



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
CARRERA QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGICA**

**EFFECTO DE DOS PÉPTIDOS DE ORIGEN
MARINO EN LA INVASIÓN Y
PROLIFERACIÓN DE TOXOPLASMA GONDII.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FÁRMACO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

RODRIGO ILLANES ORTIZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. SAÉ MUÑIZ HERNANDEZ**

**ASESOR DE TESIS:
ÁNGEL GARCÍA SÁNCHEZ**

CIUDAD DE MÉXICO, 2016



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.

Agradecimientos.

- A la Universidad Autónoma de México.
- A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Al Instituto Nacional de Cancerología.
- A mi Directora de tesis la Dra. Saé Muñiz Hernández
- A mi asesor de tesis M. en C. Ángel García Sánchez
- A mis compañeros de laboratorio.

Dedicatoria.

Dedico esta tesis a mis padres quienes me apoyaron en mi desarrollo profesional y personal, a mis hermanos quienes muchas veces me hicieron reír, a mis amigos con los que he convivido a lo largo de la carrera, a los profesores que me orientaron en mi desarrollo académico, y finalmente a Yolanda Alemán quien me ha ayudado y apoyado en muchas ocasiones.

Índice

1. Introducción.	5
2. Marco Teórico.	6
2.1. <u>Toxoplasma gondii</u> .	6
2.2. Formas parasitarias de <u>T. gondii</u> .	7
2.3. Ciclo de vida de <u>T.gondii</u> .	9
2.3.1. Etapa sexual.	9
2.3.2. Etapa asexual.	10
2.4. Mecanismos de invasión de <u>T. gondii</u> .	12
2.4.1. Invasión activa.	12
2.4.2. Invasión pasiva.	14
2.5. Epidemiología.	16
2.6. Tratamiento.	18
2.7. Conotoxinas.	20
2.6. <u>Conus californicus</u> .	21
3. Planteamiento del problema.	23
4. Hipótesis.	23
5. Objetivos.	24
6. Materiales y métodos.	25
6.1. Diseño experimental.	25
6.2. Técnicas.	26
6.2.1. Mantenimiento y purificación de taquizoitos de <u>T.gondii</u> .	26
6.2.2. Mantenimiento de Línea Celular	26

6.2.3 Conotoxinas	26
6.2.4 Exposición de taquizoíto extracelulares a los péptidos.	27
6.2.5. Ensayo de invasión.	27
6.2.6. Ensayo de proliferación.	28
6.3. Análisis estadístico.	28
7. Diagrama de flujo	29
8. Resultados.	30
9. Discusión.	38
10. Conclusión.	40
11. Perspectivas.	40
12. Referencias.	41
13. Anexo.	45

1. Introducción:

El parásito intracelular *Toxoplasma gondii*, fue descrito por primera vez en 1908 por Nicolle, Monceaux y por Splendore. Su nombre proviene de la palabra griega toxon que significa “arco” y hace referencia a la forma que tiene el parásito. Toxoplasma puede infectar a cualquier vertebrado de sangre caliente. Una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con este parásito.

El tratamiento más común contra la toxoplasmosis es la combinación de sulfadiazina y pirimetamina; sin embargo, esta terapia tiene acción limitada sobre el parásito; además induce efectos adversos. Por esta razón hoy en día se buscan nuevas formas de tratar la infección. El uso de fármacos de origen natural, terrestres ó marinos, son investigados como una alternativa para el tratamiento de algunas enfermedades de interés médico como es, la toxoplasmosis.

Compuestos alternativos que actualmente se encuentran analizando sus propiedades parasiticidas, son las conotoxinas, éstas son obtenidas de caracoles marinos del genero *Conus*. El género *Conus* es un grupo grande y extenso de más de 700 especies de depredadores carnívoros que se encuentran en todos los hábitats marinos tropicales. Las conotoxinas tienen como blanco una amplia gama de receptores y canales iónicos con una alta selectividad, algunos de estos compuestos han sido utilizados por su actividad farmacológica en contra del dolor; sin embargo, no existe información sobre su posible función como antiparasitarios, por lo que en este trabajo se probara la actividad antiparasitaria que podrían presentar en contra del parásito intracelular *Toxoplasma gondii*.

2. Marco teórico

2.1. Toxoplasma gondii.

El parásito Toxoplasma gondii fue descubierto por primera vez en 1908 por Nicolle y Monceaux en el norte de África, en un roedor parecido a un hámster, “El gondi” (*Ctenodactylus gondii*) y en conejos por Splendore en Brasil¹. Inicialmente se creyó que el parásito era una especie de *Leishmania*, posteriormente se descubrió que se trataba de otro parásito el cual fue llamado Toxoplasma gondii debido a su forma característica en arco, siendo la única especie del género *Toxoplasma*^{1,2}.

La taxonomía de T.gondii mayormente admitida fue descrita en 1980 por Levine³:

- reino: Protista (Goldfuss, 1918);
- dominio: Eukarya
- phylum: Apicomplexa (Levine, 1970);
- clase: Sporozoea (Leuckart, 1879);
- subclase: Coccidia (Leuckart, 1879);
- orden: Eucoccidüda (Léger y Duboscq,1910);
- suborden: Eimerüna (Léger, 1911);
- familia: Sarcocystidae (Poche, 1913);
- subfamilia: Toxoplasmatinae (Biocca, 1957);
- género: *Toxoplasma* (Nicolle y Manceau,1909);
- especie: *gondii*

2.2. Formas parasitarias de *T. gondii*.

Existen tres formas infecciosas de *T. gondii*:

- Taquizoíto: Proviene de la palabra griega “tachos” que significa velocidad, fue llamado así, debido a su rápida replicación en cualquier célula nucleada⁴, se replica en un promedio de 6-8 h⁵. Es la forma dinámica, altamente infectiva e invasiva del parásito⁶. El taquízoito tiene forma de arco ó semi luna, con un tamaño de 3 x 7 µm con una distribución polarizada de sus organelos citoplásmicos, de tal forma que se identifica un extremo apical y un extremo posterior. Se encuentra rodeado por un complejo de tres membranas conocido como películo (membrana plasmática y el complejo membranal interno). Posee un núcleo esférico con un diámetro de 1-2 µm; una mitocondria única y ramificada que tiene la característica de convolucionar dentro del citoplasma del taquizoíto y alrededor del núcleo, también posee aparato de Golgi y retículo endoplásmico⁶. En la región apical se encuentran organelos relacionados con la motilidad, la secreción y la invasión celular, como son: el conoide, el anillo polar anterior, las roptrías, los micronemos y los gránulos densos (Fig 1). El citoesqueleto del parásito está constituido por 22 microtúbulos subpeliculares que se encuentran anclados al anillo polar anterior y que recorren en forma helicoidal 2/3 partes del cuerpo del parásito^{6,7}.

El conoide, es un organelo retráctil y está formado por estructuras fibrilares constituidas por subunidades de α -tubulina que se encuentran enrolladas en espiral. Las roptrías, tienen una longitud de 1 a 4 µm y se sitúan en el tercio anterior del parásito. Los gránulos densos son organelos

citoplasmáticos de 200 nm de diámetro, situados a ambos lados del núcleo, los cuales están limitados por una membrana y su contenido es homogéneo. Los micronemos son organelos más pequeños que los gránulos densos y se localizan en la mitad anterior de los taquizoítos y están limitados por una membrana³.

- Bradizoíto: El termino bradizoíto proviene de la palabra griega “brady” que significa lento, fue nombrado de esta forma para describir la lenta multiplicación cuando se convierte en quiste tisular⁴. Los quistes tisulares crecen y se desarrollan dentro de la célula hospedera, el tamaño del quiste tisular varía, los quistes tisulares jóvenes pueden ser pequeños con un tamaño de 5 mm de diámetro y contiene sólo dos bradizoítos, mientras que los más viejos contienen cientos de bradizoítos⁴.

Los quistes tisulares aparecen en la etapa crónica de la infección, esta estructura es capaz de evadir al sistema inmune del hospedero y vivir dentro sin provocar síntomas; sin embargo, si el sistema inmune se compromete, el bradizoíto puede diferenciarse a taquizoíto y reemerger^{6,8}.

- Esporozoíto: El esporozoíto se encuentra contenido en el ooquiste, que se forma durante el proceso sexual de reproducción celular y son expulsados en las heces, en su forma no esporulada^{6,9}.

En el medio ambiente bajo condiciones adecuadas esporula en 2-3 días, el ooquiste posee dos esporoquistes elipsoidales y cada uno de estos contiene 4 esporozoítos, lo que da un total de 8 esporozoítos, los esporozoítos son de 2 × 6-8 µm de tamaño; el esporozoíto maduro se convierte en la forma infecciosa^{6,8,10}.

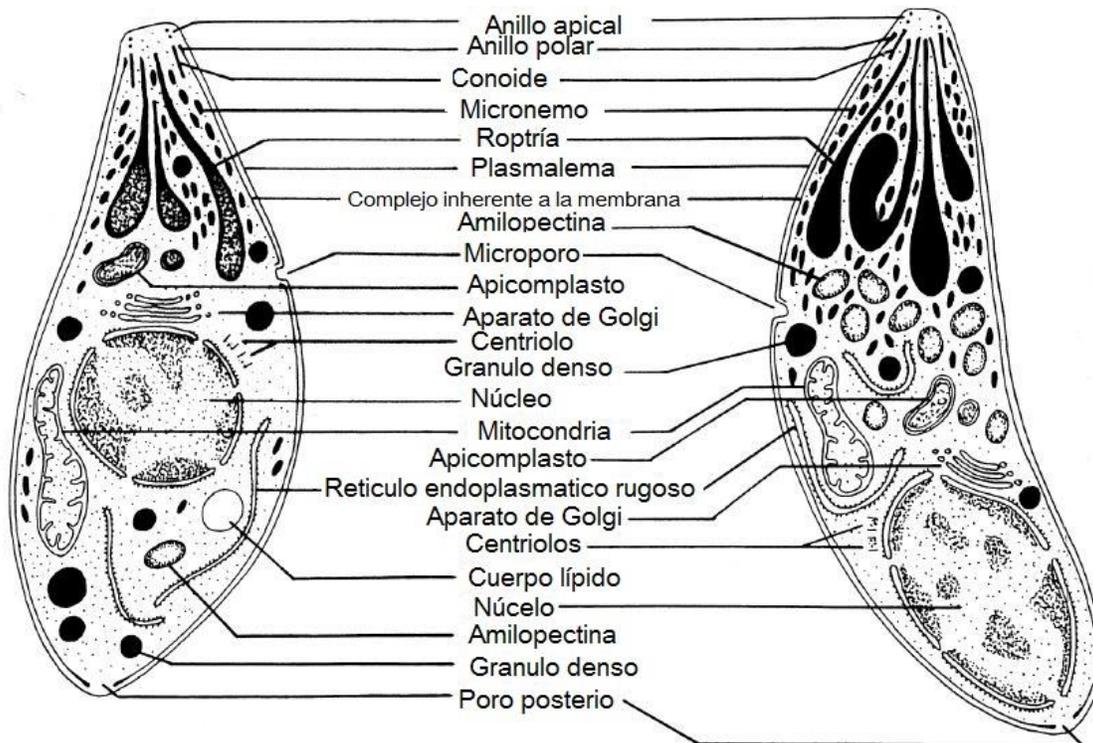


Figura 1. Esquematación de la estructura del taquizoito (izquierda) y bradizoito (derecha) de *Toxoplasma gondii*.
(Modificada de Dubey et al, 1998)

2.3. Ciclo de vida de *T. gondii*.

El taquizoíto, el bradizoíto y el esporozoíto están vinculados al complejo ciclo de vida del parásito⁴, el cual se divide en dos etapas, la sexual y la asexual.

