



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DE
TOXINAS CONTENIDAS EN LOS CONDUCTOS VENENOSOS
DE *Conus austini*”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALFREDO TORRES CORNEJO

DIRIGIDA POR

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2007.

No. Adq. H72913

No. Título _____

Clas IS. 594.32

T693 c



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DE
TOXINAS CONTENIDAS EN LOS CONDUCTOS VENENOSOS
DE *Conus austini*”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALFREDO TORRES CORNEJO

DIRIGIDA POR

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SINODALES

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

DIRECTOR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SINODAL

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SINODAL

A mi familia, por su fe confianza en mi y apoyo incondicional que me brindaron durante mi carrera y la realización de la misma.

A mi novia por su amor y apoyo que me brinda todo el tiempo.

A mis amigos por su gran amistad que me brindan día a día.

Agradecimientos

Al CONACYT por su apoyo a través del proyecto SEP-2004-C01-47432, otorgado a la Dra. Alejandra Molina Rojas del Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales.

Al SNI por su generosa aportación, mediante el apoyo económico como Ayudante de Investigador Nivel III a través del Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera con expediente, 18705 del Laboratorio de Neurofarmacología Marina de INB, UNAM.

Al CONACYT por su apoyo a través del proyecto 41477-Q, otorgado al Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera del Laboratorio de Neurofarmacología Marina, INB, UNAM.

Al CONACYT por su apoyo a través del proyecto 43754-Q, otorgado al Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez del Laboratorio de Neurofarmacología Marina, INB, UNAM.

Agradecimientos Especiales

A la Dra. Alejandra Molina Rojas del Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, UAQ. Por su dedicación, entrega, confianza y paciencia en la dirección de esta investigación para poder culminarla exitosamente.

Al Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera del Laboratorio de Neurofarmacología Marina, INB, UNAM. Por darme la oportunidad de colaborar con él en su equipo de trabajo, por su gran apoyo y por su paciencia.

Al Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez del Laboratorio de Neurofarmacología Marina, INB, UNAM. Por su espíritu investigador y su apreciable apoyo, por quien siento una gran admiración y por su valiosa cooperación en el desarrollo de este trabajo.

Al Biólogo Experimental Andrés Falcón del Laboratorio de Neurofarmacología Marina, INB, UNAM. Por haberme facilitado el apoyo y materiales, los cuales fueron indispensables para la realización de este proyecto.

Al Dr. César Ibarra Alvarado del Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, UAQ. Por su apoyo, ideas y correcciones de este trabajo de investigación.

Al Dr. Carlos Regalado González del Laboratorio de Biotecnología, UAQ. Por sus apreciables observaciones y apoyo incondicional en la elaboración de este trabajo de investigación.

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Caracoles del género <i>Conus</i>	3
II.1.1 Aparato venenoso de los caracoles del género <i>Conus</i>	5
II.2 Conotoxinas	7
II.3 Estudios realizados sobre la especie <i>C. austini</i>	12
II.4 Sistema Nervioso Entérico	18
II.4.1 Definición y función del SNE	18
II.4.2 Principales canales iónicos que regulan la excitabilidad de las neuronas del SNE	19
II.4.2.1 Canales de sodio voltaje-dependientes	19
II.4.2.2 Canales de K ⁺ activados por calcio	20
II.4.2.3 Otros canales iónicos localizados en las neuronas del SNE: canales iónicos sensibles al ácido (acid-sensing ion channels; ASICs)	20
II.4.3 Neurotransmisores y neuromoduladores presentes en el SNE y sus respectivos receptores	20
II.4.3.1 Acetilcolina (ACh)	21
II.4.3.2 Trifosfato de Adenosina (ATP)	22
II.4.3.3 Serotonina (5-hidroxi-triptamina)	22
II.4.3.4 Histamina	23
II.4.3.5 Óxido Nítrico	23
II.4.3.6 Ácido γ -aminobutírico (GABA)	24
II.4.3.7 Ácido glutámico	24
II.4.3.8 Dopamina	24
II.4.3.9 Noradrenalina (NA)	24

II.4.3.10 Somatostatina	24
II.4.3.11 Polipéptido vasoactivo intestinal (VIP)	25
II.4.3.12 Neuropeptido Y	25
II.4.4 Receptores a otros mensajeros químicos localizados en el SNE	25
II.4.4.1 Receptores al factor liberador de corticotropina	25
II.4.4.2 Receptores a cannabinoides	26
II.4.4.3 Receptores a prostaglandinas	26
II.5 Contracción espontánea del músculo liso intestinal	26
II.6 Modelo de íleon aislado de cobayo	27
II.7 Justificación	28
III. HIPÓTESIS	29
IV. OBJETIVOS	30
IV.1 General	30
IV.2 Específicos	30
V. METODOLOGÍA	31
V.1 Recolección de los especímenes de <i>C. austini</i>	31
V.2 Extracción del veneno	32
V.3 Estudio bioquímico biodirigido del extracto de los ductos del aparato venenoso de <i>C. austini</i> .	33
V.3.1 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de los ductos	33
V.3.2 Separación y purificación de las toxinas	34
V.3.3 Ensayo de íleon aislado de cobayo	34
V.3.4 Secuenciación del péptido C as 4.2.2	35
VI. RESULTADOS	37
VI.1 Obtención del extracto crudo	37
VI.2 Estudio bioquímico biodirigido del extracto crudo preparado a partir de los ductos del aparato venenoso de <i>C. austini</i> y purificación de los péptidos bioactivos.	37
VI.3 Determinación de la estructura primaria del péptido C as 4.2.2	42
VII. DISCUSIÓN	43

VIII. CONCLUSIONES

50

IX. BIBLIOGRAFÍA

51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación de las conotoxinas.	8
2	Clasificación de conopéptidos que no son ricos en enlaces disulfuro.	9
3	Conotoxinas en estudio.	12
4	Inhibición de las contracciones espontáneas de íleon aislado de cobayo inducida por los extractos totales de los ductos y los bulbos <i>C. austini</i> .	14
5	Secuencia de péptidos aislados de <i>C. austini</i> .	14
6	Fracciones y péptidos obtenidos a partir del fraccionamiento cromatográfico de los extractos crudos de los bulbos y los ductos de <i>C. austini</i> .	16
7	Principales neurotransmisores del SNE y sus receptores.	21
8	Contenido total de proteína en el extracto preparado a partir de los ductos de los especímenes de <i>C. austini</i> .	37
9	Fracciones y péptidos obtenidos a partir del fraccionamiento cromatográfico del extracto crudo de los ductos de <i>C. austini</i> .	42
10	Conopéptidos que no contienen residuos de Cys.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Familias que conforman la Superfamilia Conoidea.	4
2	Caracol <i>C. striatus</i> acechando a su presa.	4
3	A) Caracol <i>Conus</i> en vista lateral; el esquema inferior enfatiza el pie muscular que le sirve para desplazarse. B) Aparato venenoso esquematizado de los caracoles <i>Conus</i> . C) Dientes radulares.	6
4	Imagen tridimensional del ziconotide.	11
5	Efecto de los extractos preparados a partir de los A) ductos y B) bulbos de <i>C. austini</i> sobre las contracciones espontáneas del Íleon aislado de cobayo.	13
6	Gel de electroforesis de las proteínas purificadas G as 34.21A y G as 42.21A.	17
7	Especímenes utilizados para el análisis.	31
8	Aparato venenoso de <i>C. austini</i> .	32
9	Diagrama de flujo de la metodología realizada en este proyecto.	36
10	Fraccionamiento cromatográfico primario del extracto crudo de los ductos del aparato venenoso de <i>C. austini</i> .	38
11	Cromatograma de la fracción C as 4 obtenida a partir del fraccionamiento primario del extracto crudo de los ductos de <i>C. austini</i> . Se señalan las dos fracciones obtenidas: C as 4.1 y C as 4.2.	39
12	Cromatograma de la fracción C as 4.2. Se observan dos picos correspondientes a los péptidos C as 4.2.1 y C as 4.2.2.	40
13	Efecto del péptido C as 4.2.2 (0.01 µg/mL) sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo.	41
14	Efecto del péptido C as 4.2.1 (0.01 µg/mL) sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo.	41
15	Cromatograma correspondiente al fraccionamiento del extracto crudo preparado a partir de los bulbos del aparato venenoso de <i>C. austini</i> .	44

RESUMEN

Recientemente, se demostró que el extracto de los ductos del aparato venenoso de *Conus austini*, inhibía las contracciones espontáneas del ileon aislado de cobayo. Estos resultados sugieren que los ductos contienen péptidos que tienen efecto sobre el Sistema Nervioso Entérico (SNE) o la musculatura lisa intestinal. Considerando que a la fecha se desconoce la identidad de los péptidos bioactivos, se planteó la presente tesis con el objeto de purificar y determinar la estructura primaria de algunos de estos péptidos. El análisis cromatográfico del extracto obtenido de los ductos de 13 especímenes de *C. austini* permitió la purificación de dos péptidos denominados C as 4.2.1 y C as 4.2.2. El péptido C as 4.2.2 indujo un efecto excitatorio en el ileon, en tanto que C as 4.2.1 no modificó las contracciones de este tejido. El análisis por degradación de Edman mostró que C as 4.2.2 es un péptido y reveló 15 aminoácidos de su secuencia: ?VGQGGTQRSTDQTA. La identidad del aminoácido correspondiente a la porción amino terminal no se pudo determinar. Asimismo, existen dudas acerca de la identidad de los aminoácidos en las posiciones 6, 7, 8 y 11. Sin embargo, se espera que el análisis por espectrometría de masas de este péptido proporcione información que ayude a identificar, de manera inequívoca, dichos aminoácidos. Las evidencias sugieren que el péptido purificado no contiene ningún residuo de Cys, lo cual indica que no pertenece a ninguno de los grupos de conotoxinas identificados a la fecha. Su estructura tampoco corresponde con la estructura de los conopéptidos que carecen de Cys. De tal manera, que es muy probable que C as 4.2.2 constituya una nueva clase de conopéptidos bioactivos.

I. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas dos décadas se ha incrementado notablemente la investigación de compuestos naturales con actividad biológica, y aunque tradicionalmente la búsqueda de sustancias bioactivas se había concentrado en el estudio de plantas, la obtención de sustancias orgánicas con actividad biológica aisladas de organismos marinos, ha mostrado el gran potencial que presentan estos compuestos en el campo de la farmacología. Recientemente, el descubrimiento de compuestos bioactivos derivados de invertebrados marinos venenosos ha estimulado la exploración de un nuevo campo de investigación, cuyo enfoque se centra en la búsqueda de fármacos provenientes del mar.

Entre los invertebrados marinos productores de compuestos con actividad biológica destacan los gasterópodos de la superfamilia Conoidea (Conacea), integrada por caracoles marinos de las familias Conidae, Costerallidae, Mitridae, Terebridae, Turridae y Olividae, cuyos miembros, todos carnívoros venenosos, se caracterizan por poseer un sofisticado sistema de inyección de veneno a la presa. Este veneno es de acción rápida, potente y específica. Las aguas territoriales mexicanas albergan una amplia variedad de especies marinas. Desafortunadamente, en México se han realizado muy pocos estudios sistemáticos tendientes a determinar el potencial farmacológico de estos organismos marinos.

Asimismo, son muy escasas las investigaciones bioquímicas realizadas con el objeto de aislar y caracterizar sus principios activos. De manera particular, los mares de los litorales mexicanos son hábitat de un gran número de especies de gasterópodos, muchos de los cuales ni siquiera han sido identificados científicamente. Recientemente, se efectuó una evaluación farmacológica de *Conus austini*, un caracol recolectado en el Golfo de México y los resultados obtenidos demostraron que los extractos, tanto de los bulbos como de los ductos del aparato

venenoso de esta especie, inducen una inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. Los resultados derivados de esta evaluación farmacológica previa indican que *C. austini* representa una fuente potencial valiosa de péptidos novedosos que merece explorarse. Vale la pena mencionar que el único estudio bioquímico reportado previamente sobre esta especie condujo a la purificación de 5 péptidos, que incluyen una nueva γ -conotoxina que presenta toxicidad sobre el caracol de agua dulce *Pomacea paludosa*. Sin embargo, a la fecha se desconoce la identidad de los péptidos que presentan el efecto farmacológico observado en el modelo de íleon aislado de cobayo.

Desde esta perspectiva, surgió la idea de desarrollar el presente proyecto de tesis que tuvo por objeto realizar el estudio bioquímico biodirigido del extracto crudo obtenido a partir de los ductos del aparato venenoso de *C. austini* a fin de purificar los péptidos que modifican la contractilidad del íleon aislado de cobayo y determinar su estructura primaria.

II. ANTECEDENTES

II.1 Caracoles del género *Conus*

Algunos animales venenosos utilizan sustancias tóxicas para capturar a sus presas. Los escorpiones, serpientes, arañas y algunos invertebrados marinos producen venenos que actúan rápidamente al ser aplicados a sus víctimas. Las toxinas de estos animales venenosos actúan rápidamente debido a que contienen compuestos cuyos blancos de acción son canales iónicos y receptores del sistema nervioso y/o muscular, los cuales son responsables de la regulación de un gran número de procesos fisiológicos en todo organismo. La potencia de muchas de estas toxinas se relaciona con su alta especificidad para interferir con los procesos celulares, por lo que muchas de ellas han sido utilizadas como herramientas experimentales para probar rutas y mecanismos bioquímicos de células excitables (Adams y Olivera, 1994) y como prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos (Miljanich, 1997).

Entre los invertebrados marinos que producen venenos, destacan los caracoles marinos venenosos, de los cuales se sabe que existen cerca de 500 géneros que contienen a diferentes órdenes y familias. Sin embargo, menos de 2 docenas de estas especies causan envenenamiento en humanos (Cruz y col., 2000). Con relación a los caracoles venenosos productores de neurotoxinas naturales destacan los gasterópodos marinos de la superfamilia Conoidea (Conacea), la cual incluye las familias Conidae, Costerallidae, Mitridae, Terebridae, Turridae y Olividae (ver Figura 1) (Olivera, 2002).

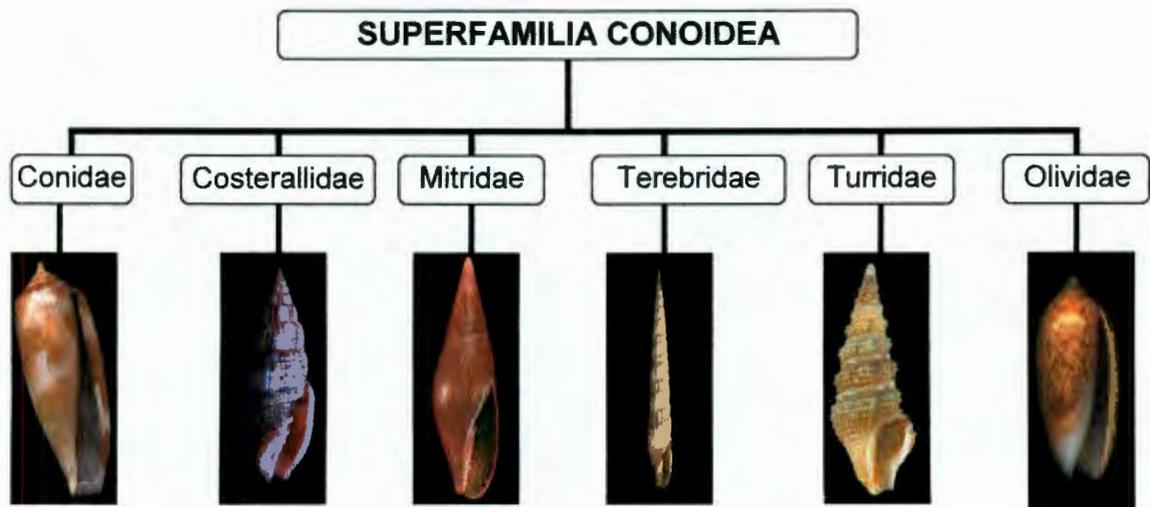


Figura 1. Familias que conforman la Superfamilia Conoidea.

