



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MICROBIOENSAYO PARA LA EVALUACIÓN DE
CONOTOXINAS EN LARVAS DE
Drosophila melanogaster

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

LUIS ÁNGEL MARTÍNEZ HERNÁNDEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Martínez

Hernández

Luis Ángel

26 25 93 44

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

304099537

2. Datos del tutor

Dr

José Estuardo

López

Vera

3. Datos del sinodal 1

Dr

Juan Rafael

Riesgo

Escovar

4. Datos del sinodal 2

Dra

América Nitxin

Castañeda

Sortibrán

5. Datos del sinodal 3

Dr

Francisco Javier

Espinosa

García

4. Datos del sinodal 4

Dr

Rafael

Camacho

Carranza

7. Datos del trabajo escrito

Microbioensayo para la evaluación de conotoxinas en larvas de *Drosophila melanogaster*

53 p

2012

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Dr. José Estuardo López Vera, quiero agradecer el haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por los consejos, paciencia y conocimientos; así como tu amabilidad y amistad. ¡¡Muchas Gracias!!

Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar, por aportar las cepas utilizadas para poder realizar este trabajo, además de su tiempo y comentarios.

Agradezco profundamente a mi comité tutorial por el tiempo y atención que me prestaron para la realización y conclusión de éste trabajo, así como sus invaluable comentarios y consejos.

A mis compañeros de la carrera: Fernando, Moisés, Diana, Yatzin, Eduardo y Federico, por brindarme su amistad y compartir tantos momentos conmigo durante la carrera.

A las chicas del laboratorio: Elba, Dalia, Artemisa, Lucia y Angélica por sus consejos, amistad y compañerismo durante mi estancia en el laboratorio.

A todos mis amigos: por haberse cruzado en mi camino brindándome su amistad y compartir tantas vivencias conmigo.

DEDICATORIAS

Quiero agradecer con gran profundidad a las dos personas que mas quiero en esta vida, ellas dos son los pilares que me han dado el valor para seguir adelante y superarme académica y personalmente.

José Guadalupe Martínez Santillán (mi padre) por la paciencia para guiarme a lo largo de mi vida, por trasmitirme el carácter que me ha influenciado y convertido en el hombre que soy.

María Luis Hernández Barrientos (mi madre) por ser la persona más comprensiva y cariñosa conmigo a pesar de mis errores, por darme la vida y heredarme parte tu sentimentalismo, además de enseñarme el valor de querer a las personas.

A mis hermanos: José Guadalupe, Fátima y Rosa Isela, por darme el privilegio de ser su hermano, por estar conmigo desde que fuimos niños y darme el gusto de compartir mi vida junto a ustedes.

A mis abuelos: Candelaria Barrientos, Miguel Hernández, Ofelia Santillán y Miguel Martínez, por brindarme cariño y parte de su tiempo, a pesar de que no conocí a todos y otros ya no están aquí, confío en que algún día nos volveremos a ver.

A un gran amigo: José Luis Galicia, por tu honesta amistad y compartir tantos momentos en nuestra loca juventud. Confío en que algún día te volveré a ver y recordar "esos viejos tiempos".

ÍNDICE

RESUMEN	2
I. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Océanos como fuente de moléculas bioactivas	4
1.2 Phylum Mollusca	5
1.2.1 Plan corporal y clasificación	5
1.3 Clase Gastropoda	6
1.4 Superfamilia Conoidea	8
1.5 Género <i>Conus</i>	9
1.6 <i>Drosophila melanogaster</i>	10
1.6.1 Descripción	10
1.6.2 Taxonomía	10
1.6.3 Ciclo de Vida	11
II. ANTECEDENTES	12
2.1 Algunos estudios sobre <i>Conus</i>	12
2.2 Características del Veneno de <i>Conus</i>	12
2.3 Conotoxinas; Características y Clasificación	13
2.4 Canales iónicos	18
2.5 Canales iónicos activados por voltaje	19
2.5.1 Canales de Potasio	19
2.6 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico	23
III. JUSTIFICACION	26

IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	29
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	31
7.1 Compuestos comerciales	31
7.2 Conotoxinas	31
7.3 Cepas de <i>D. melanogaster</i>	32
7.4 Medio de cultivo para <i>D. melanogaster</i>	32
7.5 Análisis de datos	33
VIII. RESULTADOS	34
8.2 Compuestos comerciales	34
8.3 Conotoxinas	35
IX. DISCUSIÓN	38
X. CONCLUSIONES	42
ANEXOS	43
REFERENCIAS	47

RESUMEN

La Superfamilia Conoidea formada por aproximadamente >10,000 especies se caracteriza por presentar un sistema bucal modificado, llamado aparato venenoso. La mayoría de las especies contenidas en esta Superfamilia se distribuyen en tres Familias; Conidae, Terebridae y Turridae, siendo la primera la de mayor interés, debido a que en ella se encuentra el género *Conus* en el cual se han basado la mayoría de los estudios. El veneno de cada especie de *Conus* consta de entre 50 y 200 componentes, todos biológicamente activos y se les ha llamado conotoxinas o conopéptidos. La mayoría de estos componentes en promedio están compuestos por 25 aminoácidos, entre los cuales hay varios residuos de cisteína que permiten la formación de puentes disulfuro y con ello una alta estabilidad.

Estas conotoxinas presentan una gran bioactividad, por tener como blanco molecular canales iónicos activados por voltaje, canales iónicos activados por ligando o receptores acoplados a proteínas G, entre otros. Dada la gran diversidad de conotoxinas, éstas se les han agrupado en Superfamilias por la alta semejanza a nivel del precursor y en Familias farmacológicas por su blanco molecular o de acción. Familias como las α -conotoxinas se caracterizan por ser antagonistas competitivas para receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR). Algunas otras actúan bloqueando canales de K^+ activados por voltaje de tipo *Shaker*, tal es el caso de las Familias k y kM-conotoxinas.

Existen compuestos como el 4-AP y el TEA que han sido utilizados para estudiar el canal de potasio, debido a que son bloqueadores de dicho canal. El primero es un bloqueador específico, mientras que el segundo es menos específico y se ha utilizado como base para estudiar la sensibilidad del canal de potasio. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las conotoxinas κ PVIIA, κ M-RIIK y SpIB, y de los compuestos 4-AP y TEA al ser inyectados en volúmenes bajos (4.6 nl) en larvas de tercer estadio de madurez de dos cepas de *Drosophila melanogaster* (*yw* y *eag*), para observar la sobrevivencia de ambas cepas y así determinar si con

este organismo se puede implementar un microsistema de evaluación rápida de toxinas con actividad antagónica sobre canales de potasio.

Los resultados obtenidos con las pruebas estadísticas realizadas sugieren que no existe diferencia significativa en el efecto que tienen los compuestos 4-AP y TEA sobre las cepas utilizadas ($F=0.8561$, $p=0.5658$), pero si las hay en la sobrevivencia entre la cepa *eag* y la cepa *yw* a concentraciones superiores a 10mM con ambos compuestos ($p < 0.05$). Por otra parte, con las conotoxinas κ -PVIIA y κ M-RIIIK, en ambas si se encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia de la cepa *eag* con respecto a *yw* desde la concentración de 1 μ M ($p < 0.05$). En el caso de la conotoxina SpIB no se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia entre estas dos cepas (*eag* y *yw*) con ninguna de las concentraciones utilizadas ($p > 0.05$).

Palabras Clave: conotoxinas, canales iónicos, canal de potasio, *Drosophila melanogaster*.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Océanos como fuente de moléculas bioactivas

Los Océanos sostienen aproximadamente a la mitad de la biodiversidad del planeta. Se ha calculado que en él se encuentran alrededor de diez millones de especies, de las cuales, solo se conoce una pequeña parte [55]. Los organismos marinos al igual que plantas y animales terrestres producen compuestos con propiedades bioactivas; entre las que destaca la alta actividad biológica contra patógenos [43].

Las condiciones que ejerce el mar sobre los organismos que lo habitan ocasionan que ellos sintetizen compuestos derivados de su metabolismo secundario, y estas a su vez sean utilizadas con fines específicos, tales como, marcar su territorio y defenderse de sus depredadores y competidores [55].

