

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida

**Caracterización electrofisiológica de la conotoxina gamma
PiVIIA aislada de *Conus princeps***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Daniela Silem Chávez Ramírez

Ensenada, Baja California, México
2015

Tesis defendida por

Daniela Silem Chávez Ramírez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Director del Comité

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno

Dra. Patricia Juárez Camacho



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Daniela Silem Chávez Ramírez**, como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Caracterización electrofisiológica de la conotoxina gamma PiVIIA aislada de *Conus princeps*

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Director de tesis

Hasta hace 70 años se desconocía que el origen de algunas enfermedades se debe al mal funcionamiento de canales iónicos en diversos tejidos. Sin embargo, a partir de la descripción de las canalopatías como causa de diversas patologías se produjo un avance importante en el desarrollo de su diagnóstico y tratamiento. No obstante, hoy en día gran parte de las enfermedades son tratadas de manera paliativa, en muchos casos los pacientes no responden de manera favorable al tratamiento y aunado a eso están las reacciones adversas producidas por los fármacos convencionales. Ante esta problemática, es necesario generar alternativas mediante el diseño de terapias innovadoras y el descubrimiento de nuevas moléculas con potencial farmacológico. En este sentido, se ha encontrado que las toxinas aisladas de caracoles marinos del género *Conus* podrían ser utilizadas para el tratamiento de enfermedades ya que actúan bloqueando o activando canales iónicos de manera selectiva. En el presente trabajo de investigación se caracterizó y evaluó el efecto electrofisiológico de una gamma conotoxina PiVIIA aislada del veneno de *Conus princeps*. En los ensayos electrofisiológicos realizados en neuronas de ganglio dorsal (GRD's) de ratas neonatas se encontró que esta toxina aplicada a una concentración de 3 μM incrementa de manera selectiva la corriente de Ca^{2+} dependiente de voltaje en un 53.7% y muestra un efecto reversible con un porcentaje de recuperación de 87.12%. Asimismo, se observó que la toxina γ -PiVIIA no tiene efecto sobre canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje, ni sobre canales sensibles a la concentración de protones (ASIC). Estos hallazgos nos permiten especular que esta toxina podría tener potencial farmacéutico debido a su actividad agonista de canales Ca_v y sienta las bases para continuar con las investigaciones acerca de sus blancos farmacológicos.

Palabras clave: Electrofisiología, γ -PiVIIA, *Conus princeps*, canales iónicos, GRD's.

Abstract of the thesis presented by **Daniela Silem Chávez Ramírez**, as partial requirement to obtain the Master in Life Sciences degree with orientation in Marine Biotechnology.

Electrophysiological characterization of the conotoxin gamma PiVIIA isolated from *Conus princeps*

Abstract approved by:

Ph. D. Alexei Fedórovich Licea Navarro
Thesis Director

Until seventy years ago was unknown the origin of some diseases are due to malfunction of ion channels in various tissues. However, since the description of channelopathies as a cause of various diseases there was a significant advance in the development of diagnosis and treatment. Nevertheless, we face current health issues: many diseases are treated with palliative care, in some cases patients do not respond favorably to treatment and the adverse reactions produced by conventional drugs. In this sense, it is necessary the developing of innovative therapies and the discovery of new molecules with pharmacological potential. It has been found that toxins isolated from marine snails of genus *Conus* interact with specific cell surface receptors and ion channels, and could be used to treat many diseases. In this investigation we characterized and evaluated the electrophysiological effect of a novel gamma conotoxin PiVIIA isolated from *Conus princeps*. This toxin selectively enhanced the voltage dependent calcium current in 53.7% when it was applied in a concentration 3 μ M, and it had a reversible effect with recovery rate of 87.12% in neurons of dorsal root ganglion cells (DRG) of newborn rats. On the other hand, α -PiVIIA had no effect on Na⁺ channels either voltage-dependent K⁺ channels, or in acid-sensing ion channels (ASIC). These results suggest that this toxin could have pharmaceutical potential due to its agonist activity on Ca_v channels, further studies are needed to characterize its pharmacological targets.

Keywords: Electrophysiology, γ -PiVIIA, *Conus princeps*, ion channels, DRG's.

Dedicatoria

A mi Mamá Magda, por enseñarme a nunca rendirme en la vida e impulsarme siempre a hacer realidad mis sueños. Tu gran ejemplo me alienta y me motiva. Este logro también es tuyo. ¡TE AMO!

A mi Papá Daniel por fomentarme el amor por el estudio desde pequeña y enseñarme que los objetivos se cumplen siempre con disciplina y trabajo. Gracias por tus sabios consejos y tu apoyo en cada faceta de mi vida.

A mis hermano Jabes Daniel. Tu edad no desestima tu gran madurez y sabiduría. Gracias por tus consejos y apoyo hermanito. Te quiero de aquí al infinito.

A mi hermana Berenice, porque sé que siempre estás ahí.

A mi AMOR Roberto, por ser más que mi pareja, mi apoyo incondicional. Gracias por estar siempre conmigo en la alegría y en la adversidad. Por vivir conmigo esta maravillosa experiencia. Por creer siempre en mí. ¡TE AMO !

A mi familia....

A mis abuelitas, a mi cuñada Annette Patricia, a mis sobrinitos.

A todas las personas que de alguna manera han contribuido a la culminación de esta etapa de mi vida profesional

Agradecimientos

La realización de este proyecto no hubiera sido posible, sin la valiosa contribución de muchas personas.

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca que me permitió cursar mis estudios de Maestría. Gracias también por la beca mixta para la realización de mi estancia de investigación.

Al Doctor Alexei Licea por confiar en mí y asignarme este proyecto tan interesante y por permitirme incursionar en un área que me llenó de expectativas para mi vida profesional. Muchas gracias por su consejo y por indicarme oportunamente cuando algo no estaba bien. Le agradezco su apoyo con los recursos necesarios para que este proyecto fuera una realidad y su valioso tiempo para asesorarme siempre que lo requerí. Mil gracias por todo. ¡Ya empecé mi colección de conchas de *Conus!*

A mi comité de Tesis que aportó observaciones pertinentes y recomendaciones acertadas para que este trabajo tuviera éxito. A la Dra. Karla Oyuky por tus valiosos comentarios en mis avances de tesis, que me hicieron crecer como profesionista. A la Dra. Johanna, por asesorarme en la parte técnica del trabajo, y por transmitirme tu gusto por la investigación en biotoxinas, gracias por todas tus recomendaciones. A la Dra. Patricia por ser siempre tan linda y brindarme tus sabios consejos, gracias por escucharme, asesorarme y compartir un poco de tu experiencia conmigo.

Agradezco al Dr. Enrique Soto por aceptarme en el laboratorio de Neurofisiología Sensorial de la BUAP para realizar los ensayos electrofisiológicos. Por contagiarme su alegría y hacer muy amena mi estancia. Gracias por transmitirme sus conocimientos y recomendaciones para que este trabajo fuera una realidad.

Quiero agradecer de manera especial al Dr. Emilio Salceda, por su tiempo y esfuerzo dedicado para que los ensayos electrofisiológicos se realizaran en tiempo y forma. Por enseñarme y apoyarme. Gracias por estar siempre en el momento de hacer los ensayos

electrofisiológicos asesorándome en la parte técnica y en el análisis de resultados. Por ser siempre tan amable y alegre, por preocuparse siempre por sus estudiantes. ¡Mil gracias!

Gracias a todo el personal del Laboratorio de Neurofisiología Sensorial del Instituto de Fisiología de la BUAP. Por su apoyo en todos los sentidos, por hacer de mi estancia de investigación una experiencia que siempre recordaré con mucho cariño.

Quiero reconocer y agradecer a la M. en C. Adriana Báez por capacitarme en el uso del set de electrofisiología y en el cultivo de GRD's. Gracias por asesorarme y hacer observaciones importantes en el procesamiento y análisis de resultados. Muchas gracias por estar siempre brindándome tu apoyo, tu gran amistad. Por todas esas tardes de risas en el laboratorio.

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Neurofisiología Sensorial: Carmen, Conchita, Christian, Javier, Octavio, Tere, Blanca y Carlos Uribe. "El grupo de toxinas". Fue una gran experiencia conocerlos y trabajar con ustedes. Gracias por transmitirme sus conocimientos en electrofisiología y enseñarme a obtener GRD's. Por enseñarme lo bonito que es Puebla, y por brindarme su valiosa amistad. Los recuerdo siempre con mucho cariño.

Al AMOR de mi Vida Roberto. Gracias por estar siempre a mi lado. Por tu amor que me ilumina y que me hace sonreír todos los días. Por darme fuerza y motivo para concluir esta etapa de mi vida. Por creer en mí. ¡TE AMO! ¡Eres mi Vida Entera!

A mi cuñada Annette Patricia. Gracias por ser más que mi cuñada, una gran amiga. Por escucharme siempre que lo necesité y por brindarme tu apoyo incondicional siempre. Por tus valiosos consejos. Te Quiero.

A mi amiga Mirna. Gracias por escucharme siempre durante mi estancia en la BUAP. Por todas las tardes de risas y diversión. Por tus valiosos consejos y por alentarme siempre a continuar. Por ser siempre auténtica y un gran ser humano.

A mi amiga Elizabeth Ramírez. Por estar siempre ahí, por apoyarme siempre y escucharme, por tu valiosa amistad y tus siempre sabios consejos en lo profesional y en lo académico. Por animarme siempre que lo necesité. Te quiero amiga.

A mi amiga Azucena Domínguez. Gracias por tu amistad y apoyo, por siempre estar ahí en las buenas y en las malas. Por las horas de relax en el café, por los momentos de risa, por tus palabras de ánimo.

A mis Amigos Carlos Apodaca y Juanita. Gracias por su apoyo incondicional y valiosa amistad. Por ser siempre tan lindos y por todos los momentos agradables que hemos pasado juntos. Por sus palabras de ánimo y por estar conmigo en la culminación de esta etapa.

A Katalina Ávalos y Javier Colín. Por su amistad y las tardecitas de café, por todos los momentos agradables. Por compartir este momento conmigo.

A mis compañeros del CICESE: Fernanda Ariza, Ruth García, Schery Umanzor, Iván Vivas y Mariana Solís. Muchas gracias por su amistad y apoyo. Fue agradable compartir las clases con ustedes y fuera del CICESE.

A Thaydé y Arturo, por escucharme cuando les platicaba sobre la escritura de mi tesis, por alegrarse conmigo en la culminación de esta etapa.

Al Dr. Noboru Takeuchi y a Marisol Romo por ser siempre excelentes personas y amigos. Gracias por su apoyo y consejo.

A mi grupo de divulgación “Química Divertida” conformado por los estudiantes de Nanotecnología de la UNAM, CETYS, y UABC. Gracias por los momentos agradables que me han inspirado a continuar y culminar mis estudios de Maestría.

A Santino Zapiaín por su entusiasmo en conocer acerca de las biotoxinas que me inspira a continuar investigando más para poder enseñar a otros. Por ser siempre de gran apoyo. Por alegrarte conmigo en la culminación de esta etapa de mi formación.

Al Dr. Pierrick Fournier por sus recomendaciones y comentarios acertados acerca de este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a mis amigos y estudiantes. A todas aquellas personas que de alguna manera u otra contribuyeron para que este proyecto se realizara con éxito.

Lista de Figuras

Figura	Página
1. Esquema de un canal iónico.....	4
2. Componentes de un canal iónico activado por voltaje.....	4
3. Clasificación de canales iónicos que responden a diferente clase de estímulos.....	5
4. Generación de potencial de acción en células excitables.....	7
5. Función de los canales iónicos activados por voltaje.....	8
6. Conformación estructural de los canales de calcio dependientes de voltaje.....	9
7. Registro electrofisiológico de la corriente de calcio de alto voltaje HVA y la corriente LVA de bajo voltaje.....	10
8. Estructura de los canales de sodio dependientes de voltaje. A la izquierda se observa la representación de la subunidad α , los números romanos indican los dominios homólogos.....	12
9. Esquema que muestra la localización de los distintos sitios de unión de toxinas animales y fármacos en canales de K ⁺ activados por voltaje.....	14
10. Estructura molecular de un canal de potasio activado por voltaje.....	15
11. Estructura de los canales iónicos ASIC.....	16
12. Efecto de fármacos moduladores de los canales ASIC que actúan sobre la subunidad ASIC1a o ASIC3.....	18
13. Circuito equivalente de membrana.	19
14. Técnica de patch-clamp.....	20
15. Componentes básicos de un set de patch-clamp experimental.....	23
16. Técnica patch-clamp célula completa o <i>whole-cell</i>	24
17. Diversidad morfológica de algunas conchas de caracoles del género <i>Conus</i>	27

18.a. Fotografías tomadas del aparato venenoso de <i>Conus californicus</i> y el diente radular de <i>Conus princeps</i> . Bv, bulbo venenoso; Cv conducto venenoso; P probóscide; R; diente radular en forma de arpón. b. Aparato venoso del género <i>Conus</i> c. Mecanismo de captura del género <i>Conus</i>	28
19. Fotografía de la concha y diente radular de caracoles marinos <i>Conus princeps</i>	29
20. ω -Conotoxina MVIIA. a. Secuencia de aminoácidos del péptido Ziconotide/Prialt ®; (Eli Lilly Pharmaceuticals).	30
21. Secuencia de aminoácidos de la conotoxina γ -PnVIIA comparada con γ -TxVIIA, la similitud entre las secuencias se encuentran marcadas con rectángulos.....	34
22. Efecto de γ -PnVIIA en neuronas caudodorsales de <i>Lymanea stanginalis</i> (n=5). Se observa un incremento en la excitabilidad de la membrana al aumentar la dosis y un aumento en las espigas despolarizantes.....	35
23. Efecto de γ -PnVIIA 10 μ M. A la izquierda se observa una activación de la corriente lenta de cationes a -30 mV.....	36
24. Estructura primaria de las toxinas de la familia gamma reportadas. Se observa que las cuatro conotoxinas presentan similitud en el contenido de seis cisteínas y el motivo γ -CCS-.....	37
25. Estructura primaria de las toxinas de la familia gamma reportadas....	38
26. Disección de ganglios de la raíz dorsal de rata. a. Corte de la columna vertebral b. Ganglios en la raíz posterior de la médula espinal que presentan una coloración blanquecina y un tamaño de unos 26 μ m de diámetro.....	44
27. Técnica para lograr el parche de alta resistencia en electrofisiología. a) Electrodo aproximándose a la célula. b) Succión para lograr sellar la célula con el electrodo. c) Formando sello de alta resistencia.....	45
28. Cromatograma de veneno total de <i>C. princeps</i>	53
29. Repurificación de la toxina γ -PiVIIA (Cp30).....	54
30. Secuencia de aminoácidos de la conotoxina γ -PiVIIA.....	55
31. Formación de sello de alta resistencia entre electrodo de borosilicato y célula de ganglio dorsal de rata.....	57
32. Curva I-V de resultados promedio correspondientes a la evaluación	58

del efecto de γ -PiVIA (3 μ M) sobre corriente de Ca ²⁺	
33 Gráfica de resultados promedio de la evaluación de γ -PiVIA (3 μ M) sobre corriente de Ca ²⁺ en GRD's.	59
34 Porcentajes de efecto y recuperación correspondiente a la aplicación de la toxina γ -PiVIA (10 μ M) sobre corriente de Ca ²⁺ en GRD's.....	60
35 Gráfica (I/t) de resultados promedio de la evaluación del efecto de γ -PiVIA (10 μ M) sobre corriente de Na ⁺ dependiente de voltaje n=(5).....	61
36 Gráfica de resultados promedio de la evaluación de γ -PiVIA sobre corriente de Na ⁺ en GRD's.	62
37 Gráfica de porcentajes de efecto y recuperación correspondientes al efecto de γ -PiVIA (10 μ M) sobre corriente de Na ⁺ en GRD's.	63
38 Gráfica (I/t) de resultados promedio de la evaluación del efecto de γ -PiVIA (10 μ M) sobre corriente de K ⁺ dependiente de voltaje n=(5).....	64
39 Gráfica de resultados promedio de la evaluación de γ -PiVIA sobre corriente de K ⁺ en GRD's.....	65
40 Grafica (I/t) de resultado promedio del registro de γ -PiVIA sobre corriente ASIC (n=7).	66
41 Gráfica de resultados promedio de la evaluación de γ -PiVIA sobre corriente ASIC en GRD's.	67
42 Comparación entre la secuencia de las toxinas γ -PiVIA de <i>C. princeps</i> , γ -TxVIA (<i>C. textile</i>), γ -PnVIA (<i>C.pennaceus</i>), de7a (<i>C.delessertii</i>) y as7a (<i>C.austini</i>).	70

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Función y clasificación de los canales de calcio activados por voltaje.....	11
2. Nomenclatura y localización de canales de Na ⁺ dependientes de voltaje.....	13
3. Actividad farmacológica de conotoxinas agrupadas por familias.....	32
4. Solución extracelular empleada para el registro de corriente de Ca ²⁺ en GRD's.....	47
5. Solución intracelular empleada para el registro de corriente de Ca ²⁺ en GRD's	47
6. Soluciones empleadas para la evaluación de γ -PiVIA sobre corriente de Na ⁺ en GRD's.....	49
7. Soluciones empleadas para la evaluación de γ -PiVIA sobre corriente de K ⁺ en GRD's.....	50
8. Soluciones empleadas para la evaluación de γ -PiVIA sobre corriente ASIC en GRD's	52
9. Resultados promedio correspondientes a la máxima intensidad de corriente (I _{max}) de Ca ²⁺ obtenida al aplicar γ -PiVIA (3 μ M).....	58
10. Resultados promedio correspondientes a la máxima intensidad de corriente (I _{max}) de Na ⁺ obtenida al aplicar γ -PiVIA (10 μ M).....	61
11. Resultados promedio correspondientes a la máxima intensidad de corriente (I _{max}) de K ⁺ obtenida al aplicar γ -PiVIA (10 μ M).....	64
12. Resultados de corriente máxima ASIC obtenida al aplicar γ -PiVIA (3 μ M).....	66

Lista de abreviaturas

ASIC	Canales iónicos sensibles a la concentración de ácido
GRD	Células de ganglio de la raíz dorsal
I	Intensidad de corriente
I _{max}	Intensidad de corriente máxima
ms	Milisegundo
mV	Milivolt
nA	Nanoamper
nM	Nanomolar
V	Volt
μM	Micromolar
s	Segundo
ACN	Acetonitrilo
TFA	Ácido trifluoroacético

Capítulo 1

Introducción

En la actualidad nos enfrentamos a nuevos retos en materia de salud pública: alta incidencia de enfermedades crónico-degenerativas que son la principal causa de muerte en la población, aumento en la prevalencia de enfermedades infecciosas y los efectos secundarios asociados al uso de fármacos convencionales. Por todo ello, resulta de vital importancia aplicar nuevas tecnologías en el diseño de terapias dirigidas, así como el descubrimiento y estudio de nuevas moléculas de interés farmacéutico (OMS, 2005).

Al respecto se han aplicado herramientas biotecnológicas en el estudio de la actividad biológica de metabolitos extraídos de organismos marinos, que según su actividad biológica a nivel celular y molecular podrían ser aplicados en el tratamiento de enfermedades (Harvey, 2014).

Un caso especial son las potentes toxinas aisladas del veneno de caracoles marinos del género *Conus*, que se unen de manera selectiva a receptores específicos de la membrana, y activan o bloquean canales iónicos. Se estima que existen más de 50,000 moléculas activas con potencial farmacológico en el veneno de las especies de *Conus* que podrían ser la clave para el tratamiento de muchas enfermedades (Terlau & Olivera, 2004).

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto producido por la toxina α -P1VIIA aislada del caracol marino *Conus prínceps* sobre canales de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ activados por voltaje, y su efecto en canales iónicos sensibles a la concentración de protones (ASIC) en neuronas de ganglio dorsal de ratas neonatas de la cepa *Long-Evans*.

La secuencia primaria y actividad electrofisiológica de esta conotoxina no habían sido reportadas antes, por lo que es considerada una conotoxina *novel* perteneciente a la familia gamma.

El estudio de su bioactividad resulta de suma importancia, ya que nos permite conocer cuáles podrían ser sus blancos moleculares, y saber si puede ser utilizada en el tratamiento de enfermedades.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 Canales iónicos

La membrana celular es una barrera que separa el medio intracelular del extracelular y controla el paso de iones, moléculas y productos mediante mecanismos específicos de transporte. Está formada por lípidos, proteínas y una pequeña cantidad de carbohidratos, que pueden variar en proporción de acuerdo a la función celular (Hille, 2001).

Los canales iónicos son un tipo de glicoproteínas integrales que se encuentran en la membrana, su función es regular el paso de iones y moléculas a favor de su gradiente de potencial electroquímico o mediante su unión a proteínas transportadoras, dando origen a corrientes eléctricas involucradas en la generación de respuestas celulares ante estímulos del medio interno o externo (Hille, 2001).

El avance en el conocimiento de los canales iónicos tuvo un desarrollo importante a partir de la aplicación de la técnica “patch clamp” desarrollada por los biofísicos Erwin Neher y Bert Sakmann, quienes utilizaron un microelectrodo de vidrio con punta pulida aplicado en la superficie de la membrana celular para medir las corrientes que fluyen a través de los canales iónicos (Aidley & Stanfield, 1996).

2.1.1 Estructura de los canales iónicos

De manera general, los canales iónicos están constituidos por regiones hidrofóbicas en contacto con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, y por regiones hidrofílicas que interactúan con los iones y permiten su paso hacia el interior o el exterior de la membrana (Hille, 2001) (Fig. 1)

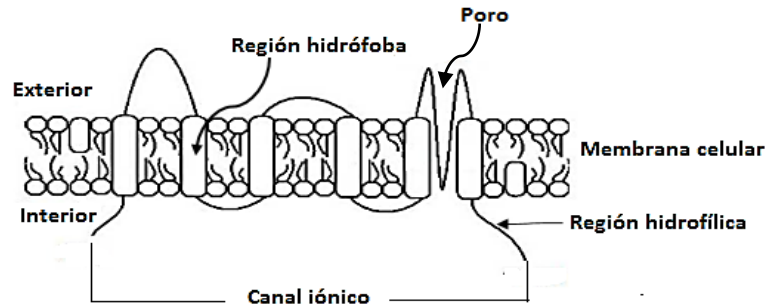


Figura 1. Esquema de un canal iónico. La región indicada como el poro contiene aminoácidos hidrofílicos, mientras que las zonas que atraviesan la membrana representan las regiones hidrofóbicas. (Modificado de Hille, 2001)

A su vez, los canales iónicos están formados por una secuencia de aminoácidos que forman un **filtro de selectividad** que permite el flujo preferencial de los iones en función de su carga y/o tamaño. Por otro lado, se encuentra la región de **sensor** formado por aminoácidos con carga positiva, su función es detectar estímulos que en respuesta dan lugar a la modificación de la estructura terciaria del canal para permitir la apertura o cierre de las **compuertas de canal** (Fig. 2) (Aidley & Stanfield, 1996).

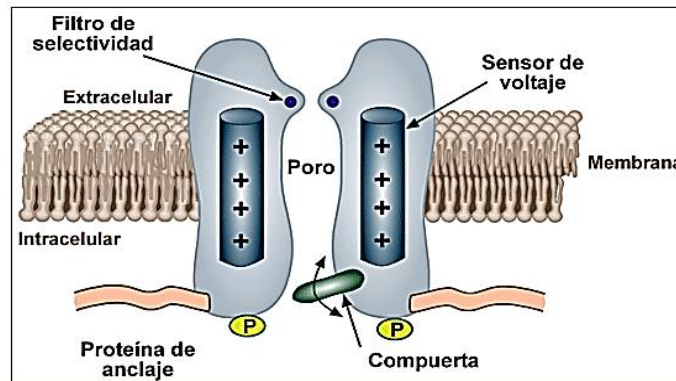


Figura 2. Componentes de un canal iónico activado por voltaje (Payandeh *et al*, 2011).

2.1.2 Clasificación de los canales iónicos

Los canales iónicos se clasifican de acuerdo a los estímulos que originan su apertura o cierre. Los **dependientes de voltaje**, se activan en respuesta a un cambio en el potencial de membrana, son altamente selectivos para el tipo de ión que pasa a través

de ellos y permiten una elevada conductancia. El flujo de iones se lleva a cabo a una gran velocidad, se calcula un flujo de hasta 10^9 iones por segundo en células excitables. Existe otro tipo de canales denominados **dependientes de ligandos** que se activan cuando sus receptores interactúan con moléculas señal (hormonas, neurotransmisores). Por otro lado, se encuentran los **canales que se activan por mediadores intracelulares** como Ca^{2+} , ATP, proteínas G, proteínas cinasas etc., encargados de acarrear información hacia blancos responsables de generar respuestas en la célula. Finalmente existen **canales iónicos que se activan en respuesta a factores físicos** como cambios en la presión, estimulación mecánica, temperatura y pH (Fig 3) (Hille, 2001).

