



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Biología Experimental

**Efecto modulador del receptor para el Ácido gamma-amino butírico tipo A por
toxinas de caracoles marinos del género *Conus***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)

PRESENTA:

BIÓL. ELBA CAMPOS LIRA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (FACULTAD DE CIENCIAS)

COMITÉ TUTOR: DR. ATAULFO MARTÍNEZ TORREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DR. IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR
DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MÉXICO, D.F. febrero de 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
Biología Experimental

**Efecto modulador del receptor para el Ácido gamma-amino butírico tipo A
por toxinas de caracoles marinos del género *Conus***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)

PRESENTA:

BIÓL. ELBA CAMPOS LIRA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (FACULTAD DE CIENCIAS)

COMITÉ TUTOR: DR. ATAULFO MARTÍNEZ TORREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DR. IGNACIO LÓPEZ GONZÁLES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR
DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MÉXICO, D.F. febrero de 2014



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/100/14

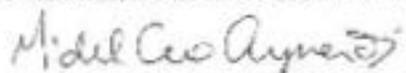
ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas celebrada el día 11 de noviembre de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del (la) alumno (a) CAMPOS LIRA ELBA con número de cuenta 301131326 con la tesis titulada "Efecto modulador del receptor para el Ácido gamma-amino butírico tipo A por toxinas de caracoles marinos del género *Conus*", realizada bajo la dirección del (la) DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA:

Presidente: DR. ATALFO MARTÍNEZ TORRES
Vocal: DR. IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ
Secretaría: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANFI IFS
Suplente: DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE
Suplente: DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universidad, D.F., a 5 de febrero de 2014

DRA. MARÍA DEL CORCRA ZÚÑIGA AHNACA
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/gif

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de la beca de manutención durante el desarrollo de la maestría en el Posgrado en Ciencias Biológicas CVU/Becario: 365662/245546.

Al apoyo por parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN213808-3. Así también a los proyectos CONACyT 153915 y 15809.

A mi Comité Tutor integrado por:

Dr. José Estuardo López Vera
Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Dr. Gerardo Corzo Burguete
Dr. Ataúlfo Martínez Torres
Dr. Ignacio López González
Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Agradecimientos

Al Dr. Estuardo López, mi tutor, por su paciencia, apoyo, orientación y sobre todo por la amistad que me brindó durante estos años.

A la Dra. Rocío Salceda por sus consejos y las sugerencias hechas a este trabajo. Sus observaciones siempre fueron importantes para mí.

Al Dr. Gerardo Corzo por las observaciones a este trabajo, los consejos y el apoyo tanto académico como moral.

Al Dr. Ataúlfo Martínez por el material genético brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Manuel Aguilar por la ayuda con los experimentos de secuenciación, la disposición de su laboratorio para ello y por la orientación en estos mismos.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, ya que el desarrollo de este trabajo se llevó a cabo en sus instalaciones.

A mis compañeros de laboratorio: Dalia, Artemisa, Angélica, Felipe, Luis, Eduardo, Haydee y Belem. Gracias por los grandes momentos vividos en ese laboratorio.

A mi familia, por estar siempre apoyándome, por no permitir darme por vencida, en especial mi madre, mis abuelas, mi tía Graciela y mi prima Zyanya que es como una hermana pequeña para mí, las amo.

Especialmente a mis padres porque, a su manera, siempre me muestran su apoyo y su cariño.

A mi tío David por ser siempre como un segundo padre para mí.

A mi novio Alejandro por todo el apoyo que me brinda, su cariño y comprensión fueron importantes para finalizar este proyecto. Te amo.

De igual forma gracias a Kehta y Pablo por el apoyo, consejos y por hacerme sentir parte de su familia.

Por estar siempre conmigo, tras cada uno de mis pasos, esta tesis la dedico a mi hermosa familia, la cual se compone por mis padres Guadalupe Lira Valdez e Israel Campos Mancha. Mis segundos padres Graciela Campos Mancha y David Campos Mancha.

Y con especial cariño a mis abuelas Dolores Mancha y Ana María Valdez

Los amo profundamente a todos

Índice

Lista de figuras y tablas _____	1
Resumen _____	2
Abstract _____	2
Introducción _____	4
Objetivo general _____	5
Objetivos particulares _____	5
Antecedentes _____	6
1. Caracoles del género <i>Conus</i> _____	6
1.1 Biología del género <i>Conus</i> _____	7
2. Componentes del veneno _____	10
2.1 Farmacología de conotoxinas _____	14
3. Conotoxinas de la especie <i>Conus spurius</i> _____	27
4. Receptores con asa de cisteína _____	29
4.1 Receptores GABA _____	30
Metodología _____	38
Resultados _____	42
Discusión _____	61
Conclusiones _____	67
Perspectivas _____	68
Bibliografía citada _____	69
Apéndice A _____	83

Lista de figuras y tablas

Fig. 1 Caracoles del género <i>Conus</i> .	6
Fig. 2 Distribución del género <i>Conus</i> .	8
Fig. 3. El aparato de veneno de los caracoles del género <i>Conus</i> .	9
Fig. 4 Modificaciones post-traduccionales de los conopéptidos.	12
Fig. 5 Diagrama de una subunidad de receptor con ascas de cisteína.	30
Fig. 6 Esquema general de los receptores GABA.	33
Fig. 7 Modelo de receptor GABA _A .	34
Fig. 8 Diagrama de la micro-inyección de ovocitos de <i>X. laevis</i> con el material.	41
Fig. 9 Evaluación de la respuesta ante la incubación de la picrotoxina.	44
Fig. 10 Corrientes de RGABA _{ρ1} .	45
Fig. 11 Cromatograma del extracto crudo de veneno de <i>Conus spurius</i> C. s. I.	47
Fig. 12 Pruebas electrofisiológicas de las fracciones FV, FVIII y FIX (3 μl).	48
Fig. 13 Pruebas electrofisiológicas de las fracciones FV, FVIII y FIX (9 μl).	48
Fig. 14 Cromatograma del extracto crudo de veneno de C. s. II.	50
Fig. 15 Actividad de la fracción FXV del veneno C. s. IV.	51
Fig. 16 Panel A. Cromatograma del extracto crudo de veneno de C. s. III.	52
Fig. 17 Actividad de la subfracción Sf I.	54
Fig. 18 Actividad de la subfracción Sf IV.	55
Fig. 19 Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene a la Sf I.	57
Fig. 20 Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene a la Sf IV.	57
Fig. 21 Cromatogramas de la secuenciación de Edman de la subfracción Sf I.	58
Tabla 1. Conotoxinas ricas en puentes disulfuro.	11
Tabla 2. Conotoxinas con dos, uno o ningún puente disulfuro.	13
Tabla 3. Resumen de las isoformas de GABA _A , localización y función.	33
Tabla 4. Linearización de subunidades para GABA _A .	40
Tabla 5. Rendimientos del material genético de las subunidades para el receptor GABA _A .	42
Tabla 6. Porcentaje de inhibición del receptor GABA _{ρ1} en presencia de diferentes fracciones del veneno de <i>Conus spurius</i> (Lote cero).	45
Tabla 7. Fracciones correspondientes entre fraccionamientos: Lote cero y lote C.s. I.	46
Tabla 8. Efecto sobre RGABA _{ρ1} de las fracciones FV, FVIII y FIX.	47
Tabla 9. Fracciones del lote C.s. II. Unidades de veneno por ensayo, obtenidas calculando el área bajo la curva de cada fracción.	51
Tabla 10. Unidades de veneno por microlitro de cada subfracción de C.s. III.	54
Tabla 11. Porcentajes de inhibición con las subfracciones obtenidas a partir del lote C. s. III.	55
Tabla 12. Estructuras primarias de las subfracciones Sf I y Sf IV y masas moleculares.	60
Tabla 13. Secuencia de la estructura primaria de la conorfamida-Sr1 y las dos variantes de la Sf I.	65
Tabla 14. Secuencia de la estructura primaria de la conotoxina sr5a y la variantes de la Sf IV.	66
Gráfico 1. Promedio de los porcentajes de actividad de las fracciones FI-XXIII.	49

Resumen

Los caracoles marinos del género *Conus* se conocen no solo por la belleza de sus conchas, sí no también por los efectos que el veneno de estos depredadores tiene sobre sus presas e incluso sobre el ser humano. En la actualidad se conocen numerosas y diferentes conotoxinas o conopéptidos que tienen efecto sobre diversos blancos moleculares tales como receptores acoplados a proteínas G, transportadores de neurotransmisores y canales iónicos voltaje y ligando dependientes por mencionar algunos.

Dentro de la gran gama de receptores a los cuales las conotoxinas se unen, cabe destacar a los receptores pertenecientes a la superfamilia de asa de cisteína. Entre estos están los receptores nicotínicos de acetilcolina y el receptor de serotonina cuyas conotoxinas inhibitorias son las α -conotoxinas y la σ -conotoxina, respectivamente. El receptor de glicina y el receptor de ácido gamma-amino butírico también forman parte de esta superfamilia y sobre los cuales aún no existe algún reporte de una posible modulación de su actividad por conotoxinas. Dada la semejanza estructural entre estos receptores, en este trabajo nos dedicamos a la búsqueda de conotoxinas presentes en el veneno de la especie *Conus spurius* que modulen al receptor para el ácido gamma-amino butírico homomérico formado por la subunidad $\rho 1$ (RGABA_A $\rho 1$).

A través de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-FR) se llevó a cabo la separación de los componentes del veneno de *C. spurius*, además se expresó de manera heteróloga el RGABA_A $\rho 1$ en ovocitos de *Xenopus laevis*. Una vez confirmada la expresión del receptor, por medio de la técnica electrofisiológica de fijación de voltaje de célula completa por dos electrodos, fueron evaluados los efectos que los componentes del veneno tenían sobre el receptor, encontrando dos componentes que presentan actividad inhibitoria y potenciadora respectivamente.

Abstract

Conus sea snails are not only known for the beauty of their shells, but also for the effects these predators' venom has on their prey and even on the human being. To date, various and different conotoxins or conopeptides are known that have an effect on several molecular targets such as G-protein coupled receptors, neurotransmitter transporters and voltage and ligand-gated ion channels, to describe only a few.

Among the wide variety of receptors to which conotoxins adhere, it is worth pointing out those belonging to the cys-loop superfamily. These include nicotinic acetylcholine receptors and the serotonin receptor, whose inhibitory conotoxins are the α -conotoxins and the σ -conotoxin, respectively. Both glycine and gamma-aminobutyric acid are also part of this superfamily, though there is no reported activity of conotoxins on them yet. Due to the structural similarity between these receptors, this work deals with the search for conotoxins present in the venom of *Conus spurius* that may modulate the gamma-aminobutyric acid homomeric receptor formed by $\rho 1$ subunit (GABA_A $\rho 1$ R).

The separation of *C. spurius*' venom components was carried out through Reversed Phase High performance liquid chromatography (RP-HPLC). Additionally, GABA_A $\rho 1$ R was heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes. Once the receptor's expression was confirmed via an electrophysiological two electrode voltage clamp technique, the effects of the venom components on the receptor were evaluated. Two components displayed inhibitory and enhancer activity on the GABA_A $\rho 1$ R.

Introducción

Durante años los productos naturales para la investigación científica y farmacéutica, hablando específicamente de metabolitos secundarios, se han obtenido de organismos terrestres como plantas y animales. Sin embargo, en los últimos años la obtención de estos productos en ambientes marinos ha adquirido una gran importancia, debido al desarrollo de técnicas de recolección de estos y al difícil acceso o agotamiento de productos terrestres, además del creciente interés por un campo menos explotado [Ordaz *et al.*, 2010]. Asimismo las condiciones físico-químicas del ambiente marino, tales como su amplio rango termal, presión, nutrientes y extensas zonas fóticas y no fóticas, permiten que toda clase de organismos sintetizen una amplia variedad de moléculas con características estructurales y moleculares muy diferentes a las del medio terrestre [Jha & Zi-rong, 2004].

Alrededor de los años setenta se da la revolución en este campo con el descubrimiento de dos compuestos hoy en día de gran importancia: la tetradotoxina (Peces) y la saxitoxina (Dinoflagelados); ambos con una relevante aplicación en biomedicina debido a los efectos que tienen sobre canales de sodio [Garateix, 2005]. En la misma década de los 70's toma fuerza el estudio científico de los venenos de los caracoles del género *Conus*, debido al efecto letal que implica para el ser humano [Endean *et al.*, 1974]. Posteriormente y hasta la fecha, las toxinas que componen los venenos de los caracoles de este género son herramientas en investigación básica de neurobiología, fisiología y farmacología [Miljanich, 1997; Olivera, 2000].

Objetivo General

- Encontrar conotoxinas que modulen la actividad del receptor $GABA_A$, a partir de veneno crudo de la especie *Conus spurius*.

Objetivos particulares

- Identificar la presencia de conotoxinas con efecto sobre el receptor $GABA_A$.
- Purificar las conotoxinas activas.
- Determinar la secuencia primaria de las conotoxinas con actividad sobre el receptor $GABA_A$.

Antecedentes

1. Caracoles del género *Conus*

En el pasado los caracoles marinos del género *Conus* así llamados por la forma de su concha, eran conocidos y apreciados a nivel mundial por la belleza de sus conchas y por el valor que éstas alcanzaron (Fig. 1). El interés sobre este género de caracoles cambió, debido al conocimiento del efecto letal del veneno de algunos de ellos sobre el ser humano [Cruz & White, 1995]. Posteriormente la investigación sobre los componentes de estos venenos se ha incrementado considerablemente hasta nuestros días [Olivera, 2000; Terlau & Olivera 2004].



Fig.1 Caracoles del género *Conus*. Primera hilera de derecha a izquierda *C. textile* y *C. magus*. Segunda hilera; *C. circumcissus*, *C. geographus* y *C. dusaveii*. Tercera hilera, *C. gloriamaris* y *C. milneedwardsi*. Cuarta hilera, *C. ammiralis*, *C. bandanus vidua* y *C. hirasei*. Tomada de Olivera 1997.

1.1 Biología del género *Conus*

El género *Conus* comprende caracoles marinos carnívoros que surgen aproximadamente hace 50 millones de años, lo cual nos permite decir, hablando en términos geológicos y evolutivos, que es un grupo relativamente reciente [López-Vera *et al.*, 2006]. Es solo después de la extinción masiva del Cretácico que se tiene registro de ellos y se piensa que la desaparición de los crustáceos predadores, principalmente los amonitas, hizo posible la radiación y diversificación de este género [Olivera *et al.*, 1990; Olivera, 1997].

La especiación de los conos, como también se le llama a los caracoles pertenecientes al género *Conus* [Aguilar *et al.*, 2005] ha sido rápida, ya que hasta la fecha se tiene reportadas 500 especies vivientes a nivel mundial [Han *et al.*, 2008] y 70 de estas habitan en las costas mexicanas [Flores-Torres, 2009; López-Vera *et al.*, 2006]. Todas las especies del género *Conus* se agrupan dentro de la familia Conidae, perteneciente al suborden Toxoglossa junto con las familias Terebridae y Turridae, siendo el aparato venenoso que poseen la característica que los unifica dentro de este grupo [Taylor & Morris, 1988; Meyer, 2001; Espiritu *et al.*, 2001].

Los caracoles *Conus* se distribuyen principalmente en mares tropicales y subtropicales (Fig. 2), habitan generalmente en arrecifes coralinos y en zonas intermareales en suelos arenosos y rocosos [López-Vera *et al.*, 2006], aunque algunas especies se han adaptado a aguas frías y algunos de los especímenes más grandes se han encontrado a profundidades que van más allá de los 100 m [Kohn *et al.*, 2001].

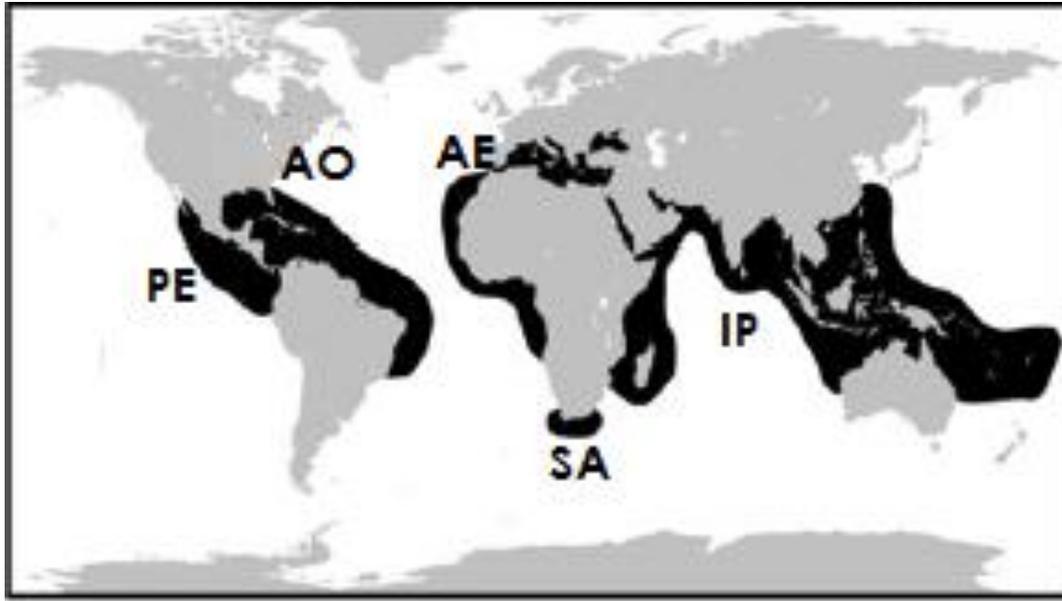


Fig. 2 Distribución del género *Conus*. Incluye zonas tropicales y subtropicales del Atlántico Oeste y caribe (AO), Atlántico Este y Mediterráneo (AE), Pacífico Este (PE), Sudáfrica (SA) y el Indo-pacífico (IP). Tomado y modificado de Kaas, *et al.*, 2010.

Los conos han desarrollado como estrategia evolutiva la utilización de veneno para la captura de sus presas. Todas las especies del género cuentan con un aparato venenoso, el cual consiste de la probóscide, un conducto de veneno, donde se sintetiza y almacena el veneno, un bulbo venenoso o muscular y un saco radular [Edean & Duchemin, 1967; Songdahl, 1973; Bingham *et al.*, 1996].

Como puede observarse en la Fig. 3, el conducto de veneno es un tubo largo y enrollado que se une al bulbo venenoso en un extremo y el extremo opuesto entra en la faringe. El saco radular, está compuesto por dos lóbulos, uno dorsal o brazo largo en donde se producen las rádulas o dientes modificados y el lóbulo ventral o brazo corto en donde se almacenan los dientes maduros. Estos dientes modificados comúnmente llamados arpones, son huecos y funcionan como aguja hipodérmicas, inyectando el veneno en la presa [Songdahl, 1973; Marshall *et al.*, 2002; Olivera, 2002].

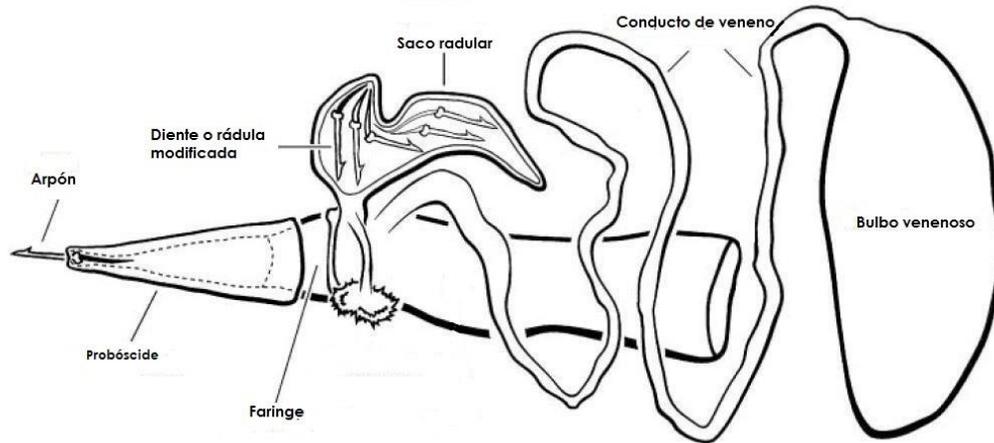


Fig. 3. El aparato de veneno de los caracoles del género *Conus*. (Tomada y modificada de Olivera, 2002).

Estos cazadores son de visión pobre y hábitos nocturnos, sin embargo la detección de la presa se logra a través de señales químicas y cambios de presión; una vez detectada la presa, el arpón se mueve hacia la faringe desde el saco radular, adelante de donde se inserta el conducto de veneno, recorriéndose hasta la probóscide, donde una vez acomodado y cargado de veneno, está listo para inyectar a la presa [Marshall *et al.*, 2002, Wang & Chi, 2004].

Los *Conus* se alimentan de diferentes tipos de presas y se clasifican en grupos artificiales basados bajo este criterio [Olivera, 1997]. El grupo más abundante es el de los vermívoros, los cuales cazan gusanos poliquetos, aunque algunos también se alimentan de hemicordados y equiuroideos; el segundo grupo es el de los molusquívoros, que se alimentan de otros gasterópodos; el tercer grupo lo forman los que se alimentan de peces o piscívoros (el más impresionante debido a la disparidad entre presa y depredador), no obstante el número de animales que pueden ser envenenados por estos caracoles va más allá de estos tres grupos artificiales [Olivera *et al.*, 1990; Terlau *et al.*, 1996].

