



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**



Instituto de Ciencias  
del Mar y Limnología  
UNAM

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**BIOENSAYO PARA LA EVALUACIÓN DE LA  
KAPPA-CONOTOXINA PVIIA EN LARVAS  
DE LA CEPA HIPERKINETIC (*Hk*) DE  
*Drosophila melanogaster*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**HAYDEE BARRÓN MORALES**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2018**





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.

---

# HOJA DE DATOS DEL JURADO

---

- 1 Datos del alumno:  
Barrón  
Morales  
Haydee  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307114572
  
- 2 Datos del tutor:  
Dr.  
José Estuardo  
López  
Vera
  
- 3 Datos del sinodal 1:  
Dra.  
Patricia  
Ramos  
Morales
  
- 4 Datos del sinodal 2:  
Dra.  
Fabiola  
Hernández  
Vázquez
  
- 5 Datos del sinodal 3:  
Dr.  
Miguel Ángel  
Torres  
Martínez
  
- 6 Datos del sinodal 4:  
M. en C.  
María Mildred Tzitzitlini  
Alejandre  
García
  
- 7 Datos del trabajo escrito:  
Bioensayo para la evaluación de la kappa-Conotoxina PVIIA en larvas de la cepa Hiperkinetic (*Hk*) de *Drosophila melanogaster*.

---

# AGRADECIMIENTOS

---

Al Dr. Estuardo López Vera, por brindarme un espacio en su equipo de trabajo y por permitirme aprender sobre las conotoxinas. Agradezco su disposición e interés en el presente proyecto, así como por la gran paciencia y asesoría durante la realización del mismo.

Al M. en C. Luis Ángel Martínez, por el tiempo brindado para realizar las valiosas observaciones y sugerencias dirigidas a este trabajo, por compartir su conocimiento. Especialmente agradezco por su actitud honesta y comentarios, así como por el apoyo y asesoría durante el proceso de este proyecto. ¡Спасибо!

A los miembros del Jurado:

Dra. Patricia Ramos Morales

Dra. Fabiola Hernández Vázquez

Dr. José Estuardo López Vera

Dr. Miguel Ángel Torres Martínez

M. en C. María Mildred Tzitzitlini Alejandre García

Por la amable disposición a formar parte del jurado, por dedicar parte importante de su tiempo en la revisión y corrección de esta tesis. Agradezco sus acertadas observaciones y recomendaciones, las cuales enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Adolfo Gracia, la Dra. Ana Rosa Vázquez y el Dr. Estuardo López por la oportunidad y la confianza otorgada para participar en el COBERPES 5 y 9, una hermosa experiencia que contribuyó a mi formación profesional y personal.

A la M. en C. Ximena Rodríguez, por explicarme que en el mundo de los sueños uno forja su destino. Quiero agradecer por su amistad y todo el apoyo brindado.

A los integrantes y compañeros de trabajo en el laboratorio de Toxinología Marina, por la constante motivación y consejos, por las conversaciones y los momentos compartidos: Ximena, Elba, Angélica, Brenda, Minerva, Marcelo y Luis; muchas gracias por su cariño y amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML)

---

# DEDICATORIAS

---

Con especial dedicación a:

Mis padres Catalina Morales y Gregorio Barrón, por estar siempre presentes, por su ejemplo de fortaleza, por enseñarme el significado de la determinación y la importancia de la perseverancia hacia toda meta en la vida, quienes me han guiado y apoyado en el camino que elegí. Les agradezco por brindarme su confianza, la paciencia y su afecto. Este logro es con todo el cariño para ustedes.

A Adrian Morales, por enseñarme que cada pieza es única y por mostrarme que con ingenio y compromiso utilizando el método preciso se logra construir y restaurar. Gracias por ser y permanecer.

A todos aquellos que me han explicado que la vida es un camino de incesante aprendizaje.

A todos ellos que me han enseñado que lo hermoso se construye poco a poco y con paciencia.

A los que me han acompañado tras cada paso dado.

El mar lo cautiva todo, y su acción estará siempre  
envuelta en misterio.

*Jacques Yves Cousteau*

---

# ÍNDICE

---

Resumen.....	9
1 INTRODUCCIÓN .....	10
2 ANTECEDENTES.....	12
2.1 Toxicología .....	12
2.1.1 Toxinología Marina.....	13
2.1.2 Phylum Mollusca.....	14
2.1.3 Clase Gastropoda.....	16
2.1.4 Superfamilia Conoidea .....	17
2.1.5 Género <i>Conus</i> .....	19
2.1.6 Veneno de <i>Conus</i> : particularidades .....	21
2.1.7 <i>Conus purpurascens</i> como fuente de toxinas moduladoras de canales iónicos.....	22
2.2 Canales iónicos.....	25
2.2.1 Canales de potasio voltaje-dependientes.....	28
2.3 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico.....	31
3 JUSTIFICACIÓN.....	34
4 HIPÓTESIS.....	36
5 OBJETIVOS .....	37
5.1 Objetivo General .....	37
5.2 Objetivos Específicos .....	37
6 MATERIALES Y MÉTODO.....	38
6.1 Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	38
6.2 Compuestos comerciales .....	39
6.3 kappa-conotoxina PVIIA.....	40
6.4 Medio de cultivo para <i>Drosophila melanogaster</i> .....	40
6.5 Estrategia experimental .....	41
6.6 Análisis de datos.....	42
7 RESULTADOS.....	43



7.1	Efecto de los compuestos comerciales sobre las cepas de <i>D. melanogaster</i> .....	43
7.2	Efecto de la kappa-conotoxina PVIIA sobre las cepas de <i>D. melanogaster</i> .....	51
8	DISCUSIÓN .....	54
9	CONCLUSIONES .....	60
10	REFERENCIAS .....	61
11	ANEXOS .....	69

---

# RESUMEN

---

Los gasterópodos marinos pertenecientes al género *Conus* producen un veneno caracterizado por actuar rápida y efectivamente sobre su presa; se sabe que este veneno es usado por los caracoles *Conus* para su alimentación, defensa y competencia en su hábitat. La síntesis de toxinas conocidas como conotoxinas o conopéptidos ha despertado gran interés en el ámbito de la Toxicología y la Farmacología, debido a su tamaño pequeño y especificidad hacia blancos moleculares. En los últimos 10 años se han implementado varios modelos biológicos para su evaluación, entre los cuales se encuentra el de *Drosophila melanogaster*.

En este trabajo se realizó la evaluación del efecto producido por la kappa-conotoxina PVIIA que tiene como blanco molecular canales de potasio voltaje-dependientes. Para ello, se llevó a cabo un bioensayo mediante inyecciones de diferentes concentraciones de la toxina en larvas de *D. melanogaster* en su tercer estadio de desarrollo y se comparó el efecto sobre dos cepas: una cepa mutante (*Hk*) y una cepa testigo (*yw*).

A partir de los resultados obtenidos se observó que hay diferencia significativa en la sobrevivencia de las cepas ensayadas. Complementario a lo anterior, se observó el comportamiento locomotor postinyección, ya que es un componente importante en la evaluación farmacológica.

---

# 1 INTRODUCCIÓN

---

Históricamente, el estudio de los organismos marinos que se caracterizan por su capacidad de sintetizar moléculas biológicamente activas ha sido reportado desde los años 50's. Estas moléculas, referidas en la literatura como metabolitos secundarios o toxinas, permiten a los organismos desempeñarse en su medio ambiente, al utilizarlas como herramientas eficientes para interactuar con otras especies, de manera que pueden competir, alimentarse y/o defenderse (Southcott, 1979; Garateix *et al.*, 2003).

Entre los grupos de organismos marinos, mayormente estudiados con relación al desarrollo de herramientas diseñadas para la supervivencia en el medio marino, destacan los animales pertenecientes a los siguientes filos: Mollusca (moluscos), Porifera (esponjas), Cnidaria (cnidarios), Echinodermata (equinodermos) y el subfilo Urochordata (tunicados). Del filo Mollusca, la mayor parte de los estudios se han realizado en el género *Conus*, ya que se ha documentado que sus venenos afectan principalmente el sistema nervioso central de sus presas (Bhakuni y Rawat, 2005; Mattei y Legros, 2014).

Investigaciones enfocadas en los venenos de los caracoles *Conus*, reportan que el efecto que ejercen es debido a sus componentes, conocidos como conotoxinas o conopéptidos, los cuales se caracterizan por unirse con alta afinidad a sus blancos moleculares, principalmente canales iónicos, aunque también se ha reportado afinidad por otros grupos de receptores de membrana (Olivera, 1997; Paredes *et al.*, 2010).

En vista de lo antes mencionado, los venenos de estos caracoles son estudiados como herramientas de diagnóstico y también como posibles tratamientos para enfermedades como: epilepsia, padecimientos cardiovasculares, trastornos del movimiento y control del dolor (Norton y Olivera, 2006; Lewis, 2009). Un ejemplo de ello es el Ziconotide (Prialt™) uno de los analgésicos más potentes disponibles, que es la variante sintética del conopéptido  $\omega$ -MVIIA (aislado de *Conus magus*), aprobado en el año 2004 por la FDA (*Food and Drug Administration*: Agencia de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos) y que se utiliza para el tratamiento del dolor crónico (Valía-Vera *et al.*, 2007).

---

## 2 ANTECEDENTES

---

### 2.1 Toxicología

Se tiene conocimiento de que el empleo y la experiencia del hombre con los distintos compuestos tóxicos, independientemente de su origen (mineral, animal o vegetal), se remota a la prehistoria, cuando fueron utilizados principalmente para la caza. No obstante, no fue sino hasta el siglo XV que la ciencia toxicológica se comenzó a establecer y desde entonces se ha ido afianzando gracias a un número creciente de trabajos donde se han proporcionado las bases científicas a la toxicología (Scarlato, 2007; Repetto y Repetto, 2009).

La toxicología hoy día se consolida como una disciplina independiente, encargada de la investigación, identificación e interpretación de los efectos provocados por sustancias químicas, naturales o sintéticas, y los fenómenos físicos capaces de interactuar y producir alteraciones en un biosistema (Silbergeld, 2001; Timbrell, 2002).

Para comprender mejor lo referente a la toxicidad de una sustancia en distintos procesos biológicos es necesario conocer su origen, la interacción y el mecanismo de acción que tiene, es por ello que a lo largo de los últimos 20 años la toxicología ha desarrollado subespecialidades o subdisciplinas tales como: genotoxicología, inmunotoxicología, toxicogenómica y otras más, entre las cuales se encuentra la toxinología (Silbergeld, 2001).

## 2.1.1 Toxinología Marina

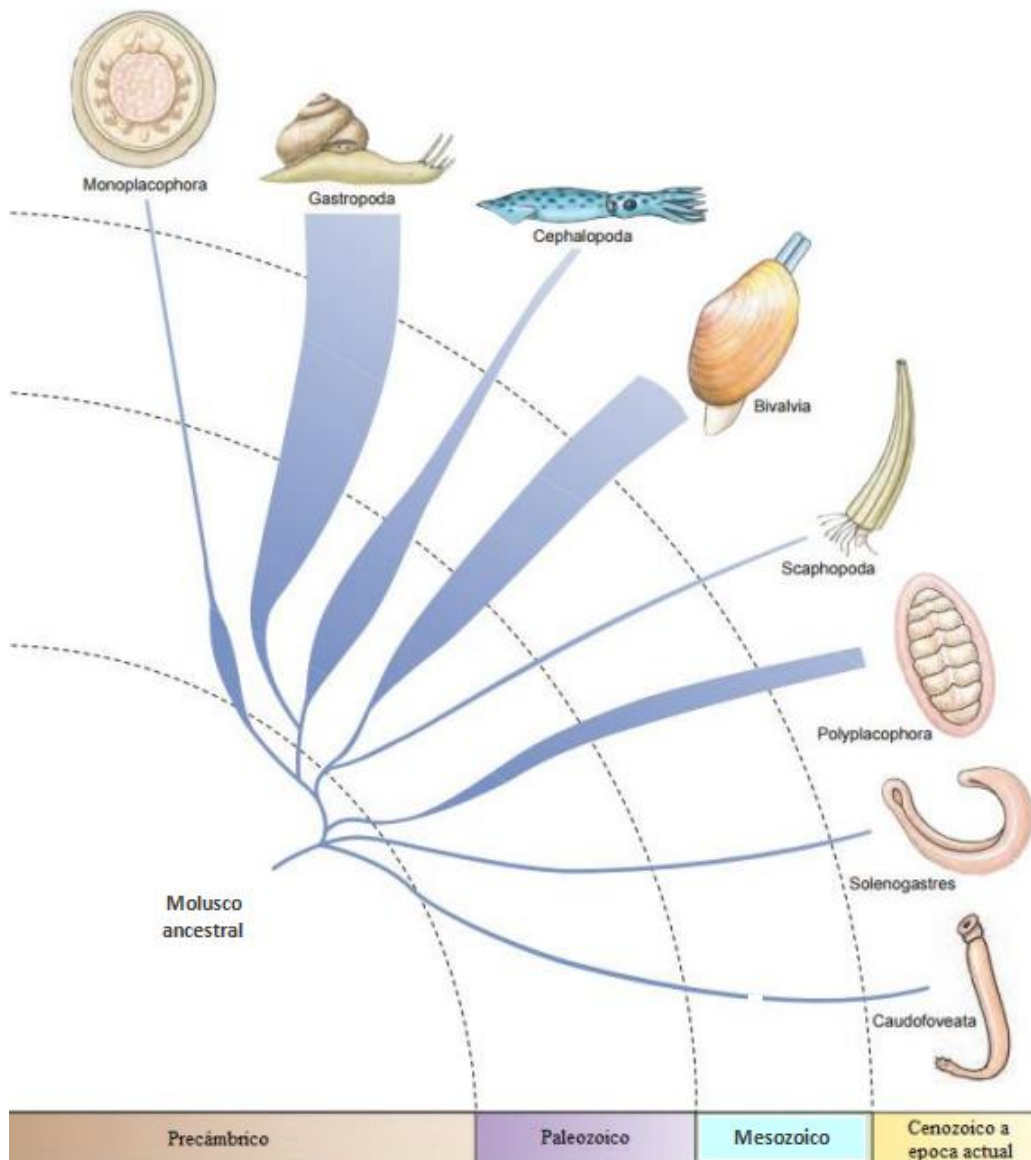
La *International Society on Toxinology* (IST), fundada en 1962, ha convenido distinguir a la toxinología como la subdisciplina que se encarga de estudiar, exclusivamente, sustancias tóxicas de origen biológico, elaboradas por organismos (plantas, bacterias, animales, hongos, virus), utilizadas con fines de alimentación, elementos defensivos y para la competencia (Meier y White, 1995; toxinology.org 2016 ).

A través de la caracterización biológica y molecular de diferentes toxinas de origen marino se ha acrecentado el interés científico, sobre todo en el campo de la biomedicina y biotecnología, debido a sus estructuras químicas y/o mecanismos funcionales. El hallazgo de compuestos como la saxitoxina proveniente de dinoflagelados; la tetrodotoxina (TTX), en peces; el estudio de estructuras como los nematocistos (en anemonas), representan novedosas contribuciones significativas en la investigación básica de la farmacología y la neurobiología (Honma y Shiomi, 2006; Xie *et al.*, 2017).