2.3.1. Etapa sexual

El hospedero definitivo (Felinos) se infectan al consumir roedores y aves que porten quistes tisulares o vegetales que contengan ooquistes. Por acción de las enzimas digestivas intestinales se liberan los bradizoíto y estos invaden a los

enterocitos del intestino del gato, donde se lleva a cabo un proceso de diferenciación celular llamado gametogonia^{6,9,11} (Figura 2 A).

Los bradizoítos una vez que invaden a las células epiteliales del yeyuno en los felinos, producen el nacimiento de muchos estadios asexuados de esquizontes que se dividen por endopoligenia^{3,4}. Varios días después de la infestación, los gamontes o gametocitos formados en los enterocitos generan dos tipos de gametos: los macrogametos hembras, esféricos, inmóviles, voluminosos, y los gametos machos, ovoides, que liberan microgametos móviles, biflagelados^{3,4}. La fecundación exige la penetración del macrogameto contenido en un enterocito del íleon por un microgameto, lo que posibilita la formación de la pared del ooquiste, el cual es eliminado en las heces en forma diploide y no esporulada la cual no es infecciosa. Su pared de doble capa delimita un volumen esférico de 10 a 12 µm de diámetro, su gran resistencia le permite al parásito a sobrevivir más de un año en el suelo, cuando las condiciones de humedad y temperatura (4-37°C) son favorables, los ooquistes esporulan y pueden infectar a los hospederos quienes lo ingieren^{3,9,11}.

2.3.2. Etapa asexual

El ciclo de replicación asexual se desarrolla en los hospederos intermediarios, los cuales pueden infectarse por el consumo de alimentos contaminados con los ooquistes esporulados o de quistes tisulares. En los hospederos intermediarios, se lleva a cabo una infección extraintestinal lo que genera un ciclo incompleto de la reproducción¹¹ (figura 2 B).

Los bradizoítos se convierten en taquizoítos y da lugar a la infección aguda con replicación intracelular de los taquizoítos. El taquizoíto invade el epitelio intestinal

y atraviesa la lámina propia llegando al torrente sanguíneo, donde se diseminará y será capaz de infectar prácticamente todos los órganos, incluyendo aquellos que se encuentran en sitios inmunológicamente privilegiados, como por ejemplo, la barrera hemato-encefálica^{3,5,6,11}.

En un individuo inmunocompetente, la presencia del parásito activará al sistema inmune lo que provocará la formación de anticuerpos y la activación de células efectoras de la respuesta inmune como los macrófagos, linfocitos T, etc; con la consecutiva liberación de citocinas como interleucinas e interferón gamma (IFN-gamma). El IFN-gamma es uno de los componentes que inducen la diferenciación de los taquizoítos a bradizoítos y de bradizoítos a quiste tisular^{3,6,11}

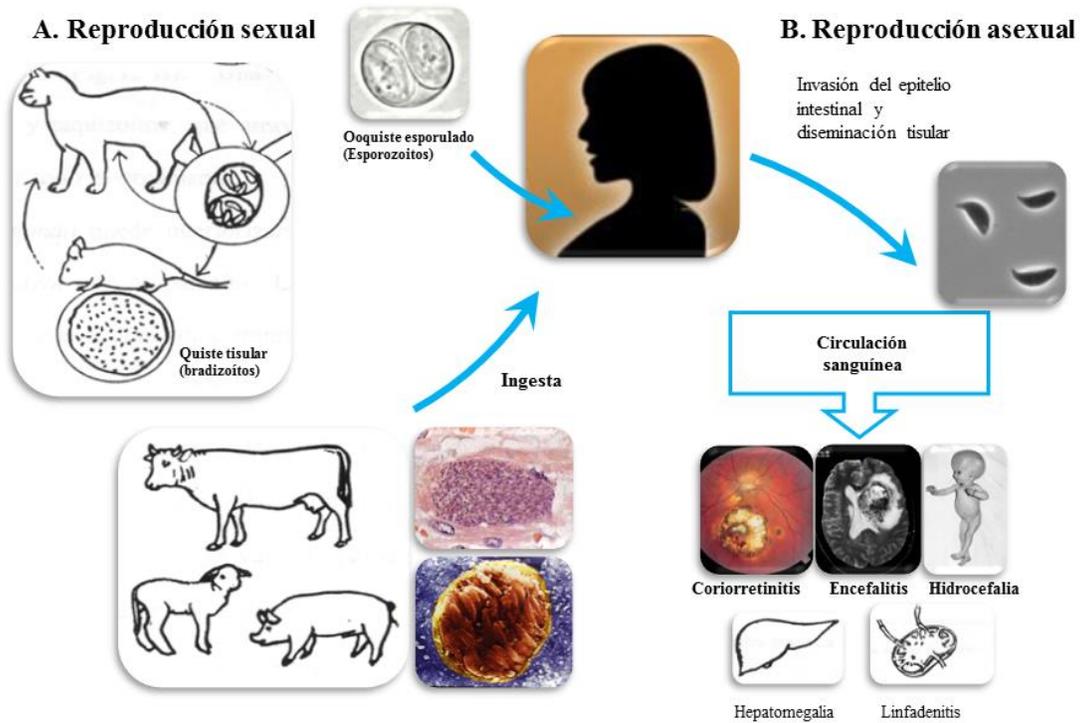


Figura 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. A. Reproducción sexual, la cual tiene lugar en el hospedero definitivo. B. Reproducción asexual, tiene lugar en los huéspedes intermediarios. (Tomada de Muñiz- Mondragón, 2009)

2.4. Mecanismo de Invasión del Toxoplasma gondii.

El taquizoíto es la forma móvil altamente infectiva, que se encarga de la diseminación del parásito a través del tejido tisular del hospedero; sin embargo, esta forma parasitaria carece de organelos de locomoción, por lo que posee un citoesqueleto que le permite realizar una serie de movimientos para llevar a cabo la invasión celular. Los movimientos por deslizamiento y la extrusión del conoide son procesos dinámicos activados durante la invasión, estos mecanismos son dependientes de calcio^{6,12,13,14}.

T. gondii invade cualquier tipo de célula nucleada ya sea fagocítica o no fagocítica y de acuerdo a esto puede presentar dos mecanismos de invasión: la invasión activa y la invasión pasiva^{6,13}.

2.4.1. Invasión activa

En este proceso los taquizoítos utilizan sus propios recursos para invadir a las células, este proceso dura de 25 a 40 seg. Este proceso de invasión activa comprende una serie de eventos que involucran¹⁵

1. Adhesión:

El taquizoíto entra en contacto con la membrana plasmática y se adhiere a la célula hospedera por su polo apical, proteínas que son secretadas por los micronemos permiten esta adhesión y el movimiento por deslizamiento del parásito sobre la membrana y a su vez proyecta el conoide hacia la membrana plasmática para sentir el lugar de entrada a la célula^{6,7,13,14} (figura 3 a y b).

2. Internalización:

En esta etapa se presenta la secreción de las roptrías sobre la membrana plasmática, esta secreción rompe la membrana celular y genera una horadación de menos de 1 μm por la cual el taquizoito se internaliza mediante movimientos tipo tornillo. Al mismo tiempo que el parásito penetra se va generando una invaginación membranal, que está compuesta por elementos de la membrana plasmática de la célula hospedera (principalmente lípidos) y por algunos secretados por el parásito (contenido de los gránulos densos) para formar la vacuola parasitófora (VP), con la generación de una red vesículotubular intravacuolar y seguido de la proliferación por un proceso asexual conocido como endodiogenia^{6,13,14}(figura 3 c y d).

3. Replicación:

Una vez formada la VP migrara hacia el núcleo y la membrana de esta (MVP), se asocia con organelos citoplásmicos de la célula hospedera que incluyen al retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, mitocondrias y elementos del citoesqueleto celular como los filamentos intermedios y microtúbulos formando una especie de caja alrededor de la VP^{6,16}. La proliferación se lleva a cabo a nivel intravacuolar por un proceso asexual llamado endodiogenia, en este proceso, se van a formar en el interior de la célula madre, dos células hijas que al madurar incorporaran algunos organelos de la célula madre mientras que otros los generan de *novo*, dando como resultado a dos individuos con capacidad invasiva y proliferativa⁶ (figura 3 e).

4. Lisis celular:

Este proceso ocurre de la misma manera que la invasión a la célula, sólo que a la inversa, primero atraviesa la membrana de la VP y posteriormente la membrana celular^{5,17}. Cuando el parásito sale de la célula hospedera, rápidamente invade las células vecinas y comenzará de nuevo su ciclo lítico^{5,17} (figura 3 f).

2.4.2. Invasión pasiva

En este tipo de invasión el parásito no se reorienta y el proceso es lento (2-4 min) comparado con la invasión activa (25-40 seg)¹⁵.

Existen dos hipótesis que explican como el parásito evita la fusión con los lisosomas:

1. La primera sugiere que cuando el parásito se encuentra en el fagosoma, el taquizoíto libera el contenido de organelos propios, lo que modifica el fagosoma convirtiéndolo en su vacuola parasitófora^{15,18} (figura 6 C y D).
2. La segunda hipótesis plantea que el parásito escapa del fagosoma y forma de *novo* su propia VP. Una vez que se establece en el citoplasma celular dentro de su VP, el parásito prolifera y después de varios ciclos de replicación emerge de manera activa, destruyendo a su célula hospedera con la capacidad de invadir nuevas células^{15,18} (figura 6).