2. Componentes del veneno

Los venenos de *Conus* comprenden más de 50, 000 componentes activos, muchos de ellos actúan sobre el sistema nervioso, y la mayoría son péptidos pequeños. Cada una de las especies de este género puede producir entre 100-200 péptidos. En general, estas toxinas llegan a presentar una longitud que va de 12 hasta 30 aminoácidos, que en comparación con las toxinas de otros animales venenosos compuestas hasta de 80 aminoácidos son realmente pequeñas [Woodward *et al.*, 1990; Olivera *et al.*, 1999]. Algo notable de estos péptidos es la riqueza de su diversidad química, la cual se deriva de la variedad de secuencias y alta frecuencia de modificaciones post-traduccionales presentes en la mayoría de estos [Kaas *et al.*, 2010]. Existen varias formas de clasificar a los componentes de los venenos de los conos, sin embargo la más general es la que divide a estos péptidos en dos grandes grupos, aquellos que son ricos en puentes disulfuro y los que tienen solo uno o ningún puente disulfuro, llamados conotoxinas [Lewis *et al.*, 2012] o conopéptidos, respectivamente [Kaas *et al.*, 2010]; en este escrito ambos términos se usarán de manera indiferente.

Las conotoxinas ricas en puentes disulfuro presentan una extraordinaria frecuencia de residuos de cisteína (Cys), que pueden encontrarse adyacentes o separados por hasta 6 aminoácidos de la siguiente Cys [Woodward *et al.*, 1990; Olivera *et al.*, 1999]. Los patrones de cisteínas de estos péptidos pueden permitir determinar a cuál de las 16 superfamilias genéticas descritas hasta ahora pertenecen y en ocasiones reflejan el blanco molecular que modulan estas toxinas [Lewis *et al.*, 2012]. Así también podemos decir que la clasificación de las conotoxinas puede basarse en superfamilias genéticas y familias farmacológicas (Tabla 1)

Tabla 1. Conotoxinas ricas en puentes disulfuro. De izquierda a derecha se muestra la definición del marco de cisteínas, que incluye nombre, número, patrón y conectividad de la cisteínas, familia genética a la que pertenecen y las familias farmacológicas que incluyen. Tomada y modificada de Kaas, *et al.*, 2010

Definición del marco de cisteínas				Super-familia genética	Familia farmacológica
Nombre	#cisteína s	Patrón de cisteínas	Conectividad s-s		
I	4	CC-C-C	(I-III, II-IV)	A	α , ρ
II	6	CCC-C-C-C	(I-IV, II-V, III-VI)	A,M	α
III	6	CC-C-C-CC	(I-IV, II-V, III-VI), (I-IV, II-IV, III-V), (I-V, II-IV, III-VI)	M	α , ι , k , μ
IV	6	CC-C-C-C-C	(I-V, II-III, IV-VI)	A,M	α , k , μ
V	4	CC-CC	(I-III, II-IV)	T	ϵ , μ
VI/VII	6	C-C-CC-C-C	(I-IV, II-V, III-VI)	I3, M, O1	δ , γ , k , μ , ω
VIII	10	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C		O2, O3	
IX	6	C-C-C-C-C-C	(I-IV, II-V, III-VI)	S	α , σ
X	4	CC-C-C	(I-IV, II-III)	P	
XI	8	C-C-CC-CC-C-C	(I-IV, II-VI, III-VII, V-VIII)	T	X
XII	8	C-C-C-C-CC-C-C		I1, I2,I3	I, k
XIII	8	C-C-C-CC-C-C-C		G	
XIV	4	C-C-C-C	(I-III, II-IV)	I2, O1	
XV	8	C-C-CC-C-C-C-C		A, J, L	α , k
XVI	4	C-C-CC		O2, V	
XVII	8	C-C-CC-C-CC-C		M	
XVIII	6	C-C-CC-CC			
XIX	10	C-C-C-CCC-C-C-C-C			
XX	10	C-CC-C-CC-C-C-C-C		Y	α
XXI	10	CC-C-C-C-CC-C-C-C			
XXII	8	C-C-C-C-C-C-C-C			
XXIII	6	C-C-C-CC-C			

Aun cuando la formación de puentes disulfuro es la modificación post-traducciona más extensa de los conopeptidos, otras modificaciones se presentan con una frecuencia considerable en estas toxinas, siendo las más importantes y abundantes la γ -carboxilación del glutamato [McIntosh *et al.*, 1984], y la hidroxilación de la prolina a 4-hidroxiprolina [Franco *et al.*, 2006], como se muestra en la Fig.4.

Otras modificaciones que se han encontrado en los conopéptidos es la bromación del triptófano, la epimerización de aminoácidos como la valina, leucina, triptófano y fenilalanina, la ciclación del amino terminal (glutamina), sulfación de la tirosina y la O-glicosilación [Han *et al.*, 2008].

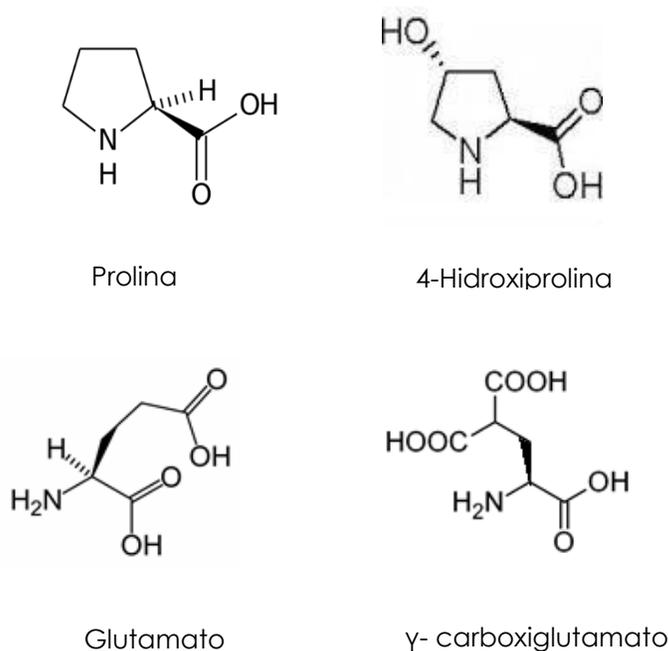


Fig. 4 Modificaciones post-traduccionales de los conopéptidos. Ejemplos más representativos, hidroxilación de la prolina y gamma carboxilación del glutamato.

La función de la mayoría de estas modificaciones aún es desconocida; sin embargo se cree que tiene efecto en la interacción específica con el blanco molecular y que intervienen en la estabilidad del plegamiento de algunos péptidos, sobre todo aquellos que carecen de residuos de cisteínas [Aguilar *et al.*, 2009]; en la Tabla 2 se enlistan algunas conotoxinas que presentan una o varias de estas modificaciones y sus blancos moleculares.

Tabla 2. Conotoxinas con dos, uno o ningún puente disulfuro. La tabla muestra los blancos moleculares de estos péptidos [Tertau y Olivera, 2004; Teichert, *et al.*, 2008; Lewis, *et al.*, 2012]

Familia		Blanco molecular
Contulakinas		Receptores de Neurotensina
Conantokinas		Receptores NMDA
Conorfamidas		¿?
Conopresinas	s-s	Receptores de vasopresina
Contrifanos	s-s	¿?
Ikot-Ikot		Receptores AMPA
Péptido-ρ	2(s-s)	Receptores Noradrenérgicos

Estudios recientes revelan que los conopéptidos pobres o carentes de Cys están estrechamente relacionados con aquellos ricos en residuos de cisteínas, los cuales forman puentes disulfuro en diferentes patrones. Por tanto la clasificación por la presencia y patrón de cisteínas no refleja la historia evolutiva de esta toxina, ya que es filogenéticamente irrelevante [Puillandre *et al.*, 2012].

Todos los conopéptidos son traducidos inicialmente como precursores o pre-propéptidos a través del mecanismo ribosomal convencional. Estos precursores consisten de la región-pre la cual es una típica secuencia señal en el extremo amino, seguido por una región-pro y finalmente la región de la toxina madura en el extremo carboxilo, siempre en una sola copia; todo dentro del marco abierto de lectura. Una vez terminada la traducción se lleva a cabo una ruptura proteolítica para obtener la toxina funcionalmente madura [Woodward *et al.*, 1990; Olivera *et al.*, 1999]. Asimismo, las modificaciones post-traduccionales son llevadas a cabo en las células del conducto de veneno, en donde se encuentran presentes la enzimas que las realizan [Bandyopadhyay *et al.*, 1998]. Estas enzimas encuentran la secuencia señal de unión dentro de la región-pro

del precursor, de igual manera esta secuencia indica a la enzima los residuos de aminoácidos que deben ser modificados dentro de la región de la toxina madura [Hooper *et al.*, 2000].

2.1 Farmacología de conotoxinas

A lo largo de los estudios que se han hecho de las conotoxinas, han sido impresionantes los hallazgos de los diversos blancos moleculares que estas modulan; algunos ejemplos se resumen en la tabla 2. Es de llamar la atención la capacidad de estas toxinas para discriminar entre las isoformas de los diferentes canales iónicos que se encuentran estrechamente relacionadas, en términos de homología [Terlau & Olivera, 2004].

Las conotoxinas actúan sobre canales iónicos activados por voltaje como son las ω , μ , μO , δ , ι y k conotoxinas: canales iónicos activados por ligando (α - y σ -conotoxinas, *ikot ikot* y *conantokinas*); receptores acoplados a proteínas G (ρ -conotoxinas, *conopresinas* y *contulakinas*) y transportadores de neurotransmisores (χ - conotoxinas) [Lewis *et al.*, 2012].

ω -conotoxinas inhibidores de canales de calcio activados por voltaje (Ca_v)

Los canales de calcio son los responsable de mediar el flujo de calcio hacia el interior de la célula en respuesta a una despolarización; son complejos protéicos heteroméricos con cuatro o cinco diferentes subunidades. La diversidad fisiológica y farmacológica de estos se debe principalmente a las propiedades de las subunidades α_1 que forman el poro [Terlau & Olivera, 2004]. Las ω -conotoxinas son inhibidores de diversas isoformas de canales de calcio [Lewis *et al.*, 2012]; la mejor caracterizada y empleada como herramienta farmacológica, es la ω -conotoxina GVIA,

principalmente para inhibir la transmisión sináptica; ésta junto con las ω -conotoxinas CVID, CVIE, CVIF y MVIIA son particularmente selectivas para la isoforma $Ca_v2.2$ de corrientes de calcio neuronales [Flinn *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2000].

La ω -MVIIA aislada de *Conus magus* fue la primera conotoxina aprobada como medicamento por la FDA en el 2004. Mostrando una potente selectividad por $Ca_v2.2$, esta toxina de 25 residuos de aminoácidos es administrada como analgésico a pacientes que sufren de dolor crónico; su nombre comercial es Prialt, conocido como Ziconotide por su nombre genérico [Han *et al.*, 2008].

El mecanismo de unión de las ω -conotoxinas a las isoformas de Ca_v al parecer involucra una región del vestíbulo externo del canal en el dominio III [Ellinor *et al.*, 1994]; sin embargo también se ha reportado que los dominios extracelulares están involucrado en la cinética de unión [McDonough *et al.*, 2002]. La afinidad con la que se unen las diferentes ω -conotoxinas a las diversas isoformas de canales de calcio depende de las subunidades presentes en éstos [Mould *et al.*, 2004]. Por ejemplo aquellas aisladas de conos piscívoros se unen específicamente, en diferentes grados, a las diversas isoformas de $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ y solo la ω -TxVII, aislada del molusquívoro *Conus textile*, bloquea los canales sensibles a dihidroxi piridina de moluscos, que son homólogos de los canales de calcio tipo-L de mamíferos [Fainzilber *et al.*, 1996].

A través de los años y de estudios de las ω -conotoxinas es como estas han llegado a ser de gran interés para las neurociencias y la industria farmacéutica como posibles terapéuticos en el manejo del dolor [Winqvist *et al.*, 2005].

Conotoxinas moduladoras de canales de sodio (Na_v) dependientes de voltaje.

En la actualidad se registran 10 isoformas diferentes de subunidades α que se distribuyen de manera diferencial en diferentes tejidos y con base en ello se ha definido una nomenclatura estándar para poder diferenciar entre estos canales, nombrándolos $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, etc. Farmacológicamente hablando también pueden clasificarse en dos grupos, aquellos que son sensibles al alcaloide tetrodotoxina (TTX) y aquellos que son insensibles a TTX [Catterall, 1992].

En la actualidad se sabe que los Na_v son blanco de cuatro clases de conotoxinas (μ , μO , δ y ι) [McIntosh *et al.*, 1995; Fiedler *et al.*, 2008]. A pesar de que estas toxinas presentan actividad en el mismo blanco farmacológico, difieren en estructura y mecanismo de acción, dando lugar a dos grupos: aquellas que producen inhibición μ - y μO -conotoxinas [Zhang *et al.*, 2006; Heinemann & Leipold, 2007] y las que producen activación δ - y ι - conotoxinas [Bulaj *et al.*, 2001; Buczek *et al.*, 2007].

El mecanismo de acción por el cual las μ -conotoxinas provocan la inhibición es a través del anclaje al sitio I del canal, mismo lugar donde se une la TTX. Por el contrario las μO -conotoxinas aparentemente intervienen con los sensores de voltaje del dominio II del canal, evitando de esta forma su apertura. Por otro lado las δ -conotoxinas provocan un retraso en la inactivación de Na_v resultando en una prolongación del potencial de acción así como una persistencia del disparo neuronal, mientras que las ι -conotoxinas aumentan la apertura del canal recorriendo la dependencia de voltaje de la activación de los Na_v a potenciales más hiperpolarizados [Lewis *et al.*, 2012].

μ-conotoxinas

Las primeras μ-conotoxinas caracterizadas fueron GIIIA, GIIIB y GIIIC aisladas de *C. geographus* [Cruz *et al.*, 1985]. Estas mostraron tener una fuerte preferencia por el subtipo Na_v1.4 que se expresa en músculo esquelético [Cruz *et al.*, 1989].

De las conotoxinas que afectan a Na_v, las μ-conotoxinas son las más numerosas y mejor caracterizadas. Actualmente existen 20 diferentes μ-conotoxinas descritas. Pertenecientes a la superfamilia de conopéptidos M, con 16-26 residuos de aminoácidos, incluyendo 6 Cys que forman 3 puentes disulfuro que estabilizan su estructura tridimensional, suelen tener una carga positiva neta, misma que contribuye a su habilidad para asociarse al vestíbulo exterior del Na_v a través de interacciones electrostáticas para así inhibir la conductancia iónica [Li *et al.*, 2003].

Como ya se ha mencionado antes, las μ-conotoxinas se unen al sitio I de Na_v, y a diferencia de la TTX que solo distingue entre isoformas sensibles e insensibles a la misma, las μ-conotoxinas muestran una alta selectividad entre los subtipos de Na_v de mamífero sensibles a TTX. Esta diferencia farmacológica surge debido a que los sitios de unión de la TTX y las μ-conotoxinas se superponen solo parcialmente [Dudley *et al.*, 1995].

Diversos estudios muestran que la afinidad y/o selectividad de las μ-conotoxinas son dependientes de los residuos de aminoácidos presentes en el poro o sitio de unión de los diferentes subtipos de Na_v [Becker *et al.*, 1992; Schroeder *et al.*, 2008; McArthur *et al.*, 2011].

μO-conotoxinas

Las μO-conotoxinas pertenecen a la superfamilia genética O. Son pocos los péptidos dentro de esta clasificación, sin embargo las MrVIA y MrVIB han captado la atención debido a sus efectos analgésicos en modelos animales de dolor, los cuales fueron asociados a sus selectividad relativa a Nav 1.8 por encima de otros subtipos de Na_v sensibles a TTX [Daly *et al.*, 2004, Bulaj *et al.*, 2006; Ekberg *et al.*, 2006]. Se ha reportado diferencias significativas en la afinidad en el subtipo nativo Na_v1.8 y Na_v1.8 expresado heterológamente. Dichas diferencias se cree surgen por la presencia de subunidades β auxiliares (particularmente β2) las cuales recientemente han mostrado incrementar significativamente la tasa de inhibición de Nav1.8 por MrVIB [Wilson *et al.*, 2011]. Adicionalmente, Na_v1.4 y Na_v1.8 comparten un residuo homólogo, el cual es distinto a otros subtipos de Na_v y se cree puede contribuir a la selectividad relativa MrVIA y MrVIB [Ekberg *et al.*, 2006]. El solapamiento funcional con la toxina β de escorpión, sugiere que las conotoxinas μO interactúan con el sensor de voltaje de los Na_v. De hecho, la inhibición voltaje dependiente de Nav1.4 mediada por MrVIB se ha atribuido al sensor de voltaje del dominio II que es otro sitio compartido con las toxinas β de escorpión [Leipold *et al.*, 2007].

δ-conotoxinas

Relacionadas estructuralmente con las μ y μO conotoxinas las δ-conotoxinas inhiben la rápida inactivación de Na_v y cambian la activación voltaje dependiente a potenciales más negativos. Como ya se había mencionado anteriormente esto provoca potenciales de acción más prolongados y un disparo neuronal persistente [Leipold *et al.*, 2005]. Estructuralmente hablando las δ-conotoxinas presentan una superficie exterior de varios residuos hidrofóbicos conservada [Shon *et al.*, 1994] los

cuales pueden estar relacionados con el sitio de unión al canal [Leipold *et al.*, 2006].

Aquellas δ -conotoxinas que se han aislado de caracoles molusquívoros son solo capaces de unirse a subtipos de Na_v de moluscos, con excepción de péptido Am2766. Las δ -conotoxinas que son capaces de anclarse a canales de sodio de mamíferos se han obtenido de especies piscívoras, con efecto sobre $\text{Na}_v1.2$ y $\text{Na}_v1.4$ [Bulaj *et al.*, 2001]. Hasta el momento solo la toxina EVIA reporta actividad selectiva sobre los subtipos neuronales $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ y $\text{Na}_v1.6$ sobre los subtipos cardiacos $\text{Na}_v1.4$ y $\text{Na}_v1.5$ [Barbier *et al.*, 2004]. Sin embargo la síntesis y purificación de estos péptidos es complicada debido a su estructura molecular [Bulaj *et al.*, 2001].

ι -Conotoxinas

El mecanismo de activación sobre los Na_v de las ι -conotoxinas es diferente al de las δ -conotoxinas, ya que a diferencia de estas últimas, las ι -conotoxinas modifican la activación voltaje dependiente de los canales de sodio. RXIA perteneciente a la superfamilia I y LtIII A de la superfamilia M, a pesar de sus diferencias moleculares, activan Na_v . Sin embargo en comparación con las δ -conotoxinas el efecto no es significativo [Buczek *et al.*, 2007; Fielder *et al.*, 2008].

k -conotoxinas que interactúan con canales de potasio (K_v)

La familia de canales iónicos que permean al ion potasio es extraordinariamente diversa, ya que hay una gran cantidad de genes que codifican las subunidades α que forman el poro. Estos canales se dividen dependiendo de la cantidad de dominios transmembranales que poseen y

estos son dos, cuatro y seis, todos ellos teniendo como función estabilizar el potencial de membrana de las células que los expresan [Hille, 2001]. Numerosas familias de κ -conotoxinas tienen como blanco molecular diversos K_v [Terlau *et al.*, 1996].

Un ejemplo de estas toxinas son las κA -conotoxinas, algunas de las cuales inhiben los K_v tipo *Shaker*, mientras que κA -SmlVA, κA -SmlVB y κA -PIVE, son péptidos excitatorios relativamente pequeños, los cuales tiene un potente efecto después de su inyección intramuscular en peces y anfibios, no así en mamíferos; probablemente reflejo de una selectividad altamente diferencial entre subtipos de canales. Sin embargo se desconocen los blancos moleculares específicos y estructura de muchas κA -conotoxinas [Teichert *et al.*, 2007].

La conotoxina PVIIA es un péptido de 27 aminoácidos perteneciente a las κO -conotoxinas que inhiben a los canales *Shaker* de potasio [Shon, *et al.*, 1998; Terlau *et al.*, 1999], los cuales presentan una gran homología con los K_v de mamífero; sin embargo el subtipo $K_v1.1$ de rata es resistente a esta toxina. PVIIA fue el primer péptido conocido que tiene efecto sobre canales de potasio [Koch *et al.*, 2001] y presenta propiedades cardioprotectoras [Zhang *et al.*, 2003].

La κM -conotoxina RIIIJ así como PVIIA posee efecto cardioprotector debido probablemente a su alta afinidad por el subtipo $K_v1.2$ de mamífero [Chen *et al.*, 2010].