## 2.1.2 Phylum Mollusca

En el reino animal, uno de los grupos más grandes que existen en cuanto a número de especies es el de los moluscos. El *Phylum Mollusca* está integrado por ocho clases y es el segundo más diverso de los invertebrados (Fig. 1), presenta diversidad en tamaño, forma y ciclos biológicos. Han colonizado hábitats marinos, dulceacuícolas y terrestres, por lo que es evidente su éxito evolutivo (Aldana y Baqueiro, 1995). Su registro geológico más antiguo pertenece a formas similares a moluscos del Precámbrico tardío, representado por la especie *Kimberella quadrata* de las colinas Ediacara del sur de Australia (Glaessner y Wade, 1966; Fedonkin y Waggoner, 1997).

Los moluscos poseen una organización corporal general que consta de 3 regiones anatómicas: (i) región cefálica, formada por estructuras sensoriales como los ojos, tentáculos sensoriales y una cavidad bucal, en donde se localiza una estructura dentada que tiene por nombre rádula, la cual ha mostrado ser eficaz para dilacerar las distintas formas de alimento; (ii) región del pie, que se localiza en la parte ventral del organismo, dicha estructura adquiere distintas formas y funciones como la locomoción y la excavación, además de que es utilizada como estructura natatoria en algunas especies de babosas marinas (Opisthobranchia); y (iii) la masa visceral, que comprende los sistemas de órganos, entre ellos el corazón, nefridio, nefridioporo, hepatopáncreas y hemocele. Esta se encuentra cubierta de manera total por la cavidad del manto (o cavidad paleal), a través de la cual tienen apertura los sistemas digestivo, reproductor y excretor, además de los llamados osfradios, órganos sensoriales cuya especialización es la quimiorrecepción (Brusca y Brusca, 2005; Fernández y Rivas, 2007).



**Fig. 1** Clases del *Phylum* Mollusca en su respectivo tiempo geológico (modificada de Hickman *et al.*, 2008).

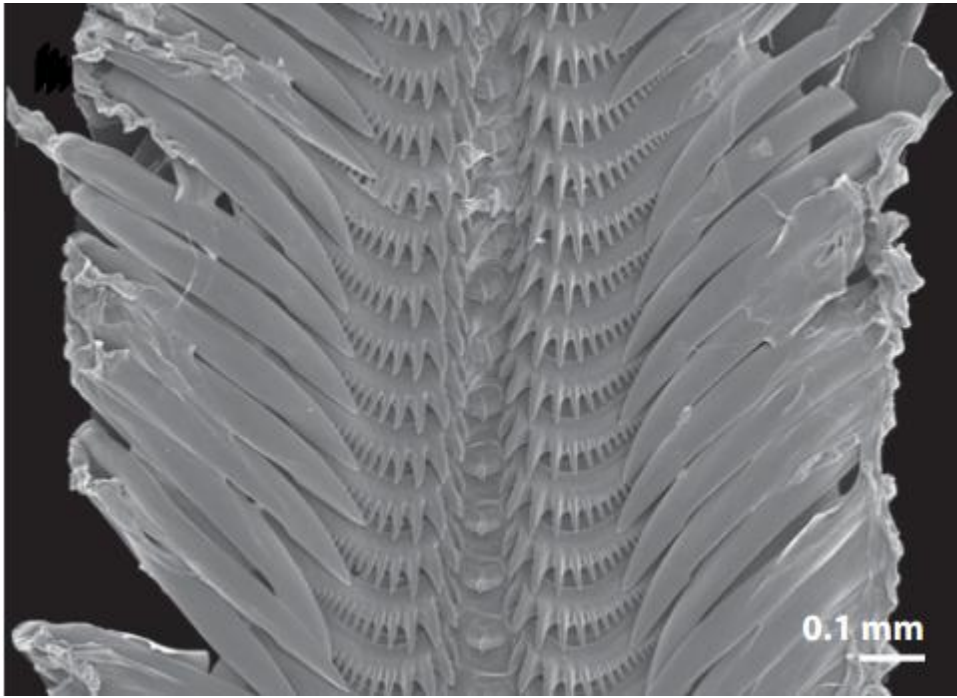


### 2.1.3 Clase Gastropoda

Del griego « *gastér* » y « *pus*» que significa “pie en el vientre”; la clase Gastropoda está constituida por organismos que tienen una distinguible variedad en forma, tamaño y hábitos alimenticios (carnívoros, herbívoros, suspensívoros, parásitos), su amplia radiación adaptativa les permitió distribuirse en ecosistemas marinos, dulceacuícolas y terrestres.

Esta clase comprende unas 70,000 especies vivientes y más de 15, 000 especies fósiles. La estructura distintiva de los gasterópodos es la rádula, que es una “cinta” provista de dientes quitinosos organizados en forma longitudinal y en cada lado se encuentran numerosos dientes marginales y laterales (Fig. 2). Entre cada especie existe una diferencia específica en el número de hileras de dientes que integran a la “cinta”. Dicha estructura se utiliza para la alimentación, sirviendo para raspar, seccionar y absorber (Marshall y Williams, 1985; Moore, 2006; Fernández y Rivas, 2007).

Tres subclases principales componen a la clase Gastrópoda: Opisthobranchia (marinos, con reducción o pérdida de la concha: babosas marinas), Pulmonata (caracoles y babosas terrestres) y Prosobranchia (caracoles marinos con concha) (Marshall y Williams, 1985).



**Fig. 2** Estructura del aparato radular. Micrografía electrónica de la rádula de *Clavus* sp. (Modificado de Olivera *et al.*, 2014).

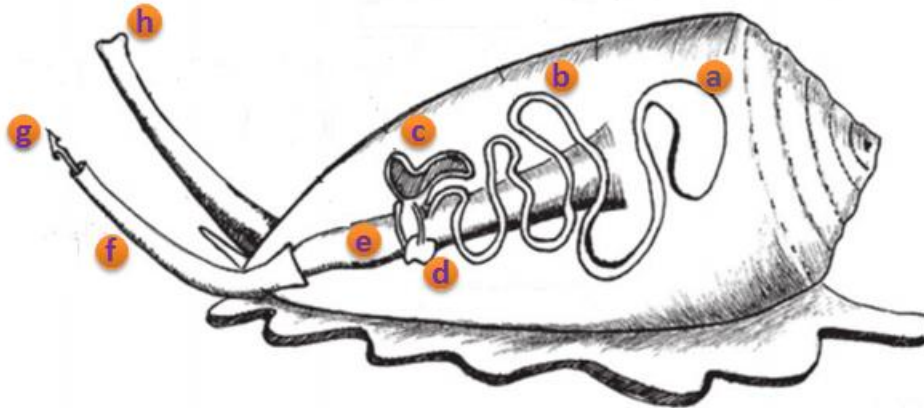
### **2.1.4 Superfamilia Conoidea**

Los organismos pertenecientes a la Superfamilia Conoidea, habitan principalmente en aguas tropicales, se pueden localizar desde la zona intermareal hasta los 1000 metros de profundidad. Son organismos de hábitos nocturnos y durante el día se encuentran guarecidos, ya sea bajo la arena o corales. Sus hábitos alimenticios son variados, hay especies que se inclinan por poliquetos, hemicordados y equiúridos (vermívoros), otras eligen peces (piscívoros) y algunas más suelen alimentarse de moluscos (molusquívoros) (Olivera, 1997; Bergillos y Rivas, 2013).

Este grupo de organismos le da un uso muy particular a la rádula, cuya estructura varía del prototipo general y presenta dientes radulares con estructura hueca y puntiaguda, en forma de arpón, que funcionan como herramienta de inoculación de venenos

potencialmente letales para sus presas y depredadores. De manera más específica, la morfología del aparato venenoso se encuentra constituida por un bulbo venenoso coligado con un conducto de veneno, un depósito de dientes radulares (saco radular), cada uno de los dientes radulares es hueco y está cargado del veneno, éste se encuentra sujeto por la parte anterior de la proboscis preparado para efectuar la inyección del veneno (Fig. 3). Una vez identificada la presa, los arpones son preparados y enviados individualmente a través de la proboscis que enfoca una posición firme hacia la localización del objetivo. Cabe resaltar que el estímulo para la liberación del arpón es táctil, y una vez que el cuerpo del pez entra en contacto con la punta de la proboscis, ésta se extiende y el arpón sobresale para la inyección inmediata del veneno (Kohn, 1956; Calderón y Field, 1999; Olivera, 2002).

Dentro de la Superfamilia hay 3 divisiones principales: Conidae, Terebridae y Turridae. De ellas, la familia Conidae se integra por 4 géneros y 71 subgéneros, siendo el género *Conus* uno de los más estudiados hasta el momento (Puillandre *et al.*, 2015).



**Fig. 3** Aparato venenoso de los organismos de la Superfamilia Conoidea; a) bulbo venenoso; b) conducto venenoso; c) saco radular; d) glándula salival; e) faringe; f) proboscis; g) diente radular en forma de arpón; h) sifón (Imagen modificada de Halai y Craik, 2008).

## 2.1.5 Género *Conus*

Es descrito como uno de los géneros más grandes de invertebrados marinos, compuesto por aproximadamente 700 especies vivientes. En un principio el interés por este grupo se debió a la particular forma cónica y la belleza de sus conchas (Fig. 4); sin embargo, en la actualidad el interés por estos caracoles reside en el estudio del veneno que sintetizan, mismo que, se ha reportado, tiene un efecto potente en sus presas e incluso afecta a humanos. Se ha revelado que más de una especie ha sido causante de picaduras en humanos, cabe señalar que los reportes indican que todas las especies de caracoles *Cono* son capaces de provocar picaduras y daños graves, independientemente del tamaño y de los hábitos alimenticios que las caractericen (molusquívoros, piscívoros o vermívoros) (Olivera, 1997; Terlau y Olivera, 2004; Paredes *et al.*, 2010). De acuerdo con Fegan y Andresen (1997), cuando una picadura no mortal ocurre en humanos, los síntomas reportados son: náuseas, cefalea y parálisis local; en tanto que para los envenenamientos mortales se produce edema cerebral, coma e insuficiencia respiratoria en tan solo unas horas a partir del envenenamiento.

Por su parte, la especie *Conus geographus* ha sido confirmada como causante de por lo menos 36 decesos documentados entre los años 1670 y 1998 (Dutertre *et al.*, 2014).



**Fig. 4** Conchas representativas del género *Conus*: a) *C. textile*; b) *C. marmoreus*; c) *C. gloriamaris*; d) *C. geographus*; e) *C. capitaneus*; f) *C. praezellens*; g) *C. tessulatus*; h) *C. imperialis*; i) *C. burneus* (Fotografía: Elaborada por Barrón-Morales, 2017).

## 2.1.6 Veneno de *Conus*: particularidades

Los venenos de los caracoles *Cono* se componen de toxinas de naturaleza peptídicas denominadas conotoxinas o conopéptidos, dicha clasificación se basa en el número de puentes disulfuro que presentan en su estructura primaria; se denominan conotoxinas aquellas que presentan dos o más puentes disulfuro y conopéptidos si tienen uno o ningún puente disulfuro. Se ha propuesto que cada especie expresa entre 50 y 200 conopéptidos distintos (López-Vera, 2010). Estos caracoles poseen un coctel de compuestos únicos, biológicamente activos. Así, las toxinas de estas especies tienen como blanco molecular una amplia gama de canales iónicos y/o receptores específicos implicados en la transmisión neuromuscular de vertebrados e invertebrados (Milne *et al.*, 2003; Halai y Craik, 2009).

Las toxinas que componen los venenos de *Conus* se caracterizan por su tamaño pequeño (entre 7 y 40 residuos de aminoácidos), su diversidad molecular, la estabilidad estructural, así como su selectividad y afinidad sobre receptores estructuralmente similares; estas características han permitido que se consideren como agentes con posibles efectos farmacológicos (Olivera, 2006; López-Vera, 2010).

Debido a la variedad y especificidad de los componentes en el veneno de *Conus*, se ha suscitado un gran interés en su estudio durante los últimos 30 años (López-Vera, 2005, 2010).

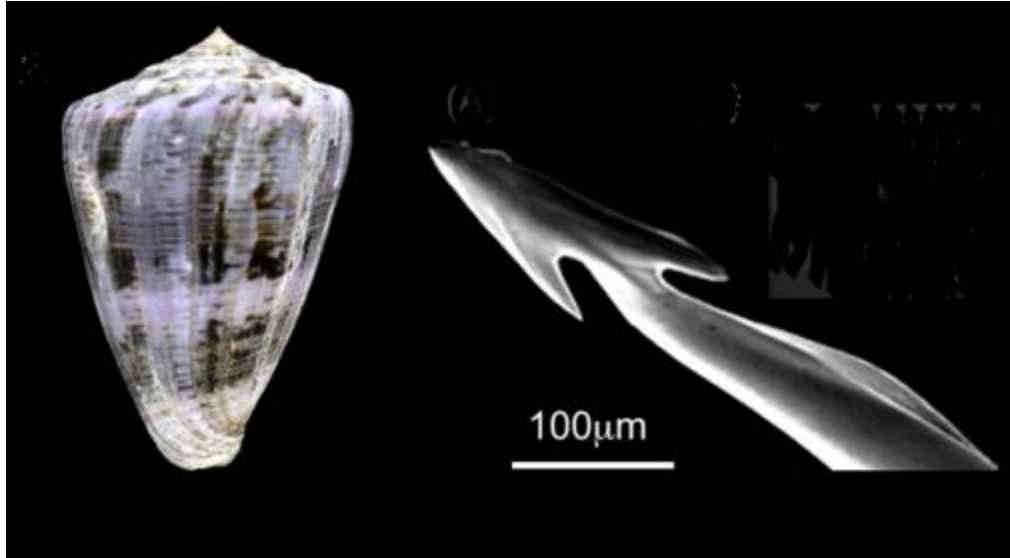
## 2.1.7 *Conus purpurascens* como fuente de toxinas moduladoras de canales iónicos

La especie *Conus purpurascens* se distribuye en México, en el Golfo de California desde Bahía Magdalena hasta el sur del Ecuador (Landa *et al.*, 2013) (Fig. 5).

Se caracteriza porque su concha presenta contorno ancho y color púrpura que va de claro a oscuro y cuyas bandas o puntos son de color café o púrpura oscuro (Fig. 6). Mide entre 3.8 y 7.5 cm, aproximadamente; posee una excelente capacidad de mimetizarse en la zona que habita y se le encuentra mayoritariamente junto a rocas en la zona intermareal, pero casi siempre permanece enterrada. También se ha reportado su presencia en la zona mesolitoral inferior, sobre sustrato coralino y en la zona submareal. Se alimenta principalmente de peces pequeños de los arrecifes y su veneno es capaz de provocar en ellos parálisis en menos de cinco segundos postinyección (Calderón y Field, 1999; Landa *et al.*, 2013).



**Fig. 5** Distribución de *Conus purpurascens*. Se señala en rojo la zona con una mayor distribución (Modificado de ConoServer, 2017).



**Fig. 6** Ejemplar representativo de *Conus purpurascens*. Concha de un ejemplar de tamaño promedio y diente radular en forma de arpón (Modificado de Chun *et al.*, 2012).

Existen diversos estudios respecto al veneno de *Conus purpurascens* en los que se describen la identificación, descripción, caracterización e incluso el análisis estructural tridimensional de sus toxinas; mismas que han permitido precisar blancos moleculares, lo que conlleva a un trascendente avance en términos de farmacología (Scanlon *et al.*, 1997; Savarin *et al.*, 1998). Así, *Conus purpurascens* representa un ejemplar importante dentro del género *Conus* para el estudio de toxinas.



