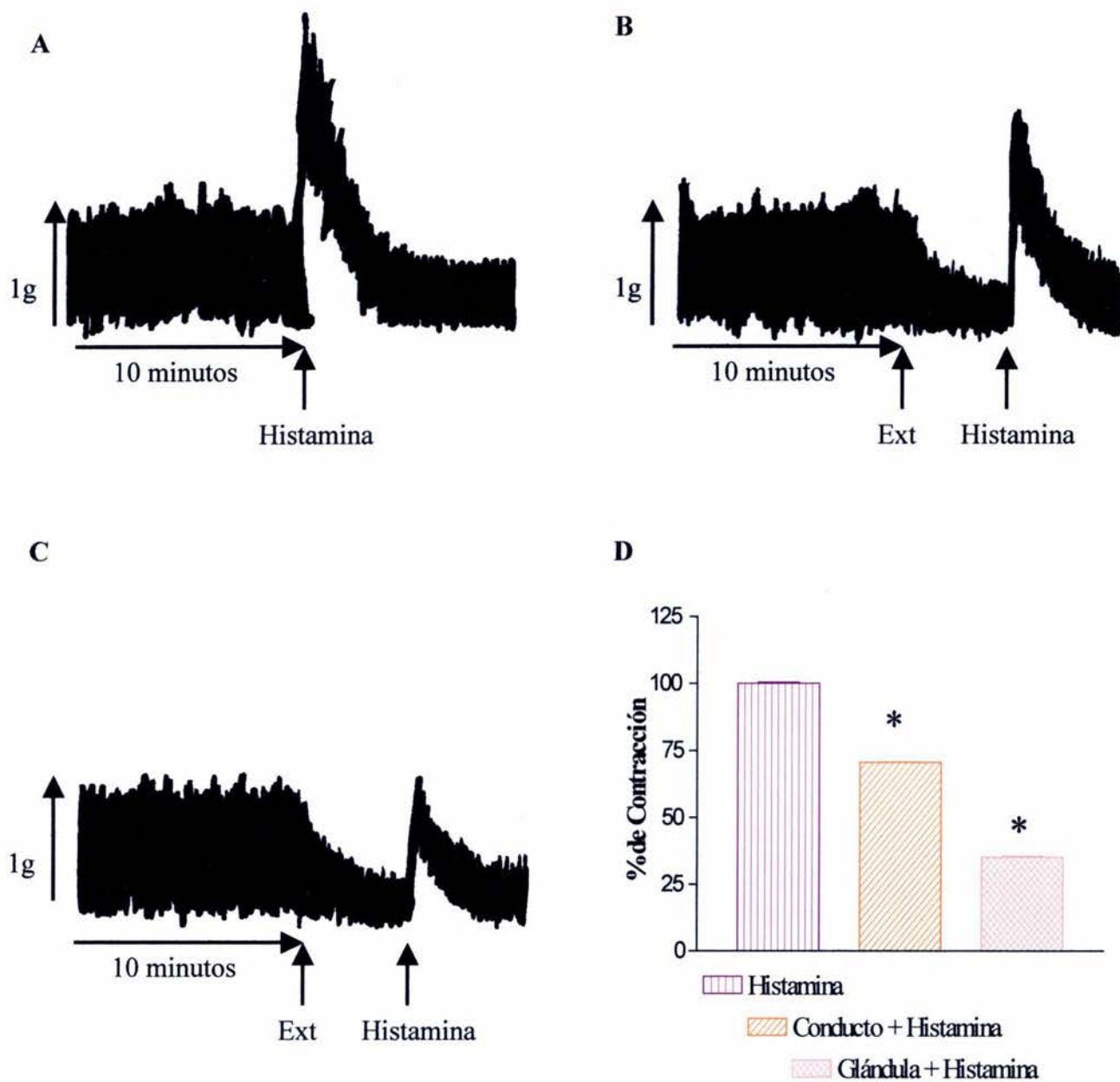
**Figura 14.** Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *C. austini* sobre las contracciones inducidas por ACh. **A)** Efecto de ACh (0.1 mM) sobre las contracciones espontáneas del íleon. Efecto de los extractos (10  $\mu$ g proteína/ml) de: **B)** conductos y **C)** glándulas sobre las contracciones inducidas por ACh y **D)** cuantificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre la contracción inducida por ACh.

\* Indica si existe una diferencia significativa entre el efecto del control y el efecto de los extractos



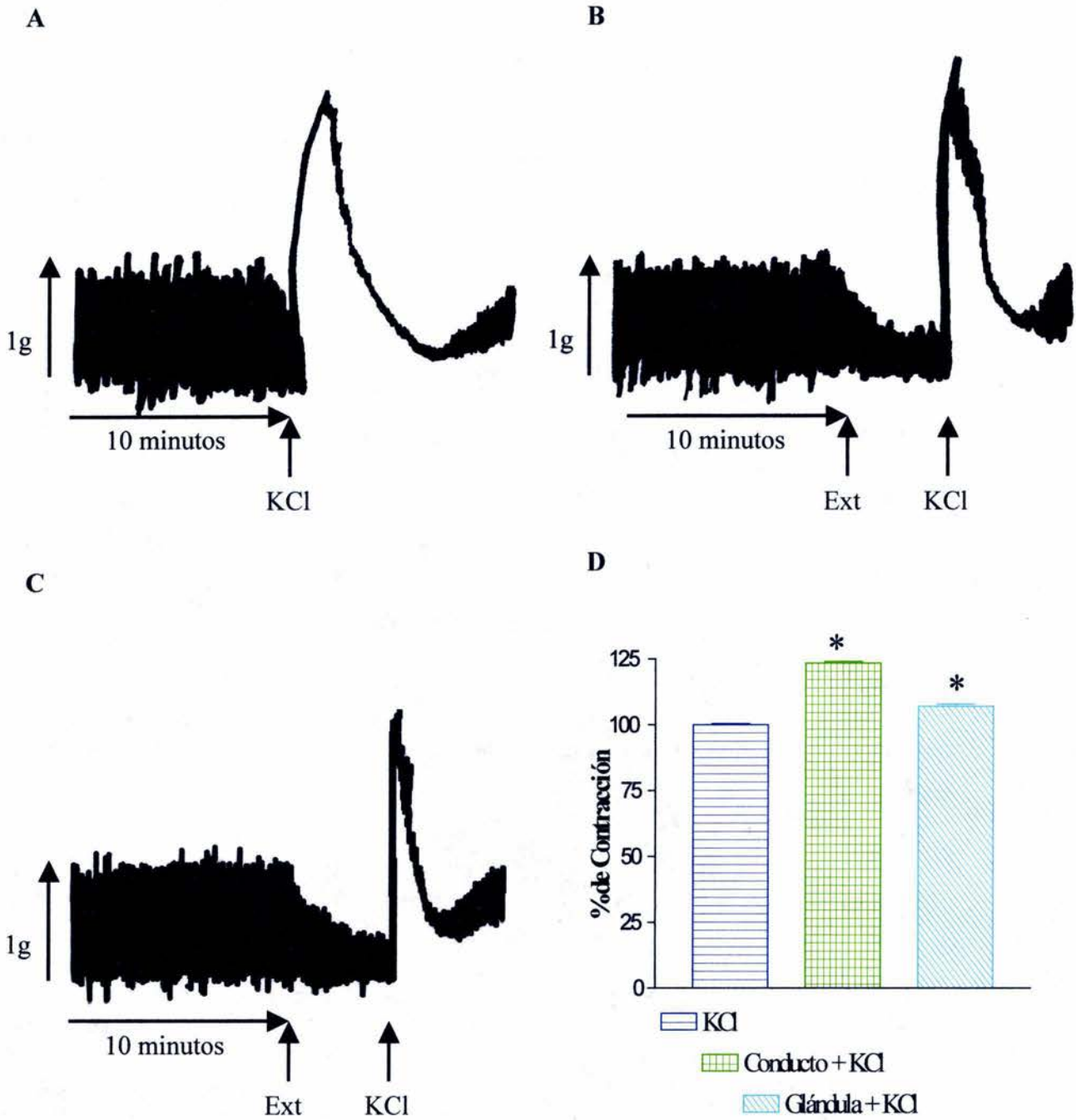
**Figura 15.** Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *C. austini* sobre las contracciones inducidas por nicotina A) Efecto de nicotina (0.1 mM) sobre las contracciones espontáneas del íleon. Efecto de los extractos (10 µg proteína/ml) de: B) conductos y C) glándulas sobre las contracciones inducidas por nicotina y D) cuantificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre la contracción inducida por nicotina.

\* Indica si existe una diferencia significativa entre el efecto del control y el efecto de los extractos



**Figura 16.** Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *C. austini* sobre las contracciones inducidas por histamina. **A)** Efecto de histamina ( $1 \times 10^{-3}$  M) sobre las contracciones espontáneas del íleon. Efecto de los extractos ( $10 \mu\text{g}$  proteína/ml) de: **B)** conductos y **C)** glándulas sobre las contracciones inducidas por histamina y **D)** cuantificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre la contracción inducida por histamina.

\* Indica si existe una diferencia significativa entre el efecto del control y el efecto de los extractos



**Figura 17.** Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *C. austini* sobre las contracciones inducidas por KCl. **A)** Efecto de KCl (60 nM) sobre las contracciones espontáneas del íleon. Efecto de los extractos (10 µg proteína/ml) de: **B)** conductos y **C)** glándulas sobre las contracciones inducidas por KCl y **D)** cuantificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre la contracción inducida por KCl.

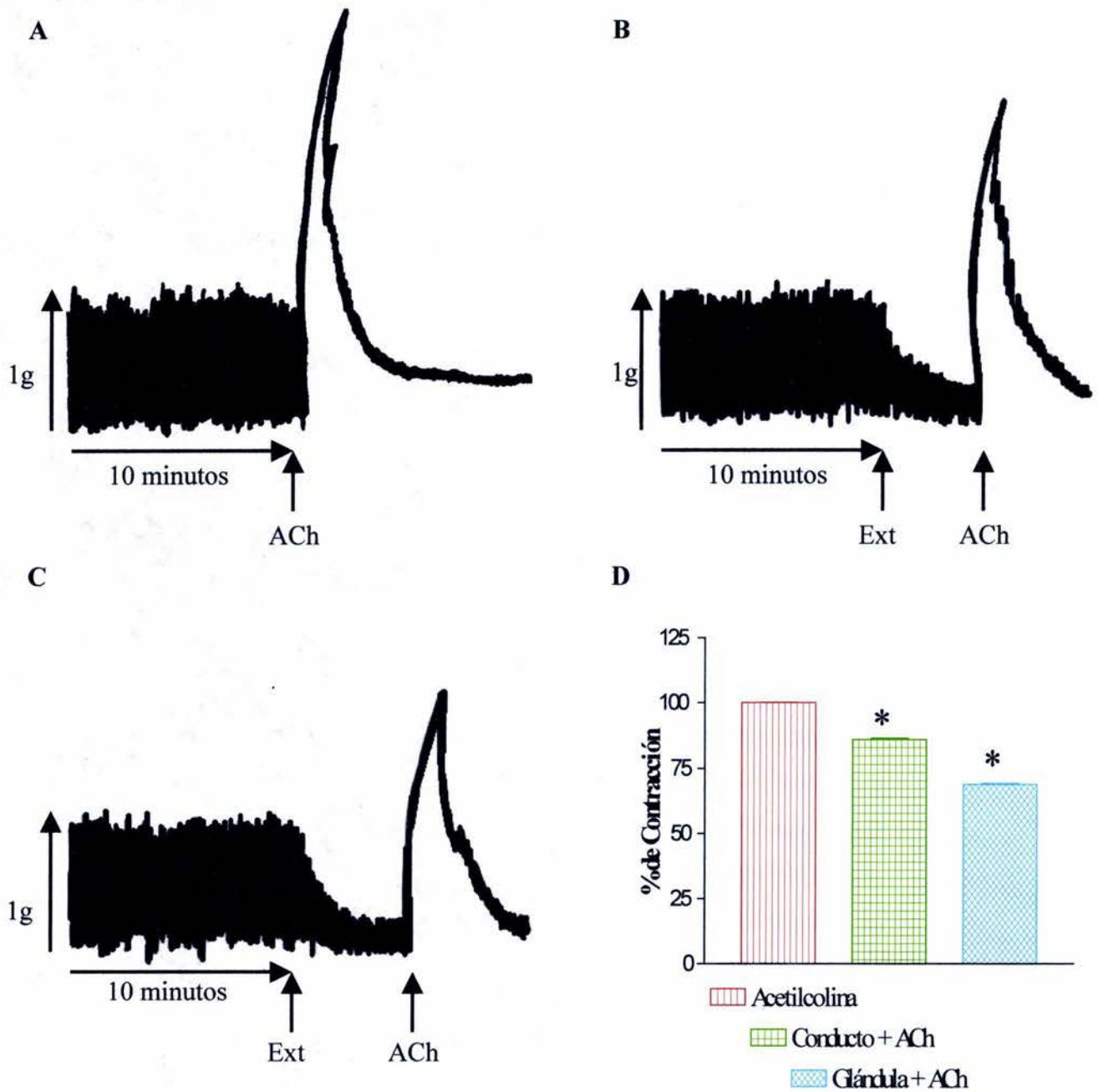
\* Indica si existe una diferencia significativa entre el efecto del control y el efecto de los extractos

#### 4.2 DETERMINACIÓN PRELIMINAR DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE GLÁNDULAS Y CONDUCTOS VENENOSOS DE *C. spurius*.

