



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

PURIFICACIÓN Y EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE
FRACCIONES DEL VENENO DE *Conus gladiator*
(GASTROPODA: CONIDAE) EN EL CANAL DE POTASIO
Kv10.1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :
DANIELA GARCÍA LÓPEZ

TUTOR:
DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA

COTUTOR:
M. EN C. LUIS ÁNGEL MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno.
García
López
Daniela
5518243201
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
313219854
2. Datos del tutor.
Dr.
José Estuardo
López
Vera
3. Datos del sinodal 1:
Dr.
Manuel Benigno
Aguilar
Ramírez
4. Datos del sinodal 2:
Dra.
Bárbara Pamela
Serrano
Flores
5. Datos del sinodal 3:
Dra.
Fabiola
Hernández
Vázquez
6. Datos del sinodal 4:
M. en C.
Luis Ángel
Martínez
Hernández
7. Datos del trabajo escrito:
Purificación y evaluación electrofisiológica de fracciones del veneno de *Conus gladiator* (Gastropoda: Conidae) en el canal de potasio Kv10.1.
71 p.
2020

“There is no better high than discovery”

E. O. Wilson



A mi familia

Esta tesis la dedico a mis padres Gerardo y Rocío, por qué sin ellos no sería lo que soy actualmente. Todo lo que sé y he logrado se lo debo a ambos; gracias por sus consejos, amor y apoyo. A mis hermanas Davely, Rocío y Monserrat por chiquearme y apoyarme en cada locura que se me ocurre. A Juanito Escutia y Mayito, por ser mis dos guardianes de vida. ¡Los quiero mucho familia! ♥

AGRADECIMIENTOS

ACADÉMICOS

- Al Dr. Estuardo López Vera, por permitirme entrar al Taller de Toxinología Marina (a pesar de omitir no haber cursado Biología de Animales II) y por ayudarme en mi proceso de titulación.
- A los miembros de mi jurado, Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez, Dra. Bárbara Pamela Serrano Flores y la Dra. Fabiola Hernández Vázquez, por aceptar formar parte de mi jurado, brindarme sus observaciones y correcciones sobre mi escrito.
- Al M. en C. Luis Ángel Martínez Hernández, por compartirme un poquito de su genialidad.
- A la Dra. Mónica Ortiz Arellano y los miembros de su laboratorio, por su cálida bienvenida, enseñanza y por el ceviche más delicioso que he probado.
- A mis profesores de carrera más queridos: la Dra. Victoria Forero Forero, por ser la mejor en Molecular. Al Biol. Jorge Rojas Gutiérrez, por sus excelentes clases de plantas. A la Dra. Sara Quiroz Barroso y Dr. Miguel Ángel Torres Martínez, por ser el mejor ejemplo de trabajo en equipo. Al Dr. Juan Carlos Gallardo y Dr. Álvaro Marín, por brindarme una breve estancia en el Instituto de Cardiología. A la Dra. Fabiola Hernández Vázquez y Dra. María del Carmen Miñana Solís, por hacer la fisiología animal divertida. Al Dr. Ángel Ramírez Velasco y René Hernández Rivera, por sus asombrosas clases de dinosaurios. Por último, a la Lab instructor Heather Dietz de University of Regina por su enseñanza en Canadá.
- A todo el personal administrativo de la UNAM que ha contribuido en el avance de mis trámites de intercambio, becas y titulación en contingencia.

PERSONALES

Nota: Esta sección puede causar diabetes por la melosidad contenida.

- A mi papá Gerardo, por el cariño, apoyo, soporte y atención que me brinda todos los días, sus cuidados y todos los momentos que compartimos. No pude haber pedido un mejor papá que el que tengo.
- A mi mamá Rocío, por siempre buscar que sea una mujer capaz de lograr cualquier cosa y por estar siempre pendiente de la familia.
- A mi hermana Davely, por dejarme estafarle de vez en cuando algún capricho como mi volcán de chocolate, hacer videos bobos conmigo (Shazam) y por su apoyo en mis estudios.
- A mi hermana Rocío, por consentirme, escucharme y ofrecerme su apoyo siempre. Por el tiempo que fuimos rappitenderas y nuestras peleas por el amor de Mayito.
- A mi hermana Monchis, gracias por qué compartimos muchas historias divertidas juntas como cuando te resbalaste en pipí, jaja. Gracias por ser muy divertida y cariñosa conmigo, así como apoyarme en cosas locas. Por mi escritorio pro bono y a su concubino Gusito Nucita por qué siempre le ganó en todo.
- A Pam, por ser mi mejor amiga en la carrera, por todas las locuras que hicimos, desde videos graciosos hasta correr en chanclas en una práctica de campo. A Jessica, por ser mi primera amiga en la universidad, confidente y por darme grandes consejos.

- A Aurora, por ser mi mejor amiga desde sexto de primaria hasta ahora. Por los momentos divertidos como la patada de la feria y hacer sushi casero, aunque la mitad del arroz se quemó.
- A Vania, por ser mi mamá oso en mi estancia en Canadá y por ser mi sensei en las artes de Pokemon Go.
- A clan Morros: Paquete (Daniel), Vale, Perlita, Edgar y Angy, por hacer de mi último año de prepa el más divertido y por seguir reuniéndonos a pesar de la distancia.
- A clan Tiburoncin: Ara, Erick y Naye, por ser el equipo de laboratorio más divertido que he tenido y por ese maravilloso picnic en la cascada.
- A mi profe de piano, por siempre animarme cuando estaba triste durante la realización de esta tesis y a su familia por su calidez hacia mí.
- A Luis, por tenerme paciencia en cada torpeza que cometía en el laboratorio y por ser un gran maestro; ya que gran parte de lo que aprendí en el laboratorio, es gracias a él.
- A Xime, por ser una gran maestra y amiga, por inducirme en las artes de operación de las ranas, y por su apoyo y cariño en todo momento. Mucho de lo aprendido igual se lo debo a ella.
- A **todos** los miembros del laboratorio de Toxinología Marina por hacer las reuniones de comida muy divertidas. A Elba, por siempre ayudarme en dudas del lab y existenciales. A Miri, por ofrecerme su amistad, cariño y ser su dama de honor ja!. A Luis tatoos (el exiliado), por hacerme reír con cada bobada que hacía. A Mine, por los chismes y su apoyo en malos momentos.

ÍNDICE

RESUMEN	2
I. INTRODUCCIÓN	4
II. ANTECEDENTES	6
2.1 Phyllum Mollusca	6
2.1.1 Plan corporal, morfología	6
2.2 Clase Gastropoda	7
2.3 Superfamilia Conoidea	8
2.4 Familia Conidae	9
2.5 Género <i>Conus</i>	9
2.5.1 <i>Conus gladiator</i>	11
2.6 Estudios del veneno de <i>Conus</i>	12
2.7 Conotoxinas y su clasificación	13
2.8 Canales iónicos	15
2.9 Canales activados por voltaje	16
2.10 Canales de potasio	16
2.10.1 Arquitectura	16
2.10.2 Clasificación	17
2.10.3 Canal Kv10.1	18
2.10 Conotoxinas con actividad en canales de potasio	20
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. HIPÓTESIS	25
V. OBJETIVOS	26
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27

VII. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.1 Material biológico	28
7.2 Obtención del extracto crudo	28
7.3 Cuantificación del veneno	30
7.4 Fraccionamiento total del veneno	30
7.5 Amplificación del plásmido del canal de potasio Kv10.1	31
7.5.1 Obtención del cDNA	32
7.6 Transcripción <i>in vitro</i>	32
7.7 Obtención de ovocitos	32
7.8 Expresión heteróloga	33
7.9 Evaluación electrofisiológica	33
7.10 Análisis estadísticos	34
7.11 Determinación de la masa molecular	34
VIII. RESULTADOS	36
8.1 Fraccionamiento total del veneno	36
8.2 Evaluación electrofisiológica	38
8.3 Repurificación de las fracciones activas	42
8.4 Evaluación electrofisiológica de las subfracciones de las repurificaciones	45
8.5 Determinación de la masa molecular	48
IX. DISCUSIÓN	51
X. CONCLUSIONES	57
XI. PERSPECTIVAS	58
XII. REFERENCIAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Fotografía de las principales estructuras que componen el aparato venenoso de un caracol <i>Conus</i> .	10
Figura 2. Distribución de <i>Conus gladiator</i> , <i>Conus fergusonii</i> y <i>Conus archon</i> .	11
Figura 3. Fotografía de <i>Conus gladiator</i> .	12
Figura 4. Clasificación de las conotoxinas.	15
Figura 5. Clasificación de los canales iónicos de potasio.	17
Figura 6. Colecta de <i>Conus gladiator</i> .	28
Figura 7. A) Extracción del organismo por ruptura de concha. B) Ejemplar macho de <i>C. gladiator</i> . C) Ejemplar hembra de <i>C. gladiator</i> .	29
Figura 8. Estructuras del aparato venenoso de <i>Conus gladiator</i> .	30
Figura 9. Microcirugía de <i>X. laevis</i> .	33
Figura 10. Perfil cromatográfico del veneno total de <i>C. gladiator</i> .	37
Figura 11. Perfil cromatográfico del péptido CPY-PI1a.	38
Figura 12. Evaluación electrofisiológica de las fracciones A) 28, B) 29, C) 30, D) 35 y E) 47 de <i>C. gladiator</i> .	40
Figura 13. Porcentaje de bloqueo de las cinco fracciones activas del veneno de <i>C. gladiator</i> en el canal de potasio Kv10.1.	41
Figura 14. Repurificación de la fracción activa 28.	42
Figura 15. Repurificación de las fracciones activas 28, 29 y 30.	43
Figura 16. Repurificación de la fracción activa 35.	44
Figura 17. Repurificación de la fracción activa 47.	45
Figura 18. Evaluación electrofisiológica de la fracción F30-1 de <i>C. gladiator</i> .	46

Figura 19. Comparación del porcentaje de bloqueo de la fracción 30 y del componente F30-1 obtenido durante la repurificación.	47
Figura 20. Espectrometría de masas MALDI-TOF de la muestra F30-1.	49
Figura 21. Espectrometría de masas MALDI-TOF de la muestra F30-2.	50
Tabla 1. Resultados de la cuantificación de proteínas usando el sistema NanoDrop 2000.	36

RESUMEN

El estudio de los venenos de animales terrestres y marinos ha revelado que son una fuente importante de componentes bioactivos con potencial utilidad para desarrollar fármacos. Algunos ejemplos son el Captopril, empleado en el tratamiento contra la hipertensión, el cual se obtuvo de la serpiente *Bothrops jararaca* y el Ziconotide, para el dolor crónico, obtenido de *Conus magus*. La superfamilia Conoidea engloba, entre otros, a los caracoles marinos venenosos de tres familias: Conidae, Terebridae y Turridae, siendo la primera la de mayor interés dado que su veneno es considerado un coctel de péptidos neuroactivos. Cada especie puede producir alrededor de 100 a 200 toxinas con potencial farmacológico, por lo que se ha estimado que aproximadamente entre 500,000 a 1,000,000 de toxinas están contenidas en el veneno de las 700 especies del género *Conus*; sin embargo, se ha caracterizado menos del 0.1% de sus componentes a nivel farmacológico. Se ha reportado que el veneno de estos caracoles puede tener actividad en canales iónicos activados por ligando y voltaje.

El canal iónico de interés en este trabajo es el canal de potasio Kv10.1 debido a que a nivel de expresión ectópica está relacionado con el 70% de los tipos de cáncer en humanos, dado que promueve la proliferación de células cancerígenas. La búsqueda de fármacos bloqueadores y/o moduladores específicos del canal Kv10.1 ha sido exhaustiva, no obstante, los fármacos reportados hasta el momento no son específicos. Debido a ello, un número considerable de investigaciones ha sido centrada en las toxinas del veneno de animales, dado que éstas presentan alta especificidad por sus blancos moleculares. En el presente trabajo se buscó identificar por lo menos un componente en el

veneno de *Conus gladiator* con actividad en el canal de potasio Kv10.1. Para esto se realizó la amplificación del RNA codificante para el canal Kv10.1, el fraccionamiento del veneno total, la evaluación electrofisiológica en ovocitos de *Xenopus laevis* y la repurificación de las fracciones activas. Como resultado se encontró que en el veneno total de *C. gladiator* están presentes 5 fracciones activas, todas ellas mayoritarias; a una de éstas se logró realizar la subfracción y se registró una actividad mayor a la inicial.

Palabras clave: *Conus gladiator*, conotoxinas, RP-HPLC, fracciones, canales de potasio, Kv10.1, electrofisiología.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de los venenos ya sea de animales terrestres (serpientes, escorpiones, arañas) o marinos (medusa, caracoles, etc.) ha demostrado que son una fuente importante de componentes bioactivos con potencial utilidad para el desarrollo de fármacos, lo cual es un hallazgo relevante [94].

El entendimiento de las propiedades de los venenos comenzó a despertar la curiosidad de los científicos italianos Francesco Redi y Felice Fontana en los siglos XVII y XVIII, pero fue hasta el siglo XX cuando empezaron los estudios bioquímicos de los venenos. Cabe mencionar que en la antigua Roma los venenos se utilizaban para tratar enfermedades como varicela, lepra y fiebre, entre otras [94].

En términos generales, el veneno se compone de toxinas, y éstas tienen la particularidad de presentar afinidad y especificidad por componentes presentes en las células; dichas propiedades las colocan como potenciales agentes terapéuticos [1]. Un dato importante sobre el estudio de las toxinas es que han permitido conocer la estructura de los canales iónicos; por ejemplo, las toxinas de escorpión han servido para caracterizar la estructura y función de algunos canales de potasio [92]. En sí, los venenos de arañas y escorpiones tienen como blanco molecular canales iónicos activados por voltaje. Por otro lado, las serpientes presentan neurotoxinas con efecto en receptores nicotínicos de acetilcolina. En cambio, las toxinas de caracoles marinos del género *Conus* tienen actividad sobre ambos tipos de proteínas de membrana [94].

Algunos ejemplos de animales cuyo estudio dio como resultado fármacos derivados del estudio de venenos son; el de la serpiente *Bothrops jararaca* y el

del caracol marino *Conus magus*; del primero se derivó el Captopril utilizado como tratamiento de la hipertensión, mientras que del segundo se obtuvo el Ziconotide, que se utiliza para el tratamiento del dolor crónico y agudo [9, 95].

A nivel molecular, el Captopril tiene un efecto de potenciación de bradicinina (FPB), el cual actúa como hipotensor; es decir, promueve la vasodilatación. El Captopril actúa como inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la cual está relacionada con la vasoconstricción y, por lo tanto, con el aumento de la presión arterial [95].

En el caso del Ziconotide, compuesto idéntico a la ω -conotoxina MVIIA, tiene como característica el bloquear a los canales de calcio tipo N, involucrados en la liberación de neurotransmisores responsables de transmitir la señal que produce un efecto doloroso. Por lo tanto, al impedir la apertura del canal la señal de dolor no se transmite [9]. Este fármaco presenta muchas ventajas comparado con otros fármacos para tratar el dolor crónico y agudo; entre las más importantes es ser más potente y de mayor duración que la morfina [53] y no generar dependencia como algunos fármacos derivados de opioides [9].

II. ANTECEDENTES

2.1 Phylum Mollusca

El Phylum Mollusca es el grupo más diverso en el Reino Animal después del Phylum Artropoda (1,242,042 especies); está integrado por aproximadamente 50,000 especies vivientes y unas 60,000 en el registro fósil [7]. A pesar de las grandes extinciones masivas, han sido capaces de adaptarse a diversos hábitats del planeta Tierra, que van desde zonas tropicales hasta mares polares; en tierra, lagos, mares, etc. [11, 27].

Este grupo incluye a los caracoles y babosas (Clase Gastropoda), almejas (Clase Bivalvia), pulpos y calamares (Clase Cephalopoda). Otros grupos no tan familiares que también están incluidos como lo son las cucarachas de mar (Clase Poliplacophora), los dientes de elefante (Clase Scaphopoda) y las clases Monoplacophora, Aplacophora y Solenogastres [7, 72].

Se cuenta con registros arqueológicos donde se conoce que el hombre ha utilizado a los caracoles como material de construcción, moneda, ornamentaciones, alimento, etc. [11]. No obstante, en las últimas décadas los moluscos de la Clase Gastropoda, específicamente los de la Superfamilia Conoidea (conos, túrridos y torrecillas), han ganado mayor relevancia debido a que algunas especies son venenosas, las cuales se han estudiado por el interés que se tiene por los componentes de sus venenos [89].

2.1.1 Plan corporal, morfología

Son organismos con simetría bilateral, protostomados celomados. A pesar de que este Phylum se integra de organismos de distintas formas y tamaños, todos los moluscos poseen características únicas que los distinguen de otros

animales [7]. El cuerpo se divide en tres regiones principales: cabeza, pie y masa visceral. En la cabeza se encuentran algunos órganos sensoriales y la boca. El pie de los moluscos puede fungir para la locomoción, natación, fijación al sustrato. La masa visceral alberga los aparatos digestivo, circulatorio, respiratorio y reproductor y sistema nervioso [7, 27].

El cuerpo se recubre de una gruesa capa denominada manto, la cual secreta el esqueleto calcáreo ya sea en forma de espículas, placas o bien como concha externa o interna. Alrededor de la masa visceral se encuentra la cavidad paleal la cual alberga a las branquias, ctenidios, y los poros excretores [7, 27, 75].

Los moluscos presentan en la región bucal una estructura única: la rádula, que utilizan para alimentarse. El sistema digestivo cuenta con un intestino completo, un estómago primitivo y glándulas digestivas (hepatopáncreas) donde se lleva a cabo la digestión intracelular. El sistema circulatorio es abierto, el corazón está rodeado por la cavidad pericárdica. El sistema excretor se conforma por metanefridios tubulares. El sistema nervioso se compone de ganglios cerebrales dorsales, un anillo nervioso circumentérico y dos pares de cordones nerviosos en forma de escalera [7, 75].