Los primeros estudios de moléculas bioactivas de origen marino se realizaron en los años sesenta, estas fueron la Tetradoxina y la Saxitoxina, moléculas extraídas del pez globo y de dinoflagelados, respectivamente. A pesar de ello, los océanos aún se encuentran casi inexplorados, desde el punto de vista de la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. Actualmente se conocen solamente en uso 13, 000 compuestos marinos frente a unos 155, 000 de origen terrestre [51].

El 70% del total de las moléculas presentes en el mar se encuentran distribuidas en cinco grupos: esponjas, cnidarios, moluscos, tunicados y equinodermos [51]. Los estudios realizados con estas moléculas han tenido un incremento significativo en las últimas décadas, ocasionado principalmente por su uso como poderosas herramientas específicas en el área de farmacología [47]. Ejemplos de ello es su utilización como tratamientos en padecimientos humanos, entre los que podemos citar a la Ecteinascidina 743 o trabectedina, procedente del tunicado *Ecteinascidia turbinata*; que presenta propiedades antitumorales [32], el veneno de la anemona *Stichodactyla helianthu* es utilizado en el tratamiento de la esclerosis múltiple [62], y el Ziconotide (Prialt) extraído

del molusco *Conus magus*, este fármaco ha superado la fase clínica IV y se utiliza para el tratamiento de dolor crónico en pacientes con SIDA y cáncer terminal, además de presentar la característica de ser 10, 000 veces mas potente que la morfina y no producir adicción [4, 83].

1.2 Phylum Mollusca

El Phylum Mollusca es el segundo grupo más grande dentro del reino animal en cuanto a número de especies: actualmente consta con cerca de 93, 000, mientras que los artrópodos ocupan el primer lugar [11]. Se conocen unos 70, 000 moluscos fósiles que datan desde el Cámbrico (debido a la aparición de una concha mineral) y han colonizado todos los hábitats del mar, del agua dulce y tierra firme [5, 9].

1.2.1 Plan corporal y clasificación.

Los moluscos presentan una gran variedad, tanto en forma y tamaño, desde microscópicas almejas hasta calamares gigantes. Son protostomados celomados con simetría bilateral. En general, el cuerpo está constituido por tres partes claramente diferenciadas: La cabeza, el pie y la masa visceral [9].

En la cabeza, usualmente, en la región bucal hay una estructura exclusiva llamada rádula, que es una banda con dientes, que se emplea como un raspador para alimentarse. Además, puede haber diferentes estructuras sensoriales, las más importantes son los ojos, los estatocistos y los tentáculos [11].

El pie corresponde a la parte ventral musculosa, es muy variable en forma y función, por lo que en especies terrestres presenta bandas ciliadas, en especies excavadoras adquiere forma de hacha, en otros la parte anterior de este se convierte en una aleta natatoria, incluso se puede convertir en un órgano prensor o a desaparecer en especies sésiles [46].

En la masa visceral se encuentra la mayor parte del canal intestinal, las gónadas, los riñones, el corazón y el estómago. Allí esta presente una glándula digestiva multifuncional, denominada hepatopáncreas, que como su nombre lo dice, actúa como hígado y páncreas [46]. Alrededor y por detrás de la masa visceral se encuentra la cavidad paleal (o cavidad del manto), en dicha cavidad suelen alojarse los ctenidios (o branquias), y los orificios de salida del tubo digestivo, de los nefridios y del sistema reproductor, así como los osfradios [11].

El cuerpo está cubierto por una gruesa lamina de piel (epidermis y cutícula) denominada manto (también llamada palio), que tiene un papel fundamental en la organización del cuerpo, ya que secreta el esqueleto calcáreo, que puede estar constituido por pequeños escleritos, o placas, incluidos en la pared del cuerpo, o por una concha sólida, interna o externa [11]. La clasificación del filo se muestra a continuación:

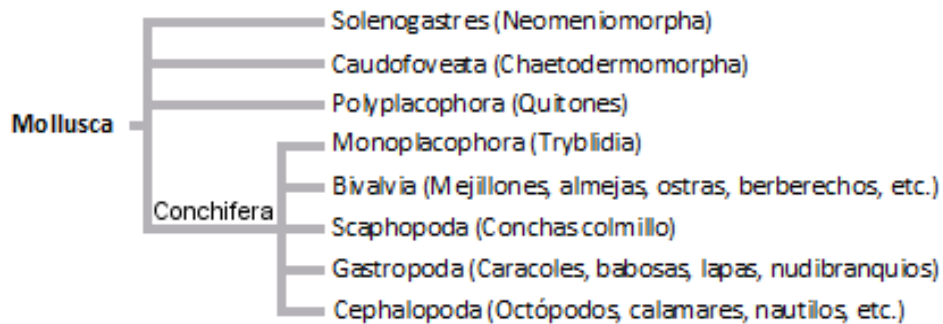


Figura 1. Clasificación del Phylum Mollusca, se muestran las ocho clases que integran al filo, el subfilo Conchifera (Gegenbaur 1878) incluye a los grupos de moluscos que presentan una concha sólida, ya sea interna o externa (Modificado de Tree of life Web Project, 1995).

1.3 Clase Gastropoda

Sin duda alguna es la clase más grande y variada dentro de los moluscos, abarca cerca de 75, 000 especies vivientes y aproximadamente 15 000 formas fósiles [11, 46]. Se tiene un registro ininterrumpido desde el periodo Cámbrico y han experimentado la radiación adaptativa más extensa de todas las clases de moluscos, por lo que se les ha considerado el grupo más próspero [9].

La alimentación de los gasterópodos es muy variada, observándose hábitos alimenticios tales como herbivoría, carnivoría, consumidores de partículas en suspensión, de materias orgánicas en descomposición, y parasitismo [70]. La rádula en la mayoría de los gasterópodos se ha convertido en un órgano de alimentación con un alto grado de desarrollo, sirviendo para raspar, cortar, etc. Su estructura presenta dientes (de quitina) dispuestos longitudinalmente y en hilera en la zona media. A los lados se encuentran hileras de dientes marginales y laterales; el número de ellos es variable y va de 16 a varios millares (Figura 2) [9].

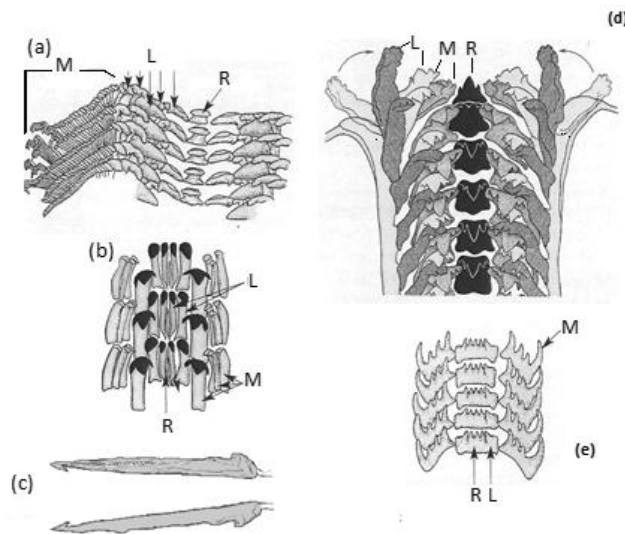


Figura 2. Modificaciones radulares y disposición de los dientes quitinosos de los cinco principales órdenes de Gasterópodos. (a) ripidioglosa; (b) docoglosa; (c) toxoglosa; (d) tenioglosa; (e) raquidioglosa. R= raquis o diente central, L= dientes laterales, M= dientes marginales. (Modificado de Remane *et al.*, 1980 [70]; Brusca y Brusca, 2005 [11]; http://www.coneshell.net/Gif/f_radule.gif).

La Clase Gastropoda se divide generalmente en tres subclases: los pulmonados (caracoles y babosas terrestres), los opistobranquios (babosas marinas) y los prosobranquios (principalmente caracoles marinos con concha), esta última es la más numerosa y en ella se encuentra el Orden Neogastropoda, el cual contiene a la Superfamilia Conoidea [11].

