



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**"Purificación y caracterización química y biológica de péptidos
del veneno de *Conus spurius*"**

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

KAREN SOFÍA LUNA RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Roberto Arreguín Espinosa

Dra. Laura Escobar Pérez

Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera

Dra. Judith Sánchez Rodríguez

México D. F. 2006



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.

Contenido

<i>Abreviaturas utilizadas</i>	5
<i>Resumen</i>	9
1. Introducción	11
2. Antecedentes	15
2.1. Veneno y toxinas	15
2.2. Clasificación de las toxinas de los <i>Conus</i>	15
Conotoxinas	17
Conopéptidos	21
Otros componentes	23
2.3. Actividad biológica	23
Canales iónicos	24
2.4. Generalidades de los moluscos	31
Phylum Mollusca	31
Clase Gastropoda	32
<i>Conus</i>	34
Morfología del aparato venenoso	38
<i>Conus spurius</i>	40
2.5. Ecología química	40
2.6. Historia del estudio de los <i>Conus</i>	41
3. Planteamiento del problema	45
4. Objetivo	47
5. Hipótesis	48
6. Área de recolección	49
6.1. Provincia caribeña	49
6.2. Rasgos batimétricos y topográficos	50
6.3. Tipos y origen de los sedimentos, distribución y transporte	50
7. Parte experimental	51
7.1. Colecta y transporte de los especímenes	51
7.2. Obtención de los conductos venenosos	51
7.3. Extracción del veneno	51
7.4. Separación y purificación de los componentes del veneno	51
7.5. Repurificación de los péptidos	52
7.6. Análisis de la estructura primaria	52
7.7. Reducción y alquilación	53
7.8. Corte enzimático	53

7.9.	Determinación de las masas moleculares	54
7.10.	Composición de aminoácidos	54
7.11.	Caracterización biológica	55
8.	Resultados	62
8.1.	Identificación de especímenes	62
8.2.	Separación y purificación de los componentes del veneno	63
8.3.	Purificación de los péptidos	64
	Péptido 34Sr4	64
	Péptido 33Sr3	65
8.4.	Estructura primaria	66
	Péptido 34Sr4	66
	Péptido 33Sr3	68
8.5.	Determinación de las masas moleculares	71
8.6.	Caracterización biológica	73
	Bioensayo en ratón	73
	Bioensayo en caracoles <i>Pomacea paludosa</i>	75
	Bioensayo en lapas <i>Patella opea</i>	76
	Bioensayo en peces <i>Lebistes reticulatus</i>	77
9.	Discusión	78
9.1.	Conorfamida-Sr4 (péptido 34Sr4)	79
9.2.	Péptido sr7a (33Sr3)	82
10.	Conclusiones	91
	<i>Literatura citada</i>	92
	<i>Apéndice</i>	101
	HPLC	101
	Degradación de Edman	101
	Espectrometría de masas	102

Índice de tablas

Tabla 1. Superfamilias de conotoxinas y familias que se han asignado a cada una de ellas.....	23
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Conus spurius</i>	31
Tabla 3. Análisis de aminoácidos del péptido 34Sr4.....	66
Tabla 4. Análisis de aminoácidos del péptido 34Sr4.....	67
Tabla 5. Análisis de aminoácidos del péptido sr7a.....	71
Tabla 6. Actividad biológica de péptidos nativos aislados de <i>C. spurius</i> en ratones.....	74
Tabla 7. Actividad biológica de los péptidos nativos aislados de <i>C. spurius</i> en caracoles.....	75
Tabla 8. Actividad biológica de los péptidos nativos aislados de <i>C. spurius</i> en lapas.....	76
Tabla 9. Conorfamidas encontradas anteriormente en el veneno de <i>C. spurius</i>	80
Tabla 10. Comparación entre el péptido sr7a y μ O-conotoxinas reportadas hasta el momento.....	83
Tabla 11. Comparación entre el péptido sr7a y algunas δ -conotoxinas.....	85
Tabla 12. Comparación entre el péptido sr7a y la κ -conotoxina.....	85
Tabla 13. Comparación entre el péptido sr7a y algunas ω -conotoxinas.....	86
Tabla 14. Comparación entre el péptido sr7a y las γ -conotoxinas.....	87
Tabla 15. Efectos biológicos de γ -conotoxinas y el péptido sr7a.....	88

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la concha de un gasterópodo.....	34
Figura 2. Esquema anatómico de un gasterópodo.....	35
Figura 3. Esquema del sistema nervioso de un gasterópodo.....	36
Figura 4. Esquema del aparato venenoso de <i>Conus</i> y micrografía electrónica de barrido del diente radular de dos especies de <i>Conus</i> : <i>C. purpurascens</i> (izquierda) y <i>C. obscurus</i> (derecha)	40
Figura 5. Mapa del Mar Caribe	49
Figura 6. Fotografía de un caracol <i>Pomacea paludosa</i> , caracol manzana	57
Figura 7. Fotografía de la concha del caracol <i>Pomacea Paludosa</i>	58
Figura 8. Esquema del sistema nervioso del caracol <i>Pomacea</i> (Ghesquiere, 1990).....	58
Figura 9. A) Fotografía de una lapa <i>Patella opea</i> . B) Representación esquemática de la vista inferior de una lapa común.....	59
Figura 10. Fotografía del pez Guppy, <i>Lebistes reticulatus</i>	60
Figura 11. Fotografías del caracol <i>Conus spurius</i>	62
Figura 12. Perfil cromatográfico del extracto crudo del conducto venenoso de <i>C. spurius</i>	63
Figura 13. Perfil cromatográfico de la repurificación del péptido 34Sr4	64
Figura 14. . Perfil cromatográfico de la repurificación del péptido 33Sr3	65
Figura 15. Secuencia primaria del péptido 34Sr4.....	66
Figura 16. Secuencia primaria del péptido 33Sr3.....	68
Figura 17. Perfil cromatográfico del corte enzimático del péptido 33Sr3 con quimotripsina.....	69
Figura 18. Secuencia de aminoácidos del péptido 33Sr3.....	69
Figura 19. Secuencia del péptido sr7a obtenida a partir de cortes con α -quimotripsina.....	70
Figura 20. Espectro de masas del péptido conorfamida-Sr4.....	72
Figura 21. Espectro de masas del péptido sr7a.....	73
Figura 22. Fotografía mostrando el método de inyección para el bioensayo en caracol.....	76
Figura 23. Fotografía mostrando las lapas empleadas en el bioensayo con el péptido CNF-Sr4.....	77

Abreviaturas utilizadas

1. Aminoácidos estándar

<i>Nombre</i>	<i>Abreviatura</i>
alanina	A
cisteína	C
ácido aspártico	D
ácido glutámico	E
fenilalanina	F
glicina	G
histidina	H
isoleucina	I
lisina	K
leucina	L
metionina	M
asparagina	N
prolina	P
glutamina	Q
arginina	R
serina	S
treonina	T
valina	V
triptófano	W
tirosina	Y

2. Modificaciones postraduccionales

<i>Nombre</i>	<i>Abreviatura</i>
extremo carboxilo amidado	-NH ₂
γ carboxiglutamato	γ
hidroxiprolina	O
serina glucosilada	S.
treonina glucosilada	T.
bromotriptófano	<u>W</u>
D-triptófano	W.
sulfotirosina	<u>Y</u>
D-γ-hidroxicvalina	V
Ácido piroglutámico	Z

3. Glosario general

<i>Nombre</i>	<i>Abreviatura</i>
5-hidroxitriptamina	5-HT
Acetilcolina	ACh
Calcio	Ca ²⁺
Conorfamida-4	CNF-4
Cisteína	Cys
Ditiotreitol	DTT
Electrospray	ESI
Bombardeo atómico rápido	FAB
γ-carboxiglutamato	Gla
Cromatografía líquida de alta eficiencia	HPLC
Instituto de Neurobiología	INB
Potasio	K ⁺
Desorción-ionización mediante láser asistida por matriz	MALDI
Sodio	Na ⁺
N-metil-D-aspartato	NMDA
Libra por pulgada cuadrada	psi
Feniltiocarbamato	PTC
Feniltiohidantoína	PTH
Sistema nervioso autónomo	SNA
Sistema nervioso central	SNC
Saxitoxina	STX
Trietilamina	TEA
Ácido trifluoroacético	TFA
Tiempo de vuelo	TOF
Tetrodotoxina	TTX

Resumen

Los organismos marinos han llegado a ser uno de los grupos con mayor potencial en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, ya que poseen propiedades únicas y características especiales que no se encuentran presentes en organismos terrestres. La mayoría de las especies marinas han elaborado a través de su historia evolutiva un sistema de defensa química basado en la producción de compuestos de alta complejidad molecular, cuya síntesis y almacenamiento favorece la sobrevivencia del organismo (Thompson *et al.*, 1983). La familia Conidae es una familia de moluscos gasterópodos venenosos que contiene uno de los grupos de depredadores más exitosos que existen: los caracoles marinos *Conus*.

Los caracoles depredadores *Conus* constituyen una especie rica en toxinas y además son uno de los géneros más diversos (>500 especies). El veneno de estos caracoles está compuesto de péptidos que tienen funciones tanto ofensivas como defensivas y de rápida acción sobre el sistema nervioso central y la unión neuromuscular (Olivera y Cruz, 2001). Estos péptidos han sido llamados “conotoxinas”. Han pasado ya más de dos décadas desde que la primer conotoxina fue caracterizada bioquímicamente.

En este trabajo se realizó la purificación y caracterización química de dos péptidos aislados del veneno de la especie *Conus spurius* recolectada en el Golfo de México, y se evaluó el efecto biológico de dichas toxinas en diferentes organismos: ratones, moluscos y peces. La purificación de las conotoxinas se llevó a cabo mediante HPLC-RP. La estructura primaria se determinó mediante diversas técnicas como la reducción y alquilación, composición de aminoácidos, digestión con quimotripsina y secuenciación automática basada en la degradación de Edman. Se comprobó la masa molecular por medio de espectrometría de masas. Las secuencias obtenidas fueron:

Péptido	Secuencia de aminoácidos
34Sr4	GPM γ DPL γ IIRI-NH ₂
33Sr3	CLQFGSTCFLGDDDDICCSGECFYSGGTFGICS

El péptido **34Sr4** (conorfamida-Sr4) presenta similitud con otros péptidos obtenidos anteriormente en el veneno de *C. spurius* (Maillo-Peñalver, 2001), las conorfamidas. En los ensayos biológicos se pudo observar que el péptido 34Sr4 (CNF-Sr4) presenta actividad tanto en

vertebrados como en invertebrados. El comportamiento de los ratones inyectados con el péptido 34Sr4 (CNF-Sr4) es semejante al de ratones inyectados intracranealmente con conorfamida-Sr1 la cual, a su vez, produce los mismos efectos que el péptido cardioactivo FMRF-NH₂, por lo que se pudiera pensar que el péptido 34Sr4 es homólogo a este tipo de neuropéptidos. Los resultados obtenidos en los bioensayos en moluscos (en caracol *Pomacea* hiperactividad y en lapas *Patella* parálisis) soportan la idea que el péptido 34Sr4 pertenezca a la familia de los RF-amido péptidos. Cabe mencionar que el péptido 34Sr4 no tuvo efecto en peces, probablemente debido a que el *Conus spurius* es una especie vermívora y, por lo tanto, no es de esperarse que los componentes de su veneno estén dirigidos a los tipos y subtipos de blancos moleculares presentes en los peces.

Si se tratara de un péptido de la familia de los RF-amido péptidos, la actividad de este péptido en el SNC de mamíferos puede ser una herramienta neurológica para entender el papel de los RF-amido péptidos en estos sistemas y sería la cuarta conorfamida aislada del veneno de *C. spurius*.

El péptido **33Sr3** (sr7a) presenta seis cisteínas en su estructura primaria con el arreglo característico de la superfamilia O; sin embargo hasta el momento es imposible indicar con seguridad la superfamilia a la cual pertenece este péptido ya que no se conoce la estructura de su precursor. Comparando la secuencia de aminoácidos obtenida para este péptido con las conotoxinas reportadas para la superfamilia O, se puede especular sobre la familia a la cual pudiera pertenecer el péptido 33Sr3 (sr7a).

Esté péptido representaría la primera conotoxina perteneciente a la superfamilia O aislada de la especie vermívora *Conus spurius*. Sin embargo, es necesario identificar su blanco farmacológico mediante métodos de electrofisiología.

1. Introducción

Los organismos marinos son uno de los grupos con mayor potencial en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, ya que poseen propiedades únicas y características especiales (sus moléculas son solubles en agua, pequeñas y biológicamente activas contra patógenos) que no se encuentran presentes en organismos terrestres y les confieren propiedades biológicas de gran interés para fines terapéuticos. A lo largo de su historia evolutiva, la mayoría de las especies marinas han elaborado un sistema de defensa química basado en la producción de compuestos de alta complejidad molecular, cuya síntesis y almacenamiento favorece la supervivencia del organismo (Thompson *et al.*, 1983). La defensa química en invertebrados marinos ha sido reportada por varios autores (Green, 1977; Engel y Pawlik, 2000; Tsukamoto *et al.*, 2001), quienes coinciden en los mecanismos de defensa que los invertebrados marinos han desarrollado a través de su historia evolutiva es una respuesta a la depredación y una herramienta en la competencia por espacio. Green y Bakus (1975) asumen que la defensa química en invertebrados marinos es solventada a menudo por productos secundarios del metabolismo, que han sido alterados y concentrados por selección natural durante diversos periodos; es por esto que los invertebrados marinos han sido reconocidos como una importante fuente de compuestos bioactivos con alto potencial de explotación farmacológica (Garzón, 1993).

En los últimos 20 años se han descubierto en los organismos marinos el mayor número de nuevas moléculas y muchas de éstas son biológicamente activas contra patógenos y contra enfermedades humanas como el cáncer, el SIDA, la malaria, etc. (Carballo, 2002).

La farmacología basada en productos de origen marino se ha desarrollado desde hace más de dos décadas en varios países (Fenical y McConnell, 1976; Munro *et al.*, 1989; Huysecom *et al.*, 1985; Blunt *et al.*, 1990; Jimeno *et al.*, 1996; Rueda *et al.*, 1997) y se han descrito miles de productos naturales (como terpenos, esteroides, algunos derivados de aminoácidos, alcaloides policíclicos, etc.), muchos de éstos activos contra el cáncer de pulmón o de colon, los linfomas, los melanomas y el SIDA, o con propiedades antibióticas e incluso antipalúdicas* (Faulkner, 1992 y Rinehart, 2000). En la actualidad se conocen especies que constituyen una fuente potencial de productos biomédicos, como las esponjas *Axinella weltneri* (Océano Índico) y *Stylotella agminata* (Océano Pacífico), efectivas contra el cáncer de pulmón; o como la *Clathria*

* Fuente: National Institute of Cancer, USA (www.cancer.gov)

pyramida (Australia), efectiva como antibiótico y como espermicida; moluscos como el *Elysia rubefescens* (Océano Pacífico), activo contra el cáncer de colon y próstata; o tunicados como el *Aplidium albicans* (Mar Mediterráneo) del cual se aisló un péptido cíclico denominado deshidrodidemnina B o aplidina (DDB) que es activo frente al cáncer de próstata —este compuesto fue introducido en Fase clínica I, en enero de 1999 por la compañía de biotecnología marina Pharma-Mar. Una de las sustancias más prometedoras es la ET-743, compuesto que ha sido aislado del tunicado *Ecteinascidia turbinata* (Mar Caribe y Mar Mediterráneo). Este compuesto está actualmente en Fase II (Rinehart, 2000) y es activo contra cáncer de pulmón, de mama y contra el melanoma.

Sin embargo, la investigación sobre los productos naturales en organismos marinos está todavía en sus comienzos, si la comparamos con la larga tradición que existe en el medio terrestre, donde diversas fuentes naturales de medicamentos han sido intensamente explotadas a lo largo de los años (Minale *et al.*, 1976). Las especies marinas representan, aproximadamente, la mitad de la biodiversidad del planeta y se calcula que el mar contiene alrededor de diez millones de especies de las que apenas se conoce una pequeña parte (Norse, 1995).

Hoy en día se sabe que los organismos marinos son extremadamente ricos y diversos en metabolitos secundarios (Ireland *et al.*, 1993) que han sido investigados principalmente por su actividad antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, antiviral y antiinflamatoria.

Los caracoles pertenecientes al género *Conus* (uno de los géneros más diversos, con más de 500 especies) constituye una fuente abundante de toxinas. Los especialistas encontraron que el veneno producido por ciertas especies para capturar a sus presas o defenderse de sus depredadores, está compuesto de péptidos que tienen funciones tanto ofensivas como defensivas y que actúan rápidamente sobre el sistema nervioso central y la unión neuromuscular (Olivera y Cruz, 2001). Estos péptidos son llamados “conotoxinas”. La primer conotoxina fue caracterizada bioquímicamente en 1978 del veneno de *C. geographus*. Se encontró que el veneno de *Conus* está compuesto por péptidos pequeños rico en disulfuros (Olivera y Cruz, 2001). El veneno es el arma más usada por caracoles piscívoros para atrapar a su presa. El veneno también puede ser empleado para otros propósitos biológicos como la defensa contra depredadores o las interacciones de competencia. Conforme evoluciona una especie —debido a un repentino cambio en el ambiente, en la presa, en los depredadores o en los competidores— genera nuevos y más poderosos componentes en el veneno. La estrategia básica del veneno sigue siendo la

misma: pequeñas estructuras peptídicas, derivadas por diversificación de algunos genes en la superfamilia, que afectan potentemente el sistema nervioso de la presa, competidor o depredador (Olivera y Cruz, 2001). Las conotoxinas son de “alta afinidad”, lo que implica que a pesar de que se introduzcan pocas toxinas en el organismo de una presa y se diluyan en su aparato circulatorio, las moléculas son capaces de unirse a su blanco molecular y afectar la movilidad y funciones del organismo atacado. Debido a estas características muy similares a las propiedades de algunos fármacos, las conotoxinas tienen un gran potencial en la medicina como modelo para diseñar nuevos y mejores fármacos, pues lo ideal sería contar con medicamentos que no tengan efectos secundarios, no requieran ser administrados en grandes cantidades, afecten a un solo blanco en el organismo y no causen adicción.

Las toxinas de los caracoles empiezan a ser utilizadas en pruebas preclínicas como analgésicos postoperatorios, relajantes musculares y antiepilépticos preventivos; también están siendo estudiadas para tratar embolias, la enfermedad de Parkinson, la hipertensión, las arritmias y el asma, entre otras patologías (Terlau y Olivera, 2004).

Existen más de 50,000 conotoxinas potenciales en los venenos de las especies del género *Conus* (único género de la familia Conidae) así que, indudablemente, aún hay mucho por hacer. En México se encuentran alrededor de 50 especies de estos caracoles y al menos tres de ellas (*C. spurius*, *C. austini* y *C. delessertii*) contienen conopeptidos con estructuras y efectos nunca antes vistos en el mundo (Maillo *et al.*, 2002; Aguilar *et al.*, 2005; Zugasti-Cruz *et al.*, 2006).

Debido al enorme potencial económico que representan los compuestos de origen marino, estamos obligados a desarrollar y probar métodos de producción para poder asegurar el suministro de estas sustancias al menos durante las fases preclínica y clínica. Hay una gran oportunidad para el suministro a gran escala de estos productos mediante síntesis química. Hasta la fecha se ha conseguido la síntesis de muchos productos con efectos interesantes desde el punto de vista farmacológico, pero, desafortunadamente, muchos productos naturales son moléculas extremadamente complejas y requieren de procesos muy complicados que hacen poco viable su producción a escala industrial. Si se consigue dilucidar la ruta de biosíntesis del compuesto tendríamos otra alternativa, ya que se podrían identificar, aislar, clonar y expresar en otro organismo huésped los genes responsables de la producción de los metabolitos. Pero en muchos casos, sólo se conocen algunos pasos de reacciones enzimáticas complejas.

Necesitamos conocer la biodiversidad de forma prioritaria, por razones de conservación y manejo de zonas litorales, de potencial genético y como fuente de nuevos productos naturales. Cientos de miles de especies marinas esperan ser descubiertas por los científicos (el 80% de todas las especies marinas) y pueden atesorar, en forma de moléculas, las sustancias necesarias para combatir nuestras peores enfermedades. Por eso no debería sorprendernos demasiado el hecho de que bajo la superficie del agua, la naturaleza tenga ya solucionados muchos de los problemas que la humanidad intenta resolver. Esta razón, entre otras, reafirma la necesidad y la importancia de proteger nuestro patrimonio biológico submarino (Carballo, 2002).

2. Antecedentes

2.1. Veneno y toxinas

Los caracoles cónicos (género *Conus*) son moluscos marinos que no se distinguen por su velocidad ni por su armamento mecánico, por lo tanto, se vieron forzados a compensar esto con la elaboración de poderosos venenos que actúan rápidamente. Los estudios han revelado que cada una de las 500 diferentes especies de caracoles depredadores *Conus* tiene su propio veneno, complejo y rico en péptidos, que emplea para capturar a sus presas, como defensa y para actividades de interacción competitiva (Terlau y Olivera, 2004).

El veneno de cada especie de *Conus* consiste en una mezcla compleja de 50 a 200 péptidos diferentes. Las toxinas de los *Conus* son mucho más pequeñas —de 12 a 35 aminoácidos— que las toxinas de otros animales venenosos, como por ejemplo: arañas y víboras (de 40 a 80 aminoácidos), pero contienen de igual manera una alta proporción de cisteína (Cys) en su estructura (Olivera *et al.*, 1990).

Debido a su tamaño molecular, las conotoxinas se difunden muy rápidamente en los tejidos de sus presas y alcanzan sus blancos moleculares en un lapso muy breve. La estrategia general del veneno es cambiar el funcionamiento del sistema nervioso del animal por la acción de estos potentes agentes farmacológicos, los cuales pueden servir como herramientas moleculares para el estudio de la estructura y función del sistema nervioso de vertebrados e invertebrados (Olivera *et al.*, 1990; Olivera, 1997; McIntosh *et al.*, 1999). Dado que la función de este veneno es inmovilizar y matar a la presa, el blanco de acción principal de las conotoxinas son proteínas de membrana responsables de la excitabilidad celular: los canales iónicos.

2.2. Clasificación de las toxinas de los *Conus*

Se pueden observar dos grandes divisiones de las conotoxinas del veneno:

- Ricas en puentes disulfuro.
- Sin o con un enlace disulfuro.

En muchas **conotoxinas** los residuos de Cys se pueden encontrar en una frecuencia muy alta. Estos residuos proporcionan una gran estabilidad a la estructura terciaria debido a que pueden formar puentes disulfuro intramoleculares. El arreglo de Cys en la estructura pri-

maria está restringido a unos cuantos patrones; en general, cada patrón corresponde a una conectividad específica de disulfuros. Además, el patrón de cisteínas determina la superfamilia genética que codifica al péptido y en muchos casos es indicativa del blanco farmacológico del conopéptido (Terlau y Olivera, 2004). Probablemente existen hasta 10 superfamilias de conotoxinas que contienen más del 80% de todos los péptidos de *Conus*. Dentro del género, las superfamilias conocidas hasta el momento (A, T, O, M, P, I, S) se han diferenciado funcionalmente y estructuralmente en familias discretas, cada una con un objetivo farmacológico específico.

Cada veneno de los caracoles cónicos piscívoros tiene tres o más componentes paralizantes que interfieren con la transmisión neuromuscular. El hecho de que el caracol emplee diversos componentes para afectar el circuito neuronal, nos da la idea de hacer una exploración sistemática en busca de péptidos que puedan afectar la actividad neuronal patológica en humanos (que es lo que ocurre en la epilepsia, por ejemplo) (Olivera y Cruz, 2001).

Los miembros de las familias peptídicas se caracterizan por compartir:

- a) un mismo patrón de puentes disulfuro y
- b) un mismo tipo de sitio de acción (blanco molecular).

Las familias a su vez se agrupan en superfamilias. Los miembros de cada superfamilia comparten una secuencia de aminoácidos muy conservada (secuencia señal) a nivel de precursor y los péptidos maduros tienen en general, un mismo patrón de cisteínas (McIntosh *et al.*, 1999). Por lo tanto, las familias representan familias farmacológicas y las superfamilias corresponden de hecho a superfamilias genéticas.

Los **conopéptidos** en lugar de contener un gran número de residuos de Cys pueden tener residuos de γ -carboxiglutamato, los cuales son igualmente responsables de su estabilidad conformacional, al propiciar la formación de hélices alfa mediante la quelación de iones de calcio (Lin *et al.*, 1997); o tienen únicamente un puente disulfuro.

Dentro de este grupo de toxinas de *Conus* se encuentran las *conorfamidas*, las *contulakinas* y *conantokinas* sin puentes disulfuro, y también las *conopresinas* y *contrifanos* que contienen un puente disulfuro.

Conotoxinas

Los componentes más característicos y predominantes del veneno de los *Conus* son las conotoxinas. A continuación se describen las siete superfamilias de conotoxinas caracterizadas hasta la fecha:

1) **Superfamilia O:** contiene seis cisteínas con un único patrón que corresponde a un arreglo específico de puentes disulfuro (C-C-CC-C-C). La superfamilia O abarca distintas familias farmacológicas que incluyen las **ω , κ , δ , μ O** y **γ -conotoxinas:**

- **ω -conotoxinas:** bloquean diferentes subtipos de canales de Ca^{2+} activados por voltaje; contienen un alto número de residuos básicos y éstos han demostrado tener un papel importante en la inhibición de canales de calcio. Una de las ω -conotoxinas que bloquean el canal iónico de calcio activado por voltaje, ω -conotoxina GVIA, es probablemente la conotoxina más ampliamente empleada en neurociencia. Más de 2000 artículos en la literatura han empleado la ω -conotoxina GVIA como **herramienta farmacológica**, principalmente para inhibir la transmisión sináptica (Terlau y Olivera, 2004). Las ω -conotoxinas inhiben canales de calcio neuronales regulados por voltaje, evitando así la liberación de neurotransmisores. Existe una enorme variabilidad en los residuos de aminoácidos diferentes a Cys entre un tipo y otro de ω -conotoxinas lo cual tiene influencia en la actividad de los péptidos. Algunas no tienen efecto en la sinápsis de mamíferos pero todas paralizan y matan a los peces (Maillo-Peñalver, 2001).
- **κ -conotoxinas:** tienen como blanco a los canales de K^+ activados por voltaje. Esta familia de conotoxinas apenas se ha empezado a caracterizar; sin embargo, parecen ser bastante selectivas (Terlau y Olivera, 2004). Bloquean al canal de K^+ tipo “*shaker*”. La κ -conotoxina PVIIA, aislada del *C. purpurascens*, produce síntomas excitatorios en ratón y en la presa (pez) actúa junto con las δ -conotoxinas causando una hiperexcitación masiva dando lugar a la parálisis tetánica. La lisina (7) y la fenilalanina (9) son importantes en esta conotoxina en el efecto inhibidor de los canales de potasio.

