



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS MODULADORES DE  
RECEPTORES DE GLICINA, A PARTIR DE  
VENENOS DE CARACOLES MARINOS DE LA  
SUPERFAMILIA CONOIDEA (*Conus spurius*).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:

FELIPE DE JESÚS PÉREZ RUEDA



DIRECTOR DE TESIS  
DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA

2010



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.

1.-Datos del alumno

Pérez  
Rueda  
Felipe de Jesús  
55569032523  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
300016255

2.- Datos del tutor

Dr.  
José Estuardo  
López  
Vera

3.-Datos del sinodal 1

Dra.  
María Luisa  
Fanjul  
Peña

4.- Datos del sinodal 2

Dr.  
Manuel Benigno  
Aguilar  
Ramírez

5.- Datos del sinodal 3

Dra.  
Ana Rosa  
Vázquez  
Bader

6.-Datos del sinodal 4

Biol.  
Miguel  
Ángel  
Velázquez  
Flores

7.-Datos del trabajo escrito

Búsqueda de péptidos moduladores de receptores de glicina, a partir de venenos de caracoles marinos de la Superfamilia Conoidea (*Conus spurius*).  
48p  
2010

*A mí madre.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más grande agradecimiento al Dr. José Estuardo López Vera por su apoyo durante el desarrollo de este proyecto, su comprensión y consejos los cuales me han ayudado a superarme profesionalmente.

Por su disponibilidad y contribución en ese trabajo agradezco a cada uno los miembros del jurado:

Dra. María Luisa Fanjul Peña  
Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez  
Dra. Ana Rosa Vázquez Bader  
Biol. Miguel Ángel Velázquez Flores

De manera muy especial quiero agradecer a la Dra. Rocío Salceda Scanelles por su paciencia, propuestas, consejos y todas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Agradezco al Biol. Gustavo Sánchez Chávez por su apoyo técnico y comentarios durante mi estancia en el laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias, y a la Escuela Nacional Preparatoria No 2 "Erasmus Castellanos Quinto", por la formación académica y profesional que me han otorgado.

## DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a la persona que más he hecho enojar; mi MADRE, gracias por todas las cosas que has hecho y has dejado de hacer por mí, por cada uno de tus regaños (decías que lo hacías por mi bien), por tu paciencia y por depositar tu confianza en mí. A dos extraordinarias personas a las que sólo les conocí cosas buenas mis abuelitos Félix y Neme. A mis tías; Blanca y Bety ya que sin tener porque se han preocupado por mí. A mi tía Elena por convertirse en mi segunda madre. A mis hermanos; Fernando, Sergio y Roberto por todas las cosas que hemos destruido juntos.

A los mugrosos de la prepa 2; Pablo, Gerardo, Mauricio y Arturo por ser más que amigos desde hace más de 10 años. A la banda de la Facultad de Ciencias: Tzizi, Alejandra, Sandra, Rocío, Briseida, Yobas, Aurelio, Lucia, Jimena, Martha, Mónica, Magali, María, Darinka, Victoria, Lilia, Erandi, Memo, Duhyadi, Alicia, Nicasio y Kiyoshi; por las prácticas, trabajos, exposiciones, tareas y fiestas que nos ha tocado compartir.

Y a los que no son de la Facultad: Haide, Blanca, Lalo, Flor, Juan, Guille, Heidy, Vania Adriana, Alejandra, por el tiempo que nos ha tocado compartir.

A todos los compañeros con los que compartí laboratorio: Jimena, Ixchel, Diego, Moisés, Liliana, Ernesto, Luis y Cesar.

A los profesores que han puesto un poquito más de lo que les corresponde; María de los Ángeles, María de Lourdes, kasandra, Nubia, Yamel, Aravidt, Julieta, René, Alejandro.

Y por supuesto a ti Tzitzitlini que estuviste a mi lado durante todo este tiempo y atreverte a compartir tu vida con la mía con todo lo que esto implica, gracias por tu apoyo, comprensión, regaños y amor, sin tu ayuda este trabajo hubiera sido más difícil de lo que fue.

*Todo ha de ser diferente. En un vaso de agua tienen que nadar unos animalitos que nadie había visto antes; la sífilis ha de ser una enfermedad muy normal y no un castigo de Dios; Dios, si es que fue Él quien lo creó, no hizo el mundo en siete días, sino en millones de años; los salvajes son hombres como nosotros; educamos mal a nuestros hijos; ¡y la Tierra ya no es redonda como hasta ahora, sino ovalada como un melón...como si esto importara algo! En todos los terrenos se hacen preguntas, se escudriña, se investiga, se husmea y se experimenta. Ya no basta decir que una cosa existe y describirla: ahora todo tiene que probarse, y mejor si se hace con testigos, datos y algunos experimentos ridículos.*

Patrick Süskind, 1985

*Ni yo puedo hacerte todas las preguntas, ni tú puedes darme todas las respuestas.*

José Saramago, 1991

*Hay tantas cosas que se pueden complicar, pero antes muerto que dejar de soñar...*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> - - - - -	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
Clasificación del Phylum Mollusca - - - - -	3
Características generales de un molusco - - - - -	4
Clase Gastropoda - - - - -	5
Superfamilia Conoidea - - - - -	6
Conotoxinas - - - - -	10
Modo de acción de algunas conotoxinas - - - - -	11
$\alpha$ -conotoxinas - - - - -	15
Canales iónicos - - - - -	17
Receptor de glicina - - - - -	18
<b>ANTECEDENTES</b> - - - - -	20
<b>OBJETIVO</b> - - - - -	24
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Colecta y transportación de los especímenes - - - - -	25
Obtención de los conductos venenosos - - - - -	25
Extracción de veneno - - - - -	25
Aislamiento de membranas sinaptosomales - - - - -	26
Ensayos de unión de ligandos radioactivos - - - - -	26
Evaluación del veneno - - - - -	27
Determinación de proteína - - - - -	28
Análisis de resultados - - - - -	28
<b>RESULTADOS</b> - - - - -	29
<b>DISCUSIÓN</b> - - - - -	36
<b>CONCLUSIONES</b> - - - - -	37
<b>REFERENCIAS</b> - - - - -	38



## RESUMEN

Dentro de la clase Gastropoda cabe resaltar a la Superfamilia Conoidea también conocida como suborden Toxoglossa, la cual agrupa aproximadamente 3,000 especies de caracoles marinos (venenosos). Las familias Conidae, Turridae y Terebridae constituyen la Superfamilia Conoidea que comparten la característica de poseer un aparato venenoso el cual está constituido por un bulbo muscular conectado a la cavidad bucal por un conducto que secreta el veneno y un saco radular.

La familia Conidae ha sido la más estudiada en cuanto a los componentes que contienen sus venenos. Los compuestos obtenidos de estos caracoles se conocen como conopéptidos o conotoxinas y están constituidos por 100 a 200 péptidos. En su mayoría estos péptidos están formados de 6 a 40 aminoácidos y tienen como característica la presencia de varios residuos de cisteína a lo largo de su estructura primaria, que permite la formación de puentes disulfuro intramoleculares.

De acuerdo al blanco molecular sobre el que actúan estos péptidos se han clasificado en familias farmacológicas, dos de estas familias son las  $\alpha$ -conotoxinas se caracterizan por ser antagonistas específicos de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) y las  $\sigma$ -conotoxinas que antagonizan a receptores de serotonina (5-HT<sub>3</sub>). Debido a que el receptor de glicina (RGly) pertenece junto con los nAChR y 5-HT<sub>3</sub> a la Superfamilia de receptores ióntropicos con asa de cisteína, en este trabajo se evaluó el efecto del veneno total del caracol de la especie *C. spurius* sobre el RGly mediante ensayos de unión específica.

Los resultados obtenidos muestran una unión total del veneno al RGly de valores similares al utilizar estriknina (antagonista del RGly). Estos resultados sugieren que, en el veneno de *C. spurius* existe al menos un componente que es capaz de unirse a los receptores de glicina de alta afinidad de la médula espinal de rata.

## INTRODUCCIÓN

### Clasificación del Phylum Mollusca

El Phylum Mollusca es el segundo más grande de todos los phyla dentro del reino animal después de los artrópodos. Los organismos que lo integran se encuentran en el mar, agua dulce y en tierra firme. Se han descrito unas 35,000 especies fósiles y más de 100,000 especies vivientes que se clasifican en 8 clases (Barnes, 1985; Kimball, 1986; Tree of life Web Project, 1995), las cuales se mencionan a continuación:

**Clase Caudofoveata** (Chaetodermomorpha) (70 especies)

**Clase Solenogaster** (Neomeniomorpha) (250 especies)

**Clase Monplacophora** (neopilina y afines) (20 especies)

**Clase Polyplacophora** (quitones) (600 especies)

**Clase Scaphopoda** (colmillos de elefante)

**Clase Bivalvia** (mejillones, almejas, ostras) (13, 000 especies)

**Clase Cephalopoda** (pulpos, calamares, sepias) (800 especies)

**Clase Gastropoda**(caracoles marinos y terrestres, lapas) (75, 000 especies)

Cabe resaltar que las clases Caudofoveata y Solenogaster se consideraban anteriormente dentro de la clase Aplacophora y recientemente se tiene contemplado subdividir a la clase Gastropoda en dos subclases: Eogastropoda (lapas verdaderas) y Orthogastropoda que incluye a todos los demás

gasterópodos siendo esta última el grupo de interés para nuestro trabajo ya que en ella se agrupan los caracoles a estudiar (Tree of life Web Project, 1995).

### **Características generales de un molusco**

El patrón básico de un molusco consiste en un cuerpo blando con simetría bilateral y una concha que lo cubre o rodea (ausente o interna en algunos grupos).

En algunos casos en lugar de concha, pueden poseer espículas (pueden aparecer en estado embrionario pero en adultos pueden fusionarse para dar una concha) o placas. La concha se forma gracias a la epidermis subyacente, denominada manto, formado por células secretoras de carbonato cálcico que se cristaliza en el exterior (Brusca y Brusca, 1990).