En general los moluscos son dioicos y cuando los gametos masculinos y femeninos se encuentran maduros son depositados en la cavidad celómica y son expulsados mediante los nefridios. La fecundación es externa; tienen la larva trocófora la cual posteriormente se transforma a veliger [75].

2.2 Clase Gastropoda

Aproximadamente cuenta con 35,000 especies vivas y 15,000 fósiles [7, 27]. Esta clase es la mayor y más diversa del Phylum y está integrada por los

caracoles, babosas, lapas y nudibranquios, entre otros, los cuales se encuentran en una gran variedad de ambientes: marino, salobre, agua dulce y terrestre [3].

La clase se divide en tres subclases: Prosobranchia donde se incluyen a los caracoles marinos, Opisthobranchia donde están las babosas marinas, y Pulmonata la cual incluye caracoles y babosas terrestres [7, 27].

Los gasterópodos pueden presentar diversos tamaños, pero la gran mayoría comprende de 1 a 8 cm de largo; no obstante, hay un caracol marino (*Pleuroploca gigantea*) con una concha de hasta 60 cm de largo [27]. Son animales sedentarios con muy poca locomoción debido al peso de su concha, su principal estructura de defensa, aunque también sirven como protección sus colores o bien sus secreciones [27].

La gran mayoría son herbívoros; sin embargo, los miembros del género *Conus* son carnívoros. En el género *Conus* la rádula está modificada; tiene forma de arpón lo que permite inyectar el veneno a sus presas [75]. La picadura de estos caracoles ha sido reportada en humanos, llegando a ser mortal en algunos casos (p. ej. *Conus geographus* y *Conus textile*) [37]. Dicho suceso generó interés por el estudio de estos organismos, dado que se ha comprobado que los componentes individuales del veneno pueden servir para el desarrollo de fármacos [52].

2.3 Superfamilia Conoidea

Esta superfamilia comprende todos los caracoles marinos venenosos, también llamados toxoglosos (lengua venenosa); constituido por más de 10,000 especies [6, 28], repartidas principalmente en tres familias: Conidae, Terebridae y Turridae, siendo la primera la de mayor interés. Todos los organismos que

integran a este taxón poseen un aparato venenoso a excepción de la subfamilia Perevicaciinae (Turridae) [46].

2.4 Familia Conidae

La familia Conidae se constituye de cuatro géneros (*Conus*, *Conasprella*, *Profundiconus* y *Californiconus*) y 71 subgéneros [70], siendo el género *Conus* el de mayor éxito evolutivo, al ser el género de invertebrados marinos con el mayor número de especies vivientes. Los miembros de esta familia se distribuyen en su mayoría en los océanos Indopacífico y Pacífico Occidental y habitan en sustratos rocosos, arenosos, fangosos, etc [66].

2.5 Género Conus

Es el género más estudiado de la familia Conidae; se compone de 700 especies aproximadamente [41, 69], las cuales se han adaptado a la gran mayoría de hábitats tropicales [62]. A partir de registros fósiles se estima que el género *Conus* surgió hace 50 millones de años, posteriormente a la gran extinción Cretácico-Terciario (K-T). El primer fósil perteneciente a este género data del Eoceno [39, 47].

Todos los individuos que integran a este género son depredadores y utilizan su veneno como herramienta para la captura de sus presas. El aparato venenoso (Figura 1) de estos caracoles se constituye de las siguientes estructuras:

- 1) Conducto venenoso: aquí se lleva a cabo la síntesis y almacenaje del veneno.
- 2) Bulbo venenoso: se encarga de transferir el veneno del conducto hasta el saco radular.

3) Saco radular: en esta estructura se encuentran los dientes radulares, que presentan una forma similar a una aguja hipodérmica que sirve para la inyección del veneno [41].

Los Conos, llamados así por la forma de su concha, presentan una región extensible y con gran capacidad de maniobra, la probóscide, en la cual se posiciona un diente radular, el cual sirve para que el veneno sea inyectado en la presa [41].

Las especies que integran al género *Conus* se pueden dividir en tres grupos con base en el tipo de alimentación. El grupo más abundante es el de los vermívoros, que se alimentan de gusanos (poliquetos, hemicordados y equiuroideos). El segundo grupo es el de los molusquívoros, es decir, los que se alimentan de otros gasterópodos. Finalmente, el tercer grupo corresponde al de los piscívoros, caracterizados por alimentarse de peces [38, 89].

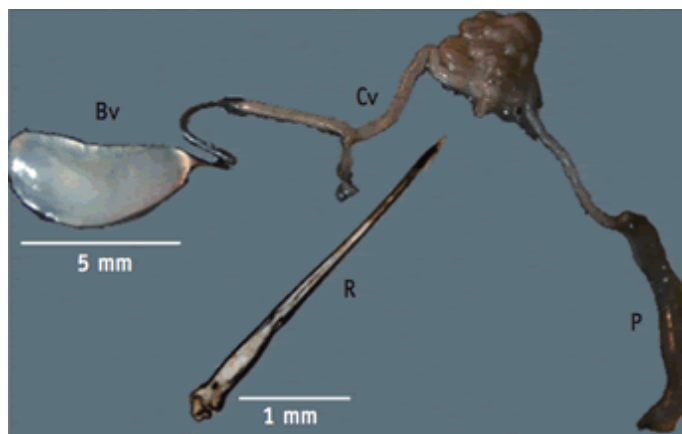


Figura 1. Fotografía de las principales estructuras que componen el aparato venenoso de un caracol *Conus*. En la parte superior se observa el aparato venenoso de *Conus californicus* y en la parte media inferior el diente radular de *Conus princeps*. Bv= bulbo venenoso, Cv= conducto venenoso, P= probóscide, R= diente radular. (Imagen tomada de: López-Vera *et al.*, 2006 [47]).

2.5.1 *Conus gladiator*

La especie fue descrita en 1833 por Broderip; se distribuye desde la costa del Pacífico de Baja California (México) hasta el norte de Perú (Figura 2), así como en las Islas Galápagos, las Islas de Revillagigedo, la Isla Clipperton y las Islas Cocos. Se encuentran en áreas rocosas a profundidades de 0 a 5 m [87]; además, ésta especie se ha observado asociada a colonias de anémonas del género *Palythoa* [63]. Se alimentan principalmente de anélidos (poliquetos), eunicidos y nereidos [40].

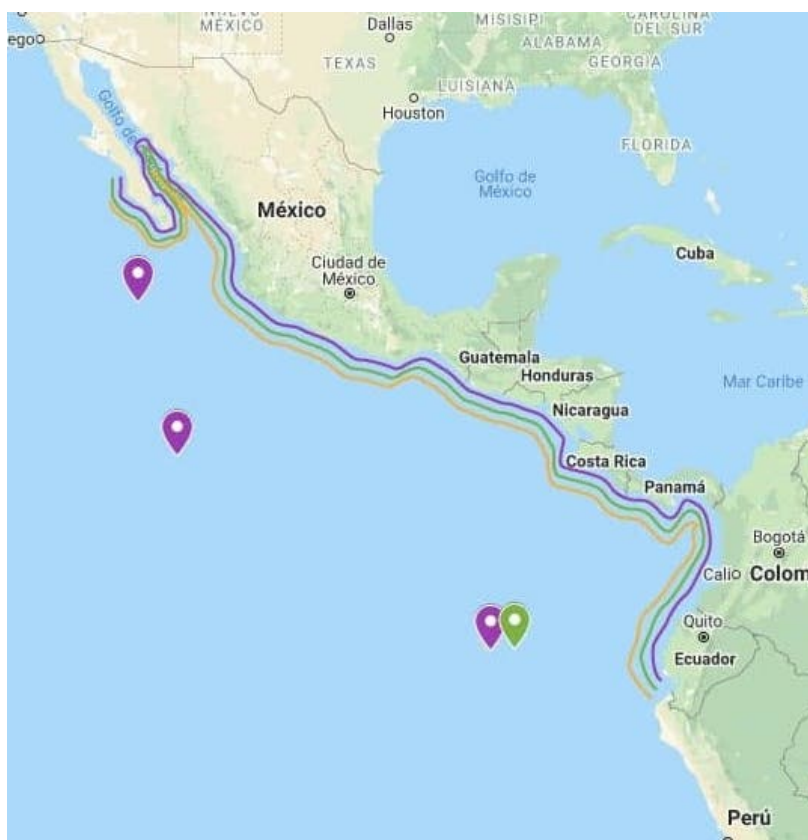


Figura 2. Distribución de *Conus gladiator*, *Conus fergusonii* y *Conus archon*. En color morado se indica la distribución de *C. gladiator*, incluidas las Isla Clipperton, Islas Revillagigedo e Islas Galápagos; en color verde se indica la distribución de *Conus fergusonii* incluida la Isla Lobos y en naranja *Conus archon*. (Mapa obtenido en Google My Maps y modificado con la información obtenida de Tenorio, 2013 [84, 85, 86]).

La concha es de color blanco en el fondo con dos bandas espirales de color pardo claro; el periostraco es fibroso y de color pardo oscuro; la abertura es amplia y de color blanco. Los adultos tienen una longitud promedio de 43.2mm y diámetro de 27.4 mm (Figura 3) [66].



Figura 3. Fotografía de *Conus gladiator*. A) El caracol se encuentra asociado a la anémona del género *Palythoa* B) Tamaño del caracol en cm (A) Elaboración por miembros de COMUAS, B) elaboración propia).

2.6 Estudios del veneno de *Conus*

El veneno de estos gasterópodos ha generado gran interés para el desarrollo de fármacos debido a que es un “coctel” de péptidos neuroactivos, mismo que les es útil para la captura de presas y defensa contra depredadores, y lo cual ha generado gran diversificación de las toxinas [68]. Cada especie puede producir alrededor de 100 a 200 toxinas con potencial farmacológico [18, 52]; por lo tanto, se ha estimado que aproximadamente entre 500,000 a 1,000,000 toxinas están contenidas en el veneno de las 700 especies de caracoles marinos que integran

al género *Conus* [52, 60, 67], no obstante, solo se han caracterizado menos del 0.1% de sus componentes a nivel farmacológico [44].

El estudio del veneno crudo de los caracoles marinos comenzó en los años 60's; Whyte y Edean reportaron que el veneno total del caracol *Conus geographus* causa convulsiones, parálisis y muerte en ratones [96] y posteriormente se reporta que este veneno causa parálisis en la mayor parte de las clases de vertebrados [19].

Con base en los reportes de Edean y colaboradores, Cruz, Gray y Olivera en 1978 buscaron elucidar cuál era el componente activo presente en el veneno de *Conus geographus*. A partir de diversas técnicas aislaron la miotoxina como el factor letal; ésta se compone de 13 residuos de aminoácidos, lo cual la hace interesante debido a que su tamaño es mucho menor comparándolo con las neurotoxinas de serpientes y escorpiones, que en promedio se componen de 60 residuos de aminoácidos [16].

2.7 Conotoxinas y su clasificación

La mayoría de las toxinas presentes en el veneno de *Conus* tienen una longitud de 12 a 35 residuos de aminoácidos, caracterizándose por presentar modificaciones postraduccionales, las cuales les confieren diversidad química. Se pueden clasificar en conotoxinas cuando presentan dos o más puentes disulfuro y en conopéptidos cuando presentan uno o ningún puente disulfuro [31]. Existen otras tres formas de clasificar a las conotoxinas, que pueden ser por superfamilias génicas (basada en análisis de su secuencia señal), por su arreglo de cisteínas y por familias farmacológicas (dependiendo del blanco molecular por el cual presentan afinidad) (Figura 4) [31].

Algunos ejemplos de superfamilias de conotoxinas que han sido mayoritariamente estudiadas son:

Superfamilia A: incluye a las familias farmacológicas α y α A-conotoxinas las cuales son antagonistas competitivos de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) y a las kA-conotoxinas las cuales inhiben a los canales de potasio (K^+).

Superfamilia M: las μ -conotoxinas bloquean canales de sodio (Na^+) y las Ψ -conotoxinas son antagonistas no competitivos del nAChR.

Superfamilia O: las ω -conotoxinas bloquean canales de calcio (Ca^{2+}), las kO-conotoxinas inhiben canales de K^+ , las μ O-conotoxinas bloquean canales de sodio (Na^+).

Superfamilia S: Las σ -conotoxinas presentan actividad en el receptor de serotonina ($5-HT_3$) [61].

2.9 Canales activados por voltaje

Los canales que integran a este grupo son los canales de sodio (Na_v^+), potasio (K_v^+) y calcio (Ca_v^{2+}) [71]. Se encargan de la generación de las señales eléctricas en células excitables. Dependen del cambio de voltaje en el potencial de membrana para su activación, permitiendo el paso selectivo de iones a través de la membrana plasmática a favor de su gradiente electroquímico. Presentan tres estados conformacionales: abierto (estado conductor), inactivado (estado cerrado que no se puede activar o no conductor) y cerrado (disponible para su activación) [98].

2.10 Canales de potasio

Los canales de potasio permiten el flujo de los iones K^+ a través de la membrana debido a que tienen alta selectividad por este ion. Se encuentran en todas las células y tienen diversas funciones, tales como el mantenimiento del potencial de reposo y la repolarización de la membrana durante el potencial de acción [25], la liberación de neurotransmisores, la contracción del músculo liso, el ritmo cardiaco, etc. [79, 98]. Cuando los genes de estos canales están mutados pueden causar hiperexcitabilidad (genes KCNQ2 y 3), retrasos en la repolarización del corazón (gen KCNQ1) y epilepsia (gen KCNH1) [73]. El gen KCNH1 codifica al canal Kv10.1 , cuya expresión se da en el cerebro de mamíferos; sin embargo, la expresión ectópica (fuera del cerebro) es indicador de cáncer [12].

2.10.1 Arquitectura

Estructuralmente los canales de potasio se componen de cuatro subunidades α , que forman un poro acuoso; además, se ha reportado su asociación con

proteínas accesorias denominadas β . Dependiendo del tipo de canal de potasio, cada subunidad α puede estar formada de un cierto número de segmentos transmembranales. La selectividad por el ion K^+ se debe a la presencia de una estructura llamada filtro de selectividad, ubicada en el poro, específicamente entre los segmentos 5 y 6; dicha región se conoce como asa P y se caracteriza por presentar una secuencia de aminoácidos altamente conservada (GYC) [51, 98]. Es importante resaltar que dicha secuencia se encuentra conservada entre los canales de potasio; sin embargo, en algunos casos como los canales Kv10 y Kir6, la tirosina (Y) es sustituida por fenilalanina (F) [98].

2.10.2 Clasificación

Se clasifican en 3 grandes familias con base en la arquitectura de sus subunidades α : i) Canales con seis/siete segmentos transmembranales y un poro (6STM/1P), ii) canales con 2 segmentos transmembranales y un poro (2STM/1P), y iii) canales con cuatro segmentos transmembranales y dos poros (4STM/2P) (Figura 5) [79].

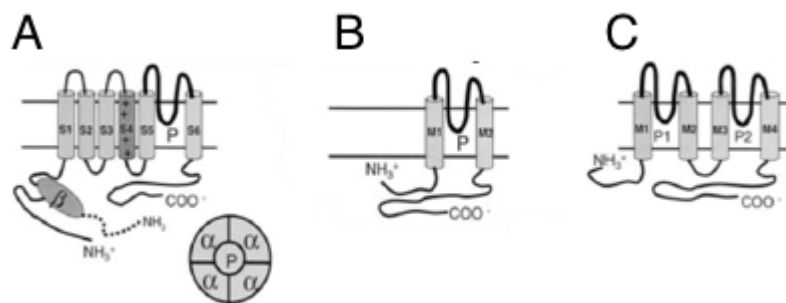


Figura 5. Clasificación de los canales iónicos de potasio. Representación esquemática de la clasificación con base a su arquitectura. En A) se representan los canales con seis segmentos

transmembranales y un poro. B) Canales con dos segmentos transmembranales y un poro. C) Canales con cuatro segmentos transmembranales y dos poros (Modificado de Solís *et al.* 2008 [79]).

La familia de los canales de potasio 6STM/1P engloba a los canales dependientes de voltaje (Kv) y a los activados por Ca^{2+} (K_{Ca}). Los primeros, como su nombre lo dice, son activados por voltaje y su función es repolarizar a las células excitables. Los segundos se activan por voltaje y por la concentración de Ca^{2+} intracelular [98].

Los canales 2STM/1P son rectificadores entrantes (K_{IR}). Esta familia incluye 7 subfamilias K_{IR} [79], cuyos miembros también son dependientes de voltaje; estos se encargan de dejar pasar más cargas positivas hacia el interior de la célula.

Los canales 4STM/2P son conocidos como canales de fuga y se encargan de estabilizar el potencial de reposo y pueden ser tanto dependientes como independientes del voltaje. Esta familia incluye 15 subfamilias [79].

2.10.3 Canal Kv10.1

El canal Kv10.1 forma parte de los canales dependientes de voltaje (6STM/1P) y en la literatura se le reporta como canal *ether à-go-go* ó hEAG. En mamíferos, su expresión ha sido reportada únicamente en el sistema nervioso (SN) de adultos; anteriormente su función era desconocida [50, 59]. No obstante, Mortensen y colaboradores reportaron de Kv10.1 que su función es regular la excitabilidad presináptica de regiones con altas tasas de disparo o elevada actividad eléctrica [57]. Este canal se localiza en mayor parte en las terminales presinápticas de las fibras paralelas y las células de Purkinje (PF-PC) [57].

Cabe remarcar que el canal Kv10.1 cuenta con características únicas que no comparte con el resto de los canales de potasio. A nivel electrofisiológico, se caracteriza por presentar el efecto o desplazamiento Cole-Moore, el cual establece que una fuerte hiperpolarización que precede a un pulso despolarizante retrasa la activación del canal [14, 49]. Otras características que presenta el canal Kv10.1 es la de no inactivarse [49] y que su cinética de activación se puede modular por la presencia del ion Mg^{+2} [88].