Hasta la fecha, se ha descrito que las moléculas identificadas, secuenciadas y sintetizadas de *Conus purpurascens* pueden actuar de forma selectiva en:

- Receptores nicotínicos de acetilcolina (ACh)
  - $\alpha$ A-PIVA
  - $\alpha$ -PIA
  - $\alpha$ -PIB
  - $\psi$ -PIIIE
  - $\psi$ -PIIIF
- Canales de sodio activado por voltaje (Nav)
  - $\mu$ -PIIIA
  - $\delta$ -PVIA
- Canales de Potasio activados por voltaje (Kv)
  - k-PVIIA

La kappa-conotoxina PVIIA (k-PVIIA) fue identificada en el veneno del caracol marino *Conus purpurascens*, está compuesta de 27 residuos de aminoácidos. Se ha observado que la PVIIA en el veneno de *C. purpurascens* induce una rápida inmovilización de la presa (pez) y tiene actividad sobre canales de potasio activados por voltaje (Terlau *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 2004).

## 2.2 Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas de membrana, sus principales características son:

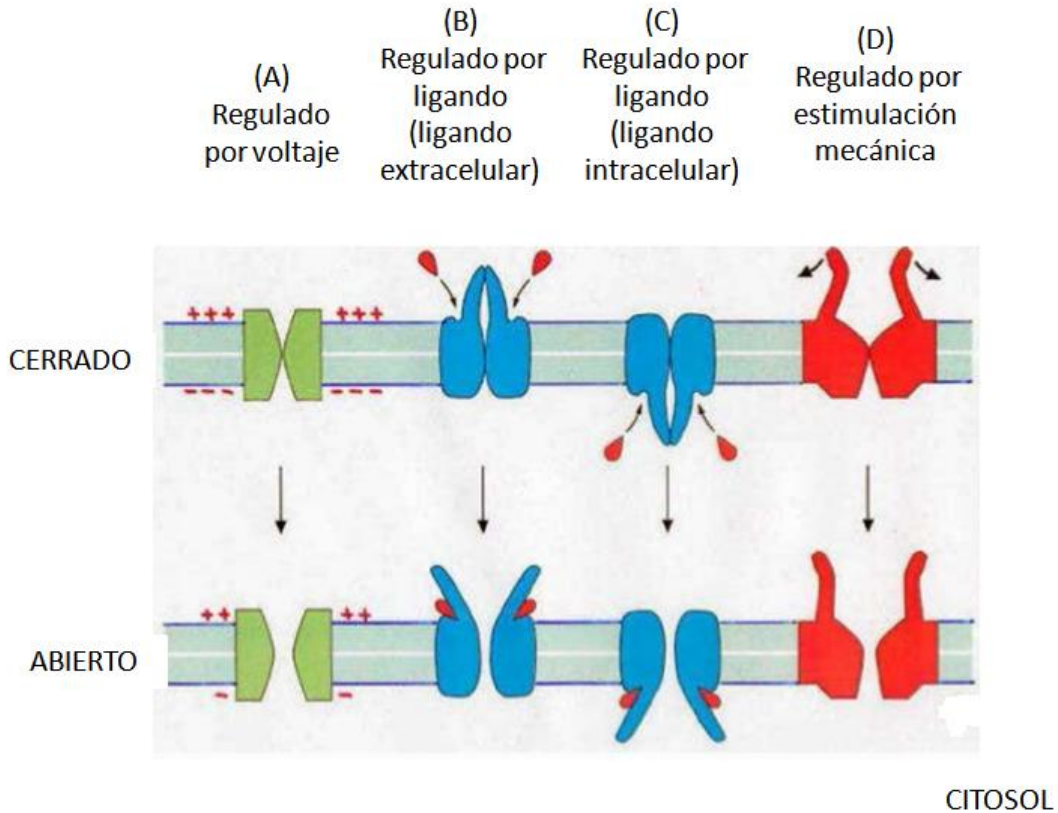
- Forman un poro hidrofílico que atraviesa la bicapa lipídica de la membrana celular.
- Los canales iónicos tienen selectividad por diferentes iones.
- Presentan una mayor velocidad de transporte con respecto a las otras proteínas transportadoras, conduciendo así miles de iones por milisegundo (Gartner *et al.*, 2007).

Los canales iónicos regulan el tránsito de iones hacia el interior y al exterior de las células, el desplazamiento de iones como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  a través de las membranas celulares mantiene una diferencia en las concentraciones iónicas externas e internas, la entrada y salida de los iones es indispensable para la estabilidad de las células y el funcionamiento de un considerable número de procesos biológicos, entre los cuales se encuentran la señalización eléctrica en células excitables, la conducción nerviosa, la contracción muscular, la secreción hormonal, así como procesos sensoriales en el aprendizaje y la memoria (Alberts *et al.*, 2007).

Para la distinción de los diferentes tipos de canales iónicos existentes se pueden citar dos aspectos principales; el primero se relaciona con la selectividad iónica, es decir, el tipo de iones a los que se les permite el paso, y el segundo hace referencia a las condiciones que determinan la apertura y el cierre del canal, llamado mecanismo de compuerta o “gating” (Silverthorn, 2008) (Tabla 1, Fig. 7).

**Tabla 1.** Regulación de canales iónicos (Modificado de Silverthorn, 2008).

<b>Mecanismos de compuerta del canal</b>	
<b>Mediante tensión mecánica</b>	Se abre a respuestas físicas como presión o estiramiento. Se localizan en células sensitivas como las células ciliadas auditivas en el oído.
<b>Regulados por unión a un ligando</b>	El estado abierto dependerá de la unión del canal con una molécula específica, llamada “ligando”, ya sea a nivel extracelular (neurotransmisores) o citoplasmático (neuromoduladores o moléculas señal).
<b>Voltaje-dependientes</b>	La activación de estos canales, depende de los cambios en el potencial de membrana de la célula.



**Fig. 7** Representación de los sistemas de regulación de canales iónicos (Modificado de Alberts y Bray, 2006).

Los canales iónicos fluctúan entre los estados abierto y cerrado, de manera general se les designa la configuración siguiente: 1) el estado activado; abierto y conductor, 2) el estado inactivado; cerrado y no susceptible de abrirse en respuesta a un estímulo y 3) el estado en reposo; que en respuesta a un estímulo se puede activar (Hille, 2001; Nelson y Cox, 2009).

## 2.2.1 Canales de potasio voltaje-dependientes

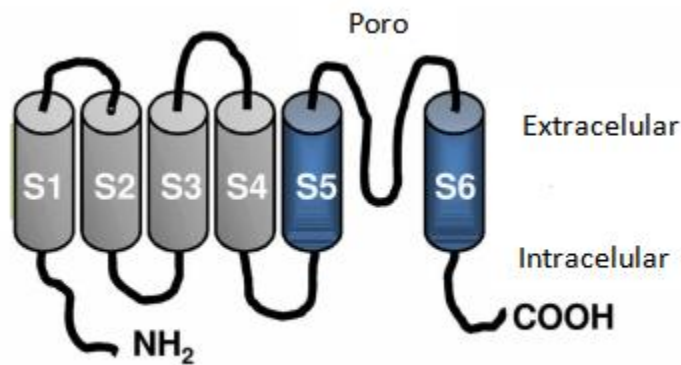
Los canales selectivos al ion potasio conforman una familia diversa. De acuerdo con Tian *et al.*, (2014), tan solo en humanos, 90 genes codifican las subunidades  $\alpha$  de los canales de  $K^+$ , que a su vez se asocian con las subunidades  $\beta$ , lo cual modifica su función. Existe una amplia multiplicidad en esta familia de canales iónicos y hoy en día, se acepta ampliamente que los canales de potasio pueden estar presentes en cualquier compartimiento subcelular: en la superficie neuronal y muscular; además, al no ser uniforme su distribución y al tener una localización selectiva en las células, están involucrados en la regulación de distintos procesos como son: la liberación de neurotransmisores, la regulación del volumen celular, la contracción muscular, el ritmo cardiaco, la secreción de insulina, el transporte epitelial y la excitabilidad neuronal, entre otros (Solis *et al.*, 2008; Luján, 2010).

En neuronas, un potencial de acción tiene una duración de 1 a 2 milisegundos y se encuentra constituido por un ciclo de despolarización, repolarización y posthiperpolarización. Dichos cambios cíclicos del potencial eléctrico a través de la membrana celular resultan de la apertura y cierre en secuencia de ciertos canales iónicos regulados por voltaje, entre los cuales se ubica a los canales de  $K^+$  .

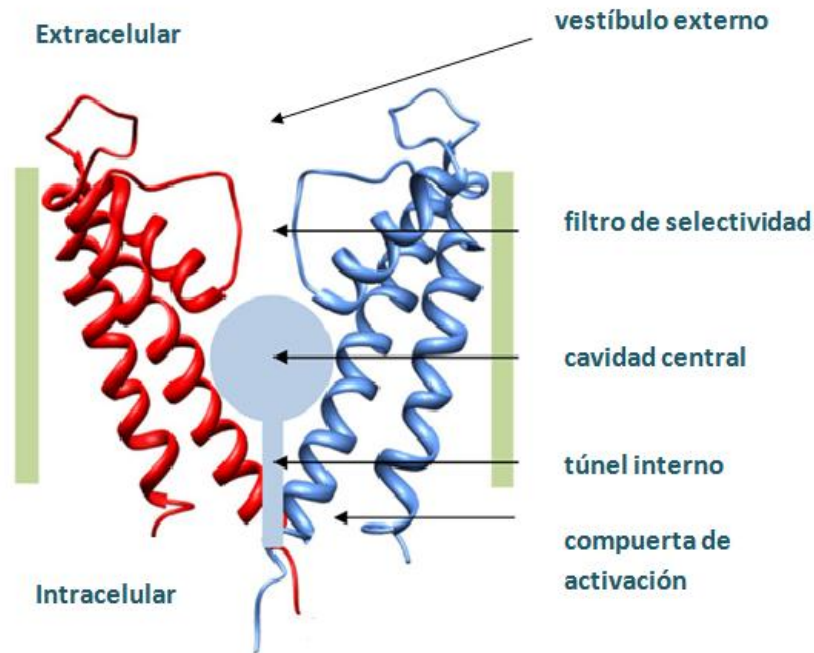
En los canales de potasio regulados por voltaje, se describen dominios proteicos que actúan como sensores del potencial de membrana, ya que un cambio de potencial induce en ellos un cambio conformacional y desencadena la apertura y el cierre del canal de  $K^+$  . Estos canales desempeñan una función específica que es regular la excitabilidad postsináptica así como la duración, la forma y el disparo durante el potencial de acción,

contribuyendo así a la repolarización de la membrana de la célula (Dodson y Forshite, 2004).

La estructura de los canales de potasio regulados por voltaje consta mayoritariamente de 6 segmentos transmembrana (S1-S6) (Fig. 8); entre los segmentos S5 y S6 se localizan las secuencias que establecen el poro y el filtro de selectividad (Fig. 9). En la mayoría de los canales, el dominio S4 presenta una serie de aminoácidos (argininas o lisinas), cargados positivamente, los cuales detectan los cambios en el potencial de membrana, actuando como un sensor de voltaje (Doyle *et al.*, 1998; Felipe *et al.*, 2007; Nelson y Cox, 2009).



**Fig. 8** Topología de los canales de potasio regulados por voltaje: segmentos transmembrana (S1-S6) (Modificado de Labro y Snyders, 2012).



**Fig. 9** Topología del poro de los canales de potasio regulados por voltaje (Modificado de Labro y Snyders, 2012).

Por otro lado, la inactivación de estos canales ocurre mediante dos mecanismos: una inactivación rápida conocida también como tipo N, la cual ocurre en los primeros milisegundos y una inactivación lenta conocida también como tipo C, la cual se genera segundos después de la activación del canal. Farmacológicamente, se han utilizado compuestos como el Tetraetilamonio y la 4-aminopiridina para estudiar la sensibilidad y la funcionalidad de estos canales. Así mismo, el primero de ellos se ha asociado a la inactivación tipo C, mientras que el segundo está asociado a la inactivación tipo N (Armstrong y Binstock, 1965; Glover, 1982; Carrillo-Flores, 2014).

Las propiedades de los canales de  $K^+$  han sido estudiadas desde los años 80's y especialmente en el modelo experimental *Drosophila melanogaster*, esto debido a que el ser humano y esta especie comparten varios genes ortólogos. Hoy en día, se han descrito subfamilias de canales iónicos de potasio activados por voltaje en mamíferos (Kv1-4) y sus homólogos en *D. melanogaster* son: *Shaker* (Kv1), *Shab* (Kv2), *Shaw* (Kv3), y *Shal* (Kv4) (Butler *et al.*, 1989; Tian *et al.*, 2014; Carrillo-Flores, 2014). Cabe resaltar que el canal tipo *Shaker* fue el primer canal de  $K^+$  clonado y secuenciado a partir del comportamiento tembloroso bajo anestesia visto en una colonia de *Drosophila melanogaster*, por lo cual lleva ahora su nombre. Otra característica de esta subfamilia de canal de potasio es que tiene una amplia distribución en el sistema nervioso y la deficiencia funcional de los canales se ha vinculado con algunas enfermedades motoras entre ellas la epilepsia y por otro lado con el Alzheimer que es una enfermedad neurodegenerativa (Papazian *et al.*, 1991; Schulte *et al.*, 2006).

### **2.3 *Drosophila melanogaster* como modelo biológico.**

La investigación con *D. melanogaster* inició hace un poco más de 100 años. A partir de la observación de homologías entre el genoma de *D. melanogaster* y el genoma del ser humano, este modelo biológico sigue ayudando a dilucidar procesos en la biología humana (Pandey y Nichols, 2011).

Conocida comúnmente como mosca del vinagre, es un organismo holometábolo, es decir, presenta estadios de desarrollo y metamorfosis. Su ciclo de vida se desarrolla en las

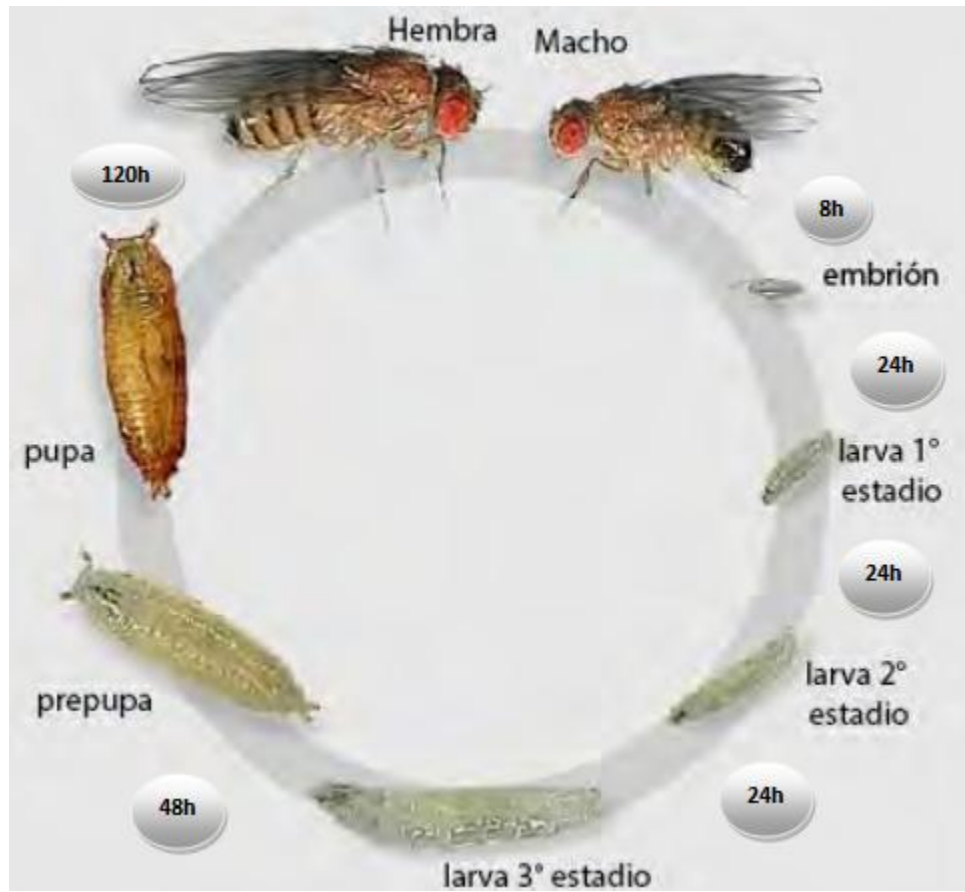


siguientes fases; un huevo, tres estadios larvales (L1, L2, L3), una pupa y un adulto (Fig. 10) (Rodríguez-Arnaiz, 2003; Campos-Ortega y Hartenstein, 2013).

