



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



U N A M

Farmacología del veneno del caracol marino
Conus californicus

T E S I S

que para obtener el grado académico de

MAESTRA EN CIENCIAS
(QUÍMICA MARINA)

P r e s e n t a

ANA BEATRIZ SANTACRUZ GARCÍA

Director de Tesis: Dra. Laura Escobar Pérez

Comité Tutorial: Dr. Manuel Aguilar Ramírez
Dr. Roberto Arreguín Espinoza
Dr. Edgar Heimer de la Cotería
Dr. Faustino Rodríguez Romero



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.

A mi madre,

Que me dio la vida, por quien soy quien soy, y por quien seguiré siendo
aun más.

A mis abues Pedro† y Ana†,

Que siempre se encuentran a mi lado.

A mis tias, tios, primas y primos,

Que siempre me han aguantado.

A mi papá Sergio†.

Agradecimientos:

A la Dra. Laura Escobar Pérez, por su asesoría, apoyo y valiosos comentarios durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Manuel Aguilar Ramírez, por su valiosa asesoría para la realización del proyecto.

Al Dr. Alexei Licea y la Bióloga Karla Juárez, por su apoyo, proporcionándonos el material biológico.

A la M en C. Carolina Salvador Hernández, por su apoyo técnico.

Al jurado asignado por sus comentarios en la revisión.

Al Q.F.B. Rolando Carrisoza por su gran apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio.

A CONACYT (190208) y a la DGEP por las becas otorgadas.

El presente trabajo fue realizado con financiamiento de los proyectos
CONACYT 41365
DGAPA IN224406

ÍNDICE.

I. ABREVIATURAS

II. RESUMEN

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 CARACOLES CONO. TAXONOMÍA..... | 1 |
| 1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES..... | 2 |
| 1.3 DISTRIBUCIÓN | 3 |
| 1.4 CLASIFICACIÓN GENERAL..... | 3 |
| 1.5 VENENO | 4 |
| 1.6 SÍNTESIS DE LAS CONOTOXINAS..... | 7 |
| 1.7 NOMENCLATURA DE LAS CONOTOXINAS | 7 |
| 1.8 MEMBRANA PLASMÁTICA..... | 8 |
| 1.8.1 POTENCIAL DE ACCIÓN..... | 8 |
| 1.9 CANALES IÓNICOS | 10 |
| 1.10 CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE..... | 13 |
| 1.11 CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE..... | 13 |
| 1.12 ESTRUCTURA DE LOS CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE..... | 15 |
| 1.13 CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE COMO BLANCOS BIOLÓGICOS DE TOXINAS..... | 16 |
| 1.14 BLANCOS BIOLÓGICOS DE LAS CONOTOXINAS..... | 19 |
| 1.15 <i>Conus californicus</i> | 23 |
| 2 JUSTIFICACIÓN..... | 24 |
| 3 OBJETIVOS..... | 26 |
| 4 METODOLOGÍA..... | 27 |
| 4.1 TRANSFORMACIÓN DEL DNA DEL CANAL DE SODIO Nav 1.2.... | 27 |

| | |
|---|----|
| 4.2 SÍNTESIS IN VITRO DEL cRNA DEL CANAL DE SODIO Nav 1.2.... | 28 |
| 4.3 OBTENCIÓN DE OVOCITOS DE LA RANA <i>Xenopus laevis</i> | 31 |
| 4.4 MICROINYECCIÓN DE RNA A OVOCITOS..... | 33 |
| 4.5 REGISTRO DE CORRIENTES..... | 34 |
| 4.6 PRUEBAS CON EL VENENO DEL CARACOL MARINO <i>Conus californicus</i> | 35 |
| 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 36 |
| 5.1 OBTENCIÓN DEL DNA DEL CANAL Nav 1.2..... | 36 |
| 5.2 SÍNTESIS DEL mRNA DEL CANAL Nav 1.2..... | 38 |
| 5.3 INYECCIÓN DE RNA A LOS OVOCITOS..... | 39 |
| 5.4 REGISTRO DE CORRIENTE DEL CANAL Nav 1.2..... | 39 |
| 5.5 PRUEBAS CON LAS FRACCIONES DEL VENENO DEL CARACOL MARINO <i>Conus californicus</i> | 41 |
| 6 CONCLUSIONES..... | 48 |
| 7 PERSPECTIVAS..... | 49 |
| 8 LITERATURA CITADA..... | 50 |
| 9 ANEXO..... | 55 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| Ca^{++} | Ion calcio. |
| CaCl_2 | Cloruro de calcio. |
| cm | Centímetros. |
| Cl^- | Ion cloruro. |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico. |
| $^\circ\text{C}$ | Grados centígrados. |
| g | Gramos. |
| K^+ | Ion potasio. |
| KCl | Cloruro de potasio. |
| LiCl | Cloruro de litio. |
| mg | Miligramos. |
| ml | Mililitros. |
| M | Concentración molar. |
| mM | Concentración milimolar. |
| MgCl_2 | Cloruro de magnesio. |
| MPM | Marcador de peso molecular. |
| RNA | Acido ribonucleico. |
| mRNA | Acido ribonucleico mensajero. |
| M | Metros. |
| mV | Milivoltios. |
| Na^+ | Ion sodio. |
| NaCl | Cloruro de sodio. |
| Nav | Canales de sodio dependientes de voltaje. |
| ng | Nanogramos. |

| | |
|-----|--------------------------|
| nm | Nanometros. |
| pb | Pares de bases |
| pH | Potencial de hidrógeno. |
| PKC | Cinasa de proteínas. |
| rpm | Revoluciones por minuto. |
| TTX | Tetrodotoxina. |
| STX | Saxitoxina. |
| μg | Microgramos. |
| μl | Microlitros. |

RESUMEN

Los caracoles marinos como (*Conus*) pertenecen al grupo de los gasterópodos marinos y constituyen un inusual y rico grupo de predadores venenosos conformado por más de 500 especies. Estos caracoles son carnívoros y poseen glándulas venenosas que producen un trauma excitotóxico y parálisis por bloqueo neuromuscular.

Estudios previos de los *Conus* muestran que el veneno contiene entre 50 y 200 péptidos activos diferentes (conopéptidos o conotoxinas) la mayoría de 12-30 aminoácidos.

Todas las conotoxinas inhiben la comunicación celular. Los canales iónicos son proteínas de membrana que participan en esta comunicación celular.

Los canales iónicos catalizan directamente el flujo de iones en las células excitables, como las neuronas y los músculos, lo que provoca los cambios de voltaje a través de la membrana.

En particular los canales de sodio dependientes de voltaje, también conocidos como Nav's, se encuentran en casi todas las células excitables. Los Nav's son blancos moleculares de varios grupos de toxinas, las que se unen a sitios específicos del canal y modifican drásticamente su funcionamiento.

El objetivo principal de este trabajo consistió en identificar conotoxinas bloqueadoras del canal neuronal Nav 1.2 del caracol marino *Conus californicus*.

Se utilizó la técnica de fijación de voltaje para registrar la corriente del canal de sodio Nav 1.2 previamente inyectado en ovocitos de la rana africana *Xenopus laevis* como sistema de expresión, para después registrar los efectos que tenía el veneno del caracol sobre la corriente del canal. Se observó que el veneno del caracol *Conus californicus* contiene conotoxinas que bloquean la corriente del canal Nav 1.2 y se concluyó que por su blanco biológico estas conotoxinas pertenecen al grupo de las μ -conotoxinas o de las μ O-conotoxinas.

1 INTRODUCCIÓN.

1.1 CARACOLES CONO. TAXONOMÍA.

Los caracoles *Conus* pertenecen a la superfamilia Conoidea; esta familia pertenece a la clase gasteropoda, subclase orthogastropoda, superorden caenogastropoda (Kaufenstein y cols., 2003), orden sorbeoconcha, suborden hypsogastropoda e infraorden neogastropoda. Esta superfamilia incluye a las familias Conidae, Terebridae y Turridae (Vaught, 1989) y dentro de la familia Conidae a los caracoles del género *Conus*.

Los gasterópodos marinos conocidos como caracoles cono (*Conus*) constituye un inusual y rico grupo de predadores venenosos conformado por más de 500 especies (Kohn, 1968)(Fig. 1). Estos caracoles han existido desde hace 55 millones de años. El número de especies de *Conus*, el género más grande en el mundo animal sólo rebasado por los insectos, podría duplicarse cada 6.1 millones de años (Duda y Palumbi, 2004).



Fig. 1.- Ejemplos de la variedad de *Conus* existentes en los diferentes océanos.

1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES.

Los caracoles como son carnívoros marinos y tienen glándulas venenosas. Algunas de las toxinas de estos animales se cuentan entre las más potentes del reino animal. Su concha tiene una forma cónica regular, con una estrecha abertura en la base del ápice por donde se extiende el caracol. En estos animales el aparato radular está muy modificado, la rádula es toxoglossa, es decir, está provista de una serie de dientes con forma de arpón, acanalados y barbados. Los caracoles han desarrollado una probóscide larga y maniobrable apoyada en un bulbo bucal muy voluminoso y musculoso (Fig. 2-B); este bulbo muscular está conectado a la cavidad bucal por el conducto secretor del veneno. De este modo, a la hora de cazar a su presa, estos animales extienden la probóscide y “disparan” un diente (que puede o no estar unido a la probóscide) cargado de veneno. Los caracoles tienen larvas *velígeras* de exótico velo que conviven con la fauna del plancton. Presentan dos ojos colocados a ambos lados del sifón. En su parte inferior presentan un pie, por medio del cual se desplazan (Fig. 2-D); en la parte trasera del pie se encuentra localizado el opérculo (Fig. 2-F), el cual sirve como tapadera.

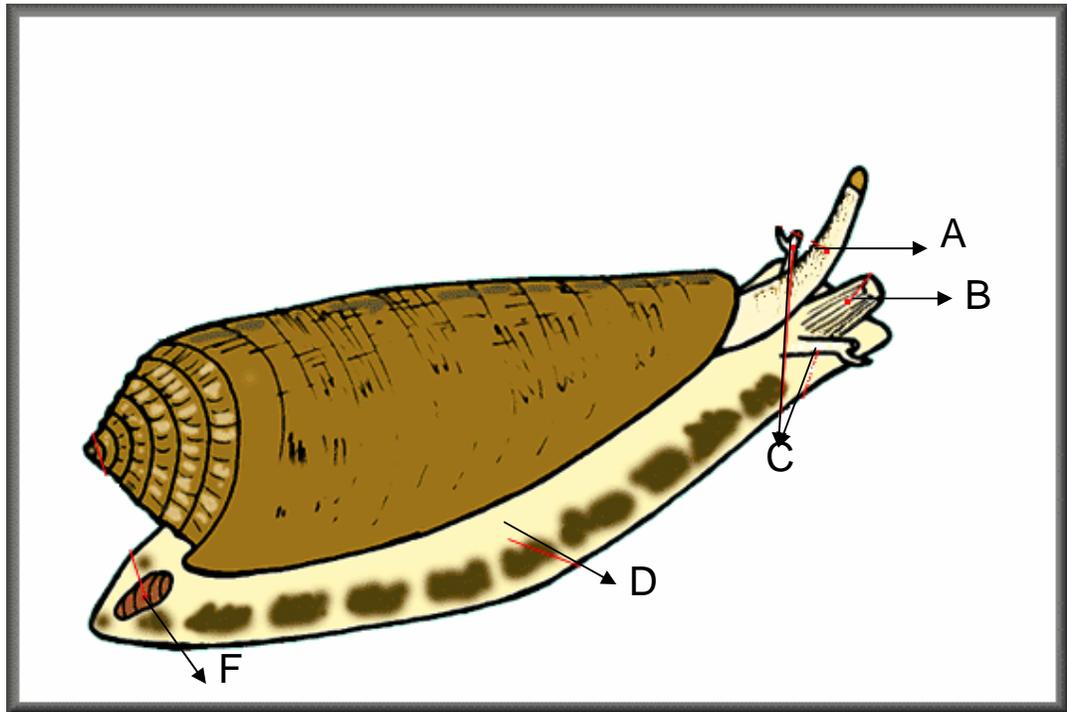


Fig. 2.- Esquema del cuerpo de un Conidae, donde se muestran las características generales de los caracoles cono. A) Sifón. B) Probóscide. C) Ojos. D) Pie. F) Opérculo. www.coneshell.net

1.3 DISTRIBUCIÓN.

Los caracoles como se pueden encontrar en todos los ambientes marinos tropicales y son particularmente prominentes alrededor de los arrecifes de coral y en aguas marinas superficiales (Kohn 1959, 1966, y Nybakken y cols., 1972). Algunas especies se han adaptado a aguas frías como el *C. californicus*, pero la gran diversidad se encuentra en los trópicos. Como ya se mencionó la mayor cantidad de especies de conos viven en aguas relativamente superficiales, aunque existen algunas especies que se han adaptado a profundidades de más de 150 m como el *Conus angasi*.

| HABITAT | SP. DE CONUS | TIPO DE ALIMENTACION | PROFUNDIDAD |
|------------------------|------------------------|----------------------|-------------|
| Fango | <i>C. trigonus</i> | vermívoro | |
| Arrecifes rocosos | <i>C. anemone</i> | piscívoro | 25 m. |
| | <i>C. papilliferus</i> | vermívoro | 10 m. |
| | <i>C. peronianus</i> | vermívoro | 30 m. |
| Arrecifes coralinos | <i>C. glans</i> | vermívoro | 10 m. |
| | <i>C. imperialis</i> | vermívoro | |
| | <i>C. geographus</i> | piscívoro | |
| Plataforma continental | <i>C. striatus</i> | piscívoro | |
| | <i>C. angasi</i> | | 100-200 m. |
| | <i>C. cyanostomus</i> | | 40 m. |
| | <i>C. nielsenae</i> | | 34 m. |

Tabla 1.- Ejemplos de la diversidad de ambientes y profundidades donde se pueden encontrar las diferentes especies de *Conus*.

1.4 CLASIFICACION GENERAL.

Los caracoles como se clasifican tradicionalmente en tres grupos de acuerdo con su tipo de presa (Craig, 2000):

Piscívoros.- Se alimentan de peces :

Conus striatus
Conus geographus
Conus magus
Conus catus
Conus tulipa

Molusquívoros.- Se alimentan de moluscos.

Conus textile

Conus marmoreus

Conus pennaceus

Vermívoros.- Su alimentación es a base de gusanos.

Conus imperialis

Conus eburneus

Conus quercinus

Conus lividus

Conus tessulatus

Conus ventricosus

Conus parvatus

Conus rattus

Conus flavidus

Conus generalis

Conus arenatus

Algunas especies de conos como el *Conus californicus* han colonizado habitats en aguas frías y no tienen especies que compitan con él, esta especie es generalista (Kohn, 1966).

1.5 VENENO.

Dado el gran dinamismo del ambiente marino donde habitan, estos gasterópodos desarrollaron mecanismos efectivos para inmovilizar y capturar a sus presas así como para su defensa. Los caracoles producen potentes neurotoxinas las cuales paralizan a sus presas.

Los componentes biológicamente activos del veneno de los caracoles como son sintetizados en células epiteliales que forran el ducto tubular venenoso (Fig. 3-B), para después ser vertido dentro de la probólide (Fig. 3-C) por el bulbo muscular (Fig. 3-A). Todos los caracoles como poseen un diente radular el cual se mueve individualmente dentro de la probólide y es utilizado tanto como arpón como aguja hipodérmica, para inyectar el veneno a su presa. Una vez que la presa ha caído en un estado de parálisis, el caracol retracta el diente, extiende su probólide y engulle a la presa (Fig. 4-A). Otro mecanismo de captura funciona extendiendo la probólide hasta que la o las presas queden dentro de ella para después extender su diente radular, arponeando a la presa para inyectar el veneno y después engullirla (Fig. 4-B).