El género *Conus* (Phylum: Mollusca; Clase: Gastropoda; Orden: Neogastropoda; Suborden: Toxoglossa; Superfamilia: Conoidea (Conacea); Familia: Conidae; Género: *Conus*) contiene alrededor de 500 especies que se encuentran ampliamente distribuidas en aguas tropicales y constituyen unos de los organismos más dominantes de depredadores en los arrecifes coralinos (Olivera y col., 1985). De hecho, las especies piscívoras de este género representan los únicos caracoles conocidos que se alimentan de vertebrados (Kohn, 1956). En la Figura 2 se muestra una fotografía del *C. striatus*, una especie piscívora.



Figura 2. Caracol *C. striatus* acechando a su presa.

Los caracoles del género *Conus* se alimentan de noche y sus presas incluyen gusanos marinos, cefalópodos, otros gasterópodos, bivalvos, peces y crustáceos. Para alimentarse, envenenan a sus presas mediante la inyección de toxinas, a través de un diente hueco y desechable ubicado al final de la probóscide (Kohn y col., 1972). Las toxinas actúan rápidamente y su especificidad depende del tipo de organismo con el que se alimenta. De tal forma, que las especies piscívoras como *C. purpurascens* producen venenos que paralizan a los peces de inmediato (Terlau y col., 1996).

II.1.1 Aparato venenoso de los caracoles del género *Conus*

Los caracoles del género *Conus* han desarrollado diversas adaptaciones para detectar, emboscar y capturar a sus presas. Los caracoles cazan de noche y cuando olfatean una presa, por medio del osfradio (órgano olfativo localizado en el sifón), extienden la probóscide, en cuya punta se encuentra colocado un diente radular (Figura 3A). El diente es insertado en el cuerpo de la presa/depredador y el veneno es inyectado (Kohn, 1956; Halstead, 1988).

El aparato venenoso de los caracoles del género *Conus* se considera como una de las estructuras anatómicas más complejas y sofisticadas para inyectar un veneno. Este aparato (Figura 3B), consiste de un conducto en donde se sintetiza y almacena el veneno; un bulbo muscular, que se cree transfiere el veneno desde el conducto hacia la probóscide y, lo más sorprendente, un diente en forma de arpón que sujeta a la presa y sirve también como una aguja hipodérmica para inyectar el veneno (Figura 3C).

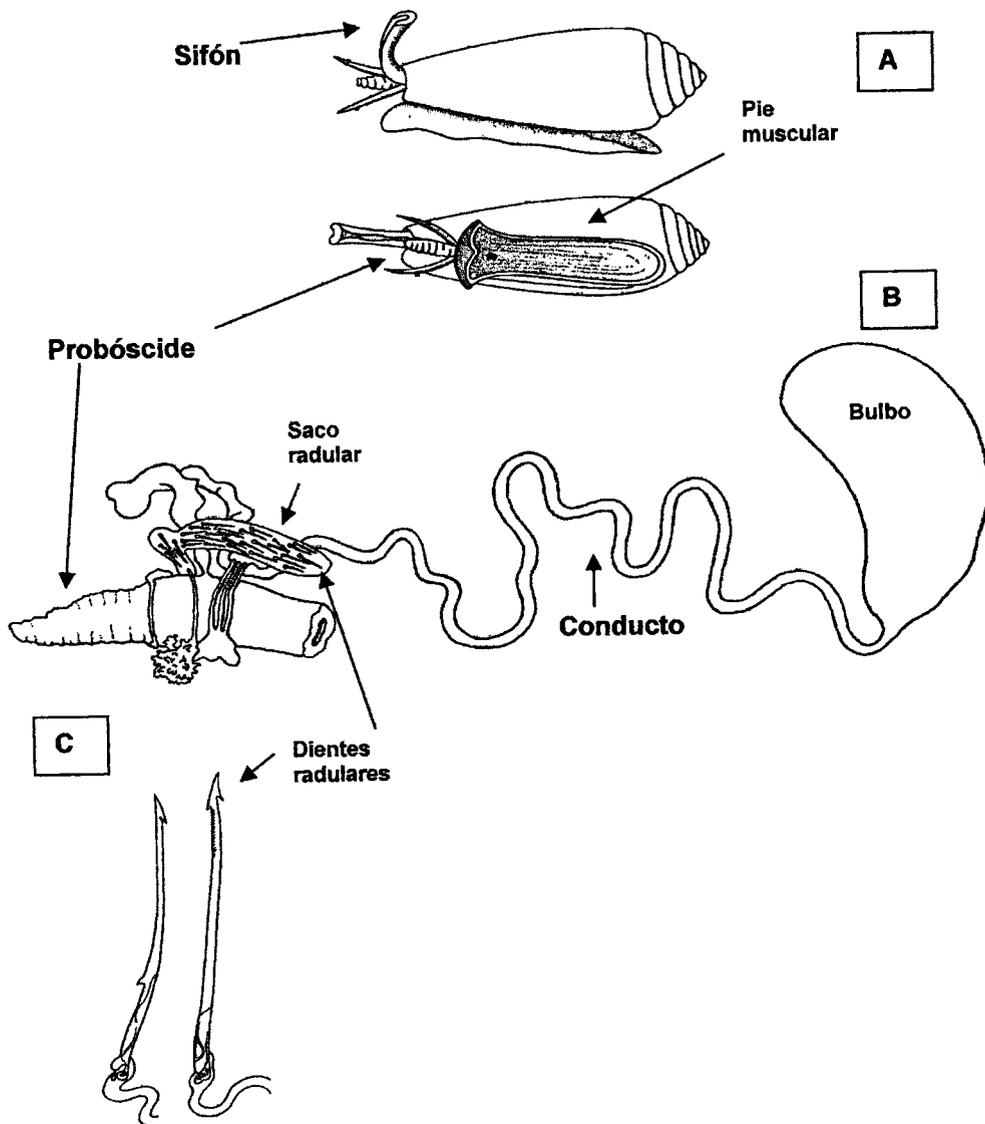


Figura 3. A) Caracol *Conus* en vista lateral; el esquema inferior enfatiza el pie muscular que le sirve para desplazarse. B) Aparato venenoso esquematizado de los caracoles *Conus*. C) Dientes radulares.

La producción e inyección del veneno de *Conus* involucra tres pasos:

- 1) Síntesis, procesamiento y empaque de las toxinas peptídicas en el conducto.
- 2) Generación y almacenaje de los dientes radulares en el saco radular y transferencia de un solo diente a la punta de la probóscide.
- 3) Inserción final del diente y la inyección del veneno (Marshall y col., 2002).

II.2 Conotoxinas

Los venenos de los caracoles del género *Conus* son extremadamente complejos, ya que se ha estimado que el veneno de una sola especie puede contener entre 50 a 200 diferentes componentes (Jones y col., 1996), los cuales incluyen enzimas que facilitan la invasión tisular y toxinas peptídicas que interactúan con receptores celulares específicos membranales y canales iónicos. Las toxinas son principalmente usadas para sedar, inmovilizar y matar a las presas, aunque también son utilizadas como sistema de defensa (Olivera, 2002). Con respecto a las toxinas peptídicas producidas por las especies de *Conus*, éstas se han denominado conopéptidos, los cuales se clasifican en 2 grupos principales: los péptidos que no tienen puentes disulfuro o sólo tienen uno y los péptidos que contienen varios puentes disulfuro. Estos últimos se denominan, de manera genérica, "conotoxinas" (McIntosh y col., 1999; Olivera, 2002).

Las conotoxinas constituyen los principales compuestos neurotóxicos presentes en los venenos de los caracoles del género *Conus*. Estas toxinas son polipéptidos pequeños que contienen una alta proporción de cisteínas, separadas por 0-6 aminoácidos (Gehrmann y col., 1998). La mayoría de las conotoxinas presentan de 1 a 4 puentes disulfuro, lo cual les confiere una conformación molecular rígida y estable. Considerando el arreglo de las cisteínas, las conotoxinas se han clasificado en diferentes superfamilias, las cuales se dividen a su vez en familias que abarcan conotoxinas con un mismo blanco farmacológico de acción (Olivera, 1997; Olivera y Cruz, 2001). En la actualidad se conocen 14 superfamilias de conopéptidos, entre las que se incluyen 8 superfamilias de conotoxinas (Cuadro 1) y 6 superfamilias de toxinas que incluyen las conopresinas, las conantoquinas, las contulaquinas, los contrifanos, las conorfamidas y las konkunitzinas (Cuadro 2).

Cuadro 1. Clasificación de las conotoxinas (Armishaw y Alewood, 2005; Olivera, 2006).

SUPER FAMILIA	FAMILIA	NOMBRE	SECUENCIA	CISTEÍNAS	SITIO DE ACCION
A	α	GI	ECCNPACGRHYS	CC-C-C	Inhibidor de nACh-R
	αA	PnIA	GCCSLPPCAANNPDYC	CC-C-C	Inhibidor de nACh-R
	αA	PIVA	GCCGSYONAACHOCSCKD ROSYCGQ	CC-C-C-C-C	Inhibidor de nACh-R
	κA	MIVA	AO γ LVV τ A τ TNCCGYNOMTI COOCMCTYSCOORRKO	CC-C-C-C-C	Inhibidor de canales de K ⁺ voltaje-dependientes
T	ρ	TIA	FNWRCCLIPACRRNHKKFC	CC-C-C	Inhibidor del $\alpha 1A$ -adrenoreceptor
	χ	MrIA	NGVCCGYKLCHOC	C-C-CPC	Inhibidor del transportador neuronal de noradrenalina
	τ	TxIX	γ CC γ AGBCC τ AAO	CC-CC	Inhibidor de canales de Ca ²⁺ voltaje-dependientes
O	ω	CVID	CKSKGAKCSKLMYDCCSG SCSGTVGRC	C-C-CC-C-C	Inhibidor de canales de Ca ²⁺ voltaje-dependientes
	κ	PVIA	CRIONQKCFQHLDDCCSR KCNNRFNKC	C-C-CC-C-C	Inhibidor de canales de K ⁺ voltaje-dependientes
	δ	TxVIA	WCKQSGEMCNVLDQNC DGYCIVFVCT	C-C-CC-C-C	Inhibidor de canales de Na ⁺ voltaje-dependientes
	μO	MrVIA	ACRKKWEYCIVPIIGFIYCC PGLICGPFVVCV	C-C-CC-C-C	Retrasa inactivación de canales de Na ⁺ voltaje-dependientes
M	μ	PIIA	ZRLCCGFOKSCRSRQCKO HRCC	CC-C-C-CC	Inhibidor de canales de Na ⁺ voltaje-dependientes
	ψ	PIIE	HOCCLYGKCRRYOGCSS ASCCQR	CC-C-C-CC	Inhibidor de nAChR
	κM	RIIK	LOSCSLNLRICOVOACKR NOCCT	CC-C-C-CC	Inhibidor de canales de K ⁺ voltaje-dependientes
	γ	PnVIA	DCTSWFGRCTVNS γ CCSN SCDQTYC γ LYAFOS	C-C-CC-C-C	Activador de canales de Na ⁺ tipo marcapaso
P	Espasmódicos	bx9a	MHLSLARSAVLMLLLLFALG NFVVVQSGQITRDVDNGQL TDNRRNLQSKWKPVSLYM SRRGCNNSCQEHSDCESH CICTFRGCGAVNG	C-C-C-C-C-C	No se conoce
I	Excitatorios	r11a	GPSFCKADEKPCYHAD CNCCLSGICAPSTNWILPG CSTSSFFKI	C-C-CC-CC-C-C	No se conoce
	κI	BtXA	CRAEGTYCENDSQCLNE CCWGGCGHPCRHP	C-C-CC-CC-C-C	Modulador del canal de K ⁺ Tipo Baker
S	σ	GVIII	GCTRTCGGOKCTGTCTCT NSSKCGCRYNVHPSGBGC GCACS	C-C-C-C-C-C-C C-C-C	Inhibidor de 5-HT ₃ -R
	αS	RVIII	KCNFDKCKGTGVYNCGES CSCEGLHSCRCTYNIGSMK SGCACICTYY	C-C-C-C-C-C-C C-C-C	Inhibidor de nACh-R
J	Sin designar	pl14a	FPRPRICNLACRAGIGHKY PFCHCR	C-C-C-C	Posible Inhibidor de canales de K ⁺

nACh-R = Receptor Colinergico Nicotínico; 5-HT₃ = Receptor Serotoninérgico.

Cuadro 2. Clasificación de conopéptidos que no son ricos en enlaces disulfuro (Maillo y col., 2002; Armishaw y Alewood, 2005; Bayrhube y col., 2005).

SUPER FAMILIA	NOMBRE	SECUENCIA	CISTEINAS	SITIO DE ACCION
Conkunitzinas	Conkunitzina S-1	KDRPSLCDLPADSGSG TKAEKRIYYNSARKQCL RFDYTGQGGNENFR RTYDCQRTCLYT	C-C-C-C	Inhibidor de canales de K ⁺ voltaje-dependientes
Conopresinas	Conopresina-S	CFIRNCPRG	C-C	Agonista de vasopresina
Contrifanos	Contrifano-R	GCOWEPWC	C-C	Modulador de canal de Ca ²⁺ Tipo L
Conantoquinas	Conantoquina-G	GE γ LQ γ NQ γ LIR γ KSN	No cisteinas	Antagonista glutamatergico de NMDA-R
Contulaquinas	Contulaquina-G	ZSEEGGSNAT γ KKPYIIL	No cisteinas	Antagonista de neurotensina
Conorfamidas	Conorfamida	GPMGWVPVFYRF	No cisteinas	No se conoce

NMDA-R = Receptor Glutamatergico.

Una superfamilia puede tener varias familias con actividades farmacológicas distintas: superfamilia A (α -, α A-, κ A-, y ρ -conotoxinas); superfamilia T (τ - y χ -conotoxinas); superfamilia O (ω -, κ -, δ -, y μ O-conotoxinas); superfamilia M (μ -, y ψ -conotoxinas); superfamilia P (conotoxinas espasmódicas); superfamilia I (κ I-conotoxinas y péptidos excitatorios); superfamilia S (σ - y α S-conotoxinas) y superfamilia J (familia no definida). Con relación a los conopéptidos que no se clasifican como conotoxinas, se encuentran aquellos que tienen un solo enlace disulfuro, que incluyen a las conopresinas y los contrifanos. Por otra parte, las conantoquinas, las contulaquinas y las conorfamidas no contienen cisteína (Terlau y Olivera, 2004). Recientemente, se purificó la conkunitzina S-1 a partir del veneno de *C. striatus*, la cual es un péptido de 60 aminoácidos, que contiene 3 enlaces disulfuro y es un análogo estructural de las proteínas Kunitz, algunas de las cuales han sido caracterizadas como bloqueadoras de canales de K⁺ (Bayrhube y col., 2005).

Con respecto a los mecanismos de acción de las conotoxinas que pertenecen a las diferentes familias, a la fecha se tiene la siguiente información: a)

las α -conotoxinas y las α A-conotoxinas inhiben el receptor nicotínico (Hopkins y col., 1995); b) las κ A-conotoxinas inhiben los canales de K^+ voltaje-dependientes; c) las ρ -conotoxinas inhiben los receptores α 1A-adrenérgicos; d) las $\tilde{\chi}$ -conotoxinas inhiben el transportador neuronal de noradrenalina; e) τ -conotoxinas inhiben los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes; f) las ω -conotoxinas bloquean canales Ca^{2+} neuronales presinápticos regulados por voltaje, evitando la liberación de neurotransmisores; g) las κ -conotoxinas inhiben los canales de K^+ del tipo "Shaker" (Shon y col., 1998); h) las δ -conotoxinas retrasan inactivación de canales de Na^+ a diferencia las μ -conotoxinas, que bloquean canales de Na^+ , que lo hacen en un sitio diferente del canal (Terlau y Olivera, 2004); i) las μ O-conotoxinas bloquean canales de Na^+ activados por voltaje (Daly y col., 2004); j) las μ -conotoxinas bloquean canales de Na^+ en células musculares (Nicke y col., 2004); k) las ψ -conotoxinas inhiben el receptor nicotínico; l) κ M-conotoxinas inhiben los canales de K^+ voltaje-dependientes; m) las γ -conotoxinas son agonistas de canales catiónicos de tipo marcapaso en neuronas (Terlau y Olivera, 2004); n) las κ I-conotoxinas moduladoras de canales de K^+ Tipo Baker; o) las σ -conotoxinas inhiben el receptor serotoninérgico 5-HT₃ (England y col., 1998) y p) las α S-conotoxinas inhiben el receptor nicotínico.

