



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**MODULACIÓN DE CANALES DE POTASIO KCNQ, POR LAS TOXINAS DEL
CARACOL MARINO DEL GÉNERO *Conus***

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
BRENDA ELIZABETH TERRAZAS TORRES

TUTOR PRINCIPAL:
DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM (CU)

COMITÉ TUTOR:
DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM (PUERTO MORELOS)
DRA. ROSALBA ALONSO RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM (MAZATLÁN)
DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM (JURIQUILLA)
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM (CU)

CD. MX., SEPTIEMBRE, 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.



**“MODULACIÓN DE CANALES DE POTASIO KCNQ, POR LAS TOXINAS DEL
CARACOL MARINO DEL GÉNERO *Conus*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIÓL. BRENDA ELIZABETH TERRAZAS TORRES

TUTOR PRINCIPAL:
DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM (CU)

COMITÉ TUTOR:
DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
ICMyL-UNAM (PUERTO MORELOS)
DRA. ROSALBA ALONSO RODRÍGUEZ
ICMyL-UNAM (MAZATLÁN)
DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA-UNAM (JURIQUILLA)
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA-UNAM (CU)

MÉXICO, CDMX, SEPTIEMBRE, 2018.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por apoyar mis estudios mediante una beca con número CVU 699546.

Al Dr. Estuardo López Vera, por su apoyo académico, por su tiempo y dedicación a esta tesis en el laboratorio de Toxinología Marina.

A las Dras. Judith Sánchez Rodríguez, Rosalba Alonso Rodríguez, así como los Dres. Manuel Benigno Aguilar Ramírez y Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros, por formar parte del Comité Tutorial que supervisó el desarrollo de este trabajo de tesis, por las sugerencias y correcciones al manuscrito.

En especial quiero reconocer la colaboración y apoyo conceptual y técnico provisto por los Dres. Manuel Benigno Aguilar Ramírez, Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros y Lourival Possani.

Al jurado que forma parte del examen: el Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros como Presidente, el Dr. José Estuardo López Vera como Secretario, el Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez como Vocal, y como suplentes a las Dras. Judith Sánchez Rodríguez y Rosalba Alonso Rodríguez.

También deseo agradecer a las siguientes personas por el apoyo brindado:

-A la Dra. Mónica Anabel Ortiz Arellano por la recolección e identificación de los caracoles marinos utilizados.

-Al Dr. Baldomero Olivera, investigador de la Universidad de Utah por facilitarnos el material genético utilizado en este proyecto.

-Al Dr. Adolfo Gracia y la Dra. Ana Rosa Vázquez por permitirme participar en el Crucero Oceanográfico, COBERPES 8, una experiencia maravillosa.

-A la Dra. Elisa Carrillo Flores que gracias a su experiencia y conocimiento me ayudó a sacar adelante este proyecto.

-Al personal de la Coordinación de Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología: Diana Juárez Bustos, Guadalupe Godoy Medina, Chantal Ruíz Guerrero, Gabriela Almaraz Mejía y Yazmín Valenzuela Velázquez, por el apoyo brindado en la entrega y recepción de documentos.

DEDICATORIA PERSONAL

A los amigos que conocí durante el Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología Dra. Elisa Carrillo, Dra. Ximena Rodríguez, M. en C. Minerva Reynoso, Lic. Haydee Barrón Morales, Dra. Elba Campos, Dr. Luis Martínez, Dra. Angélica Ruelas, con los que compartí alegría, comidas, fiestas y sin razones, determinantes para mantener la coherencia o incoherencia todo el tiempo.

A mi hermoso y maravilloso esposo Ricardo Hernández Maldonado por ser como es, por siempre estar a, y de mi lado. Tu existencia enriquece la mía

A los mejores padres del mundo la Dra. Ma. Elena Torres y el M. en C. Ángel Terrazas, a los que agradezco todo, mis modelos a seguir y sobre todo, porque sin su material genético nunca lo hubiera logrado.

RRTT, sonrío porque eres mi hermano, río porque no hay nada que puedas hacer para evitarlo.

A mi familia, la única institución que sé que funciona.

A todos mis amigos, estamos locos, ahí seguiremos y nunca nos dejaremos, ya saben demasiado.

A todos aquellos animales que han dado su vida, sin su consentimiento, para que la ciencia siga a flote.

“Vencedores seremos, porque somos titanes. ¡Quién ha puesto al huracán jamás ni yugos ni trabas, ni quién al rayo detuvo prisionero en una jaula! Que mi voz suba a los montes y baje a la tierra y truene, eso pide mi garganta desde ahora y desde siempre. Si me muero que me muera con la cabeza muy alta.”

CONTENIDO

CONTENIDO	vi
Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas	viii
Índice de Anexos	viii
Abreviaturas	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
Moluscos.....	1
Clase Gastrópoda.....	3
Conotoxinas.....	9
Síntesis del veneno.....	10
Clasificación de las conotoxinas.....	12
Señales eléctricas: Potencial de acción.....	17
Canales iónicos.....	18
Canales de potasio (K+).	20
JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA.....	30
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVOS.....	32
General	32
Particulares.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
Propagación de los cDNA KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 y KCNQ5.....	33
Registros electrofisiológicos para evaluar el veneno fraccionado y/o purificado.	37
Caracterización bioquímica	37
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	59
Perspectivas	59
REFERENCIAS	60
Anexos.....	64

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de las estructuras internas de los gasterópodos	1
Figura 2. Esquema que muestra una sección vertical de la concha y el manto	2
Figura 3. Representación esquemática de la concha de un gasterópodo.....	3
Figura 4. Clasificación de la familia Conidae	4
Figura 5. Diversidad de <i>Conus</i>	5
Figura 6. Esquema del aparato venenoso de <i>Conus</i>	7
Figura 7. <i>Conus fergusonii</i> : a) mapa de distribución geográfica, y b) fotografía de la concha del caracol	8
Figura 8. <i>Conus spurius</i> : a) mapa de distribución geográfica, y b) fotografía de la concha del caracol	9
Figura 9. Esquema del proceso de maduración de un conopéptido.	11
Figura 10. Nomenclatura de conotoxinas, basado en el sistema NC-IUPHAC.	16
Figura 11. Fases del potencial de acción en los canales dependientes de voltaje.....	18
Figura 12. Regulación de canales iónicos	19
Figura 13. Representación de las relaciones de aminoácidos en la región del Filtro de Selectividad (FS) de la superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje	21
Figura 14. Enfermedades relacionadas con los canales de potasio	22
Figura 15. Distribución de las subunidades de Kv7 en los diferentes tejidos corporales	23
Figura 16. Esquema general de los canales de la familia KCNQ	25
Figura 17. Cristalografía de un canal Kv.....	26
Figura 18. Esquema del ciclo de compuertas o "gating"	27
Figura 19. Topología de los canales Kv	28
Figura 20. Esquema del mecanismo de transporte en "una sola fila"	29
Figura 21. Registro de KCNQ1	41
Figura 22. Registro de KCNQ2	41
Figura 23. Registro de KCNQ3	42
Figura 24. Registro de KCNQ5	42
Figura 25. Registro de KCNQ2/3	42
Figura 26. Perfil cromatográfico del veneno de <i>Conus fergusonii</i>	43
Figura 27. Inhibición de la corriente KCNQ2 al administrar 2 µg de F8	44
Figura 28. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la F8 del veneno de <i>Conus fergusonii</i>	45
Figura 29. Perfil cromatográfico del veneno de <i>C. spurius</i>	46
Figura 30. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F2 del veneno de <i>C. spurius</i>	47
Figura 31. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F6 del veneno de <i>C. spurius</i>	47
Figura 32. Inhibición de KCNQ2/3 por F2-21	48
Figura 33. Inhibición de KCNQ2/3 por F6-T6.....	48
Figura 34. Perfil cromatográfico de otro lote de veneno de <i>C. spurius</i>	49
Figura 35. Activación de KCNQ2/3 por C2L3.....	49
Figura 36. Espectro de masas de la subfracción F2-21	51
Figura 37. Espectro de masas de la subfracción F6-T6	51
Figura 38. Espectro de masas de la subfracción C2L3.....	52
Figura 39. Estructura primaria de conorfamida-Sr1 y conorfamida-Sr2 en comparación con F2-21.....	57

Índice de Tablas

Tabla 1. Superfamilias genéticas de las conotoxinas	12
Tabla 2. Clasificación de las conotoxinas	13
Tabla 3. Familias farmacológicas.	15
Tabla 4. Familias genéticas de KCNQ.	24
Tabla 5. Gradiente lineal utilizado	35
Tabla 6. Porcentaje de identidad de los diferentes subtipos de KCNQ1, KCNQ2 y KCNQ3. ..	40
Tabla 7. Concentración de las subfracciones que presentaron actividad en KCNQ2/3.	50
Tabla 8. Masa experimental obtenida para los componentes purificados.....	50
Tabla 9. Alineamiento de secuencias obtenido a través de BLAST	57

Índice de Anexos

Anexo 1. Medios de cultivo	64
Anexo 2. Diluciones para sembrar en cajas Petri	64
Anexo 3. Enzimas de restricción y promotores usados en los diferentes plásmidos.....	64
Anexo 4. Secuencia de nucleótidos obtenida tras la secuenciación. ¡Error! Marcador no definido.	
Anexo 5. Resultado de la degradación de Edman para la subfracción F2-21.	66

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
bp	Pares de bases
BrEt	Bromuro de etidio
Ca ²⁺	Ión calcio
Cys	Cisteína
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (siglas en inglés de: <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
cDNA	DNA complementario
<i>Gating</i>	En electrofisiología se refiere a la apertura (activación) o cierre (desactivación o inactivación) de las compuertas de los canales iónicos.
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
m	Metros
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µmol	Micromoles
ml	Mililitros
mm	Milímetros
ms	Milisegundo
nA	Nanoamperio
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nt	Nucleótidos
K ⁺	Ión potasio
RNA	Ácido Ribonucleico (siglas en inglés de: <i>Ribonucleic acid</i>)
nAChR	Receptor nicotínico de Acetilcolina
cRNA	RNA complementario, transcripto sintético de una molécula o fragmento de DNA específico, realizado por una técnica de transcripción <i>in vitro</i> .
mRNA	RNA mensajero
Na ⁺	Ión sodio
TEA	Tetraetilamonio
U/µl	Unidades por microlitro: Es definido como la cantidad de enzima que libera 1 µg o µmol de producto por µl de reacción.

RESUMEN

El veneno de los conos marinos (caracoles del género *Conus* que comprende alrededor de 700 especies), se compone por diversos péptidos de pequeño tamaño que difieren en su estructura y función, son generalmente llamadas conotoxinas. Cada organismo es capaz de expresar hasta 100 diferentes conotoxinas, que tienen acción sobre diferentes blancos moleculares como son: receptores acoplados a proteínas G, como transportadores, receptores para neurotransmisores y algunos tienen actividad enzimática, pero una abrumadora mayoría están dirigidos selectivamente a un canal iónico. Durante este trabajo nos enfocamos en aquellas toxinas específicas para canales de potasio, que son un grupo muy diverso de proteínas y elementos clave para una variedad de diferentes funciones fisiológicas.

Se estudiaron dos especies de caracoles vermívoras, *Conus fergusonii* y *Conus spurius*, de esta última sólo se encontró actividad en el canal de potasio dependiente de voltaje KCNQ2/3 por dos fracciones F2-21 y F6-T6 (y su análogo C2L3), obtenidas por cromatografía líquida. A F2-21 inhibió 23% con 2 µg del componente, mientras que C2L3 activó el canal 48% con 2 µg.

Únicamente se obtuvo la estructura primaria del compuesto F2-21, un péptido de 12 residuos de aminoácido arreglados de la siguiente manera: GPM γ PRFYFIRL, donde γ representa una modificación post-traducciona de la gamma-carboxilación del glutamato y por la similitud de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal podría agruparse dentro de las conorfamidas.

ABSTRACT

The venom of the cone snail (snails of the genus *Conus*, comprising about 700 species), is composed of several small peptides that differ in their structure and function, they are generally called conotoxins. Each organism is capable of expressing up to 100 different conotoxins, which have action on different molecular targets such as: receptors coupled to G proteins, as trans-terminators, receptors for neurotransmitters and some have enzymatic activity, but an overwhelming majority are selectively directed to an ion channels. During this work we focused on those specific toxins for potassium channels, which are a very diverse group of proteins and key elements for a variety of different physiological functions.

Two species of vermivorous snails, *Conus fergusonii* and *Conus spurius* were studied, of this last one was only activity in the voltage-dependent potassium channel KCNQ2/3 by two fractions F2-21 and F6-T6 (and its analog C2L3), and obtained by liquid chromatography. A F2-21 inhibited 23% with 2 μ g of the component, whereas C2L3 activated the 48% channel with 2 μ g.

Only the primary structure of compound F2-21 could be obtain; it is a peptide of 12 amino acid residues arranged as follows: GPM γ PRFYFIRL, where γ represents a post-translational modification of gamma-carboxylation of glutamate and by the amino acid similarity in the carboxyl terminal end could be grouped within the conorfamides.

INTRODUCCIÓN

Moluscos

En el Reino Animal, dentro del grupo de los invertebrados se encuentra el Phylum Mollusca. Es el segundo filo más grande en cuanto a número de organismos se refiere. Se estima hay más de 100,000 especies clasificadas en ocho clases, cientos de familias y miles de géneros [1].

Estos organismos se caracterizan por ser animales celomados, de cuerpo suave, comúnmente bilaterales aunque algunos presentan una condición asimétrica. Las dos características únicas del filo son: el manto y la rádula. El manto es el tegumento encargado de segregar placas, conchas o espículas calcáreas (CaCO_3) (Figura 1 y Figura 2). La rádula, es un órgano de naturaleza quitinosa, a manera de dientes que forma parte del aparato digestivo, y es utilizado para su alimentación (Figura 1) [1].

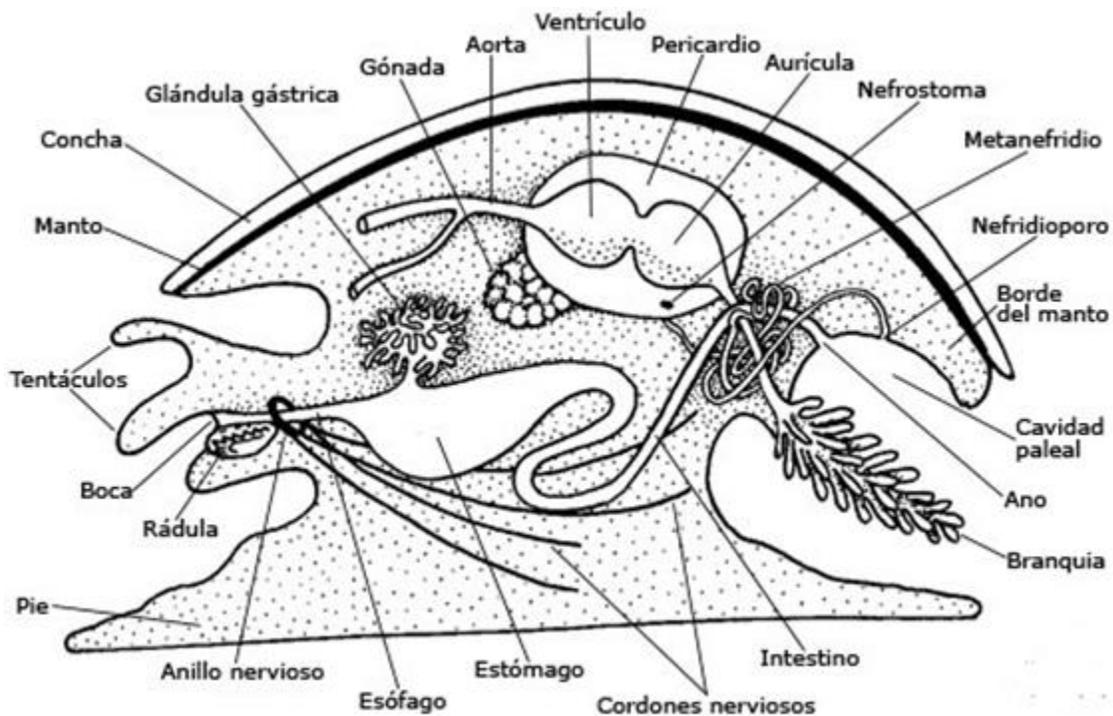


Figura 1. Esquema de las estructuras internas de los gasterópodos [2].

La concha de los moluscos, cuando la hay, es segregada por el manto y está limitada por él. Típicamente tiene tres capas. El periostraco es la capa externa, de aspecto córneo, constituida por una sustancia orgánica llamada conquiolina, esta capa aparece muchas veces desgastada sobre las partes más viejas de la concha. La capa media, o capa prismática, se compone de prismas de carbonato de calcio (tanto de calcita como de aragonita, ambos con la fórmula química CaCO_3 , pero diferente estructura cristalina, por lo que la calcita es más estable) densamente empaquetados y depositados en una matriz proteínica. Finalmente la capa nacarada de la concha que es la más interna, donde el nácar calcáreo se deposita en capas finas y onduladas, estas producen las irisaciones nacaradas que vemos en la madreperla (Figura 2) [1, 3].

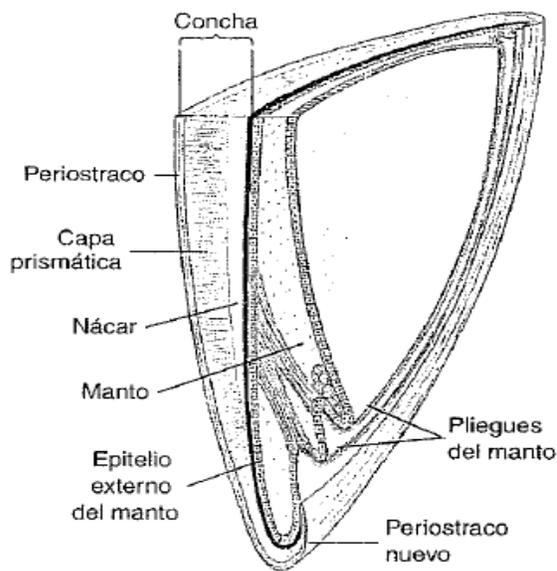


Figura 2. Esquema que muestra una sección vertical de la concha y el manto de un bivalvo. El epitelio del manto externo secreta la concha; el epitelio interno por lo general es ciliado [1].

Entre moluscos existe una gran variación respecto a la estructura de la concha. Mientras los moluscos de agua dulce tienen, por lo general, un periostraco grueso que da cierta protección ante los ácidos del agua y la putrefacción de los restos vegetales, en los de agua marina el periostraco es relativamente fino y en algunos falta [1]. En especies más evolucionadas, las conchas quedan embebidas dentro del cuerpo del molusco (conocidas como conchas internas), o han desaparecido por completo [4].

Los moluscos son esencialmente acuáticos: la mayoría marinos, pocos dulceacuícolas y en menor medida presentan formas terrestres. Dentro del grupo, también existen animales con

estrategias alimentarias muy variadas: herbívoros, carnívoros, filtradores, detritívoros y algunos son parásitos [5].

Clase Gasterópoda

Es la clase de moluscos más abundante y diversificada. Comprende unas 80,000 especies conocidas vivas y más de 15,000 fósiles, ya que los moluscos tienen una larga historia geológica, que abarca desde el Cámbrico inferior hasta la actualidad [1]. Esta clase ha sufrido una radiación adaptativa muy amplia, no obstante, los gasterópodos son predominantemente marinos y existen algunos en aguas continentales. Es también la más variada en cuanto a la forma de las conchas, estas formas se correlacionan con comportamientos o hábitats específicos. Por ejemplo las conchas con espirales bajas son más estables en áreas de choque de olas o en superficies verticales de roca. Varios grupos de gasterópodos bentónicos de fondo blando y bivalvos tienen largas espigas en el caparazón que les ayuda a estabilizarse en sedimento suelto, así como proporcionar cierta protección contra depredadores [1, 6].

La mayoría de gasterópodos tienen conchas, constituidas por una sola pieza; las más comunes son las espirales asimétricas enrolladas al lado derecho, en las cuales cada vuelta

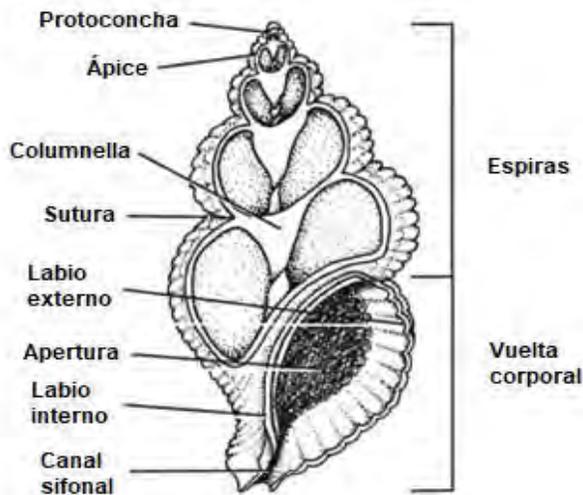


Figura 3. Representación esquemática de la concha de un gasterópodo [8]

se sitúa alrededor de un eje central denominado columella (Figura 3). Para adaptarse a las conchas, los animales, enroscan su cuerpo al crecer, esto implica la torsión de la masa visceral al girar 180° en torno a su eje longitudinal en espiral. Como consecuencia de ello, los órganos pares (branquias, riñones y aurículas del corazón) tienden a reducir su tamaño o pierden uno de un lado (izquierdo o derecho); también como consecuencia, el orificio genital y el ano, se trasladan a la parte anterior del cuerpo [5, 7].

Familia Conidae

De la clase Gastrópoda deriva la superfamilia Conoidea, conocida también como suborden Toxoglossa y agrupa a todos los caracoles marinos venenosos (se conocen más de 10,000 especies) [9].

Esta superfamilia la constituyen, a su vez, las familias: Drilliidae, Pseudoelatomidae, Strictispiridae, Conidae, Terebridae y Turridae (Figura 4). Para ello se consideraron caracteres anatómicos (como la anatomía de aparato digestivo, forma de la concha, protoconcha, rádula), pues las familias Drilliidae, Pseudomelatonidae y Strictispiridae no presentan aparato venenoso (Figura 4) [10].

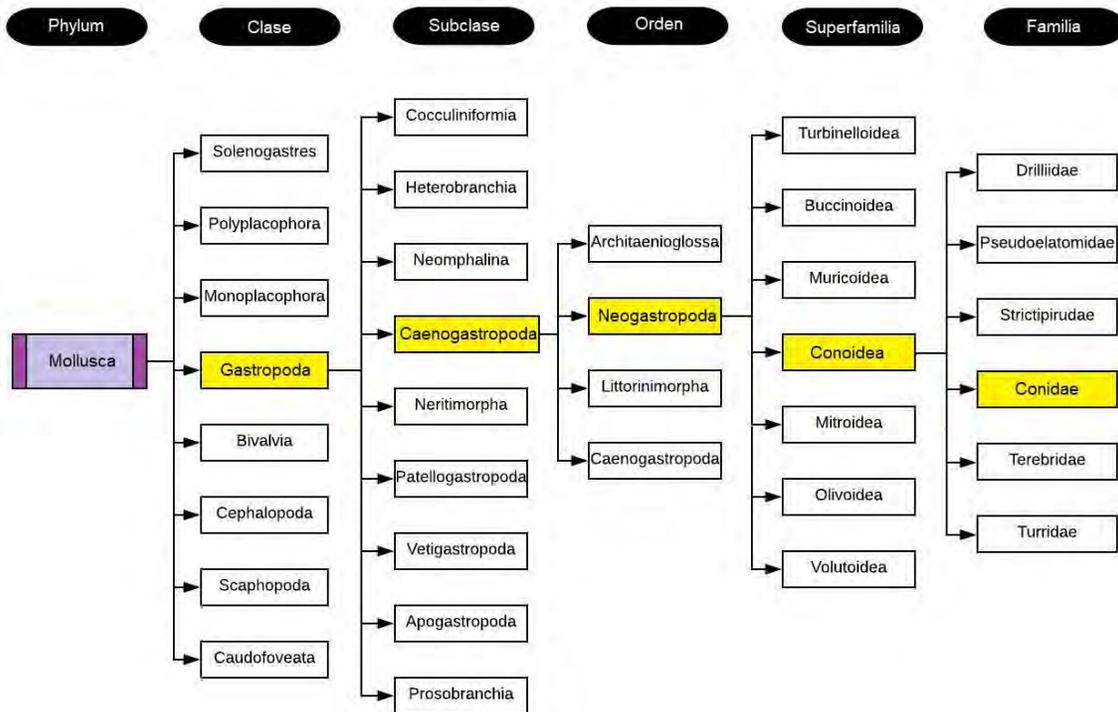


Figura 4. Clasificación de la familia Conidae [11].

De los caracoles marinos venenosos destacan los miembros de la familia Conidae, conocidos vulgarmente como conos.

Género *Conus*

Basados en análisis moleculares, la familia Conidae se compone de cuatro géneros vivos: *Californiconus*, *Profundiconus*, *Conasprella* y *Conus* [12].

El género *Conus* está representado por 56 subgéneros, con alrededor de 803 especies conocidas [5]. Los ejemplares típicos de ésta familia son llamados conos por la forma de su concha [12, 13].

Estos organismos se encuentran principalmente en ambientes tropicales y subtropicales marinos, en el área latitudinal incluida entre los 40° Norte y los 40° Sur (Figura 5). Para su estudio, estos ambientes, se han dividido en siete regiones: 1) Indo-Pacífica; 2) Panameña; 3) Caribeña; 4) Oeste de África; 5) Sudafricana; 6) Peruana y 7) Mediterránea. Son particularmente más diversos en la región Indo-Pacífica, donde se encuentra aproximadamente el 60% del total de especies conocidas. Habitan principalmente alrededor de arrecifes de coral, cerca de la costa y en aguas poco profundas generalmente a menos de 100 m de profundidad (aunque algunos organismos se han encontrado hasta los 1,000 m de profundidad); también es importante mencionar que algunas especies se han adaptado a aguas más frías, como *Conus sieboldii*, que reside entre las aguas frías de norte de Japón y las cálidas más al sur de Okinawa [9, 13, 14].