1.4 Superfamilia Conoidea

La Superfamilia Conoidea también conocida como el suborden Toxoglossa, es un grupo constituido por más de 10, 000 especies. Se caracteriza por presentar un sistema bucal modificado para formar un aparato venenoso, el cual está constituido por tres partes: un bulbo venenoso, un conducto venenoso y un saco radular (Figura 3). El veneno es producido en el conducto venenoso, donde células epiteliales especializadas expresan y secretan una gran variedad de toxinas de origen peptídico [86], después es empujado por el bulbo hasta el saco, en el cual se almacenan los dientes desechables en forma de arpón [20]. En la depredación un diente se tiene dentro de la proboscis (estructura larga con gran capacidad de maniobra), la cual sirve como cordel de pesca, un incremento en la presión hidrostática impulsa el diente, que simultáneamente penetra en la pared corporal de la presa, captura y la sujeta, e inyecta una potente neurotóxina a través de la herida y paraliza a la presa que posteriormente es engullida por completo [42, 56]

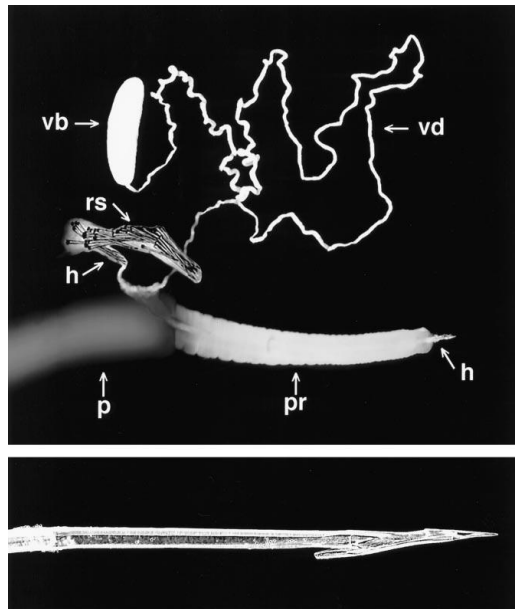


Figura 3. En la parte superior se muestra el aparato venenoso de *C. purpurascens*. El aparato venenoso comprende; vb, bulbo venenoso; vd, ducto venenoso; rs, saco radular; p, faringe; pr, proboscide; h, diente radular en forma de arpón. Cada arpón es usado una sola vez, los demás se alojan en el saco radular. En la parte baja, se muestra una fotografía tomada con microscopio electrónico de barrido de un diente radular. (Tomado de Olivera, 2006) [57].

La mayor parte de las especies que contiene la Superfamilia Conoidea están distribuidas principalmente entre las Familias Conidae, Terebridae y Turridae, siendo la primera la de mayor interés, debido a que la mayoría de los estudios que se han realizado están basados en el género *Conus* perteneciente a esta Familia [41]. La clasificación antes mencionada está basada exclusivamente en las características morfológicas de la concha. Otra clasificación fue propuesta en 1993 por Taylor y colaboradores [80]. En ella proponen clasificar a la Superfamilia Conoidea en 6 familias, tomando en consideración la anatomía de la parte anterior del aparato digestivo de las especies estudiadas, llegando así a la inclusión de las Familias Pseudomelatonidae, Drilliidae y Strictispiridae; todas con el aparato venenoso característico de la Superfamilia a excepción de la Familia Strictispiridae que no presenta aparato venenoso.

1.5 Género *Conus*

Dentro de la Familia Conidae se encuentran tres Géneros: *Conorbis* (con una especie), *Hemiconus* (ya extinto) y *Conus* [39]. La aparición y expansión del género *Conus* se presenta después de la extinción masiva del Cretácico/Terciario (K/T), hace aproximadamente 50 millones de años. La primer radiación del grupo ocurre tras la desaparición de los amonites, que eran los moluscos depredadores de los mares. Una segunda radiación se suscita en el Mioceno y continua hasta la actualidad [34, 56, 82]. Los fósiles más antiguos pertenecientes al Género *Conus* son: *C. roualti* y *C. concinnus*, descubiertos en Francia e Inglaterra, respectivamente [34, 39].

Se han descrito 700 especies dentro del Género *Conus*, las cuales habitan arrecifes coralinos y zonas intermareales con suelos arenosos o rocosos, aunque existen especies que habitan profundidades mayores a los 400 metros y actualmente se destacan como uno de los principales depredadores de estos hábitats [42, 59]. Pueden ser encontrados en todo el ambiente tropical; solo unas pocas especies habitan aguas frías. Se ha documentado que un solo arrecife de coral en el Indo-Pacífico tropical puede tener más de 30 especies diferentes de *Conus* [56].

La clasificación de los *Conus* está basada en el tipo de presa de la cual se alimenta. El primer grupo corresponde a los vermívoros, con 300 especies, las cuales se alimentan de poliquetos,

equiuridos y hemicordados. El segundo grupo corresponde a los molusquívoros, que se alimenta de otros moluscos y el tercer grupo el de los piscívoros, que se alimenta de peces, de estos dos últimos grupos se han descrito cerca de 50 especies [61].

1.6 *Drosophila melanogaster*

1.6.1 Descripción

El Género *Drosophila* agrupa alrededor de 3341 especies. Al ser un insecto presenta una tagmosis dividida en: cabeza, tórax y abdomen, con un exoesqueleto de quitina, el adulto mide aproximadamente 3mm y presenta un marcado dimorfismo sexual [67].

El primer tagma, la cabeza, presenta seis segmentos: Labrum, Clipeus, Antenal, Ocular, Maxilar y Labial [72]. El segundo tagma presenta tres segmentos torácicos (numerados de T1 a T3), del Protórax (T1) salen el primer par de patas (con peines sexuales en machos), del Mesotórax (T2) sostiene el segundo par de patas y un par de alas, y el Metatórax (T3) presenta un par de patas y un par de balancines [3]. El tercer tagma está formado por siete u ocho segmentos visibles en la hembra y de cinco a seis visibles en el macho [72].

1.6.2 Taxonomía

La clasificación de *D. melanogaster* ó “mosca del vinagre” o “mosca de la fruta” es la siguiente:

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Hexapoda

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Orden: Diptera

Familia: Drosophilidae

Género: *Drosophila*

Especie: *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830).

1.6.3 Ciclo de Vida

Drosophila melanogaster es un organismo holometábolo y presenta estadios en su ciclo de vida (Figura 4): huevo, larva (con sus respectivos estadios), pupa e imago o adulto, con una duración de 10 días a 25 °C y 60% de humedad [8, 73]. Una vez fertilizado el huevo de la hembra de *D. melanogaster*, y un día posterior a la ovoposición, eclosionará una larva que pasa por tres estadios larvarios. Estos estadios larvarios duran cuatro días, y en ellos aumenta de tamaño hasta convertirse en una pupa inmóvil (similar a un capullo de mariposa); en los siguientes cinco días el cuerpo de la larva será “remodelado” y posteriormente dará lugar a un adulto [71].

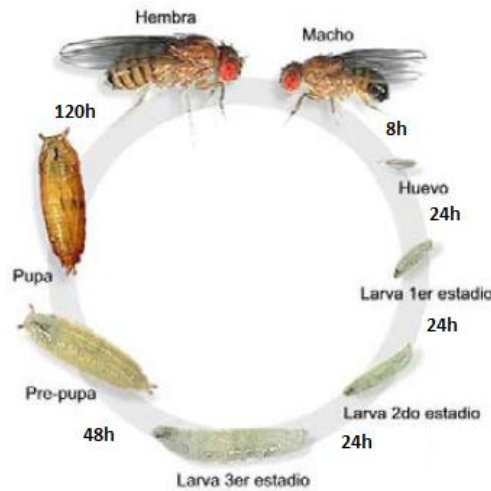


Figura 4. Ciclo de vida de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Modificado de <http://flymove.uni-muenster.de/>).

Es importante destacar que 72 horas posterior a la eclosión, la larva se encuentra en el tercer estadio larval (L3), con una talla de aproximadamente 4.5mm y presenta activas a la mayoría de sus rutas metabólicas [24]. Se encuentran presentes dos estirpes celulares generales: una corresponde al tejido larvario y otra integrada por células de los discos imagales, estas últimas presentan un menor tamaño, indiferenciación aparente y proliferación a un ritmo diferente de las células larvarias [3, 74]. Este estadio larval termina aproximadamente a las 120 horas después de la eclosión, dando origen a la pupa. En la pupa ocurre un proceso de histólisis de la mayoría de los tejidos larvarios al tiempo que continúa la diferenciación y organización de las respectivas estructuras del adulto a partir de los discos imagales, principalmente [27].