Algunas κ -conotoxinas exhiben una interesante selectividad sobre diferentes subtipos de canales de potasio. ViTx inhibe los subtipos $K_v1.1$ y $K_v1.3$, pero no a $K_v1.2$, mientras que SrXIA, inhibe los subtipos $K_v1.2$ y $K_v1.6$ pero no al $K_v1.3$; ambas conotoxinas pertenecen a la familia de las $\kappa I(2)$ -

conotoxinas; y aunque se desconoce el mecanismo molecular de unión de la primera [Kaufertstein *et al.*, 2003]; recientes estudios revelan que SrXIA presenta un motivo diada Arg17 y Arg29 residuos que probablemente estén involucrados en su actividad biológica [Aguilar *et al.*, 2010].

Otras conotoxinas que interactúan con canales de potasio son el Contrifano-Vn, que también presenta actividad sobre canales de calcio [Massilia *et al.*, 2003] y la Conkunitzina-S1, estructuralmente estabilizada por solo dos puentes disulfuro, parece unirse al poro de los canales *Shaker* de potasio inhibiéndolos [Bayrhuber *et al.*, 2005].

Conotoxinas moduladoras de receptores acoplados a proteínas G y transportadores de neurotransmisores

Dentro de las conotoxinas, existen péptidos capaces de inhibir la activación por noradrenalina, ya sea por la vía de los α_1 -adrenoreceptores o bien por la vía de los transportadores de este neurotransmisor [Sharpe *et al.*, 2001].

El péptido TIA perteneciente a las ρ -conotoxinas es un inhibidor alostérico de los receptores α_1 -adrenoreceptores. Sharpe *et al.* (2003) con estudios experimentales de competencia con ligandos marcados radioactivamente, reportan este efecto sobre el receptor α_{1B} de hámster. Posteriormente en 2004, estudios de desplazamiento de radioligandos muestran que TIA es selectivo también para el subtipo humano α_{1B} sobre los subtipos α_{1A} y α_{1D} [Chen *et al.*, 2004].

Debido a la importancia de los adrenoreceptores en funciones como el control de la presión sanguínea, función pulmonar, contractilidad de miocardio, metabolismo y algunas funciones del sistema nervioso central, el hallazgo de estos moduladores de diferentes subtipos de $\alpha 1$ -adrenoreceptores, incrementa una vez más el interés sobre estos pequeños péptidos, debido a su gran potencial terapéutico [Koch *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 2012].

De equivalente importancia es el descubrimiento de los χ -conopéptidos, ya que estos inhiben el transporte de la noradrenalina por la vía de los transportadores de norepinefrina (NET), que es un importante blanco de diversos fármacos de tratamientos neurológicos como la depresión, ansiedad, desorden obsesivo-compulsivo y déficit de atención e hiperactividad [Goddard *et al.*, 2010].

La toxina MrlA es un inhibidor de NET no competitivo, el cual exhibe su efecto sin importar la concentración de noradrenalina presente [Sharpe *et al.*, 2001]. La administración intratecal de este péptido ha sido evaluada en modelos de dolor neuropático agudo en roedores, produciendo un efecto reversible significativo tanto en ratas como en ratones, sin efectos secundarios significativos [Nielsen *et al.*, 2005]. Este mismo péptido modificado se encuentra en fases de estudios clínicos I y II para el tratamiento del dolor crónico [Lewis, 2011].

Otro ejemplo de moduladores de receptores acoplados a proteínas G son las Conopresinas; tanto la conopresina-G como la conopresina-T son muy semejantes a la vasopresina, solo que estas dos presentan una carga positiva adicional [Nielsen *et al.*, 1994]. El efecto que tiene la conopresina-T es la inhibición específica del receptor V_1 -vasopresina y un efecto agonista parcial sobre el receptor para la oxitocina. Los receptores de vasopresina y

oxitocina se unen a sus agonistas naturales y a las conopresinas en un sitio formado por el arreglo de siete dominios transmembranales [Dutertre *et al.*, 2008].

A la vez, la contulakina-G es un agonista efectivo de los receptores de neurotensina 1 (NTSR1) y 2 (NTSR2), lo cual no es extraño debido a la similitud que existe entre las secuencias primarias de la neurotensina y la contulakina-G [Craig *et al.*, 1999]. La contulakina-G se encuentra en la fase I de estudios clínicos, ya que tiene un efecto antinociceptivo mucho mejor que la morfina, sin los efectos de déficit motor [Lewis *et al.*, 2012].

Conotoxinas moduladoras de canales iónicos ligando dependientes

Se han encontrado conopéptidos capaces de modular receptores iónicos ligando dependientes dentro de los cuales se encuentran los receptores de glutamato tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA) y α -Amino-3-Hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA), a serotonina (5-hidroxitriptamina₃ o 5-HT₃) y receptores de acetilcolina (ACh), siendo estos últimos, blanco del grupo de conotoxinas mejor caracterizado, además del más grande y diverso [McIntosh *et al.*, 1999].

Conotoxinas moduladoras de receptores nicotínicos de acetilcolina (RnACh).

Los vertebrados presentan dos subfamilias de RnACh, los de tipo muscular que se encuentran en la terminal post-sináptica de la placa neuromuscular y los de tipo neuronal que se encuentran tanto en las terminales post y pre-sinápticas en el sistema nervioso central y periférico [Sargent, 1993; McGehee & Role, 1995].

Los receptores RnACh musculares están formados por la combinación de subunidades α (2 subunidades) β γ y δ en el músculo fetal y con una sustitución de la subunidad γ por una subunidad ϵ en el adulto. Los receptores neuronales para la acetilcolina están conformados solo por combinación de subunidades α y β . En ambos tipos, el sitio de unión para la acetilcolina se encuentra en la interface de las subunidades α y las otras subunidades [McIntosh *et al.*, 1999].

Las α -conotoxinas son antagonistas específicos de diversos RnACh; su alta especificidad se debe a que son antagonistas competitivos, ya que estas toxinas se unen a mismo sitio del ligando natural [López-Vera, 2010], actuando de la misma manera que la α -bungarotoxina y el alcaloide usado por indígenas de Sudamérica, el curare [Terlau & Olivera, 2004].

Ejemplo de la especificidad de las α -conotoxinas son las α 3/5- que poseen un motivo -CCX₃CX₅C- en la secuencia primaria y α 4/3- con un motivo -CCX₄CX₃C- (Las X con el número en subíndice, hacen referencia en el número de residuos de aminoácidos entre las cisteínas). Las primeras son aisladas principalmente de especies piscívoras y actúan principalmente sobre receptores nicotínicos musculares, incluso de mamíferos [McIntos *et al.*, 1999]. Muchas de estas α 3/5-conotoxinas son capaces de diferenciar entre los dos sitios de unión al ligando; como la α -MI que es altamente selectiva por el sitio de unión en la interface α 1/ δ sobre la interface α 1/ γ [Sine *et al.*, 1995]. Por otro lado los blancos de la subfamilia α 4/3-conotoxinas comprenden toda clase de receptores nicotínicos neuronales, así las α -conotoxinas Iml y Imll inhiben a los receptores homoméricos α ₇, mientras que α -PnlB, y α -PnlA inhiben al receptor α ₃ β ₂ [McIntosh *et al.*, 1999; Ellison *et al.*, 2008].

Los receptores nicotínicos también son inhibidos por otras dos familias de conotoxinas, las α A-conotoxinas (por ejemplo α A-PIVA), la cuales no presentan similitud estructural con las α -conotoxinas, pero presentan la misma actividad; y las ψ -conotoxinas (por ejemplo ψ -PIIIIE), que actúan por oclusión del poro de los RnACh y por tanto son inhibidores no competitivos [Hopkins *et al.*, 1995; Shon *et al.*, 1997].

σ -conotoxina inhibidora del receptor de serotonina (R5-HT₃).

La serotonina o 5-hidroxitriptamina es un neurotransmisor que participa en la regulación de la atención y otros procesos cognitivos, además de estar involucrado en procesos emocionales como la ansiedad y la depresión [Kandel *et al.*, 2000]. De todos los receptores a serotonina, solo el R5-HT₃ es un canal iónico activado por ligando perteneciente a la misma superfamilia que los RnACh, y es blanco de la conotoxina σ -GVIII A [England *et al.*, 1998]. Esta conotoxina pertenece a la superfamilia S, es un péptido que tiene 41 residuos de aminoácidos, cinco puentes disulfuro, el extremo carboxilo terminal amidado y una modificación post-traducciona inusual 6-bromotriptofano; la σ -GVIII A es un inhibidor competitivo de receptores 5-HT₃ expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* [Lewis *et al.*, 2012].

Conotoxinas inhibidoras de receptores de glutamato

Dentro de los receptores de glutamato, se sabe que los de AMPA y NMDA son regulados por conotoxinas.

Los receptores AMPA se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central; están involucrados en la transmisión rápida excitatoria mediada por glutamato y son tetrámeros formados por las

subunidades GluR1-GluR4 [Fletcher *et al.*, 1996]. Estos receptores son blanco molecular de una conotoxina conocida como Ikot Ikot, nombre tomado del término filipino "girando alrededor", haciendo referencia al efecto que se observa en peces que son inyectados con esta toxina, es un péptido con 86 residuos de aminoácidos con 13 Cys y su forma activa se presenta en forma de dímero. Es un agonista de AMPA que incrementa la magnitud de la corriente a través del bloqueo de la desensibilización de este receptor [Dingledine *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2009].

Los receptores NMDA son canales iónicos ligando dependientes tetraméricos con una alta permeabilidad para el ión calcio [Dingledine *et al.*, 1999], los cuales están compuestos en su mayoría por dos tipos de subunidades: 2NR1 y 2NR2. Este receptor necesita la unión de sus dos agonistas (glutamato y glicina) para su apertura y funcionamiento apropiado [Loftis & Janowsky, 2003].

Las conantokinas son pequeños péptidos con una potente y selectiva acción inhibitoria de los receptores NMDA. Estudios de estructura y actividad han revelado que esta acción inhibitoria se debe a la unión de esta toxina al sitio de unión al ligando [Wittekindt *et al.*, 2001]. Estas toxinas no presentan residuos de cisteína. Sin embargo, tienen un alto contenido de ácido γ -carboxiglutámico, el cual confiere estabilidad a la molécula [Nielsen *et al.*, 1999].

3. Conotoxinas de la especie *Conus spurius*

Como se ha descrito anteriormente son muchas y diversas las conotoxinas, así como también sus blancos moleculares. En el caso de los caracoles de la especie *C. spurius*, vermívoro que se distribuye en las costas de Florida y el Golfo de México, se han aislado toxinas como la sr5a, la cual es una T-1 conotoxina, perteneciente a la superfamilia T; esta toxina es uno de los componentes mayoritarios de veneno y se caracteriza por ser altamente hidrofóbico. Los bioensayos realizados con esta toxina en ratones adultos producen un efecto depresivo en la actividad por 15-19 min y una respiración agitada [Aguilar *et al.*, 2006]. Este efecto también se presenta con la conorfamida-Sr 1, perteneciente a la familia de neuropéptidos FRamida y fue el primero en su tipo aislado de un veneno de cónido. Este péptido también abundante en el veneno de *C. spurius*, no tiene Cys [Maillo *et al.*, 2002].

Mediante posteriores trabajos realizados con la técnica de RT-PCR se encontraron 8 precursores de T1-conotoxinas, de los cuales 4 son totalmente nuevos y uno corresponde a sr5a; los diferente análisis de estos precursores arrojaron datos filogenéticos que demuestran que los precursores de las T1-conotoxinas de *C. spurius* están mucho más relacionados con precursores de caracoles molusquívoros, que con aquellos presentes en el veneno de los vermívoros [Zamora-Bustillos *et al.*, 2009].

En el año 2007 se aislaron dos α 4/7-conotoxinas del veneno de *C. spurius*, la SrlA y la SrlB. La actividad y especificidad de ambas toxinas fue evaluada electrofisiológicamente junto con el análogo sintético [γ 15E]SrlB; mostrando una notable potenciación de la actividad colinérgica de los subtipos de receptores de acetilcolina $\alpha_1\beta_1\gamma\delta$ y $\alpha_4\beta_2$ a concentraciones muy

bajas (nM), manifestando la alta afinidad que pueden presentar estas toxinas por sus blancos [López-Vera *et al.*, 2007].

Posteriormente en el 2008 se describe la conorfamida-Sr 2, la cual al igual que la conorfamida-Sr 1 no presenta Cys; sin embargo en su estructura primaria presenta modificaciones post-traduccionales poco usuales, un extremo C-terminal amidado y dos γ -carboxiglutamatos. La similitud que presentan las conorfamidas con las FRamidas de moluscos, ratones y poliquetos es una posible explicación del efecto de estas toxinas sobre estos animales [Aguilar *et al.*, 2008].

4. Receptores con asa de cisteína

Tanto el RnACh como R5-HT₃ son miembros de una superfamilia de receptores ligando dependientes, conocida como receptores con asa de cisteína; así llamada por un asa característica que se forma por un puente disulfuro entre dos residuos de cisteínas en el dominio extracelular. Los RnACh y R5-HT₃ son canales catiónicos selectivos y permiten el paso de iones calcio y potasio desencadenando una respuesta excitatoria en la neurona post-sináptica [Connolly & Wafford, 2004]. A esta superfamilia también pertenecen los receptores de glicina (RGly) y los receptores para el ácido γ -amino butírico tipo A (RGABA_A) y tipo C (RGABA_C) [Qian & Ripps, 1999].

Los receptores con asa de cisteína poseen una estructura general, que consiste en cinco subunidades acomodadas alrededor de un canal central que permite el paso de los iones a través de la membrana. Cada una de estas subunidades posee un gran dominio extracelular constituido por 10 láminas β , a su vez cada subunidad también contiene 4 dominios transmembranales formados por α -hélices (M1-M4) (Fig. 5). El poro del canal está formado por las hélices M2 de cada subunidad y los cambios conformacionales que éstas sufren al momento de unirse el ligando permiten el paso de los iones de un lado de la membrana al otro [Cederholm & Schofield, 2009].

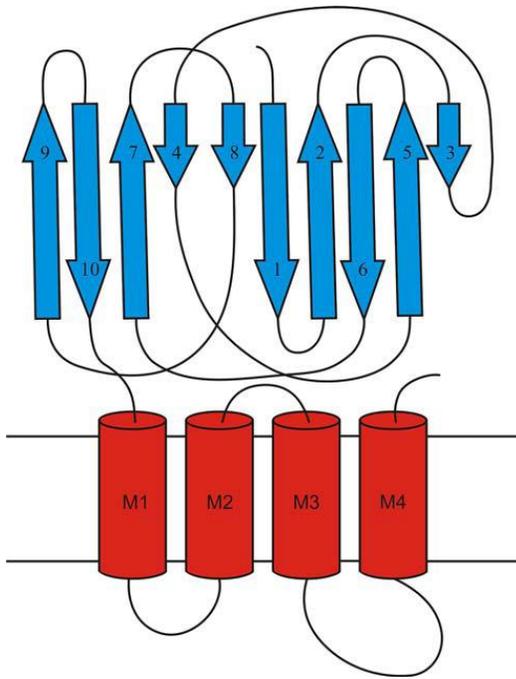


Fig. 5 Diagrama de una subunidad de receptor con asas de cisteína, mostrando el dominio extracelular (azul) con sus cadenas β , y el dominio transmembranal con sus cuatro α -hélices, M1-M4 (rojo). Las hélices M2 de cada subunidad forman el poro. La hoja β interna (cadenas β 1, 2, 3, 5, 6 y 8) interactúan con la hoja β externa (cadenas β 4, 7, 9 y 10), formando una estructura de β sándwich. Tomada de [Cederholm & Schofield, 2009].

4.1 Receptores GABA

El ácido γ -amino butírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos. Fue en la década de los 50's cuando se llevó a cabo el descubrimiento del GABA y estudios electrofisiológicos entre los años 50's y 60's, determinaron su papel como neurotransmisor, al cumplir con los criterios para ser designado como tal. Está presente en terminales nerviosas y es liberado por neuronas estimuladas eléctricamente, existe un mecanismo para terminar con la acción del neurotransmisor liberado y existe un receptor específico [Olsen & DeLorey, 1999; Martin & Olsen, 2000].

Existe un cuerpo amplio de evidencias, que sugiere que las funciones alteradas en la neurotransmisión GABAérgica tienen un papel importante en desórdenes neurológicos y psiquiátricos en humanos. Estos incluyen un mal desarrollo del SNC, retraso mental y epilepsia, alteraciones del sueño,

dependencia a drogas (especialmente alcoholismo), procesos sensoriales, varios tipos de aprendizaje, esquizofrenia y problemas en la coordinación motora y enfermedades de Huntington y Parkinson [Olsen, 2001, Barnard *et al.*, 1998].

La neurotransmisión GABAérgica ha sido manipulada farmacológicamente en el tratamiento de la ansiedad y también con fines anestésicos, al inhibir la neurotransmisión mediada por el RGABA_A [Whiting *et al.*, 1999; Rudolph *et al.*, 2001].

El neurotransmisor GABA se encuentra ampliamente distribuido en el SNC en altas concentraciones, siendo éstas 1000 veces más elevadas que las de otros neurotransmisores monoamínicos, de acuerdo con la abundancia y acciones específicas de las neuronas GABAérgicas en estas regiones [Olsen & DeLorey, 1999; Martin & Olsen, 2000].

Para la síntesis de GABA *in-vivo*, el principal precursor es la glucosa; no obstante el piruvato y otros aminoácidos también pueden actuar como precursores. El primer paso en la síntesis de GABA es la trans-aminación del α -cetoglutarato en ácido glutámico o glutamato por la enzima α -cetoglutarato transaminasa. El segundo paso es la descarboxilación del glutamato catalizada por la ácido glutámico descarboxilasa (GAD) dando así GABA. Es importante mencionar que GAD es una enzima que solo se expresa en las células que usan GABA como neurotransmisor, siendo un excelente marcador para las neuronas GABAérgicas en el SNC. Una vez sintetizado GABA por GAD en las terminales nerviosas, éste es introducido en vesículas secretoras y está listo para ser liberado en la sinapsis [Olsen & DeLorey, 1999].

La liberación de GABA se lleva a cabo cuando ocurre la despolarización de la neurona pre-sináptica, después de lo cual el neurotransmisor se difunde hasta los receptores ubicados en la superficie post-sináptica. La acción de GABA termina con la recaptura de éste tanto por la terminal presináptica como por células de la glía. El GABA recapturado por las terminales nerviosas puede ser reutilizado, sin embargo aquél que es recapturado por la glía es metabolizado en succinato por la α -cetoglutarato transaminasa y no puede ser nuevamente sintetizado a partir de glutamato en este compartimento, ya que la GAD no se encuentra presente. Así que GABA en la glía es convertido en glutamina la cual es transportada nuevamente a la neurona, en donde ésta es convertida en glutamato por la enzima glutaminasa [Chen *et al.*, 2004].

Así como los receptores de acetilcolina y glutamato, los receptores para GABA pueden ser de dos tipos, canales iónicos ligando dependientes (GABA_A Y GABA_C) y receptores acoplados a proteínas G (GABA_B) [Johnston, 1996; Barnard *et al.*, 1998].

Los canales iónicos GABA_A y GABA_C pueden distinguirse farmacológicamente y por la diferencia en la composición molecular de sus subunidades [Johnston, 1996; Bormann, 2000]. Ambos receptores son glicoproteínas pentaméricas de alrededor de 275 KDa. Los receptores heteroméricos GABA_A están formados por las subunidades α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ y π [Whiting *et al.*, 1999] (Fig. 6 y 7), mientras que RGABA_C está compuesto exclusivamente por la combinación de las subunidades ρ 1-3 [Bormann, 2000]. Sin embargo, las subunidades ρ presentan un alto grado de similitud con las secuencias de aminoácidos de las subunidades de RGABA_A, y se ha sugerido que representen subtipos del mismo RGABA_A [Barnard *et al.*, 1998; Didelon *et al.*, 2002]. Las subunidades poseen un peso entre de 50-60 KDa y tienen un 20-30% de identidad en secuencia entre

todas las subunidades y alrededor del 70% de identidad dentro de los subtipos para cada subunidad [Whiting *et al.*, 1999, Sieghart & Sperk, 2002].