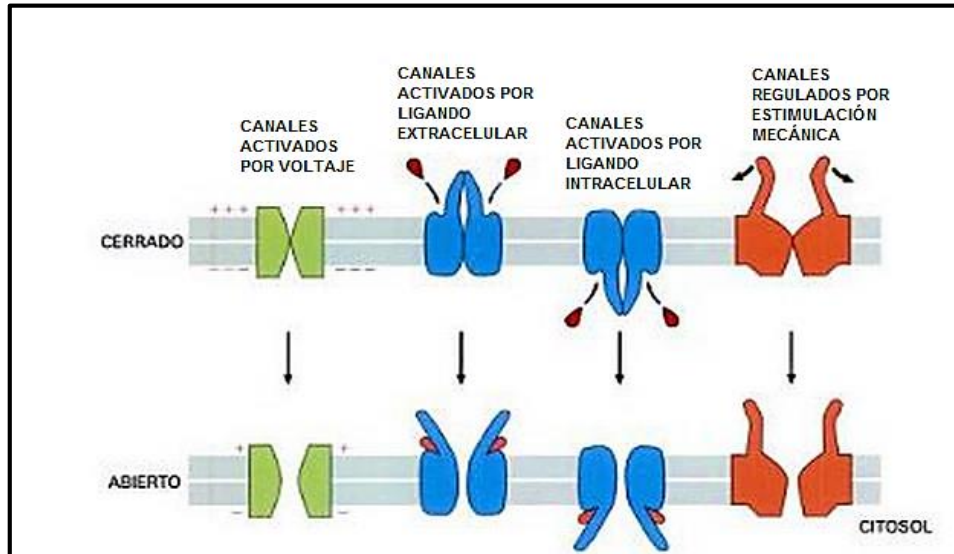


Figura 3. Clasificación de canales iónicos que responden a diferente clase de estímulos. (Lodish *et al.*, 2004)

La variedad de canales iónicos existentes es muy grande y su localización es diversa. Los organelos intracelulares como el retículo endoplásmico, la mitocondria y el núcleo también tienen canales iónicos en sus membranas (Martínez Rosas, 2004).

2.1.3 Función e importancia de los canales iónicos.

Los canales iónicos cumplen funciones vitales en todas las células. En los mamíferos determinan procesos como la excitabilidad de nervios y músculos, secreción hormonal, proliferación celular, transducción sensorial, control del equilibrio hídrico, regulación de la presión sanguínea y comunicación celular (Hübner & Jentsch, 2002).

Por otra parte, los canales iónicos son blancos moleculares para un diverso grupo de fármacos que aumentan o inhiben su función ya sea interactuando directamente con el propio canal o actuando a través de segundos mensajeros. Ejemplo de estos fármacos son algunos agentes ansiolíticos, hipoglucemiantes, antihipertensivos, anticonvulsivantes y antiarrítmicos (Flórez, 2003).

2.1.4 Canales iónicos activados por voltaje.

Los canales que dependen de voltaje regulan el paso de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ , cuando hay cambios en el potencial de membrana, su función principal es la propagación de potenciales de acción en células excitables como las cardíacas o nerviosas, y también regulan la concentración de Ca^{2+} intracelular en casi todas las células. En los sistemas biológicos, se encuentran involucrados en procesos celulares fundamentales como la excitabilidad eléctrica, secreción, contracción muscular, reacciones inmunes, fecundación, diferenciación celular, etc (Kew & Davies, 2010).

La generación de potencial ocurre por cambios en la concentración de iones en la cara interna y externa de la membrana, lo que da lugar a una diferencia de carga electroquímica que se expresa en voltios (V) (Kew & Davies, 2010).

La célula en estado de **reposo** o polarizado mantiene un potencial de -40 a -90 mV debido a una mayor concentración de iones negativos en el interior de la membrana, y una baja permeabilidad de cationes. En las células excitables como las neuronas, es necesario que ocurra un cambio rápido en el potencial para que sea posible la transmisión de respuestas a estímulos. Por ello, la membrana se **despolariza** al haber

flujo de iones con carga positiva hacia el interior, y un incremento en el potencial hacia valores que tienden a valores positivos. Una vez que ocurre la despolarización, la membrana se **repolariza**, se abren los canales que permiten la salida de cationes, y se observa una reducción en el potencial hasta el estado inicial de reposo. Después de la repolarización, sigue una fase de **hiperpolarización**, hay una entrada de iones negativos, el potencial de membrana baja a -75mV y la célula se prepara para generar una nueva respuesta (Fig. 4) (Kew & Davies, 2010).

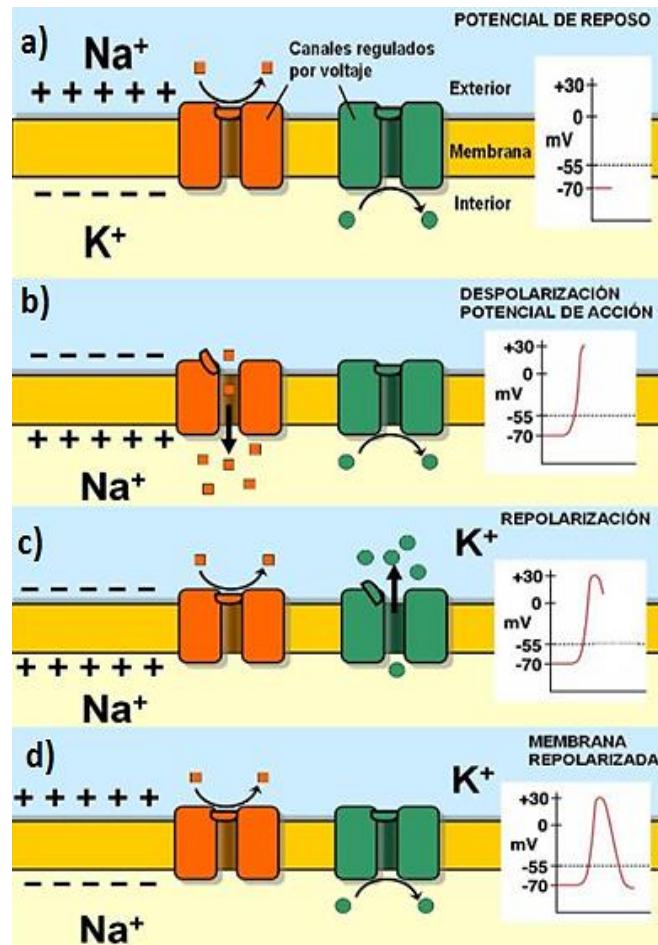


Figura. 4 Generación de potencial de acción en células excitables. a. Fase de reposo de la célula. El potencial de membrana se encuentra en un promedio de -70mV . b. Membrana celular despolarizada, apertura del canal de sodio que induce un cambio en el potencial electroquímico en el citosol, hasta $+30\text{mV}$. c. y d. Membrana celular repolarizada. Apertura del canal de potasio que induce la salida de K^+ , reduciendo el potencial electroquímico en el citosol, hasta -70mV . Recuperado de www.genomasur.com

2.1.4.1 Canales de calcio dependientes de voltaje.

Los canales de calcio regulados por voltaje, regulan el paso de Ca^{2+} al interior de la célula en respuesta a cambios en el potencial de membrana. El Ca^{2+} juega un papel muy importante en los procesos intracelulares de las células, por ejemplo en el control de la liberación de neurotransmisores, la muerte neuronal, diferenciación celular, secreción de hormonas, control de la excitabilidad eléctrica de la célula, contracción muscular y como segundo mensajero en la expresión de genes (Fig.5) (Berridge, Lipp, & Bootman, 2000).

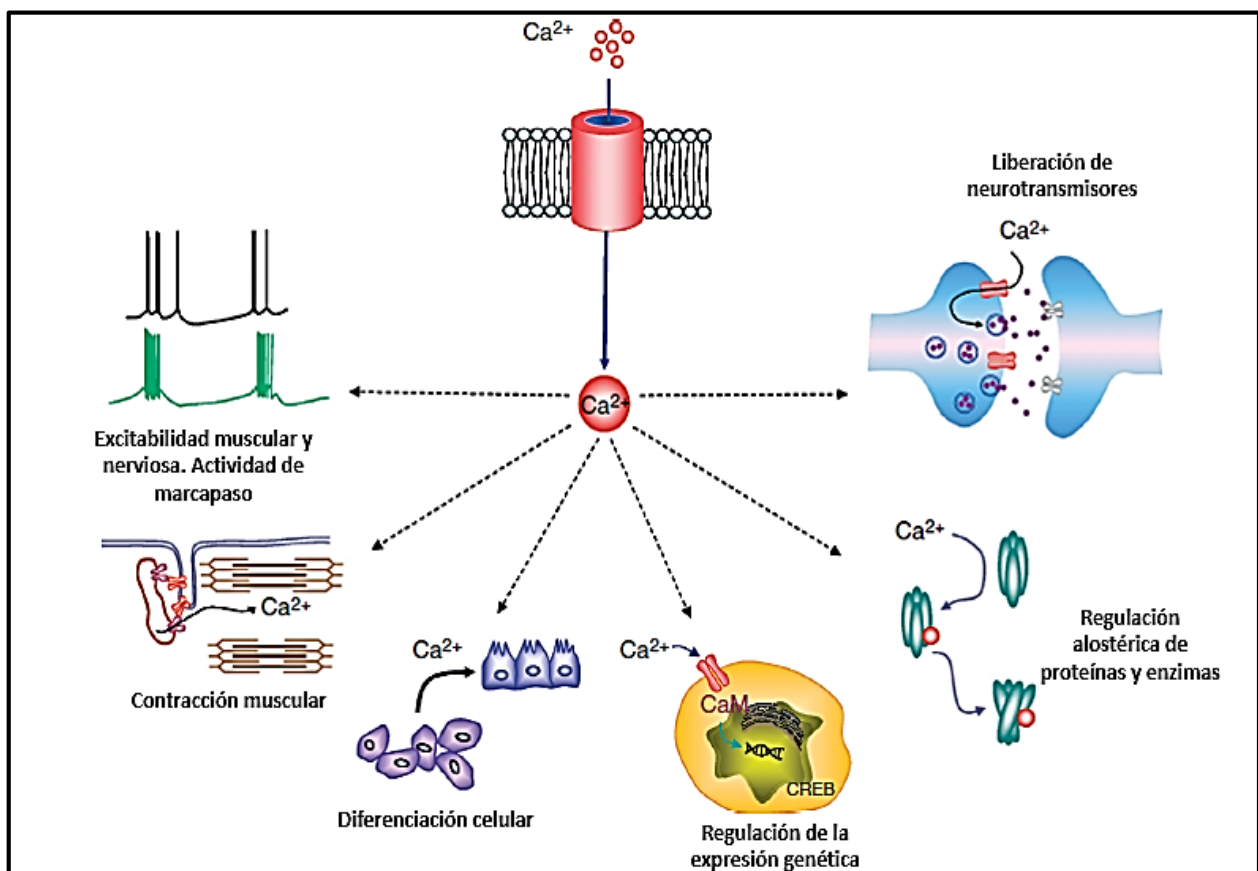


Figura 5. Función de los canales iónicos activados por voltaje. Los canales de calcio dependientes de voltaje median el flujo de calcio en respuesta a la despolarización de la membrana. Modificado de Snutch, 2009.

A su vez, los canales de calcio activados por voltaje se encuentran formados por una subunidad principal llamada α_1 , que sirve como poro y sensor de los cambios de potencial. También presenta cuatro dominios, que a su vez están formados por 6

segmentos transmembranales (S1-S6) (Fig. 6). Los extremos amino y carboxilo de la subunidad $\alpha 1$ se encuentran localizados intracelularmente. Por otro lado, los segmentos S4 de cada dominio poseen residuos de arginina y lisina, que forman el sensor de voltaje, que sufre cambios conformacionales en respuesta a una señal despolarizante que produce la apertura del canal. Los segmentos S5 y S6 se encuentran unidos por un asa que posee residuos de glutamato o aspartato y da lugar al filtro de selectividad que condiciona la entrada de iones Ca^{2+} (Snutch, 2009).

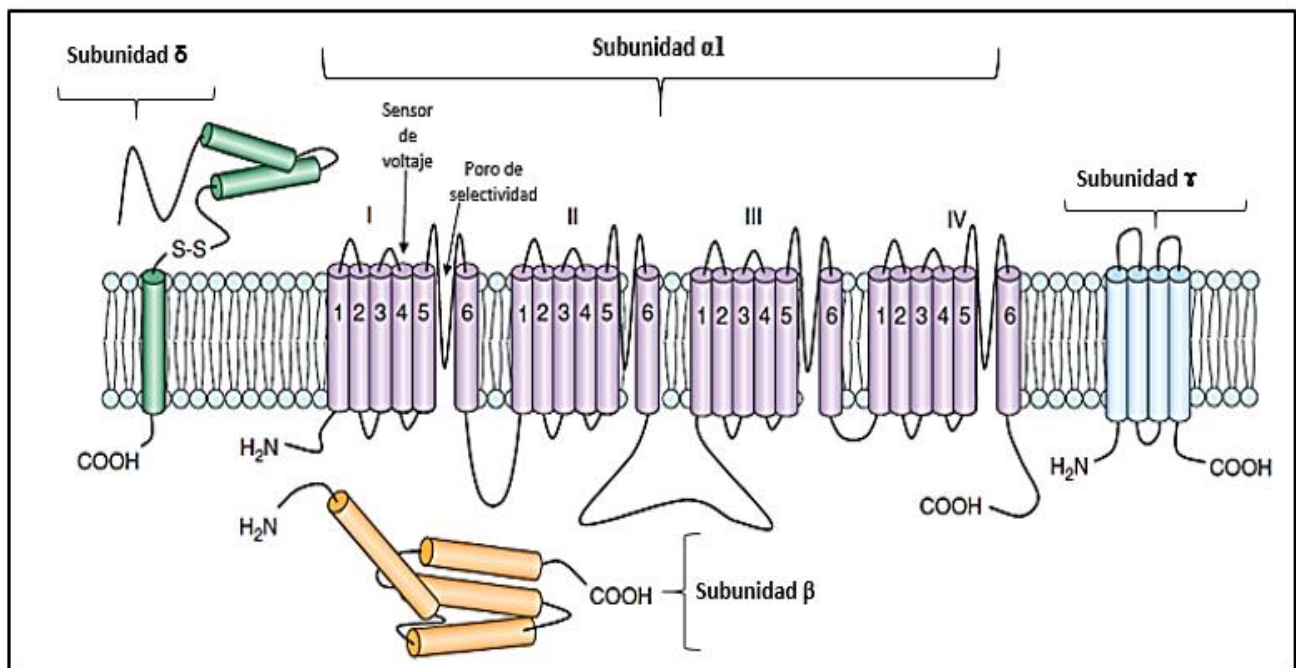


Figura 6. Conformación estructural de los canales de calcio dependientes de voltaje. Modificado de Snutch, 2009.

Los canales de calcio dependientes de voltaje se clasifican de acuerdo a sus características electrofisiológicas en cinco tipos: T, L, N, P/Q y R. Los canales iónicos de tipo T o LVA son conocidos como de bajo umbral de activación, porque se activan con pulsos de despolarización cercanos al potencial de reposo (-50mV) y se cierran con lentitud al repolarizar la membrana. Los canales de tipo L, N y P/Q O HVA requieren estímulos despolarizantes altos y son denominados de alto umbral (Fig. 7). En su estructura, los canales de tipo L contienen cinco polipéptidos $\alpha 1$, β , δ y γ que modulan la actividad del canal incluyendo su incorporación a la membrana plasmática, la

amplitud de corriente, sensibilidad a fármacos y cinética de inactivación (Catterall, 2010).

Existen muchos tipos de canales iónicos dependientes de voltaje, que se clasifican de acuerdo a la secuencia molecular de su subunidad $\alpha 1$. Con base en esto, los canales HVA se subdividen en tipo L ($\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ y $\alpha 1F$) y tipo N, que comprende a los tipos P/Q ($\alpha 1A$), N ($\alpha 1B$) y R ($\alpha 1E$). Por otro lado, los canales LVA agrupan tres subunidades $\alpha 1$ que codifican para canales tipo T, como se muestra en la tabla 1 (Fanjul & Hiriart, 2008).

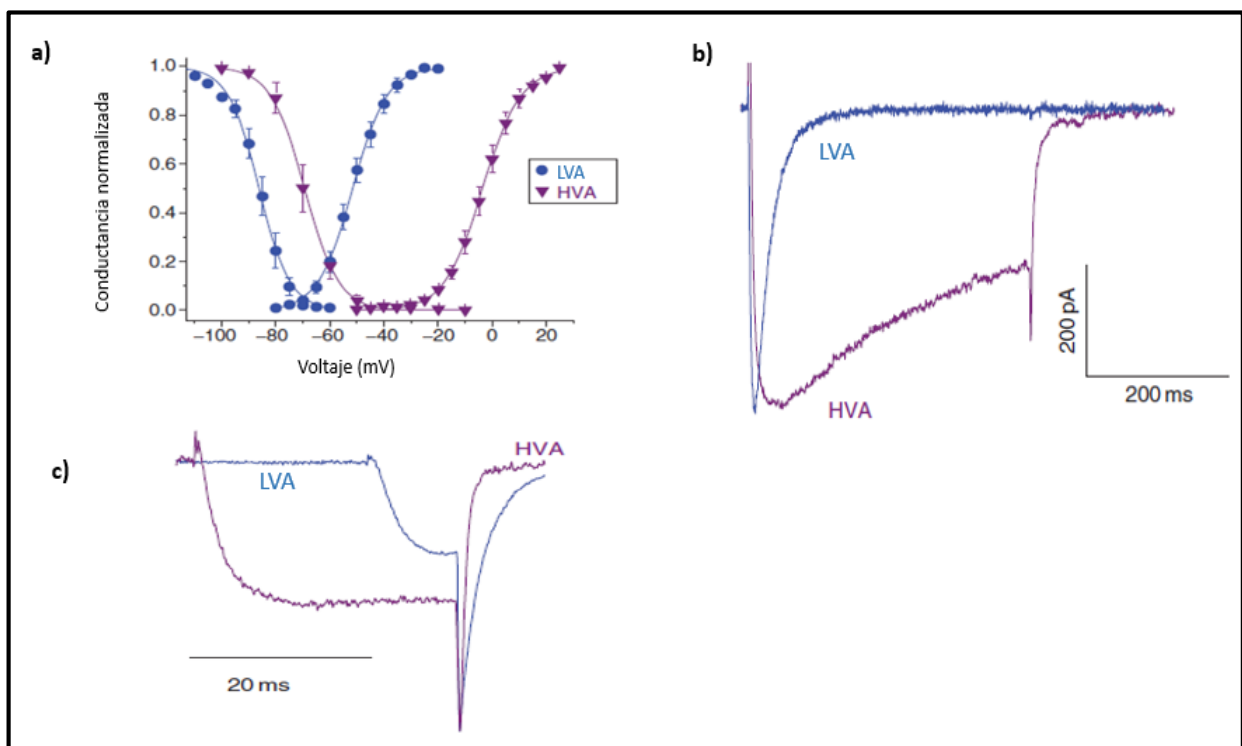


Figura 7. Registro electrofisiológico de la corriente de calcio de alto voltaje HVA y la corriente LVA de bajo voltaje. a. Apertura de canales de calcio. Se observa que los canales tipo T se abren a potenciales más bajos (-70mV) que los de tipo HVA (-20mV). b. Inactivación de canales iónicos de calcio. En la gráfica se muestra que los canales tipo T se inactivan más rápido en comparación con los de tipo HVA. c. Desactivación o cierre de los canales de calcio. La gráfica muestra que los canales de calcio tipo T tienden a cerrarse lentamente que los de tipo HVA. Modificado de Snutch, 2009.

Tabla 1. Función y clasificación de los canales de calcio activados por voltaje. (Barbado, Fablet, Ronjat, & De Waard, 2009)

Tipo de corriente	Tipo de canal	Subtipo	Subunidad	Función	
LVA	L		Cav 1.1	Excitación del músculo esquelético. Regulación de la transcripción	
			Cav 1.2	Excitación y contracción del músculo cardiaco y liso. Secreción endócrina. Regulación de Ca ²⁺ en dendritas. Regulación de actividad enzimática. Regulación de la transcripción.	
			Cav 1.3	Corriente de marcapaso. Transducción auditiva. Secreción endócrina. Regulación de Ca ²⁺ en dendritas.	
			Cav 1.4	Transducción visual	
HVA	N	P/Q	Cav 2.1	Liberación de neurotransmisores. Regulación de Ca ²⁺ en dendritas.	
		N	Cav 2.2		
		R	Cav 2.3		
	L	T		Cav 3.1	Corriente de marcapasos
				Cav 3.2	
				Cav 3.3	

La importancia en el estudio de los canales de calcio activados por voltaje, reside en que son blanco molecular de una gama de fármacos y toxinas que actúan bloqueando su función, también conocidos como antagonistas de los canales de calcio. Estos fármacos son ampliamente utilizados en el tratamiento de hipertensión, angina de pecho y arritmias cardiacas (Triggle, 2003).

2.1.4.2 Canales de sodio dependientes de voltaje.

Los canales de sodio activados por voltaje juegan un papel muy importante en la propagación de potenciales de acción en células excitables como células endócrinas, células musculares y neuronas. Son blanco molecular de aproximadamente el 13% de los fármacos conocidos, en particular aquellos que bloquean la entrada de sodio a la célula, utilizados para anestesia, tratamiento de arritmias, hipertensión, epilepsias, ansiedad y otras enfermedades del cerebro. Se sabe también que los canales de sodio

activados por voltaje son blanco de muchas toxinas animales (Denac, Mevissen, & Scholtysik, 2000).

En su estructura, los canales de sodio se encuentran formados por un complejo denominado subunidad α que presenta nueve isoformas asociadas a una o más de tres subunidades β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$). A su vez, la subunidad α está formada por cuatro dominios homólogos (I a IV) con seis α -hélices de transmembrana (S1 a S6). En los segmentos S4 se encuentran aminoácidos con carga positiva que cumplen la función de detectar los cambios en el potencial de membrana.¿ (Marban, Yamagishi, & Tomaselli, 1998).

Por otro lado, el poro del canal se forma entre los segmentos S5 y S6 de cada uno de los dominios. Estos segmentos contienen en su estructura aminoácidos de carga negativa que confieren permeabilidad sólo para cationes, y ácido glutámico que detecta el tamaño del ión Na^+ y permite el paso de éste por sobre otros iones positivos. Además, en la región de unión de los dominios III y IV se encuentra una partícula que inactiva el canal después de su apertura (Fig. 8) (Yu & Catterall, 2003).

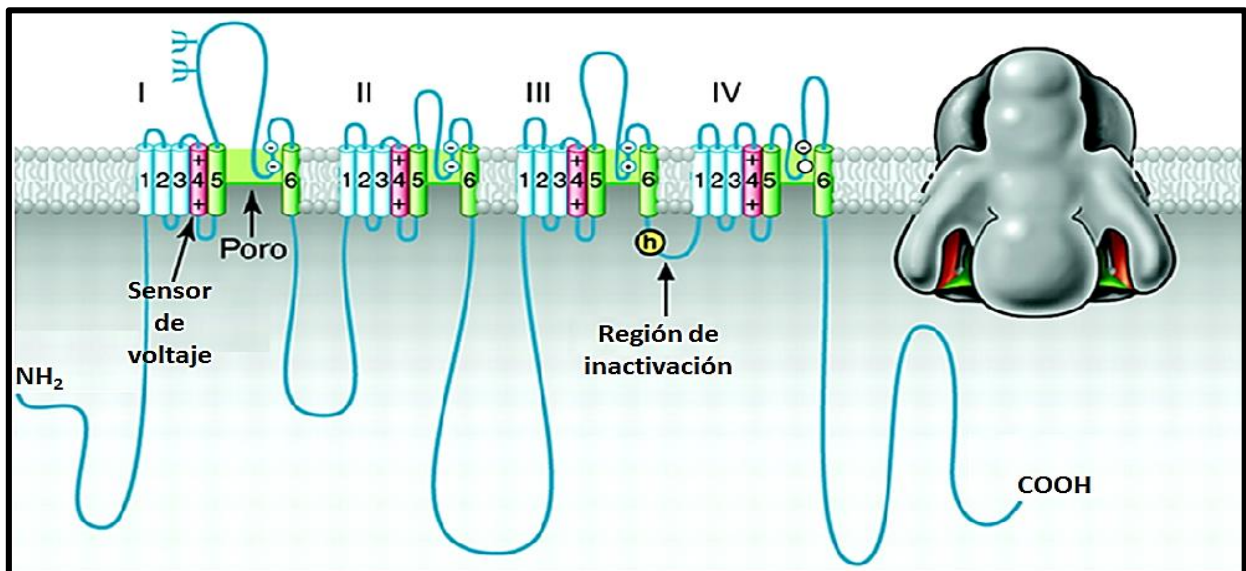


Figura 8. Estructura de los canales de sodio dependientes de voltaje. A la izquierda se observa la representación de la subunidad α , los números romanos indican los dominios homólogos. La α -hélice está representada en color verde por la unión de los segmentos S5 y S6 y el loop o región entre ellos. El segmento S4 se encuentra marcado con color rojo. La puerta de inactivación en color amarillo se encuentra formada por un complejo isoleucina-fenilalanina-metionina-treonina. Los círculos insertos en el loop de cada dominio representan los aminoácidos que forman el filtro de selectividad. A la derecha la representación tridimensional del canal de sodio. Modificado de Yu et al., 2005

En estado de reposo, los canales de sodio se encuentran en estado desactivado o cerrado a la conducción de iones. Cuando ocurre un cambio en el potencial de membrana (-50 mV), los sensores S4 se activan y el canal se abre durante un periodo corto de 2-5 milisegundos aproximadamente. Al terminar este proceso se da una fase de inactivación, el poro se hace más estrecho por el movimiento de la partícula de inactivación, en este estado el canal permanece abierto y el poro no conduce iones. La remoción de la partícula de inactivación ocurre una vez que la membrana se repolariza y el canal vuelve a estar disponible para la conducción iónica (Yu, Yarov-Yarovoy, Gutman, & Catterall, 2005).