En la parte posterior, el manto forma una cámara denominada cavidad paleal (única en moluscos) donde se alojan varias estructuras; las branquias, en forma de peine, llamadas ctenidios, los órganos quimiorreceptores encargados de detectar la calidad del agua (osfradios), la desembocadura de los conductos urinarios (nefridios), las gónadas y el ano (Brusca y Brusca, 1990).

Otra característica de los moluscos, es la presencia de un pie, el cual muestra una enorme plasticidad evolutiva. Está dotado de una musculatura compleja y potente y ha experimentado una gran diversificación, originando el pie excavador de los bivalvos, el pie escindido en tentáculos de los cefalópodos o el pie nadador de algunos gasterópodos pelágicos, entre otros (Brusca y Brusca, 1990).

El sistema bucal consiste en una cavidad revestida de quitina y un órgano de alimentación conocido como rádula, que consiste en una base cartilaginosa alargada recubierta de hileras longitudinales de dentículos quitinosos curvos que funcionan como un raspador que ayuda para la alimentación; la rádula se ha modificado para adaptarse a otras formas de nutrición (Fig. 1) (Barnes, 1985).

### **Clase Gastropoda**

La clase Gastropoda es de las más importantes del grupo de los moluscos de la cual se han descrito más de 75,000 especies vivientes pertenecientes a 6 subclases y unas 15,000 formas fósiles. Esta clase presenta un registro fósil ininterrumpido desde el Cámbrico y ha experimentado la radiación adaptativa más extensa de todos los grupos de moluscos. Las especies marinas de esta clase se han adaptado a vivir en todo tipo de fondos, desde la zona intermareal hasta zonas abisales. No obstante otras especies han colonizado agua dulce e incluso los caracoles pulmonados se han adaptado a tierra firme (Barnes, 1985; Luna-Ramírez, 2006).

En los gasterópodos se observan todo tipo de hábitos alimenticios; incluye herbívoros, carnívoros, consumidores de partículas en suspensión y parásitos. En la mayoría de los gasterópodos la rádula es empleada como órgano de masticación, constituido por estructuras semejantes a dientes de naturaleza quitinosa. Los dientes varían en número de 16 a varios millares dispuestos en hileras (Fig. 1) (Barnes, 1985).

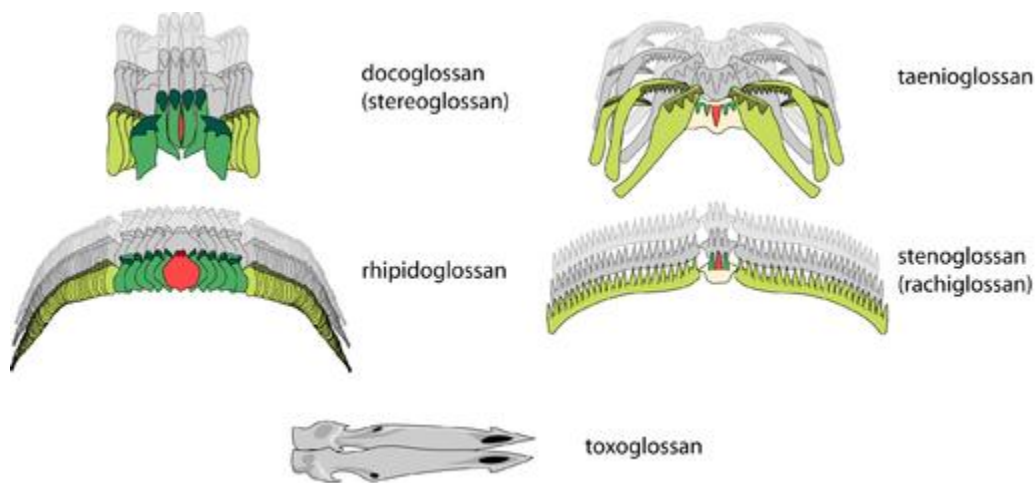


Figura 1. Representación gráfica de la disposición de los dientes quitinosos y modificaciones de la rádula en cinco de las principales ordenes de gasterópodos. Rojo= diente central o raquis, Verde= dientes laterales, Amarillo= dientes marginales. Modificado de [http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Radula\\_types.png](http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Radula_types.png)

## Superfamilia Conoidea

En el caso de la Superfamilia Conoidea también conocida como suborden Toxoglossa y perteneciente a la clase Gastropoda el sistema bucal se ha modificado a un aparato venenoso (Fig. 2) . Éste se constituye por: 1) un bulbo muscular, que se cree que puede participar en la inyección del veneno y está conectado a la cavidad bucal por: 2) un conducto que secreta el veneno; la evidencia histológica indica que al parecer el veneno es producido por el epitelio glandular de tipo holócrino del conducto. El conducto se une en la región posterior de la faringe, mientras que el saco radular se une a la faringe en la región anterior. Se cree que en este sitio de la faringe es donde los dientes radulares se cargan

con veneno (Barnes, 1985; Olivera, 1997). 3) El saco radular está formado por dos protuberancias; una en donde se encuentran de 10 a 12 dientes radulares y una larga con aproximadamente 60 dientes; en ambas porciones los dientes se encuentran fijos a la membrana de la rádula por un cordón delegado de tejido. El saco radular cuenta con un epitelio ciliado en forma lineal que probablemente facilita la salida de los dientes radulares del saco radular hacia la faringe. Los dientes radulares tiene la forma de un lámina enrollada de quitina, para formar una estructura tubular con la punta en forma de arpón (Halstead, 1988).

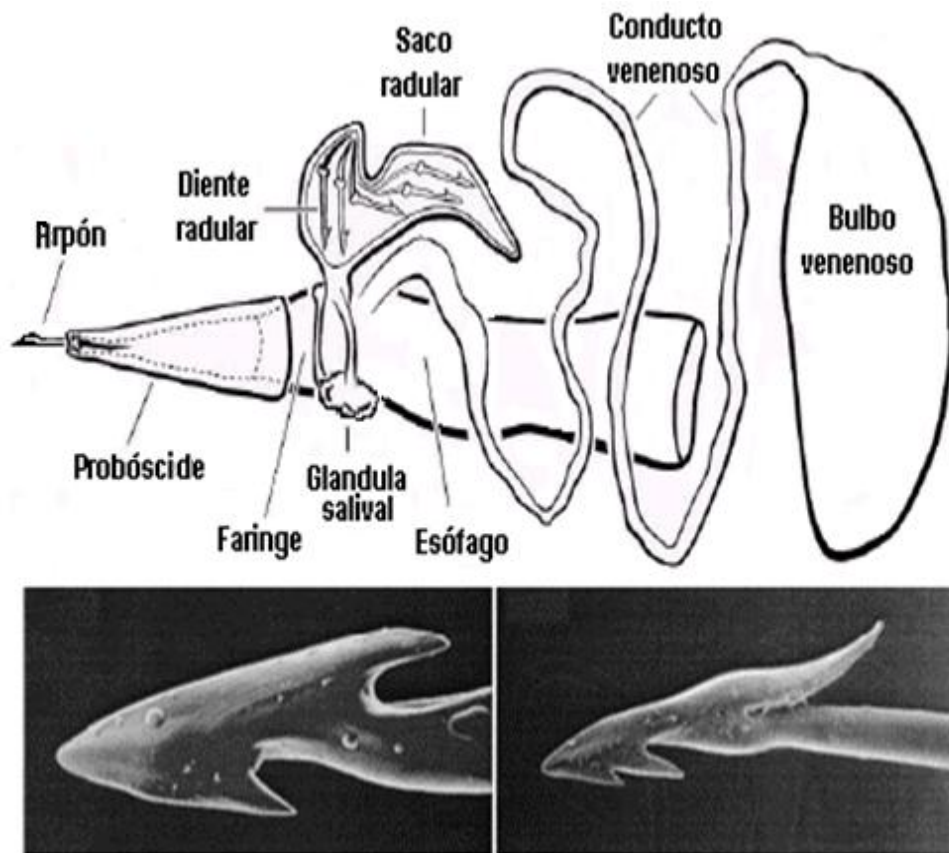


Figura 2. Representación gráfica del aparato venenoso de un caracol del género *Conus* modificado de Olivera et al 1990.

El veneno es utilizado para la defensa del animal de sus depredadores y la captura de sus presas. La picadura se realiza por medio del arpón cargado de veneno. El arpón pasa de la faringe a la apertura anterior de la probóscide, en donde es guardado; la probóscide es retráctil alcanzando varios centímetros de longitud y cuando se produce un ataque esta es proyectada, siendo así el arpón introducido en el músculo de la presa o depredador. Las presas son inmovilizadas rápidamente por el veneno neurotóxico que penetra en la herida a través de la cavidad hueca del diente (Barnes, 1985; Halstead, 1988).

El haber desarrollado un sistema venenoso se cree que es la causa de la gran diversidad de especies que hay en la Superfamilia Conoidea en la cual se agrupa aproximadamente a 3,000 especies de caracoles marinos venenosos que se conocen actualmente (López-Vera, 2005). Esta superfamilia se distribuye en mares tropicales y subtropicales, encontrándose principalmente en las regiones del Atlántico Occidental y en el Océano Indo-Pacífico (Barnes, 1985). Habita principalmente aguas poco profundas y asociadas a arrecifes coralinos. Las familias Conidae, Turridae y Terebridae forman parte de la Superfamilia Conoidea y la mayoría de sus miembros comparten la característica de poseer el aparato venenoso (Barnes, 1985; Olivera, 1999).

El registro fósil de la Superfamilia Conoidea se remonta al periodo Cretácico, pero los verdaderos *Conus* se encuentran hasta después de la extinción del límite K-T (Cretácico/Terciario). El primer fósil considerado como un *Conus* se remonta al Eoceno temprano. Este grupo es considerado como un oportunista que después



de la extinción del K-T aprovechó la extinción de otros grupos de caracoles carnívoros (amonites) para ocupar su nicho ecológico. Probablemente esto ocasionó una primera radiación en la diversidad de *Conus*; una segunda radiación ocurrió a inicios del Mioceno y continúa hasta hoy en día (Kohn, 1985). Estas radiaciones dentro del género *Conus* requirieron de la evolución de nuevos venenos y eficientes mecanismos de acción para los mismos (Terlau y Olivera, 2004).