Tabla 3. Resumen de las isoformas de GABAA, localización y función. Tomada de Basic Neurochemistry, Second Edition, p 295

Subunidades	Localización	Función
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	Extensamente en células GABAérgicas.	Sedante anticonvulsivante
$\alpha 2\beta 3\gamma 2$	Cerebro anterior Médula espinal	Ansiedad Relajante muscular
$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	Glía	Anticonvulsivante
$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	Corteza	Inhibición tónica
$\alpha 4\beta 2\gamma 2$	Tálamo	
$\alpha 4\beta 2/3\gamma 2$	Giro dentado	
$\alpha 4\beta 2\delta$	Tálamo	
$\alpha 4\beta 2/3\delta$	Giro dentado	
$\alpha 5\beta 3\gamma 2$	Hipocampo CA1 Ganglio sensorio	
$\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$	Células granulares cerebelares	
$\alpha 6\beta 2/3\delta$	Células granulares cerebelares	
$\gamma 3, \theta, \epsilon$	Poca información	

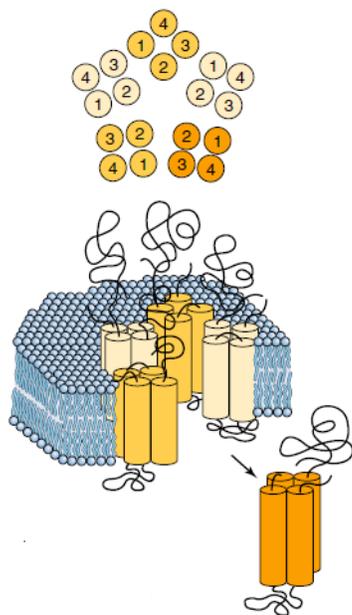
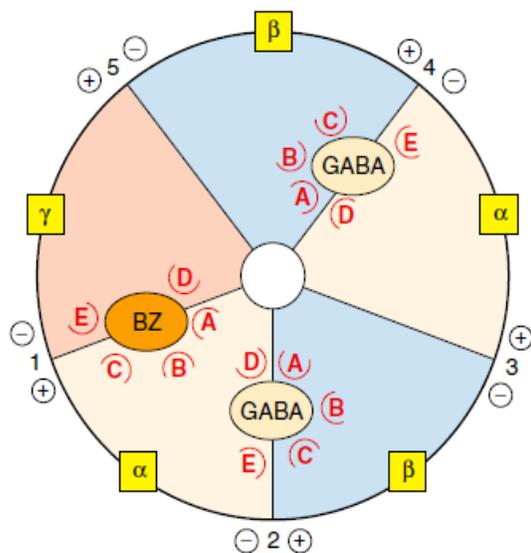


Fig. 6 Esquema general de los receptores GABA. La proteína se muestra como un canal transmembranal pseudosimétrico, constituida por 5 subunidades homólogas, cada una compuesta por cuatro regiones transmembranales (1-4). En el panel superior se muestra el arreglo de las cinco subunidades alrededor de un par central, el canal para el ión cloruro.

Tomada de Basic Neurochemistry, Second Edition, p 294



Tomada de Basic Neurochemistry, Second Edition, p.294

Fig. 7 Modelo de receptor GABA_A heteropentámero mostrando los sitios de unión a ligando y las interacciones de los dominios de las subunidades. Las 5 subunidades (-β-γ-α-β-α-) y las interfaces (1-5). También se muestran sitios de unión a benzodiazepinas y varias ascas de péptidos (A-E) involucrados en la unión del ligando y las interfaces de las subunidades, estas ascas son homólogas en otros miembros de la familia de receptores con asa de cisteína.

Los receptores GABA_C también llamados GABA_{AOR} compuestos por las subunidades ρ_1 , ρ_2 y ρ_3 , son receptores pentaméricos que pueden encontrarse de manera homomérica o heteromérica [Enz & Cutting, 1999] y se expresan principalmente en neuronas de la retina [Yazulla, 1986; Lukasiewicz, 1996], también se tienen evidencias que se distribuyen ampliamente en diversas zonas del sistema nervioso central de vertebrados [Albrecht *et al.*, 1997; Wegelius *et al.*, 1998; Milligan *et al.*, 2004].

Están involucrados en procesos visuales, en la regulación de los ritmos del sueño, percepción del dolor, memoria, aprendizaje, regulación de hormonas, y secreción neuroendocrina y gastrointestinal [Adamian *et al.*, 2009].

Los RGABA_C, compuestos por las subunidades ρ son mucho más sensibles a GABA, obteniendo una dosis efectiva media (EC₅₀) a concentraciones 1-5 μ M, mientras que los RGABA_A compuestos por las subunidades α , β , γ , δ , ϵ , θ y π , presentan una EC₅₀ de 10-100 μ M [Han *et al.*, 1997]. Los receptores GABA_C además de ser muy sensibles a su ligando

natural, presentan una cinética de activación y desactivación muy lenta, asimismo son menos vulnerables a la desensibilización que RGABA_A [Qian & Ripps, 1999].

El RGABA_C también es un grupo farmacológicamente diferente, ya que no responde a la bicuculina ni al baclofen; el ácido *cis*-aminocrotónico (CACA) es un agonista selectivo para este receptor, por otro lado el 1, 2, 5, 6-tetrahidro-piridin-4-metil ácido fosfónico (TPMPA) es un antagonista altamente selectivo y específico de éste, al mismo tiempo RGABA_C es insensible a los fármacos que modulan a GABA_A como las benzodiazepinas, barbituratos y neuroesteroides; sin embargo la picrotoxina es un fuerte antagonista tanto RGABA_A como el homómero de ρ_1 [Bormann, 2000; Chebib *et al.*, 2009].

Así como en el caso de todos los miembros de la superfamilia de receptores con asa de cisteína, las subunidades ρ presentan un dominio N-terminal extracelular muy grande, cuatro dominios transmembranales y un extremo C-terminal extracelular corto. Los dominios TMI y TMII están interconectados por un pequeño bucle extracelular; los dominios TMIII y TMIV están unidos por un bucle grande intracelular involucrado en la localización, anclaje y agrupamiento del receptor en la membrana neuronal a través de la interacción con una proteína asociada a microtúbulo 1b (MAP1b) de citoesqueleto [Hanley *et al.*, 1999].

En el ser humano los genes que codifican las subunidades ρ_1 y ρ_2 se localizan en la región 15 del brazo largo del cromosoma 6, y la subunidad ρ_3 en la región once del cromosoma 3 [Qian & Ripps, 1999]. Estas subunidades cuando son expresadas heterológicamente en ovocitos de *X. laevis* forman canales homoméricos funcionales y también se ha logrado realizar un ensamblaje con la subunidad γ_2 formando receptores con

propiedades funcionales cercanas a aquellos nativos encontrados en las células bipolares en la retina [Pan & Qian, 2005].

Como ya se ha mencionado antes, existen conotoxinas con efectos en contra de los miembros de la superfamilia de receptores con asa de cisteína; tales como RnACh [Olivera & Teichert, 2007], R-5HT₃ [England *et al.*, 1998] y últimamente en RGly [Pérez-Rueda, 2010]. Sin embargo hasta el momento no hay reporte de que estas toxinas tengan algún efecto sobre RGABA_A.

Las propiedades farmacológicas que presentan las conotoxinas las convierte en una herramienta útil no solo para clasificarlas por sí mismas, sino también para dilucidar la estructura y función de los diferentes blancos moleculares que estas afectan.

Planteamiento del Problema

Todos los receptores con asa de cisteína median la transmisión rápida en el sistema nervioso central, en respuesta a la unión del neurotransmisor, pero poco se sabe acerca del papel de muchos de sus subtipos (Cascio, 2004). El desarrollar o descubrir ligandos selectivos para los diferentes subtipos de receptores ionotrópicos de esta superfamilia, ayudaría a definir su función.

Hipótesis

Se han reportado conotoxinas que tienen como blanco molecular a tres miembros de la superfamilia de receptores ionotrópicos con asa de cisteína; por lo tanto existen conotoxinas que modulan a los receptores GABAérgicos

Metodología

Obtención de especímenes

Se usaron caracoles de la especie *Conus spurius*. donados por el laboratorio de Neurofarmacología Marina a cargo de los Dres. Edgar P. Heimer de la Coterá y Manuel Aguilar Ramírez, del Instituto de Neurobiología-UNAM.

Extracción del veneno

Se extrajo el veneno sacrificando los animales y disectaron 5 conductos venenosos. Estos se homogeneizaron en 10 ml de 40% de acetonitrilo (ACN) y 2% de ácido trifluoroacético (TFA). El homogenado se centrifugó a 12, 000 g por 30 min a -4°C . El sedimento se desechó y se trabajó con el sobrenadante.

Separación y purificación de los componentes del veneno

Los péptidos que constituyen el veneno de esta especie se separaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, con la utilización de una columna analítica Vydac C18 (4.6 mm x 250 mm, tamaño de partícula 5 μm , 300 Angstrom tamaño de poro). Se ocuparon diferentes gradientes de elusión entre la solución A (0.1% de TFA) y la solución B (0.085% de TFA y 90% de ACN). Los componentes del veneno se guardaron en congelación hasta su utilización.

Las unidades de veneno se obtuvieron calculando el área bajo la curva de cada una de las fracciones. Las unidades se expresan en $\text{Au} \cdot \text{min}$.

Análisis de la estructura primaria

La obtención de la secuencia primaria de los péptidos se obtuvo por el principio de degradación de Edman a través de un secuenciador automático (Procise 491 Protein Sequencing System, Applied Biosystems, Foster City, CA) de la unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM, por el Dr. Manuel Aguilar Ramírez.

El análisis de la masa molecular de los péptidos, se realizó por espectrometría de masas, utilizando la técnica de ESI (electrospray ionization) con un equipo (Voyager System 4271, Applied Biosystems, Foster City, CA). Los análisis se obtuvieron gracias a la colaboración que se tiene con el Dr. Baldomero M. Olivera de la Universidad de Utah. EUA.

Obtención de los clones para GABA_A

Los clones de las diferentes subunidades para el receptor GABA_A fueron proporcionadas por el Dr. Ataúlfo Martínez Torres a cargo del Laboratorio de Neurobiología Molecular del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología, UNAM. Las subunidades fueron α_1 , β_1 , γ_2 y ρ_1 , las tres primeras en el plásmido P3 pCDM8. Estas se propagaron en células competentes MC1061/P3 de *Escherichia coli*, siguiendo las recomendaciones del manual Ultracom (Invitrogen). La selección se realizó en cultivos con medio sólido Luria Betani (LB) y ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$). Una doble selección se llevó a cabo en cultivos líquidos de 3 o 25 ml con ampicilina y tetraciclina [100 $\mu\text{g/ml}$] para cada una de las subunidades.

Para el plásmido con la subunidad ρ_1 se realizó la transformación en células competentes de la cepa XL1Blue *E. coli*. La selección se hizo con ampicilina [80 $\mu\text{g/ml}$] en cajas Petri con medio LB sólido.

Obtención del DNA

La obtención del DNA de los cultivos se realizó con el Kit QIAfilter Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Transcripción *in-vitro*

El proceso de transcripción se hizo con una previa linearización del cDNA utilizando las enzimas *Not I* y *Xho I* dependiendo de la subunidad que se trate (Tabla 4). Una vez linearizado y purificado con QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) se utilizó el molde (2 μg) y como enzima de transcripción la T7 bajo el protocolo del mMessage mMachine Kit (Applied Biosystem).

Tabla 4. Linearización de subunidades para GABA_A

Subunidad de GABA _A	Enzima de restricción	
α_1	<i>NotI</i>	37 °C toda la noche
β_1		
γ_2	<i>XhoI</i>	
ρ_1		

Inyección de RNA mensajero en ovocitos

Se inyectaron ovocitos de *Xenopus laevis* para la expresión heteróloga del RNAm codificante de los receptores GABA_A (α_1 β_1 γ_2) y GABA_A (ρ_1), en cantidades de 50 ng de RNAm para cada receptor, con ayuda de un nanoinyector (Nanoliter 2000, World Precision Instruments).

Electrofisiología

Los estudios electrofisiológicos consistieron en registros de fijación de voltaje con dos electrodos en ovocitos de *Xenopus laevis*. Fijando el voltaje a -60 mV y perfundiendo estos con una solución extracelular cuyo contenido en, concentración milimolar es: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1.0 MgCl₂ y 5 HEPES (pH 7.1-7.5). Las corrientes se generaron con una concentración de 10 y 1 μ M de GABA (Fig. 8).

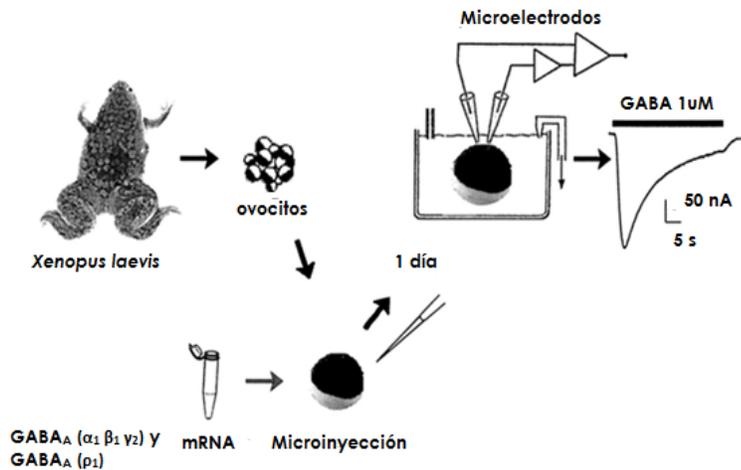


Fig. 8 Diagrama de la micro-inyección de ovocitos de *X. laevis* con el material obtenido de la transcripción *in-vitro* y el registro electrofisiológico. Modificada de Miledi *et al.* 2002

Resultados

Propagación del cDNA para las subunidades del receptor GABA_A (RGABA_A) y transcripción *in-vitro* (RNAm)

Se logró exitosamente la propagación de las diferentes subunidades que componen al receptor GABA_A ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 2$ y $\rho 1$) después de la purificación del cDNA de cultivos de 3ml en medios LB/ampicilina dado que los rendimientos que se obtuvieron fueron por arriba de cientos de ng/ μ l, como puede observarse en la Tabla 5. No obstante, los rendimientos de la transcripción *in-vitro* de estas subunidades fueron menores a cientos de ng/ml excepto para la subunidad $\rho 1$ en la que se obtuvo 1 μ g/ μ l.

Tabla 5. Rendimientos del material genético de las subunidades para el receptor GABA_A

Subunidades	$\alpha 1$	$\beta 1$	$\gamma 2$	$\rho 1$	
Cantidad en ng/ μ l	23 \pm 6.8	149 \pm 68.3	237 \pm 60	770 \pm 47.2	cDNA
	86 \pm 64	94 \pm 9.3	62 \pm 7.2	670.3 \pm 123	mRNA

Expresión heteróloga del RGABA_A en ovocitos de *X. laevis*

La expresión heteróloga del subtipo de receptor GABA_A ($\alpha 1\beta 1\gamma 2$) se realizó con una mezcla de 1 μ g (RNAm) de cada una de las subunidades e inyectando en el citoplasma del ovocito una concentración de 50 ng de la mezcla. Además, de las inyecciones citoplasmáticas, se realizaron inyecciones al núcleo del ovocito con 2 ng de una mezcla del cDNA de las subunidades (1 μ g cada una). Sin embargo no se obtuvieron corrientes GABAérgicas de ninguno de los dos lotes, aún en presencia de una alta concentración de GABA [10 μ M].

Para la expresión del subtipo conformado por la subunidad ρ_1 se inyectó 50 ng de RNAm, ya que se sabe que la expresión heteróloga del homómero de esta subunidad es posible a esta concentración del mensajero [Adamian *et al.*, 2009; Jones & Palmer, 2009]. En este caso la expresión del RGABA ρ_1 fue exitosa y se decidió seguir trabajando con este subtipo del receptor.

Las corrientes generadas por el RGABA_A ρ_1 fueron de 500 nA en promedio en presencia de 10 μ M de GABA. Sin embargo, analizando la curva dosis-respuesta para este receptor a GABA [Goutman & Calvo, 2004], se redujo la concentración a 1 μ M ya que ésta se obtiene la máxima respuesta de RGABA_A ρ_1 . Las corrientes fueron similares e incluso mayores a 500 nA, después de dos días de la inyección. Además, se utilizó la picrotoxina a una concentración 100 μ M, misma que la utilizada como control positivo de inhibición de RGABA_A ρ_1 [Goutman & Calvo, 2004]. Ellos reportan que usando esta concentración de picrotoxina se puede obtener el 50 % de inhibición en la respuesta del receptor, ensayo que pudimos reproducir en el laboratorio, obteniendo un porcentaje de inhibición del 40% (Fig. 9).

Evaluación a través de registros electrofisiológicos de fracciones del veneno de *C. spurius* sobre el receptor de GABA ρ_1 que presentaban actividad sobre receptores nACh

Una vez comprobado que en efecto teníamos corrientes GABAérgicas para este particular subtipo de receptor, se decidió probar 5 fracciones del veneno de *Conus spurius* de un lote que se tenía en el laboratorio (Lote cero) y presentaba actividad sobre receptores de nACh,

las cuales fueron obtenidas por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.

Las fracciones habían sido resuspendidas en 30 μl de solución ND96 y en nuestro ensayo electrofisiológico se utilizó 3 μl por ovocito. La actividad observada se resume en la tabla 6 y los trazos más significativos en la Fig. 10.

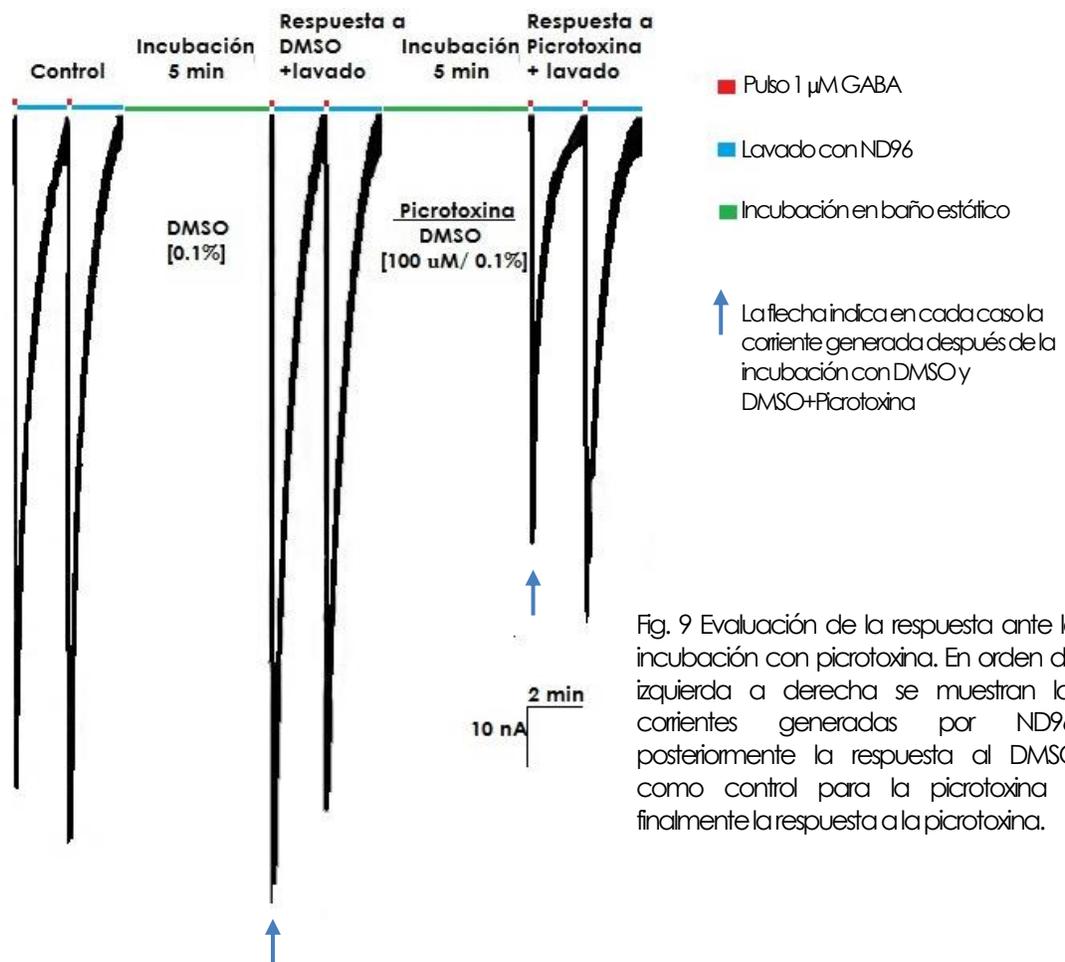


Fig. 9 Evaluación de la respuesta ante la incubación con picrotoxina. En orden de izquierda a derecha se muestran las corrientes generadas por ND96, posteriormente la respuesta al DMSO como control para la picrotoxina y finalmente la respuesta a la picrotoxina.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición del receptor $GABA_{A\rho_1}$ en presencia de diferentes fracciones del veneno de *Conus spurius* (Lote cero).