Los canales de sodio activados por voltaje se denominan Na_v y se clasifican en familias de acuerdo a su función y su perfil de expresión, como se describen en la tabla 2 (Ogata & Ohishi, 2002).

Tabla 2. Nomenclatura y localización de canales de Na^+ dependientes de voltaje. (Ogata & Ohishi, 2002)

Nombre del canal	Localización
Na_v 1.1	Neuronas centrales, periféricas y cardiomiocitos
Na_v 1.2	Neuronas centrales y periféricas
Na_v 1.3	Neuronas centrales, periféricas y cardiomiocitos
Na_v 1.4	Células del músculo esquelético
Na_v 1.5	Cardiomiocito, neuronas centrales
Na_v 1.6	Neuronas centrales, células de la raíz dorsal, neuronas periféricas, células del corazón, células gliales
Na_v 1.7	Ganglios de la raíz dorsal, neuronas simpáticas, células de Schwann, y células neuroendocrinas
Na_v 1.8	Células de la raíz dorsal
Na_v 1.9	Células de la raíz dorsal
Na_x	Células de la raíz dorsal, células de corazón y útero, células de la glía
$Na_v\beta$ 1	Neuronas centrales, neuronas periféricas, células de musculo esquelético, corazón y glía
$Na_v\beta$ 2	Neuronas centrales, neuronas periféricas, células corazón y glía
$Na_v\beta$ 3	Neuronas centrales, neuronas periféricas, glándula adrenal, células de riñón,
$Na_v\beta$ 4	Neuronas centrales, neuronas periféricas, células de musculo esquelético y corazón

Es importante mencionar que el mecanismo de acción de los fármacos y toxinas que tienen actividad sobre canales de sodio dependientes de voltaje, depende de su unión específica a una determinada subunidad del canal (Fig. 9) (Al-Sabi, McArthur, Ostroumov, & French, 2006).

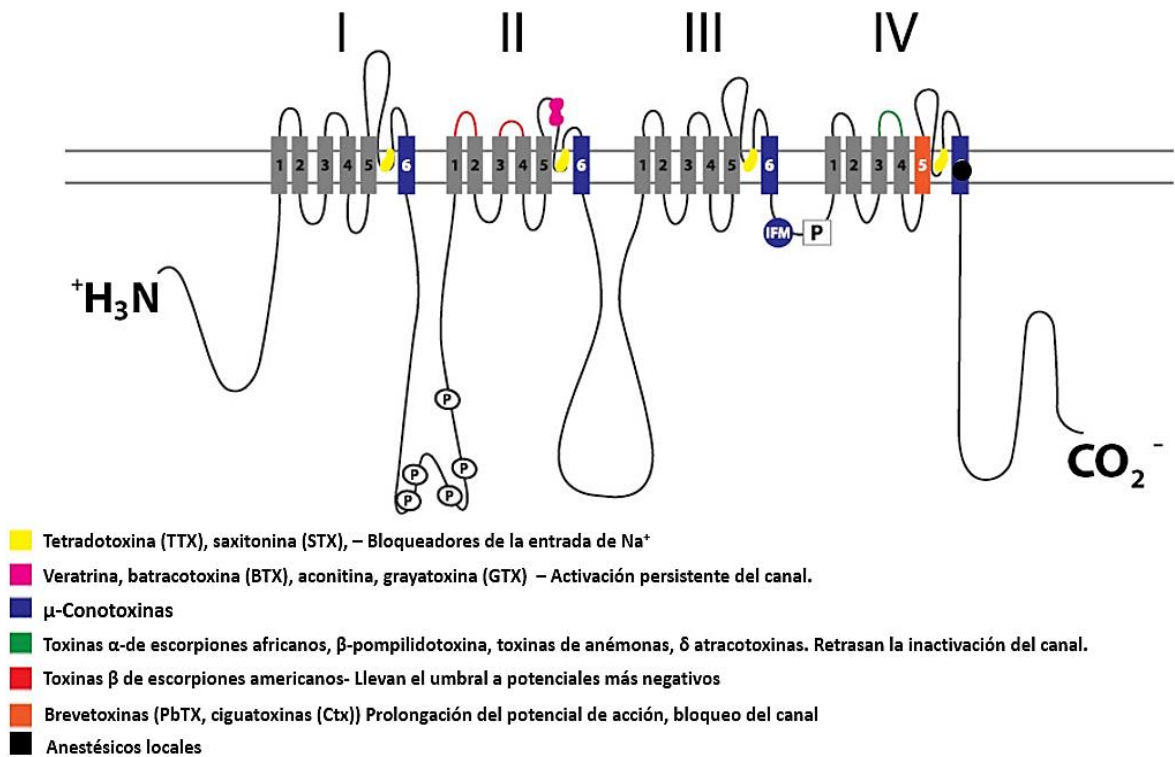


Figura 9. Esquema que muestra la localización de los distintos sitios de unión de toxinas animales y fármacos en canales de K^+ activados por voltaje. Modificado de Ogata & Ohishi, 2002.

2.1.4.3 Canales de potasio activados por voltaje.

Los canales de potasio dependientes de voltaje permiten el paso de iones K^+ cuando ocurren cambios en el potencial de membrana y desempeñan un papel muy importante en el proceso en el que ésta vuelve al estado de reposo después de su despolarización (Sansom et al., 2002).

Se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes células como las del útero, epiteliales, neuronas, endócrinas, gastrointestinales y musculares. Su función principal es el control de la excitabilidad neuronal, modulación de la liberación de neurotransmisores, regulación los movimientos peristálticos, modulación de la secreción de hormonas y en el músculo liso regulando la actividad mecánica (Solís, López-Hernández, & Cortés-Gasca, 2008).

Los canales de potasio activados por voltaje (Kv) se clasifican en tres grupos, los de alta conductancia (BK), de conductancia intermedia (IK) y los de baja conductancia (SK). Los canales SK e IK requieren concentraciones submicromolares de Ca^{2+} para activarse y su conductancia es de 5 a 20 pS. Los canales BK poseen una alta conductancia (100-250 pS) y se activan por despolarización de la membrana y por una concentración micromolar de Ca^{2+} (Yellen, 2002).

La estructura de los BK consiste en cuatro subunidades α independientes que forman el poro de canal. Cada unidad α está compuesta por seis segmentos transmembrana (S1 a S6) de amino terminal extracelular y cuatro subunidades β hidrofílicas. El sensor de voltaje se localiza en el segmento S4 que contiene residuos de arginina y lisina. El grupo carboxilo terminal contiene cuatro segmentos hidrofílicos ubicados en el citoplasma, que forman el centro que contiene un dominio que regula la conductancia de K^+ (Figura 10) (Li, Um, & McDonald, 2006).

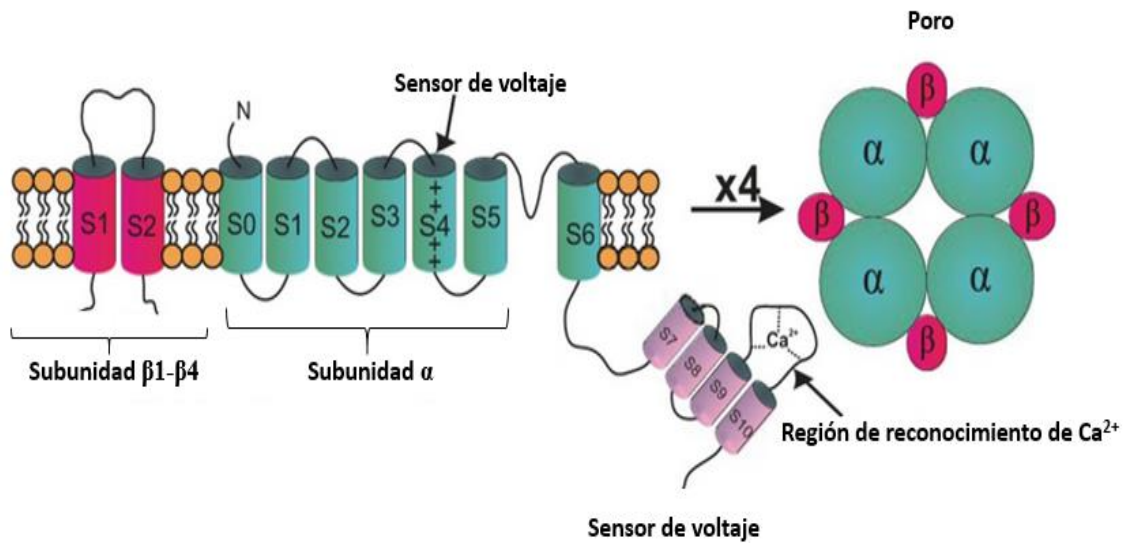


Figura 10. Estructura molecular del canal BK. Modificado de (Petkov, 2014)

Por otro lado, la subunidad β está formada por dos dominios transmembranales, uno amino y otro carboxilo terminal intracelulares. A diferencia de la subunidad α , las subunidades β se expresan sólo en tejidos determinados, por lo que se sabe que ésta subunidad modifica las propiedades funcionales del canal. Por ejemplo, la subunidad $\beta 1$ muestra una alta expresión en vasos sanguíneos, la subunidad $\beta 2$ en riñones, páncreas, ovarios y glándula suprarrenal, la subunidad $\beta 3$ se expresa solamente en testículos, páncreas y corazón, finalmente la subunidad $\beta 4$ se expresa casi exclusivamente en cerebro (Fig. 9) (Orio, Rojas, Ferreira, & Latorre, 2002).

Aunque se conoce desde hace tiempo el papel de los canales de potasio en la transmisión de potencial de membrana y en procesos de excitabilidad de la célula, el diseño de fármacos que actúen de manera selectiva en estos canales es un campo aún poco explorado. Los fármacos de la familia de sulfonamidas hipoglucemiantes actúan uniéndose a los canales de potasio dependientes de ATP de las células β pancreáticas, producen cierre del canal e inducen despolarización de la membrana y entrada de Ca^{2+} , lo que facilita la liberación de insulina. También hay fármacos que actúan activando los

BK y en consecuencia inhiben la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje para producir efectos vasodilatadores. Estos últimos fármacos son ampliamente utilizados en el tratamiento de hipertensión y arritmias (Kocic, 2012).

Es importante señalar que existe una amplia gama de toxinas aisladas del veneno de escorpiones, caracoles marinos, anémonas, serpientes y arañas, que actúan bloqueando de manera selectiva los canales de potasio dependientes de voltaje, de las cuales ya se encuentran algunas en fase de experimentación clínica y que podrían ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades asociadas al mal funcionamiento de los canales de potasio (Mouhat, Andreotti, Jouirou, & Sabatier, 2008).

2.1.4.4 Canales iónicos sensibles a la concentración extracelular de protones (ASIC)

Los canales ASIC se abren o cierran en respuesta a la concentración extracelular de protones o a la presencia de amilorida para permitir el paso de cationes a la célula, preferentemente de Na^+ . Se localizan en células del sistema nervioso central y periférico, principalmente en las células de la raíz dorsal, bulbo olfatorio, hipocampo, amígdala, cerebelo y córtex cerebral (McIntosh, Olivera, Cruz, & Gray, 1984).

Se conoce que los ASIC's participan en el proceso de percepción de dolor, neurotransmisión, y comunicación celular. Además, están involucrados en el desarrollo de algunas fisiopatologías como la sobrecarga del calcio intracelular que conduce a la muerte de las neuronas, desarrollo de isquemia e inflamación autoinmune. También tiene un papel importante en los procesos de hiperalgesia, como modulador de los nociceptores o como el impulso primario (Krishtal, 2003).

En su estructura, los ASIC se componen de dos dominios de transmembrana, (TM1) y (TM2), un loop extracelular rico en cisteína con dominios amino y carboxilo terminal intracelulares. La región TM2 sirve como sensor de pH y la región TM1 como filtro de selectividad de iones (Fig. 11) (Holzer, 2011).

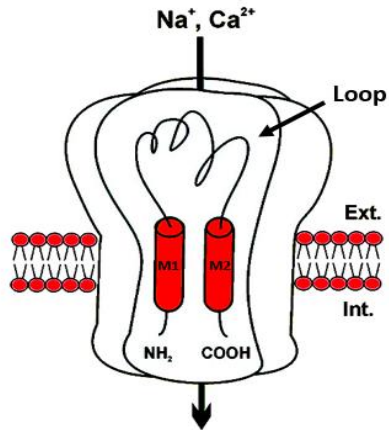


Figura 11. Estructura de los canales iónicos ASIC. Recuperado de flipper.diff.org

Los canales ASIC se clasifican en 4 tipos, ASIC1, ASIC2, ASIC3 y ASIC4, asociados a subunidades 1a, 1b, 2a, 2b, 3 y 4, de los cuales sólo son funcionales los homómeros ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC3 y los heterómeros ASIC1a+2a, ASIC2a+2b, ASIC1a+3, ASIC2a+3 y ASIC2b+3 (Lingueglia, 2007).

De manera general, los ASIC se inactivan a un pH fisiológico (7.4) y se activan cuando el pH disminuye (6.5). La subunidad ASIC3 es más sensible a la concentración de H^+ y la ASIC 1 a amilorida, mientras que ASIC2a es menos sensible a la concentración de H^+ . La subunidad ASIC3 forma canales que también son permeables al Ca^{2+} . (Lingueglia, 2007).

Debido a que los ASIC's participan en el desarrollo de patologías y tienen un papel importante en la nocicepción, se han investigado nuevos fármacos que puedan bloquear su actividad. Entre ellos la amilorida, fármaco diurético y antihipertensivo que bloquea los canales ASIC evitando la entrada de cationes. Algunos metales pesados como el Zn^{2+} modulan la respuesta de los ASIC. (Fig. 11) (Lingueglia & Lazdunski, 2013). Es importante mencionar que se han descrito toxinas animales con efecto antinociceptivo. Tal es el caso de la toxina PcTx1, aislada del veneno de tarántula *Psalmopoeus cambridgei*, que actúa bloqueando los ASIC1a, y la toxina APETx2,

obtenida de la anémona marina *Anthopleura elegantissima* con actividad bloqueadora de la unidad ASIC3. Por otro lado, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos como el diclofenaco, naproxeno y ácido acetilsalicílico tienen un efecto inhibitor de la ciclooxigenasa II, pero también presentan efectos sobre los ASIC, produciendo efectos antiinflamatorios (Fig. 12) (Baron & Lingueglia, 2015).

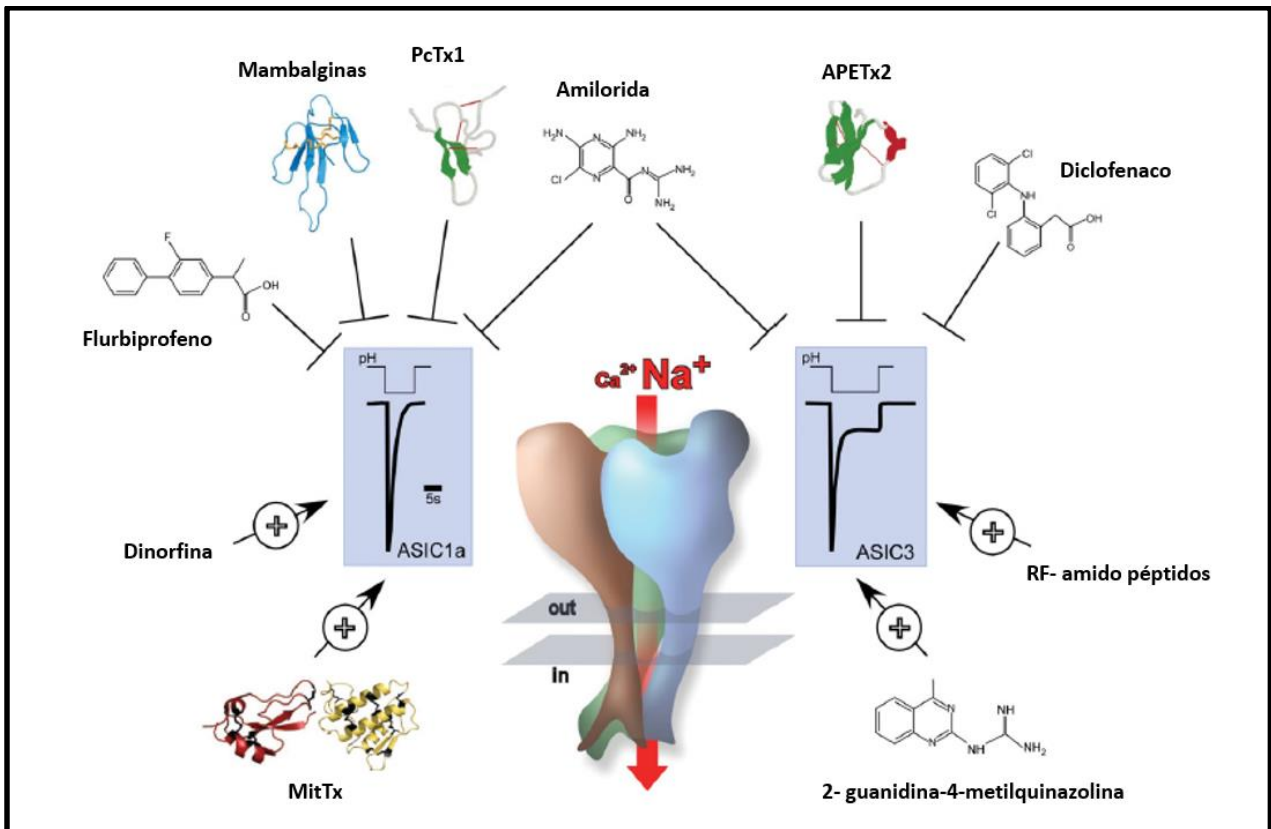


Figura 12. Efecto de fármacos moduladores de los canales ASIC que actúan sobre la subunidad ASIC1a o ASIC3.

2.2 Registro de la actividad eléctrica de canales iónicos.

La membrana celular se comporta como un circuito eléctrico, donde la bicapa lipídica funge como capacitor, los canales como resistencias, y el flujo de iones representa una corriente eléctrica cuya magnitud y cinética se puede registrar, amplificar y procesar mediante técnicas electrofisiológicas (Figura 13) (Hille, 2001).

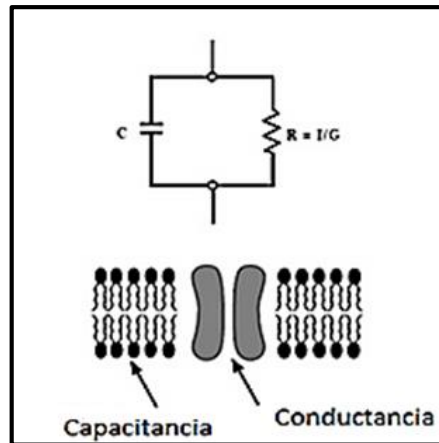


Figura 13. Circuito equivalente de membrana. Modificado de Hille, 2011.

La electrofisiología ha permitido un amplio desarrollo en el estudio de la estructura, función y farmacología de los canales iónicos. La técnica electrofisiológica consiste en detectar y registrar las corrientes eléctricas que son producidas por la apertura o cierre de canales, mediante el uso de microelectrodos (Raković & Djordjević, 2006).

El fundamento de la electrofisiología se centra en la Ley de Ohm, que explica la relación entre corriente (I), voltaje (E) y conductancia (R). (Ecuación 1) (Hille, 2001).

$$I = \frac{E}{R} \text{ (Ecuación 1)}$$

El flujo neto de cargas a través de la membrana, se denomina **corriente eléctrica** y se mide en amperes (Coulomb/s). El **potencial eléctrico** se mide en Volts ($\text{m}^2 \cdot \text{kg} / \text{A} \cdot \text{s}^3$), indica el trabajo necesario para que se produzca un flujo de iones. La **conductancia eléctrica** o resistencia se mide en Ohm ($\text{m}^2 \cdot \text{kg} / \text{C}^2 \cdot \text{s}$), y es la medida de la facilidad con que las cargas iónicas fluyen a través de la membrana celular (Hille, 2001).

2.2.1 Técnica patch-clamp

La técnica de patch clamp es útil para el estudio de canales iónicos en una amplia variedad de células, pero resulta especialmente útil en el estudio de las células excitables como neuronas, cardiomiocitos, fibras musculares y células β -pancreáticas. (Conforti, 2012).

Para realizar esta técnica se utiliza como electrodo un capilar de vidrio con diámetro de $1\ \mu\text{m}$ en la punta. El microelectrodo se llena con solución intracelular y se ensambla con un alambre de plata que conduce la corriente detectada hacia un amplificador. (Figura 13) (Kornreich, 2007).

Después, se coloca el electrodo muy cerca de la membrana y se aplica succión para formar un sello o parche de alta resistencia entre ellos ($1\text{G}\Omega$). La alta resistencia del sello permite aislar las corrientes que se producen en la región de la membrana que hace contacto con el electrodo (Figura 13) (Kornreich, 2007).

Posteriormente, la célula se perfunde con solución extracelular o se añaden fármacos o sustancias para estudiar el efecto de éstas sobre los canales iónicos, a diferentes condiciones (Fig.13) (Kornreich, 2007).

Para realizar el registro de la corriente, es necesario utilizar un equipo conocido como set de patch-clamp que permite realizar de manera sencilla registros electrofisiológicos (Fig. 14).

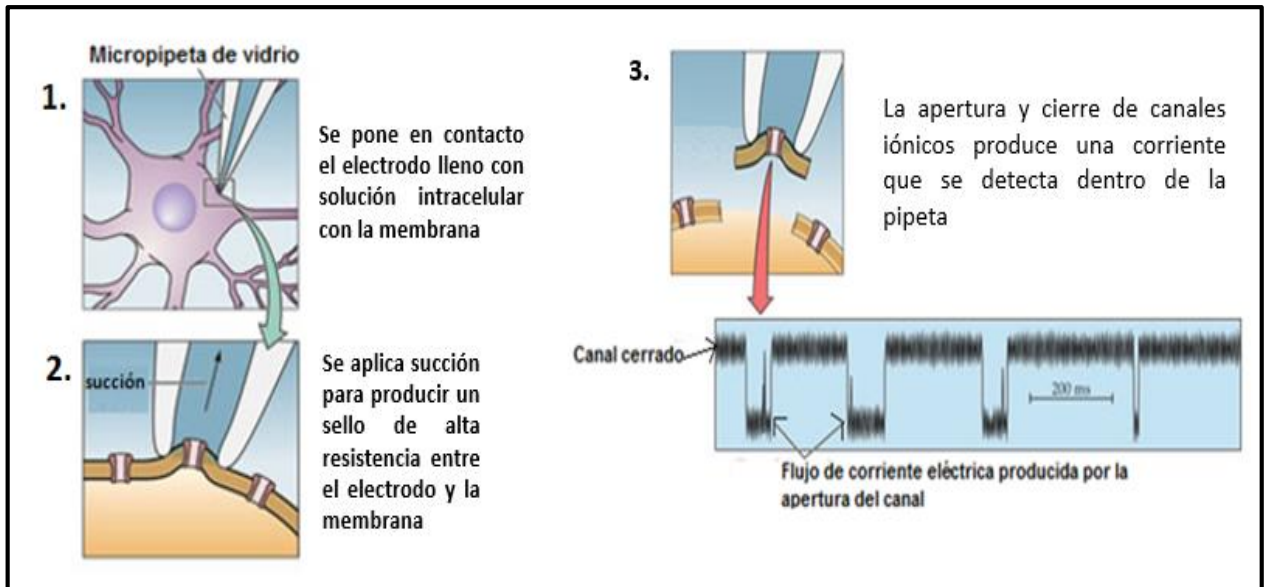


Figura 14. Técnica de patch-clamp, Recuperado de Breedlove & Watson, 2013.

El set de patch clamp se compone básicamente de un sistema de perfusión de solución extracelular e intracelular (L), un electrodo de grabación (A) y un electrodo de referencia (B) conectados al cabezal de un manipulador manual (C) localizado sobre la platina de un microscopio invertido de contraste de fases (E). (Fig. 15) (Kornreich, 2007).

Es importante que el microscopio, se coloque sobre una mesa de aire antivibratoria (F) localizada dentro de una jaula de Faraday (G) que aísla el ruido eléctrico ambiental. (Fig. 15) (Kornreich, 2007).

A su vez, el set se compone de macromanipuladores (D) y un micromanipulador (K) que permite aproximar de manera manual el electrodo de referencia a la célula. Por otro lado, las células fijas se colocan en la cámara de registro para visualizarse en el microscopio. (Fig. 15) (Kornreich, 2007).

Una vez que se hace parche de alta resistencia, y se perfunde la célula con la solución de trabajo se procede a registrar la señal analógica que pasa a un amplificador de corriente (I), a un osciloscopio (J) y a un convertidor analógico digital, para después ser observada en un ordenador (H). (Fig. 15) (Kornreich, 2007).