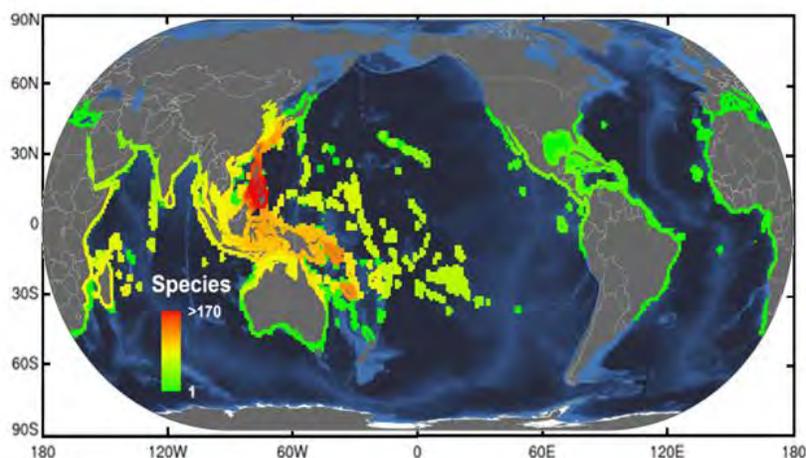


Figura 5. Diversidad de *Conus*. El mapa incluye la riqueza total de especies, en base a datos de la IUCN (*International Union for Conservation of Nature*). Los colores indican el número de especies encontradas en la región, en color verde, los sitios donde se encuentran un bajo número de especies, y hacia el rojo los sitios donde se encuentra la mayor diversidad [15].

Con respecto a la reproducción de estos organismos; que no ha sido ampliamente estudiada, se sabe que la mayoría de ellos presenta sexos separados y fertilización interna. La puesta de huevos ocurre una vez al año; para ello, éstos son anclados al substrato en cápsulas, poniendo en promedio 25 cápsulas, y cada una contiene más de 1,000 huevos [13].

Durante la etapa de larva veliger (de nado libre, planctónica, etapa que dura aproximadamente 1-50 días) la primera concha, denominada protoconcha, en su fase temprana es lisa y dependiendo de la especie, a medida que se desarrolla, su forma cambia y aparecen ornamentaciones más complejas [13].

Esta primera etapa de desarrollo es crítica, debido a una tasa alta de mortalidad durante los primeros días después de la eclosión. Este estado crítico del ciclo de vida ha obstaculizado la mayoría de los intentos de crianza en cautiverio; además, existe el problema de encontrar el alimento adecuado para cada etapa del desarrollo [13].

Los cónidos constituyen un grupo inusual de predadores altamente especializados, ya que todos utilizan veneno para capturar a sus presas. En base a su alimentación han sido caracterizados en tres grupos principales:

- a) Vermívoros, consumen diversos tipos de gusanos, principalmente poliquetos.
- b) Molusquívoros, se alimentan de otros gasterópodos
- c) Piscívoros, se alimentan de peces.

Sin embargo, se sabe que otros también se alimentan de hemicordados y ofiúridos. El veneno no sólo es utilizado por los caracoles para cazar sino también como defensa contra sus predadores y competidores [16].

La mayoría de organismos son de hábitos nocturnos; cazan principalmente durante la noche, y aunque tienen ojos pedunculares, su visión es pobre, así que utilizan tácticas quimiosensoriales (osfradio) para detectar y seguir a su presa (localizándola a través del “olor”) [16, 17].

Para cazar utilizan un aparato venenoso altamente especializado. Éste comprende una glándula venenosa, glándulas salivales (glándulas salivales accesorias), saco radular, faringe, probóscide y rádula (Figura 6) [13].

Los componentes activos de veneno son sintetizados en las células epiteliales que revisten el conducto venenoso. Un impulso provocado por el bulbo venenoso, hace que el veneno generado sea expulsado a través del conducto venenoso hacia la faringe o al saco radular (donde los dientes radulares son producidos y almacenados, no tiene conexión con la probóscide). La rádula modificada o “diente”, ha evolucionado hacia estructuras en forma de arpón acanalado. Cada diente es movido de forma individual a la faringe donde se carga con veneno para ser impulsado a través de la probóscide. Los arpones llegan a medir hasta 10 mm de largo [9, 13].

Los arpones funcionan como agujas hipodérmicas, inyectando el veneno a su presa (pequeñas cantidades, aproximadamente 50 μ l), paralizando el sistema nervioso o muscular en segundos [9, 13, 18].

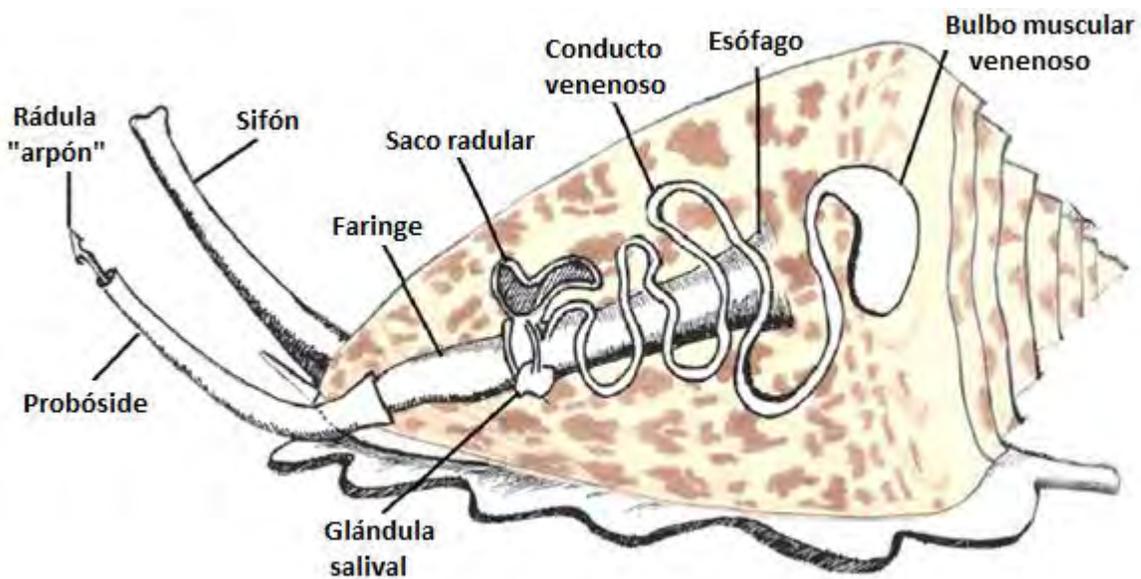


Figura 6. Esquema del aparato venenoso de *Conus* [19].

Se estima que el tiempo de vida promedio de un caracol cónico es de 10-20 años, sean organismos silvestres o crecidos en cautiverio; pueden alcanzar un tamaño mayor a los 20 cm, aunque la mayoría de las especies alcanzan un tamaño máximo de 8 cm y pesan <100 g [13].

Conus fergusonii

Esta especie vermívora se distribuye desde la costa de Baja California, México, hasta el norte de Perú, incluidas las Islas Galápagos (Figura 7a); es encontrado desde la zona de marea hasta los 200 m de profundidad en sustratos de arena y lodo [20].

Son caracoles de gran tamaño ya que van desde los 60 hasta los 153 mm; presentan de 12 a 13 giros con espira ligeramente elevada. Los organismos pequeños presentan un contorno cóncavo mientras que en los grandes es casi recto; el hombro angulado de manera aguda en especímenes pequeños y en los grandes es menos angulado. Su concha es color amarillo claro-naranja en organismos pequeños (Figura 7b), más pálido en especímenes juveniles, decolorándose hacia el color blanco en los organismos adultos [21].



a



b

Figura 7. *Conus fergusonii*: a) mapa de distribución geográfica [20], y b) fotografía de la concha del caracol (fotografía propia).

Conus spurius

Es una especie vermívora, que se distribuye desde Carolina del Norte hasta el sureste de Venezuela (Figura 8a). Suele encontrarse desde la zona de marea hasta los 30 m de profundidad [22].

Los adultos suelen alcanzar los 80 mm de longitud, aunque generalmente son de menor tamaño (Figura 8b). Presenta de 9 a 10 espiras, y las tres primeras forman una espira aplanada y la abertura es larga y estrecha. El canal sifonal forma sólo una muesca, el labio exterior es fino, su opérculo es córneo y pequeño. La concha es color crema con hileras de manchas romboidales colocadas en espirales y el interior de la apertura es blanco [23].



a



b

Figura 8. *Conus spurius*: a) mapa de distribución geográfica [22], y b) fotografía de la concha del caracol (fotografía propia).

Conotoxinas

Los estudios preliminares del veneno de *Conus* fueron realizados por Kohn, A. J. y sus colaboradores por el año de 1960, estudiaron la morfología del aparato venenoso, la forma en que ocurre el ataque por parte del caracol cónico y la naturaleza de su veneno [24].

A partir de esto, se profundizó más para dilucidar los componentes del veneno y fue hasta el año 1981 que las primeras conotoxinas se purificaron y caracterizaron a partir del veneno crudo extraído de *Conus geographus*, una especie peligrosa de *Conus* que ha causado la muerte en humanos. Los primeros péptidos de interés, fueron aquellos que al ser inyectados en peces o ratones causaron parálisis y muerte, puesto que tienen como blanco molecular canales iónicos importantes para la transmisión neuro-muscular. Desde entonces la investigación sistemática de sus toxinas ha continuado a pasos acelerados. Son compuestos tan diversos que hasta ahora sólo una minúscula fracción de la diversidad total de los componentes tóxicos han sido caracterizado en detalle [25].

El veneno, distintivo de cada especie de predadores del género *Conus*, es principalmente de naturaleza peptídica; sus componentes son relativamente pequeños (en promedio de 25 aminoácidos) y por lo tanto son relativamente fáciles de sintetizar. Son denominados comúnmente como conopéptidos o conotoxinas [18, 26, 27].

Cada especie produce más de 100 péptidos únicos, con un solapamiento estimado del 5% interespecie [17].

Síntesis del veneno

Los conopéptidos se expresan como proteínas precursoras (pre-pro-péptidos) que son procesados en el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi [28]. Todas son traducidas a través de un mecanismo ribosomal convencional y los mRNA que codifican a cada péptido pueden ser identificados en el conducto del veneno [26].

La organización del pre-pro-péptido consiste en: una secuencia señal típica en el extremo amino (NH₂-terminal) conocida como región “pre”, de aproximadamente 20 aa, y altamente conservada; una región “pro” intermedia conformada por 20-40 aa, con una tasa de mutación alta; y finalmente, el péptido maduro, la región biológicamente activa que consta de 10-30 aa, localizada en el extremo carboxilo. Una señal estándar (XR) que sirve para la proteólisis, es generalmente encontrada inmediatamente antes del péptido maduro (o toxina madura) (Figura 9) [27].

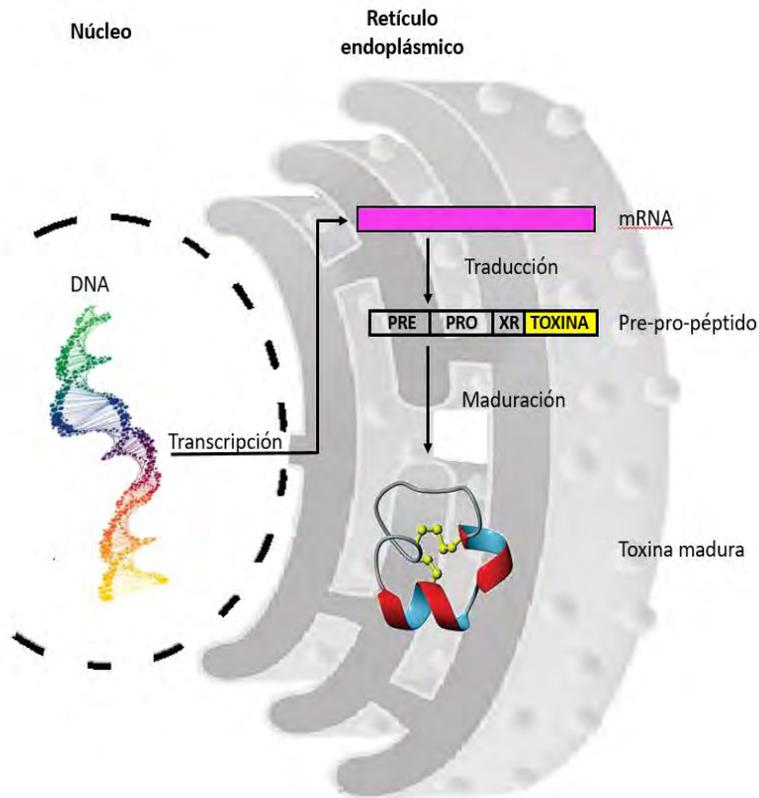


Figura 9. Esquema del proceso de maduración de un conopeptido (diseño propio).

Después de la traducción llevada a cabo por los ribosomas, el precursor polipeptídico ingresa al RE donde se realizan algunas modificaciones post-traduccionales (PTMs) y la proteólisis específica, para dar lugar a una toxina madura [27].

Estas PTMs requieren una maquinaria enzimática especializada que cambia la naturaleza de algunos de los residuos de aa, y confieren una diversidad excepcional a nivel inter e intra especie [27, 29].

Las PTMs más comunes son: la formación de puentes disulfuro, la γ -carboxilación del ácido glutámico, la hidroxilación de valina en la γ -posición, de prolina en C-4, y de lisina en C-5, la sulfatación de tirosina, la bromación de triptófano en el C-6, la efimerización de los residuos L- a D-, como la de leucina, triptófano, valina y fenilalanina, la amidación C-terminal, la O-glicosilación de treonina o serina y la piroglutamilación de glutamina N-terminal [30].

En las conotoxinas, la característica más importante y prevalente es la formación de puentes disulfuro, que brindan estabilidad y rigidez a las conotoxinas. Con sólo algunos cambios en los residuos inter cisteínas, se puede lograr que el péptido tenga efecto en un blanco molecular diferente, entre los que se encuentran: canales iónicos, receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) o transportadores de neurotransmisores [16, 31, 32].

Clasificación de las conotoxinas

Las toxinas presentes en el veneno de los caracoles cónicos históricamente fueron divididas en aquellas que eran ricas en residuos de cisteína o “conotoxinas” y las que no presentan residuos de cisteína o solo un par llamados “conopéptidos”; ahora esta distinción es considerada redundante [16, 31].

Las conotoxinas pueden ser clasificadas en las siguientes tres categorías: 1) en base a su secuencia señal (superfamilias genéticas), 2) dependiendo del patrón o arreglo de cisteínas (familias estructurales) y 3) por el blanco molecular (familias farmacológicas) [29].

Superfamilia genética

La secuencia señal clasifica a las toxinas dentro de una Superfamilia; hasta la fecha se conocen cerca de 26 Superfamilias y son designadas con letra mayúscula, que son: A, B1, B2, B3, C, D, E, F, G, H, I1, I2, I3, J, K, L, M, N, O1, O2, O3, P, Q, S, T, V e Y [29, 31].

Más de 2,500 secuencias nucleotídicas se encuentran catalogadas en ConoServer, donde el 15% de ellas son secuencias genómicas. Los precursores de las conotoxinas comprenden 3 regiones y sólo la región “pre”, péptido señal del RE, es altamente conservada entre subgrupos particulares; por esta razón es usada para agrupar a las conotoxinas en superfamilias genéticas. En la Tabla 1 se enlistan las diferentes superfamilias, la secuencia consenso, el número correspondiente de péptidos identificado y el arreglo de cisteínas que puede encontrarse en cada una de ellas [28].

Tabla 1. Superfamilias genéticas de las conotoxinas [29, 33].

Superfamilia genética	Péptidos identificados	Arreglo de cisteínas encontrado	Secuencia consenso del péptido señal (región "pre")
A	202	I, II, IV, XIV	MGMRMMFTVFLLVVLATTVVSXTS
B1	14	Conantoquinas	MXLYTYLYLLVPLVTFHLILGXGT
B2	1	VII	MLRLITAAVLVSACLA
B3	1	XXIV	METLTLLWRASSSCLLVVLSHSLRLLLG
C	4	Contulaquinas	MXXAYWVMVMVIXAPLSEG
D	28	XV, XX	MPKLEMMLLVLLILPLXYFDAAGG
E	1	XXII	MMTRVFFAMFFLMALTEG
F	1	No definido	MQRGAVLLGVVALLVLPQAGA
G	1	XIII	MSGMGVLLLVLLLVMPPLAA

H	7	VI/VII	MNTAGRLLLLLCLALGVLVFESLG
I1	17	VI/VII, XI	MKLXXTFLLXLXILPXXXG
I2	57	XI, XII	MMFRXTSVXCFLLVIXXLNL
I3	7	VI/VII, XI	MKLVLAIVXILMLLSLSTGA
J	12	XIV	MPSVRSVTCCCLLWXMLSXXLVTPGSP
K	4	XXIII	MIMRMTLTLFVLVVMTAASASG
L	13	XIV	MXXXVMFXVXLXLTMPLTX
M	361	I, II, III, IV, VI/VII, IX, X, XIV, XVI	MMXKXGVXMLXIXLXLFLPLXXXQLDA
N	3	XV	MSTLKMMLLILLLLLPXATFDSDG
O1	460	I, VI/VII, XII, XIV	MKLTCVXIVAVLFLTXAXLXTA
O2	84	VI/VII, XIV, XV	MEKLTILLLVAAVLMSTQALXQS
O3	28	VI/VII	MSGLGIMVLTLLLLVFMXTSHQ
P	9	IX	MHXXLXXSAVLXLXLLXAXNFXXVQ
Q	4	XVI, VI/VII	MHTLEMLLLLLLLLPLALG
S	13	VIII	MMXKMGAMFVLLLLFXLXSSQQ
T	157	I, V, X, XVI	MRCLPVPFXILLLLIXSAPSVDA
V	2	XV	MMPVILLLLLSLAIRXXDG
Y	1	XVII	MQKATVLLLALLLLLPLSTA

*Donde la X significa aminoácido no determinado

Familia estructural

Dependiendo de la disposición de los residuos de cisteína en la secuencia primaria de la toxina madura se agrupan en familias estructurales. Por ejemplo, un péptido maduro puede tener un número variable de residuos de cisteínas (4, 6, 8, o 10) y su respectiva posición puede variar. Seis cisteínas pueden estar organizadas como CCC-C-C-C o CC-C-C-C-C o CC-C-C-CC, donde '-' representa un número variable de aa [28]. Las familias estructurales están representadas con un número romano y, a la fecha, 26 distintos tipos de arreglos de cisteína han sido descritos, de acuerdo a lo mostrado en la siguiente tabla:

Tabla 2. Clasificación de las conotoxinas, según el arreglo y patrón de cisteínas [34].

Número (romano) de arreglo de cisteínas	Patrón de cisteínas	Número de cisteínas
I	CC-C-C	4
II	CCC-C-C-C	6

III	CC-C-C-CC	6
IV	CC-C-C-C-C	6
V	CC-CC	4
VI/VII	C-C-CC-C-C	6
VIII	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	10
IX	C-C-C-C-C-C	6
X	CC-C.[PO]C	4
XI	C-C-CC-CC-C-C	8
XII	C-C-C-C-CC-C-C	8
XIII	C-C-C-CC-C-C-C	8
XIV	C-C-C-C	4
XV	C-C-CC-C-C-C-C	8
XVI	C-C-CC	4
XVII	C-C-CC-C-CC-C	8
XVIII	C-C-CC-CC	6
XIX	C-C-C-CCC-C-C-C-C	10
XX	C-CC-C-CC-C-C-C-C	10
XXI	CC-C-C-C-CC-C-C-C	10
XXII	C-C-C-C-C-C-C-C	8
XXIII	C-C-C-CC-C	6
XXIV	C-CC-C	4
XXV	C-C-C-C-CC	6
XXVI	C-C-C-C-CC-CC	8

Familia farmacológica

La producción de una gran cantidad de péptidos, biológicamente activos, es una adaptación evolutiva de depredadores con movimiento lento y carentes de aditamentos mecánicos. Una alta especificidad a sus blancos permite un uso más rápido y eficiente de un menor número de moléculas y evita gasto energético. Aunque también puede que dos o más conotoxinas actúen de forma paralela, esto con la finalidad de asegurarse que la presa quede inmovilizada, este último efecto se conoce como “camarilla de toxinas” [9].

La familia farmacológica o funcional, se describe con base al blanco molecular de la toxina y se representa con una letra del alfabeto griego (

Tabla 3) [29].

Tabla 3. Familias farmacológicas, de acuerdo a la molécula en la que tienen efecto [26].

FAMILIA	MOLÉCULA BLANCO	TOXINA(S) REPRESENTATIVA
alfa(α)-conotoxina	Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)	GI
chi(χ)-conotoxina	Transportador neuronal de noradrenalina	MrIA, CMrVIA
delta(δ)-conotoxina	Canales de sodio dependientes de voltaje (agonista, retardada inactivación)	TxVIA
epsilon(ϵ)-conotoxina	Canales de calcio presinápticos o receptores presinápticos acoplados a proteínas G	TxVA
gamma(γ)-conotoxina	Corrientes catiónicas neuronales (entrantes)	PnVIIA, TxVA
iota(ι)-conotoxina	Canales de sodio dependientes de voltaje (agonista, no retardada inactivación)	RXIA
kappa(κ)-conotoxina	Canales de potasio dependientes de voltaje (bloqueador)	PVIIA
mu(μ)-conotoxina	Canales de sodio dependientes de voltaje (antagonista, bloqueador)	GIIIA
omega(ω)-conotoxina	Canales de calcio voltaje dependientes (bloqueador)	GVIA
rho(ρ)-conotoxina	Alfa1-adrenocetores (GPCR)	TIA
sigma(σ)-conotoxina	Canales iónicos 5-HT ₃ dependientes de serotonina	GVIIIA
tau(τ)-conotoxina	Receptores de somatostatina	CnVA
Contulaquinas	Receptores de neurotensina	Contulaquina-G
Conantoquinas	Receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA)	Conantoquina-Br
Conorfamidas	Canal de potasio Shaker	Conorfamida-Sr3
Conopresinas	Receptores de vasopresina	Conopresina-S
Contrifanos	Canales de calcio tipo L	Contrifano-R

Las toxinas de *Conus* pueden generar distintos tipos de respuesta en su presa como por ejemplo [32, 35]:

- 1) Excitabilidad celular. Provoca un estado permanente de contracción de las fibras musculares de la presa (llamado estado tetanizado).
- 2) Inhibición motora. Inhibe los canales de Na⁺, Ca²⁺ y a los receptores nicotínicos postsinápticos provocando la inhibición total de la neurotransmisión. La inhibición se da poco a poco y se logra después del efecto tetanizante.

- 3) Inhibición Nirvana. Algunos *Conus* atrapan a sus presas con su boca falsa en forma de red (dentro de la probóscide son liberadas las toxinas), y se cree que un efecto anestésico en la presa facilita su caza.

Nomenclatura

La convención para el nombramiento de las conotoxinas se basa en el sistema NC-IUPAC (del inglés: *The International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification*) [28]. Como se ilustra en la Figura 10, la primera letra en griego indica el blanco farmacológico de la toxina. En seguida una o dos letras (la primera en mayúscula) que indican la especie de donde fue aislada la conotoxina, en este caso *C. pennaceus*. Esta (s) letra (s) es (son) seguida (s) de un número romano que provee información del arreglo de cisteínas que presenta. Finalmente una letra mayúscula denota el orden en que fue descubierta la toxina de esa categoría (la especie + arreglo de cisteínas). Si el blanco molecular no ha sido identificado para la toxina en cuestión, se omite la letra griega, se utilizan letras minúsculas para indicar la especie, números arábigos para indicar el arreglo de cisteínas y letras minúsculas para detallar el orden en el que fue descubierta [28].

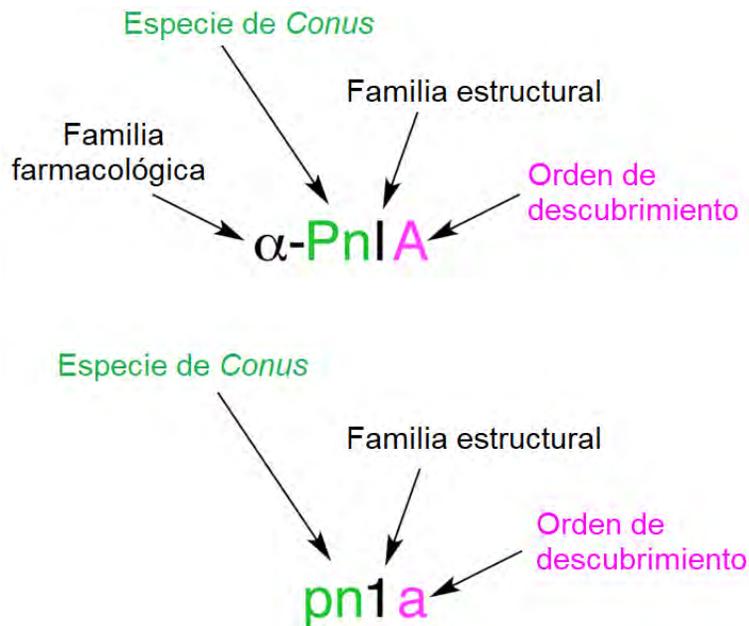


Figura 10. Nomenclatura de conotoxinas, basado en el sistema NC-IUPHAC [28].

Puesto que la finalidad del veneno es la de inmovilizar y matar a sus presas, el blanco de acción principal recae en los canales iónicos de membrana que transmiten las señales químicas y eléctricas, o en los receptores que las modulan [16].

Señales eléctricas: Potencial de acción

La membrana celular, que es una bicapa lipídica semipermeable; separa el medio externo del interno de la célula, y aunque la concentración total iónica es similar en ambos lados de la membrana, la concentración iónica específica (por ejemplo de iones de K^+) es diferente. La difusión iónica generada por el gradiente electroquímico crea una diferencia de cargas entre el medio extracelular y el intracelular, lo que se traduce en un potencial de membrana que es del orden de -100mV (negativo dentro de la célula) [36].