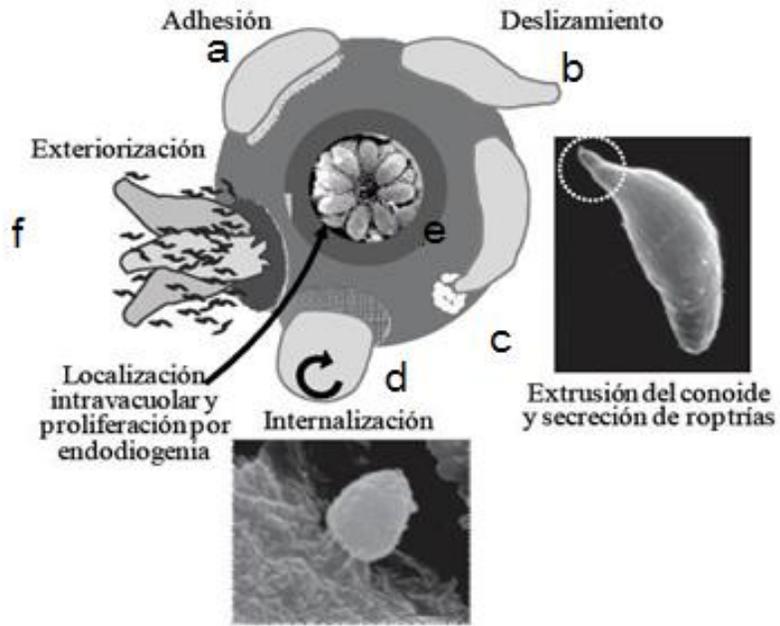


Figura 3. Mecanismo de invasión activa de *T.gondii*.
(Tomada de Muñiz- Mondragón, 2009)

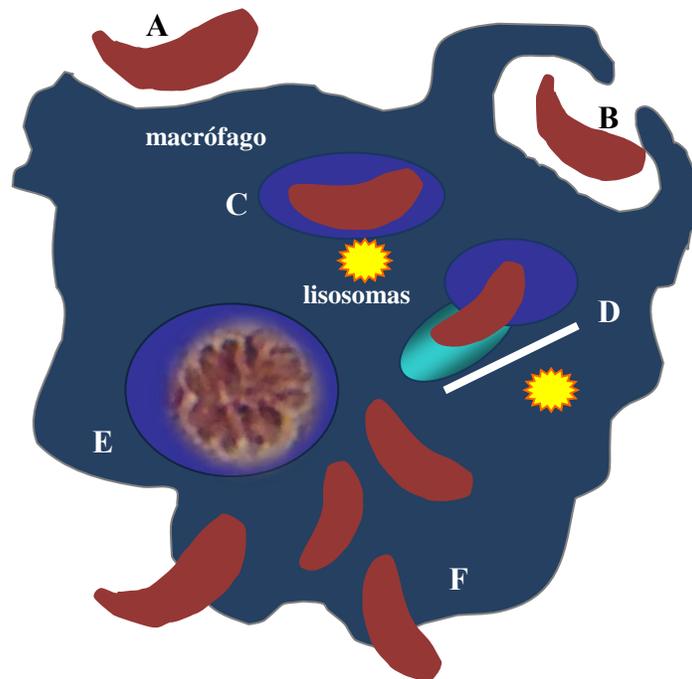


Figura 4. Fases de la Invasión pasiva. A) Adhesión; B) Internalización por medio de elongaciones citoplásmicas; C) Modificación de vacuola fagosomal; D) Formación de vacuola parasitofora de novo; E) Replicación; F) Externalización. (Tomada de Luna-Nophal, 2016)

2.5. Epidemiología de T. gondii.

La toxoplasmosis es la zoonosis parasitaria ocasionada por el parásito protozoario Toxoplasma gondii, el cual infecta a todas las especies animales de sangre caliente incluyendo al humano^{6,20,21,22}.

Es la infección humana con más prevalencia en el mundo (se estima que se encuentra entre el 30 y 50 % de la población mundial), con más latencia que la tuberculosis la cual afecta a una tercera parte de la población mundial²¹.

La seroprevalencia del parásito que es medida por anticuerpos específicos anti-Toxoplasma IgG, varía entre el 1 y 100%, dependiendo de las condiciones ambientales y socioeconómicas, incluyendo los hábitos alimentarios y las prácticas relacionados con la salud, el nivel general de higiene, la susceptibilidad del huésped, localización geográfica y la humedad del suelo. La incidencia de infección es mayor en los climas más cálidos y húmedos, también aumenta con la edad²³.

La incidencia de la toxoplasmosis también difiere de acuerdo al país; sin embargo, hay mayor incidencia en los países subdesarrollados que en los países desarrollados. Existen áreas de alta prevalencia en América Latina, partes de la costa este/centro de Europa, Oriente Medio y partes del sudeste de Asia y África²¹.

En México la seroprevalencia se encuentra entre un rango del 15 al 50% entre la población general, donde las áreas con una mayor prevalencia se encuentran en las costas del golfo de México y del Pacífico, mientras que hay una baja prevalencia en regiones áridas²⁴.

El hombre puede adquirir la infección por diferentes rutas: 1) mediante la ingestión de quistes tisulares presentes en carne mal cocida proveniente de animales infectados, 2) de ooquistes liberados en las heces de gatos que contaminan frutas, verduras o fuentes de agua potable, 3) infección por vía transplacentaria, de la madre al feto^{6,20,21,22}.

La toxoplasmosis afecta principalmente a individuos que se encuentran inmunosuprimidos debido a algún tratamiento contra el cáncer, que hayan recibido un trasplante de órganos, individuos con VIH y mujeres embarazadas. En el caso de la infección congénita, (de la madre al feto) dependerá del trimestre de embarazo en el que la mujer contrae la infección; si es en el primer trimestre de embarazo se encontrara un bajo riesgo de infección congénita(10-15%), mientras que habrá un mayor riesgo de infección congénita en el tercer trimestre de embarazo (60-90%)²⁴.

Entre las patologías que se presentan por toxoplasmosis se encuentran: la encefalitis, la coriorretinitis, ceguera y la linfadenopatía. Particularmente en mujeres embarazadas, *T. gondii* alcanza y atraviesa la placenta alojándose en el feto, en el cual puede inducir malformaciones, hidrocefalia, macro o microcefalia y lesiones oculares; e incluso llega a inducir el aborto. La infección con toxoplasma no muestra diferencias entre género, raza y distribución geográfica⁶.

La toxoplasmosis humana presenta dos fases, la fase aguda y la fase crónica. La fase aguda de la toxoplasmosis se caracteriza por la diseminación de la forma de taquizoíto y su replicación dentro de las células nucleadas en cualquier tejido del hospedero, en individuos inmunocompetentes la infección es asintomática en un 80% de los casos; sin embargo, la replicación del parásito conduce a una muerte

celular y una rápida invasión de células adyacentes; además de generar una fuerte respuesta inmunológica y producir linfadenopatía. Debido a una eficiente respuesta inmune al cabo de 2 o 3 semanas después de la infección²¹, el taquizoíto se convierte en quiste tisular. El desarrollo de quistes tisulares a través del tiempo, es lo que define la forma de infección crónica, el quiste tisular puede permanecer de por vida en el hospedero sin que en este se desarrolle alguna patología^{5,6}, si el sistema inmune se compromete el parásito puede reemerger y causar la diseminación del parásito a tejidos u órganos^{6,21}.

2.6. Tratamiento

En 1942 Sabin y Warren informaron de la eficacia de sulfonamidas contra toxoplasmosis en modelos murinos; Eyles y Coleman en 1953 descubrieron el efecto sinérgico de la terapia combinada de sulfonamidas y pirimetamina; este último es el tratamiento común para la toxoplasmosis en humanos², usualmente el tratamiento incluye ácido fólico para prevenir la supresión de la médula ósea por la pirimetamina²¹. Garin y Eyles en 1958 encontraron que la espiramicina tiene actividad antitoxoplásmica en ratones². Debido a que la espiramicina no es tóxica y no atraviesa la placenta, se ha utilizado como profilaxis en las mujeres durante el embarazo para reducir la transmisión del parásito a partir de la madre al feto². El descubrimiento de la clindamicina que tiene actividad antitoxoplásmica, proporcionó otra alternativa de fármacos para el tratamiento de la toxoplasmosis, especialmente en pacientes alérgicos a las sulfonamidas². La atovacuona es un fármaco antiprotozoario que se utiliza en pacientes que son alérgicos a la clindamicina y a las sulfonamidas²¹.

El tratamiento más común es la combinación de dos fármacos que inhiben la biosíntesis de pirimidina en el parásito: la sulfadiazina que es un inhibidor de dihidropteroato sintetasa y la pirimetamina, un inhibidor de dihidrofolato reductasa; este tratamiento debe administrarse con folinato calcico cada tres días al fin de evitar anemia megaloblastica, también debe mantenerse al paciente hidratado, ya que la sulfadiazina es poco soluble en la orina^{22,25,26,27}. Sin embargo, esta terapia ha tenido una eficacia limitada, principalmente por dos razones:

1. La intolerancia del paciente y los efectos adversos que produce el fármaco sobre el paciente^{22,26}.
2. Los factores intrínsecos parasitarios, tales como resistencia y baja susceptibilidad al fármaco^{20,26}.

Algunos efectos adversos de esta terapia, se encuentra la trombocitopenia, anemia megaloblastica ocasionada por deficiencia de ácido fólico, algunos otros signos que se presentan por sensibilidad a las sulfamidas son, reacciones cutáneas como el eritema multiforme y la necrólisis epidérmica tóxica, la cristaluria puede causar problemas renales, también puede ocasionar purpura trombocitopenica y hepatitis tóxica²⁷.

Por otra parte, esta terapia no afecta a los taquizoitos intracelulares o a su forma de quiste tisular²³, por lo que se buscan nuevas alternativas para tratar la toxoplasmosis, que sean eficaces contra la forma intracelular del parásito y que no tenga efectos adversos en el paciente.