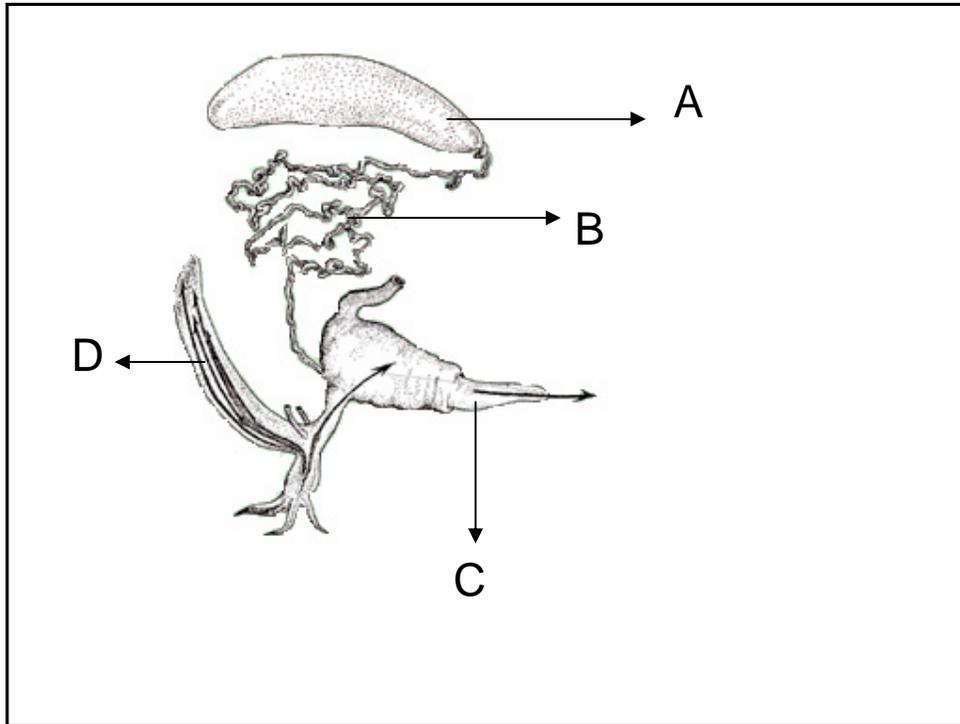


Fig. 3.- Aparato inyector del veneno. A) Bulbo muscular. B) Ducto tubular venenoso. C) Probócid. D) Saco de depósito dental. www.nighthawkitricity.wsu.edu

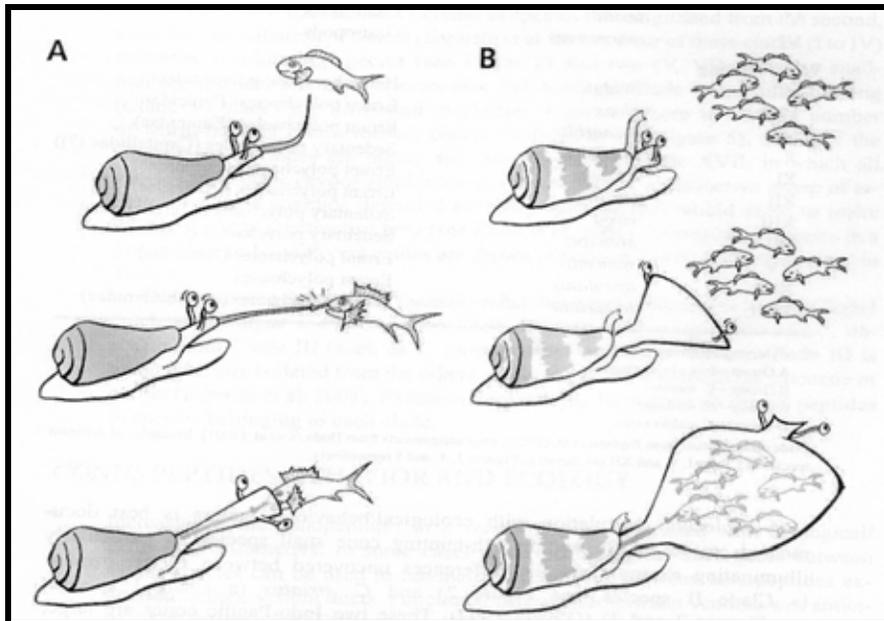


Fig. 4.- Estrategias de captura de presas utilizadas por las diferentes especies de caracoles como (Olivera, 1997).

El efecto de los venenos sobre sus presas es muy rápido. Los venenos de algunos *Conus* cazadores de peces producen un choque excitotóxico y parálisis irreversible por bloqueo neuromuscular. En los humanos el veneno puede ser de consecuencias fatales (López-Vera y cols., 2004).

La proporción de los componentes del veneno es diferente en cada inyección. El veneno contiene péptidos neurotóxicos paralizantes y en algunos casos letales, así como componentes que presentan diferentes respuestas fisiológicas. En particular los venenos de los caracoles piscívoros son mucho más letales que las de los otros grupos.

El veneno contiene entre 50 y 200 péptidos activos diferentes (conopéptidos o conotoxinas) la mayoría en el rango de 12-30 aminoácidos (Gray y cols., 1988; Myers y cols., 1993). Existen dos divisiones en cuanto a los componentes del veneno: las conotoxinas con varios puentes disulfuros y los péptidos con uno o ningún puente disulfuro (Fig. 5).

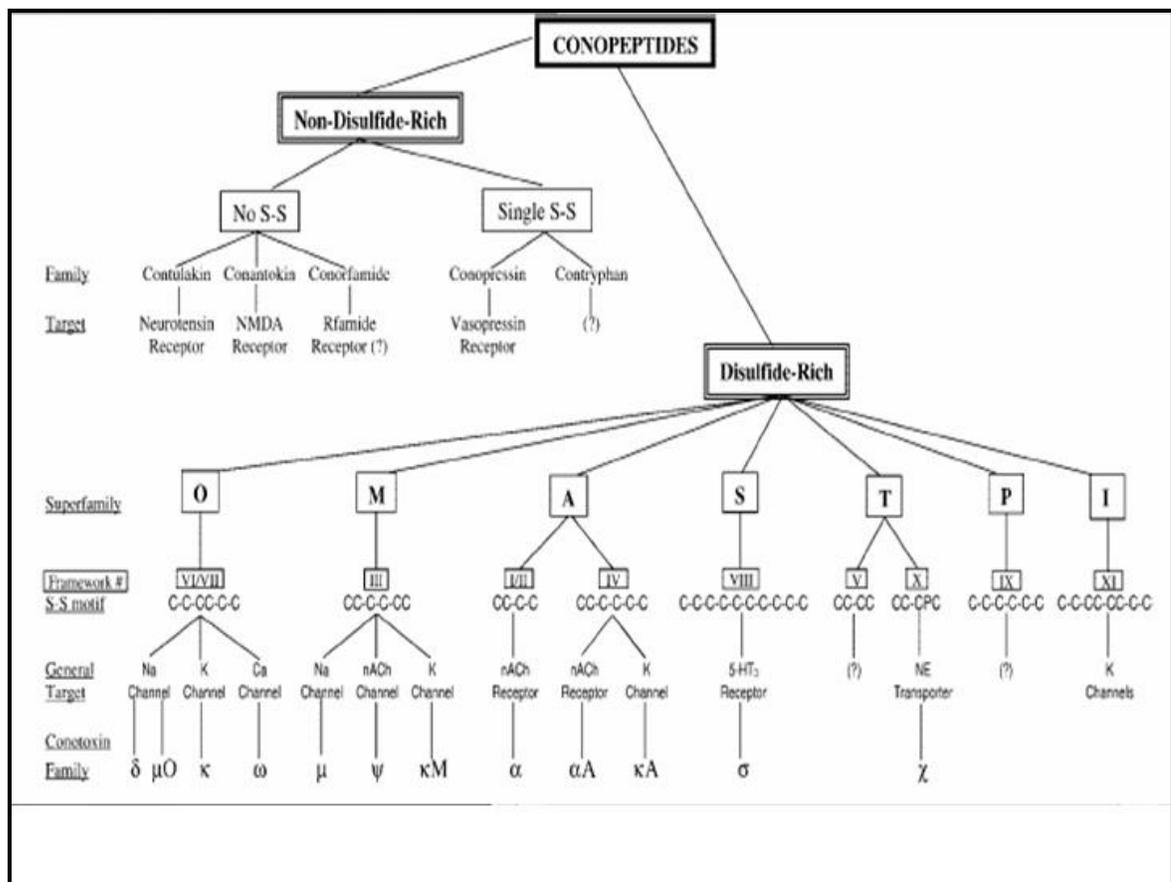


Fig. 5.- Esquema de los diferentes tipos de conopéptidos conocidos. (Terlau y Olivera, 2004)

1.6 SÍNTESIS DE LAS CONOTOXINAS.

El mRNA es traducido a un pre-pro-péptido donde el péptido biológicamente activo se encuentra localizado hacia el carboxilo terminal. El precursor tiene una secuencia señal típica (la pre-región) y una región variable llamada pro-región. Los péptidos de los *Conus* pueden ser agrupados en superfamilias genéticas. Dentro de una súper familia, los péptidos no sólo presentan un arreglo similar de sus cisteínas en el péptido maduro, sino también muestran secuencias similares tanto en la región pro péptido como en la pre peptídica. Después de la traducción en los ribosomas, el precursor polipeptídico entra en el retículo endoplasmico donde sufre diferentes modificaciones post-traduccionales como son la formación de los puentes disulfuro, la amidación del carboxilo terminal etc. (Craig y cols., 1999). Se ha establecido que las variaciones entre los miembros de una superfamilia ocurren mayormente en la región madura del carboxilo terminal y en grado mucho menor en la región del amino terminal del precursor (West y cols., 2002).

1.7 NOMENCLATURA DE LAS CONOTOXINAS.

La posición de los residuos de cisteínas en la secuencia primaria de la conotoxina determina la formación de los puentes disulfuro y estos a su vez la estructura terciaria del péptido. Las toxinas se pueden clasificar de acuerdo al número de tazos (loops) que se encuentran entre los residuos de cisteínas. De esta forma tenemos tres tipos:

- Estructuras con dos tazos:
Secuencia.- cc..(1)..c..(2)..c
Ejemplos de esta estructura son las α -conotoxinas. A este grupo pertenecen los *C. geographus* y *C. striatus*.
La estructura primaria de las α -conotoxinas consiste en una cadena polipeptídica de menos de 20 aminoácidos (Cartier y cols, 1996).
- Estructuras con tres tazos:
Secuencia.- cc...(1)...c...(2)...c...(3)...cc
Las μ conotoxinas son ejemplos de este tipo de estructura, perteneciendo a esta clase las toxinas de los *C. geographus*, *C. textile* y el péptido Scratcher.
- Estructuras con cuatro tazos:
Secuencia.- c...(1)...c...(2)...cc...(3)...c...(4)...c
Ejemplos de este tipo de estructura son las omega conotoxinas pertenecientes a las especies *geographus*, *magus* y *textile*.

1.8 MEMBRANA PLASMÁTICA.

La membrana celular es crucial para la vida y comunicación celular, ya que encierra a la célula, define sus propiedades y mantiene diferencias esenciales entre el citosol y el ambiente extracelular (Alberts y cols., 1994). La membrana celular estructuralmente está compuesta de una doble capa de lípidos continuos de entre 5 a 10 nm de espesor. Los lípidos conforman la parte estructural de la membrana. En ella se encuentran a su vez tanto proteínas como carbohidratos unidos a proteínas, los cuales se encuentran distribuidos de manera heterogénea dependiendo del tipo celular (Alberts y cols., 1994).

En el líquido extracelular los iones más importantes son el Na^+ y el Cl^- , mientras que en el interior de la célula predomina el K^+ y fosfatos orgánicos aniónicos. Como resultado de esto, existe una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana (potencial de membrana) que se mide en voltios. El voltaje en las células vivas es de -50 a -90 mV (milivoltios), representando el signo negativo que el interior es más negativo que el exterior. En algunas condiciones especiales, algunas células pueden tener un potencial de membrana positivo.

La membrana celular es impermeable a los iones, por lo que es indispensable el uso de elementos celulares que puedan transportar los iones de un lado a otro a través de la membrana. A estos elementos se les llama canales iónicos. Los canales iónicos son proteínas de membrana que forman un poro acuoso a través de la membrana plasmática, el cual permite un flujo selectivo de iones extraordinariamente alto de un lado a otro de la membrana (Hille, 1992). Este gran movimiento de iones produce una corriente eléctrica la cual puede ser detectada por técnicas como la fijación de voltaje con dos microelectrodos (voltage-clamp).

1.8.1 POTENCIAL DE ACCIÓN.

Todos los organismos eucariontes poseen fibras nerviosas encargadas de transmitir señales a todo el organismo, y normalmente se estimulan por mecanismos físicos y químicos. Por ejemplo, la presión sobre ciertas terminaciones nerviosas de la piel causa un estiramiento mecánico de las mismas y de esta manera abre los poros de la membrana a los iones de sodio, y por lo tanto origina impulsos. El calor y el frío producen el mismo efecto así como lesiones titulares que pueden originar impulsos dolorosos.

Las señales nerviosas se transmiten mediante potenciales de acción, que son cambios rápidos del potencial de membrana. El potencial de acción comienza con un rápido cambio del valor negativo normal del potencial de membrana en reposo, a un valor positivo y finaliza con un cambio hacia valores de nuevo negativos. El potencial de acción tiene tres etapas sucesivas que son (Fig. 6):

1.- Etapa de reposo.- Es el potencial de membrana en reposo, este valor es negativo y en las células es de cerca de -90 mV.

2.- Etapa de despolarización.- En esta etapa la membrana se hace muy permeable para los iones de sodio, permitiendo que un gran número de ellos se muevan al interior del axón, por la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje. Como resultado de la entrada momentanea de sodio aumenta el valor del potencial en dirección positiva. A este cambio del potencial de negativo a positivo se le llama despolarización.

3.- Etapa de repolarización.- Tras el aumento de la permeabilidad de los iones sodio sus canales comienzan a cerrarse y los de potasio a abrirse y al haber una difusión de potasio al exterior de la célula, el potencial de membrana se reestablece. A esto se le llama repolarización (Guyton, 1992).

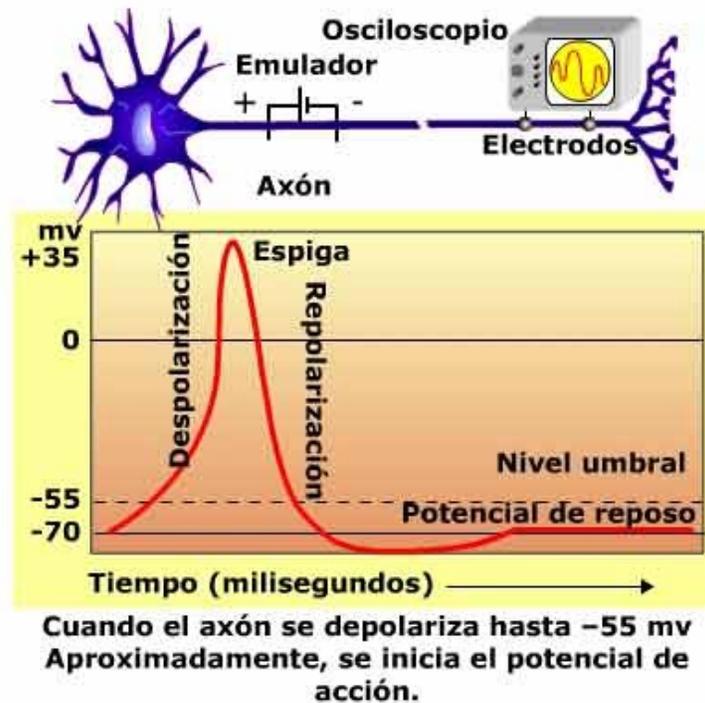


Fig. 6.- Esquematización de un potencial de acción. www.aev.es

Esto tiene un efecto sobre la membrana adyacente y la vuelve también muy permeable al sodio. Por lo tanto, también aquí hay difusión de sodio y el proceso se repite una y otra vez a lo largo de la fibra nerviosa (Fig. 7). Es así como el impulso nervioso viaja a lo largo de la fibra. La transmisión de la despolarización a lo largo de una fibra nerviosa o muscular se denomina impulso nervioso o muscular (Guyton, 1983).

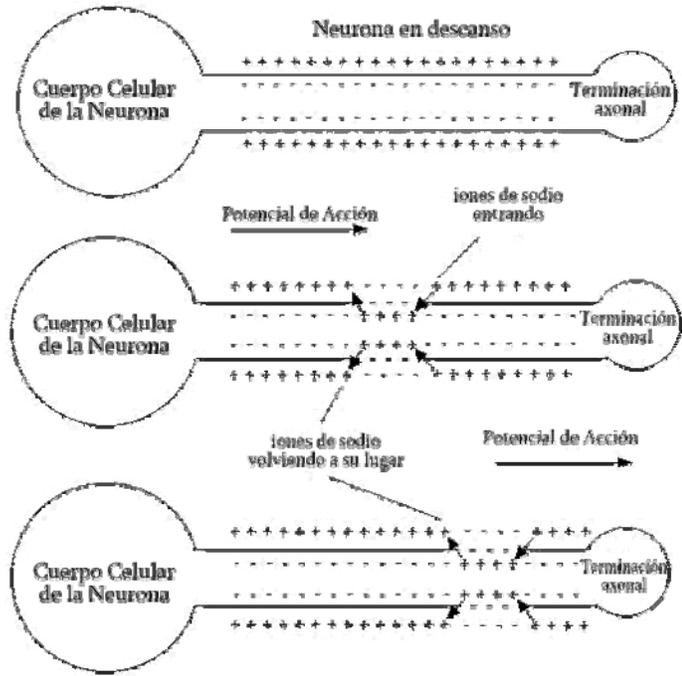


Fig. 7.- Propagación del potencial de acción a lo largo del axón de una neurona.

1.9 CANALES IÓNICOS.

Los canales iónicos se encuentran ampliamente distribuidos en las células de los organismos eucariontes. Estos participan en una gran variedad de procesos celulares que van desde la excitabilidad celular hasta la locomoción e integración neuronal.

Los principales componentes de los canales iónicos son: 1) poro acuoso.- por el cual fluyen los iones, 2) filtro de selectividad.- se encuentra localizado en el poro e identifica al ión permeable, y 3) compuerta de inactivación.- su función es limitar el flujo de iones.