Las características estructurales de las conotoxinas (tamaño pequeño y rigidez) les confieren una alta afinidad y especificidad de unión a canales iónicos o receptores membranales, razón por la cual estos péptidos han resultado ser sumamente útiles como herramientas farmacológicas para el estudio de receptores y canales iónicos. Además, las conotoxinas constituyen prototipos estructurales muy promisorios para el diseño de fármacos con efecto sobre los sistemas nervioso y muscular (Adams y Olivera, 1994; Miljanich, 1997; Olivera, 1997). A este respecto, es importante mencionar los casos de la ω -conotoxina GVIA, aislada a partir de *C. geographus* y de la ω -conotoxina MVIIA, obtenida del veneno de *C.*

magus. La conotoxina GVIA se ha convertido en una herramienta usual para medir la inhibición de la liberación de neurotransmisores inducida por la activación de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes. Este péptido bloquea los canales de Ca^{2+} tipos L y N en las neuronas, pero solamente afecta los canales de Ca^{2+} tipo N en las células musculares (Wang y col., 2000). Por otra parte, la ω -MVIIA conotoxina, un péptido de 25 aminoácidos, bloquea específicamente canales de Ca^{2+} tipo N y es de 100 a 1000 veces más potente que la morfina, la cual constituye el analgésico más potente usado en la actualidad. Además, esta toxina, a diferencia de la morfina, no causa adicción (Atanassoff y col., 2000).

Un ensayo clínico reciente demostró que el ziconotide, un análogo sintético de la ω -MVIIA conotoxina, tiene efectos analgésicos significativos comparado con placebos cuando se administró a pacientes considerados intolerantes o resistentes a otros tratamientos, tales como los analgésicos sistémicos y la morfina intratecal (Staats y col., 2004). Por lo tanto, el ziconotide es otra opción para pacientes con dolor refractario. La desventaja de este fármaco es que se debe administrar por vía intratecal (Prommer, 2005). El ziconotide, cuyo nombre comercial es "PRIALT", fue aprobado para su producción comercial en Junio del 2004 (Figura 4) (Elan Pharmaceuticals, 2004).

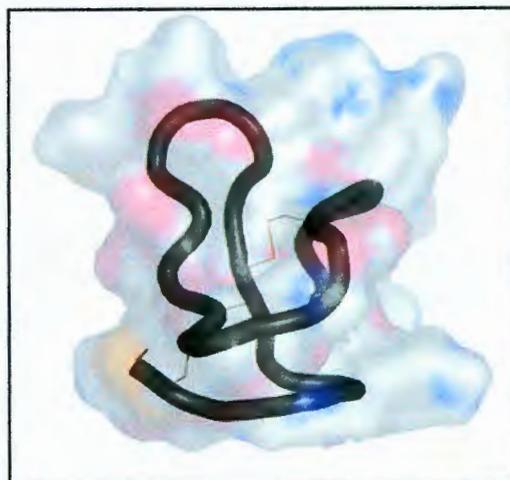


Figura 4. Imagen tridimensional del ziconotide.

En el Cuadro 3, se presentan otros ejemplos de conopéptidos que actualmente están siendo objeto de estudios farmacológicos y que resultan muy promisorios para el desarrollo de nuevos medicamentos.

Cuadro 3. Conotoxinas en estudio (Shen y col., 2000; Nelson, 2004).

CONOPÉPTIDOS	FAMILIA	ESPECIE	APLICACIÓN	ETAPA CLÍNICA	COMPAÑÍA
Vc1.1	α	<i>C. victoriae</i>	Dolor neuropático	Preclínica	Metabolic (Australia)
CVID	ω	<i>C. catus</i>	Dolor neuropático	Fase II	Amrad (Australia)
MriA/B	χ	<i>C. marmoreus</i>	Dolor neuropático	Preclínica	Xenome (EUA)
Contulaquina-G	Contulaquina	<i>C. geographus</i>	Dolor Crónico	Fase II	Cognetix (EUA)
Conantoquina-G	Conantoquina	<i>C. geographus</i>	Epilepsia	Preclínica	Cognetix (EUA)

II.3 Estudios realizados sobre la especie *C. austini*

En un estudio realizado recientemente, se evaluó el efecto de los extractos de los bulbos y de los ductos del aparato venenoso de gasterópodos marinos de las familias Conidae y Turridae, recolectados en aguas territoriales de México, con el fin de identificar candidatos idóneos para la obtención de compuestos con actividad sobre el sistema nervioso y/o muscular. Las especies seleccionadas fueron *C. austini*, *C. spurius* y *Polystira albida*. En este trabajo se encontró que los extractos, tanto de bulbos, como de ductos del aparato venenoso de *C. austini* (evaluados en un rango de 0.001 a 1 mg de proteína/mL) produjeron una inhibición, dependiente de la concentración, de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo (Feregrino, 2004).

El efecto inhibitorio inducido por ambos extractos se presentó de manera inmediata después de la aplicación del extracto y se caracterizó por una disminución en la amplitud y en el tono basal de las contracciones normales del íleon. La respuesta máxima inhibitoria se observó aproximadamente a los 8.5-9 min después de la aplicación del extracto de los ductos, independientemente de la

concentración aplicada. En tanto que el efecto presentado por el extracto de los bulbos indujo una inhibición máxima de aproximadamente 7 min después de la aplicación del extracto, también de manera independiente de la concentración (Figura 5) (Feregrino, 2004). El efecto relajante de la musculatura lisa intestinal producido por ambos extractos fue reversible después de lavar el íleon con la solución de Krebs-Henseleit. De tal forma que después de 8 lavados, se observó una recuperación de un 70% a un 80% de las contracciones normales (Feregrino, 2004).

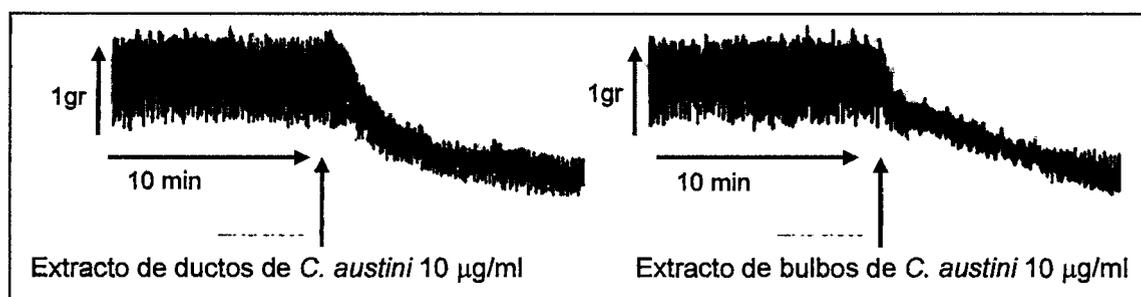


Figura 5. Efecto de los extractos preparados a partir de los A) ductos y B) bulbos de *C. austini* sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo.

Se construyeron las respectivas curvas concentración-respuesta obtenidas para el efecto inhibitorio producido por ambos extractos. A partir de estas curvas se obtuvieron los valores de las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) y los efectos máximos (E_{max}) para cada uno de los extractos de bulbos y ductos (Cuadro 4). El valor promedio de la CI_{50} calculado para el efecto de los bulbos fue de $0.593 \pm 0.094 \mu\text{g/ml}$. En tanto que el valor promedio de la CI_{50} calculado para los ductos fue de $0.972 \pm 0.068 \mu\text{g/ml}$. Estos datos indicaron que el extracto de los bulbos es aproximadamente 1.6 veces más potente que el extracto obtenido de los ductos. Asimismo, se observó que el extracto de los bulbos resultó ser aproximadamente 215 veces menos potente que la tetrodotoxina (TTX) para inducir un efecto relajante de la musculatura lisa intestinal. Por otra parte, el extracto de los ductos fue aproximadamente 352 veces menos potente que el control positivo (Feregrino, 2004).

Cuadro 4. Inhibición de las contracciones espontáneas de fleón aislado de cobayo inducida por los extractos totales de los ductos y los bulbos *C. austini*.

SUSTANCIA O EXTRACTO DE PRUEBA	CI ₅₀ (µg/ml)	E _{max} (%)	POTENCIA
TTX	0.002763 ± 0.0019	78.71 ± 4.978	1.00
Ductos	0.97265 ± 0.06834	65.9233 ± 1.7203	0.00284
Bulbos	0.59307 ± 0.09476	70.095 ± 1.60128	0.00465

Los valores son los promedios ± SE; n = 6 (95% intervalo de confianza).
La potencia se obtuvo mediante la fórmula: Potencia = CI₅₀ TTX/ IC₅₀ extracto, asumiendo un valor de 1.00 para TTX.

Más recientemente, se realizó el estudio bioquímico del extracto preparado a partir de los ductos del aparato venenoso de *C. austini*. En este trabajo se purificaron 5 péptidos por cromatografía líquida de alta resolución, que fueron denominados: as7a, asB, as14a, as14b y as15a. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos purificados se determinaron por diferentes técnicas: reducción y alquilación, composición de aminoácidos y secuenciación automática de Edman. Las secuencias obtenidas de los péptidos purificados, se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 5. Secuencia de péptidos aislados de *C. austini*.

PÉPTIDO	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
as15a	CKCPSCNFNDVTENCKCCIFRQP
asB	SLYSOWK γ KM $\gamma\gamma$ AAGGQ...
as7a	TCKQKGEGCSLDVγCCSSSCKPGGPLDFC
as14a	GGVGRCIYNCMNSGGGLNFIQCKTMCY
as14b	RWDVDQCIYYCLNGVVGYSYTECQTMCS

γ = γ -carboxiglutamato.

La conotoxina as15a presentó un nuevo patrón de cisteínas: C-C-C-C-CC y provocó síntomas paralíticos en el sistema nervioso central del ratón. De igual forma, las toxinas as14a y as14b provocaron alteraciones en la conducta de ratones y tuvieron un patrón de cisteínas que no había sido encontrado en

caracoles vermívoros, con un arreglo de cisteínas: C-C-C-C. El péptido asB no presentó cisteínas, pero presentó un alto contenido de residuos de γ -carboxiglutamato (Zugasti, 2005). Por último, se caracterizó un péptido (as7a) similar a las γ -conotoxinas. Esta es la segunda toxina de esta familia que se caracteriza de un caracol vermívoro. Este péptido causó síntomas tóxicos en el molusco *Pomacea paludosa*, cuando se administró por vía intramuscular. Sin embargo, no provocó ningún efecto cuando se administró por vía intracerebral en ratones (Zugasti-Cruz y col., 2006).

Considerando los resultados de la evaluación farmacológica realizada con los extractos, de los bulbos y los ductos de *C. austini*, empleando el modelo de íleon aislado de cobayo, en 2006, nuestro grupo de trabajo inició un estudio bioquímico biodirigido de los extractos preparados a partir de los bulbos y ductos de *C. austini*. En esa ocasión, se seleccionaron 10 especímenes de *C. austini*, los cuales fueron recolectados en la misma fecha en que se recolectaron los caracoles que fueron objeto de estudio de la presente tesis. Se disectaron los bulbos y los ductos del aparato venenoso de los caracoles y se prepararon los correspondientes extractos. Posteriormente, se procedió a realizar su estudio bioquímico biodirigido utilizando el modelo de íleon de cobayo para monitorear la actividad farmacológica. En primer término, se realizó el fraccionamiento primario de los extractos, mediante HPLC. Ese fraccionamiento permitió la obtención de ocho fracciones primarias a partir del extracto de los bulbos y cinco fracciones primarias a partir del extracto de los ductos. El análisis cromatográfico indicó que tanto el extracto de bulbos, como el extracto de los ductos presentaban una gran complejidad en el contenido de péptidos. Además, se puso en evidencia que los péptidos contenidos en el extracto de bulbos eran diferentes a los que se encontraban en el extracto preparado a partir de los ductos (Hernández, 2006). Tomando en cuenta, la cantidad de proteína disponible, se seleccionaron las fracciones G as 34 y G as 42 del extracto de los bulbos y la fracción C as 14 (correspondiente a la fracción que en la presente tesis

se denominó C as 4) del extracto de los conductos para su subsiguiente análisis cromatográfico. El análisis cromatográfico de las fracciones primarias seleccionadas permitió la obtención de varias fracciones secundarias, las cuales se evaluaron en el modelo de íleon aislado de cobayo (Cuadro 6) (Hernández, 2006).

Cuadro 6. Fracciones y péptidos obtenidos a partir del fraccionamiento cromatográfico de los extractos crudos de los bulbos y los conductos de *C. austini* (Hernández, 2006).

EXTRACTOS CRUDOS	FRACCIONES PRIMARIAS	FRACCIONES SECUNDARIAS	PÉPTIDOS PURIFICADOS
BULBOS (G as)	G as 5		
	G as 8		
	G as 28		
	G as 31		
	G as 33		
	G as 34*	G as 34.16*	G as 34.16A
		G as 34.21*	G as 34.21A G as 34.21B
	G as 38		
	G as 42*	G as 42.21*	G as 42.21A
		G as 42.26	
G as 42.28			
G as 42.32*			
DUCTOS (C as)	C as 12		
	C as 14*	C as 14.8	
		C as 14.10	
		C as 14.12*	
		C as 14.13	
		C as 14.14	
		C as 14.15	
		C as 14.16	
	C as 16		
	C as 19		
C as 20			

*Fracciones que mostraron actividad en el modelo de íleon aislado de cobayo.

Desafortunadamente, en esa ocasión no quedó cantidad de proteína suficiente de las fracciones G as 42.32 y C as 14.12 y por esta razón no fue posible continuar con su análisis. Por otra parte, sí fue posible seguir con el estudio de las fracciones G as 34.16, G as 34.21 y G as 42.21 (Hernández, 2006).

El análisis cromatográfico, mediante HPLC, de las fracciones G as 34.16, G as 34.21 y G as 42.21 permitió la separación de cuatro péptidos: el péptido denominado G as 34.16A (purificado de la fracción G as 34.16); los péptidos G as 34.21A y G as 34.21B (purificados de la fracción G as 34.21) y el péptido G as 42.21A (purificado de la fracción G as 42.21). De los cuatro péptidos purificados, no quedó proteína suficiente para realizar un análisis de secuenciación y sólo fue posible hacer un análisis por gel de electroforesis de G as 34.21A y G as 42.21A (Figura 6) (Hernández, 2006).

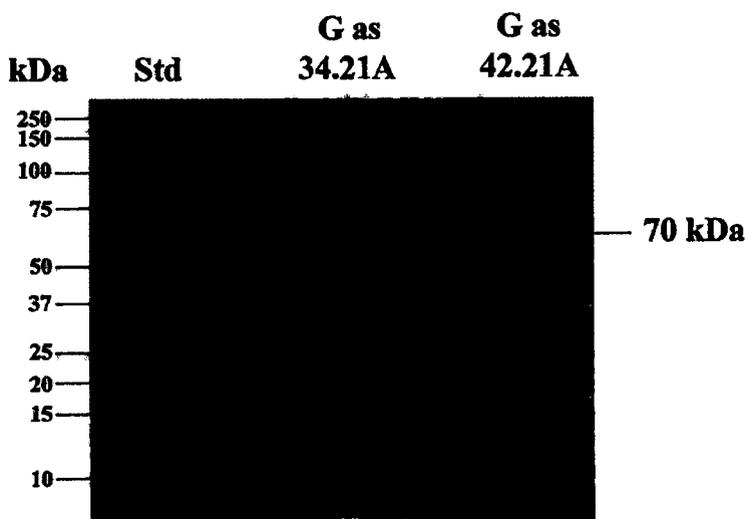


Figura 6. Gel de electroforesis de las proteínas purificadas G as 34.21A y G as 42.21A.