2.7. Conotoxinas.

Las conotoxinas son péptidos pequeños de 10 a 40 aminoácidos de largo, en su mayoría ricas en disulfuro, codificadas por superfamilias de genes que han generado una especificidad y que tienen como objetivo a diversos receptores y canales iónicos²⁶. Las conotoxinas son obtenidas del veneno de los caracoles marinos del género *Conus*^{25, 28}. Los primeros péptidos de veneno de *Conus* fueron aislados y caracterizados hace dos décadas, trayendo consigo una investigación continua, acelerada y sistemática acerca de estos péptidos²⁶. Existen alrededor de 700 especies de caracoles marinos que sintetizan toxinas peptídicas. Estas toxinas peptídicas se clasifican de acuerdo a la estructura que tienen en dos grandes grupos²⁸:

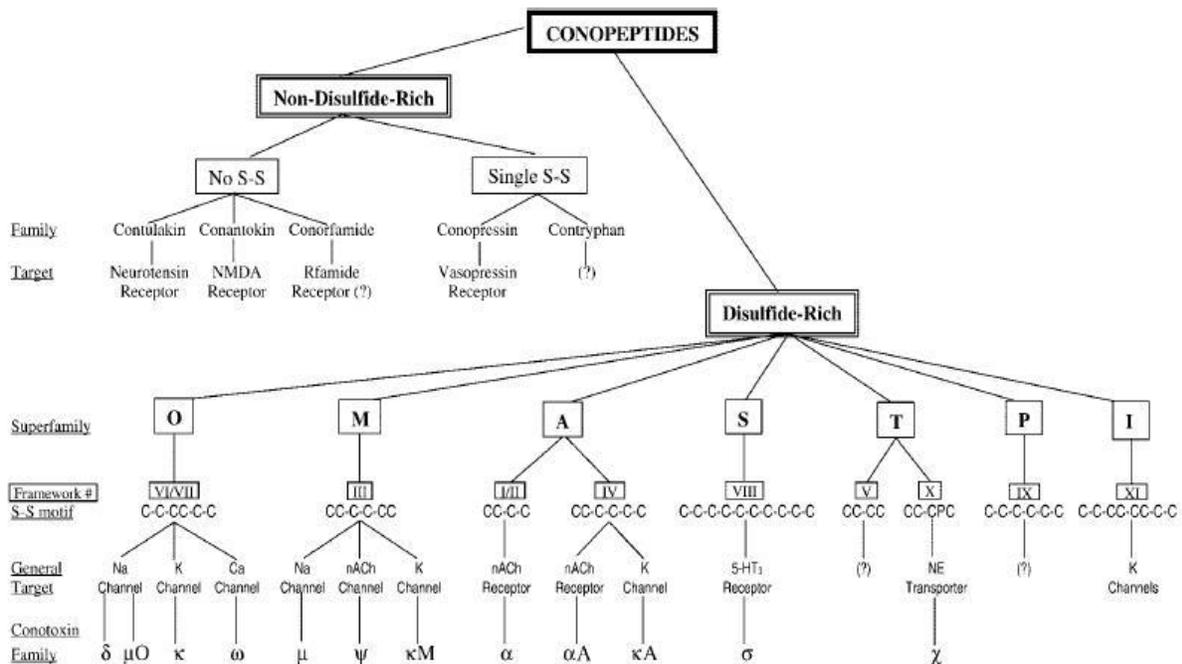


Figura 5. Organización de los conopéptidos. (Obetnida de Terlau-Olivera, 2004)

- Conotoxinas ricas en disulfuro: contienen residuos de cisteína, los residuos de cisteína se encuentran separados por 0-6 aminoácidos. Las superfamilias que se encuentran dentro de este grupo son O, M, A, S, T, P, I, (Figura 5).
- Conotoxinas que no tienen disulfuro.

2.8. *Conus californicus*.

Conus californicus es el caracol marino más inusual del género *Conus*, se encuentra en las costas de California (EUA), Ensenada y Baja California (México). Estudios moleculares han establecido que *C. californicus* es una especie filogenéticamente distante de otros caracoles marinos. Estas características filogenéticas sugieren que *C. californicus* puede expresar novedosas toxinas peptídicas^{22,26,28,29}.



Figura 6. *Conus californicus*.
(Tomada de Biggs JS,2010)

En un estudio realizado en 2010, 15 péptidos fueron purificados y analizados bioquímicamente^{26,30}, de los cuales 6 fueron considerados miembros de una nueva superfamilia. Los patrones de cisteína que presentaban los péptidos de *C.*

californicus eran similares a los de la familia J; sin embargo, estos diferían en la secuencia señal de aminoácidos, por lo que se les integro a una nueva superfamilia llamada J2^{26,29,30}.

Existe poca información sobre el efecto de las conotoxinas de C.californicus, pero su similitudes con la familia J donde se encuentran las especies C. literatus y C. plamorbis, de los cuales se conoce a que receptores y canales iónicos afectan sus respectivas conotoxinas (lt14a y pl14a); lt14a fue probada como analgésico en ratones, por lo que esta conotoxina tiene como objetivos los receptores nicotínicos de acetil colina (nAChR) lo que provoca una inhibición en el flujo de calcio (Ca²⁺)³¹. La conotoxina pl14a tiene como objetivo los canales de K⁺ y los nAChR³². De acuerdo a esto es posible suponer los receptores y los canales iónicos a los que las conotoxinas de la familia J2 podrían tener como objetivo.

No obstante en estudios anteriores se ha utilizado uno de estos péptidos, cal14.1a, sobre 4 líneas celulares de cáncer de pulmón, donde se encontró que la conotoxina inducía apoptosis por activación de las caspasas 3 y 7, además de que bloqueaba el receptor nicotínico de acetilcolina³³. También fue probado como antiparasitario contra Toxoplasma gondii, donde se encontró que las concentraciones micromolares de s-cal14.1a tenían mayores efectos sobre la viabilidad, la invasión y proliferación de toxoplasma, además se menciona que la conotoxina podría atravesar la membrana apical de la célula huésped y la membrana de la vacuola parasitófora, lo que induciría una interrupción de la maquinaria de replicación del parásito²⁶.

3. Planteamiento del problema

La infección por *Toxoplasma gondii*, puede causar serios problemas de salud en individuos con un sistema inmune comprometido. La infección del feto puede inducir malformaciones, e incluso su muerte. Diferentes estudios, han sugerido que entre el 70-85 % de las muertes en pacientes con VIH están relacionadas a la encefalitis toxoplásmica. El tratamiento utilizado comúnmente hoy en día, sulfadiazina-pirimetamina, presenta algunas desventajas como son la intolerancia del paciente a los fármacos, así como la resistencia y poca susceptibilidad del parásito hacia el tratamiento; principalmente en su forma quística. Debido a lo anterior, es importante la búsqueda de fármacos que presenten mayor eficacia sobre el parásito. Las toxinas de origen marino, representan una alternativa en estudio de nuevos compuestos con actividad parasiticida; por lo que en el presente trabajo proponemos el uso de dos toxinas extraídas del caracol *Conus californicus*.

4. Hipótesis

La forma sintética de las toxinas CCJ2 y CCJ3 tendrán un efecto parasiticida sobre el taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.

5. Objetivos generales y particulares

Objetivo general

Analizar el efecto de dos péptidos sintéticos, CCJ2 y CCJ3, en la invasión y en la proliferación intracelular del taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto *in vitro* de los péptidos sintéticos sobre el taquizoíto de toxoplasma en condiciones extracelulares.
2. Determinar si el pre-tratamiento con las conotoxinas induce un efecto inhibitorio sobre la invasión y proliferación intracelular del taquizoíto.

6. Materiales y Métodos.

6.1. Diseño Experimental.

Es un estudio observacional prolectivo y comparativo debido a la comparación del efecto de la conotoxina con el control. Es un estudio transversal ya que se recolectan datos en un sólo momento, en un tiempo único (exposición a la toxina 30 min y 2h). La población a usar son células HEP-2 que son infectadas con taquizoítos de *T. gondii*.

Variables:

- Variable independiente: concentración de la conotoxina, tiempo de exposición a la conotoxina,
- Variable dependiente: invasión del parásito a la célula, proliferación del parásito dentro de la célula con el taquizoíto pre tratado.

6.2. Técnicas.

6.2.1 Mantenimiento y purificación de taquizoitos de Toxoplasma gondii.

Se utilizaron taquizoitos de T. gondii cepa RH, los cuales se mantuvieron mediante pases consecutivos en ratones machos Balb-C, de 6 a 8 semanas de edad aproximadamente. Los ratones se inocularon de forma intraperitoneal, con 500×10^3 taquizoitos, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, los parásitos se extraen mediante exudados peritoneales en PBS 1X. Los parásitos se purifican mediante centrifugaciones repetidas y se purifican a través de una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 5 μm ; posteriormente los taquizoitos se cuentan en una cámara de Neubauer.

6.2.2 Mantenimiento de la línea celular.

Se utilizó a línea celular Hep-2 derivada originalmente de un carcinoma epidermoide de laringe. Las células Hep-2 se mantuvieron en Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM) suplementado con 8% de suero fetal bovino, a 37 °C y en una atmósfera al 5% de CO₂.

6.2.3 Conotoxinas.

Los péptidos utilizadas en los ensayos de presente trabajo, corresponden a las secuencias de las toxinas s-cal14.1b y s-cal14.2a aisladas de Conus californicus, nombradas y presentadas por Biggs et al. 2010 (Banco de Genes Fj959130 y

Fj959131, respectivamente). En este proyecto se utilizó una forma sintética, producida por Ontores Biotecnologías Co, Ltd (Hangzhou, Zhejiang, China).

6.2.4. Exposición de taquizoíto extracelulares a los péptidos.

Los taquizoitos recién purificados fueron expuestos a concentraciones crecientes de toxinas 10nM, 50nM, 100 nM, 1µM, 10µM, 50µM y 100µM; durante 30 min y 2h.

6.2.5 Ensayo de invasión.

Se sembraron 50×10^3 células Hep-2 por pozo, en placas chamber slide (Lab-teK II) con 0.5 mL de medio EMEM complementado. Las células se expusieron a los taquizoitos previamente tratados con las diferentes concentraciones de los péptidos, durante 1h. Después, las muestras se fijan con formaldehído al 10% durante 45 min. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X y se permeabilizaron con Tritón-X100 al 1% por 20 min. Las muestras se procesaron para microscopía óptica, mediante una tinción de contraste Hematoxilina-Eosina, finalmente las laminillas se montaron con glicerol al 50%. El análisis de las laminillas se realizó mediante un objetivo 63X (1.4 AN) en un microscopio AxioOberve (Carl Zeiss México).

Se contaron un total de 500 células totales por muestra, de las cuales se consideraron como células invadidas aquellas que presentaron por lo menos una vacuola parasitófora en el citoplasma.