- **δ -conotoxinas:** retrasan o inhiben la desactivación rápida de los canales iónicos de Na^+ activados por voltaje. Estos canales determinan la forma y la duración de los potenciales de acción. Esto da por resultado un estado hiperexcitado de las células afectadas que eventualmente pueden llevar a una hiperexcitación masiva del organismo completo. El mecanismo molecular de esta acción no está aún claro (Terlau y Olivera, 2004).
- **μO -conotoxinas:** inhiben la conductancia del canal de Na^+ asociándose al dominio III (Zorn *et al.*, 2006). Las μO -conotoxinas presentan muchos residuos hidrofóbicos al igual que las δ -conotoxinas; la diferencia radica en la secuencia de aminoácidos distintos a cisteínas a lo largo de la secuencia, los cuales confieren alta selectividad por los diferentes subtipos de canales de Na^+ que existen. La hidrofobicidad de las μO - y δ -conotoxinas puede ser importante para su mecanismo de acción además de ser un sello bioquímico distintivo.
- **γ -conotoxinas:** esta familia contiene —junto con las seis cisteínas características de la superfamilia O— un patrón distintivo en su estructura primaria: γCCS . Presenta un residuo con modificación postraduccional, gamma-carboxiglutamato (Gla), el cual se ha encontrado en forma abundante también en la familia de conopéptidos denominado *conantokinas*. Este residuo proporciona estabilidad conformacional al propiciar la formación de hélices alfa. Se conocen actualmente cuatro γ -conotoxinas, de las cuales únicamente se han clonado (Conticello *et al.*, 2001) los precursores de dos de ellas: $\gamma\text{-PnVIIA}$ (Fainzilber *et al.*, 1998) y TxVIIA (Fainzilber *et al.*, 1991; Nakamura *et al.*, 1996) y las secuencias de sus péptidos señal indican que pertenecen a la superfamilia O. Estrictamente hablando, sólo puede clasificarse como tal a la $\gamma\text{-PnVIIA}$, ya que hasta ahora es la única que ha demostrado tener efecto activador sobre canales marcapaso. Los canales marcapaso también se denominan “canales activados por hiperpolarización” y se cree que son los causantes de desencadenar el disparo espontáneo de los potenciales de acción (Fainzilber *et al.*, 1991). Los péptidos TxVIIA y as7a (Zugasti-Cruz *et al.*, 2006; Zugasti-Cruz, 2005) también podrían ser γ -conotoxinas debido a sus efectos biológicos. Por último, el pép-

tido de γ 7a (Aguilar *et al.*, 2005) comparte el motivo γ CCS, y por lo tanto pudiera pertenecer también a esta familia.

2) **Superfamilia M:** tienen seis cisteínas con un único patrón (CC-C-C-CC). Está integrada por las familias farmacológicas μ , ψ y por la κ M-conotoxinas:

- **μ -conotoxinas:** bloquean las corrientes de Na^+ compitiendo por el sitio I de los canales de Na^+ activados por voltaje —mismo en el que se une la TTX (tetrodotoxina) del pez globo y la STX (saxitoxina) del dinoflagelado que causa la marea roja. Hasta ahora son los únicos péptidos que bloquean las corrientes en este sitio. Esto sugiere que las μ -conotoxinas son una fuente potencial de antagonistas específicos para el estudio de los diversos tipos de canales de sodio activados por voltaje, a diferencia de las δ - y μ O-conotoxinas que afectan las corrientes originadas por los canales de Na^+ por otros mecanismos (Cruz *et al.*, 1985; Terlau y Olivera, 2004). Las μ -conotoxinas actúan sobre canales de sodio activados por voltaje de músculos (Gray *et al.*, 1988) y de nervios (Terlau y Olivera 2004). Varias de ellas contienen hidroxiprolina y se encuentran amidadas.
- **ψ -conotoxinas:** tienen efecto antagónico en los receptores de acetilcolina. Actúan en el subtipo muscular de los receptores nicotínicos; son no-competitivas. Estas conotoxinas se encuentran generalmente en el mismo veneno que contiene a las α A-conotoxinas. Las ψ -conotoxinas están más relacionadas estructuralmente con las μ -conotoxinas que bloquean canales de Na^+ y con las κ M-conotoxinas que actúan sobre canales de K^+ (Terlau y Olivera, 2004).
- **κ M-conotoxinas:** tienen como blanco molecular a los canales de K^+ activados por voltaje (Terlau y Olivera, 2004). Bloquean los canales tipo *shaker*.

3) **Superfamilia A:** está integrada por las familias α , α A y κ A-conotoxinas. Las dos primeras son antagonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina y la tercera es antagonista de canales de K^+ . Esta superfamilia tiene diferentes patrones de cisteínas:

- **α -conotoxinas:** fueron de las primeras en ser descubiertas. Han sido estudiadas en muchas especies de *Conus*. Tienen cuatro Cys y por lo tanto, dos puentes disulfuro (CC-C-C). Han sido clasificadas en tres grupos con base en el número de residuos que presentan entre cisteínas (entre la segunda y tercera Cys, y entre

la tercera y la cuarta Cys). Las α -conotoxinas son subtipos altamente selectivos de antagonistas nicotínicos y han probado ser agentes farmacológicos valiosos para discriminar entre isoformas relacionadas cercanamente de receptores nicotínicos de acetilcolina (Terlau y Olivera, 2004). Se han reportado α -conotoxinas que antagonizan exclusivamente receptores nicotínicos de acetilcolina de tipo muscular, como aquellas que solamente antagonizan receptores nicotínicos neuronales (Maillo-Peñalver, 2001). En general, las α -conotoxinas de *Conus* piscívoros inhiben los receptores nicotínicos musculares en mamíferos (Martínez *et al.*, 1995), mientras que los receptores nicotínicos neuronales son inhibidos por α -conotoxinas de especies de *Conus* molusquívoros (Fainzilber *et al.*, 1994). Esta familia es la más esparcida en el género (Olivera, 2002).

- **α A-conotoxinas:** presentan seis residuos de cisteínas con el patrón CC-C-C-C-C. Son competidoras antagonistas de receptores nicotínicos. Todos los péptidos pertenecientes a esta familia que se han caracterizado actúan en el subtipo muscular de los receptores nicotínicos (Terlau y Olivera, 2004).
- **κ A-conotoxinas:** tienen el mismo patrón de cisteínas que las α A-conotoxinas. Las κ A-conotoxinas son péptidos O-glicosilados en serina. Bloquean canales de K^+ en peces y anfibios el cual se identificó recientemente como el canal Kv1 tipo *shaker* (Smith, 2006).
- **ρ -conotoxinas:** son antagonistas del receptor adrenérgico α -1 el cual es un receptor acoplado a proteína G. Su arreglo de Cys es CC-C-C y probablemente pertenecen a la superfamilia A (Terlau y Olivera, 2004). La única ρ -conotoxina caracterizada hasta el momento es la ρ -TIA; es muy parecida a una α 4/7 (cuyo arreglo de cisteínas es -CCX₄CX₇C-). Esta subfamilia de α -conotoxinas actúa antagonizando no competitivamente los receptores adrenérgicos alfa (1B) (Chen *et al.*, 2004).

4) **Superfamilia S:** está constituida por la σ -conotoxina GVIII A y recientemente por la α S-conotoxina RVIII A. La σ -conotoxina GVIII A es un conopéptido inusual que contiene un residuo con modificación postrasduccional, bromotriptofano, el cual tiene gran afinidad al receptor antagonista 5-HT₃ (receptor de serotonina). Contiene diez cis-

teínas, todas separadas (Terlau y Olivera, 2004). La α S-conotoxina RVIII A es bioquímicamente única con respecto a su secuencia de aminoácidos (47 residuos), modificaciones postraduccionales (dos γ -carboxiglutamatos) y blanco molecular; pero comparte el mismo patrón de cisteínas que la σ -conotoxina. Exhibe una especificidad muy amplia en subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR). La α S-RVIII A define una nueva familia de antagonistas nicotínicos dentro de la superfamilia S (todas las conotoxinas previamente caracterizadas que son antagonistas competitivos de nAChR habían sido miembros de la superfamilia A) (Teichert *et al.*, 2005).

- 5) **Superfamilia T:** tiene blancos moleculares diferentes. Contiene cuatro cisteínas con dos patrones distintos. Las χ -conotoxinas o λ -conotoxinas (C-C-CPC) actúan en el transporte de norepinefrina, inhibiendo a los transportadores de noradrenalina dependientes de Na^+ . No afecta el transporte de dopamina ni de serotonina (Sharpe *et al.*, 2001, 2003). Las τ -conotoxinas o ϵ -conotoxinas (CC-CC) bloquean canales de Ca^{2+} presinápticos (Terlau y Olivera, 2004).
- 6) **Superfamilia P:** incluye a los péptidos espasmódicos. Su blanco molecular no ha sido identificado (Lirazán *et al.*, 2000). Contiene seis Cys con un solo patrón (C-C-C-C-C-C).
- 7) **Superfamilia I:** de caracterización reciente, presenta un nuevo patrón de cisteínas con ocho residuos. Se han diferenciado dos tipos de conotoxinas en esta superfamilia: una que bloquea canales de K^+ (Kaufenstein *et al.*, 2003) y otra que modula positivamente canales de potasio dependientes de Ca^{2+} , la κ -BtX (Fan *et al.*, 2003). Son conotoxinas más grandes, de 30 a 50 aminoácidos.

En general, todas las superfamilias tienen un arreglo característico de residuos de cisteínas, exceptuando a las superfamilias A y T cuyos miembros pueden contener dos arreglos de cisteínas distintos, pero tienen la misma secuencia señal altamente conservada.

Conopéptidos

Este grupo de toxinas de *Conus* contienen únicamente dos o ningún residuo de cisteína. Se dividen en cinco grupos que se describen a continuación.

Las **conorfamidas** presentan similitud con los miembros de la familia de los RF-amido péptidos, algunos de los cuales activan canales de Na⁺ activados por protones (DEG/ENAC). En el 2002 se caracterizó la conorfamida Sr1 (aislada de *C. spurius*); sin embargo el blanco molecular de ésta no se conoce. El péptido tiene 12 aminoácidos, no contiene residuos de cisteína y se encuentra amidado (Maillo *et al.*, 2002).

El conopéptido mejor caracterizado es la **conantokina-G** (*antokin*, vocablo filipino que significa sueño) y actúa en el receptor de NMDA (N-metil-D-aspartato). Este péptido pone a ratones jóvenes a dormir y a los más grandes les provoca hiperactividad lo cual sugiere la presencia de diferentes subtipos de receptores de NMDA en animales jóvenes y adultos. La conantokina-G es un péptido lineal, pequeño, de 17 aminoácidos, sin puentes disulfuro. La caracterización bioquímica del péptido reveló cinco residuos de un aminoácido no estándar, el γ -carboxiglutamato (Gla). El descubrimiento de Gla en la conantokina-G establece la presencia por primera vez de Gla en un sistema invertebrado. Los residuos de Gla proveen la estabilidad estructural para formar la conformación helicoidal. La conantokina-G también es un potente anticonvulsionante y se ha probado clínicamente en humanos para su uso terapéutico. Es antagonista competitivo del receptor de NMDA (Terlau y Olivera, 2004). La familia de las conantokinas ha demostrado tener potencial terapéutico para la epilepsia (Olivera y Cruz, 2001; Jiménez *et al.*, 2002).

La **contulakina-G** presenta similitud con los miembros de la familia de las neurotensinas. Se cree es agonista específico de subtipo del receptor de la familia de los péptidos de la neurotensina. No contiene residuos de Cys (Terlau y Olivera, 2004). La conantokina-G y la contulakina-G se están desarrollando para tratar la epilepsia y el dolor (Terlau y Olivera, 2004).

Las **conopresinas** (conopresina-G y conopresina-S) son agonistas del receptor de vasopresina. Contienen un puente disulfuro. Las conopresina-G tienen actividad biológica muy similar a la provocada por las hormonas neurohipofisarias vasopresina y oxitocina de vertebrados. Es el primer péptido del veneno de un *Conus* homólogo a un neuropéptido endógeno (Cruz *et al.*, 1987).

Los **contrifanos** tienen presencia de D-aminoácidos en algunos de sus residuos. Cuentan con un puente disulfuro en su estructura. El contrifano-Vn, modula la actividad de canales de K⁺ activados por voltaje y dependientes de Ca²⁺ (Terlau y Olivera, 2004).

Otros componentes

Además de los péptidos, se ha encontrado serotonina en el veneno de *C. imperialis* (England *et al.*, 1998) y altos niveles de ácido araquidónico en el veneno de *C. textile* (Nakamura *et al.*, 1982).

Tabla 1. Superfamilias de conotoxinas y familias que se han asignado a cada una de ellas

Superfamilia	Arreglo de cisteínas	Familia	Actividad farmacológica
A	CC-C-C	α	Antagonista, receptor nicotínico de acetilcolina
	CC-C-C-C-C	αA	Antagonista, receptor nicotínico de acetilcolina
	CC-C-C-C-C	κA	Bloquea canal de K^+ activado por voltaje
	CC-C-C	ρ	Antagonista, receptor adrenérgico $\alpha 1B$
T	CC-CC	τ (ϵ)	Bloquea canal de Ca^{2+} presináptico
	C-C-CPC	χ (λ)	Inhibe transporte de norepinefrina
O	C-C-CC-C-C	ω	Inhibe canal de Ca^{2+} activados por voltaje
	C-C-CC-C-C	κ	Bloquea canal de K^+ activados por voltaje
	C-C-CC-C-C	δ	Retrasa inactivación, canal de Na^+ activado por voltaje
	C-C-CC-C-C	μO	Bloquea canal de Na^+ activado por voltaje
	C-C-CC-C-C	γ	Modula canal marcapaso
M	CC-C-C-CC	μ	Bloquea canal de Na^+ activado por voltaje
	CC-C-C-CC	ψ	Antagonista, receptor nicotínico de acetilcolina
	CC-C-C-CC	κM	Bloquea canal de K^+ activado por voltaje
P	C-C-C-C-C-C	Espasmódicos	$\zeta?$
I	C-C-CC-CC-C-C	Excitatorios	Canal de K^+ $\zeta?$
	C-C-CC-CC-C-C	κI	Modula canal de K^+ activado por voltaje dependiente de Ca^{2+} (Tipo BK) Bloquea canal de K^+ Kv1.1 y Kv1.3
S	C-C-C-C-C-C-C-C-C	σ	Antagonista, receptor 5-HT ₃
No asignada	C-C	Conopresinas	Agonista, receptor vasopresina-oxitocina
No asignada	C-C	Contrifanos	Modula canal de K^+
	No cisteínas	Conantokinas	Antagonista NMDAR
	No cisteínas	Contulakinas	Agonista, receptor de neurotensina
	No cisteínas	Conorfamidas	Activa canales de Na^+ $\zeta?$

Clasificación basada en posición y número de cisteínas.

2.3. Actividad biológica

De acuerdo a la actividad biológica de las conotoxinas en modelos animales, éstas pueden ser agrupadas dentro de tres categorías básicas:

- 1) las que producen efectos excitatorios,
- 2) las que producen parálisis y
- 3) las que inhiben circuitos sensoriales.

De las conotoxinas cuya función se ha demostrado, los principales sitios de acción son de tres clases:

- 1) Canales iónicos activados por voltaje: algunas conotoxinas provocan un retraso en la desactivación del canal de Na^+ y otras bloquean específicamente canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} ; también hay conotoxinas que modulan canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} .
- 2) Canales iónicos dependientes de ligando (canal-receptor): existen conopeptidos y conotoxinas antagonistas de receptores de NMDA, de serotonina así como antagonistas competitivos y no competitivos de receptores nicotínicos.
- 3) Receptores asociados a proteínas G: ciertas conotoxinas actúan como antagonistas del receptor adrenérgico y como agonistas de receptores de neurotensina y vasopresina.

Canales iónicos

La membrana plasmática tiene permeabilidad selectiva. Moléculas pequeñas y no polares como el oxígeno y dióxido de carbono atraviesan rápidamente la membrana. Moléculas no cargadas y polares, como el agua, también se difunden a través de ella, pero más lentamente (Drucker, 2005). En cambio moléculas cargadas, como los iones —no importa qué tan pequeños sean— casi nunca atraviesan las membranas celulares debido a la capa de hidratación que los acompaña.

Las proteínas de transporte transmembranal se ocupan de transferir solutos que no pueden atravesar la membrana por difusión simple tales como azúcares, aminoácidos, nucleótidos, iones y algunos metabolitos celulares. Estas proteínas poseen segmentos que atraviesan la membrana, formando caminos por los cuales los solutos hidrofílicos pueden pasar la bicapa lipídica sin entrar en contacto con el interior hidrofóbico. Existen dos clases de proteínas de transporte: las *proteínas acarreadoras* o *transportadores* y los ***canales proteicos***.

Las proteínas acarreadoras primero se unen con solutos específicos en un lado de la membrana y luego sufren cambios conformacionales que culminan en la transferencia de los solutos unidos hacia al otro lado de la membrana (mecanismo parecido al de la interacción enzima-sustrato). En cambio, los canales proteicos forman poros acuosos que traspasan toda la bicapa lipídica y que cuando se abren permiten el paso de los iones: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- de ma-

nera selectiva. Los flujos de protones (H^+) son también importantes pero se emplean poco en la señalización celular.

En el movimiento controlado de iones a través de la membrana plasmática participan proteínas membranales de transporte, las cuales se subdividen en **canales iónicos**, *acarreadores* y *bombas*. Los canales iónicos se caracterizan por su selectividad y sus mecanismos de compuerta. Los acarreadores acoplan flujos de iones y sustancias orgánicas. Las bombas trabajan contra un gradiente de concentración por lo que dependen de la hidrólisis de ATP.

Los **canales iónicos** son proteínas que permiten el paso de iones a través de las membranas celulares (a favor de su gradiente de concentración). Estas proteínas son responsables de la excitabilidad eléctrica de células musculares, cardíacas, esqueléticas y lisas, además gobiernan los procesos de señalización eléctrica en el sistema nervioso y endocrino. El transporte a través de canales proteicos es rápido debido a que los canales interactúan débilmente con el soluto transportado. Todos los canales iónicos promueven el flujo pasivo a través de la membrana.

Los canales iónicos no son simples poros acuosos. En primer lugar, no se encuentran abiertos de manera permanente, sino que disponen de uno o más estados conformacionales estables que representan estados funcionales diferentes. Se ha determinado que los canales iónicos tienen al menos un estado abierto y varios estados cerrados. El tránsito entre los diferentes estados conformacionales del canal se llama *mecanismo de compuerta* (*gating*, en inglés). Los canales permiten el paso de ciertos tipos de iones, con exclusión de otros, es decir, son *selectivos*. En el filtro de selectividad, el ion se desnuda de su capa de hidratación para establecer enlaces químicos débiles (interacciones electrostáticas) con aminoácidos cargados, que tapizan las paredes del canal.

Algunos canales son regulados por la unión de un ligando (**canales activados por ligando**), ya sea un neurotransmisor o una hormona, o por segundos mensajeros que actúan por el lado citoplasmático. Otros canales son influenciados por cambios en el potencial de membrana (**canales dependientes de voltaje**) o por el estiramiento de la membrana (**canales sensibles al estiramiento**). Algunos canales son sensibles a dos o más tipos de estímulos, como los canales de K^+ activados por voltaje y por Ca^{2+} (Drucker, 2005).

Los canales pueden estar en uno de los tres estados funcionales posibles: **cerrado y activable** (disponible), **abierto y activo** o **cerrado y no activable** (desensibilizado o inactivado).

Los canales iónicos son susceptibles de ser ocluidos o bloqueados por iones libres, o moléculas del citoplasma o del medio extracelular. Por ejemplo, el paso a través del canal puede bloquearse por partículas que se unen, ya sea a la boca externa o interna del poro, o en alguna otra parte dentro del camino hidrofílico. De manera típica, las moléculas bloqueadoras son toxinas o drogas que se originan fuera de la célula.

Los canales iónicos están compuestos por una o más subunidades homólogas o heterólogas. En el caso de los canales de Na^+ y Ca^{2+} sensibles a voltaje, son monómeros con 4 dominios de seis fragmentos transmembranales estructurados similarmente, que se repiten dentro de una proteína. Las subunidades o dominios individuales contienen toda la maquinaria necesaria para abrir y cerrar el canal.

Los canales de potasio que dependen del voltaje son *tetraméricos*. Todos ellos tienen poros iónicos que permiten el paso de un tipo de ión de modo exclusivo. Los canales iónicos *pentaméricos*, como el activado por acetilcolina, están compuestos de un rosetón de cinco subunidades e incluyen a la gran familia de canales receptores operados por neurotransmisores. Los canales receptores a acetilcolina (nicotínicos) y los canales receptores ionotrópicos para glutamato y 5-hidroxitriptamina son catiónicos, en tanto que los canales receptores a glicina y GABA (ácido gamma aminobutírico) son aniónicos.

CANALES DE SODIO

Los canales de sodio activados por voltaje (Na_v) son los responsables de la transmisión del potencial de acción en las fibras nerviosas. La activación de estos canales es seguida de una inactivación espontánea: los canales se cierran a pesar de que la despolarización persiste. La inactivación tiene lugar en unos pocos milisegundos y constituye el primer paso hacia la terminación del potencial de acción. Una vez hiperpolarizada la célula, debe transcurrir un cierto tiempo para que los canales de Na^+ se recuperen de la inactivación. Durante este tiempo (periodo refractario), los canales de Na^+ no pueden activarse de nuevo y en consecuencia, no se pueden generar el potencial de acción.

Los Na_v cuentan con una subunidad α y pueden regularse por una subunidad β (β_1 , β_2 y β_3). Los Na_v tienen sitios a los que se unen toxinas en forma específica. La tetrodotoxina (TTX) y saxitoxina (STX) se enlazan al sitio I bloqueando la conductancia del canal. Las toxinas de anémonas marinas y las α -toxinas de escorpiones se enlazan al sitio III y retardan el proceso de inactivación. Las β -toxinas de escorpiones se unen al sitio IV y promueven la activación del canal (Gray *et al.*, 1988)

CANALES DE CALCIO

Los canales de calcio activados por voltaje (Ca_v) están presentes en todas las células excitables (neuronas, células musculares y endocrinas), así como también en muchas células no excitables. Son complejos macromoleculares de 4 ó 5 proteínas diferentes. Los Ca_v tienen dos funciones principales: actúan como segundo mensajero y se abren cuando se despolariza la membrana.

Los potenciales de acción de la mayor parte de los músculos de invertebrados y del músculo liso de vertebrados se logran a través de canales de calcio y no de sodio. El calcio regula la actividad secretora de la célula (hormonas y neurotransmisores) y actúa como mensajero intracelular en una gran variedad de procesos celulares (en el corazón, en el músculo esquelético), además de los efectos que tienen en el potencial de la membrana celular (en algunas neuronas regula el disparo de los potenciales de acción) (Drucker, 2005).

CANALES DE POTASIO

Los canales de K^+ activados por voltaje (Kv_s) son cruciales para la generación y propagación del potencial de acción. Estos canales ayudan a restaurar el estado de reposo después de la despolarización. Además, provocan la disminución de la excitabilidad por su acción de hiperpolarización. Los Kv_s no sólo son importantes para la segunda fase del potencial de acción, la cual ocurre por la apertura de canales de potasio que hacen que este ion salga de la célula (recordemos que normalmente los iones de K^+ están mucho más concentrados al interior que al exterior), sino que también se ven involucrados en reestablecer el potencial de reposo.

Los Kv_s son la subfamilia más diversa entre los canales iónicos dependientes de voltaje. Algo que es común en todos los canales de Kv_s es su organización. Cada subunidad contiene seis segmentos transmembranales denominados S1 a S6, una región de poro entre los segmen-

tos S5 y S6; los dominios amino y carboxilo terminales están del lado citoplasmático. Los Kv_s forman tetrámeros, es decir, cuatro subunidades α que rodean a un poro central selectivo para K^+ .

Los Kv_s clásicos toman sus nombres a partir de las mutantes de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, que se utilizaron para aislar estas clonas. En este sentido se tienen las subfamilias *shaker*, *shab*, *shaw* y *shal*.

La familia de péptidos que bloquean a los canales de Na_v al parecer se encuentra ampliamente conservada en un gran número de especies de *Conus*. En contraste, familias de conopéptidos divergentes estructural y genéticamente bloquean a los canales de K^+ en diferentes especies (Terlau y Olivera, 2004).

RECEPTOR DE GLUTAMATO

Se encuentran particularmente en el sistema nervioso central y participan en sinapsis excitadora. El glutamato es el neurotransmisor más abundante en el cerebro y media más del 50% de la transmisión sináptica en el sistema nervioso de los vertebrados. La neurotransmisión a través de glutamato está implicada en casi todos los aspectos del funcionamiento normal del cerebro, incluyendo la memoria, el movimiento, el desarrollo y la neurodegeneración. La neurotransmisión anormal de glutamato forma parte de la patofisiología de la mayor parte de los desórdenes psiquiátricos incluyendo la epilepsia, la esquizofrenia, las adicciones, la depresión, la ansiedad y el mal de Parkinson (Olivera y Cruz, 2001).

La mayor parte de las sinapsis responsables de la transmisión rápida y excitatoria en vertebrados usa glutamato como neurotransmisor para la activación de los canales iónicos asociados a este tipo de receptor ionotrópico. Se conocen varios tipos y éstos se han clasificado según el agonista que los activa. Tres de ellos se han definido por los efectos excitatorios (despolarizantes) de agonistas específicos:

- N-metil-D-aspartato (NMDA)
- kainato
- quisqualato (o AMPA, el nombre de otro agonista más específico)

Los receptores glutamatérgicos de NMDA son permeables a sodio, potasio y calcio y son bloqueados por magnesio.

Se ha visto que la glicina, aminoácido con propiedades inhibitoras, a concentraciones muy bajas, facilita los efectos del NMDA (excitadores) y que drogas como la ketamina (agente anestésico) y la fenciclidina (droga que produce alucinaciones), son antagonistas del receptor de NMDA (Brailowsky, 1999).

RECEPTOR DE ACETILCOLINA (ACh)

Los receptores colinérgicos han sido divididos en dos tipos:

- los muscarínicos que son receptores metabotrópicos y
- los nicotínicos que son receptores o canales ionotrópicos

Estos términos se refieren a los efectos de la muscarina, sustancia proveniente de un hongo (*Amanita muscaria*) que tiene efectos similares a los de la nicotina, contenida en el tabaco. La muscarina en general estimula receptores metabotrópicos colinérgicos mientras que la nicotina primero estimula y después la respuesta disminuye (desensibilización).

Existen neuronas que responden a la acetilcolina en muchas partes del cerebro y, de acuerdo con la región, este neurotransmisor puede tener efectos excitadores o inhibitorios. El receptor nicotínico es un canal iónico activado por ACh. Está bien establecido que la acetilcolina es el transmisor a nivel de la unión neuromuscular y en muchas áreas del sistema nervioso autónomo (SNA).

Se ha relacionado a la acetilcolina con funciones mnésicas (las ligadas a la memoria), así como en la transmisión del dolor, el calor y los sabores. También en la regulación de los movimientos voluntarios y el control del ciclo sueño-vigilia (Brailowsky, 1999).