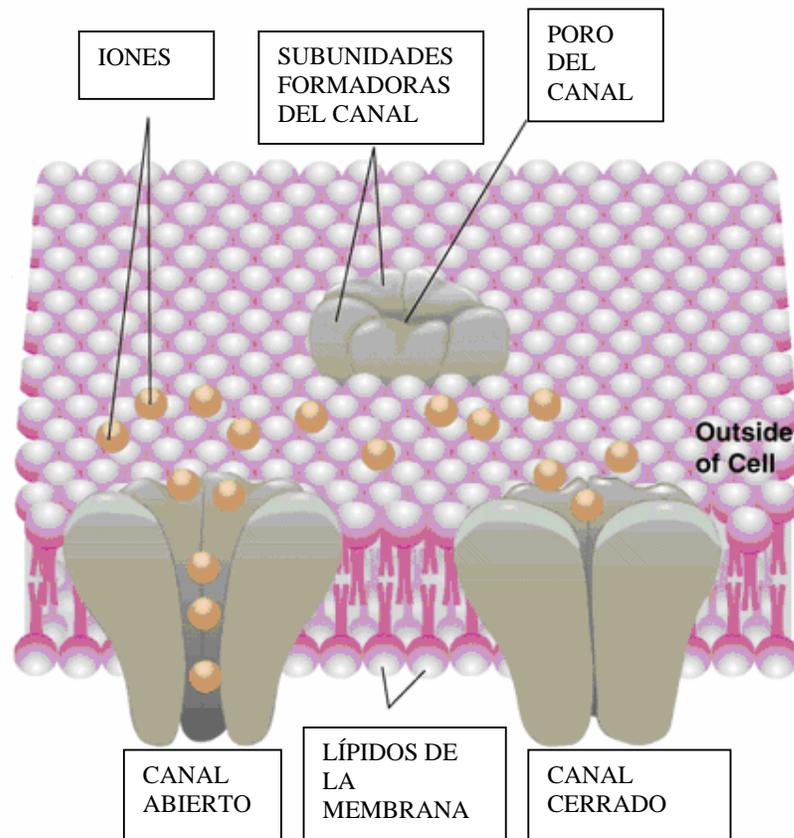


Fig. 8.- Esquematzación de un canal iónico. www.homepage.psy.utexas.edu

Los canales iónicos pueden encontrarse en tres estados, el cerrado (no conductor) que no permite el paso de iones (Fig. 8) el abierto (conductor) el cual permite el paso de iones a favor de su gradiente electroquímico (Fig. 8) (de mayor a menor concentración) y el inactivo en el cual el canal se encuentra abierto pero no permite el paso de iones (Hille, 1992); la secuencia de estos tres estados es abierto-inactivo-cerrado. A nivel molecular, la transición desde el estado cerrado al abierto es un cambio conformacional de la proteína inducido por la energía liberada de la unión con un ligando o por la aportada por un cambio en el voltaje a través de la membrana plasmática. El proceso de transición del estado abierto al cerrado y viceversa se conoce como gating (Hernández y Félix, 2001). Actualmente se conocen varios tipos de canales iónicos de acuerdo a su mecanismo de apertura y cierre (Alberts y cols., 1994):

- 1.- Canales regulados por ligandos: se abren en respuesta a la unión de determinados neurotransmisores (como la acetilcolina, el glutamato, la glicina, etc.) u otras moléculas (Aidley, 1998) (Fig. 9-A).
- 2.- Canales regulados por voltaje: se abren en respuesta a cambios en el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática (Fig. 9-C).

3.- Canales regulados por un impulso mecánico: se abren en respuesta a una acción mecánica (Aidley, 1998) (Fig. 9-D).

4.- Canales activados por segundos mensajeros como son las proteínas G o nucleótidos cíclicos (Fig. 9-B).

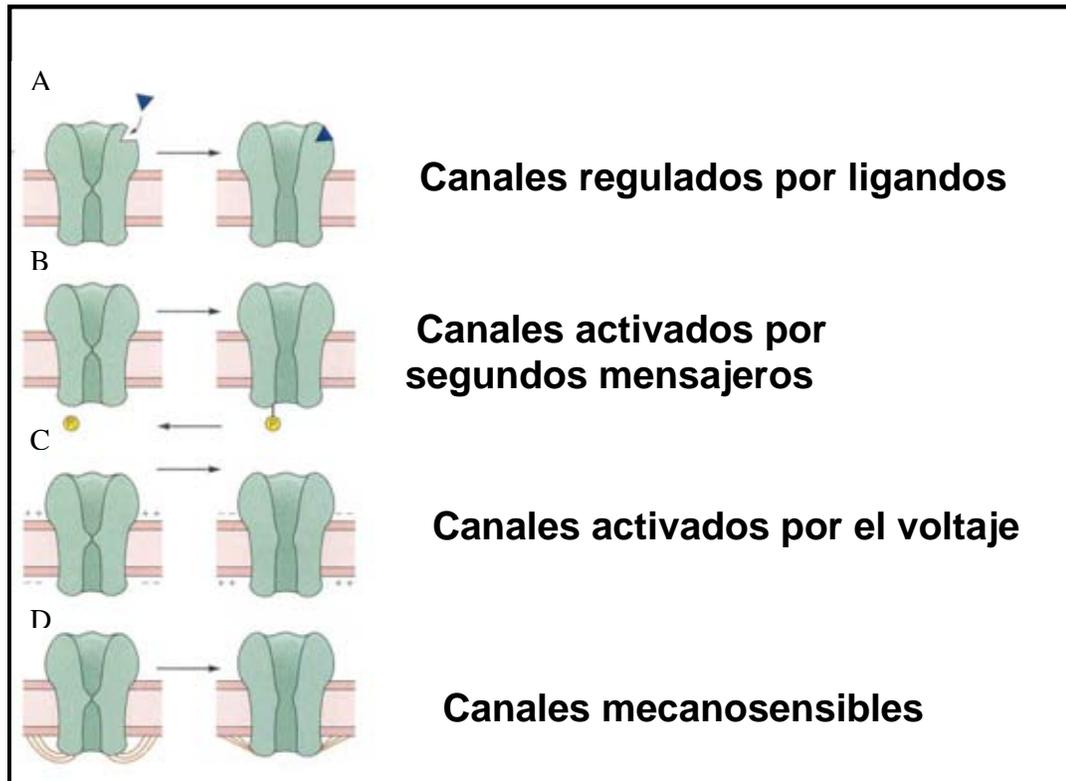


Fig. 9.- Tipos de canales iónicos.

A su vez los canales iónicos pueden ser descritos en términos de su selectividad iónica:

Canales Catiónicos

Canales de sodio
Canales de Potasio
Canales de Calcio

Canales Aniónicos

Canales de cloro

1.10 CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE.

Los canales iónicos dependientes de voltaje son proteínas transmembranales que conducen iones y cuyo mecanismo de apertura y cierre está regulado por el voltaje de la membrana. Este tipo de canales juegan un papel muy importante en la generación y propagación de los impulsos nerviosos. El sensor de voltaje es una región de la proteína compuesta por aminoácidos cargados que se mueve con un cambio en el potencial eléctrico de la membrana. El movimiento del sensor inicia un cambio conformacional de la proteína que abre el poro (Bezanilla, 2005).

1.11 CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE (Nav).

Los canales de sodio dependientes de voltaje, también conocidos como Nav, son glicoproteínas transmembranales que se encuentran en casi todas las células excitables. Los canales normalmente están cerrados y se abren cuando la membrana se despolariza a un valor umbral de voltaje, permitiendo que los iones de sodio entren a la célula, esto causa la despolarización en el potencial de acción. Los Nav forman una familia con 12 tipos de canales (Wood y cols., 2004).

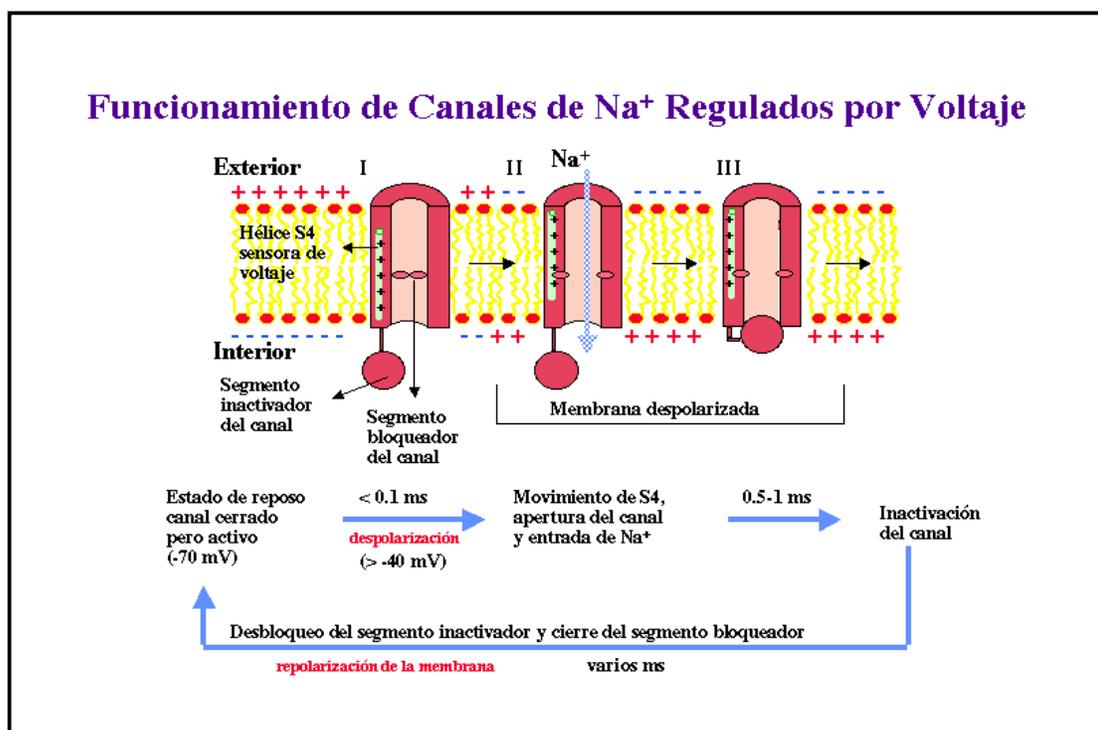


Fig. 10.- Funcionamiento de los canales de sodio activados por voltaje.
www.plataforma.uchile.cl

| NOMBRE DEL CANAL | GEN | NOMBRE ORIGINAL | ESPECIE | TEJIDO |
|--|--------------------|---|---|---|
| Nav 1.1 | SCN1A | rat I ⁷ HBSCI ⁸⁸ GPBI | Rata Humano Puerco de guinea | CNS SNP CNS CNS |
| Nav1.2 | SCN2A | rat II ⁷ HBSCII ⁸⁸ HBA ⁹⁰ rat IIA ³⁰ | Rata Humano Humano Rata | CNS CNS CNS CNS |
| Nav1.2 ^a | | | | |
| Nav1.3 | SCN3A | rat III ^{35,91} | Rata | CNS |
| Nav1.4 | SCN4A | SkM1, μ 1 ⁴⁸ SkM1 ^{95,96} | Rata Humano | Corazón Corazón |
| Nav1.5 | SCN5A | SkM2 ⁴⁴ rH1 ⁴³ H1 ⁹⁹ | Rata Humano | Corazón Corazón |
| Nav1.6 | SCN8A | NaCh6 ⁹ PN4a ¹⁸ Scn8a ^{32,39} Scn8a ²⁰ CerIII ²⁸ | Rata Rata Ratón Humano Puerco de guinea | CNS PNS CNS PNS CNS CNS CNS |
| Nav1.7 | SCN9A | PNI ^{66,69} hNE-Na ⁶⁸ Nas ⁶⁷ | Rata Humano Conejo | PNS Tiroides Cels. Schwann |
| Nav1.8 | SCN10A | SNS ⁷² PN3 ⁷³ SNS ⁷⁴ | Rata Rata Ratón | PNS PNS PNS |
| Nav2.1 | SCN6A | Na2.1 ⁵ | Humano | Corazón, útero, músculo. |
| Nav2.2 | SCN7A ^a | Na-G ¹⁰³ SCL11 ⁷⁶ | Rata Rata | Astrositos, PNS |
| Nav2.3 | | Na2.3 ⁷⁵ | Ratón | Corazón, útero, músculo |
| Nav3.1 | | NaN ⁶ | Rata | PNS |
| Na β 1.1 Subunidades reguladoras | SCN1B | SCN1B | Rata Humano | CNS CNS |
| Na β 2.1 Subunidades reguladoras | SCN2B | SCN2B | Rata Humano | CNS CNS |

Tabla 2.- Clasificación de los diferentes canales de sodio en mamífero (Goldin y cols., 2000)

1.12 ESTRUCTURA DE LOS CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE.

Los canales de sodio dependientes de voltaje son cruciales para la propagación del potencial de acción en las células excitables. Estos canales se forman por una subunidad alfa, responsables de la selectividad y apertura por voltaje y una pequeña subunidad β (Catterall y Cestel , 2000). La subunidad alfa tiene 4 dominios y cada uno tiene 6 segmentos transmembranales. El segmento transmembranal número cuatro (S4) de todos los dominios, se encuentra cargado positivamente, y actúa como sensor de voltaje (Fig.11).

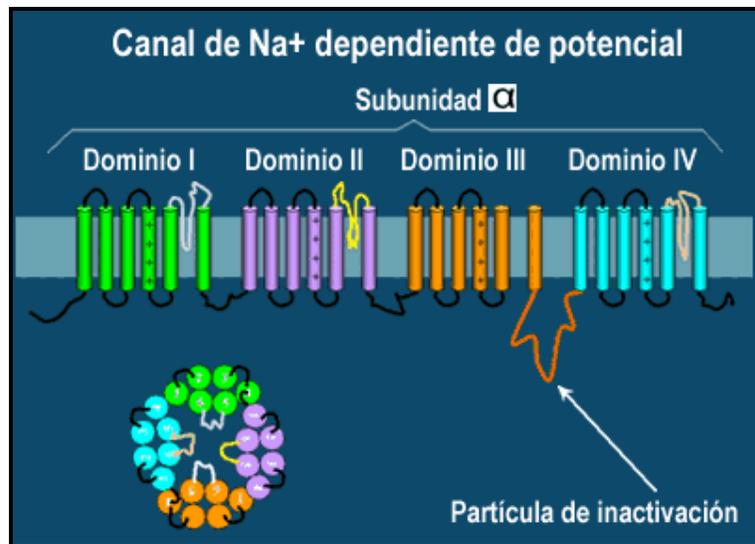


Fig. 11.- Estructura general de un canal de sodio dependiente de voltaje (Nav) con sus cuatro dominios; cada dominio con sus seis segmentos transmembranales (alfa hélices), y el dominio o partícula de inactivación colocado entre el dominio 3 y 4.

www.plataforma.uchile.cl

Entre el dominio III y IV, se encuentra el dominio de inactivación. En la inactivación el canal se encuentra abierto pero no permite el paso de más iones dado que este dominio ocluye el poro (Fig. 12).

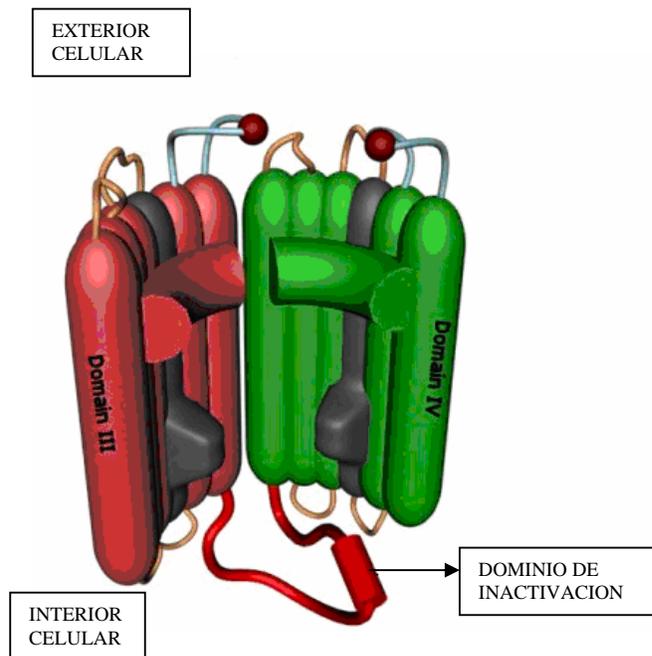


Fig. 12.- Conformación del canal, vista lateral de 2 dominios. www.ionmemb.com

Los Nav son críticos para mediar la rápida transmisión de los impulsos eléctricos en tejidos excitables como el músculo cardíaco y esquelético así como en el sistema nervioso (Fozzard y Hank, 1996; Li y Tomaselli, 2004).

1.13 Nav's COMO BLANCOS BIOLÓGICOS DE TOXINAS.

Los Nav son blancos moleculares de varios grupos de neurotoxinas. Estas toxinas se unen a sitios específicos del canal y modifican drásticamente su funcionamiento (Craig, 2000).

Se han identificado al menos 6 sitios de unión para las neurotoxinas en el canal de Na⁺ (Fig. 13).

De acuerdo a cómo alteran la función del canal de Na⁺ las toxinas se clasifican en:

- Bloqueadoras del poro.
- Que modifican la apertura y cierre del canal (gating), uniéndose a sitios intramembranales.
- Que modifican la apertura y cierre del canal, uniéndose a las asas extracelulares.

El proceso de transición del estado abierto al cerrado y viceversa se conoce como "gating" (Hernández y Félix, 2001).

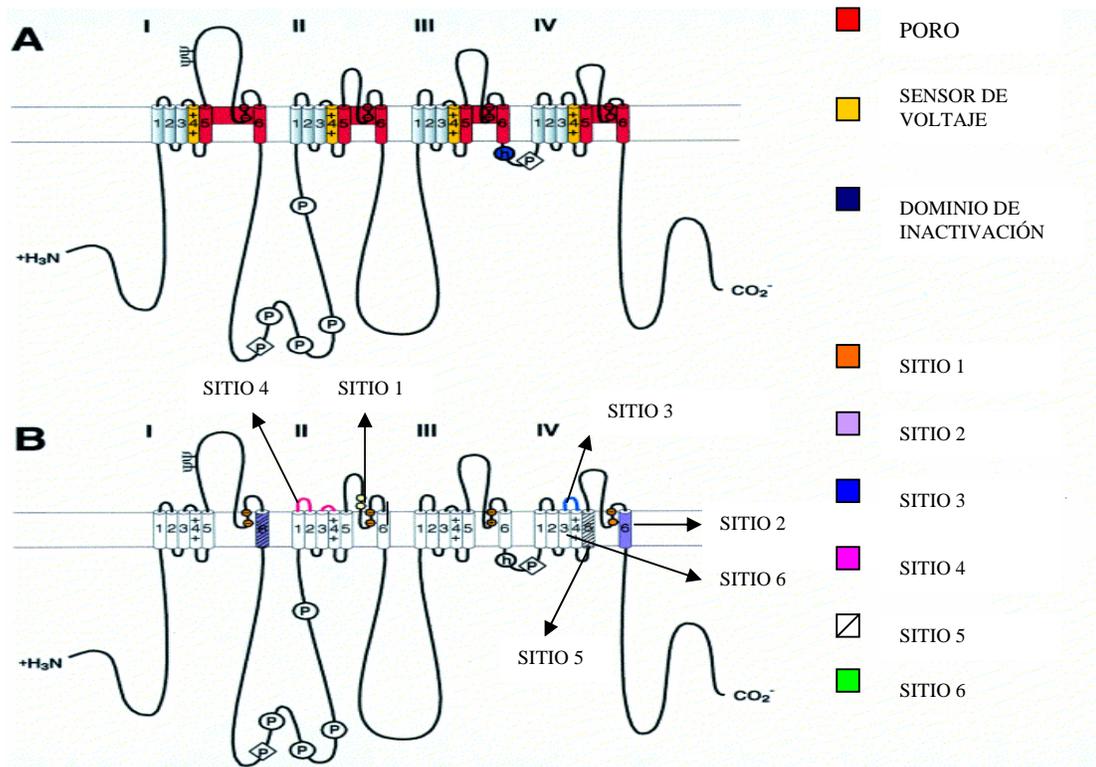


Fig. 13.- Localización de los sitios de unión de las neurotoxinas en los canales de sodio de mamífero (Catterall y Cestelé, 2000).