La evaluación del efecto de los extractos obtenidos a partir de glándulas y conductos venenosos de *C. spurius* sobre las contracciones del íleon producidas por ACh indicó que ambos extractos inhiben las contracciones generadas por este neurotransmisor con porcentajes de inhibición de  $13.18\% \pm 0.538$  ( $n = 6$ ), en el caso del extracto de conductos y de  $30.91 \pm 0.424$  ( $n = 6$ ), en el caso del extracto de glándulas (Figura 18). Sin embargo, a diferencia de lo que se observó con los extractos provenientes de *C. austini*, ni el extracto de conductos, ni el extracto de glándulas de *C. spurius* modificaron de manera significativa las contracciones inducidas por nicotina en el íleon (Figura 19).

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados con histamina indicaron que el extracto de conductos venenosos bloquea significativamente las contracciones inducidas por este neurotransmisor ( $76.96\% \pm 0.133$  de inhibición). Se observó que el extracto de glándulas también inhibe, aunque en menor grado ( $26.06\% \pm 0.328$  de inhibición), las contracciones provocadas por la histamina en el íleon (Figura 20).

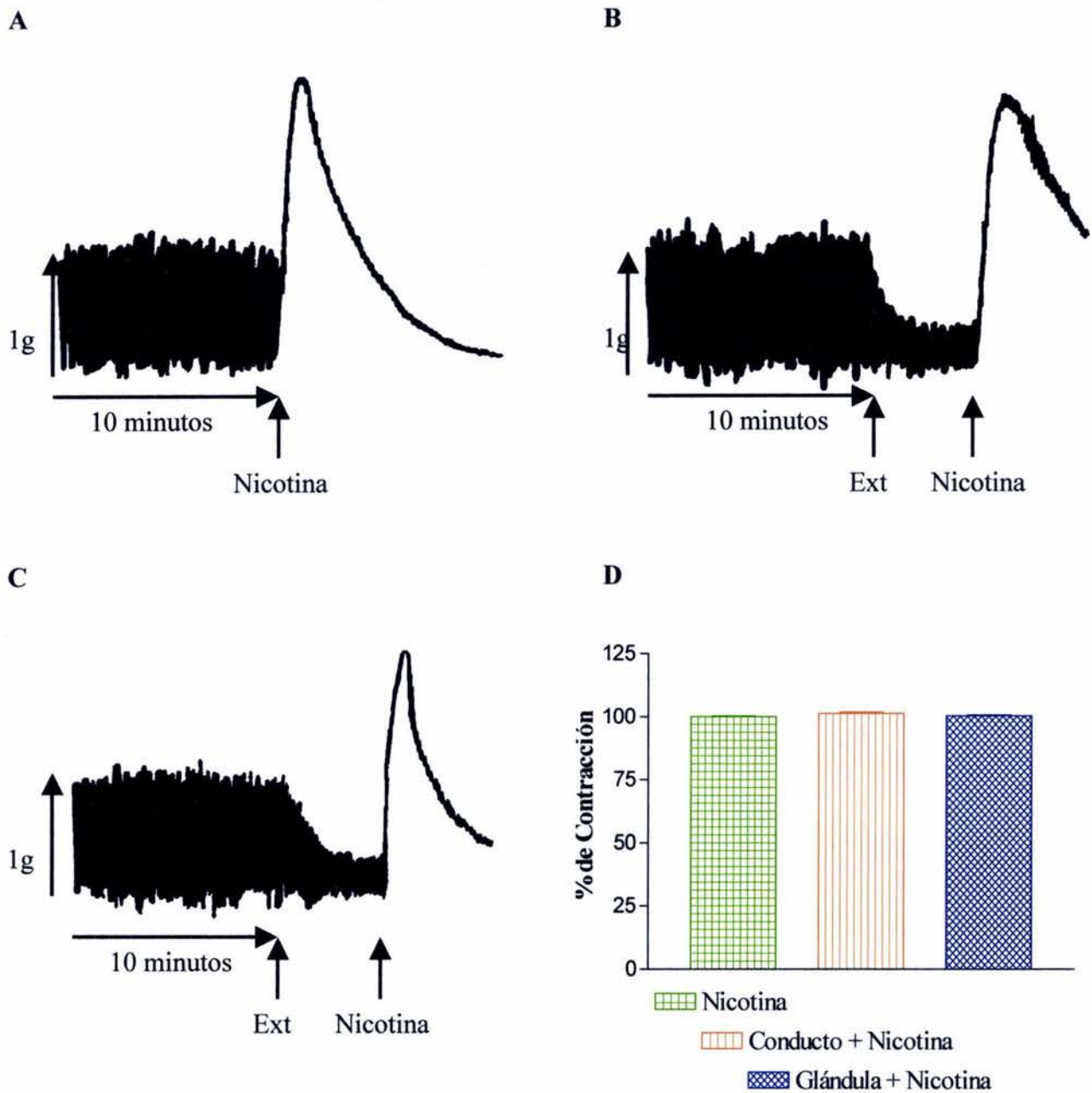
Por otra parte, se encontró que el extracto proveniente de glándulas no modifica significativamente las contracciones producidas por KCl en el íleon. Sin embargo, el extracto de conductos venenosos sí inhibe ( $32.53\% \pm 0.141$ ), de manera significativa las contracciones provocadas por este compuesto (figura 21).



**Figura 18.** Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *C. spurius* sobre las contracciones inducidas por ACh. **A)** Efecto de ACh (0.1 mM) sobre las contracciones espontáneas del íleon. Efecto de los extractos (10 µg proteína/ml) de: **B)** conductos y **C)** glándulas sobre las contracciones inducidas por ACh y **D)** cuantificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre la contracción inducida por ACh.

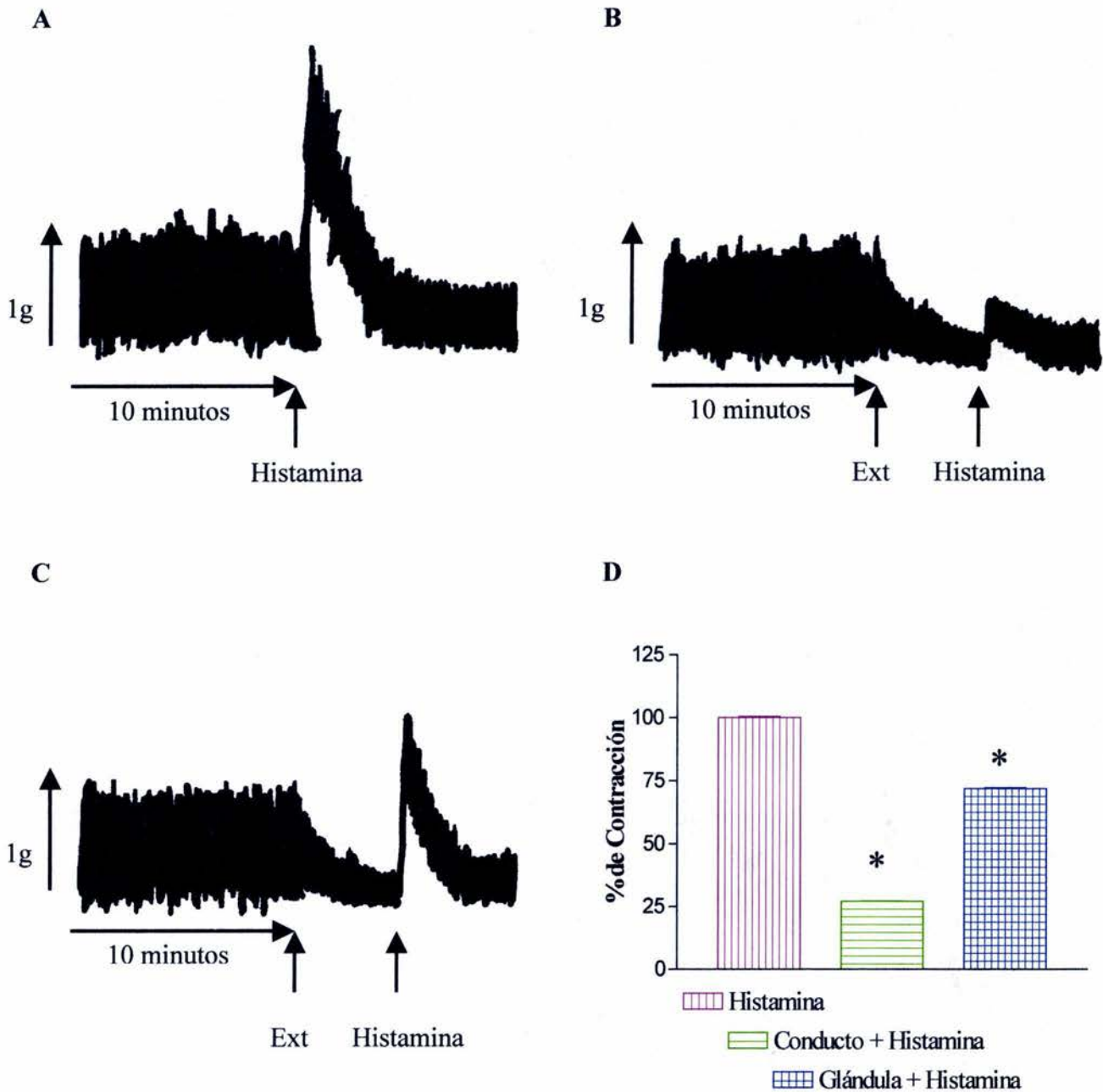
\* Indica si existe una diferencia significativa entre el efecto del control y el efecto de los extractos