Fracciones	Porcentaje de inhibición (%)
Control ND96	0
Fracción 8	99
Fracción 10	34
Fracción 12	2
Fracción 13	90
Fracción 14	99

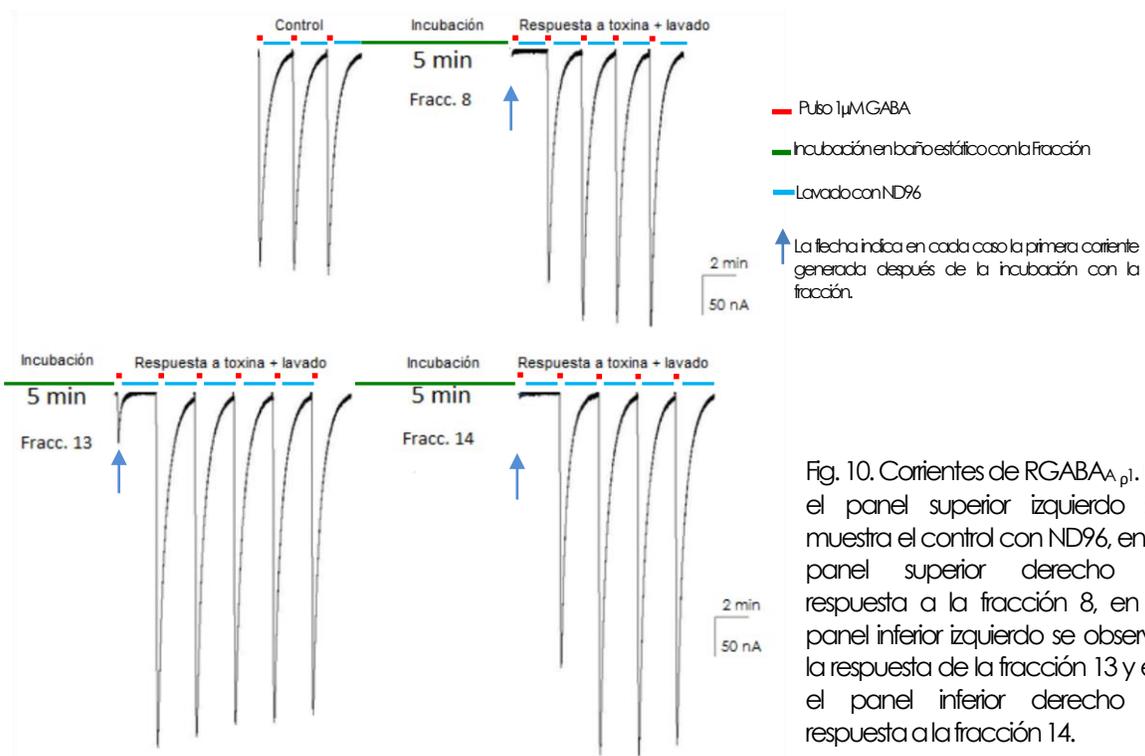


Fig. 10. Corrientes de $R_{GABA_{A\rho_1}}$. En el panel superior izquierdo se muestra el control con ND96, en el panel superior derecho la respuesta a la fracción 8, en el panel inferior izquierdo se observa la respuesta de la fracción 13 y en el panel inferior derecho la respuesta a la fracción 14.

Al ver inhibición cercana al 100% por las fracciones 8, 13 y 14 se decidió fraccionar un nuevo lote de veneno con el fin de obtener más material para repetir los ensayos electrofisiológicos.

La obtención del veneno se realizó homogeneizando en un politrón 5 conductos venenosos en 10 ml de solución de extracción, obteniendo

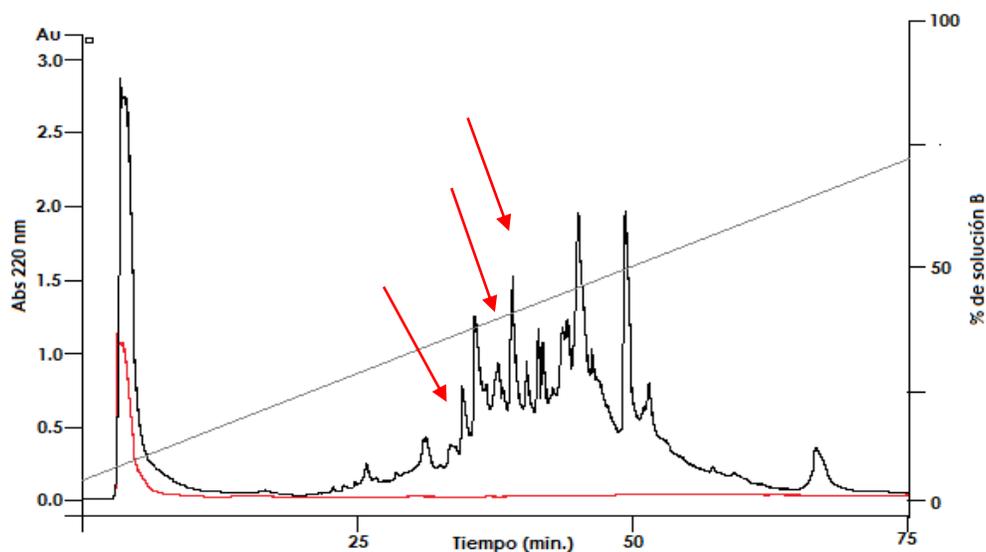
ocho lotes de veneno (1 ml cada uno) los cuales se identificaron con las siglas de la especie y números romanos consecutivos (C.s. I-VIII). Estas se conservaron a -70 °C hasta el momento de su uso.

El fraccionamiento de cada lote se realizó en dos corridas con un volumen de 500 µl cada una, con la finalidad de obtener una mejor resolución de los componentes de veneno. Una vez separados los componentes, estos se colocaron en un concentrador hasta sequedad. Para realizar las pruebas electrofisiológicas las fracciones de ambas corridas fueron resuspendidas en 30 µl de ND96.

En el caso del fraccionamiento C.s. I, las fracciones correspondientes a las que presentaron actividad fueron colectadas con base en el tiempo de retención y el porcentaje de solución B en el cual eluyen. La Tabla 7 resume las equivalencias de las fracciones obtenidas del lote cero y C.s. I. En la Fig.11 se muestra el cromatograma correspondiente al lote C.s. I y se resaltan las fracciones equivalentes a aquellas del lote cero que presentaron actividad.

Tabla 7. Fracciones correspondientes entre fraccionamientos: Lote cero y el lote C.s. I. Unidades de veneno obtenidas calculando el área bajo la curva correspondiente a cada fracción. Estas unidades corresponden a las que se utilizaron en cada experimento.

Fracciones Lote cero	Unidades de veneno Au*min	Fracciones C.s. I	Unidades de veneno Au*min	Tiempo de retención min.	% de sol. B
Fracción 8	0.02	Fracción FVI	0.02	34	39
Fracción 13	0.02	Fracción FVIII	0.02	37	42
Fracción 14	0.3	Fracción FIX	0.3	38	43



La evaluación electrofisiológica de las fracciones VI, VIII y IX del nuevo lote fueron evaluadas con volúmenes de 3 y 9 μl ; se procuró utilizar la misma cantidad de veneno, tomando como referencia las unidades de veneno al calcular el área bajo la curva de cada fracción. Los resultados no fueron los mismos a los obtenidos en el lote cero. Estos se resumen en la Tabla 8. Las Fig. 12 y Fig. 13 ilustran los trazos electrofisiológicos obtenidos después de 5 minutos de incubación de cada una de las fracciones con los diferentes volúmenes.

Tabla 8. Efecto sobre $\text{RGABA}_{A_{\alpha 1}}$ de las fracciones FVI, FVIII y FIX.
Las unidades de veneno corresponden a las utilizadas en cada experimento.

Fracciones	Volumen en μl	Unidades de veneno $\text{Au} \cdot \text{min}$	% de inhibición
FVI	3	0.02	5
	9	0.06	-1.3
FVIII	3	0.02	8
	9	0.06	-2
FIX	3	0.02	14
	9	0.06	-2.5

Los valores negativos presentes en la Tabla 8, indican que no hubo una inhibición de la corriente, sino que la amplitud de ésta se incrementó en el porcentaje indicado en estos valores.

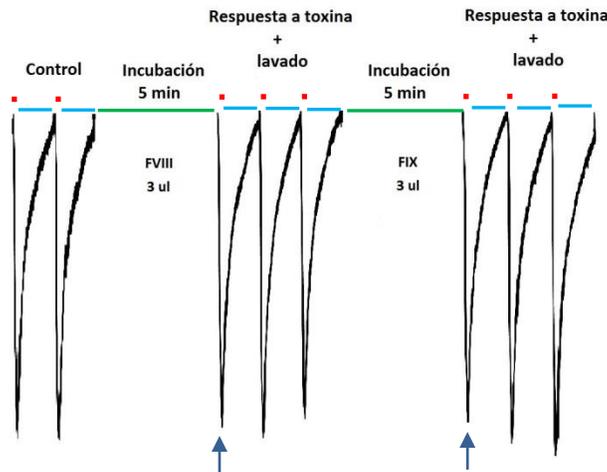
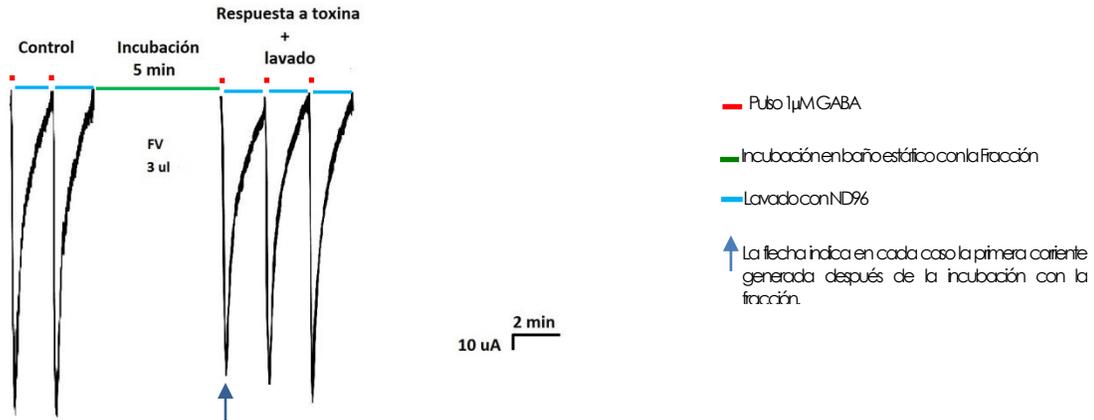


Fig.12 Trazos representativos de las pruebas electrofisiológicas de las fracciones FV, FVIII y FIX (3 µl), del extracto de veneno C. s. l. Panel superior izquierdo muestra el control, el panel superior derecho la respuesta a la toxina para la FV, panel inferior izquierdo la respuesta para la FVIII y el panel inferior derecho la respuesta para la FIX.

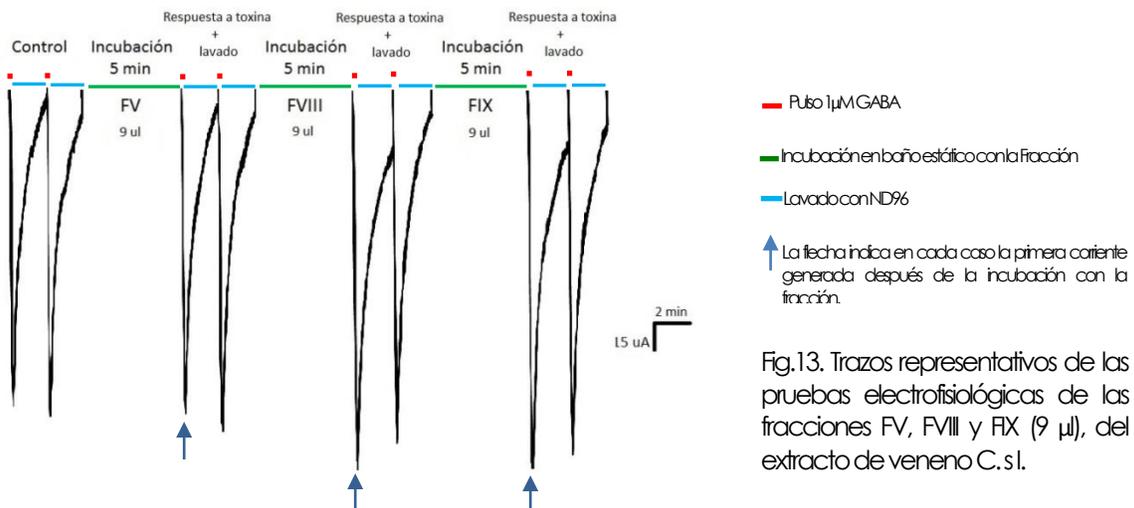


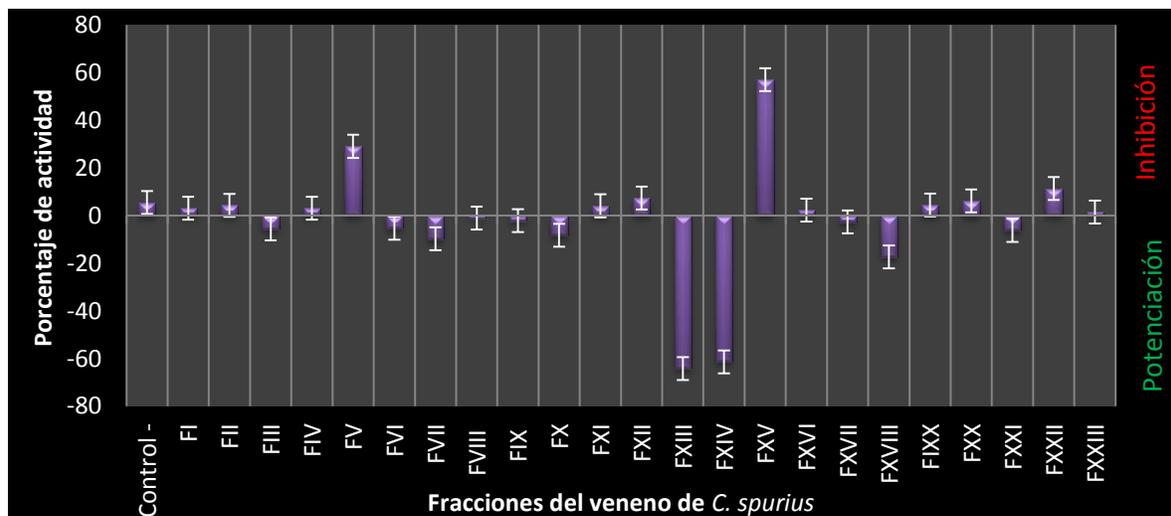
Fig.13. Trazos representativos de las pruebas electrofisiológicas de las fracciones FV, FVIII y FIX (9 µl), del extracto de veneno C. s. l.

Evaluación del veneno completo de *C. spurius* a través de registros electrofisiológicos.

A manera de evaluar un lote completo de veneno, se llevó a cabo el fraccionamiento del lote C.s. II (Fig 14). Las 23 fracciones obtenidas fueron resuspendidas en 20 μ l de ND96 y fueron evaluadas por triplicado. Cada uno de los experimentos se realizó con 3 μ l.

En el gráfico 1 podemos observar el promedio de la actividad de cada fracción, siendo la fracción FXV la que presenta un mayor porcentaje de inhibición, con un valor de 57%. Además es importante recalcar que el efecto de esta fracción es irreversible (Fig. 15). Las fracciones 13 y 14 presentaron un porcentaje mayor al 60% de incremento en la corriente, sin embargo la actividad mostró una rápida recuperación de las corrientes.

Gráfico 1. Promedio de los porcentajes de actividad de las fracciones FI-XXIII



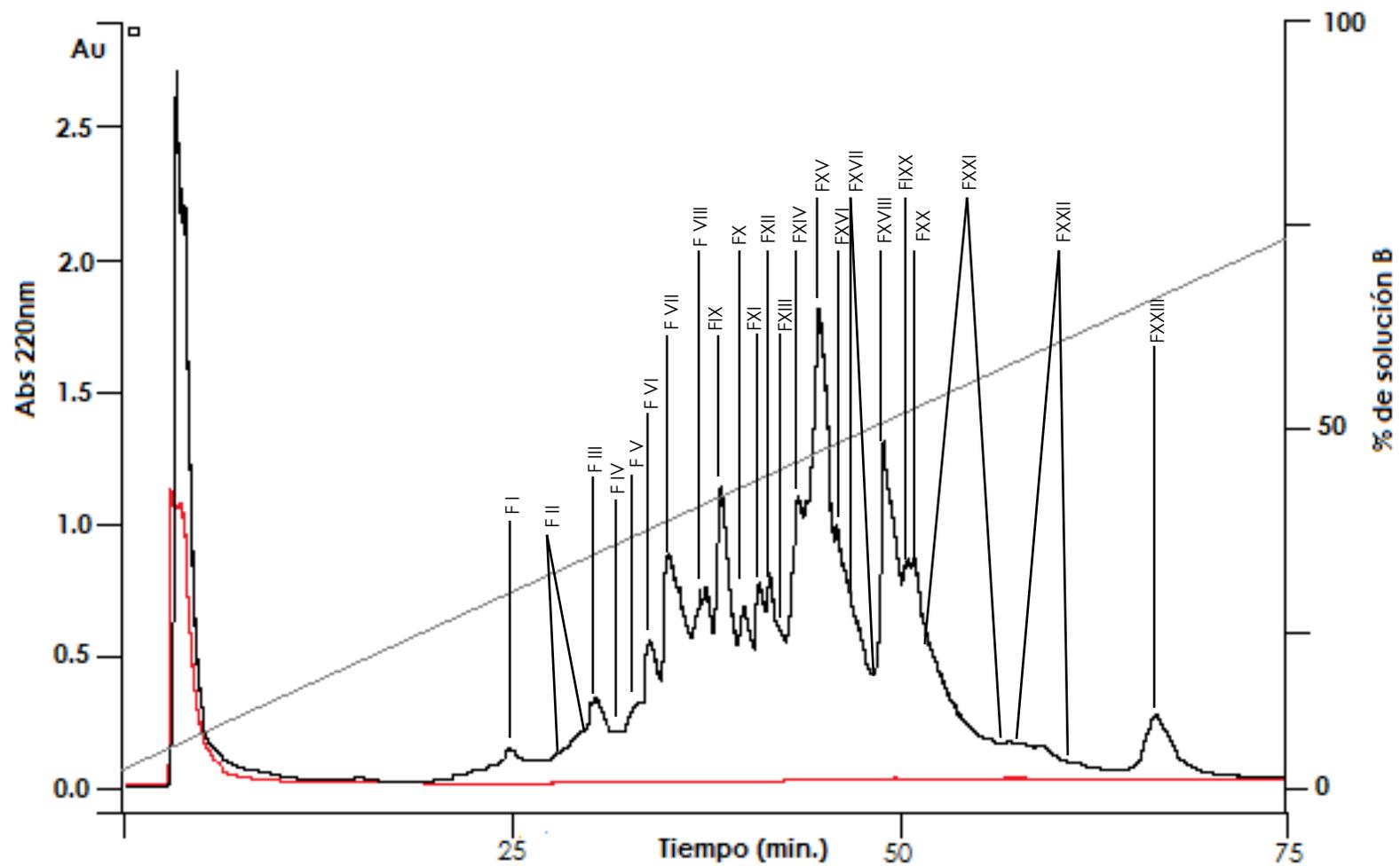


Fig. 14 Cromatograma del extracto crudo de veneno de C. s.l. Gradiente lineal 5-100% de solución B en 90 min (línea gris). Flujo de 1 ml/min. Blanco con solución de extracción 1 ml (línea roja).

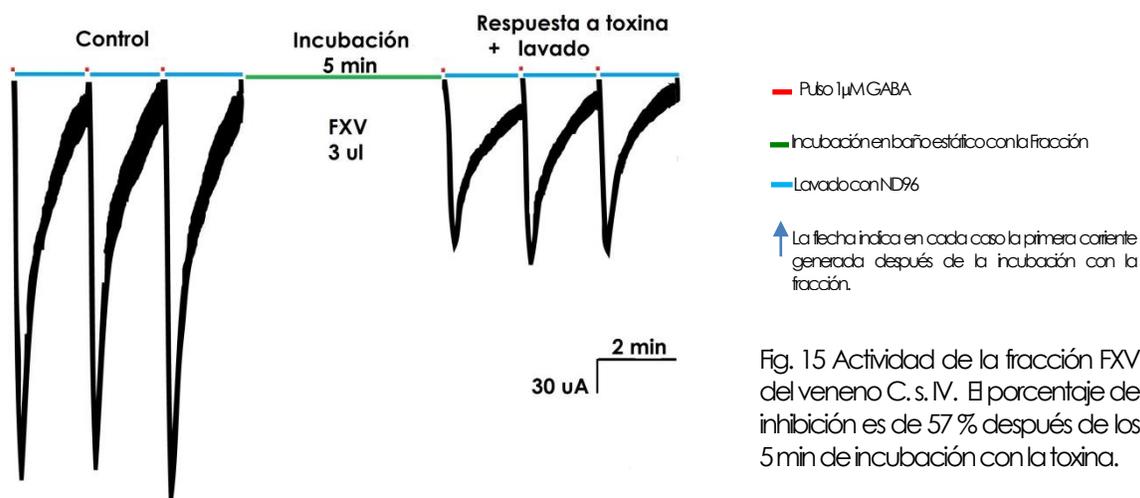


Fig. 15 Actividad de la fracción FXV del veneno C. s. IV. El porcentaje de inhibición es de 57 % después de los 5 min de incubación con la toxina.

Las unidades de veneno correspondientes a cada ensayo se muestran en la Tabla 9. Las unidades de veneno se obtuvieron calculando el área bajo la curva de cada una de las fracciones y posteriormente sacando la relación de unidades por microlitro.

Tabla 9. Fracciones del lote C.s. II. Unidades de veneno por ensayo, obtenidas calculando el área bajo la curva de cada fracción.