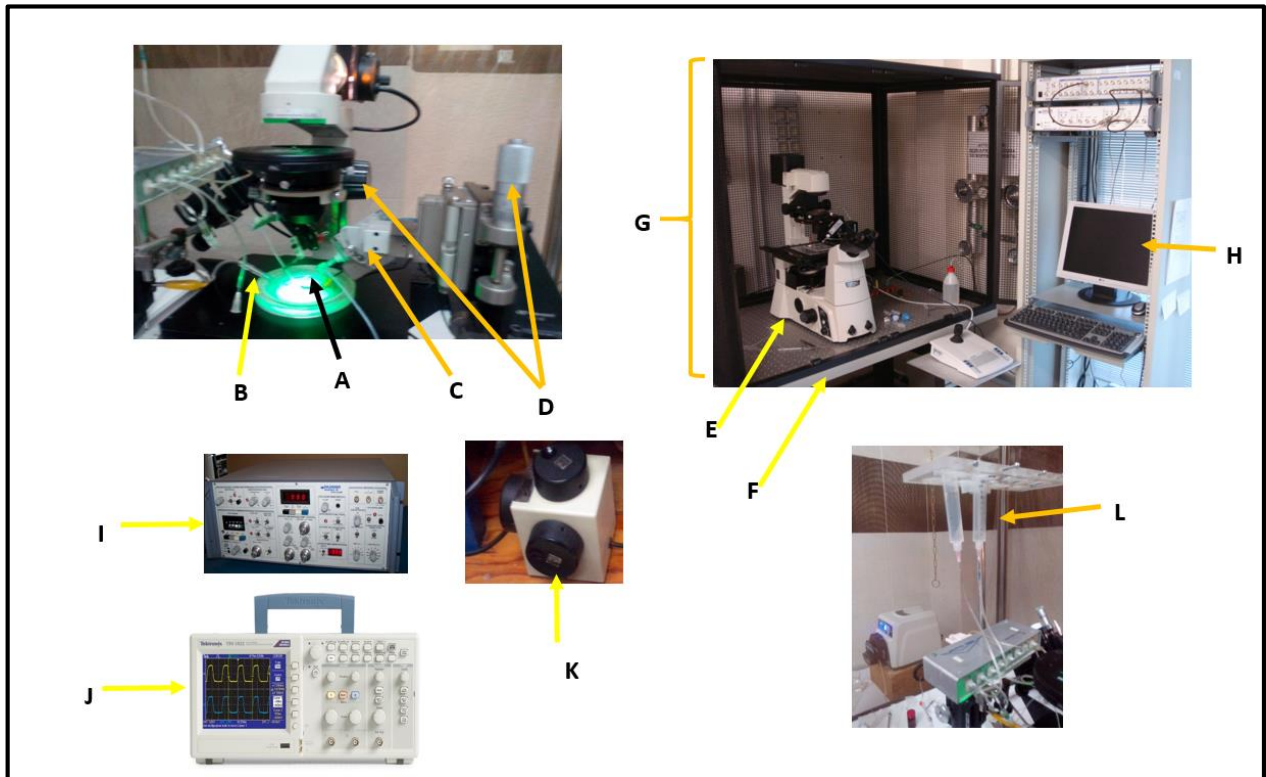


Figura 15. Componentes básicos de un set de patch-clamp experimental. A. electrodo de grabación, B. electrodo de referencia, C. cabezal de manipulador manual, D. macromanipuladores, E. microscopio invertido de contraste de fases, F. mesa antivibratoria, G. jaula de Faraday, H. ordenador, I. amplificador de corriente, J. osciloscopio, K. micromanipulador, L. sistema de perfusión.

2.2.1.1 Patch-clamp, modalidad célula completa.

Existen diversas variantes de la técnica básica para registro de potencial de membrana antes descrita. Una de estas variantes es la denominada configuración de célula completa o *whole-cell*.

Para realizar esta técnica es necesario lograr el sello de alta resistencia y romper la membrana que está por debajo del electrodo para provocar contacto directo con el

citoplasma. De esta manera, la solución de registro funge como medio interno de la célula y permite aislar corrientes determinadas como se observa en la figura 16.

Una ventaja que ofrece esta modalidad es el registro de corrientes a través de múltiples canales al mismo tiempo, la membrana presenta una menor resistencia y en consecuencia mayor acceso eléctrico al interior de la célula.

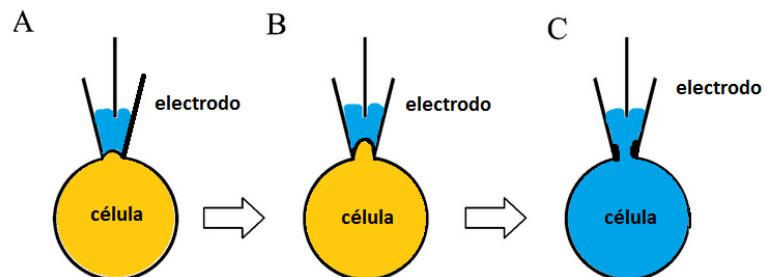


Figura 16. Representación esquemática de la técnica patch-clamp célula completa o *whole cell*. A. Sello de alta resistencia entre el electrodo y la membrana. B. Succión aplicada sobre la membrana de la célula que genera tensión de ruptura. C. Ruptura de la membrana y registro de la corriente. En azul se representa la solución intracelular de registro.

2.3 Canalopatías.

Los canales iónicos son proteínas que pueden perder o cambiar su estructura y función si ocurre alguna alteración en su secuencia de aminoácidos. Estas anomalías en los canales iónicos son denominadas *canalopatías*, su origen puede ser genético o autoinmune, y son causa de una gran diversidad de enfermedades (Raja Rayan & Hanna, 2010).

Las canalopatías de origen genético se producen por mutaciones en la región que codifica para un canal iónico determinado. Estas mutaciones producen cadenas polipeptídicas que no se procesan de manera correcta y no se incorporan a la membrana, o al acoplarse dan lugar a canales iónicos no funcionales. Es posible también que ocurran mutaciones en la región promotora del gen que codifica para un canal iónico, lo cual produce subexpresión o sobreexpresión del canal. Se pueden

producir además mutaciones en genes que codifican para moléculas reguladoras de los canales iónicos ya sea por defectos en su estructura o en las rutas que conducen a su producción (Martínez Rosas, 2004).

Por otro lado, las enfermedades autoinmunes pueden ser causantes de canalopatías, cuando los anticuerpos disminuyen o aumentan la función del canal, tal es el caso de la neuromiotonía que se origina por la producción de anticuerpos contra canal de potasio Kv 1.1, que produce hiperexcitabilidad en los nervios y actividad muscular continua (Raja Rayan & Hanna, 2010).

Hasta hace setenta años se desconocía que el origen de algunas enfermedades se debe a canalopatías. Sin embargo, en la actualidad se conoce una gran diversidad de patologías asociadas al mal funcionamiento de canales iónicos en diversos tejidos. Por ejemplo, a nivel de músculo esquelético, las mutaciones en los canales de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} activados por voltaje y en canal de acetilcolina conducen a desórdenes como parálisis hiper e hipocalémicas, miotonías, e hipertermia maligna. Se sabe que las alteraciones en canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en las neuronas son la causa de epilepsias, ataxia, migraña hemipléjica, Alzheimer, Parkinson y esquizofrenia. También se ha descubierto que algunas patologías renales, problemas a nivel endocrino como la hipoglucemia hiperinsulinémica infantil y la fibrosis cística están vinculadas a mutaciones en los canales iónicos. Se ha reportado que diversas mutaciones en los canales de Na^+ y K^+ son la principal causa de desórdenes en músculo cardíaco, como arritmias e hipertensión (Jentsch, Hübner, & Fuhrmann, 2004).

A partir de la descripción de las canalopatías como causa de enfermedades, se produjo un avance importante en el desarrollo de su diagnóstico y tratamiento. Sin embargo, hoy en día gran parte de las enfermedades de origen canalopático son tratadas de manera paliativa, y en muchas ocasiones los pacientes no responden favorablemente al tratamiento (Nadeem & Hussain, 2010).

Sumando a lo anterior, están los efectos adversos asociados al uso de fármacos convencionales tales como: alergias, ansiedad, alteraciones visuales, insomnio, nefrolitiasis, confusión, falta de apetito, cefaleas, vómito, mareos y uno de los más agresivos, la dependencia (Flórez, 2003).

El paciente que sufre la enfermedad, no logra tener una buena calidad de vida, y se ve mermado en su actividad productiva y económica. Ante esta problemática, es necesario generar alternativas de solución, mediante la creación de terapias innovadoras y el descubrimiento de nuevas moléculas con potencial farmacológico que permitan la tratamiento eficaz y prevención de enfermedades (Blanckenberg, 2014).

2.4 Aplicación de la biotecnología marina en la terapéutica.

La biotecnología marina comprende el uso de organismos marinos, sus genomas o sus metabolitos para la creación o modificación de productos destinados a usos específicos en diferentes sectores de la industria (Querellou et al., 2010).

Los organismos marinos han evolucionado para adaptarse al ambiente adquiriendo diversos mecanismos de defensa, ataque y comunicación que permiten su supervivencia. Entre estas estrategias evolutivas se encuentran una inmensa variedad de metabolitos con potente actividad biológica que pueden ser aplicados en la generación de nuevos medicamentos (Molinski, Dalisay, Lievens, & Saludes, 2009).

Un caso especial de la aplicación de la biotecnología marina en la medicina, es el estudio de la actividad biológica que tienen las toxinas de los caracoles marinos del género *Conus* para el desarrollo de nuevas terapias (Baldomero M. Olivera, 2002).

2.4.1 Género *Conus*

Los caracoles marinos del género *Conus* se encuentran ampliamente distribuidos en todo el mundo. Se conocen de 500 a 700 especies que se caracterizan por poseer una amplia gama de péptidos bioactivos y una gran belleza en sus conchas. (Figura 17) (Kumar, Kumar, & Umamaheswari, 2015).

El género *Conus* es depredador, un grupo de especies se alimenta de gusanos, otro grupo de peces y finalmente está el grupo que se alimenta de moluscos o una combinación de los tres (Baldomero M. Olivera, 2002).

Una característica importante de este género de caracoles marinos es su aparato venenoso especializado, que está formado por tres componentes: el **conducto** donde se produce el veneno y es empujado por el **bulbo** hasta un saco **radular** donde se almacenan los dientes en forma de arpón que permiten inyectar potentes venenos que paralizan los sistemas nervioso y muscular de sus presas, que son ingeridas mediante una estructura larga y flexible conocida como probóscide (Fig.18) (Terlau & Olivera, 2004).



Figura 17. Diversidad morfológica de algunas conchas de caracoles del género *Conus*. (Bulaj & Olivera, 2008)

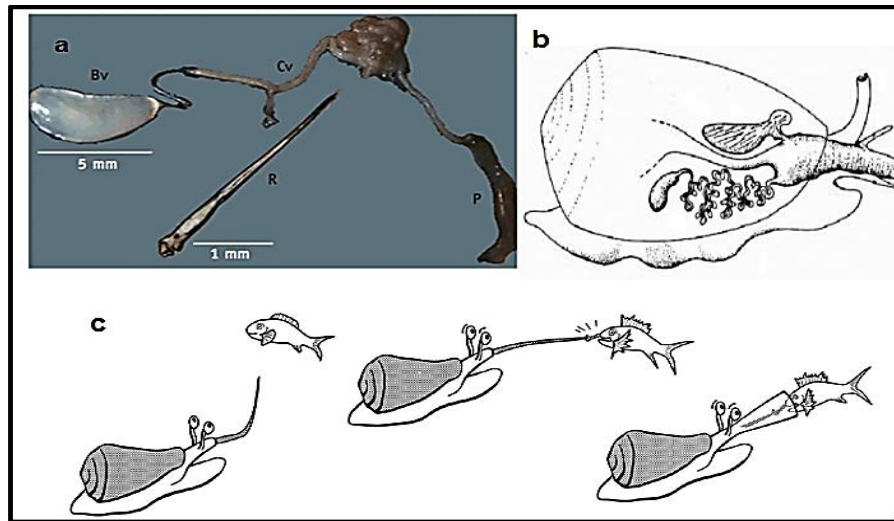


Figura 18. a. Fotografías tomadas del aparato venenoso de *Conus californicus* y el diente radular de *Conus princeps*. Bv, bulbo venenoso; Cv conducto venenoso; P probóscide; R; diente radular en forma de arpón. b. Aparato venoso del género *Conus* c. Representación del mecanismo de captura una especie piscívora. (B. M. Olivera, 1997)

2.4.1.1 *Conus princeps*, especie de interés.

Conus princeps es una especie vermívora que se alimenta de poliquetos. Se distribuye desde el Golfo de California hasta el Ecuador y habita en las salientes rocosas, con mayor frecuencia en pozas de marea y sobre sustratos de coral. Su talla oscila entre 2 y 5 centímetros de longitud total (Flores-Garza *et al.*, 2014).

La concha de esta especie presenta un color anaranjado con líneas axiales onduladas color marrón oscuro que se extienden hacia la espira, exhibe un periostraco grueso y oscuro con cerdas en forma de líneas espirales. Se distingue también por poseer dientes en forma de sierra, de morfología recta, con diámetro uniforme a lo largo de los bordes. (Nybakken, 1970).



Figura 19. Fotografía de la concha y diente radular de caracoles marinos *Conus princeps*. (Recuperada de www.coneshell.net, colección de Giancarlo Paganelli)

Del total de las conotoxinas caracterizadas pocas se han extraído de *Conus princeps*, por lo que se sugiere explorar el veneno de esta especie para determinar sus blancos moleculares (Tenorio, 2013).

2.4.1.2 Estructura química de los péptidos del género *Conus*.

Se sabe que el veneno de *Conus* puede estar constituido por aproximadamente 50 a 300 pequeñas proteínas (péptidos) diferentes, a las que se les denomina conotoxinas o conopéptidos, muchos de los cuales están formados por entre 10 y 40 aminoácidos aproximadamente (Armishaw & Alewood, 2005).

Es importante señalar que los péptidos del género *Conus* contienen residuos cisteína a lo largo de su estructura primaria, esto posibilita la formación de enlaces disulfuro que confieren alta estabilidad a la molécula. Además también pueden contener α -hélices, hojas β y β -giros (Thapa, Espiritu, Cabalteja, & Bingham, 2014).

Otra característica importante de las péptidos del género *Conus* es la presencia de complementos de aminoácidos con modificaciones postraduccionales tales como

amidaciones en la región carboxilo terminal, hidroxilación, carboxilación, bromación, glucosilación y sulfatación (Baldomero M Olivera & Cruz, 2001).

Una ventaja importante de las conotoxinas en comparación de otros venenos de arañas, serpientes o anémonas es su bajo peso molecular y estabilidad estructural, que facilita su síntesis química. La figura 20 muestra la estructura química y secuencia de la ω -conotoxina MVIIA de *Conus magus*. Se trata de un fármaco utilizado para el dolor crónico aprobado por la FDA y comercializado con el nombre de Prialt® (Olivera, 2006).

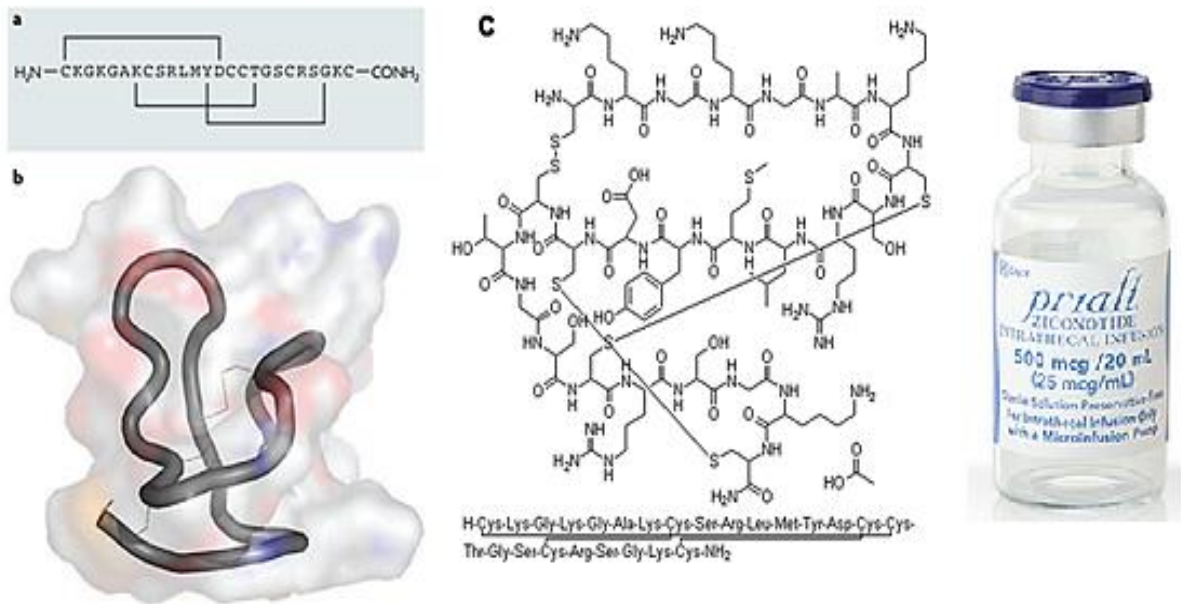


Figura 20. ω -Conotoxina MVIIA. a. Secuencia de aminoácidos del péptido (Ziconotide/Prialt®; Elan Pharmaceuticals). b. Estructura tridimensional de la conotoxina sintética. c. Secuencia de aminoácidos de ω -Conotoxina MVIIA. Modificado de Molinski et al., 2009

Los componentes del veneno de *Conus* se clasifican de acuerdo a la presencia de enlaces disulfuro en su molécula. De esta manera, se denominan conotoxinas a aquellos péptidos que exhiben múltiples enlaces disulfuro, y conopéptidos a los que carecen de enlaces disulfuro o presentan un residuo cisteína en su estructura química (Terlau & Olivera, 2004).

A su vez, las conotoxinas se clasifican en 27 superfamilias de acuerdo a la homología en su secuencia de aminoácidos, patrón de cisteínas y su actividad fisiológica (Norton & Olivera, 2006).

2.4.1.3 Blancos moleculares de las conotoxinas.

Se ha descrito que los componentes del veneno de *Conus* actúan sobre receptores acoplados a proteínas G y transportadores de neurotransmisores, incluso algunos pueden tener actividad enzimática. Sin embargo, la mayor parte de las conotoxinas estudiadas tiene como blanco molecular canales iónicos dependientes de voltaje o ligando (Lewis, 2009).

El efecto farmacológico de las conotoxinas puede ser variado según el receptor al que se unan, lo que determina a qué familia farmacológica pertenecen como se describe en la tabla 3.

Hasta el momento, se han descrito las propiedades farmacológicas de aproximadamente 0.1% de los péptidos de *Conus* descubiertos y se ha encontrado que podrían tener un potencial farmacéutico en tratamiento de dolor, enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes, trastornos cardiacos y neuromusculares, así como terapia de cáncer y diabetes (Bingham, Mitsunaga, & Bergeron, 2010).

Tabla 3. Actividad farmacológica de conotoxinas agrupadas por familias. Modificado de Thapa et al., 2014

FAMILIA	MECANISMO DE ACCIÓN	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA
α (alpha)	Inhibidor del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR)	Antinociceptivo
γ (gamma)	Incrementa corrientes catiónicas entrantes en células de marcapaso.	No descrita
δ (delta)	Agonista de canales de Na ⁺ activados por voltaje.	Antinociceptivo
ξ (epsilon)	Actúa sobre receptores acoplados a proteínas G. Reduce el flujo presináptico de Ca ²⁺	No descrito
I (iota)	Agonista de canales de Na ⁺ activados por voltaje (no afecta la inactivación del canal)	No descrito
κ (kappa)	Bloqueador de canales de K ⁺ activados por voltaje	Tratamiento de enfermedades del corazón / anticancerígeno
μ (mu)	Bloqueador de canales de Na ⁺ activados por voltaje	Antinociceptivo
ρ (rho)	Inhibidor del adrenoreceptor α -1.	Modulación de vasodilatación
σ (sigma)	Inactivador canales iónicos de serotonina	No descrito
T (tau)	Activador del receptor sst3 de somatostatina	No descrito
χ (chi)	Inhibidor del transporte neuronal de noradrenalina	Antinociceptivo. Tratamiento de desorden cardiovascular e incontinencia urinaria
ω (omega)	Bloqueador canales de calcio dependientes de voltaje	Antinociceptivo
Conantokina	Antagonista del receptor N-metil-aspartato	Antinociceptivo / Anticonvulsivante
Conopresina	Agonista del receptor de vasopresina	Tratamiento de desórdenes cardiovasculares
Contulakina	Agonista del receptor de neurotensina	Antinociceptivo

2.4.1.4 Actividad biológica de gamma conotoxinas.

La superfamilia O de conotoxinas incluye diversos péptidos que presentan tres enlaces disulfuro en su estructura, pero diferentes blancos farmacológicos (M. Fainzilber, Gordon, Hasson, Spira, & Zlotkin, 1991).

Por otro lado, las conotoxinas de la superfamilia O se caracterizan por tener seis residuos de cisteína conectados el primero con el cuarto, el segundo con el quinto y el tercero con el sexto (I-IV,II-V,III-VI) (M. Fainzilber et al., 1991).

Entre las conotoxinas pertenecientes a la superfamilia O, la familia γ ha sido poco estudiada. Se han caracterizado y reportado dos gamma- conotoxinas que presentan dos residuos de γ -carboxiglutamato en su estructura que mostraron un perfil excitatorio, la conotoxina TxVIIA aislada de *Conus textile neovicarus*, y la conotoxina PnVIIA de *Conus pennaceus* (M. Fainzilber et al., 1991).

2.4.1.4.1 Gamma conotoxina TxVIIA.

Fainzilber et al. 1991, reportaron la caracterización y evaluación de la actividad fisiológica de la conotoxina gamma-TxVIIA aislada del caracol marino *Conus textile neovicarus* colectado en el mar rojo. Se describe que esta toxina de peso molecular 3,088.9 Daltons está formada por 25 aminoácidos, de los cuales seis son cisteínas, presenta dos residuos gama carboxilados en la posición 9 y 13, además de carga negativa neta (-4).

Conotoxina γ -TxVIIA **CGGYSTYCrVDSrCCSDNCVRSYCTLF-NH₂**

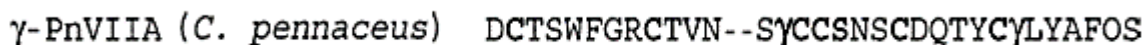
Se evaluó el efecto electrofisiológico de la conotoxina γ -TxVIIA en neuronas aisladas de ganglios del caracol marino de género *Aplysia*, midiendo el potencial de acción en presencia de la toxina. Se observó que γ -TxVIIA induce despolarización de la membrana. Sin embargo, no se presenta incremento en la duración del potencial de acción (M. Fainzilber et al., 1991)

Por otro lado, se observó que γ -TxVIIA administrada en una dosis 8.6 pmol/100mg de masa corporal, indujo parálisis en caracoles (M. Fainzilber et al., 1991).

No se observó ningún efecto tóxico en ensayos con ratones al ser administrada vía intracerebral a dosis de 15-20 nmol/kg. (M. Fainzilber *et al.*, 1991)

2.4.1.4.2 Gamma conotoxina PnVIIA

En 1998, Fainzilber *et al.*, reportaron la caracterización de una segunda gamma conotoxina denominada PnVIIA, aislada de *Conus pennaceus*. Esta toxina tiene una masa molecular de 3718.4 Daltons y en su estructura química presenta una secuencia de 32 aminoácidos, seis cisteínas y dos residuos gamma carboxilados característicos de las gamma conotoxinas. (Fainzilber *et al.*, 1998)



Por otro lado, se observa que presenta similitud en su estructura química comparada con la toxina γ -TxVIIA, además de poseer carga negativa neta como se describe en la figura 21. (Fainzilber *et al.*, 1998)

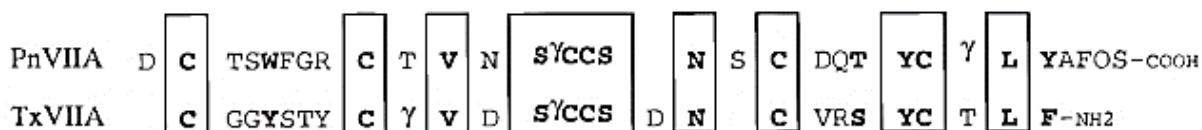


Figura 21 Secuencia de aminoácidos de la conotoxina γ -PnVIIA comparada con γ -TxVIIA, la similitud entre las secuencias se encuentran marcadas con rectángulos. (Michael Fainzilber *et al.*, 1998)

Al ser separadas por cromatografía de líquidos de alta resolución ambas eluyen casi al mismo tiempo bajo las mismas condiciones de separación. (Fainzilber *et al.*, 1998)

Por otro lado, se evaluó la actividad biológica de γ -PnVIIA administrada a una dosis de 0.5 pmol/mg en moluscos del género *Patella*, observando relajación del músculo del pie. También se realizaron ensayos en moluscos bivalvos para evaluar la toxicidad de γ -

-PnVIIA, la toxina presentó un efecto paralizante al administrarse en una DE_{50} de 63.2 pmol/100mg. (Fainzilber et al., 1998)

Para conocer la actividad de γ -PnVIIA en canales iónicos se realizaron ensayos electrofisiológicos en neuronas caudodorsales del molusco *Lymanea stanginalis*. La toxina mostró actividad despolarizante, incrementando el efecto al aumentar la dosis, como se describe en la figura 22. Cabe señalar que al evaluar el efecto aplicando una concentración 10 μ M se produjo una mayor actividad excitatoria en las neuronas. (Fainzilber et al., 1998)

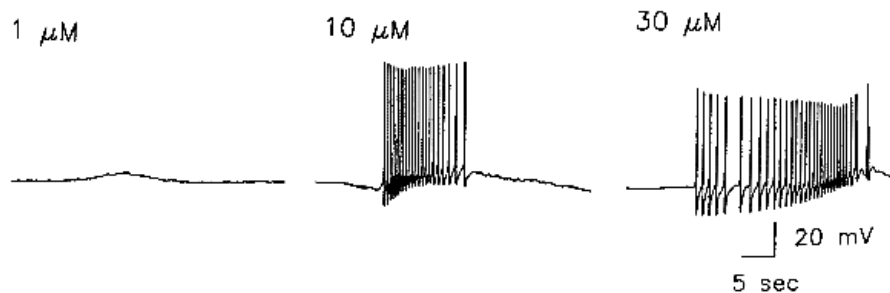


Figura 22 Efecto de γ -PnVIIA en neuronas caudodorsales de *Lymanea stanginalis* (n=5). Se observa un incremento en la excitabilidad de la membrana al aumentar la dosis y un aumento en las espigas despolarizantes.