A nivel de expresión ectópica, se ha reportado que está relacionada con el 70% de los tipos de cáncer en humanos, debido a que promueve la proliferación de las células cancerígenas [26, 64, 65]. Estudios en cultivos celulares en donde se ha transfectado dicho canal, indican un aumento de la actividad metabólica, al ser comparados con cultivos de células sanas o que han sido transfectadas con otro canal de potasio (Kv1.4). En células de fibroblasto (NIH3T3) la expresión del canal causa aglutinamientos de éstas; es decir, inhibe la propiedad que tienen éstas de no proliferar al entrar en contacto entre sí [64].

Estudios recientes sobre mutaciones en el gen que codifica este canal (*KCNH1*, cromosoma 1) [64] son responsables de retrasos mentales, como son el caso del síndrome de Zimmerman-Laband [42] y el síndrome de Temple-Baraitser [78]. Dado que el canal Kv10.1 está involucrado en diversas patologías, se ha vuelto un blanco terapéutico de gran importancia [74].

La búsqueda de fármacos bloqueadores y moduladores específicos del canal Kv10.1 que pudieran contrarrestar la actividad del canal ha sido exhaustiva. Sin embargo, fármacos que se sabe tienen afinidad por el canal no son del todo específicos; algunos ejemplos son: el astemizol, la imipramina y la guinidina, que

mostraron un efecto antiproliferativo en distintos cultivos que expresan a Kv10.1 [65, 97].

Tomando en consideración la falta de especificidad de los fármacos, se ha recurrido al estudio de las toxinas de animales venenosos, con el objetivo de aprovechar la especificidad que generalmente presentan por sus blancos moleculares y que dicha propiedad permita el emplear estas moléculas como herramientas para el desarrollo de fármacos.

Ejemplos de la búsqueda de toxinas son el péptido k-hefutoxina1, el cual fue aislado del veneno del escorpión asiático negro del bosque (*Heterometrus fulvipes*). La inhibición es dosis dependiente con una IC₅₀ de 26 µM en el canal Kv10.1 [56]. Una característica interesante de esta toxina es que para presentar actividad sobre otros canales (Kv1.1 y Kv1.2) debe ser evaluada a concentraciones muy altas (40 µM) [81].

Otro péptido reportado en la literatura con actividad inhibitoria (IC₅₀ 1.01 µM) en el canal Kv10.1 es APETx4, el cual se aisló del veneno de la anémona *Anthopleura elegantissima*. Este péptido fue evaluado en diversos canales a una concentración de 1.6 µM; no obstante, se reportó que no tiene inhibición significativa en los canales Kv1.1 y Kv11.1, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, Kv1.3, Kv1.5 y Kv2.1, sin embargo, presenta mayor afinidad por el canal Kv1.4 (66% de inhibición) [55].

2.11 Conotoxinas con actividad en canales de potasio

Diversas toxinas del veneno de Conos presentan actividad en canales de potasio, pero poco es conocido sobre la forma en que interactúan las toxinas con dichos canales [44].

Las kA-conotoxinas (MIVA, SIVA, SIVB, PIVE y PIVF) presentan actividad en peces y anfibios, pero no en mamíferos; el motivo se desconoce [36, 76, 83].

En el grupo de las kO-conotoxinas, se encuentra la PVIIA, fue aislada del veneno de *Conus purpurascens* e interactúa con el canal de potasio tipo *Shaker* a una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 60 nM; no obstante, no tiene actividad en el canal Kv1.1 (canal de mamífero homólogo al tipo *Shaker*) [32, 48, 77, 90].

Entre las kM-conotoxinas encontramos a RIIK, RIIIJ, Vt3.1. Tanto la kM-RIIK como la kM-RIIIJ fueron aisladas del veneno de *Conus radiatus*, la primera tiene actividad en canales de potasio tipo *Shaker* y una IC₅₀ de 1.21 µM. La segunda bloquea canales de potasio Kv1.2 y Kv1.6 de humano y Kv1.4 de rata. [13]. El péptido Vt3.1 fue aislado del veneno de *Conus vitulinus* y tiene actividad en la subunidad de canales de potasio KCa1.1 en asociación con β4 [32, 45].

La conotoxina PIXIVA pertenece a las kJ-conotoxinas, fue aislada del veneno de *Conus planorbis*, es peculiar debido a que es capaz de inhibir al canal Kv1.6 y a diversas isoformas del nAChR [29].

Entre las kI-conotoxinas se encuentran ViTx, Sr11a y BeTX. La ViTx puede inhibir al canal Kv1.1 y Kv1.3 pero no al Kv1.2. Por otra parte, la Sr11a inhibe al canal Kv1.2 y Kv1.6 pero no al Kv1.3 [2, 35].

El Contrifano-Vn fue aislado del veneno de *Conus ventricosus* y se le considera como uno de los componentes más pequeños reportado en los venenos de *Conus* (9 residuos de aminoácidos) [32]. Presenta actividad en canales de potasio dependientes de voltaje y dependientes de Ca²⁺. La Konkunitzina-S1 (*Conus striatus*) es de las toxinas más grandes reportadas en el

veneno de *Conus* ya que presenta 60 residuos de aminoácidos e inhibe los canales de potasio tipo *Shaker* (IC_{50} 502 nM) [4].

Además, se han reportado conopéptidos (sin puentes disulfuro) como Mo1659 el cual fue aislado de *Conus monile* y produce una reducción en la amplitud de las corrientes de potasio mayor al 50% [82]. Los conopéptidos CPY-Fe1 y CPY-PI1 fueron aislados de *Conus ferrugineus* y *Conus planorbis* respectivamente, CPY-Fe1 tiene una IC_{50} de 8.8 μ M en el canal Kv1.6, mientras que, CPY-PI1 tiene una IC_{50} de 170 nM para el canal Kv1.6 y una IC_{50} de 2 μ M para el canal Kv1.2 [30]. Por último, la Conorfamida-Sr3 se obtuvo del veneno de *Conus spurius* y tiene actividad en el canal de potasio tipo *Shaker* con una K_d de 2.7 μ M [10].

III. JUSTIFICACIÓN

El interés por estudiar el veneno de los caracoles *Conus* es relativamente reciente, a partir de los años 60's se han elucidado diversas características que éste presenta. Con base en los estudios de Kohn podemos conocer las características del aparato venenoso [41] y con el estudio de Whyte y Edean en 1962 se conocen los efectos que el veneno puede causar en ratones [96].

A lo largo de estos 60 años en los que el veneno de caracoles *Conus* ha sido estudiado, se han descubierto gran variedad de toxinas con actividad en distintos blancos moleculares, ya sean canales activados por voltaje o por ligando. No obstante, a la fecha, de las 700 especies descritas de *Conus*, sólo de 11 especies se conoce que sus venenos presentan toxinas con actividad en canales de K^+ y de estos solamente han sido reportadas 15 toxinas [91].

Con base a lo reportado en la literatura, aún no se cuenta con alguna conotoxina que presente actividad en el canal de potasio Kv10.1. Por lo tanto, es importante la búsqueda de componentes en los venenos de *Conus* que inhiban o modulen la actividad del canal Kv10.1, ya que está involucrado en diversas patologías como son el 70% de los tipos de cáncer (expresión ectópica), síndromes asociados al retraso mental y epilepsia (mutaciones en el gen KCNH1) [26, 64, 65].

El interés de emplear conotoxinas como posibles moduladores o inhibidores de canales iónicos se debe a la alta afinidad por su blanco molecular; ejemplo de ello es la conotoxina kM-R11K, que presenta actividad en Kv1.2 (IC_{50} 335 nM) y no en otros canales de potasio (Kv1.1, Kv1.3, Kv1.4), incluso a concentraciones de 10 μ M [21].

Además, el veneno de cada especie de *Conus* se constituye de 100 a 200 toxinas con potencial farmacológico; por lo tanto, esto facilita encontrar alguna toxina capaz de modular o inhibir la cinética del canal Kv10.1 en distintas especies de *Conus*, ya que es posible que los péptidos de especies diferentes compartan el mismo blanco molecular [8].

IV. HIPÓTESIS

Dado que se ha demostrado la presencia de toxinas de Conos con actividad sobre distintos subtipos de canales de potasio, es posible encontrar en el veneno de *Conus gladiator* por lo menos un componente que module o inhiba el canal de potasio Kv10.1.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

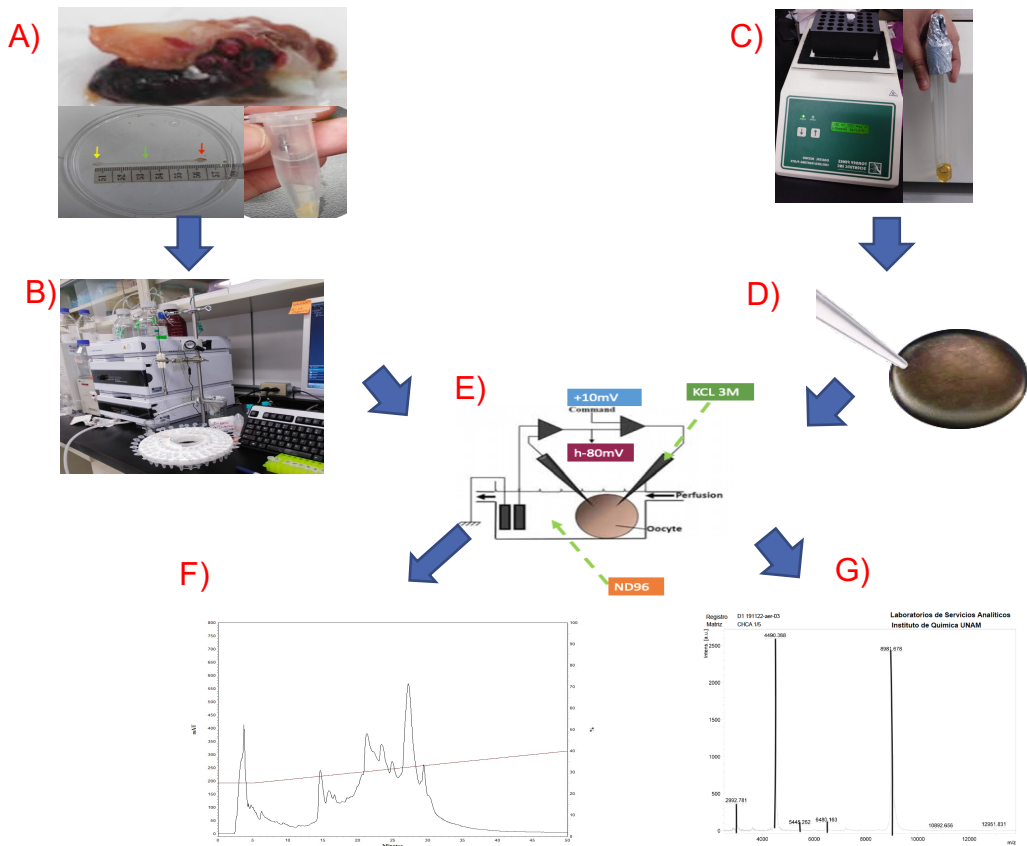
- Identificar fracciones en el veneno de *C. gladiator* con actividad en el canal de potasio Kv10.1.

Objetivos particulares

- Obtener y fraccionar el veneno total de la especie *C. gladiator*.
- Llevar a cabo la expresión heteróloga del canal Kv10.1 en ovocitos de *Xenopus laevis*.
- Realizar la evaluación electrofisiológica de las fracciones del veneno en el canal Kv10.1.
- Repurificar las fracciones activas en el canal Kv10.1.
- Determinar el peso molecular de las fracciones con actividad en Kv10.1.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A) Procesamiento del veneno. Extracción del organismo, disección del conducto venenoso y obtención del extracto crudo de veneno. **B) Fraccionamiento del veneno.** Fraccionamiento del veneno mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC). **C) Amplificación del RNA codificante para el canal Kv10.1.** Transformación de la cepa XL1-blue de *E. coli*, linealización (Sfil) y transcripción (T7). **D) Expresión heteróloga.** Inyección de 4.6, 9.2 y 13.8 ng del RNA codificante para el canal Kv10.1. **E) Evaluación electrofisiológica.** Potencial de mantenimiento a -80 mV y pulsos de prueba a +10 mV cada 10 segundos. **F) Determinación de masa molecular de las fracciones con actividad en el canal Kv10.1.** MALDI-TOF en la matriz CHCA 1/5.



VII. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material Biológico

Se colectaron 10 ejemplares de *Conus gladiator* en la zona intermareal de la bahía de Mazatlán, Sinaloa, en periodo de marea baja en el mes de febrero (Figura 6). Se colocaron en un contenedor con agua de mar, al cual se le hicieron recambios de agua constantes.

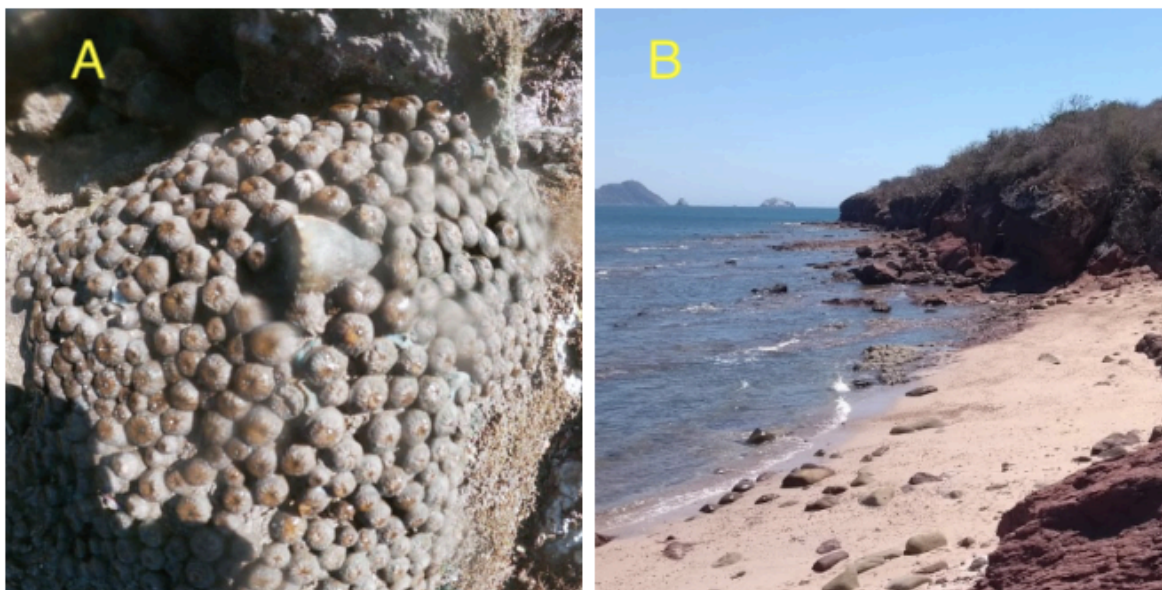


Figura 6. Colecta de *Conus gladiator*. A) Caracol *C. gladiator* asociado a la anemona del género *Palythoa*. B) Zona intermareal en la bahía de Mazatlán. (Fotografías: elaboración propia).

7.2 Obtención del extracto de veneno

La extracción del organismo se logró por ruptura de la concha con una prensa de banco (Figura 7). La disección de los conductos venenosos (10 en total) se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias del Mar (FACIMAR) de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), en el Laboratorio que alberga la colección de moluscos de la Universidad Autónoma de Sinaloa (COMUAS) a cargo de la Dra. Mónica Ortiz Arellano (Figura 8). Posteriormente, estos fueron colocados en 1 ml de solución de extracción (40% acetonitrilo (ACN) y ácido

trifluoroacético (TFA) al 2%). Durante el transporte de Sinaloa a la Ciudad de México se mantuvieron en hielo seco. Posteriormente se almacenaron a -20°C durante 48 h hasta su procesamiento.

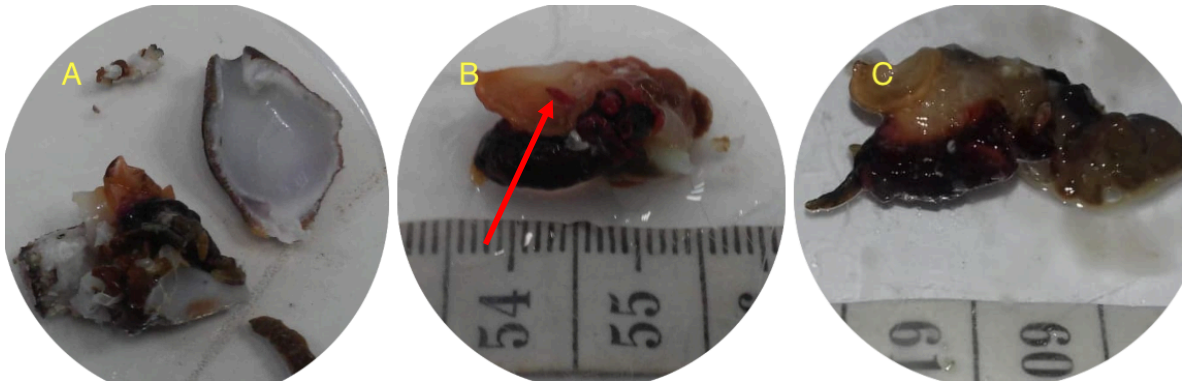


Figura 7. A) Extracción del organismo por ruptura de concha. B) Ejemplar macho de *C. gladiator*. La flecha roja señala el órgano sexual (pene). C) Ejemplar hembra de *C. gladiator* (ausencia de pene) (Fotografías: elaboración propia).