La unión de acetilcolina o nicotina al receptor induce un cambio conformacional que permite la entrada de sodio a la célula, lo cual causa la despolarización de la membrana plasmática. El receptor nicotínico de acetilcolina es un pentámero formado por diferentes subunidades α , β , γ , δ y ϵ . Se conocen receptores nicotínicos musculares y neuronales (Stryer, 1995).

RECEPTOR DE SEROTONINA

Desde el punto de vista histórico, la serotonina (cuyo nombre científico es 5-hidroxitriptamina o 5-HT) ha sido el neurotransmisor que más ha influido en el campo de la neuropsiquiatría.

Cuando se detectó la presencia de la 5-HT en el cerebro aparecieron las teorías que relacionaban a este neurotransmisor con varias formas de enfermedades mentales (Brailowsky, 1999). La serotonina es un neurotransmisor que interacciona con una serie de receptores, para modular muchos procesos tanto en el sistema nervioso central como en el periférico de mamíferos, ejemplo de esto son las respuestas del comportamiento emocional como la ansiedad o depresión y neuropatías como la migraña (Stone, 1995).

La respuesta obtenida después de estimular los núcleos serotoninérgicos puede consistir, por un lado, en una inhibición (hiperpolarización membranar) provocada por el aumento de la permeabilidad (conductancia) al K^+ o, por el otro, en una excitación en la que aumenta la frecuencia de disparo (así se le llama al incremento en la ocurrencia de los potenciales de acción) por entrada de sodio (despolarización). Se han descrito tres tipos principales de receptores a la serotonina: 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃. La mayoría de ellos son postsinápticos (Brailowsky, 1999).

De estos receptores de serotonina, sólo uno, el receptor 5HT₃ es un canal iónico activado por ligando, el resto son receptores acoplados a proteínas G. El receptor 5HT₃ es similar a los receptores nicotínicos de acetilcolina tanto funcional como estructuralmente. Recientemente se ha demostrado la utilidad de antagonistas para receptores 5HT₃ como drogas ansiolíticas en pruebas animales y, en primates, estos antagonistas mejoran el desempeño de las actividades cognitivas (Maillo-Peñalver, 2001).

RECEPTORES ASOCIADOS A PROTEÍNAS G

Las tres principales catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) se distribuyen de manera diferente en el interior del sistema nervioso, es decir, hay áreas donde son muy abundantes y en otras son muy escasas.

En 1946 se identificó el verdadero transmisor de los nervios de la división simpática del SNA: la noradrenalina. Estas células están asociadas a centros de regulación autónoma, por una parte a las funciones respiratorias, cardiovasculares y viscerales, y por otra a estructuras hipotálamicas más anteriores (Brailowsky, 1999).

2.4. Generalidades de los moluscos

Phylum Mollusca

Los miembros del phylum Mollusca figuran entre los invertebrados más notables e incluyen formas tan conocidas como las almejas, las ostras, los calamares, los pulpos y los caracoles. Se hicieron populares durante los siglos XVIII y XIX gracias a los coleccionistas de conchas (Barnes, 1969).

En cuanto a la abundancia de especies, los moluscos constituyen uno de los phyla más grandes de invertebrados junto con los artrópodos. Han sido descritas más de 100,000 especies vivientes y además se conocen unas 35,000 especies fósiles (Barnes, 1969). Los gasterópodos y los monoplacóforos surgieron en la época temprana del Cámbrico, hace aproximadamente 450 millones de años; esto sugiere que descienden de un ancestro común que no tenía concha y no dejó evidencia alguna de su existencia en el registro fósil.

El Phylum Mollusca está dividido en siete clases diferentes:

- 1) Aplacophora (moluscos sin concha externa).
- 2) Monoplacophora (conchas de una pieza).
- 3) Gastrópoda (caracoles).
- 4) Pelecypoda, Bivalvia o Lamelibranchia (almejas).
- 5) Cephalopoda (pulpos y calamares).
- 6) Polyplachophora (quitones).
- 7) Scaphopoda (conchas en forma de colmillo).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Conus spurius*

Reino	Animalia , animal, animals, animax
Phylum	Mollusca , molluscs mollusks mollusques, molusco
Clase	Gastropoda , Cuvier, 1797, caracol, caramujo, escargots, gastéropodes, gastropods, lesma, limaces, slugs, snails
Subclase	Prosobranchia Mine-Edwards, 1848
Orden	Neogastropoda
Familia	Conidae Rafinesque, 1815
Género	<i>Conus</i> Linnaeus, 1758
Especie	<i>Conus spurius</i> Gmelin, 1791, alphabet cone

Clase Gastrópoda

Casi la mitad de las 40,000 especies de gasterópodos conocidas son marinas, cifra a la que se deben añadir unas 15,000 formas fósiles. Esta clase es sin duda la más rica entre los moluscos.

Los gasterópodos han experimentado la más amplia radiación adaptativa entre todas las clases de moluscos. Si tenemos en cuenta la gran variedad de hábitats invadida por los gasterópodos, procede aceptar desde luego que estos animales son los más prósperos entre todos los moluscos. Las especies marinas se han adaptado a vivir en todos los tipos de fondos, así como a una existencia pelágica natatoria. Muchos de ellos han invadido el agua dulce, y los caracoles pulmonados —que incluye cerca de un millar de géneros— han conquistado la tierra al perder sus branquias y convertir la cavidad del manto en un pulmón (Barnes, 1969).

Los gasterópodos modernos se subdividen en tres subclases:

1. **Prosobranchia:** incluye todos los individuos que respiran por branquias en los cuales cavidad, manto, branquias y ano se encuentran situados en la parte anterior del cuerpo, en otras palabras, aquellos cuya torsión es evidente. La mayor parte de los gasterópodos son prosobranquios.
2. **Pulmonata:** incluye los caracoles terrestres. Esta subclase ha conservado la posición anterior de postorsión del ano y cavidad del manto, pero las branquias han desaparecido, y la cavidad del manto se ha transformado en pulmón.
3. **Opisthobranchia:** se observan diferentes etapas de distorsión, y muchas de sus especies han adoptado simetría bilateral secundaria. Se observa en esta variedad de animales una disminución o ausencia de la concha y cavidad del manto, y en muchos miembros se distingue la selección de una existencia pelágica o natatoria. Los individuos más conocidos de esta subclase son las liebres y babosas de mar (nudibranquios).

Las últimas dos subclases evolucionaron a partir de la subclase Prosobranchia.

La **concha** típica del gasterópodo es una estructura cónica compuesta de espiras tubulares, que contiene en su interior la masa visceral del individuo. La concha protege los órganos internos subyacentes o la masa visceral y se origina como producto de la secreción del epitelio superficial del manto (Barnes, 1969).

La concha del gasterópodo típico está compuesta de tres capas:

1. Una externa llamada **perióstraco**: es delgada y está compuesta de una sustancia orgánica cornea conocida como conquiolina; puede ser muy delgada y transparente o fibrosa.
2. Una media prismática llamada **mesóstraco**, de naturaleza calcárea y formada principalmente por carbonato de calcio.
3. Una interna llamada capa nacarada o **endóstraco**, de naturaleza calcárea e integrada principalmente por carbonatos de magnesio, fósforo, sílice y calcio.

El carbonato de calcio, principal componente de la concha, se precipita en forma de calcita y aragonita. La precipitación de estas sales se lleva a cabo formando capas prismáticas, columelares, foliares o laminares que se integran a la concha en intervalos cíclicos, tanto en tamaño como en espesor, y dan líneas de crecimiento axiales en los gasterópodos (García-Cubas *et al.*, 1994).

La concha de un gasterópodo es esencialmente un cono enroscado helicoidalmente, con crecimiento espiral perpendicular al eje del cuerpo, que se refleja conforme al incremento en el diámetro de las vueltas. Si la vuelta es en el sentido de las manecillas del reloj, la torsión se denomina **dextrógira** o **dextrorsa**; si es en sentido contrario, **levógira** o **sinistrorsa**.

A la última vuelta del cuerpo, generalmente la más grande, se le conoce como **vuelta corporal** y al resto de ella **espira**. Las vueltas que se suceden después y llegan al ápice se denominan **vueltas apicales**.

La unión o contacto entre dos vueltas forma la **sutura** y el límite que se aprecia superficialmente entre las dos vueltas se designa **línea de sutura**, que puede ser lisa o ligeramente marcada. La fusión de las vueltas en el interior origina una estructura llamada **columela**, que sigue la dirección del eje de la concha. Cuando la columela se extiende hacia delante formando un tubo o canal se denomina **canal sifonal**.

La abertura de la concha corresponde al orificio situado al final de la vuelta corporal, por medio de éste el animal extiende su cuerpo al exterior; está delimitado en su contorno por el perístoma, en el cual externamente se distingue un borde, **labio externo** o **labro**, formado por la prolongación más alargada de la concha; opuesto a él, sobre la pared interna de la abertura, hay un **labio interno** o **labium**.

El **ombliigo** es la depresión o hendidura de la concha cercana a la base de la columela, originada por la fusión incompleta de las vueltas al final anterior o basal. En algunos casos, el ombliigo está cubierto por un depósito calcáreo, denominado **callo umbilical**. El **opérculo** es una placa córnea o calcárea adherida firmemente a la parte dorsal del pie; cuando el animal se retrae queda taponada la abertura como un mecanismo de protección (García-Cubas, *et al.*, 1994).

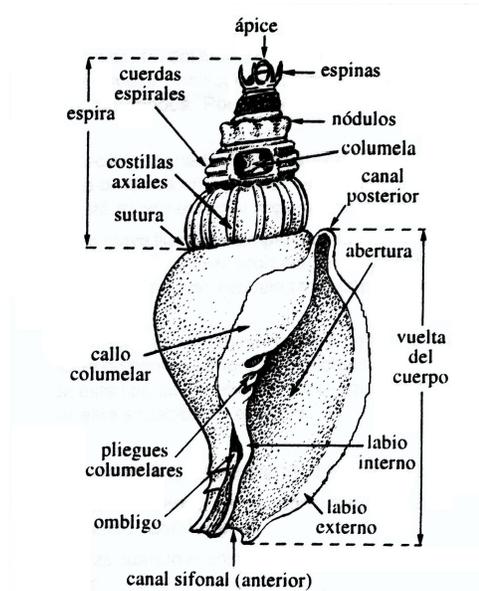


Figura 1. Esquema de la concha de un gasterópodo

Las conchas de los gasterópodos ostentan una infinita variedad de colores, formas y dibujos. Existen dos tipos de ornamentaciones:

- i. la escultura axial, con elementos dispuestos paralelamente al eje de la concha
- ii. y la escultura espiral, que es perpendicular a la anterior.

Conus

Los *Conus* habitan predominantemente aguas templadas y tropicales en el Atlántico occidental y zonas del Indo pacífico (Barnes, 1969). Viven en los fondos lodosos y arenosos, prefieren las aguas superficiales con arrecifes de coral y los sitios bajo las rocas. Unas 50 especies de *Conus* se encuentran en aguas americanas (Abbott y Dance, 1990). Los cónidos son en general de hábitos nocturnos, durante el día se entierran en la arena o bajo los corales y por las noches salen a cazar (Lira-Galera *et al.*, 1989).

Existen alrededor de 500 especies conocidas de *Conus* equipadas con un aparato venenoso altamente especializado que emplean para capturar y paralizar a su presa. Algunos conos de los océanos Índico y Pacífico pueden causar picaduras severas e incluso mortales. Los conos americanos tienen un aguijón menos peligroso (Abbott y Dance, 1990).

Los cónidos son predadores rapaces y se alimentan capturando a sus presas mediante su aparato radular que se encuentra modificado para funcionar como un arpón venenoso. El caracol sólo puede “picar” cuando tiene la cabeza totalmente fuera de la concha. La probóscide muscular es la que lanza el arpón (diente radular modificado). Los dientes radulares son desechables, sólo se utilizan una vez (Lira-Galera *et al.*, 1989).

Los caracoles cónicos son animales de cuerpo blando que presentan simetría bilateral no segmentada y poseen tres regiones:

- i) cabeza,
- ii) pie ventral y
- iii) masa visceral dorsal cubierta por el manto, el cual tiene la función de secretar el exoesqueleto o concha (García-Cubas *et al.*, 1994).

La respiración se realiza por medio de una branquia. La concha asimétrica y su transporte causaron cierta oclusión de la cavidad del manto en el lado derecho, lo que a su vez provocó la reducción o pérdida de la branquia derecha y de la aurícula asociada con ésta.

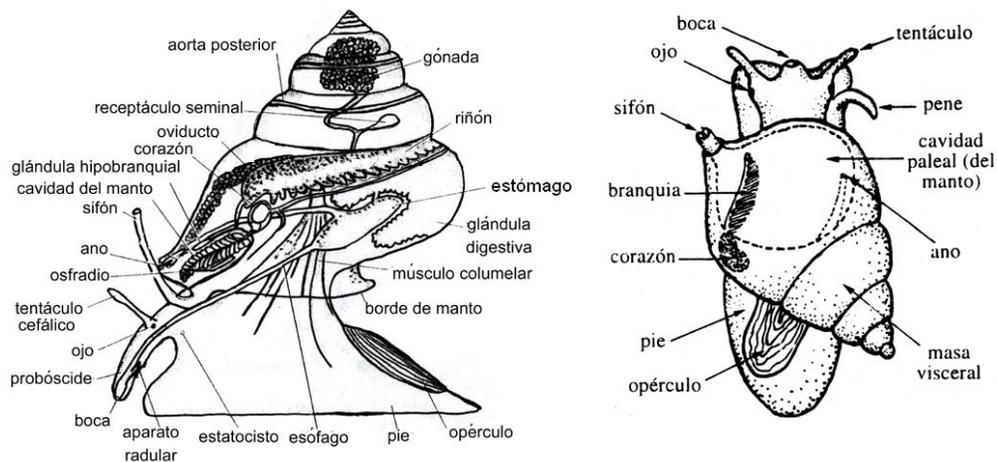


Figura 2. Esquema anatómico de un gasterópodo

Presentan un sistema circulatorio abierto donde la sangre pasa de la branquia hacia la aurícula. Dos vasos sanguíneos discurren por el eje de la branquia:

- i. el vaso aferente portador de sangre para esta última estructura y
- ii. el vaso eferente que drena la branquia.

La sangre posee amebocitos, así como un pigmento respiratorio llamado hemocianina que contiene dos átomos de cobre para transportar una molécula de oxígeno. La sangre de estos animales es isosmótica con el agua de mar, y cuando se les coloca en aguas salobres la concentración sanguínea simplemente se iguala con la del medio. Como resultado de la torsión, el corazón de los gasterópodos está situado anteriormente en la masa visceral.

La digestión tiene lugar intracelularmente en las células de los tubos distales. El aparato digestivo está provisto de una rádula y un hepatopáncreas. El intestino, largo y enrollado, tiene como función principal la formación de bolitas fecales. El ano se abre en la región dorsal media del borde posterior de la cavidad del manto y los desechos son expulsados por medio de la corriente exhalante. La excreción se lleva a cabo por medio de órganos renales. Los gasterópodos acuáticos, como casi todos los demás invertebrados acuáticos, excretan amoníaco o compuestos de amonio (Barnes, 1969).

El plan básico del sistema nervioso consta de un anillo situado alrededor del esófago, del cual surgen un par de cordones que forman ganglios e inervan el manto y la masa visceral (Figura 3).

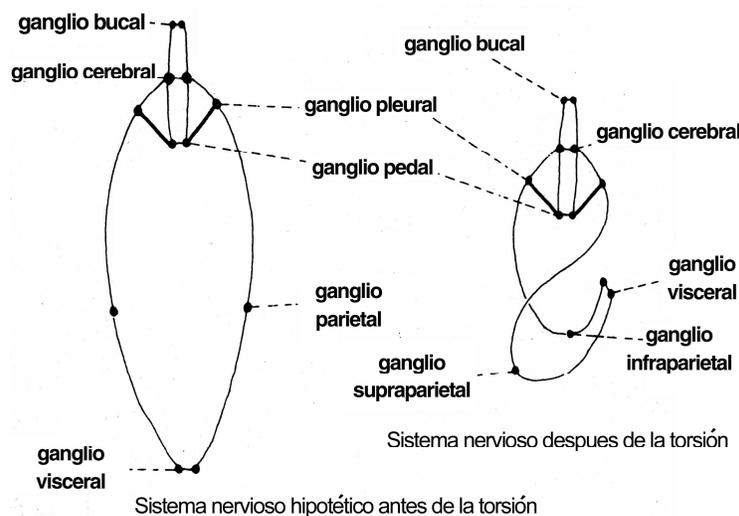


Figura 3. Esquema del sistema nervioso de un gasterópodo

Estos moluscos ponen sus huevos en el agua o en cápsulas. No hay cópula, la fecundación es externa. Los huevos y los espermatozoides al madurar, penetran la cavidad celómica de donde son transportados al exterior. La fecundación tiene lugar en el agua de mar circundante. El cigoto experimenta segmentación espiral típica. La gástrula resultante se desarrolla con rapidez para constituir una larva trocófora (en forma de trompo) libre nadadora. La larva trocófora pasa al estado de larva velígera (vida libre), más altamente desarrollada, en la que el pie, la concha y otras estructuras hacen su aparición.

Los órganos de los sentidos más comunes son un par de tentáculos, un ojo en la base de cada tentáculo y uno o dos osfradios que registran cambios químicos en la corriente de ventilación que pasa a través de la cavidad del manto.

El pie del gasterópodo típico es una suela reptante plana que se ha adaptado para la locomoción en gran variedad de sustratos. Se mueve por medio de un deslizamiento sobre el sustrato, utilizando una combinación de actividad ciliar y de contracciones musculares. Los cilios son importantes en la locomoción de las formas juveniles y de las especies que habitan en los fondos blandos. La capacidad principal de movimiento procede de ondas de finas contracciones musculares que corren de la parte posterior al anterior del pie, o de la anterior a la posterior; cada onda representa un paso diminuto. La mayoría de los gasterópodos —a pesar de conservar su pie plano reptante— son animales móviles relativamente activos que están más cefalizados que los moluscos de tipo quitón y bivalvo. Las glándulas mucosas abundan en el pie, desde donde lubrican el sustrato para facilitar la locomoción (Barnes, 1969).

Estos caracoles, *Conus*, se pueden dividir en 3 grupos de acuerdo al tipo de presa con la que se alimentan (Kohn *et al.*, 1960):

- 1) Cazadores de peces (piscívoros).
- 2) Cazadores de moluscos (molusquívoros).
- 3) Cazadores de gusanos (vermívoros).

La rádula se ha convertido en un órgano de alimentación muy desarrollado que actúa como raspador, cepillo, rallador, cortador o transportador. Los *Conus* tienen rádulas (estenoglosas) con tres dientes (o en algunos sólo uno) en hilera transversal, son gruesos y ostentan por lo regular varias cúspides. Los dientes ganchudos externos recolectan las partículas desgarradas o desprendidas y las llevan hacia el centro de la rádula cuando ésta se

retrae. Poseen una probóscide sumamente extensible que le permite al caracol alcanzar y penetrar partes vulnerables de la presa; la probóscide contiene el esófago, la cavidad bucal, la rádula y la boca verdadera.

Durante la ingestión, la probóscide sale por la abertura del saco proboscídeo mediante presión sanguínea y un diente único de la rádula se desliza hacia fuera del saco de ésta, hacia la cavidad bucal, y es introducido luego en la presa. Una vez que el animal acaba de comer, la probóscide se retrae por acción de unos músculos situados dentro de la cavidad proboscídea. La presencia de ciertas proteínas específicas, liberadas por la presa o la carroña es detectada por el animal cuando éstas llegan a él con la corriente de ventilación, esto ayuda al molusco a localizar a su presa y estimula la proyección de la probóscide, que empieza a buscar.

En las especies que se alimentan de poliquetos y caracoles el diente sale de la probóscide mientras que en las especies piscívoras el cono se encuentra sepultado en la arena y no dispara su arpón sino hasta que el pez se detiene sobre el fondo. En ese momento la víctima es punzada en el abdomen y el *Conus* la sujeta con el extremo del diente. La víctima es inmovilizada muy rápidamente por el veneno neurotóxico que penetra en la herida a través de la cavidad hueca del diente. Las presas de todas las conchas llamadas conos son tragadas enteras, hecho realmente notable en el caso de especies que se alimentan de peces (Barnes, 1969).

El efecto del veneno es muy rápido y actúa paralizando la unión neuromuscular. Kline (1956) informó que un espécimen de *C. geographus* murió cinco minutos después del ataque de *C. textile*. La mordedura o picadura de algunas especies del Pacífico meridional es muy tóxica para el hombre y se han comunicado algunos casos de muerte en un plazo no mayor de cuatro horas.

Morfología del aparato venenoso

BULBO VENENOSO

El bulbo venenoso es un órgano largo y transversalmente orientado que se encuentra justo enfrente de las vísceras. El bulbo venenoso consiste principalmente en capas delgadas de músculo, tejido conectivo y una capa de células epiteliales cuboidales. Bouvier (1887) propuso que el bulbo venenoso funcionaba como un órgano propulsor y Hermitte concluyó que su función era de almacenamiento y propulsión del veneno desde el lugar donde se produce hasta el diente radular (Kohn *et al.*, 1960).

CONDUCTO VENENOSO

El conducto venenoso es un tubo largo, irregularmente curvado que se origina en el extremo derecho del bulbo venenoso y ocupa gran parte de la cavidad corporal dorsal y lateral del esófago y anterior del bulbo venenoso. Su extremo distal entra en la porción anterior del esófago-estómago algunas veces llamada faringe. Las paredes del conducto venenoso consisten en capas de tejido muscular y conectivo. En la pared hay numerosas células epiteliales. Hinegardner (1958) concluyó que estas células son la fuente del veneno (Kohn *et al.*, 1960).

RÁDULA

El aparato radular del *Conus* se encuentra en un órgano en forma de Y o L conocido como “saco radular” que se encuentra enfrente del bulbo venenoso. Este saco contiene dientes en diferentes estados de desarrollo. Al alimentarse, un diente se mueve desde el saco radular hasta la faringe y se queda en la probóscide hasta ser inyectado. Cuando el diente se encuentra en la faringe o en la probóscide se cree que éste se llena con veneno proveniente del conducto venenoso. Antes de alimentarse, la probóscide se extiende fuera de la boca, entonces el diente penetra a la presa que es paralizada por el veneno y tragada entera (Kohn *et al.*, 1960). Los dientes son largos, con surcos y provistos de púas en su extremo, un cordón delgado de tejido los mantiene fijos en la membrana de la rádula (Barnes, 1969).

CARACTERÍSTICAS DEL VENENO

El material proveniente del conducto venenoso es normalmente color blanco o amarillo pálido, pero en el *C. striatus* es ocasionalmente gris o negro. Tiene una consistencia viscosa y en el microscopio se aprecia con aspecto granular. Tiene un pH = 8.

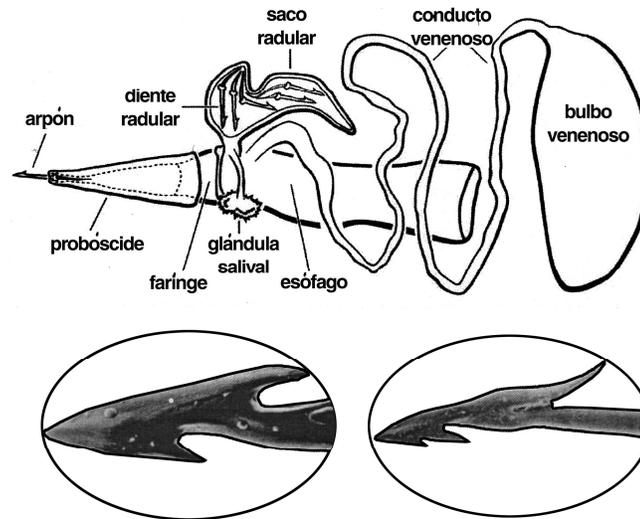


Figura 4. Esquema del aparato venenoso de *Conus* y micrografía electrónica de barrido del diente radular de dos especies de *Conus*: *C. purpurascens* (izquierda) y *C. obscurus* (derecha)

Conus spurius

Es un caracol con concha en forma de cono. Presenta de 9 a 10 espiras, las tres primeras forman una espira aplanada y la abertura es larga y estrecha. El canal sifonal forma sólo una muesca. El labio exterior es fino. Su opérculo es córneo y pequeño. Es color crema con hileras de manchas romboidales colocadas en espirales. El interior de la apertura es blanco. Son de 2 a 3 pulgadas de largo. Se encuentra cerca de la playa en aguas someras próximas a los arrecifes. Se localiza en el Golfo de México, en Florida y en el Caribe (Lira-Galera *et al.*, 1989).

2.5. Ecología química

La ecología química comenzó de manera formal en la década de los sesenta y se puede definir como la química involucrada en la interacción entre los organismos de un ecosistema o también como el estudio de la toxicidad en organismos marinos desde un punto de vista ecológico.

En la actualidad, la ecología química incluye una amplia variedad de disciplinas dentro de la biología y de la química que históricamente se han desarrollado a la par que la química de los productos naturales.

Los principales aspectos que contempla la “ecología química” se relacionan con fenómenos tan diversos como el mutualismo, la simbiosis, la comunicación química, la detección de predadores, el reconocimiento del alimento, la bioluminiscencia, la competencia por el es-

pacio, etc. (Carballo, 2002). Se ha comprobado que, en muchos casos, los metabolitos secundarios actúan como mecanismos de defensa; por ejemplo, hay evidencia indirecta de que el veneno de varias especies de *Conus* es empleado para defenderse de predadores y también que algunas especies lo emplean para interacciones competitivas. Las picaduras a humanos son de naturaleza defensiva (Olivera, 2002).

De todas las especies marinas, el phylum de invertebrados sésiles es el que muestra las mayores actividades biológicas frente a patógenos y otras enfermedades humanas, y producen los productos naturales con mayor potencial farmacológico en comparación con las algas o las fanerógamas marinas (Ireland *et al.*, 1993). La frecuente aparición de compuestos bioactivos en estos animales se interpreta, en algunos casos, como un sistema de defensa química frente a factores externos causantes de estrés como la predación, el exceso de recubrimiento por organismos adherentes, o la fuerte competencia por el espacio (Norris y Fenical, 1982; Davis *et al.*, 1989; Faulkner, 1992; Pawlik, 1993; Proksch, 1994). De esta forma, algunas especies marinas han desarrollado a lo largo de su evolución la capacidad de sintetizar compuestos químicos relacionados con la adquisición y defensa del espacio vital, muchos de los cuales presentan propiedades farmacológicas de clara aplicación en medicina —sustancias antitumorales, antibacterianas, etc. (Ireland *et al.*, 1993).

En un principio se llegó a pensar que los diferentes metabolitos secundarios de origen marino que se iban aislando, presentaban características únicas y distintivas de cada especie. Sin embargo, las investigaciones y la experiencia que se tiene en la actualidad muestran que la situación es mucho más compleja. Muchos estudios sugieren que hay una gran fuente de variación incluso dentro de un mismo organismo. En efecto, la biosíntesis de metabolitos secundarios puede verse influenciada por factores externos como las condiciones ambientales, la presencia de predadores, la infección por parásitos, la temperatura del agua, la profundidad, el nivel de nutrientes, etc., y por factores internos como por ejemplo el estado de desarrollo, la reproducción, etc. (Carballo, 2002).