Se observó también que la célula presentó periodos de reposo largos después de hiperpolarización al aumentar el tiempo de aplicación de la toxina. De acuerdo a lo anterior, se determinó que la toxina actúa inicialmente como un agonista o activador y posteriormente como antagonista o inhibidor de canales iónicos que conducen a efectos excitatorios en la membrana. (Fainzilber et al., 1998)

Posteriormente, se realizaron ensayos electrofisiológicos para determinar la identidad de los canales activados por γ -PnVIIA. No se observó efecto significativo de la toxina

en corriente activada por canales de Na^+ ni por canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. (Michael Fainzilber et al., 1998)

Sin embargo, cuando se aplicó un protocolo de rampa lenta de voltaje en células de marcapaso de *Lymanea stangnalis* se observó entrada lenta de iones Na^+ a la célula al aplicar voltajes mayores de -30mV y un bloqueo de la corriente al utilizar iones Cd^{2+} o Ni^{2+} en la solución extracelular de registro. Por otro lado, al adicionar Ca^{2+} en la solución salina extracelular, se observó un incremento en la corriente en un 26% ($n=6$), lo cual indica que los canales activados por $\gamma\text{-PnVIIA}$ son permeables a iones Ca^{2+} como se describe en la figura 23. (Michael Fainzilber et al., 1998)

Se considera a $\gamma\text{-PnVIIA}$ como una conotoxina novel con potencial farmacéutico, por su actividad activadora de corrientes entrantes lentas de iones que están involucradas en enfermedades como algunos tipos de epilepsia, enfermedades del corazón, etc. (Michael Fainzilber et al., 1998)

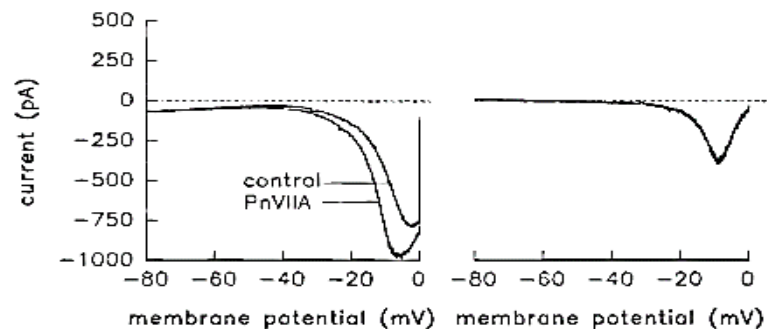


Figura 23. Efecto de $\gamma\text{-PnVIIA}$ $10\mu\text{M}$. A la izquierda se observa una activación de la corriente lenta de cationes a -30mV

2.4.1.4.3 Conotoxina $\alpha 7a$

En 2005, Zugasti-Cruz et al, reportaron la caracterización y evaluaron la actividad biológica de un péptido de 31 aminoácidos extraído del caracol vermívoro del Golfo de México *Conus austini*. (Zugasti-Cruz et al., 2006)

TCKQKGEGCSLDV γ CCSSSCKPGGPLFDFDC,

La secuencia de aminoácidos de esta toxina muestra seis residuos de cisteína, que corresponden por su arreglo a la superfamilia O2, además de presentar dos residuos gama carboxilados y un peso molecular de 3236.16 Da. (Zugasti-Cruz et al., 2006)

De la misma manera, esta toxina presenta similitud en su secuencia de aminoácidos con las conotoxinas γ -PnVIIA y γ -TxVIIA como se observa en la figura 24. (Zugasti-Cruz et al., 2006)

TxVIIA	CGYSTYCVVD	--SYCCSDNC	-----VRSYCTLF&
γ -PnVIIA	DCTSWFGRCTVN	--SYCCSNSC	-----DQTYCYLYAFOS
$\alpha 7a$	TCKQKGEGCSLD	--VYCCSSSCKPGGPLFDFDC	

Figura 24. Estructura primaria de $\alpha 7a$, γ -PnVIIA y γ -TxVIIA. Se señalan similitudes dentro de rectángulos.

La conotoxina $\alpha 7a$ se administró vía intramuscular a una dosis de 1.4pmol/100 mg en caracoles del género *Pomacea paludosa*, mostrando un efecto tóxico y paralizante. En otro ensayo se administró la toxina vía intracraneal a una dosis de 2pmol/100 mg y no se observó efecto significativo. (Zugasti-Cruz et al., 2006)

2.4.1.4.4 Conotoxina $\alpha 7a$

En 2005 Aguilar et al, reportaron la caracterización de una cuarta conotoxina tipo gamma aislada del veneno del caracol vermívoro *Conus delessertii* colectado en Yucatán, México. (Aguilar, López-Vera, Imperial, et al., 2005)

Se determinó la secuencia de los 28 aminoácidos que componen a la toxina α -de7a, siendo evidente el patrón de cisteínas que define a la superfamilia O2, seis cisteínas, dos residuos de gamma-carboxiglutamato distintivos de la familia, así como un residuo de hidroxiprolina. Su peso molecular es de 3170 Da. (Aguilar, López-Vera, Imperial, *et al.*, 2005)

de7a (*C. delessertii*) ACKOKNNLCAIT γ MA γ CCSGFCL γ YRCS

Aún no se ha descrito la actividad biológica de esta toxina, pero se sospecha que tenga una actividad excitatoria debido a las similitudes en su secuencia que presenta respecto a las otras conotoxinas de la familia gamma antes descritas. Figura 25 (Aguilar, López-Vera, Imperial, *et al.*, 2005)

TxVIIA	CGGYSTYCYVD--SYCCSDNC-----VRSYCTLF&
γ -PnVIIA	DCTSWFGRCTVN--SYCCSN γ SC-----DQTYCYLYAFOS
de7a	ACKOKNNLCAIT γ MA γ CCSGFC-----LIYRCS&
as7a	TCKQKGEGCSLD--VYCCSS γ CKPGGPLFD γ DC

Figura 25. Estructura primaria de las toxinas de la familia gamma reportadas. Se observa que las cuatro conotoxinas presentan similitud en el contenido de seis cisteínas y la secuencia - γ CCS-. (Morales-González *et al.*, 2015)

Capítulo 3.

Hipótesis

La conotoxina γ -P_{IV} aislada del veneno de *Conus princeps* tiene actividad sobre canales iónicos de Ca²⁺, Na⁺, K⁺ dependientes de voltaje y es agonista de canales iónicos sensibles a la concentración de protones (ASIC) expresados en células de ganglio dorsal de rata.

Capítulo 4.

Objetivos

Objetivo general

Determinar electrofisiológicamente la actividad de la conotoxina γ -PiVIA en canales iónicos dependientes de voltaje, y en canales sensibles a la concentración de protones (ASIC) expresados en células de ganglio dorsal de rata.

Objetivos particulares.

- Determinar la actividad de la γ -PiVIA sobre corriente de Ca^{2+} activada por voltaje mediante técnica *whole-cell* patch clamp en células de ganglio dorsal de rata.
- Determinar la actividad de la γ -PiVIA sobre corriente de Na^{+} activada por voltaje mediante técnica *whole-cell* patch clamp en células de ganglio dorsal de rata.
- Determinar la actividad de la γ -PiVIA sobre corriente de K^{+} activada por voltaje mediante técnica *whole-cell* patch clamp en células de ganglio dorsal de rata.
- Determinar la actividad de la γ -PiVIA sobre corriente activada por pH ácido (ASIC) mediante técnica *whole-cell* patch clamp en células de ganglio dorsal de rata.

Capítulo 5.

Metodología

5.1 Colecta de organismos *C. princeps*

Los caracoles de la especie *C. princeps* se colectaron de acuerdo al color y morfología de su concha cerca de la zona de arrecife y rocas, entre 1 y 5 m de profundidad en la bahía de Estacahuite, ubicada a 96°28'48 O y 15°40'03 N, en el municipio de San Pedro Pochutla, Oaxaca, México. La hora y fecha de la colecta se determinó consultando un calendario de mareas.

Los ejemplares se trasladaron al laboratorio de Investigación de la Universidad del Mar campus Puerto Ángel, donde se congelaron a -70°C, para su disección, liofilización y almacenamiento.

5.2 Obtención de veneno total.

La extracción de veneno total se realizó mediante la disección de los organismos. Se extrajo el aparato venenoso y se separó el ducto venenoso para ser macerado con un homogeneizador manual (Weathon) en 1 ml de solución amortiguadora C (H₂O 60% /ACN40% / TFA 0.1%). Se utilizó este volumen por cada 20 organismos. La muestra se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C, dos veces durante 10 minutos, recolectando el sobrenadante que se congeló a -70 °C, para su liofilización y almacenamiento.

5.3 Cuantificación de veneno por peso seco.

Se estimó la cantidad de extracto total obtenido por medio de diferencia de peso seco. Se determinó el peso de un tubo estéril previamente secado a 37°C, en este tubo se colocó el veneno para ser liofilizado (Liofilizador Labconco). Una vez realizada la liofilización, el tubo se pesó nuevamente. La diferencia entre el peso de los tubos se estimó como peso del homogeneizado.

5.4 Fraccionamiento del veneno total de *C. princeps*

Se realizó la separación del veneno de acuerdo al tiempo de retención de sus componentes, por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP). Se empleó un cromatógrafo Agilent 110 (Agilent Technologies). Se utilizó una columna cromatográfica Zorbax C18 214TPS54 (Zorbax, Agilent Technologies), 4.5 x 250 mm, 300 Å), con precolumna Zorbax C18 (4.6 x 12.5 mm, 5µm). Los péptidos de veneno total se detectaron mediante su absorbancia de radiación UV a una longitud de onda de 230 nm

Se eluyó durante 65 minutos a temperatura ambiente una muestra de 6 mg de veneno disuelta en 200 µl de solución A (H₂O 99.98%/TFA 0.12%) . Se inyectaron volúmenes de 200 µl de muestra resuspendida para realizar la separación. La elución se realizó a temperatura ambiente y flujo de 1ml/min. El método de separación utilizado fue por gradiente creciente de solución como se describe a continuación:

- a) 0-5 min: 100% de solución A (0% de solución B)
- b) 5-65 min: gradiente lineal de 0-60% de solución B

El veneno total eluido fue colectado en fracciones durante periodos de 5 minutos. Posteriormente, las fracciones obtenidas se congelaron a -81°C para su liofilización y almacenamiento a 4°C.

5.5 Repurificación de la toxina α -PiVIA

Se denominó Cpp30 (α -PiVIA) al pico eluido en el minuto 30, separado y repurificado de la fracción 4, correspondiente a los péptidos eluidos en el tiempo de retención (30-35 min). Se utilizó un gradiente lineal de 27-32% de solución B (ACN 99.98% / TFA 0.12%). La conotoxina se congeló a -81°C para su liofilización y almacenamiento a 4°C. La cantidad de toxina obtenida se cuantificó mediante la lectura de su absorbancia de radiación UV a una longitud de onda de 230 nm, empleando un Nanodrop ND100 (LabTech, Wilmington, DE, USA)

5.6 Determinación de la masa molecular de α -PiVIA

La determinación de la masa molecular de la toxina se realizó en laboratorio de Biotoxinas de la Unidad de Innovación Biomédica del CICESE, empleando un espectrómetro de masas Q-TOF Agilent (Agilent Technologies).

5.7 Secuenciación de α -PiVIA

La determinación de estructura primaria de la toxina α -PiVIA se realizó mediante espectrometría de masas utilizando un espectrómetro de masas Q-TOF Agilent (Agilent Technologies). La confirmación de los 11 aminoácidos N-terminales y la detección de la hidroxiprolina en la posición cuatro se realizó por degradación automática Edman en un secuenciador automático de proteínas (LF-3400D TriCart, Beckman Coulter, Fullerton, USA).

5.8 Análisis electrofisiológico.

5.8.1 Material biológico.

Para los ensayos electrofisiológicos se utilizaron ratas neonatas Long-Evans de la cepa CII de 7 a 10 días de edad. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a la "Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio", emitido por la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos y el "Reglamento de la Ley General de Salud" de la Secretaría de Salud en México.

5.8.2 Cultivo de neuronas de ganglio dorsal de rata.

La disección del ganglio dorsal se realizó en una campana de flujo laminar y el instrumental utilizado se esterilizó con luz ultravioleta.

Para obtener los ganglios de la raíz dorsal se sacrificó a la rata por decapitación y se realizó un corte a través de la columna vertebral para exponer el tejido de la médula espinal.

Se retiró el tejido correspondiente a la médula, exponiendo los ganglios dorsales ubicados dentro de los canales vertebrales. Se identificaron los ganglios como nódulos blanquecinos ubicados en las raíces, y se cortaron separando los axones. Los ganglios

dorsales extraídos se colocaron en una caja Petri (Corning) con medio de cultivo L-15 al 100% (Invitrogen, Carlsbad, CA). (ver figura 26)

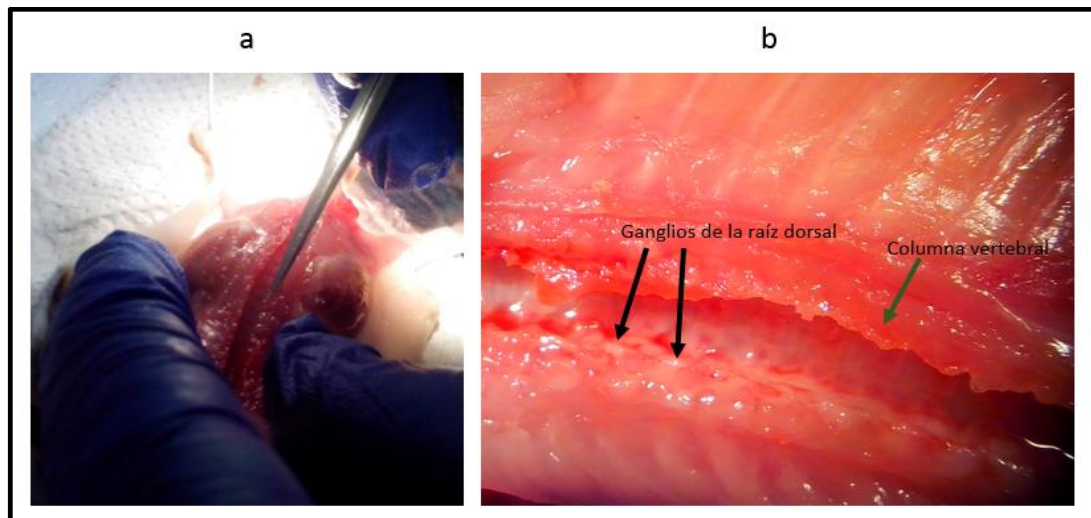


Figura 26. Disección de ganglios de la raíz dorsal de rata. a) Corte de la columna vertebral. b) Ganglios en la raíz posterior de la médula espinal que presentan una coloración blanquecina y un tamaño de unos 26 μm de diámetro.

Posteriormente, los ganglios se colocaron en medio de cultivo Leivobitz L-15 al 100 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) adicionado con tripsina 0.125 % y colagenasa 0.125 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), y se incubaron por 30 minutos a 37°C para promover la desintegración del tejido y la liberación de las neuronas.

Después del tratamiento con enzimas, los ganglios se disociaron mecánicamente con una pipeta Pasteur y se lavaron tres veces con medio L-15 al 100 % estéril (Invitrogen, Carlsbad, CA), realizando centrifugaciones de 15000 rpm a temperatura ambiente durante dos minutos, retirando el sobrenadante y reemplazando con medio L-15 adicionado con enzimas.

Las células obtenidas se colocaron en cajas de cultivo de 35 mm (Corning, Corning NY) que contenían 4 cubreobjetos de vidrio de 10-12 mm, cubiertos con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) y con medio de cultivo L-15 pH=7.4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) adicionado con 3.77 g/l HEPES (Sigma-Aldrich), 1.32 g/l NaHCO_3 (Merck, Naucalpan, México), 1.32

g/l, penicilina 100 U/ml, 2,5 mg/ml (Lakeside, Toluca, México), fungizona, y suplementado con suero fetal bovino (SBF) al 10%. (Ambos de Invitrogen Carlsbad, CA)

Las células se incubaron de 4-6 horas a 37°, en atmósfera humidificada (95 % aire, 5 % CO₂) dentro de una estufa de incubación con camisa de agua, y control de CO₂ de alta precisión (Nuair, Plymouth, MN) para permitir a las células adherirse a los cubreobjetos.

5.8.3 Registro electrofisiológico en GRD's.

Se colocó un cubreobjetos con células en la cámara de perfusión de un microscopio invertido con iluminación de contraste de fases (TMS, Nikon Co. Tokio, Japón). Todos los registros de corriente se realizaron a temperatura ambiente (23-25 °C) en configuración de célula completa (*whole cell* patch clamp). Los electrodos de registro se elaboraron a partir de capilares de borosilicato de 1.2 mm de diámetro (TW120-3; WPI Sarasota, FL) utilizando un estirador horizontal Flaming Brown (P-97 Sutter Instruments Company).

Para establecer el parche, se llenó un electrodo con solución intracelular y se procedió a formar un sello de alta resistencia (mayor a 1 GΩ) aproximando el electrodo y la célula con ayuda de los manipuladores del microscopio y posteriormente aplicando ligera succión mecánica para romper la membrana (Figura 27). Para todos los ensayos sólo se utilizaron capilares que tuvieron resistencias entre 2.5 y 3.5 MΩ.



Figura 27. Técnica para lograr el parche de alta resistencia en electrofisiología. a) Electrodo aproximándose a la célula. b) Succión para lograr sellar la célula con el electrodo. c) Formando sello de alta resistencia.

Las células se perfundieron en la cámara de registro con solución extracelular (composición de acuerdo a la corriente aislada) empleando una bomba peristáltica (Masterflex, L/S Easy-Load II, Cole Parmer, Vernon Hills, IL).

En los ensayos referentes a la evaluación de la actividad de la toxina en canales de Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} activados por voltaje se aplicó la toxina y la solución extracelular empleando un sistema de microeyección por presión (BAS, West Lafayette, IN), que mantuvo microperfundida la célula con un flujo de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

En los registros de corriente ASIC la toxina se aplicó utilizando un sistema de perfusión de cambio rápido (SF-77B, Warner Inst., Hamden, CT).

En todos los ensayos el registro de las corrientes se realizó usando un amplificador de fijación de voltaje Axopatch 1D (Molecular Devices, Union City, CA). Las señales de comando de pulso y muestreo de datos se generaron mediante una tarjeta de conversión analógica digital de 16 bits (Digidata 1320, Molecular Devices), controlada por el software pClamp 9.2 (Axon Instruments, Molecular Devices).

En todos los experimentos, una vez abierta la célula, se compensó electrónicamente su capacitancia y la resistencia en serie ($\approx 80\%$). Los registros de corrientes iónicas se filtraron a 5 KHz.

Durante todos los experimentos, se monitoreó de manera continua la resistencia de entrada y la capacitancia de la membrana, con la finalidad de tener condiciones de registro estables. Los electrodos tuvieron por lo general una resistencia de 1.5 a 2.5 $\text{M}\Omega$.

5.8.4 Preparación de toxina.

Se prepararon dos soluciones de toxina a diferente concentración para ser evaluadas:

- a) Solución de α -P₁VIIA (3 μM). Se preparó una solución stock de concentración 100 μM , disolviendo toxina liofilizada en agua desionizada. A partir de la solución Stock se realizó una dilución, aforando con solución extracelular.

- b) Solución de α -PiVIIA (10 μ M). Se preparó una solución stock de concentración 100 μ M, disolviendo toxina liofilizada en agua desionizada. A partir de la solución Stock se realizó una dilución aforando con solución extracelular.

5.8.5 Evaluación del efecto de α -PiVIIA sobre corriente de Ca^{2+} en GRD's.

Con la finalidad de aislar únicamente la corriente de Ca^{2+} se utilizaron las siguientes soluciones de registro:

Tabla 4. Solución extracelular empleada para el registro de corriente de Ca^{2+} en GRD's.

COMPONENTE	CaCl ₂ (J.T. Baker)	HEPES (Sigma-Aldrich)	CsCl (Sigma-Aldrich)	4-Aminopiridina (Sigma-Aldrich)	Cloruro de tetraetilamonio (Sigma-Aldrich)	Glucosa (J.T. Baker)
Concentración (mM)	1.8	10	5	10	130	10

*La solución se ajustó a un pH=7.4 con HCl. Osmolaridad=289mOsm

- 4-Aminopiridina es un inhibidor de canales de K⁺
- TEA-Cl es un inhibidor de canales de K⁺
- CsCl es inhibidor de la corriente de Na⁺ y K⁺

Tabla 5. Solución intracelular empleada para el registro de corriente de Ca^{2+} en GRD's.

COMPONENTE	CaCl ₂ (J.T. Baker)	HEPES (Sigma-Aldrich)	CsCl (Sigma-Aldrich)	EGTA (Sigma-Aldrich)	Cloruro de tetraetilamonio (Sigma-Aldrich)	Mg-ATP (Sigma-Aldrich)	Na-GTP (Sigma-Aldrich)
Concentración (mM)	0.134	15	130	10	10	2	1

*La solución se ajustó a un pH=7.2 con CsOH. Osmolaridad=297mOsm

- Mg-ATP y Na-GTP sirven como aporte energético para mantener los ciclos celulares
- EGTA es un agente que amortigua la fluctuación de Ca^{2+} intracelular

Para aislar la corriente de Ca^{2+} se sometió a las células a un potencial de mantenimiento de -80 mV y la corriente se activó mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de voltaje.

El protocolo de registro del efecto de $\alpha\text{-PiVIIA}$ en corriente de Ca^{2+} consistió en aplicar rampas de voltaje en un rango de -100 mV a $+100 \text{ mV}$, durante un tiempo de 600 ms .

En todos los experimentos al menos se registraron ocho corrientes de control antes de realizar la aplicación de la toxina, para garantizar que las células presentaran una corriente de Ca^{2+} estable.

El tiempo de aplicación de la toxina fue de 6 segundos aproximadamente, que consistieron en 10 registros del protocolo de rampa de voltaje. Después de aplicar la toxina se realizaron ocho registros correspondientes al lavado de las células con solución extracelular, con la finalidad de evaluar la reversibilidad del efecto. El tiempo transcurrido entre la aplicación de la toxina y lavado fue de 4.8 s aproximadamente, (intervalo entre barridos).

5.8.6 Evaluación de $\alpha\text{-PiVIIA}$ sobre corriente de Na^+ en GRD's.

Para aislar la corriente de Na^+ se aplicaron pulsos despolarizantes de 30 pA para generar potencial de acción con una duración aproximada de 5 a 10 ms , las corrientes se evocaron mediante la aplicación de un pulso de prueba de -10 mV con una duración de 40 ms , partiendo de un potencial de retención de -90 mV .

Para el estudio de los efectos de $\alpha\text{-PiVIIA}$ sobre la corriente de sodio se aplicó un pulso fijo de -10 mV durante 40 ms , partiendo de un potencial de retención de -100 mV .

Se registraron al menos cinco corrientes de control antes de aplicar la toxina, para garantizar que la célula mantuviera una corriente de Na^+ estable.

El tiempo de aplicación de la toxina fue de 3.2 segundos aproximadamente, que consistieron en 10 registros aproximados del protocolo de evaluación del efecto de α -PiVIIA sobre corriente de Na^+ .

Posterior a la aplicación de la toxina, se lavó la célula con solución extracelular para evaluar la reversibilidad del efecto producido, el intervalo transcurrido entre cada registro fue de 8 s.

Las soluciones utilizadas para aislar específicamente la corriente de Na^+ en GRD's y evaluar el efecto de α -PiVIIA se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Soluciones empleadas para la evaluación de α -PiVIIA sobre corriente de Na^+ en GRD's.