Estudios previos describen muchas ventajas sobre el uso de *D. melanogaster* como modelo biológico, entre las que se pueden citar:

- Facilidad de cría y mantenimiento
- Alta tasa reproductiva: Un promedio de 500 huevos por hembra (Valencia *et al.*, 1984)
- Ciclo de vida corto
- Amplio conocimiento de su genética

En condiciones control de 25°C de temperatura y 65% de humedad, el ciclo de vida tiene una duración aproximada de 10-12 días. Dentro del ciclo, cabe resaltar el desarrollo de la larva, el cual ocurre en tres estadios de desarrollo: L1 (24 a 47h), L2 (48 a 71h) y L3 (72 a 96h); durante los cuales se presentan etapas o “picos” que se caracterizan por una elevada expresión de genes. La expresión génica durante los tres estadios se encuentra involucrada en eventos para el correcto funcionamiento a nivel fisiológico y metabólico así como el adecuado desarrollo morfológico desde el nivel de la larva hasta del organismo adulto. En tanto que en el tercer estadio larvario (L3) se presenta un pico de expresión de genes los cuales están relacionados con funciones bioquímicas y celulares como son: la codificación de componentes de rutas metabólicas y la síntesis de complejos proteicos, entre ellos los canales iónicos tipo *Shaker* que participan fundamentalmente en el proceso de la señalización neuronal y en la diferenciación muscular (Petitpierre, 1997; Arbeitman *et al.*, 2002; Flybase, 2017).



**Fig. 10** Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Modificado de FlyMove, 2017.

---

## 3 JUSTIFICACIÓN

---

El veneno producido por los caracoles marinos del género *Conus* es de particular interés para diversas investigaciones con enfoque: biotecnológico, toxicológico, biomédico, farmacológico y a las posibles implicaciones que pueden tener a nivel fisiológico y molecular. Asimismo, los estudios de los efectos *in vivo* de las toxinas de Cónidos aún son escasos cuando se confrontan con investigaciones a niveles celular y molecular, que en su mayoría se han centrado en casos *in vitro* (Favreau y Stöcklin, 2009).

*Drosophila melanogaster* constituye un organismo altamente utilizado para realizar numerosos estudios con enfoques multidisciplinarios. Además del vasto conocimiento sobre su genoma, ciclo de vida y sistemática, esta especie ha sido un excelente modelo para evaluar genotoxicidad, lo cual es importante porque a través de ello se han localizado nuevos enfoques de estudio. El uso de *D. melanogaster* y su variedad de mutantes ha sido de vital importancia para el conocimiento y el análisis sobre la funcionalidad de los canales de potasio (Wheeler, 1981). Un ejemplo de ello es la cepa Hiperkinetic (*Hk*) de *D. melanogaster* ya que presenta una mutación en la subunidad beta que conforman los canales de potasio tipo *Shaker* y se ha vuelto importante debido a que esta mutante sirvió para determinar algunos aspectos en la función del canal (Yao y Wu, 1999).

Por consiguiente, en el presente trabajo nos enfocaremos a valorar los efectos de la kappa-conotoxina PVIIA y los compuestos comerciales empleados en farmacología de los canales de potasio (TEA y 4-AP) en la sobrevivencia de *D. melanogaster*, mediante su inyección en larvas de tercer estadio de desarrollo pertenecientes a dos cepas; *Hk* y *yw*, con

la finalidad de establecer un bioensayo de especificidad y evaluación rápida para conotoxinas con actividad en canales de potasio, a partir de los resultados obtenidos con la conotoxina.

---

## 4 HIPÓTESIS

---

La existencia de la cepa *Hk* de *Drosophila melanogaster* con modificaciones sobre el canal de potasio tipo *Shaker*, nos permitirá utilizarla como un bioensayo para la caracterización rápida y específica de conotoxinas ( $\kappa$ -PVIIA) sobre éstos canales.

---

# 5 OBJETIVOS

---

## 5.1 Objetivo General

Realizar una detección rápida y una evaluación de los efectos de la kappa-conotoxina PVIIA con actividad antagonista sobre canales de potasio en larvas de *Drosophila melanogaster*.

## 5.2 Objetivos Específicos

- Comparar el efecto de la kappa-conotoxina PVIIA y los compuestos 4-Aminopiridina y Tetraetilamonio sobre la sobrevivencia de organismos adultos de las cepas *Hk* y *yw*.
- Valorar el bioensayo que consiste en microinyecciones de la conotoxina y los bloqueadores 4-AP y TEA en larvas de tercer estadio de desarrollo de *D. melanogaster*, de manera que éste pueda ser empleado como modelo para la identificación de toxinas con efecto antagonista en canales de potasio.
- Observar el comportamiento larval en los diferentes tratamientos experimentales en el momento de la inyección.

---

# 6 MATERIALES Y MÉTODO

---

## 6.1 Cepas de *Drosophila melanogaster*

El material biológico utilizado en este trabajo fue proporcionado por el Banco de Moscas del Instituto de Neurobiología (INB) -UNAM, Campus Juriquilla. A cargo del Dr. Juan R. Riesgo Escobar.

- *yw* (yellow-white) cepa testigo
- *Hk* (Hiperkinetic)

La cepa *yw*, cuya singularidad se encuentra determinada por la presencia de una cutícula con coloración amarilla, asociado con el marcador *y* (*yellow*, localización: 1-0.60); y además, la presencia de una coloración blanca en los ojos, codificado por el marcador *w* (*white*, localización: 1-1.5) (Lindsley y Zimm, 1992).

La cepa *Hk* (localización: 1-30.1) agita las patas vigorosamente bajo anestesia inducida por trietilamina y por éter. Esta cepa consiste en una mutación de la subunidad  $\beta$  del canal de potasio tipo *Shaker*. La mutación en esta cepa afecta la excitabilidad neuronal y el patrón de movimiento larval. Los organismos adultos muestran hiperexcitabilidad causada por potenciales de acción espontáneos aberrantes en las células neuronales y se correlaciona con el comportamiento de sacudir las patas bajo anestesia inducida (Lindsley y Zimm, 1992; Wang y Wu, 1996; Wang *et al.*, 2002; FlyBase, 2017).

## 6.2 Compuestos comerciales

- Solución salina 0.9%
- TEA (tetraetilamonio)
- 4-AP (4-aminopiridina)

La solución salina normal (SSN) es una solución isotónica de electrolitos y tiene una composición similar a la composición electrolítica del líquido extracelular. Esta solución fisiológica compuesta por iones de cloruro de sodio es usada como suero y está indicada para corregir desequilibrios electrolíticos y para el tratamiento de la acidosis leve o moderada (msssi.gob.es 2017).

Por otra parte, Armstrong y Binstock en 1965 describieron al Tetraetilamonio (TEA) como un inhibidor de las corrientes de los canales de potasio. El TEA se ha utilizado como bloqueador inespecífico de estos canales.

La 4-Aminopiridina (4-AP) es un bloqueador de canales de potasio (Glover, 1982). Este fármaco bloquea de manera preferente las corrientes transitorias del ion potasio; actúa en la función sináptica interneuronal y neuromuscular (Schafer *et al.*, 1973; Goodman *et al.*, 2009).



## 6.3 kappa-conotoxina PVIIA

Reportes indican que la kappa-conotoxina PVIIA es un péptido que inhibe a los canales tipo *Shaker* del ión potasio activado por voltaje (Naranjo, 2002; Chun *et al.*, 2012) y en estudios realizados por Shon *et al.*, en 1998 se propuso que la kappa-conotoxina PVIIA se une a una estructura extracelular del poro en el canal de  $K^+$  .

## 6.4 Medio de cultivo para *Drosophila melanogaster*

El medio de cultivo para propagar las cepas se obtuvo al disolver uno por uno los siguientes ingredientes en 400 ml de agua a una temperatura de 85°C:

- 7g de grenetina
- 8g de agar
- 50g de levadura fresca
- 50g de piloncillo

Una vez disueltos los ingredientes, se ajustó la temperatura a 55°C para lograr enfriar un poco el compuesto, se agregó 1% (5ml) de ácido propiónico. Finalmente, en recipientes de vidrio (botellas de 250 ml), se depositó una porción equivalente a dos centímetros del medio de cultivo y se dejó enfriar para su posterior uso.

## 6.5 Estrategia experimental

### Ensayos

Se realizaron 5 ensayos de inyecciones por cada una de las concentraciones y para cada uno de los tratamientos: solución salina normal, 4-AP, TEA y la conotoxina kappa-PVIIA. Cada ensayo a su vez se integró de lotes de 100 larvas por cepa (*yw*, *Hk*) y como número total fueron 500 larvas inyectadas por cepa y por concentración para cada compuesto y para la conotoxina. Las concentraciones inyectadas para cada uno de los compuestos se realizaron en un orden milimolar (mM): 1, 10, 30, 100, mientras que para la conotoxina fue en el orden micromolar ( $\mu\text{M}$ ): 1, 5, 10, 30, 100 (Martínez-Hernández, 2016).

### Obtención de larvas

Con el objetivo de sincronizar el desarrollo de las larvas y colectar huevos se colocó en frascos con medio fresco y por separado un cultivo maduro de moscas de las cepas *yw* y *Hk* durante 4 horas para la ovoposición, transcurrido este tiempo se retiraron las moscas. Cuando las larvas se encontraban en su tercer estadio de desarrollo (72 horas) fueron extraídas de los frascos con ayuda de un pincel (a manera de apartar pero evitando barrer para no dañar a las larvas) y se transfirieron sobre portaobjetos que previamente se prepararon con cinta adhesiva doble cara, el número de larvas colocadas e inyectadas fue de 25 por portaobjetos.

### Procedimiento de inyección

Se utilizó un microscopio estereoscópico y un microinyector (nanoliter 2000), en el cual se colocaron las microagujas hechas con tubos capilares de vidrio (0.53 mm DI). Dichas

microagujas fueron cargadas primero con aceite mineral y posteriormente con el compuesto o toxina a inyectar. Para realizar las inyecciones se colocaron 25 larvas en un portaobjetos, las inyecciones se llevaron a cabo entre el 5° y 6° segmento de cada una de las larvas, en un volumen de 4.6nl y se observó la respuesta inmediata que tuvieron las larvas a la inyección (10s). Finalizadas las inyecciones, con la ayuda de un pincel y con un suave contacto sobre el portaobjetos se humedeció con agua desionizada el área donde se encontraba cada una de las larvas para poder así despegarlas; inmediatamente se colocaron una por una en tubos de polipropileno con medio de cultivo. Este procedimiento se repitió hasta que en cada tubo se depositaron 100 larvas (un lote).

La observación de los organismos y el registro de las moscas que sobrevivieron se cuantificaron a partir de las 48 horas posteriores a la inyección (día 5) hasta las 240 horas (día 15).

## **6.6 Análisis de datos**

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa Statistica 7, mediante la prueba curva dosis-respuesta para obtener el porcentaje de sobrevivencia correspondiente a cada concentración por compuesto y por cepa. A fin de comparar las medias de la variable de sobrevivencia que están asociadas a dos factores, la cepa que se utiliza y la concentración del compuesto o toxina, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) donde un valor de  $p < 0.05$  se consideró como significativo. La prueba de ANOVA permitió determinar si los diferentes niveles del factor tienen un efecto significativo sobre el valor de la variable dependiente.

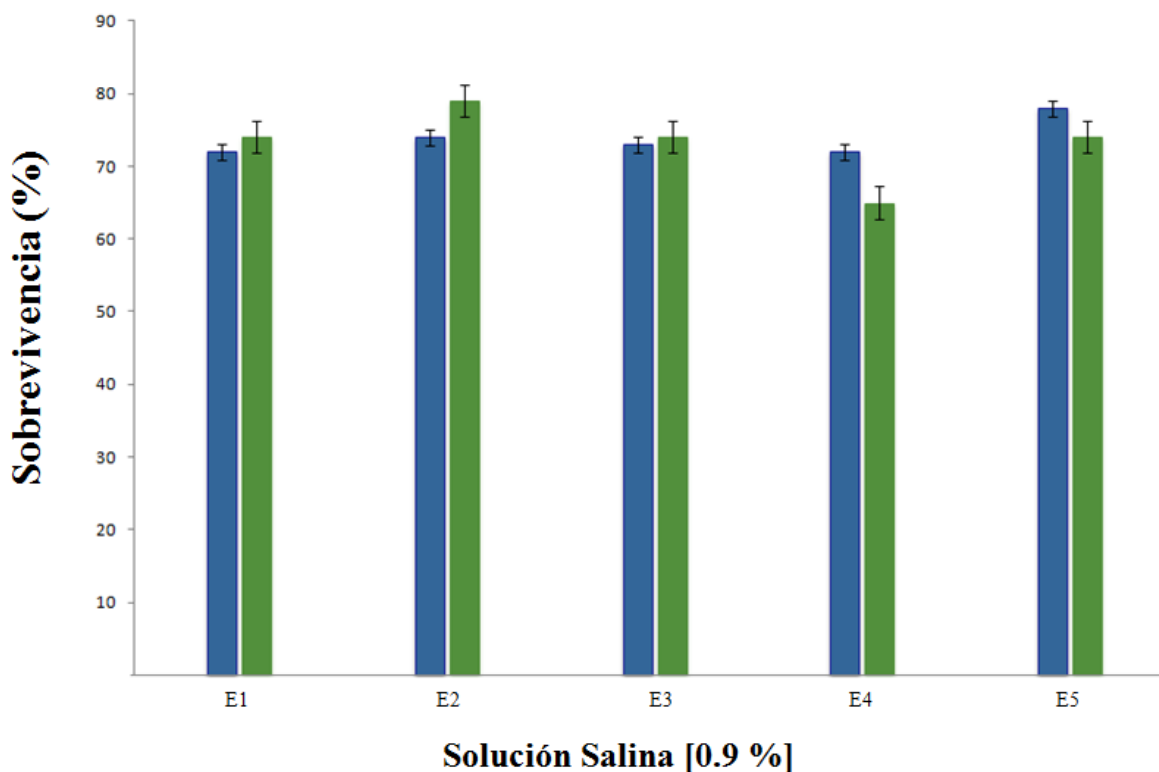
---

## 7 RESULTADOS

---

### 7.1 Efecto de los compuestos comerciales sobre las cepas de *D. melanogaster*

Con el propósito de conocer el efecto físico producido por la inyección en la sobrevivencia de las larvas, se decidió realizar inyecciones con solución salina (compuesto control) en cinco lotes de 100 larvas para ambas cepas. Se observó que la sobrevivencia promedio en ambas cepas fue similar y cercano al 80% (Fig. 11), una vez confirmado que la solución salina y la técnica de inyección tienen un efecto semejante para ambas cepas y que no afectan la sobrevivencia *per se* (Mejía *et al.*, 2010) se prosiguió a probar los compuestos 4-AP, TEA y la kappa-conotoxina PVIIA.