1.- Bloqueadoras del poro.- Las toxinas bloqueadoras del poro se unen al sitio receptor 1 (Fig. 13, sitio 1, color naranja), y pueden ser de dos tipos: las heterocíclicas solubles en agua como la tetrodotoxina (TTX) y la saxitoxina (STX), y las peptídicas como las μ -conotoxinas. Las toxinas actúan desde la parte extracelular de la membrana y al unirse al sitio 1, bloquean la conductancia de los canales de sodio (Fig. 14).

Estas toxinas se unen preferentemente a los canales de sodio musculares, teniendo una menor afinidad por las isoformas neuronales. (Terlau y cols., 1996)

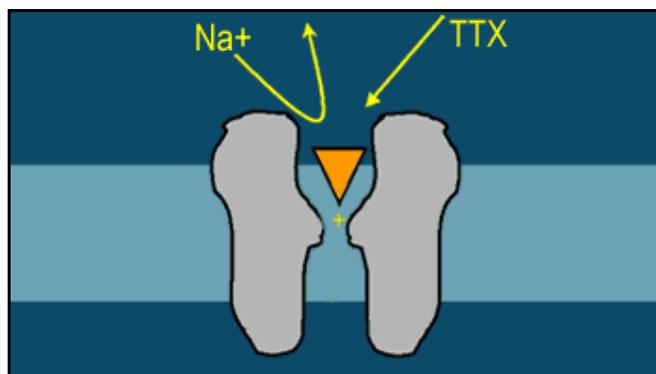


Fig. 14.- Sitio 1. Representación del bloqueo de los canales de sodio por la TTX.

www.plataforma.uchile.cl

2.- Toxinas que alteran la apertura y cierre del canal uniéndose a sitios intramembranales.- Estas toxinas se dividen en:

Toxinas que se unen al sitio 2:

Dentro de estas neurotoxinas se encuentran:

- Grayanotoxina (toxina del rhododendro y otras plantas de la familia Ericaceae). Estas toxinas son liposolubles.
- Veratridina (alcaloide de las Liliaceas)
- Batracotoxina (toxina de la piel del sapo colombiano *Phyllobates aurotaenia*).
- Acotina (toxina de la planta *Acotinum napellus*).

Estas toxinas se unen al estado abierto del canal y causan una activación persistente, bloquean la inactivación del canal (Catterall, 1977). Se ha propuesto que el bloqueo de la inactivación por estas toxinas se debe a la interacción que tienen con el segmento transmembranal IVS6 (Fig. 13, sitio 2, color morado), el cual es muy importante para la inactivación rápida de los canales.

Toxinas que se unen al sitio 5.- Dentro de este tipo de toxinas se encuentran:

Las brevetoxinas y ciguatoxinas son toxinas liposolubles aisladas de los dinoflagelados *Ptychodiscus brevis* y *Gambierdiscus toxicus*, respectivamente. Estas toxinas se unen al sitio 5 el cual se localiza en el segmento 6 del dominio IV (Fig. 13, sitio 5, color negro rayado) y, al igual que las toxinas del sitio 2, causan el desplazamiento de la curva de activación hacia potenciales más negativos y el bloqueo de la inactivación (Lombet y cols., 1987).

3.- Toxinas que alteran la apertura y cierre del canal uniéndose a sitios extracelulares.- Estas toxinas se dividen en:

Toxinas que se unen al sitio 3.- Dentro de este grupo se encuentran diferentes toxinas de origen polipeptídico:

- Toxinas alfa de alacrán.
- Toxinas de anémonas.
- Algunas toxinas de arañas.

Estas toxinas enlentecen o bloquean la inactivación de los canales de sodio. (Pauron y cols., 1985). Este efecto de enlentecimiento o bloqueo de la inactivación se debe a que al unirse al sitio 3, que se encuentra extracelularmente entre los segmentos 3 y 4 del dominio IV del canal (Fig.13, sitio 3, color azul), la toxina interfiere en el cambio conformacional que debe sufrir el canal para llevar a cabo la inactivación rápida.

Toxinas que se unen al sitio 6.- Dentro de esta categoría se encuentra la conotoxina TxVIA del *Conus textile*. Esta conotoxina causa una marcada prolongación del potencial de acción, debido a la inhibición de la inactivación del canal. La TxVIA tiene

los mismos efectos fisiológicos que las toxinas que se unen al sitio 3 (Fainzilber y cols., 1994). El sitio 6 se encuentra entre el segmento S3/S4 del dominio 4 del canal (Fig.13, sitio 6, color verde).

Toxinas que se unen al sitio 4.- Las neurotoxinas que se unen al sitio 4 son de alacrán, específicamente las β toxinas. Estas toxinas son péptidos de aproximadamente 60-65 residuos de aminoácidos. Las β -toxinas inducen un cambio en la curva de activación, desplazándola hacia voltajes más negativos, y reducen la amplitud del pico de la corriente del canal de sodio (Fig. 13, sitio 4, color rojo).

1.14 BLANCOS BIOLÓGICOS DE LAS CONOTOXINAS.

La comunicación celular entre las neuronas es mediada por neurotransmisores. Éstos se encuentran almacenados en vesículas y se liberan en las terminales nerviosas después de la despolarización de la membrana durante un potencial de acción. Por ejemplo, la unión del neurotransmisor con el canal nicotínico induce un cambio conformacional en el receptor ionotrópico (un receptor ionotrópico es una asociación de varias subunidades diferentes que forman un canal iónico) que permite el flujo de sodio hacia dentro de la célula. Este flujo de sodio causa una despolarización celular y se abren los canales de sodio dependientes de voltaje por lo que se produce un potencial de acción (Fig. 6. Guyton, 1983). Los canales de calcio dependientes de voltaje también se abren, permitiendo el flujo de calcio al interior celular. El flujo de calcio al interior de la célula activa la enzima proteína cinasa C (PKC) lo que permite la fusión de las vesículas neurotransmisoras con la membrana, liberando su contenido, para difundirse por todos los espacios extracelulares y unirse a los receptores celulares más cercanos, continuando el proceso.

Existen diferentes canales iónicos que participan en la comunicación celular. En general los diferentes tipos de conotoxinas actúan sobre estos canales evitando la correcta comunicación celular. Tomando en cuenta sobre que canales iónicos actúan, las conotoxinas se pueden dividir en:

1.- Alfa (α) conotoxinas.- Estas toxinas fueron las primeras en ser aisladas del veneno de un caracol *Conus* y se les nombro alfa conotoxinas por tener la misma acción que las alfa neurotoxinas de las serpientes venenosa, las cuales inhiben el receptor nicotínico.

Dentro de las principales α -conotoxinas se encuentran las GI, GIA y GII de *Conus geographus* y la MI de *Conus magus*. Estas conotoxinas tienen una base de cisteinas CC-C-C con dos puentes disulfuro y pertenecen a la superfamilia A.

El mecanismo por el cual provocan parálisis es porque se unen a la subunidad alfa del canal nicotínico, de esta manera impiden la unión de la acetilcolina y no hay flujo de sodio al interior de la célula, el cual es básico para la despolarización de la membrana celular; en consecuencia, inhiben la neurotransmisión.

Las α -conotoxinas causan una inhibición postsináptica en las uniones neuromusculares ocasionando parálisis y muerte (Olivera y cols., 1990).

2.- Omega (ω) conotoxinas.- Las ω -conotoxinas son péptidos de entre 24 y 30 aminoácidos con 3 puentes disulfuro y una organización de cisteínas de C-C-CC-C-C por lo que pertenecen a la superfamilia O.

La ω -conotoxina más conocida es la GVIA de *Conus geographus*, aunque también se han reportado las MVIIA, MVIIIV y MVIID de *Conus magus*, la CnVIIA de *Conus consors* y la CVID de *Conus catus* (Olivera y cols., 1995). Estas toxinas bloquean los canales de calcio dependientes de voltaje principalmente los de tipo L y N neuronales y los tipo N musculares (Feng y cols., 2001). Estas toxinas al bloquear los canales de calcio interfieren con la propagación del potencial de acción celular.

La ω -conotoxina MVIIA bloquea los canales de calcio tipo N y se ha reportado que es entre 100 y 1000 veces más potente que la morfina y además no causa adicción, esta toxina es conocida como SNX-111 y ha sido probada por la FDA para el tratamiento del dolor crónico.

3.- Mu (μ)conotoxinas.- Las μ -conotoxinas actúan sobre los Nav's, tanto musculares y en menor medida los neuronales. Este tipo de conotoxinas pertenecen a la superfamilia M y tienen un arreglo de cisteínas de CC-C-C-CC (Terlau y Olivera, 2004). Estas toxinas se unen a los Nav's en el sitio designado como sitio 1 en el poro del canal, lo que conduce a una inhibición del flujo de sodio (Stephan y cols., 1994). Al unirse al sitio 1 del canal este tipo de toxinas compiten con la TTX y la STX (Gray y cols., 1988). Algunas toxinas pertenecientes a este grupo son las GIIIA, GIIIB yGIIA de *Conus geographus* (Safó y cols., 2000), y la SMIIIA de *Conus stercusmuscarum*. (Terlau y cols., 2004)

4.- Delta (δ) conotoxinas.- Las δ -conotoxinas pertenecen a la súper familia O, lo que significa que tienen un patrón de cisteínas de C-C-CC-C-C. Estas toxinas actúan sobre los Nav's, pero estas no compiten con la TTX y las μ -conotoxinas, por lo tanto su sitio de unión al canal no es en el sitio 1. Este tipo de toxinas son solubles en la membrana lipídica e interfieren en la apertura y cierre de los canales de sodio Nav's (Fainzilber, 1996). Algunos estudios sugieren que su sitio de unión es el sitio 6. Un ejemplo de este tipo de toxina es la δ -SVIE de *Conus striatus* (Leipold y cols., 2005).

5.-Kappa (κ) conotoxinas.- Son conotoxinas de la superfamilia O con un patrón de cisteínas de C-C-CC-C-C. Estas toxinas inhiben los canales Shaker de potasio además de retardar la inactivación de los Nav's (Oliva y cols., 2005), por lo cual ocasionan un rápido choque excitotóxico y la parálisis de las presas. La κ -conotoxina más conocida es la κ -PVIIA de *Conus purpurascens*. (Terlau y cols., 1996)

6.- ψ conotoxinas.- Conotoxinas pertenecientes a la superfamilia M con un arreglo de cisteínas de CC-C-C-CC. Estas toxinas bloquean a los receptores de acetilcolina. (Ireland y Van Wagoner, 2003)

7.- Sigma (σ) conotoxinas.- Estas toxinas pertenecen a la superfamilia S con un arreglo de cisteínas de C-C-C-C-C-C-C-C-C-C. Las σ -conotoxinas actúan sobre el receptor a serotonina 5-HT3 (Terlau y Olivera, 2004).

8.- Existe otro tipo de conotoxinas denominadas superfamilia I, estas conotoxinas presentan un arreglo de C-C-CC-CC-C-C. Las conotoxinas de esta superfamilia inhiben los canales Kv 1.1 y Kv 1.3 (Terlau y Olivera, 2004).

9.- La superfamilia P son toxinas con un arreglo de cisteínas -C-C-C-C-C-C-. Aún no se sabe sobre que canales iónicos actúan (Olivera y Cruz, 2001).

10.- μ O-conotoxinas.- Toxinas de la superfamilia O, con un arreglo de cisteínas de C-C-CC-C-C. Estas conotoxinas inhiben las canales de sodio Nav's. Ejemplos de estas conotoxinas son las μ O-MrVIA y μ O-MrVIB de *Conus marmoreus* (Terlau y Olivera, 2004).

Existen diferentes conotoxinas que tienen como blanco biológico los canales de sodio dependientes de voltaje. En la tabla siguiente se encuentran las conotoxinas que se han identificado hasta el momento:

μ -conotoxinas

| TOXINA | ESPECIE DE <i>Conus</i> | SECUENCIA | CISTEÍNAS | BLANCO |
|-----------|---------------------------|------------------------|-----------|-------------------|
| 1.-GIIIA | <i>C. geographus</i> | RDCCT00KKCKDRQCK0QRCCA | CC-C-C-CC | Nav 1.4 |
| 2.-GIIIB | <i>C. geographus</i> | RDCCT00KCKDRRCK0MKCCA | CC-C-C-CC | Nav 1.4 |
| 3.-GIIIC | <i>C. geographus</i> | RDCCT00KKCKDRRCK0LKCCA | CC-C-C-CC | Nav 1.4 |
| 4.-PIIIA | <i>C. purpurascens</i> | ZRLCCGF0KSCRSRQCK0HRCC | CC-C-C-CC | Nav 1.2 y Nav 1.4 |
| 5.-SmIIIA | <i>C. stercusmuscarum</i> | ZRCCNGRRGCSSRWCRDHSRCC | CC-C-C-CC | ? |

1, 2 y 3. Craig, 2000

4 y 5. Terlau y Olivera, 2004.

μ O-conotoxinas

| TOXINA | ESPECIE DE <i>Conus</i> | SECUENCIA | CISTEÍNAS | BLANCO |
|-----------|-------------------------|---------------------------------|------------|-------------------------------|
| 1.- MrVIA | <i>C. marmoreus.</i> | ACRKKWEYCIVPIIGFIYCCPGLICGPFVCV | C-C-CC-C-C | Nav 1.2 Nav 1.4 Nav 1.7 |
| 2.- MrVIB | <i>C. marmoreus.</i> | ACSKKWEYCIVPILGFVYCCPGLICGPFVCV | C-C-CC-C-C | Nav 1.2 Nav 1.4 |

Zorn y cols., 2006.

δ-conotoxinas

| TOXINA | ESPECIE DE <i>Conus</i> | SECUENCIA | CISTEÍNAS | BLANCO |
|-----------|----------------------------|---------------------------------|------------|-------------------------------|
| 1.- NgVIA | <i>C. nigropunctatus</i> | SKCFS0GTFCGIK0GLCCSVRCFSLFCISFE | C-C-CC-C-C | No determinado |
| 2.- GmVIA | <i>C. gloriamaris</i> | VKPCRKEGQLCDPIFQNCRCGWNCVLFV | C-C-CC-C-C | Nav 1.2 Nav 1.4 Nav 1.6 |
| 3.- PVIA | <i>C. purpuracens</i> | EACYAOGTFCGIK0GLCCSEFCLPGVCCFG | C-C-CC-C-C | Nav 1.2 Nav 1.4 Nav 1.6 |
| 4.- TxIB | <i>C. textile</i> | WCKQSGEMCNVLDQNCDDGYCIVFVCT | C-C-CC-C-C | No determinado |
| 5.- SVIE | <i>C. striatus</i> | DGCSSGGTFCGIH0GLCCSEFCFLWCITFID | C-C-CC-C-C | Nav 1.4 |

1.- Fainzilber y cols., 1994.

2.- Shon y cols., 1994.

4.- Fainzilber y cols., 1994.

3 y 5.- Terlau y Olivera, 2004.

Los venenos de los caracoles marinos del genero *Conus* han sido caracterizados las ultimas dos décadas y han tenido un impacto significativo en el área de la toxicología. Se han realizado diversos estudios los cuales revelan el mecanismo de acción de estas toxinas, lo que ha sido de gran utilidad no solo en el entendimiento del mecanismo molecular básico de envenenamiento por estos caracoles, sino también como herramienta farmacológica.

Los primeros indicios de que las conotoxinas podrían tener uso farmacológico se dieron durante los años setentas cuando en el laboratorio del Dr. Baldomero Olivera un estudiante de nombre Craig Clark les inyectó a los cerebros de ratones vivos el veneno de un caracol cono, observando una gran variedad de síntomas, que iban desde adormecimiento e hiperactividad hasta comezón. Al mismo tiempo otro estudiante Michael McIntosh establecía que el veneno de *C. magus* inducía fuertes temblores en roedores.

1.15 *Conus californicus*.



Fig. 15 .- *Conus californicus*

Los caracoles fueron descritos por primera vez en 1844 por Reeve, pertenecen a la especie *californicus*, miden entre 1.9 a 4.1 cm de largo, son de forma cónica con espiral en su parte superior, amarillentos con líneas longitudinales de tono café oscuro (www.enature.com). Habitan en la arena o grava, a una profundidad de 30 m. A diferencia de las otras especies de este género que habitan en mares tropicales, estos caracoles se les encuentra en aguas frías, preferentemente en las costas de California y Baja California. Se alimentan principalmente de gasterópodos *Sabella crassicornis* y *Diopatra ornata*. Su dieta es generalista, se ha reportado que puede consumir cerca de 56 especies diferentes (Kohn, 1966). Dentro de esta gran variedad de especies se encuentran diferentes tipos de peces, moluscos y gusanos (Saunders y Wolfson, 1961).