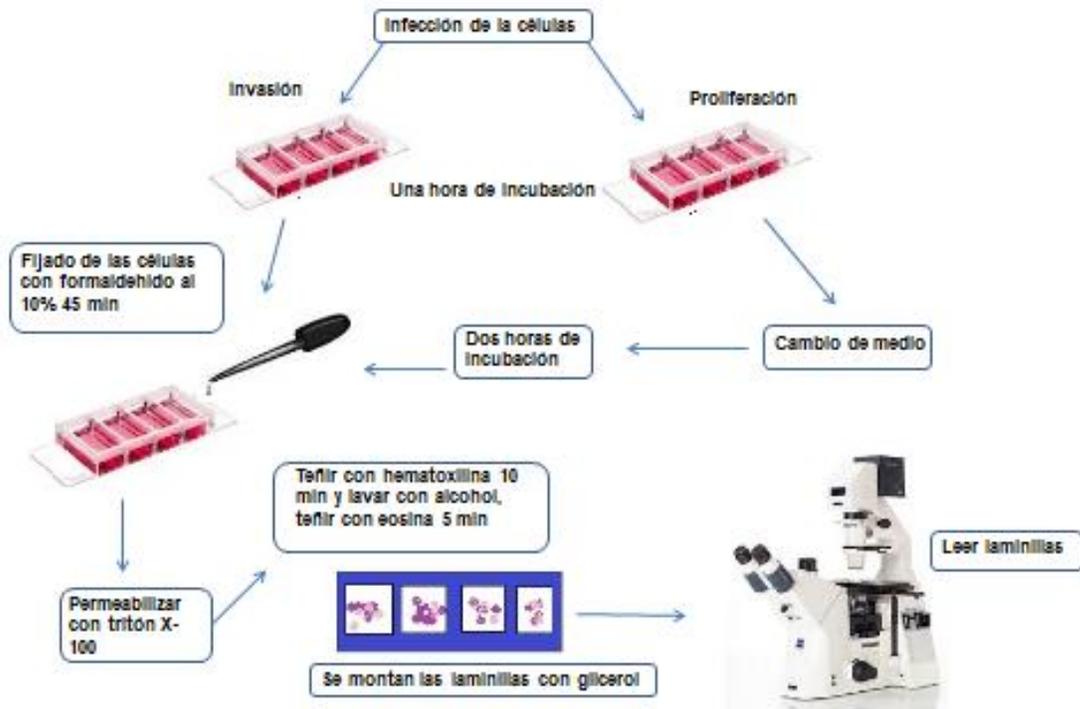
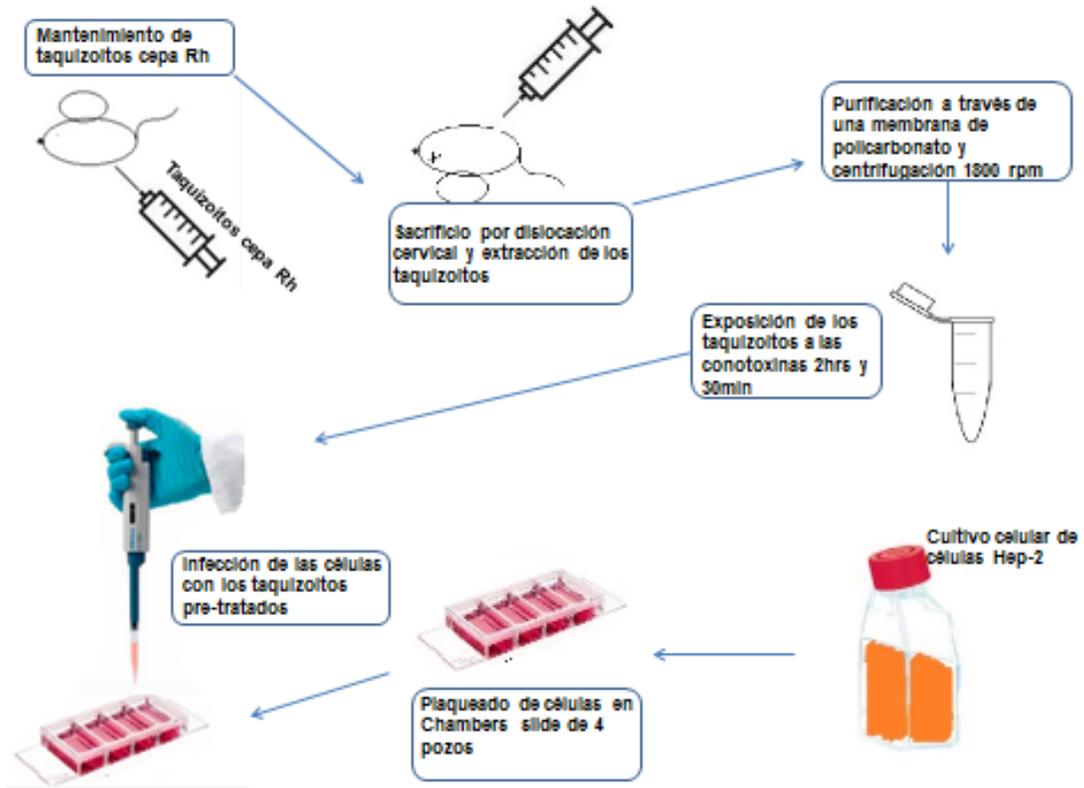
6.2.6. Ensayo de proliferación.

Para el ensayo de proliferación, las células se invadieron bajo el mismo esquema que en el punto anterior, después de permitir la invasión de las células con los taquizoitos pre-taratados, las monocapas se lavaron y se permitió continuar la incubación por 24 h más. Al término de la incubación, las muestras se procesaron de la misma forma que las muestras de invasión y se analizó mediante microscopía óptica. Se contaron 500 células totales, se consideraron como células en proliferación aquellas que presentaron dentro de la vacuola parasitófora 8 o más taquizoitos.

6.3. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 20, se consideró significancia estadística una probabilidad de $p \leq 0.05$.

7. Diagrama de flujo.

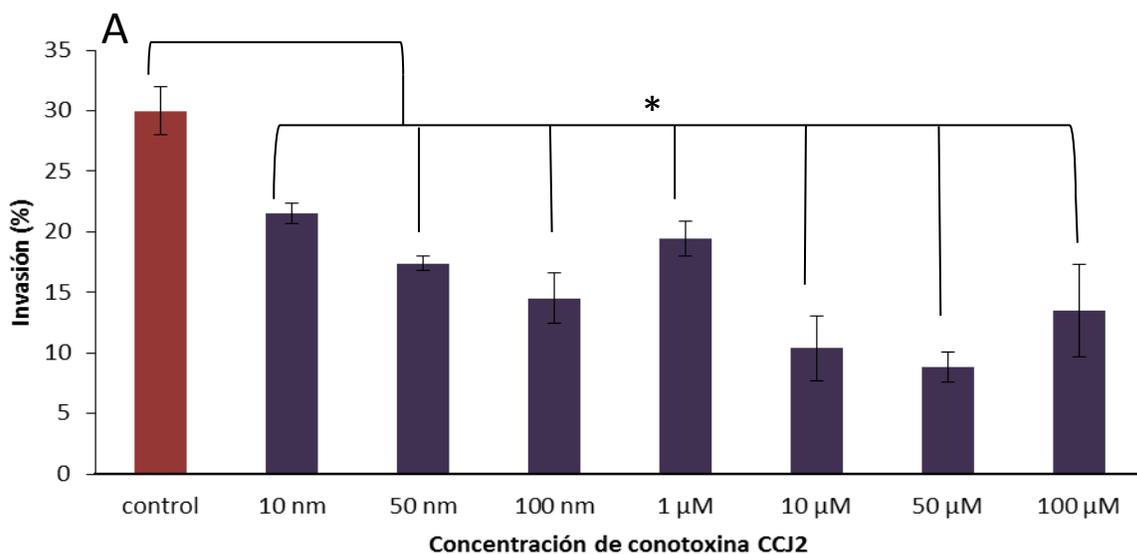


8. Resultados

Ensayo de invasión de *T. gondii*, 30 min y 2h de exposición a la conotoxina CCJ2.

Para analizar el efecto de las toxinas sobre la capacidad de invasión de los taquizoítos, éstos fueron expuestos a siete concentraciones crecientes de cada una de las toxinas, se enfrentaron a sus células hospederas por 1h y en seguida se procesaron para su análisis por microscopía óptica.

A 30 min de exposición, se observa que cualquiera de las concentraciones utilizadas tienen una inhibición de la invasión, estadísticamente significativa (figura 7A). El mayor efecto se observa a 10 μ M y 50 μ M, donde sólo el 35% de las células mostró invasión (Figura 7A). A las dos horas de exposición de los taquizoitos a la toxina, observamos una diferencia estadísticamente significativa de todas las concentraciones con respecto al control (Figura 7B). Nuevamente, observamos un mayor efecto en las concentraciones de 10 y 50 μ M.



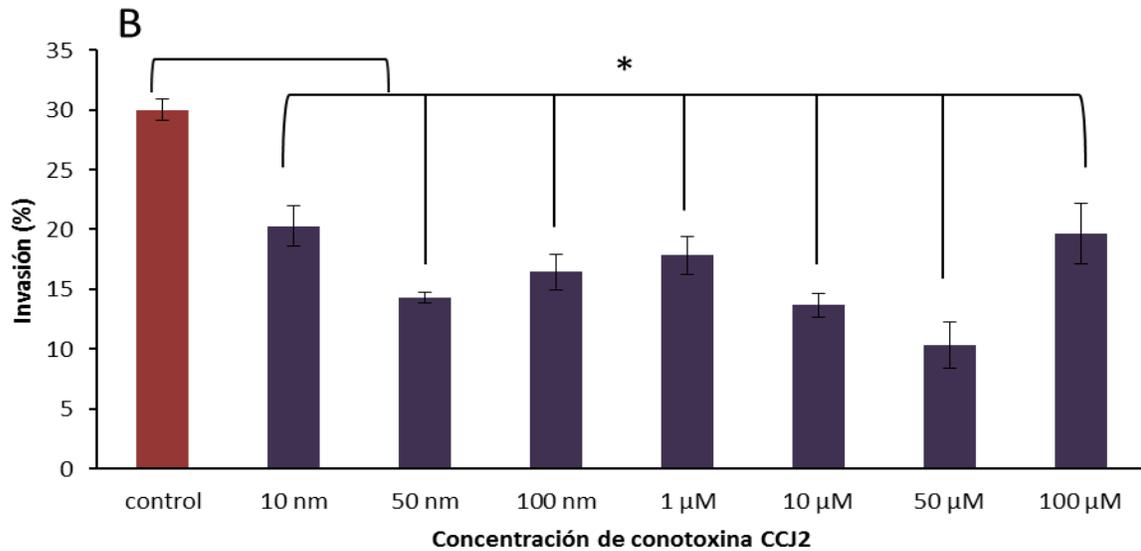


Figura 7. Invasión de células HEp-2 con taquizoitos tratados con conotoxina CCJ2, 30 min y 2 h. Porcentaje de células invadidas con taquizoitos tratados con conotoxina. Para cada barra se contaron 500 células por triplicado en experimentos independientes. A) invasión de los taquizoitos pre-tratados a los 30 minutos con la conotoxina. B) Invasión con los taquizoitos pre-tratados a las 2hrs (*) Indica diferencia significativa entre el control y el tratamiento. $p \leq 0.05$

Ensayo de proliferación de *T. gondii* con exposición a la conotoxina CCJ2 30 min y 2 h.