2.6. Historia del estudio de los *Conus*

Lo que motivó inicialmente la investigación del veneno de los *Conus* fue que la picadura de algunos de estos moluscos puede causar la muerte en humanos. El pionero de estas investigaciones fue Alan Kohn (Kohn *et al.*, 1960), quien descubrió por primera vez que los caracoles

cónicos cazaban peces; y en Australia un grupo de investigadores (Endean *et al.*, 1974) documentaron la farmacología del veneno crudo de *C. geographus*, demostrando que el veneno tenía diferentes compuestos activos biológicamente.

El primer péptido de *Conus* del cual se obtuvo la secuencia completa de aminoácidos fue la α -conotoxina GI con 13 aminoácidos y 2 puentes disulfuro. Se extrajo del veneno del *Conus geographus* (Cruz *et al.*, 1978). Posteriormente se realizó la caracterización de las μ -conotoxinas, otro grupo mayoritario de péptidos paralizantes que afectan a los mamíferos. La presencia de estos dos péptidos en el veneno de *C. geographus* explicó por qué es que las picaduras de estos caracoles son mortales.

El siguiente paso en la investigación de las conotoxinas se dio en la Universidad de Utah. Un estudiante de 18 años, Craig Clark, tuvo la fascinante idea de inyectar fracciones de veneno directamente en el sistema nervioso de mamíferos, en lugar de usar las inyecciones intraperitoneales (i.p.) que era el método estándar en ese laboratorio. Cuando se inyectaba el veneno de *Conus* por el método i.p. se obtenían resultados apenas visibles. Sin embargo, cuando la misma dosis se inyectaba intracranealmente, la verdadera diversidad farmacológica del veneno de *Conus* se revelaba con el asombroso conjunto de fenotipos conductuales producidos en ratones (Olivera y Cruz, 2001). Clark decidió purificar una fracción "durmiente", la cual ponía a ratones menores de 14 días en un estado adormilado. Otros dos estudiantes descubrieron que si la misma fracción era inyectada a ratones de 21 días, se manifestaba un síndrome de hiperactividad en los ratones: trepaban las paredes de sus jaulas y corrían de una esquina a otra. Ahora, este péptido se conoce como conantokina-G y se sabe que es un antagonista del receptor de glutamato tipo NMDA (N-metil-D-aspartato). Este es uno de los pocos péptidos de *Conus* que no poseen enlaces disulfuro. La familia de las conantokinas ha demostrado tener potencial terapéutico para la epilepsia (Olivera y Cruz, 2001).

Posteriormente, un grupo de investigación mexicano caracterizó la conorfamida-Sr1 que se encuentra en la especie *Conus spurius* que vive en el Caribe y en el Atlántico oeste. Aunque ya se habían encontrado una gran variedad de RF-amidas en sistemas biológicos, este es el primer reporte de un miembro de la familia de neuropéptidos que es un componente mayoritario de un veneno (Maillo *et al.*, 2002). Se determinó la secuencia del péptido natural empleando métodos de secuenciación estándar de Edman y espectrometría de masas y se confirmó por medio de síntesis química. El péptido tiene 12 aminoácidos y no contiene residuos de cisteína.

El péptido se encuentra amidado. No se había caracterizado anteriormente otro péptido de un *Conus* vermívoro del Atlántico (Maillo *et al.*, 2002). La conorfamida-Sr1 inyectada en ratones provocó hiperactividad caracterizada por una frecuencia mayor en caminar o correr alrededor de la jaula, trepando paredes y brincando, esto se comparó con el control, a los que sólo se les inyectó solución salina. La secuencia C-terminal de la conorfamida-Sr1 sugiere que es un miembro de la familia de los péptidos RF-amido, una familia de neuropéptidos presente en invertebrados y vertebrados.

El primer péptido del veneno de un *Conus* homólogo a un neuropéptido endógeno fue la conopresina-G, la cual pertenece a la familia de neuropéptidos de la vasopresina-oxitocina (Nielsen *et al.*, 1994). Con este trabajo se amplió la noción de que todos los péptidos de *Conus* que son homólogos a neuropéptidos endógenos parecen ser agonistas.

En el 2003 se presentó el primer análisis del veneno de un gasterópodo no-*Conus*, *Terebra subulata*, que pertenece a la familia Terebridae; ésta se encuentra incluida en la superfamilia Conoidea, que comprende a la familia Conidae. La purificación y caracterización bioquímica del veneno de *Terebra subulata* se llevó a cabo por un grupo de investigadores en los Estados Unidos (Imperial *et al.*, 2003). Se adoptó el termino “augertoxinas” para los componentes polipeptídicos del veneno de los miembros de la familia Terebridae. Se identificaron tres polipéptidos de 40 a 41 aminoácidos con 3 a 4 enlaces disulfuro. Cuando se inyectó una mezcla de dos de estos componentes al nemátodo *C. elegans* se observó un dramático síndrome motriz en todos los gusanos inyectados; éstos giraban de una manera no coordinada por lo menos durante 10 minutos, pero todos se recuperaron eventualmente. La mitad de los gusanos empezaron a moverse después de un periodo inicial de parálisis por algunos minutos más; sin embargo no tiene efecto en ratones. La actividad biológica se debe a la augertoxina s7a la cual tiene 3 enlaces disulfuro (Cys); en cambio, la augertoxina s11a no tuvo ningún efecto (Imperial *et al.*, 2003).

El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar algunos de los componentes más abundantes e hidrofílicos del veneno de *T. subulata* y poder compararlos con el veneno de los *Conus*. Comparado con el veneno de los *Conus* que se han analizado, se encontró que los componentes del veneno en *T. subulata* contienen más residuos de aminoácidos en su estructura primaria, es decir son más largos. Las primeras conotoxinas que se caracterizaron fueron de 10-30 aminoácidos, en cambio los tres componentes del veneno de *Terebra* tienen ≥ 40 ami-

noácidos. Este tamaño de toxinas es más común en otros animales; se parecen mucho —en tamaño y en el arreglo de las Cys— a péptidos del veneno de arañas.

También se han estudiado otros caracoles venenosos, los túrridos (familia Turridae), que están incluidos en la misma superfamilia (Conoidea) que los *Conus*. Los túrridos producen péptidos que han sido llamados "turritoxinas". El estudio de las turritoxinas a escala mundial se inició en nuestro país, en la UNAM (Campus Juriquilla) el año pasado; se obtuvieron péptidos con características muy diferentes de las de las conotoxinas (López-Vera *et al.*, 2004). Los polipéptidos caracterizados del conducto venenoso de los caracoles túrridos *Polystria albida* y *Germula periscelida* contienen una gran proporción de residuos de metionina, tirosina y arginina y pocos o ningún residuo de Cys.

No sólo se buscan compuestos con actividades que se puedan aplicar en el tratamiento de diversas enfermedades, también otras propiedades, como la capacidad analgésica, son intensamente buscadas por diversas compañías. En este sentido, la compañía irlandesa Elan Corp., lanzó un nuevo analgésico, el primer medicamento aislado de un macroorganismo marino. La sustancia, cuya versión sintética es llamada Prialt™, proviene del caracol tropical piscívoro *Conus magus*, que ataca a sus presas valiéndose de un arpón venenoso. Es una ω -conotoxina muy poderosa. La dosis a administrar es mil veces menor a la de la morfina, la cual además de generar tolerancia, produce adicción. El novedoso analgésico obtuvo la aprobación condicional de la Dirección de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos en el año 2000, y la aprobación definitiva a finales del 2004.

3. Planteamiento del problema

Las fuentes tradicionales de los compuestos bioactivos han sido, hasta hace pocos años, las plantas y los microorganismos terrestres, de donde se han obtenido más de la mitad de las prescripciones farmacéuticas actuales. Sin embargo, las muestras del medio terrestre han sido ampliamente exploradas por lo que en la actualidad presentan gran dificultad para suministrar nuevas moléculas con bioactividad (sólo 1 de cada 10,000 moléculas sometidas a "screening" presentan actividad potencial interesante). En comparación, el mar ha sido escasamente explorado. El mar contiene aproximadamente diez millones de especies diferentes. El medio marino es mucho más agresivo por lo que la mayoría de las especies ha desarrollado para su defensa un arsenal de moléculas solubles en agua, muchas de las cuales podrían tener aplicación como fármacos efectivos en el tratamiento de múltiples enfermedades (Fernández, 2002). La investigación de este amplio potencial farmacéutico ha sido una de las mayores ocupaciones en las últimas décadas. Sin embargo, muchas de estas moléculas con elevada actividad son hoy apenas grandes promesas debido a la escasa cantidad en la que han sido aisladas. Esto nos obliga a desarrollar y probar métodos de producción, para poder asegurar el suministro de estas sustancias al menos durante las fases preclínica y clínica.

Una de las fuentes que ha demostrado mayor riqueza en sustancias bioactivas es el género *Conus* de caracoles marinos. Las toxinas peptídicas de estos organismos pueden ser sintetizadas de manera relativamente fácil, en cantidades adecuadas para hacer estudios detallados enfocados a determinar su potencial terapéutico. De las más de 50 especies de *Conus* que habitan en las aguas territoriales mexicanas, sólo tres especies han sido estudiadas en cuanto a las toxinas contenidas en sus venenos, y han demostrado contener péptidos con estructuras novedosas (Maillo *et al.*, 2002; Aguilar *et al.*, 2005; Zugasti-Cruz *et al.*, 2006). Por lo tanto, es necesario seguir explorando nuestra biodiversidad en la búsqueda de compuestos activos biológicamente.

En el Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la UNAM se fraccionó un extracto crudo del conducto venenoso de la especie vermívora *Conus spurius* y se han caracterizado parcialmente varios picos cromatográficos (Maillo-Pañalver, 2001).

Se encontró un péptido con la secuencia GPM γ ... que se cree pertenece a la familia de los RF-amido péptidos reportado anteriormente en el veneno de los *Conus* (Maillo *et al.*, 2002). La familia de los RF-amido péptidos es un grupo de péptidos que comparten en la secuencia del carboxilo terminal Arg-Phe-amida. Estos péptidos se encuentran distribuidos en los metazoos y notablemente en anélidos. Datos farmacológicos sugieren que los péptidos RF-amido están involucrados en el control del ritmo cardiaco en moluscos y en el tono de la pared muscular en poliquetos, también se les han atribuido funciones de transmisión o señalización en invertebrados (Salzet y Stefano, 2001).

Otro péptido con la secuencia CLQFGS... podría pertenecer a la superfamilia "O". Dentro de la superfamilia O se encuentran varias familias de toxinas dirigidas hacia canales iónicos activados por voltaje; las δ - y μ O-conotoxinas afectan canales de Na⁺, las κ -conotoxinas bloquean canales de K⁺, las ω -conotoxinas bloquean canales de Ca²⁺ y las γ -conotoxinas que actúan en canales de sodio que se activan a voltajes hiperpolarizantes (marcapaso).

Hasta el momento, sólo cinco péptidos de la superfamilia O han sido aislados del veneno de especies vermívoras como el *Conus spurius* (Abogadie *et al.*, 1990; Aguilar *et al.*, 2005; Zugasti *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2006).

Por lo tanto, es importante dilucidar la estructura primaria completa de los péptidos y determinar si tienen efecto sobre el sistema nervioso central de un mamífero. La caracterización estructural sentaría las bases para su eventual síntesis química en cantidades adecuadas para hacer estudios detallados acerca de su blanco molecular y mecanismo de acción. Esto último sería de gran interés si el péptido tuviera actividad biológica en un organismo empleado para estudiar compuestos con fines de desarrollo de fármacos.

Por otra parte, se cree que los conopéptidos en el veneno están correlacionados con parámetros ecológicos de comportamiento, ya que hay evidencia indirecta que el veneno es empleado por varias especies de *Conus* para defenderse de depredadores, y también que algunas especies lo emplean para interacciones competitivas; es por eso que un estudio de ecología química para comprender estas interacciones es de igual manera importante.

4. Objetivo

General

Purificar y determinar la estructura química de péptidos aislados del veneno de *Conus spurius*, así como caracterizar su actividad biológica en un mamífero (con el fin de desarrollar fármacos) y realizar un estudio de ecología química con estos péptidos.

El interés en el veneno de *Conus* está dirigido por la hipótesis que propone que la especificidad de la presa en los Conidae puede estar relacionada con una selectividad complementaria de los componentes relevantes de sus venenos.

Específicos

- Purificar el péptido aislado del extracto crudo del conducto venenoso.
- Cuantificar el péptido purificado.
- Determinar la masa molecular del péptido intacto mediante espectrometría de masas.
- Someter el péptido a reducción y alquilación para estabilizar los posibles residuos de cisteína y repurificarlo.
- Determinar la estructura primaria del péptido alquilado.
- Determinar el efecto del péptido intacto sobre el sistema nervioso central del ratón.
- Realizar un estudio de ecología química con el péptido.

5. Hipótesis

Estructural

- El péptido 34Sr4 aislado del veneno de *Conus spurius* es análogo a la familia de los neuropéptidos endógenos conocidos como RF-amido péptidos.
- El péptido 33Sr3 del veneno de *Conus spurius* tiene 6 residuos de cisteína en el arreglo C-C-CC-C-C y por lo tanto pudiera pertenecer a la superfamilia O de conotoxinas.

Biológica

- Los péptidos aislados de *C. spurius* tienen efectos sobre el sistema nervioso central de ratón que se manifiesta en cambios conductuales o motores.
- Los péptidos aislados de *C. spurius* tienen efectos sobre el sistema nervioso central de moluscos y peces que se manifiestan en la inhabilidad de reaccionar a estímulos (parálisis).

6. Área de recolección

La recolección de los ejemplares se realizó en la península de Yucatán que se encuentra limitada por el Golfo de México y el Mar Caribe, cuenta con 1 100 kilómetros de costa. Su extensión es de 197,600 Km², e incluye parte de México, Belice y Guatemala.

6.1. Provincia Caribeña

Ubicada en el centro de las Antillas, esta provincia tropical se extiende de norte a sur desde Florida hasta Las Bermudas.

El Mar Caribe está situado al este de América Central. También es llamado Mar de las Antillas por estar ubicado al sur y al oeste del arco antillano. En él se encuentran las Islas Caribes. Limita al norte con las Grandes Antillas: Cuba, la isla de la Española en la que se encuentran Haití y la República Dominicana y la isla de Puerto Rico (a lo largo del Trópico de Cáncer); al este con las Pequeñas Antillas (meridiano 60°); al sur con Venezuela, Colombia y Panamá (paralelo 10°); y al oeste con el resto de países centroamericanos (Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Guatemala, Belice) y la Península de Yucatán, México (meridiano 88°) (Figura 5).



Figura 5. Mapa del Mar Caribe

6.2. Rasgos batimétricos y topográficos

El Mar Caribe se extiende en un área total de 2 640 000 Km² y tiene una profundidad media superior a la del Golfo de México, de 4000 m. La cuenca caribeña es típicamente geosinclinal, dado que su arquitectura se conforma por depresiones abismales, trincheras, crestas montañosas y canales submarinos. La construcción de un perfil batimétrico de estos rasgos evidencia una marcada diferencia con la parte occidental de la Península de Yucatán, lo cual denota la presencia de un margen positivo muy distinto al margen activo del oriente.

La plataforma continental del Caribe mexicano es muy estrecha, con sólo 20 Km frente a Cancún y gradualmente se atenúa hacia el sur, y en Puerto Morelos prácticamente desaparece, confundándose con la ladera del talud continental que tiene una pendiente mayor a 4° y alcanza rápidamente 400 m de profundidad, en los cuales el talud se interrumpe con un par de elevaciones alargadas que constituyen la Isla de Cozumel y el Banco Flecha Smith de 17 m de profundidad. Al oriente de estas formaciones, el talud aumenta bruscamente su pendiente hasta llegar a montañas ovaladas de 405 y 262 m de altura, limitadas por escarpes que se extienden hacia la Planicie Abisal de Yucatán.

Los taludes de la Península de Yucatán y Cuba se aproximan entre sí en una depresión estrecha que se conoce como Canal de Yucatán y se observa por su menor profundidad con una divisoria entre las cuencas del Golfo de México y del Mar Caribe (De la Lanza, 1991).

6.3. Tipos y origen de los sedimentos, distribución y transporte

El piso oceánico del Mar Caribe es irregular y está formado principalmente por sedimentos que contienen grandes cantidades de carbonatos de tipo biogénico y zonas arrecifales muy limitadas en Yucatán. En contraste, en Quintana Roo abundan los organismos marinos que favorecen la formación de arrecifes coralinos y zonas de arrecifes bordeantes. Cerca de la costa este de la Península de Yucatán, dominan las arenas carbonatadas biogénicas con un contenido de hasta 70% de carbonato de calcio que reflejan la presencia de sistemas arrecifales, localizados sobre la plataforma continental del borde oriental de la península y sobre el litoral de la Isla Cozumel (Rezak y Edwards, 1972).

7. Parte experimental

7.1. Colecta y transporte de los especímenes

Los caracoles de la especie *Conus spurius* se obtuvieron mediante redes camaroneras en las costas del Mar Caribe, entre 37 y 100 m de profundidad. Los ejemplares capturados se congelaron (con hielo seco) hasta la llegada al laboratorio de Neurofarmacología Marina en el Instituto de Neurobiología de la UNAM y se mantuvieron a -70 °C hasta ser utilizados.

7.2. Obtención de los conductos venenosos

Se aislaron los conductos venenosos de 11 ejemplares de *C. spurius* por quebrantamiento de las conchas en forma mecánica. Una vez liberados los organismos, se realizó la disección de los conductos venenosos y la glándula venenosa con ayuda de unas pinzas y tijeras, con el cuerpo del caracol sobre una caja de Petri en hielo.

7.3. Extracción del veneno

El veneno se extrajo con una mezcla de 40% de acetonitrilo y 2% de ácido trifluoroacético (TFA). Se homogenizaron únicamente los conductos venenosos y posteriormente se centrifugó (centrífuga de mesa SORVAL, modelo MC12) a 735 g durante 3 min, a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se repitió el proceso de centrifugado por cuadruplicado para recuperar mayor cantidad de material. Finalmente se concentró (Speed Vac Plus SC110A, Savant, Holbrook NY) y se procedió a resuspender la muestra para así poder purificarla.

7.4. Separación y purificación de los componentes del veneno

El extracto crudo se resuspendió en una solución de 0.1% de TFA (solución A) y en una solución de 90% de acetonitrilo con 0.085% TFA (solución B) en una proporción de 7:3 en 1 ml. Se centrifugó a 11,130 g (centrífuga de mesa SORVAL, modelo MC12) durante 15 min a temperatura ambiente. Se separó el sobrenadante —el precipitado se desechó— y se agregó 300 µl de solución B. Dicha disolución se volvió a centrifugar y posteriormente se agregó una mezcla de soluciones A-B en una proporción de 60:40 en 1 ml y nuevamente se centrifugó. El sobre-

nadante se separó para ser inyectado en el cromatógrafo (Varian) y así comenzar con la purificación.

Los péptidos del veneno se separaron en varias etapas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase inversa, con una columna semipreparativa C18 (Vydac, 218TP510, 10 x 250 mm, 5 μm de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro), equipada con precolumna de C18 (Vydac, 218GK54, 4.6 x 10 mm, 5 μm de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro) y filtro (Alltech, 28689; 4 mm, 2 μm tamaño de poro). Los péptidos se eluyeron a temperatura ambiente con un gradiente de 5% a 100% de solución B en 95 minutos; con un incremento de 1% de B por minuto y un flujo de 2.5 ml por minuto. Se inyectaron 2 ml. La detección fue realizada con un espectrofotómetro de flujo ajustado a 220 nm de longitud de onda. La colecta de los péptidos se realizó de manera manual en tubos Eppendorf de 1.5 ml con base en el cambio de absorción.

7.5. Repurificación de los péptidos

La repurificación se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa (HPLC-RP) del material obtenido en la primera elución. Los gradientes de repurificación se diseñaron tomando en cuenta el porcentaje de solución B de elución aparente calculado a partir del tiempo de retención para dicho material. Las soluciones empleadas fueron esencialmente las mismas que en el extracto crudo (solución A y B).

7.6. Análisis de la estructura primaria

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos purificados se obtuvieron mediante un secuenciador automático de proteínas bajo el principio de degradación de Edman (Procise 491 Protein Sequencing System, Applied Biosystems, Foster City CA). Este análisis se usó también para la cuantificación de los péptidos.

7.7. Reducción y alquilación

Para conocer la secuencia primaria completa de los péptidos es necesario someterlos a la reducción de los puentes disulfuro y a su posterior alquilación para evitar la formación de puentes disulfuro y estabilizar los residuos de cisteína durante la secuenciación de Edman (Tarr, 1986).

El péptido seco y purificado se disolvió en 100 μL de TRIS 0.1 M (pH= 8) y luego se agregó 100 mg de clorhidrato de guanidina y se redujo con 45 μL de ditioneitol (DTT) 50 mM a 65 °C por 25 minutos bajo atmósfera de nitrógeno. Se agregó 4 μL de 4-vinilpiridina para su alquilación y la mezcla se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente por 16 horas bajo atmósfera inerte. El péptido alquilado se repurificó mediante HPLC-RP inmediatamente después de su derivación con una columna analítica C18 (Vydac 218TP54, 4.6 x 250 mm, 5 μm de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro) con precolumna C18 (Vydac 218GK54, 4.6 x 10 mm, 5 μm de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro) y un gradiente discontinuo de 10 - 60% de solución B en 50 minutos (incrementando 1%B cada minuto) después de un paso isocrático a 10% B durante 15 min.

7.8. Corte enzimático

Se decidió digerir el péptido denominado 33Sr3 con α -quimotripsina. La α -quimotripsina hidroliza péptidos y proteínas en el lado carboxilo de los aminoácidos aromáticos: triptófano, tirosina y fenilalanina, y también en el extremo carboxilo de leucina y metionina; con cortes ocasionales en otros sitios. Cabe señalar que si el residuo siguiente es prolina, el corte no ocurrirá.

Las condiciones para escindir un péptido es que éste debe estar desnaturalizado y solubilizado para una rápida y completa digestión. La digestión se lleva a cabo con 200 μL de amortiguador con pH \approx 8 — 8.5 de bicarbonato de amonio y cloruro de calcio ($[\text{NH}_4\text{HCO}_3] = 0.1 \text{ M}$ y $[\text{CaCl}_2] = 0.1 \text{ mM}$). El pH se ajusta con hidróxido de amonio (NH_4OH). Se agrega 1 μL de α -quimotripsina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se incuba a 37 °C por una hora. Inmediatamente después se separa mediante HPLC-RP con un gradiente de 0 - 50% de solución B y aumentando 1% por minuto. Se empleo una columna analítica C8 (Agilent, Eclipse XDB-C8, 5 μm , 4.6 x 150 mm,

80 Å de tamaño de poro) con precolumna C8 (Varian 310-793-2300; 4.6 x 15 mm, 5 µm de tamaño de partícula, 100 Å de tamaño de poro) y un asa de 5 ml.

7.9. Determinación de las masas moleculares

Para conocer la masa molecular de los péptidos, éstos se analizaron mediante espectrometría de masas. Los espectros de iones positivos de las muestras se obtuvieron en el departamento de Química en la Universidad de Utah, Salt Lake City mediante un espectrómetro Voyager-DE STR MALDI (Perceptive Biosystems / Global Medical Instruments).

7.10. Composición de aminoácidos

Para determinar las estructuras primarias completas de los péptidos se decidió realizar el análisis de aminoácidos fundamentado en la técnica de Bidlingmeyer *et al.* (1986) la cual se basa en la hidrólisis ácida gaseosa de proteínas o péptidos, seguida por la formación del derivado feniltiocarbamilo (PTC) de los aminoácidos vía derivatización con fenilisotiocianato (PITC). Posteriormente, los derivados PTC-aminoácidos se separan mediante cromatografía líquida seguida de la detección por ultravioleta a 254 nm.

La derivatización es un método rápido, eficiente, sensible (se puede emplear a partir de concentraciones pmolares) y específico para el análisis de aminoácidos.

Los péptidos (500 pmol) fueron hidrolizados a 110°C por 24 horas empleando la técnica de hidrólisis en fase gaseosa con ácido clorhídrico (HCl) al 30% conteniendo 1% de fenol (v/v). Una vez que se removió el exceso de HCl con vacío (Speed vac), los péptidos fueron neutralizados con un exceso de trietilamina (TEA) en una solución de metanol: agua: TEA (2:2:1) y derivados con una mezcla de metanol-TEA-PITC-agua (7:1:1:1). Después de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, el exceso de reactivos y disolventes se remueven con presión reducida y las muestras se reconstituyen con una mezcla de amortiguador de fosfato de sodio dibásico 5 mM (pH = 7.5): acetonitrilo: metanol, 19:1:5 antes de ser separadas mediante HPLC-RP.

Las muestras se inyectaron en volúmenes de 20 µl (100 pmol) en un cromatógrafo Waters R 600E Multisolvent Delivery System con una columna Nova Pack C18 (Waters 3.9 x 300

mm, 4 μm de tamaño de partícula, 60 Å de tamaño de poro) con precolumna Nova Pack C18 y un asa de 20 μl . La detección se realizó mediante UV a 254 nm con una temperatura de 45°C.

Las disoluciones empleadas para eluir las muestras fueron:

- Solución A: amortiguador acuoso (acetato de sodio 0.14 M con TEA 0.5 ml/L); ajustando el pH con ácido acético hasta 6.34
- Solución B: acetonitrilo al 60% en agua.

El gradiente fue de 10-51% de solución B en 20 minutos empleando una curva convexa (tipo 5) con un flujo de 1 ml/min.

7.11. Caracterización biológica

Se decidió evaluar la actividad biológica de los péptidos en ratones, ya que con anterioridad se ha demostrado que muchas de las conotoxinas tienen actividad biológica en el sistema nervioso central de mamíferos y además muchos estudios de toxicidad y teratología llevados a cabo en ratones, son diseñados para proveer información de toxicidad potencial para humanos y también es un sistema a partir del cual se pueden hacer extrapolaciones a otros mamíferos (Gad y Chengelis, 1992).

Los ratones tienen la ventaja de que la evaluación de sustancias en su sistema nervioso se puede medir en primera instancia por medio de cambios conductuales evidentes.

Los ratones son la especie roedora más frecuentemente empleada en pruebas tóxicas agudas donde generalmente cada animal recibe una única dosis de la sustancia prueba. Los resultados de un buen diseño de pruebas tóxicas agudas pueden ayudar a predecir el blanco en el organismo.

La observación clínica comprende el registro de efectos que pueden ser detectados por observación directa, tales como el modo de andar anormal y el peso corporal. La observación clínica provee la primera indicación de cuál es el sistema fisiológico afectado por el artículo de prueba. Cabe señalar que no se miden parámetros cardiovasculares porque se ha reportado el ritmo cardíaco de ratones en un intervalo de 300 a más de 800 latidos/min (Gad y Changelis, 1992). Muchos de los efectos aparecen después de la administración de una dosis aguda.