**Fig. 11.** Sobrevivencia de las cepas *yw* (■) y *Hk* (■) inyectadas con solución salina 0.9% en cinco ensayos (E1-E5), cada ensayo consta de 100 larvas inyectadas por cepa.

A continuación, en la tabla 2 se muestra desglosada por compuesto y por concentración la sumatoria del número de organismos de *yw* y *Hk* que sobrevivieron de los ensayos realizados (5), es decir, el total de 500 y en la figura 12 se observa la relación entre la sobrevivencia y las concentraciones de los compuestos 4-Aminopiridina (4-AP) y Tetraetilamonio (TEA) para las cepas *yw* y *Hk*.

En la cepa *Hk* inyectada con TEA disminuye significativamente la sobrevivencia con las concentraciones 30 mM y 100 mM, en tanto que en las concentraciones 1 mM y 10 mM la sobrevivencia es mayor.

Los lotes experimentales inyectados con el compuesto 4-AP muestran un aumento gradual en la sobrevivencia de la cepa *Hk* conforme aumenta la concentración (1 mM, 30

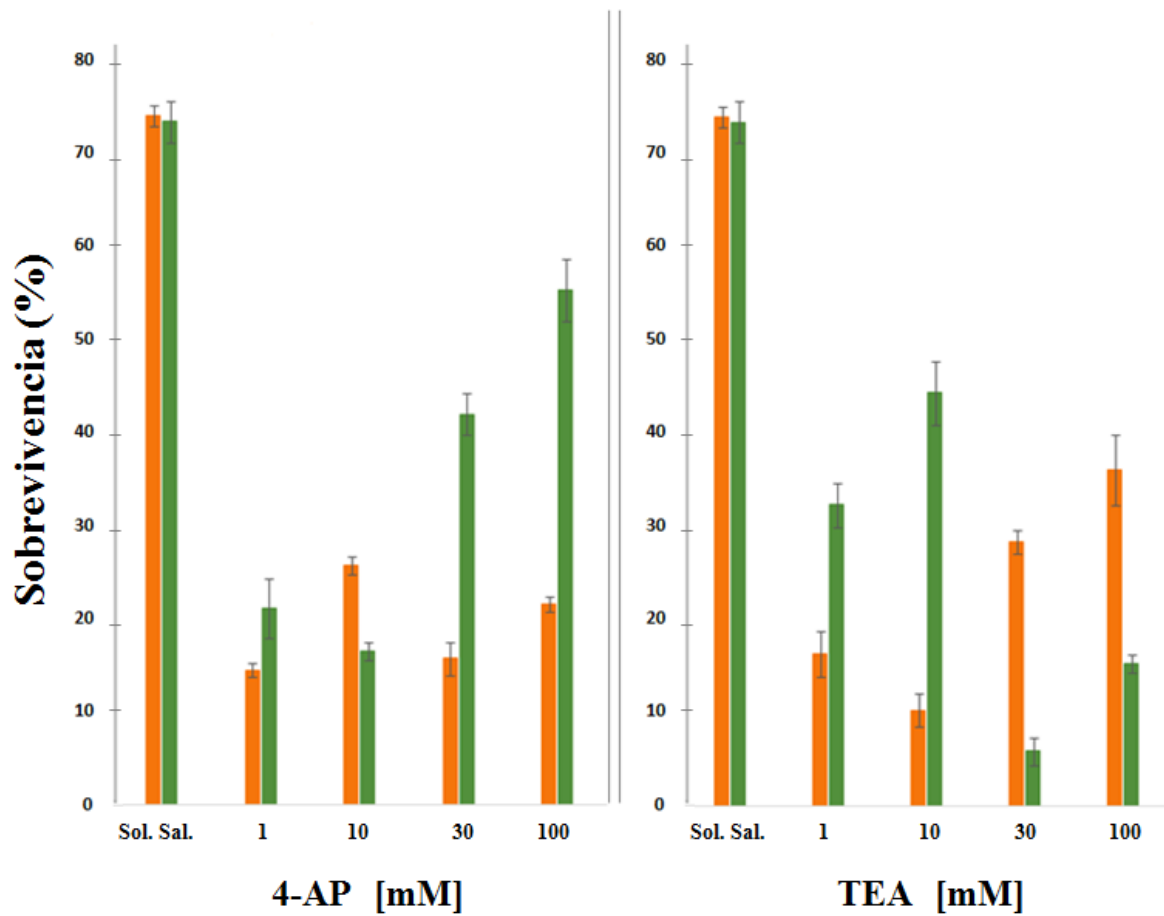
mM y 100 mM). Para este compuesto la concentración con menor porcentaje de sobrevivencia de la cepa *Hk* es la de 10 mM.

Al evaluar el compuesto TEA en la cepa *yw* se observa un aumento de la sobrevivencia con las concentraciones más altas, 30 mM y 100 mM; mientras que la sobrevivencia de *yw* con el compuesto 4-AP se mantiene similar en las distintas concentraciones.

Para confirmar las diferencias significativas entre los grupos experimentales y los tratamientos se realizó la prueba HSD de Tukey que tiene como base una técnica de comparaciones múltiples, donde se tiende a equiparar cada grupo de datos con todos los demás (anexo II).

**Tabla 2.** Sumatoria del número de organismos sobrevivientes registrados por compuesto y concentración a lo largo de los 5 ensayos realizados. Se presenta la media aritmética, la desviación estándar (s) y el error estándar (e.e.).

compuesto	<i>JW</i>				<i>Hk</i>			
	Número de sobrevivientes	$\bar{x}$	s	e.e.	Número de sobrevivientes	$\bar{x}$	s	e.e.
<b>Sol. Sal</b>	369	73.8	2.5	1.1	366	73.2	5	2.2
<b>4-AP</b>								
1 mM	72	14.4	1.7	0.8	105	21	7	3.1
10 mM	128	25.6	2.3	1	82	16.4	2.3	1
30 mM	78	15.6	4	1.8	209	41.8	5	2.2
100 mM	107	21.4	1.8	0.8	276	55.2	7.5	3.3
<b>TEA</b>								
1 mM	81	16.2	5.4	2.4	161	32.2	5.3	2.4
10 mM	51	10.2	3.9	1.7	221	44.2	7.6	3.4
30 mM	141	28.2	2.8	1.2	29	5.8	3.3	1.5
100 mM	180	36	8.5	3.8	76	15.2	2.3	1
<b>PVIA</b>								
1 $\mu$ M	101	20.2	1	0.4	100	20	1.9	0.8
5 $\mu$ M	125	25	2.1	0.9	59	11.8	2.5	1.1
10 $\mu$ M	160	32	2.4	1.1	215	43	5.1	2.3
30 $\mu$ M	140	28	3.7	1.6	234	46.8	2.3	1
100 $\mu$ M	151	30.2	1.5	0.7	304	60.8	2.6	1.2

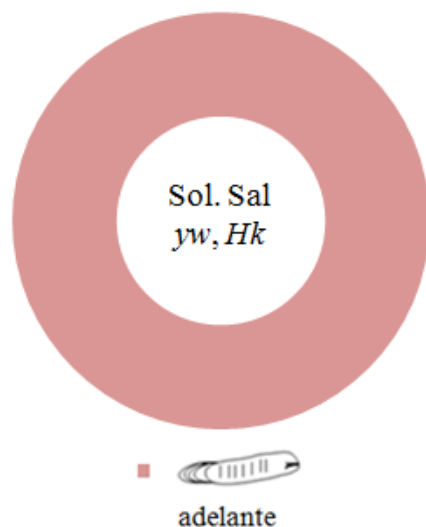


**Fig. 12** Sobrevivencia de las cepas *yw* (■) y *Hk* (■) inyectadas con diferentes concentraciones de 4-Aminopiridina (4-AP) y Tetraetilamonio (TEA), cada punto representa el promedio de 5 ensayos independientes  $\pm$  E.E., para 4-AP ( $F= 42.7$ ,  $p <0.05$ ) y TEA ( $F= 56.4$ ,  $p <0.05$ ).

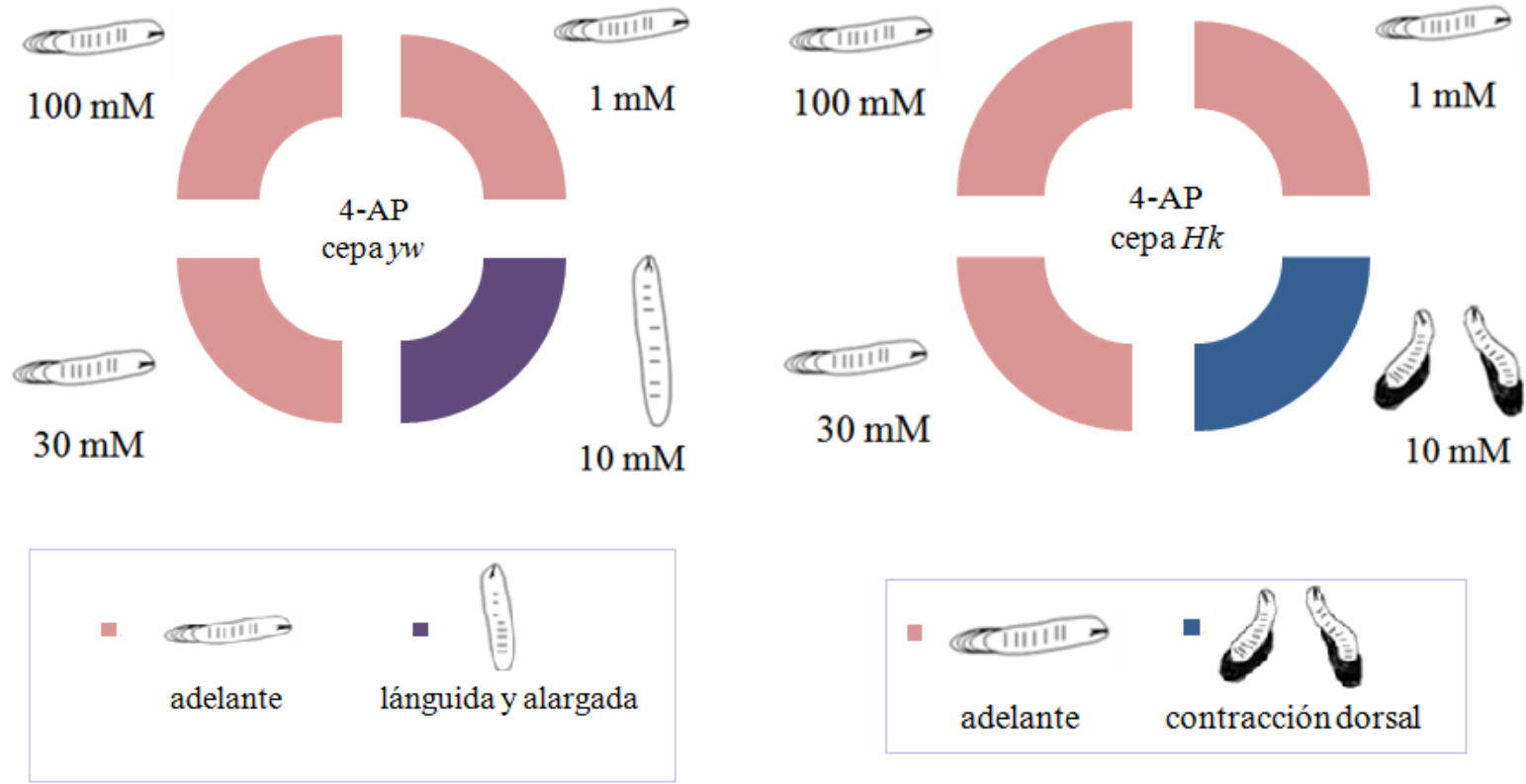


### Locomoción sol. Salina, 4-AP y TEA.

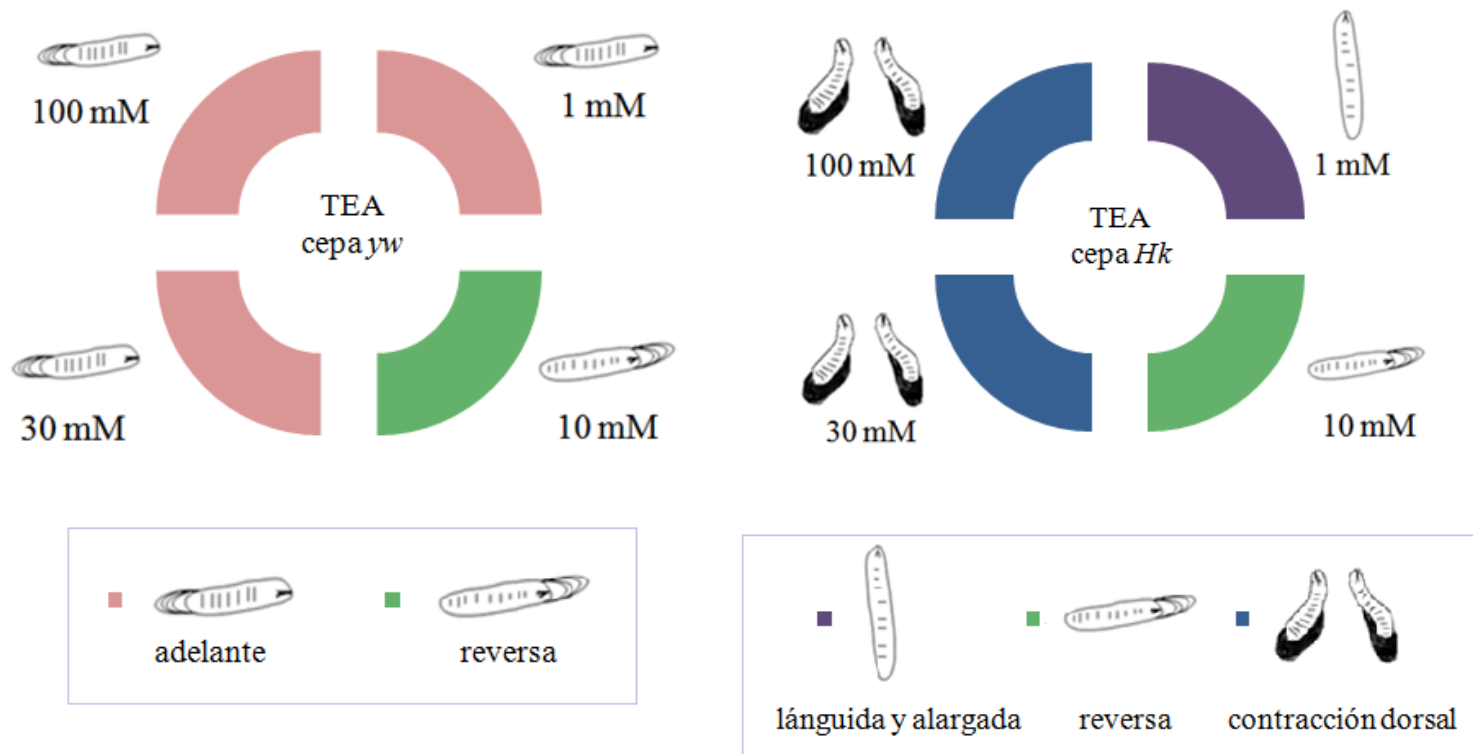
El efecto que tienen las toxinas de *Conus purpurascens* al inyectar su veneno es una actividad excitotóxica y también de inmovilización que ocurre en un lapso de 5 a 10 segundos y que facilita la captura de la presa. Por ello, aunado a los efectos vistos en la sobrevivencia y como información adicional se observó y detectó el comportamiento locomotor postinyección (10 segundos) de las larvas inyectadas con los diferentes tratamientos. Cabe señalar que las conductas motoras respecto a los tratamientos se observaron solamente en las larvas que durante el proceso de inyección se despegaron por si solas. Para identificar el patrón de locomoción de las larvas observado en este trabajo se utilizó como referencia la investigación de Clark *et al.*, 2016. Para los compuestos solución salina (Fig. 13), 4-Aminopiridina (Fig. 14) y Tetraetilamonio (Fig. 15) se observaron los siguientes movimientos: a) hacia adelante; b) hacia atrás; c) contracción dorsal; d) lánquida y alargada.