Componente	Solución extracelular** Concentración (mM)	Solución intracelular* Concentración (mM)
NaCl (Sigma-Aldrich)	20	10
CaCl₂ (J.T. Baker)	1.8	---
MgCl₂ (Sigma-Aldrich)	1	---
CsCl (Sigma-Aldrich)	---	30
EGTA (Sigma-Aldrich)	---	8
HEPES (Sigma-Aldrich)	10	5
Cloruro de Tetraetilamonio (Sigma-Aldrich)	45	10
CsF (Sigma-Aldrich)	---	100
4-Aminopiridina (Sigma-Aldrich)	10	---
Cloruro de colina (J.T. Baker)	70	---
Na-GTP (Sigma-Aldrich)	---	1
Mg-ATP (Sigma-Aldrich)	---	2
Glucosa (J.T. Baker)	10	---

*La solución intracelular se ajustó a un pH=7.2 con CsOH.

**La solución extracelular se ajustó a un pH=7.4 con HCl.

- CsF es un agente que favorece la formación del sello de alta resistencia

5.8.7 Evaluación del efecto α -PiVIA sobre corriente de K^+ en GRD's.

Se aisló la corriente de potasio mediante la aplicación de un pulso de voltaje de -10mV con una duración de 50 ms, partiendo de un potencial de retención de -90mV.

La evaluación del efecto de α -PiVIA sobre la corriente de potasio se aplicó un pulso fijo de +30 mV durante 1 s, partiendo de un potencial de retención de -90 mV. Se registraron al menos cinco corrientes de control antes de aplicar la toxina, para garantizar que la célula mantuviera una corriente de K^+ estable. El tiempo de aplicación de la toxina fue de 10 segundos aproximadamente, que consistieron en 10 registros del protocolo de evaluación del efecto de α -PiVIA sobre corriente de K^+ . Una vez que se aplicó la toxina, lavó la célula con solución extracelular. El intervalo transcurrido entre cada registro fue de 8 s. A continuación se describe la composición de las soluciones utilizadas para el registro del efecto de α -PiVIA sobre corriente de K^+ en GRD's.

Tabla 7. Soluciones empleadas para la evaluación de α -PiVIA sobre corriente de K^+ en GRD's.

Componente	Solución extracelular** Concentración (mM)	Solución intracelular* Concentración (mM)
KCl (Sigma-Aldrich)	5.4	72.5
CdCl₂ (Sigma-Aldrich)	0.1	---
EGTA (Sigma-Aldrich)	---	10
NMDG (Sigma-Aldrich)	---	72.5
MgCl₂ (Sigma-Aldrich)	1.2	---
CaCl₂ (J.T. Baker)	1.8	0.1
HEPES (Sigma-Aldrich)	10	5
Colina-Cl (Sigma-Aldrich)	140	3
Na-GTP (Sigma-Aldrich)	---	1
Mg-GTP (Sigma-Aldrich)	---	2
Glucosa (J.T. Baker)	10	---

*La solución intracelular se ajustó a un pH=7.2 con KOH.

**La solución extracelular se ajustó a un pH=7.4 con HCl.

- NMDG (N-metil-D glucamina) regula la corriente de K^+ activada por voltaje

-Colina-Cl (Cloruro de colina) bloquea la corriente de entrada de Na^+

5.8.8 Evaluación del efecto α -P_iVIIA sobre corriente ASIC en GRD's.

La corriente total ASIC se aisló mediante un cambio rápido de pH desde 7.4 a 6.1 durante 5 s, abriendo las salidas de un sistema de perfusión de cambio rápido (SF-77B, Warner Instruments, Hamden, CT).

Para cada experimento, se registraron al menos dos corrientes de control antes de aplicar la toxina y dos registros de lavado. Las variables medidas para caracterizar las corrientes ASIC fueron: a) la amplitud máxima de pico (I_{peak}), b) la constante de tiempo, c) la amplitud de corriente al final del pulso de pH ácido y d) el coeficiente de desensibilización.

La toxina se aplicó 20 s antes y durante los 5 s del pulso ácido (aplicación sostenida). Posterior a la aplicación de α -P_iVIIA, se lavó la célula con solución extracelular normal pH=7.4. En todos los ensayos la célula se mantuvo en un potencial fijo de -60mV. El tiempo entre barridos individuales fue de 1 minuto para garantizar la recuperación completa de la célula después de la desensibilización. La composición de las soluciones utilizadas para el registro del efecto de α -P_iVIIA sobre corriente de ASIC en GRD's se describe a continuación.

El cultivo de células de ganglio dorsal de rata y todos los ensayos electrofisiológicos se realizaron en el Laboratorio de Neurofisiología Sensorial en Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Tabla 8. Soluciones empleadas para la evaluación de α -PiVIA sobre corriente de ASIC en GRD's

Composición	*Solución extracelular pH=7.4	Solución extracelular pH=6.1	Solución intracelular normal
	Concentración (mM)	Concentración (mM)	Concentración (mM)
NaCl (Sigma-Aldrich)	140	140	10
KCl (Sigma-Aldrich)	5.4	5.4	125
MES (Sigma-Aldrich)	---	10	---
CaCl₂ (J.T. Baker)	1.8	1.8	0.134
MgCl₂ (Sigma-Aldrich)	1.2	1.2	---
EGTA (Sigma-Aldrich)	---	---	10
HEPES (Sigma-Aldrich)	10	---	5
Na-GTP (Sigma-Aldrich)	---	---	1
Mg-ATP (Sigma-Aldrich)	---	---	2
Glucosa (J.T. Baker)	10	10	---
**Capsazepina (Sigma-Aldrich)	---	10	---

-*La solución extracelular se ajustó a un pH=7.4 con HCl.

-MES (Solución amortiguadora de ácido 2-N-Morfolino-etanosulfónico) mantiene pH=6.1

**Se adiciona capsazepina a la solución para inactivar el receptor TPRV-1 presente en las GRD's.

5.8.9 Análisis de datos

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software Clampfit versión 10.2 (Molecular Devices) y el programa estadístico Sigma Plot 11.0 (Systat, San Jose, CA).. La amplitud de corriente al pico se midió como la corriente máxima para cada rampa de voltaje. Para el análisis comparativo de los valores de la amplitud se aplicó la prueba estadística t de Student, considerando como significativa una $p < 0.05$ y altamente significativa una $p < 0.001$.

Capítulo 6.

Resultados

6.1 Extracción y cuantificación de veneno.

Se colectaron 50 caracoles de la especie *Conus princeps*, de los cuales se obtuvieron 208 mg de veneno total que se separó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa.

Para su fraccionamiento, el veneno total se colectó en 13 fracciones correspondientes a intervalos de tiempo de cinco minutos. De acuerdo a lo reportado en 2012 por Elizalde, J., las 13 fracciones obtenidas se combinaron a fin de obtener un total de 6 fracciones como se muestra en la figura 28.

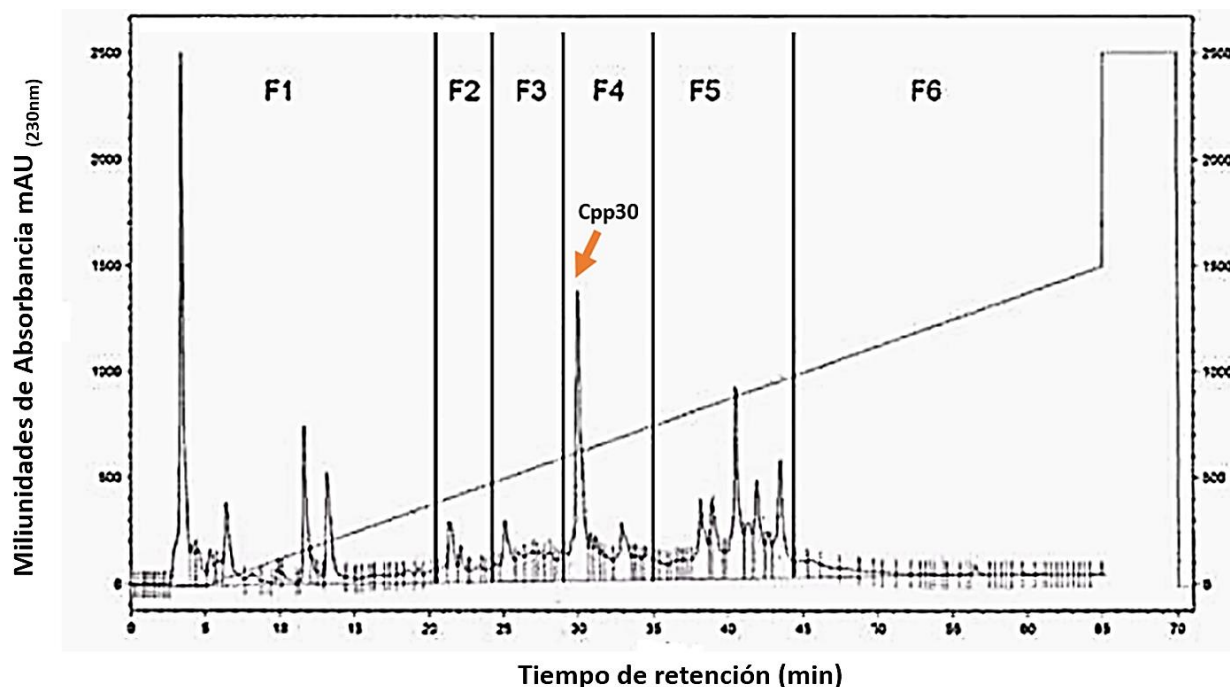


Figura 28. Cromatograma de veneno total de *C. princeps*. Se indican los picos correspondientes a las seis fracciones obtenidas mediante líneas y con una flecha se señala un pico mayoritario obtenido en la fracción cuatro que fue denominado Cpp30.

Al separar las fracciones de veneno total, se observó que en la F4 hay un pico mayoritario en comparación al resto de los picos eluidos en las otras fracciones.

Se decidió repurificar la fracción 4 y obtener el pico puro obtenido en entre el minuto 30 y 33 para caracterizarlo y conocer su actividad biológica. Inicialmente este pico fue denominado Cpp30 debido a que eluye en el minuto 30 y fue extraído del veneno de *C.princeps*. Cp:Conus prínceps, p30: pico 30.

6.2 Repurificación de la toxina α -PiVIA

Se realizó la purificación de la fracción 4 del veneno de *C.princeps* y se aisló el pico eluido en el minuto 30 siguiendo la metodología señalada en el apartado 5.5. Se observó un pico limpio que representa aproximadamente el 60% del total de componentes encontrados en la fracción 4, como se describe en la Figura 29.

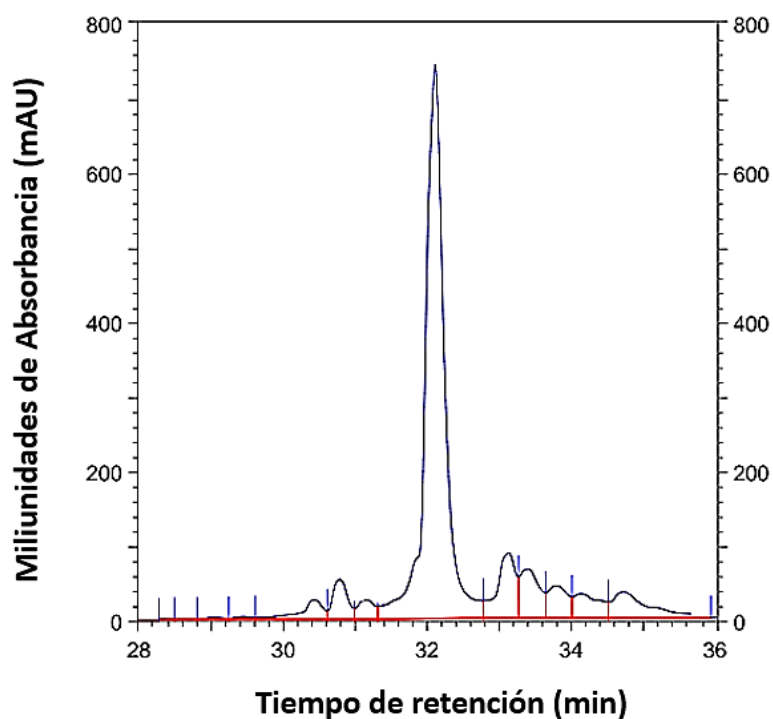


Figura 29. Repurificación de la toxina α -PiVIA (Cpp30). Se considera Cpp30 el componente eluido y colectado entre durante el intervalo que comprende el minuto 31.3 y 32.

Se emplearon 150 μg del componente Cpp30 para realizar los ensayos electrofisiológicos y el resto se utilizó para realizar los ensayos referentes a la determinación de su secuencia primaria de aminoácidos.

6.3 Secuenciación y determinación de la masa molecular de γ -PiVIIA

Se determinó que el componente Cpp30 presentó el perfil de conotoxina con un peso molecular de 3.096 Daltons.

Los resultados de la secuenciación por espectrometría de masas, demostraron que la toxina en estudio tiene una estructura primaria formada por 25 aminoácidos, entre los cuales se observan seis residuos cisteína, dos residuos gamacarboxilados y una hidroxiprolina en la posición cuatro, como se describe en la figura 30.

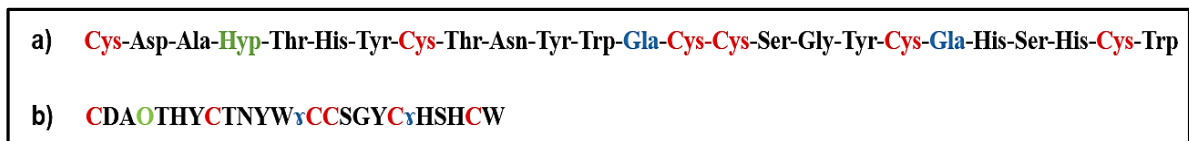


Figura 30. Secuencia de aminoácidos de la conotoxina γ -PiVIIA. a. Estructura primaria de γ -PiVIIA representando los aminoácidos con nomenclatura de tres letras. b. Estructura primaria de γ -PiVIIA representando los aminoácidos con nomenclatura de una letra.

De acuerdo a sus características estructurales, se clasificó a Cpp30 como una conotoxina que pertenece a la superfamilia O, debido a que presenta un patrón de cisteínas **C-C-CC-C-C**. Además, la toxina presenta dos residuos de gamma-carboxiglutamato característicos de la familia farmacológica gamma (γ), la secuencia de esta toxina no había sido reportada antes.

En concordancia con las reglas para la nomenclatura de conotoxinas establecidas en 2001 por Olivera B.M. y Cruz L.J., se denominó **γ -PiVIIA** a la conotoxina en estudio. Se considera γ la familia farmacológica, "Pi" la especie de *C. princeps*, VII es el patrón de cisteínas (C-C-CC-C-C), y A debido a que es el primer péptido aislado con esta secuencia de aminoácidos que presenta este patrón de cisteínas.

6.4 Análisis electrofisiológico.

Considerando que la toxina PiVIIA es similar en su estructura primaria con las cuatro gamma conotoxinas que han sido reportadas y sabiendo que éstas han presentado actividad excitatoria en canales catiónicos dependientes de voltaje, se determinó evaluar el efecto electrofisiológico de la conotoxina PiVIIA en canales iónicos de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ que se encuentran expresados en células de ganglio dorsal de rata.

Se trabajó con células de ganglio dorsal de rata para los ensayos electrofisiológicos debido a que son altamente excitables, se encargan de transmitir la información sensorial desde la periferia hasta el sistema nervioso central, presentan homogeneidad morfológica fisiológica y bioquímica, además de ser relativamente grandes, con un tamaño que oscila en las 15 micras aproximadamente. Además de expresar una gran variedad de canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} de acuerdo a lo reportado en 2011 por Yusaf *et al.* Por todas las cualidades anteriores son ampliamente utilizadas como modelo para estudiar la actividad electrofisiológica de fármacos sobre canales iónicos. (Martínez *et al.*, 2000)

Cabe señalar que se probó el efecto de PiVIIA en canales iónicos sensibles a pH ácido (ASIC) debido a que se sabe que participan en la transmisión sináptica excitatoria y son dianas de toxinas animales como el péptido PcTx1 y APETx2 de serpiente mamba y el MitTX de anémona marina, que podrían ser candidatos a fármacos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central y periférico. (Baron & Lingueglia, 2015)

6.4.1 Cultivo de células de ganglio dorsal de rata

Se siguió la metodología señalada en el apartado 5.8.2 para el cultivo de células de ganglio dorsal de rata. Los cultivos realizados fueron viables, ya que las células mantuvieron la función y la morfología celular óptima para realizar los ensayos electrofisiológicos.

Se observaron cultivos con gran población de células fijas que respondieron de manera favorable en la formación de los parches de alta resistencia. Se colocó un nuevo cultivo

celular cada hora durante cada experimento, para asegurar la integridad y la función de las células.

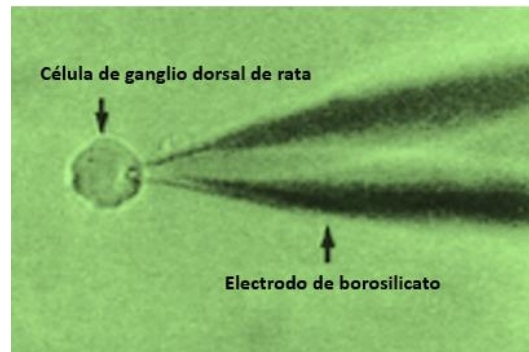


Figura 31. Formación de sello de alta resistencia entre electrodo de borosilicato y célula de ganglio dorsal de rata. Puede observarse muy definida la membrana celular y la forma circular característica de las GRD's.

6.4.2 Evaluación del efecto de α -PnVIIA sobre corriente de Ca^{2+} en GRD's

Se evaluó el efecto de PnVIIA sobre corriente de Ca^{2+} , en 10 células ($n=10$) que mantuvieron una corriente estable durante los ensayos. Se siguió el protocolo señalado en la sección 5.8.5 y se evaluó la intensidad de evocada por la rampa de voltaje en condiciones control, al aplicar la toxina y al efectuar el lavado.

La toxina se aplicó en una concentración saturante de $3 \mu\text{M}$, considerando que la α -PnVIIA presenta efecto dosis-dependiente sobre canales catiónicos al aplicarse a concentraciones ($1, 3$ y $10 \mu\text{M}$)

Los resultados promedio obtenidos se describen en tabla 9. Se observa que al aplicar la conotoxina PnVIIA hay un aumento de la corriente máxima en casi un orden de magnitud respecto a la corriente control.

De la misma forma, se produjo un incremento en el área bajo la curva de la corriente evocada al aplicar la toxina respecto a la corriente control, como se ilustra en la figura 32 correspondiente a la gráfica que relaciona las intensidades de corriente obtenidas al aumentar el voltaje (I-V).

Por otro lado, en la tabla 9 se observa que la máxima intensidad de corriente de lavado (1.522 nA) es menor que la I_{max} de la corriente producida al aplicar la toxina (2.425 nA) y tiende a un valor cercano a la I_{max} de la corriente control.

Tabla 9. Resultados promedio correspondientes a la máxima intensidad de corriente (I_{max}) de Ca^{2+} obtenida al aplicar γ -PiVIIA ($3\mu M$)

	Control	Aplicación γ -PiVIIA	Lavado
Promedio I_{max} (nA)	-1.326	-2.425	-1.522

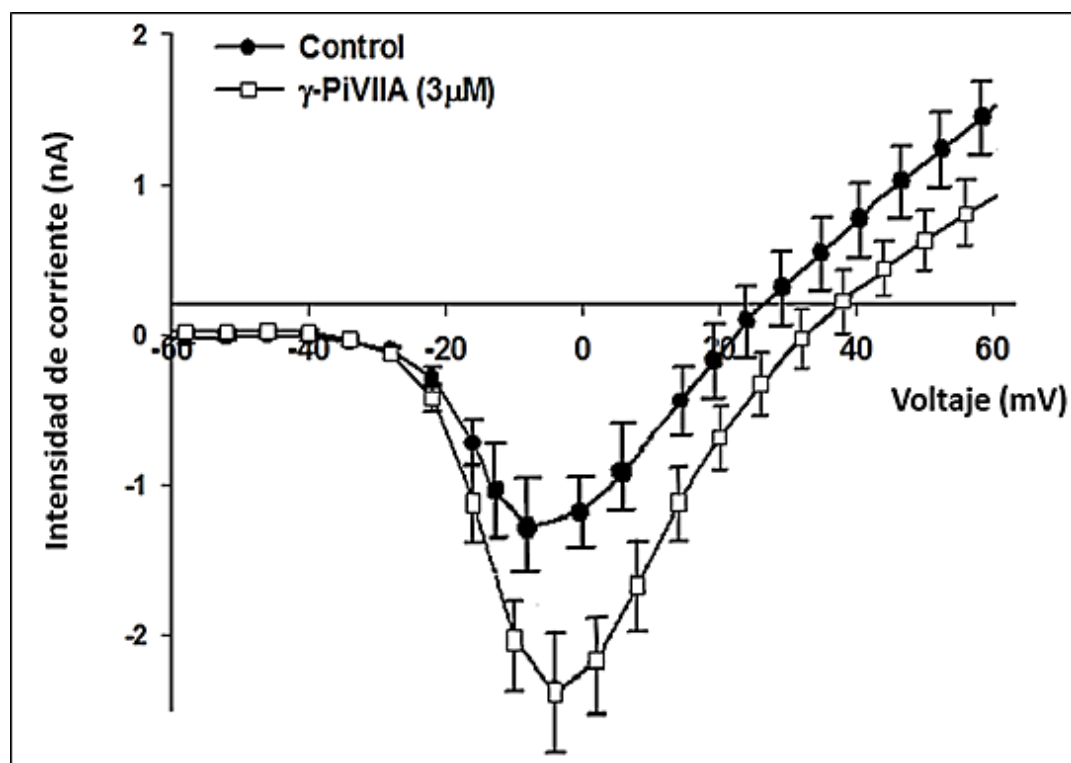


Figura 32. Curva I-V de resultados promedio correspondientes a la evaluación del efecto de γ -PiVIIA ($3\mu M$) sobre corriente de Ca^{2+} . El área bajo la curva producida al aplicar la toxina tiende a aumentar comparada con el área bajo la curva de la corriente control. Se observa también un aumento en la I_{max} en la corriente al aplicar la conotoxina comparada con la corriente evocada en condiciones control.

Para determinar si el aumento de la corriente es producido por la conotoxina se aplicó la prueba estadística t-student, $\alpha=0.05$. Se comparó el valor de la I_{max} del grupo de corrientes control respecto a la I_{max} del grupo de corrientes resultantes de la aplicación de PiVIIA y se determinó que si hay una diferencia significativa en la I_{max} de la corriente control, respecto a la I_{max} de la corriente producida al aplicar la conotoxina, ya que el valor de P calculada fue 0.00028, considerando como significativa una $P<0.05$.

El resultado anterior es alentador porque nos permite saber que la conotoxina γ -PiVIIA podría tener un efecto agonista de canales iónicos de Ca^{2+} , ya que se produce un aumento significativo en la corriente al realizar la aplicación de la toxina a una concentración $3\mu M$ como se ilustra en la figura 33.

También se observa que la corriente disminuye al efectuar el lavado, este último resultado es indicativo que la toxina podría tener un efecto reversible.

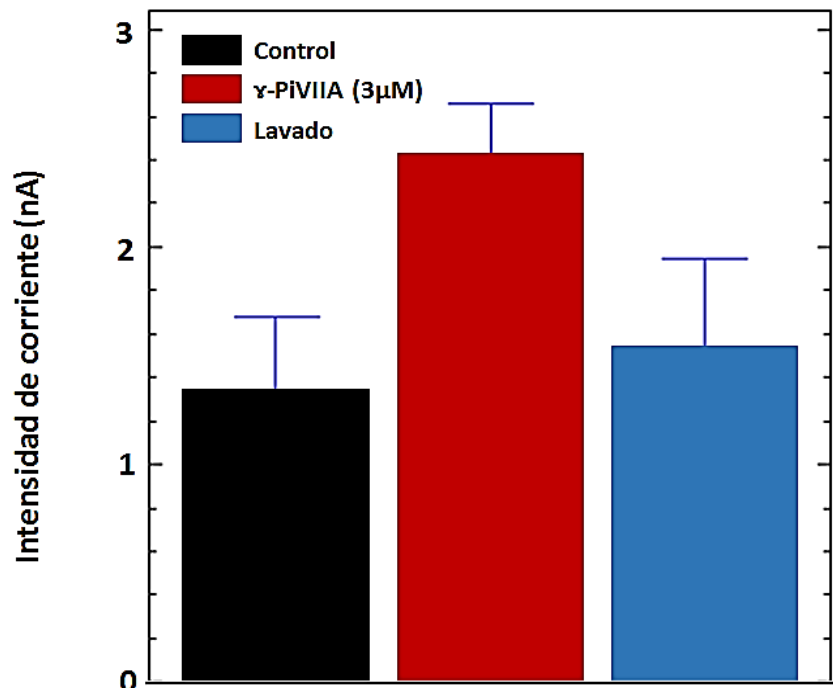


Figura 33. Gráfica de resultados promedio de la evaluación de γ -PiVIIA (3 μM) sobre corriente de Ca^{2+} en GRD's. Se observa un cambio estadísticamente significativo al realizar la aplicación de la conotoxina ($P=0.00028$). La célula tiende a recuperarse después de la aplicación, ya que la corriente de lavado disminuye y tiende a una I_{max} que no tiene diferencia significativa con la corriente evocada en condiciones control.