También se decidió evaluar el efecto de estos péptidos en moluscos y peces, como parte de un estudio ecológico para comprobar si existe alguna correlación entre los hábitos alimenticios y la toxicidad del veneno de los Conidae, así como para identificar nuevas toxinas activas en sistemas invertebrados y además conocer si el veneno sirve para otros fines como por ejemplo: la defensa y/o competencia por espacio.

El interés en el veneno de *Conus* está dirigido por la hipótesis que propone que la especificidad de la presa en los Conidae puede estar relacionada con una selectividad complementaria de los componentes relevantes de sus venenos.

Para el estudio de ecología química se emplearon caracoles, lapas y peces. El emplear caracoles en bioensayo presenta un problema mayor debido a su tendencia a retraerse rápidamente en su concha después del estímulo nocivo, impidiéndonos así la observación de cualquier efecto inmediato paralizante. Para solucionar este problema se decidió emplear lapas, las cuales tienen conchas planas y se protegen a sí mismas adhiriéndose fuertemente a sustratos sólidos y debido a que son univalvas se puede apreciar el efecto fácilmente.

BIOENSAYO EN RATÓN

Los péptidos se disolvieron en solución salina normal y fueron inyectados en dosis cuantificadas en el SNC de ratones; su comportamiento se registró y comparó con el manifestado por ratones controles inyectados en el SNC con el mismo volumen de solución salina normal. Se ha comprobado que la mayor parte de las conotoxinas ocasionan trastornos o desviaciones en la conducta normal del ratón, y en general, estas conductas que se desvían de la normalidad son reproducibles y en ocasiones pueden dar una idea del blanco de acción específico a nivel molecular (Olivera *et al.*, 1999).

Se emplearon ratones macho Swiss Webster de 9.5 a 11.3 g de peso de 21 ó 25 días. La conotoxina se les inyectó intracerebralmente empleando jeringas para insulina Becton Dickinson Ultra Fine de 1 ml. Los ratones controles se inyectaron con 30 μ l de solución salina normal (0.9 NaCl). Una vez inyectados se colocaron en una jaula y se evaluó su comportamiento durante 1 hora. Los ratones experimentales fueron inyectados con diferentes dosis (250 — 1000 pmol) de péptido disuelto en 30 μ l de solución salina. Concluido el periodo de observación, los ratones fueron perfundidos y posteriormente decapitados para extraer el cerebro y realizar un análisis histológico de éste.

BIOENSAYO EN CARACOL

Se emplearon caracoles *Pomacea paludosa* (Figura 6) o mejor conocidos como “caracol manzana” los cuales fueron inyectados en el pie con 30 μ l de solución salina o péptido (250 pmol) y se evaluó su comportamiento por 1 hora.



Figura 6. Fotografía de un caracol *Pomacea paludosa*, caracol manzana

El caracol manzana *Pomacea*^{*} pertenece a la familia Ampullariidae, habita las aguas dulces de numerosas áreas tropicales en diversas partes del mundo (América del sur, central y el sur de EUA) y se han convertido en una mascota popular. Su atractiva apariencia y tamaño relativamente grande (5 a 15 cm) han contribuido enormemente a su éxito. La familia del caracol manzana (Ampullariidae) está dividida en varios géneros: *Asolene*, *Felipponea*, *Marisa* y *Pomacea* son géneros del nuevo mundo, mientras que los géneros *Afropomus*, *Lanistes* y *Saulea* son originarios de África.

El caracol manzana habita un amplio rango de ecosistemas, desde charcas, canales de riego y estanques hasta lagos y ríos. La mayoría de las especies prefieren aguas lentas con suaves corrientes y tan solo unas pocas se han adaptado a ríos con fuertes corrientes. La combinación de pulmones y branquias refleja la adaptación a un hábitat con agua pobre en oxígeno. El opérculo protege al caracol frente a depredadores. Muchas especies, particularmente las del género Sudamericano *Pomacea*, tienen otra destacable característica anatómica, un sifón para respirar. Este órgano formado por un pliegue de la epidermis en el lado izquierdo del cuello, es difícilmente visible cuando no está en uso. Algunas veces el caracol necesita refrescar el aire del interior de sus pulmones, el músculo de este pliegue se contrae y el pliegue se convierte en una estructura tubular como un sifón, el cual capacita al caracol para respirar aire mientras permanece sumergido. Estos caracoles no son hermafroditas, presentan separación de sexos.

* Fuente: www.applesnail.net

Su cuerpo posee un pigmento negro y el pie es de color gris. Su concha es globosa, con una abertura larga, ovalada, de 40 a 55 mm de ancho y 40 a 65 mm de altura. De color amarillo a verde con rayas rojas y bandas oscuras en espiral (Figura 7).



Figura 7. Fotografía de la concha del caracol *Pomacea Paludosa*

El sistema nervioso del caracol manzana consiste en varios ganglios esparcidos por todo el cuerpo conectados con los otros mediante una comisura. La función de las comisuras entre los ganglios es integrar las diferentes partes del sistema nervioso.

En estos caracoles no existe un sistema nervioso central como en los mamíferos. Cada ganglio envía un órgano específico con sus nervios. Por ejemplo, el ganglio pedal envía el pie del caracol (Figura 8).

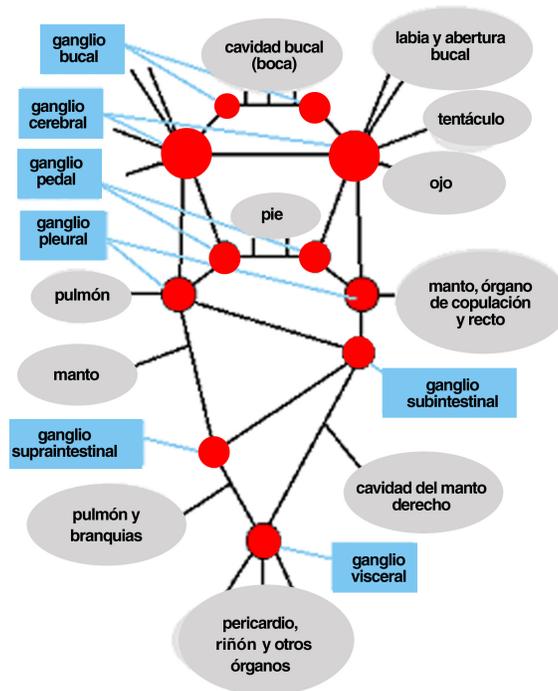


Figura 8. Esquema del sistema nervioso del caracol *Pomacea* (Ghesquiere, 1990)

BIOENSAYO EN LAPAS

Se emplearon lapas *Patella opea* (Figura 9A) las cuales fueron recolectadas en las costas del Pacífico y se mantuvieron en el acuario del laboratorio más de 24 horas antes de utilizarse. Los bioensayos se realizaron inyectándoles 10 μ l del péptido (50 ó 250 pmol) al pie de la lapa volteada boca arriba. El animal inyectado se colocó en su posición normal en una caja de Petri con agua de mar fresca y aireada, se examinaron 5 minutos después (Fainzilber y Zlotkin, 1992).

Las lapas* son moluscos que se distinguen por su habilidad para adherirse fuertemente a las rocas. Viven en la zona intermareal, junto a balanos y moluscos (Figura 9B). No tienen succión pero sí un fuerte pie muscular que puede sujetarse a las pequeñas imperfecciones en la superficie de las rocas, asegurando su estancia inclusive en condiciones de tormenta. Cuando baja la marea, su pie forma un sello para asegurar que no se sequen.

Su concha es aplanada y está decorada con diminutas líneas radiales, con tonalidades que van del café al blanco con líneas delgadas color café oscuro. El interior de la concha es blanco con una mancha café en el centro. El borde es irregular y ondulado. Se alimentan de todo organismo que puedan arrancar con la rádula. Se desplazan únicamente para conseguir alimento pero siempre regresan al mismo punto. Con el paso de los años, llegan a hacer una marca oval en la roca en donde se postran, conocida como “cicatriz de casa”.

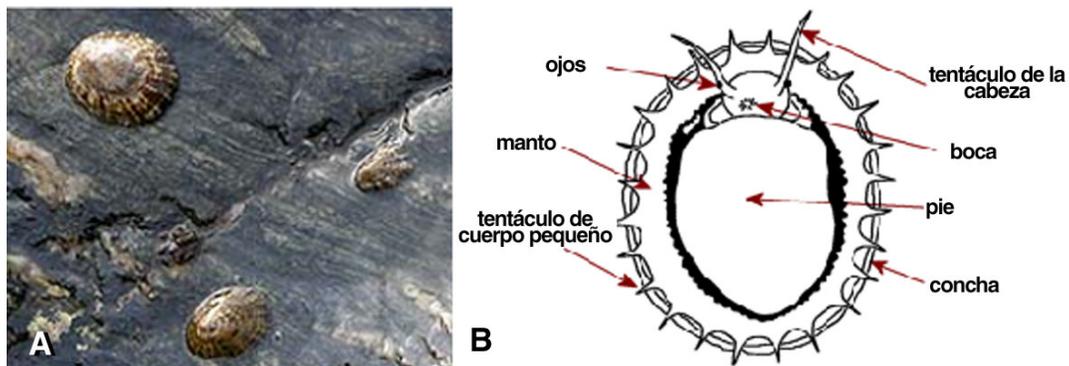


Figura 9. A) Fotografía de una lapa *Patella opea*. B) Representación esquemática de la vista inferior de una lapa común

* Fuente: www.marine-reserve.co.uk

BIOENSAYO EN PECES

Se emplearon peces *Lebistes reticulatus*, comúnmente conocidos como *guppies* (Figura 10). Se les inyectó intramuscularmente 250 pmol de péptido disuelto en 10 μ l de solución salina. La inyección se realizó debajo de la aleta dorsal, en la parte posterior. Los peces, después de ser inyectados, se observaron durante 2 horas para registrar algún posible cambio en su comportamiento (Fainzilber *et. al.*, 1991).



Figura 10. Fotografía del pez Guppy, *Lebistes reticulatus*

Los peces *Lebistes reticulatus** son peces de agua dulce, ovovivíparos. La hembra (6 cm) es mayor que el macho (3 cm), tiene el cuerpo grisáceo y una aleta caudal generalmente de color roja, amarilla o azul; mientras que el macho tiene parte del cuerpo y aleta caudal muy llamativos, de varios colores; constantemente perseguirá a las hembras tratando de llamar su atención. Es interesante observar que el número de hembras siempre es mayor que el de los machos, a la razón de 3:1.

Son originarios de América del sur y central (Venezuela, Barbados, norte de Brasil y Guayanas). También se les conoce como pez arco iris. Se encuentran hoy diseminados por todo el mundo. Desde el comienzo de la acuariofilia ha sido y es uno de los peces más introducidos debido a la facilidad de su mantenimiento y reproducción.

El nombre Guppy proviene del apellido de Robert J. L. Guppy quien fue homenajeado por el naturalista inglés Guenther, quien recibió de Robert los primeros peces colectados en América Central en el año 1860. Pertenecen a la familia de los Poeciliidae, a la cual también pertenecen los Molinesias, Platys y Espadas.

* Fuente: www.animals.net

Son ágiles y multicolores. Los Guppy son utilizados en acuarios desde mediados de 1900. Entretanto, su utilización no se limita apenas a esta afición ya que, debido a su hábito voraz de alimentarse con larvas de insectos, los Guppy son utilizados en países del oriente como herramienta de control biológico. Ya fueron utilizados también en Brasil, en la década 30, para combatir los transmisores de malaria y de la fiebre amarilla. Son también utilizados en laboratorios, en los experimentos ecotoxicológicos, genéticos, comportamentales y reproductivos.

8. Resultados

8.1. Identificación de especímenes

Los caracoles recolectados fueron identificados como *Conus spurius* por poseer características únicas de esta especie en su concha, así como por el lugar donde fueron recolectados (Mar Caribe Mexicano). Se compararon con los prototipos reportados para esta especie de Abbott y Dance, 1990.

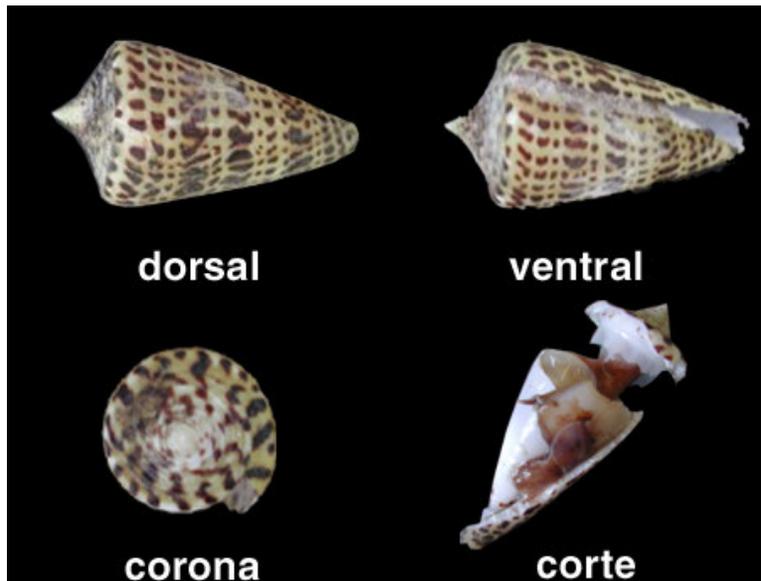


Figura 11. Fotografías del caracol *Conus spurius*

Su concha tiene forma de cono, es de color marfil con rombos café oscuro en vueltas concéntricas en la misma dirección del último giro de la concha; es posible observar un perióstraco café más claro que el de las manchas. Presenta de 9 a 10 espiras y la abertura es larga y estrecha (Figura 11). El interior de la concha es de color blanco. Las conchas son lisas, sin rugosidades, con el labio exterior delgado. Su largo es de 4.5 a 7 cm; la espira está un poco elevada en el centro. El conducto venenoso es de 2 a 6 veces el largo de su concha. Se encuentra en aguas poco profundas en Florida y en el Golfo de México.

8.2. Separación y purificación de los componentes del veneno

La Figura 12 muestra la separación analítica del extracto crudo del veneno de *C. spurius*, del cual fueron separados y purificados los dos péptidos que se emplearon en este estudio. Se eligieron los picos **33Sr3** y **34Sr4** porque ya se tenían secuencias parciales de interés, ya que podría tratarse de una O-conotoxina y una nueva conorfamida, respectivamente (Maillo-Peñalver, 2001).

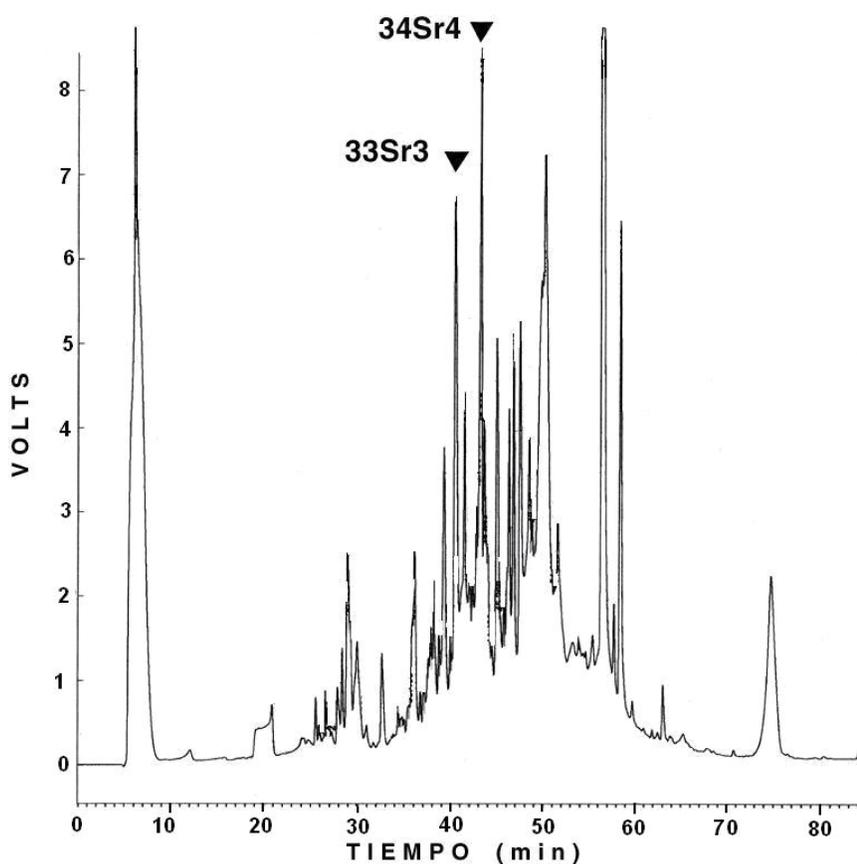


Figura 12. Perfil cromatográfico del extracto crudo del conducto venenoso de *C. spurius*.

8.3. Purificación de los péptidos

Péptido 34Sr4

El pico denominado **34Sr4** se concentró y posteriormente se disolvió en 500 μ l de solución B (90% acetonitrilo con 0.085% de TFA). La porción disuelta se repurificó en primera instancia mediante HPLC-RP empleando soluciones A y B con una columna semipreparativa C8 (YMC, C8; 250 x 10 mm i.d., diámetro de partícula 5 μ m, tamaño de poro 12 nm) y un gradiente de 24-45% de solución B en 58 minutos después de un paso isocrático de 10 minutos a 24% de solución B y un flujo de 1 ml/min. El péptido 34Sr4 eluye a 38.8% de solución B (Figura 13A). Se eligió este péptido debido a que al ser secuenciado parcialmente se encontró que éste poseía un patrón similar (GPM γ D) al de un péptido previamente estudiado en el veneno de estos caracoles: la conorfamida-Sr1 (Maillo *et al*, 2002).

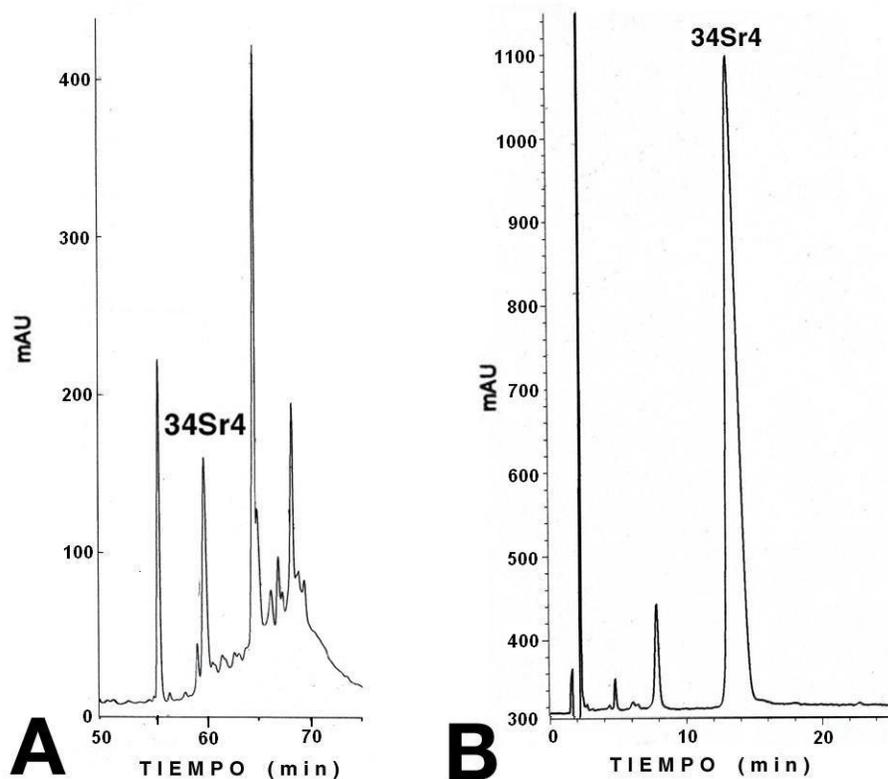


Figura 13. Perfil cromatográfico de la repurificación del péptido 34Sr4

A. primera repurificación; el péptido eluye a los 59.25 min (38.8% B)

B. segunda repurificación del péptido 34Sr4, el péptido eluye a los 13 min (48.25%B₆₀)

Dicho péptido (pico 34Sr4) se repurificó empleando un gradiente de 45-55% de solución B₆₀ (60% de acetonitrilo, 0.1% TFA) en 40 minutos con una columna Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 x 150 mm, diámetro de partícula 5 µm, 80 Å tamaño de poro) y se inyectaron 200 µl. El péptido eluyó en 48.25% de solución B₆₀ (Figura 13B).

Péptido 33Sr3

El pico denominado 33Sr3 se concentró y posteriormente se disolvió en 500 µl de solución B para así poder inyectarlo en el cromatógrafo. Se repurificó con una columna semipreparativa C8 con un asa de 2 ml y un flujo de 2.5 ml por minuto con un gradiente de 23-41% de solución B en 54 minutos con 10 minutos de isocrático. El péptido 33Sr3 eluye a 38.9% de solución B (Figura 14A). Se eligió el pico denominado 33Sr3 debido a que es el más abundante.

Dicho péptido se repurificó con una columna analítica C8 y un asa de 200 µl. El gradiente fue de 50-60% de solución B₆₀ en 40 min. El péptido eluyó en 51.86% de solución B₆₀ (Figura 14B).

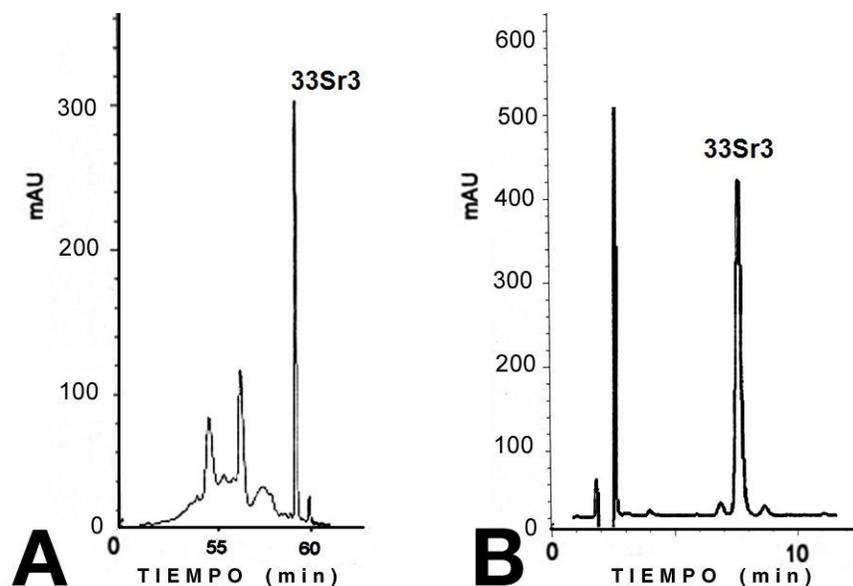


Figura 14. . Perfil cromatográfico de la repurificación del péptido 33Sr3

A. primera repurificación, el péptido eluye a los 58.209 min (38.9%)

B. segunda repurificación del péptido 33Sr3, el péptido eluye a los 7.45 min (51.86% B₆₀)

8.4. Estructura primaria

Péptido 34Sr4

La estructura primaria del péptido fue determinada por secuenciación automática mediante la degradación de Edman. Se secuenció el péptido sin reducir ni alquilar. Los resultados se muestran en la Figura 15.

γ : gamma-carboxiglutamato

G P M γ D P L γ I I R ϵ ?

Figura 15. Secuencia primaria del péptido 34Sr4

Como se puede observar es un péptido pequeño de aparentemente 11 aminoácidos. Sin embargo, cabe señalar que mediante el análisis de espectrometría de masas se sabía que la estructura primaria del péptido estaba incompleta (ver pp. 71-72). Fue imposible dilucidar el último aminoácido mediante secuenciación, posiblemente porque éste se encuentra amidado. Debido a esto fue necesario emplear otra técnica para conocer la identidad de este último residuo. Se decidió emplear la técnica Bidlingmeyer (1986) de composición de aminoácidos ya que es un método eficiente.

En primera instancia, se hidrolizaron por 24 horas 500 pmol de este péptido seguido de la derivatización y la separación mediante HPLC-RP. Los resultados de este estudio confirmaron la secuencia pero sin el último residuo (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de aminoácidos del péptido 34Sr4.
Determinado por derivatización precolumna con PITC

RESIDUO	AREA 34Sr4	PMOL 34Sr4	NÚMERO AA/MOLÉC	RESIDUO	SECUENCIA
D	33032.5	45.06	0.90	D	1
E	55938.5	100.43	2.01	E	2
S	0	0.00	0.00	S	0
G	30840	45.36	0.91	G	1
H	0	0.00	0.00	H	0
R	31932.5	49.93	1.00	R	1
T	0	0.00	0.00	T	0
A	0	0.00	0.00	A	0
P	71703	85.13	1.70	P	2
Y	0	0.00	0.00	Y	0
V	0	0.00	0.00	V	0
M	20278	30.29	0.61	M	1
CO3	0	0	0	C-C	0
I	58564.5	76.62	1.53	I	2
L	34024	43.31	0.87	L	1
F	0	0.00	0.00	F	0
K	0	0.00	0.00	K	0

Como se aprecia en la Tabla 3, únicamente aparecen 11 aminoácidos y por lo tanto la estructura primaria es incompleta. Sin embargo la técnica es lo suficientemente confiable ya que no aparecen otros aminoácidos ni contaminantes; además los valores obtenidos experimentalmente (NÚMERO AA/MOLÉC) concuerdan con los valores conocidos (SECUENCIA). Cabe señalar que con este análisis los gamma-carboxiglutamatos se identifican como ácido glutámico (E) y que la metionina (M) presenta pérdidas debidas a la hidrólisis y por lo tanto los valores para este aminoácido serán inferiores a los esperados.

Se creía que el residuo faltante pudiera ser isoleucina (I) ya que no aparecen otros aminoácidos y la secuencia obtenida hasta ahora indica que se encuentran juntas dos isoleucinas (GPMγDPLγIRRX), esto sugiere que la hidrólisis no es lo suficientemente eficaz para romper este enlace y por lo tanto únicamente se alcanzan a distinguir dos isoleucinas, la de la posición 9 ó 10 y la que ocuparía el lugar del último residuo, la posición 12. Es por esto que se decidió realizar una vez más el análisis de aminoácidos pero ahora con una hidrólisis de 72 horas. Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Análisis de aminoácidos del péptido 34Sr4.
Hidrolizado 72 horas determinado por derivatización precolumna con PITC.