El potencial de acción es un cambio breve pero pronunciado de la polaridad de membrana, dura aproximadamente 1 milisegundo (Figura 11). En un potencial de acción el voltaje a través de la membrana se invierte; el interior se vuelve positivo en relación a exterior; luego vuelve rápidamente a la situación inicial y se restaura el potencial de reposo. El cambio rápido en la polaridad tiene lugar cuando la estimulación eléctrica produce un potencial graduado mayor, que hace que el potencial de membrana descienda a -50 mV denominado potencial umbral (cambio importante sin necesidad de estimulación) [37].

Después el voltaje asciende bruscamente a 0 mV y continúa haciéndose más positivo hasta que la carga en el interior de la membrana llega a $+30\text{ mV}$. Después el potencial de membrana se invierte superando su potencial de reposo, produciendo una leve hiperpolarización (rectificación hacia el exterior) para finalmente volver a su potencial de reposo [37].

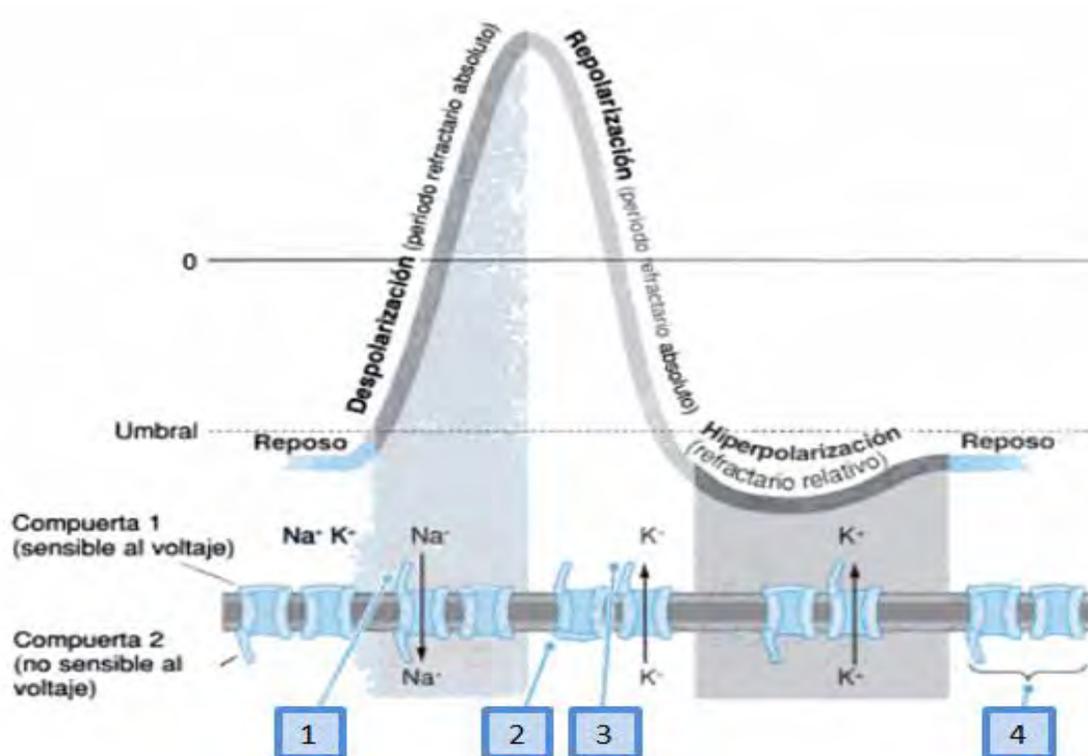


Figura 11. Fases del potencial de acción en los canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje. 1) despolarización. Comienza con la apertura de los canales de Na^+ ; 2) Cierre del canal de Na^+ (se inactivan); 3) Apertura del canal de K^+ , contribuye a la repolarización; y 4) El potencial de reposo se restaura, las compuertas vuelven a su posición inicial [37].

Canales iónicos

Los canales iónicos son responsables de la generación y orquestación de las señales eléctricas que atraviesan el cerebro que piensa, el corazón que late y el músculo que se contrae [38].

Están constituidos por proteínas transmembranales, embebidas en la membrana plasmática formando poros hidrofílicos que facilitan la difusión de los iones inorgánicos (Na^+ , K^+ , Cl^- , etc.) a través de las membranas biológicas de manera específica y selectiva. Posen dos características [39]:

- a) Selectividad iónica; permiten el paso de iones específicos, discriminándolos por tamaño y carga.
- b) Actividad de compuerta; por la que se abren, cierran e inactivan.

Atendiendo a sus propiedades cinéticas (activación-inactivación-desactivación), características farmacológicas y al estímulo que determina el cambio conformacional, podemos clasificar los canales iónicos en (Figura 12) [38]:

- Activados por cambios en el voltaje (canales voltaje-dependientes)
- Activados tras la interacción de un agonista con su receptor específico localizado en la superficie de la membrana celular (canales receptor ligando-dependientes).
- Activados por mediadores intracelulares (Ca^{2+} , ATP nucleótidos cíclicos proteín-cinasas y ácido araquidónico).
- Activados tras deformación mecánica celular (canales activados por distensión o aumento del volumen celular).

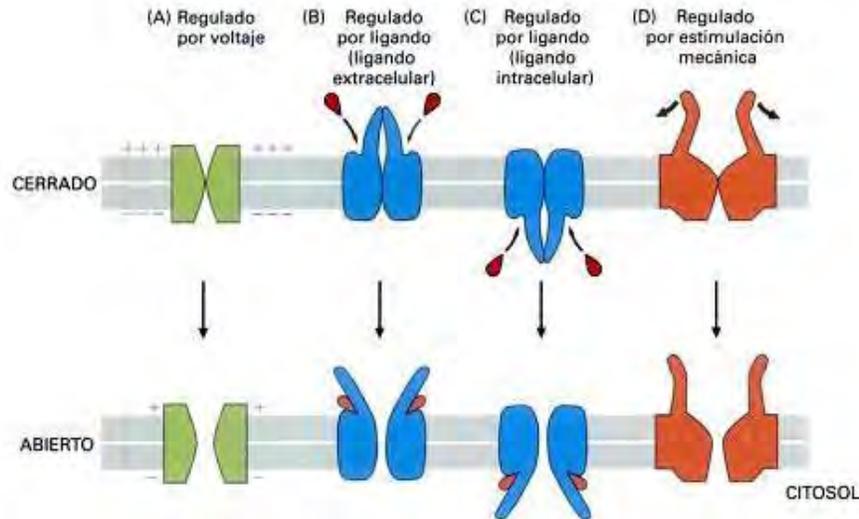


Figura 12. Regulación de canales iónicos. Según el tipo de canal iónico, las compuertas del canal se abren en respuesta a una alteración de la diferencia de voltaje a través de la membrana (a); a la unión de un ligando químico al canal (b y c) de la célula, o a la estimulación mecánica (d) [40].

Estos canales no son simples poros conductores, poseen tres propiedades fundamentales [40]:

- Permiten el flujo de iones a una velocidad muy superior a la de cualquier otro sistema biológico. El flujo de iones que atraviesa cada canal puede medirse como una corriente eléctrica, que puede producir rápidos cambios en el potencial de membrana.

- ii) Discriminar cuáles iones pasan. La selectividad iónica depende del diámetro, la conformación estructural de los canales iónicos y la secuencia de aminoácidos altamente conservada que lo forman.
- iii) Responder a un estímulo. Las proteínas del canal son capaces de adoptar diversos estados conformacionales. En general, existe un estado conductor (estado abierto, que permite el paso de iones a través de ellos) y dos no-conductores (estado inactivo y cerrado).

Así los canales iónicos juegan papeles importantes en la fisiología y toxicología humana como lo son: contracción cardíaca, transmisión neuronal, responder a cambios de temperatura, liberación hormonal, regulación de apoptosis, estrés oxidativo y de pH celular, así como la detección de varias sustancias químicas (encontradas en aire, agua y suelo) que son producidas por contaminación y patologías humanas. Por lo tanto, los canales iónicos están involucrados en varios procesos fisiológicos a nivel celular y sistémico [41].

En este trabajo nos enfocaremos en los canales de potasio.

Canales de potasio (K⁺).

Los canales de potasio representan el grupo más numeroso (Figura 13), heterogéneo y ubicuo de proteínas estructurales de membrana en células excitables y no excitables. El humano posee más de 90 genes que codifican las subunidades principales de los canales de potasio [42, 43].

El papel crucial de los canales de potasio como reguladores primarios de las propiedades eléctricas intrínsecas en células excitables, ha sido bien establecido. En el caso de células no excitables, los canales de potasio controlan el volumen celular, la proliferación, diferenciación y la sobrevivencia. Tal heterogeneidad de funciones en cada tipo celular se logra mediante la expresión de un patrón específico de corrientes de K⁺, cada una con localización subcelular, propiedades biofísicas, modulación y perfil farmacológico distintos. De hecho, los estudios electrofisiológicos en una variedad de modelos celulares han revelado una asombrosa diversidad funcional de la familia de canales de K⁺ [44].

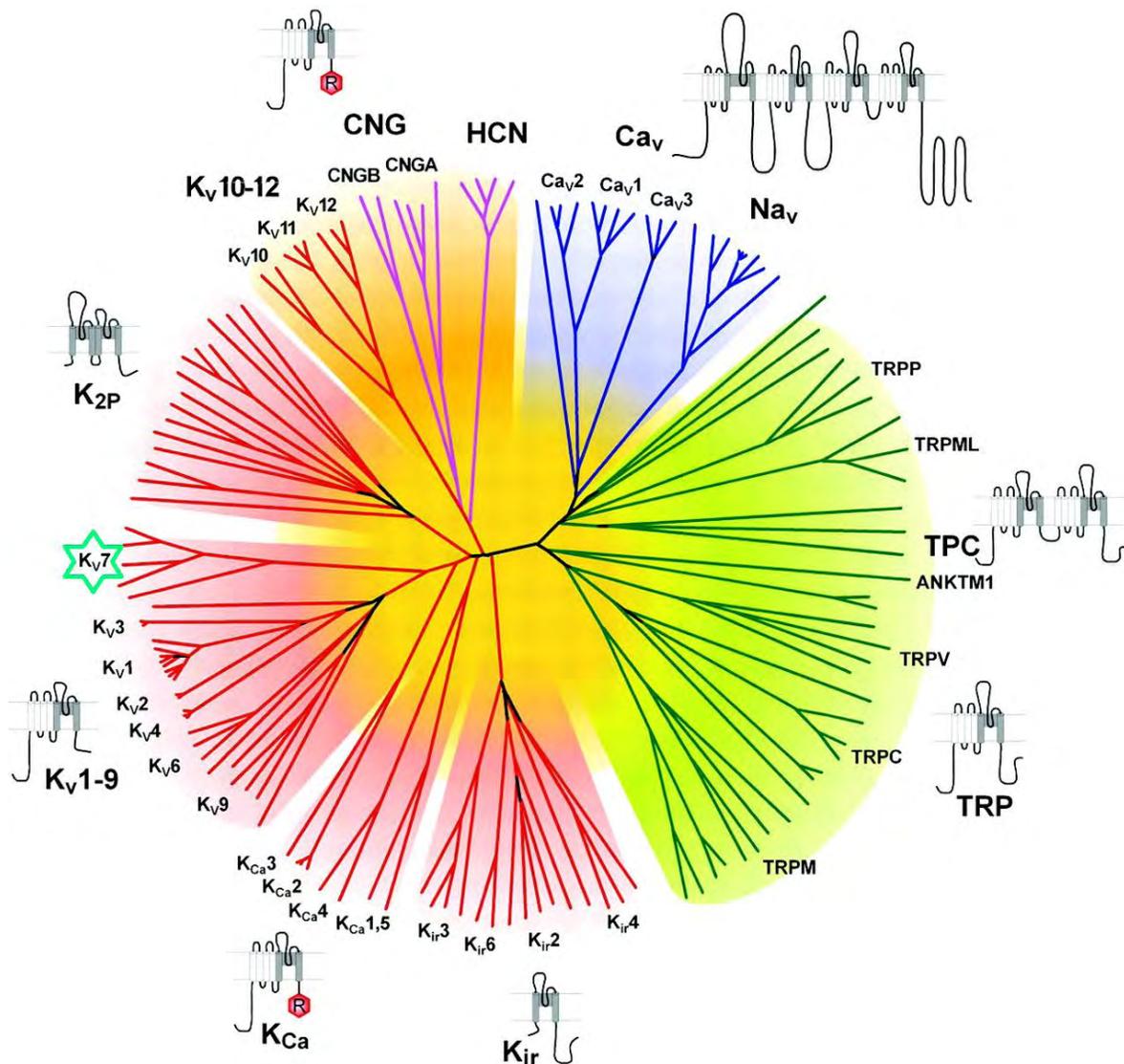


Figura 13. Representación de las relaciones de aminoácidos en la región del Filtro de Selectividad (FS) de la superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje. Son los 143 miembros de los canales iónicos dependientes de voltaje, relacionados estructuralmente, destacan siete grupos de familias de canales iónicos. Se pueden observar los canales de cuatro dominios (Na_v y Ca_v) en ramas azules, los canales regulados por nucleótidos cíclicos en magenta, los canales de receptor de potencial transitorio (TPR) y relacionados en verde y los canales de potasio en rojo, los canales Kv_{10-12} tienen un dominio de unión a nucleótidos cíclicos [45]. La familia de $KCNQ$ (K_v7) se remarcó con una estrella color verde.

Los canales de potasio son blanco importante para el desarrollo de fármacos, puesto que su deficiencia o mutación, se encuentra directamente relacionada con enfermedades en humanos (Figura 14) [42, 46].

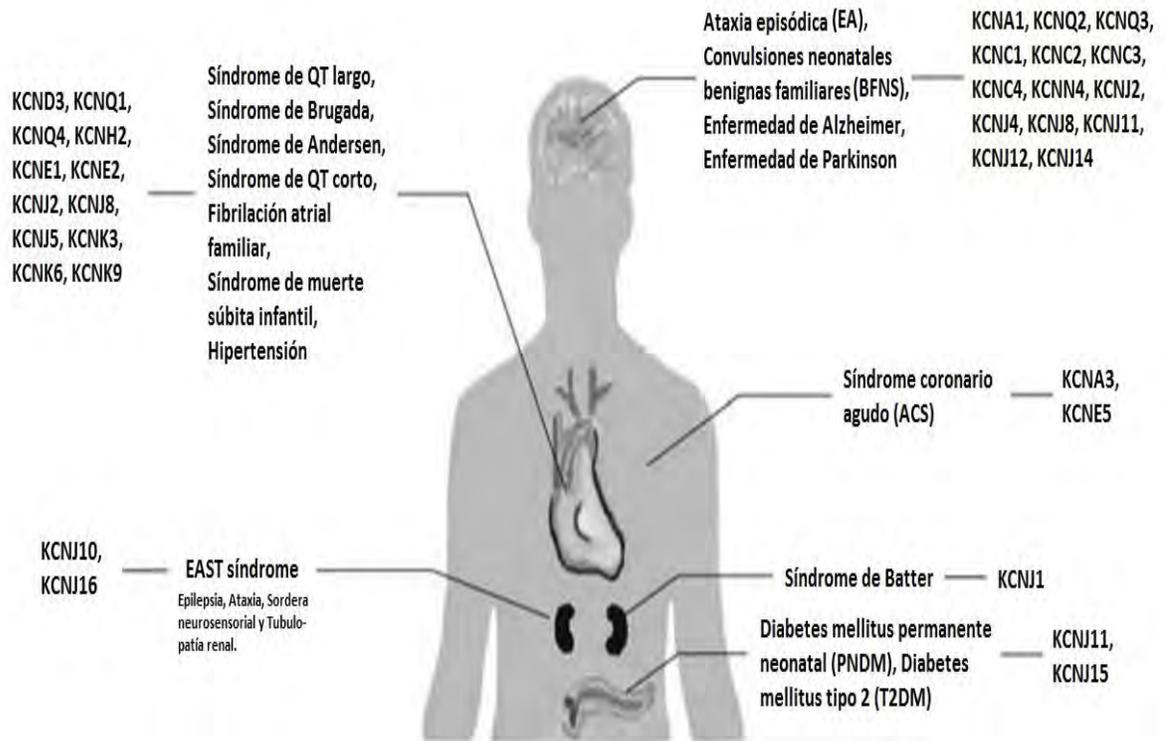


Figura 14. Enfermedades relacionadas con los canales de potasio y su ubicación principal en el humano [42].

Familia de canales de potasio dependientes de voltaje KCNQ

Entre los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv), la familia Kv7 (codificada por los genes KCNQ) comprenden 5 miembros (Kv7.1 a Kv7.5); Kv7.1 es expresado principalmente en células cardiacas, mientras que Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 y Kv7.5 se encuentran ampliamente distribuidas en neuronas y células sensoriales primarias como se observa en la Figura 15 [44].

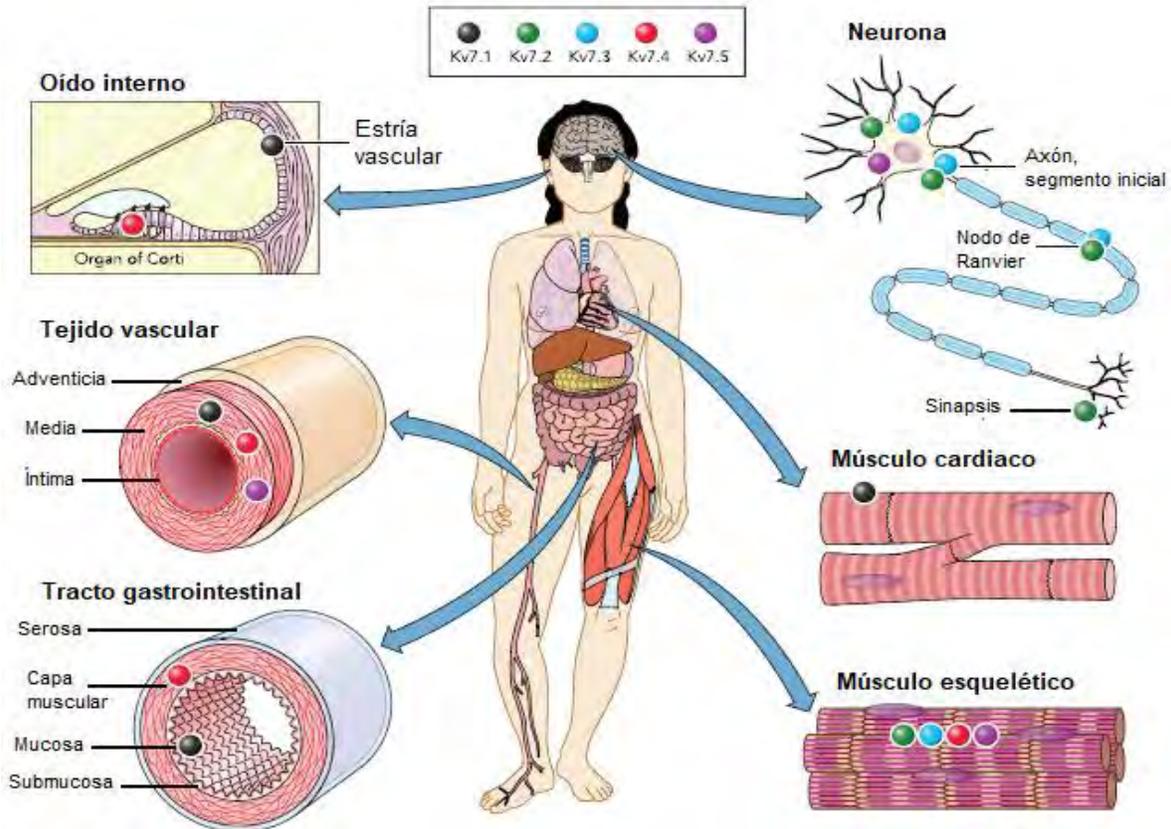


Figura 15. Distribución de las subunidades de Kv7 en los diferentes tejidos corporales. Se aprecian los principales sitios de expresión para cada subunidad de Kv7 [44].

Aunque muchas enfermedades han sido asociadas a mutaciones en los genes que codifican para canales de potasio, es interesante resaltar que, todas las mutaciones en la familia de canales de potasio KCNQ estén directamente relacionadas con enfermedades en humanos (Tabla 4) [38, 47, 48]. Dicha familia de canales de K^+ , aunque ha sido identificada recientemente, ha atraído el interés en su estudio debido a:

- a) La mayoría de los canales de la familia KCNQ, tienen una clara correlación fisiológica.
- b) Es una de las primeras familias de canales iónicos en las cuales las mutaciones han sido directamente relacionadas con enfermedades humanas.
- c) Tiene al menos un agente farmacológico que muestra selectividad para estas corrientes, algunos de los cuales pueden representar fármacos útiles.

Tabla 4. Familias genéticas de KCNQ. Ubicación principal en el organismo, subtipo con el que pueden formar heteromultímeros y enfermedades asociadas a su mutación [47].

GEN	PRINCIPAL LOCALIZACIÓN	COENSAMBLAJE	FUNCIÓN	ENFERMEDADES ASOCIADAS CON MUTACIONES
KCNQ1	Corazón, cóclea, intestino, riñón, pulmón, pituitaria, placenta	KNCE1 KCNE3	Transporte de potasio	Síndrome de largo QT (LQTS), Sordera congénita (JLNS)
KCNQ2	Cerebro, ganglios, músculo, testículos	KCNQ3 KCNE2	Control de excitabilidad	Convulsiones neonatales benignas familiares (BFNS)
KCNQ3	Cerebro, ganglios, bazo, cóclea	KCNQ2 KCNQ4 KCNQ5 KCNE2	Transporte de potasio	Convulsiones neonatales benignas familiares (BFNS)
KCNQ4	Oído interno, núcleos del tronco cerebral, células ciliadas vestibulares	KCNQ3	Transporte de potasio	Pérdida de audición sindrómica DFNA2
KCNQ5	Cerebro, ganglios, músculo esquelético	KCNQ3	Control de excitabilidad	Se cree que puede causar un tipo de epilepsia y desórdenes cognitivos

Similar a otros canales de potasio dependientes de voltaje, los canales Kv7 son tetrámeros, formados por 4 subunidades α (Figura 16a), idénticas (homómeros) o compatibles (heterómeros); cada subunidad α muestra un arreglo topológico de seis segmentos transmembranales (nombrados como S1 a S6), y terminaciones NH_2 y COOH intracelulares (Figura 16a) [47].

La región carboxilo terminal (COOH) tiene alta similitud entre la familia y es nombrado como dominio A (*A-domain*), presenta longitud variable y puede formar “receptosoma” o “canalsoma” al incorporarse con múltiples vías de señalización, podría ser blanco de varias señales de modulación [46]. La región amino terminal (NH_2) tiene un tamaño de 100 aa (Figura 16b) [47].

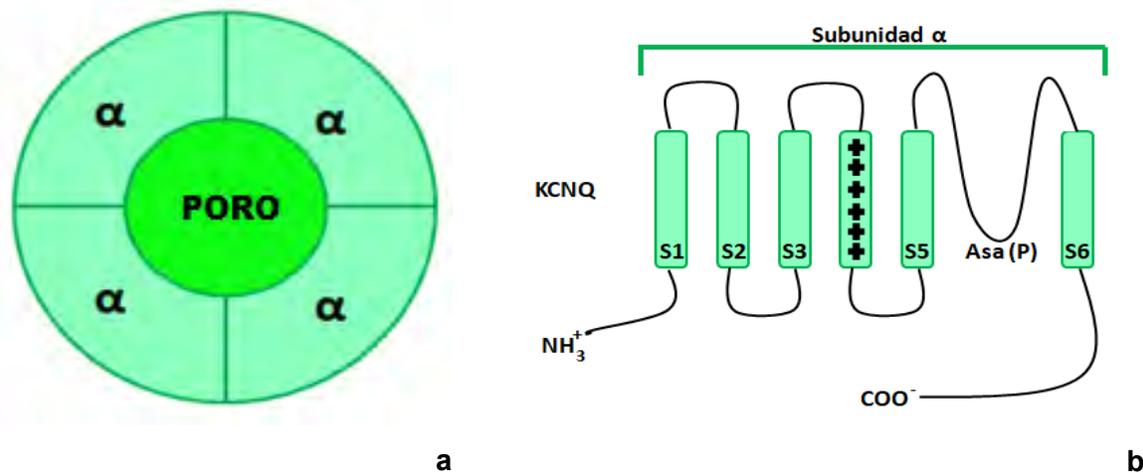


Figura 16. Esquema de: a) formación del poro del canal por las cuatro subunidades α ; b) subunidad α de la familia KCNQ, con seis segmentos transmembranales (S1-S6), la subunidad cuatro (S4) se encuentra positivamente cargado, el asa (P) es la formadora del poro del canal, la región carboxilo terminal es diferente en cada uno de los subtipos de la familia KCNQ.

Los primeros cuatro segmentos S1-S4, forman el Módulo Sensor de Voltaje (MSV) (Figura 17a). El segmento S4 se encuentra cargado positivamente (Figura 16b), presentando una distribución regular de seis residuos de aminoácidos básicos cada tercer posición (residuos de Arginina (R) y Lisina (K)); por ejemplo en *Shaker* su Filtro de Selectividad (FS) es de la forma: AILRVIRLVRVFRIFKLSRHSK), excepto KCNQ1 que presenta sólo cuatro. El MSV detecta los cambios en el potencial de membrana, bajo el efecto del voltaje, S4 se mueve hacia el medio extracelular, cambio conformacional que resulta en la apertura del canal y los residuos conservados en los segmentos S1-S3 (residuos aromáticos: Fenilalanina, Triptófano, o Tirosina y residuos negativamente cargados: Ácido aspártico y Ácido glutámico) ayudan a la estabilización de S4 en sus diferentes estados conformacionales [36, 49, 50].

Estos segmentos continúan con los últimos dos mediante el enlace S4-S5. Los segmentos S5-P-S6 forman el dominio del poro central a través del cual los iones de potasio y las moléculas de agua se difunden (Figura 17a). La parte más angosta del poro, el filtro de selectividad (FS), se encuentra hacia el lado extracelular de la proteína y presenta la secuencia canónica **GTGVT**. Inmediatamente debajo del FS se encuentra una cavidad llena de agua casi en el centro de la bicapa lipídica (Figura 17b) [44, 47, 51].