El gel de electroforesis demostró que G as 34.21A y G as 42.21A, purificados a partir de los bulbos del aparato venenoso de *C. austini*, son proteínas con pesos moleculares en el rango de 70 kDa, lo cual implicaba que tenían aproximadamente

700 residuos de aminoácidos. Estos datos sugerían que los bulbos del aparato venenoso de *C. austini* contenían proteínas bioactivas, que eran diferentes de las toxinas hasta entonces purificadas a partir de los ductos de las especies *Conus*, las cuales en su gran mayoría son polipéptidos de bajo peso molecular que contienen una alta proporción de cisteínas en su estructura (Gehrmann y col., 1998).

En resumen, a partir del estudio bioquímico biodirigido sobre los extractos de bulbos y ductos del aparato venenoso de *C. austini*, fue posible detectar la presencia de 4 péptidos con posible efecto sobre la contractilidad del ileon. De acuerdo a los datos proporcionados por el análisis de electroforesis, dos de esos péptidos, podrían constituir un nuevo tipo de toxinas con efecto sobre receptores y/o canales iónicos localizados en las membranas de las neuronas del Sistema Nervioso Entérico o de las células del músculo liso del tracto gastrointestinal. Sin embargo, no fue posible determinar la estructura primaria de dichos péptidos. También fue posible detectar una fracción cromatográfica bioactiva (G as 42.32) obtenida a partir del fraccionamiento cromatográfico secundario del extracto de bulbos que no ha sido estudiada. Por otra parte, con relación al extracto preparado a partir de los ductos, se detectó una fracción secundaria bioactiva (C as 14.2) que no se pudo investigar (Hernández, 2006).

II.4 Sistema Nervioso Entérico

II.4.1. Definición y función del SNE

El sistema nervioso entérico (SNE) se considera la tercera división del sistema nervioso autónomo (SNA) y es independiente del sistema nervioso central (SNC). Controla y coordina la motilidad, el flujo sanguíneo y la secreción del sistema digestivo. Contiene aproximadamente 10^8 neuronas, distribuidas en dos plexos que se extienden a lo largo del tubo digestivo: el plexo mientérico, localizado entre la capa de músculo liso longitudinal y la capa de músculo liso circular, y el

plexo submucoso, asociado con el epitelio mucoso. La función refleja del intestino, que es independiente del SNC, es una respuesta de la acción coordinada de neuronas sensoriales, inter-neuronas y neuronas motoras excitatorias e inhibitorias. De manera adicional, el SNE se encuentra conectado con el SNC, mediante dos vías: una aferente y una eferente (Grundy y Schemann, 2006).

La vía aferente controla las sensaciones que se originan en el intestino, tales como el dolor, la sensación de saciedad y las náuseas. Por otra parte, la vía eferente está constituida por las innervaciones del simpático y del parasimpático, los cuales ayudan a controlar y coordinar las diferentes funciones del tracto gastrointestinal. Los mecanismos nerviosos que coordinan la función del sistema digestivo están mediados por un complejo sistema de neurotransmisores, neuromoduladores y la interacción de éstos con sus respectivos receptores (Grundy y Schemann, 2006).

II.4.2. Principales canales iónicos que regulan la excitabilidad de las neuronas del SNE

II.4.2.1 Canales de sodio voltaje-dependientes

Los canales iónicos más importantes involucrados en la generación de los potenciales de acción en las neuronas del SNE son los canales de Na^+ voltaje-dependientes, los cuales se dividen, dependiendo de sus diferencias en la sensibilidad a la tetrodotoxina. En los plexos mientérico y submucoso del SNE del cobayo, se han identificado canales de sodio tipo $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ y $\text{Na}_v1.6$. Los canales $\text{Na}_v1.2$ se encontraron en los somas de la mayoría de las neuronas del SNE. En tanto que los canales $\text{Na}_v1.3$ se localizaron en las dendritas, somas y axones de las neuronas del plexo mientérico y los canales $\text{Na}_v1.6$ se encontraron en los axones de neuronas del plexo mientérico de la región del colon (Bartoo y col., 2005).

El hecho de que los canales de Na^+ se expresen, de manera diferenciada, en diferentes tipos celulares de neuronas y sitios del SNE, sugiere que existen varios patrones de generación de potenciales de acción.

II.4.2.2 Canales de K^+ activados por calcio

Una característica importante de las neuronas del SNE, es que presentan una hiperpolarización de larga duración, que se presenta después de la generación de un potencial de acción y que determina la excitabilidad de los circuitos nerviosos del SNE. Esta hiperpolarización está mediada por la apertura de un canal de K^+ dependiente de Ca^+ (IK) (Furness y col., 2004).

II.4.2.3 Otros canales iónicos localizados en las neuronas del SNE: canales iónicos sensibles al ácido (acid-sensing ion channels; ASICs)

Los ASICs se encuentran distribuidos en las neuronas del SNC y del sistema nervioso periférico (SNP) y se ha encontrado evidencia que sugiere que este tipo de canales están involucrados en la mecanocepción (sensación de movimiento) y la nocicepción (sensación de dolor). Se ha demostrado que los canales ASIC3 participan, de manera importante, en las funciones de mecanocepción, mediada por las neuronas aferentes del SNE (Page y col., 2005).

II.4.3. Neurotransmisores y neuromoduladores presentes en el SNE y sus respectivos receptores

En el Cuadro 7 se presentan los principales neurotransmisores y neuromoduladores que se encuentran en el SNE, así como sus respectivos receptores.

Cuadro 7. Principales neurotransmisores del SNE y sus receptores.

NEUROTRANSMISOR	RECEPTOR	REFERENCIA
Acetilcolina (ACh)	Nicotínico N _M Muscarínico M ₂ y M ₃	Obaid y col., 2005; Zholos y col., 2004
Trifosfato de adenosina (ATP)	Purinérgicos (P2X ₁ -P2X ₇)	Obaid y col., 2005 Xiang y Burnstock, 2005
Serotonina (5-HT)	5-HT ₃ , 5-HT ₄ y 5-HT ₇	Tonini, 2005
Histamina (H)	H ₁ , H ₂ y H ₃	Hill y col., 1997
Oxido nítrico	Guanilato ciclasa (sGC)	Kreiss y col., 2004
Ácido γ -aminobutírico (GABA)	GABA _B	Costa y col., 2000
Acido glutámico	NMDA	Singewald y col, 2000; Hill y col., 1997;
Dopamina (D)	D ₁ y D ₂	Costa y col., 2000; Brookes, 2001; Ash y Phillips, 2003
Noradrenalina	α_1 , α_2 , y β_2	Furness, 2000; Galligan y col., 2000
Somatostatina (SST)	SST ₁ y SST ₂	Brookes, 2001; Ubilluz, 1993
Polipéptido vasoactivo intestinal (VIP)	VIP ₁ y VIP ₂	Brookes, 2001; Leung y col., 2003
Neuropéptido Y	Y ₁	Costa y col., 2000; Furness, 2000

En los siguientes incisos se presenta información relevante con relación a algunos de los principales neurotransmisores y neuromoduladores que se encuentran en el SNE.

II.4.3.1 Acetilcolina (ACh)

La ACh, actuando a través de receptores colinérgicos nicotínicos, es el principal neurotransmisor involucrado en la activación sináptica rápida del SNE. Los

receptores nicotínicos de las neuronas entéricas constan de subunidades α_3 , α_5 , β_2 , β_4 y α_7 . La expresión de estos receptores no es uniforme en las neuronas del SNE, ya que existe variabilidad en su expresión en diferentes grupos de neuronas (Obaid y col., 2005).

Los receptores nicotínicos neuronales contribuyen a la transmisión sináptica rápida en los plexos entéricos. En tanto que los receptores muscarínicos, principalmente localizados en la membrana celular del músculo liso, median la contracción provocada por ACh en las capas del músculo liso (Eglen y col., 1996; Zholos y col., 2004). Los receptores muscarínicos M_2 y M_3 son co-expresados en el músculo liso gastrointestinal y su activación produce dos efectos principales que involucran la inhibición de adenilato ciclasa y la activación de la fosfolipasa C (PLC), respectivamente (Eglen y col., 1996; Zholos y col., 2004).

II.4.3.2 Trifosfato de adenosina (ATP)

El ATP es otro neurotransmisor y neuromodulador de la activación sináptica rápida y lenta en el SNE y presenta diferentes receptores purinérgicos (P_2X_1 - P_2X_7). En el íleon de cobayo se han encontrado despolarizaciones rápidas, mediadas por la interacción del ATP con receptores (P_2X_3) y despolarizaciones lentas, resultado de la estimulación de receptores P_2Y_2 (Xiang y Burnstock, 2005).

II.4.3.3 Serotonina (5-hidroxi-triptamina)

La serotonina desempeña un papel muy importante en el mantenimiento de la función normal del tracto digestivo y en la comunicación entre éste y el SNC (Gershon, 2005). En el SNE se encuentran receptores serotoninérgicos 5-HT₃, 5-HT₄ y 5-HT₇ (Tonini, 2005).

Los receptores 5-HT₄ se encuentran en el plexo submucoso y en el mientérico. La activación de estos receptores, localizados pre-sinápticamente, provoca la liberación de ACh, lo cual resulta en una estimulación del músculo liso intestinal (Liu y col., 2005). En contraste, la activación de los receptores 5-HT₇ provoca una relajación del intestino, mediada por una estimulación de neuronas nitrérgicas, que expresan óxido nítrico sintetasa (NOS). Dicha estimulación, da como resultado la producción de óxido nítrico (NO), el cual estimula su receptor intracelular, la guanilato ciclasa soluble (sGC), localizada en las células del músculo liso, provocando su relajación (Tonini, 2005).

II.4.3.4 Histamina

La histamina es un importante neurotransmisor endógeno ampliamente distribuido a lo largo del tracto gastrointestinal y éste regula una variedad de eventos patofisiológicos del sistema digestivo, incluyendo la secreción ácida gástrica, la motilidad intestinal, las respuestas vasomotoras, las enfermedades que involucran úlceras pépticas, las respuestas inflamatorias intestinales y las reacciones alérgicas. Todos estos eventos implican la interacción de la histamina con receptores H₁, H₂ y H₃ (Hill y col., 1997). En las células del músculo liso gastrointestinal se expresan principalmente receptores H₁. La respuesta contráctil del ileon a la histamina se produce a través de la activación de este receptor, lo cual provoca la elevación de los niveles de inositol 1,4,5-trifosfato, induciendo movilización del calcio intracelular (Donaldson y Hill, 1986).

II.4.3.5 Óxido nítrico

La oxido nítrico sintetasa (NOS) se encuentra presente en un gran número de neuronas entéricas, en las que el NO contribuye en los mecanismos que controlan la motilidad. Además de ésta fuente neuronal de NO (nNOS), este mensajero químico también es producido por otros componentes del sistema inmune gastrointestinal, tales como los monocitos y macrófagos. Como ya se

describió anteriormente, el NO provoca relajación del músculo liso intestinal, la cual está mediada por la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (sGC), con la respectiva elevación de la producción de GMPc (Kreiss y col., 2004).

II.4.3.6 Ácido γ -aminobutírico (GABA)

El GABA es un neurotransmisor presináptico en el SNE. Se forma a partir de la descarboxilación enzimática del ácido glutámico y su acción esta mediada en el SNE por receptores metabotrópicos GABA_B (Liu, 2005).

II.4.3.7 Ácido glutámico

El ácido glutámico es uno de los neurotransmisores excitatorios que se localizan en el SNE, en cuyas neuronas se han localizado receptores ionotrópicos NMDA (Singewald y col., 2000).

II.4.3.8 Dopamina

La dopamina es un neurotransmisor que se produce principalmente en el *nucleus accumbens*, la *substancia nigra* y el cuerpo estriado. Aunque también en el SNE se han encontrado receptores dopaminérgicos D₁ y D₂ (Ash y Phillips, 2003).

II.4.3.9 Noradrenalina (NA)

En el SNE se localizan neuronas adrenérgicas que producen noradrenalina la cual, actúa sobre receptores noradrenérgicos α_1 , α_2 , y β_2 (Furness, 2000; Galligan y col., 2000).

II.4.3.10 Somatostatina

Este neuromodulador constituye uno de los neuropéptidos más importantes localizados, en el SNC (con mayor predominio en el hipotálamo) y en el SNE. También se ha localizado en las células D del antro gástrico y en los islotes de Langerhans del páncreas.

Los efectos más importantes de la somatostatina incluyen la inhibición de las secreciones del estómago, del páncreas, del intestino delgado y del aparato biliar. También se sabe que este neuropéptido modula la actividad motora gastrointestinal por su interacción con receptores SST₁ y SST₂ (Brookes, 2001; Ubilluz, 1993).

II.4.3.11 Polipéptido vasoactivo intestinal (VIP)

El VIP es liberado por las neuronas del plexo submucoso y el único péptido en el intestino que eleva los niveles de AMPc (Leung y col., 2003).

II.4.3.12 Neuropéptido Y

Neuropéptido Y, es el principal agente pro-absorción y anti-secreción liberado por las terminaciones nerviosas entéricas (Costa y col., 2000; Furness, 2000).

II.4.4. Receptores a otros mensajeros químicos localizados en el SNE

II.4.4.1 Receptores al factor liberador de corticotropina

Se sabe que cambios en el SNC, tales como la depresión o la ansiedad influyen, de manera importante, en la función del tracto gastrointestinal y pueden producir procesos inflamatorios en éste. Existen evidencias que sugieren que el factor liberador de corticotropina está involucrado en estas alteraciones intestinales inducidas por el estrés (Tache y Perdue, 2004), las cuales incluyen disfunciones en

la función motora de propulsión del intestino, en la secreción de la mucosa y en la barrera epitelial. En el íleon de cobayo se han encontrado receptores al factor liberador de corticotropina CRF₁. En el SNE del humano, a la fecha todavía no se han identificado receptores CRF₁ (Liu y col., 2005).

II.4.4.2 Receptores a cannabinoides

Los cannabinoides inhiben la motilidad gástrica e intestinal a través de la activación de receptores CB1 (Mathison y col., 2004).

II.4.4.3 Receptores a prostaglandinas

En las neuronas del SNE se expresa, de manera constitutiva la ciclooxigenasa (COX)-2, de tal manera que las prostaglandinas se consideran como otra clase de moléculas de señalización liberadas por el SNE (Costa, 2004; Porcher y col., 2004).

II.5 Contracción espontánea del músculo liso intestinal

El músculo liso intestinal se contrae de manera espontánea cuando se estira y ésta contracción no depende de ninguna inervación extrínseca. Existen estímulos en el intestino, por ejemplo la presencia de alimentos, que generan la distensión de las paredes gastrointestinales, induciendo una actividad motora en las células del músculo liso intestinal. Esta actividad, que incluye los movimientos peristálticos, está controlada por circuitos nerviosos intrínsecos del SNE (Furnes y Costa, 1987; Hasler, 1994). Los circuitos nerviosos intrínsecos contienen neuronas intrínsecas aferentes primarias que responden a la distensión de las paredes del intestino y son las primeras en recibir la información sobre la naturaleza e intensidad del estímulo (Grider y Jin, 1994; Furness y col., 1998; Kunze y col., 1999). Las neuronas intrínsecas aferentes primarias, son neuronas Dogiel tipo II que se encuentran

distribuidas en ambos plexos (mientérico y submucoso) del SNE (Furness y col., 1998).

La respuesta de estas neuronas al estiramiento depende de la apertura de canales activados por estiramiento ("stretch activated channels") localizados en la membrana del músculo liso intestinal. La apertura de estos canales inicia la contracción de la célula muscular. El movimiento mecánico provocado por la contracción induce la distorsión de sitios específicos en las membranas de las neuronas intrínsecas aferentes, provocando la activación de canales iónicos en las membranas neuronales, con lo cual se generan y propagan potenciales de acción que se transmiten a otras neuronas y a otras células musculares (Kunze, 1999).