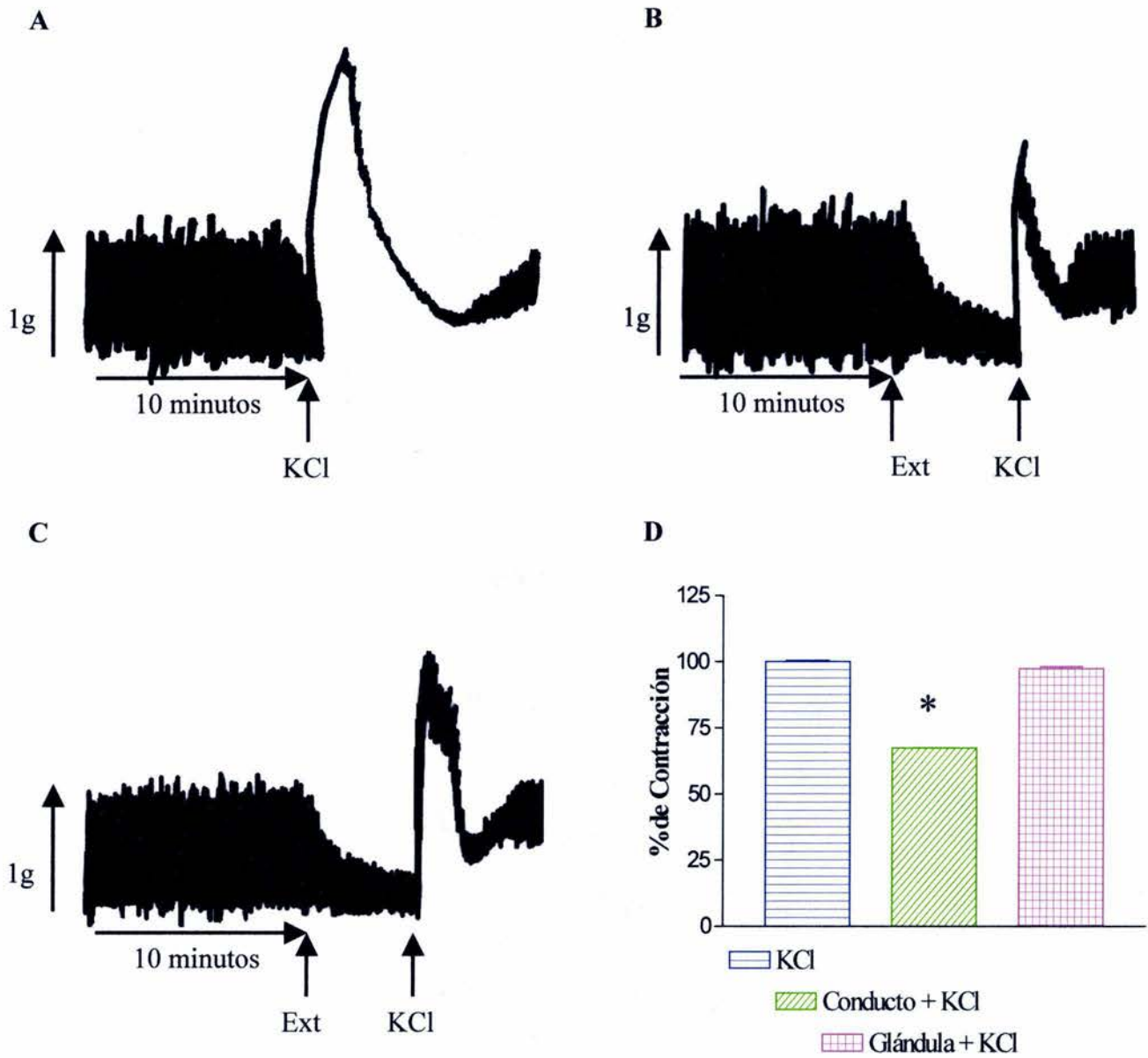
**Figura 19.** Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *C. spurius* sobre las contracciones inducidas por nicotina. **A)** Efecto de nicotina (0.1 mM) sobre las contracciones espontáneas del íleon. Efecto de los extractos (10  $\mu$ g proteína/ml) de: **B)** conductos y **C)** glándulas sobre las contracciones inducidas por nicotina y **D)** cuantificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre la contracción inducida por nicotina.

\* Indica si existe una diferencia significativa entre el efecto del control y el efecto de los extractos



**Figura 20.** Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *C. spurius* sobre las contracciones inducidas por histamina. **A)** Efecto de histamina ( $1 \times 10^{-3}$  M) sobre las contracciones espontáneas del íleon. Efecto de los extractos ( $10 \mu\text{g}$  proteína/ml) de: **B)** conductos y **C)** glándulas sobre las contracciones inducidas por histamina y **D)** cuantificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre la contracción inducida por histamina.

\* Indica si existe una diferencia significativa entre el efecto del control y el efecto de los extractos



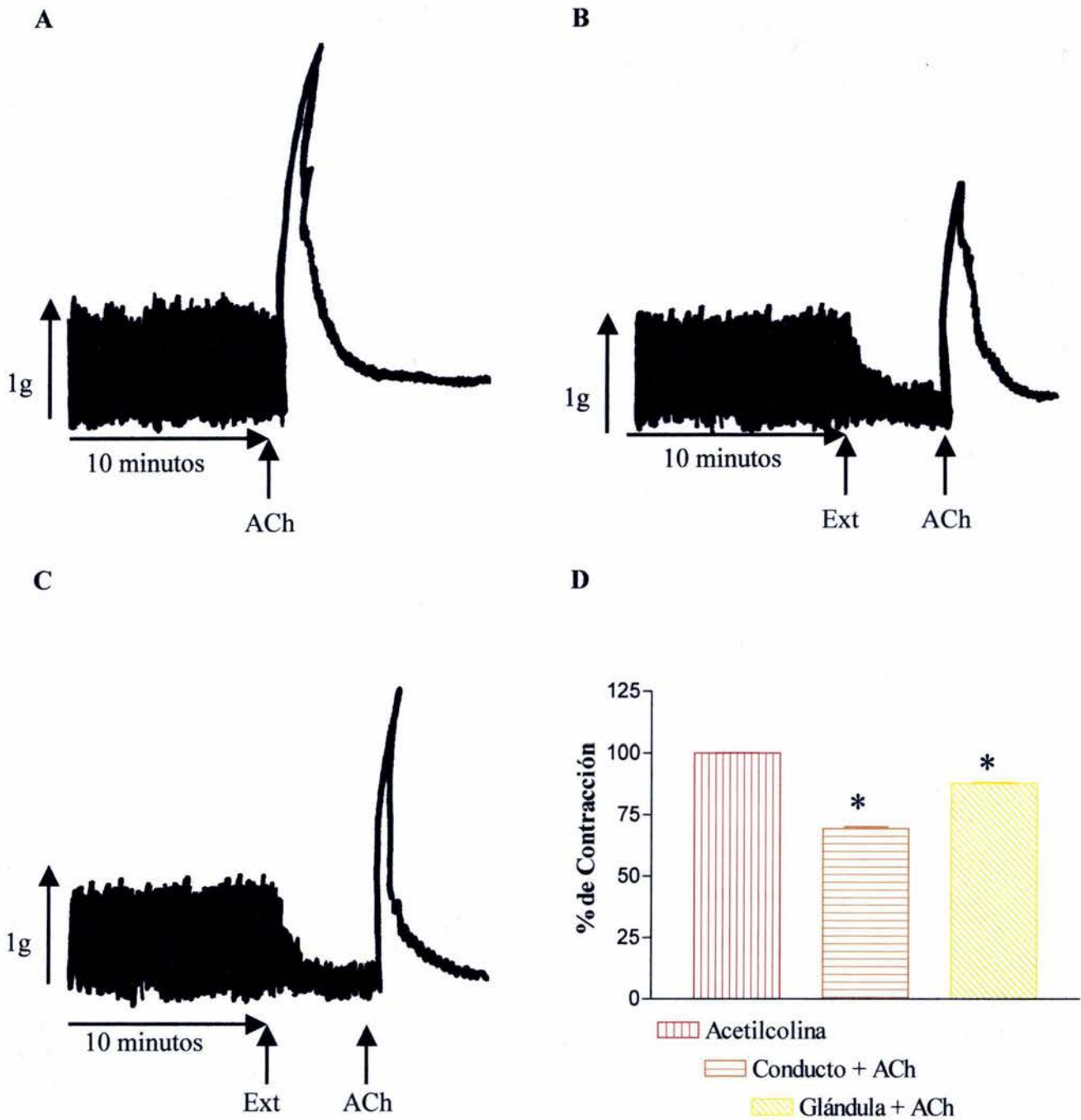
**Figura 21.** Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *C. spurius* sobre las contracciones inducidas por KCl. **A)** Efecto de KCl (60 nM) sobre las contracciones espontáneas del íleon. Efecto de los extractos (10 µg proteína/ml) de: **B)** conductos y **C)** glándulas sobre las contracciones inducidas por KCl y **D)** cuantificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre la contracción inducida por KCl.

\* Indica si existe una diferencia significativa entre el efecto del control y el efecto de los extractos

#### 4.3 DETERMINACIÓN PRELIMINAR DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE GLÁNDULAS Y CONDUCTOS VENENOSOS DE *P. albida*.

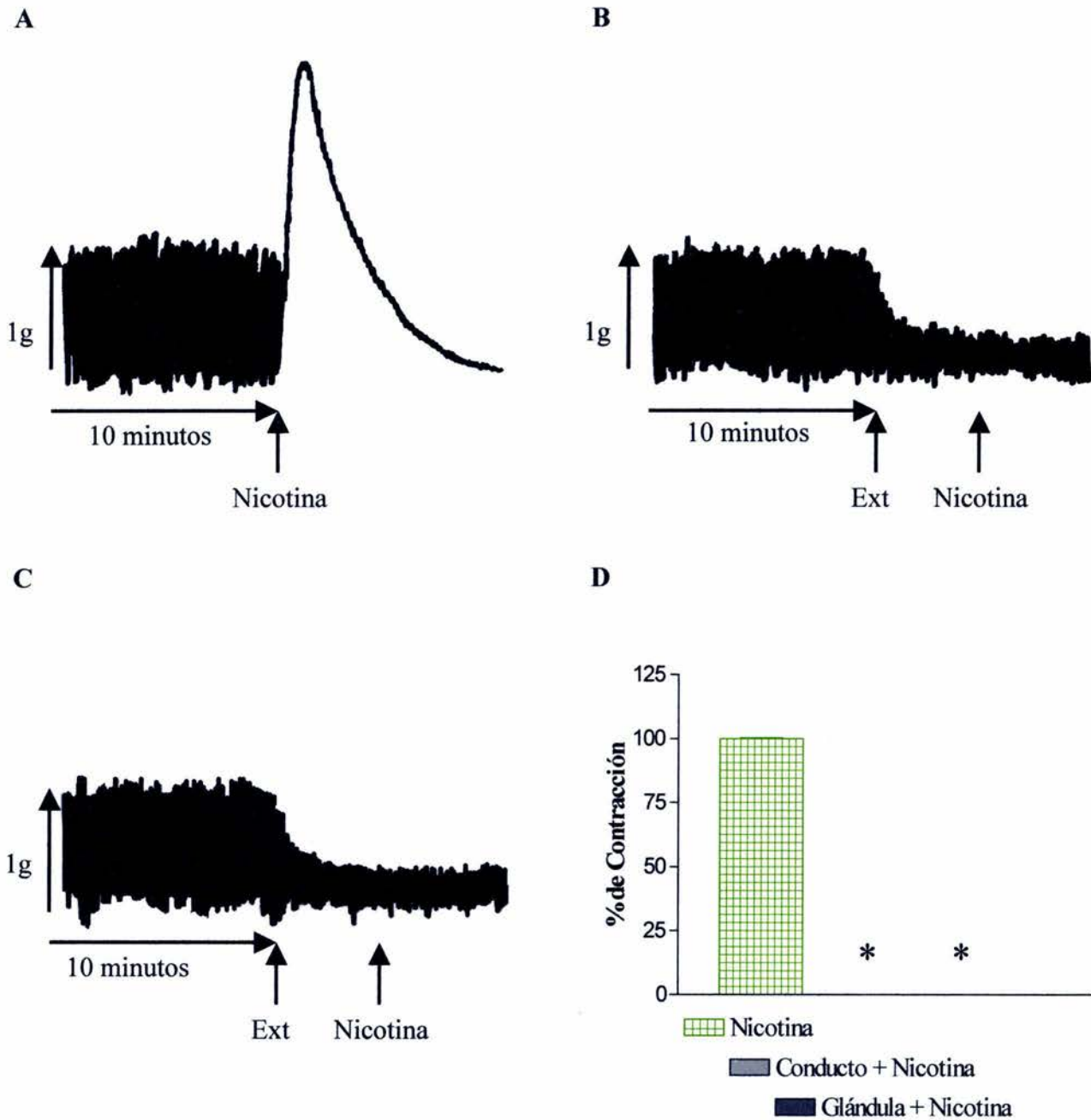
Con el objeto de determinar si los extractos de glándulas y conductos venenosos provenientes de la especie *P. albida* contenían compuestos con propiedades anticolinérgicas, se evaluó la influencia de los extractos sobre las contracciones inducidas por ACh y nicotina. En las Figuras 22 y 23 se muestran los resultados de estos experimentos. Se encontró que ambos extractos inhiben las contracciones producidas por ACh (extracto de glándulas:  $11.89 \% \pm 0.382$  ( $n = 6$ ) de inhibición; extracto de conductos:  $30.34 \% \pm 0.784$  ( $n = 6$ )). También se demostró que los extractos de glándulas y de conductos venenosos provenientes de este caracol bloquean completamente las contracciones inducidas por nicotina en el íleon. Un comportamiento similar se observó en el caso de los experimentos con histamina (Figura 24), en los que se observó que los dos extractos bloquean, de manera significativa, las contracciones generadas por la histamina (extracto de glándulas:  $84.04\% \pm 0.152$  ( $n = 6$ ) de inhibición; extracto de conductos:  $90.16\% \pm 0.152$  ( $n = 6$ ) de inhibición).