El paso de potasio a través del canal está bloqueada por dos compuertas consecutivas: La primera formada por el cruce de las hélices internas de los segmentos S6 (compuerta BC) y la segunda es a nivel del FS (Figura 17b) [49].

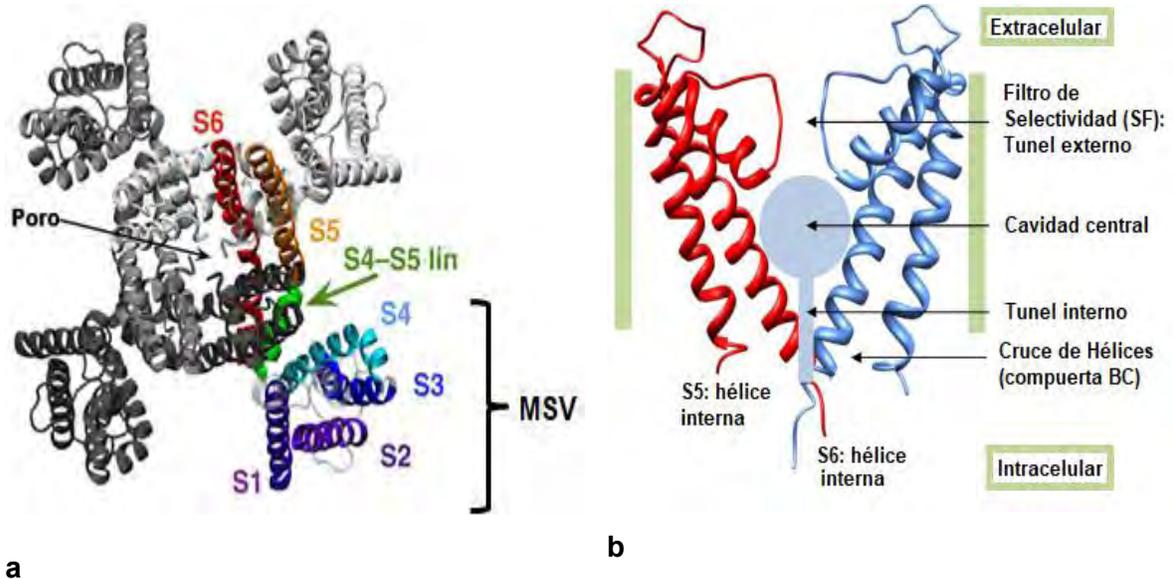


Figura 17. Cristalografía de un canal Kv. a) vista extracelular del canal, se observan las cuatro subunidades α formando el poro del canal y cómo es el arreglo que forma el módulo sensor de voltaje (S1-S4) y en el centro el poro del canal ya formado, y b) se muestran lateralmente dos subunidades α , divididas en tres regiones: FS, cavidad central y túnel interno. Las últimas dos regiones se encuentran llenas de agua [49, 51].

La descripción del ciclo de compuertas, en inglés conocido como “*gating*”, del Kv comprende cuatro distintos estados cinéticos (Figura 18). En reposo, la compuerta de activación BC se encuentra cerrada (C) mientras que el SF está abierto (O). Definimos esta conformación como estado C/O. Cuando un estímulo activador impulsa la apertura de la compuerta BC, el flujo selectivo de K^+ puede mantenerse durante centésimas de milisegundos a través del estado abierto (O/O). Sin embargo, como consecuencia del acoplo alostérico entre la BC y la hélice del poro cerca del SF, la apertura de la compuerta de activación en muchos canales conduce a una serie de cambios estructurales en el SF que lo hace no-conductor (O/I), proceso conocido como inactivación tipo-C. Una vez que el estímulo cesa, la puerta de activación del canal regresa a su estado cerrado y el canal ocupa transitoriamente el estado cerrado-inactivo (C/I) con el SF inactivo. Por último las interacciones alostéricas con la compuerta de activación logran reiniciar el FS a su conformación conductiva (C/O), completando el ciclo [52].

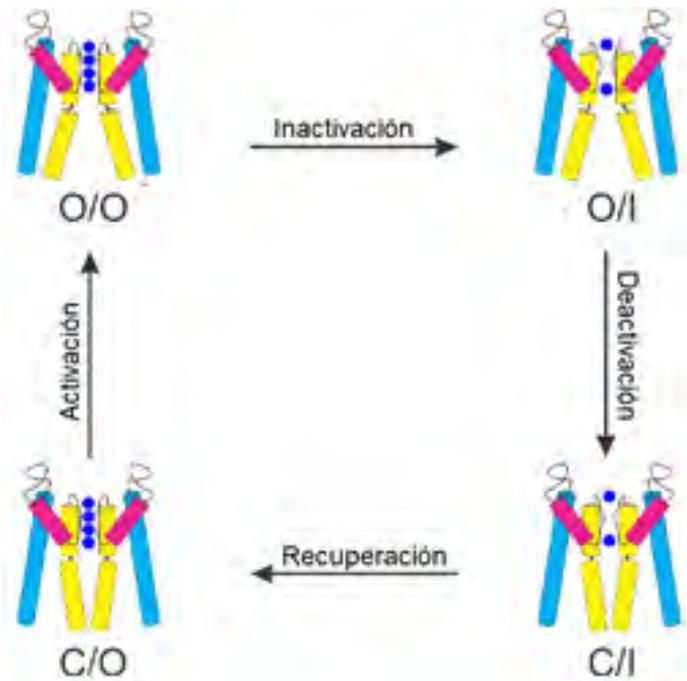


Figura 18. Esquema del ciclo de compuertas o "gating" [52].

El poro del canal comprende una cavidad acuosa no polar, que conduce hacia la región extracelular (Figura 17b). Es un poro estrecho de 12 Å de longitud, revestido exclusivamente por átomos de oxígeno del grupo carbonilo de los residuos de aminoácidos del FS, donde los átomos de K^+ se encuentran estrechamente unidos. Este arreglo crea cinco potenciales sitios de unión para los átomos de K^+ (S0-S4) en un estado casi deshidratado (en este estado se ajusta coordinadamente con los oxígenos del carbonilo de la estructura principal), los tres sitios más extremos (S1-S3) se encuentran rodeados por ocho átomos, mientras que el S4, adyacente a la cavidad central, está formado por cuatro átomos de oxígeno de carbonilos y cuatro átomos de oxígeno de la cadena lateral del aminoácido (aa) treonina (Figura 19) [53, 54].

El FS se representa como cinco conjuntos de cuatro átomos de oxígeno en un plano (la parte superior es la región extracelular), con iones K^+ (esferas verdes) y moléculas de agua (esferas rojas). Los iones de K^+ se coordinan con ocho átomos de oxígeno cuando están en los sitios S1, S3 y S2, S4. El movimiento a lo largo del FS cuando es independiente de la concentración (ic) y cuando es dependiente de la concentración (dc) implicaría la coordinación octaédrica por seis átomos de oxígeno, dos proporcionados por las moléculas de agua que intervienen (Figura 19 y Figura 20) [53].

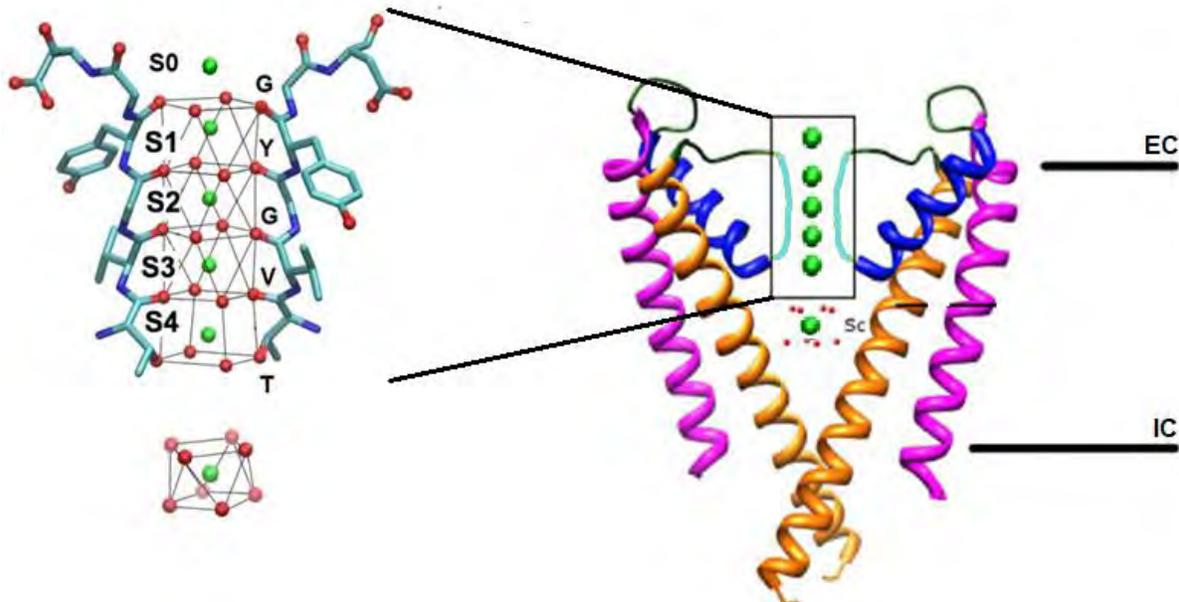


Figura 19. Topología de los canales Kv. Acercamiento del FS y los cinco sitios formados por la región altamente conservada GTGVT, b) Estructura del Kv en presencia de altas concentraciones de K^+ . Abreviaturas EC por Extracelular e IC por Intracelular [55].

Los eventos elementales que subyacen al proceso de conducción iónica se visualizan mejor con un ciclo de transporte entre múltiples estados de los iones. En el proceso una molécula de agua por una de K^+ es transportada a través del estrecho poro del canal, donde el FS está ocupado predominantemente por dos iones K^+ , en los sitios [S1, S3] o [S2, S4]. En algún punto (por ejemplo, durante un evento de conducción hacia el exterior), un tercer ión “salta” de la cavidad vestibular intracelular al sitio S4, mientras que dos iones en el FS están ubicados en los sitio S1 y S3. El ion entrante induce una transición concertada a un estado en el que los tres iones ocupan los sitio S4, S2 y S0, que es seguido de la rápida disociación y salida de los iones más externos en S0 en el lado extracelular, produciendo la conducción de un ion K^+ , en un flujo de aproximadamente 10^8 iones por segundo (Figura 20) [56].

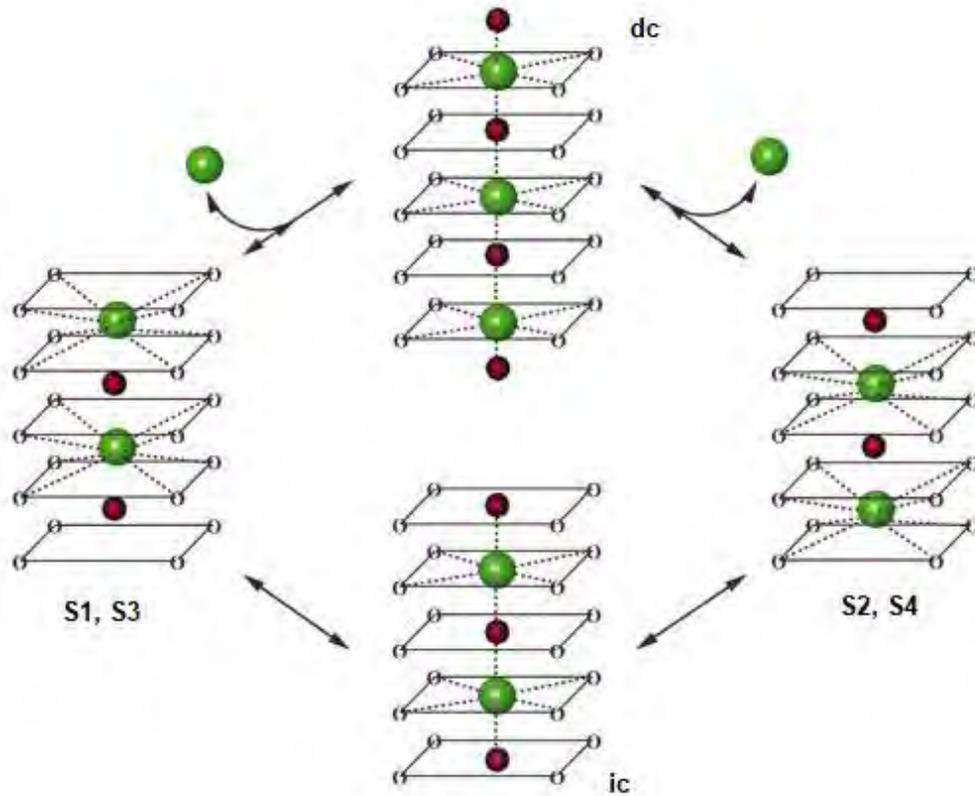


Figura 20. Esquema del mecanismo de transporte en “una sola fila” [53].

El principal método utilizado en la actualidad para estudiar los desplazamientos de iones y los canales iónicos en las células vivas consiste en la medición de las alteraciones de la corriente eléctrica. Las técnicas de registro eléctrico (electrofisiológicas) permiten detectar y medir la corriente eléctrica que fluye a través de los canales [40]. Se ha extendido el uso de ovocitos de *Xenopus laevis*, transfectados con un canal iónico particular, conectados por medio de electrodos a un sistema de registro [47]. Esta técnica se conoce como Fijación de Voltaje con Dos Electrodo (TEVC por sus siglas en inglés *Two Electrode Voltage Clamp*) [57].

JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Los venenos de *Conus* contienen una gran diversidad de toxinas, de las cuales sólo se conoce una pequeña fracción de sus blancos moleculares. La amplia gama de componentes activos provenientes de una sola especie, proveen una alta probabilidad de que presenten compuestos con actividad de activación y/o inactivación en los canales de potasio dependientes de voltaje de la familia KCNQ, característica que hace a dichas conotoxinas de interés, como herramientas de investigación electrofisiológica y para el desarrollo de nuevos fármacos.

HIPÓTESIS

En los conductos venenosos de las especies vermívoras *C. fergusonii* y *C. spurius*, se expresan toxinas con efecto en los canales de K^+ de la familia KCNQ.

OBJETIVOS

General

Caracterizar las toxinas extraídas del veneno crudo de *C. spurius* y *C. fergusonii* que presenten actividad sobre los canales de potasio subtipo KCNQ (KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 y KCNQ5).

Particulares

1. Obtener la expresión heteróloga de los diferentes subtipos de los canales de potasio de la familia KCNQ.
2. Evaluar las fracciones del veneno de *C. fergusonii* y *C. spurius* sobre los diferentes subtipos de los canales de potasio de la familia KCNQ.
3. Caracterizar bioquímicamente la toxina F2-21 de *C. spurius*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Propagación de los cDNA KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 y KCNQ5.

1.1. Preparación de células competentes.

Para la transformación, se prepararon células quimiocompetentes. Se cultivaron células XL1 Blue en cajas Petri estériles de 90x15 mm con medio LB (3 ml más 3µl de células en glicerol) adicionado con 1000 µl de tetraciclina (10 mg/ml) y se incubaron toda la noche (8 a 16 horas) a 35°C. Del cultivo de toda la noche se tomaron 1.6 ml los cuales se colocaron en un matraz de 250 ml con 50 ml de LB, para después incubarlos a 37°C hasta alcanzar una DO de 0.8. Después el cultivo se centrifugó en un tubo cónico de 50 ml a 1000 rpm (117 g) durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada (4°C) (*Eppendorf Centrifuge 5430 R*, rotor F-35-6-30) y se eliminó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en $\text{Ca}_2\text{Cl}+2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M de forma suave (para no lisar células) utilizando un décimo del volumen del cultivo. Se agregaron 88 µl de DMSO por cada ml de células en Ca_2Cl . Se hicieron alícuotas de 100 µl en tubos para microcentrifuga de 1.5 ml los cuales se congelaron inmediatamente con hielo seco y etanol, para ser almacenadas a -70°C hasta su uso. En estas condiciones, las células pueden guardarse durante varias semanas sin la pérdida de su competencia.

1.2. Transformación de células competentes

En un ambiente estéril, se descongelaron de manera lenta, sumergiendo dentro de una charola con hielo a temperatura ambiente, los tubos con células de *Escherichia coli* competentes, inmediatamente se añadió 1 µl de plásmido con una cantidad mínima de 500 ng u óptima de 1 µg (cDNA adquiridos a través de un acuerdo de “transferencia de materiales” de la Universidad de Utah del laboratorio del Dr. Baldomero Olivera). La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos, posibilitando su adsorción a la superficie celular. Se realizó un choque térmico al pasar el tubo para microcentrifuga de 1.5 ml a una temperatura de 42°C (en un bloque térmico electrónico) durante 1 minuto y enseguida se colocó en hielo durante 5 minutos, permitiendo la entrada del cDNA exógeno. Después se agregaron 900 µl de medio SOC (Anexo 1) con delicadeza (para que las células no se rompieran, pero mezclando bien) y se dejaron durante 1 hora a 37°C para su recuperación, permitiendo que el plásmido exógeno se segregue durante la división celular (3-5 generaciones).

Después de la recuperación de las cepas, se sembraron alícuotas (Anexo 2) por separado en cajas Petri con medio LB-agar selectivo, añadiendo al medio antibióticos de resistencia (en este caso, Ampicilina 80 µg/ml). Se incubaron a una temperatura de 37°C alrededor de 8 a 16 horas, tiempo en el cual ya eran visibles las colonias crecidas y transformadas sobre el medio.

Después de la incubación, se seleccionaron sólo colonias aisladas con bordes bien definidos, para ello se tomó toda la colonia con la punta de la micropipeta y se colocó en tubos cónicos estériles de 15 ml los cuales ya tenían 3ml de medio LB-líquido selectivo (ampicilina a una concentración de 1µg/ml) en un ambiente estéril. Se incubaron en agitación a 37°C durante 24 horas.

Al término de la incubación se almacenó una alícuota (500µl) en glicerol 50% a -70°C, y el resto se purificó con el kit comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System*, de la marca Promega, con el fin de obtener únicamente el DNA plasmídico.

1.3. Transcripción *in vitro* para obtener el RNA de KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 y KCNQ5.

Después de la purificación de DNA (obteniendo DNA plasmídico) de los diferentes clones se realizó una linealización utilizando enzimas de restricción como se menciona en el Anexo 3.

La digestión se realizó durante 15 minutos a 37°C, esto para linealizar el plásmido y después se purificó con el kit *EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit* (Bio Basic).

Para hacer la transcripción *in vitro* de cada subtipo de KCNQ, se utilizó el fragmento linealizado y purificado del cDNA, y el kit comercial *mMESSAGE mMACHINE Kit* (Ambion Corporation) para el promotor específico de cada plásmido (Anexo 3), para así obtener el mRNA.

En seguida el mRNA fue purificado mediante el *RNeasy Mini Kit* (Quiagen), de acuerdo con las indicaciones del fabricante, y se cuantificó mediante *Nanodrop 2000*.

1.4. Obtención de los especímenes de *Conus*

Los ejemplares de *Conus* fueron capturados con ayuda de redes camaroneras. Éstos se mantuvieron en congelación (-70°C) hasta su procesamiento [58].

1.4.1 Obtención del veneno

Se realizó la disección del cono para obtener los conductos venenosos; los conductos se colocaron en una solución de extracción proteica (2% (V/V) de ácido trifluoroacético (TFA), 40% (V/V) y acetonitrilo (ACN)). Éstos fueron macerados con el homogenizador *Tissue Tearor* 985370 de BioSpec Products, en la velocidad seis, hasta que se observó que el tejido se había disgregado en su totalidad.

Posteriormente, el extracto se pasó a tubos para microcentrífuga de 2 ml y se centrifugó a 12,000 g durante 20 minutos. El sobrenadante (fracción rica en péptidos) se separó y la concentración de proteína fue determinada utilizando *Nanodrop 2000* a una longitud de onda de 280 nm.

1.4.2. Fraccionamiento del veneno crudo por RP-HPLC

Se utilizó la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC), a temperatura ambiente, que sirve para la separación de péptidos de una mezcla compleja de compuestos biológicos (moléculas como: aa, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, plaguicidas, etc.).

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen generalmente con un tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme. En este se usó una columna C18 analítica de sílice (*Vydac* C18, 218TP54, con las medidas: 5 µm de partícula, 300 Å de poro y 250 mm x 4.6 mm). Se utilizó una precolumna C18 de sílice (*Vydac* C18, 218TP54, con las medidas: 5 µm de partícula, 300 Å de poro y 10 mm x 4.6 mm).

Se utilizaron como eluyentes la solución A que consiste de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% y H₂O grado HPLC y una solución B compuesta por TFA al 0.085% y ACN al 90% en un gradiente lineal que va del 5 al 100% de solución B en 95 minutos con un flujo de 1 ml/min (Tabla 5).

Tabla 5. Gradiente lineal utilizado. Se observa el porcentaje de solución B que va del 5 al 100% con respecto al tiempo de retención. También se consideró el porcentaje de A realizado para RP-HPLC durante el estudio.

Tiempo (min)	% solución A	% solución B	Flujo (ml/min)
0	95	5	1
5	95	5	1
100	5	95	1
101	95	5	1

Los péptidos fueron monitoreados mediante el detector de flujo del HPLC de absorción UV, a dos longitudes de onda 220 y 280 nm.

1.5. Inyección de mRNA en ovocitos de rana *Xenopus laevis*.

1.5.1. Cirugía de la rana *Xenopus laevis*, para extraer los ovocitos.

Se enfrió un litro de tricaína metanosulfonato (MS-222) al 2% con pH 7 (se metió en el congelador a -27°C durante 15-20 minutos, moviéndola constantemente para evitar la formación de hielo), una vez fría, la rana se sumergió en la solución y se sacó hasta que el organismo cesó su contracción muscular voluntaria.

Después se colocó al organismo recostado por la parte dorsal, en una charola (previamente lavada y desinfectada) con hielo, para evitar que se despierte. Se hizo un corte de aproximadamente 1 cm (primero de piel luego de músculo) en la parte baja del abdomen de lado derecho.

El corte dejó expuestos los ovarios, de uno de los cuales se retiraron fragmentos con ayuda de pinzas hemostáticas Rochester y tijeras, y se fueron colocando en tubos cónicos de 50 ml con 15 ml de una solución OR-2 (NaCl 82.5 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂·6H₂O 1 mM, HEPES 5 mM a pH 7.5), donde se lavó consecutivamente, hasta que el medio se tornó transparente.

Los ovocitos recién lavados fueron colocados en medio OR-2 con colagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1.15 mg/ml, y se agitaron manualmente durante 20 a 30 minutos, hasta que el saco se disgregó y pudieron observarse ovocitos individuales. En seguida se realizó otro lavado con OR-2 hasta que el medio se aclaró y fueron colocados en una caja de Petri estéril.

Los ovocitos se seleccionaron de forma manual, recogiendo con una pipeta Pasteur únicamente aquellos que se encontraban en estadio V y VI de desarrollo, y fueron colocados en otra caja de Petri que contenía medio extracelular ND96 (en mM: 96 de NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl, 5 HEPES, 2.5 piruvato, 0.05 mg/ml a pH=7.1-7.5) adicionado con penicilina/estreptomicina (100U/100µg)/ml y gentamicina (100 µg/ml) y se guardaron en una incubadora a 18°C para mantenerlos en buenas condiciones antes y después de la inyección de mRNA.

1.5.2. Microinyección

Con un nanoinyector *Nanoliter 2000* (*World Precision Instruments*), se inyectó cada ovocito con 50ng/50nl de mRNA, directamente en el citoplasma. Se evaluó su expresión a los 2-3 días (48-72 horas) posteriores a su inyección

Registros electrofisiológicos para evaluar el veneno fraccionado y/o purificado.

Los ovocitos se registraron con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos. Esto se realizó a partir del segundo día y hasta los tres días después de haber sido inyectados (48-72 horas). Se utilizaron ovocitos del mismo lote sin inyectar para obtener los registros control.

Para el registro se siguió un protocolo de voltaje de -70 a 70 mV con pulsos de 10 segundos e incrementos de 10 mV, con un potencial de mantenimiento de -80 mV. Para realizar los registros se utilizó la solución electrofisiológica ND96 (en mM: 96 de NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂·2H₂O, 1 MgCl₂·6H₂O, 5 HEPES) ajustado a pH 7.4 con NaOH 10 N.

Caracterización bioquímica

3.1. Determinación de la masa molecular

Este análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química, UNAM.

Los espectrómetros de masas (MS) poseen tres componentes básicos; un sistema de ionización, un analizador de masas y un detector de iones. El análisis por MS involucra a ionización de los componentes de la muestra en fase gaseosa, la separación de las especies iónicas resultantes de acuerdo a la relación de su masa con su carga eléctrica (m/z), utilizando campos electromagnéticos en el vacío.

Los péptidos purificados se sometieron a MS con el objetivo de determinar sus masas moleculares e identificar su estructura. La determinación de masas moleculares se realizó con el método de ionización: MALDI-TOF (Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz-Tiempo de Vuelo). Se usó un equipo FLEX-PC (Bruker) en modo lineal y ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) 1:5 como matriz.

Una vez que la mezcla se encuentra en la fuente de iones, las moléculas de la muestra se sometieron a fragmentación; para ello la sustancia es bombardeada con un rayo de electrones que tiene suficiente energía para romper la molécula. Los fragmentos positivos que se producen (cationes y cationes radicales, los más estables que la molécula puede formar) se aceleran en vacío a través de un campo magnético y son distribuidos en base a su relación carga/masa (m/z). Dado que la mayor parte de los iones producidos en el espectrómetro de masas conllevan una carga positiva, el valor de la relación m/z es equivalente al peso molecular del fragmento menos uno (una carga positiva). El análisis de la información del espectro de masas requiere reagrupar teóricamente los fragmentos para reconstruir la molécula original [59].

La información que arroja el espectrómetro de masas es una gráfica de intensidad relativa contra la relación m/z . El pico más intenso en el espectro se llama “pico base” y todos los demás se reportaron en relación a su intensidad.