2 JUSTIFICACIÓN.

Durante los últimos años se ha incrementado la investigación de compuestos naturales con importancia biológica. La obtención de sustancias bioactivas aisladas de organismos marinos con propiedades antitumorales e inmunosupresoras, ha resultado de gran interés para la industria farmacéutica. Sin embargo, debido a la compleja composición química de los venenos, sólo algunas toxinas de caracoles del género *Conus* se han podido caracterizar y sintetizar en cantidades requeridas para su evaluación y desarrollo como fármacos.

De las cerca de diez mil especies de caracoles marinos venenosos existentes en el mundo, las del género *Conus* son las más interesantes y evolucionadas, encontrándose más variedades taxonómicas en el Océano Atlántico mexicano.

Las conotoxinas producidas por las diferentes especies del género *Conus* tienen blancos muy específicos y son capaces de distinguir proteínas homólogas incluso entre tejidos iguales de diferentes especies de presas. El tamaño pequeño de las toxinas (entre 12-30 aminoácidos) y su alta especificidad les confieren una gran ventaja para poder ser utilizadas en el estudio molecular de las interacciones que tienen con sus receptores o blancos biológicos. Además se puede estudiar el efecto que tiene la sustitución de diferentes aminoácidos en la especificidad de la conotoxina y de esta manera conocer el papel de los diferentes residuos de aminoácidos en el reconocimiento del receptor.

Cuando se administra algún medicamento, este no sólo se une específicamente al blanco deseado por lo que puede tener efectos colaterales en los pacientes. Se han identificado conotoxinas específicas que han sido utilizadas en el tratamiento de algunas enfermedades como las toxinas del *Conus magus*, cuya toxina MVIIIa produce un efecto analgésico entre mil y dos mil veces más potente que la morfina, por lo que fue sometido a aprobación de la FDA para administrarse contra el dolor severo causado por padecimientos oncológicos (www.investigacionydesarrollo.html). Otras conotoxinas se encuentran bajo estudio por su alto potencial analgésico en dolores crónicos (Olivera y cols., 1995). Las conotoxinas de otras especies como las de *C. geographus*, *C. catus*, y *C. marmoreus*, se producen actualmente en Australia por Nextec, para ser utilizadas en dolores de tipo neurológicos. Las conotoxinas como las κ -conotoxinas que tienen como blanco los canales de potasio, tienen un gran potencial para ser usadas en terapias para la hipertensión, arritmias y asma.

El caracol *Conus caifornicus* es una especie generalista cuya alimentación consta tanto de moluscos como de gusanos y peces lo que estaría suponiendo que la composición de su veneno es muy variada y puede contener conotoxinas de varios tipos. A pesar de esto no existe ningún estudio donde se muestre la actividad biológica de su veneno.

Los canales de sodio Nav's son muy importantes en la propagación de los impulsos nerviosos por lo que seguramente tienen que existir conotoxinas que bloqueen su función en los venenos de estos caracoles. Solo hay reportadas 7 conotoxinas que tengan como blanco biológico los canales de sodio. Estas conotoxinas son las GIIIA, GIIIA y GIIIC de *Conus geographus*, la PIIIA de *Conus purpurascens*, la SmIIIA de *Conus stercusmuscarum* y las MrVIA y MrVIB de *C. marmoreus*. Estas siete conotoxinas tienen efectos de bloqueo sobre el canal de sodio dependiente de voltaje de

tipo muscular cardiaco Nav 1.4 y sólo la conotoxina SmIIIa tiene efecto sobre un canal neuronal, a pesar de que los canales neuronales son muy importantes por encontrarse en el sistema nervioso central y ser los primeros en la propagación del potencial de acción. Existen otras 5 conotoxinas que tienen como blanco los Nav's pero a diferencia de las anteriores estas no bloquean el canal sino afectan el "gating" del mismo, estas son la NgVIA de *C. nigropunctatus*, la GmVIA de *C. gloriamaris*, la PVIA de *C. purpurascens*, la TxIB de *C. textile* y la SVIE de *C. striatus*.

3 OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVOS GENERALES.

- Identificar conotoxinas bloqueadoras del canal neuronal de sodio Nav 1.2 del caracol marino *Conus californicus*.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Transformación del cDNA* .
- Purificación del cDNA*.
- Síntesis de cRNA* in vitro.
- Expresión del cRNA* en ovocitos de la rana africana *Xenopus laevis*.
- Registro de las corrientes por la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (voltage clamp).
- Probar el efecto de las fracciones del veneno del *Conus* sobre la corriente del canal Nav 1.2.

* Canal Nav 1.2.

4 METODOLOGÍA.

4.1 TRANSFORMACIÓN DEL DNA DEL CANAL Nav 1.2.

El DNA del canal fue obtenido de la transformación de células competentes HB101, con el plásmido pNa200, el cual contiene la secuencia codificadora del canal Nav 1.2, utilizando la técnica de choque térmico.

La técnica de choque térmico se realizó de la manera siguiente:

- Se descongelaron las células competentes HB101 (100 μ l), manteniéndolas siempre en hielo.
- Se les agregaron 5 μ l del plásmido pNa200 (0.5 μ g/ μ l) y se mezcló perfectamente.
- Se incubó en hielo por espacio de 30 minutos.
- Se dio un choque térmico por espacio de 45 segundos a una temperatura de 42° C sin agitación en un bloque térmico marca Thermo Stat plus de Eppendorf.
- Se colocó la muestra en hielo por espacio de 2 minutos.
- Se le agregó 1 ml de medio comercial SOC (de Gibco BRL) a temperatura ambiente.
- Se agitó la muestra durante 1 hora a 225 rpm a una temperatura de 37° C en una incubadora marca Lab-Line modelo 11345 JPN.
- Las células se siembran en cajas de LB (marca Sigma)/tetraciclina (15 μ g/ml marca Sigma).
- Se incubaron toda la noche sin agitación a 37° C en una incubadora Lab-Line.

El cDNA fue extraído de las células utilizando la técnica del Kit comercial para midiprep de Gibco BRL de Life Technologies.

4.2 SÍNTESIS IN VITRO DEL cRNA DEL CANAL Nav 1.2.

Para la síntesis de cRNA del canal de sodio dependiente de voltaje Nav 1.2, proveniente de cerebro de rata, se utilizó el método siguiente:

- En primer lugar se digirió el DNA del plásmido pNa200 que contiene la secuencia codificadora del canal.
- Digestión del plásmido pNa200:
 - H₂O 11 μ l
 - DNA 5 μ l (a una concentración de 1 μ g/ μ l)
 - Amortiguador 3 2 μ l
 - Enzima Not 1 2 μ l
- Se incubó por 2 hrs a 37°C. en bloque térmico.
- Se agregó:
 - 1 μ l de EDTA 0.5 M.
 - 40 μ l de etanol al 100 %.
 - 2 μ l de acetato de amonio 3 M.
- Se mezcló y guardó durante 20 minutos a -70°C.
- Se centrifugó 20 minutos a 14,000 rpm (15 000 g) a 4°C, hasta formar la pastilla. Se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 7 μ l de agua libre de nucleasas.
- Se corrió un gel de agarosa para corroborar la linearización del plásmido. El gel se preparó con:
 - 0.6 g. de agarosa.
 - 30 ml. de TBE 1X (Anexo).
 - 2 μ l de bromuro de etidio (10mg/ml).

Se fundió la agarosa con el TBE (anexo) y una vez fundida completamente se le agregaron los 2 μ l de bromuro de etidio, se mezcló completamente y se vació en el contenedor de geles.

Una vez que el gel se formó, se colocó en la cámara de electroforesis con amortiguador TBE. Se cargó 1 μ l de DNA en cada pozo y se dejó correr por espacio de 45 minutos a un voltaje de 80 mV.

- Una vez confirmada la linearización se preparó la reacción de transcripción con:
 - 10 μ l de 2xNTP Cap.
 - 2 μ l de amortiguador de reacción 10x.
 - 1 μ l de mezcla de la enzima T7 (RNA polimerasa del Kit T7).

Para este plásmido se utiliza el Kit T7 mMessage mMachine de Ambion Inc.

- Se mezcló y se incubó a 37°C durante 2 horas en el bloque.
- Se le agregó 1 μ l de DNasa 1 del Kit, se mezcló muy bien y se incubó por 15 minutos a 37°C en bloque térmico.
- Para parar la reacción y recuperar el RNA se le agregó a la reacción:
 - 30 μ l de agua libre de nucleasas.
 - 25 μ l de solución de precipitación de LiCl.
- Se mezcló muy bien y se dejó toda la noche a -70°C.
- Se centrifugó 20 minutos a 14,000 rpm (15 000 g) a 4°C, se lava la pastilla con 1ml de etanol al 70% y se vuelve a centrifugar por 10 minutos a 14,000 rpm (15 000 g) a 4°C.
- Se resuspendió la pastilla en 20 μ l de TE (anexo) y se realizaron alícuotas de 1 μ l por tubo, para guardarse a -70°C.
- Para probar la calidad y cantidad de cRNA, se realizó un gel de agarosa.

El gel se preparó con:

- 3 gr de agarosa marca Boehringer.
- 30 ml de agua.
- 3 ml de amortiguador MOPS 10X (anexo).
- 1.5 ml de formaldehído.

Se fundió la agarosa con el agua, después se le agregó el MOPS y posteriormente el formaldehído. Esto se mezcló perfectamente y, se vertió en el contenedor de gel y se dejó secar.

Para cargar el RNA en el gel se preparó la reacción siguiente (las cantidades mostradas son para cada muestra de RNA que se desee correr):

- 5 μ l de formamida de Sigma
- 1 μ l de MOPS.
- 2 μ l de formaldehído de Sigma.
- 1 μ l de amortiguador de corrida.
- 0.16 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml).

Una vez que se realizó la mezcla se le agregó a una alícuota de RNA de 1 μ l y se incubó durante 10 minutos a 65 °C en bloque térmico.

Al terminar los 10 minutos se cargó el gel con la muestra y se corrió a 75 mV durante 1 hr. con amortiguador MOPS.

Los ensayos biológicos son muy importantes, ya que por medio de estos se pudo observar el efecto que tiene el veneno del *Conus californicus* sobre el canal Nav 1.2. Estos ensayos se llevaron a cabo inyectando el RNA del canal en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, y después probando el efecto del veneno sobre la corriente del canal.

4. 3 OBTENCIÓN DE LOS OVOCITOS DE LA RANA *Xenopus laevis*.

Los ovocitos se obtuvieron quirúrgicamente de ranas hembras maduras, bajo anestesia térmica, la cual consistió en sumergir al ejemplar en un baño de hielo, por un lapso de 1 hora.



Fig. 16.- Rana africana *Xenopus laevis*.

Se colocó la rana boca arriba sobre una charola quirúrgica cubierta de hielo y se cubrieron con hielo sus extremidades y cabeza. Se levantó la piel de la zona del abdomen (aproximadamente 1/3 o 1 cm.) y se le realizó una pequeña incisión horizontalmente para dejar descubierto el músculo, al cual también se le realizó una pequeña incisión de forma horizontal. Se procedió a la remoción de los ovocitos, poniéndolos inmediatamente dentro de una caja de Petri con medio ND96 sin calcio (anexo).



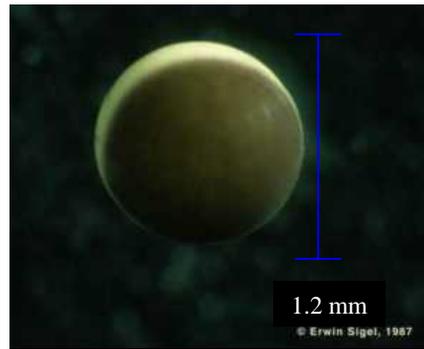
Fig. 17.- Ovocitos recién extraídos con membrana folicular.

Al terminar de extraer los ovocitos, se cosió en primer lugar el músculo de la rana y luego la piel, para después dejarla en recuperación dentro de una pecera con agua fría.

Los ovocitos extraídos se encuentran cubiertos por un fino tejido ovárico llamado folículo, el cual fue disociado por oscilación apacible en medio ND96 sin calcio y colagenasa tipo 1a, a una concentración de 10 mg / ml por espacio de 1 hora. Se lavaron los ovocitos 8 veces con medio ND96 sin calcio para eliminar toda la colagenasa. A continuación se lavaron nuevamente pero ahora con medio ND96 con calcio y gentamicina (anexo), para ser guardados con este medio a 18 ° C en una incubadora Heraeus de Kendro.



A



B

Fig. 18.- A.- Ovocitos con colagenasa en medio ND96 sin calcio. B.- Ovocito después del tratamiento con colagenasa (Sigel, 1987).

4.4 MICRO-INYECCIÓN DE RNA A OVOCITOS.

Al día siguiente se inyectaron a los ovocitos 30 ng de cRNA del canal Nav 1.2. La microinyección se llevó a cabo con un micromanipulador al cual se le colocó un capilar a modo de aguja. El capilar se cargó con la alícuota de RNA y después se introdujo en el micromanipulador y se prosiguió a inyectar los ovocitos en su polo vegetal. La microinyección se llevó a cabo dentro de una caja de Petri modificada con perforaciones para manipular los ovocitos, con medio ND96 con calcio.

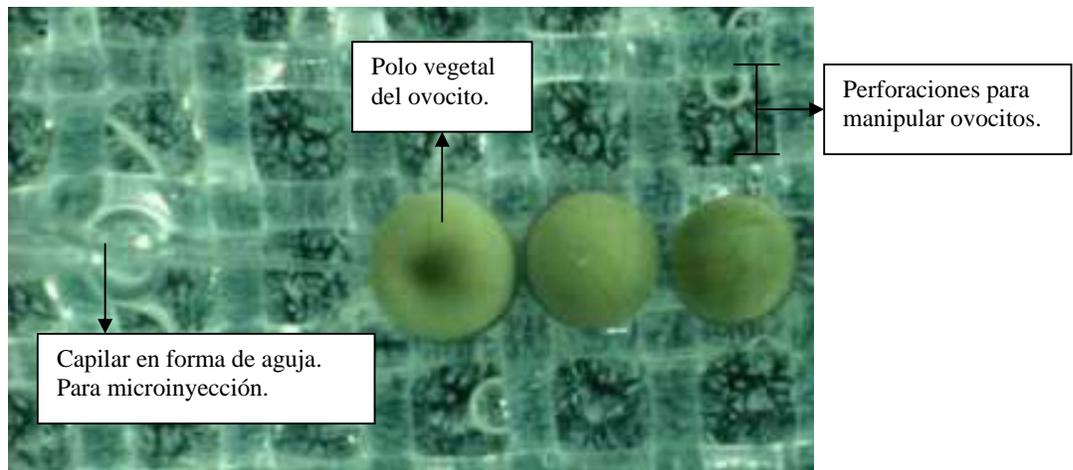


Fig. 19.- Microinyección de RNA en un ovocito.

Los ovocitos inyectados se guardaron en incubación a 18 °C en medio ND96 con calcio en la incubadora Heraeus de Kendro.

4.5 REGISTRO DE CORRIENTES.

Transcurridas 48 horas de la microinyección se comenzó a registrar las corrientes del canal de sodio con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (voltage clamp), utilizando un amplificador GENE CLAMP 500 de Axon Instruments. La solución de registro utilizada fue la ND50 y se utilizó 1 ml de esta solución, que es la capacidad de la cámara de registro.

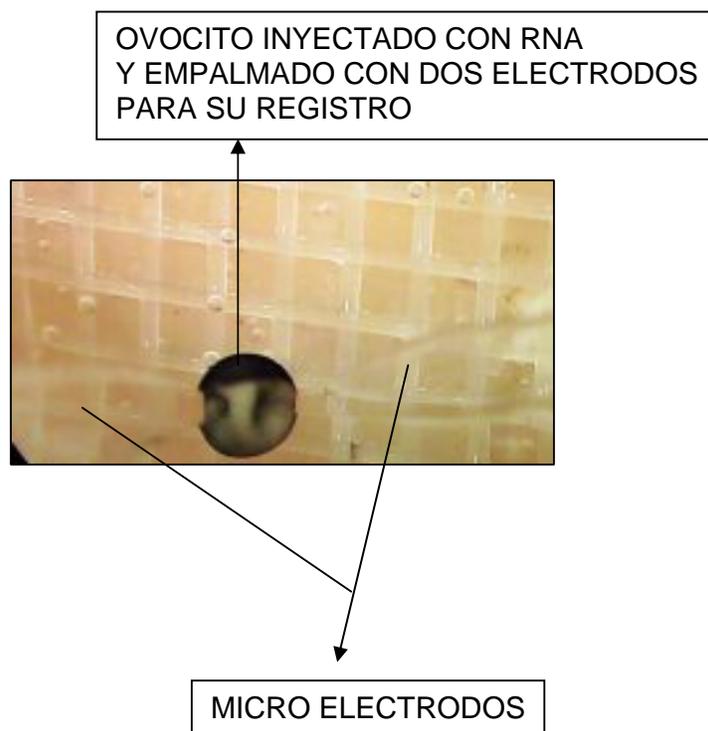


Fig. 20.- Empalme del ovocito con dos micro electrodos para medir las corrientes de sodio. Visto con microscópio estereoscópico.

El protocolo de pulsos utilizados fue a partir de -90 mV con intervalos de pulsos de 10 mV hasta llegar a un voltaje de 20 mV. Este protocolo se diseñó basándose en el artículo de Chen y cols., 2000.