Fracciones	Unidades de veneno Au*min por experimento
F I	0.01
F II	0.02
F III	0.02
F IV	0.03
F V	0.03
F VI	0.05
F VII	0.15
F VIII	0.10
F IX	0.12
F X	0.05
F XI	0.06
F XII	0.06
F XIII	0.06
F XIV	0.12
F XV	0.21
F XVI	0.09
F XVII	0.10
F XVIII	0.23
F XIX	0.10
F XX	0.08
F XXI	0.05
F XXII	0.05
F XXIII	0.05

Subfraccionamiento del lote C.s. III

Una vez comprobada la actividad sobre $RGABA_A \rho_1$, se fraccionó un nuevo lote (C.S. III). Se colectó la correspondiente FXV, en tres tubos nombrados FXV1, FXV2 y FXV3 (Fig. 16a). Los tres tubos se agruparon en uno solo con ayuda de un concentrador para obtener un volumen final de 1 ml y el subfraccionamiento se realizó utilizando un gradiente 30-65% de sol. B con un flujo de 1% de sol. B/3 min, obteniendo 6 subfracciones que fueron llevadas a sequedad ya que algunas de ellas fueron colectadas en más de un tubo (Fig. 16b).

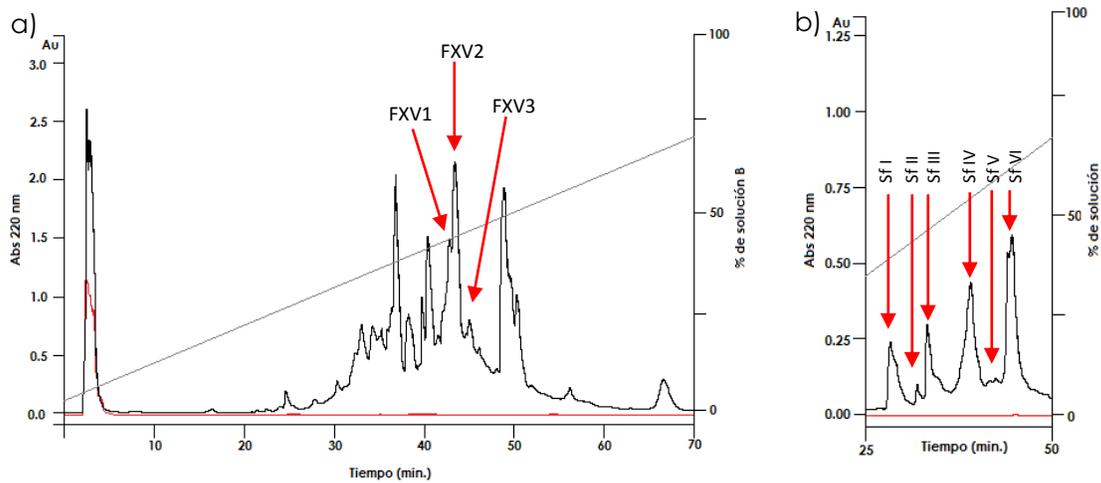


Fig. 16 Panel A. Cromatograma del extracto crudo de veneno de C. s. III. Gradiente lineal 5-100% de solución B en 90 min (línea gris). Flujo de 1ml/min. Fracción FXIV, FXV, y FXVI indicadas con flechas rojas. Panel B de izquierda a derecha subfracciones SFI-VI indicadas con flechas rojas. Gradiente 30-65% de solución B (línea gris). Flujo 1 ml/3 min. Blanco 1 ml de sol. De extracción (línea roja).

Procesamiento de las subfracciones de C.s. III

Las subfracciones fueron resuspendidas en 900 μ l de solución de extracción. Los cuales fueron divididos en tres partes iguales de 300 μ l, que fueron almacenados y debidamente etiquetados para la distinción de cada subfracción en tubos nuevos. Una vez hecho esto, se llevaron a sequedad y almacenadas a -20 °C para su posterior uso en los diferentes análisis experimentales.

Un tercio de las subfracciones se utilizó en las pruebas electrofisiológicas para observar la actividad sobre el receptor de GABA_A $_{\rho 1}$. El segundo tercio de éstas fue destinado a la obtención de la masa experimental mediante espectrometría de masas en la Unidad de Química de la Universidad de Utah, y por último la tercera parte de estas subfracciones se destinó para la obtención de la estructura primaria en la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, UNAM.

Evaluación electrofisiológica de las subfracciones de C.s. III

Cada una de estas subfracciones fue resuspendida en 10 μ l de ND96 para la evaluación electrofisiológica por duplicado. La Tabla 11 presenta las unidades de veneno correspondientes a cada una de las subfracciones por microlitro.

La evaluación electrofisiológica se realizó en dos lotes de ovocitos diferentes. Ambos lotes fueron inyectados con el mismo mensajero de RGABA_A $_{\rho 1}$ (50 ng cada ovocito). La incubación de cada lote de ovocitos fue de dos días para la expresión óptima de los receptores en la membrana.

Tabla 10. Unidades de veneno por microlitro de cada subfracción de C.s. III

Subfracción	Unidades de veneno Au*min por μ l
Sf I	0.044
Sf II	0.008
Sf III	0.005
Sf IV	0.1
Sf V	0.02
Sf VI	0.075

La primera evaluación electrofisiológica se llevó a cabo con 3 μ l de cada subfracción, obteniendo un 65% de inhibición de la corriente por parte de la subfracción Sf I (Fig. 17), el duplicado de esta fracción se realizó de manera inmediata, en un ovocito diferente, el resultado de este experimento fue una inhibición del 50%. Por otro lado, en la primera evaluación de la subfracción Sf IV, el resultado fue un incremento del 200% de la corriente (Fig. 18), al realizar el duplicado de ésta el incremento de la corriente solo fue de un 35%.

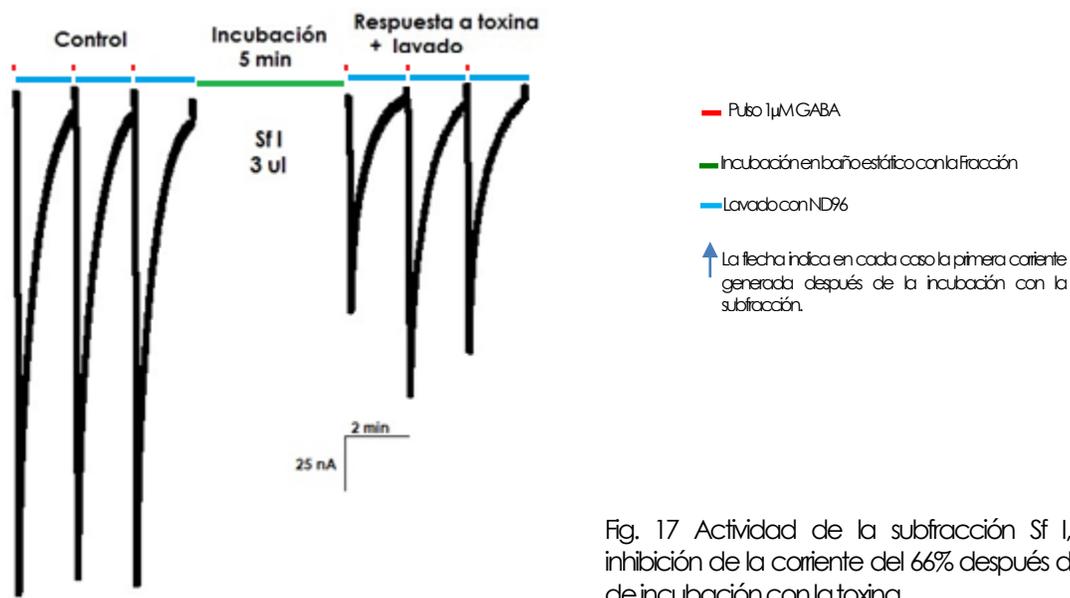


Fig. 17 Actividad de la subfracción Sf I, con una inhibición de la corriente del 66% después de los 5 min. de incubación con la toxina.

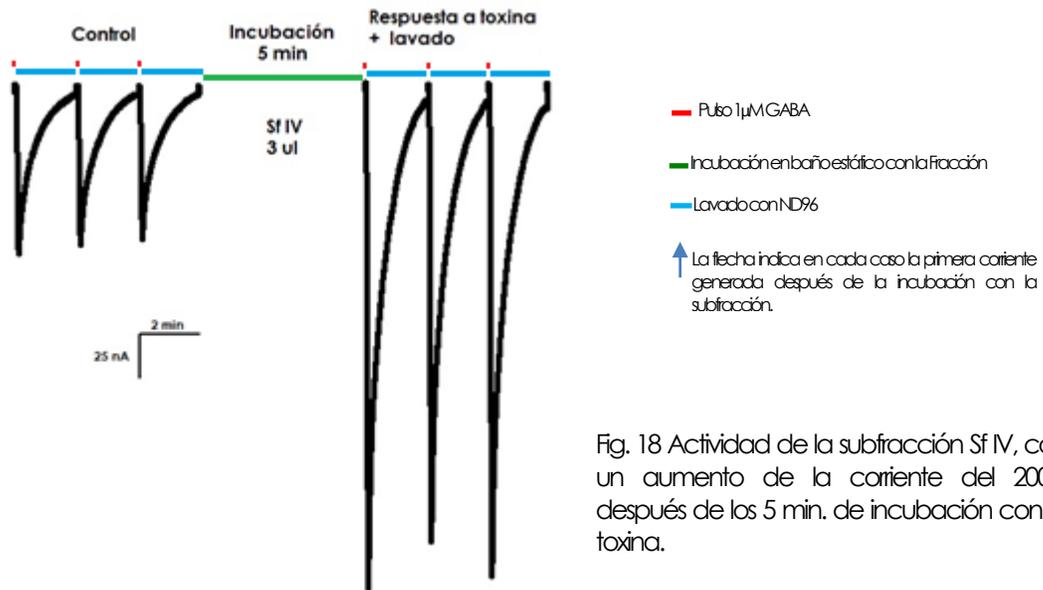


Fig. 18 Actividad de la subfracción Sf IV, con un aumento de la corriente del 200% después de los 5 min. de incubación con la toxina.

Los ensayos con las subfracciones Sf II, III, V y VI (3 µl cada una) no tuvieron cambios significativos en las corrientes de $RGABA_{A \rho 1}$. Los datos de los ensayos se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Porcentajes de inhibición con las subfracciones obtenidas a partir del lote C. s III.

Subfracciones	% de inhibición Primer Ensayo	% de inhibición Segundo ensayo
Sf I	65	50
Sf II	2	2
Sf III	9.5	15
Sf IV	-200	-35
Sf V	5	6.5
Sf VI	9	8

Obtención de la masa experimental de las subfracciones Sf I y Sf IV

Se sabe que muchos de los componentes peptídicos encontrados en los venenos de conos, pueden ser variantes de los mismos péptidos, como resultado de las modificaciones postraduccionales como amidaciones del extremo amino terminal, carboxilaciones del aminoácido glutámico, entre otras. Es por ello que para los análisis de la masa molecular se mandaron a analizar todas las subfracciones del lote C.s. III excepto de la subfracción V.

Los espectros de masa fueron obtenidos a través de la técnica de ionización mediante rocío de electrones (Electrospray Ionization Mass Spectra; -ESIMS). Para la Sf I los resultados obtenidos de este procedimiento indicaron la presencia de un componente mayoritario con una relación m/z de 1,468.72 que corresponde a una masa de 1,467.72 Da; además, se detectó un componente minoritario con una m/z de 1,727.78 que indica una masa de 1,726.78 Da (Fig. 19). En el caso de la subfracción II el componente mayoritario es de m/z de 1,469.96 Da, mismo valor obtenido en la subfracción Sf III con una intensidad del 50%. Las masas obtenidas para las subfracciones IV (Fig. 20) y VI fueron para ambas dos compuestos mayoritarios cuyos valores son m/z de 509.03 Da, 1,017.19 Da y 515.19 Da, 985.26, respectivamente.

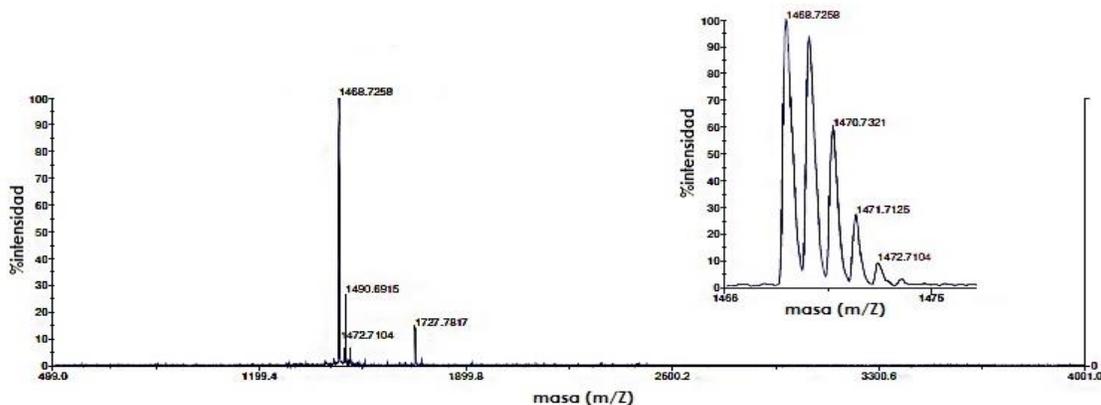


Fig. 19 Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene a la Sf I. A la izquierda en el acercamiento se puede apreciar de mejor forma el componente mayoritario de 1,468 Da.

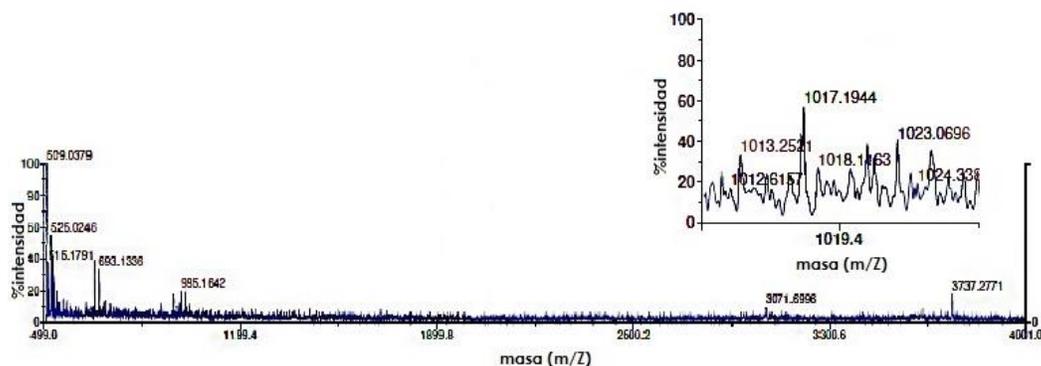


Fig. 20 Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene a la Sf IV. El componente mayoritario se aprecia al principio de la gráfica completa Sf IV con 509 Da. En el acercamiento podemos ver componentes que representan el doble de este peso molecular.

Determinación de la estructura primaria de las subfracciones Sf I y Sf IV

La estructura primaria de las subfracciones se obtuvo por medio de un secuenciador automático de proteínas bajo el principio de degradación de Edman (Procise 491 Protein Sequencing System, Applied Biosystems, Foster City, CA). Este proceso libera solo un aminoácido del extremo amino el cual se identifica mediante un cromatograma por su tiempo de retención.

En la Fig. 21 se ejemplifica los primeros cinco ciclos (residuos) de un total de 15 de la Sf I. El primer cromatograma corresponde a los aminoácidos estándar (panel superior izquierdo).

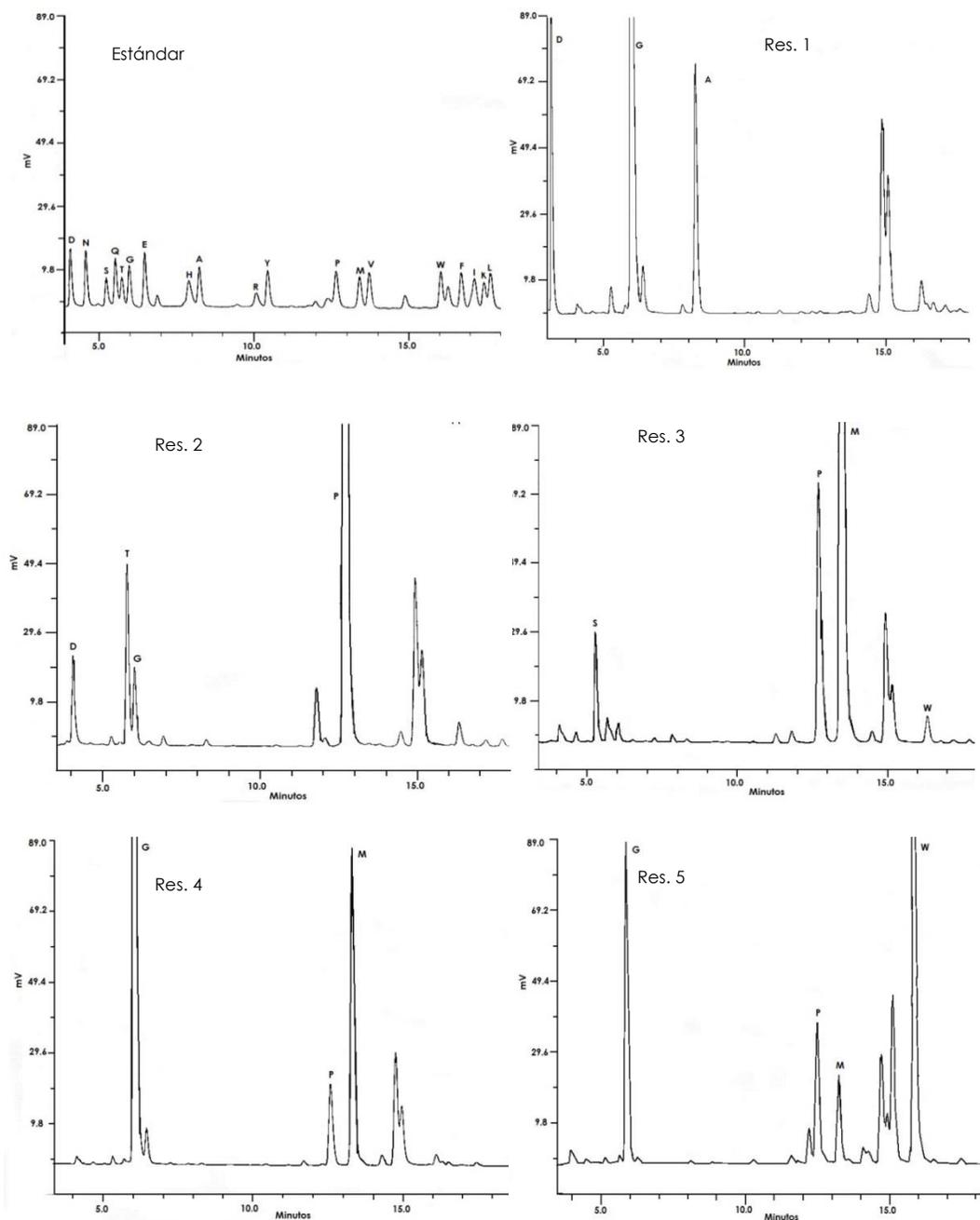


Fig. 21 Cromatogramas de la secuenciación de Edman de la subfracción Sf I. Estándar de PTH-aminoácidos v residuos del 1-5.

De este análisis se obtuvieron dos secuencias, una mayoritaria constituida por 12 aminoácidos: **GPMGWLPVFYRF** y una minoritaria de 9 aminoácidos: **ATSGPMGWL** (Tabla 12). Ambos péptidos comparten una secuencia consecutiva de seis aminoácidos entre sí (aminoácidos en rojo). Este mismo análisis permitió calcular que la cantidad para la secuencia mayoritaria fue de 2,000 pmoles.

En el caso de la subfracción Sf IV, se determinaron 4 secuencias posibles a partir de una muestra de 250 pmoles. Cada secuencia es diferente (Tabla 12). Cromatogramas no mostrados.

En la tabla 12 se presentan las secuencias obtenidas a partir de las subfracciones Sf I y Sf IV. En esta tabla se hace un alineamiento de las dos variantes para la Sf I con base en los seis aminoácidos compartidos (Las "X" completan los espacios necesarios para el alineamiento). Mientras que para las secuencias obtenidas para la subfracción IV no fue posible alinearlas debido a la gran diferencia entre ellas. Los guiones significan aminoácidos no identificados). También reporta los pesos moleculares calculados (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>) para cada una de las secuencias como las masas experimentales vistas en los espectros de masas.

Tabla 12. Estructuras primarias de las subfracciones Sf I y Sf IV y masas moleculares. El estado de cada secuencia es con base a los rendimientos vistos en la secuenciación de Edman.

Subfracción Sf I	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
Secuencia 1	XXXGPMGWLPVFYRF	1468.7	1467.7
Secuencia 2	ATSGPMGWLXXXXXX	861.4	1471.7 1489.7 1726.8
Subfracción Sf IV	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
Secuencia 1	KSSWNRW	962.5	508
Secuencia 2	IINW--LIFY	1081.3	524
Secuencia 3	ASNGNRAY	851.4	692
Secuencia 4	AG--PRFYY	872.4	962 984 1016.2

Discusión

En este trabajo se consideró al RGABA_A ρ_1 como en los trabajos de Barnard *et al.*, 1998 y Didelon *et al.*, 2002.