3.2. Determinación de la estructura primaria por el principio de degradación de Edman

Este análisis se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, del Instituto de Biotecnología, UNAM, Campus Cuernavaca, utilizando un secuenciador automático de proteínas PPSQ-31A (Shimadzu).

La secuenciación de aminoácidos por degradación de Edman ha sido una de las técnicas más usadas para la determinación *de novo* de secuencias de péptidos y proteínas debido a su alta sensibilidad.

La secuenciación automatizada utilizó el reactivo de Edman (fenilisotiocianato; por sus siglas en inglés PITC) en condiciones ligeramente básicas (pH 7.5). Esta reacción resulta en la formación de un derivado cíclico feniltiocarbamilo (PTC-proteína). Posteriormente, este producto se trató con ácido trifluoroacético (TFA), que corta el residuo amino terminal y genera un derivado de tiazolinona sin hidrolizar otros enlaces peptídicos. La tiazolinona-aminoácido se extrajo de manera selectiva mediante el uso de un solvente orgánico y luego se llevó a cabo su conversión al derivado feniltiohidantoína (PTH), el cual es posible identificar mediante HPLC. Una vez que el proceso se realizó, este se repite nuevamente, lo que permite llevar a cabo la determinación de una secuencia de 30-40 residuos de aa en una operación continua.

Sin embargo, este método presenta ciertas limitaciones en términos de la longitud de la cadena que puede secuenciar de manera continua y respecto a los aa con los que puede formar derivados sin dificultad. Por consiguiente, es necesario fragmentar una proteína de gran tamaño en “trozos” más pequeños, mediante el uso de reactivos químicos como el bromuro de cianógeno (rompe la cadena proteica en el lado carboxilo de residuos de metionina), o tripsina (proteasa intestinal capaz de romper enlaces peptídicos de lado carboxilo de aminoácidos básicos; lisinas y argininas) [23, 60].

RESULTADOS

Propagación de los plásmidos correspondientes a los subtipos KCNQ (1, 2, 3 y 5)

Se propagaron los plásmidos que codifican para cada una de las subunidades de canales de la familia KCNQ, en células competentes de *E. coli*, con excepción del subtipo KCNQ4 (por no contar con el material genético). Para el caso de los subtipos KCNQ1, 2, 3 y 5 se procedió con la purificación del plásmido, linealización y generación del cRNA.

Para confirmar la identidad de los plásmidos KCNQ1-KCNQ3 se mandó a secuenciar aproximadamente 1 ng/μl de plásmido a la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, UNAM a través del Dr. Manuel Aguilar (Anexo 4).

Las secuencias de nucleótidos obtenida se alinearon utilizando la base de datos BLAST Tabla 6[61], en la siguiente tabla se resume el porcentaje de identidad para cada uno de los subtipos. Del subtipo KCNQ5 no se mandó a secuenciar puesto que coincidió el tamaño del plásmido al ser cortado con su correspondiente enzima de restricción, con el tamaño esperado de nucleótidos que corresponden al DNA que codifica para la proteína (≈2,500 nt) (resultados no se muestran).

Tabla 6. Porcentaje de identidad de los diferentes subtipos de KCNQ1, KCNQ2 y KCNQ3.

Subtipo	Identidad
KCNQ1	88% de identidad con el canal de potasio dependiente de voltaje de la subfamilia Q, miembro 1, pertenecientes a varias familias de primates, incluyendo <i>Homo sapiens</i>
KCNQ2	99% de identidad con el canal de potasio dependiente de voltaje de la subfamilia Q, miembro 2 de <i>Homo sapiens</i>
KCNQ3	100% de identidad con el canal de potasio dependiente de voltaje de la subfamilia Q, miembro 2 de <i>Homo sapiens</i>

La identidad de los subtipos KCNQ1, KCNQ2 y KCNQ3 corresponden al gen que codifica para los canales de potasio dependientes de voltaje Kv7.1, Kv7.2 y Kv7.3 en humanos.

Expresión heteróloga de KCNQ1, 2, 3 y 5 en ovocitos de *Xenopus laevis*

Los registros electrofisiológicos para los canales homólogos Kv7.1, Kv7.2, Kv7.3 y Kv7.5, así como para el canal heterólogo Kv7.2/3 fueron obtenidos a los 3 días (72 horas) después de la inyección. Se corroboró la presencia de cada uno de los subtipos mediante el uso de tetraetilamonio (TEA) a diferentes concentraciones dependiendo del subtipo, ya que es un

inhibidor inespecífico para canales de potasio dependientes de voltaje (Figuras 21, 22, 23, 24 y 25) [47, 49].

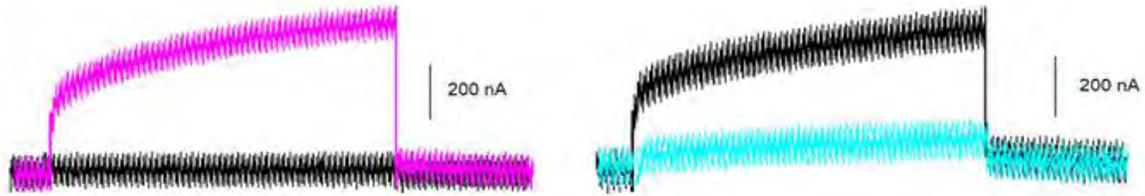
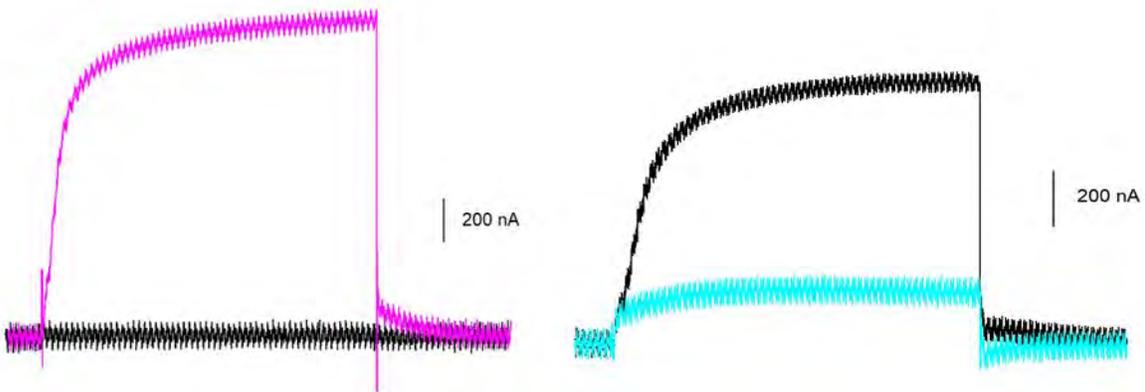


Figura 21. Registro de KCNQ1. A) protocolo de voltaje de -70 a 70 mV con pulsos de 10 s e incrementos de 10 mV, con un potencial de mantenimiento de -80 mV. Se muestran los trazos de -70 mV (negro) y de +70mV (rosa) y B) trazo al aplicar pulsos de +60 mV sin flujo en negro y en azul se muestra la inhibición al aplicar TEA [30 mM].

A

B



A

B

Figura 22. Registro de KCNQ2. A) protocolo de voltaje de -70 a 70 mV con pulsos de 10 s e incrementos de 10 mV, con un potencial de mantenimiento de -80 mV. Se muestran los trazos de -70 mV (negro) y de +70mV (rosa). B) trazo al aplicar pulsos de +50 mV sin flujo en negro y en azul se muestra la inhibición al aplicar TEA [30 mM].

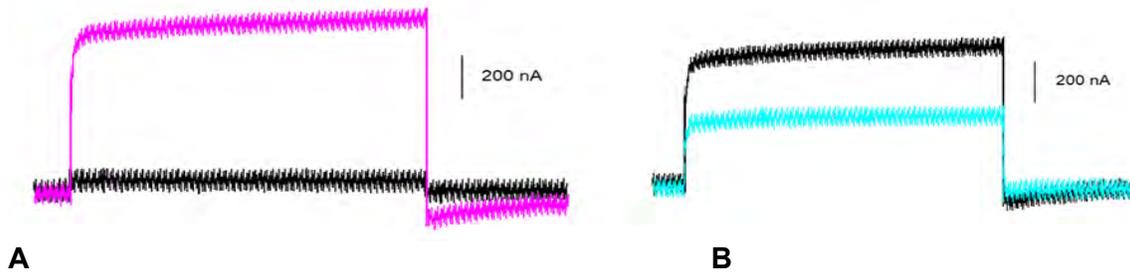


Figura 23. Registro de KCNQ3. A) protocolo de voltaje de -70 a 70 mV con pulsos de 10 s e incrementos de 10 mV, con un potencial de mantenimiento de -80 mV. Se muestran los trazos de -70 mV (negro) y de +70 mV (rosa). B) trazo al aplicar pulsos de +60 mV sin flujo en negro y en azul se muestra la inhibición al aplicar TEA [30 mM].

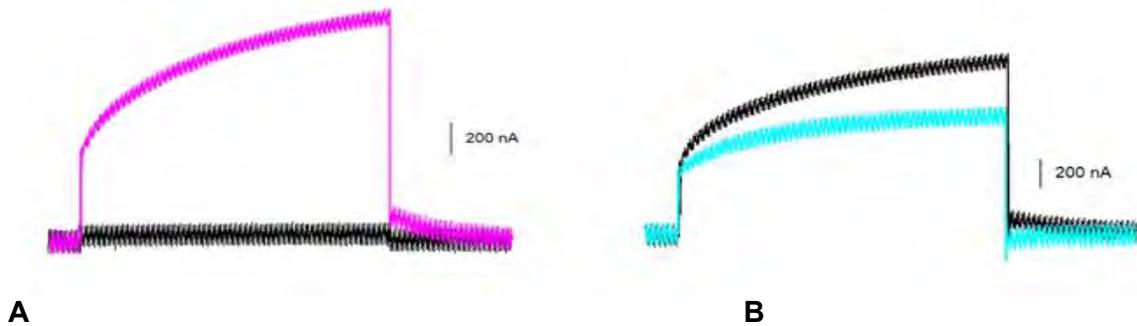


Figura 24. Registro de KCNQ5. A) protocolo de voltaje de -70 a 70 mV con pulsos de 10 s e incrementos de 10 mV, con un potencial de mantenimiento de -80 mV. Se muestran los trazos de -70 mV (negro) y de +70 mV (rosa). B) trazo al aplicar pulsos de +50 mV sin flujo en negro y en azul se muestra la inhibición al aplicar TEA [30 mM].

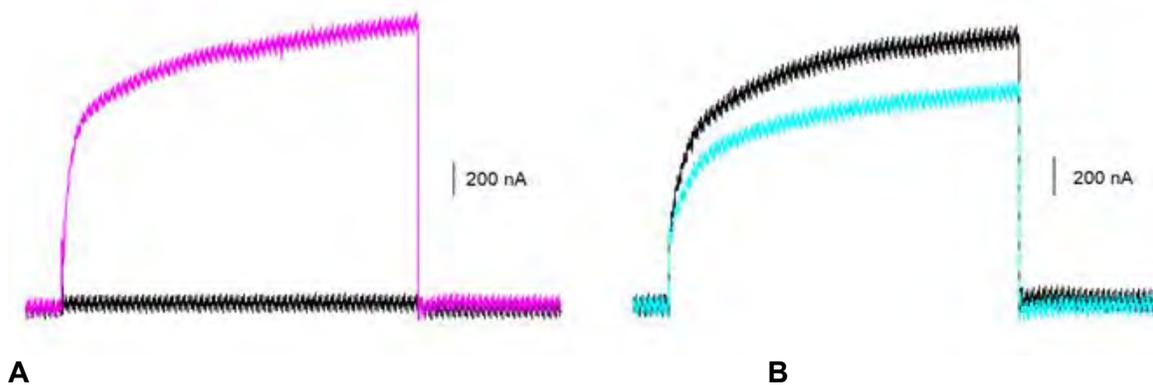


Figura 25. Registro de KCNQ2/3. A) protocolo de voltaje de -70 a 70 mV con pulsos de 10 s e incrementos de 10 mV, con un potencial de mantenimiento de -80 mV. Se muestran los trazos de -70 mV (negro) y de +70 mV (rosa). B) trazo al aplicar pulsos de +50 mV sin flujo en negro y en azul se muestra la inhibición al aplicar TEA [30 mM].

Fraccionamiento del veneno de *Conus fergusonii* por RP-HPLC.

Se extrajo de *Conus fergusonii* un total de 37 mg/ml de veneno. Se realizaron 10 corridas en RP-HPLC usando 10 mg de extracto de veneno en cada una de ellas.

Se utilizó un gradiente lineal que va de 5-100% de solución B en 95 minutos con flujo de 1 ml/min, se colectaron 12 fracciones (F1-F12), cada 5 minutos, excepto por las primeras dos (F1 y F2) que correspondieron a los minutos 0-7 y 7-10. Como resultado del fraccionamiento, se obtuvieron 12 fracciones, que fueron numeradas del 1 al 12 (Figura 26).

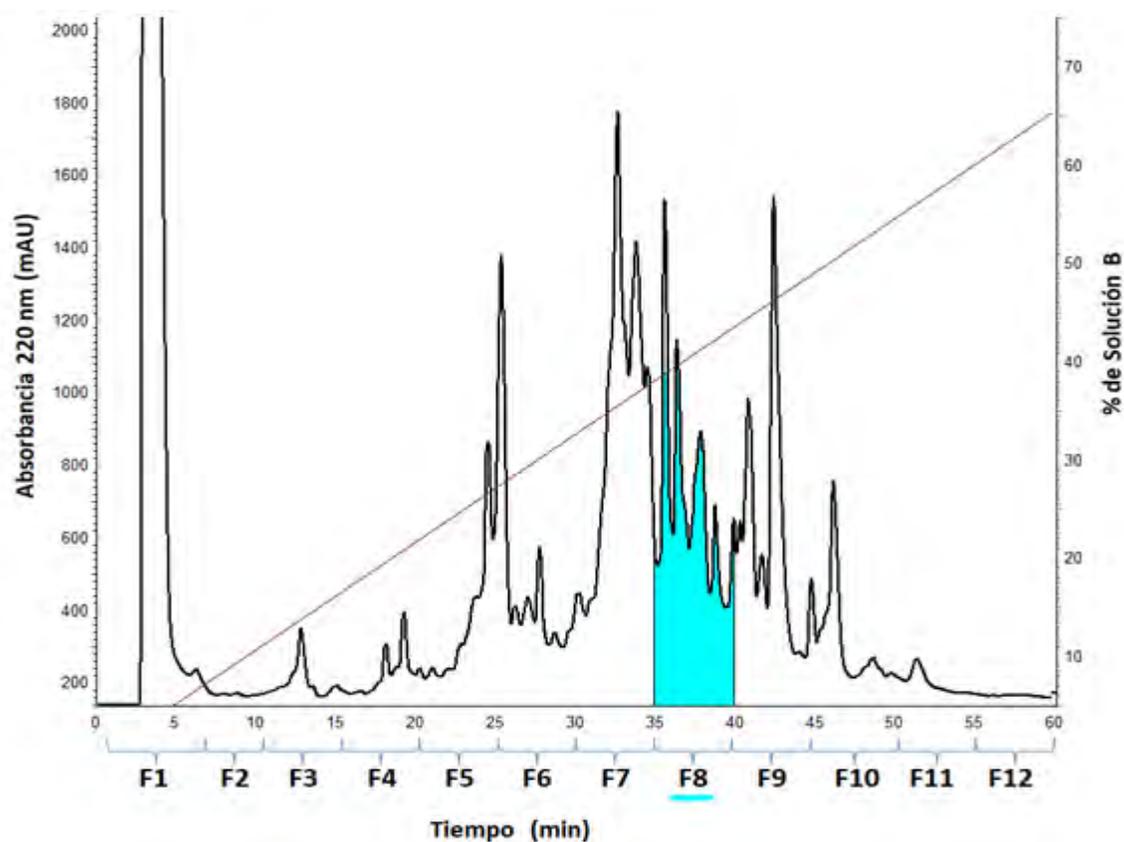


Figura 26. Perfil cromatográfico del veneno de *Conus fergusonii*. Se utilizó un gradiente lineal que va de 5 a 100% en solución B en 95 minutos con un flujo de 1 ml/min. Los corchetes inferiores indican el tiempo al cual fueron colectadas cada una de las fracciones enumeradas de la F1 a F12. En azul se muestra la fracción F8 que resultó tener actividad en un subtipo de KCNQ.

Evaluación de las fracciones obtenidas por RP-HPLC en los subtipos KCNQ expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Se hizo la evaluación de las fracciones del veneno de *C. fergusonii* a partir de la F7 a la F12, debido a que las primeras fracciones (F1-F6) tienen efecto sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina (tema de investigación de otro estudiante) [62].

La evaluación de las fracciones antes mencionadas (de F7 a F12) se realizaron utilizando 1 µg de cada fracción, en los subtipos KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ5 y KCNQ2/3.

No se observó ningún efecto en la modulación de las corrientes para los subtipos KCNQ1, KCNQ3, KCNQ5 ni en KCNQ2/3. En el caso de KCNQ2 se observó una inhibición del 18% en la corriente por parte de la fracción F8 con una cantidad de 1 µg. Se evaluó con 2 µg de la fracción F8 obteniendo una inhibición del 40% y es de señalar que al lavar la corriente regresó a su estado inicial (el efecto es reversible) (Figura 27).

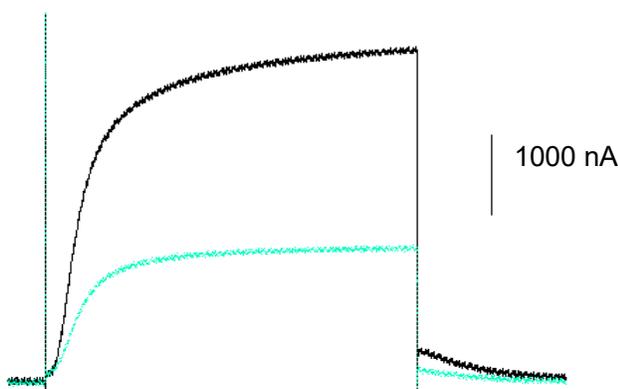


Figura 27. Inhibición de la corriente KCNQ2 al administrar 2 µg de F8. La línea negra es el trazo control con pulsos de 30 mV; línea azul amplitud de la corriente en presencia de 2 µg de F8.

Subfraccionamiento de la F8 de *C. fergusonii*

Se subfraccionó el resto del material de la fracción F8 que presentó actividad en KCNQ2, mediante RP-HPLC. Se utilizó un gradiente lineal que va de 30-50% de solución B en 50 minutos con flujo de 1 ml/min, se colectaron todas las subfracciones, pero sólo se nombraron las 6 subfracciones principales T1, T2, T3, T4, T5 y T6 (Figura 28).

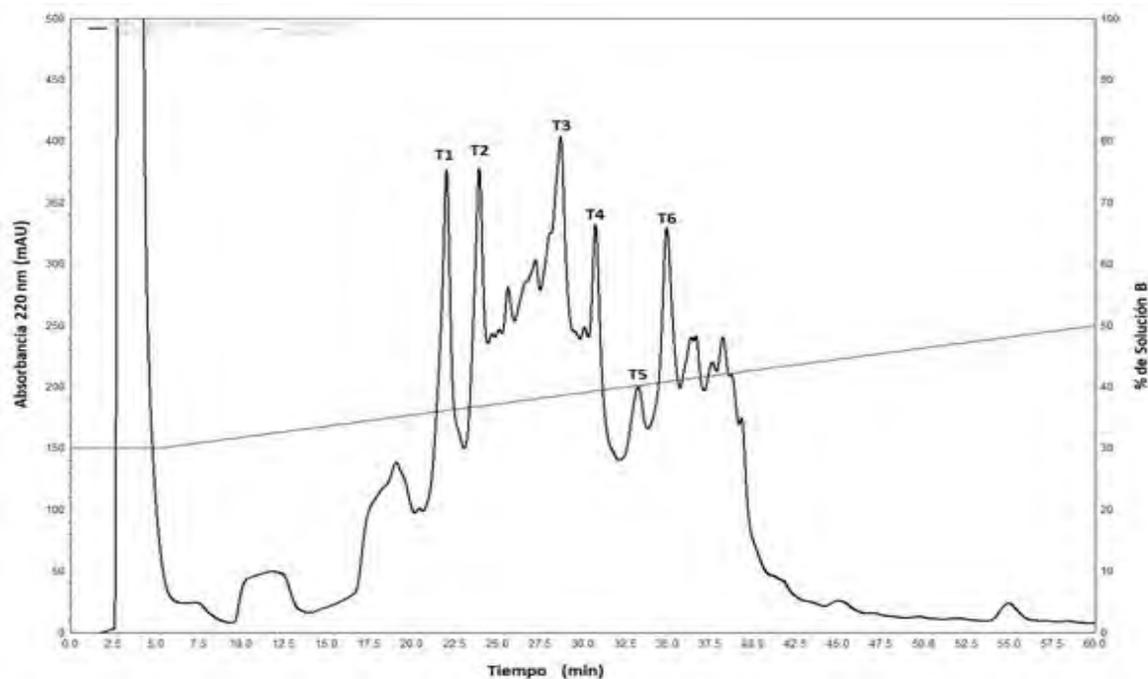


Figura 28. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la F8 del veneno de *Conus fergusonii*. Para el subfraccionamiento se utilizó un gradiente lineal que va de 30-50% de solución B en 50 minutos con un flujo de 1 ml/min, se colectaron las seis subfracciones principales (T1 hasta T6).

Evaluación de las subfracciones de *C. fergusonii* en el subtipo KCNQ2.

De la fracción F8 de *C. fergusonii*, se había obtenido 40% de actividad inhibitoria en el subtipo 2 de la familia KCNQ. Sin embargo, al evaluar de 1 a 2 μg de cada una de las subfracciones mayoritarias seleccionadas de F8 (T1-T6), no se obtuvo la actividad inhibitoria antes registrada (se realizaron triplicados).

Sin embargo, se hizo un nuevo lote de veneno con el objeto de obtener mayor cantidad de material correspondiente a la fracción F8 y poder reevaluar el efecto de ésta en el canal KCNQ2. No fue posible reproducir el efecto inhibitorio (datos no se muestran).

Evaluación de subfracciones de *Conus spurius* en los subtipos de canal de potasio KCNQ2/3 expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

El fraccionamiento del veneno de *C. spurius* se realizó con un gradiente lineal de 5 a 100% de solución B en 95 minutos con un flujo de 1 ml/min. Se recolectaron 8 fracciones (de la F0 a F8), una cada 10 minutos, excepto por la F0 que fue del minuto 5 al 10 (Figura 29).

Ensayos previos del veneno de *C. spurius* en cepas mutantes de canales de potasio de *Drosophila melanogaster* (cepa *eag* (o *KCNH1*) y *Shaker*; *Kv1* en mamíferos) indican que las subfracciones F2-21 y F6-T6 afectan la sobrevivencia de estas moscas [63].

El subfraccionamiento de la fracción F2 se realizó con un gradiente lineal de 15 a 35% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1ml/min, cada componente mayoritario fue recolectado y numerado conforme a su elusión (Figura 30).

Mientras que el subfraccionamiento de F6 se hizo con un gradiente lineal de 55 a 75% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1ml/min, cada componente mayoritario fue recolectado y numerado de acuerdo a su tiempo de elusión (Figura 31).

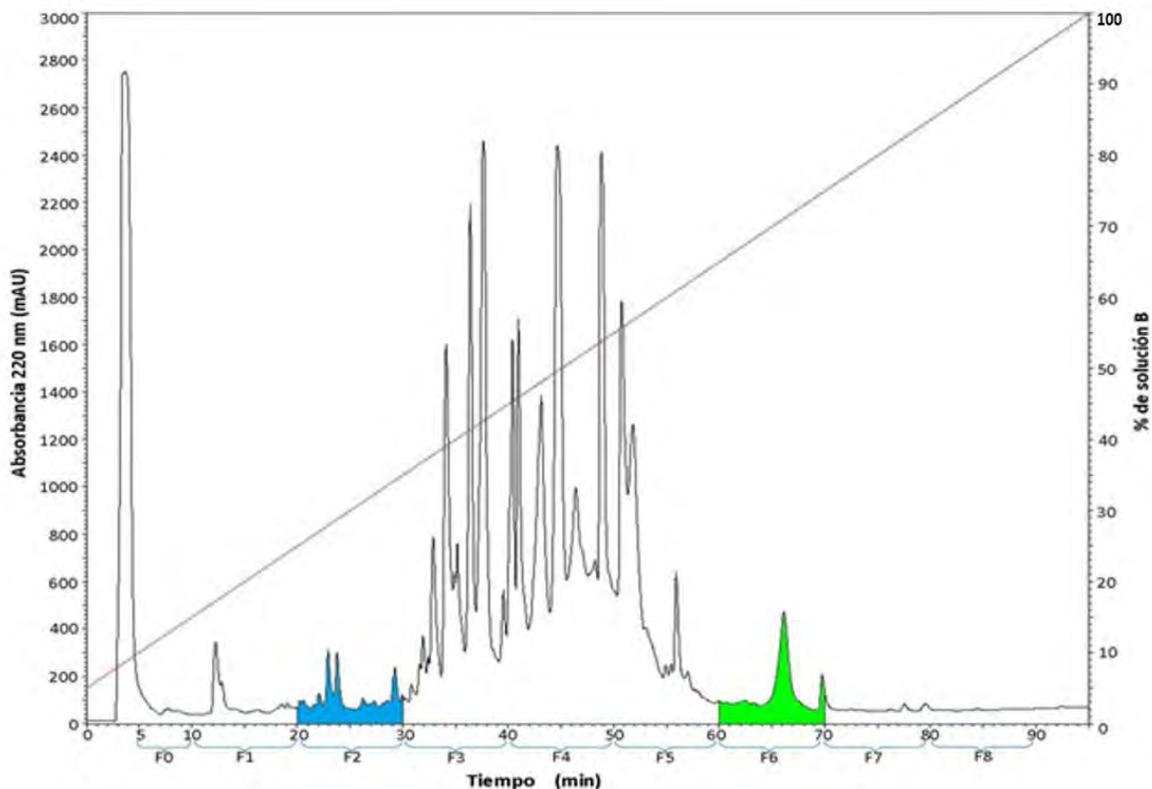


Figura 29. Perfil cromatográfico del veneno de *C. spurius*. El fraccionamiento se realizó con un gradiente lineal que va de 5-100% de solución B en 95 minutos con un flujo de 1 ml/min. Los corchetes inferiores indican el tiempo al cual fueron colectadas cada una de las fracciones enumeradas de la F0 a F8. En azul se muestra la fracción F2 y en verde la F6 que resultaron tener actividad en cepas mutantes de canales de potasio de *Drosophila melanogaster* (cepa *eag* y *Shaker*).