Los conductos venenosos se descongelaron a -4°C , y posteriormente se homogeneizaron con un Polytron Tissue Tearor 985370 de BioSpec Products en solución de extracción. El homogenado se centrifugó a $12,000\text{ g}$ durante 10 minutos; finalmente se colectó el sobrenadante (extracto crudo de veneno) en 5 tubos Eppendorf de 2ml.

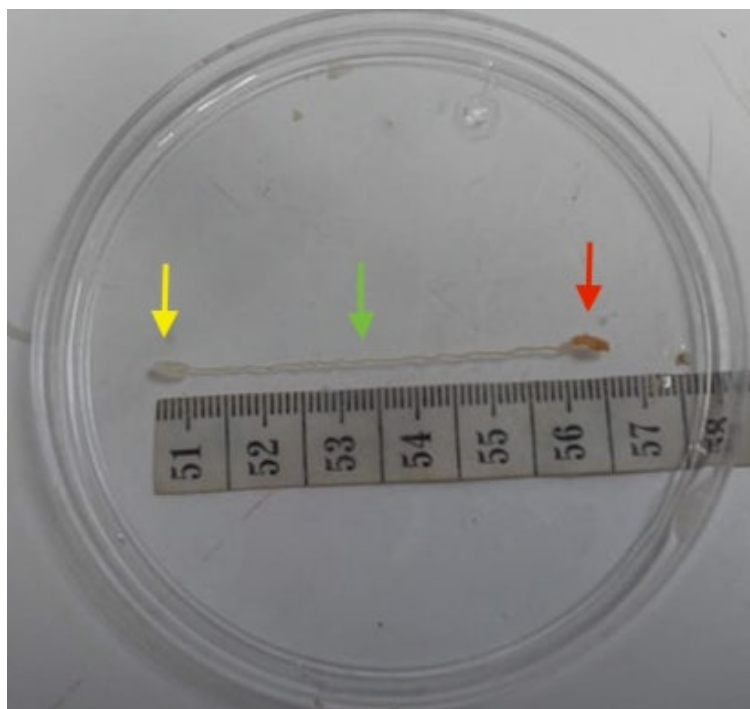


Figura 8. Estructuras del aparato venenoso de *Conus gladiator*. La flecha amarilla señala el bulbo venenoso. La flecha verde señala el conducto venenoso. La flecha roja señala el saco radular. (Fotografía: Elaboración propia).

7.3 Cuantificación del veneno

La cantidad de proteína total del extracto crudo de veneno se cuantificó utilizando 1 μ l por tubo en el sistema NanoDrop 2000 Thermo Scientific. La longitud de onda se monitoreó a 280 nm y el blanco utilizado fue solución de extracción.

7.4 Fraccionamiento total del veneno

El fraccionamiento del veneno crudo de *C. gladiator* se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés). Se trabajó con un total de 7 mg de proteína para cada uno de los fraccionamientos realizados. El equipo de cromatografía está provisto de una columna analítica Vydac C18 (4.6 mm x 250 mm, tamaño de partícula 5 μ m,

tamaño del poro 300 Armstrong), y una precolumna C18 (218TP54, 4.6 X 10 mm, 5 µm de tamaño de partícula).

Las soluciones empleadas para el fraccionamiento fueron solución A (0.1%TFA) y solución B (0.085% TFA en 90% de ACN). El gradiente de elución fue de 5% a 100% de solución B durante 100 minutos a un flujo de 1ml/min. El monitoreo se realizó con un espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda de 220 nm.

7.5 Amplificación del plásmido del canal de potasio Kv10.1

Se utilizaron células de la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli*; a éstas se les añadió 1 µl del plásmido del canal Kv10.1 donado por el Dr. Luis Pardo del Instituto Max-Planck de Medicina Experimental, Alemania. La mezcla se mantuvo en hielo por 30 minutos. Enseguida se les dio un choque térmico en un Thermoblock al colocarlas a 42°C por 30 segundos y se colocaron en hielo durante 5 minutos. La recuperación de las células se llevó a cabo en el medio SOC (Tryptona, Extracto de Levadura, NaCl 8 mM, KCL 250 mM, MgCl₂ 2 M y glucosa 20 mM; pH 7 ajustado con 1 N NaOH) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se cultivaron en cajas de Petri con medio LB (Tryptona, Extracto de levadura, NaCl, Agar Agar; se ajustó a pH 7.2 con 10 N NaOH) y se añadió el antibiótico de resistencia (Ampicilina 80 µg/ml) al medio, se incubaron 12 horas a 37°C. Posteriormente, se seleccionaron las colonias individuales definidas y se sembraron en tubos Falcon de 15 ml con 3 ml de medio LB líquido con ampicilina durante 12 horas a 37°C.

7.5.1 Obtención del cDNA

Para obtener el material genético, éste fue purificado con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de la marca Promega, después de haber realizado la propagación del mismo en células en medio líquido (tubos de 15 ml); el cDNA se cuantificó con el sistema NanoDrop 2000 a una longitud de onda de 260/280 nm.

7.6 Transcripción *in vitro*

Previamente a realizar la transcripción fue necesario llevar a cabo la linealización del cDNA con la enzima Sfil. Se llevó a cabo su purificación con el kit EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit (Bio Basic). Para la transcripción se empleó la enzima T7 (2 μ L) siguiendo el protocolo de Ambion mMessage mMachine. Finalmente, se llevó a cabo la purificación con el kit RNeasy Mini kit (QIAGEN) y se realizó la cuantificación del material en un sistema NanoDrop 2000.

7.7 Obtención de ovocitos

Se utilizaron ovocitos de *Xenopus laevis*, mismos que fueron obtenidos mediante microcirugías en la parte abdominal de las ranas. Éstas se anestesiaron con tricaína metasulfonato (MS-222) al 2% durante 20 minutos (NOM-062-ZOO-1999). Los ovocitos se extrajeron y se colocaron en medio OR-2 (NaCl 82.5 mM, KCL 2.5 mM, MgCl₂·6 H₂O 1 mM, HEPES 5 mM; el pH se ajustó a 7.5 con NaOH 10 N) con el cual se realizaron lavados para eliminar residuos (Figura 9).

Posterior a los lavados, se agregó colagenasa al medio OR-2 (1.15 mg/ml) y se mantuvo en agitación hasta observar que el saco folicular se disgregó.

Después, se realizaron lavados con OR-2 hasta que el medio se observase transparente.

Finalmente, se seleccionaron los ovocitos de los estadios de desarrollo V y VI y se colocaron en medio ND96 (mM): 96 NaCl, 2 KCL, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, ajustado a pH 7.2 con 10 N NaOH y adicionado con los antibióticos Penicilina/Estreptomicina (100 U/100 µg) /ml y Gentamicina (100 µg/ml).

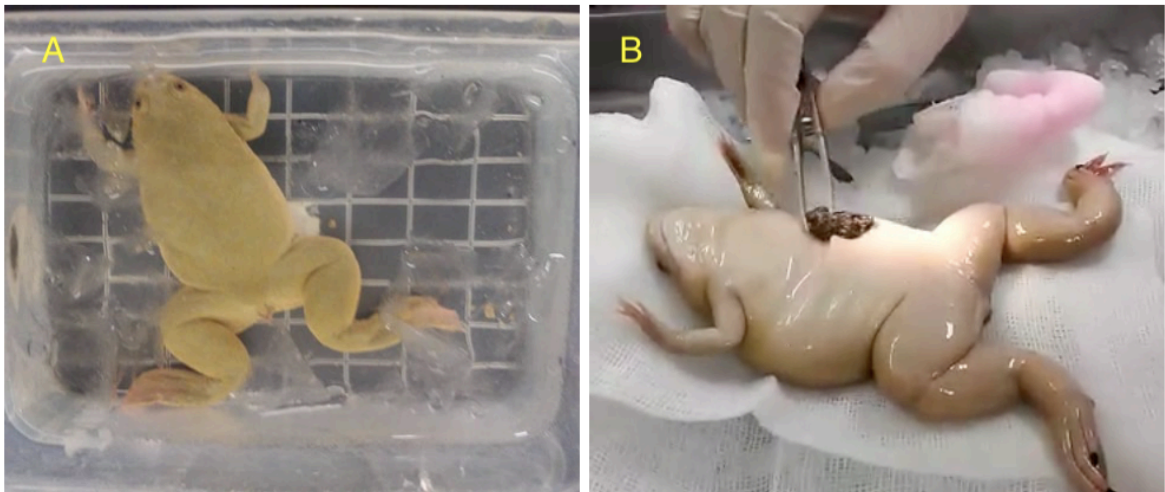


Figura 9. Microcirugía de *X. laevis*. A) Rana en triclaína metasulfonato al 2% durante 20 minutos.

B) Extracción de ovocitos. (Fotografía: Elaboración propia).

7.8 Expresión heteróloga

Con ayuda de un microinyector Nanoliter 2000 se inyectaron 4.6, 9.2 y 13.8 ng de mRNA que codifica el canal de potasio Kv10.1 en el citoplasma de los ovocitos; posteriormente, se incubaron a 15° C durante 24 horas.

7.9 Evaluación electrofisiológica

Los registros electrofisiológicos se realizaron empleando la técnica de fijación por voltaje con dos microelectrodos (Voltage Clamp) en los ovocitos de *Xenopus laevis*; se utilizó un amplificador OC725C de Warner (New Haven, CT, USA) y un software LabView (National Instruments, Austin, TX, USA). Los microelectrodos

(resistencia 0.6-1 M Ω) fueron llenados con solución de cloruro de potasio (KCl) 3 M. Se utilizó la solución ND96 como solución de registro, la cual se compone de (mM): 96 NaCl, 2 KCL, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES, ajustada a pH 7.2 con 10 N NaOH para simular la solución extracelular. El potencial de mantenimiento se fijó a -80 mV y los pulsos de prueba fueron de +10 mV cada 10 segundos.

Los registros se realizaron a una temperatura de 19 a 22° C con una duración de 1200 ms. Los datos obtenidos fueron analizados a través de la programación llamada Recall-All mediante el uso del software LabVIEW (National Instruments) los trazos de las corrientes se elaboraron con el software Sigmaplot 10.0. (Systat Software Inc., San José, CA, USA.)

7.10 Análisis estadísticos

El porcentaje de bloqueo de las fracciones evaluadas se calculó tomando los valores máximos de la amplitud de corriente (tiempo de registro 1095 a 1100 ms) del ND96 (control) y de las fracciones de veneno. Finalmente, en el programa Excel se calculó el promedio de la corriente normalizada. El porcentaje de bloqueo se calculó con la siguiente fórmula $(1 - I_{\text{toxina o fracción}} / I_{\text{control}} \times 100)$.

Para determinar si el porcentaje de bloqueo fue significativo, se analizaron los datos de aquellas fracciones con una inhibición superior al 20%, recurriendo a la prueba estadística *T* de *Student* para muestras independientes en el software *Statistica* 10 (n=3).

7.11 Determinación de la masa molecular

Para el análisis de la masa molecular, se enviaron 1.22 μg de las fracciones repurificadas (F30-1 y F30-2) a los Laboratorios de Servicios Analíticos del Instituto de Química, UNAM. Dicho análisis se llevó a cabo en un espectrómetro

de masas marca Bruker Microflex con MALDI-Tiempo de vuelo (MALDI-TOF por sus siglas en inglés), el cual se compone de la fuente de iones Bruker microSCOUT, el tubo de vuelo vertical el cual contiene el reflector y dos placas detectoras, el sistema de vacío, un digitador, el sistema de láser y una cámara. La matriz en la que se mezclaron cada una de las muestras fue ácido-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, por sus siglas en inglés).

VIII. RESULTADOS

Se obtuvieron 10 conductos venenosos en total de *Conus gladiator*, los cuales se homogeneizaron en solución de extracción y se centrifugaron a 12,000 g por 10 minutos y se trabajó con el sobrenadante (veneno total, 14 ml). Dicho sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf y se cuantificó la proteína en un sistema NanoDrop 2000 (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la cuantificación de proteínas usando el sistema NanoDrop 2000.

Muestra	A280 (mg/mL)
Blanco (Solución de extracción)	0.015
1	3.03
2	2.82
3	2.98
4	2.51
5	2.8

8.1 Fraccionamiento total del veneno

Se inyectaron 7 mg del veneno crudo de *C. gladiator* en el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC). El perfil cromatográfico del veneno se observa en la Figura 10.

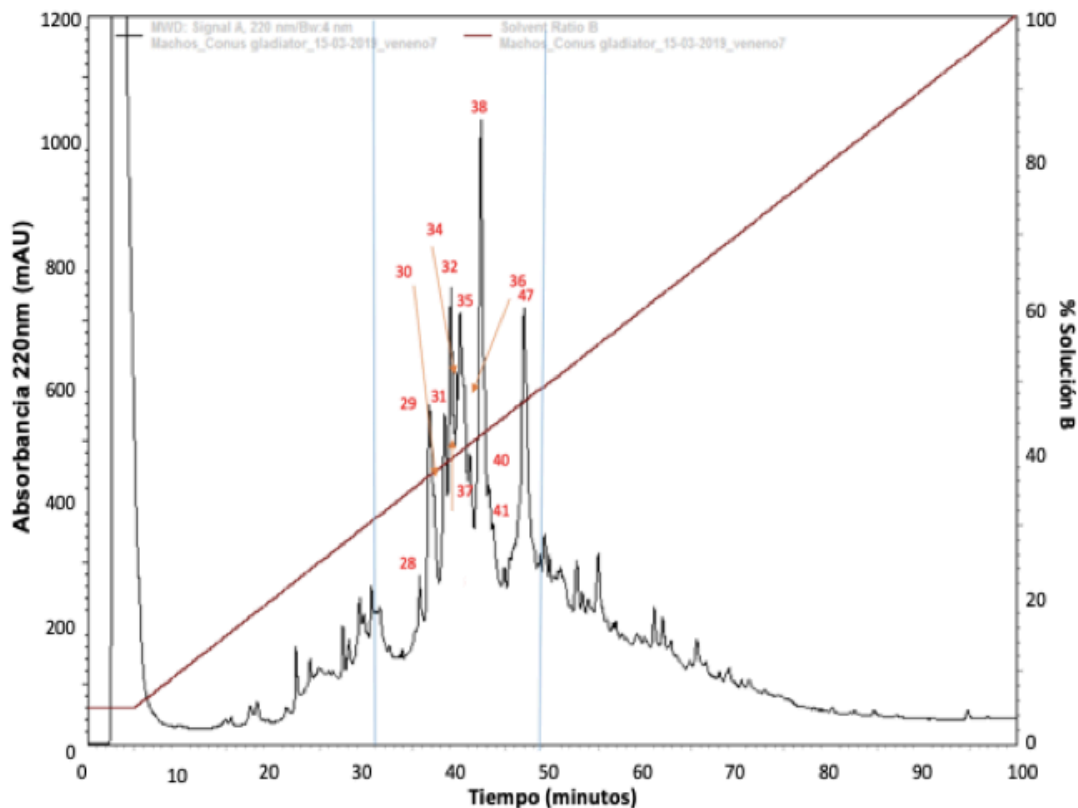


Figura 10. Perfil cromatográfico del veneno total de *C. gladiator*. La longitud de onda a la que se monitoreó fue 220 nm; se usó un paso isocrático a 5% de solución B durante 5 minutos seguido de un gradiente lineal de 5-100% de solución B en 95 minutos (línea roja). El área del recuadro azul comprende las fracciones que se evaluaron electrofisiológicamente.

Para llevar a cabo la evaluación electrofisiológica de cada una de las fracciones de interés (numeradas en color rojo en la Figura 10), se decidió comenzar con una concentración de 10 μM , tomando en consideración el antecedente reportado en la literatura que indica que el conopéptido CPY-Fe1 de *Conus ferrugineus* tiene una IC_{50} de 8.8 μM en el canal Kv1.6 expresado en ovocitos de *X. laevis* [30].

Para estimar la cantidad disponible por fracción del veneno de *C. gladiator*, se utilizó como referencia una muestra de 5 nanomoles del conopéptido CPY-PI1,

cuyo peso molecular promedio es de 4094.80 Da equivalente a 20.47 μg misma que fue analizada en el cromatógrafo y de esta manera se pudo obtener un valor de referencia (área bajo la curva) que permitió hacer la estimación de la cantidad disponible de cada una de las fracciones de interés (Figura 11).