**Fig. 13** Representación del movimiento locomotor en larvas de tercer estadio de las cepas *yw* y *Hk*, expuestas a solución salina.



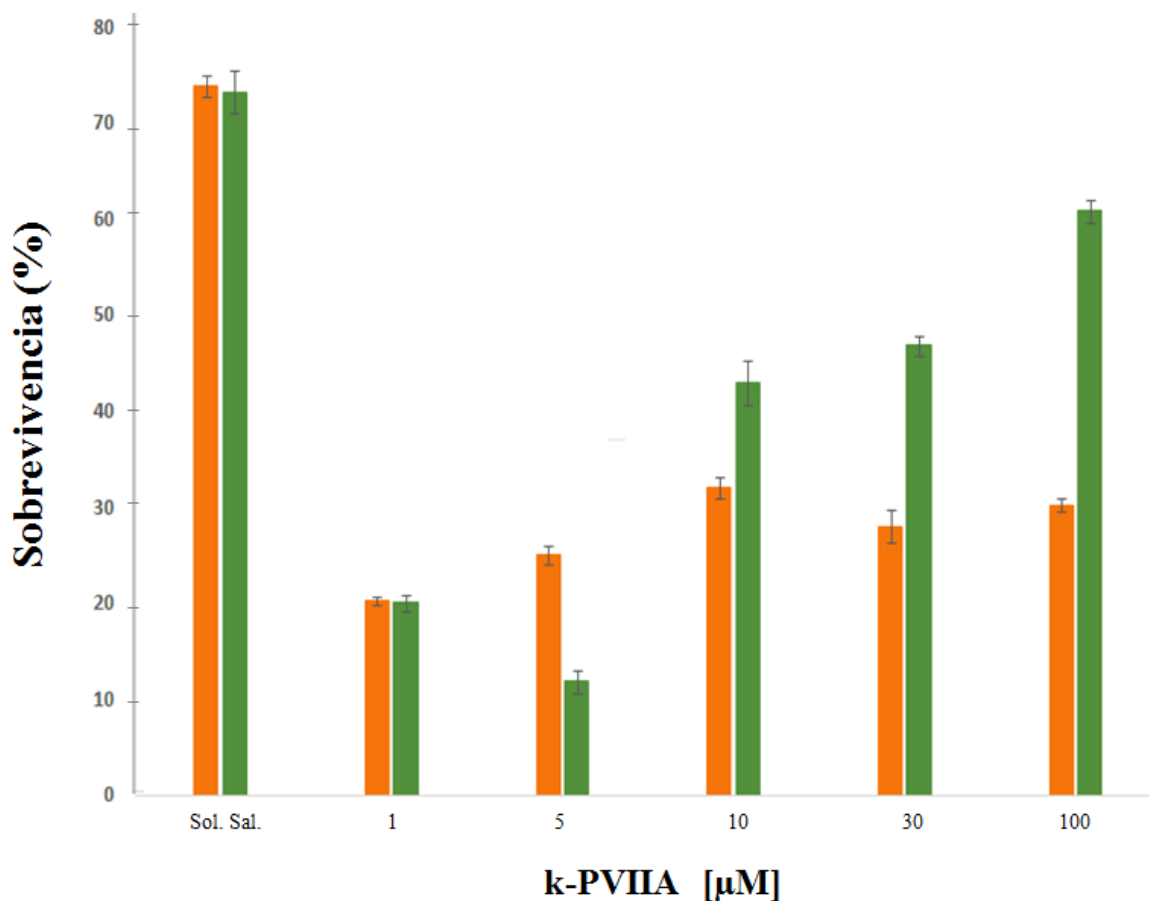
**Fig. 14** Representación del movimiento locomotor en larvas de tercer estadio de las cepas *yw* y *Hk*, expuestas a distintas concentraciones del compuesto 4-Aminopiridina.



**Fig. 15** Representación del movimiento locomotor en larvas de tercer estadio de las cepas *yw* y *Hk*, expuestas a distintas concentraciones del compuesto Tetraetilamonio.

## 7.2 Efecto de la kappa-conotoxina PVIIA sobre las cepas de *D. melanogaster*.

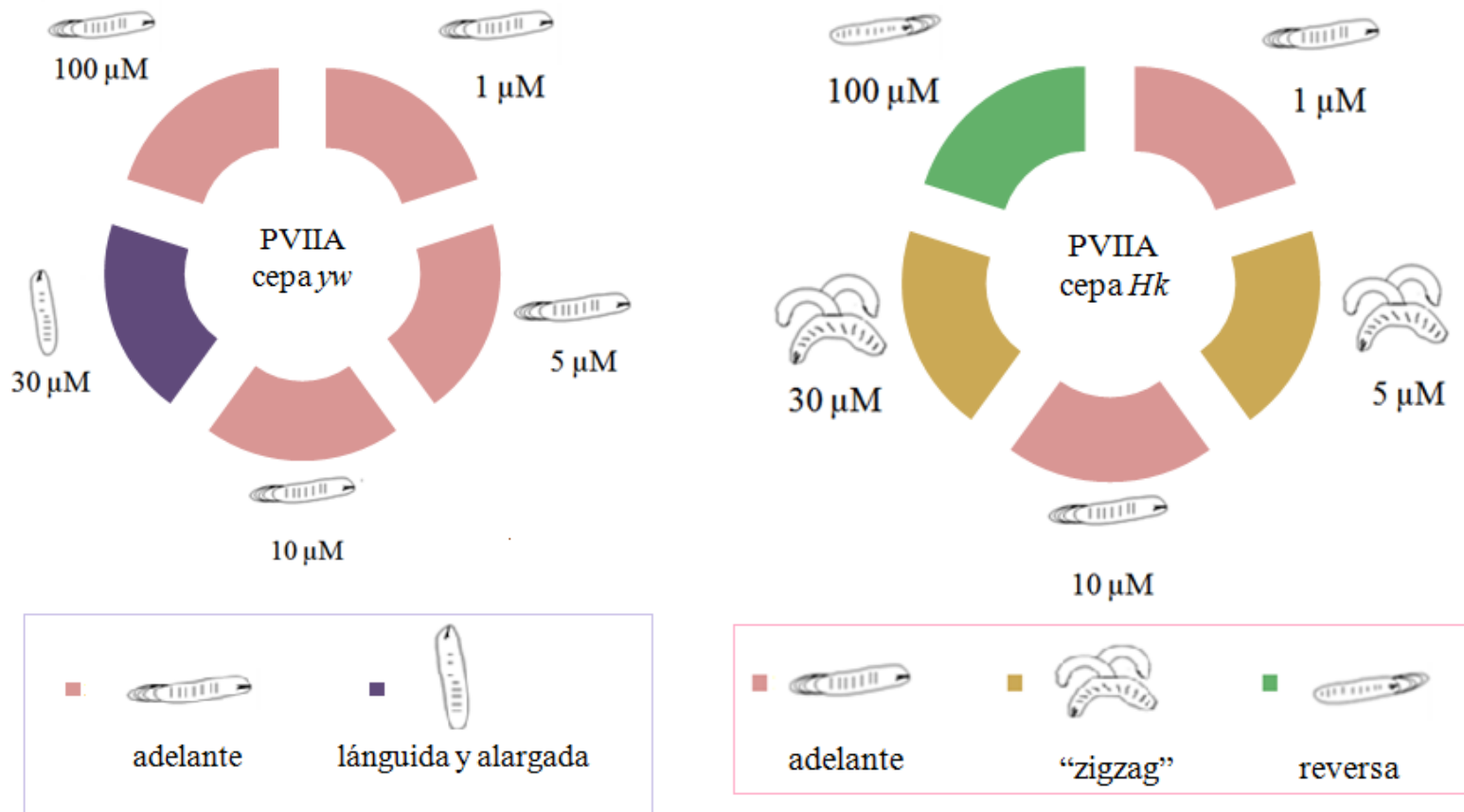
En la figura 16 se muestra la relación entre la sobrevivencia y las concentraciones (en  $\mu\text{M}$ ) de la kappa-conotoxina PVIIA para las cepas *yw* y *Hk*. Se observa que al aplicar la conotoxina a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  el porcentaje de sobrevivencia de la cepa *Hk* es bajo (> 20%); en tanto que para las concentraciones restantes, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  la tasa de sobrevivencia es más alta. Por su parte, la sobrevivencia de la cepa *yw* con relación a la conotoxina PVIIA se mantiene uniformemente baja en sus distintas concentraciones (~35%).



**Fig. 16** Sobrevivencia de las cepas *yw* (■) y *Hk* (■) inyectadas con diferentes concentraciones de la kappa-conotoxina PVIIA, cada punto representa el promedio de 5 ensayos independientes  $\pm$  E.E. k-PVIIA ( $F= 92.1$ ,  $p < 0.05$ ).

## Locomoción kappa-conotoxina PVIIA

Aunado a los efectos vistos por la kappa-conotoxina PVIIA en la sobrevivencia, durante la inyección se detectaron diferentes conductas motoras que se presentan como información adicional las cuales son los movimientos siguientes; a) hacia adelante, b) hacia atrás, c) contracción dorsal, d) región anterior en “zigzag” (Fig. 17). La característica de movimiento en zigzag de la región anterior de la larva se produjo en la cepa *Hk*, en las concentraciones 5  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ ; esto ocurrió mediante movimiento brusco y presuroso, con una duración de segundos ( $\pm 10$  s) seguido de un estado de poco movimiento. Por otra parte, el movimiento por contracción en dirección inversa se produjo en la concentración de 100  $\mu\text{M}$  para *Hk*, mientras que para *yw* se observó un estado lánguido y alargado en la concentración 30  $\mu\text{M}$ . Salvo esas excepciones, el comportamiento larval mantuvo en general un estado de desplazamiento hacia adelante.



**Fig. 17** Representación del movimiento larval de las cepas *yw* y *Hk* expuestas a distintas concentraciones de la kappa-conotoxina PVIIA.

---

## 8 DISCUSIÓN

---

Debido a que se busca optimizar la utilización del veneno de los caracoles Cono por la dificultad que implica muestrear un organismo y la poca cantidad de veneno que se extrae, Martínez-Hernández (2016), señala lo importante que es el uso de técnicas que permitan analizar las conotoxinas de manera rápida y sobre todo en cantidades y/o concentraciones pequeñas.

Con base a lo anterior, resultó de interés para el presente trabajo evaluar el efecto de la kappa-conotoxina PVIIA, inhibidor selectivo para canales de potasio tipo *Shaker* sobre la cepa *Hk*, una mutante en la cual está alterado el gen que codifica la subunidad beta del canal de potasio y en la cepa *yw* que no presenta mutaciones en canales de potasio (cepa testigo), ambas del modelo de *Drosophila melanogaster*. Para ratificar el efecto de la conotoxina se evaluó también el efecto respecto a dos compuestos no específicos (TEA y 4-AP) inhibidores de canales de potasio. Para ello, se realizó el conteo de organismos (moscas) que sobrevivieron, posterior a la inyección de los tratamientos.

En primer lugar, al comparar los resultados de la curva dosis-respuesta de la kappa-conotoxina PVIIA y del compuesto TEA se encontró un efecto similar en las concentraciones bajas (1, 10  $\mu$ M y 1, 10 Mm) donde la sobrevivencia fue del 45% y 30%, respectivamente. No obstante, se observó que la respuesta fue opuesta en las concentraciones consiguientes, mientras que *Hk* a concentraciones mayores de TEA disminuye su porcentaje de sobrevivencia (15%), con PVIIA a concentraciones mayores aumenta su porcentaje de sobrevivencia (60%). Por el contrario, en los resultados de la

curva-dosis respuesta del compuesto 4-AP, con los obtenidos de la kappa-conotoxina PVIIA, se observó que se mantuvo un comportamiento similar en la sobrevivencia en las distintas concentraciones para ambas cepas, como se ve en las figuras 12 y 16. Es de notar que, a medida que aumenta la concentración del 4-AP y PVIIA, la sobrevivencia de la cepa *Hk* también es mayor, contrario al efecto visto por el compuesto de TEA que a mayor concentración sobre la cepa *Hk* la sobrevivencia disminuye. Estos resultados pueden ser explicados con un hecho que acontece en la Toxicología y que es denominado “hormesis”. La hormesis es un suceso de respuesta característico, que está relacionado a la dosis y se basa en los siguientes supuestos: (1) los efectos de un compuesto a bajas dosis son opuestos a los efectos a altas dosis, lo cual tiene como resultado que las curvas dosis-respuesta sean bifásicas y se representan en las gráficas de dos maneras: en forma de “J” o como una “U” invertida (Calabrese *et al.*, 2007); y (2) existe una respuesta de estimulación para dosis bajas y una respuesta de inhibición para dosis altas (Rattan *et al.*, 2009; Calabrese *et al.*, 2011). Considerando lo anterior, el compuesto TEA se comporta bajo el supuesto 1, mientras que el compuesto 4-AP y la kappa-conotoxina PVIIA tendrían un efecto hormético bajo el supuesto 2, sobre la cepa *Hk*.

A manera de no solo de entender el efecto de hormesis por los compuestos antes mencionados, una explicación fisiológica de los resultados puede deberse a:

1) En el caso del tratamiento con TEA y la kappa-conotoxina PVIIA el efecto similar en la sobrevivencia a bajas concentraciones es debido a que comparten el mismo sitio de unión en la región del vestíbulo, ubicado en el lado extracelular del canal de potasio tipo *Shaker* (Armstrong, 1971; Shon *et al.*, 1998).



2) La baja tasa de sobrevivencia a los tratamientos por 4-AP y la kappa-conotoxina PVIIA observada en las concentraciones menores, puede explicarse a una sobre estimulación en los receptores de potasio tipo *Shaker*, y por otro lado, que al aumentar la concentración exista una mayor inhibición de éstos canales y por consiguiente se regula el paso de iones a condiciones “normales” y se ve reflejado en una mayor sobrevivencia.