En los experimentos realizados para determinar la influencia de los extractos sobre las contracciones inducidas por KCl se observó que el extracto de glándulas inhibe las contracciones provocadas por este agente despolarizante con un porcentaje de  $17.98\% \pm 0.429$  ( $n = 6$ ). Sin embargo, el extracto proveniente del conducto no modifica significativamente las contractilidad del íleon despolarizado con KCl (Figura 25).



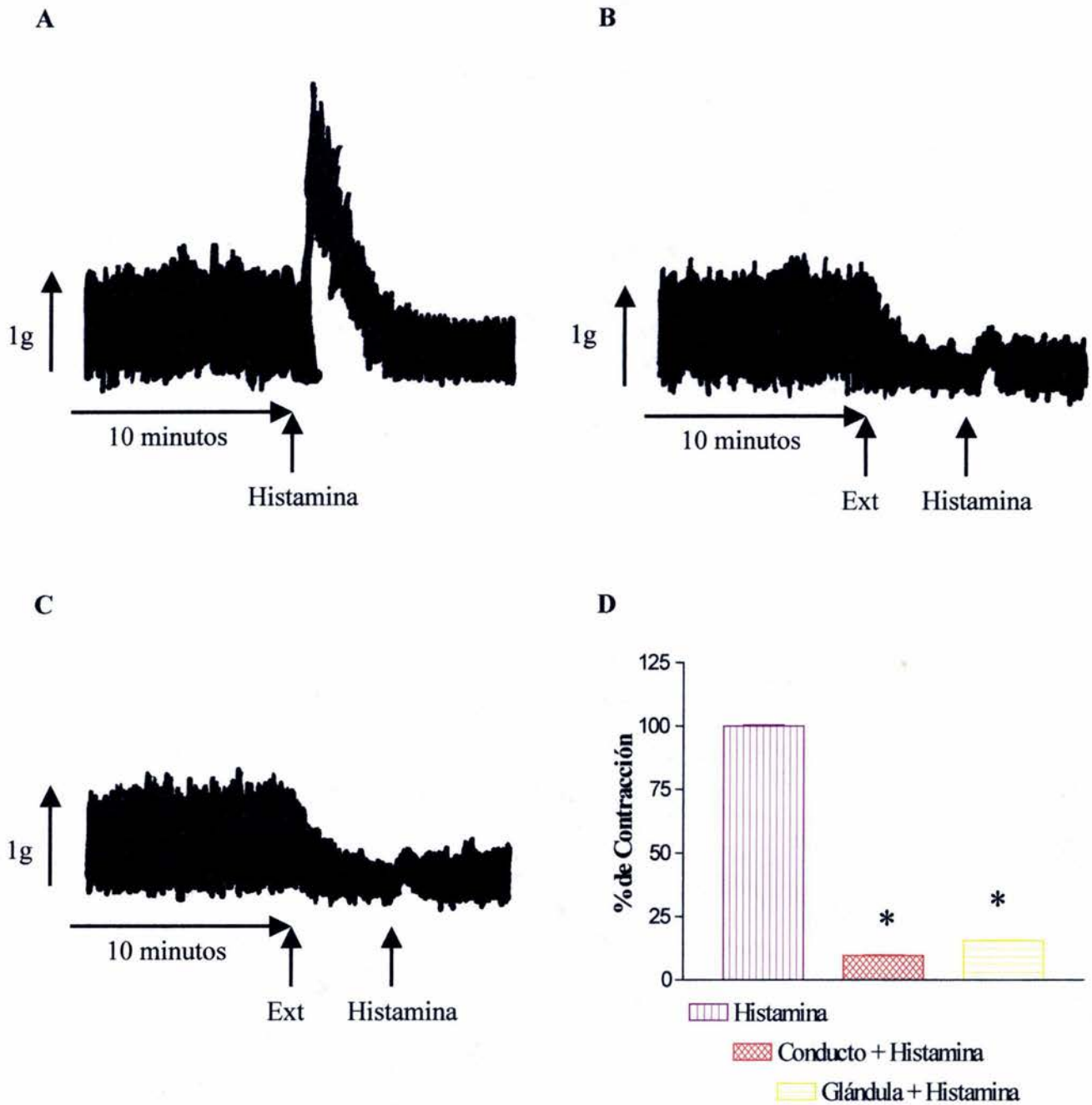
**Figura 19.** Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *P. albida* sobre las contracciones inducidas por ACh. **A)** Efecto de ACh (0.1 mM) sobre las contracciones espontáneas del íleon. Efecto de los extractos (10 µg proteína/ml) de: **B)** conductos y **C)** glándulas sobre las contracciones inducidas por ACh y **D)** cuantificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre la contracción inducida por ACh.

\* Indica si existe una diferencia significativa entre el efecto del control y el efecto de los extractos



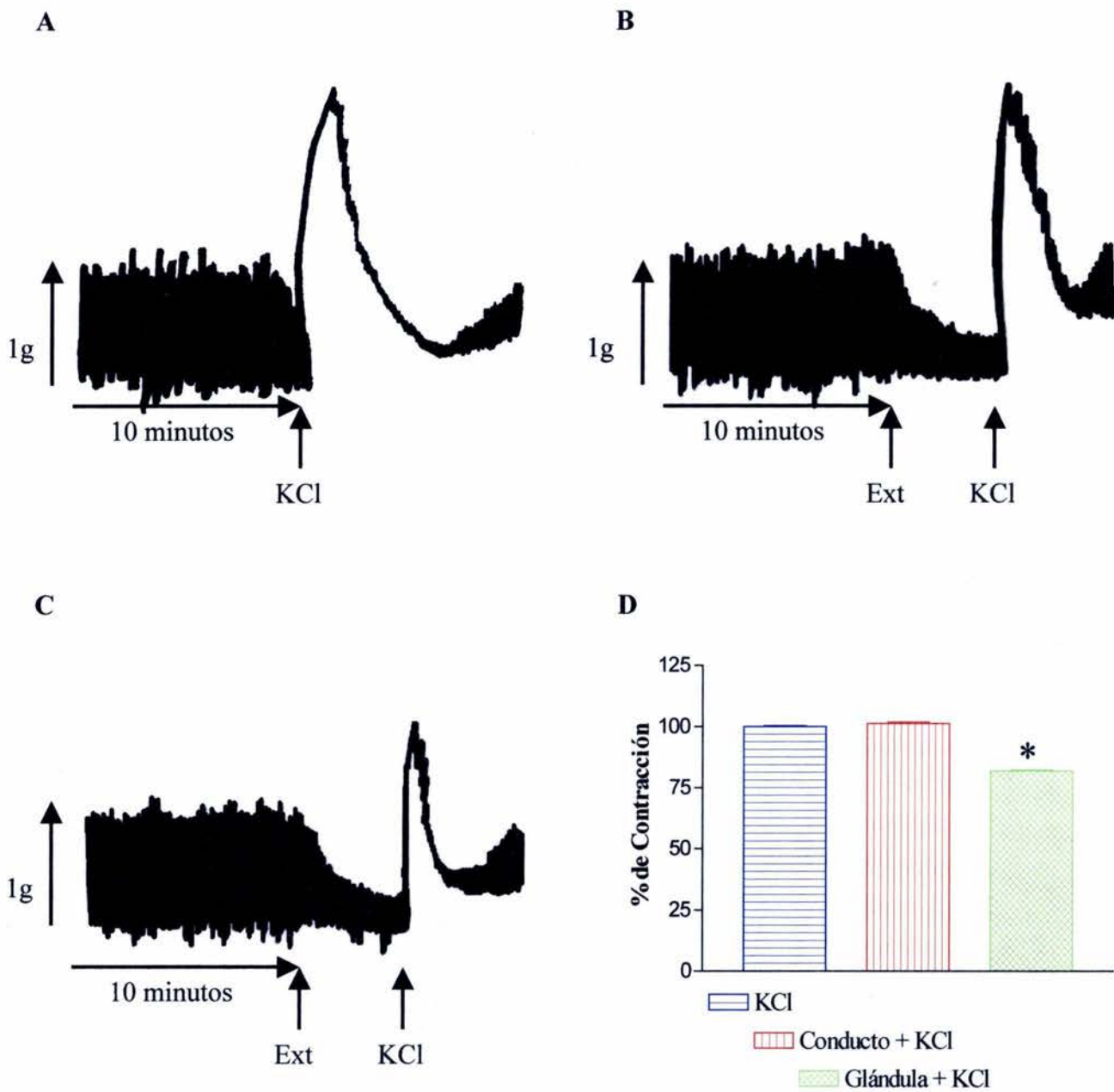
**Figura 20.** Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *P. albida* sobre las contracciones inducidas por nicotina. **A)** Efecto de nicotina (0.1 mM) sobre las contracciones espontáneas del íleon. Efecto de los extractos (10 µg proteína/ml) de: **B)** conductos y **C)** glándulas sobre las contracciones inducidas por nicotina y **D)** cuantificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre la contracción inducida por nicotina.

\* Indica si existe una diferencia significativa entre el efecto del control y el efecto de los extractos



**Figura 21.** Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *P. albida* sobre las contracciones inducidas por histamina. **A)** Efecto de histamina ( $1 \times 10^{-3}$  M) sobre las contracciones espontáneas del íleon. Efecto de los extractos ( $10 \mu\text{g}$  proteína/ml) de: **B)** conductos y **C)** glándulas sobre las contracciones inducidas por histamina y **D)** cuantificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre la contracción inducida por histamina.

\* Indica si existe una diferencia significativa entre el efecto del control y el efecto de los extractos



**Figura 22.** Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *P. albida* sobre las contracciones inducidas por KCl. **A)** Efecto de KCl (60 nM) sobre las contracciones espontáneas del íleon. Efecto de los extractos (10 µg proteína/ml) de: **B)** conductos y **C)** glándulas sobre las contracciones inducidas por KCl y **D)** cuantificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre la contracción inducida por KCl.