II. ANTECEDENTES

2.1 Algunos estudios sobre *Conus*

El estudio del veneno de los caracoles cono inician en la década de los 70's. Las primeras evidencias sobre la existencia de múltiples toxinas presentes en tales venenos fueron descubiertas en Australia por parte del investigador Robert Endean y colaboradores en 1974, al utilizar el veneno crudo de un grupo de caracoles cono y encontraron evidencia que sugería la presencia de más de un componente activo [19].

Tres años después Spence y colaboradores en 1977 realizan la primera caracterización bioquímica haciendo referencia a componentes activos presentes en los venenos de *Conus* [78]. La toxina extraída de *C. geographus*, paralizaba e inhibía los potenciales de acción en músculos, sin que se detectara algún efecto sobre la actividad eléctrica de los nervios. Este fue un gran avance para este campo de estudio, debido a que se determinó la composición de aminoácidos de la toxina. Sin embargo no fue caracterizada por completo.

No fue sino hasta finales de los 70's y principios de los 80's cuando se logra secuenciar y sintetizar químicamente la primera toxina. El péptido fue nombrado α -conotoxina GI, está compuesto de 13 aminoácidos y se extrajo de *C. geographus* [16, 23].

En los litorales de México se encuentran más de 50 especies pertenecientes al Género *Conus*, alimentándose mayoritariamente de gusanos marinos [59]. Desafortunadamente no se le ha dado en el país gran énfasis al estudio de los venenos de los caracoles cono.

2.2 Características del Veneno de *Conus*

Se ha identificado un gran número de toxinas en las especies del Género *Conus*. Los genes que codifican esos péptidos son el resultado de una acelerada evolución, por lo que cada especie cuenta con una única serie de toxinas peptídicas. De esta manera de las 700 especies de caracoles cono descritas se sabe que cada una de ellas produce hasta 200 péptidos, por lo que se

estima que puedan existir más de 100,000 secuencias peptídicas en los ductos venenosos de todas las especies incluidas en el Género [59].

El veneno de cada especie de *Conus* consta de entre 50 y 200 componentes únicos, todos biológicamente activos y a los que se les ha llamado conotoxinas o conopéptidos [44]. Muchos de ellos están formados por 7 y 40 aminoácidos, aunque la mayoría contiene en promedio 25 aminoácidos, siendo muy pequeños al compararlos con las de arañas y víboras cuyo tamaño va de 40 a 80 aminoácidos [42, 55].

Una característica de estas toxinas es la presencia o no de residuos de cisteína en su estructura primaria, por lo que son divididas principalmente en dos grupos; *i*) aquellas que presentan múltiples puentes disulfuro, llamados conotoxinas y *ii*) los que contienen uno o ningún puente disulfuro, llamados conopéptidos [33, 48].

Estos últimos representan una minoría, sin embargo, poseen propiedades farmacológicas nuevas en el ámbito de la medicina. Incluidas en este grupo tenemos a; las *conantokinas*, péptidos pequeños de 17-27 aminoácidos antagonistas al receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) [62], las *contulakinas*, que son péptidos parecidos a la neurotensina, las *conopresinas*, agonistas de la vasopresina y los *contrifanos*, cuyo blanco molecular aún es desconocido [49], entre otros.

2.3 Conotoxinas; Características y Clasificación

El pequeño tamaño molecular de las conotoxinas permite que se difundan rápidamente en los tejidos de la presa y así alcancen en un breve lapso de tiempo los blancos moleculares que pueden ser canales iónicos activados por voltaje, canales iónicos activados por ligando o receptores acoplados a proteínas G [68]. Otra característica interesante de las conotoxinas es su alta estabilidad, lograda mediante modificaciones postraduccionales y múltiples enlaces disulfuro, lo que favorece un plegamiento estable del péptido y confiere la capacidad de resistir la degradación enzimática inducida por proteasas que bien se pueden encontrar dentro del mismo veneno o en la presa [15, 36].

Dentro de las conotoxinas se ha documentado la presencia de dos o más enlaces disulfuro. En algunos casos del 22 al 50% de los aminoácidos que conforman al péptido son cisteínas (Cys), capaces de formar enlaces disulfuro. Los residuos de cisteínas les confieren una termo estabilidad poco común, incluso a temperaturas de 100°C [14]. Además estos péptidos tienen otras modificaciones post-traduccionales reportadas que incluyen amidación en la región C-terminal, hidroxilación de prolinas, y carboxilación en glutaminas, bromación de triptofanos, glucosilación en treoninas, sulfatación de tirosinas, piroglutamación, ciclización de los extremos amino y carboxilo terminal e isomerización en aminoácidos de tipo D [36, 57].

Un gran número de péptidos han sido identificados en diversas especies de *Conus*, y estos se han agrupado dentro de Superfamilias con estructura similar (genéticamente descrito) y Familias funcionalmente similares (farmacológicamente descritas) [59]. Los miembros de cada Superfamilia tienen en común una secuencia señal altamente conservada en sus precursores y los miembros de cada Familia dentro de una Superfamilia tienen características compartidas en la disposición de residuos de cisteína dentro de sus péptidos [33].

Se conocen cerca de once Superfamilias de conotoxinas (ver Tabla 1), de las cuales las más extensamente estudiadas son las; A, M y O. La mayoría de especies de *Conus* que cazan peces y moluscos se encuentran dentro de estas 3 Superfamilias, que son las que cuentan con la mayor proporción de péptidos presentes en sus venenos [33].

La Superfamilia A esta integrada por las familias α , αA , κA y ρ -conotoxinas. Esta superfamilia tiene diferentes patrones de cisteínas (CC-C-C y CC-C-C-C-C).

- Las α -conotoxinas fueron las primeras en descubrirse y son las más pequeñas, compuestas por 13-15 aminoácidos [39]. Son antagonistas competitivas para el receptor nicotínico de acetilcolina, y se unen a receptores de tipo neuromuscular [7].

- Las α A-conotoxinas al igual que las α -conotoxinas, son competitivamente antagonistas para receptores nicotínicos de acetilcolina [33]. Todos los péptidos pertenecientes a esta familia que se han caracterizado actúan en el subtipo muscular de estos receptores [82].
- Las κ A-conotoxinas son péptidos O-glicosilados en serina, que actúan bloqueando canales de K^+ activados por voltaje en peces y anfibios en los cuales se identificó recientemente como blanco el canal Kv1 tipo *Shaker* [7, 41].
- Las ρ -conotoxinas antagonizan el receptor adrenérgico, que es un receptor acoplado a proteínas G. Esta familia relativamente nueva cuenta con una única conotoxina caracterizada, la ρ -TIA [43].

La Superfamilia M: Integrada por las familias farmacológicas μ , ψ y por las κ M-conotoxinas, que presentan un patrón único en el arreglo de cisteínas (CC-C-C-CC).

- μ -conotoxinas: es la familia más notable, esta compuesta por péptidos de 20-22 aminoácidos, varias de ellas contienen hidroxiprolina y se encuentran amidadas. Tienen su efecto bloqueando las corrientes de Na^+ compitiendo por el sitio I de los canales de Na^+ sensibles a voltaje [41]. Actúan sobre canales de sodio activados por voltaje de músculos y nervios [54].
- ψ -conotoxinas: son antagonistas no competitivos de los receptores nicotínicos de acetilcolina, actúan en el subtipo muscular [31, 82]. Son las conotoxinas más grandes en cuanto al número de residuos de aminoácidos [41].
- κ M-conotoxinas: Bloquean canales de K^+ activados por voltaje, principalmente los de tipo *Shaker* [82].

La Superfamilia O: Es la más diversa en términos de función farmacológica. Comprende a las familias; ω , κ , δ , μ O y γ -conotoxinas. Presenta un patrón único en el arreglo de cisteínas (C-C-CC-C-C).