4.6 PRUEBAS CON EL VENENO DEL CARACOL MARINO *Conus californicus*.

Para iniciar los ensayos se probaron 2 fracciones del veneno del caracol que nos fueron proporcionadas por el Dr. Alexei Licea y la bióloga Karla Juárez del C.I.C.E.S.E. Los caracoles se colectaron en la zona intermareal del kilómetro 47 de la carretera Tijuana-Ensenada, sin determinar el estadio de los organismos. Ellos llevaron a cabo la extracción del veneno y su fraccionamiento por la técnica cromatográfica de HPLC. Las dos fracciones fueron extraídas en una columna Vvdac 218 TP 54 a un flujo de 1.0 ml/minuto., se hizo un lavado de 5 minutos con 100% de solución A (0.12% de ácido trifluoroacético en agua) y luego un gradiente lineal de 0-60% de solución B (0.1% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo) con un incremento de B de 1% por minuto. Las fracciones liofilizadas se resuspendieron en 100 µl de agua. Se registró la corriente de Na⁺ por el método de “voltage clamp” y se agregaron diferentes cantidades de cada una de las fracciones del veneno a la cámara de registro, con el medio ND50.

La fracción de HPLC que bloqueó la corriente se volvió a analizar por HPLC.

A continuación se muestra una tabla donde se muestra la secuencia de fraccionamiento por HPLC del veneno del caracol:

| FRACCIÓN | SUBFRACCIÓN | EFECTO |
|---|--------------------|---------------------------------------|
| 1.- FRACCIÓN I | | SIN EFECTO |
| 2.- FRACCIÓN II | | BLOQUEO DEL CANAL |
| SUBFRACCIONES DE LA FRACCIÓN II | | |
| | 2.1.- 30-35 | SIN EFECTO |
| | 2.2.- 35-40 | BLOQUEO DEL CANAL |
| | 2.3.- 40-45 | BLOQUEO DEL CANAL |
| | 2.4.- 45-50 | AFECTACIÓN GATING |
| | 2.5.- 50-55 | SIN EFECTO |
| SUBFRACCIONES DE LA FRACCIÓN 35-40 | | |
| | 2.2.1.- 35 | BAJO BLOQUEO DEL CANAL |
| | 2.2.2.- 36 | BLOQUEO DEL CANAL |
| | 2.2.3.- 38 | BLOQUEO DEL CANAL |
| | 2.2.4.- 39 | ALTERACIÓN DEL GATING DEL CANAL |
| | 2.2.5.- 40 | BLOQUEO DEL CANAL |
| SUBFRACCIONES DE LA FRACCIÓN 38 | | |
| | 2.2.3.2.- S | BLOQUEO DEL CANAL. TIPO µ-CONOTOXINA. |

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Obtención del DNA del canal Nav 1.2.

El DNA del canal se obtuvo de la transformación de las células HB101 con el plásmido pNa200. La extracción del DNA se realizó por la técnica de midiprep de Gibco BRL de Life Technologies.

Una vez purificado el DNA del canal, fue linearizado con la enzima Not 1. Se confirma que el DNA es el adecuado a través de una electroforesis en gel de agarosa:

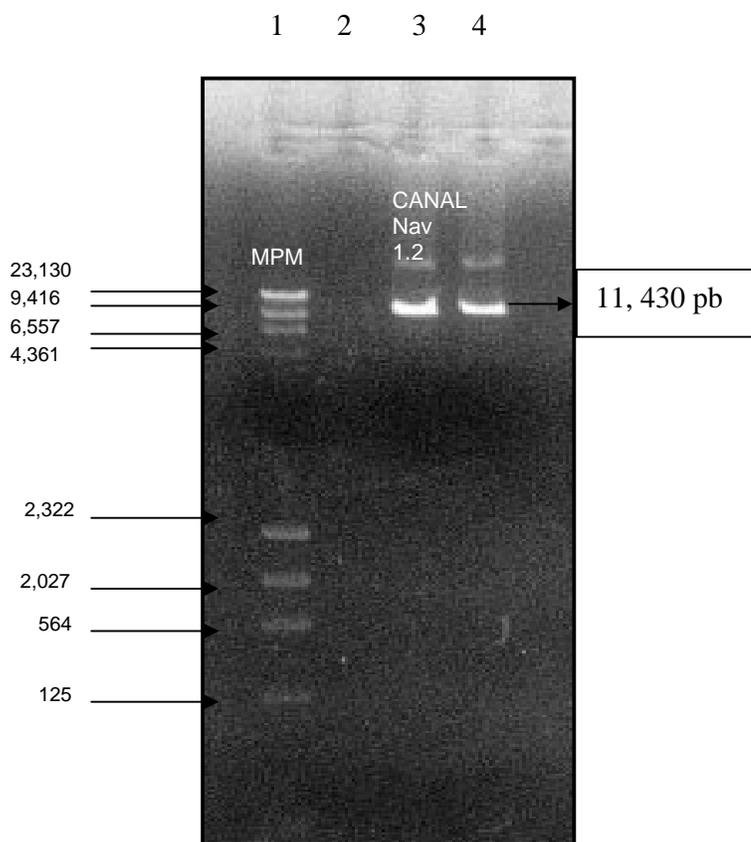


Fig. 21.- Gel de DNA donde se muestra el plásmido pNa 200 linealizado con la enzima Not 1. Carril 1.- Marcador de peso molecular. Carril 3 y 4.- DNA del plásmido pNa 200.

El peso molecular del DNA del plásmido pNa200 obtenido de la transformación y purificación del mismo, coincide con el peso molecular esperado de 11,430 pb. comprobando con este gel que el DNA obtenido es linearizado favorablemente con la

enzima de restricción Not 1 (carriles 3 y 4) y es efectivamente el plásmido pNa200 que contiene la región codificante para el canal de sodio dependiente de voltaje Nav 1.2.

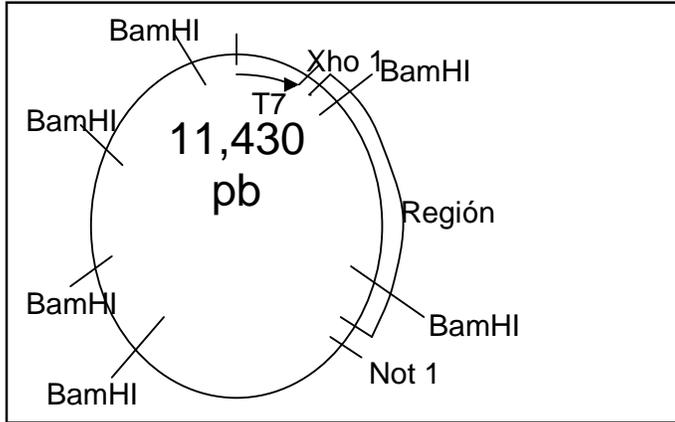


Fig. 22.- Mapa de restricción del plásmido pNa200. Plásmido proporcionado por el Dr. Alan L. Goldin.

Para confirmar que el DNA era el correcto, se realizaron ensayos con las enzimas de restricción Xho 1 esperándose una banda (Fig. 23) y con la enzima BamHI 6 bandas (Fig. 24) sobre el plásmido no linearizado. En el siguiente gel se observa la presencia de la banda obtenida por la digestión con la enzima Xho 1:

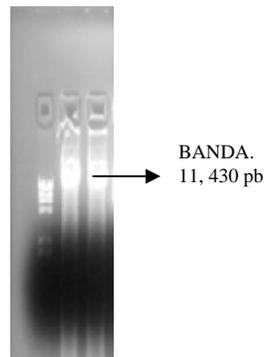


Fig. 23.- Gel de DNA donde se muestra la banda resultante de la linearización con la enzima Xho 1.

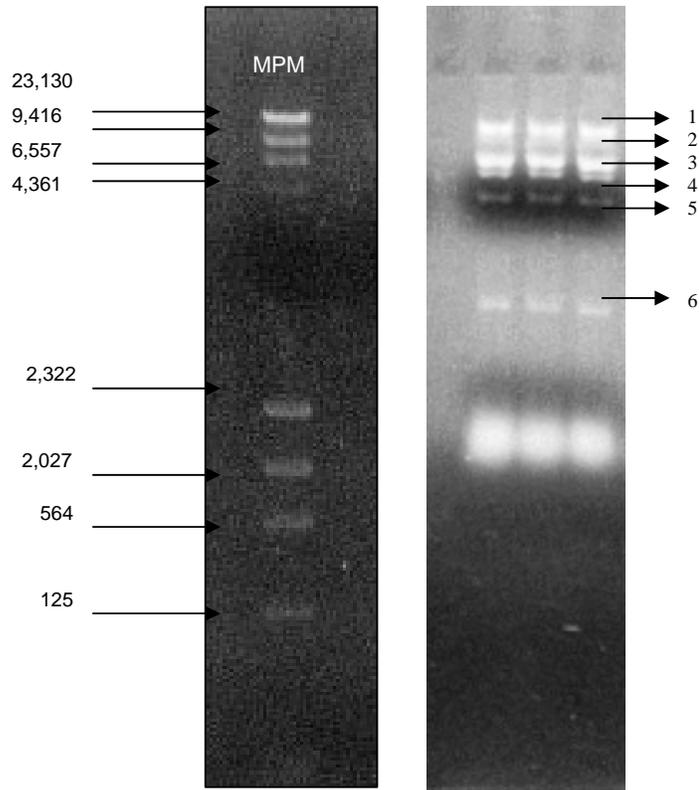


Fig. 24.- Gel de DNA digerido con la enzima BamH 1, mostrando las 6 fragmentos esperados (el gel es cualitativo).

Con estos dos últimos ensayos se comprobó que el DNA obtenido era el correcto al dar un patrón de 6 fragmentos con la enzima BamH1 (Fig. 24) y 1 fragmento con la enzima Xho 1 (Fig. 23), además de linearizarse correctamente con la enzima Not 1 (Fig. 21).

5.2 Síntesis in vitro del mRNA del canal Nav 1.2.

Una vez obtenido el cDNA se utilizó la técnica de mMMESSAGE mMACHINE para la síntesis de mRNA. Para cuantificar y comprobar que el mRNA obtenido de la transcripción in vitro no se encontraba degradado, la reacción fue monitoreada en un gel desnaturalizante de agarosa y se cuantificó con un espectrofotómetro a 260 nm.

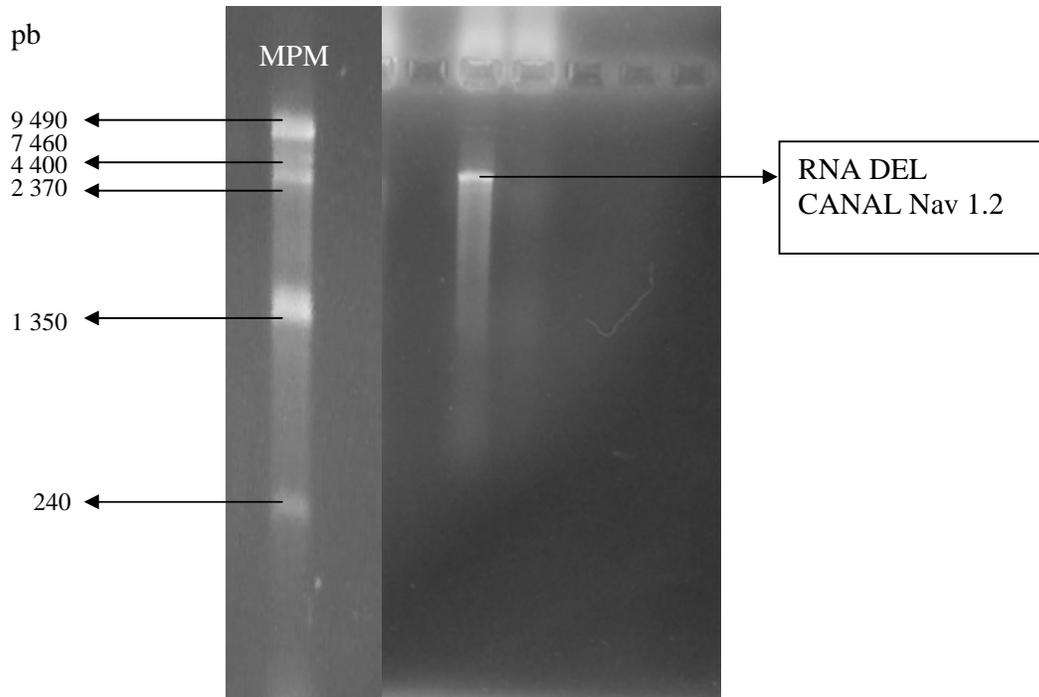


Fig. 25.- Electroforesis en gel del RNA del canal Nav 1.2.

El mRNA del canal se obtuvo a una concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y en buen estado debido a que se observa una banda bien definida. (Fig. 25)

5.3 Inyección del mRNA del canal Nav 1.2 en los ovocitos.

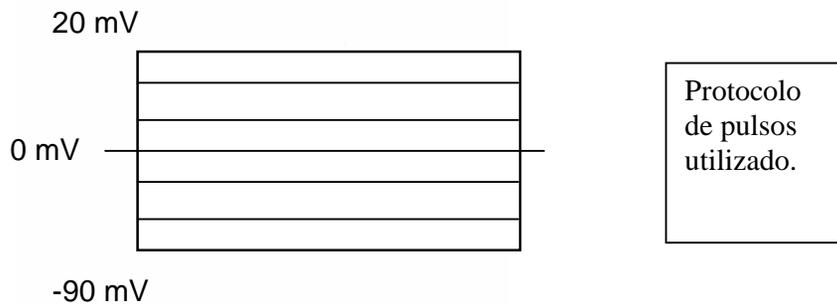
Se inyectaron 30 ng de mRNA del canal Nav 1.2 en los ovocitos, previamente obtenidos por cirugía. Estos ovocitos fueron incubados por espacio de dos días en medio ND96 con calcio (anexo) y gentamicina a una temperatura de 18°C.

5.4 Registro de las corrientes del canal de sodio Nav 1.2.

El registro del canal de sodio se llevó a cabo 48 horas después de la microinyección, por medio del método de fijación de voltaje con dos microelectrodos (voltage clamp), utilizando la solución ND50 (anexo) como solución de registro.

Primero se registraron los ovocitos que no fueron inyectados con el fin de revisar su estado.

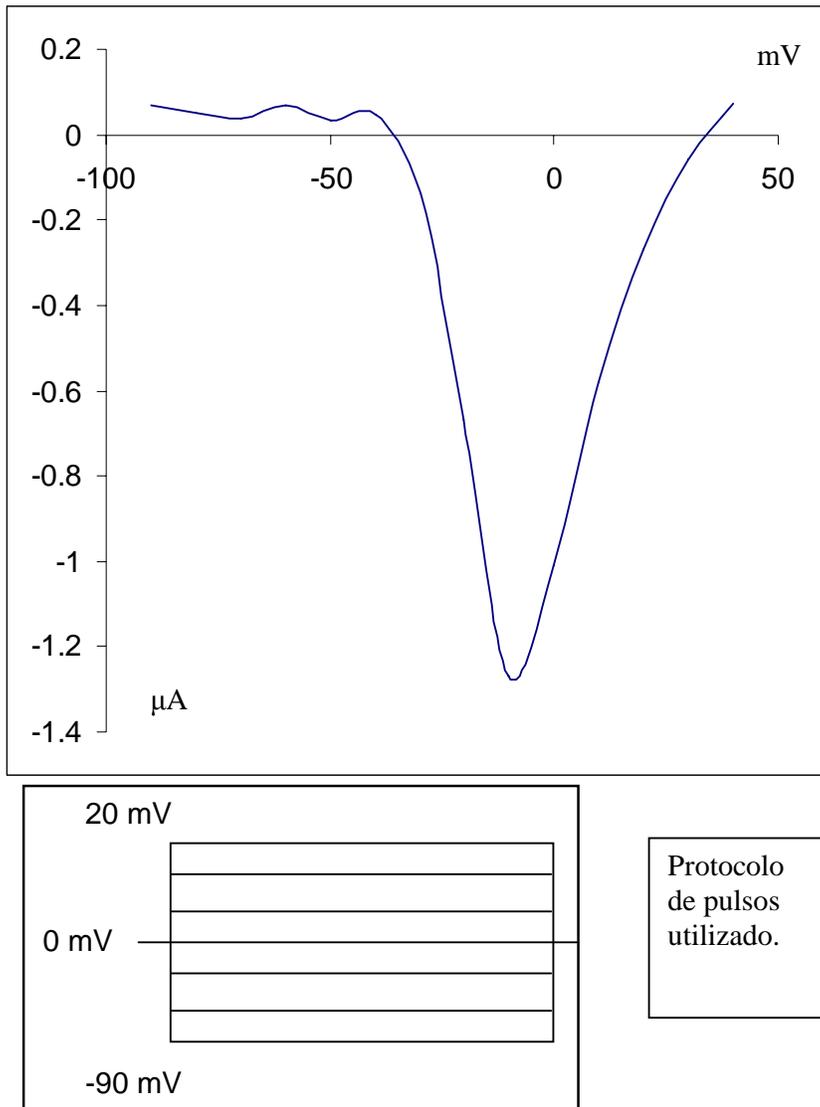
Registro de los ovocitos control.



Este registro muestra que los ovocitos se encuentran en buen estado y no muestran ninguna corriente endógena en el rango de voltajes en los que se registrará el canal de sodio. El pico de corriente que se observa al inicio y al final de los pulsos de voltaje corresponde a la corriente capacitiva de las células.

A continuación se registraron las corrientes de los ovocitos inyectados con el mRNA del canal Nav 1.2, para observar si estos expresaban el canal y si el protocolo de voltaje diseñado era el correcto para este tipo de canales. Las corrientes de sodio registradas se encuentran representadas en el registro siguiente.

Registro de las corrientes del canal Nav 1.2 expresado en los ovocitos a -10 mV.



Este resultado demuestra que el canal Nav 1.2 es funcional; esto es, que se está expresando correctamente en el ovocito y que el protocolo de voltaje utilizado es el correcto (Chen y cols., 2000).