\* Indica si existe una diferencia significativa entre el efecto del control y el efecto de los extractos



## DISCUSIÓN

Los productos naturales constituyen una fuente alternativa muy valiosa en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas. Un elevado porcentaje de los medicamentos que se utilizan actualmente contienen principios activos de origen natural, principalmente vegetal. Así mismo, un gran número de sustancias naturales han representado prototipos estructurales para la síntesis de fármacos análogos con mayor actividad biológica (Cordell, 2000). De manera adicional, muchos compuestos naturales se emplean como instrumentos de investigación útiles en el estudio de distintos procesos fisiológicos y/o farmacológicos. En la actualidad, el estudio de los productos naturales constituye un campo de investigación muy importante en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos, como lo demuestra un estudio recientemente realizado por la Agencia de Administración de Alimentos y Fármacos (Food and Drug Administration) de Estados Unidos, en el período de 1983 a 1994, el cual indicó que el 30% de los fármacos aprobados en ese lapso eran productos naturales o sustancias derivadas de ellos (Cragg *et al.*, 1997).

En el caso particular de México, se sabe que nuestro país posee una gran biodiversidad de especies animales y vegetales, que constituye una de las más importantes del mundo, junto con las de Australia y Brasil (Mittermier, 1988). Es bien conocido el hecho de que las aguas territoriales mexicanas albergan una amplia variedad de microorganismos y especies vegetales y animales, muchas de las cuales, ni siquiera han sido identificadas científicamente. Evidentemente, los organismos marinos que comprenden la rica biodiversidad de México constituyen una fuente potencial muy valiosa de compuestos bioactivos de interés farmacológico que merece ser explorado. En este contexto surgió la idea de realizar la presente investigación cuyo objetivo principal era realizar un rastreo farmacológico de gasterópodos marinos de las familias Conidae y Turridae, recolectados en aguas territoriales de México, con el fin de identificar candidatos idóneos para la obtención de compuestos con actividad sobre el sistema nervioso y/o muscular. Las especies seleccionadas fueron *Conus austini*, *C. spurius* y *Polystira albida*.

Las especies se seleccionaron considerando, en el caso de *C. austini* y *C. spurius*, que los gasterópodos marinos de la familia Conidae son famosos por producir venenos que contienen una gran variedad de péptidos neuroactivos cuyas actividades involucran una interacción con canales iónicos y/o receptores a neurotransmisores localizados en las membranas de las células del sistema nervioso y/o muscular. Por otra parte, en el caso de *P. albida*, este caracol se seleccionó considerando que a la fecha no se tiene conocimiento de ningún estudio farmacológico realizado sobre alguna especie de la familia Turridae.

La estrategia de investigación utilizada para la realización del presente trabajo comprendió la evaluación farmacológica de los extractos crudos preparados a partir de las glándulas y los conductos venenosos de las tres especies seleccionadas y la realización de un estudio farmacológico preliminar a fin de proponer un posible mecanismo de acción que explicara el efecto presentado por los extractos. En este trabajo se utilizó el modelo de íleon aislado de cobayo para evaluar el efecto farmacológico de los extractos. Este modelo se utiliza ampliamente en farmacología para la detección de especies bioactivas, así como para el análisis preliminar del mecanismo de acción de sustancias con efecto sobre el sistema nervioso o la musculatura lisa intestinal.

En el presente trabajo se evaluó no sólo el efecto de los extractos de los conductos venenosos, sino también el efecto de los extractos preparados a partir de las glándulas del aparato venenoso de los caracoles. Es importante mencionar que los estudios bioquímicos y/o farmacológicos realizados hasta la fecha con especies de la superfamilia Conacea se han centrado en la investigación de los componentes del veneno que se extrae a partir de los conductos venenosos, ya que hasta la fecha no se sabe a ciencia cierta cual es la función de las glándulas de los caracoles y también se desconoce cual es su participación en la secreción del veneno (Endean and Duchemin, 1967; Freeman *et al.* 1974, Halstead, 1988; Olivera, 1997; Marshall *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos resultados recientemente obtenidos por el grupo de trabajo del Dr. Edgar Heimer (resultados no publicados) sugieren que las glándulas también contienen compuestos bioactivos. Por esta razón, en la presente investigación se decidió explorar también la actividad del extracto preparado a partir de las glándulas en nuestro modelo farmacológico.

En primer término, se evaluó el efecto de los extractos sobre las contracciones espontáneas del íleon. Esta evaluación demostró que los extractos obtenidos a partir de los conductos y glándulas venenosas de las tres especies objeto de estudio inducen una disminución en el tono y la amplitud de las contracciones espontáneas del íleon, de una manera dependiente de la concentración. Las figuras 7, 9 y 11 muestran las curvas concentración-respuesta obtenidas para el efecto inhibitor de los extractos evaluados. A partir de estas curvas se obtuvieron los valores de las  $IC_{50}$  y los valores de potencia se calcularon utilizando como comparación el efecto inhibitor inducido por la tetradotoxina. En el caso de *C. austini*, se observó que los extractos preparados a partir de las glándulas ( $IC_{50} = 0.59 \pm 0.09$   $\mu\text{g}$  de proteína/ml) son más potentes que los extractos de los conductos venenosos ( $IC_{50} = 0.97 \pm 0.06$   $\mu\text{g}$  de proteína/ml). Sin embargo, los extractos preparados a partir de los conductos venenosos de *C. spurius* ( $IC_{50} = 0.47 \pm 0.04$   $\mu\text{g}$  de proteína/ml) y *P. albida* ( $IC_{50} = 0.23 \pm 0.12$   $\mu\text{g}$  de proteína/ml) fueron más potentes que los extractos de las respectivas glándulas (*C. spurius*:  $IC_{50} = 1.11 \pm 0.07$   $\mu\text{g}$  de proteína/ml; *P. albida*:  $IC_{50} = 0.62 \pm 0.28$   $\mu\text{g}$  de proteína/ml). Los resultados de la evaluación farmacológica indicaron que los extractos de los conductos venenosos obtenidos de *P. albida* son los más potentes de todos los extractos evaluados, con una potencia 86 veces menor que la TTX. Por otro lado, los extractos de las glándulas obtenidas de *C. spurius* son los menos potentes, con una potencia 404 veces menor que la TTX.

El diseño experimental incluyó la evaluación de los extractos de glándulas y conductos venenosos obtenidos a partir de seis especímenes de cada especie de caracol, con el objeto de determinar si había diferencias en la actividad farmacológica de los extractos provenientes de glándulas y conductos de diferentes individuos de la misma especie. En estos experimentos no se observó una diferencia significativa entre las respectivas curvas concentración-efecto de los extractos de los conductos obtenidos de los diferentes individuos de las especies evaluadas. Por otra parte, tampoco se observó una diferencia significativa entre las curvas concentración-respuesta obtenidas para los extractos de las glándulas provenientes de diferentes individuos de las dos especies de *Comus*. Sin embargo, las curvas concentración respuesta de los extractos de las glándulas de *P. albida* se distribuyeron en dos grupos, entre los cuales sí se observó una diferencia

significativa. Estos resultados sugieren que no existe variación individual en el contenido de los compuestos relajantes de la musculatura lisa presentes en los conductos venenosos de las especies objeto de estudio. Al parecer tampoco existe variación individual en el contenido de los principios activos presentes en las glándulas de las dos especies de *Comus*. En el caso de los extractos obtenidos de las glándulas de *P. albida*, sí existen diferencias en la actividad farmacológica inducida por los respectivos extractos preparados a partir de los diferentes individuos de prueba. El origen de estas diferencias no se puede determinar con los experimentos realizados. Por esta razón, resulta interesante seguir explorando en este sentido a fin de determinar las causas que justifiquen las variaciones observadas en las potencias de los extractos.

En este punto resulta conveniente mencionar que los resultados que nosotros obtuvimos con relación al efecto relajante de la musculatura lisa inducido por los extractos de los conductos venenosos de las dos especies de *Comus* son novedosos y difieren de las observaciones encontradas en otras investigaciones. En dichos estudios se demostró que los extractos obtenidos de los conductos de *Comus tessulatus* (Kobayashi *et al.*, 1981) y *Comus textile* (Schweitz *et al.*, 1986) generan un aumento en las contracciones inducidas por el íleon aislado de cobayo.

Con el objeto de determinar la naturaleza química de los componentes de los extractos que inducían la relajación del íleon, se realizaron experimentos en los que los extractos se sometieron a ebullición durante 30 min. En estos experimentos se observó que todos los extractos evaluados perdían su actividad espasmolítica después de la ebullición, lo cual sugiere que los componentes bioactivos son de naturaleza peptídica.

La disminución de la contractilidad del íleon originada por los extractos obtenidos de las glándulas y los conductos venenosos de los caracoles, no proporcionaba ninguna información con relación al mecanismo de acción de los componentes bioactivos. El efecto podría ser el resultado de una interferencia con la síntesis, liberación o degradación de los neurotransmisores presentes en el SNE. Pero también podría ser una consecuencia de la interacción directa de los principios activos con los receptores de neurotransmisores,

hormonas o autacoides. Por otra parte, los compuestos podrían estar interaccionando con canales iónicos localizados en las membranas de las células nerviosas y/o musculares. Asimismo, los principios activos podrían estar interfiriendo con los mecanismos de transducción de señales involucrados en el proceso de contracción muscular, por ejemplo modificando la síntesis o acción de los segundos mensajeros que influyen en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , etc. De tal manera, que con la finalidad de iniciar la caracterización farmacológica del mecanismo de acción de los extractos, se decidió investigar su efecto sobre las contracciones del íleon de cobayo inducidas por dos agonistas colinérgicos: la ACh y la nicotina, y también la histamina y el KCl, este último un agente despolarizante que provoca la activación de canales voltaje dependientes en las membranas de las células nerviosas y musculares.

La ACh y la histamina se eligieron debido a que estos neurotransmisores juegan un papel muy importante en el control de la motilidad de la musculatura lisa gastrointestinal y cuentan con una alta población de receptores en el íleon (Babe y Serafin, 1996; Brown y Taylor, 1996; Sanders-Bush y Mayer, 1996).

En el íleon de cobayo se encuentran receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos. Los receptores nicotínicos que hay en este tejido son neuronales (Hille, 1994) y regulan principalmente el flujo de iones sodio, potasio y calcio. En el íleon estos receptores se localizan solamente en las sinapsis neuronales del SNE y no en las sinapsis neuromusculares (Numa *et al.*, 1983). Por otra parte, en el íleon de cobayo se han encontrado dos tipos de receptores muscarínicos, los M2 y los M3. La activación de estos receptores induce contracción de las células musculares gastrointestinales mediante mecanismos diferentes. La activación de los receptores M2, los cuales son los más abundantes receptores muscarínicos en el íleon (Ehlert and Tomas, 1994), provocan la inhibición de la adenilato ciclasa (AC). En tanto que la activación de los receptores M3 aumenta la actividad de la fosfolipasa C, con el subsecuente aumento en la producción de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (Ehlert and Thomas, 1995).

Por su parte, la histamina provoca contracción del íleon por interacción con receptores H1, que son receptores acoplados a proteínas G y cuya activación estimula la PLC. (Bade y Serafin, 1996).

Los experimentos con el KCl se realizaron para observar la posible interferencia de las sustancias responsables del efecto inhibitorio de los extractos en el transporte de sodio y calcio en las membranas neuronales y/o musculares. En condiciones normales, el potasio se encuentra a menor concentración en el exterior de la células que en el interior, al elevarse la concentración de potasio extracelular se induce la despolarización de la membrana celular (Lefkowitz *et al.*, 1996). Esta despolarización origina la activación de canales de Na<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup> voltaje dependientes, dando como resultado un aumento en la entrada de Na<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup> al interior de las neuronas y un incremento en el influjo de calcio en las células del músculo liso.