Dentro de la familia Conidae se encuentra el género *Conus* que es uno de los grupos de animales con mayor éxito. Se conocen alrededor de 500 especies y es probablemente el género de moluscos con mayor número de especies (Olivera et al., 1991; Röckel et al., 1995).

Los *Conus* se dividen generalmente en tres grupos dependiendo del tipo de presa que cazan. El grupo más amplio es el de los vermívoros los cuales se alimentan de gusanos en su mayoría de poliquetos, pero algunos caracoles también llegan a alimentarse de hemicordados. El segundo grupo es el de los molusquívoros que se alimentan de otros gasterópodos pudiendo incluso existir canibalismo. El último grupo y el que menos número de especies tiene es el piscívoro; este grupo ha sido el más estudiado ya que cuenta con venenos que inmovilizan rápidamente a su presa (peces) (Kohn, 1959; Olivera, 1997; Olivera et al., 1985; Terlau et al. 1996).

La mayoría de los *Conus* son nocturnos. A pesar de que tienen un par de ojos compuestos, su visión es pobre y es con su capacidad quimiosensorial con lo que detectan a sus presas (Kohn et al, 2001).

## **Conotoxinas**

El veneno obtenido de los caracoles del género *Conus* está formado por una mezcla de alrededor de 100 a 200 péptidos los cuales están formados por 6 a 40 aminoácidos y se les conoce como conopéptidos o conotoxinas. Las conotoxinas suelen ser mucho más pequeñas que las toxinas de otros organismos venenosos tales como arácnidos y serpientes. Las toxinas de estas especies terrestres están compuestas por secuencias de entre 40 a 100 residuos de aminoácidos (Olivera et al., 1990). Una característica común de las conotoxinas es la presencia de varios residuos de cisteína a lo largo de su estructura primaria, que permite la formación de puentes disulfuro intramoleculares que proporcionan una alta estabilidad a la molécula (Olivera y Cruz 2001; Jones y Bulaj, 2000). Además, las conotoxinas presentan una diversidad inusual de modificaciones postraduccionales (Craig y Olivera, 1999). Estas modificaciones incluyen algunas muy conocidas y ampliamente distribuidas como hidroxilación de prolina y O-glucosilación de serina y/o treonina (Craig et al., 1998) así como otras inusuales como bromación de triptófano (Jiménez et al., 1997),  $\gamma$ -carboxilación del ácido glutámico (McIntosh et al., 1990) y sulfatación de tirosina (Loughnan et al., 1998).

Al comparar secuencias homólogas de cDNA de diferentes especies de *Conus* se han observado patrones de péptidos con arreglos similares de Cys en la secuencia primaria. Los arreglos de Cys en la estructura primaria de estos péptidos están restringidos a unos cuantos patrones; en general cada patrón corresponde a una interconectividad entre residuos de cisteína específica, aunque hay excepciones. Generalmente, el patrón de cisteínas es diagnóstico de la superfamilia de genes que codifica a los péptidos y en muchos casos puede ser indicativo del blanco farmacológico del conopéptido (Olivera y Cruz 2001; Jones y Bulaj, 2000).

Los blancos moleculares de cada uno de los componentes del veneno de los *Conus* son funcionalmente muy diversos, e incluyen receptores acoplados a proteínas G y transportadores de neurotransmisores, algunos componentes del veneno de estos caracoles también tienen actividad enzimática. Sin embargo; la mayoría de los componentes caracterizados de estos venenos tiene como blanco canales iónicos ya sea activados por ligando o los activados por voltaje. Las conotoxinas tienen la capacidad de discriminar entre isoformas moleculares estrechamente relacionadas con miembros de una determinada familia de canales iónicos (Terlau y Olivera, 2004). De acuerdo al blanco molecular sobre el que actúan estos péptidos se han clasificado en familias farmacológicas (Tabla 1).

### **Modo de acción de algunas conotoxinas**

En la superfamilia M de conotoxinas se encuentran las  $\psi$ -,  $\kappa$ M- y  $\mu$ -conotoxinas, las cuales se aislaron inicialmente del veneno de un caracol piscívoro *C. geographus*. Las  $\mu$ -conotoxinas están formadas por 22 a 25 aminoácidos con 6 residuos de cisteína. Este grupo de péptidos bloquean las corrientes de  $\text{Na}^{++}$  actuando sobre el sitio I de los canales de  $\text{Na}^+$  activados por voltaje (Terlau y Olivera, 2004).

Otros grupos de conopéptidos que interactúan con los canales iónicos activados por voltaje son las  $\mu$ O- y  $\delta$ - conotoxinas, las cuales son usualmente péptidos hidrofóbicos, pertenecientes a la superfamilia O, tienen un patrón de puentes disulfuro los cuales dan a estos péptidos una estructura de nudos inhibidores de cisteína (ICK) (Terlau et al. 1996).

Las  $\mu$ O- conotoxinas son una familia de conopéptidos que inhiben la conductancia de los canales de  $\text{Na}^+$ , pero lo hacen por un mecanismo diferente al de las  $\mu$ -conotoxinas, ya que no compiten por el sitio de unión de la saxitoxina (STX) (Terlau et al., 1996).

Los conopéptidos pertenecientes a la familia de  $\delta$ -conotoxinas se caracterizan por inhibir la inactivación rápida de la corriente de  $\text{Na}^+$ , dando como resultado una hiperexcitación en las células afectadas, lo cual eventualmente puede dirigir a una hiperexcitación eléctrica del organismo completo (Jiang et al., 2003a).

Tabla 1. Clasificación de las superfamilias y familias de conotoxinas.

<b>SUPERFAMILIA DE GENES</b>	<b>ARREGLO DE CISTEÍNAS</b>	<b>BLANCO MOLECULAR</b>	<b>FAMILIA DE FARMACOLÓGICA</b>
<b>O</b>	<b>C-C-CC-C-C</b>	Canales de Na <sup>+</sup>	δ
			μO
		Canales de K <sup>+</sup>	κ
		Canales de Ca <sup>++</sup>	γ
		Canales de Ca <sup>++</sup>	ω
<b>M</b>	<b>CC-C-C-CC</b>	Canales de Na <sup>+</sup>	μ
		Receptor de nACh	ψ
		Canales de K <sup>+</sup>	κM
<b>A</b>	<b>CC-C-C</b>	Receptor nACh	α
	<b>CC-C-C-C-C</b>	Receptor nACh	αA
		Canales de K <sup>+</sup>	κA
		Receptor de adrenalina	ρ
<b>S</b>	<b>C-C-C-C-C-C-C-C-C</b>	Receptor 5-HT <sub>3</sub>	σ
<b>T</b>	<b>CC-CC</b>	Canales de Na <sup>+</sup>	ε/τ
	<b>CC-CPC</b>	Transportador NE	λ/χ
<b>P</b>	<b>C-C-C-C-C-C</b>		
<b>L</b>	<b>C-C-C-C</b>	Receptor nACh	αL
<b>J</b>	<b>C-C-C-C</b>	Receptor nACh y Canales de K <sup>+</sup>	α/κJ
<b>I</b>	<b>C-C-CC-CC-C-C</b>	Canales K <sup>+</sup>	κI
		Canales de Na <sup>+</sup>	ι
<b>V</b>	<b>C-C-CC-C-C-C-C</b>		
<b>C</b>	<b>C-C</b>	Receptor nACh	αC
<b>D</b>	<b>C-CC-C-CC-C-C-C-C-C</b>	Receptor nACh	αD

La primera conotoxina conocida que tiene como blanco molecular un canal de  $K^+$  activado por voltaje fue la  $\kappa$ -conotoxina PVIIA, aislada del caracol piscívoro *C.purpurascens* (Terlau et al., 1996).

El canal de  $K^+$  bloqueado por  $\kappa$ -conotoxina PVIIA es un componente clave en la rápida inmovilización de la presa debido a que los canales de  $K^+$  son importantes para la fase de repolarización del potencial de acción además de estar involucrados en el potencial de membrana en reposo (Hille, 2001).

Otras conotoxinas que tienen como blanco a los canales de  $K^+$  son las  $\kappa A$ - y  $\kappa M$ -conotoxinas, que son estructuralmente independientes unas de otras; las  $\kappa A$ -conotoxinas son péptidos O- glicosilados pertenecientes a la superfamilia A de conotoxinas, mientras que las  $\kappa M$ -conotoxinas tienen un arreglo de puentes disulfuro similar al de las  $\mu$ -conotoxinas que pertenecen a la superfamilia M (Le Gall et al., 1997).

Las  $\omega$ -conotoxinas fueron de las primeras en ser caracterizadas y las más utilizadas en el área de las neurociencias. Las  $\omega$ -conotoxinas son inhibidoras de los canales de  $Ca^{++}$  sensibles a voltaje, los cuales controlan varios procesos fisiológicos, tales como la liberación de neurotransmisores y la contracción muscular (Agustine et al., 1987). Este tipo de canales son de los más heterogéneos, poseen al menos seis tipos llamados L, N, P, Q, R y T, cada uno de ellos con diferentes subtipos (Randall, 1998). El conocimiento de diferentes

subtipos de canales de  $\text{Ca}^{++}$  se debe en gran medida al descubrimiento de las  $\omega$ -conotoxinas (Fainzilber et al., 1998). Además, los péptidos de esta clase, con actividad sobre los canales de calcio del tipo N, poseen un potencial terapéutico en el tratamiento del dolor agudo y neuropático (Miljanich y Ramachandran, 1995); ejemplo de ello es el péptido CVID (AM-336, AMRAD), aislado de *C. catus*, actualmente en la fase II de estudios clínicos, mientras que un análogo sintético del MVIIA (nombre genérico Ziconitide; nombre comercial Prialt), aislado de *C. magus*, fue aprobado a finales del 2004 para el tratamiento del dolor en pacientes con cáncer (Miljanich, 2004).