- ω -conotoxinas: se han convertido en reactivos para investigaciones en canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. Se usan para bloquear las terminales presinápticas y con ello la liberación de neurotransmisores [26].
- δ -conotoxinas: su actividad es variable según el sistema en el cual se utilice. Puede retrasar o inhibir la inactivación de canales de Na^+ sensibles a voltaje [26].
- μO -conotoxinas; afectan las corrientes originadas por los canales de Na^+ , asociándose al dominio II [26].
- κ -conotoxinas: actúan bloqueando canales de K^+ activados por voltaje de tipo *Shaker* [54].
- γ -conotoxinas: esta familia presenta junto con las seis cisteínas un patrón distintivo en su estructura primaria: γCCS . Presenta un residuo con modificación post-traducciona, gamma-carboxiglutamato (Gla). La $\gamma\text{-PnVIIA}$ es la única toxina que ha demostrado tener un efecto activador sobre canales marcapaso o “canales activados por hiperpolarización”, causantes del disparo espontáneo de potenciales de acción [45].

Tabla 1. Clasificación de las Conotoxinas.

Superfamilia	Arreglo de Cisteínas	Familia	Actividad farmacológica y/o blanco molecular
A	CC-C-C	α	Antagonista, receptor nicotínico de acetilcolina
		ρ	Antagonista, receptor adrenérgico α 1B
	CC-C-C-C-C	αA	Antagonista, receptor nicotínico de acetilcolina
		κA	Bloquea canales de K^+ activados por voltaje
M	CC-C-C-CC	μ	Bloquea canales de Na^+ activados por voltaje
		ψ	Antagonista, receptor nicotínico de acetilcolina
		κM	Bloquea canales de K^+ activados por voltaje
O	C-C-CC-C-C	ω	Bloquea canales de Ca^{2+} activados por voltaje
		κ	Bloquea canales de K^+ activados por voltaje
		δ	Retrasa la inactivación de canales de Na^+ activados por voltaje
		μO	Bloquea canales de Na^+ activados por voltaje
		γ	Modula canales tipo marcapaso
T	CC-CC	$\tau(\epsilon)$	Bloquea canales de Ca^{2+} presinápticos
	C-C-CPC	$\chi(\lambda)$	Inhibe el transporte de norepinefrina
I	C-C-CC-CC-C-C	κI	Modula canales de K^+ activados por voltaje dependientes de Ca^{2+} (Tipo BK)
		I	Bloquea canales Kv1.1 y Kv1.3 Agonista del canal de Na^+
P	C-C-C-C-C-C		(?)
S	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	σ	Antagonista, receptor 5-HT ₃
J	C-C-C-C	$\alpha/\kappa J$	Receptores de acetilcolina Inhibe canales de K^+
V	C-C-CC-C-C-C-C		(?)
C	C-C	αC	Receptores nicotínicos de acetilcolina
D	C-CC-C-CC-C-C-C-C-C	αD	Receptores nicotínicos de acetilcolina

(Fuente: McIntosh *et al.*, 1999 [48]; McIntosh y Jones, 2001 [49]; Jiménez *et al.*, 2003[31]; Olivera, 2006 [57]; Heinemann y Leipold, 2007 [26]; Favreau y Stöcklin, 2009 [20]; Pérez-Rueda, 2010 [64]).

2.4 Canales iónicos

El paso de moléculas a través de la membrana está mediado por proteínas de transporte, que poseen segmentos que la atraviesan, formando canales por los cuales pasan solutos que no pueden atravesar la membrana por difusión simple, tales como aminoácidos, nucleótidos, iones, etc. Se conocen dos clases de proteínas de transporte; las proteínas acarreadoras o transportadores y los canales proteicos [69]. Los transportadores se unen con solutos específicos en un lado de la membrana, posteriormente sufren cambios conformacionales que terminan en la transferencia de estos solutos hacia el otro lado de la membrana. Los canales proteicos forman poros acuosos que traspasan la bicapa lipídica, mismos que al abrirse permiten el paso de iones; en esta clase se encuentran los canales iónicos [3].

Algunos canales iónicos son regulados por la unión de un ligando, llamados canales activados por ligando, que puede ser un neurotransmisor o una hormona (a nivel extracelular), o por segundos mensajeros (a nivel citoplasmático). Otros tipos son los canales dependientes de voltaje, que son influenciados por cambios en el potencial de membrana, y por último existe un grupo de canales que se activan por tensión mecánica. La tensión mecánica se origina por una variación en la tensión de la bicapa lipídica. La representación de estos tres tipos de canales iónicos se observa en la Figura 5-A [3, 28].

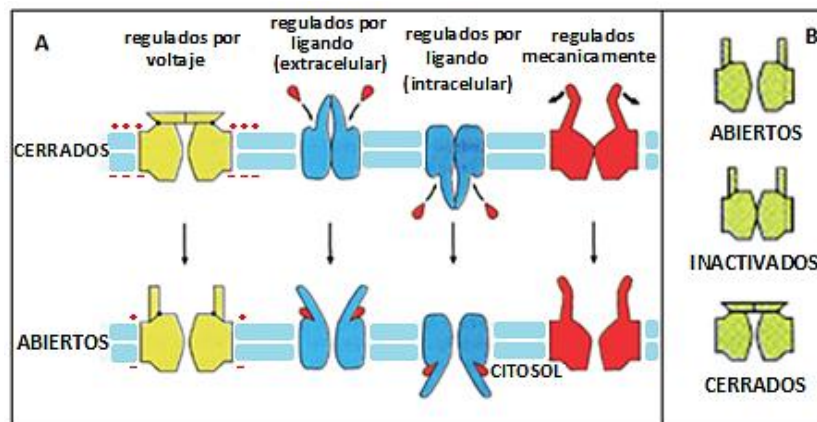


Figura 5. Canales iónicos regulados. Dibujo esquemático de los diferentes sistemas a través de los cuales se pueden regular los canales iónicos (Modificado de Alberts *et al.*, 2002 [3]).

Los canales iónicos disponen de uno o más estados conformacionales estables, que corresponden a estados funcionales. Los tres estados funcionales posibles son: abierto activo (O), cerrado activable (C) y cerrado no activable (I); es decir, este último está desensibilizado o inactivado (Figura 5-B). El estado desensibilizado hace referencia a los canales activados por ligando y el inactivado está en relación a canales activados por voltaje que se encuentran en estado no conductor [63]. La transición de un canal entre los diferentes estados recibe el nombre de “mecanismo de compuerta” o “*gating*”.

2.5 Canales iónicos activados por voltaje

Las funciones que realizamos diariamente, tales como la capacidad de percepción, movimiento y lenguaje, entre otras, se deben a la velocidad con la que se comunican nuestras células. La señalización más rápida de nuestro cuerpo implica mensajes eléctricos producidos por apertura y cierre de canales iónicos en las membranas celulares. Los canales iónicos son proteínas de membrana y funcionan como poros para el paso de iones en particular, como respuesta a un estímulo [3].

Los canales iónicos que se activan por un cambio en la diferencia de voltaje a través de la membrana, sufren un cambio conformacional que conduce al cierre o apertura del poro. Esto genera una alteración transitoria de la permeabilidad de la membrana a iones de manera selectiva y a favor de un gradiente electroquímico. Los principales iones son el sodio, el potasio, el calcio y el cloruro [69]. Entre otras funciones, los canales iónicos son responsables del potencial de membrana, de la contracción muscular, de la regulación del volumen celular, participan en las vías de señalización y son los encargados de la generación del impulso nervioso [28].

2.5.1 Canales de Potasio

La Superfamilia de los canales de potasio es la más grande y estudiada de los canales iónicos. Su clasificación está basada en el número de segmentos transmembranales y de poros, por lo que se han identificado 4 grupos generales; el primer grupo es el de los activados por Calcio (K_{Ca}) que

presenta 6 segmentos transmembranales por subunidad, un sensor de voltaje y un poro. El segundo grupo son los rectificadores entrantes (Kir) formados por heterotetrámeros de 4 subunidades α y β , donde la subunidad α solo contiene 2 segmentos transmembranales y entre ellos se dispone un poro. El tercer grupo son los que tienen dos poros por dominio (K2P) que se encuentran formados por dímeros de unidades con cuatro u ocho segmentos transmembranales y dos poros. Finalmente, el cuarto grupo son los llamados canales de potasio dependientes de voltaje (Kv), y son el grupo más grande y diverso, formado por 12 familias [63, 90].