II.6 Modelo de íleon aislado de cobayo

El hecho de que exista una gran variedad de sustancias neurotransmisoras en el SNE, permite compararlo farmacológicamente con el sistema nervioso central (SNC). Así, la musculatura lisa gastrointestinal innervada por el SNE constituye un tejido adecuado para la caracterización de compuestos con potencial actividad farmacológica a nivel del sistema nervioso y del músculo liso gastrointestinal (Samuelsson, 1990; Rojas y col., 2002).

Este modelo presenta ventajas adicionales como la relativa facilidad del bioensayo y el requerimiento de pequeñas cantidades de sustancia para inducir un efecto en el íleon. Por las razones antes mencionadas el modelo de íleon aislado de cobayo resulta muy apropiado, tanto en la evaluación farmacológica preliminar de los extractos crudos preparados a partir de diferentes organismos, como en el monitoreo de la actividad biológica durante el proceso de aislamiento de los principios activos (Samuelsson, 1990; Rojas y col., 2002).

II.7 Justificación

El estudio farmacológico previamente realizado sobre *C. austini*, indicó que el extracto crudo de los ductos de su aparato venenoso contiene péptidos bioactivos que tienen efecto sobre el Sistema Nervioso Entérico (SNE) o la musculatura lisa intestinal. Sin embargo, a la fecha se desconoce la identidad de los compuestos responsable de dicho efecto farmacológico, ya que el único estudio bioquímico efectuado sobre esta especie no involucró el monitoreo de la actividad farmacológica durante el proceso de la purificación de los péptidos contenidos en el veneno de este caracol.

Por este motivo, en el presente trabajo de investigación se planteó realizar el estudio bioquímico biodirigido del extracto de los ductos de *C. austini* a fin de purificar y caracterizar la estructura primaria de los péptidos que presentan efecto en el modelo de íleon aislado de cobayo. Es importante mencionar que aunque se han realizado varios estudios sobre la especie del género *Conus*, a la fecha son escasos los estudios efectuados sobre especies de este género que habitan en los mares mexicanos. De tal manera que, continuando con el esfuerzo iniciado por el Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera y su grupo de colaboradores del Instituto de Neurobiología de la UNAM, se propuso la realización de esta tesis a fin de contribuir con el estudio de organismos marinos que habitan en mares de México y que constituyen fuentes potenciales valiosas de compuestos bioactivos.

III. HIPÓTESIS

El ducto del aparato venenoso de *C. austini* contiene péptidos que tienen efecto sobre el sistema nervioso entérico o sobre la musculatura lisa intestinal.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Purificar y determinar la estructura primaria de los péptidos contenidos en los ductos del aparato venenoso de *C. austini* que modifican la contractilidad del íleon aislado de cobayo.

IV.2 Específicos

- Realizar el estudio bioquímico biodirigido del extracto preparado a partir de los ductos del aparato venenoso de *C. austini*, con el objeto de purificar los péptidos que modifican la contractilidad del íleon aislado de cobayo.
- Determinar la estructura primaria de los péptidos bioactivos purificados a partir de los ductos del aparato venenoso de *C. austini*.

V. METODOLOGÍA

La metodología que se utilizó para la realización del presente trabajo, involucró los siguientes pasos: 1) recolección de los especímenes de *C. austini*; 2) extracción del veneno a partir de los ductos del aparato venenoso de *C. austini* y 3) estudio bioquímico biodirigido del extracto preparado a partir de los ductos del aparato venenoso de *C. austini*.

V.1 Recolección de los especímenes de *C. austini*

La recolección de los especímenes se llevó a cabo del 14 al 19 de octubre del 2000 en la plataforma de Tamaulipas (Enfrente de la Laguna Madre). Los especímenes se recolectaron por arrastre, mediante redes camaroneras y a diferentes profundidades de 50-80 m.

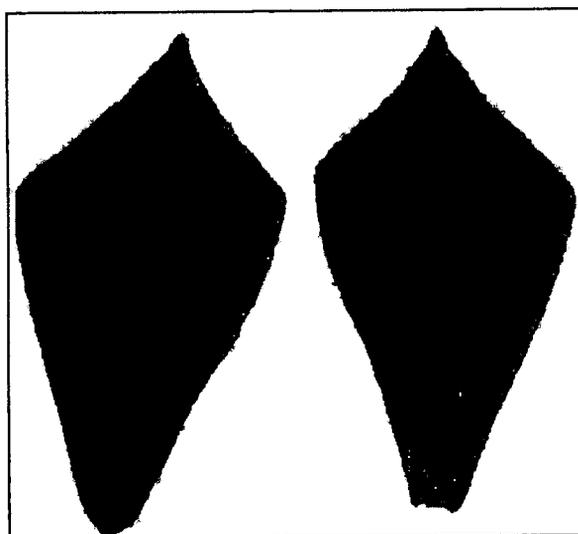


Figura 7. Especímenes utilizados para el análisis.

Los especímenes fueron almacenados a -20° C y se transportaron, al Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la

UNAM en Querétaro, donde fueron congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su posterior estudio.

V.2 Extracción del veneno

Los cuerpos de 13 caracoles pequeños fueron separados de sus conchas, mediante centrifugación de los especímenes enteros a $900\text{ }^{\circ}\text{G}$ durante 3 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una centrífuga (Beckman GPR). Posteriormente, se disecaron los ductos del aparato venenoso con la ayuda de pinzas y tijeras en hielo (Figura 8). Una vez aislados, los ductos se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL, y se agregó a cada tubo 1 mL de solución amortiguadora de extracción en hielo con una composición de 40% (v/v) de acetonitrilo (ACN) y 2% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA).

Posteriormente, se realizó la extracción de los péptidos mediante la homogenización de los ductos; utilizando un homogenizador manual vidrio/vidrio (Kontes Glass Co., Duall[®] modelo 22). El homogenizado resultante se pasó a un tubo Eppendorf de 2 mL adicionando 1 mL de solución de extracción para lavado, obteniéndose un volumen final de 2 mL. Se centrifugó a $1130\text{ }^{\circ}\text{G}$ durante 15 minutos a 4°C , en una centrífuga Sorvall, modelo MC 12.

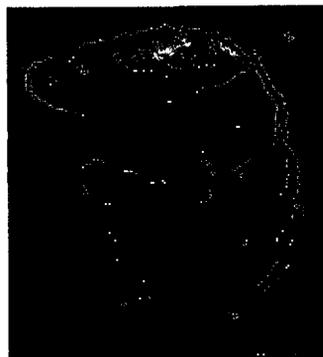


Figura 8. Aparato venenoso de *C. austini*.

Se colectó el sobrenadante de los ductos en un tubo Eppendorf de 2 mL y se determinó la concentración de proteína total por el método de Lowry modificado mediante un kit (Bio-Rad protein DC Assay).

Dicho sobrenadante se sometió a un sistema de secado por vacío Savant (Speed Vac Plus, modelo SC 110 A, centrífuga y bomba de vacío UVS 400).

V.3 Estudio bioquímico biodirigido del extracto de los ductos del aparato venenoso de *C. austini*.

V.3.1 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de los ductos.

El fraccionamiento del extracto, así como la separación y purificación de los péptidos, se efectuó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC), utilizando un equipo Varian (Prostar, detector modelo 310; bombas modelo 230); se empleó una asa de inyección de 5 mL. La detección de los péptidos fue realizada mediante un espectrofotómetro de flujo ajustado a 220 nm de longitud de onda. Se preparó la siguiente composición de disolventes: solución A (0.1% de TFA en agua desionizada) y solución B (0.085 % TFA en 90 % ACN /agua).

Para realizar el fraccionamiento cromatográfico primario del extracto crudo de *C. austini*, se utilizó una columna analítica C18 (Vydac 218TP54, 4.6 x 250 mm; tamaño de partícula de 5 μ m). A la columna se le aplicó un paso isocrático del 5% de solución B por 10 minutos; posteriormente, se desarrolló un gradiente de 5-75% de solución B en 102 minutos a un flujo de 1mL/min. A partir de este fraccionamiento primario se obtuvieron 9 fracciones (C as 1, C as 2, C as 3, C as 4, C as 5, Cas 6, C as7, C as 8, C as 9). En un estudio anterior (Hernández, 2006), se encontró que la fracción C as 4 presentaba un efecto excitatorio significativo sobre la contractilidad

del íleon aislado de cobayo, y por esta razón se seleccionó para continuar con los análisis cromatográficos a fin de purificar los péptidos bioactivos.

V.3.2 Separación y purificación de los péptidos bioactivos

La fracción C as 4 se sometió a una nueva cromatografía de fase reversa, se aplicó un paso isocrático de 13% de solución B por 5 minutos, desarrollando un gradiente del 13-37% de solución B en 105 minutos. El flujo en los tres casos fue de 1 mL/min. Las fracciones secundarias obtenidas a partir de los análisis cromatográficos descritos anteriormente, fueron evaluadas mediante el ensayo de íleon de cobayo y se seleccionó la fracción C as 4.2, la cual presentó un efecto farmacológico en el íleon. Esta fracción bioactiva fue sometida a un posterior análisis cromatográfico que se resume a continuación:

La fracción C as 4.2 se sometió a un análisis cromatográfico en un equipo Varian (Prostar, detector modelo 310; bombas modelo 230); se empleó una columna analítica C8 (Vydac 208TP54, 4.6 x 250 mm; tamaño de partícula de 5 µm). En el análisis de la fracción se utilizó un asa de 1 mL y un paso isocrático de 7% de solución B durante 5 minutos; desarrollando un gradiente del 7-28% de solución B en 84 minutos con el mismo flujo. A partir de la fracción C as 4.2 se separaron dos péptidos denominados C as 4.2.1 y C as 4.2.2, los cuales fueron evaluados mediante el ensayo de íleon de cobayo.

V.3.3 Ensayo de íleon aislado de cobayo

Para el registro de íleon aislado, se utilizaron cobayos machos adultos (600-800 g); los animales se sacrificaron por dislocación cervical y el intestino delgado disecado se colocó en solución Krebs (mM): NaCl 119, KCl 4.6, NaHCO₃ 20,

KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, CaCl_2 1.5 y glucosa 11.4 (pH 7.4), burbujeado constantemente con una mezcla gaseosa de 5% de CO_2 en O_2 .

Se separó la porción correspondiente al íleon y se hicieron cortes transversales para obtener anillos de aproximadamente 1 cm de longitud. Éstos se colocaron posteriormente en cámaras de incubación con solución Krebs a 37°C y con el burbujeo constante de la mezcla de CO_2 - O_2 . Las contracciones mecánicas se registraron isométricamente por medio de transductores de fuerza Grass Modelo FT03, acoplados a un polígrafo Grass de 4 canales Modelo 7D. La actividad espontánea del íleon se mantuvo a una tensión de un gramo. Después de un período de estabilización de 30 minutos, se registró la actividad espontánea durante 10 minutos. Estos registros se utilizaron como control. Al cabo de este período, se evaluaron los efectos de los péptidos durante 10 minutos. Los resultados obtenidos se compararon con el control (Rojas y col., 1995).

V.3.4 Secuenciación del péptido C as 4.2.2

La secuenciación automática se llevó a cabo en el equipo "Procise 491 Protein Sequencing System" de Applied Biosystems Inc. (Foster City CA), empleando el método "Pulsed-Liquid", del fabricante. Se usaron de 6 a 60 microlitros de una solución que contenía el péptido. Se aplicaron aproximadamente 20 pmoles del péptido para llevar a cabo la secuenciación. La obtención de la secuencia del péptido C as 4.2.2 se llevó a cabo mediante el método de degradación de Edman.

En la Figura 9 se muestra un diagrama de flujo en el que se resume la metodología empleada para la purificación de los péptidos C as 4.2.1 y C as 4.2.2 a partir de los ductos de *C. austini*.

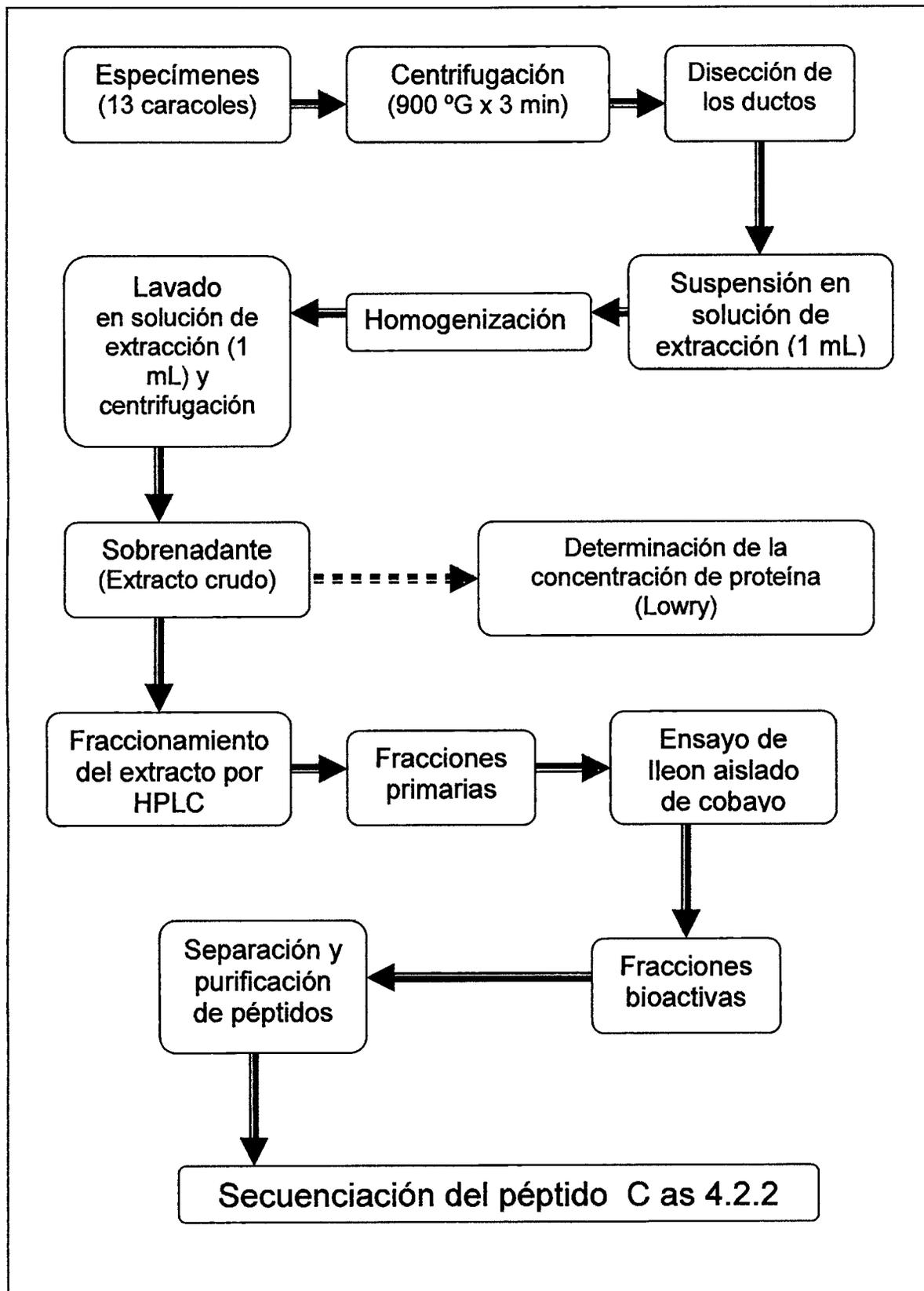


Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología realizada en este proyecto.

VI. RESULTADOS

VI.1 Obtención del extracto crudo

Se disecaron los ductos del aparato venenoso de 13 caracoles *C. austini*, utilizando un microscopio estereoscópico. Se preparó un extracto a partir de los ductos, al cual se le determinó la cantidad de proteína, mediante el método de Lowry (Cuadro 8).

Cuadro 8. Contenido total de proteína en el extracto preparado a partir de los ductos de los especímenes de *C. austini*.