Las  $\sigma$ -conotoxinas tienen la capacidad de antagonizar receptores para serotonina ( $5\text{-HT}_3$ ); hasta el momento el único ejemplo de estas toxinas es el péptido  $\sigma$ -conotoxina GVIIIA aislado de *Conus geographus*, el cual actúa sobre el receptor  $5\text{-HT}_3$  antagonizándolo competitivamente siendo altamente selectivo para este receptor; debido a que el péptido  $\sigma$ -conotoxina GVIIIA tiene bromación en un residuo de triptófano, este residuo puede ser importante para la actividad del péptido ya que la actividad endógena del ligando natural del receptor  $5\text{-HT}_3$  es un derivado hidroxilado del triptófano (England et al., 1998).

### **$\alpha$ -conotoxinas**

Las  $\alpha$ -conotoxinas se caracterizan por ser antagonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina (RnAChs), los cuales son canales iónicos dependientes de ligando que tienen una función muy importante en la transmisión sináptica a lo

largo del sistema nervioso (Nicke et al., 2004). Estos péptidos, generalmente, actúan sobre un subtipo de receptor presentando un alto grado de especificidad entre subtipos (Tabla 2); son antagonistas competitivos, lo que implica que actúan sobre el sitio de unión donde interacciona el ligando natural para abrir el canal iónico, en la interfase entre dos subunidades  $\alpha$  o en la interfase entre una subunidad  $\alpha$  y otra cualquiera, por ejemplo  $\alpha 1\gamma$ ,  $\alpha 1\epsilon$ ,  $\alpha 7\alpha 7$  y  $\alpha 3\beta 4$ . La  $\alpha$  A-OIVB conotoxina es específica por la interfase  $\alpha 1\gamma$  y la  $\alpha$  A-EIVA conotoxina por la interfase  $\alpha 1\epsilon$  para el tipo muscular de RnACh. (Teichert et al., 2005).

Ejemplos de  $\alpha$ -conotoxinas que inhiben los RnAChs de tipo neuronal son las  $\alpha$ -conotoxinas Iml y ImII, aisladas ambas del caracol *Conus imperialis*; estas toxinas son péptidos constituidos por 12 aminoácidos y difieren entre ellas por solo 3 aminoácidos. Ambas  $\alpha$ -conotoxinas son inhibidoras del subtipo  $\alpha 7$  de los RnAChs; la Iml inhibe de manera competitiva, mientras que ImII es no competitiva (Ellison et al., 2004).

Las  $\alpha$ -conotoxinas han funcionado como herramienta en el estudio de los RnAChs, ya que ayudan a definir los mecanismos moleculares en los que están involucrados, así como a diferenciar distintos subtipos de este receptor (Olivera et al., 1990).



Tabla 2. Nombre, fuente de obtención y subtipo de acción para los RnACh de algunas  $\alpha$ -conotoxinas.

TOXINA	ESPECIE	SUBTIPO
$\alpha$ -MI	<i>C. magus</i>	$\alpha 1 \alpha > > \alpha 1 \alpha$
$\alpha$ -MII	<i>C. magus</i>	$\alpha 3 \alpha 2 = \alpha 6 \alpha 2 \alpha 3$
$\alpha$ -SI	<i>C. striatus</i>	$\alpha / \alpha, \alpha / \alpha$
$\alpha$ -EI	<i>C. ermineus</i>	$\alpha 1 \alpha = \alpha 1 \alpha$
$\alpha$ -ImI	<i>C. imperialis</i>	$\alpha 7$
$\alpha$ -ImII	<i>C. imperialis</i>	$\alpha 7$
$\alpha$ -GI	<i>C. geographus</i>	$\alpha \alpha, \alpha \alpha$
$\alpha$ -Epl	<i>C. episcopatus</i>	$\alpha 7, \alpha 3 \alpha 4$
$\alpha$ -AulB	<i>C. aulicus</i>	$\alpha 3 \alpha 4$
$\alpha$ -GIC	<i>C. geographus</i>	$\alpha 3 \alpha 2$
$\alpha$ -GID	<i>C. geographus</i>	$\alpha 7, \alpha 3 \alpha 2, \alpha 4 \alpha 2$
$\alpha$ -PIA	<i>C. purpurascens</i>	$\alpha 6 \alpha 2 \alpha 3 > \alpha 3 \alpha 2$

## Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas integrales de la membrana plasmática que permiten el paso selectivo de iones en presencia de un estímulo específico. Son principalmente importantes en células excitables, como las neuronas y los miocitos. Los canales iónicos facilitan el flujo de iones que provoca cambios de voltaje a través de la membrana plasmática (Miller, 1992). Se conocen dos tipos

principales de canales iónicos; los operados por voltaje y los activados por ligando (Miller, 1992). Los canales iónicos activados por ligando son proteínas que regulan la transmisión sináptica y están agrupados en diferentes familias. La familia de receptores con asa de cisteína en la que se encuentran los receptores del ácido  $\gamma$ -aminobutírico de tipo A (GABA-A), serotonina de tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>), nicotínico de acetilcolina (RnACh) y de glicina (RGly) (Kandel et al., 2002), están formados por cinco subunidades cada una con cuatro hélices transmembranales; además en su ligando específico los miembros de esta familia difieren en la selectividad de iones. Otro grupo de canales iónicos activados por ligando es el de la superfamilia de receptores de glutamato. Una tercera familia de canales iónicos activados por ligando involucrados en la transmisión sináptica es la de los receptores de trifosfato de adenosina (ATP) (England et al., 1998).

### **Receptor de glicina**

La glicina es el principal receptor inhibitorio en diferentes regiones del sistema nervioso central; en la médula y tallo cerebral alcanza concentraciones de 3.62 y 1.3  $\mu\text{Mol/g}^{-1}$  de tejido respectivamente (Daly, 1990). La glicina se acumula en vesículas sinápticas por medio de un sistema de transporte que es dependiente de protones y es liberada por una depolarización dependiente de calcio (Zafra et al., 1997). La acción de la glicina es mediada por su receptor postsináptico, el receptor de glicina (RGly), el cual está constituido por dos subunidades  $\alpha$  y tres subunidades  $\beta$  embebidas en la membrana plasmática (Grudzinska et al.) (Fig. 3).

Formando un canal selectivo al  $\text{Cl}^-$  que se antagoniza por el alcaloide estrocnina. El RGly se ancla al citoesqueleto por medio de la proteína periférica de membrana llamada gefirina que interactúa con proteínas del citoesqueleto tubulina y F-actina (Matzenbach et al., 1994)

Al ser activado el RGly, el flujo resultante de  $\text{Cl}^-$  cambia el potencial de membrana hacia el potencial de equilibrio del  $\text{Cl}^-$ , dependiendo del valor del potencial de equilibrio relativo al potencial de reposo de la célula. El flujo de  $\text{Cl}^-$  puede ocasionar una despolarización o una hiperpolarización. El RGly es conocido como un receptor inhibitorio porque el potencial de equilibrio del  $\text{Cl}^-$  es menor que el potencial de reposo de las células (Kneussel y Betz, 2000).

En la médula espinal de la rata se reveló por medio de clonación molecular, la presencia de un gen que codifica la subunidade  $\alpha 1$  la cual tiene un peso de 48 kDa y un segundo gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de 58 kDa (Grenningloh et al., 1987, 1990). Posteriormente también en médula espinal de rata se clonaron los genes que codifican las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  (Akagi et al. 1991). La subunidad  $\alpha 4$  no ha sido encontrada en el humano ni en la rata; se ha identificado en ratón, pollo y pez cebra (Matzenbach et al., 1994; Harvey et al., 2000; Devignot et al., 2003).

En el sistema nervioso de la rata el RGly se ha encontrado en altas concentraciones en la médula espinal y retina mientras que en el tálamo e

hipotálamo se presenta en bajos niveles y está ausente en la mayoría de las regiones del cerebro (Rampon et al. 1996; Pourcho y Goebel, 1990).

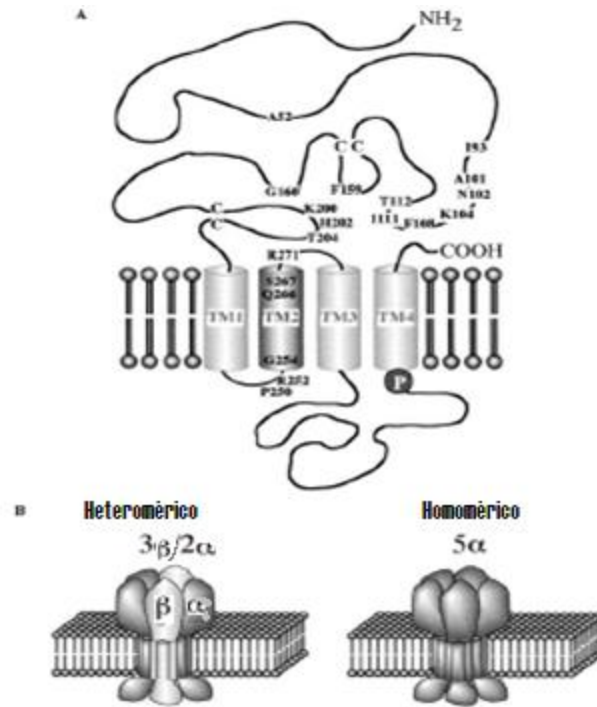


Figura 3. Estructura del receptor de Glicina. A) Topología de la membrana plasmática de una subunidad  $\alpha$  con cuatro dominios transmembranales, mostrando la posición de los aminoácidos funcionalmente importantes. B) Arreglos de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en heterómeros (Izquierda) y homómeros (Derecha). Tomada de Legendre 2000.

## Antecedentes

En aguas mexicanas podemos encontrar más de 60 especies de caracoles marinos pertenecientes al género *Conus*. En el Pacífico se reportan las especies: *C. arcatus*, *C. bartschi*, *C. brunnes*, *C. californicus*, *C. gratus*, *C. purpurascens*, *C. recurvus*, *C. virgatus*, mientras que en el Atlántico, habitan las especies: *C. austini*, *C. mus*, *C. nux*, *C. puncticulatus* y *C. spurius* entre otras ([www.coneshell.net](http://www.coneshell.net)).