RESIDUO	AREA 34Sr4	PMOL 34Sr4	NÚMERO AA/MOLÉC	RESIDUO	SECUENCIA
D	11679	24.06	1.29	D	1
E	22702	40.67	2.19	E	2
S	0	0.00	0.00	S	0
G	14010	22.06	1.19	G	1
H	0	0.00	0.00	H	0
R	12715	18.59	1.00	R	1
T	0	0.00	0.00	T	0
A	0	0.00	0.00	A	0
P	28460	33.20	1.79	P	2
Y	0	0.00	0.00	Y	0
V	0	0.00	0.00	V	0
M	5396	9.15	0.49	M	1
CO3	0	0	0	C-C	0
I	37136	67.11	3.61	I	3
L	13177	21.74	1.17	L	1
F	0	0.00	0.00	F	0
K	0	0.00	0.00	K	0

Los resultados de la hidrólisis por 72 horas resolvieron la identidad del último aminoácido satisfactoriamente, ya que el resultado concuerda con lo esperado y la masa de este pépti-

do ajusta perfectamente (ver pp. 71-72). Por lo tanto la estructura primaria del péptido 34Sr4 es: **GPMγDPLγIIRI**; sin embargo, con estos datos no es posible saber si el extremo carboxilo se encuentra libre o amidado. Desde el punto de vista estructural, este péptido se asemeja a los miembros de la familia de los neuropéptidos endógenos derivados de la RF-NH₂, que define a la familia de los RF-amido péptidos. Su secuencia es parecida a los FRMF-amido péptidos aislados anteriormente del veneno de *C. spurius*; es por eso que se le designó con el nombre de **conorfamida-Sr4***. Los RF-NH₂ péptidos producen hiperactividad en ratones mayores de 14 días.

Péptido 33Sr3

La estructura primaria del péptido fue determinada en primera instancia por secuenciación automática mediante la degradación de Edman. El péptido se secuenció reducido y alquilado para poder observar las Cys como piridileticisteína-PTH encontrándose la siguiente secuencia:

	10	20	30
C L Q F G S T C F L	G D D D I C C S	G E E F Y	¿? ¿? G E G F G T

Figura 16. Secuencia primaria del péptido 33Sr3

Al parecer se trataba de un péptido de 31 residuos pero el patrón de cisteínas aún no se encontraba bien definido al igual que otros aminoácidos, por lo tanto no es posible hablar de la Superfamilia de conotoxinas a la cual pertenece. Debido a que fue imposible identificar algunos aminoácidos, se decidió realizar un corte enzimático con quimotripsina para secuenciar así fragmentos más pequeños y poder conocer con precisión su estructura.

* A las familias de conopéptidos, aquellas con uno o ningún puente disulfuro, se les asigna un nombre formado por la palabra cono más el nombre de la familia que indique su blanco de acción, en este caso RF- amido péptidos, seguido de una o dos letras para indicar la especie.

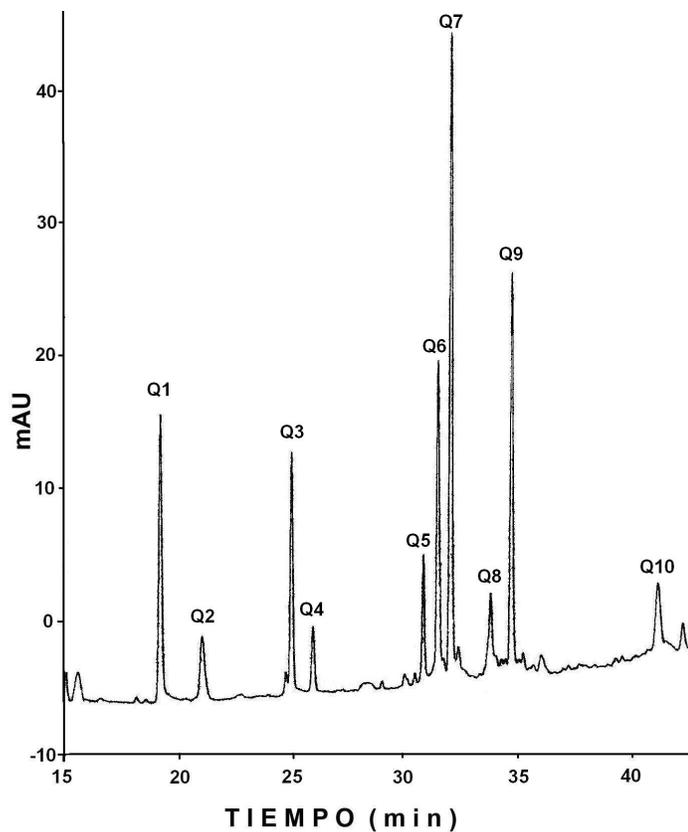


Figura 17. Perfil cromatográfico del corte enzimático del péptido 33Sr3 con quimotripsina. Se obtuvieron diez fragmentos los cuales se secuenciaron.

Péptido completo	CLQFGSTCFLGDDDDICCSGECFYSSGGTFGICS 5 10 15 20 25 30
Fragmentos	(Q7) LGDDDDICCSGECFY SGGTF (Q2) GSTCFL (Q3) GICS (Q1) CLQF (Q6) YSSGGTF (Q4) GSTCFLGDDDDICCSGECF (Q8)

Figura 18. Secuencia de aminoácidos del péptido 33Sr3.

Reducido y alquilado se sometió al corte enzimático con α -quimotripsina, los fragmentos fueron aislados por HPLC-RP y analizados mediante el secuenciador.

Tabla 5. Análisis de aminoácidos del péptido sr7a.
Determinado por derivatización precolumna con PITC.

RESIDUO	AREA SPIIIB'	PMOL SPIIIB'	NÚMERO AA/MOLÉC	RESIDUO	SECUENCIA
D	370643	505.64	2.51	D	3
E	279052	501.02	2.49	E	2
S	391099	959.00	4.76	S	4
G	826168.333	1,215.18	6.03	G	6
H	0	0.00	0.00	H	0
R	0	0.00	0.00	R	0
T	197636.333	360.28	1.79	T	2
A	0	0.00	0.00	A	0
P	0	0.00	0.00	P	0
Y	145127.667	201.54	1.00	Y	1
V	0	0.00	0.00	V	0
M	0	0.00	0.00	M	0
CO3	0	0	0	C-C	6
I	227927	298.20	1.48	I	2
L	319225.667	406.34	2.02	L	2
F	543090.333	714.86	3.55	F	4
K	0	0.00	0.00	K	0

Como se puede apreciar en la Tabla 5, no aparecen otros aminoácidos que no se encuentren en el péptido sr7a y la proporción en la que se encuentran es muy cercana a la que se esperaba. Entonces la estructura primaria confirmada del péptido sr7a es: **CLQFGSTCFLGDDDDICCSGECFYSGGTFGICS** con la que se puede especular que pertenece a la superfamilia O, ya que cuenta con seis cisteínas distribuidas con el siguiente patrón: C-C-CC-C-C, el cual es característico de dicha familia.

8.5. Determinación de las masas moleculares

La estructura de los péptidos fue corroborada por espectrometría de masas. La masa molecular monoisotópica calculada para la secuencia **GPM γ DPL γ IIRI-NH₂** es de 1380.74; obteniéndose para la misma mediante espectrometría de masas (Figura 20) un valor de 1380.90 Da, lo cual indica que la estructura del péptido conorfamida-Sr4 (CNF-Sr4) está completa y correcta. El cálculo de la masa teórica se hizo con la suposición de que los dos residuos de gamma-carboxiglutamato (Gla) se encuentran descarboxilados, es decir, se encuentran como glutama-

to; la descarboxilación de los residuos de Gla ocurre en forma casi cuantitativa cuando se utiliza la técnica de MALDI-TOF, como se hizo en este trabajo.

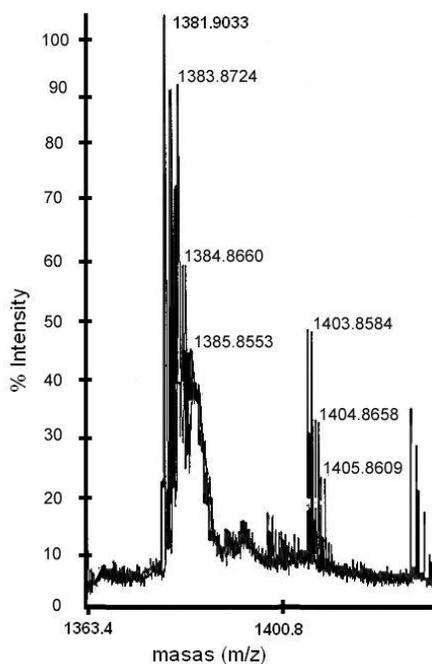


Figura 20. Espectro de masas del péptido conorfamida-Sr4

La masa molecular monoisotópica obtenida experimentalmente para la secuencia CLQFGS... es de 3349.89 Da. En el espectro (Figura 21) se aprecian dos grupos de picos monoisotópicos con una diferencia en masas de ≈ 16 indicando la posible existencia de oxidación en una metionina (aminoácido susceptible a oxidación), hidroxilación en una prolina o microheterogeneidad fenilalanina-tirosina. La secuencia obtenida no contiene ninguno de los dos primeros aminoácidos, por lo que hasta el momento se propone que la molécula con mayor masa molecular (3365.82 Da) es una variante del péptido Sr7a con una sustitución Phe-Tyr en la posición 9 (ver Estructura primaria, *Péptido sr7a*). La masa monoisotópica calculada para la secuencia mostrada en la Figura 19, considerando que el extremo carboxilo está libre, es de 3328.23 Da. La diferencia (21.66 Da) con la masa experimental podría deberse a la presencia mayoritaria de un aducto de sodio (diferencia esperada 21.99 Da).

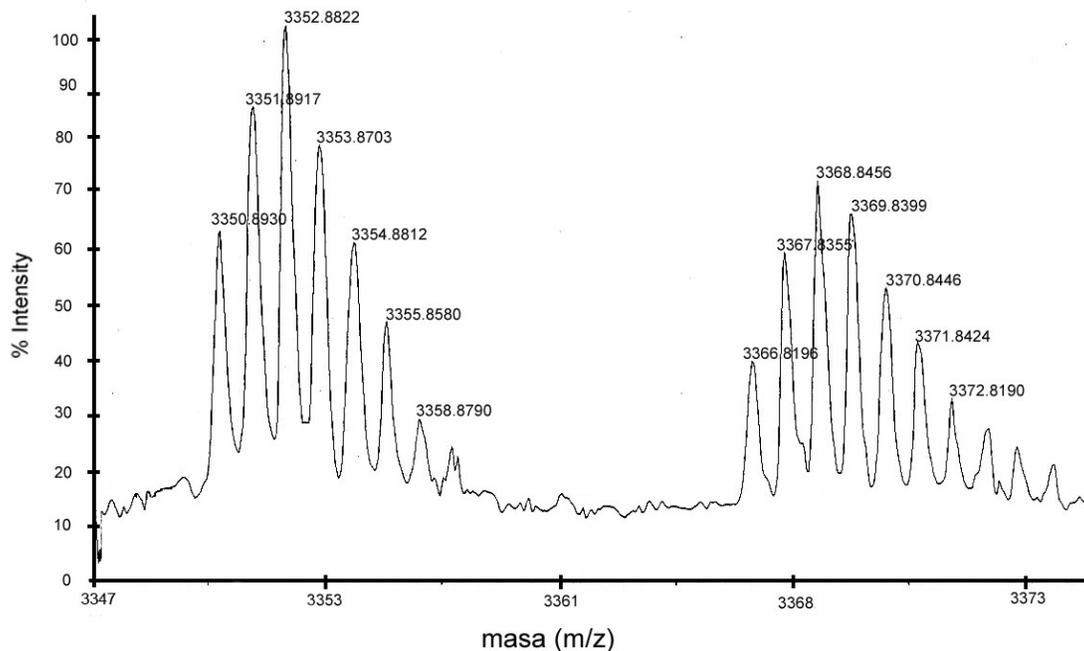


Figura 21. Espectro de masas del péptido sr7a

8.6. Caracterización Biológica

La actividad biológica de los péptidos se determinó mediante bioensayos en ratones, moluscos y peces según se indica en la parte experimental.

Bioensayo en ratón

El bioensayo consistió en la inyección intracerebral de una dosis determinada de los péptidos nativos en ratones de 21 ó 25 días de nacidos. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Los ratones inyectados con 250 y 500 pmol de conorfamida-Sr4 fueron de 21 días de nacidos. Debido a que al duplicar la dosis no se pudo observar un cambio evidente en el comportamiento de los ratones, se realizó una perfusión para poder analizar el sitio de inyección así como un posible daño celular. Los ratones empleados en la dosis de 1000 pmol de conorfamida-Sr4 fueron de 25 días de nacidos. Los síntomas expresados por estos ratones fueron mucho más evidentes que con los ratones inyectados con 250 pmol; es decir, en los ratones de 1000 pmol el clonus de las extremidades duró al menos un minuto mientras que en los ratones de 250 pmol fue tan sólo de algunos segundos. La hiperactividad también se vio enaltecida con la

dosis de 1000 pmol; los ratones brincaban una y otra vez sin importarles golpearse en la cabeza. El análisis histológico indica que la toxina provoca un daño citotóxico unilateral que llega hasta el estriado.

Tabla 6. Actividad biológica de péptidos nativos aislados de *C. spurius* en ratones

PÉPTIDO	DOSIS (pmol)	BIOACTIVIDAD
Conorfamida-Sr4	250 (n=3)	Clonus de los miembros anteriores, seguido de un período de somnolencia y posteriormente hiperactividad
Conorfamida-Sr4	500 (n=3)	Incremento del rascado y acicalamiento
Conorfamida-Sr4	1000 (n=3)	Clonus de los miembros anteriores, masticación, periodo de inactividad y posteriormente hiperactividad
sr7a	250 (n=3)	Síndrome hiperactivo

Los ratones inyectados con 250 pmol de sr7a fueron de 21 días de nacidos. La hiperactividad presentada se caracterizó por un deambular continuo alrededor de la jaula, trepar con las 4 patas por el techo de la jaula y, si se les quitaba el techo, brincaban para intentar salir, acicalamiento muy frecuente y apresurado, de manera compulsiva. Nunca estuvieron inmóviles como suelen hacerlo los ratones normales y los controles.

El síndrome hiperactivo está caracterizado por el movimiento rápido y constante del ratón alrededor del interior de la jaula, siempre en la misma dirección, y deteniéndose brevemente en las esquinas para intentar asomarse al borde de la caja; por la tanto se puede decir que el péptido sr7a causa hiperactividad en ratones.

Bioensayo en caracoles *Pomacea paludosa*

El bioensayo consistió en la inyección intramuscular en el pie del caracol de una dosis determinada de los péptidos nativos a caracoles de 12.8 a 15.5 g. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Actividad biológica de los péptidos nativos aislados de *C. spurius* en caracoles

PÉPTIDO	DOSIS (pmol)	BIOACTIVIDAD
CNF-Sr4	250	Síndrome de hiperactividad, posterior recuperación
sr7a	250	Parálisis (inactividad)

Los caracoles inyectados con solución salina no se vieron afectados en ningún momento por la inserción de la aguja (Figura 22), ni tampoco presentaron algún cambio en su comportamiento; éstos continuaron pegados al vidrio de la pecera sin moverse durante todo el tiempo de la observación. En cambio, los caracoles inyectados con 250 pmol de conorfamida-Sr4 comenzaron a desplazarse activamente por toda la pecera en el momento de la inyección; minutos después (≈ 20), se quedaron inmóviles pegados al vidrio —en señal de recuperación— hasta el término de la observación.

Uno de ellos, el de menor peso corporal, a los 5 minutos realizó movimientos peristálticos de cabeza (hacia arriba y hacia abajo) durante 10 segundos y al mismo tiempo extendía su sifón moviéndolo de un lado a otro, lo que indica, probablemente, que el caracol experimentaba problemas para respirar.

Los caracoles inyectados con 250 pmol de péptido sr7a presentaron cambios en su comportamiento. Al momento de la inyección, se retrajeron en su concha ocasionando que se cayeran al fondo de la pecera donde permanecieron inmóviles por al menos 30 minutos, siendo incapaces de cerrar su opérculo por completo. Reaccionaban con lentitud a los estímulos táctiles.



Figura 22. Fotografía mostrando el método de inyección para el bioensayo en caracol

Bioensayo en lapas *Patella opea*

Las lapas fueron inyectadas en la parte posterior del pie con dos distintas dosis de cada péptido; una de 50 pmol y la otra de 250 pmol

Las lapas inyectadas con 50 pmol de CNF-Sr4 perdieron fuerza de adhesión, no se sujetaron con la misma fuerza a la superficie ni reaccionaron al tacto, como las controles que al ser tocadas en el pie contrajeron éste (Figura 23). Al parecer presentaron parálisis.

La dosis de 250 pmol de CNF-Sr4 presentó efectos más evidentes. Las lapas al ser inyectadas se quedaron completamente inmóviles, no reaccionaron ante ningún estímulo, no se adhirieron a la superficie y no contrajeron el pie. Se trata evidentemente de una parálisis.

El péptido sr7a no produjo ningún cambio en las lapas. Se probaron dosis de 50 pmol y dosis de 250 pmol. Aparentemente, este péptido no tiene efecto en ellas, al menos en las dosis probadas.

Tabla 8. Actividad biológica de los péptidos nativos aislados de *C. spurius* en lapas

PÉPTIDO	DOSIS (pmol)	BIOACTIVIDAD
CNF-Sr4	50	Perdieron fuerza de adhesión y no reaccionaban al tacto
CNF-Sr4	250	Parálisis
sr7a	50-250	Sin efecto

Cabe señalar que debido al poco tiempo de observación, con este bioensayo únicamente se pueden ver los efectos de una parálisis rápida. Este efecto se debe generalmente a neurotoxinas utilizadas por los animales venenosos para inmovilizar a sus presas rápidamente (Zlot-

kin, 1987). La actividad de otros componentes del veneno, como citolisinas y proteasas (Kreger, 1989) no se puede manifestar en este lapso de tiempo.

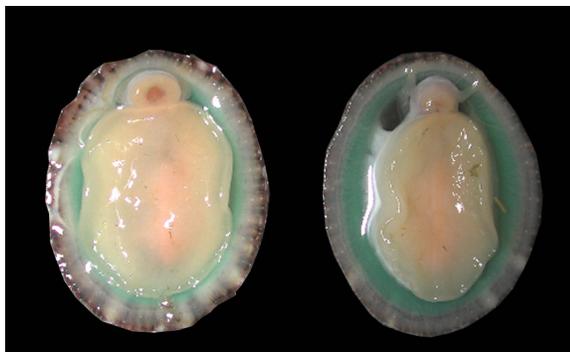


Figura 23. Fotografía mostrando las lapas empleadas en el bioensayo con el péptido CNF-Sr4. Una se encuentra totalmente inmóvil (izquierda) después de ser inyectada con 250 pmol de péptido mientras que la otra reacciona contrayéndose después de ser inyectada con solución salina (control).

Bioensayo en peces *Lebistes reticulatus*

Se utilizaron peces de 200—230 mg de peso que fueron inyectados debajo de la aleta dorsal, en la parte posterior, con dosis de 250 pmol de péptido disueltos en 10 μ l de solución salina. Previamente a la administración de la dosis a los peces, se inyectaron cinco peces controles, de la misma manera en que iban a ser inyectados los peces problema. Los controles no se vieron afectados por el manejo ni por la inyección de solución salina.

Se inyectaron tres peces con 250 pmol de CNF-Sr4 y tres más con 250 pmol de sr7a. Los peces inyectados no presentaron cambio en su comportamiento para ninguno de los dos péptidos; es decir, los péptidos aquí estudiados (CNF-Sr4 y sr7a) no tienen actividad biológica en peces *Lebistes reticulatus*.

Cabe la posibilidad que con dosis mayores de péptido los resultados fuesen los mismos; ya que la bibliografía ha reportado bioensayos en peces con dosis 20 veces mayor a la dosis paralítica media (PD₅₀) en moluscos y no ha habido actividad en peces (Fainzilber *et al.*, 1991).

9. Discusión

La familia Conidae está integrada por moluscos gasterópodos venenosos y contiene uno de los grupos de depredadores más exitosos que existen: los caracoles marinos *Conus* que, de acuerdo a la especificidad de su presa, pueden ser piscívoros, molusquívoros o vermívoros (Kohn y Nybakken, 1975). El estudio del veneno de algunas especies piscívoras de *Conus* demostró que éste se compone de pequeños péptidos neurotóxicos llamados *conotoxinas*, las cuales ostentan una gran selectividad en los receptores de su blanco molecular. Las conotoxinas son péptidos ricos en puentes disulfuro, de 12 a 35 aminoácidos, que tienen su blanco molecular en diferentes subtipos de canales iónicos activados por voltaje o por ligando. El veneno de un *Conus* tiene alrededor de 100 diferentes péptidos biológicamente activos.

La investigación toxinológica en *Conus* se ha basado mayoritariamente en el estudio de especies piscívoras; en cambio, el veneno de los *Conus* vermívoros y molusquívoros no se ha estudiado tan intensamente, probablemente debido a la baja actividad que presentan en vertebrados (Endean y Rudkin, 1963, 1965) y a la falta de bioensayos apropiados para invertebrados (Gray *et al.*, 1988). Las conotoxinas en el veneno pueden relacionarse con parámetros ecológicos y de comportamiento; es por eso que se encuentran bajo presión selectiva, es decir, deben evolucionar para conseguir una alta afinidad hacia el blanco fisiológico. Cuando se prueba en otros phyla de animales, a pesar de contar con blancos aparentemente homólogos, la afinidad decrece significativamente (Olivera, 2002).

Las neurotoxinas son herramientas poderosas en la investigación del sistema nervioso. Un ejemplo clásico de este trabajo es el de la tetrodotoxina, el cual provee evidencia experimental crítica del bloqueo de canales de sodio activados por voltaje ya que se inhibe la propagación de los potenciales de acción en el músculo. En la actualidad, muchos agentes farmacológicos novedosos, de gran interés potencial para los neurocientíficos, se han caracterizado a partir del veneno de reptiles, arañas, escorpiones, anémonas marinas y caracoles cónicos, generalmente para elucidar la interrelación entre estructura y función de sus blancos.

El estudio del veneno de los *Conus* ha impactado a la farmacología, ya que presentan una gran diversidad estructural y funcional de toxinas; y debido a su pequeño tamaño, su síntesis es relativamente fácil. A pesar que los caracoles cónicos emplean terapia combinatoria de drogas como estrategia para envenenar a la presa, los componentes individuales del veneno

han mostrado tener potencial terapéutico y algunos de ellos han alcanzado las fases de pruebas clínicas en humanos. De hecho, la ω -conotoxina MVIIA, de *C. magus*, fue aprobada a finales del 2004 para el tratamiento del dolor crónico, con el nombre comercial de Prialt™.

El estudio del veneno de los *Conus* se encuentra dirigido por consideraciones ecológicas. Se sugiere que la especificidad en su presa se encuentra relacionada con una selectividad complementaria de los componentes relevantes de sus venenos, como se ha demostrado con las toxinas derivadas de artrópodos y gusanos nemertinos (Zlotkin, 1987; Kem, 1988). Por ejemplo, la ω -conotoxina-GVIA aislada de la especie piscívora *C. geographus* no es activa en sistemas invertebrados (McCleskey *et al.*, 1987) y puede distinguir entre diferentes grupos de vertebrados (Gray *et al.*, 1988). Además, la hipótesis de la especificidad en grupos de animales se encuentra soportada por trabajos anteriores con el veneno crudo de Conidae (Endean y Rudkin, 1963, 1965).

Entender el efecto en el comportamiento de los péptidos de *Conus* requiere una perspectiva integral. La especificidad molecular de los péptidos de *Conus* sugiere que la aplicación de un péptido específico de *Conus* en el CNS llevará a una perturbación selectiva de algunos circuitos. El efecto de las toxinas puede distinguirse usando técnicas de electrofisiología y además, se debe identificar el blanco a nivel molecular.

En este trabajo se realizó el aislamiento, purificación y caracterización química y biológica de dos péptidos del veneno del caracol vermívoro *Conus spurius*.

9.1. Conorfamida-Sr4 (péptido 34Sr4)

La estructura primaria de uno de los componentes del veneno de la especie *C. spurius*, inicialmente denominado **34Sr4**, fue determinada mediante secuenciación química, composición de aminoácidos y espectrometría de masas, siendo ésta **GPM γ DPL γ IIRI-NH₂**.

Al comparar la secuencia del extremo amino (GPM) con otros péptidos obtenidos anteriormente del veneno de *C. spurius* (Maillo-Peñalver, 2001) (Tabla 9), se infiere que este péptido pudiera tratarse de una conorfamida; es más, el último residuo de este péptido también se encuentra amidado. Por lo tanto, se puede proponer con seguridad que este péptido corresponde a la familia de los RF-amido péptidos.

Tabla 9. Conorfamidas encontradas anteriormente en el veneno de *C. spurius*

Conorfamida	Secuencia
Conorfamida-Sr1	GPMGWVPVFYRF-NH ₂
Conorfamida-Sr2	GPM γ PPDFIRY-NH ₂
Conorfamida-Sr3	ZVIIVPVAGGTLFRY-NH ₂

γ , gamma-carboxiglutamato

Actualmente la familia de neuropéptidos más ampliamente distribuida y más diversa es la del tipo FMRF-amido péptidos. Se piensa que los FMRF-amido péptidos se encuentran presentes en todos los animales (Greenberg y Price, 1992) y se les ha atribuido funciones de transmisión o señalamiento en invertebrados. Los FMRF-amido péptidos tienen secuencias similares al péptido tipo, Phe-Met-Arg-Phe-NH₂, el cual se descubrió por primera vez en 1977, en el extracto del sistema ganglionar de la almeja *Microcallista nimbosa* y se determinó que era capaz de aumentar y prolongar las contracciones del corazón y otros músculos en la especie (Price y Greenberg, 1977). Estudios posteriores determinaron que este péptido se encontraba presente en una gran variedad de especies de moluscos, anélidos y nemátodos, y que en todas ellas tenía efectos cardioexcitatorios.

Sin embargo, con el estudio de los FMRF-amido péptidos se descubrió que la secuencia tipo (FMRF) puede tener ciertas variaciones pero conservando generalmente los últimos dos residuos, por lo tanto se denominó a esta familia los RF-amido péptidos. La familia de los RF-amido péptidos es un grupo de péptidos que comparten en la secuencia del carboxilo terminal Arg-Phe-amida y son neuromoduladores (Walker *et al.*, 1993). Estos péptidos se encuentran distribuidos entre los metazoos y notablemente en anélidos.

Las conorfamidas representan el tercer grupo de péptidos homólogos a familias de neuropéptidos, presente en venenos de *Conus*. El primero de ellos fue aislado del veneno de *C. geographus* (Cruz *et al.*, 1987), la conopresina-G, la cual es agonista del receptor de vasopresina. Su actividad biológica es muy similar a la provocada por las hormonas neurohipofisarias vasopresina y oxitocina de vertebrados. Posteriormente se demostró que este péptido es un neuropéptido endógeno de la familia de la vasopresina, presente en una gran variedad de moluscos (Nielsen *et al.*, 1994). La segunda familia de análogos a neuropéptidos endógenos proveniente de especies de *Conus*; la contulakina-G, fue aislada también del veneno de *C. geographus*. Ésta

representa el primer ejemplo conocido de miembros de la familia de las neurotensinas provenientes de una fuente de invertebrados (Craig *et al.*, 1999).

En los ensayos biológicos se pudo observar que el péptido CNF-Sr4 presenta actividad tanto en vertebrados como en invertebrados, concordando con los resultados publicados para la actividad de los RF-amido péptidos. (Greenberg y Price, 1992; Price y Greenberg, 1977). El comportamiento de los ratones inyectados con el péptido CNF-Sr4 es semejante al de ratones inyectados intracranealmente con conorfamida-Sr1, la cual, a su vez, produce los mismos efectos que el péptido cardioactivo FMRF-NH₂, por lo que se pudiera pensar que el péptido 34Sr4 es un análogo a este tipo de neuropéptidos.