CARACOLES (13)	PROTEÍNA (mg)
DUCTOS	4.888

VI.2. Estudio bioquímico biodirigido del extracto crudo preparado a partir de los ductos del aparato venenoso de *C. austini* y purificación de los péptidos bioactivos

A partir del fraccionamiento primario del extracto crudo de los ductos (cromatograma de la Figura 10), se obtuvieron 9 fracciones primarias (C as 1, C as 2, C as 3, C as 4, C as 5, C as 6, C as 7, C as 8, C as 9). La fracción C as 4 se seleccionó para su subsiguiente análisis cromatográfico, debido a que en un análisis previo, se había encontrado que esta fracción provocaba una estimulación de las contracciones espontáneas del íleon (Hernández, 2006). El análisis cromatográfico de C as 4 se llevó a cabo mediante cromatografía de fase reversa; el cromatograma obtenido se muestra en la Figura 11. En dicha figura se resalta la fracción secundaria C as 4.2 que fue elegida para continuar con la purificación de los péptidos. El análisis cromatográfico de la fracción C as 4.2, mediante HPLC, se muestra en la Figura 12, en la que se observan dos picos que indican la presencia de dos péptidos que se denominaron C as 4.2.1 y C as 4.2.2.

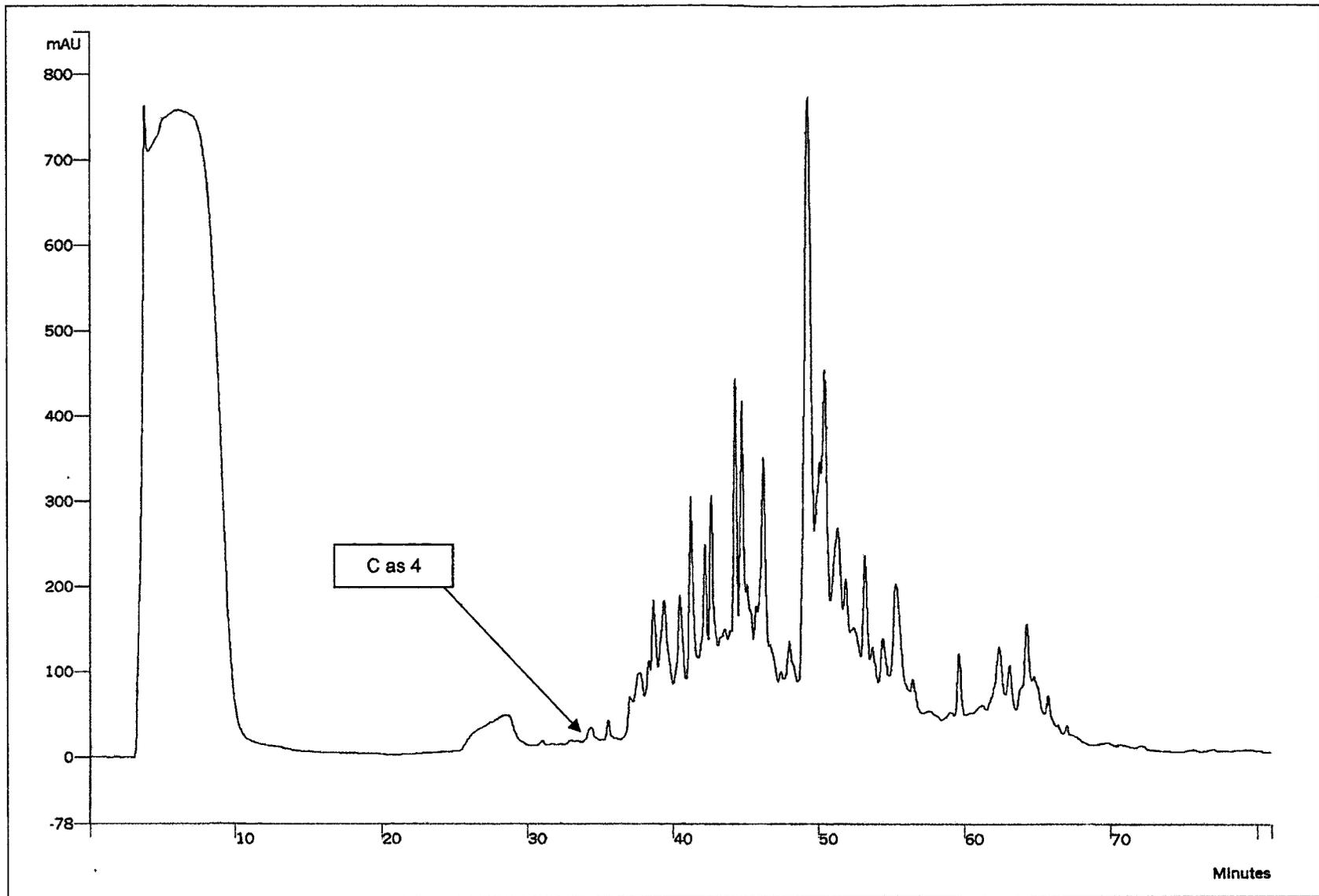


Figura 10. Fraccionamiento cromatográfico primario del extracto crudo de los ductos del aparato venenoso de *C. austini*.

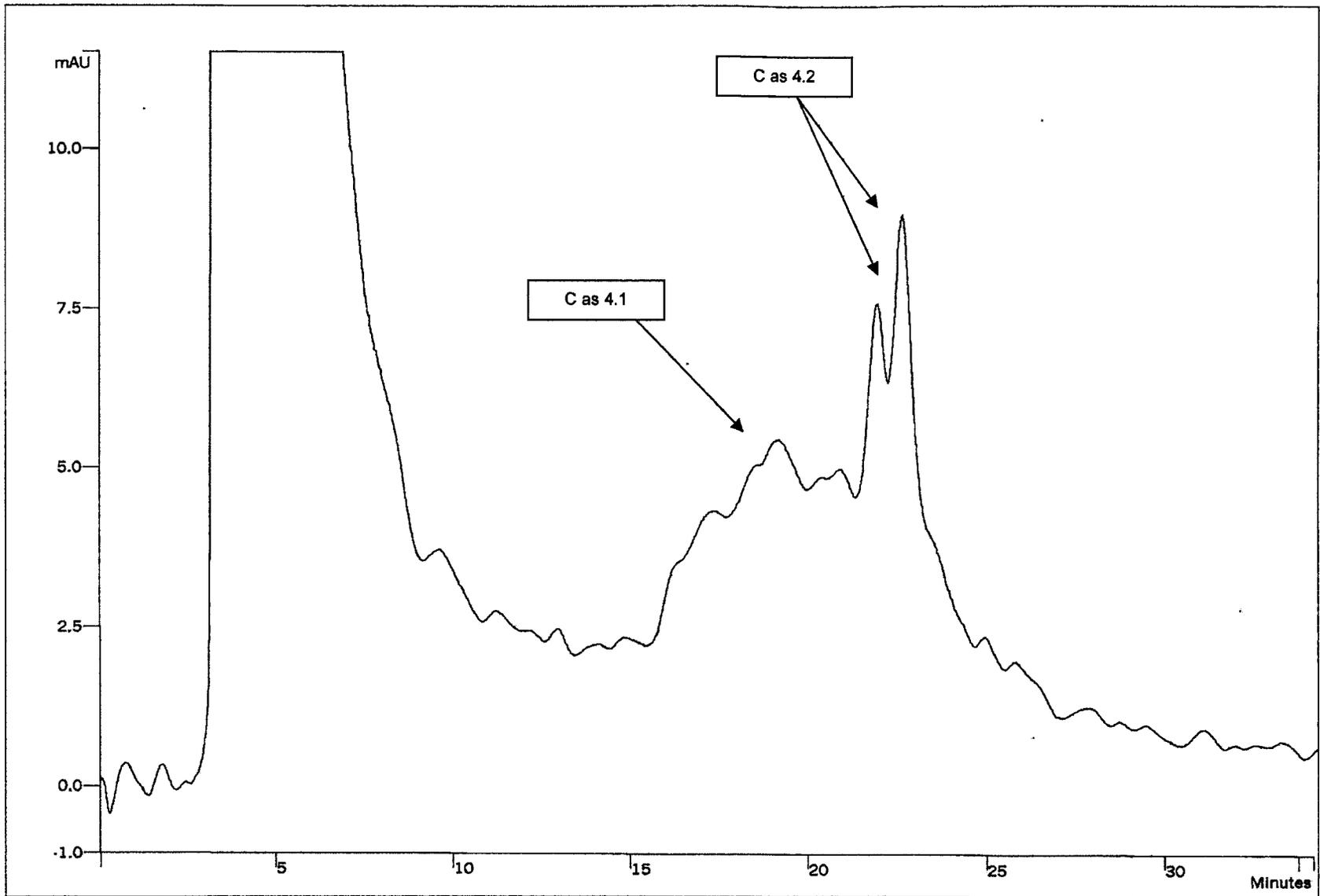


Figura 11. Cromatograma de la fracción C as 4 obtenida a partir del fraccionamiento primario del extracto crudo de los ductos de *C. austini*. Se señalan las dos fracciones obtenidas: C as 4.1 y C as 4.2.

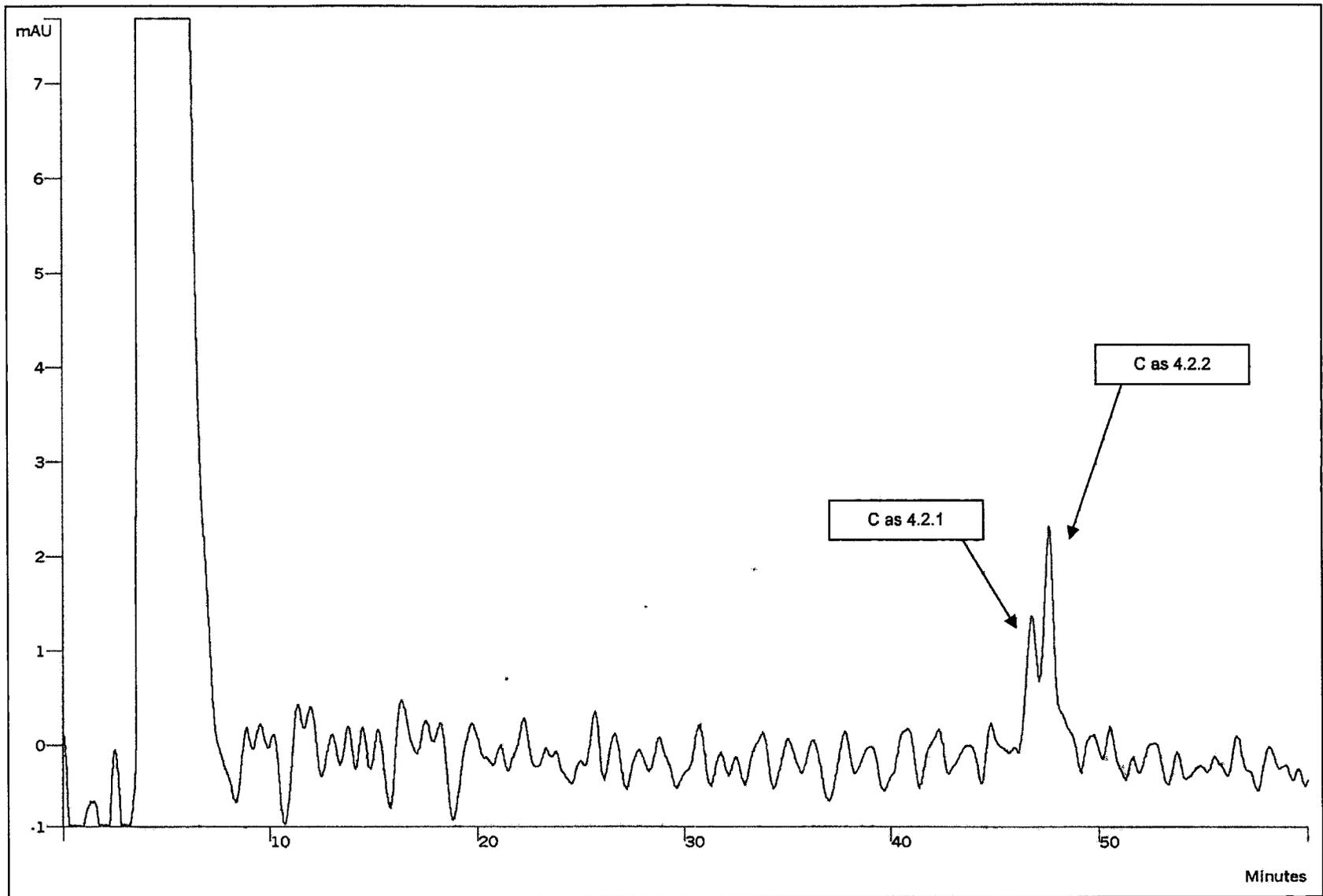


Figura 12. Cromatograma de la fracción C as 4.2. Se observan dos picos correspondientes a los péptidos C as 4.2.1 y C as 4.2.2.

Los péptidos C as 4.2.1 y C as 4.2.2 fueron evaluados, mediante el ensayo de íleon aislado de cobayo. Los resultados de esta evaluación mostraron que el péptido C as 4.2.2 indujo un efecto excitatorio significativo cuando se evaluó a una concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este efecto correspondió al 30.43% del efecto inducido por acetilcolina (ACh) 1 μM . En la Figura 13 se muestra un registro representativo del efecto inducido por C as 4.2.2 sobre el íleon. Por otra parte, la evaluación de C as 4.2.1 mostró que este péptido no modificó, de manera significativa, la contractilidad del íleon, cuando se evaluó a una concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La Figura 14 muestra el efecto inducido por C as 4.2.1 sobre las contracciones espontáneas del íleon. Considerando que C as 4.2.2 presentó un mayor efecto excitatorio sobre el íleon, éste se seleccionó para su posterior análisis de secuenciación, mediante el método de degradación de Edman.

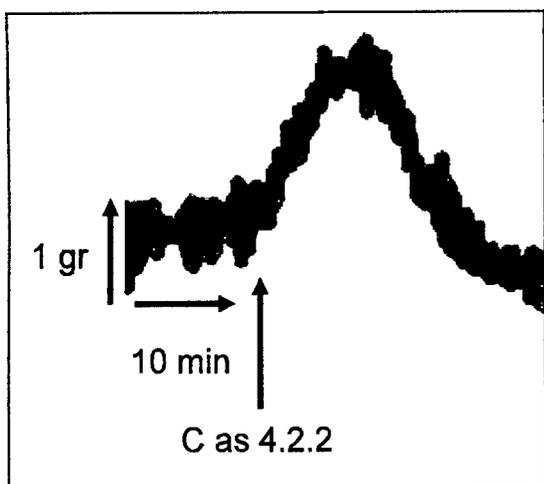


Figura 13. Efecto del péptido C as 4.2.2 (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo.

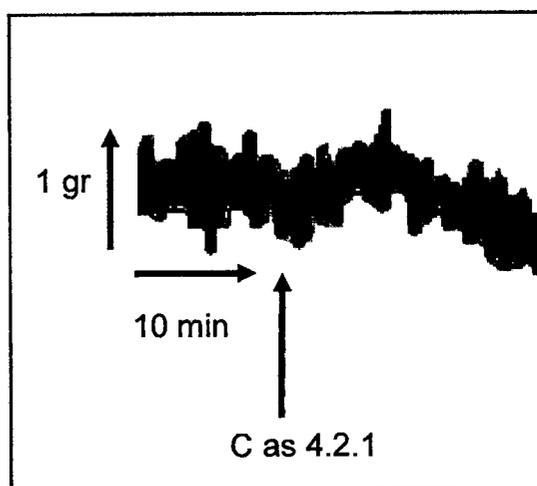


Figura 14. Efecto del péptido C as 4.2.1 (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo.

En el Cuadro 9 se muestra un resumen del proceso de purificación de los péptidos C as 4.2.1 y C as 4.2.2, a partir del extracto crudo de los ductos del aparato venenoso de *C. austini*.

Cuadro 9. Fracciones y péptidos obtenidos a partir del fraccionamiento cromatográfico del extracto crudo de los ductos de *C. austini*.