La especie *Conus spurius* es una de las más abundantes en México y fue descrita por Gmelin en 1791 esta especie llega a medir hasta 12 cm de longitud. El color de la apertura de la concha es blanco y cuentan con un patrón de color café en pequeños recuadros lo cual le confiere su identidad (Fig. 4) (López-Vera, 2005). En nuestro país *C. spurius* se encuentra en el Golfo de México y el Caribe Mexicano, pero su distribución global va desde las costas de Florida hasta territorio venezolano. Se localiza generalmente sobre sustrato de arena gruesa y arenas carbonatadas, en un intervalo batimétrico de 17 a 35 m (Vázquez-Bader, 1994). No hay publicaciones que describan la presa de *C. spurius*; sin embargo Lowell Thomas ha visto a caracoles de esta especie comer gusanos nemertinos (Shongdahl y Lane, 1970; Shongdahl, 1973).

El veneno de la especie *Conus spurius* es extremadamente complejo, está constituido por un gran número de péptidos como se muestra en la figura 5.

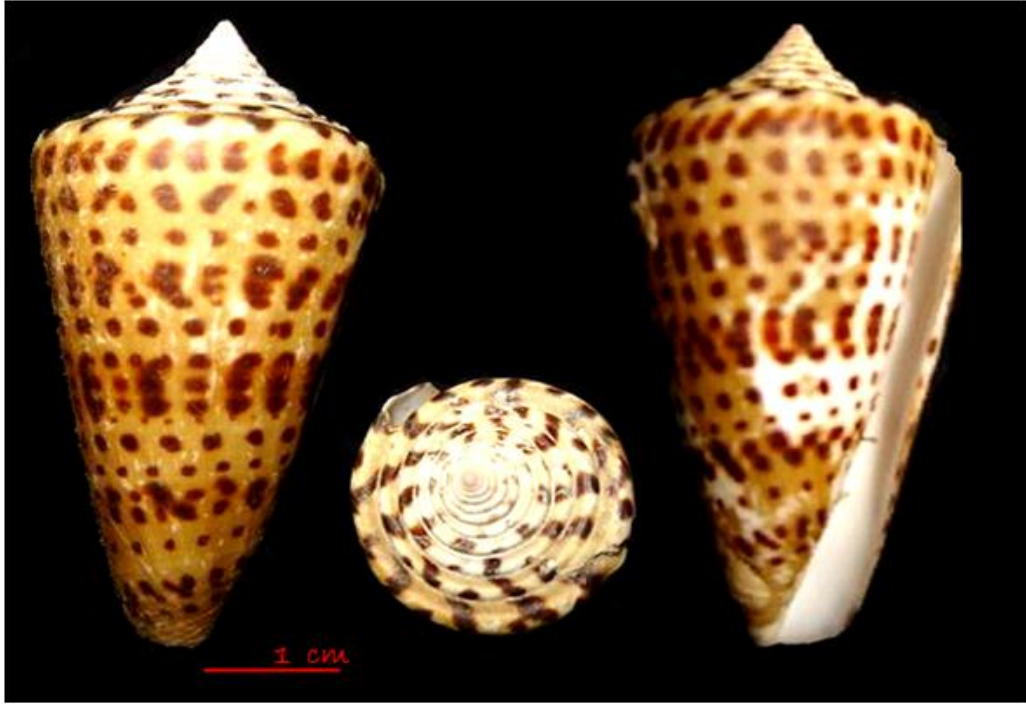


Figura 4. Concha de *Conus spurius*.

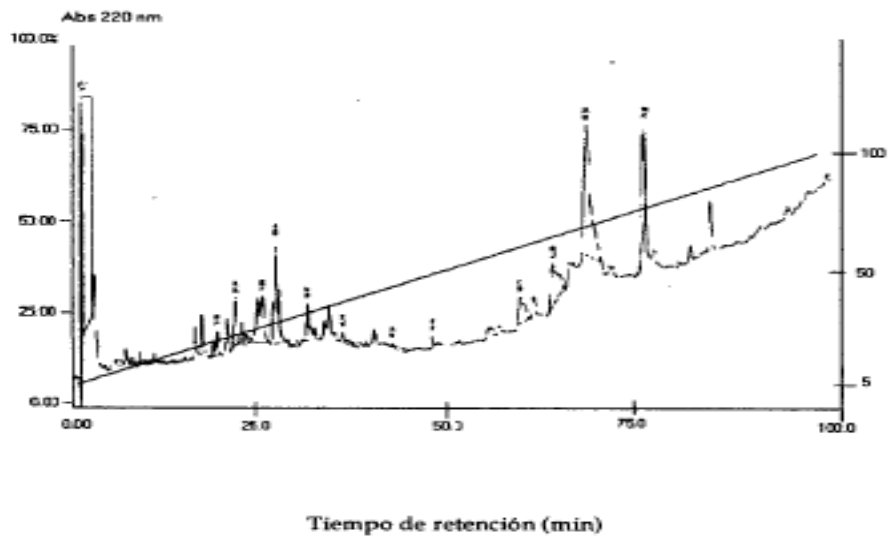


Figura 5. Cromatograma del extracto crudo de *C.spurius*, obtenido mediante HPLC de fase reversa. Modificado de López-Vera, 2005.

Hasta la fecha han sido aislados varias conotoxinas y conopeptidos del veneno de *Conus spurius*, las cuales se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Algunas conotoxinas aisladas del caracol *C. spurius*

<b>AUTOR</b>	<b>CONOTOXINA</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Aguilar et al., 2006	Sr5a	Causa depresión al inyectarse intracranealmente en ratones.
Luna-Ramírez, 2006	Sr7a	Perteneciente a la superfamilia O, Hiperactividad en ratones.
López-Vera et al., 2007	Sr1a y Sr1b	Inhibición de receptores de acetilcolina
Pérez-Reyes, 2009	Sr11a	Bloqueo de canales de potasio de la familia KVI de mamíferos.
Zamora-Bustillos et al.,	Sr5	Identificación de 4 subtipos de la conotoxina Sr5a

## **JUSTIFICACIÓN**

Debido a que se han encontrado conotoxinas con efectos contra dos de los miembros de la superfamilia de receptores ionotrópicos con asa de cisteína a la cual también pertenece el RGly, tales como RnACh ( $\alpha$ -conotoxinas) y 5-HT<sub>3</sub> ( $\sigma$ -conotoxinas).

## **HIPOTESIS**

El veneno de *Conus spurius* contiene toxinas que actúan sobre el receptor ionotrópico de glicina.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto del extracto del veneno de caracoles *Conus spurius* sobre la unión del ligando específico del RGly.

### **Objetivos particulares**

Obtención del veneno total de la especie *C. spurius*.

Evaluación del efecto del veneno total sobre el RGly utilizando ligandos radioactivos en ensayos de unión específica.



## **MATERIALES Y METODOS**

### **Colecta y transportación de los especímenes**

Los ejemplares de *C. spurius* fueron capturados frente a la costa de Yucatán, por medio de redes de arrastre. El manejo de los ejemplares fue bajo estricta congelación.

### **Obtención de los conductos venenosos**

Después de quebrar las conchas el cuerpo del caracol se colocó en una caja Petri con hielo, y la disección del conducto venenoso se realizó con ayuda de unas pinzas y unas tijeras. Los conductos venenosos aislados se colocaron en una solución de extracción al 40% (v/v) de acetonitrilo (ACN) y 2% (v/v) de ácido trifluoroacético (ATF).

### **Extracción de veneno**

La extracción del veneno se realizó mediante la homogenización de los conductos venenosos, en una proporción 5:3 (v/v) de amortiguador de extracción a 4 °C, utilizando un homogenizador de vidrio con émbolo del mismo material. El homogenado se centrifugó a 17,000 x g por 30 minutos a 4 °C, el botón se desechó y el sobrenadante que contiene los péptidos se liofilizó (López-Vera, 2005).

## **Aislamiento de membranas sinaptosomales**

Se aislaron membranas sinaptosomales de la médula espinal de ratas Long-Evans adultas. Las ratas se sacrificaron por decapitación y la médula se extrajo con ayuda de unas pinzas. El tejido se homogenizó al 10% (p/v) en una solución de sacarosa 0.32 M Tris 10 mM pH 7; el homogenado se centrifugó a 50.25 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 71,000 g durante 25 minutos y posteriormente, el precipitado se lavó con agua desionizada y centrifugó a la misma velocidad, en tres ocasiones más. El último botón correspondió a las membranas sinaptosomales este se congeló a -20°C y se utilizó para el ensayo de unión de ligandos radioactivos.

## **Ensayos de unión de ligandos radioactivos**

La unión específica de glicina-<sup>3</sup>H y de estricnina-<sup>3</sup>H se determinó siguiendo una modificación del método de Young y Snyder (1973). Las membranas (85 µg de proteína), se incubaron durante 30 minutos en un amortiguador (Tris 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.17 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM y KCl 4.7 mM) pH 7.4 a temperatura ambiente, en presencia de diferentes concentraciones de glicina-<sup>3</sup>H ó 50 nM de estricnina-<sup>3</sup>H en un volumen final de 175 µL. La incubación se detuvo por centrifugación en una aerofuga Beckman a 20 psi durante 4 minutos. El sobrenadante se desechó y el botón se lavó superficialmente con 100 µl de agua fría y se centrifugó

nuevamente en las mismas condiciones. Finalmente el botón se resuspendió en 100  $\mu$ L de SDS al 0.1% después de 10 minutos, se transfirió a un vial y se le agregaron 5 mL de líquido de centelleo (Tritosol). La radioactividad unida en las membranas se determinó en un contador de centelleo líquido, Beckman S1500.

La unión específica de glicina y estricnina se determinó incubando en presencia de una concentración de 1 mM y 200  $\mu$ M de los ligandos no radioactivos respectivamente.

### **Evaluación del veneno**

Se llevó a cabo la evaluación del efecto del veneno incubando simultáneamente con glicina- $^3$ H 50 nM ó estricnina- $^3$ H 50 nM. El veneno crudo de la especie *C. spurius* se disolvió en agua y por separado en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.05% y 0.025% (concentraciones en las que no se observó efecto sobre la unión total de glicina).