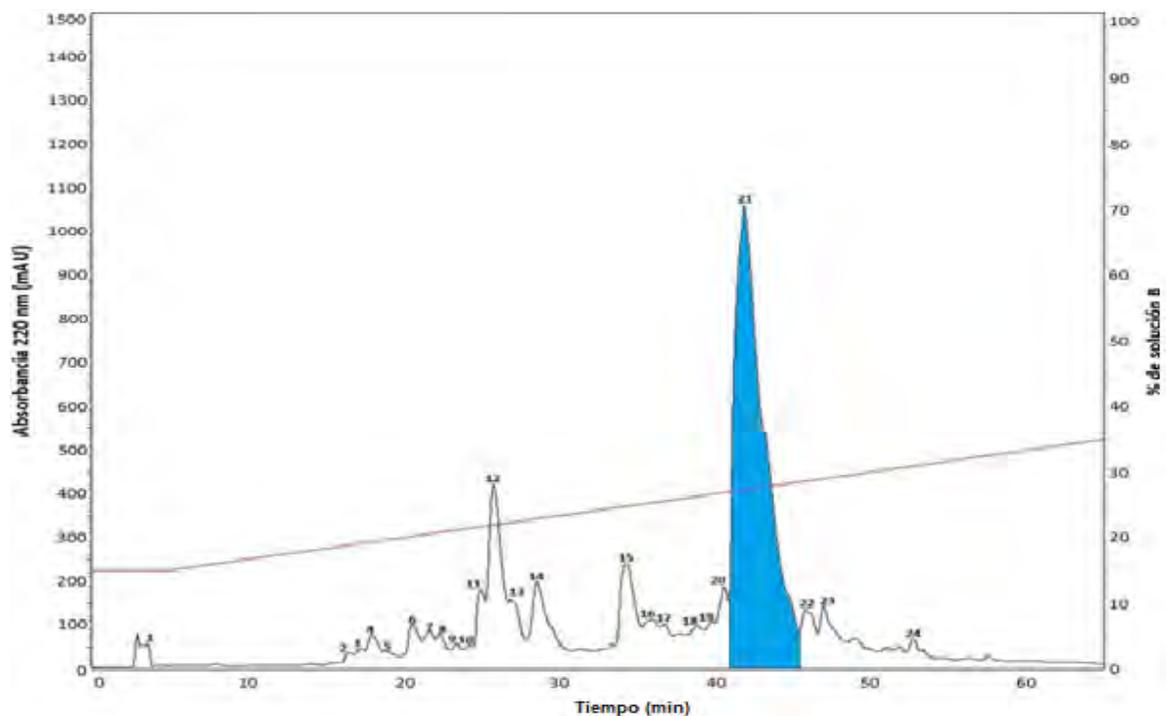


Figura 30. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F2 del veneno de *C. spurius*. El subfraccionamiento se realizó con un gradiente lineal que va de 15-35% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 ml/min. En azul se muestra la subfracción F2-21.

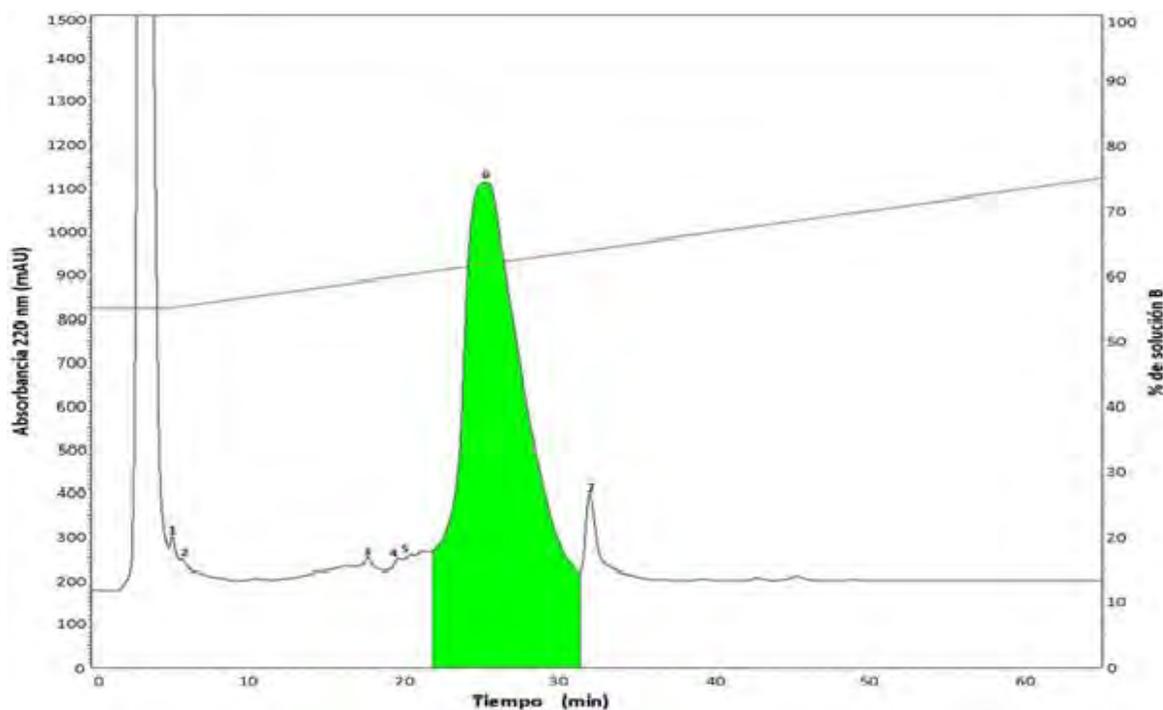


Figura 31. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F6 del veneno de *C. spurius*. El subfraccionamiento se realizó con un gradiente lineal que va de 55-75% de solución B en 65 minutos con un flujo de 1 ml/min. En verde se muestra la subfracción F6-T6.

Se evaluaron las dos subfracciones previamente ensayadas en *D. melanogaster* en el subtipo KCNQ2/3, expresado en huevos de *X. laevis*.

La subfracción F2-21 inhibió un 23% de la corriente de potasio (Figura 32), mientras que la subfracción F6-T6 inhibió al heterómero en un 31% (Figura 33), ambas utilizando aproximadamente 2 µg.

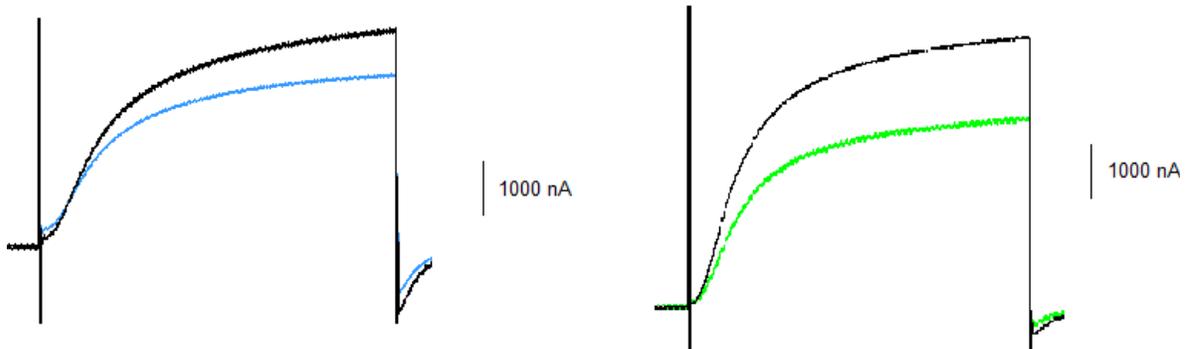


Figura 32. Inhibición de KCNQ2/3 por F2-21. La línea negra muestra el trazo control al despolarizar a 20 mV. La línea azul muestra el trazo después de aplicarse la subfracción.

Figura 33. Inhibición de KCNQ2/3 por F6-T6. La línea negra muestra el trazo control al despolarizar a 20 mV. La línea verde muestra el trazo después de aplicar la subfracción.

Evaluación de las subfracción C2L3 de *Conus spurius* en el subtipo KCNQ2/3

Al observar una inhibición del 31% de las corriente de potasio en KCNQ2/3 por la subfracción F6-T6, se decidió obtener mayor cantidad de material, para ello se juntaron las fracciones correspondiente a F6, a partir de 8 fraccionamientos del veneno crudo de *C. spurius*. Al ser un lote nuevo, se le nombró a la subfracción como C2L3 (Figura 34).

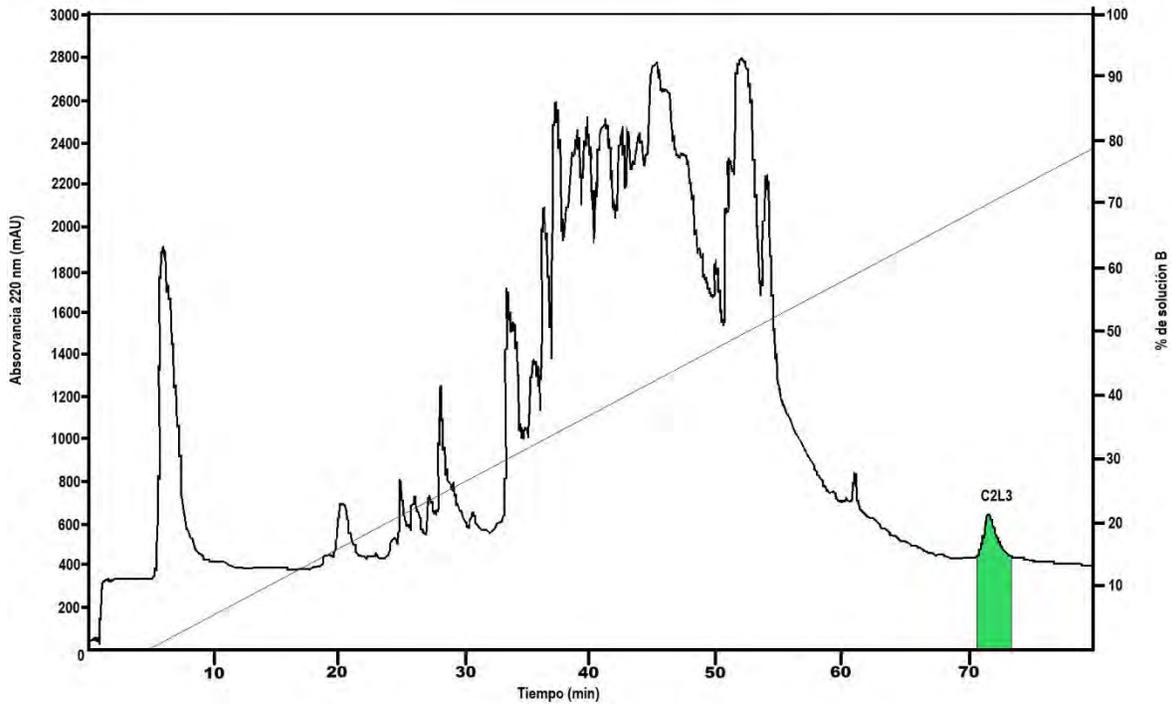
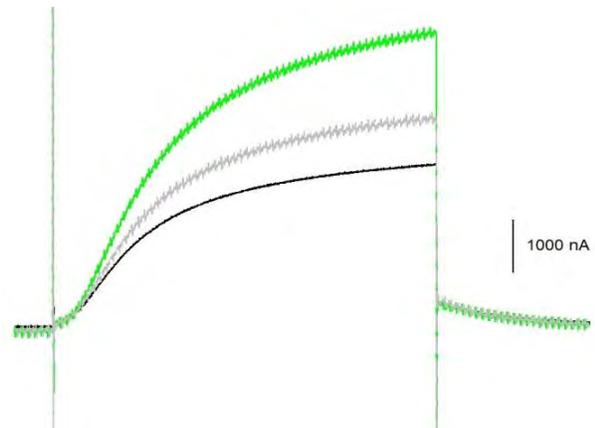


Figura 34. Perfil cromatográfico de otro lote de veneno de *C. spurius*. El fraccionamiento se realizó con un gradiente lineal que va de 5-100% de solución B en 95 minutos con un flujo de 1 ml/min. La fracción C2L3 se observa color verde.

La evaluación electrofisiológica de 2 μ g de la subfracción C2L3 sobre el subtipo KCNQ2/3 (por triplicado) mostró una actividad agonista de 48% (Figura 35). Es de mencionar que la amplitud de la corriente no regresó a su estado basal después de lavar.

Figura 35. Activación de KCNQ2/3 por C2L3. Línea negra; trazo control al despolarizar a 20 mV, línea verde; trazo después de aplicar la subfracción; trazo gris, recuperación después del lavado de la toxina.



Una vez obtenidas las subfracciones que presentaron actividad en el canal heterólogo KCNQ2/3, ya purificadas por RP-HPLC, se procedió a caracterizarlas químicamente.

Espectrometría de masas

Se envió aproximadamente 1 nmol de las muestras F2-21, F6-T6 y C2L3, al Laboratorio de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química, UNAM (ver Pág. 36 en “Materiales y Métodos”) para su análisis por espectrometría de masas. La cantidad enviada para el análisis se determinó a través de la función de “área bajo la curva” de sus respectivos cromatogramas utilizando el software del sistema HPLC *Agilent Technologies Infinity 1260*, y se tomó como referencia el área obtenida para 5 nmol de α -RglA (compuesto sintético) de una conotoxina de 13 aa, que actúa sobre RnACh. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 7. Concentración de las subfracciones que presentaron actividad en KCNQ2/3.

Muestra	F2-21	F6-T6	C2L3
Área bajo la curva	63,088,957	14,514,743	19,875,418
Cantidad (nmol)	60.099	13.826	18.933
*El área bajo la curva de α -RglA es 5,248,738 que corresponde a 5 nmol.			

Se obtuvieron las masas experimentales para las tres subfracciones, cuyos espectros indican una masa/carga monoisotópica de 1,544.598 Da (Figura 36), 3,132.586 Da (Figura 37) y 3,131.298 Da (Figura 38) respectivamente. Las masas experimentales se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Masa experimental obtenida para los componentes purificados.

Muestra	F2-21	F6-T6	C2L3
Masa experimental (m/z)	1,544.598	3,132.586	3,131.298
Masa experimental (Da)	1,543.598	3,131.586	3,130.298

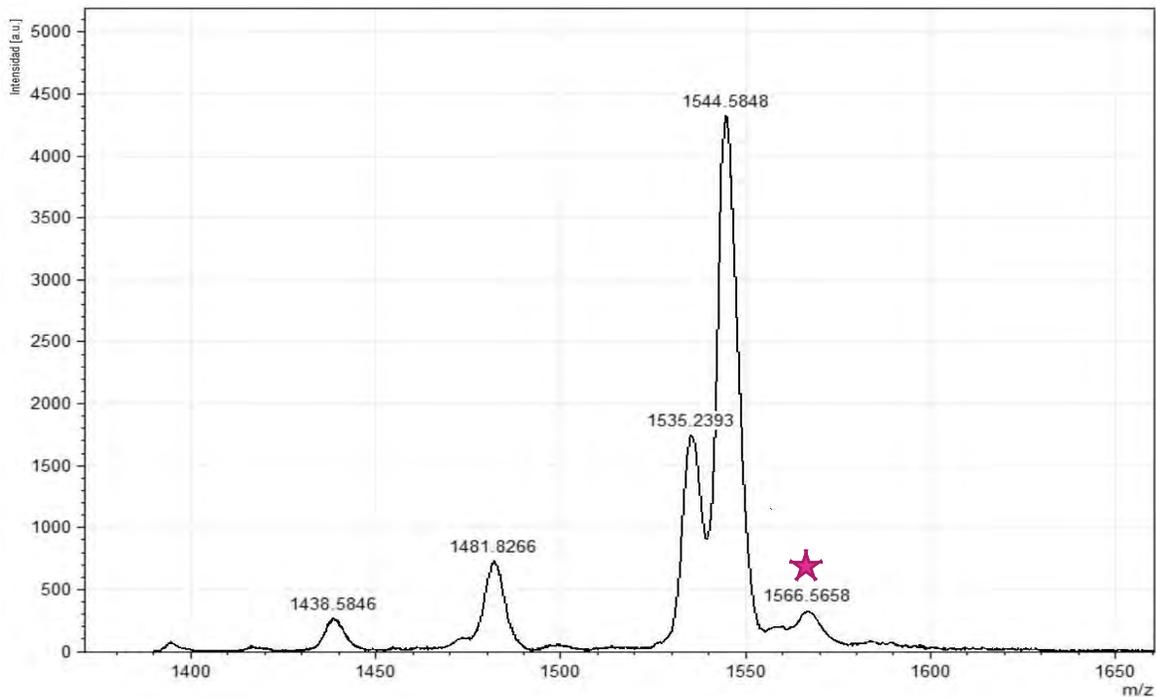


Figura 36. Espectro de masas de la subfracción F2-21. El pico base corresponde a un analito de 1544.5848 (m/z). También puede verse un pico minoritario que corresponde a un analito de 1566.5658 (m/z) que se encuentra resaltado con una estrella.

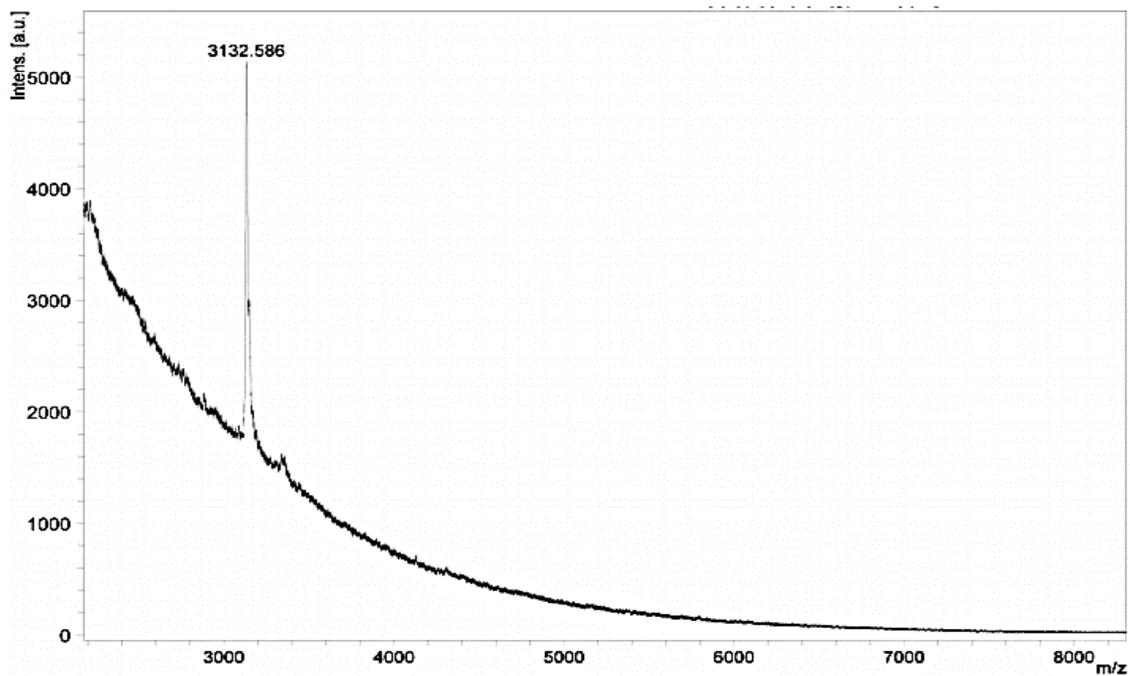


Figura 37. Espectro de masas de la subfracción F6-T6. El pico base corresponde a un analito de 3132.586 (m/z).

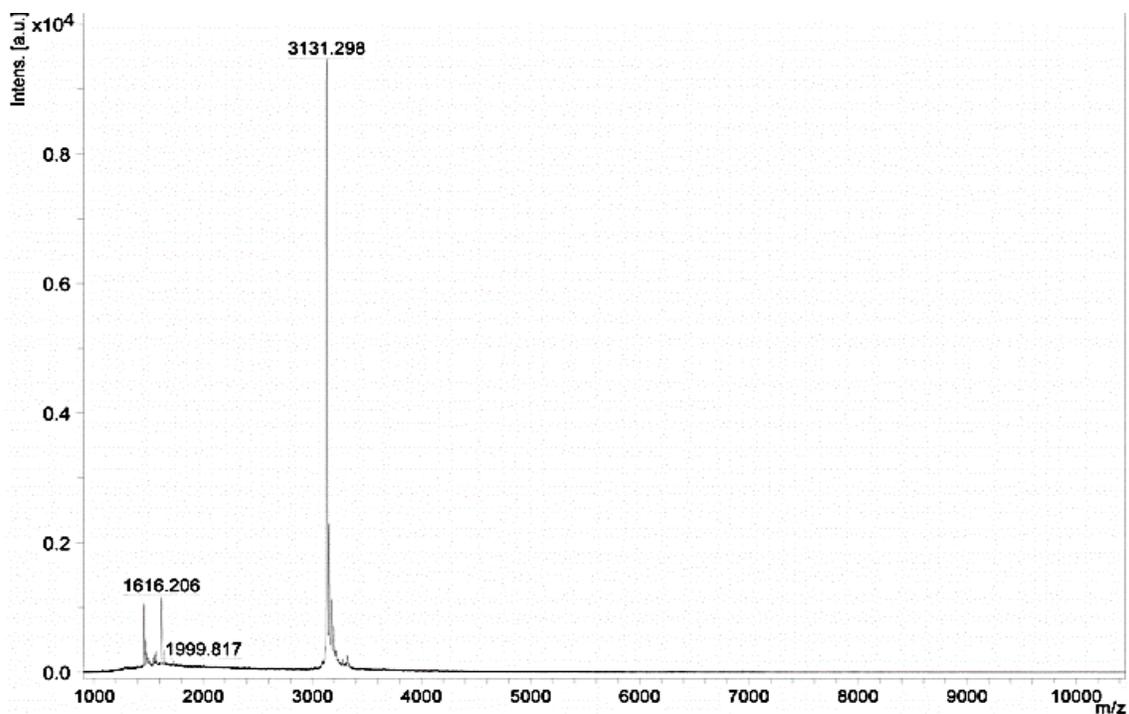


Figura 38. Espectro de masas de la subfracción C2L3. El pico base corresponde a un analito de 3131.298 (m/z). El obtener varios iones indica varios componentes en la muestra.

Determinación de la estructura primaria de la subfracción F2-21

De los tres componentes que fueron sometidos a espectrometría de masas, únicamente la subfracción F2-21 se eligió para llevar a cabo la determinación de su estructura primaria debido que las otras dos subfracciones se utilizaron en otros ensayos electrofisiológicos.

Una vez que la degradación de Edman fue llevada a cabo, se obtuvo una secuencia de 12 residuos de aminoácidos (Anexo 5 Anexo 5):



DISCUSIÓN

Las toxinas de origen peptídico presentes en los animales venenosos son un claro ejemplo de las estrategias evolutivas de éstos como son para: la captura, la defensa y la competencia. El veneno de los caracoles marinos del género *Conus* es una fuente rica de péptidos con actividad biológica; cada cónido puede llegar a presentar hasta 100 toxinas diferentes. Estas toxinas tienen un tamaño molecular pequeño (típicamente <5 kDa), son relativamente fácil de sintetizar, presentan estabilidad estructural y son altamente específicas; esto las hacen ideales para pruebas farmacológicas y útiles herramientas en ciencia básica [17].

Dichos péptidos pueden agruparse de acuerdo a un sistema de clasificación determinado basado principalmente en sus blancos moleculares o, la posición y conectividad de sus residuos de Cys; es por ello que para poder clasificar una nueva conotoxina es necesario realizar una serie de análisis químicos como pueden ser: la espectrometría de masas, secuenciación y técnicas electrofisiológicas, entre otras. Esto propicia a que en muchas ocasiones, la caracterización resulte complicada, principalmente porque el veneno que es producido por los caracoles está en concentraciones muy bajas y las toxinas pueden presentar diferentes estados de maduración; aunado a modificaciones post-traduccionales que complican su análisis; esto conlleva a que en su proceso de caracterización, haya una pérdida de material que puede llegar a ser mayor al 70% [64].

Es por ello que el material que se logra purificar debe ser cuidadosamente utilizado para optimizar su uso. Especialmente cuando la cantidad de cierta fracción es mínima, se tiende a recurrir a bioensayos que sean rápidos, sencillos y que necesiten una cantidad reducida de material para evaluar la toxicidad de las mismas [58]. Por esta razón se utilizó para el veneno crudo de las dos especies estudiadas en este trabajo, una colecta de los componentes peptídicos cada cinco o diez minutos en lugar de hacerlo por señales individuales en el cromatograma de manera tal que facilitara la identificación de compuestos activos y en segundo término purificar el componente activo [63].

Para este trabajo se utilizaron dos especies: *C. fergusonii* y *C. spurius*, especies que habitan en aguas mexicanas y de las cuales, hasta el momento, no se tienen reportes de ser especies amenazadas [20, 22].

Es irónico que la razón por la que se descubrieron algunos de los primeros genes de los canales de K^+ fue porque produjeron cambios fenotípicos en *Drosophila melanogaster*, cuando mutaron espontáneamente. Ejemplos como *Shaker* y *ether-a-go-go (eag)* ilustran este punto. Esto condujo al descubrimiento de genes homólogos en insectos y mamíferos. Recientemente, se ha descubierto que todas las mutaciones en la familia de canales de potasio KCNQ están relacionadas directamente con una enfermedad [47]. Por esa razón se decidió utilizar los canales de potasio de la familia KCNQ como un blanco molecular para el estudio de nuevas conotoxinas, recalcando la importancia de obtener compuestos específicos que los modulen.