Para evaluar la reversibilidad del efecto de PiVIIA se aplicó una prueba estadística t-student, $\alpha=0.05$ comparando la I_{max} del control y I_{max} producida al realizar el lavado. Se observó que no hay diferencia significativa en la I_{max} de ambos grupos, ya que el valor de P calculada fue 0.5188, considerando como significativa $P<0.05$. Este resultado nos permite inferir que el efecto de la conotoxina es reversible, es decir, PiVIIA se separa de su sitio de unión con el canal después de ejercer su efecto.

Por otro lado, se calculó el porcentaje de efecto de PiVIIA y el porcentaje de recuperación de la célula después de aplicar el tratamiento. Los resultados representados en la figura 34 indican que la conotoxina α -PiVIIA produce un aumento en la corriente de Ca^{2+} en un 53.7% cuando es aplicada a una concentración 3 μ M en neuronas de ganglio dorsal. El efecto producido es reversible, ya que la célula se recupera en un 87.12% al efectuar el lavado.

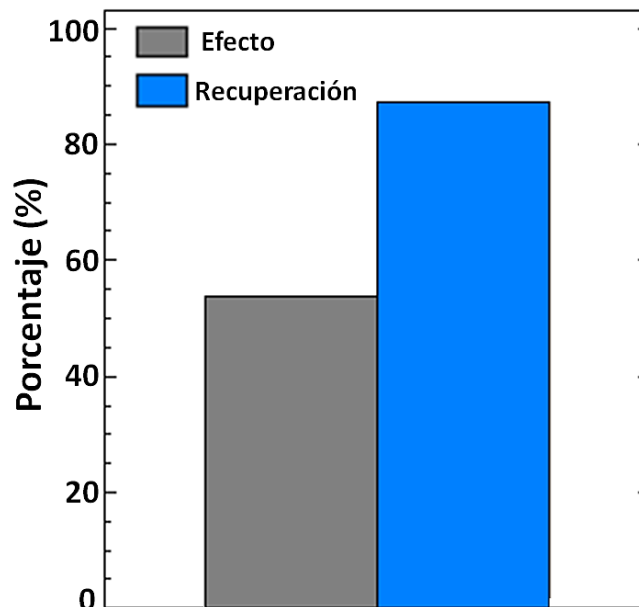


Figura 34. Porcentajes de efecto y recuperación correspondiente a la aplicación de la toxina α -PiVIIA (10 μ M) sobre corriente de Ca^{2+} en GRD's.

6.4.3 Evaluación del efecto de α -PiVIIA sobre corriente de Na^+ en GRD's

El efecto de la conotoxina α -PiVIIA sobre corriente de Na^+ se evaluó en cinco células ($n=5$) que mantuvieron fijo el sello de alta resistencia y presentaron una corriente estable durante los ensayos efectuados. La toxina se aplicó en una concentración

saturante $10\mu\text{M}$ considerando que la conotoxina PiVIIA mostró actividad sobre canales catiónicos a una concentración $10\mu\text{M}$.

Se siguió el protocolo descrito en la sección 5.8.6 y se evocó una corriente control que tuvo una I_{max} promedio de 4.98 nA . Al realizar la aplicación de la toxina PiVIIA la corriente presentó un promedio en el valor de I_{max} de 5.19 nA , y al lavar la célula la corriente sostuvo una I_{max} promedio de 5.25 nA .

Tabla 10. Resultados promedio correspondientes a la máxima intensidad de corriente (I_{max}) de Na^+ obtenida al aplicar γ -PiVIIA ($10\mu\text{M}$)

	Control	Aplicación γ -PiVIIA	Lavado
Promedio I_{max} (nA)	4.98	5.19	5.25

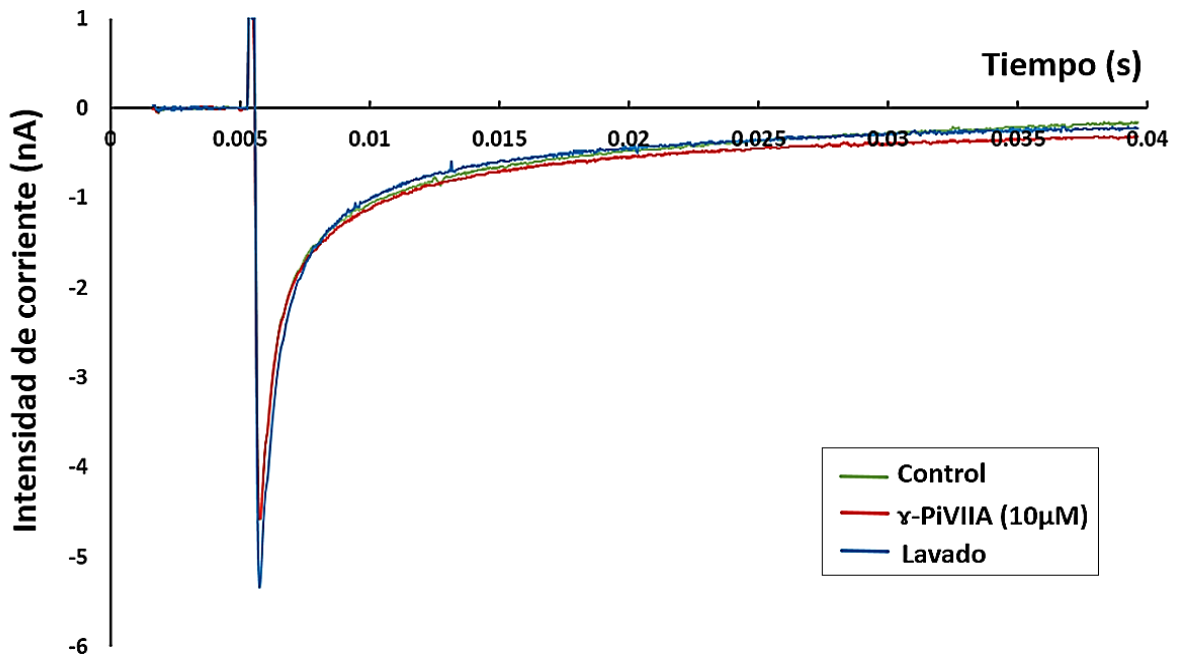


Figura 35. Gráfica (I/t) de resultados promedio de la evaluación del efecto de γ -PiVIIA ($10\mu\text{M}$) sobre corriente de Na^+ dependiente de voltaje $n=5$). No se observa un efecto significativo entre el trazo de la corriente en condiciones control respecto al trazo de corriente evocada al aplicar la toxina γ -PiVIIA, $P=0.07$. No se diferencia aparente entre los trazos de corriente control y de lavado.

La figura 35 muestra los resultados promedio de la corriente máxima evocada en condiciones control, al aplicar la toxina y cuando se efectuó el lavado. No se observa una diferencia aparente entre los tres grupos, lo que sugiere que no hay efecto aparente de la toxina sobre canales iónicos de Na^+ dependientes de voltaje.

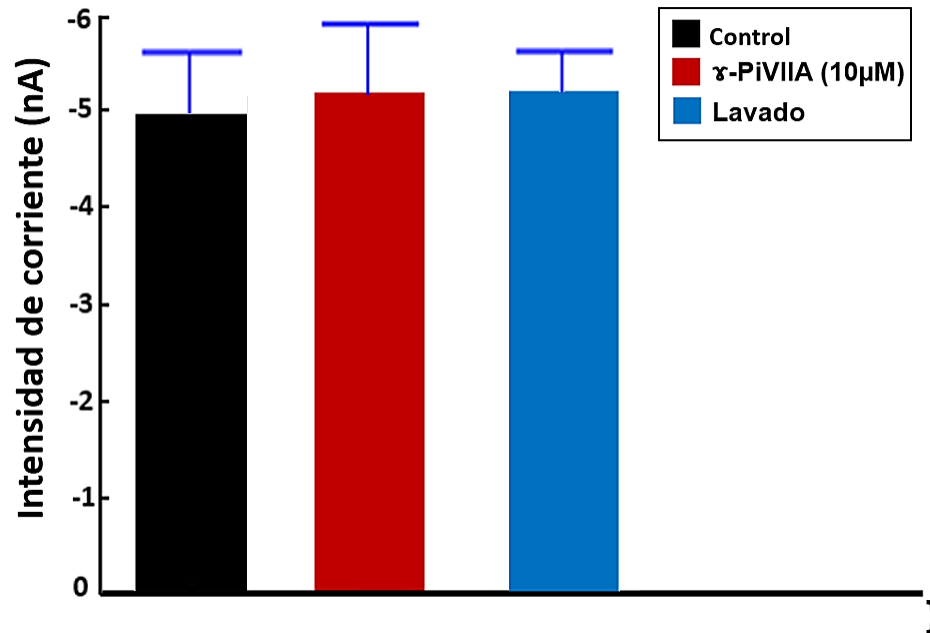


Figura 36. Gráfica de resultados promedio de la evaluación de α -PiVIIA (10 μ M) sobre corriente de Na^+ en GRD's. No se observan cambios aparentes al comparar la corriente control, la corriente producida al aplicar la toxina, ni al efectuar el lavado. $P=0.07$

Se aplicó una prueba estadística t-student comparando los datos promedio de máxima intensidad de corriente del grupo de corrientes control respecto al grupo de corrientes evocadas al aplicar la conotoxina y no se observó diferencia significativa entre ellas $P=0.07$ considerando como significativa $P<0.05$. Este resultado estadístico descarta que a toxina tenga algún efecto sobre la corriente de sodio dependiente de voltaje.

La gráfica de la figura 37 compara el porcentaje de efecto y de recuperación de la célula después de aplicar la toxina. No hay un efecto significativo de la toxina y las células se mantuvieron estables durante los ensayos, ya que el porcentaje de recuperación es mayor a 100%.

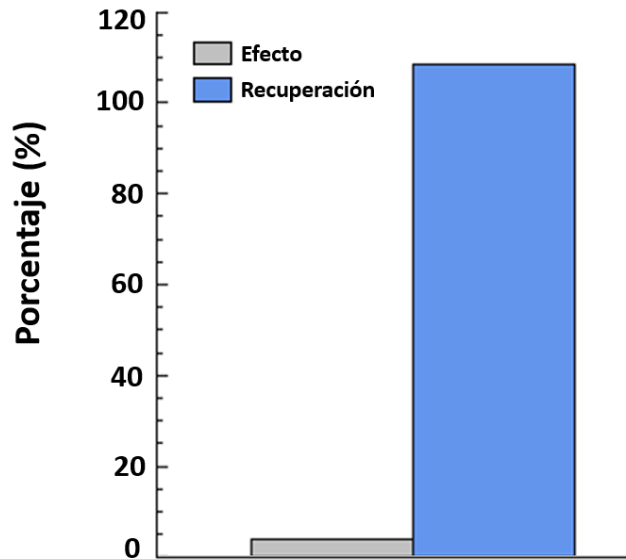


Figura 37. Gráfica de porcentajes de efecto y recuperación correspondientes al efecto de α -PiVIIA (10 μ M) sobre corriente de Na⁺ en GRD's.

6.4.4 Evaluación del efecto de α -PiVIIA sobre corriente de K⁺ en GRD's

Para evaluar el efecto de PiVIIA sobre canales iónicos de K⁺, se utilizaron cinco células (n=5) que se mantuvieron estables durante el registro electrofisiológico siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.8.7.

Se determinó evaluar el efecto de PiVIIA a una concentración saturante 10 μ M, considerando que las toxinas α -PnVIIA y α -TxVIIA observaron efecto en canales catiónicos dependientes de voltaje a una concentración en orden picomolar, y un efecto que incrementaba con la dosis de 1 a 10 μ M respectivamente.

La toxina PiVIIA no tuvo efecto significativo sobre canales iónicos de K⁺ dependientes de voltaje como se puede observar en las figuras 38 y 39 correspondiente a los resultados promedio de las cinco evaluaciones realizadas. Sin embargo, hay una ligera variación entre el componente sostenido al aplicar la toxina respecto a los componentes sostenidos del control y el lavado.

Tabla 11. Resultados promedio correspondientes a la máxima intensidad de corriente (I_{max}) de K^+ obtenida al aplicar α -PiVIIA ($10 \mu M$)

	Control	Aplicación α -PiVIIA	Lavado
Promedio I_{max} (nA)	4.12	4.18	3.94

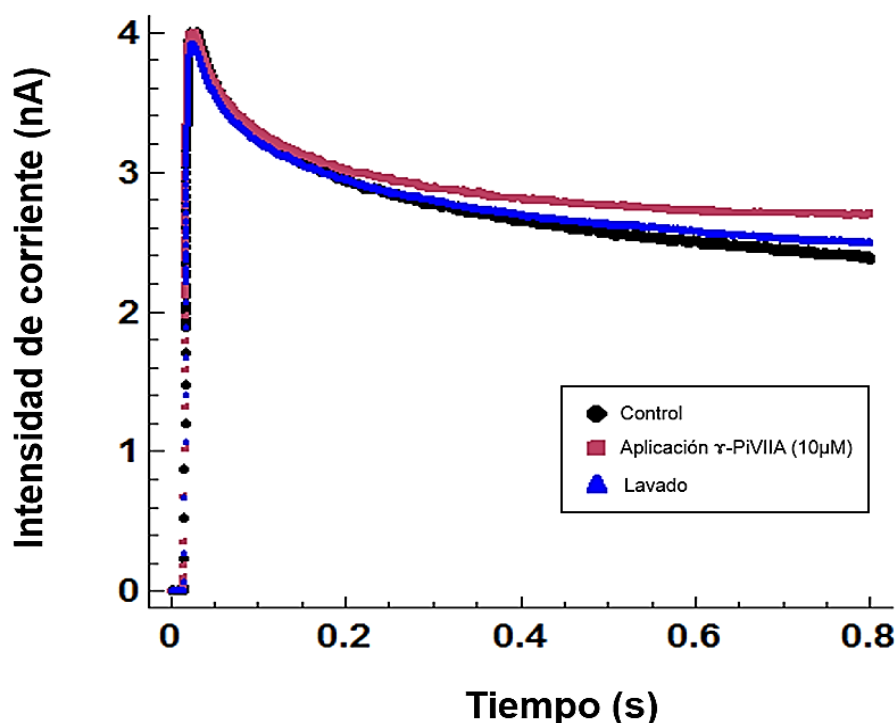


Figura 38. Gráfica (I/t) de resultados promedio de la evaluación del efecto de α -PiVIIA ($10 \mu M$) sobre corriente de K^+ dependiente de voltaje $n=(5)$. No se observa un efecto aparente entre la máxima intensidad de corriente máxima (I_{max}) en condiciones control respecto a la corriente evocada al aplicar la toxina α -PiVIIA. No hay diferencia significativa entre la intensidad de corriente máxima (I_{max}) en condiciones control y la I_{max} de la corriente que se produjo al realizar el lavado, ($P=0.35$). Se observa una diferencia aparente entre el componente sostenido de la corriente de aplicación respecto a la corriente control y de lavado.

Se analizaron los resultados obtenidos mediante la prueba estadística t-student $\alpha=.05$ y no se observó diferencia significativa entre la I_{max} de las corrientes control respecto a la I_{max} de las corrientes producidas al aplicar la toxina α -PiVIIA ($P=0.35$). Por otro lado, no hay diferencia significativa entre la I_{max} de la corriente control respecto a la

Imax promedio de la corriente de lavado ($p=0.11$). Este resultado estadístico indica que no hay efecto de la toxina sobre corriente de K^+ dependiente de voltaje.

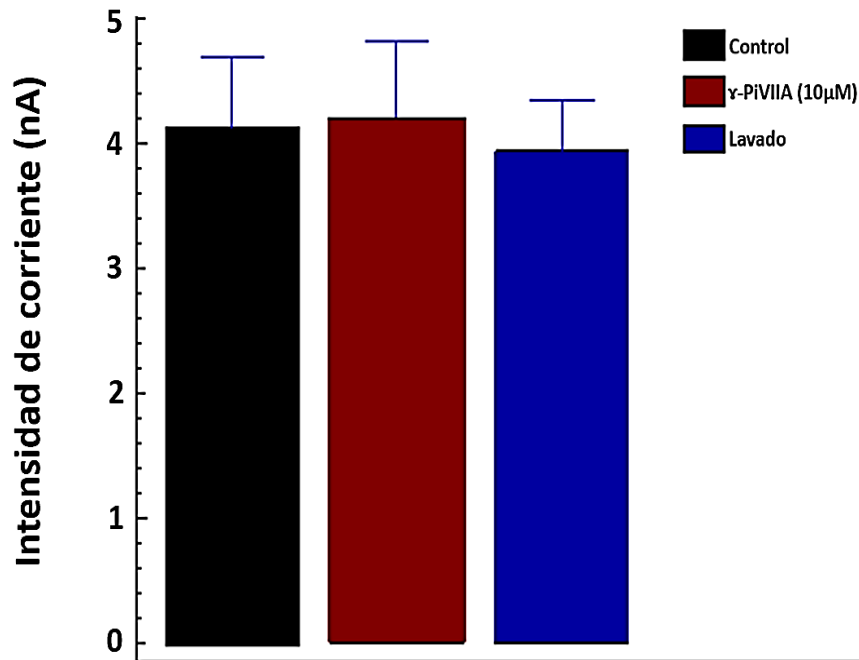


Figura 39. Gráfica de resultados promedio de la evaluación de γ -PiVIIA sobre corriente de K^+ en GRD's. No se observan cambios significativos al comparar la corriente control, la corriente producida al aplicar la toxina, ni al efectuar el lavado.

Para saber si el ligero cambio entre el componente sostenido (Isos) se debe a la aplicación de la conotoxina, se aplicó la prueba estadística t-student a los componentes sostenidos de la corriente promedio control y de aplicación, y no se observó diferencia significativa entre ambos ($P=0.37$). De acuerdo a este resultado, se descarta un efecto de la toxina.

6.4.5 Evaluación del efecto de γ -PiVIIA sobre corriente ASIC en GRD's

La evaluación del efecto de γ -PiVIIA sobre corriente total activada por pH ácido ASIC se realizó en siete células ($n=7$) para asegurar que el resultado fuera estadísticamente significativo, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.8.8

El efecto de la toxina γ -PiVIA se evaluó a una concentración saturante de $3\mu\text{M}$, considerando que las toxinas animales PcTx1 y APETx2 y MitTX presentan efecto en canales ASIC a concentración 10 nM .

Las gráficas de resultados promedio representados en las figuras 40 y 41, indican que la conotoxina en estudio no tiene efecto aparente sobre canales iónicos activados por pH, al no haber cambio significativo en la intensidad de corriente máxima cuando se realizó la aplicación sostenida de la toxina respecto a la intensidad de corriente evocada en condiciones control. Se observa también que no hubo variación significativa en los trazos de la corriente al efectuar el lavado.

Tabla 12. Resultados de corriente máxima ASIC obtenida al aplicar γ -PiVIA ($3\mu\text{M}$)

	Control	Aplicación γ -PiVIA	Lavado
Promedio I _{max} (nA)	-1.05	-0.96	-0.98

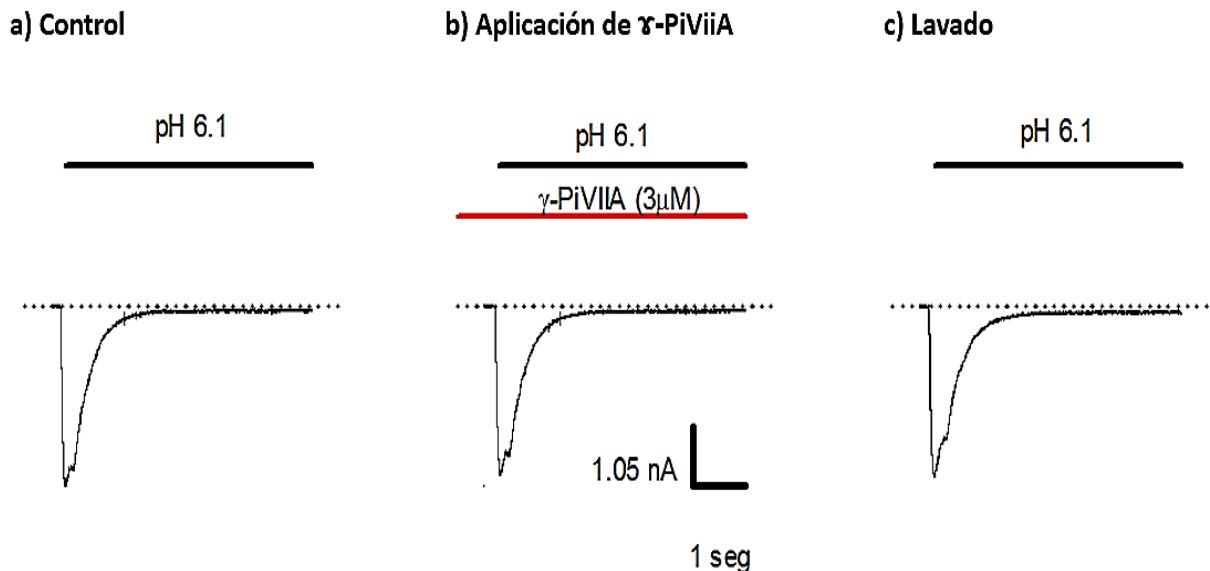


Figura 40. Grafica (I/t) de resultado promedio del registro de γ -PiVIA ($3\mu\text{M}$) sobre corriente ASIC ($n=7$). No se observa un cambio aparente en la I_{max} (corriente máxima) al realizar la aplicación de PiVIA respecto al control ni al realizar el lavado.

Se analizaron los resultados promedio de las siete evaluaciones realizadas del efecto de α -PiVIA, aplicando la prueba estadística t-student $\alpha=0.05$ y no se observó diferencia significativa en la intensidad máxima de corriente al aplicar la toxina a una concentración $3 \mu\text{M}$, respecto a la I_{max} de la corriente control ($P=0.07$). De la misma manera, no se observó diferencia significativa entre la I_{max} de la corriente de lavado respecto de la corriente control ($P=0.09$).

Evaluación del efecto de α -PiVIA sobre corriente ASIC en GRD's

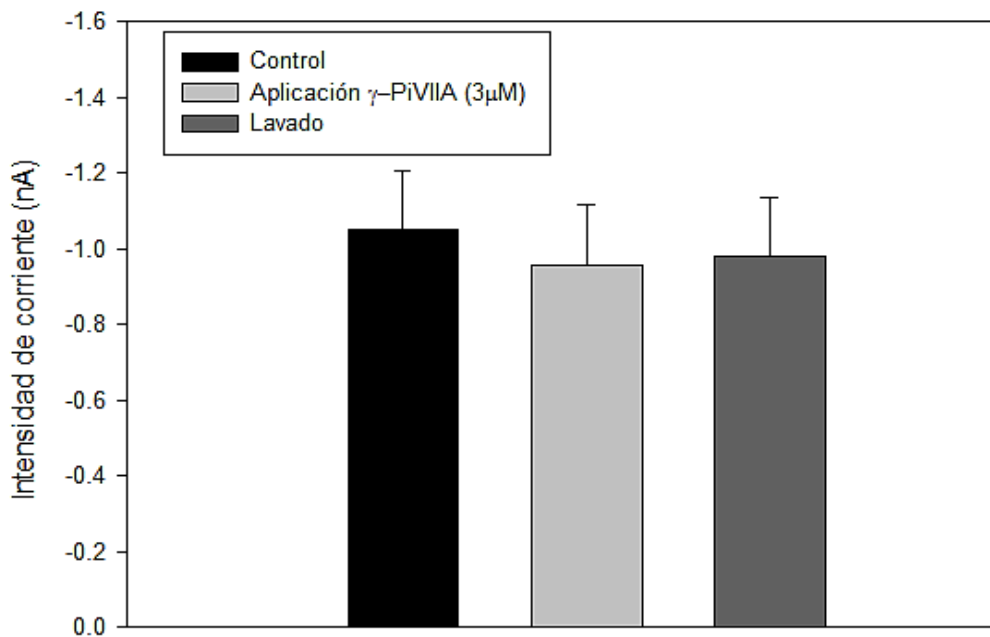


Figura 41 Gráfica de resultados promedio de la evaluación de α -PiVIA sobre corriente ASIC en GRD's. No se observan cambios significativos en el máximo de corriente evocada en condiciones control, al aplicar la toxina ni al realizar el lavado, ($P=0.07$).

Los resultados promedio de la evaluación en las siete células muestran que hubo un porcentaje de cambio de 9.77 en la intensidad de corriente al aplicar la toxina α -PiVIA, respecto de la corriente control. Sin embargo, este resultado podría deberse a algún efecto espontáneo round-down durante los experimentos, ya que queda descartado un posible efecto de la conotoxina, debido a que el análisis estadístico aplicado (prueba t-student) indica que no hay una diferencia significativa entre el promedio de la intensidad de corriente control y el promedio de la corriente al aplicar la toxina.