### **Determinación de proteína**

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry et al. 1951) utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Se midió la absorbancia a 690 nm en un lector de microplacas (usando un Kit comercial de Bio-Rad).

## Análisis de resultados

El cálculo de los parámetros de la constante de afinidad ( $K_D$ ) y del número máximo de sitios de unión ( $B_{MAX}$ ) de glicina- $^3H$ , en las membranas sinaptosomales de médula de rata, se realizó por medio del programa computacional GraphPad Prism 5.0 con la ecuación:

$$Y = B_{max} \frac{Xh}{K_Dh + Xh}$$

En donde “ $X$ ” es la concentración de ligando radioactivo.  **$B_{max}$**  es la unión específica expresada en las mismas unidades que  $Y$ , este valor es extrapolado a concentraciones muy altas de radioligando  **$K_D$**  es la concentración de radioligando necesaria para producir el 50% del efecto máximo y “ $h$ ” es la pendiente.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en este estudio, se realizó por medio del programa de cómputo GraphPad Prism 5.0, aplicando una prueba “ $t$ ” no paramétrica.

## RESULTADOS

Con el propósito de conocer las condiciones óptimas para determinar la unión específica de glicina- $^3\text{H}$  en las membranas sinaptosomales de la médula de la rata adulta, se evaluó la unión de 50 nM glicina- $^3\text{H}$  a partir de la caracterización de la unión a diferentes concentraciones de proteína y tiempos de incubación. La unión máxima de glicina- $^3\text{H}$  se observó a una concentración de 85  $\mu\text{g}$  (en un volumen de 175  $\mu\text{L}$ ) de proteína total, la cual alcanzó a los 30 minutos una saturación con un valor de  $0.4 \pm 0.16$  pmol/mg proteína (Fig. 6).

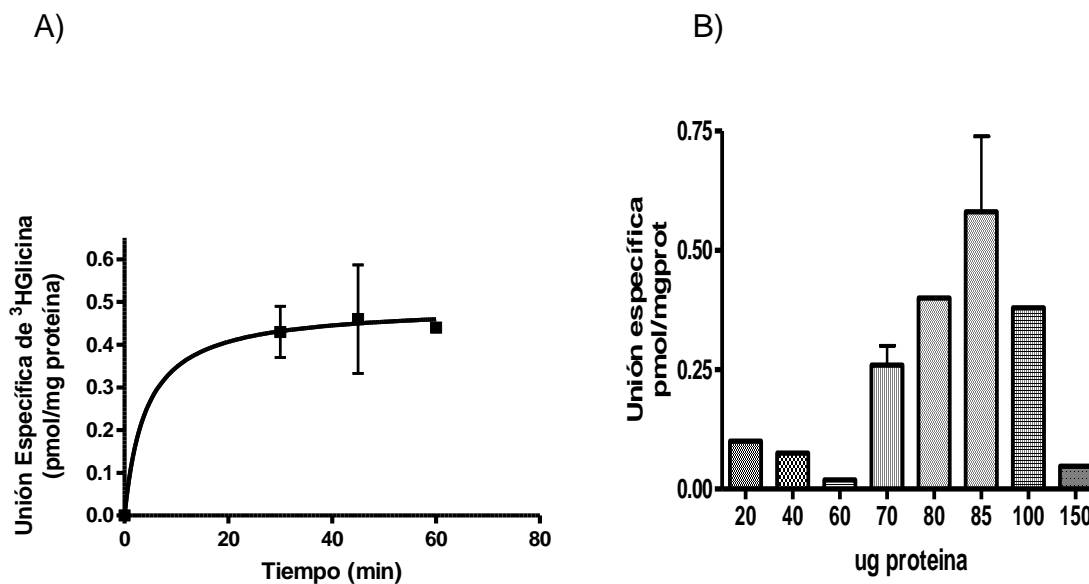


FIGURA 6. A) Unión específica de glicina- $^3\text{H}$  a las membranas sinaptosomales de la médula espinal de la rata. Los ensayos de unión son el promedio de 2 a 7 experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$  el error estándar. B) Curso temporal de la unión de glicina- $^3\text{H}$  [50 nM]. Los valores en cada tiempo son el promedio de 2 a 3 experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$  el error estándar.

Bajo estas condiciones se evaluó la unión específica de glicina-<sup>3</sup>H a diferentes concentraciones de este ligando en un intervalo de 20 a 323 nM. La unión específica de la glicina-<sup>3</sup>H a las membranas sinaptosomales de la médula de la rata representó el 64%. La figura 7 muestra una curva de tipo sigmoide que se satura a una concentración de 200 nM. El análisis de Scatchard mostró cooperatividad en el sistema (Segel, 1968); el análisis con el programa GraphPad Prism 5.0 reveló una afinidad de  $K_D = 184$  nM y un número máximo de sitios de unión de  $B_{MAX} = 2$ .

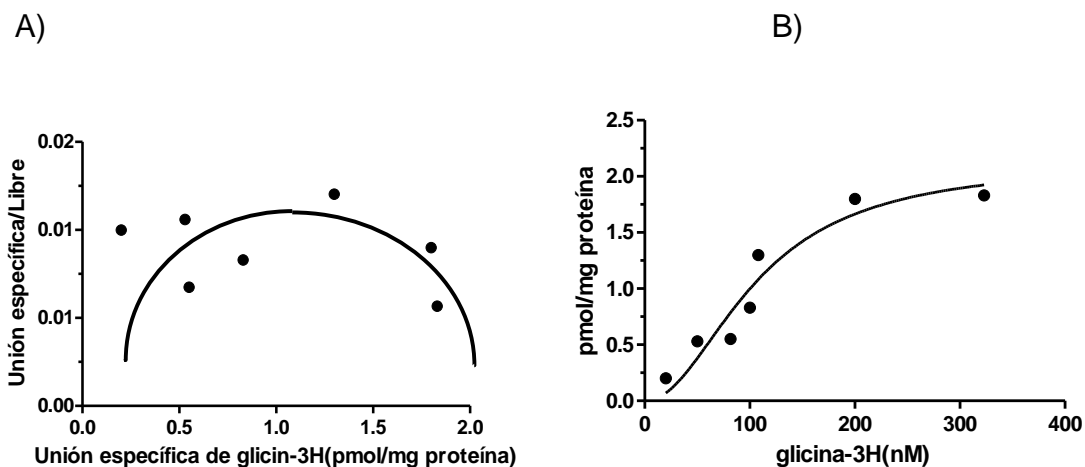


Figura 7. A) Curva de saturación de la unión específica de glicina-<sup>3</sup>H a las membranas sinaptosomales de la médula de la rata determinando la unión específica en presencia de glicina 1 mM. B) Análisis de Scatchard los datos se tomaron de la figura 5-A los valores son la media de 3 a 7 experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$  el error estándar.

En la figura 8 se muestra que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la unión específica de glicina-<sup>3</sup>H al desplazar en presencia de glicina fría, glicina fría y 2 µL de DMSO AL 1%, o 2 µL veneno (disuelto en DMSO). El veneno desplazó  $0.58 \pm 0.087$  pmol/mg de proteína, valor similar a los obtenidos con la glicina fría y glicina+DMSO al 0.1% los cuales fueron de  $0.50 \pm 0.157$  y  $0.71 \pm 0.25$  pmol/mg de proteína respectivamente. Al incubar las membranas sinaptosomales de médula de rata con el veneno total de *C. spurius* disuelto en agua, no hubo desplazamiento (datos no mostrados), lo cual sugiere que el péptido que interactúa con el receptor de glicina es un péptido hidrofóbico.

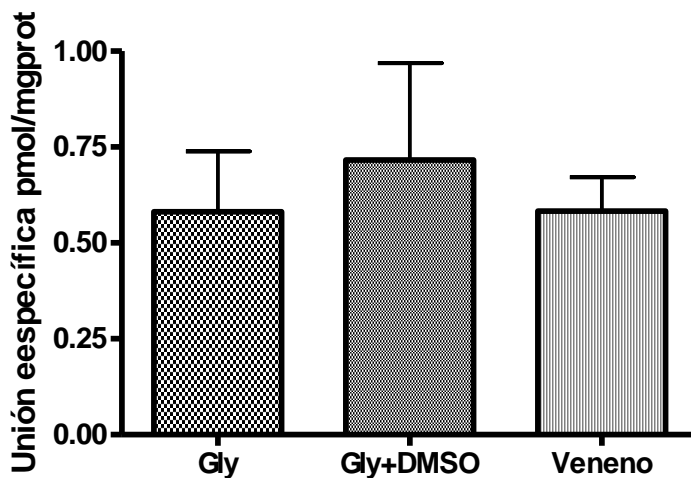


Figura 8. Unión específica de glicina-<sup>3</sup>H a las membranas sinaptosomales de la médula de la rata. La unión específica se determinó en presencia de glicina 1 mM. La unión en presencia del veneno se determinó con el total del veneno de un ejemplar de la especie *C. spurius* los datos son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$  el error estándar. Se determinó que no existen diferencias significativas entre los experimentos en los que la unión específica se realizó desplazando con glicina fría y los que se desplazaron con glicina + DMSO al 0.1% ( $p=0.66$ ), ni con los desplazados por el veneno disuelto en DMSO ( $p=0.99$ ).

Con el objetivo de confirmar si la unión de glicina observada en experimentos anteriores era sobre él rGly, se probó la unión específica de estriquina-<sup>3</sup>H 50 nM, en membranas sinaptosomales de la médula de la rata la cual fue de  $0.933 \pm 0.19$  pmol/mg de proteína lo cual representa el  $38.4\% \pm 5.7\%$ ; el desplazamiento con estriquina + DMSO al 0.1% fue de  $0.76 \pm 0.155$  pmol/mg con el veneno total de *C. spurius* (disuelto en DMSO), al agregar 2  $\mu$ L de éste la unión específica fue de  $0.86 \pm 0.113$  pmol/mg y al desplazar con 1  $\mu$ L de veneno la unión específica fue de 0.9 pmol/mg de proteína (Fig. 9).