De esta manera y para asegurarnos de que el material genético con el que se contaba era el correcto para la expresión de los subtipos de KCNQ1, KCNQ2 y KCNQ3; fue necesario mandar a secuenciar sus plásmidos correspondientes. Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos se realizó la alineación en una base de datos gratuita (blast.ncbi.nlm.nih.gov), que confirmó la identidad de los tres subtipos: de 99 y 100% de homología para los subtipos KCNQ2 y KCNQ3 de la especie *Homo sapiens*, mientras que KCNQ1 resultó en 88% para varias familias de primates, incluyendo *Homo sapiens*; este menor porcentaje de similitud, se debe a que la región codificante mostró muchos nucleótidos indeterminados, pero en realidad es también un plásmido que codifica para canales de potasio de *Homo sapiens* (Anexo 4).

A la fecha las corrientes de KCNQ han sido eficientemente expresadas de forma heteróloga en ovocitos de *X. laevis*, además de que dicha expresión presenta otras ventajas como: se pueden extraer cientos de células viables y duraderas de una sola rana sin matarla, son células grandes (>1.3 mm), se puede usar DNA o RNA para su expresión y presenta pocos canales endógenos [65, 66]. Aunque hay que considerar otros aspectos para su mantenimiento, en general permiten una manipulación sencilla. Por todo ello, se decidió utilizar este sistema de expresión, en el cual, tuvimos éxito en expresar los homómeros y heterómeros de la familia de canales de potasio KCNQ.

Entre las conotoxinas que han sido hasta ahora estudiadas, y de las cuales se conoce su blanco molecular, en 2% de ellas se han identificado actividad moduladora para canales de potasio, pero ninguna de ellas ha mostrado ser específica para los K_v de la familia KCNQ, aunque sí han identificado toxinas que no tienen ningún efecto en ellos [30].

Durante este estudio, se evaluaron las fracciones (de la F7 a F12) de *C. fergusonii*, en los homómeros KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ5 y en el heterómero KCNQ2/3, de las cuales únicamente la fracción F8 mostró actividad en el subtipo KCNQ2. Sin embargo, al repurificar y evaluar los componentes mayoritarios de otro lote de veneno que corresponde a la F8, no se encontró el mismo efecto. Resolviendo que al menos los componentes más hidrofóbicos del veneno de *C. fergusonii* (de las fracciones F7 a F12), ninguno presenta actividad en los subtipos KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ5 y KCNQ2/3.

Uno de los subtipos de la familia de KCNQ mayormente estudiados es el heterómero KCNQ2/3, que se encuentra principalmente en sistema nervioso y tiene un importante papel en la modulación de la excitabilidad neuronal; por ello es un nuevo blanco molecular en el desarrollo de fármacos para trastornos neuropsiquiátricos como epilepsia, dolor, ansiedad, desórdenes bipolares, esquizofrenia, entre otros [67]. La expresión del heterómero facilita su estudio debido a que el registro de sus corrientes son 10 veces mayores, a las esperadas a partir de la simple suma de las corrientes producidas por los homómeros KCNQ2 y KCNQ3 [47]. Por ello se decidió utilizar el heterómero KCNQ2/3 para los ensayos con el veneno de *C. spurius*.

De acuerdo a los estudios electrofisiológicos realizados de las subfracciones provenientes de *C. spurius*, dos mostraron actividad, F2-21 y F6-T6, ambas de inhibición (Figura 32 y Figura 33, respectivamente) sobre el subtipo KCNQ2/3.

Sin embargo, al realizar ensayos en el subtipo KCNQ2/3 con un componente supuestamente equivalente al F6-T6 (la subfracción C2L3), se observó que la actividad era contraria al resultado anterior, pues activó al canal durante los ensayos (por triplicado) (Figura 35). Esto puede ser debido al mal estado en el que se encontraban los ovocitos durante el ensayo con F6-T6, puesto que presentaban alteraciones en su coloración en el polo animal (puntos blancos) que podían atribuirse a una infección bacteriana [68].

Es de mencionar que F2-21 y F6-T6, eluyeron a muy diferentes porcentajes de solución B, esto indica que F2-21 es un componente hidrofílico (Figura 30), contrario a F6-T6 que eluyó a porcentajes mayores de acetonitrilo en la solución, es decir, más hidrofóbico (Figura 31). Los espectros de masas de ambas subfracciones, son espectros con una señal mayoritaria.

La subfracción C2L3 es equiparable con F6-T6 puesto que sus pesos moleculares no difieren por más de 1 Da. Donde C2L3 tiene una masa experimental de 3,130.298 (Figura 38) y F6-T6 de 3,131.586 (Figura 37), lo cual indica que ambas muestras son el mismo

compuesto. La diferencia en una unidad podría deberse a una desamidación del extremo carboxilo de F6-T6 respecto a C2L3 [69]. Dicha modificación es muy común en las conotoxinas ya que las protege de la degradación por carboxipeptidasas y puede promover la estabilización de la estructura secundaria del péptido y mejora la unión de la toxina con su receptor [70, 71].

De los compuestos puros se enviaron a secuenciar dos de ellos, F2-21 y C2L3, y únicamente se obtuvo una secuencia de aminoácidos para F2-21. La no obtención de secuencia para C2L3, no puede estar relacionada a la cantidad de muestra enviada ya que la cantidad enviada fue de 28 nmol (en general 1 nmol es suficiente para este tipo de análisis), sin embargo, existen otros factores de los que depende un buen resultado: la existencia de una modificación post-traduccional en la región N-terminal del compuesto que impide el acople de PITC durante la degradación de Edman, al manejo de la muestra o bien, que se trate de un péptido cíclico [62].

La subfracción F2-21 resultó en un péptido de 12 aminoácidos de longitud (GPM γ PRFYFIRL), sin ningún residuo de cisteína. Se sabe que dentro de los conopéptidos existen toxinas sin residuos de cisteínas y se han agrupado dentro de las superfamilias de las contulaquinas, conantoquinas y conorfamidas, entre otras [69].

A partir de esta secuencia, se obtuvo la masa promedio calculada, con ayuda del programa IonSource (ionsource.com) de 1567.78 Da, considerando el extremo carboxilo amidado. Esta masa no concuerda con el peso experimental monoisotópico del ión molecular más abundante en el espectro de masas que es de 1543.58 Da (una vez restada la carga +1), sin embargo en el mismo espectro de masas existe un ión molecular cuyo peso experimental monoisotópico es de 1565.56 (una vez restada la carga +1) (Figura 36) que resulta en una diferencia de 2.22 Da. Tomando en cuenta: 1) que todas las conorfamidas caracterizadas hasta la fecha tienen amidado su extremo carboxilo; y 2) que la exactitud de la espectrometría de masas por MALDI-TOF es de 0.1% [72], es decir, ≈ 1.5 Da para el caso de F2-21. Este resultado indica que la secuencia de aminoácidos de F2-21 está completa.

El haber tenido un ion molecular mayoritario de 1543.58 Da, pudiera deberse a otro péptido que no pudo ser visto durante la secuenciación de Edman, debido a otros factores que ya se mencionaron anteriormente (como en el caso de C2L3).

Una vez dilucidada la secuencia de F2-21 se procedió a comparar con otras secuencias peptídicas reportadas para el género *Conus* a través de los servicios provistos por BLAST [61], presentó similitud con respecto a la Conorfamida-Sr2 (CNF-Sr2) (Tabla 9).

Tabla 9. Alineamiento de secuencias obtenido a través de BLAST. Se muestra el nombre del péptido en cuestión (1ª columna), el alineamiento obtenido (2ª columna) junto con la posición del aminoácido a partir de donde se inició el alineamiento y las sustituciones de aminoácidos con carga similar (+), el porcentaje de identidad (3ª columna), el porcentaje de similitud (4ª columna) y el puntaje del alineamiento.

Péptido	Alineamiento	% Identidad	% Similitud	Puntaje
F2-21	GPME 4	100%	33%	17.2
CNF-Sr2	GPME 4			

No obstante, el programa de BLAST solo da una identidad de 100% al comparar los cuatro primeros aminoácidos. Sin embargo, se realizó una comparación con las tres conorfamidas descritas hasta la fecha, extraídas y purificados de *C. spurius* que son: CNF-Sr1, CNF-Sr2 y CNF-Sr3, que pertenecen a la familia de neuropéptidos RFamidas (también conocidos como péptidos relacionados a la FMRFamida: Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) (Figura 39). Estas RFamidas participan en una amplia variedad de procesos fisiológicos en moluscos, incluyendo funciones vitales básicas, reproducción y desarrollo, entre otros. La comparación de F2-21 con las tres conorfamidas (CNF-Sr1, CNF-Sr2, CNF-Sr3) resultó en un 41.66%, 50% y 33.33% de similitud, respectivamente. Es de notar que en la región carboxilo terminal se comparten los residuos de aminoácidos Phe, Arg e Ile que indica su relación con las FMRFamidas (Figura 39).

CNF-Sr1				G	P	M	G	W	V	P	V	F	Y	R	F	-NH ₂
CNF-Sr2				G	P	M	Y	D	P	L	Y	I	I	R	I	-NH ₂
CNF-Sr3	A	T	S	G	P	M	G	W	L	P	V	F	Y	R	F	-NH ₂
F2-21				*	*	*	*					*	*	*		
				*	*	*	*					*	*	*		
				G	P	M	Y	P	R	F	Y	F	I	R	L	-NH ₂

Figura 39. Estructura primaria de conorfamida-Sr1 y conorfamida-Sr2 en comparación con F2-21. El código de una letra es empleada para los residuos de aminoácidos estándar. Para las modificaciones post-traduccionales: Y, gamma-carboxiglutamato y -NH₂ es la amidación del extremo carboxilo. Los (*) indican la posición donde se encuentran los residuos de aminoácidos conservados.

Es de resaltar que la CNF-Sr2 y nuestro péptido, comparten la carboxilación del glutamato en la posición número 4. Además que en todas las conorfamidas, el carboxilo terminal está amidado. Es de mencionar, que dentro de las conorfamidas, sólo se ha demostrado la actividad para la CNF-Sr3, que bloquea canales de potasio tipo *Shaker*.

Con base a estos resultados podemos decir que hemos caracterizado una nueva conorfamida la cual sería nombrada como CNF-Sr4 que tiene actividad antagonista sobre un canal de potasio de la familia KCNQ del subtipo 2/3.

CONCLUSIONES

- Los componentes del veneno de *C. fergusonii* no presentaron ninguna actividad sobre los diferentes subtipos de canales de la familia KCNQ (KCNQ1, KCNQ2, KCNQ5 y KCNQ2/3).
- En el veneno de *C. spurius* existen dos componentes (F2-21 y F6-T6) con actividad sobre el subtipo KCNQ2/3. La subfracción F2-21 presenta una actividad antagonista, con un 23% de inhibición de la corriente, mientras que F6-T6 (C2L3) resultó activar 48% al heterómero.
- La secuencia primaria para F2-21 es GPM γ PRFYFIRL-NH₂, lo cual indica que es una nueva conorfamida, cuyo nombre sería CNF-Sr4.

Perspectivas

- Sintetizar F2-21 para determinar la constante de inhibición media (IC₅₀) sobre el subtipo KCNQ2/3.
- Hacer proteómica del conducto venenoso del *C. spurius* para determinar la secuencia de aa de C2L3.

REFERENCIAS

1. Hickman Jr, C.P., *Principios integrales de zoología*. 2009.
2. asturnatura.com. *Características generales de los Moluscos*. 2017; Available from: <https://www.asturnatura.com/moluscos/caracteristicas-moluscos.html>.
3. Saxena, A., *Text book of mollusca*, ed. DPH. 2005, India. 527.
4. Llosa, Z.B., *Zoología General*. 2003: EUNED. 505.
5. Álvarez, F.P., et al., *Zoología aplicada*. 2003: Díaz de Santos.
6. Brusca, R., D. Lindberg, and W. F. Ponder, *Phylum Mollusca*. 2016. 451-530.
7. Marshall, A.J. and W.D. Williams, *Zoología. Invertebrados*. 1985: Reverté.
8. Beltrán, G.J.F., B.M. Conradi, and G.C.J. J. *Características de los principales grupos de moluscos gasterópodos*. Zoowiki 2017 [13/02/2017]; Available from: <https://www.bioscripts.net/zoowiki/temas/12A.html>.
9. Olivera, B.M., "Conus" Venom Peptides: Reflections from the Biology of Clades and Species. Annual Review of Ecology and Systematics, 2002: p. 25-47.
10. Taylor, J., Y.I. Kantor, and A. Sysoev, *Foregut anatomy, feeding mechanisms, relationships and classification of the Conoidea*. Bulletin of the Natural History Museum. Zoology series, 1993. **59**(2): p. 125-170.
11. Board, W.E. *World Register of Marine Species*. 2016 [cited 2016 09/01/2016]; Available from: <http://www.marinespecies.org>.
12. Puillandre, N., et al., *One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails*. Journal of Molluscan Studies, 2014: p. eyu055.
13. Dutertre, S. and R.J. Lewis, *Cone snail biology, bioprospecting and conservation*. Snails: Biology, Ecology and Conservation, 2012: p. 85-105.
14. Peters, H., et al., *Conus: First comprehensive conservation Red List assessment of a marine gastropod mollusc genus*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83353.
15. Jenkins, C.N. and K.S. Van Houtan, *Global and regional priorities for marine biodiversity protection*. Biological Conservation, 2016. **204**: p. 333-339.
16. Terlau, H. and B.M. Olivera, *Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides*. Physiological reviews, 2004. **84**(1): p. 41-68.
17. Lewis, R.J., et al., *Conus venom peptide pharmacology*. Pharmacological reviews, 2012. **64**(2): p. 259-298.
18. Marshall, J., et al., *Anatomical correlates of venom production in Conus californicus*. The Biological Bulletin, 2002. **203**(1): p. 27-41.
19. Halai, R. and D.J. Craik, *Conotoxins: natural product drug leads*. Natural Product Reports, 2009. **26**(4): p. 526-536.
20. Tenorio, M.J. *Conus fergusonii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T192566A2117478 2013 [cited 2017 07 Noviembre]; Available from: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T192566A2117478.en>.
21. McLean, J. and J. Nybakken, *Growth-stages of Conus fergusonii Sowerby, 1873, the Reinstatement of Conus xanthicus Dall, 1910 and a New Species of Conus from the Galápagos Islands*. Veliger, 1979. **22**(2): p. 135.
22. Petuch, E. *Conus spurius*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T192525A2109173 2013 [cited 2017 07 Noviembre]; Available from: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T192525A2109173.en>.
23. Luna Ramirez, K.S., *Purificación y caracterización química y biológica de peptidos del veneno de Conus spurius*, in Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. 2006, UNAM: CDMX. p. 103.

24. Kohn, A.J., P. Saunders, and S. Wiener, *Preliminary studies on the venom of the marine snail Conus*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1960. **90**(3): p. 706-725.
25. Clark, C., B.M. Olivera, and L.J. Cruz, *A toxin from the venom of the marine snail Conus geographus which acts on the vertebrate central nervous system*. Toxicon, 1981. **19**(5): p. 691-699.
26. Norton, R.S. and B.M. Olivera, *Conotoxins down under*. Toxicon, 2006. **48**(7): p. 780-798.
27. Craig, A., P. Bandyopadhyay, and B.M. Olivera, *Post-translationally modified neuropeptides from Conus venoms*. European Journal of Biochemistry, 1999. **264**(2): p. 271-275.
28. Akondi, K.B., et al., *Discovery, synthesis, and structure–activity relationships of conotoxins*. Chemical reviews, 2014. **114**(11): p. 5815-5847.
29. Mir, R., et al., *Conotoxins: Structure, therapeutic potential and pharmacological applications*. Current pharmaceutical design, 2016. **22**(5): p. 582-589.
30. Essack, M., V.B. Bajic, and J.A. Archer, *Conotoxins that confer therapeutic possibilities*. Marine drugs, 2012. **10**(6): p. 1244-1265.
31. Robinson, S.D. and R.S. Norton, *Conotoxin gene superfamilies*. Marine drugs, 2014. **12**(12): p. 6058-6101.
32. Olivera, B.M., *Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology*. Molecular Biology of the Cell, 1997. **8**: p. 2101-2109.
33. Aiping, L., et al., *Various conotoxin diversifications revealed by a venom study of Conus flavidus*. Molecular & cellular proteomics, 2013: p. mcp. M113. 028647.
34. Kaas, Q., J.-C. Westermann, and D.J. Craik, *Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer*. Toxicon, 2010. **55**(8): p. 1491-1509.
35. Olivera, B.M. and R.W. Teichert, *Diversity of the neurotoxic Conus peptides*. Molecular Interventions, 2007. **7**(5): p. 251.
36. Bezanilla, F., *How membrane proteins sense voltage*. Nature reviews Molecular cell biology, 2008. **9**(4): p. 323.
37. Kolb, B. and I.Q. Whishaw, *Neuropsicología humana*. 2006: Ed. Médica Panamericana.
38. Menéndez, J.T. *Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular*. in *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2004.
39. Taleisnik, S., *Receptores celulares y la transducción de señales; Temas de biología celular*. 2006, Argentina. 272.
40. Alberts, B., et al., *Introducción a la biología celular*. 2006, México. 864.
41. Restrepo-Angulo, I., D. Vizcaya-Ruiz, and J. Camacho, *Ion channels in toxicology*. Journal of Applied Toxicology, 2010. **30**(6): p. 497-512.
42. Tian, C., et al., *Potassium channels: structures, diseases, and modulators*. Chemical biology & drug design, 2014. **83**(1): p. 1-26.
43. Rogawski, M.A., *KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy*. Trends in neurosciences, 2000. **23**(9): p. 393-398.
44. Soldovieri, M.V., F. Miceli, and M. Tagliatela, *Driving with no brakes: molecular pathophysiology of Kv7 potassium channels*. Physiology, 2011. **26**(5): p. 365-376.
45. Frank, H.Y., et al., *Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily*. Pharmacological reviews, 2005. **57**(4): p. 387-395.
46. Wang, J.-j. and Y. Li, *KCNQ potassium channels in sensory system and neural circuits*. Acta Pharmacologica Sinica, 2016. **37**(1): p. 25-33.
47. Robbins, J., *KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacology & therapeutics, 2001. **90**(1): p. 1-19.

48. Jentsch, T.J., *Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease*. Nature Reviews Neuroscience, 2000. **1**(1): p. 21-30.
49. Labro, A.J. and D.J. Snyders, *Being flexible: the voltage-controllable activation gate of Kv channels*. Frontiers in pharmacology, 2012. **3**: p. 168.
50. Moreau, A., P. Gosselin-Badaroudine, and M. Chahine, *Biophysics, pathophysiology, and pharmacology of ion channel gating pores*. Frontiers in pharmacology, 2014. **5**: p. 53.
51. Fowler, P.W. and M.S. Sansom, *The pore of voltage-gated potassium ion channels is strained when closed*. Nature communications, 2013. **4**: p. 1872.
52. Cuello, L.G., D.M. Cortes, and E. Perozo, *The gating cycle of a K⁺ channel at atomic resolution*. Elife, 2017. **6**.
53. Morais-Cabral, J.H., Y. Zhou, and R. MacKinnon, *Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 37-42.
54. Noskov, S.Y., S. Berneche, and B. Roux, *Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 830.
55. Naranjo, D., et al., *Pore size matters for potassium channel conductance*. The Journal of general physiology, 2016: p. jgp. 201611625.
56. Roux, B., *Ion conduction and selectivity in K⁺ channels*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2005. **34**: p. 153-171.
57. Guan, B., X. Chen, and H. Zhang, *Two-Electrode Voltage Clamp*, in *Ion Channels*. 2013, Springer. p. 79-89.
58. López, V.J., *Actividad biológica de péptidos de caracoles de la superfamilia conidea*, in *Instituto de Neurbiología*. 2005, UNAM: México. p. 10-44.
59. Payá, A.C., *Fundamentos y funciones de la espectrometría de masas*. Valencia, mayo, 2006.
60. Navarrete, E.L., *Síntesis de péptidos*. Universidad nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología, 2007.
61. Altschul, S.F., et al. *Basic local alignment search tool*. 1990 10/05/2016].
62. Rodríguez Ruíz, X.C., *Caracterización bioquímica y funcional de conotoxinas con efecto sobre receptores nicotínicos de acetilcolina*, in *Toxinología*. 2017, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM: Ciudad de México. p. 109.
63. Martínez Hernández, L.Á., *Drosophila melanogaster como modelo in vivo para evaluar conotoxinas con actividad antagónica sobre canales de potasio*, in *Toxinología marina*. 2016, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM: Ciudad de México. p. 106.
64. Kaufenstein, S., et al., *A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels*. Toxicon, 2003. **42**(1): p. 43-52.
65. Tammaro, P., K. Shimomura, and P. Proks, *Xenopus oocytes as a heterologous expression system for studying ion channels with the patch-clamp technique*. Potassium Channels: Methods and Protocols, 2009: p. 127-139.
66. Bröer, S., *Xenopus laevis oocytes*, in *Membrane Transporters in Drug Discovery and Development*. 2010, Springer. p. 295-310.
67. Kumar, M., et al., *Synthesis and evaluation of potent KCNQ2/3-specific channel activators*. Molecular pharmacology, 2016. **89**(6): p. 667-677.
68. Green, S.L., *Factors affecting oogenesis in the South African clawed frog (Xenopus laevis)*. Comparative medicine, 2002. **52**(4): p. 307-312.
69. Aguilar, M.B., et al., *Conorfamide-Sr2, a gamma-carboxyglutamate-containing FMRFamide-related peptide from the venom of Conus spurius with activity in mice and mollusks*. Peptides, 2008. **29**(2): p. 186-195.
70. Silva, A.M., et al., *Post-translational modifications and mass spectrometry detection*. Free radical biology and medicine, 2013. **65**: p. 925-941.

71. da Silva, A.V., et al., *The effects of the C-terminal amidation of mastoparans on their biological actions and interactions with membrane-mimetic systems*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2014. **1838**(10): p. 2357-2368.
72. Scoble, H.A., *Mass spectrometric strategies for the structural characterization of proteins*. *A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing*, 1993: p. 125-153.

Anexos

Anexo 1. Medios de cultivo

Medio SOB	
Triptona	20 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	0.5 g/l
Diluir en 800 ml de H ₂ O bidestilada, añadir 10 ml de KCl (250 mM) Ajustar a pH 7 con NaOH (1N) y aforar a 1 L Esterilizar en autoclave	
Medio SOC	
Es el medio SOB al que se le añade:	
MgCl ₂ 2M estéril	5 ml
Solución de glucosa 20mM	20 ml
Una vez mezclada se esteriliza por filtración	
Medio LB-líquido	
Triptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
NaCl	5 g
Se mezcla bien por agitación con H ₂ O bidestilada Ajustar a pH 7.2 con NaOH 10N Aforar a 500 ml Esterilizar en autoclave	
Medio LB-agar	
Es lo mismo que LB-líquido pero se agrega además 7.5g de agar-agar	

Anexo 2. Diluciones para sembrar en cajas Petri

Del tubo de crecimiento tomar	Añadir medio SOC fresco
10 µl de bacteria	90 µl
50 µl de bacteria	50 µl
100 µl de bacteria	-
200 µl de bacteria (el volumen que sobre)	-

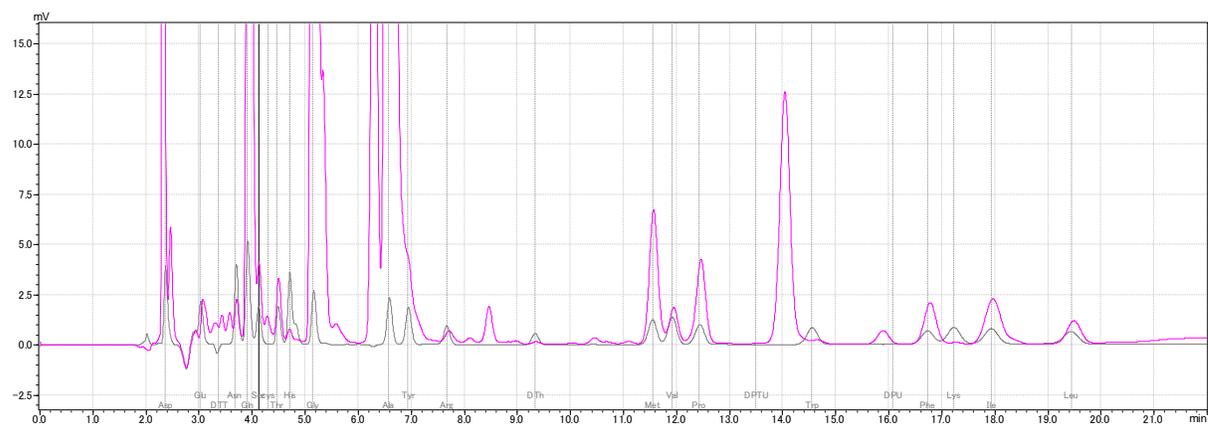
Anexo 3. Enzimas de restricción y promotores usados en los diferentes plásmidos.