EXTRACTO CRUDO	FRACCIONES PRIMARIAS	FRACCIONES SECUNDARIAS	PÉPTIDOS PURIFICADOS	
DUCTOS (C as)	C as 1			
	C as 2			
	C as 3			
	C as 4*	C as 4.1		
		C as 4.2*		C as 4.2.1
				C as 4.2.2*
	C as 5			
	C as 6			
	C as 7			
	C as 8			
C as 9				

*Fracciones y péptidos que mostraron actividad en el ileon aislado de cobayo.

VI.3. Determinación de la estructura primaria del péptido C as 4.2.2

El análisis de secuenciación de C as 4.2.2 reveló 15 aminoácidos de su estructura primaria es la siguiente:

?-Val-Gly-Gln-Gly-Gly-Thr-Gln-Arg-Ser-Thr-Asp-Gln-Thr-Ala

La identidad del residuo de aminoácido correspondiente a la porción amino terminal no se pudo determinar de manera inequívoca, debido a la poca cantidad disponible de muestra. El equipo de secuenciación indicó que los probables residuos correspondientes al amino terminal son: Ser, Thr, Gly, Ala o Val. También existe ambigüedad con relación a la identidad de los aminoácidos en las posiciones 6, 7, 8 y 11. Se espera que el análisis por espectrometría de masas proporcione información que ayude a identificar, de manera inequívoca estos aminoácidos.

VII. DISCUSIÓN

La estrategia de investigación utilizada para la realización de esta tesis, comprendió la preparación del extracto crudo preparado a partir de los ductos del aparato venenoso de *C. austini*, la realización del estudio bioquímico biodirigido de este extracto con el objeto de purificar los péptidos bioactivos y la determinación preliminar de la estructura primaria de los péptidos purificados. Para el monitoreo de la actividad farmacológica se empleó el modelo de íleon aislado de cobayo, el cual se utiliza ampliamente en farmacología para la detección de especies bioactivas, así como para el análisis preliminar del mecanismo de acción de sustancias con efecto sobre el sistema nervioso o la musculatura lisa intestinal (Gershon y col., 1994).

Es importante mencionar que los estudios bioquímicos y farmacológicos realizados hasta la fecha con especies de la superfamilia Conoidea (Conacea) se han centrado en la investigación de los componentes del veneno que se extrae a partir de los ductos del aparato venenoso de los caracoles y a la fecha no se sabe a ciencia cierta cuál es la función de los bulbos de los caracoles y también se desconoce cuál es su participación en la secreción del veneno (Freeman y col., 1974; Halstead, 1988; Olivera, 1997; Marshall y col., 2002).

Para la realización del presente trabajo, se seleccionaron 13 especímenes de *C. austini*, a partir de los cuales se disecaron los bulbos y los ductos del aparato venenoso. Se prepararon los correspondientes extractos y se determinó que el extracto de los ductos contenía 4.8 mg de proteína. Una vez preparado el extracto de ductos, se procedió a realizar su estudio bioquímico biodirigido. Por otra parte, el extracto de los bulbos fue objeto de otro estudio bioquímico.

El primer paso en la secuencia metodológica de estudio bioquímico involucró el fraccionamiento primario del extracto, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Este fraccionamiento permitió la obtención de nueve fracciones primarias (C as 1 – C as 9). Vale la pena hacer mención que este análisis cromatográfico indicó que el extracto de los ductos presentaba una gran complejidad en el contenido de péptidos y al comparar el cromatograma del fraccionamiento primario del extracto de ductos (Figura 10), con el correspondiente al extracto de los bulbos (Figura 15), se puso en evidencia que los péptidos contenidos en ambos extractos son diferentes.

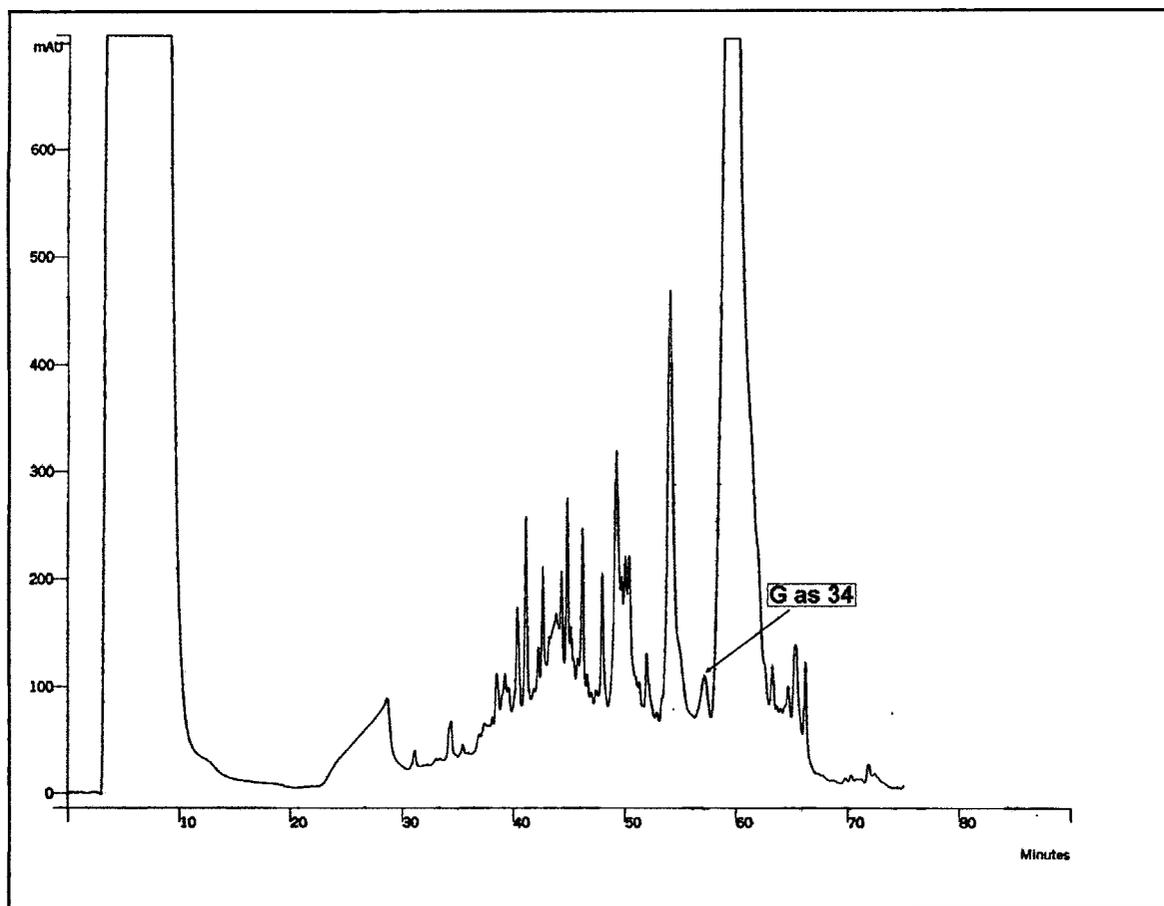


Figura 15. Cromatograma correspondiente al fraccionamiento del extracto crudo preparado a partir de los bulbos del aparato venenoso de *C. austini*.

Considerando que en un estudio previo se había encontrado que C as 4 provocaba una estimulación de las contracciones espontáneas del íleon (Hernández, 2006), esta fracción se seleccionó para continuar con el estudio. El análisis cromatográfico de C as 4 permitió la obtención de dos fracciones secundarias: C as 4.1 y C as 4.2. En el estudio previo al que hemos hecho referencia (Hernández, 2006) se había demostrado que la fracción secundaria C as 4.2 era la que conservaba el efecto excitatorio inducido por la fracción original C as 4 (Cuadro 9). El efecto excitatorio producido por C as 4.2, fue bastante significativo, ya que a una concentración de proteína de 0.01 $\mu\text{g/ml}$ indujo una excitación en el íleon de aproximadamente un 42.44 %, con respecto a la contractilidad normal de dicho tejido (Hernández, 2006). Por este motivo, la fracción secundaria C as 4.2 fue elegida para continuar con la purificación de los péptidos.

El análisis cromatográfico, mediante HPLC, de la fracción C as 4.2 permitió la purificación de dos péptidos que se denominaron C as 4.2.1 y C as 4.2.2, los cuales fueron evaluados, mediante el ensayo de íleon aislado de cobayo. Los resultados de esta evaluación mostraron que sólo el péptido C as 4.2.2 estimuló las contracciones espontáneas del íleon, con un efecto correspondiente al 30.43 % del efecto inducido por ACH 1 μM , cuando se evaluó a una concentración de 0.01 $\mu\text{g/ml}$. Con respecto a la evaluación farmacológica de C as 4.2.1, se encontró que este péptido no modificó significativamente las contracciones del íleon.

En este punto de la investigación no es posible proponer un mecanismo de acción que explique el efecto excitatorio inducido por el péptido C as 4.2.2. Como se mencionó en la sección de antecedentes, la contractilidad del músculo liso gastrointestinal "in vivo" está modulada por el SNE y los impulsos de origen extrínseco que provienen del SNA simpático y parasimpático (Grundy y Schemann, 2006). Por otra parte, las células musculares de un trozo aislado de Íleon se

encuentran bajo la influencia exclusiva del SNE y su estado contráctil, en un momento determinado, depende del balance de la información controlada por los diversos mensajeros químicos, ya sea estimuladores o inhibidores que se encuentran en el SNE. Este balance puede ser alterado por la acción de fármacos y sustancias de prueba. Al adicionar una sustancia de prueba a la solución de Krebs-Henseleit en la que se encuentra el trozo de íleon, se puede inducir un cambio en el estado contráctil del músculo liso intestinal, causando una contracción o una relajación. Este cambio puede ser registrado con el objeto de estudiar el efecto de dichos fármacos o sustancias de prueba (Samuelsson, 1990; Williamson y col., 1996).

Los cambios en la contractilidad del íleon inducidos por una sustancia de prueba pueden ser el resultado de su interferencia con la síntesis, la liberación o la degradación de mensajeros químicos. Pero también, pueden ser el resultado de la acción directa de las moléculas con los receptores de dichos mensajeros químicos. De manera adicional, los fármacos pueden modificar los efectos de los neurotransmisores, hormonas o autacoides, actuando directamente en sus receptores o produciendo una interferencia con la producción de segundos mensajeros, como por ejemplo, el AMPc, el GMPc, el diacil-glicerol (DAG) o el inositol trifosfato (IP₃), los cuales a su vez, influyen en los niveles intracelulares de Ca²⁺. Además, el fármaco puede actuar directamente sobre las células del músculo liso intestinal, interfiriendo con el transporte de Ca²⁺ o con los mecanismos de contracción muscular (Gershon y col., 1994).

De tal manera, que la presencia en el SNE de un gran número de terminales nerviosas con diferentes neurotransmisores y con varios tipos de receptores, permite que el ensayo de íleon aislado constituya una excelente herramienta de investigación para la detección del efecto de sustancias de prueba y para el monitoreo de la actividad farmacológica durante los procesos de purificación de

compuestos bioactivos. Sin embargo, debido a la complejidad que representan los múltiples posibles sitios y mecanismos de acción, resulta muy difícil la elucidación exacta del mecanismo de acción de las sustancias de prueba, empleando únicamente este bioensayo.

Con relación a la identidad química de C as 4.2.2, el análisis de secuenciación por degradación de Edman, indicó 15 aminoácidos de su estructura primaria:

?-Val-Gly-Gln-Gly-Gly-Thr-Gln-Arg-Ser-Thr-Asp-Gln-Thr-Ala
(?-VGQGGTQRSTDQTA)

Debido a la poca cantidad de muestra disponible, no fue posible determinar con precisión cual era el aminoácido correspondiente a la porción amino terminal. El equipo de secuenciación indicó que este aminoácido podría ser Ser, Thr, Gly, Ala o Val. También existe ambigüedad con relación a los aminoácidos en las posiciones 6, 7, 8 y 11. Será necesario esperar los resultados del análisis por espectrometría de masas, el cual se encuentra en proceso, a fin de corroborar la estructura de este péptido.

Independientemente de la confirmación de la estructura primaria de C as 4.2.2, las evidencias sugieren que no contiene ningún residuo de Cys, lo cual indica que no pertenece a ninguno de los grupos de conotoxinas ricas en Cys identificados a la fecha. Su estructura tampoco se parece a la estructura de las Conantoquinas, Contulaquinas o Conorfamidas (Cuadro 10), las cuales son conopéptidos que carecen de Cys (Maillo y col., 2002; Amirshaw y Alewood, 2005).

Cuadro 10. Conopéptidos que no contienen residuos de Cys

NOMBRE	SECUENCIA
Conantoquina-G	GE $\gamma\gamma$ LQ γ NQ γ LIR γ KSN
Contulaquina-G	ZSEEGGSNAT γ KKPYIIL
Conorfamida-Sc1	GPMGWVPVYRF

γ = γ -carboxiglutamato

En este sentido es importante mencionar que en el estudio bioquímico biodirigido del extracto obtenido a partir de los bulbos del aparato venenoso de *C. austini* (Valencia, 2007), que se realizó de manera simultánea al presente trabajo, se purificó un péptido de 12 aminoácidos, con la siguiente estructura primaria:

Gly-Pro-Met- γ -Asp-Pro-Leu-Glu-Ile-Ile-Arg

El novedoso péptido purificado a partir de los bulbos del aparato venenoso de *C. austini*, presenta una gran similitud con la conorfamida Sr2, previamente purificada a partir de los ductos del aparato venenoso de *C. spurius* (Maillo, 2001) y por esta razón se ha propuesto su clasificación como una nueva conorfamida (Valencia, 2007). Esta nueva conorfamida purificada a partir de los bulbos, induce un efecto excitatorio sobre las contractilidad del íleon de cobayo, de manera semejante a la que induce el péptido C as 4.2.2, obtenido a partir de los ductos en la presente investigación.

Con base en los resultados obtenidos en esta tesis es posible proponer que el péptido C as 4.2.2, purificado a partir de los ductos del aparato venenoso de *C. austini* podría constituir una nueva clase de conopéptidos bioactivos con efecto sobre receptores y/o canales iónicos localizados en las membranas de las neuronas del Sistema Nervioso Entérico o de las células del músculo liso del tracto gastrointestinal.

Resulta interesante la observación de que el péptido C as 4.2.2 se haya purificado a partir de un pico minoritario en el cromatograma obtenido del análisis del extracto total, y cuyo tiempo de retención, en las condiciones cromatográficas utilizadas, resulta ser muy diferente al correspondiente tiempo de retención que presentaron los picos a partir de los cuales se purificaron las cuatro conotoxinas, ricas en Cys (as7a, as14a, as14b y as15a) y el conopéptido que carece de Cys (as B) (Cuadro 5) que el Dr. Alejandro Zugasti purificó previamente de los ductos de *C. austini* (Zugasti, 2005). Es importante mencionar que los péptidos purificados por Zugasti y col. se obtuvieron a partir de picos mayoritarios en el cromatograma del fraccionamiento del extracto total. Evidentemente, el hecho de haber monitoreado la actividad farmacológica durante la realización del estudio bioquímico realizado en el presente trabajo, fue crucial para la purificación del nuevo péptido bioactivo C as 4.2.2.

La realización de esta tesis condujo a la purificación de un péptido novedoso que aumenta, por un mecanismo que está por determinarse, la contractilidad del íleon de cobayo. La estructura primaria de este péptido debe determinarse, de manera inequívoca, a fin de proponerlo como un representante de una nueva familia de conopéptidos. Por estas razones, resulta muy importante continuar con esta investigación con el objeto de corroborar la estructura primaria de C as 4.2.2 y caracterizar el mecanismo de acción involucrado en su efecto farmacológico.

Es evidente, que la presente tesis constituye un aliciente para continuar con el estudio multidisciplinario de estos gasterópodos marinos, que pueden ser una fuente muy importante de compuestos bioactivos útiles para el desarrollo de nuevos fármacos o de herramientas de investigación que puedan servir para entender mejor diferentes procesos celulares.