La suposición anterior se apoya también tomando en consideración que a lo largo de los ensayos se observó y se registró muerte celular en el estadio de pupa la cual disminuyó a medida que acrecentó la concentración de la conotoxina (anexo III). Es posible que la muerte celular registrada por un efecto de toxicidad ocurriera mediante el proceso de muerte celular inducida debido a que se observó una disminución y compactación del volumen celular dentro del pupario. De acuerdo con Fernández y Bodega (2005), esa respuesta es característica de la muerte celular inducida. Así mismo, se le ha descrito como un tipo de muerte celular fisiológica que se encuentra regulada genéticamente y que además acontece con el fin de mejorar la función del organismo (Fernández y Bodega, 2005).

Si bien es cierto que el tratamiento con la conotoxina mostró una respuesta positiva con respecto a la sobrevivencia de la cepa *Hk* que parece responder mejor en comparación a la cepa *yw* debido a que sobreviven más organismos conforme aumenta la concentración de la toxina, no podemos definir lo anterior como un efecto “benéfico” definitivo. Se propone dar seguimiento a este tipo de investigación para precisar si los efectos horméticos por exposición a la kappa-conotoxina PVIIA o también por otras toxinas pueden tener consecuencia a largo plazo en el ciclo de vida completo del organismo.

En segunda instancia, diferentes estudios indican que el comportamiento es una característica muy importante en el desarrollo de la vida de un organismo, y podría explicar

si existe un vínculo de conexión entre un compuesto y una reacción a nivel molecular y fisiológico; como ejemplo se encuentra el trabajo realizado por Jansen *et al.*, (2014), donde el comportamiento locomotor de *Drosophila melanogaster* es un indicativo de la acción farmacológica de componentes derivados de plantas. De acuerdo con sus resultados, el tratamiento por exposición a extractos de la planta *Bacopa monnieri* aumentó la locomoción y mejoró la capacidad de ascensión de *D. melanogaster*. El mismo estudio encontró que los extractos de *B. monnieri* tienen gran potencial de actuar para mejorar la actividad de enzimas antioxidantes. Es por eso, que en el presente trabajo de tesis se dispuso registrar no solo el efecto en la sobrevivencia de las larvas sino también el comportamiento en la locomoción de las mismas al momento de la inyección, siendo un factor de gran utilidad para relacionar una actividad particular en el movimiento del organismo como respuesta a las distintas concentraciones inyectadas de los compuestos y la toxina a evaluar.

Basándose en lo anterior, cabe señalar que solamente en las concentraciones de 5 y 30  $\mu\text{M}$  de la conotoxina se observó un comportamiento locomotor brusco y presuroso en forma de zigzag en la región anterior de las larvas (Fig. 17). Se debe agregar la observación de que para la concentración 30 $\mu\text{M}$  sobrevivieron 234 organismos mientras que con 5 $\mu\text{M}$  sobrevivieron 59, ese resultado podría explicarse por el proceso de horméisis descrito anteriormente.

En la concentración de 10mM de 4-AP se observó un comportamiento de contracción dorsal en la cepa *Hk* y una postura lánguida y alargada en la cepa *yw* (Fig. 14). Con el compuesto TEA ambas cepas tuvieron un desplazamiento en dirección reversa a una concentración de 10 mM. La cepa *Hk* mostró además: contracción dorsal (30 y 100 mM),

postura lánguida y alargada (1mM) (Fig. 15). Estos comportamientos se asemejan a los obtenidos en un estudio realizado por Clark *et al.*, (2016) en el que de una forma similar realizan un monitoreo de distintos programas motores en larvas de *D. melanogaster* e indican que en cada comportamiento locomotor se involucran subconjuntos distintos de interneuronas que van a controlar los diferentes elementos implicados en el programa motor de las larvas. Señalan también que aun conociendo esa información es necesaria una exploración exhaustiva para caracterizar completamente los factores e interneuronas que intervienen en el proceso motor. En consonancia con la recomendación anterior, para la evaluación de toxinas se sugiere realizar un seguimiento de los efectos en la locomoción y examinar lo que sucede durante el ciclo de vida y hasta la etapa final del mismo para así determinar con más precisión lo siguiente: (1) si existe más de un comportamiento locomotor para una concentración particular; (2) la proporción de larvas que expresan los patrones de comportamiento; (3) si un comportamiento locomotor se encuentra relacionado directamente con algún tipo de muerte celular (necrosis, apoptosis).

Con respecto a los resultados obtenidos en este trabajo, se considera que el ensayo resultó ser propicio para relacionar un efecto en la sobrevivencia con un comportamiento a nivel locomotriz con base en la exposición de los compuestos 4-AP, TEA y la kappa-conotoxina PVIIA. Si bien, los resultados no muestran un movimiento de las larvas exclusivo para una concentración particular de la PVIIA, los compuestos 4-AP y TEA; no obstante, para futuras evaluaciones de toxinas (de las cuales no se conoce su blanco de acción o molecular) sobre la cepa *Hk* el registro de un comportamiento locomotor brusco y presuroso en forma de zigzag estaría indicando que la toxina en cuestión podría tener un efecto sobre canales tipo *Shaker*.

Finalmente, la técnica utilizada en este trabajo nos permitió evaluar y analizar los efectos producidos por diferentes compuestos en el periodo correspondiente al tercer estadio larval del ciclo de vida de *D. melanogaster*, durante el cual se observó el comportamiento locomotor de las larvas y posteriormente se cuantificó el porcentaje de sobrevivencia (moscas adultas) de *D. melanogaster*. De tal manera, que este trabajo puede ser empleado como método efectivo para evaluar a un menor costo y tiempo, toxinas de otros organismos con actividad sobre canales de potasio tipo *Shaker* con el fin de aprovechar al máximo el material biológico, sobre todo en casos en los cuales la obtención de toxinas es muy difícil y escasa.

---

## 9 CONCLUSIONES

---

- El ensayo por microinyección de conotoxinas específicas para canales de potasio tipo *Shaker* en *D. melanogaster* fue exitoso para una evaluación de conotoxinas rápida (*in vivo*).
- Se presentaron 5 tipos de comportamiento locomotor: hacia adelante, hacia atrás, contracción dorsal, región anterior “zigzag”, lánguida y alargada, en los diferentes tratamientos experimentales.
- El comportamiento locomotor brusco y presuroso en forma de zigzag en la cepa *Hk* pudiera ser indicativo de un efecto sobre canales de potasio tipo *Shaker*.
- Es conveniente considerar a la cepa Hiperkinetic (*Hk*) de *D. melanogaster* para evaluar conotoxinas con posible actividad sobre canales de potasio tipo *Shaker*.

---

## 10 REFERENCIAS

---

- ❖ Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2007. Molecular Biology of the Cell (Fifth ed.). Garland Science, New York.
- ❖ Alberts, B. y D. Bray. 2006. Introducción a la biología celular. Médica Panamericana. 2ª ed.
- ❖ Aldana, D. y E. Baqueiro. 1995. Los moluscos en México: estudio y aprovechamiento. Bol. Acad. Inv Cient. Nov-Dic. (27): 33-45.
- ❖ Arbeitman, M. N., Furlong, E. M., Imam, F., Johnson, E., Null, B. H., Baker, B. S., Krasnow, M. A., Scott, M. P., Davis, R. W., White, K. P. 2002. Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. Science, 297 (5590): 2270-2275.
- ❖ Armstrong, C. M. 1971. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. J. Gen. Physiol. 58(4):413-437.
- ❖ Armstrong, C. M. y L. Binstock. 1965. Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride. J. Gen. Physiol. 48: 859-872.
- ❖ Bergillos, G. F. y M. F. Rivas. 2013. Toxinología Clínica: Lesiones por picaduras y mordeduras de animales. Bubok Publishing S.L. Volumen 1.
- ❖ Bhakuni, D. S. y D. S. Rawat. 2005. Bioactive Marine Natural Products. A C.I.P. catalogue record for the book is available from the Library of Congress. Anamaya Publishers, New Delhi. India.
- ❖ Brusca, R. C. y G. J. Brusca. 2005. Invertebrados. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid.
- ❖ Butler, A., Wel, A. G., Baker, K., Salkoffil. 1989. A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. Science: 17; 243 (4893): 943-947
- ❖ Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J, *et al.*, 2007. Biological stress response terminology. Toxicol. Appl. Pharm. 222: 122-128.
- ❖ Calabrese, V., Cornelius, C., Dinkova-Kostova, A. T, *et al.*, 2011. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. Biochim. Biophys. Acta. 1822: 753-783.
- ❖ Calderón, C. R. y C. J Field. 1999. Envenenamiento por contacto con caracol *Conus*. Rev. Mex. Pue. Y Ped. Vol. 7: 2-4.

- ❖ Campos-Ortega, J. y V. Hartenstein. 2013. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer Science.
- ❖ Carrillo-Flores, E. 2014. Estudio funcional de los determinantes moleculares de la inactivación y la selectividad del poro de canales de K<sup>+</sup>. Tesis Doctoral. Ciencias Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 88 p.
- ❖ Chun, J., Baker, Baker, M., Kim, D., LeRoy, M., Toribo, P., Bingham, J. 2012. Cone snail milked venom dynamics-A quantitative study of *Conus puepurascens*. *Toxicon* 60: 83-94.
- ❖ Clark, M. Q., McCumsey, S. J., Lopez-Darwin, S., Heckscher, E. S y Doe. C. Q. 2016. Functional genetic screen to identify interneurons governing behaviorally distinct aspects of *Drosophila* larval motor programs. *G3* 6: 2023-2031.
- ❖ Dodson, P. y I. Forsythe. 2004. Presynaptic K<sup>+</sup> channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends Neurosci.* 4: 210-217.
- ❖ Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Mackinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science.* 280: 69-77.
- ❖ Dutertre, S., Jin, A. H., Vetter, I., Hamilton, B., Sunagar, K., Lavergne, V., Dutertre, V., Fry, B. G., Antunes, A., Venter, D. J., Alewood, P. F y Lewis, R. 2014. Evolution of separate predation-and defence- evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nat. Commun.* (5) 3521: 1-9.
- ❖ Favreau, P. y R. Stöcklin. 2009. Marine snail venoms: use and trends in receptor and channel neuropharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9: 594-601.
- ❖ Fedonkin, M. A. y B. M Waggoner, 1997. The Late Precambrian fossil *Kimberella* is a mollusk-like bilaterian organism. *Nature*, 388: 868-871.
- ❖ Fegan, D. y D. Andresen. 1997. *Conus geographus* envenomation. *Lancet* 349: 1672
- ❖ Felipe, A., Sole, L., Bielanska, J., Villalonga, N., Roura-Ferrer, M., Martínez-Mármol, R., Ferreres, J., Condom, Enric. 2007. Potassium Channels: Evaluating Alternative Cancer Therapies. *Adv. Gen. Mol. Cell. Ther.* 1: 20-29.
- ❖ Fernández, M. A. y G. Rivas. 2007. Niveles de organización en animales. Las prensas de ciencias. México, UNAM. Facultad de ciencias.
- ❖ Fernández, R. B. y G. P, Bodega. 2005. Biología celular. Editorial Síntesis. 1a ed.
- ❖ Garateix, A., Salceda, E., Aneiros, A., Soto, E. 2003. *Bunodosoma granulífera*: fuente

- de péptidos con acción sobre canales iónicos. *Avicennia* 16: 13-21.
- ❖ Gartner, L., Hiatt, J., Sturm, J. 2007. Temas clave: Biología celular e histología. Editorial Lippincott. 5a ed.
  - ❖ Glaessner, M. F. y M. Wade. 1966. The late Precambrian fossils from Ediacara, South Australia. *Palaeontology* 9: 599-628.
  - ❖ Glover, W. E. 1982. The aminopyridines. *Gen. Pharmacol.* 13, 259-285.
  - ❖ Goodman, A. D., Brown, T.R., Krupp, L.B., Schapiro, R.T., Schwid, S.R., Cohen, R., Marinucci, L.N., Blight, A.R. 2009. Sustained-release oral fampridine in multiple sclerosis: a randomized, double-blind. Controlled trial. *Lancet* 373, 732-738.
  - ❖ Halai, R. y D. J. Craik. 2009. Conotoxins: natural product drug leads. *Nat. Prod. Rep.* 26: 526-536.
  - ❖ Hickman, C. P., Roberts, S. L., Keen, S. L., Larson, A., I'Anson, H. y Einsenhour, D.J. 2008. *Integrated Principles of Zoology*. McGraw-Hill. Higher Education. 14<sup>th</sup> ed.
  - ❖ Hille, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA: Sinauer. 3<sup>a</sup> ed.
  - ❖ Honma, T. y K. Shiomi. 2006. Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects. *Mar. Biotechnol.* 8, 1-10.
  - ❖ Jansen, R. L. M., Brogan, B., Whitworth, A. J. y Okello, E. J. 2014. Effects of five ayurvedic herbs on locomotor behavior in a *Drosophila melanogaster* Parkinson's disease model. *Phytother. Res.* 28: 1789-1795.
  - ❖ Koch, E. D., Olivera, B. M., Terlau, H y Conti, F. 2004. The binding of  $\omega$ -Conotoxin PVIIA and fast C-type inactivation of *Shaker* K<sup>+</sup> channels are mutually exclusive. *Biophys. J.* 86: 191-209.
  - ❖ Kohn, A. J. 1956. Piscivorous gastropods of the genus *Conus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 42, 168-171.
  - ❖ Labro, A. J. y Snyders, D. J. Being flexible: the voltaje-controllable activation gate of Kv channels. 2012. *Frontiers in Pharmacology: Pharmacol. Ion. Channel. Channel.* 3: 1-12.
  - ❖ Landa, J. V., Michel, M. E., Castillo, S. G y Heimer de la Cotera, E.P. 2013. Los caracoles conos de Tenacatita, productores de venenos con potencial biomédico. *Elementos* 90. 41-48.
  - ❖ Lewis, R. J. 2009. Conotoxins: molecular and therapeutic targets. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 46, 45-65.



- ❖ Lindsley, L. D. y G. G. Zimm. 1992. *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, EE. UU. 4<sup>a</sup> ed.
- ❖ López-Vera, E. 2005. Actividad biológica de péptidos de caracoles de la Superfamilia Conoidea. Tesis Doctoral. Ciencias Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 83 p.
- ❖ López-Vera E. 2010. Los receptores nicotínicos de acetilcolina y las  $\alpha$ -conotoxinas. REB 29(01): 8-12. Vol. 29.
- ❖ Luján, R. 2010. Organisation of potassium channels on the neuronal surface. J. Chem. Neuroanat. 40, 1-20.
- ❖ Marshall, A. J y Williams, W. D. 1985. *Zoología de invertebrados*. Barcelona España. 7<sup>th</sup>ed.
- ❖ Martínez-Hernández, L. A. 2016. *Drosophila melanogaster* como modelo in vivo para evaluar conotoxinas con actividad antagónica sobre canales de potasio. Tesis de Maestría. Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 99 p.
- ❖ Mattei, C. y C. Legros. 2014. The voltage-gated sodium channel: A major target of marine neurotoxins. Toxicon 91: 84-95.
- ❖ Meier, J. y J. White. 1995. *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press Boca Raton.
- ❖ Mejia, M., Heghinian, M. D., Busch, A., Armishaw, C. J., Marí, F., Godenschwege, T. A. 2010. A novel approach for in vivo screening of toxins using the *Drosophila* giant fiber circuit. Toxicon 8: 1398-1407.
- ❖ Milne, T. J., Abbenante, G., Tyndall, J. D., Halliday, J y Lewis, R. J. 2003. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. J. Biol. Chem. 278: 31105-31110.
- ❖ Moore, J. 2006. *An Introduction to the Invertebrates*. Cambridge University Press. 2<sup>o</sup> ed.
- ❖ Naranjo, D. 2002. Inhibition of single *Shaker* K channels by k-conotoxin-PVIIA. Biophys. J 82: 3003-3011.
- ❖ Nelson, D. y M. Cox. 2009. *Lehninger: Principios de bioquímica*. Ediciones Omega. 5<sup>a</sup> ed.
- ❖ Norton, R. S. y B. M. Olivera. 2006. Conotoxins down under. Toxicon 48, 780-798.