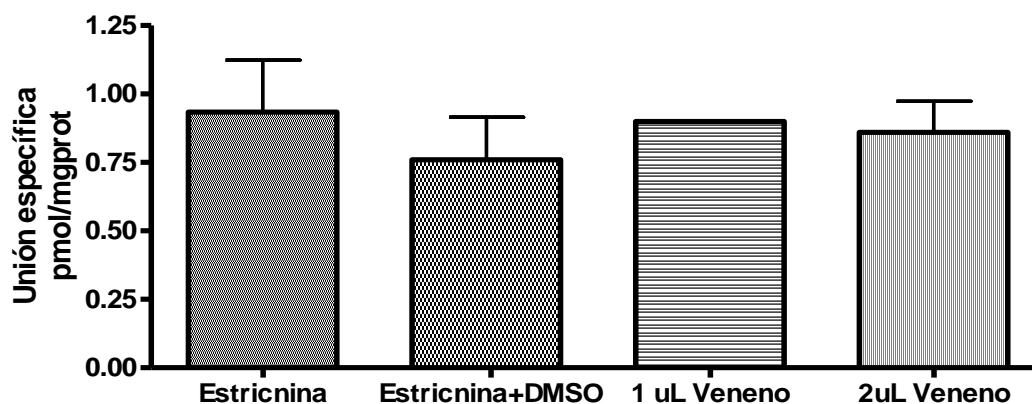


Figura 9. Unión específica de estriquina-<sup>3</sup>H a las membranas sinaptosomales de la médula de la rata en presencia de veneno total de *C. spurius* (1 y 2  $\mu$ ), estriquina y estriquina +DMSO al 0.1%. La unión específica de estriquina se realizó con una concentración 200 $\mu$ M del ligando radioactivo. Los valores son el promedio de tres a ocho experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$  el error estándar. No se encontró diferencia significativa al comparar los valores de unión específica encontrados al desplazar con estriquina, estriquina + DMSO al 0.1%( $p=0.51$ ) y con el veneno total ( $p=0.7351$ ).



## DISCUSIÓN

Algunos animales han desarrollado una serie de venenos; estos animales son capaces de inmovilizar a otro debido a que uno de los componentes del veneno puede ser altamente potente y específico en algún receptor del sistema nervioso y/o muscular (Adams y Olivera, 1994).

Estos venenos generalmente están compuestos por péptidos y trazas de compuestos no proteicos tales como carbohidratos y sales. Cuando estas molécula son aisladas de venenos, se les denomina toxinas (Meier y Stocker, 1995).

Las toxinas son producidas por una gran variedad de organismos tanto terrestres como marinos. Estas toxinas han sido utilizadas a lo largo del tiempo por diversas culturas en el ámbito ceremonial, medicinal o en la vida cotidiana por ejemplo en la caza (Schultes y Robert, 1992). Muchas neurotoxinas han sido utilizadas con fines terapéuticos, de diagnósticos y como insecticidas (Casida, 1972 y Holmstedt y Kline, 1979). En el campo científico las toxinas son una importante herramienta para estudiar los mecanismos fisiológicos y moleculares del sistema nervioso (Adams y Olivera, 1994). Sin embargo con el avance de la clonación molecular y el incremento en el número de canales y receptores identificados, surge la necesidad de tener neurotoxinas altamente específicas (Adams y Olivera, 1994).

En el Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la UNAM se han caracterizado algunos péptidos del veneno de la especie *Conus spurius* con actividad sobre el RnACh, que al igual que el RGly pertenece a la misma superfamilia de receptores con asa de cisteína (López-Vera et al., 2007).

En este sentido en el presente trabajo se demostró por primera vez que en el veneno del caracol *C. spurius* existen péptidos con la capacidad de unirse al receptor de glicina.

La unión específica de la glicina-<sup>3</sup>H a las membranas sinaptosomales de la médula de la rata representó el 64% de la unión total. Este valor es semejante al reportado para otras regiones del sistema nervioso (Velázquez-Fores 2005).

El obtener una unión específica de glicina-<sup>3</sup>H saturable en las membranas sinaptosomales de la médula espinal de la rata con respecto al tiempo y a la concentración de glicina con una cinética de tipo sigmoide obedece a la existencia de un sistema específico de unión para glicina. En trabajos previos se observó que la unión específica de glicina-<sup>3</sup>H en membranas sinaptosomales de retina de rana presentó una cinética de tipo sigmoide que se logró abatir después de varios pasos de congelación y lavado (Pérez-León, 1994); en las membranas totales de retina de rata, a pesar de que el tejido se lavó y congeló en repetidas ocasiones, no se pudo eliminar dicho efecto (Velásquez, 2005); este mismo fenómeno se observó, en el presente trabajo, en membranas sinaptosomales de médula espinal de rata indicando, que el RGly presenta un comportamiento de tipo sigmoide tanto

en médula espinal como en retina. El análisis de Scatchard reveló una gráfica característica de un sistema en el que existen al menos dos sitios de unión para el ligando (glicina) que son cooperativos (Segel, 1975) con una  $K_D$  de 184 nM, lo que confirma una alta afinidad de la glicina por su receptor; este resultado semejante al reportado en otros sistemas glicinérgicos en donde la  $K_D$  fue de 112 nM en retina de rata (Velázquez-Flores, 2005) y de 211 nM en médula de rata (Kishimoto et al., 1981).

Cabe mencionar que la estriquina es el antagonista por excelencia del receptor de glicina con una afinidad mayor incluso que la propia glicina. El antagonismo de la estriquina es el criterio farmacológico al que se recurre con mayor frecuencia para proponer que una respuesta electrofisiológica es provocada por la glicina (Pérez-León y Salceda, 1996), lo que ha permitido caracterizar el receptor de glicina en diferentes regiones del sistema nervioso. En este trabajo la unión específica de estriquina representó el  $38.4\% \pm 5.7\%$  de la unión total, valor similar al provocado por el veneno total de *C. spurius*, este valor es mayor al reportado para las membranas totales de la retina de la rata (27%) (Velázquez-Flores, 2005) pero menor al de membranas sinaptosomales en retina de bovino y de rana (Pérez-León y Salceda, 1995).

Estos resultados indican que la médula espinal de rata presenta un receptor de glicina de alta afinidad y que es sensible a la estriquina y al veneno de *C. spurius*.

Debido a que fue utilizado el veneno total de *C. spurius* no es posible determinar cuál de los componentes del veneno interactúa con el receptor de glicina.

Sin embargo, podemos anticipar que la actividad de este componente sea antagónica, debido a que la mayoría de las conotoxinas estudiadas presentan esta actividad.



## CONCLUSIONES

- La médula espinal de rata presenta un receptor de glicina de alta afinidad y que es sensible a la estriquina y al veneno de *C. spurius*.
- El veneno del caracol marino *Conus spurius* contiene por lo menos un péptido capaz de interactuar de forma directa con el RGly.
- El péptido o (péptidos) que interactúa con el RGly es hidrofóbico.

## REFERENCIAS

Adams, M. E. y B.M. Olivera. 1994. Neurotoxins: Overview of an emerging research technology. Trends Neurosci. 17:151-155.

Akagi, H., K. Hirai, F. Hishinuma. 1991. Cloning of a glycine receptor subtype expressed in rat brain and spinal cord during a specific period of neuronal development. FEBS Lett 281: 160-166.

Augustine, G.J., M.P. Charlton, S.J. Smith. 1987. Calcium action in synaptic transmitter release. Annu. Rev. Neurosci. 10: 633-693.

Barnes, R.D. 1985. Zoología de los invertebrados. Editorial Interamericana. México. pp.335-403.

Brusca, R.C., G.J. Brusca. 1990. Invertebrates. Sinauer Associates. Sunderland. p. 992

Casida, J. E. 1972. Pyrethrum, the Natural Insecticide. Academic Press. New York.

Craig, A.G. y B.M. Olivera. 1999. Post-translationally modified peptides from *Conus* venom. Eur J Biochem 264: 271-275.

Craig, A.G., G. Zafaralla, L.J. Cruz, A.D. Santos, D.R. Dykert, J.E. Rivier, W.R. Gray, J. Imperial, R.G. Sporning, H. Terlau, P.J. West, D. Yoshikami y B. M. Olivera. 1998. An O-glycosylated neuroexcitatory *Conus* peptide. *Biochemistry* 37: 16019-16025.

Daly, E. C. 1990. The biochemistry of glycinergic neurons. En Ottersen, O. P y J. Storm-Mathisen (Eds). *Glycine neurotransmission* John Wiley & Sons. New York. P Natural Insecticide pp.25-66

Devingnot, V., L. Prado de Carvalho, P. Bregestovski, C. Goblet. 2003. A novel glycine receptor  $\alpha$ Z1 subunit variant in the zebrafish brain. *Neuroscience* 122: 449-457

Ellison, M., F.Gao, H.L.Wang, S.M. Sine, J.M.McIntosh, B.M.Olivera. 2004.  $\alpha$ -conotoxins Iml and Imll target distinct regions of the human  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor and distinguish human nicotinic receptor subtypes. *Biochemistry* 43:16019-16026.

England L.J., J. Imperial, R. Jacobsen, A.G. Carig, J. Gulyas, M. Akhtar, J. River, D. Julius, B.M. Olivera. 1998. Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science* 281: 575-578.

Fainzilber, M., J.C. Lodder, R.C. Van Der Schors, K.W. Li, Z. Yu, A. L. Burlingame. 1998. A novel hydrophobic  $\omega$ -conotoxin blocks molluscan dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Biochemistry* 35: 8748-8656.

Grenningloh, G., A. Rienitz, B. Schmitt, C. Methfessel, M. Zensen, K. Beyreuther, E.D. Gundelfinger, H. Betz. 1987. The strychnine binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 328: 215-220.