En las figuras 14, 18 y 22 se presentan los resultados derivados de la evaluación del efecto de los extractos sobre las contracciones del íleon inducidas por ACh. Estos resultados parecen indicar que todos los extractos evaluados contienen compuestos que interfieren en alguno de los pasos involucrados en la neurotransmisión colinérgica o en los mecanismos de transducción mediados por la ACh en el proceso de la contracción muscular.

Los resultados de los experimentos realizados con nicotina permiten proponer algunas hipótesis con relación a este posible mecanismo anticolinérgico. Se observó por ejemplo, que ninguno de los extractos provenientes de *C. spurius* modificaba las contracciones inducidas por nicotina (Figura 19), lo cual sugiere que las sustancias relajantes de la musculatura lisa presentes en los conductos y las glándulas de esta especie no interaccionan con receptores colinérgicos nicotínicos presentes en las neuronas del SNE y es probable que el bloqueo de las contracciones inducidas por ACh se deba a la presencia de sustancias que bloquean receptores colinérgicos muscarínicos M2 y M3 o que interfieren con alguno de los mecanismos de transducción mediados por estos receptores. Estas observaciones resultan interesantes, sobre todo si se considera que a la fecha no se ha

descrito ninguna conotoxina que interaccione con receptores muscarínicos (Olivera and Terlau, 2004). En el caso de los extractos provenientes de *C. austini*, estos extractos sí inhibieron las contracciones generadas por nicotina (Figura 15), sugiriendo que tanto glándulas, como conductos venenosos de esta especie contienen compuestos que podrían estar bloqueando receptores nicotínicos localizados en las membranas neuronales, como en el caso de las conotoxinas  $\alpha$  (Olivera, 1997),  $\alpha A$  (Hopkins *et al*, 1995) y  $\phi$  (Shon *et al.*, 1997). Con relación a los experimentos realizados con los extractos de glándulas y conductos venenosos de *P. albida* resulta bastante notable el hecho de que ambos extractos hayan bloqueado completamente las contracciones producidas por nicotina, sugiriendo muy probablemente la presencia de sustancias bloqueadoras de receptores nicotínicos en glándulas y conductos de este caracol.

En otra serie de pruebas, se evaluó el efecto de los extractos sobre el ileón precontraído con histamina. En todos los casos, se observó una inhibición significativa de las contracciones inducidas por este neurotransmisor (Figuras 16, 20 y 24), siendo notables los bloqueos producidos por los extractos de glándulas (90.16 % de inhibición) y conductos (84.04 % de inhibición) de *P. albida* y del extracto del conducto (76.96% de inhibición) de *C. spurius*. Estos resultados resultan ser bastante novedosos en los organismos de ambos géneros, ya que por una parte, están sugiriendo que *C. spurius* y *C. austini* producen compuestos que interfieren con la neurotransmisión histaminérgica, quizá bloqueando receptores histaminérgicos H1 y/o interfiriendo con alguno de los mecanismos de transducción de señales activados por histamina. Este hecho, de confirmarse, implicaría la existencia de un nuevo grupo de conotoxinas que no se han descrito a la fecha, ya que no se conoce todavía algún compuesto de este tipo que interaccione con receptores histaminérgicos (Olivera and Terlau, 2004) o también podría indicar la presencia de una clase de compuestos antihistamínicos con estructura diferente de las conotoxinas. En el caso de *P. albida*, parece ser que este organismo produce compuestos antihistamínicos que se encuentran en grandes concentraciones en glándulas y conductos venenosos o que son muy potentes.

Finalmente, la siguiente evaluación en la secuencia metodológica planteada para la caracterización farmacológica preliminar de los extractos fue la determinación de su efecto sobre las contracciones del íleon generadas por una alta concentración de KCl. En estas pruebas se encontró que los extractos de glándulas y conductos venenosos de *C. austini* no bloquean las contracciones inducidas por este espasmógeno (Figura 17), indicando que el efecto relajante de la musculatura lisa producido por estos extractos no involucra un bloqueo de canales de  $\text{Na}^+$  o de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes. Curiosamente, los extractos de conductos de *C. spurius* y *P. albida* tampoco inhiben las contracciones inducidas por el KCl, sin embargo, los extractos de glándulas de ambas especies sí bloquean, de manera significativa las contracciones producidas por este agente despolarizante (Figuras 21 y 25). De estas observaciones se pueden proponer algunas hipótesis: Por ejemplo, que es probable la presencia de compuestos que bloquean canales de  $\text{Na}^+$  y/o de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes en las glándulas de *C. spurius* y *P. albida* y al parecer estos compuestos no se encuentran en los conductos venenosos o se encuentran en ellos, pero a concentraciones muy bajas. Se podría especular también que los compuestos bloqueadores de canales de  $\text{Na}^+$  o de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en las glándulas de *C. spurius* son conotoxinas pertenecientes a los grupos de conotoxinas  $\omega$ ,  $\delta$ ,  $\mu$  ó  $\mu\text{O}$ , aunque tampoco se descarta la posibilidad de que sean compuestos diferentes a las conotoxinas. Por otra parte, se desconoce cual podría ser la estructura química de los posibles bloqueadores de canales de  $\text{Na}^+$  y/o de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes presentes en los extractos de glándulas de *P. albida* y lo único que puede sugerirse es que se trata de péptidos y/o proteínas.



## CONCLUSIONES

- ✓ Los extractos obtenidos de glándulas y conductos venenosos de los especímenes evaluados de *C. austini*, *C. spurius* y *P. albida* presentaron un efecto inhibitorio de las contracciones espontáneas de la musculatura lisa intestinal del íleon de cobayo, el cual dependió de la concentración de proteína de los extractos.
- ✓ En el caso de *C. spurius* y de *P. albida*, el extracto de conductos presentó una potencia mayor que el extracto de los glándulas, mientras que en el caso de *C. austini*, el extracto de glándulas resultó ser más potente que el de conductos.
- ✓ Los conductos venenosos obtenidos de *P. albida* son los más potentes de todos los extractos evaluados, con una potencia 86 veces menor que la TTX. Por otra parte, los extractos de las glándulas obtenidas de *C. spurius* son los menos potentes, con una potencia 404 veces menor que la TTX.
- ✓ El efecto de los extractos obtenidos de los conductos de *C. austini*, *C. spurius* y *P. albida*, así como el efecto de los extractos obtenidos de las glándulas de *C. austini* y de *C. spurius*, no mostraron diferencias significativas entre individuos de la misma especie. Solamente, el efecto observado de los extractos obtenidos de las glándulas de *P. albida* mostró diferencias significativas individuales.
- ✓ Los compuestos bioactivos responsables del efecto relajante de la musculatura lisa son muy probablemente de naturaleza proteica y se encuentran presentes en glándulas y conductos. Todos los extractos evaluados contienen compuestos que interfieren en alguno de los pasos involucrados en la neurotransmisión colinérgica o en los mecanismos de transducción mediados por la ACh en el proceso de la contracción muscular. Las contracciones inducidas por histamina fueron inhibidas, de manera significativa, por todos los extractos evaluados. El efecto relajante de la musculatura lisa producido por los extractos de glándulas y conductos venenosos de *C. austini* o por los extractos de conductos de *C. spurius* y *P. albida* no involucra un

bloqueo de canales de  $\text{Na}^+$  o de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes, sin embargo, los extractos de glándulas de las últimas dos especies podrían contener sustancias bioactivas que inhiban estos tipos de canales iónicos. Los extractos evaluados podrían contener diferentes principios activos, los cuales inducen una inhibición de las contracciones espontáneas de la musculatura lisa intestinal del íleon de cobayo, vía mecanismos moleculares tan diversos tales como la inhibición de receptores ACh nicotínicos y muscarínicos, o el bloqueo de receptores histaminérgicos y de canales de  $\text{Na}^+$  o de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes.

## REFERENCIAS

Abbot, R. T. y Dance, S. P. 1990. Compendium of Seashells, 4th Edition, E. P. Dutton, Inc., New York, USA. pp 267.

Adams, M. E. y Olivera, B.M. 1994. Neurotoxins: overview of an emerging research technology. *TINS*. **17**, 151-155.

Andrew, P., Somlyo, A. P., Somlyo A. V. 2003. Calcium sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases and myosin phosphatase. *Physiol. Rev*, **83**, 1325-1385.

Andriantsitohaina, R., Lagaud, G.J., Andre, A., Muller, B., Stoclet. J.C. 1995. Effects of cGMP on calcium handling in Atp-stimulated rat resistance arteries. *Am. J. Physiol.* **268**, H1223-H1231.

Bade, K.S., Serafin, W.E. 1996. Histamina, brancidina y sus antagonistas. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª ed. Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Ed. McGraw-Hill interamericana, México: 621-641.

Bajalliedh, S. M., Scheller, R. H. 1995. The biochemistry of neurotransmitter secretion. *J. Biol. Chem.* **270**, 1971-1975.

Balaji, R. A., Ohtakes, A., Kazuki, S., Gopalakrishnakone, P., Kini, R. M., Tong-Seow, K, Bay, B. H. 2000.  $\lambda$ -conotoxins, a new family of conotoxins with unique disulphide pattern and protein folding. *J. Biol. Chem.* **275**, 39516-39522.

Bark, I. C., Wilson, M. C. 1994. Regulated vesicular fusion in neurons: snapping together the details. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 4621-4624.

Beckeile, M. C. 1998. Spatial control of actin filament assembly: lessons from *Listeria*. *Cell*. **95**, 741-748.

Berridge, M. J. e Irvine, R. F. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. **341**, 197-205.

Bertrand, D., Changeaus, J. P. 1995. Nicotinic receptor: an allosteric protein specialized ofr intercellular communication. *Semin. Neurosci*. **7**, 75-91.

Brookes, S. J. 2001. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat. Rec*. **262**, 58-60.

Brown, J.H. y Taylor, P. 1996. Agonistas y antagonistas de los receptores muscarínicos. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª ed. Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Ed. McGraw-Hill interamericana. México: 149-169.

Carrier, G. O., Fuchs, L. C., Winecoff, A. P., Giulumian, A. D., White, R. E. (1997). Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Caactivated K channels. *Am. J. Physiol*. **273**, H76-H84.

Caufield, M.P. 1993. Muscarinic receptors: characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther*. **58**, 319-379.

Cordell, G.A. 2000 Biodiversity and drug discovery--a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, **55**, 463-480.

Coscoy, D., Lingueglia, E., Lazdunski, M., Barbry, P. 1998. The Phe-Met-Arg-Phe-amide-activated sodium channel is a tetramer. *J. Biol. Chem*. **273** (14), 8317-8322.

Costa, M., Brookes, S., Hennig, G. W. 2000. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*. **47** (Suppl. IV), iv15-iv19.

Costa, M., Brookes, S., Steele, P. A., Gibbins, I., Burcher, E., Kandiah, C. J. 1996. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea pig ileum. *Neuroscience*. **75** (3), 949-967.

Cragg, G.M., Newman, D.J. and Snader, K.M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* **60**, 52-60.

Craing, A. G., Andyopadhyay, P., Olivera, B. M. 1999b. Posttranslationally modified neuropeptides from *Comus* venoms. *Eur. J. Biochem.* **254**, 271-275.

Craing, A. G., Norberg, T., Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., Low, W., Dykkert, J., Richelson, E., Navarro, V., Mazella, J., Watkins, M., Hillyard, D., Imperial, J., Cruz, L. J., y Olivera, B. M. 1999a. Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. *J. Biol. Chem.* **274**, 13752-13759.

Cumiskey, W. R., Feigenson, M. E. 1983. Spasmolytic activity of cinnamedrina and papaverine in isolated rat uterine muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* **263**, 113-119.