CLONES	ENZIMA DE RESTRICCIÓN	PROMOTOR
KCNQ1	NheI (10 U/µl)	Sp6
KCNQ2	KspAI (5 U/µl)	Sp6
KCNQ3	KspAI (5 U/µl)	Sp6
KCNQ4	--	--
KCNQ5	NheI (10 U/µl)	T7

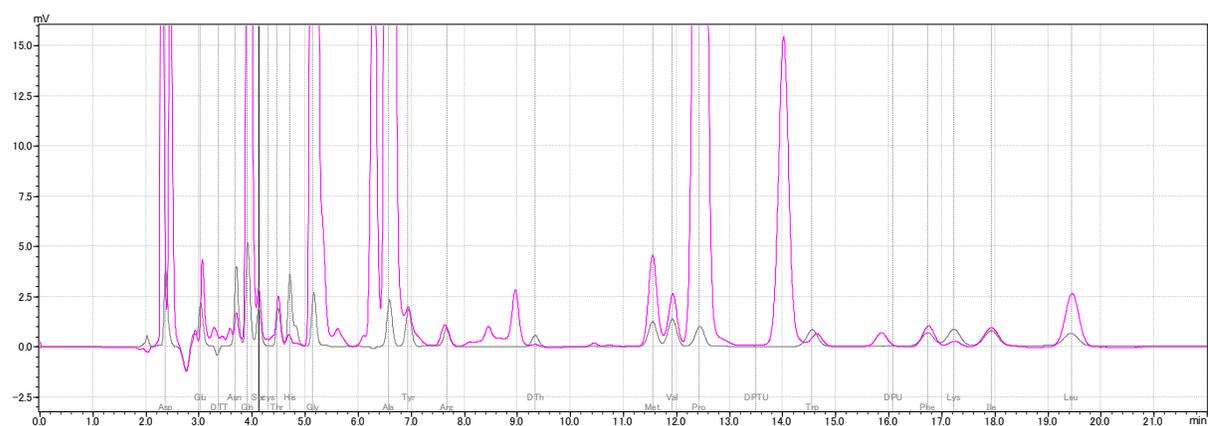
Anexo 4. Secuencia de nucleótidos obtenida tras la secuenciación

Subtipo de KCNQ	Secuencia de nucleótidos
KCNQ1	<p>CTTCTCAGGATGGCCGCGGCCTCCTCCCCGCCAGGGNCCGTAGAAGG AAAGCGCTGGGGTTGGGGCCGCCTGCCAGGCGCCCGGCGGNGCANCG NCGGGNCCTGNCCAAGAACATGCCNCNTTTTCGCCTNNNNATCNTGACT NCCNCTCNTCNCNACACANTANCGTCCNNNTACNNTTTNTNNNTTNCTCT CCTNNNATTNATNATATNATTAANNCTNTTTNTNTTTCNGATACTATCANNAN ACCCCTGANCAACTNTCCNNCTCNTCNANNCTTTCTNNNNTCCNCCNTT NNCNCNNCNCNCNCTGNCNCATCNTANCNNCCCANTCNNTCTCCCNCTC AANNCACTGCNNATTCAINTACCNTAACTTTCAACCNCCTNCTTTNCACN TACATCTNCTNACTTCTNATTCCCTACNANTCTTACNTTNTATNNNTCCCTN TATCNTCCAATCTAANANTACCTTCCACTACTTTNCNNTCNNTGGGTNNC NANCACTNCTNNNNTTCTNNTTCTCTNCAATCTGNNNTCCCTTTGCA TCATNGNTTNTCTACNCNAAGNNNATANACNTCTCTNTCTNNNACTNCNT NANANNTNTCNCNTTTCANCNNCACNNTTNNCTTGNACACATNTCCATTNN ANCACNACGCTATNCTNTCANNTNTCNTTNTNCTNTACATTCNTACACCT NTCTTNACACNCTCTCATCTNCANCTTCCCTACNNTNTAACTTCTNNTA TCAGTNTNTNACTNNTNNTCANNCCNTCNTACTCTACTTCACTAG</p>
KCNQ2	<p>TTGTTCTTTTTGCAAANCTCANAATAAACGCTCAACTTTGGCAGATCGCG AGCCACCATGGTGCAGAAGTCGCGCAACGGCGGCGTATACCCCGGCC GAGCGGGGAGAAGAAGCTGAAGGTGGGCTTCGTGGGGCTGGACCCCG GCGCGCCCGACTCCACCCGGGACGGGGCGCTGCTGATCGCCGGCTCC GAGGCCCCCAAGCGCGGCAGCATCCTCAGCAAACCTCGCGCGGGCGG CGCGGGCGCCGGGAAGCCCCCAAGCGCAACGCCTTCTACCGCAAGCT GCAGAATTTCTCTACAACGTGCTGGAGCGGCCGCGCGGCTGGGCGTT CATCTACCACGCCTACGTGTTCTCCTGGTTTTCTCCTGCCTCGTGCTGT CTGTGTTTTCCACCATCAAGGAGTATGAGAAGAGCTCGGAGGGGGCCCT CTACATCCTGAAATCGTGACTATCGTGGTGTGGGCGTGGAGTACTTC GTGCGGATCTGGGCCGACAGGCTGCTGCTGCCGGTACCGTGGCTGGAG GGGGCGGCTCAAGTTTGCCCGGAAT</p>
KCNQ3	<p>CTTGTTCTTTTTGCAANAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCAGATC GCGAGCCACCATGGGGCTCAAGGCGCGCAGGGCGGCGGGGGCGGCT GGCGGCGGCGGCGACGGGGGCGGCGGAGGCGGCGGGGCGGCTAACC CAGCCGGAGGGGACGCGGCGGCGGCCGCGGACGAGGAGCGGAAAGT GGGGCTGGCGCCCGGCGACGTGGAGCAAGTCACCTTGGCGCTCGGGG CCGGAGCCGACAAAGACGGGACCCTGCTGCTGGAGGGGCGGCGGCCGC GACGAGGGGCGAGCGGAGGACCCCGCAGGGCATCGGGCTCCTGGCCAA GACCCCGCTGAGCCGCCAGTCAAGAGAAACAACGCCAAGTACCGGCG CATCCAAACTTTGATCTACGACGCCCTGGAGAGACCGCGGGGCTGGGC GCTGCTTTACCACGCGTTGGTGTTCCTGATTGTCTGGGGTGTGATT CTGGCTGTCTGACCACATTCAAGGAGTATGAGACTGTCTCGGGAGACT GGCTTCTGTTACTGGAGACATTTGCTATTTTCATCTTTGGAGCNAAG</p>

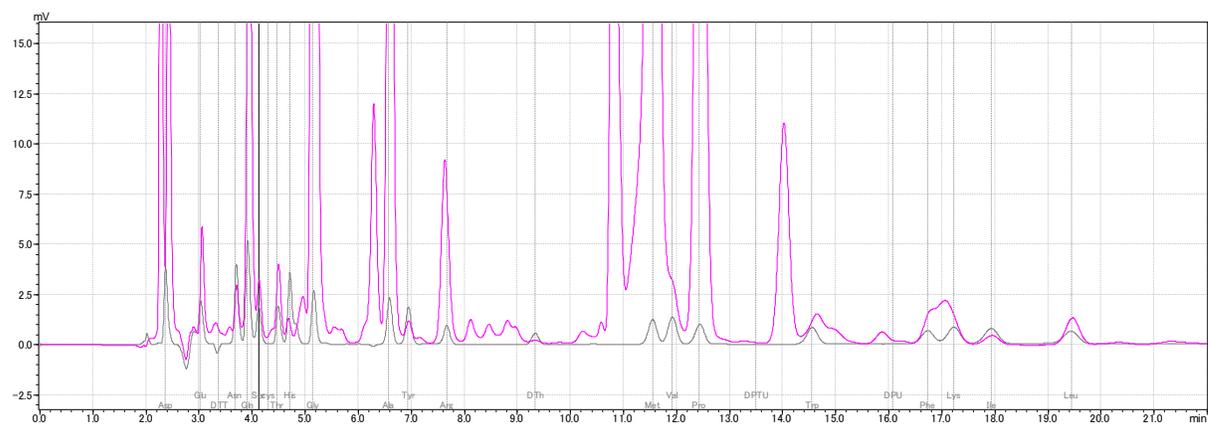
Anexo 5. Resultado de la degradación de Edman para la subfracción F2-21.



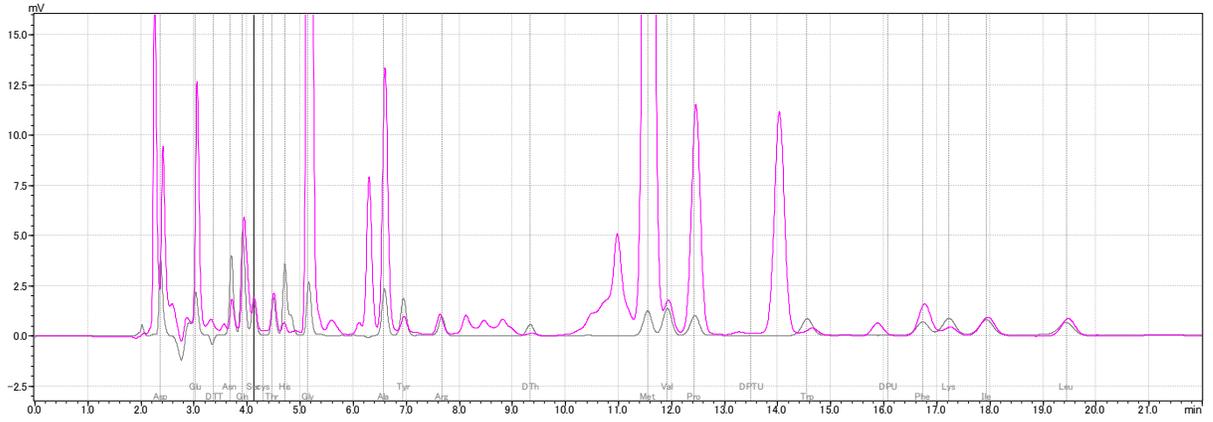
Ciclo 1



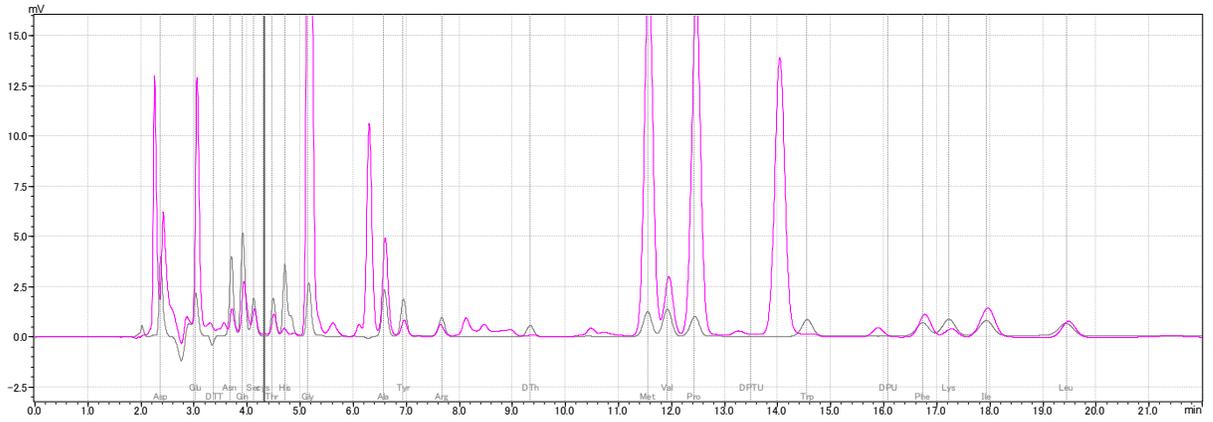
Ciclo 2



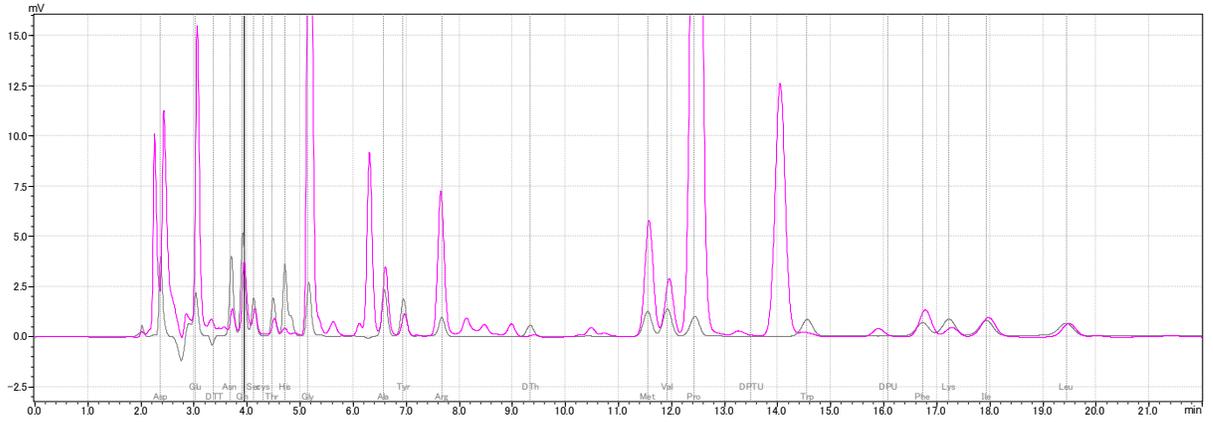
Ciclo3



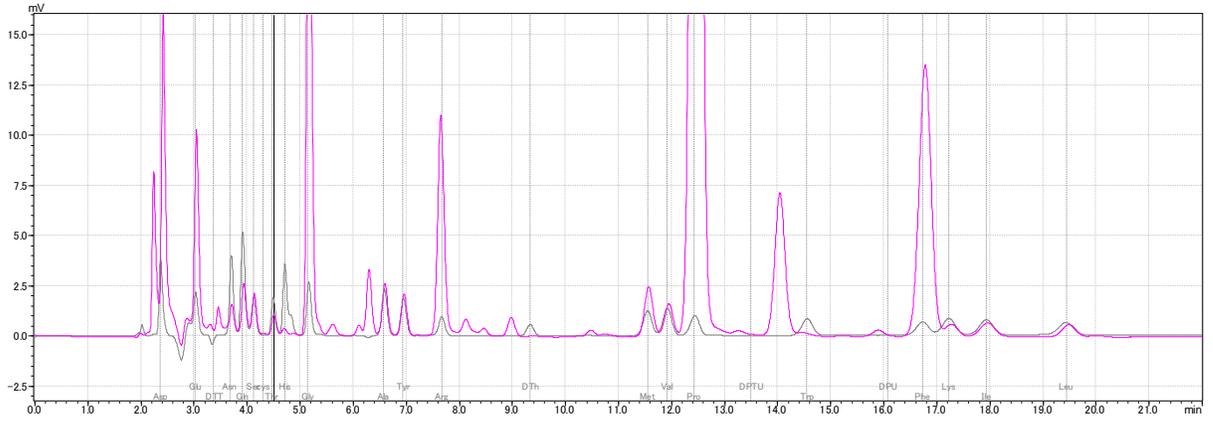
Ciclo4



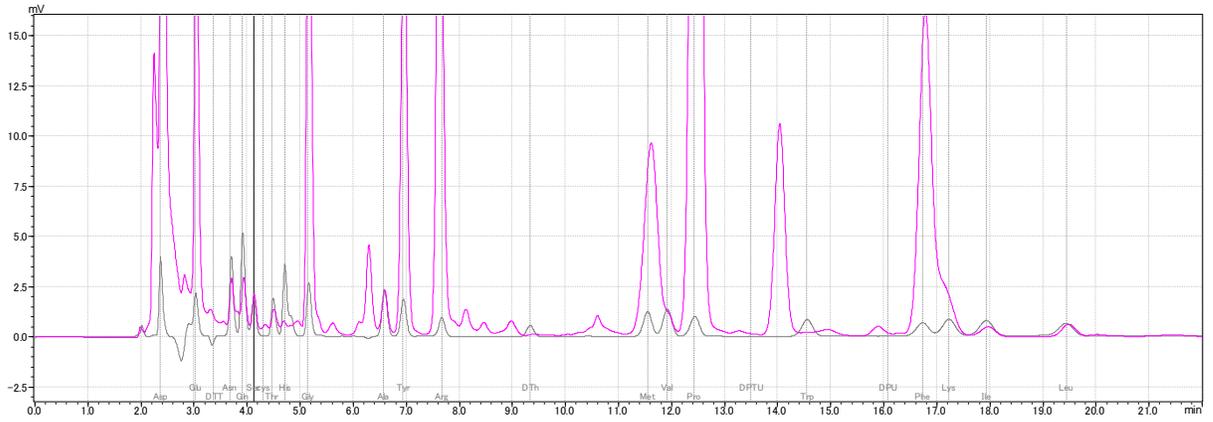
Ciclo5



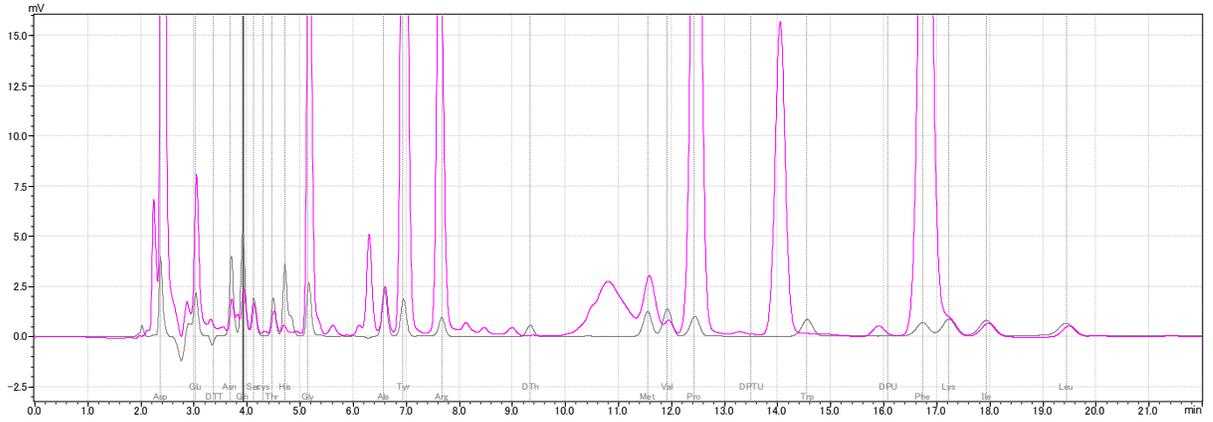
Ciclo6



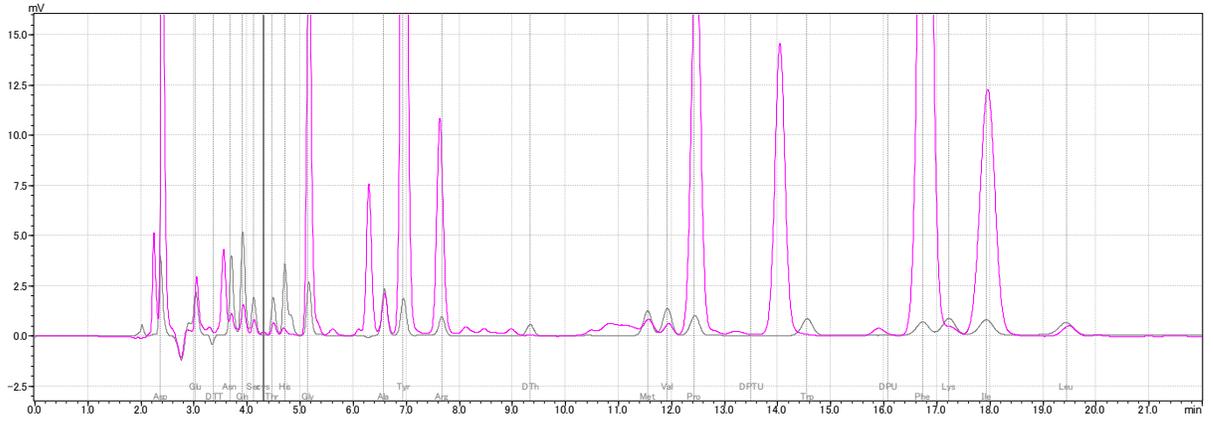
Ciclo7



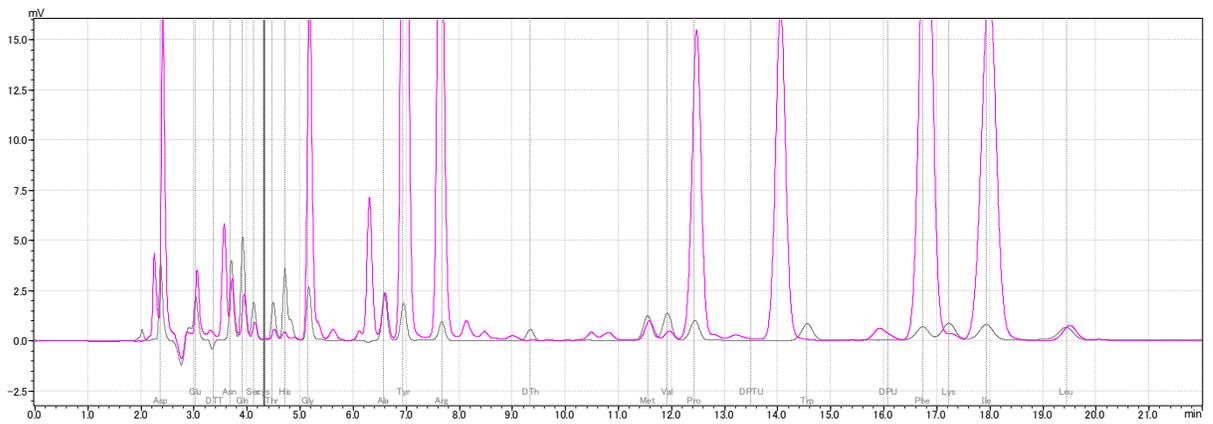
Ciclo8



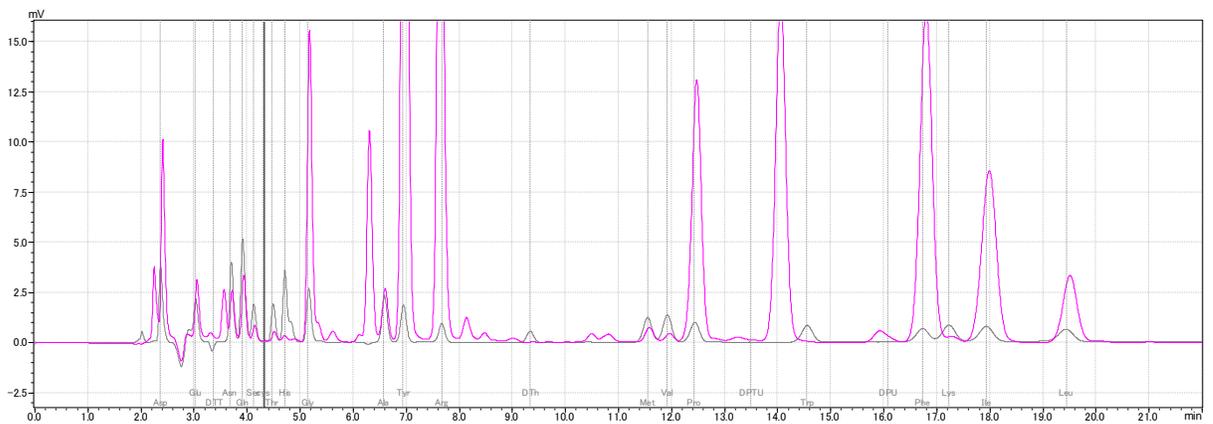
Ciclo9



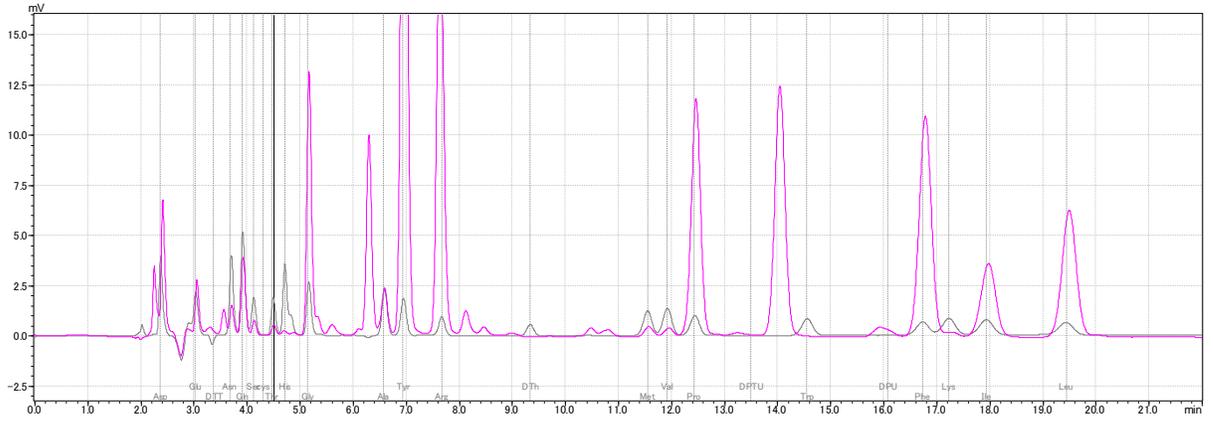
Ciclo10



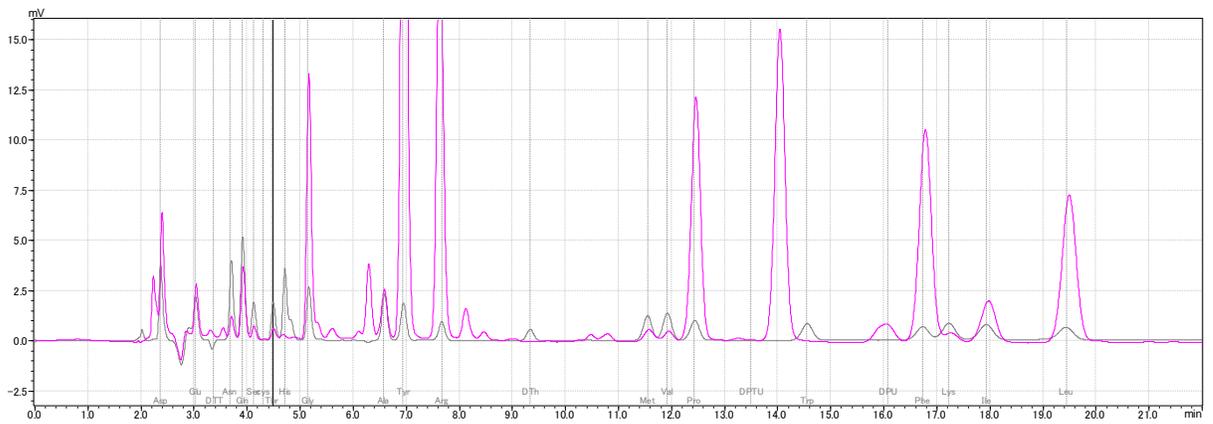
Ciclo11



Ciclo12



Ciclo13



Ciclo14