Dentro del grupo de los canales de potasio activados por voltaje se encuentran las familias más estudiadas que son: *Shaker*, *Shab*, *Shaw* y *Shal*, que reciben sus nombres a partir de los de las mutantes de estos canales en *Drosophila melanogaster*, y tienen su equivalente en mamíferos Kv1, Kv2, Kv3 y Kv4 respectivamente [79].

A diferencia de los canales activados por ligando, que se forman de pentámeros, los canales de potasio activados por voltaje son tetrámericos. La mayoría de estos están compuestos de subunidades individuales o grupos de subunidades. Cada subunidad contiene seis regiones hidrofóbicas transmembranales (S1-S6), con dominios amino y carboxilo terminales en la cara citoplasmática del polipéptido (Figura 6-A) [88]. Las subunidades unidas forman un poro central, que determina las propiedades básicas de apertura y permeabilidad características del canal iónico.

La región P (19 aminoácidos) junto con los segmentos S5 y S6 y la región peptídica que une a los segmentos S4 y S5 forman el poro acuoso. El canal consta de una boca externa y una interna. La primera está constituida por la región P y una parte extracelular de los segmentos S5 y S6, mientras que la segunda está formada por la región peptídica que une los segmentos S4 y S5 y las regiones citoplasmáticas de los segmentos S5 y S6 que se extienden a través de la membrana como dos laminas β paralelas [1, 3].

La selectividad del canal hacia el potasio es controlada por la secuencia GYC, que se encuentra altamente conservada en estos canales. Esta secuencia se ubica en el poro, exactamente entre los segmentos S5 y S6 [25]. El sensor de voltaje, que detecta las variaciones del potencial de membrana para así inducir un cambio conformacional y la consecuente activación del canal, debe sus propiedades al segmento S4, que presenta cada tres residuos un aminoácido cargado positivamente (Arg/Lys) que interactúa con las cargas negativas de los segmentos S2 y S3 [2, 59, 75].

En el ensamblaje de las subunidades α del canal existe la región de tetramerización, a la que se le ha nombrado región T1 que precede al segmento S1 (residuos 83-96) que junto con las cisteínas de las posiciones 55, 96 y 505 se encargan del ensamblaje de las 4 subunidades α , formando así homotetrámeros en familias como *Shaker* y *Shal* e impiden el ensamblaje de subunidades de distintas familias [60, 79]. En canales heterotetrámericos, es decir, que presentan subunidades α y β , el ensamblaje de estas subunidades se produce entre dominios situados en el extremo N-terminal de la subunidad α y el C-terminal de la subunidad β . La presencia de subunidades β modifica las características de cinética o dependencia de voltaje del canal [90].

En este tipo de canales el mecanismo de apertura implica movimientos de la hélice que forma el segmento S4 hacia el interior de la membrana. En estado de reposo (polarizado o cerrado), el segmento S4 se encuentra casi totalmente inmerso en el citoplasma, presentando 5 de sus 7 cargas positivas hacia el medio intracelular [30, 79]. Cuando hay una despolarización se provoca un desplazamiento de este segmento hacia el exterior, quedando así 3 de estas cargas positivas expuestas al medio intracelular, 3 en el espesor de la membrana y 1 en contacto con el medio extracelular. Posteriormente ocurre otro desplazamiento del segmento S4 hacia el medio extracelular, de modo que el residuo R365 queda totalmente expuesto [35]. De esta manera que cuando las 4 subunidades presentan esta posición del segmento S4, el canal se encuentra abierto.

La inactivación que se presenta en estos canales se puede dar por dos mecanismos: uno rápido o de tipo N y otro lento o de tipo C. La diferencia entre ellos es que la inactivación de tipo N implica una reducción completa de la corriente en respuesta a un estímulo despolarizante con duración corta, mientras que la inactivación de tipo C se da en células que fueron despolarizadas durante segundos o minutos. Sin embargo, los canales que se inactivaron por este mecanismo se reactivan más rápido que los que se inactivaron por el mecanismo de inactivación rápida [88].

La inactivación tipo N se presenta en familias como *Shaker* y se puede explicar por un mecanismo llamado de “cadena y pelota”. En que los primeros 22 aminoácidos de cada uno de los extremos N-terminales forman una “pelota de inactivación” y se unen a través de una cadena de aminoácidos a un receptor con carga negativa, que se localiza en la boca intracitoplasmática del canal, que puede ser ocupado tras la apertura del mismo, produciendo su rápida inactivación (Figura 6-B) [79].

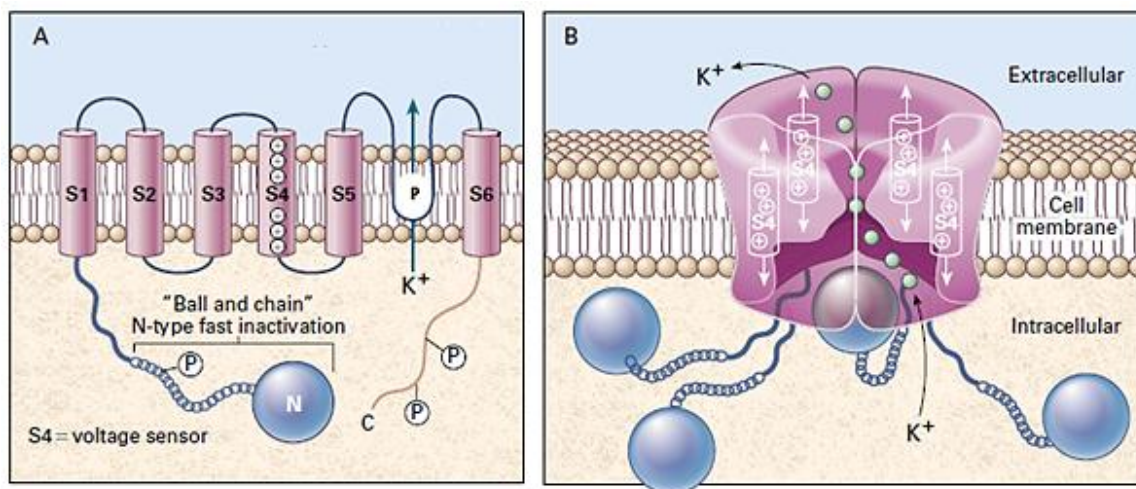


Figura 6. Estructura del canal iónico de potasio activado por voltaje. En el panel A muestra una subunidad con sus seis segmentos transmembranales (S1-S6). La secuencia de 22 aminoácidos del extremo N-terminal participa en la inactivación tipo N en el mecanismo llamado de “cadena y pelota”, ocluyendo el poro del canal. El segmento S4 es el sensor de voltaje, que está cargado positivamente, porque contiene residuos de Lisina y Arginina. En el panel B se muestran las cuatro subunidades que se ensamblan para formar el canal. Mediante cristalografía de rayos X, se ha llegado a construir un poro con medidas de 0.9 a 1.4 nm de diámetro en la boca externa, 0.4 a 0.5 nm en la boca interna, y con una profundidad de 0.5 a 0.7 nm (Modificado de Ackerman y Clapham, 1997 [1]).

Diversos estudios para conocer la funcionalidad del canal de potasio se han realizado utilizando compuestos como el Tetraetilamonio (TEA) y la 4-aminopiridina (4-AP), que son bloqueadores del canal de potasio de los más utilizados, a pesar de que el primero de ellos es menos específico, por lo que se utiliza como referencia para estudiar la sensibilidad del canal de potasio. Además se encontró que en el poro del canal de potasio se encuentra una secuencia de aminoácidos VTMTTV (posiciones 438-443) que es característica para la unión del TEA [60], compuesto al que también se le atribuye afectar funciones colinérgicas en las sinapsis del Sistema Nervioso Central (CNS) [82].