Uno de los aspectos que es interesante de estudiar de los receptores GABA_A es el que está conformados por las subunidades α_1 , β_1 y γ_2 . El interés radica en que hay autores que dicen que es posible su expresión heteróloga, mas no se ha confirmado su expresión en tejidos cerebrales de mamíferos [McKernan & Whiting, 1996; Martin *et al.*, 2009]. Sin embargo, en el presente trabajo la expresión heteróloga del subtipo GABA $\alpha_1 \beta_1 \gamma_2$ no fue exitosa, a pesar de la presencia de material genético a concentración óptima de las subunidades de este subtipo de receptor, y aun cuando el tiempo de expresión se prolongó hasta por cinco días y la concentración del neurotransmisor se incrementó a 10 μM . La no expresión funcional pudo deberse a que algunas de las subunidades pudiera contener mutaciones a nivel del precursor que aunque exista la expresión de ésta la función se comprometa.

No obstante, la expresión del subtipo GABA_A conformado solo por la subunidad ρ_1 fue completamente satisfactoria y congruente con los trabajos realizados con esta misma subunidad en el mismo modelo de expresión [Martínez-Martínez *et al.*, 2003; Goutman & Calvo, 2004]. De esta forma las corrientes obtenidas a una concentración de 1 μM de GABA fueron ≥ 500 nA y la picrotoxina a una concentración de 100 μM produjo inhibición del 50% de las corrientes.

Una vez corroborada la expresión del receptor GABA_A por las técnicas electrofisiológicas, se empezó a inspeccionar el efecto de 5

fracciones del veneno de *C. spurius* (lote cero) que habían sido probadas y que presentaron actividad sobre el subtipo de receptor de acetilcolina $\alpha 7$.

Tomando en cuenta que tanto los RnACh y el RGABA_A pertenecen a la misma superfamilia [Cederholm & Schofield, 2009] se decidió probar la actividad de estas fracciones, observando una actividad inhibitoria $\geq 90\%$ de la corriente por parte de las fracciones 8, 13 y 14 (Fig. 10).

Sin embargo, los datos obtenidos por parte de estas tres fracciones no fueron reproducibles ya que la evaluación solo pudo realizarse en una ocasión. Al tratar de corroborar este efecto con las fracciones correspondientes del lote C.s. I, no se logró repetir el efecto inhibitorio (Fig. 12) aun cuando la cantidad de veneno presente en las pruebas fue el mismo (Tabla 7). Para resolver esto, se triplicó la cantidad de muestra a evaluar obteniendo inhibición menor al 10% (Tabla 8 y la figura 13). Una posibilidad de no poder repetir los efectos inhibitorios de las fracciones aun cuando se consideró la cantidad, así como los tiempos de retención y porcentaje de solución B al cual eluyen estas fracciones puede deberse a una diferencia en cuanto a los “pooles” de veneno que se utilizó, siendo estos diferentes.

Dado que los datos obtenidos entre el lote cero y el lote C.s. I no fueron comparables y reproducibles, se llevó a cabo la evaluación electrofisiológica de un nuevo “pool” de veneno de *C. spurius*. Para esto se fraccionó el veneno del lote C.s. II obteniendo 23 fracciones, las cuales se evaluaron por triplicado cada una. En el gráfico 1 se observa que de todas las fracciones, la fracción FXV fue la que presentó una actividad inhibitoria promedio del casi 60%. Mientras que las fracciones XIII y XIV presentaron valores similares ($\geq 60\%$) pero de incremento en la corriente. Así

se decidió solo trabajar con la fracción FXV ya que fue la única con un efecto irreversible sobre el $RGABA_{A\rho1}$ (Fig. 15).

Identificada la fracción con actividad sobre el $RGABA_{A\rho1}$, a partir de un nuevo lote de veneno (lote C.s. III) se tomaron las fracciones aledañas a ésta, a manera de asegurar la presencia del componente activo al momento de realizar el subfraccionamiento, ya que se sabe que en ocasiones la elución de los componentes puede variar un poco debido a su concentración o a factores físicos externos [Weston & Brown, 1997; Dong, 2006].

La representación gráfica de este procedimiento se observa en la figura 16; las fracciones FXIV, FXV y FXVI, fueron tomadas del extracto crudo, para su posterior subfraccionamiento con un gradiente de 30-65% de sol. B en 105 min, que equivale a un incremento de sol. B de 1% de sol. B/3 min; este gradiente incluye los porcentajes de solución B al cual eluye el componente con actividad sobre nuestro receptor, teniendo un subfraccionamiento más preciso para cada componente obtenido [Weston & Brown, 1997].

Como se mencionó en los resultados las subfracciones obtenidas se dividieron en tres tercios y cada uno de ellos fueron destinados para diferentes procesos experimentales: evaluación electrofisiológica, espectrometría de masas y secuenciación.

De los resultados obtenidos con el subfraccionamiento del lote C. S. III, la subfracción Sf I es sumamente interesante, dado a que la masa calculada (monoisotópica) considerando amidado el extremo carboxilo (1,467.73 Da) y la masa experimental (monoisotópica) (1,467.72 Da) de la secuencia obtenida (variante 1 de Sf I) coinciden perfectamente. Esto

indica que la estructura primaria de uno de los péptidos contenidos en esta subfracción está completamente resuelta. Al hacer una comparación de secuencias con el banco de datos (NCBI-Blast) dio una similitud del 91 % respecto a la conorfamida-Sr1 (CNF-Sr1). Esta conorfamida es la primera en su tipo reportada y aislada también de *Conus spurius* [Maillo, et al., 2002]. La diferencia entre estas dos secuencias solo radica en el cambio de un aminoácido; valina (V) por leucina (L) en la posición 6 (Ver, tabla 13) Además estos dos aminoácidos presentan características químicas semejantes, ya que ambos se encuentran clasificados dentro de los aminoácidos apolares. Por todas estas características podemos decir que la secuencia obtenida para la Sf I es una variante de la CNF-Sr1 ([V6L]-CNF-Sr1).

Maillo y colaboradores (2002) reportan que CNF-Sr1 tanto la nativa como la sintética causan hiperactividad en ratones, síntomas que son detectables a dosis menores a 0.1 nmol/g, siempre y cuando el extremo carboxilo se encuentre amidado; si esta modificación es eliminada para observar la misma actividad biológica se requiere aumentar la dosis a 1.5 nmol/g. Esta fue la actividad que se reportó para esta conorfamida, más no hay hasta la fecha un reporte de un blanco específico de estas moléculas [Kaas, et al., 2010; Lewis, et al., 2012].

En este trabajo se reporta por primera vez y con base a la similitud con la CNF-Sr1 el blanco molecular para estos conopéptidos. Siguiendo la nomenclatura para las conotoxinas hemos llamado al péptido activo CNF-Sr3. Es de resaltar que la CNF-Sr3 presentó una actividad inhibitoria mayor al 50% sobre las corrientes GABAérgicas. Sin embargo, la potencia de la misma no fue muy alta debido a que si consideramos la cantidad de muestra utilizada en nuestros registros electrofisiológicos con base a lo obtenido en la secuenciación (2,000 pmoles) la concentración final en

nuestra cámara de registro fue de 20 μ M, actividad un poco baja, si consideramos que la mayoría de las α -conotoxinas (bloqueadoras de RnACH) presentan actividad en el orden de nanomolar. No obstante, se debe considerar que la CNF-Sr3 proviene de una subfracción que solo presenta un 88.2 % de pureza (Apéndice A).

Tabla 13. Secuencia de la conorfamida-Sr1 y de las dos variantes de la Sf I. Pesos moleculares y porcentaje de similitud respecto a CNF-Sr1.

Péptidos	Estructura primaria	Peso Molecular Calculado (Daltons)	Peso Molecular Experimental (Daltons)	Porcentaje de homología con respecto a CNF-Sr1
CNF-Sr1	GPMGWV PVFYRF _(r12)	1453.72	1453.8	100
Sf I variante 1	GPMGWL PVFYRF _(r12)	1467.73	1467.72	91
Sf I variante 2	ATSGPMGWL PVFYRF _(r12)	1726.85	1726.78	80

Por otro lado la variante 2 de Sf I presenta un masa monoisotópica calculada de 861.4 Da, valor que no se encontró en los espectros de masas para Sf I. Sin embargo, si consideramos añadir los mismos 6 aminoácidos en la parte C-terminal de la CNF-Sr3 la masa monoisotópica calculada es de 1,726.85 y la masa observable en el espectro de masas es de 1,726.78 (Tabla 13). De esta forma la variante dos es una forma extendida (en el extremo amino) de la variante 1 que presentaría un 80% de similitud con la conorfamida-Sr1.

Los resultados experimentales obtenidos para la subfracción IV fueron muy interesantes, debido al efecto potenciador. Sin embargo, no es exclusivo en nuestro ensayo ya que se ha visto el mismo efecto en algunas conotoxinas. Un ejemplo de estas conotoxinas son las κ A-SmIVA, κ A-SmIVB y

κA-PIVE, péptidos excitatorios relativamente pequeños para canales de potasio activados por voltaje [Teichert *et al.*, 2007].

No obstante, al momento de hacer una búsqueda en la base de datos, de las secuencias obtenidas, la secuencia 2 solamente presentó una similitud del 70% respecto a la toxina sr5a aislada de *C. spurius*. La toxina Sr5a tiene un tamaño de 13 aminoácidos y causa un comportamiento depresivo en ratones [Aguilar, *et al.*, 2006]. De esta secuencias no es posible adjudicar la actividad a alguno de estos péptidos incompletos, aún si consideráramos la secuencia 2 con dos residuos de cisteína por semejanza a la sr5a la masa calculada de esta sería de 1286.6, masa no encontrada en los espectros (Tabla 14).

Tabla 14. Secuencia de la estructura primaria de la conotoxina sr5a y la variantes de la SfIV. Pesos moleculares y porcentaje de homología respecto a sr5a.

Péptidos	Estructura primaria	Peso Molecular Calculado (Daltons)	Peso Molecular Experimental (Daltons)	Porcentaje de homología con respecto a sr5a
Sr5a	IINWCCLIFYQCC	1616.4	1616.6	100
SfIV 2	IINWCCLIFY	1081.3	—	70

Conclusiones

Se obtuvo la secuencia completa de un péptido con efecto sobre el receptor GABA_A ρ_1 al cual nombramos CNF-Sr3. Este péptido actúa sobre su blanco con una potencia relativamente baja a una concentración de 20 μ M, en comparación con las α -conotoxinas donde se observa actividad en el orden de nanomolar. Cabe recalcar que la muestra no era completamente pura y esto es solo una aproximación.

Se obtuvieron 4 secuencias parciales en otra subfracción con actividad también sobre el receptor GABA_A ρ_1 con efecto potenciador. De estas secuencias la variante 2 presenta un 70% de homología con la conotoxina-T-1 sr5a.

Perspectivas

- Realizar la síntesis química de la CNF-Sr3 y probar su actividad sobre $RGABA_{A \rho 1}$ y realizar las pruebas estadísticas pertinentes para confirmar.
- Una vez corroborada la actividad sobre $RGABA_{A \rho 1}$ determinar la concentración inhibitoria 50% (IC_{50}) de la CNF-Sr3.
- Determinar la especificidad de la CNF-Sr3 con base en la IC_{50} .
- Determinar con exactitud la secuencia del elemento activo de la SfIV.
- Comprobar el efecto de la SfIV sobre el $RGABA_{A \rho 1}$.

Bibliografía citada

Adamian, L. Gussin, H. Y., Tseng, Y. Y., Moni, N. J., Feng, F., Qian, H., Pepperbeg, D. R. & Liang, L. (2009). Structural model GABA_C receptor based on evolutionary analysis: Testing of predicted protein-protein interactions involved in receptor assembly and function. *Protein Sci* 18: 2371-2383.

Aguilar, M. B., Flores-Torres, A., Batista, C. V., Falcon, A., López-Vera, E., de la Cotera, E. P. (2009). Structural characterization of five post-traslationally modified isomorphs of a novelputative delta-conotoxin from vermivorous snail *Conus delessertii* from the Mexican Caribbean Sea. *Peptides* 30: 458-466

Aguilar, M. B., Lezama-Monfil, L., Maillo, M., Pedraza-Lara, H., López-Vera, E., & de la Cotera, E. P. (2006). A biologically active hidrophibic T-1-conotoxin from the venom of *Conus spurius*. *Peptides* 27: 500-505.

Aguilar, M. B., López –Vera, E., Becerril, B., Possani, L. D., Olivera, B. M. y de la Cotera, E. P. (2005). A novel conotoxin from *Conus delessertii* wuith posttranslationally modified lysine residues. *Biochemistry* 44: 11130-11136.

Aguilar, M. B., Luna-Ramírez, K. S., Echeverria, D., Falcón, A., Olivera, B. M., de la Cotera, E. P. & Maillo, M. (2008). Conorfamide-Sr2, a gamma-carboxyglutamate-containing FMRF amide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks. *Peptides* 29(2): 186-195.

Aguilar, M. B., Pérez-Reyes L. I., López, Z., de la Cotera, E. P., Falcón, A., Ayala, C., Galván, M., Salvador, C. & Escobar L. I. (2010). Peptide sr11a from *Conus spurius* is a novel peptide blocker for K_v1 potassium channels. *Peptides* 31: 1287-1291.

Albrecht, B. E. , Breitenbach, U., Stuhmer, T., Harvey, R. J., & Darlison, M. G. (1997). In situ hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction studies on the expression of the GABAC receptor p1- and p2-subunit genes in avian and rat brain. *Eur J Neurosci* 9: 2414–2422.

Bandyopadhyay, P. K., Garrett, J. E., Shetty, R. P., Keate, T., Walker, C. S. & Olivera, B. M. (2002). γ -Glutamyl carboxylation: an extracellular post-translational modification that antedates the divergence of molluscs, arthropods and chordates. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1264–1269.

Barbier, J., Lamthanh, H., Le Gall, F., Favreau, P., Benoit, E., Chen, H., Gilles, N., Ilan, N., Heinemann, S. H., & Gordon, D. (2004). A δ -conotoxin from *Conus ermineus* venom inhibits inactivation in vertebrate neuronal Na⁺ channels but not in skeletal and cardiac muscles. *J Biol Chem* 279: 4680–4685.

Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N. & Langer, S. Z. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50: 291–313.

Bayrhuber, M., Vijayan, V., Ferber, M., Graf, R., Korukottu, J., Imperial, J., Garrett, J. E., Olivera, B.M., Terlau, H., Zweckstetter, M. (2005). Conkunitzin-S1 is the first member of a new Kunitz-type neurotoxin family. Structural and functional characterization. *J Biol Chem* 280: 23766–23770.

Becker, S. Terlau, H. (2008). Toxin from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *App Microbiol Biotechnol* 79:1-9.

Bingham, J.-P., A. Jones, R. J. Lewis, P. R. Andrew, & P. F. Alewood. (1996). Conus venom peptides (conopeptides): inter-species, intra-species and within individual variation revealed by ionspray mass spectrometry. *Biomed Asp Marine Pharmacol* 13–27.

Bormann, J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21:16–19.

Buczek, O., Wei, d., Babon, J. J., Yang, X., Fiedler, B., Chen, P. (2007). Structure and sodium channel activity of an excitatory I (1) superfamily conotoxina. *Biochemistry* 46: 9929-9940.

Bulaj, G., de la Cruz, R., Azimi-Zonooz, A., West, P., Watkins, M., Yoshikami, D., & Olivera, B. M. (2001). δ -Conotoxin structure/function through a cladistic analysis. *Biochemistry* 40:13201–13208.

Bulaj, G., Zhang, M. M., Green, B. R., Fiedler, B., Layer, R. T., Wei, S., Nielsen, J. S., Low, S. J., Klein, B. D., Wagstaff, J.D., et al. (2006). Synthetic μ O-conotoxin MrVIB blocks TTX resistant sodium channel Nav1.8 and has a long-lasting analgesic activity. *Biochemistry* 45: 7404–7414.

Cascio, M. (2004). Structure and function of the glycine receptor and related nicotinic receptors. *J Biol Chem* 279:19383-19386.

Catterall, W. A. (1992) Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev* 72 Suppl: S15–S48.

Cederholm J.M.E, Schofield P., Lewis T. (2009). Gating mechanism in Cys-loop receptors. *Eur Biophys J* 39: 37-49

Chen, P., Dendorfer, A., Finol-Urdaneta, R. K., Terlau, H., & Olivera, B. M. (2010). Biochemical characterization of κ M-R111J, a Kv1.2 channel blocker: evaluation of cardioprotective effects of κ M-conotoxins. *J Biol Chem* 285: 14882–14889.

Chen, N.H., Reith, M. E. A. and Quick, M. W. (2004) Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 447: 519–531.

Conolly, C.N., & Wafford, K.A. (2004) The cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc* 32-3: 529-34

Craig, A. G., Norberg, T. Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., Low, W., Dykert, J., Richelson, E., Navarro, V., et al. (1999). Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. *J Biol Chem* 274: 13752–13759.

Cruz, L. J., Gray, W. R., Olivera, B. M., Zeikus, 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.

Cruz LJ, Kupryszewski G, Lecheminant GW, Gray WR, Olivera BM, & Rivier J. (1989). μ -Conotoxin G11A, a peptide ligand for muscle sodium channels: chemical synthesis, radiolabeling and receptor characterization. *Biochemistry* 28: 3437–3442.

Cruz, L. J. & White, J. (1995). Clinical toxicology of Conus snail stings. In: Clinical Toxicology of Animal Venoms, edited by Meier J and White J. Boca Raton, FL: CRC.

Daly, N. L., Ekberg, J. A., Thomas, L., Adams, D. J., Lewis, R. J., & Craik, D. J. (2004). Structures of μ O-conotoxins from *Conus marmoreus*. Inhibitors of tetrodotoxin (TTX)-sensitive and TTX-resistant sodium channels in mammalian sensory neurons. *J Biol Chem* 279: 25774–25782.

Didelon F, Sciancalepore M, Savic N, Mladinic M, Bradbury A & Cherubini E (2002). γ -Aminobutyric acidA ρ receptor subunits in the developing rat hippocampus. *J Neurosci Res* 67: 739–744.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7–61.

Dong, M. W. (2006) Modern HPLC for Practicing Scientists. New Jersey: Wiley-Interscience. 17-80 pp.

Dudley, S. C., Jr., Todt, H., Lipkind, G., & Fozzard, H. A. (1995). A μ -conotoxin-insensitive Na_v channel mutant: possible localization of a binding site at the outer vestibule. *Biophys J* 69: 1657–1665.

Dutertre, S., Croker, D., Daly, N. L., Andersson, A., Muttenthaler, M., Lumsden, N. G., Craik, D. J., Alewood, P. F., Guillon, G., & Lewis, R. J. (2008). Conopressin-T from *Conus tulipa* reveals an antagonist switch in vasopressin-like peptides. *J Biol Chem* 283: 7100–7108.

Ekberg, J., Jayamanne, A., Vaughan, C. W., Aslan, S., Thomas, L., Mould, J., Drinkwater, R., Baker, M. D., Abrahamsen, B., Wood, J. N. (2006). μ O-conotoxin MrVIB selectively blocks Nav1.8 sensory neuron specific sodium channels and chronic pain behavior without motor deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17030–17035.

Ellinor, P. T., Zhang, J. F., Horne, W. A., & Tsien, R. W. (1994). Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin. *Nature* 372: 272–275.

Ellison, M., Feng, Z. P., Park, A. J., Zhang, X., Olivera, B. M., McIntosh, J. M., and Norton, R. S. (2008). α -RglA, a novel conotoxin that blocks the $\alpha_9\alpha_{10}$ nAChR: structure and identification of key receptor-binding residues. *J Mol Biol* 377: 1216–1227.

Endean, R., & C. Duchemin. (1967). The venom apparatus of *Conus magus*. *Toxicon* 4: 275–284.

Endean, R., Parrish, G., & Gyr, P. (1974). Pharmacology of the venom of *Conus geographus*. *Toxicon* 12: 131–138.

England, L.J., Imperial, J., Jacobsen, R., Craig, A.G., Gulyas, J., Akhtar, M., Rivier, J., Julius, D., Olivera, B.M. (1998). Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science* 16: 575-578.

Enz, R. & Cutting, G. R. (1999). GABAC receptor ρ subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur J Neurosci* 11: 41–50.

Espiritu, D. J. D., Watkins, M., Dia-Monje, V., Cartier, G. E., Cruz, L. J., & Olivera, B. M. (2001). Venomous cone snails: molecular phylogeny and the generation of toxin diversity. *Toxicon* 39: 1899–1916.

Fainzilber, M., Lodder, J. C., Van Der Schors, R. C., Li, K. W., Yu, Z., Burlingame, A. L., Geraerts, W. P., & Kits, K. S. (1996). A novel hydrophobic ω -conotoxin blocks molluscan dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Biochemistry* 35: 8748–8752.

Fiedler, B., Zhang, M. M., Buczek, O., Azam, L., Bulaj, G., Norton, R. S., Olivera, B. M., & Yoshikami, D. (2008). Specificity, affinity and efficacy of ω -conotoxin RXIA, an agonist of voltage-gated sodium channels Nav1.2, 1.6 and 1.7. *Biochem Pharmacol* 75: 2334–2344.

Fletcher, E. J. and Lodge, D. (1996) New developments in the molecular pharmacology of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate and kainate receptors. *Pharmacol Ther* 70: 65–89.