VIII. CONCLUSIONES

- El extracto preparado a partir de los ductos del aparato venenoso de *C. austini* contiene péptidos que modifican la contractilidad del músculo liso intestinal.
- Los perfiles cromatográficos, obtenidos mediante análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución, de los extractos de bulbos y los ductos del aparato venenoso de *C. austini* sugieren que ambos extractos contienen péptidos diferentes.
- Se purificaron dos péptidos a partir de los ductos del aparato venenoso de *C. austini*. El péptido C as 4.2.1 no modificó la contractilidad del íleon, en contraste, el péptido C as 4.2.2 aumentó, de manera significativa, las contracciones espontáneas del íleon.
- La estructura primaria parcial de C as 4.2.2 es:
?-Val-Gly-Gln-Gly-Gly-Thr-Gln-Arg-Ser-Thr-Asp-Gln-Thr-Ala
- La secuencia de aminoácidos de C as 4.2.2 indica que éste péptido podría constituir una nueva clase de conopéptidos bioactivos con efecto sobre el SNE o la musculatura lisa intestinal.
- Es importante determinar completamente la estructura primaria de C as 4.2.2 y continuar con su estudio farmacológico a fin de caracterizar su mecanismo de acción.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. E. y Olivera, B. M. 1994.** Neurotoxins: Overview of an emerging research technology. *Neurotoxins*: Vol. 17: 151-155.
- Ash, S. y Phillips, A. G. 2003.** Independent modulation of basal and feeding-evoked dopamine efflux in the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex by the central and basolateral amygdala nuclei in the rat. *Neuroscience*: Vol. 116: 293-305.
- Atanassoff, P. G., Hartmannsgruber M. W. y Thrasher, J. 2000.** Ziconotide, a new N-type calcium channel blocker, administered intrathecally for acute postoperative pain. *Regional anesthesia and pain medicine*: Vol. 25: 274-278.
- Armishaw, C. J. y Alewood, P. F. 2005.** Conotoxins as research tools and drug leads. *Current protein and peptide science*: Vol. 6: 221-240.
- Bartoo, A. C., Sprunger, L. K. y Schneider, D. A. 2005.** Expression and distribution of TTX-sensitive sodium channel alpha subunits in the enteric nervous system. *The journal of comparative neurology*: Vol. 486: 117–131.
- Bayrhuber, M., Vinesh, V., Ferber, M., Graf, R., Korukottu, J., Imperial, J., Garrett, J. E., Olivera, B. M., Terlau, H., Zweckstetter, M. y Becker, S. 2005.** Conkunitzin-S1 is the first member of a new Kunitz-type neurotoxin family. *The journal of biological chemistry*: Vol. 280: 23766-23770.
- Brookes, S. J. 2001.** Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anatomical Record*: Vol. 262: 58-60.
- Costa, M., Brookes, S. y Hennig, G. W. 2000.** Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*: Vol. 47: 15-19.
- Costa, M. 2004.** COX and the gut: now we see it now we don't. *Neurogastroenterology and Motility*: Vol. 16: 693–695.
- Cruz, L. J., Spencer, P. S., Schaumburg, H. H. y Ludolph, A. C. 2000.** Experimental and Clinical Neurotoxicology. *Conotoxins*, 2da ed., Oxford University Press, USA: 417-419.
- Daly, N. L., Ekberg, J. A., Thomas, L., Adams, D. J., Lewis, R. J. y Craik, D. J. 2004.** The Journal of biological chemistry: Vol. 279: 25774-25782.

- Donaldson, J. y Hill, S. J. 1986.** Histamine-induced hydrolysis of polyphosphoinositides in guinea-pig ileum and brain. *European journal of pharmacology*: Vol. 124: 255–265.
- Eglen, R.M., Hegde, S. S., y Watson, N. 1996.** Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacological reviews*: Vol. 48: 531-565.
- Elan Pharmaceuticals, Inc. 2004.** www.elan.com
- England, L. J., Imperial, J., Jacobsen, R., Craig, A. G., Gulyas, J., Akhtar, M., Rivier, J., Julius, D. y Olivera, B. M. 1998.** Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science*: Vol. 281: 575-578.
- Feregrino, P. A. G. 2004.** Determinación del efecto de extractos de glándulas y conductos venenosos de gasterópodos marinos sobre la contractilidad del músculo liso intestinal. Querétaro, Qro. Instituto de Neurobiología de la UNAM. Tesis para obtener el título de Maestría. 87.
- Freeman, S. E., Turner, R, J. y Silva, S.R. 1974.** The venom and venom apparatus of the marine gastropod *Conus striatus* Linne. *Toxicon*: Vol. 12: 587-592.
- Furness, J. B. y Costa, M. 1987.** *The Enteric Nervous System*. 1ra ed., Churchill Livingstone, London: 108-110.
- Furness, J. B., Kunze, W. A., Bertrand, P. P., Clerc, N. y Bornstein, J. C. 1998.** Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Progress in Neurobiology*: Vol. 54: 1-18.
- Furness, J. B. 2000.** Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system*: Vol. 81: 87-96.
- Furness, J. B., Kearney, K. y Robbins, H. L. 2004.** Intermediate conductance potassium (IK) channels occur in human enteric neurons. *Autonomic Neuroscience*: Vol. 112: 93–97.
- Galligan, J. J., Le Pard, K. J., Schneider, D. A. y Zhou, X. 2000.** Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system*: Vol. 81: 97-103.
- Gerhrmann, J., Alewood, P. F. y Craik, D. J. 1998.** Structure determination of the three disulfide bond isomers of α -conotoxin GI: a model for the role of disulfide bonds in structural stability. *Journal of molecular biology*: Vol. 278: 401-415.

- Gershon, M. D., Kirshgessner, A. L. y Wade, P. R. 1994.** Functional anatomy of the enteric nervous system. 1ra ed. Raven Press, New York. Vol. 1: 381-422.
- Gershon, M. D., 2005.** Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. Journal of clinical gastroenterology: Vol. 39: 5184-5193.
- Grider, J. R. y Jin, J. G. 1994.** Distinct populations of sensory neurons mediate the peristaltic reflex elicited by muscle stretch and mucosal stimulation. Journal of Neuroscience: Vol. 14: 2854-2860.
- Grundy, D. y Schemann, M. 2006.** Enteric nervous system. Current Opinion in Gastroenterology. Vol 22: 102-110.
- Halstead, B. W. 1988.** Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. 2da. ed. Darwin Press, New Jersey: 243-263.
- Hasler, W. L. 1994.** Motility of the small intestine. 1ra. ed. Yamada, Philadelphia: 207-233.
- Hernández, C. D. H. 2006.** Estudios bioquímicos y farmacológicos del caracol marino venenoso *Conus austini*. Querétaro, Qro. Instituto de Neurobiología de la UNAM. Tesis para obtener el título de Químico Farmacobiólogo. 26, 34-36.
- Hill, S. J., Ganellin, C. R., Timmerman, H., Schwartz, J. C., Shankley, N. P., Young, J. M., Schunack, W., Eevi, R. y Haas, H. L., 1997.** Classification of histamine receptors. Pharmacological reviews: Vol. 49: 253-278.
- Hopkins, C., Grilley, M., Shon, K. J., Gruz, L. J., Gray, V. R., Dykert, J., Rivier, J., Yoshikami, B. y Olivera, B. M. 1995.** A new family of *Conus* peptides targeted to the nicotinic acetylcholine receptor. The journal of biological chemistry: Vol. 270: 22361-22367.
- Jones, A., Bingham, J.P., Gehrman, J., Bond, T., Loughnan, M., Atkins, A., Lewis R.J. y Alewood, P.F. 1996.** Rapid Communications in Mass Spectrometry: Vol 10: 138-143.
- Kohn, A. J. 1956.** Piscivorous gastropods of the genus *Conus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: Vol. 42: 168-171.

- Kohn, A. J., Nybakken, J. W. y Van Mol, J-J. 1972.** Radula tooth structure of the gastropod *Conus imperialis* elucidated by scanning electron microscopy. *Science*: Vol. 176: 49-51.
- Kreiss, C., Toegel, S. y Bauer, A. J. 2004.** α 2-adrenergic regulation of NO production alters postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*: Vol. 287: 658-666.
- Kunze, W. A. A., Clerc, N., Bertrand, P. P. y Furness, J. B. 1999.** Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea-pig myenteric neurons. *The journal of physiology*: Vol. 517: 547-561.
- Leung, F. W., Iwata, F., Seno, K. y Leung, J. W. 2003.** Acid-induced mesenteric hyperemia in rats: role of CGRP, substance P, prostaglandin, adenosine, and histamine. *Digestive diseases and sciences*: Vol. 48: 523- 532.
- Liu, S., Gao, X. y Gao, N. 2005.** Expression of type 1 corticotropin-releasing factor receptor in the guinea pig enteric nervous system. *Journal of comparative neurology*: Vol. 481: 284-298.
- Liu, M., Geddis, M. S. y Wen, Y. 2005.** Expression and function of 5-HT₄ receptors in the mouse enteric nervous system. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*: Vol. 289: 1148-1163.
- Maillo, P. M. 2001** Extracción, purificación y caracterización química y biológica de péptidos neuroactivos provenientes de especies de *Conus*. Querétaro, Qro. Instituto de Neurobiología de la UNAM. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Biomédicas. 75-85.
- Maillo, P. M., Aguilar, M. B., López-Vera, E., Craig, A. G., Bulaj, G., Olivera, B. M. y Heimer de la Cotera, E. P. 2002.** Conorfamide, a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides. *Toxicon*: Vol. 40: 401-417.
- Marshall, J., Kelley, W. P., Rubakhin, S. S., Bingham, J.P., Sweedler, J. V., y Gilly, W. F. 2002.** Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus*. *The biological bulletin*: Vol. 203: 27-41.

- Mathison, R., Ho, W. y Pittman, Q. J. 2004.** Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *British journal of pharmacology*: Vol. 142: 1247–1254.
- McIntosh, J. M., Santos, A. D., y Olivera, B. M. 1999.** *Conus* peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annual review of biochemistry*: Vol. 68: 59–88.
- Miljanich, G. P. 1997.** Venom peptides as humans pharmaceuticals. *Science & medicine*: Vol. 4: 6-15.
- Nelson, L. 2004.** Venomous snails: one slip, and you're dead. *Nature*: Vol. 429: 798–799.
- Nicke, A., Wonnacott, S. y Lewis, R.J. 2004.** *European journal of biochemistry*: Vol. 27: 2305-2319.
- Obaid, A. L., Nelson, M. E., Lindstrom, J. y Salzberg, B. M. 2005.** Optical studies of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in the guinea-pig enteric nervous system. *The journal of experimental biology*: Vol. 208: 2981–3001.
- Olivera, B. M., Gray, W. R., Zeikus, R., McIntosh, J. M., Vargas, J., Rivier, J., De Santos, V. y Cruz, L. J. 1985.** Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science*. Vol. 230: 1338-1343.
- Olivera, B. M. 1997.** *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Molecular biology of de cell*: Vol. 8: 2101-2109.
- Olivera, B. M. y Cruz, L. J. 2001.** Conotoxins in retrospect. *Toxicon*: Vol. 39: 7-14.
- Olivera, B. M. 2002.** *Conus* venom peptides: reflections from the biology of clades and species. *Annual review of ecology and systematics*: Vol. 33: 25-42.
- Olivera, B. M. 2006.** *Conus* peptides: biodiversity-based, discovery and exogenomics. *The journal of biological chemistry*: Vol. 281: 31173–31177.
- Page, A. J., Brierley, S. M. y Martin, C. M. 2005.** Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut*: Vol. 54:1408–1415.

- Porcher, C., Horowitz, B., Ward, S. M. y Sanders, K. M. 2004.** Constitutive and functional expression of cyclooxygenase 2 in the murine proximal colon. *Neurogastroenterology and Motility*: Vol. 16:785–799.
- Prommer, E. E. 2005.** Ziconotide: can we use it in palliative care?. *The American journal of hospice & palliative Care*. Vol. 22: 269-372.
- Rojas, A., Cruz, S., Rauch, V., Bye, R. y Mata, R. 1995.** Spasmolytic potential of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*: Vol. 2: 51-55.
- Rojas, A., Torres, M., Rojas, J. I., Feregrino, A. y Heimer de la Cotera, E. P. 2002.** Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon*: Vol. 40: 777-785.
- Samuelsson, G. 1990.** Assays for pharmacological activity: Non-specific assays. *Methods in plant biochemistry*. 1ra ed. Academic Press, Nortfolk: 261-280.
- Shen, G. S., Layer, R. T. y McCabe, R.T. 2000.** Conopeptides: From deadly venoms to novel therapeutics. *Drug discovery today*: Vol. 5: 98–106.
- Shon, K. J., Stocker, M., Terlau, H., Stuhmer, W., Jacobsen, R.B., Walker, C.S., Grilley, M., Watkins, M., Hillyard, D.R., Gray, W.R. y Olivera, B.M. 1998.** The journal of biological chemistry: Vol. 273: 33-38.
- Singewald, N., Kouvelasd, D., Mostafa, A. Sinner, C. y Phillippu, A. 2000.** Release of glutamate and GABA in the amygdala of conscious rats by acute stress and baroreceptor activation: differences between SHR and WKY rats. *Brain research*: Vol. 864: 138-141.
- Staats, P. S., Yearwood, T. y Charapata, S. G. 2004.** Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: A randomized controlled trial. *The journal of de American Medical Association*: Vol. 291: 63-70.
- Tache, Y., y Perdue, M. H. 2004.** Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterology and Motility*: Vol. 16(1):137–142.
- Terlau, H., Shon, K. J., Grilley, M., Stocker, M., Stuhmer, W. y Olivera, B. M. 1996.** Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature*. Vol. 381: 148-151.

- Terlau, H. y Olivera, B. M. 2004.** *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological reviews*: Vol. 84: 41–68.
- Tonini, M. 2005.** 5-HT₇ receptors modulate peristalsis and accommodation in the guinea pig ileum. *Gastroenterology*: Vol. 129: 1557–66.
- Tonini, M. 2005.** 5-Hydroxytryptamine effects in the gut: the 3, 4, and 7 receptors. *Neurogastroenterology and Motility*: Vol. 17: 637–642.
- Wang, Y. X., Gao, D. y Pettus, M. 2000.** Interactions of intrathecally administered ziconotide, a selective blocker of neuronal N-type voltage-sensitive calcium channels, with morphine on nociception in rats. *Pain*: Vol. 84(2-3): 271-281.
- Ubilluz, R. 1993.** Avances en péptidos gastrointestinales: somatostatina. *Revista de gastroenterología del Perú*: Vol. 13: 178-85
- Valencia, G. C. J. 2007.** Caracterización bioquímica y farmacológica de toxinas contenidas en los bulbos del aparato venenoso de *Conus austini*. Querétaro, Qro. Facultad de Química, UAQ. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. En prensa.
- Williamson, M. E., Ukako, T. D. y Evans, J. F. 1996.** Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. *Pharmacological methods in phytotherapy research*: 1-46.
- Xiang, Z. y Burnstock, G. 2005.** Distribution of P₂Y(2) receptors in the guinea pig enteric nervous system and its coexistence with P₂X(2) and P₂X(3) receptors, neuropeptide Y, nitric oxide synthase and calretinin. *Histochemistry and cell biology*: 1–12.
- Zholos, A. V., Tsytsyura, Y. D., Gordienko, D. V., Tsvilovskyy, V. V. y Bolton, T. B. 2004.** Phospholipase C, but not InsP₃ or DAG, -dependent activation of the muscarinic receptor-operated cation current in guinea-pig ileal smooth muscle cells. *British journal of pharmacology*: Vol. 141: 23-36.
- Zugasti, C. A. 2005.** Caracterización Bioquímica y Biológica de las Toxinas del Caracol Marino *Conus austini*. Querétaro, Qro. Instituto de Neurobiología de la UNAM. Tesis para obtener el título de Doctorado en Ciencias del Mar y Limnología. 1-2.

Zugasti- Cruz, A., Maillo, M., López-Vera, E., Falcón, A., Heimer de la Coterá, E., Olivera, B. M. y Aguilar, M. B. 2006. Amino acid sequence and biological activity of a γ -conotoxin-like peptide from the worm-hunting snail *Conus austini*. Peptides: Vol. 27: 506–511.