Se permitió la invasión de las células HEp-2 con los taquizoitos pre-tratados con la conotoxina, manteniendo la incubación por 24 h. Lo anterior con la finalidad de permitir al menos 4 ciclos de replicación intracelular; cada ciclo comprende entre 6-8 h. Las células en las cuales había al menos una vacuola parasitófora con 8 taquizoitos, se consideraron como células proliferadas

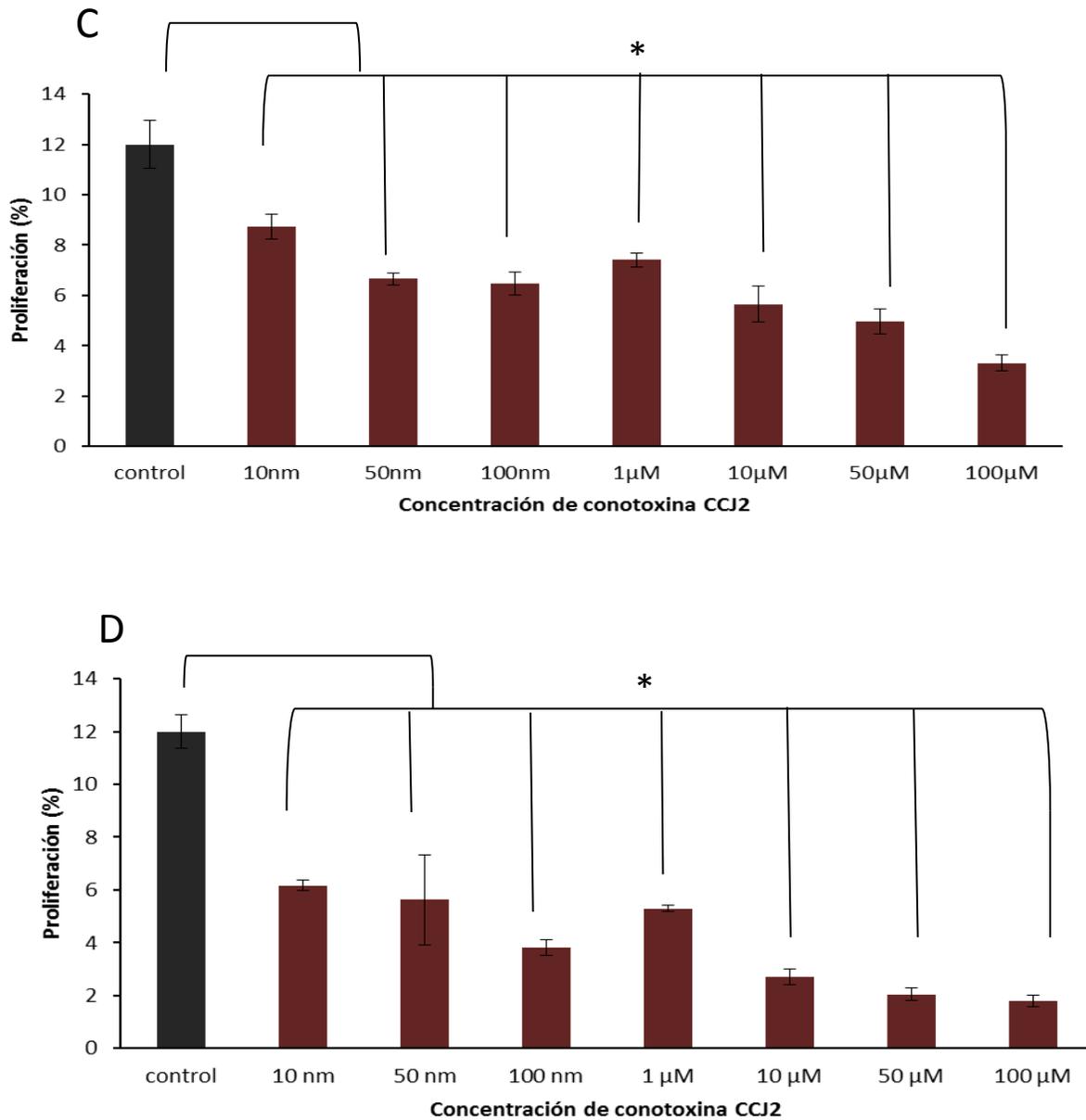


Figura 8. Proliferación de taquizoitos en células HEp-2, CCJ2 30 min y 2 h de exposición. C) Proliferación con los taquizoitos pre-tratados con la conotoxina a los 30 min. D) Proliferación con los taquizoitos pre-tratados con la conotoxina a las 2 h. (*) Indica diferencia significativa con respecto al control $p \leq 0.05$, se contaron 500 células para cada barra en experimentos independientes por triplicado.

En el ensayo de proliferación, se observa que la conotoxina induce una inhibición en la capacidad de proliferación de los taquizoítos expuestos a ambos tiempos (Fig. 8C, D). Esta inhibición de la proliferación parece ser directamente proporcional a la concentración, es decir, a mayor concentración mayor inhibición de la proliferación, en ambos tiempos analizados.

Es importante mencionar que la concentración 1 μM presenta un ligero aumento en los porcentajes de invasión y de proliferación; sin embargo, permanece con cambios significativos con respecto al control. A la fecha se desconoce la razón de éste comportamiento.

Ensayo de invasión de *T. gondii* con exposición a la conotoxina CCJ3 30 min y 2 h.

Utilizamos una segunda toxina sintética perteneciente a la familia J2, de las conotoxinas marinas. La secuencia de ambos péptidos es altamente conservada, por lo que analizamos el efecto de la CCJ33, bajo el mismo esquema experimental que para la toxina CCJ2.

Se observa una inhibición de la capacidad de invasión del taquizoíto, en ambos tiempos de exposición (Fig. 9 E, F). Este resultado es comparable al efecto observado con la exposición a la toxina CCJ2. El porcentaje de inhibición en la invasión es de aproximadamente un 60% con respecto al control, en la concentración con mayor efecto (50 μM). Sin embargo, ésta inhibición en la invasión es menor en la máxima concentración empleada, 100 μM , principalmente a dos horas exposición.

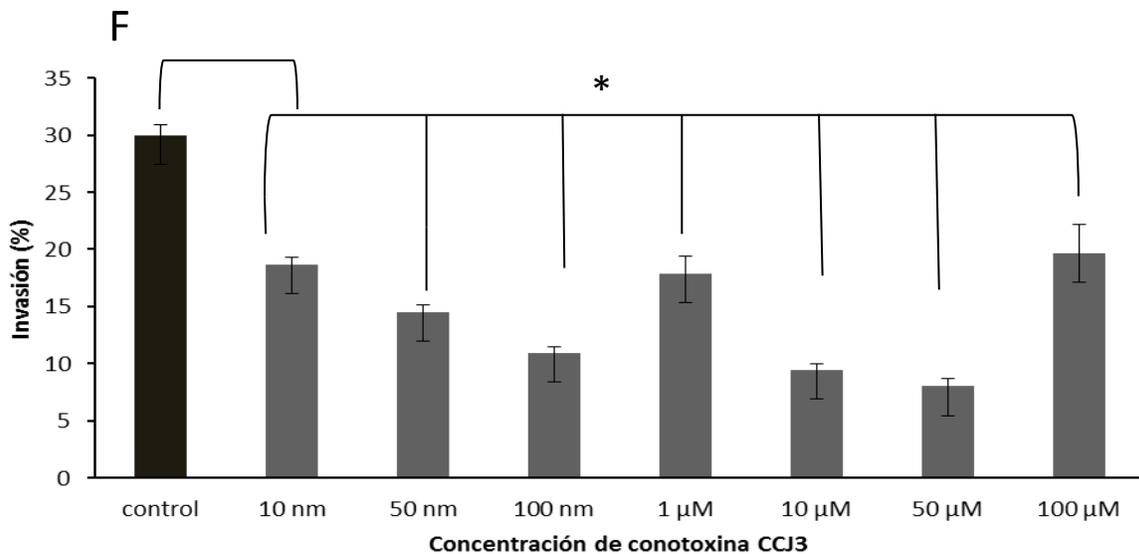
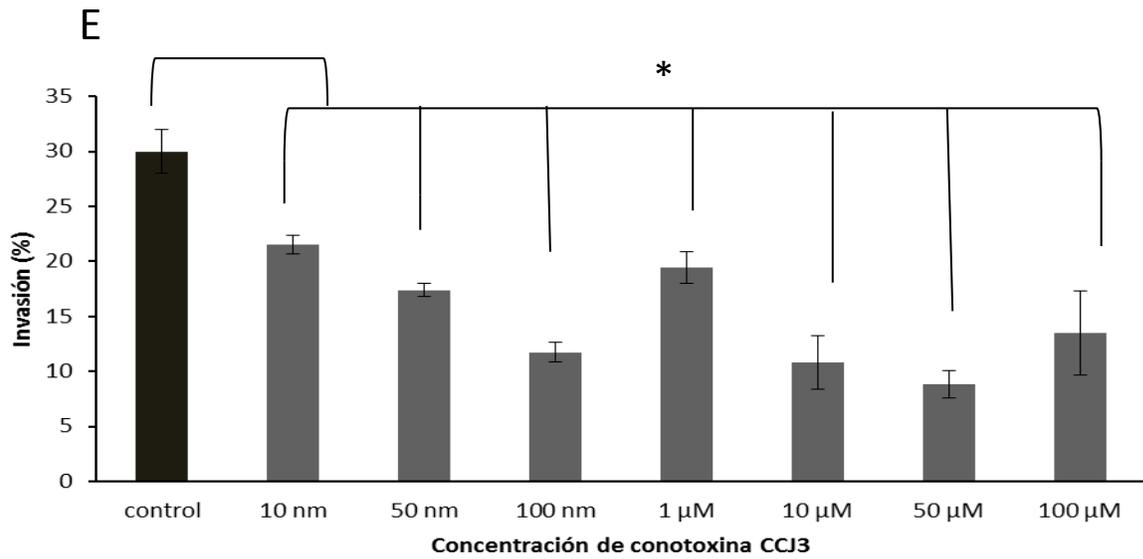


Figura 9. Invasión de células HEp-2 con taquizoitos tratados con conotoxina CCJ3, 30 min y 2 h. Porcentaje de células invadidas con taquizoitos tratados con conotoxina. Se contaron 500 células por triplicado en experimentos independientes para cada barra. E) Invasión con taquizoitos pre-tratados a los 30 min. F) Taquizoitos pre-tratados con conotoxina las 2hrs (*) Indica diferencia significativa entre el control y el tratamiento $p \leq 0.05$.