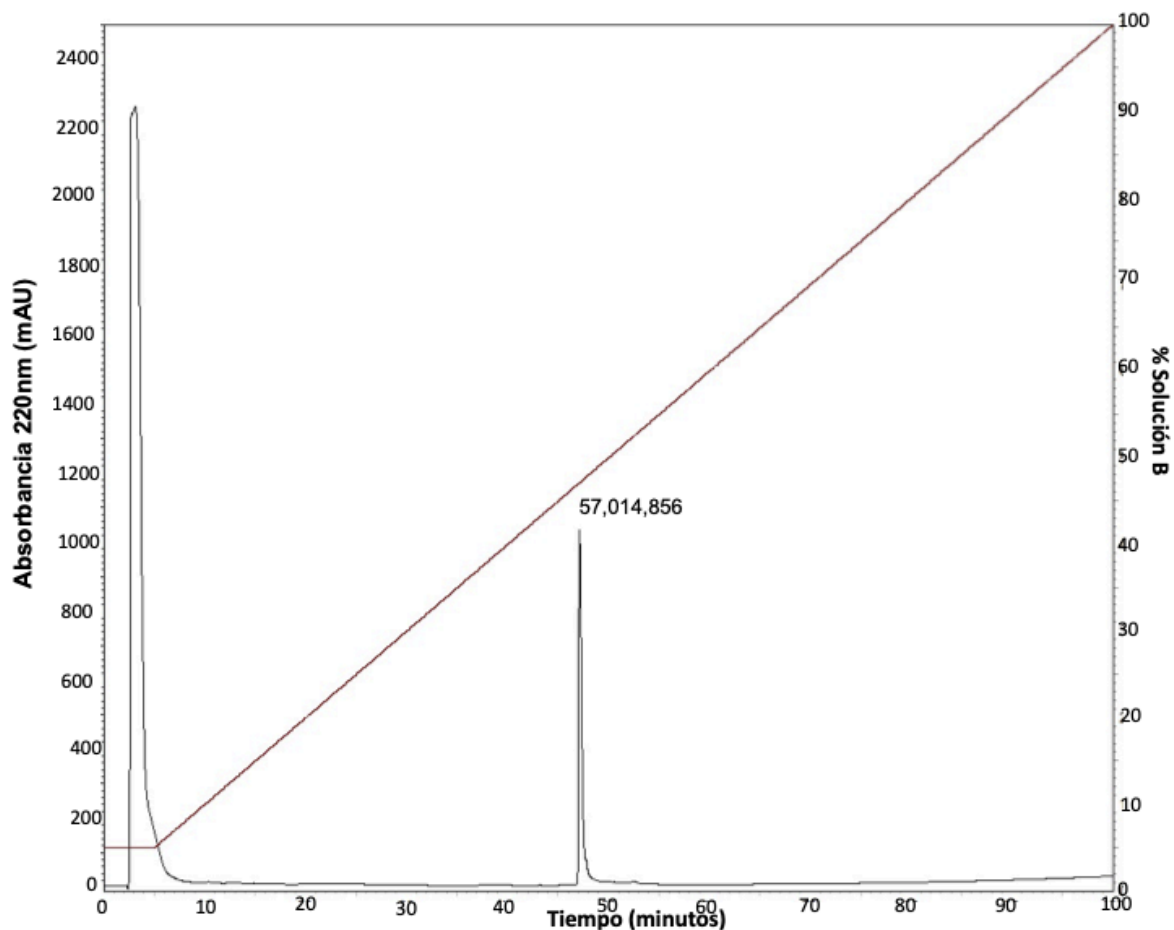


Figura 11. Perfil cromatográfico del péptido CPY-PI1a. La longitud de onda a la que se monitoreó fue 220 nm; se usó un paso isocrático a 5% de solución B durante 5 minutos, seguido de un gradiente lineal de 5-100% de solución B en 95 minutos (línea roja); el valor en la parte superior del pico indica el área bajo la curva de 5 nanomoles = 20.47 μg .

8.2 Evaluación electrofisiológica

Se llevó a cabo la evaluación electrofisiológica de 13 fracciones de *Conus gladiator* a una concentración de 10 μM en el canal Kv10.1. Cabe resaltar que

solamente con cinco de ellas se observó una disminución en la amplitud de la corriente superior a 20%. La fracción 28 presentó un porcentaje de bloqueo de 28.72%, la fracción 29 de 28.15%, la 30 de 38.68%, la fracción 35 de 39.16% y la 47 de 33.57% (Figura 12).

En la Figura 13 se muestra que el efecto sobre la amplitud de la corriente de las 5 fracciones activas es estadísticamente significativo con base en la prueba *T* de *Student* para muestras independientes ($p < 0.05$).

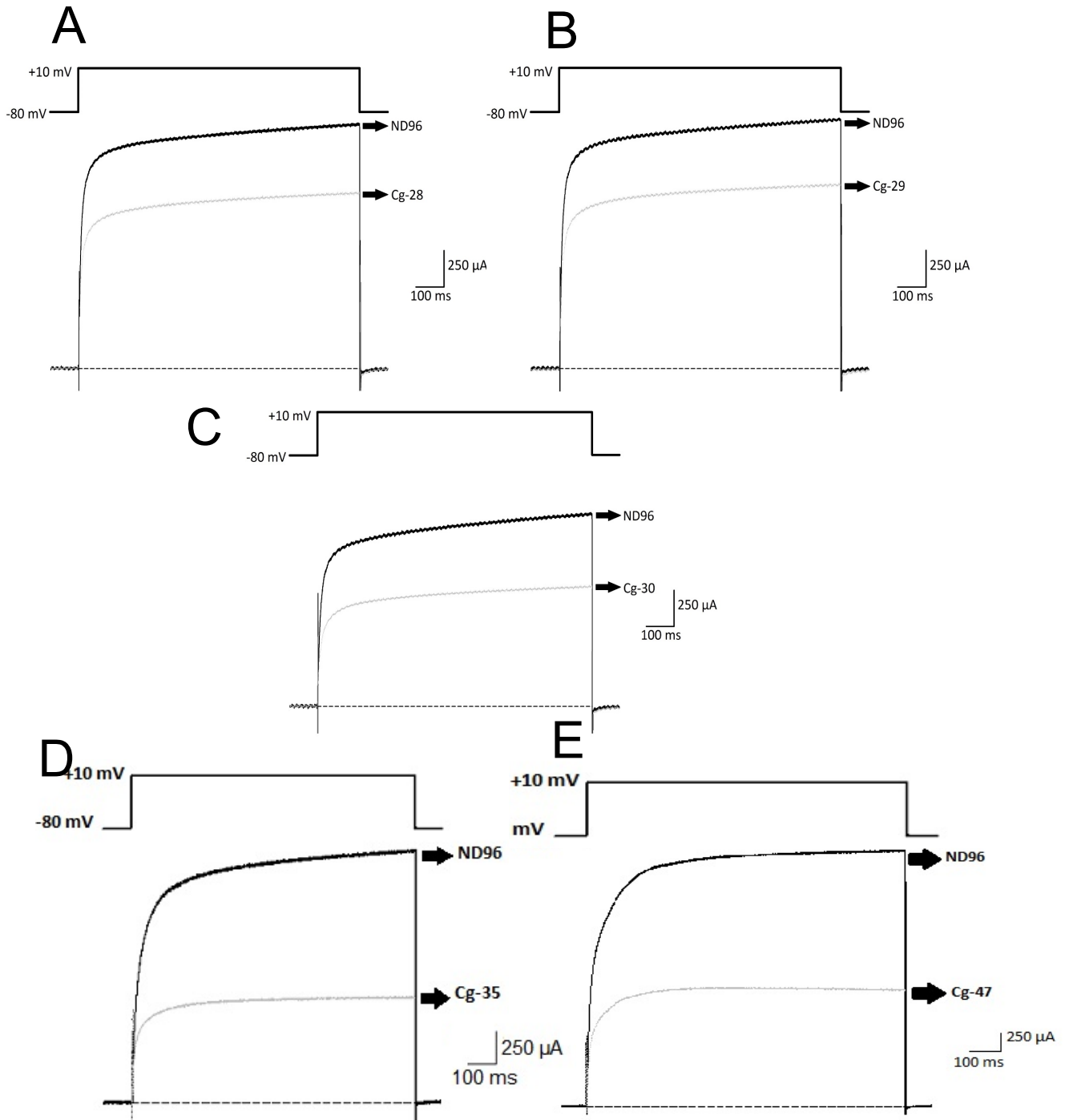


Figura 12. Evaluación electrofisiológica de las fracciones A) 28, B) 29, C) 30, D) 35 y E) 47 de *C. gladiator* en el canal de potasio Kv10.1. En los trazos de color negro se indica la corriente en condiciones control (ND96), mientras que en color gris la actividad de las fracciones. El número de ensayos por fracción fue de 3 en ovocitos distintos (n=3).

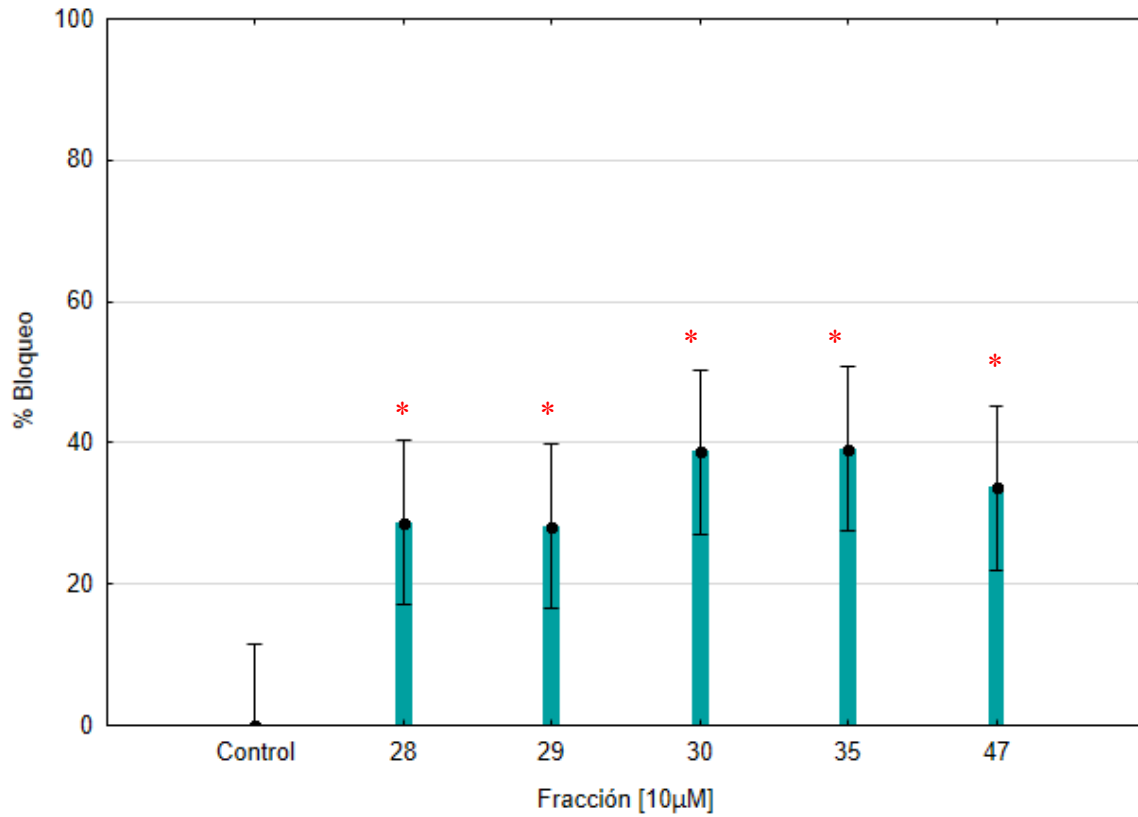


Figura 13. Porcentaje de bloqueo de las cinco fracciones activas del veneno de *C. gladiator* en el canal de potasio Kv10.1. La concentración a la que se evaluaron las fracciones fue de 10 μ M. Los puntos indican la media \pm E.E.M. El número de ensayos por fracción fue de 3 (n=3). Los asteriscos indican una $p < 0.05$ respecto al control.

8.3 Repurificación de las fracciones activas

Posteriormente a la evaluación electrofisiológica, las fracciones del veneno de *C. gladiator* que presentaron una mayor actividad (28, 29 y 30) se repurificaron en RP-HPLC utilizando un paso isocrático a 25% de solución B durante 5 minutos seguido de un gradiente lineal de elución que va de 25 a 40% de solución B durante 45 minutos con un flujo de 1 ml/min. En la primera repurificación, el rendimiento obtenido de la fracción 28 fue mínimo (Figura 14); por lo tanto, se decidió repurificar a estas tres fracciones en conjunto para así poder recuperar la mayor cantidad posible (Figura 15).

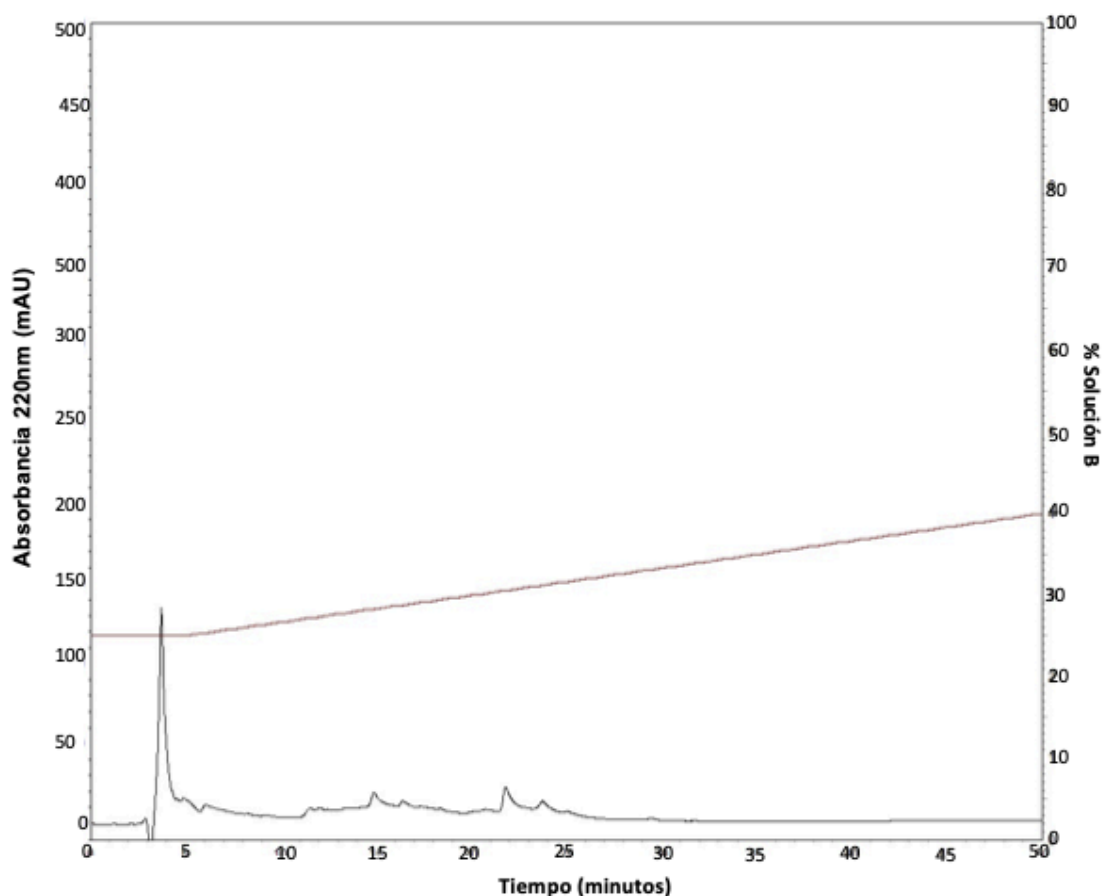


Figura 14. Repurificación de la fracción activa 28. La longitud de onda a la que se monitoreó fue 220 nm; el programa utilizado consistió en un paso isocrático a 25% de solución B durante 5 min seguido de un gradiente lineal de 25 a 40% de solución B en 45 minutos (línea roja).

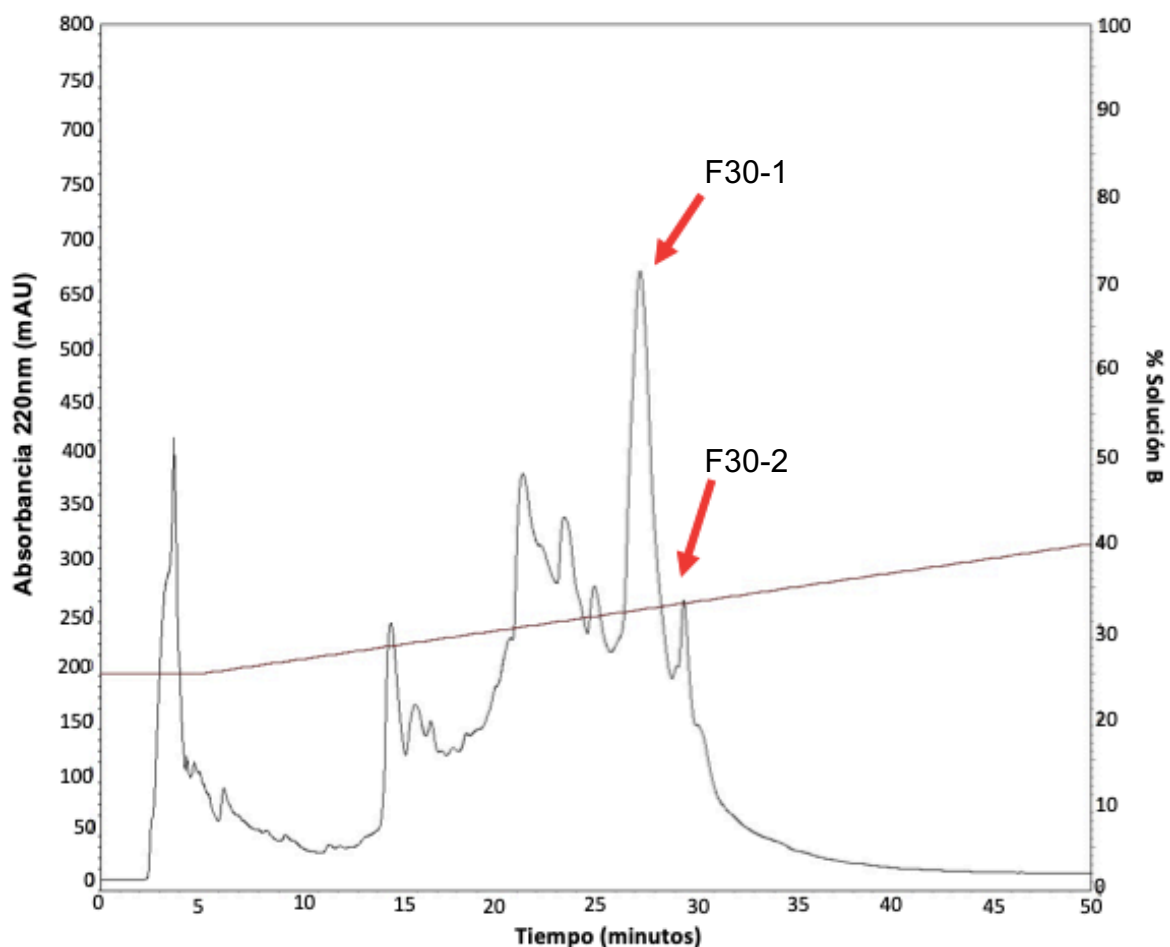


Figura 15. Repurificación de las fracciones activas 28, 29 y 30. La longitud de onda a la que se monitoreó fue 220nm; el programa utilizado consistió en un paso isocrático a 25% de solución B durante 5 min seguido de un gradiente lineal de 25 a 40% de solución B en 45 minutos (línea roja). Las flechas rojas indican las muestras que se enviaron a determinación de masa molecular.