5.5 Pruebas con las fracciones del veneno del caracol *Conus californicus* en el canal Nav 1.2.

Una vez registrada la corriente del canal de sodio Nav 1.2 se probaron los efectos de las dos fracciones del veneno. Se utilizaron diferentes concentraciones de

ambas toxinas. La concentración inicial con la que se comenzó el ensayo fue de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y se probaron 10 μg de cada fracción. Con la fracción I no se observó ningún tipo de efecto sobre la corriente del canal, utilizándose hasta 50 μg de la fracción 1; por otro lado la fracción 2 con la primera concentración presentó un pequeño efecto sobre la corriente del canal, probándose así diferentes concentraciones, encontrando que con 20 μg se tenía un efecto drástico sobre la corriente.

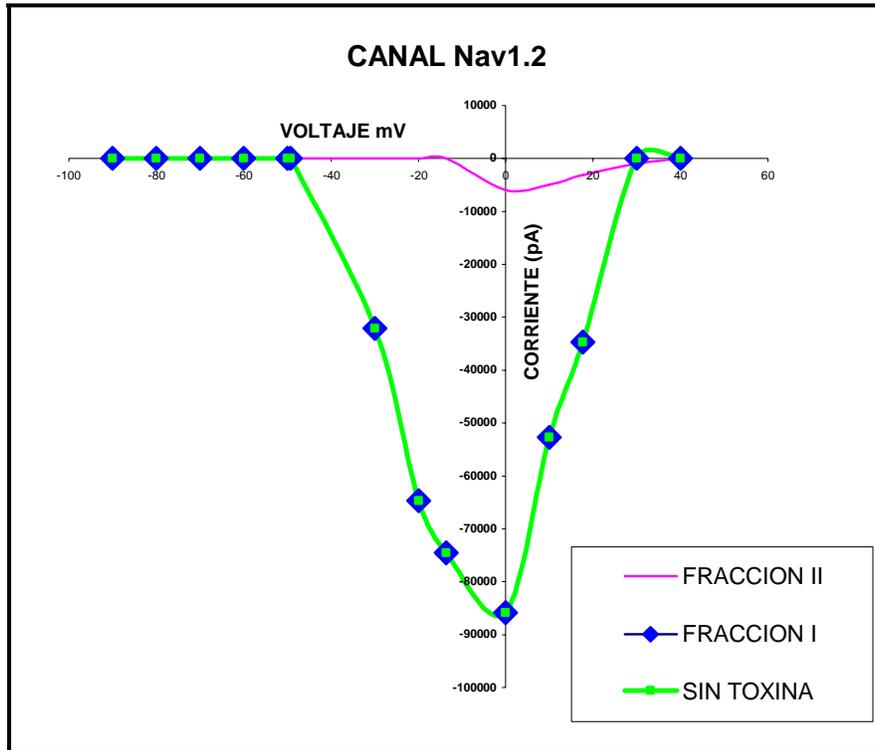


Fig. 26.- Curva corriente contra voltaje (I/V) donde se observa: Verde) Corriente del canal de sodio control. Azul) Corriente del canal después de la adición de la fracción I del veneno. Rosa) Corriente obtenida después de la adición de 20 μg de la fracción II.

Como ya se mencionó anteriormente, la fracción que bloqueó la corriente del canal fue la fracción II. Esta fracción es la que se colectó del minuto 30 al 60 en el cromatograma presentado a continuación:

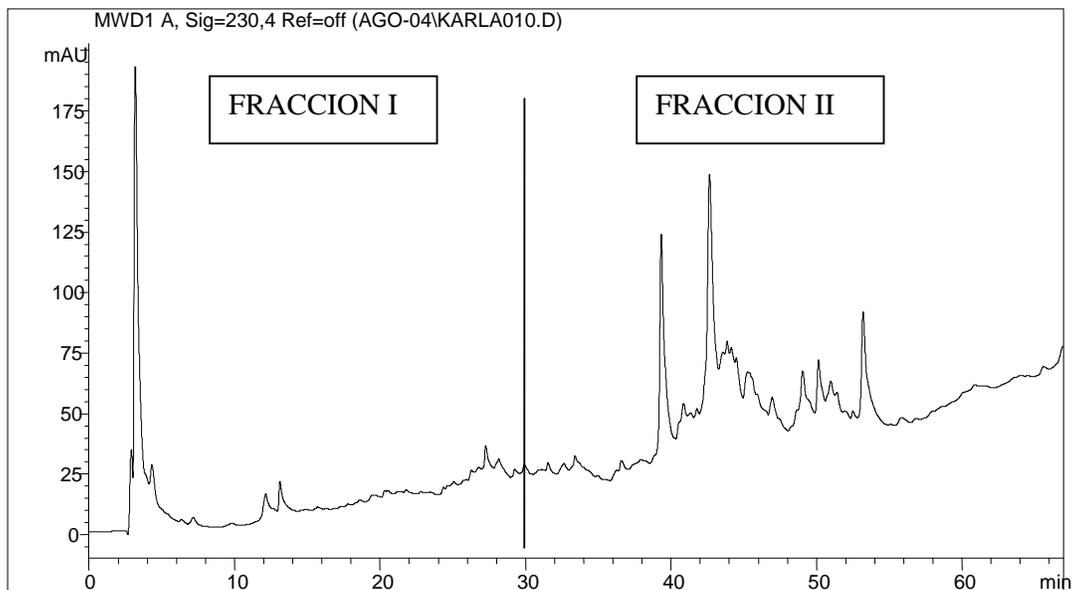


Fig. 27.- Cromatograma del veneno del caracol *Conus californicus*. Las dos fracciones fueron obtenidas en una columna Vvdac 218 TP 54 a un flujo de 1.0 ml/minuto. Se hizo un lavado de 5 minutos con 100% de solución A (0.12% de ácido trifluoroacético en agua) y luego un gradiente lineal de 0-60% de solución B (0.1% de ácido trifluoroacético con acetonitrilo) con un incremento de B de 1% por minuto. (Laboratorio del Dr. Alexei Licea)

El cromatograma de la fracción II muestra un mayor número de componentes.

La fracción II se volvió a separar, se subfraccionó en fracciones de 5 min. Se comenzaron a probar, adicionándole al ovocito una cantidad igual a la que bloqueó en el primer ensayo, esto es, 20 µg.

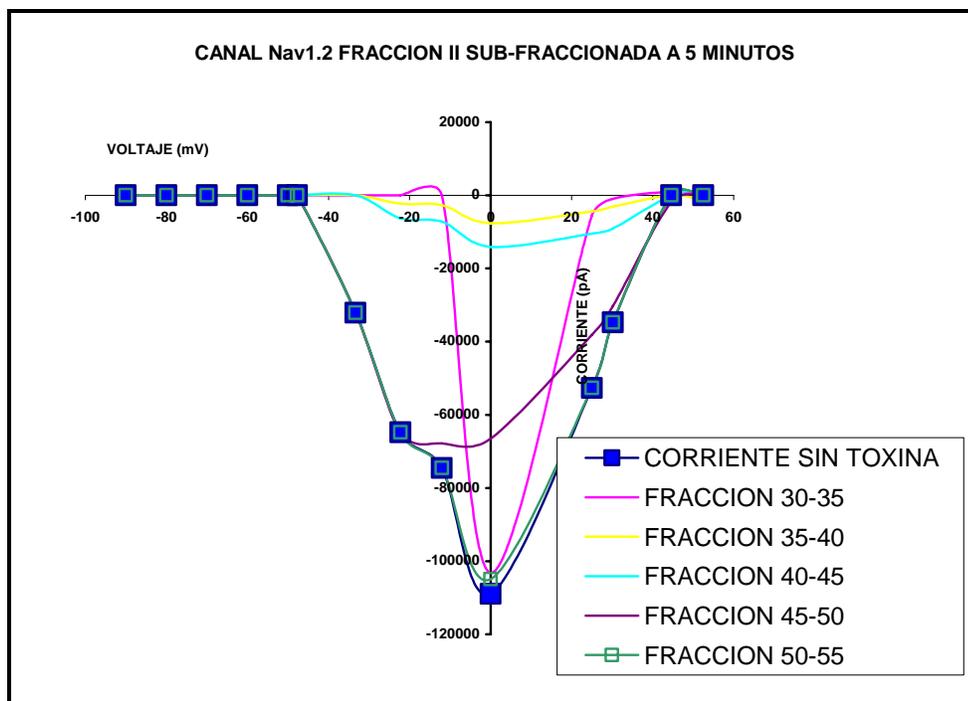


Fig. 28.- Curva I/V del canal Nav 1.2 después de añadir las subfracciones obtenidas de la fracción II. Azul) Control. Rosa) Fracción 30-35. Amarillo) Fracción 35-40. Verde claro) Fracción 40-45. Morado) Fracción 45-50. Verde oscuro) Fracción 50-55.

Se puede observar que las fracciones correspondientes a los minutos 35-40 y 40-45 son las fracciones que provocan un bloqueo sobre el canal; la fracción correspondiente a los minutos 35-40 nos da un bloqueo del 98 % de la corriente y la fracción 40-45 un bloqueo del 90 %. Por los resultados obtenidos podemos decir que dentro de estas fracciones se encuentran toxinas ya sean del tipo μ -conotoxinas o μ O-conotoxinas ya que sólo se inhiben los canales (Nielsen y cols., 2002; Terlau, y Olivera, 2004) sin afectarse la apertura y cierre del canal (gating). En contraste se observa que la fracción correspondiente a los minutos 45-50 provoca una afectación del “gating” del canal; el umbral de activación se desplaza hacia voltajes mas negativos; lo cual sugiere que en esta fracción se podrían encontrar toxinas del tipo δ -conotoxinas (Leipold, y cols, 2005). Estos resultados nos indican que dentro de la diversidad de proteínas que forman el veneno de este caracol, encontramos por lo menos un tipo de toxinas que nos bloquean el canal y otro que nos afecta el “gating” del mismo.

Una vez obtenidos estos resultados se volvió a subfraccionar la fracción 35-40, de manera que se obtuvieron 5 fracciones. Estas fracciones fueron probadas en ovocitos inyectados con el canal Nav 1.2, probándose 20 µg de las fracciones.

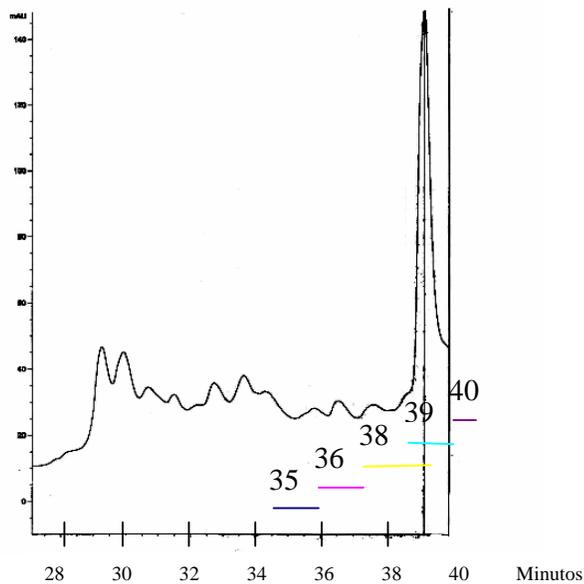
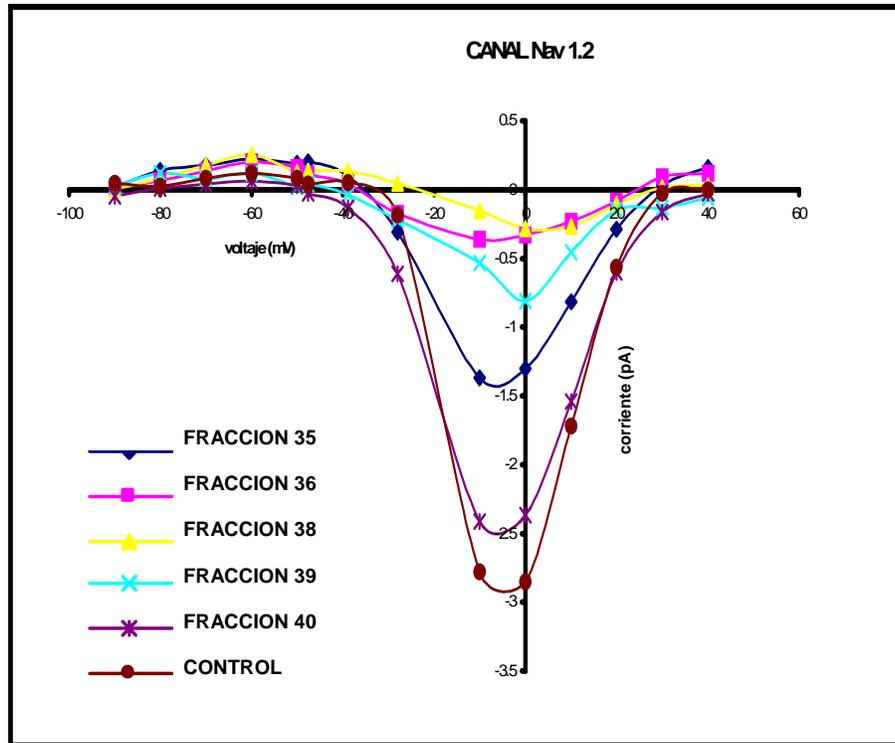


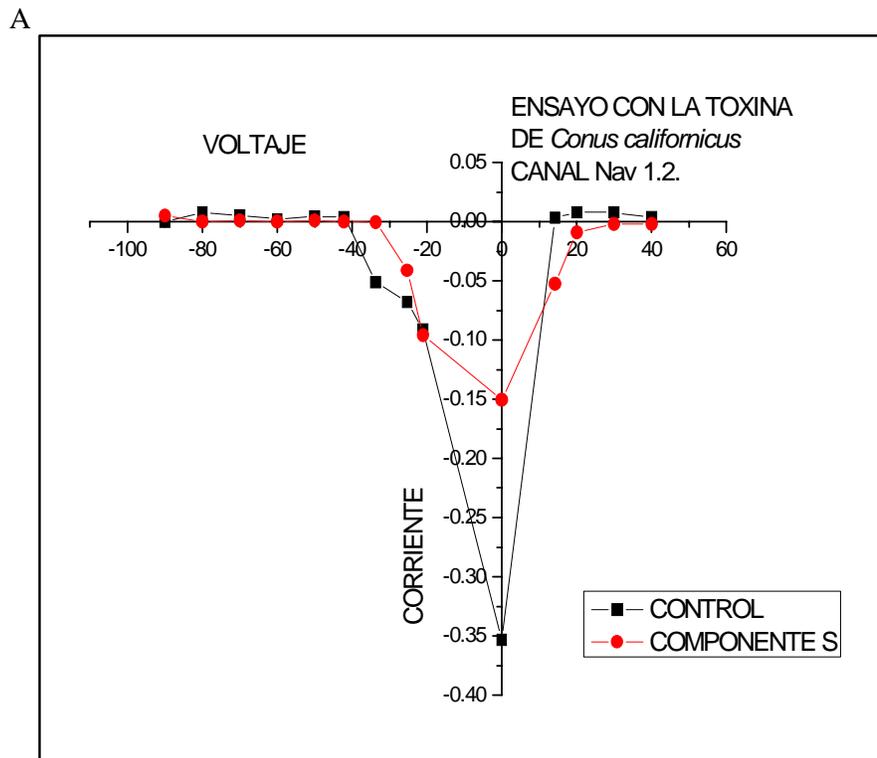
Fig. 29.- A) Curva I/V con las subfracciones de la fracción 35-40. Serie 1) Fracción del minuto 35. Serie 2) Fracción del minuto 36. Serie 3) Fracción de minuto 38. Serie 4) Fracción del minuto 39. Serie 5) Fracción del minuto 40. Serie 6) Sin toxina. B) Cromatograma correspondiente a los minutos 35-40. Azul) 35. Rosa) 36.

Amarillo) 38. Verde) 39. Morado) 40. Las fracciones se obtuvieron en una columna Vvdac 218 TP 54 a un flujo de 1.0 ml/minuto. Se hizo un lavado de 5 minutos con 100% de solución A (0.12% de ácido trifluoroacético en agua) y luego un gradiente lineal de 0-60% de solución B (0.1% de ácido trifluoroacético con acetonitrilo) con un incremento de B de 1% por minuto (Laboratorio del Dr. Alexei Licea).

Como podemos observar en la gráfica todas las fracciones probadas provocan un efecto de bloqueo sobre la corriente del canal; la fracción 39, además de bloquear al canal en un 80 %, cambia el pico de la corriente a voltajes más positivos, lo que estaría sugiriendo que dentro de la fracción 39 además de encontrarse una μ -conotoxina o μ O-conotoxina responsable del bloqueo del canal, se encuentra una δ -conotoxina responsable del cambio en el pico de la corriente. Las fracciones 35, 36, 38 y 40 nos provocan un bloqueo del canal, en el caso de la fracción 35 es del 40 %, en las fracciones 36 y 38 del 95 % y, del 10 % en el caso de la fracción 40. Dentro de las fracciones que bloquean el canal podemos observar que las fracciones 36 y 38 son las que nos dan un mayor bloqueo.

Hasta este punto podemos suponer que en estas fracciones del veneno tenemos dos tipos de conotoxinas las que bloquean al canal impidiendo la entrada de los iones de sodio que pueden ser de tipo μ -conotoxinas o μ O-conotoxinas, y otras de tipo delta-conotoxinas las cuales afectan la apertura y cierre del canal (gating).

Se decidió purificar los péptidos de las fracciones que bloquearon en un mayor porcentaje al canal, estas fracciones fueron las fracciones 36 y 38. De la purificación de la fracción 38, se obtuvo un componente llamado S, del cual se probaron 20 μ g en el ensayo con los ovocitos.