La hiperactividad presentada por los caracoles *Pomacea* frente a este péptido no es sorprendente ya que anteriormente Greenberg y Price (1992) demostraron que existen alrededor de 12 diferentes RF-amido péptidos en cada especie de moluscos como, por ejemplo, en otros gasterópodos: caracoles pulmonados y nudibranchios. El péptido CNF-Sr4 parece afectar el sistema cardiovascular en los caracoles *Pomacea* ya que uno de ellos después de ser inyectado mostró el sifón indicativo de que presentaba dificultad al respirar.

Los resultados obtenidos en el bioensayo con lapas (parálisis) apoya la teoría de que se trate de un péptido perteneciente a la familia de los RF-amido péptidos ya que las lapas también pertenecen al phylum de los moluscos y los canales se encuentran bastante conservados entre ellos. En cambio, en peces no se obtuvo respuesta alguna. Posiblemente debido a que el *Conus spurius* es una especie vermívora y por lo tanto no es de esperarse que los componentes de su veneno estén dirigidos a los tipos y subtipos de blancos moleculares presentes en peces. Es decir, el veneno en cada especie de *Conus* ha evolucionado de acuerdo a sus necesidades alimenticias y también podríamos estar hablando de una adaptación de acuerdo al hábitat. El contenido del veneno proporciona un panorama bioquímico de las interacciones bióticas y puede llevar a la especie al triunfo o al fracaso. No se ha encontrado otro miembro de los RF-amido péptidos en otras especies de *Conus*, por lo tanto se sugiere que esta nueva familia de conopéptidos evolucionó en especies de *Conus* pertenecientes a la provincia caribeña y del Atlántico.

En conclusión, pudiera ser que este tipo de péptido esté adaptado para envenenar a la presa, ya que la familia de los RF-amido péptidos tiene un papel importante en la fisiología de la pared muscular de los anélidos y nemátodos (Walker *et al.*, 1993). Sin embargo no se pueden

descartar explicaciones alternativas, como por ejemplo que el *Conus* lo emplee con propósitos endógenos o para defenderse de depredadores y/o para interacciones de competencia.

La presencia de diferentes conorfamidas en el veneno de *C. spurius* apoya la especulación de que esta familia de neuropéptidos cumple funciones específicas en el veneno: las especies piscívoras de *Conus* contienen en su veneno una serie de conotoxinas que interactúan específicamente con la capacidad de movimiento de su presa natural, la especie vermívora *C. spurius* expresa en su veneno una serie de estructuras de RF-amido péptidos que podrían ser capaces de influir en el movimiento y la supervivencia de sus presas, depredadores o posibles competidores.

Si el CNF-Sr4 se tratara de un péptido de la familia de los RF-amido péptidos, la actividad de este péptido en el SNC de mamíferos puede ser una herramienta neurológica para entender el papel de los RF-amido péptidos en estos sistemas y sería la cuarta conorfamida aislada del veneno de *C. spurius*.

9.2. Péptido sr7a (33Sr3)

Hasta el momento no es posible determinar con seguridad la superfamilia a la cual pertenece este péptido, ya que no se conoce la estructura de su precursor; sin embargo, se cree que pudiera tratarse de un péptido de la superfamilia O, ya que el patrón de cisteínas (C-C-CC-C-C) obtenido para este péptido presenta una alta similitud con esta superfamilia y no existe otro patrón similar en conotoxinas. Dentro de la superfamilia O se encuentran las familias dirigidas hacia canales iónicos activados por voltaje: las δ - y μ O-conotoxinas afectan canales de Na^+ , las κ -conotoxinas bloquean canales de K^+ , las ω -conotoxinas bloquean canales de Ca^{2+} y las γ -conotoxinas que actúan en canales de sodio que se activan a voltaje hiperpolarizante (HCN_1).

Al comparar la secuencia de aminoácidos obtenida para este péptido con las conotoxinas reportadas para la superfamilia O, se puede especular sobre la familia a la cual pudiera pertenecer el péptido sr7a. Sin embargo, también es necesario conocer el blanco farmacológico. Hasta ahora, sólo se han reportado tres μ O-conotoxinas y una κ -conotoxina. En cambio, se han reportado muchas δ -conotoxinas de especies piscívoras y molusquívoras y una gran variedad de ω -conotoxinas. Hasta ahora, sólo se han reportado cinco conotoxinas de especies ver-

mívoras perteneciente a la superfamilia O (Abogadie *et al.*, 1990; Aguilar *et al.*, 2005; Zugasti-Cruz *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2006).

Las dos μ O-conotoxinas aisladas de la especie molusquívora *Conus marmoreus* presentan 31 aminoácidos, son péptidos inusualmente hidrofóbicos y se encuentran estrechamente relacionados entre sí, es decir, su estructura primaria es casi idéntica, sólo difiere en 3 residuos. Al compararlas con el péptido sr7a se aprecia claramente que son muy diferentes (Tabla 10). El péptido sr7a no contiene tantos residuos hidrofóbicos (31% de residuos hidrofóbicos) como las μ O-conotoxinas (54% de residuos hidrofóbicos) y al parecer tampoco comparten el mismo blanco farmacológico, ya que las μ O-conotoxinas al bloquear el canal de sodio activado por voltaje impiden la transmisión de señales a través de nervios y membranas musculares imposibilitando que se lleve a cabo el potencial de acción; en cambio, el péptido sr7a produce hiperactividad lo cual se debe a un exceso de potenciales de acción. Al parecer, estas tres conotoxinas sólo comparten el mismo patrón de cisteínas y por lo tanto se puede decir que el péptido sr7a no pertenece a esta familia de conotoxinas.

Existe otra μ O-conotoxina aislada de la especie piscívora *C. geographus* (Yanagawa *et al.*, 1988) la cual presenta alguna similitud con el péptido sr7a, sin embargo, se podría decir que esto no es suficiente para clasificarla dentro de esta familia ya que, al igual que las otras dos μ O-conotoxinas, tampoco comparte los mismo efectos farmacológicos.

Tabla 10. Comparación entre el péptido sr7a y μ O-conotoxinas reportadas hasta el momento. Las conotoxinas se encuentran alineadas con base en el patrón de Cys.

Especie <i>Conus</i>	Péptido	S e c u e n c i a	
<i>C. spurius</i>	sr7a	C L Q F G S T C F L G D D D I	C C S G E C F Y S G G T F G I C S
<i>C. marmoreus</i>	μ O-MrVIA	A C R K K W E Y C I V P I I G F I Y C C P G L I C G P F V	C V
<i>C. marmoreus</i>	μ O-MrVIB	A C S K K W E Y C I V P I L G F V Y C C P G L I C G P F V	C V
<i>C. geographus</i>	μ O-GS	A C S G R G S R C P P Q	C C M G L R C G R G N P Q K C I G A H E D

Residuos hidrofóbicos: G, A, V, L, I y P.

Las μ O-conotoxinas y las δ -conotoxinas presentan algunas características similares. Las δ -conotoxinas aisladas de especies molusquívoras y piscívoras de *Conus* también contienen muchos residuos hidrofóbicos y actúan en los canales de sodio, sólo que éstas inhiben la desactivación rápida del canal de sodio, lo cual regula los potenciales de acción, llevando a un estado hiperexcitado. Los efectos observables de las δ -conotoxinas dependen del sistema de estudio. Por ejemplo, la δ -TxVIA-conotoxina, aislada de la especie molusquívora *C. textile*, en vertebr-

dos se une a canales de sodio sin ningún efecto tóxico y en membranas neuronales de moluscos prolonga la corriente de sodio. En cambio, el péptido δ -PVIA aislado de la especie piscívora *C. purpurascens* (Shon *et al.*, 1995) provoca síntomas excitatorios en ratones y en peces pero es inactivo en moluscos, aun en dosis 100 veces mayores. El péptido sr7a provoca síndrome hiperactivo en ratones y parálisis en caracoles *Pomacea* pero no tiene efecto en lapas ni en peces.

Cabe mencionar que las dos δ -conotoxinas aisladas de *C. textile*, molusquívoro, únicamente son activas en lapas, induciendo parálisis. No muestran actividad en insectos, crustáceos y peces. En los bioensayos intracerebrales en ratas no se apreció ningún efecto tóxico a pesar de las altas dosis empleadas (Fainzilber *et al.*, 1991). Esto podría demostrar la especificidad de las conotoxinas en grupos de animales la cual pudiera estar relacionada con los hábitos alimenticios de los *Conus*. Mas no se debería intentar explicar la complejidad farmacológica del veneno de los *Conus* sólo en términos de la simple especificidad estratégica presa-parálisis.

No hay publicaciones que describan la presa del *C. spurius*; sin embargo Lowell Thomas ha visto un cono de esta especie comiendo gusanos nemertinos (Songdahl y Lane; 1970; Songdahl, 1973). A partir de los resultados obtenidos en bioensayos con esta especie, se sugiere que el *C. spurius* toma como presa a los moluscos, si no primariamente, sí ocasionalmente; no se ha visto que el *C. spurius* se alimente de moluscos pero sí los mata. Además, la estructura de sus dientes tiene las características apropiadas de un molusquívoro lo cual no los excluye de ser también vermívoros.

Al comparar estructuralmente al péptido sr7a con las δ -conotoxinas (Tabla 11) se puede apreciar que presentan los mismos residuos en algunas posiciones, pero las δ -conotoxinas son un poco más cortas que el péptido sr7a y además estas conotoxinas no comienzan su secuencia con la cisteína. Es interesante que estas δ -conotoxinas compartan la lisina y la glicina en la misma posición que muchas ω -conotoxinas; sólo que las δ -conotoxinas son, en general, de naturaleza ácida (cargas netas negativas) mientras que las ω -conotoxinas presentan muchos residuos básicos así como prolina en su estructura primaria. El péptido sr7a contiene una gran cantidad de residuos ácidos y presenta la G-5 que comparten tanto las δ -conotoxinas y las ω -conotoxinas. Por lo tanto, no se encuentra excluido de ninguna de las dos familias de conotoxinas.

Tabla 11. Comparación entre el péptido sr7a y algunas δ -conotoxinas. Las conotoxinas se encuentran alineadas con base en el patrón de Cys

Especie <i>Conus</i>	Péptido	S e c u e n c i a																																
<i>C. spurius</i>	sr7a	C	L	Q	F	G	S	T	C	F	L	G	D	D	D	I	C	C	S	G	E	C	F	Y	S	G	G	T	F	G	I	C	S	-4
<i>C. textile</i>	δ -TxVIA	W	C	K	Q	S	G	E	M	C	N	L	L	D	Q	N	C	C	D	G	Y	C	I	V	L	V	C	T	-2					
<i>C. textile</i>	δ -TxVIB	W	C	K	Q	S	G	E	M	C	N	V	L	D	Q	N	C	C	D	G	Y	C	I	V	F	V	C	T	-2					
<i>C. purpurascens</i>	δ -PVIA	E	A	C	Y	A	O	G	T	F	C	G	I	K	O	G	L	C	C	S	E	F	C	L	P	G	V	C	F	G	-1			
	δ -NgVIA	S	K	C	F	S	O	G	T	F	C	G	I	K	O	G	L	C	C	S	V	R	C	F	S	L	F	C	I	S	F	E	+2	
	δ -Am2766	C	K	Q	A	G	E	S	C	D	I	F	S	Q	N	C	C	V	G	T	C	A	F	I	C	I	E	-1						
<i>C. gloriamaris</i>	δ -GmVIA	W	K	P	C	R	K	E	G	Q	L	C	D	P	I	F	Q	N	C	C	R	G	W	N	C	V	L	F	C	V	+3			
<i>C. striatus</i>	δ -SVIE	D	G	C	S	S	G	G	T	F	C	G	I	H	O	G	L	C	C	S	E	F	C	F	L	W	C	I	T	F	I	D	-3	

O, trans-4-hidroxiprolina

La única κ -conotoxina que se conoce hasta el momento es la κ -conotoxina PVIIA aislada de la especie piscívora *C. purpurascens*, la cual bloquea canales de K^+ activados por voltaje (Shon *et al.*, 1998). La inyección de este péptido en ratones conduce a un estado excitado; sin embargo, no se ha identificado aún el canal de K^+ de mamífero en donde se vea la actividad específica de esta conotoxina. La estructura primaria de la κ -conotoxina PVIIA no presenta mucha similitud con el péptido sr7a; aunque comparten algunos aminoácidos en la misma posición (Tabla 12). Presentan el mismo patrón de cisteínas pero los residuos intercisteínas son muy diferentes entre sí; sin embargo el péptido sr7a al ser inyectado en ratones produce el mismo efecto que la κ -conotoxina PVIIA, es decir, provoca un síndrome de hiperactividad. La κ -conotoxina produce hiperactividad ya que al bloquear el canal de potasio impide que se regrese al estado de reposo. Cabe señalar que tanto el péptido sr7a y la κ -conotoxina comparten la fenilalanina-9, la cual es importante para interacciones hidrofóbicas del péptido con el canal de K^+ (Terlau y Olivera, 2004). Estas evidencias podrían sugerir que el péptido sr7a fuese una κ -conotoxina.

Tabla 12. Comparación entre el péptido sr7a y la κ -conotoxina.

Especie <i>Conus</i>	Péptido	S e c u e n c i a																															
<i>C. spurius</i>	sr7a	C	L	Q	F	G	S	T	C	F	L	G	D	D	D	I	C	C	S	G	E	C	F	Y	S	G	G	T	F	G	I	C	S
<i>C. purpurascens</i>	κ -PVIIA	C	R	I	O	N	Q	K	C	F	Q	H	L	D	D	C	C	S	R	K	C	N	R	F	N	K	C	V					

O, trans-4-hidroxiprolina

En la actualidad, se han identificado una gran variedad de ω -conotoxinas de especies piscívoras de *Conus*; sin embargo parecería apropiado que las especies molusquívoras y vermívoras desarrollasen péptidos que actúen en canales de calcio activados por voltaje.

El veneno de los *Conus* piscívoros que se ha estudiado presenta múltiples ω -conotoxinas con diferencias en la secuencia de aminoácidos. Todas actúan en los canales de Ca^{2+} pero en diferentes subtipos (L, N, P, Q, R y T). Una característica de las ω -conotoxinas es la gran cantidad de aminoácidos básicos que contiene [His (H), Lys (K), Arg (R)], los cuales juegan un papel importante en la inhibición de canales de calcio; las ω -conotoxinas se encuentran amidadas y presentan residuos hidroxilados [Ser (S), Thr (T), Tyr, (Y)]. Además de las cargas positivas proporcionadas por los residuos básicos, se sabe que la tirosina-13 es importante para la unión con el canal de calcio (Terlau y Olivera, 2004). Sin embargo, las ω -conotoxinas son extremadamente diversas. El patrón de cisteínas se conserva en todas las ω -conotoxinas reportadas pero más de 4/5 de los residuos diferentes a cisteínas difieren entre ellas. Aparte de los seis residuos de cisteína, sólo se ha encontrado otro residuo absolutamente conservado en todas las ω -conotoxinas: la glicina en la posición cinco (G-5) (Myers *et al.*, 1990).

Tabla 13. Comparación entre el péptido sr7a y algunas ω -conotoxinas.

Especie <i>Conus</i>	Péptido	S e c u e n c i a				
<i>C. spurius</i>	sr7a	C L Q F G S T C F L G D D D I	C C S G E C F Y S G G T F	G	I	C S
	ω -CVID	C K S K G A K C S K L M Y D	C C T G S C S G T V G T			C *
	ω -CnTVIIIA	C K G G A O C T R L M Y D	C C H G S C S S S K G R			C
<i>C. geographus</i>	ω -GVIA	C K S O G S S C S O T S Y N	C C R S C N O Y T R			C Y*
<i>C. geographus</i>	ω -GVIB	C K S P G S S C S P T S Y N	C C R S C N P Y T K R R			C Y G
<i>C. geographus</i>	ω -GVIC	C K S P G S S C S P T S Y N	C C R S C N P Y T K R			C
<i>C. geographus</i>	ω -GVIIA	C K S P G T P C S R G M R D	C C T S C L L Y S N K			C R R Y
<i>C. geographus</i>	ω -GVIIIB	C K S P G T P C S R G M R D	C C T S C L S Y S N K			C R R Y
<i>C. magus</i>	ω -MVIIA	C K G K G A K C S R L M Y D	C C T G S C R S G K			C *
<i>C. magus</i>	ω -MVIIIB	C K G K G A S C H R T S Y D	C C T G S C N R G K			C
<i>C. magus</i>	ω -MVIIIC	C K G K G A P C R K T M Y D	C C S G S C G R R G K			C *
<i>C. magus</i>	ω -MVIIID	T R C Q G R G A S C R K T M Y N	C C S G S C N R G R			C G
<i>C. pennaceus</i>	ω -PnVIA	G C L E V D Y F C G I P F A N N G L	C C S G N C V F V			C T P Q
<i>C. pennaceus</i>	ω - PnVIB	DD C E P P G N F C G M I K I G P P	C C S G W C F F A			C A

O, trans-4-hidroxiprolina; * extremo COOH-amidado

La estructura primaria del péptido sr7a no presenta ningún residuo básico y además se encuentra cargado negativamente debido a la presencia de ácido aspártico (D) en su secuencia; además no presenta tirosina en la posición 13 pero sí glicina en la posición 5, característica de muchas ω -conotoxinas. También contiene en su secuencia varios residuos hidroxilados y comparte junto con otras ω -conotoxinas (Tabla 13) algunos residuos en la misma posición.

Al comparar los efectos del péptido sr7a con los efectos de las ω -conotoxinas no se puede llegar a ninguna conclusión contundente, ya que las ω -conotoxinas actúan en canales de calcio, los cuales son responsables de los sistemas de control y además tiene efecto en el potencial de membrana celular produciendo así muchos efectos en el sistema de prueba.

A la fecha se conocen cuatro γ -conotoxinas: dos de especies molusquívoras (*C. pennacens* y *C. textile*) y dos de especies vermívoras (*C. delessertii* y *C. austini*) y al compararlas con el péptido sr7a (Tabla 14) se puede apreciar que difieren bastante estructuralmente hablando: el péptido sr7a no contiene residuos de γ -carboxiglutamatos (Gla) en su estructura; sin embargo comparte la secuencia CCS y un número variable de residuos con el resto de las γ -conotoxinas. Difiere menos de las posibles γ -conotoxinas de especies vermívoras (de7a y as7a) que de las γ -conotoxinas de especies molusquívoras (TxVIIIA y γ -PnVIIIA). De hecho, estas últimas, además de compartir el motivo γ CCS comparten una serina (S) anterior y la carga neta negativa (-4 y -5). Mientras que las γ -conotoxinas de especies vermívoras son neutras (de7a) o ligeramente cargadas (as7a, -1). El péptido sr7a se encuentra cargado negativamente debido a la presencia de residuos ácidos (3 D y 1 E).

Tabla 14. Comparación entre el péptido sr7a y las γ -conotoxinas. Las conotoxinas se encuentran alineadas con base al patrón de Cys.

Especie <i>Conus</i>	Péptido	S e c u e n c i a		
<i>C. spurius</i>	sr7a	CL QF G S T C F L G D D D I	CCS G E C F Y S G G T F G I	CS
<i>C. pennacens</i>	γ PnVIIIA	D C T S W F G R C T V N S	γ C C S N S C D Q T Y	C γ L Y A F O S
<i>C. textile</i>	TxVIIIA	C G G Y S T Y C γ V D S	γ C C S D N C V R S Y	C T L F
<i>C. delessertii</i>	de7a	A C K O K N N L C A I T γ M A	γ C C S G F C L I Y R	CS*
<i>C. austini</i>	as7a	T C K Q K G E G C S L D V	γ C C S S S C K P G G P L F D F D C	

γ , γ -carboxiglutamato; O, 4-trans-hidroxiprolina

Los efectos biológicos de las γ -conotoxinas reportadas a la fecha son variables (Tabla 15). Las γ -conotoxinas γ -PnVIIIA (Fainzilber *et al.*, 1998) y as7a (Zugasti-Cruz *et al.*, 2006) presentan actividad en caracoles dulciacuícolas —*Lymnaea* y *Pomacea*, respectivamente— mientras que en especies marinas no —lapas *Patella*— (Fainzilber *et al.*, 1998; Zugasti-Cruz, 2005); en

cambio la conotoxina TxVIIA tiene actividad en especies marinas (*Patella* y *Aplysia*) pero no en la dulciacuícola (*Lymnaea*).

El péptido sr7a presenta actividad en caracol dulciacuícola (*Pomacea*) y no presenta actividad en moluscos marinos (lapas *Patella*) ni en peces; sin embargo, produjo hiperactividad en ratón. Comparando al péptido sr7a con la conotoxina as7a encontramos que comparten la actividad biológica respecto al caracol *Pomacea* y ambos son inactivos en la lapa *Patella* y en el pez *Lebistes reticulatus* (Zugasti-Cruz, 2005).

Tabla 15. Efectos biológicos de γ -conotoxinas y el péptido sr7a

Conotoxinas	Molusco Marino (<i>Patella</i>)	Caracol Dulciacuícola (<i>Pomacea</i>)	Pez	Rata	electrofisiología	
					<i>Lymnaea</i> (dulceacuícola)	<i>Aplysia</i> (marino)
sr7a	sin efecto	parálisis	sin efecto	hiperactividad	----	----
γ -PnVIIA	sin efecto	----	sin efecto	sin efecto	desencadena despolarización	----
TxVIIA	parálisis	sin efecto	sin efecto	sin efecto	sin efecto	desencadena despolarización
as7a	sin efecto	parálisis	sin efecto	sin efecto	----	----
de7a	----	----	----	----	----	----

La γ -PnVIIA desencadena la despolarización y dispara los potenciales de acción en las neuronas caudodorsales del caracol dulciacuícola *Lymnaea* (de manera similar como lo hace la TxVIIA en el caracol marino *Aplysia*). Es el prototipo de una nueva clase de γ -conotoxinas que proveerá herramientas para el estudio de los canales marcapaso activados por voltaje (Fainzilber *et al.*, 1998).

La TxVIIA es una conotoxina de 27 aminoácidos con seis cisteínas y dos Gla. Los estudios electrofisiológicos en donde se emplearon neuronas aisladas de *Aplysia* revelaron un efecto excitatorio fuerte de TxVIIA al causar el disparo espontáneo y repetitivo de los potenciales de acción. Además, la bioactividad del péptido se ve reducida después de la descarboxilación parcial de los Gla causada por un tiempo de almacenamiento sugiriendo así un papel funcional de los residuos Gla en la TxVIIA (Fainzilber *et al.*, 1998). La TxVIIA tiene una especificidad muy elevada a moluscos marinos y de hecho, no tiene efecto en otros sistemas neuronales de moluscos dulceacuícolas, como las neuronas caudodorsales de *Lymnaea*.

La selectividad de la TxVIIA y la γ -PnVIIA para receptores de *Aplysia* y *Lymnaea* es intrigante ya que tienen la carga neta negativa (-4 y -5) y comparten algunos residuos en la misma posición. Probablemente esta selectividad se deba a las diferencias en la fuerza iónica y la com-

posición entre los sistemas de prueba, reflejando las diferencias entre su hábitat: marino y de agua dulce, respectivamente.

Las inyecciones de γ -PnVIIA así como las del péptido as7a aplicadas a lapas *Patella* no revelaron la parálisis contráctil observada previamente para TxVIIA. Ninguna de estas γ -conotoxinas tiene actividad sobre roedores ni sobre peces (Fainzilber *et al.*, 1991; Fainzilber *et al.*, 1998; Zugasti-Cruz, 2005; Zugasti-Cruz *et al.*, 2006).

En cuanto a los péptidos de7a (Aguilar *et al.*, 2005) y as7a (Zugasti-Cruz *et al.*, 2006) la propuesta de que podrían ser γ -conotoxinas se basa exclusivamente en el motivo γ CCS, ya que no existen datos electrofisiológicos de ninguno de ellos. Sin embargo, la actividad biológica de as7a (en *Pomacea paludosa*, pero no en lapas, peces ni roedores) sugiere un parecido funcional con las γ -conotoxinas.

Entonces, hasta el momento las γ -conotoxinas tienen diferentes especificidades a nivel de molusco, lo que las hace potencialmente útiles como herramientas para estudiar el sistema nervioso de ciertos moluscos. Las γ -conotoxinas pueden ser una fuente de neurotoxinas específicas para anélidos y moluscos, además de que estos grupos de animales son sistemas modelo importantes en muchos aspectos de la investigación neurobiológica, incluyendo biofísica membranal y transmisión sináptica.

Por último, el péptido sr7a a pesar de tener actividad biológica semejante a la de las γ -conotoxinas, no es claro si pertenece o no a esta familia, ya que no presenta la combinación de residuos γ CCS que hasta el momento ha sido encontrada exclusivamente en este tipo de péptidos de la superfamilia O. Sin embargo, presenta tres residuos ácidos (D) en posiciones cercanas a la ocupada por el γ -carboxiglutamato común a los cuatro péptidos considerados como γ -conotoxinas.

Debido a que el péptido sr7a contiene seis cisteínas en su estructura primaria con el arreglo C-C-CC-C-C, se sugiere que dicho péptido pertenezca a la superfamilia O de conotoxinas ya que el patrón de cisteínas determina la superfamilia genética que codifica al péptido, sin embargo se debe conocer la estructura de su precursor para poder asegurar esto. En cambio, para conocer a la familia a la que pudiera pertenecer el péptido 33Sr3, es necesario saber con exactitud el blanco farmacológico de este péptido ya que las familias se diferencian funcional y

estructuralmente. Como se mencionó con anterioridad el blanco molecular de las toxinas puede distinguirse usando técnicas de electrofisiología.

Este péptido representaría la sexta conotoxina perteneciente a la superfamilia O aislada de un caracol vermívoro y sería la primera conotoxina aislada de la especie *Conus spurius* perteneciente a esta superfamilia.

Los péptidos aislados en este trabajo tienen actividad tanto en vertebrados (ratón) como en moluscos a pesar de que se extrajeron de una especie vermívora. Con esto, es posible especular que el veneno de estos caracoles marinos pueda ser empleado defensivamente ante depredadores y por competencia de espacio. Además, estudios realizados por Anderson y Greenberg (2001) señalan que los receptores del sistema nervioso de los gusanos poliquetos (presa natural del *C. spurius*) y vertebrados se encuentran relativamente conservados. Es interesante que el único péptido que tuvo actividad en lapas fuera la conorfamida putativa (péptido 34Sr4). Esto se debe probablemente a que la familia de los RF-amido péptidos se encuentra ampliamente distribuida en moluscos controlando diversas funciones como de transmisión o señalización en invertebrados (Payza *et al.*, 1989), estimulación o inhibición de las contracciones en el oviducto en langosta (Wang *et al.*, 1995) y la modificación de los patrones generadores de circuitos también en langosta (Dickinson *et al.*, 1990), así como un papel importante en la fisiología de la pared muscular de los anélidos y nemátodos (Walker *et al.*, 1993).