Para la fracción 35 se utilizó un paso isocrático a 33% de solución B durante 5 min seguido de un gradiente de elución de 33 a 40% de solución B en 21 minutos. En el perfil cromatográfico (Figura 16) se puede observar la presencia de tres componentes, lo cual sugiere realizar una nueva repurificación; sin embargo, la cantidad del componente obtenido es muy poca para realizarlo.

Con la fracción 47 se empleó un paso isocrático a 39% de solución B durante 5 min seguido de un gradiente de elución de 39 a 45% de solución B en 18 minutos; en el perfil cromatográfico (Figura 17) se observan dos componentes, lo cual indica que se debe repurificar nuevamente; no obstante, la cantidad de material obtenido no es suficiente para llevarla a cabo.

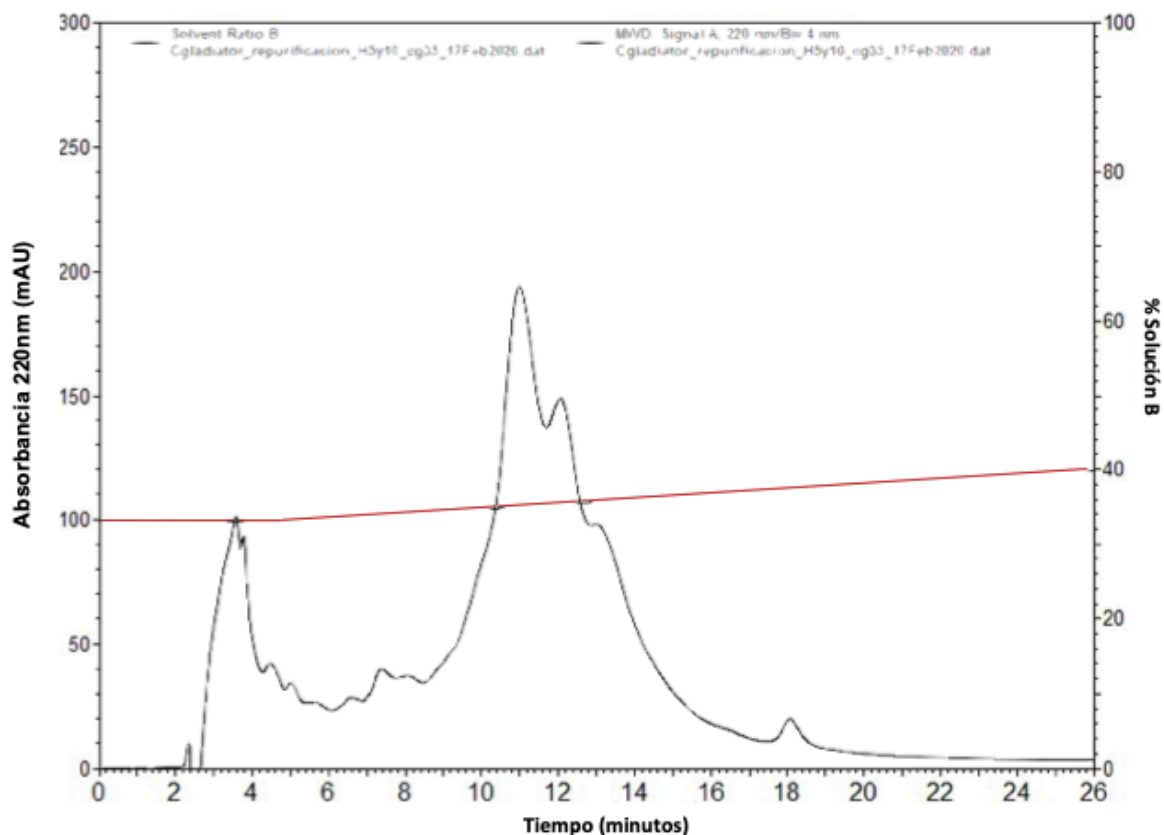


Figura 16. Repurificación de la fracción activa 35. La longitud de onda a la que se monitoreó fue 220 nm; el programa utilizado consistió en un paso isocrático a 33% de solución B durante 5 min seguido de un gradiente lineal de 33 a 44% de solución B en 21 minutos (línea roja).

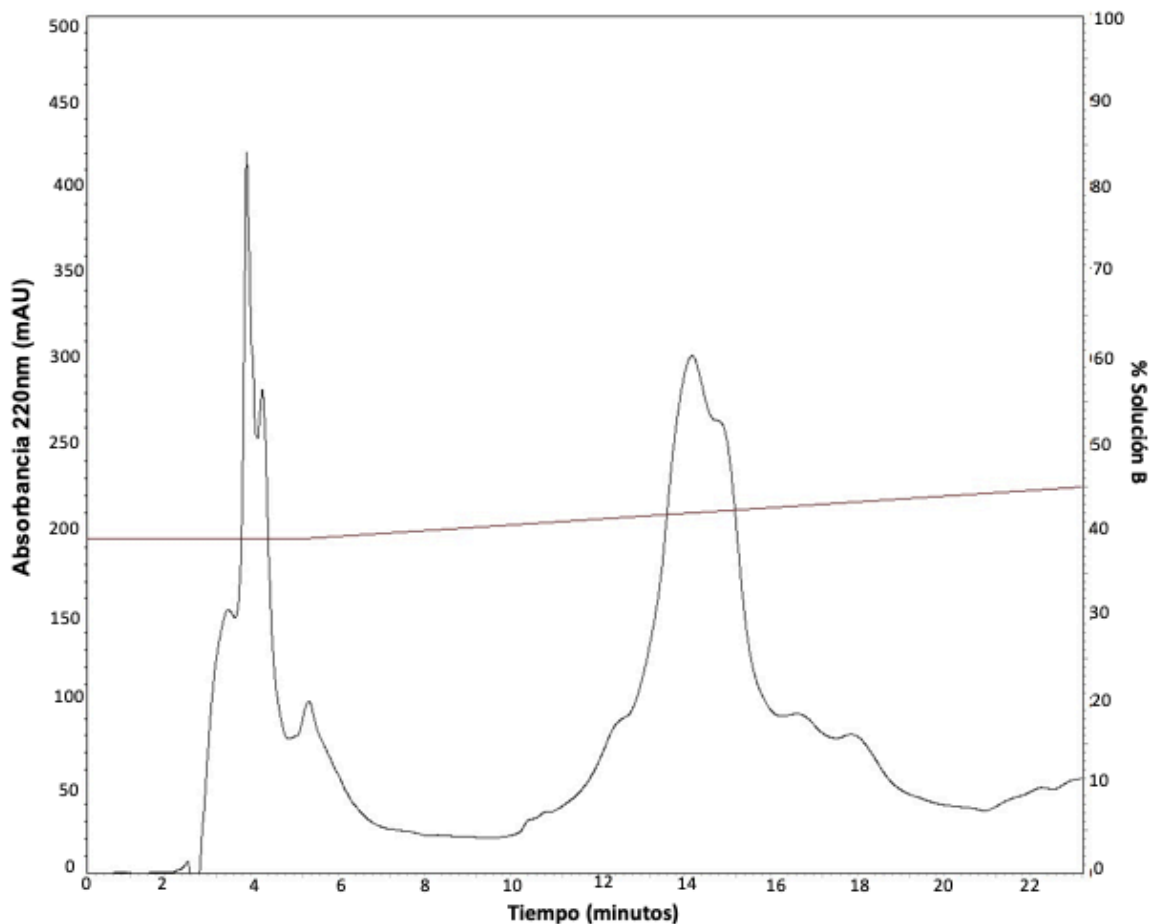


Figura 17. Repurificación de la fracción activa 47. La longitud de onda a la que se monitoreó fue 220nm; el programa utilizado consistió en un paso isocrático a 39% de solución B durante 5 min seguido de un gradiente lineal de 39 a 45% de solución B en 18 minutos (línea roja).

8.4 Evaluación electrofisiológica de las subfracciones de las repurificaciones

De la repurificación de las fracciones 28, 29 y 30 sólo se evaluó la muestra F30-1 debido a que el rendimiento de las demás subfracciones no fue suficiente para ser evaluada en Kv10.1 a una concentración 10 μ M. La evaluación de la muestra F30-1 (10 μ M) presentó un porcentaje de inhibición del 50.71%, lo cual indica que este componente conserva la actividad en el canal de potasio Kv10.1 (Figura 18).

Para el caso de las subfracciones de las fracciones 35 y 47 no se realizaron registros electrofisiológicos debido a que el rendimiento obtenido durante su repurificación no permite alcanzar la concentración de 10 μM .

La Figura 19 muestra la comparación del porcentaje de inhibición de la subfracción F30-1 (50.71%) con el de la primera evaluación de la fracción 30 (sin repurificar 38.68%), debido a que se observa un aumento en la inhibición posterior a la repurificación de la fracción. El efecto sobre la amplitud de corriente es estadísticamente significativo con base a la prueba *T* de *Student* para muestras independientes ($p < 0.05$).

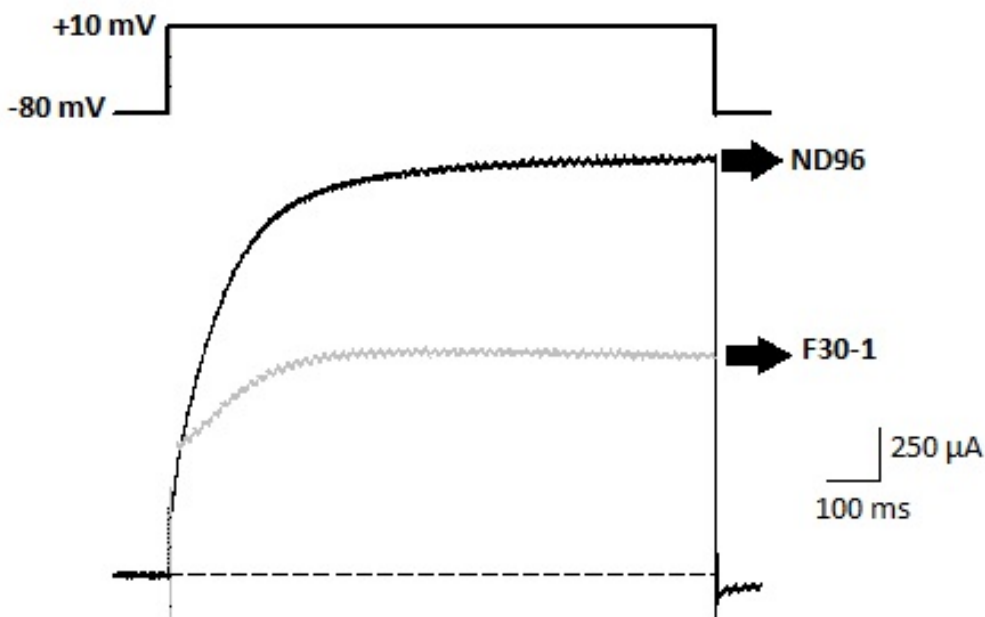


Figura 18. Evaluación electrofisiológica de la subfracción F30-1 de *C. gladiator*. Los trazos de color negro indican la corriente control (ND96), mientras que en color gris la actividad de la subfracción F30-1 (10 μM). El número de ensayos fue de 3 ($n=3$).

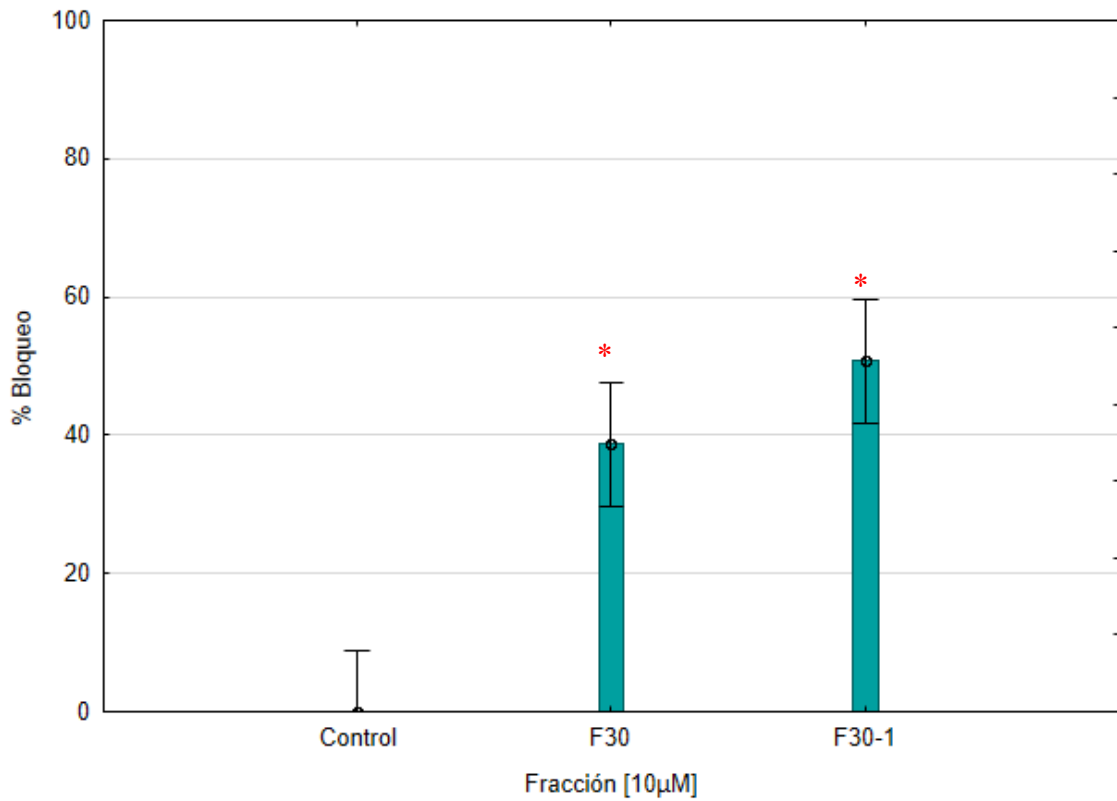


Figura 19. Comparación del porcentaje de bloqueo de la fracción 30 (10 μ M) y del componente F30-1 (10 μ M) obtenido durante la repurificación. Los puntos indican la media \pm E.E.M. El número de ensayos fue de 3 (n=3). El asterisco indica una $p < 0.05$ respecto al control.

8.5 Determinación de la masa molecular

El análisis de masa molecular de las muestras F30-1 y F30-2 se obtuvo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en una matriz CHCA 1/5. En las Figuras 20 y 21 se muestran los espectros de masas de las muestras F30-1 y F30-2, respectivamente. El análisis indica la presencia de más de un componente para ambos casos; no obstante, para la muestra F30-1 el peso molecular del componente que se encuentra en mayor cantidad indica un ion molecular de 4490.388 m/z y otro de 8981.678 m/z que pudieran corresponder a iones con carga +2 y carga +1 respectivamente, y por ende es el mismo componente y con actividad sobre Kv10.1, mientras que en el espectro de masas obtenido con F30-2 existen de igual forma dos señales mayoritarias de iones cargados +2 y +1 de 7785.211 y 15575.451 m/z respectivamente, lo que indicaría que es el mismo componente, pero definitivamente diferente al de la muestra F30-1.