Grenningloh, G., I. Pribilla, P. Prior, G. Multhaup, K. Beyreuther, O. Taleb, H. Betz. 1990. Cloning and expression of the 58 kd  $\beta$  subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron* 4: 963-970

Halstead, B. W. 1988. *Phylum Mollusca: Snails, Bivalves, Octopuses, Etc.* En: *Poisonous and Venomous Marine Animals of The World*. 2<sup>a</sup> Edición. The Darwin Press Inc. Princeton. pp. 243-262.

Harvey, R.J., V. Schmieden, A. Von Holst, B. Laube, H. Rohrer, H. Betz. 2000. Glycine receptors containing the  $\alpha 4$  subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge. *Eur. J Neurosci* 12: 994-1001.

Hille, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3<sup>a</sup> edición. Sinauer. Sunderland. p. 814.



Holmstedt, B. y N. S. Kline. 1979. Ethnopharmacologic Search for Psicoactive Drugs, Raven Press. New York. pp. 385-391.

Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cardene, B.T. Chait, R. Mackinnon. 2003a. X-ray structure of the voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. Nature 423: 42-48.

Jimenez, E.E., A.G. Craig, M. Watkins, D.R. Hillyard, W.R. Gulyas, J.E. Rivier, L.J. Cruz, B.M. Olivera. 1997. Bromocontryphan: post-translational bromination of tryptophan. Biochemistry 36: 989-994.

Kandel, E.R., J.H. Schwartz, T.M. Jessell. 2002. Principles of Neural Science 4<sup>a</sup> edición. McGraw Hill. New York. p.p 197-202 .

Kimball, J. W. 1986. Biología. 4<sup>a</sup> edición. Edt. Addison-Wiley Iberoamericana. New York. pp. 379-690.

Kishimoto, H., J.R. Simon, M.H. Aprison. 1981. Determination of the equilibrium dissociation constants and number of glycine binding sites in several areas of the rat central nervous system, using a Na<sup>+</sup> independent system. J. Neurochem. 37:1015-1024.

Kneussel, M. y H. Betz. 2000 Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. Trends Neurosci 23: 429-435.

Kohn, A. J. 1959. The ecology of *Conus* in Hawaii. Ecol. Monogr 28: 47-90.

Kohn, A. J. 1985. Evolutionary ecology of *Conus* on Indo-Pacific coral reefs. Proc Fifth Int Coral Reefs Cong 4: 139-144.

Kohn, A. J., M. Omori, H. Yamakawa, Y. Koike. 2001. Maximal species richness in *Conus*: diversity, diet and habitat on reefs of northeast Papua New Guinea. Coral Reefs Cong 20: 25-38.

.

Le Gall, F., P. Favreau, E. Benoti, C. Mattei, F. Bouet, J. L. Menou, A. Menes, Y. Letourneux, J. Molgo. 1997. A new conotoxin isolated from *Conus* venom acting selectively on axon and motor nerve terminals through a Na<sup>+</sup>-dependent mechanism. Eur J Neurosci 11: 3134-3142.

Legendre, P., D.W.Ali, P.Drapeu. 2000. Recovery from open channel block by acetylcholine during neuromuscular transmission in zebrafish. J Neurosci 20: 140-148.

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

López-vera, J., M.B.Aguilar, E.Schiavon, C.Marinzi, E.Ortiz, R.Restano Cassulini, C.V.Batista, L.D.Possani, E.P.Heimer de la Coteria, F. Peri, B.Becerril, E.Wanke. 2007. Novel  $\alpha$ -conotoxin from *Conus spurius* and the  $\alpha$ -conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. FEBS J 274: 3972-3985.

Loughnan, M, T. Bond, A. Atkins, J. Cuevas, D.J. Adams, N.M. Broxton, B.G. Livett, J.G. Jones, P.F. Alewood, R.J. Lewis. 1998.  $\alpha$ -Conotoxin Epl, a novel sulfated peptide from *Conus episcopatus* that selectively targets neuronal nicotinic acetylcholine receptors. J Biol Chem 273: 15667-15674.

Lowry, O.H., N.J. Rosebourh, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193: 265-75.

Luna-Ramírez, K. S. 2006. Purificación y Caracterización Química y Biológica de péptidos del veneno de *Conus spurius*. Tesis de Maestría en Ciencias.UNAM pp. 15-44.

Matzenbach, B., Y. Maulet, L. Sefton, B. Courtier, P. Avner, J. L. Guénet, H. Betz. 1994. Structural analysis of mouse glycine receptor  $\alpha$  subunit genes. J. Biol. Chem. 269: 2607-2612.

McIntosh, J. M. , D. Yoshikami, E. Mache, D.B. Nielsen, J.E. River, W.R. Gray, B.M. Olivera. 1990. A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity,  $\alpha$ -conotoxin Iml. *J Biol Chem* 269: 241-244.

Meier, J. y K. H. Stocker. 1995. Biology and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms. En: Meier, J. y J. White, editores. *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press Boca Raton. pp. 367-412.

Miljanich, G.P. y J. Ramachandran. 1995. Antagonists of neuronal calcium channels: Structure, function, and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 707-734  
Miljanich, G.P. 2004 Neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr Med Chem*; 11 (23):29-40.

Miller, C. 1992. Ion channel structure and function *Science* 258:240-241.

Nicke, A., S. Wonnacott, R.J.Lewis.2004.  $\alpha$ -Conotoxins as tools for the elucidation of structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Eur J Biochem.* 271: 2305-2319.

Olivera, B. M. 2002. *Conus* venom peptides: reflections from the biology of clades and species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33: 25-42.

Olivera, B. M. y L. J. Cruz. 2001. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon* 39: 7-14.

Olivera, B. M., R. Teichert. 2007. Diversity of the neurotoxic *Conus* peptides. *Mol. Interv.* 7: 251-260.

Olivera, B. M., J. Rivier, C. Clark, C. A. Ramilo, G. P. Corpuz, F. C. Abogadie, E. E. Mena, S. R. Woodward, D. R. Hillyard, L. J. Cruz. 1990. Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science* 249: 257-263.

Pérez-León, A. 1994. Caracterización de la unión de <sup>3</sup>H-glicina y <sup>3</sup>H-estricnina a las membranas sinaptosomales de la retina de la rana. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica básica. UNAM.

Pérez-León, A. y R. Salceda. 1995. Different specific binding sites of <sup>3</sup>H-glycine <sup>3</sup>H-strychnine in synaptosomal membranes isolated from retina. *Neurochem Res.* 20: 915-922.

Pérez-León, A. y R. Salceda. 1996. El receptor post-sináptico de glicina. *Ciencia* 47: 177-189.

Pérez-Reyes, L.I. 2009. Bloqueo de canales de potasio K<sub>v1</sub> por la conotoxina Sr11a. Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM.

Pourcho, G., J.Goebel. 1990. Autoradiographic and immnocytochemical studies of glycine-containing neurons in the retina. En: Ottersen, O.P y J. Strom-Mathisen. Glycine neurotransmission. Ed.John Wile & Sons. New York. pp. 25-66.

Rampon, C., P.H.Luppi, P.Peyron, M. Jouvét.1996.Distribution of glycine – immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience* 75:737-755.

Randall, A.D. 1998. The molecular basis of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel diversity: is it time for T?. *J Membr Biol.* 161: 207-213.

Röckel, D., W. Korn, A.J. Khon. 1995. Manual of living Conidae. Wiebaden Verlg Christa Hemmen. pp. 5-13.

Schultes, R.E. y F. R. Robert. 1992. Vine of the Soul: Medicine Men, Their Plants and Rituals in the Colombian Amazonia. Synergetic Press. Oracle, Ariz. P. 190.

Segel, H.I. 1968. ENZYME Kinetics Behavior and analysis of repid equilibrium and stedy-state enzyme system. En: A wiley-interscience publication. Ed John Wiley & Sons, New York.

Segel, H.I. 1975. ENZYME Kinetics Behavior and analysis of repid equilibrium and stedy-state enzyme system. En: A wiley-interscience publication. Ed John Wiley & Sons, New York.

Shongdahl, J. 1973. The venom apparatus of the Atlantic cone *Conus spurius*. Bull Mar Sc 23:600-612.

Shongdahl, J., C.E.Lane. 1970. Some pharmacological characteristics of the venom of the alphabet cone, *Conus spurius atlanticus*. Toxicon 8: 289-292.

Sola, M., V. Bavro, J.Timminis, T. Franz, S. Blum, G. Schoehn, R.Ruigrok, I.Paamann, T.Saiyed, G.O'Sullivan, B.Schmitt, H.Betz, W.Weissenhorn.2004. Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. The Embo J.23: 2510-2519.

Teichert, R. W., J.Rivier, J.Torres, J.Dykert, C. Miller, B.M.Olivera. 2005. A uniquely selective inhibitor of the mammalian fetal neuromuscular nicotinic acetylcholine receptor. J Neurosci 25:732-736

Terlau, H., M. Stocker, K.J. Shon, J.M. McIntosh, B.M. Olivera. 1996. M-Conotoxin MrVIA inhibits mammalian sodium channels but not through Site I. Neurosci 76: 1423-1429.

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

Tree of Life Web Project. 1995. Mollusca. Snails, clams, squids, octopi, chitons, and tusk shells. Version 01 January 1995(temporary). <http://tolweb.org/Mollusca/2488/1995.01.01> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/> .

Velázquez-Flores, M. 2005. Caracterización del receptor de glicina en la retina de la rata. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

Vázquez-Barder, A., A. Gracia. 1994. Macroinvertebrados bénticos de la plataforma continental del sureste del Golfo de México. Publicaciones especiales del Instituto de Biología, UNAM. México. pp.

[www.conoshell.net](http://www.conoshell.net) .

Young, A.B., Snyder, S.H. 1973. Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A; 70(10). Pp. 2832-2836.

Zafra, F., C.Aragón, C.Gómez.1997. Molecular of glycinergic neurotransmission. Mol Neurobiol 14:117-141.

Zamora-Bustillos, R., M.B.Aguilar, A.Falcón, E.P. Heimer de la Coter. 2009. Identification by TC-PCR, of four novel T-I-Superfamily conotoxins from the vermivorous snail *Conus spurius* from the Gulf of Mexico. Peptides 30: 1396-1404.