DeLanerolle, P., Nishikawa, M., Yost, D.A., Adelstein, R.S. 1984. Increased phosphorylation of myosin light chain kinase after an increase in cyclic AMP in intact smooth muscle. *Science Wash DC.* **223**, 1415-1417.

Dogiel, A. S. 1899. Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere. *Arch. Anat. Physiol. Leipzig, Anat. Abt. Jg.* **1899**, 130-158.

Ebashi, S., Ebashi, F., Kodama, A. 1967. Troponin as the calcium receptive protein in the contractile system. *J. Biol. Chem.* **62**, 137-138.

Ehlert, F.J., and Thomas, E.A. 1994. Functional role of M2 muscarinic receptors in the guinea pig ileum. *Life Sci.* **56**: (11-12); 965-971.

Ehlert, F.J., Thomas, E.A. 1995. Functional role of M2 muscarinic receptor in the guinea pig ileum. *Life Sci.* **56**, 965-971.

Ehrlich, B. E., Watras, J. 1988. Inositol 1,4,5-triphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature.* **336**, 583-586.

Endean, R., and Duchemin, C. 1967. The venom apparatus of *Conus magus*. *Toxicon* **4**, 275-284

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**, 575-578.

Fainzilber, M., Nakamura, T., Lodder, J. C., Zlotikin, E., Kits, K. S., Burlingame, A. L. 1998.  $\gamma$ -conotoxin-PnVIIA, a  $\gamma$ -carboxyglutamate-containing peptide agonist of neuronal pacemaker cation currents. *Biochemistry.* **37**, 1470-1477.

Freeman, S.E., Turner, R.J., & Silva, S.R. 1974. The venom and venom apparatus of the marine gastropod *Conus striatus* Linne. *Toxicon*, **12**, 587-592

Furness, J. B. & Costa, M. 1987. The Enteric Nervous System. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Furness, J. B. 2000. Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* **81**, 87-96.

Furness, J. B., Kunze, W. A., Bertrand, P. P., Clerc, N., Bornstein, J. C. 1998. Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog. Neurobiol.* **54**, 1-18.

Furness, J. B., Johnson, P. J., Pompolo, S., Bornstein, J. C. 1995. Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanism in the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil.* **7**, 89-96.

Furness, J. B., Pompolo, S., Murphy, R., Giraud, A. 1989. Projections of neurons with neuromedin U-like immunoreactivity in the small intestine of guinea-pig. *Cell. Tissue. Res.* **257**, 415-422.

Furukawa, K., Ohshima, N., Tawada-Iwata, Y., Shigekawa, M. 1991. Cyclic Gmp stimulates  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* **266**, 12337-12341.

Gabella, G. 1987. Structure of muscles and nerves of the gastrointestinal tract. In: Johnson L. R., Christensen, J., Jackson, M. J., Jacobson, E. J., Walsh, J. H. eds. *Physiology of the gastrointestinal tract*. New York Raven Press. 335-382.

Gabella, G. 2001. Development and ageing of intestinal musculature and nerves: the guinea-pig taenia coli. *J. Neurocytol.* **30**, 733-766.

Gallagher, P. J., Herring, B. P., Stull, J. T. 1997. Myosin light chain kinases. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* **18**, 1-16.

Galligan, J. J., Le Pard, K. J., Schneider, D. A., Zhou, X. 2000. Múltiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmiión in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* **81**, 97-103.

García-Añoveros, J., Derfler, B., Neville-Golden, J., Hyman, B. T, Corey, D. P. 1997. BnaC1 and BnaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. **94**, 1459-1464.

Gerhrmann, J., Alewood, P. F., Craik, D. J. 1998. Structure determination of the three disulfide bond isomers of  $\alpha$ -conotoxin GI: a model for the role of disulfide bonds in structural stability. *J. Mol. Biol.* **278**, 401-415.

Gershon, M. D., Kirshgessner, A. L., Wade, P. R. 1994. Functional anatomy of the enteric nervous system. In: Johnson, L. R., Alpers, D. H., Jacobson, E. E., Walsh, J. H. (Eds.). *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, 381-422.

Gibbs, W. W. 1996. A new way to spell relief: Venom, a toxin from killer sea snails promises a better painkiller. *Scientific American*. **274**, 20-21.

Granger, S. E., Hollingworth, M. Y., Weston, A. H. 1986. Effects of calcium antagonists on tension development and calcium influx in rat uterus. *Brit. J. Pharmacol.* **87**, 147-156.

Grider, J. R., Jin, J. G. 1994. Distinct populations of sensory neurons mediate the peristaltic reflex elicited by muscle stretch and mucosal stimulation. *J. Neurosci.* **14**, 2854-2860.

Guyton, A. C., Hall, J. E. 1997. Principios generales de la función gastrointestinal: motilidad, control nervioso y circulación sanguínea. En: Tratado de fisiología médica. 9ª ed. McGraw-Hill Interamericana, New York: 859-869.

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

Halstead, B.W. 1988. Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. Darwin Press. Princeton, NJ. Pp. 243-263

Hasler, W. L. 1994. Motility of the small intestine. In *Textbook of Gastroenterology*, ed. YAMADA, T., pp. 207-233. Lippincott, Philadelphia.



Haynes, D. H. y Mandveno, A. 1987. Computer modeling of  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase or sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* **67**, 244-284.

Heller, W. T., Krueger, J. K., Trehwella, J. 2003. Further insights into calmodulin-myosin light chain kinase interaction from solution scattering and shape restoration. *Biochemistry.* **42**, 10579-10588.

Higshmith, S. 1999. Lever arm model of force generation by actin-myosin-ATP. *Biochemistry.* **38**, 9791-9797.

Hille, B. 1992. Ionic Channels of Excitable Membranes. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Chapters 1-8, 16-20.

Hille, B. 1994. Modulation ion channels function by G-protein coupled receptors. *Trends Neurosci.* **17**: 531-535.

Himpens, B. y Somlyo, A.P. 1988. Free-calcium and force transients during depolarization and pharmacomechanical coupling in guinea-pig smooth muscle. *J. Physiol. Lond.* **395**, 507-530.

Holzer, P., Schicho, R., Holzer-Petsche, U., Lippe, I. T. 2001. The gut as a neurological organ. *Wiener Klin. Wochenschr.* **113**, 647-660.

Hopkins, C., Grilley, M., Shon, K. J., Gruz, L. J., Gray, V. R., Dykert, J., Rivier, J., Yoshikami, B., Olivera, B. M. 1995. A new family of *Comus* peptides targeted to the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 22361-22367.

Huang, R., Li, L., Guo, H., Wang, C.L. 2003. Caldesmon binding to actin is regulated by calmodulin and phosphorylation via different mechanisms. *Biochemistry.* **42**, 2513-2523.

Huxley, H. E. 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science.* **164**, 1356-1366.

Inestrossa, N. C. and Perlman, A. 1989. Distribution and anchoring of molecular forms of acetylcholinesterase. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 325-329.

Kamm, K. E. y Stull, J. T. 1985. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **25**, 593-620.

Kamm, K. E. y Stull, J. T. 1989. Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu. Rev. Physiol.* **51**, 299-313.

Kamm, K. E. y Stull, J. T. 2001. Dedicated myosin lighth chain kinases with diverse cellular functions. *J. Biol. Chem.* **276**, 4527-4530.

Kobayashi, J., Nakamura, H., Ohizumi, Y. 1981. Biphasic mechanical responses of the guinea pig isolated ileum to the venom of the marine snail *Comus striatus*. *Br. J. Pharmac.* **73**, 583-585.

Kobayashi, J., Nakamura, H., Ohizumi, Y. 1983. Excitatory and inhibitory effects of a Myotoxin from *Comus magus* Venom on the mouse diaphragm, the guinea pig atria, taenia caeci, ileum and vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* **86**, 283-286.

Kobayashi, J., Ohizumi, Y., Nakamura, H., and Hirata, Y. 1981. Pharmacological study on the venom of the marine snail *Comus textile*. *Toxicon.* **19**, (6); 757-762

Kohn, A. 1956. Piscivorous gastropods of the genus *Comus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. **42**, 168-171.

Kohn, A. J., Nybakken, J. W., Van Mol, J. J. 1972. Radula tooth structure of the gastropod *Comus imperialis* elucidated by scanning electro microscopy. *Science*, **176**, 49-51.

Komalavilas, P. y Lincoln, T.M. 1996. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J. Biol. Chem.* **271**, 21933-21938.

Krebs, E.G. 1972. Protein kinases. *Curr Top Cell Regul.* **5**, 99-133.

Kunze, W. A. A., Clerc, N., Bertrand, P. P., Furness, J. B. 1999. Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea -pig myenteric neurons. *J. Physiol.* **517**, 547-561.

Kunze, W. A. A., Furness, J. B., Bertrand, P. P. & Bornstein, J. C. 1998. Intracellular recording from myenteric neurons of the guinea-pig ileum that respond to stretch. *Journal of Physiology.* **506**, 827-842.

Kymura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-Kinase). *Science.* **273**, 245-248.

Langley, J. N. 1921. The autonomic nervous system. Part I. W. Heffer, editor. Cambridge.

Lee, M.R., Li, L., Kitazawa, T. 1997. Cyclic Gmp causes Ca<sup>2+</sup> desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J. Biol. Chem.* **272**, 5063-5068.

Li, L., Eto, M., Lee, M., Morita, R., Yazawa, M., Kitazawa, T. 1998. Possible involvement of the novel CPI-C17 protein in protein kinase C signal transduction of rabbit arterial smooth muscle. *J. Physiol.* **508**, 871-881.

Liu, H., Xiong, Z., Sperelakis, N. 1997. Cyclic nucleotides regulate the activity of L-type calcium channels in smooth muscle cells from rat portal vein. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1411-1421.

Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U., De Jonge, H.R. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sc.* **22**, 307-312.

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**, 401-407.

Marco, N., Stinus, L., Allar, M., Le Moal, M. y Simonet, G. 1995. Neuropeptide FLFQRFamide receptors within the ventral mesencephalon and dopaminergic terminal areas: localization and functional antiopioid involvement. *Neuroscience.* **64**(4), 1035-1044.

Marshall, J., Kelley, W.P., Rubakhin, S.S., Bingham, J.P., Sweedler, J.V., and Gilly W.F. 2002. Anatomical Correlates of Venom Production in *Conus californicus*. *Biol. Bull.* **203**, 27-41.

McIntosh, J. M., Foderaro, T. A., Li, W., Ireland, C. M., Olivera, B. M. 1993. Presence of serotonin in the venom of *Conus imperialis*. *Toxicon.* **31**, 1561-1566.

McIntosh, J. M., Hasson, A., Spira, M. E., Gray, W. R., Li, W., Marshc, M., Hillyard, D. R., Olivera, B. M. 1995. A new family of conotoxins that block voltage-gated sodium channels. *J. Biol. Chem.* **270**, 16796-16802.

Miljanich, G. P. 1997. Venom peptides as humans pharmaceuticals. *Science and Medicine.* **4**(5), 6-15.

Miller, J. A. 1989. The toxoglossan proboscis: structure and fuction. *J. Moll. Stud.* **55**, 167-181.

Mittermier, R.A. 1988. Biodiversity. In eds., E.O.W. a. F.M.P. (ed.), *Primate diversity and the tropical forest*. National Academy Press, Washinton, D. C., pp. 145-154.

Murthy, K. S. y Makhlouf, G. M. 1995. Interaction of cA-kinase and cG-kinase in mediating relaxation of dispersed smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **268**, C171-C180.

Myers, R. A., Cruz, L, J., Rivier, J. E., Olivera, B. M. 1993. *Conus* peptides as chemical probes for receptors and ion channels. *Chem. Rev.* **93**, 1923-1936.

Nakanishi, S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implication for brain function. *Science.* **258**, 597.