Registro D1 191122-aer-03
Matriz CHCA 1/5

Laboratorios de Servicios Analíticos
Instituto de Química UNAM

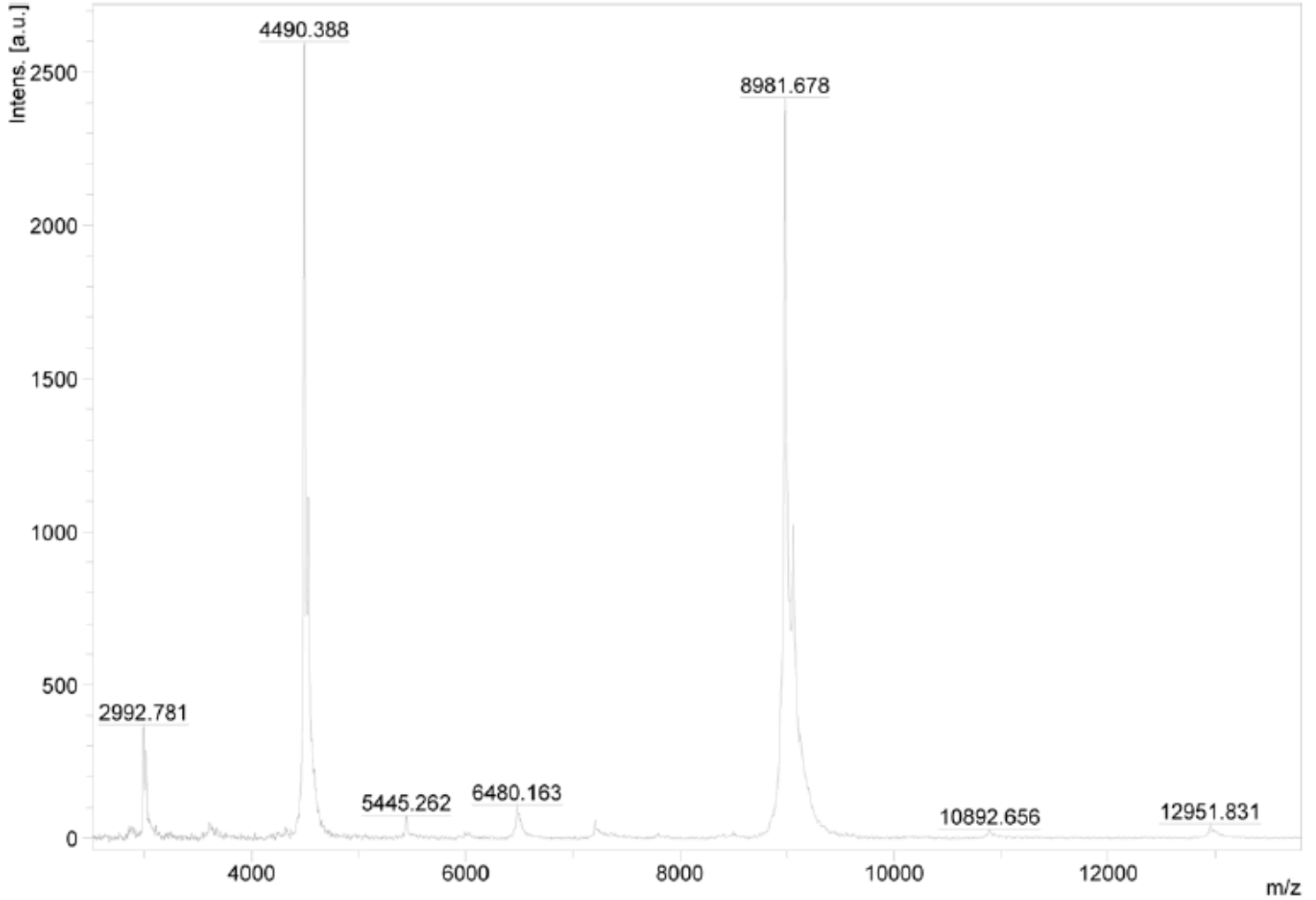


Figura 20. Espectrometría de masas MALDI-TOF de la muestra F30-1. Se observan los distintos pesos moleculares obtenidos de la muestra F30-1 con relación a la masa y carga (m/z).

Registro D2 191122-aer-04
Matriz CHCA 1/5

Laboratorios de Servicios Analíticos
Instituto de Química UNAM

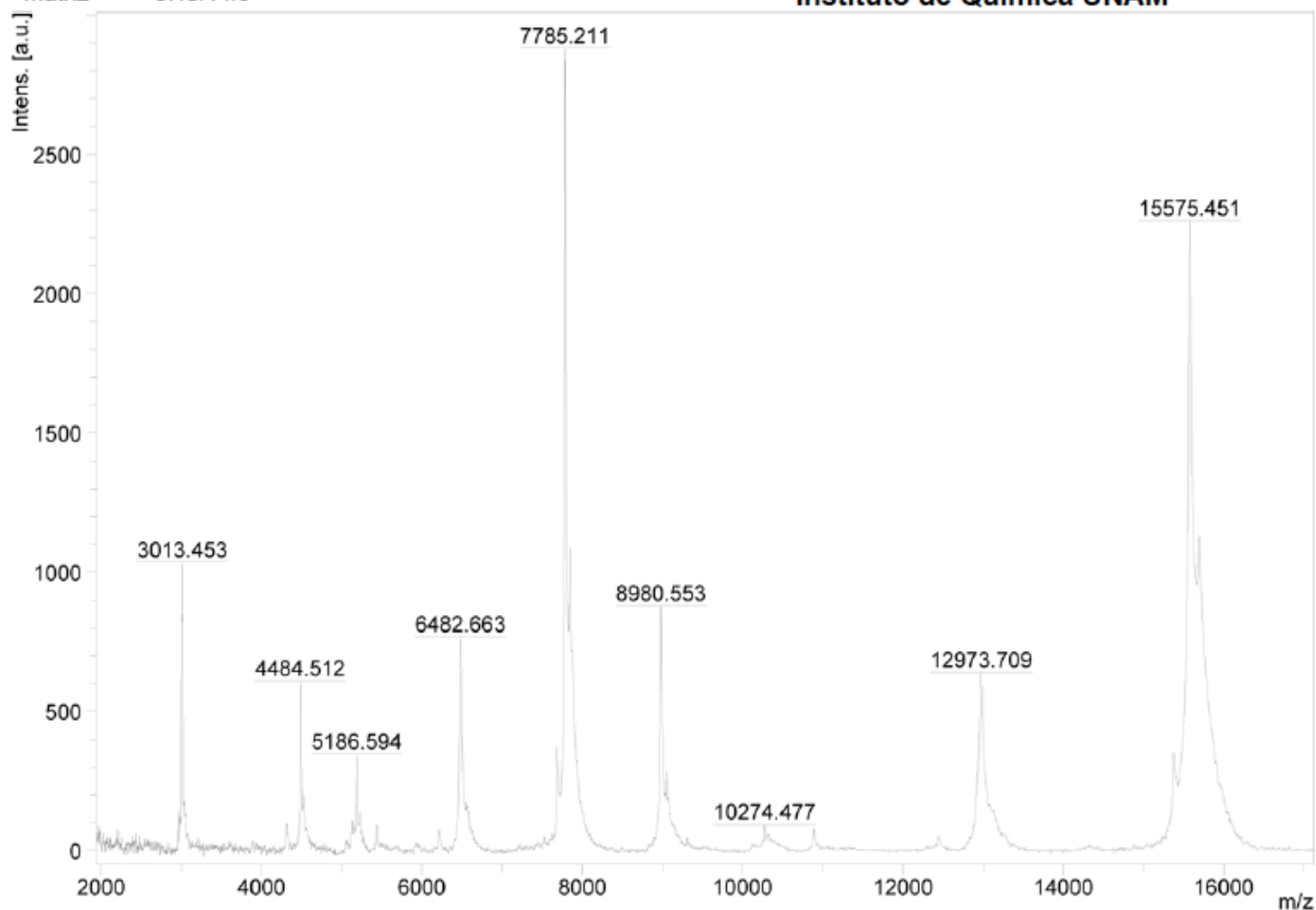


Figura 21. Espectrometría de masas MALDI-TOF de la muestra F30-2. Se observan los distintos pesos moleculares obtenidos de la muestra F30-2 con relación a la masa y carga (m/z).

IX. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis consistió en encontrar al menos un componente en el veneno del caracol marino *Conus gladiator* con actividad en el canal de potasio Kv10.1. La importancia de este canal se debe a que su expresión fuera del SN contribuye a la proliferación de células cancerígenas [26, 64, 65]; por lo tanto, es un blanco molecular de interés, dado que se busca encontrar componentes capaces de contrarrestar su actividad. El astemizol, la imipramina y la quinidina, son algunos ejemplos de compuestos químicos con actividad antiproliferativa en el canal Kv10.1; no obstante, no son específicos del canal, ya que también tienen actividad en el canal de potasio Kv11.1, lo cual produce efectos adversos como el síndrome QT largo, causando arritmias o muerte súbita [33, 65, 97]. Por tal motivo, se desea encontrar un componente presente en el veneno de *Conus gladiator*, ya que generalmente las conotoxinas tienen alta especificidad para su blanco molecular; un ejemplo es la conotoxina RIIIK la cual tiene afinidad considerable por los canales tipo *Shaker* (IC_{50} 1.21 μ M) pero no por otros canales de potasio como son Kv1.1, Kv1.3, Kv1.4, Kv2.1, Kv3.4, Kv4.2, herg y eag, evaluados a una concentración de 10 μ M [22].

En este trabajo, a través de la técnica de RP-HPLC, se muestra que el veneno de *C. gladiator* presenta alrededor de 60 componentes totales de los cuales 13 son los picos (fracciones) más abundantes que se registraron en el perfil cromatográfico. Estas fracciones fueron evaluadas en el canal de potasio Kv10.1 debido a que fueron aquellas con mayor rendimiento, lo cual permitió evaluarlas a una concentración de 10 μ M y su subsecuente repurificación, dado que como

se reporta en la literatura la eficiencia de recuperación de las muestras son moderadas o bajas después de la cromatografía [58].

Con la finalidad de realizar la evaluación electrofisiológica de las 13 fracciones mayoritarias del veneno, se utilizó como sistema de expresión heteróloga los ovocitos de *Xenopus laevis*. Miledi y colaboradores en 1982 demostraron que los canales iónicos y receptores neuronales pueden ser expresados en ovocitos de *X. laevis* al inyectar RNA en el citoplasma de esta célula [54]. Estos tienen como ventaja la capacidad de generar corrientes de los canales inyectados mayores a sus corrientes endógenas, permitiendo llevar a cabo registros electrofisiológicos sin contaminación proveniente de sus corrientes nativas [24].

Las 13 fracciones mayoritarias fueron evaluadas mediante la técnica de fijación por voltaje con dos microelectrodos; del total de muestras evaluadas se obtuvieron 5 fracciones con actividad en el canal de potasio Kv10.1. Tres de éstas (28, 29 y 30) se encuentran de manera constante en los perfiles cromatográficos, por lo que se podría inferir que su actividad de éstas en el canal Kv10.1 se debe a que comparten una secuencia parcial de aminoácidos involucrada en el bloqueo del canal.

Al realizar la repurificación de estas tres fracciones (28, 29 y 30), se obtuvieron solamente dos componentes mayoritarios, nombrados F30-1 y F30-2; el rendimiento permitió realizar el análisis de masas, sin embargo, solamente de la primera se contaba con la suficiente cantidad para realizar la evaluación electrofisiológica a una concentración de 10 μ M. No obstante, el estimado de la concentración se había realizado con base al área del péptido CPY-PI1 cuyo peso

molecular promedio es de 4098.80 Da, mientras que la fracción tiene un ion molecular de 8980.67 Da, por lo tanto, la concentración real sería entonces de 4.6 μM .

Al evaluar la subfracción F30-1, ésta bloqueó el 50.71% de la corriente. El aumento en la actividad puede deberse a que la fracción está más pura; otra posibilidad es que los componentes eliminados pudieran contener péptidos que afecten la interacción de la toxina con el canal. Dicha aseveración puede ser justificada retomando lo reportado para *Conus geographus* por Endean en 1974, Spence en 1977 y Cruz en 1985, en donde el primero concluyó que el veneno total solamente afectaba los potenciales de acción musculares, sin tener actividad sobre los nerviosos [20]. Por otra parte, Spence y colaboradores reportan que al evaluar a la “Toxina III” de *C. geographus* bloquea solamente a los canales de Na^+ musculares; no obstante, cuando es repurificada se observa que es capaz de bloquear a los canales de Na^+ nerviosos [80]. Este último resultado fue corroborado por Cruz en 1985 [17]; por lo tanto, se puede inferir que las repurificaciones de los componentes con actividad permiten eliminar péptidos que puedan actuar de manera inespecífica como “contaminantes” y afecten o modifiquen la afinidad aparente por un blanco farmacológico.

A los componentes F30-1 y F30-2 se les determinó su peso molecular y los resultados indican que son dos componentes diferentes entre sí, por lo que se descarta la posibilidad de que sean péptidos semejantes, cuyas diferencias pudieran deberse a modificaciones postraduccionales, que son muy abundantes en conotoxinas [15].

Los resultados de la repurificación de las fracciones 35 y 47, indican que los componentes no se alcanzan a separar completamente, observándose la presencia de al menos tres componentes mayoritarios para la fracción 35 (Figura 16) y de dos componentes mayoritarios para la fracción 47 (Figura 17); por lo tanto, es necesario repurificar estas muestras y llevar a cabo su evaluación electrofisiológica de manera independiente.

En el perfil cromatográfico del veneno total (Figura 10) se puede observar por lo menos 13 picos o fracciones mayoritarias, los cuales representan una fuente rica de componentes bioactivos, ya que al menos 5 fracciones mostraron actividad en el canal Kv10.1. No obstante, en el mismo perfil podemos observar la presencia de al menos 60 componentes en total. Kaufenstein y colaboradores indicaron que es posible que el gran número de péptidos presentes en el veneno de los Conos puede estar relacionado con la poca disponibilidad de un componente en particular; además el rendimiento de cada muestra se puede ver afectado en cada paso de la purificación [34]. Por lo tanto, se necesitaría una cantidad considerable de ejemplares de *Conus gladiator* para poder llevar a cabo las repurificaciones necesarias, evaluaciones electrofisiológicas, así como para la determinación de masas y secuencia.

Finalmente, si se compara la concentración evaluada (4.6 μM), así como el porcentaje de bloqueo de la repurificación F30-1 obtenida del veneno de *C. gladiator* (50.71%), con los resultados reportados para la k-hefutoxina, aislada de *Heterometrus fulvipes*, se puede decir que F30-1 presenta afinidad 10 veces mayor por el canal Kv10.1 debido a que es necesaria una concentración de 40 μM de la k-hefutoxina para obtener un porcentaje de inhibición similar (57 \pm 2%) [56].

No obstante, la toxina APETx4 aislada de la anémona *Anthopleura elegantissima* inhibe un $76\pm 2\%$ de bloqueo a una concentración de $1.6 \mu\text{M}$; con la diferencia de que la toxina APETx4 no es selectiva únicamente para el canal Kv10.1, dado que puede inhibir corrientes de canales Kv1.4 a un $66\pm 8\%$ y de Nav1.4 en $50\pm 5\%$ [55].

Por otra parte, si analizamos los resultados de espectrometría de masas obtenida para la fracción F30-1 hay dos iones moleculares con carga +1 y +2, cuyos valores de m/z son 8981.678 y 4490.388, respectivamente. El ion molecular con carga +2, si se multiplica por 2 y se le resta la carga (2) da un peso de 8978.78 Da el cual sería muy cercano al del ion carga +1 (8980.678 Da), si a éste se le resta la carga (+1); por lo tanto, la diferencia sería de 1.898 Da, que está dentro del error experimental, de lo que se infiere que el peso molecular de la fracción F30-1 es de 8978.78 Da. Si tomamos en cuenta que el peso promedio de un aminoácido equivale a 110 Da [5], la longitud del péptido sería de 81 residuos de aminoácidos. Otra posibilidad que existe al tener dos señales en el espectro de masas es que la fracción F30-1 contenga tanto una toxina monomérica como una toxina dimérica y los valores correspondan a la cadena monomérica y dimérica; para comprobar esta suposición se debe de implementar estudios de reducción y alquilación total de la fracción y ver la presencia de dos componentes al momento de realizar la cromatografía (en caso de que los monómeros, si existen, sean lo suficientemente diferentes como para separarse en las condiciones cromatográficas empleadas). Con base en los resultados de las toxinas reportadas con actividad en Kv10.1, la subfracción F30-1 tiene una masa promedio del doble (si se tratase de un dímero) o similar (si fuera un monómero) a la reportada para la APETX4 (4651.02Da), lo cual podría ser un indicador de

que las toxinas con actividad en este canal pueden ser de mayor tamaño comparadas con el tamaño promedio de las conotoxinas (12-30 residuos de aminoácidos) [43].

X. CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la expresión del canal de potasio Kv10.1 en ovocitos de *X. laevis*.
- El veneno de *Conus gladiator* presenta por lo menos 5 fracciones con actividad inhibitoria mayor a 20% en el canal de potasio Kv10.1.
- Fue posible obtener un componente semi-puro mayoritario (F30-1) con una actividad del 50% de inhibición sobre el canal de potasio Kv10.1 a una concentración de 4.6 μM .
- El componente mayoritario de la fracción F30-1 tiene, posiblemente, un peso molecular de 8978.78 Da y contiene aproximadamente 81 residuos de aminoácidos.

XI. PERSPECTIVAS

- Es necesario continuar con la repurificación de la subfracción F30-1 hasta dilucidar su secuencia primaria.
- Realizar ensayos de selectividad de la subfracción F30-1, o una subfracción más pura, sobre otros canales de K⁺.
- Determinar la IC₅₀ del componente puro de F30-1 sobre el canal Kv10.1.
- Llevar a cabo la repurificación de la subfracción F30-2 y las fracciones 35 y 47, así como las respectivas evaluaciones electrofisiológicas de los componentes obtenidos.

XII. REFERENCIAS

1. Adams M.E. y Olivera B.M. (1994). Neurotoxins: overview of an emerging research technology. *Trends in Neurosciences*, 17: 151-155.
2. Aguilar M.B., Pérez-Reyes L.I., López Z., de la Cotera E.P., Falcón, A., Ayala C., Galván M., Salvador C., Escobar L.I. (2010). Peptide sr11a from *Conus spurius* is a novel peptide blocker for Kv1. Potassium channels. *Peptides*, 31: 1287-1291.
3. Barnes R.S.K., Calow P.P., Olive P.J.W., Golding, D.W., Spicer J.I. (2001). *The Invertebrates: a synthesis*. Third edition. Blackwell Science. pp. 118-121.
4. Bayrhuber M., Vijayan V., Ferber M., Graf R., Korukottu J., Imperial J., Garrett J.E., Olivera B.M., Terlau H., Zwecstetter M., Becker S. (2005). Conkunitzin-S1 is the first member of a new Kunitz-type neurotoxin family. Structural and functional characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 23766-23770.
5. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2008). *Bioquímica*. Sexta edición. Editorial Reverté. pp. 35.
6. Bouchet P. (1990). Turrid genera and mode of development: the use and abuse of protoconch morphology. *Malacologia*, 32: 69-77.
7. Brusca R.C y Brusca G.C. (2003). *Invertebrates*. Segunda edición. Sunderland Mass: Sinauer Associates, Inc. pp. 453-455.
8. Buczek O., Bulaj G., Olivera B.M. (2005). Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 3067-3079.