Flinn, J. P., Pallaghy, P. K., Lew, M. J., Murphy, R., Angus, J. A., & Norton, R. S. (1999) Roles of key functional groups in ω -conotoxin GVIA synthesis, structure and functional assay of selected peptide analogues. *Eur J Biochem* 262: 447–455.

Flores-Torres, A. (2009). Purificación y caracterización de péptidos del veneno del caracol marino *Conus delessertii*. Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias. Instituto de Ciencias del Mar, UNAM.

Franco, .A, Pisarewicz, K., Moller, C., Mora, D., Fields, G. B., & Marì, F. (2006). Hyperhydroxylation: a new strategy for neuronal targeting by venomous marine molluscs. *Prog Mol Subcell Biol* 43: 83–103.

Garateix, A. (2005). El mar: Fuente de Nuevos Fármacos. *Elementos: Ciencia y Cultura* 12: 39-47.

Goddard, A. W., Ball, S. G., Martinez, J., Robinson, M. J., Yang, C. R., Russell, J. M., & Shekhar, A. (2010). Current perspectives of the roles of the central norepinephrine system in anxiety and depression. *Depress Anxiety* 27: 339–350.

Goutman J.D. y Calvo D.J. 2004 Studies on the mechanisms of action of picrotoxina, quercetin and preganolone at the GABA ρ_1 receptor. *Br J Pharmacol* 141: 717-27.

Han, K. H., Hwang, K. J., Kim, S. M., Kim, S.K., Gray, W. R., Olivera, B. M., Rivier, J., & Shon, K. (1997). NMR structure determination of a novel conotoxin [Pro7,13]aA-conotoxin PIVA. *Biochemistry* 36: 1669–1677.

Han, T. S., Teichert, R. W., Olivera, B. M., Bulaj, G. (2008). Conus venoms - A rich source of peptide-based therapeutics. *Curr Pharm Des* 14: 2462-2479.

Hanley, J. G., Koulen, P., Bedford, F., Gordon-Weeks, P. R., Moss, S. J. (1999). The protein MAP-1B links GABA_A receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature* 397:66–69.

Heinemann, S. H. & Leipold, E. (2007) Conotoxins of the O-superfamily affecting voltage-gated sodium channels. *Cell Mol Life Sci* 64: 1329-1340.

Hille B. (2001) Ion Channels of Excitable Membranes (3rd ed.). Sunderland, MA: Sinauer.

Hooper, D., Lirazan, M. B., Schoenfeld, R., Cook, B., Cruz, L. J., Olivera, B. M., & Bandyopadhyay, P. (2000) Post-translational modification: A two-dimensional strategy for molecular diversity of Conus peptides. In: *Peptides for the New Millennium: Proceedings of the Sixteenth American Peptide Symposium*, edited by Fields GB, Tam JP, and Barany G. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic.

Hopkins, C., Grilley, M., Miller, C., Shon, K., Cruz, L. J., Gray, W. R., Dykert, J., Rivier, J., Yoshikami, D., & Olivera, B. M. (1995). A new family of Conus peptides targeted to the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 270: 22361–22367.

Janes, R.W. (2005). α -conotoxins as selective probes for nicotinic acetylcholine receptor subclasses. *Curr Opin Pharmacol* 5: 280-292.

Johnston, G. A. (1996). GABAC receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci* 17: 319–323.

Jones, S. M. & Palmer, M. J. (2009). Activation of the Tonic GABAC Receptor Current in Retinal Bipolar Cell Terminals by Nonvesicular GABA Release. *J Neurophysiol* 102: 691-699.

Kandel, E. R., Schwartz, J.H., & Jessel, T.M. (2000). Principles of Neural Science (4th ed.). New York: McGraw-Hill.

Kaas, Q., Westermann, J-C & Craik, D.J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon* 55: 1491-1509

Kaufenstein, S, Huys, I., Lamthanh, H., Stöcklin, R., Sotto, F., Menez, A., Tytgat, J., & Mebs, D. (2003). A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. *Toxicon* 42: 43–52.

Koch, E. D., Conti, F., Olivera, B. M., & Terlau, H. (2001). Fast C-type inactivation abolishes the affinity of α -conotoxin PVIIA to Shaker K⁺ channels. *Eur J Physiol* 441: R142.

Koch, W. J., Rockman, H. A., Samama, P., Hamilton, R. A., Bond, R. A., Milano, C. A., & Lefkowitz, R. J. (1995) Cardiac function in mice overexpressing the β -adrenergic receptor kinase or a β ARK inhibitor. *Science* 268:1350–1353.

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

Kumar Jha, R. & Zi-rong, X. (2004) Biomedical Compounds from Marine organisms. *Mar Drugs* 2: 123-146.

Leipold, E., DeBie, H., Zorn, S., Borges, A., Olivera, B. M., Terlau, H., & Heinemann, S.H. (2007) μ O conotoxins inhibit Nav channels by interfering with their voltage sensors in domain-2. *Channels (Austin)* 1: 253–262.

Leipold, E., Hansel, A., Borges, A., & Heinemann, S.H. (2006). Subtype specificity of scorpion beta-toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is determined by the pore loop of domain 3. *Mol Pharmacol* 70: 340–347.

Leipold, E., Hansel, A., Olivera, B. M., Terlau, H., & Heinemann, S.H. (2005) Molecular interaction of δ -conotoxins with voltage-gated sodium channels. *FEBS Lett* 579: 3881–3884.

Lewis, R. J. (2011). Discovery and development of the χ -conopeptide class of analgesic peptides. *Toxicon* <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.07.012>.

Lewis, R. J., Dutertre, S., Vetter, I., & Mac Donald, J. Christie (2012). Conus venom Peptide Pharmacology. *Pharmacol Rev* 64: 259-298.

Li, R. A., Hui, K., French, R. J., Sato, K., Henrikson, C. A., Tomaselli, G. F., and Marbán, E. (2003). Dependence of mu-conotoxin block of sodium channels on ionic strength but not on the permeating $[\text{Na}^+]$: implications for the distinctive mechanistic interactions between Na^+ and K^+ channel pore-blocking toxins and their molecular targets. *J Biol Chem* 278: 30912–30919.

Loffis, J. M. & Janowsky, A. (2003). The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther* 97: 55–85.

Lopez-Vera E., Aguilar- Ramírez M.B. & Heimer E.P (2006) Toxinas de caracoles marinos del género Conus. *Ciencia* 3: 47-51

López-Vera, E. (2010). Los Receptores Nicotínicos de Acetilcolina y Las α -Conotoxinas. *REB* 29(1): 8-12

Lukasiewicz, P. D. (1996) GABAC receptors in the vertebrate retina. *Mol Neurobiol* 12:181–194.

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

Martin, D. L. & Olsen, R. W. (2000). GABA in the Nervous System: The View at 50 Years. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 394-400 pp.

Martin, I., Bowery, N. & Dunn, S. (2009). GABA Receptors. *Tocris Revs.* 32: 1-15

Martínez-Martínez, A., Reyes-Ruiz, J. M., Martínez-Torres, A. & Miledi, R. (2003). Functional Expression in frog oocytes of human ρ_1 receptors produced in *Saccharomyces servisiae*. *PNAS* 101(2): 682-686

McArthur, J. R., Singh, G., McMaster, D., Winkfein, R., Tieleman, D. P., & French, R. J. (2011) Interactions of key charged residues contributing to selective block of neuronal sodium channels by μ -conotoxin KIIIA. *Mol Pharmacol* 80: 573–584.

McDonough, S. I., Boland, L. M., Mintz, I. M., & Bean, B. P. (2002). Interactions among toxins that inhibit N-type and P-type calcium channels. *J Gen Physiol* 119: 313–328.

McGehee, D. S. & Role, L. W. (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons *Annu Rev Physiol* 57:521–46

McIntosh, J. M., Hasson, A., Spira, M. E., Gray, W. R., Li, W., Marsh, M., Hillyard, D. R., & Olivera, B. M. (1995). A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem* 270: 16796–16802.

McIntosh, J. M., Olivera, B. M., Cruz, L. J., & Gray, W. R. (1984). γ Carboxyglutamate in a neuroactive toxin. *J Biol Chem* 259: 14343–14346.

Massilia, G. R., Eliseo, T., Grolleau, F., Lapied, B., Barbier, J., Bournaud, R., Molgò, J., Cicero, D. O., Paci, M., Schininà, M. E., Ascenzi, P., & Polticelli, F. (2003). Contryphan Vn: a modulator of Ca^{2+} -dependent K^+ channels. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 238–246, 2003.

Meyer, L. (2001). Characterization of the venom of the marine snail *Conus delessertii*. Diplomarbeit. Fachbereich Biologie , Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin. 73 pp.

Miledi, R.; Eusebi, F.; Martínez-Torres, A.; Palma, E. & Trettel, F. (2002). Expression of functional neurotransmitter receptors in *Xenopus* oocytes after injection of human brain membranes. *PNAS* 13238–13242

Miljanich, G. P. (1997). Venom peptides as human pharmaceuticals. *Science Med* 6–15.

Milligan, C. J., Buckley, N. J., Garret, M., Deuchars, J., Deuchars, S. A. (2004). Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABAA and GABAC receptor subunits in native central neurons. *J Neurosci* 24: 9241–9250.

Mould, J., Yasuda, T., Schroeder, C. I., Beedle, A. M., Doering, C. J., Zamponi, G. W., Adams, D. J., & Lewis, R. J. (2004). The $\alpha 2\delta$ auxiliary subunit reduces affinity of ω -conotoxins for recombinant N-type (Cav2.2) calcium channels. *J Biol Chem* 279: 34705–34714.

Nielsen, C. K., Lewis, R. J., Alewood, D., Drinkwater, R., Palant, E., Patterson, M., Yaksh, T. L., McCumber, D., & Smith, M. T (2005). Anti-allodynic efficacy of the χ -conopeptide, Xen2174, in rats with neuropathic pain. *Pain* 118: 112–124.

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.

Olivera, B. M. (1997). *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets and drug design: 50 million years of neuropharmacology. (EE Just Lecture, 1996). *Mol Biol Cell* 8: 2101–2109.

Olivera, B. M. (2000). ω -Conotoxin MVIIA: from marine snail venom to analgesic drug. In: *Drugs from the Sea*, edited by Fusetani N. Basel: Karger.

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., Rivier, J., Clark, C., Ramilo, C. A., Corpuz, G. P., Abogadie, F. C., Mena, E. E., Woodward, S. R., Hillyard, D. R., Cruz, L. J. (1990). Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science* 249: 257-63.

Olivera, B. M., & Teichert, R. (2007). Diversity of the Neurotoxic *Conus* Peptides. *Mol Interventions* 7: 251-259.

Ordaz, G., D' Armas, H., Yáñez, D., Hernández, J. & Camacho, A. (2010) Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de los

extractos de tres corales y tres moluscos marinos de Sucre, Venezuela. Rev Biol Trop 58(2): 677-688.

Olsen, R. W. GABA., In K. L. Davis, D. Charney, J. T. Coyle and C. Nemeroff (eds) (2001). Neuropsychopharmacology: Fifth Generation of Progress. American College of Neuropsychopharmacology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 159–168.

Olsen, R. W. and DeLorey, T. M. GABA and glycine. In G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, S. K. Fisher and M. D. Uhler (eds) (1999), Basic Neurochemistry, 6th Edn. New York: Lippincott-Raven, pp. 335–346.

Pan, Y. & Qian, H. (2005) Interactions between ρ and $\gamma 2$ subunits of the GABA receptor. *J Neurochem* 94: 482–490.

Pérez-Rueda F. (2010). Búsqueda de péptido moduladores de receptores de glicina, a partir de venenos de caracoles marinos de la superfamilia Conoidea (*Conus spurius*). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

Puillandre, N., Koua, D., Favreau, P., Olivera, B. M. & Stöcklin, R. (2012). Molecular Phylogeny, Classification and Evolution of Conopeptides. *J Mol Evol* 74: 297-309.

Qian, H. & Ripps, H. (1999) Response kinetics and pharmacological properties of heteromeric receptors formed by coassembly of GABA ρ - and $\gamma 2$ -subunits. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 266:2419–2425.

Rudolph, U., Crestani, F. y Mohler, H. (2001). GABAA receptor subtypes: Dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 188–194.

Sargent, P. B. (1993). The diversity of Neuronal Nicotinic Acethylcholine Receptors *Annu Rev Neurosci* 16:403–43.

Schroeder, C. I., Ekberg, J., Nielsen, K. J., Adams, D., Loughnan, M. L., Thomas, L., Adams, D. J., Alewood, P. F., & Lewis, R. J. (2008). Neuronally μ -conotoxins from *Conus striatus* utilize an α -helical motif to target mammalian sodium channels. *J Biol Chem* 283: 21621–21628.

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., et al. (2001). Two new classes of conopeptides inhibit the $\alpha 1$ -adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nat Neurosci* 4: 902–907.

Sharpe, I. A., Thomas, L., Loughnan, M., Motin, L., Palant, E., Croker, D. E., Alewood, D., Chen, S., Graham, R. M., Alewood, P. F., et al. (2003) Allosteric $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonism by the conopeptide ρ -TIA. *J Biol Chem* 278: 34451–34457.

Shon, K. J., Grilley, M., Jacobsen, R., Cartier, G. E., Hopkins, C., Gray, W. R., Watkins, M., Hillyard, D. R., Rivier, J., Torres, J., et al. (1997). A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry* 36: 9581–9587.

Shon; K. J., Hasson, A., Spira, M. E., Cruz, L. J., Gray, W. R., & Olivera, B. M. (1994). δ -Conotoxin GmVIA, a novel peptide from the venom of *Conus gloriamaris*. *Biochemistry* 33: 11420–11425.

Shon, K. J., Stocker, M., Terlau, H., Stühmer, W., Jacobsen, R., Walker, C., Grilley, M., Watkins, M., Hillyard, D. R., Gray, W. R., et al. (1998). κ -Conotoxin PVIIA is a peptide inhibiting the shaker K^+ channel. *J Biol Chem* 273: 33–38.

Sieghart, W. and Sperk, G. (2002). Subunit composition, distribution, and function of GABAA receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2: 795–816.

Songdhal, J. H. (1973). The Venom and Venom Apparatus of Atlantic the Cone, *Conus spurius atlanticus*. *Bull Mar Sci* 23(3): 600-612.

Taylor, J. D. & Morris, N.J. (1988). Relationships of Neogastropoda. *Malacological Rev Suppl* 4: 167–179.

Teichert, R. W., Jacobsen, R., Terlau, H., Yoshikami, D., & Olivera, B. M. (2007) Discovery and characterization of the short κ A-conotoxins: a novel subfamily of excitatory conotoxins. *Toxicon* 49: 318–328.

Terlau, H., Boccaccio, A., Olivera, B. M., & Conti, F. (1999) The block of Shaker K^+ channels by κ -contoxin PVIIA is state dependent. *J Gen Physiol* 114: 125–140.

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

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

Walker, C. S., Jensen, S., Ellison, M., Matta, J. A., Lee, W. Y., Imperial, J. S., Duclos, N., Brockie, P. J., Madsen, D. M., Isaac, J. T., et al. (2009). A novel Conus snail polypeptide causes excitotoxicity by blocking desensitization of AMPA receptors. *Curr Biol* 19: 900-908.

Wang, Ch-Z. y Chi C-W. (2004). Conus peptides a rich pharmaceutical treasure. *Acta Biochem Biophys Sin* 36: 713-723

Weston, A. & Brown P. R. (1997). HPLC and CE Principles and Practice. San Diego, California. *Academic Press.* 22-60 pp

Whiting, P. J., Bonnert, T. P. y McKernan R.M. (1999) Molecular and functional diversity of the expanding GABAA receptor family. *Ann NY Acad Sci* 868: 645-653.

Wegelius, K., Pasternack, M., Hiltunen, J. O., Rivera, C., Kaila, K., Saarma, M., Reeben, M. (1998). Distribution of GABA receptor rho subunit transcripts in the rat brain. *Eur J Neurosci* 10: 350-357.

Wilson, M. J., Zhang, M. M., Azam, L., Olivera, B. M., Bulaj, G., & Yoshikami, D. (2011). Nav subunits modulate the inhibition of Nav1.8 by the analgesic gating modifier μ O-conotoxin MrVIB. *J Pharmacol Exp Ther* 338: 687-693.

Winqvist, R. J., Pan, J. Q., & Gribkoff, V. K. (2005). Use-dependent blockade of Cav2.2 voltage-gated calcium channels for neuropathic pain. *Biochem Pharmacol* 70: 489-499.

Wittekindt, B., Malany, S., Schemm, R., Otvos, L., Maccacchini, M. L., Laube, B., & Betz, H. (2001). Point mutations identify the glutamate binding pocket of the N-methyl-daspartate receptor as major site of conantokin-G inhibition. *Neuropharmacology* 41: 753-761.

Woodward, S. R., Cruz, L. J., Olivera, B. M., & Hillyard, D. R. (1990). Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *EMBO J* 1: 1015-1020.

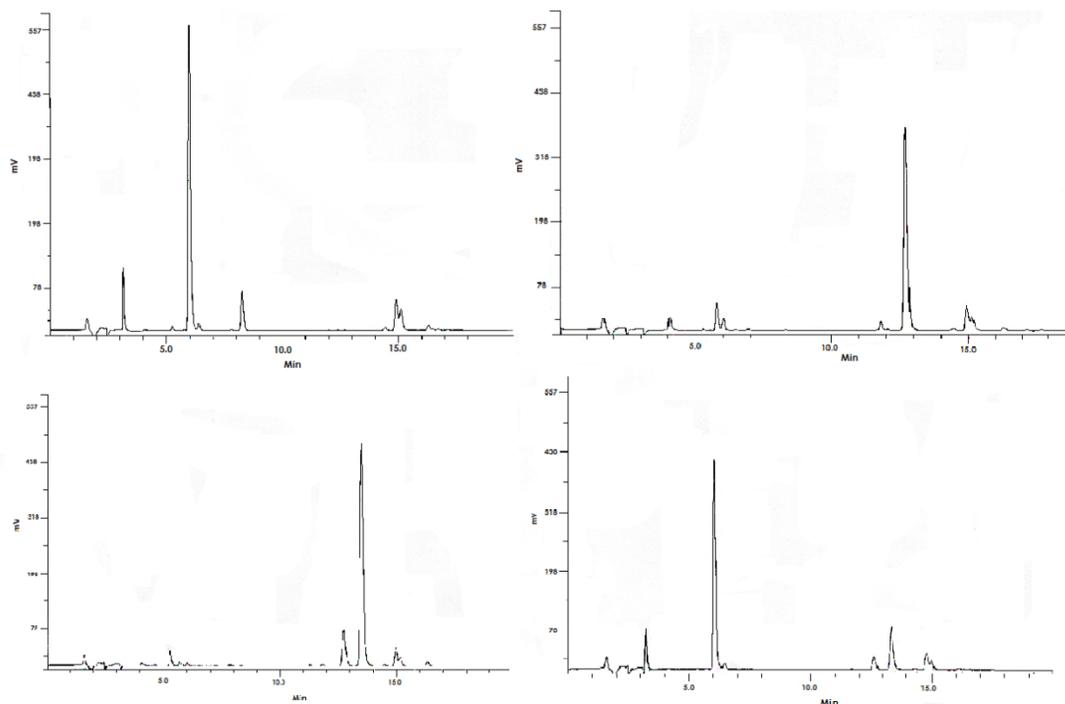
Yazulla, S. (1986). GABAergic mechanisms in the retina. *Prog Ret Res* 5: 1–52.

Zamora-Bustillos, R., Aguilar, M. B., Falcón, A. & de la Coteria, E. P., (2009). Identification, by RT-PCR, of four novel T-1-superfamily conotoxins from the vermivorous snail *Conus spurius* from the Gulf of Mexico. *Peptides* 30: 1396-1404.

Zhang, M. M., Fiedler, B., Green, B. R., Catlin, P., Watkins, M., Garret, J. E., *et al.* (2006). Structural and functional diversities among μ -conotoxins targeting TTX-resistant sodium channels. *Biochemistry* 45: 3723-3732.

Zhang, S. J., Yang, X. M. Liu, G. S., Cohen, M. V., Pemberton, K. & Downey, J. M. (2003). CGX-1051, a peptide from *Conus* snail venom, attenuates infarction in rabbit hearts when administered at reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 42: 764-771.

Apéndice A



Cromatograma de los primeros cuatro amino ácidos para obtener la secuencia de Sf 1 o CNf-3.

Tabla. En verde la posición del aminoácido. En rojo la secuencia y concentración en pmoles del compuesto mayoritario y en negro la secuencia y concentración en pmoles del compuesto minoritario de la muestra.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G	P	M	G	W	L	P	V	F	Y	R	F		
A	T	S	G	P	M	G	W	L	P	V	F	Y	R
2236.63	1637.99	2540.76	1795.79	842.53	1423.62	791.65	11030.8	979.9	1032.1	1114.34	244.56		
316.47	280.88	186.42	?	179.51	262.81	170.39	26.26	116	116.26	163.17	?	148.01	136.51

Tabla de la suma de los componentes totales de Sf 1 y los porcentajes correspondientes a cada componente

Suma del total de componentes	17845.591	100%
Comp. mayoritario	15742.898	88.22%
Comp. minoritario	2102.693	11.78%