Nielsen, D. B., Dykert, J., Rivier, J. E., McIntosh, J. M. 1994. Isolation of Lys-conopressin-G from the venom of the worm-hunting snail *Conus imperialis*. *Toxicon.* **23**(2), 277-282.

Nishizuka, Y. 1988. The molecular heterogenety of protein kinase C and its aplications for cellular regulation. *Nature.* **334**, 661-665.

Noda, M., Yasuda-Fukazawa, C., Moriishi, K., Kato, T., Okuda, T., Kurukawa, K. 1995. Involvement of rho in GTP $\gamma$ S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS lett.* **367**, 246-250.

Numa, S., Noda, M., Takahasi, H., Tanabe, T., Toyosoto, M., Furatani, Y., Kikyotani, S. 1983. Molecular structure of the nicotinic acetylcholine receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **48**, 57-69.

Olivera, B. M. 1997. Conus venom peptides, receptor and ion channel targets and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Molecular Biology of the cell.* **8**, 2101-2109.

Olivera, B. M. 1999. The subfamily Turrinae in the Philippines: the genus *Turris* (Roding, 1798).

Olivera, B. M. y Cruz, L. J. 2000. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon*. **39**, 7-14.

Olivera, B. M., Gray, W. R., Zeikus, T., McIntosh, J. M., Varga, J., Rivier, J., de Santos, V., Cruz, L. J. 1985. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science*. **230**, 1338-1343.

Olivera, B. M., Rivier, J., Clark, C., Ramilo, C., 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**, 257-263.

Olivera, B. M., Rivier, J., Scott, J. K., Hillyard, D. R., Cruz, L. J. 1991. Conotoxins. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22067-22070.

Orstavik, S., Solberg, R., Taskén, K., Nordahl, M., Altherr, M.R., Hansson, V., Jahnsen, T., Sandberg, M. 1996. Molecular cloning, cDNA structure, and chromosomal localization of the human type II cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* **220**, 759-765.

Ozaki, H., Satoh, T., Karaki, H., Ishida, Y. 1988. Regulation of metabolism and contraction by cytoplasmic calcium in the intestinal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **263**, 14074-14079.

Ozaki, H., Stevens, R.J., Blondfield, D.P., Publicover, N.G., Sanders, K.M. 1991. Simultaneous measurement of membrane potential, cytosolic Ca<sup>2+</sup>, and tension in intact smooth muscles. *Am. J. Physiol.* **260**, C917-C925.

Rayment, I. 1996. The structural basis of the myosin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 15850-15853.

Rigby, A. C., Lucas-Meunier, E., Lalume, D. E., Czenwiec, E., Hambe, B., Dahlqvist, I., Fossier, P., Baux, G., Roepstorff, P., Baleja, J. D., Furie, B. C., Stenflo, J. 1999. A conotoxin from *Comus textile* with unusual protranslational modifications reduces presynaptic  $Ca^{2+}$  influx. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*. **96**, 5758-5763.

Rojas, A., Cruz, S., Rauch, V., Bye, R., Mata, R. 1995. Spasmolytic potential of some plants used in mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders, *Phytomedicin*. **2**, 51-55.

Rojas, A., Torres, M., Rojas, J. I., Feregrino, A., Heimer- de la Cotera, E. 2002. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon*. **40**, 777-785.

Ruiz-Velasco, V., Zhong, J., Hume, Jr., Keef, K.D. 1998. Modulation of  $Ca^{2+}$  channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res*. **82**, 557-565.

Ruth, P., Wang, G. X., Boehhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H., Hofmann, F. 1993. Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**, 2623-2627.

Sabine, B., Willenbrock, R., Haase, H., Karczewski, P., Wallukat, G., Dietz, R., Krause, E.G. 1995. Cyclic Gmp-mediated phospholamban phosphorylation in intact cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. **214**, 75-80.

Samuelsson G. 1990. Assays for Pharmacological Activity: Non-Specific Assays. In: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol 6, Acaedmic Press, Great Yarmouth, Norfolk, 261-280.

Samuelsson, G. 1991. Assays for pharmacological activity: Non-specific assays. En: *Methods in plant biochemistry*. Dey, P.M., Harborne, J.B., Ed. Academic Press, Norfolk: vol 6, 261-280.

Sanders-Bush, E., Mayer, S.E. 1996. Agonistas y antagonistas de los receptores de 5-hidroxitriptamina. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ª ed. Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Ed. McGraw-Hill interamericana, México: 265-280.

Sargent, P. B. 1993. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **16**, 403-443.

Schweitz, H., Renaud, J.F., Randimbivololona, N., Preau, C., Schmid, A., Romey, G., Rakotovaq, L., and Lazdunski, M. 1986. Purificación, subunit structure and pharmacological effects on cardiac and smooth muscle cells of a polypeptide toxin isolated from the marine snail *Comus tessulatus*. *Eur. J. Biochem.* **161**, 787-792

Segura, L., Burnett, J. W., Heimer-de la Cotera, E. 1999. Adult *Limuche unguiculata* (thimble jellyfish) can cause seabathers eruption. *Dermatology.* **198**, 171-172.

Shon, K. J., Grilley, M. M., Marsh, M., Yoshikami, D., Hall, A. R., Kurz, B., Gray, W. R., Imperial, J. S., Hillyard, D. R., Olivera, B. M. 1995. Purification, characterization, synthesis and cloning of the lockjaw peptide from *Comus purpurascens* venom. *Biochem.* **34**, 4913-4918.

Shon, K. J., Grilley, M., Jacobsen, R., Cartier, E., Hopkins, C., Gray, W. R., Watkins, M., Hillyard, D. R., Rivier, J., Torees, J., Yoshikami, D., Olivera, B. M. 1997. A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Comus purpurascens* venom. *Biochemistry.* **36**, 9581-9587.



Silver, P. y Disalvo, J. 1979. Adenosine 3':5'-monophosphate-mediated inhibition of myosin light chain phosphorylation in bovine aortic actomyosin. *J. Biol. Chem.* **254**, 9951-9954.

Smith, C. W., Pritchard, K., Martson, S.B. 1987. The mechanism of Ca<sup>2+</sup> regulation of vascular smooth muscle thin filaments by caldesmon and calmodulin. *J. Biol. Chem.* **262**, 116-122.

Somlyo, A.P. y Somlyo, A.V. 1994. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* **372**, 231-236.

Szpacenko, A., Wagner, J., Dabrowska, R., Ruegg, J.C. 1985. Caldesmon-induced inhibition of ATPase activity of actomyosin and contraction of skinned fibres of chicken gizzard smooth muscle. *FEBS Lett.* **192**, 9-12.

Tamaoki, J., Tagaya, E., Nishimura, K., Isono, K., Nagai, A. 1997. Role of Na(+)-K+ ATPase in cyclic Gmp-mediated relaxation of canine pulmonary artery smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* **122**, 112-116.

Tamura, N., Itoh, H., Ogawa, Y., Nakagawa, O., Harada, M., Chun, T.H., Suga, S., Yoshimasa, T., Nakao, K. 1996. cDNA cloning and gene expression of human type I $\alpha$  cGMP-dependent protein kinase. *Hypertension.* **27**, 552-557.

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

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

Torres, M., Aguilar, M., Falcón, A., Sánchez, L., Radwan, F., Burnett, J., Heimer-de la Cotera, E., Arellano, R. O. 2001. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon*. **39**, 1297-1307.

Weisbrodt, N.W. 1987. Physiology of the gastrointestinal tract. 2<sup>a</sup> ed. Raven press, New York: 1987:632.

Wendt ,T., Taylor, D., Trybus, K.M., Taylor, K. 2001. Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2. *Biochemistry*. **98**, 4361-4366.

West D. J., Andrews E. D., Bowman D., McVean A. R., Thornclyke M. C. 1996. Toxins from some poisonous and venomous marine snail. *Comp. Biochem. Physiol.* **113C**, 1-10.

Williamson, M. E., Ukako, T. D. and Evans, J. F. 1996. Pharmacological methods in phytotherapy research. Selection, preparation, and pharmacological evaluation of plant material. John Wiley and Sons, New York, 1-46.

Yoshida, Y., Cai, J.Q., Imai, S. 1992. Plasma membrane Ca(2+)-pump Atpase is not a substrate for cGMP-dependent protein kinase. *J. Biochem. (Tokyo)*. **111**, 559-562.

## INDICE DE FIGURAS

No.	DESCRIPCION	PÁGINA
1	Familias que conforman la Super Familia <i>Conacea</i>	3
2	Esquema del tracto gastrointestinal del cobayo	9
3	Interacción entre los filamentos de actina y miosina para el mecanismo de contracción muscular	11
4	Composición de la Miosina II	12
5	Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. austini</i> , <i>C. spurius</i> y <i>P. albida</i> sobre las contracciones espontáneas de íleon aislado de cobayo	33
6	Recuperación de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo después del lavado de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. austini</i>	34
7	Curvas concentración respuesta del efecto relajante de los extractos de glándulas y conductos de <i>C. austini</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo	35
8	Recuperación de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo después del lavado de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. spurius</i>	38
9	Curvas concentración respuesta del efecto relajante de los extractos de glándulas y conductos de <i>C. spurius</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo	39
10	Recuperación de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo después del lavado de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>P. albida</i>	43
11	Curvas concentración respuesta del efecto relajante de los extractos de glándulas y conductos de <i>P. albida</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo	44
12	Efecto de los extractos de conductos venenosos de las tres especies evaluadas sobre la musculatura lisa antes y después de ser	48

sometidos a condiciones desnaturalizantes (98°C por 30 min)

- |    |                                                                                                                                                                                     |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 13 | Efecto de los extractos de glándulas de las tres especies de evaluadas sobre la musculatura lisa antes y después de ser sometidos a condiciones desnaturalizantes (98°C por 30 min) | 49 |
| 14 | Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. austini</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por acetilcolina                      | 52 |
| 15 | Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. austini</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por nicotina                          | 53 |
| 16 | Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. austini</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por histamina                         | 54 |
| 17 | Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. austini</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por KCl                               | 55 |
| 18 | Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. spurius</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por acetilcolina                      | 57 |
| 19 | Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. spurius</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por nicotina                          | 58 |
| 20 | Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. spurius</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por histamina                         | 59 |
| 21 | Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. spurius</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por KCl                               | 60 |
| 22 | Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>P. albida</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por acetilcolina                       | 62 |
| 23 | Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>P. albida</i> sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por nicotina                           | 63 |

- 24 Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *P. albida* sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por histamina 64
- 25 Efecto de los extractos de glándulas y conductos venenosos de *P. albida* sobre las contracciones del íleon aislado de cobayo inducidas por KCl 65

## INDICE DE CUADROS

No.	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Principales neurotransmisores del SNE y sus receptores.	14
2	Longitud y contenido de proteína de glándulas y conductos venenosos de los especímenes de <i>C. austini</i> evaluados.	30
3	Longitud y contenido de proteína de glándulas y conductos venenosos de los especímenes de <i>C. spurius</i> evaluados.	31
4	Longitud y contenido de proteína de glándulas y conductos venenosos de los especímenes de <i>P. albida</i> evaluados.	31
5	Inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducida por los extractos de los conductos de <i>C. austini</i> .	36
6	Inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducida por los extractos de las glándulas de <i>C. austini</i> .	37
7	Inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducida por los extractos de los conductos de <i>C. spurius</i> .	40
8	Inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducida por los extractos de las glándulas de <i>C. spurius</i> .	41
9	Inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducida por los extractos de los conductos de <i>P. albida</i> .	45
10	Inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducida por los extractos de las glándulas de <i>P. albida</i> .	45
11	Resumen de los parámetros obtenidos a partir de las gráficas concentración respuesta de la inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo inducidas por los extractos de glándulas y conductos venenosos de <i>C. austini</i> , <i>C. spurius</i> y <i>P. albida</i>	46