Por el contrario el 4-AP si es un bloqueador específico del canal de potasio y cabe mencionar que es un fármaco empleado en el tratamiento de enfermedades neurológicas, tales como esclerosis múltiple, síndrome de Eaton-Lambert, botulismo, *miastema gravis* y enfermedad de Alzheimer [77]. Ya que al ser un derivado de piridinas actúa inhibiendo canales de potasio, que se asocia a un aumento en el paso de sodio y de calcio hacia el interior celular, por lo que aumenta la liberación de acetilcolina en las terminales nerviosas, la prolongación del potencial de acción y con ello la actividad neuromuscular [10].

2.6 *Drosophila melanogaster* como modelo biológico

La implementación de *Drosophila melanogaster* como modelo biológico data desde los trabajos realizados por el investigador estadounidense Thomas Hunt Morgan en 1909. La importancia de este organismo radica en el vasto conocimiento que actualmente se tiene sobre su genoma, las ventajas en el mantenimiento de la misma en condiciones de laboratorio (como su tamaño pequeño, el pequeño espacio en donde puede ser cultivada, el ciclo de vida corto y el elevado número de descendientes que se pueden obtener en poco tiempo) y el gran número de cepas mutantes con las que se cuenta [17, 72]. La mosca del vinagre o mosca de la fruta (*D. melanogaster*) ha sido la clave para conocer la funcionalidad y la topología de los canales de potasio. La documentación del primer canal de potasio fue consecuencia del estudio electrofisiológico del mutante *Shaker* de *D. melanogaster* [27].

En 1969 se producen varios mutantes por la inducción con Etil Metano Sulfonato (EMS), tales mutantes tienen como característica principal mover las patas bajo anestesia con éter, además de que muestran un temblor lento y rítmico de pies, el *loci* fue llamado *éter a go go (eag)* [87]. Estudios realizados en *eag* encontraron defectos electrofisiológicos muy notables en las uniones neuromusculares en las larvas de esta cepa. Estos defectos se atribuyen a genes encargados de codificar proteínas implicadas en la regulación o modulación de una o más clases de canales de potasio activados por voltaje [18]

Mutaciones como las del gen *white (w/w)* se encuentran entre las más utilizadas en la experimentación [27]. Esta mutación fue de las primeras descubiertas en la especie y fue utilizada en las primeras pruebas de determinación de herencia ligada al sexo [66]. Otras mutaciones como la del gen *yellow (y)* se han utilizado para investigaciones de filogenia del género *Drosophila*, debido a que este gen proviene de un ancestro común y se ha documentado que no solo participa en la coloración amarilla, si no que participa en la coloración total del organismo. Análisis genéticos han identificado su relación con genes Hox, que al estar presentes en ciertas partes del cuerpo regulan la pigmentación del color amarillo [29].

D. melanogaster presenta un sistema circulatorio abierto, donde la hemolinfa es bombeada por el corazón desde la parte anterior hacia la posterior del cuerpo, y a su vez se encarga del movimiento de nutrientes, sales, hormonas y residuos metabólicos, además de ser almacén de cerca del 70% de agua total del organismo. En las larvas juega un papel importante, gracias a ella hay una presión hidrostática interna provocada por la contracción muscular que sirve para el desplazamiento de las larvas [22]. Se ha calculado que una larva de tercer estadio de *D. melanogaster* contiene alrededor de 50 a 300 nanolitros (nl) de hemolinfa [65].

Por sus características, la mosca de la fruta es utilizada en diferentes áreas de estudio con diversas metodologías *in vitro* e *in vivo* para evaluar parámetros bioquímicos y eventos genéticos terminales como letalidad, citotoxicidad, teratogénesis, etc. La letalidad evalúa el daño que un compuesto causa a los sistemas biológicos mediante la proporción de sobrevivientes a los tratamientos [27].

III. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos 30 años se ha acrecentado el estudio del veneno de los caracoles marinos de la Superfamilia Conoidea (en las que se incluyen las Familias Terebridae, Turridae y Conidae) con particular interés en el género *Conus*. El veneno de cada especie de estos caracoles, está constituido por alrededor de 50 a 200 péptidos diferentes entre sí, todos altamente activos [42].

Durante el proceso purificación de los venenos de *Conus* la pérdida de material es uno de los principales problemas con los que se afronta. Para obtener determinados péptidos se recurre a la cromatografía, llegando a perder más del 70% del material original después de algunos cuantos de estos pasos [21]. Este problema podría ser resuelto si se contara con una vasta cantidad de ejemplares, lo que rara vez ocurre, por lo que el material que se logra purificar debe de ser utilizado cuidadosamente para optimizar su uso, incluso cuando la cantidad de cierta fracción es mínima se recurre a la realización de bioensayos que sean rápidos, sencillos y que reduzcan la cantidad de material requerido para evaluar la toxicidad [40].

Las nuevas técnicas analíticas permiten el estudio de cantidades de muestra en el orden de los picomoles para la determinación química de estos péptidos; no siendo esto así para algunos bioensayos. Es por ello que en este trabajo se implementará el ensayo de microinyecciones en larvas de *Drosophila melanogaster* con la finalidad de evaluar la toxicidad de los péptidos parcialmente caracterizados, obtenidos en baja cantidad (nanomoles). La toxicidad será medida en relación al porcentaje de sobrevivencia de las moscas, en dos cepas de *D. melanogaster* (*yw* y *eag*).

Se optó por estas cepas debido a que *eag* es una cepa mutante para canales de potasio y por lo tanto se espera que la mortalidad sea mayor a la de *yw* (cepa control). Esta última es utilizada como control porque no se han documentado mutaciones en sus canales de potasio activados por voltaje, además de que si hubiese una contaminación de la cepa *eag* en los medios de cultivo de *yw* esta sería reflejada en las características fenotípicas de las moscas. Por otra parte se utilizan larvas de tercer estadio de desarrollo porque la mayoría de la rutas metabólicas se encuentran

activas, por su talla relativamente grande con respecto a sus estadios larvales anteriores y debido a su transparencia, que durante las primeras inyecciones de práctica con azul de metileno permitió ver la forma en que se distribuye en la hemolinfa de la larva.

IV. HIPÓTESIS

- Las conotoxinas y compuestos comerciales con actividad antagónica sobre canales de potasio afectan diferencialmente la sobrevivencia de la cepa mutante (*eag*) sobre la silvestre (*yw*).

V. OBJETIVOS

Objetivo General

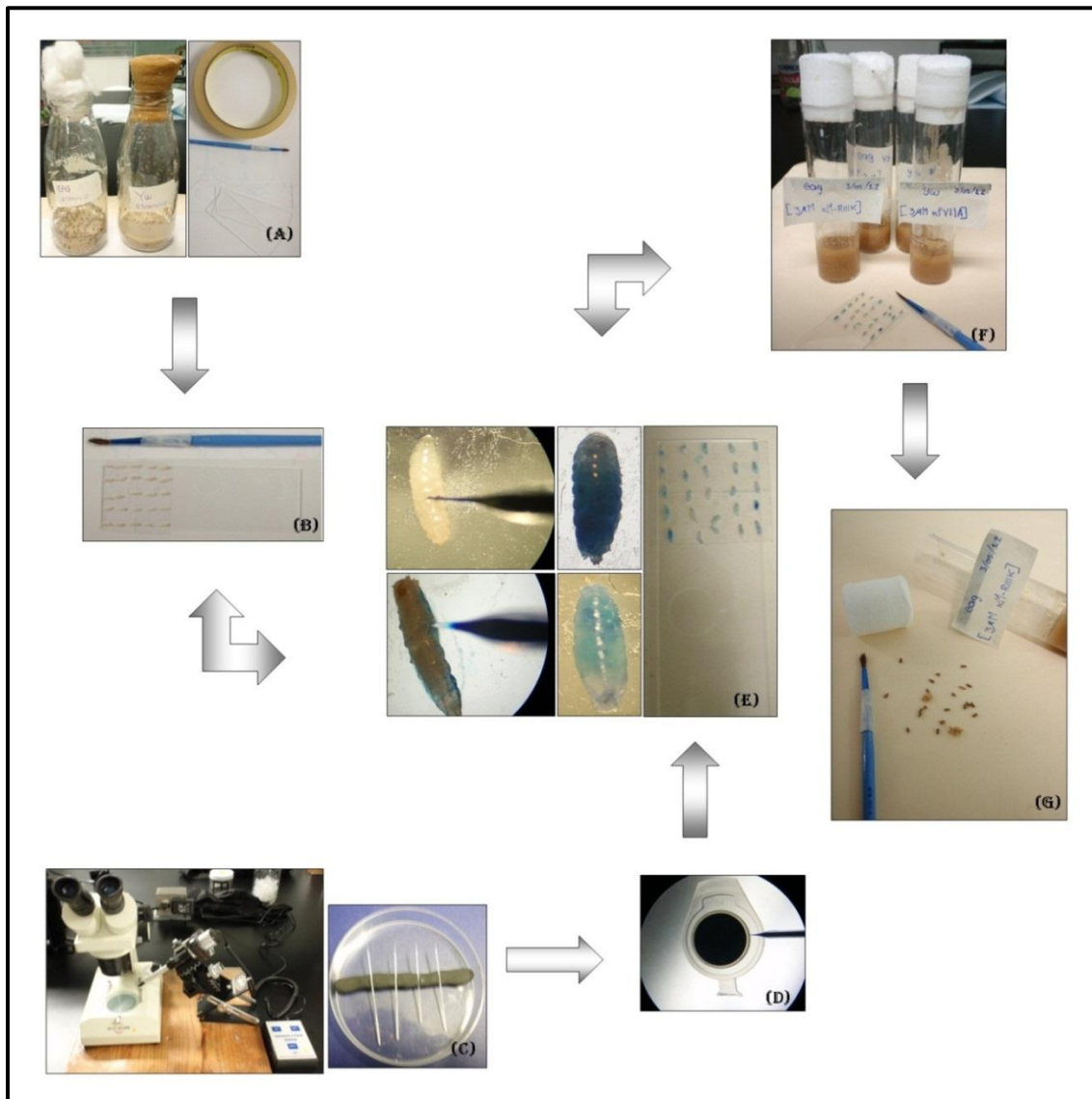
- Implementar un microsistema de evaluación rápida de toxinas, con actividad sobre canales de potasio.