- ❖ Olivera, B. M. 1997. *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol. Biol. Cell.* 8: 2101-9.
- ❖ Olivera, B. M. 2002. *Conus* venom peptides: reflections from the biology of clades and species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33: 25-47.
- ❖ Olivera B.M. 2006. *Conus* peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *J. Biol. Chem.* 281:31173-31177.
- ❖ Olivera, B. M., Corneli, P. S., Watkins, M y Fedosov, A. 2014. Biodiversity of cone snails and other venomous marine gastropods: evolutionary success through neuropharmacology. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2:487-513.
- ❖ Pandey, B. U. y C. D. Nichols. 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev.* 63: 411-436.
- ❖ Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N y Jan, L. Y. 1991. Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349: 305-310.
- ❖ Paredes, C., Cardoso, F., Altamirano, K., Baltazar, P., Romer, L. 2010. La familia Conidae en el mar peruano. The family Conidae from Peruvian Sea. *Rev. Peru. Biol.* 17 (1): 65-73.
- ❖ Petitpierre, E. 1997. *Drosophila* y otros insectos en la investigación genética. *Biol. S.E.A.* 20: 401-403.
- ❖ Puillandre, N., Dura, T. F., Meyer, C., Olivera, B. M y Bouchet, P. 2015. One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails. *J. Mollus. Stud.* 81:1-23.
- ❖ Rattan, S. I., Fernandes, R. A., Demirovic, D., Dymek, B y Lima, C. F. 2009. Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: effects on aging, wound healing, angiogenesis, and differentiation. *Dose-Response* 7: 90-103.
- ❖ Repetto, J. M. y G. K. Repetto. 2009. *Toxicología Fundamental*. 4ta Edición. Editorial Diaz De Santos.
- ❖ Rodríguez-Arnaiz, R. 2003. *Drosophila* como organismo modelo en la biología experimental. En: Jiménez L. F. y H. Merchant. *Biología Celular y Molecular*. Editorial Prentice Hall. México. capítulo 25.

- ❖ Savarin, P., Guenneugues, M., Gilquin, B., Lamthanh, H., Gasparini, S., Zinn-Justin, S. y Ménez, A. 1998. Three-dimensional structure of k-conotoxin PVIIA, a novel potassium channel-blocking toxin from cone snails. *Biochem.* 37: 5407-5416.
- ❖ Scanlon, M. J., Naranjo, D., Thomas, L., Alewood, P. F., Lewis, R. J y Craik, D. J. 1997. Solution structure and proposed binding mechanism of novel potassium channel toxin k-conotoxin PVIIA. *Structure.* 5: 1585-1597.
- ❖ Scarlato, E. 2007. Toxicología. La ciencia de las flechas. *Bol. Asoc. Toxicológica Argentina* 21, 77.
- ❖ Schafer, E. W., Brunton, R. B y Cunningham, D. J. 1973. A summary of the acute toxicity of 4-aminopyridine to birds and mammals. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 26: 532-538.
- ❖ Schulte, U., Thumfart, J., Klocker, N., Sailer, C., Bildl, W., Biniossek, M., Dehn, D., Deller, T., Eble, S., Abbass, K., Wangler, T., Knaus, H y Fakler, B. 2006. The epilepsy-linked *Lgi1* protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kv beta 1. *Neuron* 49: 697-706.
- ❖ Shon, K. J., Stocker, M., Terlau, H., Stühmer, W., Jacobsen, R., Walker, C., Grilley, M., Watkins, M., Hillyard, D. R., Gray. W. R y Olivera, B. M. 1998. k-Conotoxin PVIIA is a peptide inhibiting the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. *Biol. Chem.* 273: 33-38.
- ❖ Silbergeld, E. K. 2001. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Capítulo 33. Toxicología. Herramientas y enfoques.
- ❖ Silverthorn, D. E. 2008. Fisiología humana: un enfoque integrado. Médica Panamericana. 4<sup>a</sup> ed
- ❖ Southcott, R.V. 1979. Marine Toxins. In: Handbook of Clinical Neurology. Vinken P.J. y G.W: Brown (Eds). Elsevier/North-Holland. Publishing. Company. Germany.
- ❖ Solis, H., López-Hernández, E., Cortés-Gasca, D. 2008. La excitabilidad neuronal y los canales de potasio. *Arch. Neurocién (Mex)* Vol. 13 N°. 3: 195-200.
- ❖ Terlau, H., Shon, K., Grilley, M., Stocker, M., Stühmer, W., Olivera, B.M. 1996. Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting cone snail. *Nature.* 381: 148-151.
- ❖ Terlau, H y B. M Olivera. 2004. *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* 84:41-68.

- ❖ Tian, C., Zhu, R., Zhu, L., Qiu, T., Cao, Z. y Kang, T. 2014. Potassium channels: structures, diseases, and modulators. *Chem. Biol. Drug. Des.* 83 (1): 1-26.
- ❖ Timbrell, J. 2002. *Introduction to toxicology*. USA, CRC press.
- ❖ Valencia, R., Abrahamson, S., Lee, W. R., Von Halle, E.S., Woodruff, R.C., Würigler, F.E y Zimmering, S. 1984. Chromodome mutation test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Toxy program. *Mutat Res.* 134: 61- 88.
- ❖ Valía-Vera, J. C., Villanueva, V. L., Asensio-Samper, J. M., López- Alarcón, M. D., de Andrés, J. A. 2007. Ziconotide una alternativa innovadora en el dolor crónico neuropático intenso. *Rev. Neurol.* 45: 665-669.
- ❖ Wang, J. W. y C. F. Wu. 1996. In vivo functional role of the *Drosophila Hyperkinetic*  $\beta$  subunit in gating and inactivation of *Shaker*  $K^+$  channels. *Biophys. J.* 71: 3167-3176.
- ❖ Wang, J. W., Soll, D. R. y C. F Wu. 2002. Morphometric description of the wandering behavior in *Drosophila* larvae: a phenotypic analysis of  $K^+$  channel mutants. *J. Neurogenet.* 16: 45-63.
- ❖ Wheeler, M. R. 1981. *Drosophilidae*. Manual of Nearctic Diptera. Research Branch Agricultural Canada. Cap. 95. 1(27):1011-1018.
- ❖ Xie, B., Huang, Y., Baumann, K., Fry, B. G y Shi, Q. 2017. From marine venoms to drugs: Efficiently supported by a combination of transcriptomics and proteomics. *Mar. Drugs.* 15 (4): 103-112
- ❖ Yao, W. D y C. F. Wu. 1999. Auxiliary Hyperkinetic beta subunit of  $K^+$  channels: regulation of firing properties and  $K^+$  currents in *Drosophila* neurons. *J Neurophysiol* 81, 2472-84.

## REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.

- ❖ ConoServer, 2017. <http://www.conoserver.org/>
- ❖ FlyMove, 2017. <http://flymove.uni-muenster.de/>
- ❖ FlyBase, 2017. <http://flybase.org/>
- ❖ International Society on Toxinology, 2016. <http://toxinology.org/index.htm>
- ❖ Ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad, 2017.  
<https://www.msssi.gob.es/>

# 11 ANEXOS

## ANEXO I. Pruebas de ANOVA factorial

Univariate Tests of Significance for Sobrevivencia [4-AP] Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	64225.28	1	64225.28	3348.555	0.000000
Cepa	1613.12	1	1613.12	84.104	0.000000
Concentración	20245.92	4	5061.48	263.894	0.000000
Cepa*Concentración	3280.48	4	820.12	42.759	0.000000
Error	767.2	40	19.18		

Univariate Tests of Significance for Sobrevivencia [TEA] Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	56112.5	1	56112.5	2168.18	0.000000
Cepa	19.22	1	19.22	0.743	0.393948
Concentración	20608.4	4	5152.1	199.077	0.000000
Cepa*Concentración	5847.68	4	1461.92	56.488	0.000000
Error	1035.2	40	25.88		

Univariate Tests of Significance for Sobrevivencia [compuestos comerciales]					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	120200.9	1	120200.9	5335.148	0.000000
Cepa*Concentración	646.1	4	161.5	7.169	0.000055
Cepa^Compuesto	640.1	1	640.1	28.411	0.000001
Concentración^Compuesto	1757.5	4	439.4	19.501	0.000000
Cepa*Concentración^Compuesto	8482.1	4	2120.5	94.12	0.000000
Error	1802.4	80	22.5		

Univariate Tests of Significance for Sobrevivencia [k-PVIA]					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	90016.27	1	90016.27	13519.34	0.000000
Cepa	897.07	1	897.07	134.73	0.000000
Concentración	20184.53	5	4036.91	606.29	0.000000
Cepa*Concentración	3066.53	5	613.31	92.11	0.000000
Error	319.6	48	6.66		

**ANEXO II. Prueba Post-hoc HSD-Tukey (Diferencia Honestamente Significativa de Tukey). Las diferencias significativas se indican en rojo.**

Tukey HSD test; variable Sobrevivencia (4-AP) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 19.180, df = 40.000												
Cell No.	Cepa	Concentración	{1} 73.800	{2} 14.400	{3} 25.600	{4} 15.600	{5} 21.400	{6} 73.200	{7} 21.000	{8} 16.400	{9} 41.800	{10} 55.200
1	yw	Sol.Sal-0.9%		0.000158	0.000158	0.000158	0.000158	1.000000	0.000158	0.000158	0.000158	0.000159
2	yw	1mM	0.000158		0.007967	0.999989	0.285613	0.000158	0.362534	0.999223	0.000158	0.000158
3	yw	10mM	0.000158	0.007967		0.025747	0.877648	0.000158	0.809941	0.053409	0.000181	0.000158
4	yw	30mM	0.000158	0.999989	0.025747		0.542141	0.000158	0.637017	1.000000	0.000158	0.000158
5	yw	100mM	0.000158	0.285613	0.877648	0.542141		0.000158	1.000000	0.728177	0.000158	0.000158
6	hk	Sol.Sal-0.9%	1.000000	0.000158	0.000158	0.000158	0.000158		0.000158	0.000158	0.000158	0.000160
7	hk	1mM	0.000158	0.362534	0.809941	0.637017	1.000000	0.000158		0.809941	0.000158	0.000158
8	hk	10mM	0.000158	0.999223	0.053409	1.000000	0.728177	0.000158	0.809941		0.000158	0.000158
9	hk	30mM	0.000158	0.000158	0.000181	0.000158	0.000158	0.000158	0.000158	0.000158		0.000873
10	hk	100mM	0.000159	0.000158	0.000158	0.000158	0.000158	0.000160	0.000158	0.000158	0.000873	

Tukey HSD test; variable sobrevivencia (TEA) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 25.880, df = 40.000												
Cell No.	cepa	concentracion	{1} 73.800	{2} 16.200	{3} 10.200	{4} 28.200	{5} 36.000	{6} 73.200	{7} 32.200	{8} 44.200	{9} 5.8000	{10} 15.200
1	yw	Sol.Sal-0.9%		0.000158	0.000158	0.000158	0.000158	1.000000	0.000158	0.000158	0.000158	0.000158
2	yw	1mM	0.000158		0.691337	0.018798	0.000165	0.000158	0.000620	0.000158	0.066144	0.999999
3	yw	10mM	0.000158	0.691337		0.000215	0.000158	0.000158	0.000158	0.000158	0.930022	0.861524
4	yw	30mM	0.000158	0.018798	0.000215		0.339364	0.000158	0.960274	0.000620	0.000158	0.008036
5	yw	100mM	0.000158	0.000165	0.000158	0.339364		0.000158	0.971230	0.275160	0.000158	0.000160
6	hk	Sol.Sal-0.9%	1.000000	0.000158	0.000158	0.000158	0.000158		0.000158	0.000158	0.000158	0.000158
7	hk	1mM	0.000158	0.000620	0.000158	0.960274	0.971230	0.000158		0.018798	0.000158	0.000323
8	hk	10mM	0.000158	0.000158	0.000158	0.000620	0.275160	0.000158	0.018798		0.000158	0.000158
9	hk	30mM	0.000158	0.066144	0.930022	0.000158	0.000158	0.000158	0.000158	0.000158		0.133160
10	hk	100mM	0.000158	0.999999	0.861524	0.008036	0.000160	0.000158	0.000323	0.000158	0.133160	

Tukey HSD test; variable sobrevivencia (k-PVIIA ) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 6.661, df = 48.000														
Cell No.	cepa	concentración	{1} 73.800	{2} 20.200	{3} 25.000	{4} 32.000	{5} 28.000	{6} 30.200	{7} 73.200	{8} 20.000	{9} 12.000	{10} 42.400	{11} 46.800	{12} 60.800
1	yw	Sol. Sal 0.9%		0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	1.000000	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.000127
2	yw	1 µM	0.000126		0.347250	0.000131	0.007679	0.000289	0.000126	1.000000	0.004118	0.000126	0.000126	0.000126
3	yw	5 µM	0.000126	0.347250		0.025453	0.907508	0.238565	0.000126	0.289794	0.000127	0.000126	0.000126	0.000126
4	yw	10 µM	0.000126	0.000131	0.025453		0.619699	0.998150	0.000126	0.000129	0.000126	0.000202	0.000126	0.000126
5	yw	30 µM	0.000126	0.007679	0.907508	0.619699		0.989721	0.000126	0.005627	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126
6	yw	100 µM	0.000126	0.000289	0.238565	0.998150	0.989721		0.000126	0.000238	0.000126	0.000128	0.000126	0.000126
7	hk	Sol. Sal 0.9%	1.000000	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126		0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.000127
8	hk	1 µM	0.000126	1.000000	0.289794	0.000129	0.005627	0.000238	0.000126		0.005627	0.000126	0.000126	0.000126
9	hk	5 µM	0.000126	0.004118	0.000127	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.005627		0.000126	0.000126	0.000126
10	hk	10 µM	0.000126	0.000126	0.000126	0.000202	0.000126	0.000128	0.000126	0.000126	0.000126		0.478065	0.000126
11	hk	30 µM	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.478065		0.000126
12	hk	100 µM	0.000127	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	0.000127	0.000126	0.000126	0.000126	0.000126	



**ANEXO III. Organismos de *D. melanogaster* que presentaron muerte celular en el estadio de pupa.**

**Tabla 3.** Sumatoria del número de organismos que presentaron muerte celular en el estadio de pupa.

	<i>yw</i>	<i>Hk</i>
compuesto	Muerte celular en pupa	Muerte celular en pupa
<b>Sol. Sal</b>	40	48
<b>4-AP</b>		
1 mM	45	268
10 mM	79	270
30 mM	48	197
100 mM	38	178
<b>TEA</b>		
1 mM	44	239
10 mM	45	209
30 mM	13	377
100 mM	48	205
<b>PVIA</b>		
1 $\mu$ M	46	252
5 $\mu$ M	58	304
10 $\mu$ M	42	203
30 $\mu$ M	39	198
100 $\mu$ M	45	174