Ensayo de proliferación de *T. gondii* con exposición a la conotoxina CCJ3

30 min y 2 h.

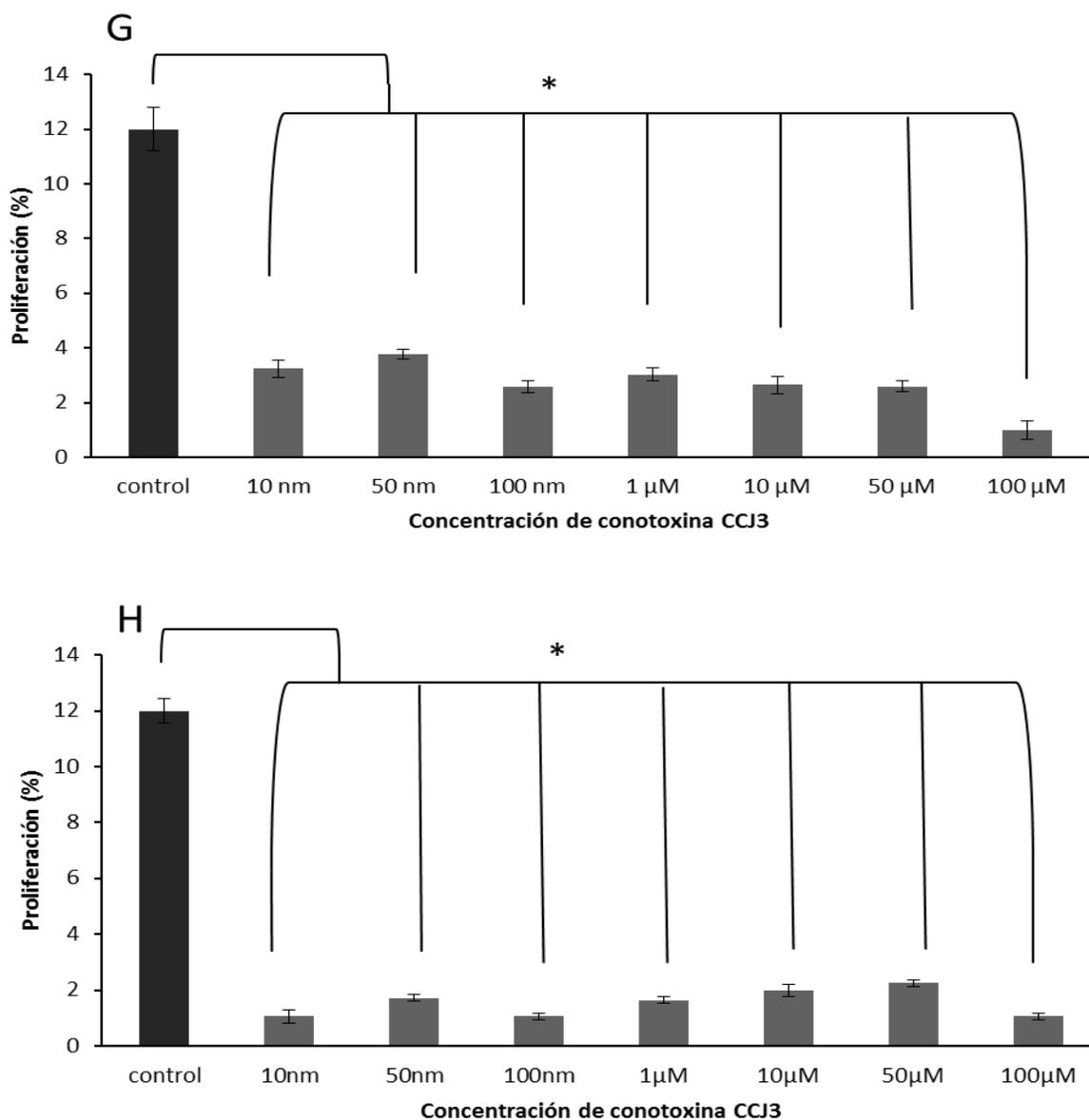
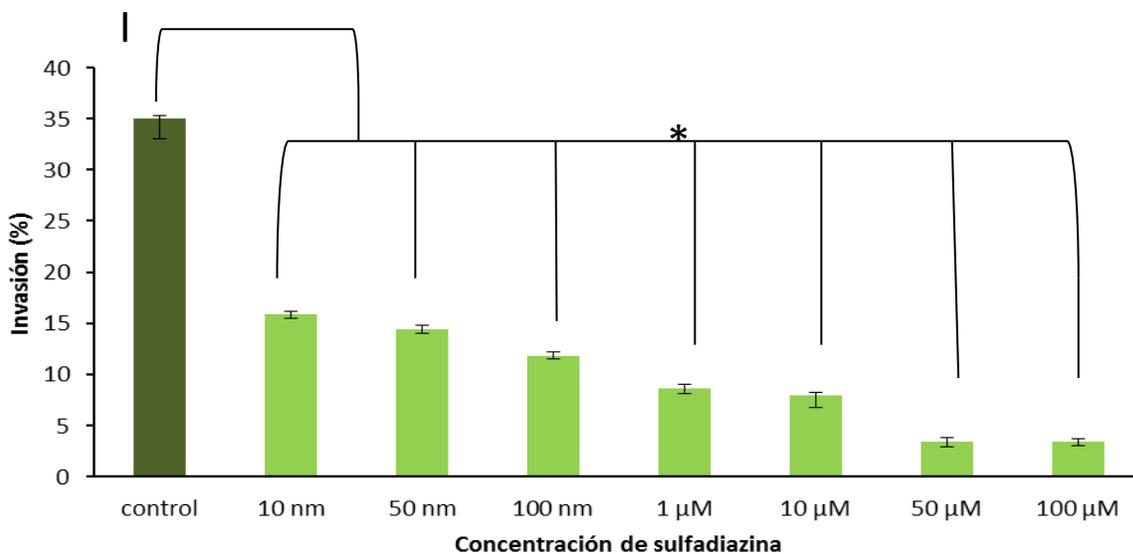


Figura 10. Proliferación de células HEp-2 con tachizoitos tratados con conotoxina CCJ3, 30 min y 2 h. G) Porcentaje de células proliferadas con tachizoitos pre-tratados a los 30 min con conotoxina. H) Porcentaje de células proliferadas con tachizoitos pre-tratados a las 2 h con conotoxina. Se contaron 500 células por triplicado en experimentos independientes para cada barra. (*) Indica diferencia significativa entre el control y el tratamiento $p \leq 0.05$.

En los ensayos de proliferación, encontramos efecto de inhibición de este proceso sobre los taquizitos expuestos a la toxina CCJ3. En promedio la inhibición de la proliferación intracelular es de 66% y 83% con respecto al control, a 30 minutos y 2 horas respectivamente (Fig. 10 G, H).

En otro ensayo se presenta el porcentaje de células invadidas con taquizoítos que fueron expuestos previamente al tratamiento convencional, sulfadiazina-pirietamina (Fig.11 I,J). El porcentaje observado es menor con respecto al control (Fig 11 I,J); pero fue evidente que el tratamiento con S-P tuvo mayor efecto comparado con las conotoxinas. Con respecto a la proliferación observada en traquizoítos pre-tratados con S-P, la inhibición a las concentraciones más elevadas fue cercano al 100% (Figura 11 J). Los resultados presentados para S-P, corresponden a 30 min de exposición.



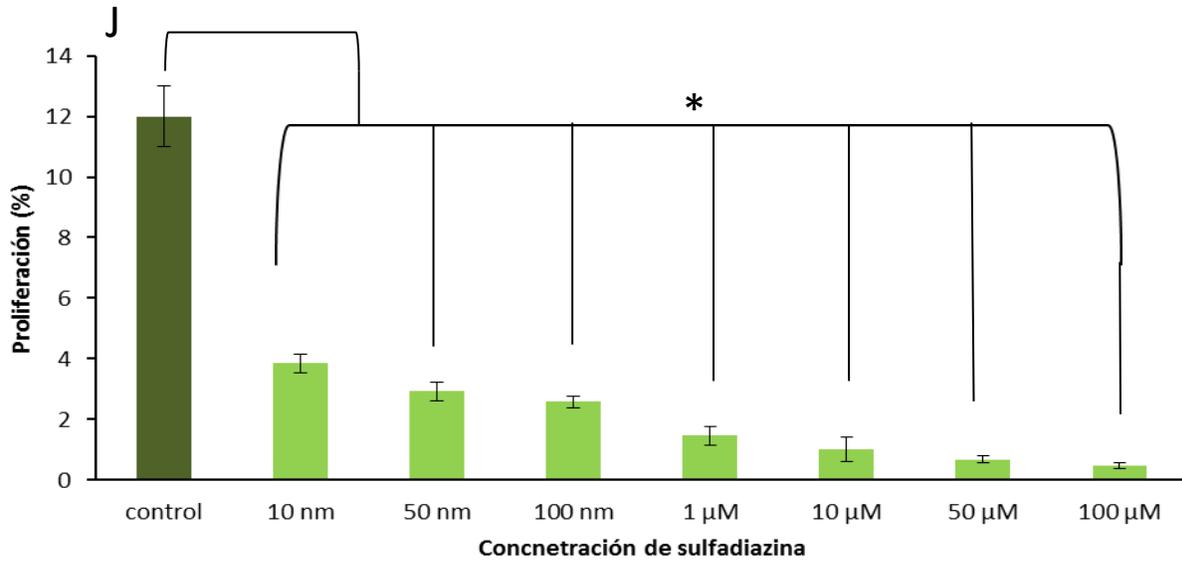


Figura 11. Invasión y proliferación de taquizoitos tratados con sulfadiazina. (*) Indica que hay diferencia significativa con respecto al control. $p \leq 0.05$. I) Representa la invasión de los taquizoitos utilizando el tratamiento convencional sulfadiazina/pirimetamina. J) Se muestra el efecto del tratamiento convencional contra la proliferación.