Es importante señalar también pese a no haber un efecto significativo en la intensidad de corriente ASIC provocado por la conotoxina, la célula se mantuvo estable durante los experimentos, ya que el porcentaje de cambio entre la corriente de lavado y la corriente control es del 6.66 %.

Capítulo 7.

Discusión

Los resultados obtenidos indican que la conotoxina α -PiVIIA actúa como activador de canales de Ca^{2+} motivados por voltaje al incrementar la intensidad de corriente entrante en un 53.7 % y ejercer un efecto reversible. Este resultado preliminar sienta las bases para que en estudios posteriores se determine el subtipo de canales de calcio donde ejerce su efecto, el receptor específico al que se une y cuáles podrían ser sus blancos terapéuticos.

Es importante señalar que la estructura y la actividad biológica de la toxina PiVIIA no se había reportado antes y que estos resultados permiten continuar investigando su potencial farmacológico.

7.1 Secuencia y actividad biológica de α -PiVIIA

De acuerdo a los resultados, la toxina α -PiVIIA mostró una secuencia de aminoácidos con el mismo patrón de cisteínas (C-C-CC-C-C) que exhiben las dos gamma conotoxinas anteriormente reportadas y los dos péptidos tipo gamma. Sin embargo, PiVIIA tiene poca identidad en su secuencia respecto a las otras gamma conotoxinas reportadas, sólo presenta en común el aminoácido Treonina con TxVIIA, Glicina con de7a y Serina con PnVIIA.

Como se muestra en la figura 42, las cinco conotoxinas exhiben el patrón $-\alpha\text{CCS}-$ que no exhiben en el resto de toxinas que pertenecen a la superfamilia O, además de tener dos residuos de α -carboxiglutamato y la modificación postraducciona de hidroxiprolina.

En este sentido, la presencia de hidroxiprolina podría contribuir a la formación de puentes de hidrógeno entre la toxina y su blanco molecular o a estabilizar su estructura molecular de acuerdo a lo reportado por Aguilar y colaboradores en 2005. Tal es el caso de la conotoxina μ -GIIIA, que presenta un aumento su tasa de plegamiento al

eliminar las hidroxiprolinas de su secuencia, pero disminuye su capacidad de unión a los canales de sodio de músculo esquelético como lo demuestran Lopez-Vera y colaboradores en 2008.



Figura 42. Comparación entre la secuencia de las toxinas α -PiVIIA de *C. princeps*, α -TxVIIA (*C. textile*), α -PnVIIA (*C. pennaceus*), de7a (*C. delessertii*) y as7a (*C. austini*). Se presentan los aminoácidos con código de una letra. Para las modificaciones postraduccionales se emplean las letras: O, hidroxiprolina; γ , carboxiglutamato; &, C-terminal amidado. Los residuos idénticos se muestran entre rectángulos. El peso molecular de todas gamma conotoxinas oscila entre los 300-3200 D ya que están conformadas por entre 25-32 aminoácidos.

La presencia de gamma carboxiglutamato en PiVIIA podría promover la formación de estructuras alfa hélices que incrementen la estabilidad de la molécula de acuerdo a lo descrito en 1984 por el grupo de McIntosh y colaboradores en sus estudios acerca del papel del α -carboxiglutamato en la estabilidad de neurotoxinas.

En 2008 Nakamura *et al*, determinaron que los residuos de gamma carboxiglutamato presentes en α -TxVIIA están relacionados con la capacidad de unión de la toxina con su receptor cuando al eliminar estos residuos de la toxina, se produjo una disminución en su bioactividad. Podemos inferir también que los residuos gamma carboxilados presentes en la estructura primaria de PiVIIA podrían intervenir en su afinidad con su receptor y en la potencia de su actividad biológica.

Se ha visto que las gamma conotoxinas tienen en común su actividad excitatoria. Sin embargo, sus blancos moleculares son distintos. α -TxVIIA tiene actividad excitatoria en neuronas de *Aplysia*, pero no tiene efecto excitatorio en neuronas caudodorsales de *Lymnaea*, blanco molecular de α -PnVIIA. El mecanismo de acción de PnVIIA consiste en la activación de canales de marcapaso permitiendo la entrada lenta de cationes,

mientras que PiVIA actúa como agonista de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. (Zugasti-Cruz et al., 2006).

Se sugiere entonces que la actividad biológica de las gamma conotoxinas está directamente relacionada con la alimentación de las diferentes especies y las condiciones medioambientales en las que se desarrollan, tomando en cuenta que en estudios *in vivo*, TxVIA indujo parálisis en sus presas y as7a provocó contracción muscular en *P. paludosa*. De los cinco organismos de los que fueron aisladas las conotoxinas, una habita en el Caribe mexicano (de7a), dos en el Golfo de México (PiVIA y as7a), dos al norte del Mar Rojo (TxVIA y PnVIA), esto podría explicar la diferencia en sus secuencias que es posible que esté relacionada también con la época en la que fueron colectados.

Las observaciones anteriores concuerdan con lo reportado en 2006, por Zugasti-Cruz y colaboradores quienes deducen que las gamma conotoxinas presentan en realidad poca identidad entre sus secuencias y esto podría estar relacionado con la diferencia en su efecto y blanco molecular. Las toxinas aisladas de conos moluscívoros (TxVIA, PnVIA) presentan cuatro aminoácidos comunes en sus secuencias. Asimismo, la conotoxinas (as7a y de7a) aisladas de conos vermívoros comparten sólo dos aminoácidos en común.

Un dato importante a discutir es que PiVIA es la única gamma conotoxina que exhibe tres histidinas en su secuencia. Se especula que estos aminoácidos podrían determinar su afinidad por los canales de calcio y promover su apertura. Sin embargo este último dato no ha sido estudiado aún.

No obstante, es necesario realizar estudios bioinformáticos que nos permitan realizar una comparación entre la estructura tridimensional de las cinco gamma conotoxinas y relacionarla con su bioactividad.

7.2 α -PiVIA agonista de canales de calcio activados por voltaje.

Hasta el momento sólo se han reportado conotoxinas que actúan bloqueando de manera selectiva canales de calcio, tal es el caso de las conotoxinas CVID, GVIA, MVIIA, MVIIC and SVIB de la familia farmacológica omega. Por lo tanto, se considera que PiVIA es la primer conotoxina aislada y caracterizada que activa canales de calcio dependientes de voltaje. (Pringos *et al*, 2011)

α -PiVIA mostró incrementar la corriente entrante de Ca^{2+} activada por voltaje en GRD's en un rango de potencial de -20 a +40 mV, con una intensidad máxima que tiende a valores más negativos. Es destacable mencionar que a una concentración saturante (3 μM) presenta un aparente efecto reversible. Sin embargo, es necesario realizar estudios futuros para evaluar si la toxina efectivamente muestra una tendencia a romper la unión con su sitio de acción o esta aparente reversibilidad se debe simplemente a una saturación de los canales de calcio que produce una disminución en la corriente.

Cabe mencionar el efecto de α -PiVIA se observó únicamente sobre la corriente de Ca^{2+} de alto umbral HVA, debido a que no se logró evidenciar la corriente LVA con el protocolo utilizado en los experimentos en ratas neonatas, debido a que la corriente tiende a inactivarse de manera rápida. Sería oportuno evaluar el efecto de la toxina específicamente sobre la corriente de bajo umbral (LVA), ya que los canales iónicos de tipo L han resultado ser blanco terapéutico de toxinas animales que actúan como antagonistas de la corriente de Ca^{2+} . (Triggle, 2003)

Aunque los resultados obtenidos en este trabajo son preliminares, el estudio de la estructura y actividad biológica de la toxina PiVIA. Por lo tanto, es necesario realizar más réplicas de los experimentos y evaluar su efecto a diferentes concentraciones para conocer si hay una relación directamente proporcional entre el incremento de la corriente y la concentración de toxina. Es necesario efectuar también ensayos que permitan determinar la identidad de los Ca_v , sobre los cuales actúa la toxina mediante un modelo de expresión heteróloga. De la misma forma, se deben hacer estudios bioinformáticos que predigan el sitio de unión de la toxina con su receptor mediante la relación de su estructura tridimensional. También es importante mencionar que es

importante conocer la conectividad de sus cisteínas para saber si es similar al de omega conotoxinas.

Por otra parte, es conveniente realizar una curva dosis-respuesta para conocer cuál es la concentración efectiva a la cual la toxina ejerce su efecto máximo. También es necesario evaluar su efecto en modelos *in vivo*, para entender su interacción con sistemas biológicos. En este aspecto también podrían realizarse estudios *in vitro*, para investigar si esta toxina podría tener bioactividad en el tratamiento de alguna enfermedad.

Se han descrito pocos fármacos que incrementan el flujo del calcio entrante en las células excitables, entre ellos se encuentran BAY k8622 activador de Cav1.1, GGP38392, FPL 64176, 1-etil-2-benzimidazolinona que se encuentran en fase de investigación preclínica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y cardíacas. (Bechem *et al*, 1989)

Por lo anterior se considera que los resultados preliminares obtenidos sobre la actividad de PiVIIA sobre Cav son prometedores

Considerando su efecto electrofisiológico en GRD's, se especula es posible que la toxina α -PiVIIA pudiera tener como blanco células del corazón para aumentar la contractilidad del musculo cardiaco o incluso actuar en células β para inducir liberación de insulina en el músculo pancreático. Sin embargo, en el presente trabajo, sólo se muestran datos preliminares. Es necesario continuar con la investigación acerca de esta conotoxina y obtener resultados que nos permitan concluir acerca de su actividad farmacológica.

7.3 Especificidad de α -PiVIIA por canales de Ca^{2+} activados por voltaje en GRD's.

Los resultados preliminares obtenidos indican que α -PiVIIA no tiene efecto sobre la corriente de K^+ o Na^+ activada por voltaje a concentración saturante de 10 μ M, pero promueve la apertura de canales Ca_v a una concentración de 3 μ M.

Para realizar los experimentos con las diferentes corrientes se agregaron en la solución extracelular bloqueadores de la corriente de Ca^{2+} , N^+ o K^+ , para garantizar que el resultado del efecto fuera específico para algún tipo de corriente.

Las μ -conotoxinas también pertenecientes a la superfamilia O, presentan actividad en canales de Na^+ activados por voltaje al disminuir el periodo de inactivación de los Nav, lo que causa una prolongación del potencial de acción. Por el contrario, las conotoxinas de la familia δ abren los canales de Na^+ . Sin embargo γ -PiVIIA no tiene efecto sobre la corriente de Na^+ a pesar de tener en mismo marco de cisteínas, esto podría explicarse en función de su estructura tridimensional y el motivo -S γ CCS- que presenta distintivo de la familia gamma.

Por otra parte, γ -PiVIIA no presentó actividad aparente sobre canales Kv, como las conotoxinas kappa de su misma superfamilia. Es necesario realizar estudios sobre su estructura tridimensional para explicar el motivo por el cual no tiene afinidad sobre estos canales. Se sabe que las toxinas animales que actúan en canales iónicos de K^+ dependientes de voltaje suelen estar estructurados con alfa hélices dispuestas de manera antiparalela, o de manera perpendicular. (Mouhat *et al*, 2008)

De las conotoxinas caracterizadas hasta el momento, ninguna ha presentado actividad sobre canales sensibles a la concentración de protones (ASIC). Sin embargo, se decidió realizar estos experimentos para conocer de manera preliminar la especificidad de PiVIIA. (Lingueglia & Lazdunski, 2013)

Considerando lo anterior, γ -PiVIIA presenta selectividad por los canales de Ca^{2+} , una cualidad que la convierte en una molécula de interés para seguir evaluando su bioactividad.

Capítulo 8.

Conclusiones

1. La conotoxina α -PiVIIA promueve la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje al incrementar la corriente HVA en un 53.7% respecto a la corriente control evocada.
2. El efecto agonista de la conotoxina α -PiVIIA sobre la corriente de Ca^{2+} es reversible, al observarse recuperación respecto a la corriente control en un 87.12%
3. La conotoxina α -PiVIIA no tiene efecto sobre canales de Na^{+} activados por voltaje, al no mostrar cambio significativo entre la máxima intensidad de corriente de aplicación y la corriente control.
4. La conotoxina α -PiVIIA no tiene efecto sobre canales de K^{+} activados por voltaje, al no producirse cambio significativo en la intensidad de corriente máxima de la corriente control respecto a la corriente control evocada.
5. La conotoxina α -PiVIIA no tiene efecto sobre canales sensibles a la concentración extracelular de protones (ASIC), al no observarse diferencia significativa entre la corriente de aplicación sostenida y la corriente control.
6. Las gamma conotoxinas PiVIIA, TxVIIA, PnVIIA, de7a y as7a presentan en común el motivo **-S α CCS-** pero poca identidad entre sus secuencias que influye en su distinta bioactividad.
7. α -PiVIIA es una conotoxina novel con potencial farmacéutico que podría tener aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de enfermedades cardiacas, neurodegenerativas y para promover la producción de insulina en las células β del páncreas.

Capítulo 9.

Perspectivas

- Estudiar la relación entre la concentración de γ -PiVIIA y el incremento en la corriente de Ca^{2+} mediante la elaboración de una curva dosis-respuesta.
- Evaluar el efecto de γ -PiVIIA en corriente de bajo umbral LVA.
- Identificar el tipo de Cav en el que actúa γ -PiVIIA mediante su estudio en un modelo de expresión heteróloga.
- Realizar estudios bioinformáticos que permitan predecir cual es el blanco molecular de γ -PiVIIA.
- Efectuar estudios *in vitro* que permitan evaluar la actividad terapéutica de γ -PiVIIA
- Evaluar el efecto de γ -PiVIIA en modelos *in vivo* para conocer su actividad farmacológica.
- Relacionar la estructura y bioactividad de las conotoxinas de la familia gamma mediante estudios bioinformáticos.

Lista de referencias bibliográficas

- Aguilar, M. B., López-Vera, E., Imperial, J. S., Falcón, A., Olivera, B. M., and De la Cotera, E. P. H. (2005). Putative γ -conotoxins in vermivorous cone snails: The case of *Conus delessertii*. *Peptides*, 26(1), 23–27.
- Aguilar, M. B., López-Vera, E., Ortiz, E., Becerril, B., Possani, L. D., Olivera, B. M., and Heimer de la Cotera, E. P. (2005). A Novel Conotoxin from *Conus delessertii* with Posttranslationally Modified Lysine Residues †. *Biochemistry*, 44(33), 11130–11136.
- Aidley, D. J., and Stanfield, P. R. (1996). *Ion Channels: Molecules in Action* (1st ed.). Cambridge University Press.
- Al-Sabi, A., McArthur, J., Ostroumov, V., and French, R. J. (2006). Marine toxins that target voltage-gated sodium channels. *Marine Drugs*, 4(3), 157–192.
- Armishaw, C., and Alewood, P. (2005). Conotoxins as Research Tools and Drug Leads. *Current Protein & Peptide Science*, 6(3), 221–240.
- Barbado, M., Fablet, K., Ronjat, M., and De Waard, M. (2009). Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(6), 1096–1104.
- Baron, A., and Lingueglia, E. (2015). Pharmacology of acid-sensing ion channels – Physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology*, 94, 19–35.
- Bechem, M., Gross, R., Hebisch, S., and Schramm, M. (1989). Ca-agonists: a new class of inotropic drugs. *Basic Research in Cardiology*, 84 Suppl 1, 105–16.
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000). No Title. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21.
- Bingham, J. P., Mitsunaga, E., and Bergeron, Z. L. (2010). Drugs from slugs-Past, present and future perspectives of γ -conotoxin research. *Chemico-Biological Interactions*, 183(1), 1–18.
- Blanckenberg, J. M. (2014). The channelopathies: an overview. *Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia*, 8(1), 13–16.
- Breedlove, S., and Watson, N. (2013). *Biological Psychology: An Introduction to Behavioral, cognitive and clinical neuroscience* (7a. ed.). Sunderland, Associates.
- Bulaj, G., and Olivera, B. M. (2008). Folding of Conotoxins: Formation of the Native Disulfide Bridges During Chemical Synthesis and Biosynthesis of *Conus* Peptides. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(1), 141–156.

- Catterall, W. A. (2010). Voltage-Gated Calcium Channels. *Handbook of Cell Signaling* (2a. ed), Vol. 2. Elsevier
- Conforti, L. (2012). Cell Physiology Source Book. *Cell Physiology Source Book*. Elsevier.
- Denac, H., Mevissen, M., and Scholtysik, G. (2000). Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362(6), 453–479.
- Elizalde, J. M. (2012). Efecto del veneno de *Conus princeps* y *Anthopleura* sp . sobre el canal TRPV1. *Tesis de Maestría*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Fainzilber, M., Gordon, D., Hasson, a., Spira, M. E., and Zlotkin, E. (1991). Mollusc-specific toxins from the fvenom of *Conus textile neovicarius*. *European Journal of Biochemistry*, 202(2), 589–595.
- Fainzilber, M., Nakamura, T., Lodder, J. C., Zlotkin, E., Kits, K. S., and Burlingame, A. L. (1998). γ -conotoxin-PnVIIA, a γ -carboxyglutamate-containing peptide agonist of neuronal pacemaker cation currents. *Biochemistry*, 37(6), 1470–1477.
- Fanjul, M. L., and Hiriart, M. (2008). *Biología funcional de los animales I* (2da. ed.). México, D.F.: Siglo XXI.
- Flores-Garza, R., Garcia-Moctezuma, Y. M., Flores-Rodríguez, P., Michel-Morfín, J. E., and Torreblanca-Ramírez, C. (2014). The Conidae Family (Snails Producers of Poisons) Associated with the Rocky Intertidal Zone of Acapulco, Mexico. *Natural Resources*, 05(08), 343–350.
- Flórez, J. (2003). Acciones de los fármacos II. Mecanismos moleculares. *Farmacología Humana*, (4ª. ed) Masson. Barcelona. p. 19–49.
- Harvey, A. L. (2014). Toxins and drug discovery. *Toxicon*, 92, 193–200.
- Hille, B. (2001). Ion Channels of Excitable Membranes (3rd ed.). University of Washington.
- Holzer, P. (2011). Acid sensing by visceral afferent neurones. *Acta Physiologica*, 201(1), 63–75.
- Hübner, C. a, and Jentsch, T. J. (2002). Ion channel diseases. *Human Molecular Genetics*, 11(20), 2435–2445.
- Jentsch, T. J., Hübner, C. a, and Fuhrmann, J. C. (2004). Ion channels: function unravelled by dysfunction. *Nature Cell Biology*, 6(11), 1039–1047.

- Kew, J., and Davies, C. (2010). *Ion Channels: From Structure to Function*. Oxford University Press.
- Kocic, I. (2012). *Potassium Channels as a Target for Clinical Therapeutics*. (I. Kocic, Ed.). Bentham Science Publishers.
- Kornreich, B. G. (2007). The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology*, 9(1), 25–37.
- Krishtal, O. (2003). The ASICs: Signaling molecules. *Trends in Neurosciences*, 26(9), 477–483.
- Kumar, P. S., Kumar, D. S., and Umamaheswari, S. (2015). A perspective on toxicology of Conus venom peptides. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(5), 337–351.
- Lewis, R. J. (2009). Conotoxins: Molecular and Therapeutic Targets. In *Marine Toxins as Research Tools* (Vol. 46, pp. 45–65). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Li, Y., Um, S. Y., and McDonald, T. V. (2006). Voltage-gated potassium channels: regulation by accessory subunits. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 12(3), 199–210.
- Lingueglia, E. (2007). Acid-sensing ion channels in sensory perception. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17325–17329.
- Lingueglia, E., and Lazdunski, M. (2013). Pharmacology of ASIC channels. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 2(4), 155–171.
- Lopez-Vera, E., Walewska, A., Skalicky, J. J., Olivera, B. M., and Bulaj, G. (2008). Role of hydroxyprolines in the in vitro oxidative folding and biological activity of conotoxins. *Biochemistry*, 47(6), 1741–1751.
- Marban, E., Yamagishi, T., and Tomaselli, G. F. (1998). Structure and function of voltage-gated sodium channels. *The Journal of Physiology*, 508 (Pt 3, 647–657.
- Martínez, M., Quiroga, N. Y., Castellanos, J. E., and Hurtado, H. (2000). Subpoblaciones neuronales presentes en el ganglio de la raíz dorsal. *Biomédica*, 20(3), 248.
- Martínez Rosas, M. (2004). Los canales iónicos: la biología y patología. *Archivos de Cardiología de México*, 74(2), S205–S210.
- McIntosh, J. M., Olivera, B. M., Cruz, L. J., and Gray, W. R. (1984). Gamma-carboxyglutamate in a neuroactive toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(23), 14343–6.

- Molinski, T. F., Dalisay, D. S., Lievens, S. L., and Saludes, J. P. (2009). Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(1), 69–85.
- Morales-González, D., Flores-Martínez, E., Zamora-Bustillos, R., Rivera-Reyes, R., Michel-Morfin, J. E., Landa-Jaime, V., and Aguilar, M. B. (2015). Diversity of Aconotoxins of three worm-hunting cone snails (*Conus brunneus*, *Conus nux*, and *Conus princeps*) from the Mexican Pacific coast. *Peptides*, 68, 25–32.
- Mouhat, S., Andreotti, N., Jouirou, B., and Sabatier, J.-M. (2008). Animal Toxins Acting on Voltage-Gated Potassium Channels. *Current Pharmaceutical Design*, 14(24), 2503–2518.
- Nadeem, A., and Hussain, M. (2010). Ion Channels and Channelopathies. *Pak J Physiol*, 6(1), 54–57.
- Nakamura, T., Yu, Z., Fainzilber, M., and Burlingame, A. L. (2008). Mass spectrometric-based revision of the structure of a cysteine-rich peptide toxin with γ -carboxyglutamic acid, TxVIIA, from the sea snail, *Conus textile*. *Protein Science*, 5(3), 524–530.
- Norton, R. S., and Olivera, B. M. (2006). Conotoxins down under. *Toxicon*, 48(7), 780–798.
- Nybakken, J. (1970). Radular anatomy and systematics of the West American Conidae. In *American Malacological Bulletin* (Vol. 2414). American Museum of Natural History.
- Ogata, N., and Ohishi, Y. (2002). Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Japanese Journal of Pharmacology*, 88(4), 365–377.
- Olivera, B. M. (1997). Conus Venom Peptides, Receptor and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50 Million Years of Neuropharmacology. *Molecular Biology of the Cell*, 8(11), 2101–2109.
- Olivera, B. M. (2002). Conus Venom Peptides: reflections from the biology of clades and species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(1), 25–47.
- Olivera, B. M., and Cruz, L. J. (2001). Conotoxins, in retrospect. *Toxicon*, 39(1), 7–14.
- Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G., and Latorre, R. (2002). New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 17, 156–161.
- Petkov, G. V. (2014). Central role of the BK channel in urinary bladder smooth muscle physiology and pathophysiology. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307(6), R571–R584.

- Pringos, E., Vignes, M., Martinez, J., and Rolland, V. (2011). Peptide neurotoxins that affect voltage-gated calcium channels: A close-up on ??-agatoxins. *Toxins*, 3(1), 17–42.
- Querellou J, Borresen T, Boyen C, Dobson A, Höf le M, Ianora A, Jaspars M, Kijjoa A, Olafsen J, and Rigos G. Marine biotechnology: realising the full potential of Europe. VLIZ Special Publication 2010; 47:21. Raja Rayan, D. L., & Hanna, M. G. (2010). Ion Channels and Human Disorders. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Raković, D., and Djordjević, D. (2006). Ionic Channels. In *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- O.M.S. (2005). *Preventing Chronic Diseases. A vital Investment. World Health Organization*.
- Sansom, M. S. P., Shrivastava, I. H., Bright, J. N., Tate, J., Capener, C. E., and Biggin, P. C. (2002). Potassium channels : structures , models , simulations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1565, 294–307.
- Snutch, T. (2009). Voltage-gated calcium channels. *Elsevier*.
- Solís, H., López-Hernández, E., and Cortés-Gasca, D. (2008). La excitabilidad neuronal y los canales de potasio. *Neuroscience*. 13(3), 195–201.
- Tenorio, M. (2013). *Conus princeps*. In IUCN Red List of Threatened Species. Recuperado de: <https://www.marinespecies.org>
- Terlau, H., and Olivera, B. M. (2004). Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, 84(1), 41–68.
- Thapa, P., Espiritu, M. J., Cabalteja, C. C., and Bingham, J. P. (2014). Conotoxins and their regulatory considerations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 70(1), 197–202.
- Triggle, D. J. (2003). Drug targets in the voltage-gated calcium channel family: why some are and some are not. *Assay and Drug Development Technologies*, 1(5), 719–733.
- Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419(6902), 35–42.
- Yu, F. H., and Catterall, W. a. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4(3), 207.
- Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. a, and Catterall, W. a. (2005). Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 387–395.

- Yusaf, S. P., Goodman, J., Pinnock, R. D., Dixon, a K., and Lee, K. (2001). Expression of voltage-gated calcium channel subunits in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett*, 311(2), 137–141.
- Zugasti-Cruz, A., Maillo, M., López-Vera, E., Falcón, A., Cotera, E. P. H. D. La, Olivera, B. M., and Aguilar, M. B. (2006). Amino acid sequence and biological activity of a γ -conotoxin-like peptide from the worm-hunting snail *Conus austini*. *Peptides*, 27(3), 506–511.