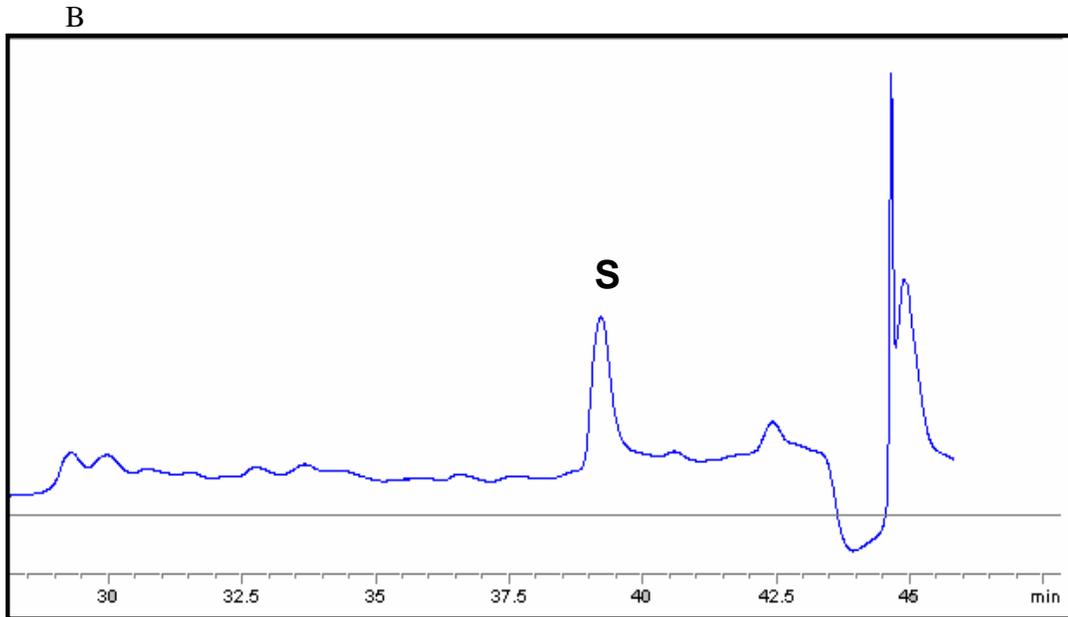


Fig. 30.- A) Efecto de componente S de la fracción 38 sobre la curva I/V del canal Nav 1.2. B) Cromatograma de la fracción 38. Columna Vydac C18 equilibrada con ácido trifluoroacético al 0.12 % con un flujo de 1.0 ml/minuto. Se hizo un lavado de 5 minutos con 100% de solución A (0.12% de ácido trifluoroacético en agua) y luego un gradiente lineal de 0-60% de solución B (0.1% de ácido trifluoroacético con acetonitrilo) con un incremento de B de 1% por minuto. (Laboratorio del Dr. Alexei Licea)

Como se puede apreciar en la gráfica anterior el componente S inhibió el 43 % de la actividad del canal. Al presentar un efecto de bloqueo sobre el canal de sodio Nav 1.2, nos está indicando que pertenece ya sea al grupo de las μ -conotoxinas o de las μ O-conotoxinas, responsables del bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje, uniéndose al sitio 1 extracelular del canal de sodio en caso de ser μ -conotoxinas. Lo que prosigue en secuenciar este componente para su identificación.

6 CONCLUSIONES.

La identificación de conotoxinas se ha llevado a cabo principalmente en el modelo del ratón, por inyección peritoneal o intracraneal de los venenos de los caracoles. En contraparte, la ingeniería genética ha hecho posible probar el efecto de los venenos sobre los canales iónicos, blancos moleculares de las toxinas, expresados en sistemas heterólogos.

Dados los efectos paralizantes del veneno del *Conus californicus*, es de esperarse que uno de los blancos moleculares en las membranas de las células de sus presas sean los canales de sodio que dependen del voltaje (Nav), responsables de la propagación del impulso nervioso (potencial de acción).

En este trabajo llevamos a cabo por primera vez el ensayo farmacológico del veneno del *Conus californicus*, sobre los Nav neuronales expresados en los ovocitos de la rana africana *Xenopus laevis*. Con el registro de las corrientes de sodio por la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos se lograron identificar varios componentes con actividad.

- El componente S bloqueó la corriente del canal Nav1.2. Este efecto corresponde al provocado por las μ -conotoxinas y las μ o-conotoxinas. Hasta la fecha se conocen cinco μ -conotoxinas, la PIIIA de *C. purpurascens*, la GIIIA, GIIIB y GIIC de *C. geographus* y la SmIIIA de *C. stercusmuscarum*. Esta identificación es muy importante debido a que por la compleja composición de los venenos de los *Conus* no se han podido caracterizar un gran número de toxinas provenientes de estos invertebrados. A la fecha se tienen identificadas dos μ O-conotoxinas las MrVIA y MrVIB de *C. marmoreus*.
- Dentro de la fracciones 39 y 45-50 existen componentes que cambian el voltaje al que se abren los canales. Este efecto corresponde a toxinas que se unen a los sitios 6 de los canales de sodio Nav, que son las δ -conotoxinas. Hasta la fecha se tienen reportadas dos δ -conotoxinas que afectan la cinética del canal Nav 1.2: la PVIA de *C. purpurascens* y la GmVIA de *C. gloriamaris*. Se conocen otras cinco δ -conotoxinas que tienen efecto sobre otras isoformas de los Nav.

Este trabajo contribuyó en la identificación de componentes que podrán aplicarse en el bloqueo selectivo de los canales de sodio neuronales, dado que sólo existen 3 tipos de conotoxinas hasta la fecha reportadas que bloqueen el canal y, al parecer, solo una de ellas (PIIA) es específica para esta isoforma.

7 PERSPECTIVAS.

- Secuenciar el componente S de la fracción 38 para poder identificar el tipo de conotoxina que es, con base en su patrón de cisteínas.
- Producir la toxina recombinante con el fin de realizar ensayos de dosis-respuesta para determinar su especificidad.
- Purificar las toxinas de las fracciones que tuvieron efecto sobre el “gating” del canal.

8 LITERATURA CITADA.

- Aidley, D.J., Stanfield, P.R. 1998. Ion channels molecules in action. First edition. Cambridge University Press, UK.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1994. Molecular Biology of The Cell. Tercera Edición. Garland Publishing, Inc. USA.
- Bezanilla, F. 2005. Voltage-gate ion channels. IEEE Trans Nanobioscience. 4(1): 34-48.
- Catterall, W.A. 1977. Membrane potential-dependent binding of scorpion toxin to the action potential Na⁺ ionophore. J. Biol. Chem. 10, 252 (23), 8660-8668.
- Catterall, W.A., Cestel , S. 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. Biochimie 82: 883-892.
- Cartier, G.E., Yoshikami, D., Gray, W.R., Luo, S., Olivera, B.M., McIntosh, J.M. 1996. A new α -conotoxin which targets $\alpha 3\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. J. Biol. Chem. 271, 7522-7528.
- Chen, Y.H, Dale, T.J., Romanos, M.A., Whitaker, W.R.J., Xie Xin Min., Clare J.J. 2000. Cloning distribution and functional analysis of the type III sodium channel from human brain. European Journal of Neuroscience, Vol.12, pp. 4281-4289.
- Craig, A.G., Bandyopadhyay, P., Olivera, B.M. 1999. Post-translationally modified peptides from Conus venoms. Eur J Biochem 264: 271-275.
- Craig, A.G., 2000. The Characterization of Conotoxins. J.Toxicol.-Toxin Reviews, 19 (1), 53-93.
- Duda T.F., Palumbi, S.R. 2004. Gene expresión and feeding ecology: evolution of piscivory in the venomous gastropod genus *Conus*. The Royal Society, 271, 1165-1174.
- Fainzilber, M., Kofman, O., Zlotkin, E., Gordon, E. 1994. A new neurotoxin receptor site on sodium channels is identified by a conotoxin that affects sodium channel inactivation in mollusks and acts as an agonist in rat brain. J.Biol. Chem. 252, 8669-8676.
- Feng, Z.P., Hamid, J., Doering, C., Bose, G. M., Snutch, T.P., Zamponi, G.W. 2001.

- Fozzard, H.A., Hanck, D.A. 1996. Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. *Physiol. Rev.*, 76(3), 887-926.
- Goldin, Alan L., Barchi, R.L., Caldwell, J.H., Hofmann, F., Howe, H.J.C., Kallen R.G., Mandel, G.Jr., Meisler, M.H., Berwald, N.Y., Noda, M., Tamkun, M.M., Waxman, S.G., Wood, J.N., Catterall, W.A. 2000. Nomenclature of voltage-gate sodium channels. *Neuron* 28: 365-368.
- Gray, W.R., Olivera, B.M., Cruz, L.J., 1988. Peptide toxins from venomous *Conus* snails. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 665-700.
- Guyton A.C. 1983. *Fisiología Humana*. Quinta Edición. Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México.
- Guyton A.C. 1992. *Tratado de Fisiología Médica*. Octava Edición. Editorial Interamericana- McGraw Hill. México.
- Hernández, A.V., Félix, R. 2001. *Fisiopatología de los canales sensibles al voltaje- Avance y perspectiva* vol. 20. Marzo-abril.
- Hille, B., 1992. *Ionic channels of excitable membranes*. Segunda edición. Sinauer associates Inc. USA.
- Ireland, C.M., Van Wagoner, R.M. 2003. An improved solution structure for ψ -conotoxin PIIIE. *Biochemistry*, 42, 6347-6352.
- Kaufenstein, S., Huys, I., Lamthanh, H., Stöcklin, R., Sotto, F., Menez, A., Tytgat, J., Mebs, D. 2003. A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. *Toxicon* 42, 43-2.
- Kohn, A.J. 1959. The Ecology of *Conus* in Hawaii. *Ecol. Monogr* 29: 47-90.
- Kohn, A.J. 1966. Food specialization in *Conus* in Hawaii and California. *Ecology* 47: 1041-43.
- Kohn, A.J., 1968. Microhabitats, abundance and food of *Conus* on atoll reefs in the Maldive and Chagos Islands. *Ecology* 49, 1046-1062.
- Kohn, A.J., Saunders, P.R., Wiener, S. 1960. Preliminary studies on the venom of the marine snail *Conus*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 90, 706-725.
- Leipold, E., Hansel, A., Olivera, B.M., Terlau, H., Heinemann, S.H. 2005. *FEBS*, 579: 3882- 3884.
- Li, R.A., Tomaselli, G.F., 2004. Using the deadly μ -conotoxins as probes of voltage-gated sodium channels. *Toxicon* 44: 117-122.

- Lombet A., Bidard J.N., Lazdunski M. 1987. Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel. FEBS 219, 355- 359.
- López-Vera, E., Heimer de la Coteria, E.P., Maillo, M., Riesgo-Escovar, J.R., Olivera, B.M., Aguilar, M.B. 2004. A novel structural class of toxins: the methionine-rich peptides from the venoms of turrid marine snails (Mollusca, Conoidea). Toxicon 43, 365-374.
- Myers, R.A., Cruz, L.J., Rivier, J., Olivera, B.M., 1993. *Conus* peptides as chemical probes for receptors and ion channels. Chem. Rev. 93, 1923-1936.
- Nielsen, K.J., Watson, M., Adams, D.J., Hammarström, A.K., Gage, P.W., Hill, J.M., Craik, D.J., Thomas, L., Adams, D., Alewood, P.F., Lewis, R.J. 2002. Solution structure of μ -conotoxin PIIIA, a preferential inhibitor of persistent tetrodotoxin-sensitive sodium channels.
- Nybakken, J.W., Mool, V., Khon, A.J. 1972. Radula tooth structure of the gastropod *Conus imperialis*. Science 176, 49-51.
- Olivera, C., Gonzalez, V., Naranjo, D. 2005. Slow inactivation in voltage gate potassium channels is insensitive to the binding of pore occluding toxins. Biophys J., Agosto., 89 (2): 1009-19.
- Olivera, B. M., Rivier, J., Clark, C., Ramilo, C. A., Corpuz, G.P., Abogadie, F.C., Mena, E.E., Woodward, S.R., Hillyard, D.R., Cruz, L.J. 1990. Diversity of *Conus* neuropeptides. Science 249, 257-263.
- Olivera, B.M., Cruz, L.J., 2001. Conotoxins, in retrospect. 2001 Toxicon 39: 7-14.
- Olivera, B.M., Hillyard, D.R., Marsh, M., Yoshikami, D. 1995. Combinatorial peptide libraries in drug design: lessons from venomous cone snails. Tibtech 13, 422-426.
- 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. Vol.8, 2102-2109.
- Pauron, D., Barhanin, J., Lazdunski, M. 1985. The voltage-dependent Na⁺ channel of insect nervous system identified by receptor sites for tetrodotoxin, and scorpion and sea anemone toxins. Biochem 131, 1226-1233.
- Safo, P., Rosenbaum, T., Shcherbatko, A., Choi, D., Han, E., Toledoaral, J., Olivera, B.M., Brehm, P., Mandel, G. 2000. Distinction among neuronal subtypes of voltage-activated sodium channels by μ -conotoxin PIIIA. J. Neurosci, 20: 76-80.

- Saunders, P.R., Wolfson, F. Food and feeding behavior in *Conus californicus* Hinds. Veliger 3: 73-76.
- Sigel E. 1987. www.ux.unibe.ch
- Stephan, M.M., Potts, J.F., Agnew, W.S. 1994. The micro1 skeletal muscle sodium channel: mutation E403Q eliminates sensitivity to tetrodotoxin but not to μ -conotoxins GIIA and GIIIB. J Membr Biol, 137: 1-8.
- 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.
- Terlau, H., Olivera, B.M. 2004. Conus venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. Physiol Rev, 84: 41-68.
- Vaught, K.C., 1989. A classification of living mollusca. American Malacologist, Inc. Melbourne, FL.
- West, P.J., Bulaj, G., Garrett, J.E., Olivera, B.M., Yoshikami, D. 2002. μ -Conotoxin SmIIIA, a potent inhibitor of tetrodotoxin-resistant sodium channels in amphibian sympathetic and sensory neurons. Biochemistry 41, 15388-15393.
- Wood, J.N., Boorman, J.P., Okuse, K., Mark, D.B. 2004. Voltage-gated sodium channels and pain pathways. Wiley Periodicals, Inc.
- Zorn, S., Leipold, E., Hansel A., Burlaj, G., Olivera, B.M., Terlau, H., Heinemann, S.H. 2006. The μ O-conotoxin MrVIA inhibits voltage-gated sodium channels by associating with domain 3. FEBS Lett., 20., 580 (5): 1360-64.
- www.bioq.unizar.es
- www.coneshell.net
- www.enature.com
- www.homepage.psy.utexas.edu
- www.investigacionydesarrollo.html
- www.ionmemb.com
- www.nighthawktricity.wsu.edu
- www.plataforma.uchile.cl

- www.aeu.es
- www.psicologia-online.com

9 ANEXO.

Amortiguador TBE

| Stock | 10X | 5X | Concentración final 1X (concentración de trabajo) |
|-------------------|----------|----------|--|
| Tris base | 108 g. | 54 g. | 89 mM |
| Acido bórico | 55 g. | 27.5 g. | 89 mM |
| EDTA 0.5 M pH 8.0 | 40 ml. | 20 ml. | 2 mM |
| Aforar a: | 1000 ml. | 1000 ml. | |

Colorante para corrimiento de DNA en gel.

| | |
|--------------------|--------|
| Azul de bromofenol | 0.25 % |
| Xileno cianol FF | 0.25 % |
| Glicerol en agua | 30 % |

Se guarda a 4 °C.

Gel de agarosa 1% para DNA

| | |
|-------------------|---------|
| Agarosa | 0.3 g. |
| TBE 1X | 30 ml. |
| Bromuro de etidio | 1.4 µl. |

Se funde la agarosa en el buffer TBE 1X y se le agrega el bromuro de etidio. Esto se coloca dentro un contenedor de geles para que una vez solidificado se coloque en la cámara de electroforesis y se carguen las muestras de DNA con el colorante. El voltaje para correr el gel fue de 80 mV.

Gel de agarosa para RNA

- 1.- 0.3 gr de agarosa de disuelven en 30 ml de agua.
- 2.- Añadir 3 ml de MOPS 10 X.
- 3.- Añadir 1.5 ml de formaldehído.
- 4.- Vaciar en contenedor.

Medio LB sólido

1.- A 1000 ml de LB 1X líquido agregar 15 g de agar.

2.- Esterilizar en autoclave.

3.- Colocar en cajas y guardar a 4 ° C.

** Tetraciclina.- se le agrega a una concentración de 15 µg/ml.

Medio ND96

| | Stock | Concentración final mM | 1000 ml. | 500 ml. |
|---------------------|--------|------------------------|----------|---------|
| KCl | 1 M | 2 | 2 ml. | 1 ml. |
| Hepes | 1 M | 5 | 5 ml. | 2.5 ml. |
| Piruvato | 1.25 M | 2.5 | 2 ml. | 1 ml. |
| NaCl | 1 M | 96 | 96 ml. | 48 ml. |
| MgCl | 1 M | 1 | 1 ml. | 0.5 ml. |
| CaCl ₂ * | | 1.8 | 1.8 ml. | 0.9 ml. |
| Gentamicina ** | | | 100 mg. | 50 mg. |

*Para medio ND96 con calcio.

**Para medio ND96 con calcio y gentamicina.

Se ajusta el pH 7.5 y se esteriliza por filtración.

MOPS 10X

| | Para 1000 ml | Concentración final |
|-------------------|--------------|---------------------|
| MOPS | 41.86 g. | 0.4 M |
| Acetato de sodio | 6.8 g. | 0.1 M |
| EDTA 0.5 M pH 8.0 | 20 ml. | 0.01 M |

Se ajusta el pH a 8 con NaOH. Se filtra y se guarda a 4 °C, en recipiente ambar.

TE

1.- Tris HCL 10 mM.

2.- EDTA 1 mM.

A un pH de 7.