10. Conclusiones

- ✓ Se llevó a cabo el aislamiento, purificación y caracterización química y biológica de dos péptidos del veneno de *Conus spurius*.
- ✓ La conorfamida-Sr4 (34Sr4) presenta similitud estructural con la familia de los RF-amido péptidos. De ser una conorfamida, sería la cuarta conorfamida presente en el veneno de *Conus spurius*.
- ✓ Se sugiere que el péptido sr7a (33Sr3) pertenezca a la superfamilia O de conotoxinas, siendo así la primera conotoxina aislada de la especie *Conus spurius* perteneciente a esta superfamilia.
- ✓ Con base en los bioensayos, se sugiere que la función del veneno en el género *Conus* no sólo sea envenenar a la presa sino que también juega un papel importante en la ecología química de este género.

Literatura citada

1. Abbott, R.T., Dance, S.P. **(1990)** Compendium of Seashells, 4th Edition, Odyssey Publications, California, USA. pp. 267.
2. Abogadie, F.C., Ramilo, C.A., Corpuz, G.P., Cruz, L.J. **(1990)** Biologically active peptides from *Conus quercinus*, a worm-hunting species. *Proc. Natl. Sci. Tech.* (Philippines) 12: 219-232.
3. Aguilar, M.B., López-Vera, E., Imperial, J.S., Falcón, A., Olivera, B.M., Heimer de la Cotera, E.P. **(2005)** Putative γ -conotoxins in vermivorous cone snails: the case of *Conus delessertii*. *Peptides* 26: 23-27.
4. Anderson, P.A., Greenberg, R.M. **(2001)** Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp. Biochem. Physiol. B* 129: 17-28.
5. Barnes, R. D. **(1969)** Zoología de los invertebrados, Segunda edición, Editorial Interamericana, S.A.; México, D.F. pp. 294-331.
6. Bidlingmeyer, A., Cohen, S., Tarwin, T. **(1986)** PITC derivatives in amino acid analysis. *Nature* 320: 769-770.
7. Blunt, J. W., Munro, H.G., Battershill, C.N., Copp, B.R., McCombs, J.D., Perry, N.D., Prinsep, M., Thompson, A.M. **(1990)** From the antarctic to the antipodes; 45° of marine chemistry. *New. J. Chem.*, 14: 761-775.
8. Bouvier, E.L. **(1887)** Système nerveux, morphologie générale et classifications des Gastéropodes Prosobranches. *Annales des Sciences Naturelle (Zoologie)* 7:1-510.
9. Brailowsky, S. **(1999)** Las sustancias de los sueños. Neuropsicofarmacología. Segunda Edición. La ciencia para todos/130. Fondo de cultura económica. México, D.F. 355 p.
10. Carballo, J.L. **(2002)** Los organismos marinos y las moléculas bioactivas. Perspectiva actual. En: Navia, A.J.L. (Ed.) *El mar como fuente de moléculas bioactivas*, Secretariado de publicaciones y medios audiovisuales. Universidad de León, León, España, 233 p.
11. Chen, Z., Rogge, G., Hague, C., Alewood, D., Colless, B., Lewis, R.J., Minneman, K.P. **(2004)** Subtype-selective noncompetitive or competitive inhibition of human alpha1-adrenergic receptors by ρ -TIA. *J Biol Chem.* 279: 35326-35333.

12. Conticello, S.G., Gilad, Y., Avidan, N., Ben-Asher, E., Levy, Z., Fainzilber, M. **(2001)** Mechanisms for evolving hypervariability: The case of conopeptides. *Mol. Biol. Evol.*, 18: 120-131.
13. Craig, A.G., Norberg, T., Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., Low, W., Dykert, J., Richelson, E., Navarro, V., Mazella, J., Watkins, M., Hillyard, D., Imperial, J., Cruz, L.J., Olivera, B.M. **(1999)** Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. *J. Biol. Chem.* 274: 13752-13759.
14. Cruz, L.J., de Santos, V., Zafaralla, G.C., Ramilo, C.A., Zeikus, R. Gray, W.R., Olivera, B.M. **(1987)** Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs. *J. Biol. Chem.* 262: 15821-15824.
15. Cruz, L.J., Gray, W.R., Olivera, B.M., Zeykus, R.D., Kerr, L., Yoshikami, D., Moczydlowski, E., **(1985)** *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J. Biol. Chem.* 260: 9280-9288.
16. Cruz, L.J., Gray, W.R., Olivera, B.M. **(1978)** Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 190: 539-548.
17. Davis, A.R., Targett N.M., McConnell O.J., Young C.M. **(1989)** Epibiosis of marine algae and benthic invertebrates: natural products chemistry and other mechanisms inhibiting settlement and overgrowth. *Bioorg. Mar. Chem.* 3: 86-114.
18. De la Lanza y Espino, Guadalupe **(1991)** Oceanografía de mares mexicanos. AGT Editor, S.A. México, D.F. 569 p.
19. Dickinson, P.S., Meccas C, Marder E. **(1990)** Neuropeptide fusion of two motor-pattern generator circuits. *Nature* 344: 155-158.
20. Drucker, R. **(2005)** Fisiología Médica. Ed. El Manual Moderno. México, D.F. 956 p
21. Endean, R., Parrish, G., Gyr, P. **(1974)** Pharmacology of the venom of *Conus geographus*. *Toxicon* 12: 131-138.
22. Endean, R., Rudkin, C. **(1965)** Further studies of the venoms of Conidae. *Toxicon* 2: 225-249.
23. Endean, R., Rudkin C. **(1963)** Studies of the venoms of Conidae. *Toxicon* 1: 49-64.
24. Engel, S., Pawlik, J.R. **(2000)** Allelopathic activities of sponge extract. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 207: 273-281.

25. England, L.J., Imperial, J., Jacobsen, R., Craig, A.G., Guylas, 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.
26. Fainzilber, M., Zlotkin, E. (1992) A new bioassay reveals mollusc-specific toxicity in molluscivorous *Conus* venoms. *Toxicon* 30: 465-469.
27. Fainzilber, M., Nakamura, T., Lodder, J., Zlotkin, E., Kits, K., Burlingame, A. (1998) γ -Conotoxin-PnVIIA, a γ -carboxyglutamate-containing peptide agonist of neuronal pacemaker cation currents. *Biochemistry* 37: 1470-1477.
28. Fainzilber M., Hasson A., Oren R., Burlingame A.L., Gordon D., Spira M.E., Zlotkin E. (1994) New mollusc-specific α -conotoxins block *Aplysia* neuronal acetylcholine receptors. *Biochemistry* 33: 9523—9529.
29. Fainzilber, M., Gordon, D., Hasson, A., Spira, M.E., Zlotkin, E. (1991) Mollusc-specific toxins from the venom of *Conus textile neovicarius*. *Eur. J. Biochem.* 202: 589-595.
30. Fan, C.X., Chen, X.K., Zhang, C., Wang, L.X., Duan, K.L., He, L.L. Cao, Y., Liu, S.Y., Zhong, M.N., Ulens, C., Tytgat, J, Chen, J.S., Chi, C.W., Zhou, Z. (2003) A novel conotoxin from *Conus betulinus*, κ -BtX, unique in cysteine pattern and in function is a specific BK channel modulator. *J. Biol. Chem.* 278: 12624-12633.
31. Faulkner, D.J. (1992) Biomedical uses for natural marine chemicals. *Oceanus* 35: 29-35.
32. Fenical, W., McConnell, O. (1976) Simple antibiotics from the red seaweed *Dasya pedicellata* var. *stanfordiana*. *Phytochemistry*, 15: 435-436.
33. Fernández, J. (2002) Particularidades en el aislamiento y estudio de los productos naturales de origen marino. En: Navia, A.J.L. (Ed.) *El mar como fuente de moléculas bioactivas*, Secretariado de publicaciones y medios audiovisuales. Universidad de León, León, España, 233 p.
34. Finehout, E.J., Lee, K. H. (2004) Introduction to mass spectrometry applications in biological research: Biochemistry and molecular biology education 32: 93-100.
35. Gad, S.C., Changelis, C.P. (1992) Animal models in toxicology, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, pp. 884.
36. García-Cubas, A., Reguero, M., Jácome, L. (1994) Moluscos arrecifales de Veracruz, México (Guía de Campo); UNAM, México, D.F. pp. 13-30.

37. Garzón, M.J. (1993) The biosynthesis of marine natural products. *Chem. Rev.* 93: 1699-1733.
38. Gray W.R., Olivera B.M., Cruz L.J. (1988) Peptide toxins from venomous *Conus* snails. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 665—700.
39. Green, G. (1977) Antibiosis in marine sponges. *FAO Fisheries Report* 200: 199-205.
40. Green, G., Bakus, G. (1975) Toxicidad en esponjas y holoturias. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología.*, UNAM 2: 61-66.
41. Greenberg, M.J., Price, D.A. (1992) Relationships among the FMRFamide-like peptides. *Prog. Brain Res.* 92, 25-37.
42. Hinegardner, R.T. (1958) The venom apparatus of the cone shell. *Hawaii Med. J.* 17, 533-563.
43. Huysecom, J., van der Vyer, G. (1985) Bioassays on the toxicity of temperate marine sponges. *Third International Conference on the Biology of sponges*, Woods Hole, Massachusetts: 32 (abstract).
44. Imperial, J.S., Watkins, M., Chen, P., Hillyard, D.R., Cruz, L.J., Olivera, B.M. (2003) The augertoxins; biochemical characterization of venom components from the toxoglossate gastropod *Terebra subulata*. *Toxicon* 42: 391-398.
45. Ireland, C.M., Copp, B.R., Foster, M.P., McDonald, L.A., Radisky, D.C., Swersey, J.C. (1993) Biomedical potencial of marine natural products. In: *Marine Biotechnology*, Ataway, D.H. y Zaborsky, O.R. (Eds.), Plenum Press, New York, USA. pp. 1-43.
46. Jiang, H., Xu, C.Q., Wang, C.Z., Fan, C.X, Zhao, T.Y., Chen, J.S., Chi, C.W. (2006) Two novel O-supefamily conotoxins from *Conus vexillum*. *Toxicon* 47: 425-436.
47. Jimenez, E.C., Donevan, S.D., Walker, C., Zhou, L.M., Nielsen, J., Cruz, L.J., Armstrong, H., White, H.S., Olivera, B.M. (2002) Conantokin-L, a new NMDA receptor antagonist: determinants for anticonvulsant potency. *Epilepsy Res.* 51: 73-80.
48. Jimeno, J.M., Faircloth, G., Cameron, L., Meely, K., Vega, E., Gómez, A., Fernández-Sousa Faro, J.M. Rinehart, K. (1996) Progress in the acquisition of new marine-derived anticancer compounds: Development of Ecteinascidin-743 (ET-743). *Drugs of the Future* 21: 1155-1165.
49. Kaufenstein, S., Huys, I., Lamthanh, H., Stocklin, R., Sotto, F., Menez, A., Tytgat, J., Mebs, D. (2003) A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. *Toxicon* 42: 43-52.

50. Kem, W.R. (1988) Handbook of natural toxins. Vol. 3, Marine toxins and venoms. Marcel Dekker, New York, USA. pp. 353-378.
51. Kline, G.F. (1956) Notes on the stinging operation of *Conus*. *The Nautilus* 69: 76-78
52. Kohn, A.J., Nybakken J.W. (1975) Ecology of *Conus* on eastern Indian Ocean fringing reefs: Diversity of species and resource utilization. *Mar. Biol.* 29: 211-234.
53. Kohn, A. J., Saunders, P. R., Wiener, S. (1960) Preliminary studies on the venom of the marine snail *Conus*. *Ann. NY Acad. Sci.* 90: 706-725.
54. Kreger, A.S. (1989) Cytolytic activity in the venom of the marine snail *Conus californicus*. *Toxicon* 27: 56.
55. Lin, C.H., Chen, C.S., Hsu, K.S., King, D.S., Lyu, P.C. (1997) Role of modified glutamic acid in the helical structure of conantokin-T. *FEBS Lett.* 407: 243-248.
56. Lira-Galera I.E., Müdespacher-Ziehl, C., Cifuentes-Lemus, J.L., (1989) Guía ilustrada de animales venenosos de México y el Caribe, Limusa, Editores Noriega, México, D.F. 105 p.
57. Lirazan, M. Hooper, D., Corpuz, G.P., Ramilo, C.A., Brandyopadhyay, P., Cruz, L.J., Olivera, B.M. (2000) The spasmodic peptide defines a new conotoxin superfamily. *Biochemistry* 39: 1583-1588.
58. López-Vera, E., Heimer de la Cotera, E. P., Maillo-Peñalver, M., Riesgo-Escovar, J.R., Olivera, B. B., Aguilar, M.B. (2004) A novel structural class of toxins: the methionine-rich peptides from the venom of turrid marine snails (Mollusca, Conoidea). *Toxicon* 43: 365-374.
59. Maillo-Peñalver, M. A. (2001) Extracción, purificación y caracterización química y biológica de péptidos neuroactivos provenientes de especies de *Conus*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
60. 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.
61. Martínez, J.S., Olivera, B.M., Gray, W.R., Craig, A.G., Groebe, D.R., Abramson, S.N., McIntosh, J.M. (1995) α -conotoxin EI, a new nicotinic acetylcholine receptor antagonist with novel selectivity. *Biochemistry* 34: 14519-14526.
62. Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Ahern, K.G. (1997) *Biochemistry*, Third edition, Addison Wesley Longman, Inc., San Francisco, USA. 1200 p.

63. McCleskey, E.W., Fox, A.P., Feldman, D.H., Cruz, L.J., Olivera, B.M., Tsien, R.W., Yoshikami, D. **(1987)** Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84: 4327-4331.
64. McIntosh, J.M., Olivera, B.M., Cruz, L.J. **(1999)** *Conus* peptides as probes for ion channels. *Methods Enzymol.* 294: 605-624.
65. Minale, L., Cimino, G., de Stefano, S. **(1976)** Natural products from Porifera. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Herz, W., Grisebach y G.W. Kirby (Eds.), Springer-Verlag, New York, USA. pp. 1-72.
66. Munro, M.H., Blunt, J. W., Barns, G., Battershill, C.N., Lake R., Perry, S. **(1989)** Biological activity in New Zealand marine organisms. *Pure Appl. Chem.*, 61: 529-534.
67. Myers R.A., McIntosh J.M., Imperial J., Williams, R.W., Oas T., Haack J.A., Hernandez, J.F., Rivier, J., Cruz, L.J., Olivera, B.M. **(1990)** Peptides from *Conus* venoms which affect Ca²⁺ entry into neurons. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 9: 179—202.
68. Nakamura, T., Yu, Z., Fainzilber, M., Burlingame, A.L. **(1996)** Mass spectrometric-based revision of the structure of a cysteine-rich peptide toxin with γ -carboxyglutamic acid, TxVIA, from the sea snail, *Conus textile*. *Protein Science*: 524-530.
69. Nakamura, H., Kobayashi, J. Ohizumi, Y., Hirata, Y. **(1982)** The occurrence of arachidonic acid in the venos Duch of the marine snail *Conus textile*. *Experientia* 39: 897.
70. Nielsen, D.B., Dykert, J., Rivier, J.E., McIntosh, J.M. **(1994)** Isolation of Lysconopressin-G from the venom of the worm-hunting snail *Conus imperialis*. *Toxicon* 32: 845-848.
71. Norris, J. N., Fenical, W. **(1982)** Chemical defenses in tropical marine algae. In. *Atlantic Barrier Reef. Ecosystem at Carrie Bow Cay, Belize. I.: Structure and communities*. Rützler, K. y I.G. Macintyre (Eds). Smithson. *Contr. Mar. Sci.* 12: 590-626.
72. Norse, E.A. **(1995)** Maintaining the world's marine biological diversity. *Bull. Mar. Sci.* 57: 10-13.
73. Olivera, B.M. **(2002)** *Conus* venom peptides: reflections from the biology of clades and species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33: 25-47.
74. Olivera, B.M. **(1997)** *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years on neuropharmacology. *Mol. Biol. Cell.* 8: 2101-2109.
75. Olivera, B.M., Cruz, L.J. **(2001)** Conotoxins, in retrospect. *Toxicon* 39: 7-14.

76. Olivera, B.M., Cruz, L.J., Yoshikami, D. (1999) Effects of *Conus* peptides on the behavior of mice. *Curr. Op. Neurobiol.* 9: 772-777.
77. 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.
78. Pawlik, J.R. (1993) Marine Invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.* 93: 1911-1922.
79. Payza, K., Greenberg, M.J., Price, D.A. (1989) Further characterization of *Helix* FMRFamide receptors: kinetics, tissue distribution, and interactions with the endogenous heptapeptides. *Peptides* 10: 657-661.
80. Price, D.A., Greenberg, M.J. (1977) Structure of molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* 197: 670-671
81. Proksch, P. (1994) Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon* 32: 639-655.
82. Rezak, R., Edwards, G. (1972) Carbonate sediments of the Gulf of Mexico. *Texas A&M Ocean. Stud.* 3:263-280 En: Oceanografía de mares mexicanos, Guadalupe de la Lanza y Espino, Ed. 1991, AGT Editor, S.A. México, D.F .
83. Rinehart, K.L., (2000) Antitumor compounds from tunicates. *Med. Res. Rev.* 20: 1-27.
84. Rueda, A., Zubía, E., Ortega, M.J., Carballo, J.L., Salvá, J. (1997) New cytotoxic metabolites from the sponge *Cacospongia scalaris*. *J. Org. Chem.* 62: 1481-1485.
85. Salzet, M., Stefano, G.B. (2001) Biochemical evidence for an annelid neuroendocrine system: Evolutionary conserved molecular mechanisms. *Can. J. Zool.* 79: 175-191.
86. Sharpe, I.A., Palant, E., Schroeder, C.I., Kaye, D.M., Adams, D.J., Alewood, P.F., Lewis, R.J. (2003) Inhibition of the norepinephrine transporter by the venom peptide χ -MrIA. Site of action, Na⁺ dependence, and structure-activity relationship. *J Biol Chem.* 278: 40317-40323.
87. Sharpe, I.A., Gehrmann, J., Loughnan, M.L., Thomas, L., Adams, D.A., Atkins, A., Palant, E., Craik, D.J., Adams, D.J., Alewood, P.F., Lewis, R.J. (2001) Two new classes of conopeptides inhibit the α 1-adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nat. Neurosci.* 4: 902-907.
88. Shon, K.J., Stocker, M., Terlau, H., Stuhmer, W., Jacobsen, R., Craig, W., Grilley, M., Hillyard, D.R., Gray, W.R., Olivera, B.M. (1998) ω -Conotoxin PVIIA is a peptide inhibiting the *Shaker* K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 273: 33-38.

89. Shon, K., 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 and cloning of the lockjaw peptide from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry* 34: 4913—4918.
90. Smith, G.T. **(2006)** Pharmacological characterization of ionic currents that regulate high-frequency spontaneous activity of electromotor neurons in the weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J Neurobiol.* 66: 1-18.
91. Songdahl, J. **(1973)** The venom apparatus of the Atlantic cone *Conus spurius*. *Bull. Mar. Sci.* 23: 600-612.
92. Songdahl, J., Lane, C.E. **(1970)** Some pharmacological characteristics of the venom of the alphabet cone, *Conus spurius atlanticus*. *Toxicon* 8: 289-292.
93. Stone, T.W. **(1995)** Neuropharmacology. Biochemical and medicinal chemistry series. W.H. Freeman/Spektrum, New York, USA, pp. 18-19, 52-56.
94. Stryer, L., **(1995)** Bioquímica, Cuarta Edición, Editorial Reverté, S.A., México, D.F. 1096 p.
95. Tarr, G.E., **(1986)** Manual Edman Sequencing System En: JE Shively (Ed.), Methods of Protein Microcharacterization, Humana Press, Clifton NJ, pp. 155-194.
96. Teichert, R.W., Jimenez, E.C., Olivera, B.M. **(2005)** α S-conotoxin RVIIIa: a structurally unique conotoxin that broadly targets nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry*, 44: 7897-7902.
97. Terlau, H., Olivera, B.M. **(2004)** *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* 84: 41-68.
98. Thompson, J.E., Barrow, K.D., Faulkner, D.J. **(1983)** Localization of two brominated metabolites, aerothionin and homoaerothionin, in spherulous cells of the marine sponge *Aphysina fistularis* (=Verongia thiona). *Acta Zoologica* 64: 199-210.
99. Tsukamoto, S., Tane, K., Ohta, T., Matsunaga, S., Fusetani, N., Van Soest, R.W.M. **(2001)** Four new bioactive pyrrole-derived alkaloids from the marine sponge *Axinella brevistyla*. *J. Nat. Prod.* 64: 1576-1578.
100. Walker, R.J., Holden-Dye, L., Franks, C.J. **(1993)** Physiological and pharmacological studies on annelid and nematode body wall muscle. *Comp. Biochem. Physiol. C* 106: 49-58.

101. Wang, Z., Orchard, I., Lange, A.B., Chen, X., Starratt, A.N. **(1995)** A single receptor transduces both inhibitory and stimulatory signals of FMRFamide-related peptides. *Peptides* 16: 1181-1186.
102. Yanagawa, Y., Abe, T., Satake, M., Odani, S., Susuki, J., Ishikawa, K. **(1988)** A novel sodium channel inhibitor from *Conus geographus*: purification, structure, and pharmacological properties. *Biochemistry* 27: 6256-6262.
103. Yoste, R.W., Ettore, L.S., Conlon, R.D. **(1981)** Introducción a la cromatografía líquida práctica, Perkin Elmer, Texas, USA 138 p.
104. Zlotkin, E. **(1987)** Pharmacology of survival: insect selective neurotoxins derived from scorpion venom. *Endeavour* 11: 168-174.
105. Zorn, S., Leipold, E., Hansel, A., Bulaj, 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.* 580: 1360-1364.
106. Zugasti Cruz, A. **(2005)** Caracterización bioquímica y biológica de las toxinas del caracol marino *Conus austini*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México.
107. Zugasti-Cruz, A., Maillo, M., López-Vera, E., Falcón, A., Heimer de la Cotera, E.P., Olivera, B.M., Aguilar, M.B. **(2006)** Amino acid sequence and biological activity of a γ -conotoxin-like peptide from the worm-hunting snail *Conus austini*. *Peptides* 27: 506-511.

Apéndice

HPLC

La cromatografía es la técnica analítica más ampliamente utilizada y también es la técnica más antigua habiéndose utilizado desde 1903. Los métodos cromatográficos son métodos físicos que consisten en pasar una solución (fase móvil) a través de un medio (fase estacionaria) que muestre adsorción selectiva para diferentes componentes en el soluto. La velocidad con la que cualquier componente en la fase móvil atraviesa la columna, depende inversamente de la interacción con la fase estacionaria. La separación se logra gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra. Las moléculas más fuertemente adsorbidas son las últimas en eluir.

La cromatografía es un método lento, es por eso que se inventó la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en donde se emplean presiones de 2000-3000 psi para forzar a la solución (y a la mezcla de componentes que interesa separar) a pasar más rápidamente a través de la columna (Mathews *et al.*, 1997).

En la cromatografía líquida la fase móvil es un líquido. Cuando se dice que es de **fase inversa**, la fase móvil es más polar que la fase estacionaria. En este caso, cuanto más apolar sea la muestra, mayor será su retención. Es posible mantener constante la composición de la fase móvil durante el análisis (operación isocrática) o bien, cambiarla (elución por gradiente). En la elución por gradiente se varía la composición de la fase móvil (Yoste *et al.*, 1981).

Degradación de Edman

Una vez conseguido el péptido puro es posible averiguar su secuencia de aminoácidos, es decir, su estructura primaria. La determinación de la estructura primaria de una proteína se conoce comúnmente como *secuenciación*. Pehr Edman diseñó un método para el marcado del residuo amino-terminal y su eliminación, sin destruir los enlaces peptídicos entre los otros aminoácidos. La degradación de Edman separa del extremo amino del péptido un residuo de aminoácido en cada ciclo operativo en forma secuencial, involucrando una serie de reacciones: el *fenilisotiocianato* reacciona con el grupo amino-terminal no cargado del péptido para formar un derivado de *feniltiocarbamato*. Mediante un ácido fuerte anhídrico se libera un derivado cíclico del aminoácido terminal, dejando intacto el péptido acortado en un aminoácido. El compuesto

cíclico es una *feniltiohidantoína (PTH)* del aminoácido. Ahora, se puede repetir toda la serie de reacciones y se puede determinar el segundo residuo y así sucesivamente.

Este procedimiento se ha automatizado con la creación de secuenciadores. En un secuenciador de fase líquida se coloca una delgada película de proteína o péptido en un tubo cilíndrico giratorio para someterla a una degradación de Edman. Los reactivos y los disolventes para la extracción se pasan sobre la película inmovilizada de proteína y el PTH-aminoácido liberado se identifica por medio de *cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)* (Stryer, 1995). El método no es muy eficiente con cadenas largas (≈ 50 aa) (Mathews *et al.*, 1997).

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas involucra la medición de la relación masa/carga (m/z) de los iones. Se ha convertido en una herramienta esencial analítica en la investigación biológica ya que provee información acerca de la identidad, la cantidad y las modificaciones que pudiera contener la proteína; y también puede ser empleada para caracterizar una gran variedad de biomoléculas tales como azúcares y oligonucleótidos.

Un espectrómetro de masas es un instrumento que puede ionizar una muestra y medir la relación m/z de los iones resultantes. Los espectrómetros de masas pueden proveer información cuantitativa y cualitativa de la composición elemental, isotópica y molecular de muestras orgánicas e inorgánicas. Además, las muestras pueden analizarse en estado líquido, sólido y gaseoso y el intervalo de masas que pueden ser estudiadas es de algunos átomos (pocos Da) hasta proteínas (más de 300,000 Da).

La ionización de moléculas tan grandes como las proteínas no fue posible sino hasta 1981 con la introducción del método de ionización por bombardeo atómico rápido (FAB). La habilidad para ionizar moléculas grandes se mejoró con el advenimiento de la ionización con "electrospray" (ESI) en 1988, al emplear cromatografía líquida para analizar mezclas complejas. El análisis de masas por tiempo de vuelo (TOF) se desarrolló comercialmente en 1956; pero fue hasta 1991 cuando se introdujo una técnica de ionización para moléculas biológicas que se podía emplear con los análisis de TOF. Este proceso de desorción-ionización mediante láser y asistido por matriz (MALDI), es capaz de ionizar y vaporizar grandes moléculas, tales como proteínas.

En MALDI la muestra es co-cristalizada junto con una matriz orgánica, como el ácido sinapínico o el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, que sea capaz de absorber la luz ultravioleta. Los cristales resultantes son irradiados con pulsos de láser en una longitud de onda en la cual la matriz tiene una absorción espectral grande. Este proceso desorbe la mezcla y fotoexcita la matriz, la cual ioniza el analito vía transferencia de protones. El resultado de este proceso son iones en fase gaseosa, la mayoría de ellos se encuentran monocargados. Después de que la muestra es ionizada, los iones se dirigen hacia el analizador de masas, el cual separa los iones con base en su relación m/z ; los iones más ligeros viajan más rápido que los pesados. Los datos obtenidos de la espectrometría de masas MALDI-TOF proveen una confirmación directa de la masa molecular (Finehout y Lee, 2004).