9. Calvo-Mosquera G., González-Cal A., Martínez-Nieto G.A., Pita-Pardo L., Calvo-Rodríguez D., Primucci C.G., Duarte-Bermúdez B.P. (2012). Un veneno para el dolor. El ziconotide. *Farmacéuticos de atención primaria*, 10: 63-67.
10. Campos-Lira E., Carrillo E., Aguilar M.B., Gajewiak J., Gómez-Lagunas F., López-Vera E. (2017). Conorfamide-Sr3, a structurally novel specific inhibitor of the Shaker K⁺ channel. *Toxicon*, 138: 53-58.
11. Castillo-Rodríguez Z. (2014). Biodiversidad de moluscos marinos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 419-430.
12. Cázares-Ordoñez V., Pardo L.A. (2017). Kv10.1 potassium channel: from the brain to the tumors. *Biochemistry and Cell Biology*, 95: 531-536.
13. Chen P., Dendorfer A., Finol-Urdaneta R. K., Terlau H., Olivera B. M. (2010). Biochemical characterization of κM-RIIIJ, a Kv1.2 channel blocker: Evaluation of cardioprotective effects of κM-conotoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 14882-14889.
14. Cole K. y Moore J. (1960). Potassium ion current in the squid giant axon: dynamic characteristic. *Biophysical Journal*, 1: 1-14.
15. Craig G., Bandyopadhyay P., Olivera B.M. (1999). Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. *European Journal of Biochemistry*, 264: 271-275.
16. Cruz L., Gray W. Olivera M.B. (1978). Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 190: 539-548.

17. Cruz L.J., Gray W.R., Olivera B.M., Zeikus R.D., Kerr L., Yoshikami D., Moczydlowski E. (1985). *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 260: 9280-9288.
18. Dutertre S., Jin A.H., Kaas Q., Jones A., Alewood P.F., Lewis R.J. (2013) Deep genomics reveals the mechanism for expanded peptide diversity in cone snail venom. *Molecular & Cell Proteomics*, 12: 312-329.
19. Endean R., Rudkin C. (1963). Studies of the venoms of some Conidae. *Toxicon*, 1: 49-64.
20. Endean R., Parish G., Gyr P. (1974). Pharmacology of the venom of *Conus geographus*. *Toxicon*, 12: 131-138.
21. Ferber M., Al-Sabi A., Stocker M., Olivera B.M., Terlau H. (2004) Identification of a mammalian target of kM-conotoxin RIIK. *Toxicon*, 43: 915-921.
22. Ferber M., Sporning A., Jeserich G., De la Cruz R., Watkins M., Olivera B.M., Terlau H. (2003). A novel *Conus* peptide ligand for K⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 2177-2183.
23. Gao B., Peng C., Yang J., Yi Y., Zhang J., Shi Q. (2017). Cone snails: A big store of conotoxins for novel drug discovery. *Toxins*, 9, E397.
24. Goldin A.L. (1993). *Xenopus* oocytes as an expression system for ion channels. In: Glossmann H., Striessnig J. (eds.). *Methods in Pharmacology*. Springer, Boston, MA. pp. 79 y 80.

25. González C., Baez-Nieto D., Valencia I., Oyarzún I., Rojas P., Naranjo Latorre R. (2012). K (+) channels: function-structural overview. *Comprehensive Physiology*, 2: 2087-2149.
26. Hemmerlein B., Weseloh R. Mello de Queiroz F.M., Knötgen H., Sánchez A., Rubio M.E., Martin S., Schliephacke T., Jenke M., Radzun H.J., Stühmer W., Pardo L.A. (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Molecular Cancer*, 5: 41.
27. Hickman C.P., Roberts L.S., Larson A. (1998). *Integrated Principles of Zoology*. Cuarta edición. McGraw-Hill Higher Education. pp. 326-330.
28. Holford M., Puillandre N., Terryn Y., Cruaud C., Olivera B.M., Bouchet P. (2009). Evolution of the *Toxoglossa* venom apparatus as inferred by molecular phylogeny of the Terebridae. *Molecular Biology and Evolution*, 26:15-25.
29. Imperial J.S., Bansal P.S., Alewood P.F., Daly N.L. Craik D.K., Sporning A., Terlau H., López-Vera E., Bandyopadhyay P.K., Olivera B.M. (2006). A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry*, 45: 8331-8340.
30. Imperial J.S., Chen P., Sporning A., Terlau H., Daly N., Craik D., Olivera B.M. (2008). Tyrosine-rich conopeptides affect voltage-gated K⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 23026–23032.
31. Kaas Q., Westermann J., Craik D.J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon*, 55: 1491-1509.

32. Kaas Q., Yu R., Jin A. H., Dutertre S., Craik D. J. (2012). ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. *Nucleic Acids Research*, 40: D325-330.
33. Kallergis E.M., Goudis C.A., Simantirakis, E.N., Kochiadakis G.E., Vardas P.E. (2012). Mechanisms, risk factors, and management of acquired long QT syndrome: A comprehensive review. *The Scientific World Journal*, 2012: 212178.
34. Kaufenstein S., Huys I., Kuch U., Melaun C., Tytgat J., Mebs D. (2004) Novel conopeptides of the I-superfamily occur in several clades of cone snails. *Toxicon*, 44: 539-548.
35. Kaufenstein S., Huys I., Lamthan H., Stöcklin R., Sotto F., Menez A., Tytgat J., Mebs D. (2003). A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. *Toxicon*, 42: 43-52.
36. Kelley W.P., Schulz J.R., Jakubowski J.A., Gilly W.F., Sweedler J.V. (2006). Two toxins from *Conus striatus* that individually induce tetanic paralysis. *Biochemistry*, 45: 14212-14222.
37. Kohn A.J. (1958). Recent cases of human injury due to venomous marine snails of the genus *Conus*. *Hawaii Medical Journal*, 17: 528-532.
38. Kohn A.J. (1959). The ecology of *Conus* in Hawaii. *Ecological Monographs*, 29: 47-90.
39. Kohn A.J. (1985) Evolutionary ecology of *Conus* on Indo-Pacific coral reefs. *Proceedings of the Fifth International Coral Reef Congress*, 4: 139-144.
40. Kohn A.J. (2014). *Conus* of the Southeastern United States and Caribbean. United Kingdom: Princeton University Press. pp. 362.

41. Kohn A.J., Saunders P.R., Wiener S. (1960). Preliminary studies on the venom of the marine snail *Conus*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 90: 706-725.
42. Kortüm F., Caputo V., Bauer, C.K, Stella L., Ciolfi A., Alawi M. (2015) Mutations in *KCNH1* and *ATP6V1B2* cause Zimmermann-Laband syndrome. *Nature Genetics*, 47: 661-667.
43. Layer R.T. y McIntosh J.M. (2006). Conotoxins: Therapeutic potential and application. *Marine Drugs*, 4: 119-142.
44. Lewis R.J., Dutertre S., Vetter I., MacDonald C.J. (2012). *Conus* venom peptide pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 64: 259-298.
45. Li M., Chang S., Yang L., Shi J., McFarland K., Yang X., Moller A., Wang C., Zou X., Chi C., Cui J. (2014). Conopeptide Vt3.1 preferentially inhibits BK potassium channels containing $\beta 4$ subunits via electrostatic interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 289: 4735-4742.
46. López-Vera E. (2005). Actividad biológica de péptidos de caracoles de la Superfamilia Conoidea. Tesis de Doctorado. Instituto de Neurobiología, UNAM. Querétaro, Qro.
47. López-Vera E., Aguilar-Ramírez M.B., Heimer de la Cotería E.P. (2006). Toxinas de caracoles marinos del género *Conus*. *Revista Ciencia*, 57: 47-51.
48. Lubbers N.L., Campbell T.J., Polakowski J.S., Bulaj G., Layer R.T., Moore J., Gross C.G., Cox B.F. (2005). Postischemic administrations of CGX-1051, a peptide from cone snail venom, reduces infarct size in both rat and

dog models of myocardial ischemia and reperfusion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 46: 141-146.

49. Ludwig J., Terlau H., Wunder F., Brüggemann A., Pardo L., Marquardt A., Stühmer W., Pongs O. (1994). Functional expression of a rat homologue of the voltage gated *ether-à go-go* potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* channel and its mammalian counterpart. *The EMBO Journal*, 13: 4451-4458.

50. Ludwig J., Weseloh R., Karschin C., Liu Q., Netzer R., Engeland B., Stansfeld C., Pongs O. (2000). Cloning and functional expression of rat eag2, a new member of the *ether-à-go-go* family of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 16: 59-70.

51. Martínez-Hernández L.A. (2012). Microbioensayo para la evaluación de conotoxinas en larvas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

52. Martínez-Hernández L.A, López-Vera E., Aguilar-Ramírez M.B. (2014). El veneno de los caracoles marinos y su paradójico uso médico. *Revista digital universitaria*, 15: 2-11.

53. McGivern J. (2007). Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 3: 69-85.

54. Miledi R., Parker I., Sumikawa K. (1982). Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes, *The EMBO Journal*, 1: 1307-1312.

55. Moreels L., Peigneur S., Galan D., De Pauw E., Béress L., Waelkens E., Pardo L.A., Quinton L., Tytgat J. (2017). APETx4, a novel sea anemone toxin and a modulator of the cancer-relevant potassium channel Kv10.1. *Marine Drugs*, 15: E287.
56. Moreels L., Peigneur S., Yamaguchi Y., Vriens K., Walkens E., Zhu S., Thevissen K., Cammue B.P.A., Sato K., Tytgat J. (2016). Expanding the pharmacological profile of k-hefutoxin 1 and analogues: A focus on the inhibitory effect on the oncogenic channel Kv10.1. *Peptides*, 89: 43-50.
57. Mortensen L.S., Schmidt H., Farsi Z., Barrentes-Freer A., Rubio M.E., Ufartes R., Eilers J., Sakaba T., Stühmer W., Pardo L. (2015). Kv10.1 opposes activity-dependent increase in Ca^{2+} influx into the presynaptic terminal of the parallel fibre-Purkinje cell synapse. *The Journal of Physiology*, 593: 181-196.
58. Nugent K.D., Burton W.G., Slattery T.K., Johnson B.F. (1988). Separation of proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 443: 381-397.
59. Occhiodoro T., Bernheim L., Liu J.H., Bijlenga P., Sinnreich M., Bader C.R., Fisher-Louheed J. (1998). Cloning of a human *ether-à-go-go* potassium channel expressed in myoblast at the onset of fusion. *FEBS Letters*, 434: 177-182.
60. Olivera B.M. (2002). *Conus* venom peptides; reflections from the biology of clades and species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 33: 25-47.

61. Olivera B.M. y Cruz L.J. (2001). Conotoxins in retrospect. *Toxicon*, 39: 7-14.
62. Olivera B.M., Rivier J., Clark C., Ramilo C., Corpuz G.P., Abogadie E., Mena E., Woodward S., Hillyard D., Cruz L.J. (1990). Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science*, 249: 257-263.
63. Ortíz-Arellano M.A., Heimer de la Cotera, E.P., Michel-Morfin J.E. (2012). Gasterópodos marinos del suborden Toxoglossa en la costa de Sinaloa. *Sociedad internacional de malacología médica y aplicada*, 18: 5-9.
64. Pardo L.A., del Camino D., Sánchez A., Alves F., Brüggemann A., Beckh S., Stümer W. (1999) Oncogenic potential of EAG K⁺ channels. *The EMBO Journal*, 18: 5540-5547.
65. Pardo L.A., Gómez-Varela D., Major F., Sansuk K., Leurs R., Downie B., Tietze L.F., Stühmer W. (2012). Approaches targeting Kv10.1 open a novel window for cancer diagnosis and therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 19: 675-682.
66. Paredes C., Cardoso F., Altamirano K., Baltazar P., Romero L. (2010). La familia Conidae en el mar peruano. *Revista Peruana de Biología*, 2010. 17: 65-73.
67. Peng C., Yao G., Gao B., Fan C., Bian C., Wang J., Cao Y., Wen B., Zhu Y., Ruan Z., Zhao X., You X., Bai J., Li J., Lin Z., Zou S., Zhang X., Qiu Y., Chen J., Coon S., Yang J., Chen J., Shi Q. (2016). High-throughput identification of novel conotoxins from the Chinese tubular cone snail (*Conus betulinus*) by multi-transcriptome sequencing. *Gigascience*, 5: 1-14.

68. Prashanth J.R., Dutertre S., Jin A.H., Lavergne V., Hamilton B., Cardoso F.C., Griffin J., Venter D.J., Alewood P.F., Lewis R.J. (2016). The role of defensive ecological interactions in the evolution of conotoxins. *Molecular Ecology*, 25: 598-615.
69. Puillandre N., Bouchet P., Duda T.F., Kaufenstein S., Kohn A.J., Olivera B.M., Watkins M., Meyer C. (2014). Molecular phylogeny and evolution of the cone snails (Gastropoda, Conoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 78: 290-303.
70. Puillandre N., Duda T.F., Meyer C., Olivera B.M., Bouchet P. (2015). One, Four or 100 genera? A new classification of the cone snails. *Journal of Molluscan Studies*, 81: 1-23.
71. Purves D., Augustine G., Fitzpatrick D., Hall W., LaManta A., Williams S.M. (2004). *Neuroscience*. Massachusetts: Sinauer Associates. pp. 73-76.
72. Ramírez-Herrera M. y Urbano B. (2014). Moluscos Invasores de México. *CONABIO*, 112: 6-9.
73. Robbins J. (2001) KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacology and Therapeutics*, 90: 1-19.
74. Rodríguez-Ragado J.A., Acuna-Macías I., Camacho J. (2012). Eag1 channels as potential cancer biomarkers. *Sensors*, 12: 5986-5995.
75. Rupert E.E., Barnes R.D. (1996). *Zoología de Invertebrados*. Sexta edición. McGraw-Hill International. pp. 365-370.

76. Santos A.D., McIntosh M., Hillyard D.R., Cruz L.J., Olivera B.M. (2004). The A-superfamily of conotoxins. *The Journal of Biological and Molecular Biology*, 279: 1756-17606.
77. Scanlon M.J., Naranjo D., Thomas L., Alewood P.F., Lewis R.J., Craik D.J. (1997). Solution structure and proposed binding mechanism of a novel potassium channel toxin k-conotoxin PVIIA. *Structure*, 5: 1585-1597.
78. Simons C., Rash L.D., Crawford J., Cristofori-Armstrong B., Miller D., Ru, K., Baillie G.J., Alanay Y., Jacquinet A., Debray F.G., Verloes A., Shen J., Yesil G., Guler S., Yuksel A., Cleary J.G., Grimmond S.M., McGaughan J., King G.F., Gabbett M.T., Taft R.J. (2015). Mutations in the voltage-gated potassium channel gene *KCNH1* cause Temple-Baraitser syndrome and epilepsy. *Nature Genetics*, 47: 73-77.
79. Solís H., López-Hernández E., Cortés-Gasca D. (2008). La excitabilidad neuronal y los canales de potasio. *Archivos de Neurociencias (México)*, 13: 195-201.
80. Spence I., Gillessen D., Gregson R.P., Quinn R.J. (1977). Characterization of the neurotoxic constituents of *Conus geographus* (L) venom. *Life Sciences*, 21: 1759-1769.
81. Srinivasan K.H., Sivaraja V., Huys I., Sasaki, T., Cheng B., Krishnaswamy T., Kumar S., Sato K., Tytgat J., Yu C., Cheng San C., Ranganathan S., Bowie J., Kini R.M., Gopalakrishnakone P. (2002). k-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 30040-30047.

82. Sudarshal S., Singaravadivelan G., Ramasamy P., Ananda K., Sarma S., Sikdar S., Krishna K., Balaram P. (2004). A novel 13 residue acyclic peptide from the marine snail, *Conus monile*, targets potassium channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317: 682-688.
83. Teichert R.W., Jacobsen R., Terlau H., Yoshikami D., Olivera B.M. (2007). Discovery and characterization of the short kA-conotoxins: a novel subfamily of excitatory conotoxins. *Toxicon*, 49: 318-328.
84. Tenorio M.J. (2013). *Conus archon*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013.
85. Tenorio M.J. (2013). *Conus fergusonii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013.
86. Tenorio M.J. (2013). *Conus gladiator*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013.
87. Tenorio M.J., Tucker J.K., Chaney H.W. (2012). The families Conilithidae and Conidae. The Cones of the Eastern Pacific. ConchBooks, Hackenheim.
88. Terlau H., Ludwig J., Steffan R., Pongs O., Stühmer W., Heinemann H. (1996). Extracellular Mg^{2+} regulates activation of rat eag of potassium channel. *Pflugers Archiv*, 432: 301-312.
89. Terlau H., Olivera B.M. (2004). *Conus* venoms. A rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, 84: 41-68.
90. Terlau H., Shon K-J., Grilley M., Stocker M., Stuhmer W., Olivera B.M. (1996). Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature*, 381: 148-151.

91. Tian C., Zhu R., Zhu L., Qiu T., Cao Z., Kang T. (2014). Potassium channels: Structures, diseases, and modulators. *Chemical Biology & Drug Design*, 83: 1–26.
92. Tytgat J., Chandy K.G., Garcia M.L., Gutman G.A., Martin-Eauclaire M.F., van der Walt J.J, Possani L.D. (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends in Pharmacological Science*, 20: 444-447.
93. Unwin, N. (1989). The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron*, 3: 665-676.
94. Utkin Y.N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World Journal of Biological Chemistry*, 6: 28-33.
95. Waheed H., Moin S.F., Choudhary M.I. (2017). Snake venom: From deadly toxins to life-saving therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, 24: 1874-1891.
96. Whyte J.M. y Edean R. (1962). Pharmacological investigation of the venoms of the marine snails *Conus textile* and *Conus geographus*. *Toxicon*, 1: 25-31.
97. Wulff H., Castle N., Pardo L. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8: 982–1001.
98. Yang S. y Jan L.Y. (2013). Potassium Channels: Their Physiological and Molecular Diversity. In: *Encyclopedia of Biophysics*. pp. 1993-1940. Springer.