9. Discusión

En este estudio se evaluó el efecto de dos péptidos de origen marino del caracol Conus californicus, estos péptidos llamados conotoxinas tienen como blanco receptores y canales iónicos, los cuales se ven involucrados en varios mecanismos celulares. Las dos conotoxinas utilizadas para este estudio CCJ2 y CCJ3 fueron utilizadas en el tratamiento experimental contra la toxoplasmosis, para ello se utilizó un modelo *in vitro* el cual constaba de la utilización de células HEp-2.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en los ensayos de invasión se aprecia un efecto con la conotoxina CCJ2, con un 35% aproximadamente sobre la invasión en las concentraciones micromolares de 10 μM y 50 μM a los 30 minutos y 2 horas. En la conotoxina CCJ3 se muestra el mismo efecto inhibitorio a las mismas concentraciones que la CCJ2. En ambas toxinas, se pudo ver que el efecto fue superior en el tiempo más largo de exposición.

Con base a lo obtenido en los resultados de invasión en las dos conotoxinas, se obtuvo un efecto contra Toxoplasma gondii, debido al conocimiento de las conotoxinas, por su capacidad de tener como blanco a canales iónicos y a receptores, la conotoxina debe de afectar algún canal o receptor que se encuentre involucrado en la invasión del Toxoplasma gondii. Al igual que en estudios anteriores con otra de las conotoxinas derivadas de C. californicus la s-cal14.1a, se cree que afecta los canales de Ca^{2+} , ya que T.gondii utiliza al menos 3 mecanismos dinámicos dependientes de calcio para realizar la invasión activa, estos mecanismos son: la motilidad por deslizamiento, la extrusión del conoide y la secreción de compuestos a partir de diferentes organelos, si las conotoxinas

utilizadas en este estudio tienen algún efecto contra la invasión, puede que esté dirigido hacia este mecanismo. Sin embargo, para corroborar algún efecto sobre los canales de Ca^{2+} , es necesario realizar ensayos dirigidos.

Por otro lado, ambas conotoxinas presentaron un efecto inhibitorio contra la proliferación de *T.gondii*, donde se observa una inhibición de hasta el 92% en la máxima concentración utilizada, para ambos tiempos y ambas toxinas.

De acuerdo a los resultados observados, las dos conotoxinas tienen un mayor efecto sobre la proliferación. Por otra parte, mientras que los canales de Ca^{2+} podrían ser afectados en la invasión, en la proliferación lo que podría verse afectados, son los canales de K^{+} y los receptores de acetilcolina que están involucrados en la replicación del taquizoito dentro de la célula. No obstante el conocimiento del mecanismo de las conotoxinas en *C.californicus* aún es desconocido, por lo que para corroborar la hipótesis de que son afectados los canales de K^{+} , de Ca^{2+} y los receptores de acetilcolina, se tendrían que hacer más estudios.

Los péptidos utilizados en este estudio son una novedosa alternativa como tratamiento contra la toxoplasmosis humana. Aunque aún deben ser probados en diferentes modelos y encontrar el mecanismo de acción de las mismas.

Finalmente las dos conotoxinas mostraron que alteran el proceso de invasión y la proliferación del parásito intracelular *Toxoplasma gondii*.

10. Conclusión.

- En conclusión, se logró observar el efecto contra invasión y la proliferación de *Toxoplasma gondii*, utilizando los péptidos sintéticos CCJ2 y CCJ3.
- Los péptidos de origen marino mostraron alteración del proceso de invasión y proliferación, observándose un mejor efecto en las concentraciones micromolares de 10,50 y 100.

11. Perspectivas.

- Realizar experimentos *in vivo* con infección de *Toxoplasma gondii* en ratones y utilizando los péptidos CCJ2 y CCJ3 como tratamiento.
- Aumentar la dosis de los péptidos CCJ2 y CCJ3.
- Realizar pruebas para conocer donde pueden estar afectando los péptidos.

12. Referencias.

1. Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan. Perspectives and Methods.* Ed. Elsevier. Gran Bretaña. 2007
2. Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 2008;55(6):467–75.
3. Dardé ML, Peyron F. *Toxoplasma y toxoplasmosis.* EMC - Pediatría. 2013;48(1):1–12.
4. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(2):267–99
5. Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000;64(3):607–23
6. Muñoz S, Mondragón R. *Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente. *Rev. Educ. Bioquímica.* 2009;28(2):52–8
7. Nichols BA, Chiappino ML. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* 1985;(31):65–9.
8. Galván Ramírez ML, Mondragón R, *Toxoplasmosis Humana*, Guadalajara, Jalisco, México, Ediciones Cuellar 2001
9. Hill D, Dubey JP, Biology P, Laboratory S, Service AR, Kingdom U, et al. *Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention.* *Clin Microbiol Infect.* 2002. 8:634-640
10. Hill DE, Sreekumar C, Jones J, Dubey JP. *Toxoplasma gondii.* 1970
11. Hernández MI, García DSM. *Toxoplasmosis en el hombre.* *Bioquímica.* 2003;28(3):19–27

12. González Del Carmen M., Mondragón M., González S., Galván I., Mondragón R. Identificación y caracterización funcional de pkc en el parásito intracelular *Toxoplasma gondii* (176125):176125.
13. Del Carmen MG, Mondragón M, González S, Mondragón R. Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* 2009;11(6):967–82.
14. Bonhomme A, Bouchot A, Pezzella N, Gomez J, Le Moal H, Pinon JM. Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Rev.* 1999;23(5):551–61.
15. Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 6:2457–64
16. Hoff EF, Carruthers VB. Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion? *Trends Parasitol.* 2002;18(6):251–5.
17. Sibley LD. How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;21(5):592–8
18. Toulah FH, Sayed Al-Ahl SA, Amin DM, Hamouda MH. *Toxoplasma gondii*: Ultrastructure study of the entry of tachyzoites into mammalian cells. *Saudi J Biol Sci.* King Saud University; 2011;18(2):151–6.
19. Luna Nophal A. Efecto in vitro de la dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre el parásito intracelular *Toxoplasma gondii*. [Tesis de Maestría]. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2016.
20. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1217–58.

21. Halonen S, Weiss L. Toxoplasmosis. *Handb clin Neurol*. 2014. 125-145 p.
22. Sepúlveda-Arias JC, Veloza L a, Mantilla-Muriel LE. Anti-Toxoplasma Activity of Natural Products: A Review. *Recent Pat Antiinfect. Drug. Discov*. 2015;(April):186–94.
23. Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. Toxoplasmosis - A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One*. 2014;9(3).
24. Hernández Cortazar I, Acosta Viana KY, Ortega Pacheco A, Guzman Marin ES. Review Toxoplasmosis in Mexico: Epidemiological Situation in Humans and Animals. *Rev Inst Med Trop são paulo*. 2015;57(2):93–103.
25. I. Villena, D. Aubert, B. Leroux, D. Pyrimethamine-sulfadoxine Treatment of Congenital Toxoplasmosis: Follow-up of 78 Cases Between 1980 and 1997. *Scand J Infect Dis*. 1998;30(3):295–300
26. De León Nava M, Romero Núñez E, Luna Nophal A, Bernáldez Sarabia J, Sánchez Campos L, Licea Navarro A, et al. In Vitro Effect of the Synthetic cal14.1a Conotoxin, Derived from *Conus californicus*, on the Human Parasite *Toxoplasma gondii*. *Mar Drugs*. 2016;14(4):66.
27. OMS (Organización Mundial de la Salud). *Medicamento Utilizados en las Enfermedades Parasitarias*. 1991. p. 96
28. Terlau H, Olivera Bm. *Conus Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides*. *Physiol Rev*. 2004;84(1):41–68.
29. Prashanth JR, Brust A, Jin A-H, Alewood PF, Dutertre S, Lewis RJ. Cone snail venomomics: from novel biology to novel therapeutics. *Future. Med. Chem*. 2014;6(15):1659–75.

30. Biggs JS, Watkins M, Puillandre N, Ownby JP, Lopez-Vera E, Christensen S, et al. Evolution of Conus peptide toxins: Analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844. *Mol Phylogenet Evol.* Elsevier Inc.; 2010;56(1):1–12
31. Ren Z, Wang L, Qin M, You Y, Pan W, Zhou L, et al. Pharmacological characterization of conotoxin It14a as a potent non-addictive analgesic. *Toxicon.* Elsevier Ltd; 2015;96:57–67.
32. Imperial JS, Bansal PS, Alewood PF, Daly NL, Craik DJ, Sporning A, et al. A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry.* 2006;45(27):8331–40.
33. Oroz Parra I, Navarro M, Cervantes Luevano K, Álvarez Delgado C, Salvesen G, Sanchez Campos L, et al. Apoptosis Activation in Human Lung Cancer Cell Lines by a Novel Synthetic Peptide Derived from *Conus californicus* Venom. *Toxins (Basel).* 2016;8(2):38.

13. Anexo.

Preparación de reactivos y soluciones

-PBS 1X

Para 1L en agua Milli-Q, pH 7.2-7.4

- 8 g de NaCl (cloruro de sodio)
- 0.2 g de KCl (cloruro de potasio)
- 1.15 g de Na₂HPO₄ (fosfato de sodio dibásico anhidro)
- 0.2 g de KH₂PO₄ (fosfato de potasio dibasico anhidro)

-Medio EMEM 8% de suero bovino fetal

Para 100 mL

- 92mL de EMEM
- 8mL de Suero bovino fetal
- 200µL de PES (Penicilina, Estreptomicina)

Se colocó en un frasco de 100mL estéril y se guardó en refrigeración a 4°C hasta su uso.

-Glicerol al 50%

Para 10mL

- 5mL de PBS 1X
- 5mL de Glicerol

-Conotoxinas

- 1mg de la conotoxina CCJ2 (s-cal14.1b) en 562.1µL de PBS 1X para concentración stock de 1mM.

- 1mg de la conotoxina CCJ3 (s-cal14.2a) en 538.2 μ L de PBS 1X para concentración stock de 1mM.

La cantidad de conotoxina a utilizar se preparó de acuerdo al número de taquizoitos a usar.

15 μ L de conotoxina = 1,000,000 de taquizoitos

-Taquizoitos de *Toxoplasma gondii*

Se utilizaron 10 taquizoitos por célula, por lo que para 50,000 células (por tratamiento) se usaron 500,000 taquizoitos.