Objetivos Particulares

- Valorizar el bioensayo mediante la inyección en larvas de *Drosophila melanogaster* de compuestos comerciales con propiedades antagónicas sobre los canales de potasio.
- Evaluar conotoxinas específicas para canales de potasio, así como una conotoxina no específica.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Inyección de larvas. **(A)** Con la ayuda de un pincel, se recolectaron las larvas de tercer estadio que estaban en los frascos con medio de cultivo donde las cepas fueron propagadas. **(B)** Se colocaron en un portaobjetos que tenía cinta adhesiva doble cara. **(C)** Para llevar a cabo las inyecciones se hicieron microagujas con tubos capilares de vidrio (0.53mm DI), también se utilizó un microscopio estereoscópico y un nanoinyector (nanoliter 2000). **(D)** La microaguja se cargó con aceite mineral y posteriormente el compuesto y/o toxina a inyectar. **(E)** Las inyecciones se realizaron entre el 7° y 8° segmento con una concentración inicial de $3\mu\text{M}$ para los compuestos comerciales y de $1\mu\text{M}$ para las conotoxinas. **(F)** Con ayuda del pincel y agua se despegaron las larvas y se colocó en viales de polipropileno que contenían medio de cultivo en su interior. El total de inyecciones realizadas fue de 5 ensayos cada uno de 100 individuos que se colocaron en 4 lotes con cantidades de 25 larvas (por compuesto y toxina). **(G)** Diez días después de la inyección se contó el total de individuos que logro llegar a estadio adulto.



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Compuestos comerciales

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

La 4-Aminopiridina (4-AP) es un fármaco utilizado en la práctica clínica y es capaz de bloquear canales de potasio [85]. Esta droga en el humano tiene una acción significativa sobre la unión neuromuscular, pero con poco efecto sobre el sistema nervioso autónomo [76]. El Tetraetilamonio (TEA) fue la primera droga empleada como bloqueador de canales de potasio. A pesar de que no es muy potente ni muy específica, ha sido utilizada como criterio de diferenciación entre canales sensibles a esta [13].

La solución de Ringer es lo que se conoce como solución salina normal de cloruros de sodio, potasio y calcio en agua destilada, es isotónica con el tejido animal, y se usa tópicamente como suero fisiológico [10]. Se utiliza en todas las formas de deshidratación, acidosis o alcalosis, y en los experimentos sirve para bañar los tejidos animales. También es llamada solución Ringer-Locke.

7.2 Conotoxinas

- κ -conotoxina PVIIA (extraído de *Conus purpurascens*).
- κ M-conotoxina RIIIK (extraído de *Conus radiatus*).
- SpIB (extraído de *Conus spurius*)

La κ -conotoxina PVIIA está compuesta por 27 aminoácidos y fue la primera en descubrirse que tiene como blanco molecular un canal de K^+ activado por voltaje de tipo *Shaker* [4]. La κ -conotoxina PVIIA es un compuesto activo presente en el veneno del caracol piscívoro *Conus purpurascens* [81], actúa rápidamente ayudando a la inmovilización de la presa, presenta actividad sobre canales de K^+ , importantes en la fase de repolarización del potencial de acción y en el potencial de membrana en estado de reposo [28].

La κ M-conotoxina RIIIK presenta 27 aminoácidos. Fue el primer péptido de la familia de las κ M-conotoxinas que se clonó del veneno de *Conus radiatus* y tiene alta afinidad por canales de K^+ de tipo *Shaker* [82].

La conotoxina Sp1B es un péptido aislado del veneno del caracol vermívoro *Conus spurius*, está compuesto por 18 aminoácidos y tiene como blanco molecular receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) [42].

7.3 Cepas de *D. mel anogaster*

-*yw* (*yellow-white*) cepa control

-*eag* (*ether-a-go-go*) cepa mutante

La cepa *yw* se caracteriza por presentar una coloración corporal amarilla y ojos blancos. El marcador *y* (localización: 1-0.60) es el encargado del patrón de coloración en la cutícula. Esta coloración mutante puede ser total (tipo y^1) o solo en ciertas regiones del cuerpo (tipo y^2). El marcador *w* (localización: 1-1.5) es una mutación recesiva y se distingue por conferir una coloración blanca en los ojos de la mosca [38].

Por otro parte, mutaciones en el gen se identificaron porque *eag* (localización: 1-45.3) el alelo mutante utilizado fue inducido por EMS. Esta cepa que recibe su nombre porque bajo anestesia por éter mueve las patas, es una mutación que ocasiona una serie repetitiva de potenciales de acción en los nervios de las larvas debido a corrientes anormales de potasio en los músculos [38]. En este mutante, las corrientes de K^+ se inactivan más rápidamente que en los canales iónicos nativos [37].

7.4 Medio de cultivo para *Drosophila melanogaster*

Se prepara con: piloncillo (50g), levadura fresca (50g), agar (8g) y grenetina (7g), disueltos en 400ml de agua a 85°C (agregar uno por uno hasta disolver). Se deja enfriar la mezcla a 55°C, después se agrega ácido propiónico (1%= 5ml) con la finalidad de controlar el crecimiento de

hongos en el medio de cultivo. Se vierte aproximadamente 30 ml de este medio en botellas de vidrio de 250 ml.

7.5 Análisis de datos

Los resultados obtenidos en porcentaje de sobrevivencia de las moscas fueron normalizados para que se pudieran realizar pruebas paramétricas, mismas se realizaron con ayuda del software estadístico STATISTICA 7. La normalización de los datos consistió en tomar como proporciones a la sobrevivencia de cada cepa con respecto a la concentración de cada compuesto comercial y toxina utilizada. A estas proporciones se les sacó la raíz cuadrada, y tal resultado se le calculó el arcoseno. Los valores obtenidos con este procedimiento fueron los utilizados para realizar el análisis estadístico ANOVA factorial (Análisis de Varianza factorial).

Se optó por el análisis ANOVA factorial (factorial= más de un factor) porque permite evaluar el efecto individual y en conjunto de dos o más factores (variables independientes categóricas) sobre una variable dependiente cuantitativa. En nuestros experimentos la variable dependiente corresponde a la sobrevivencia y los factores corresponden a las cepas y concentraciones utilizadas. De esta manera se establece un modelo de dos factores (Cepa y Concentración) donde los efectos de interés son 3; los dos efectos principales (uno por factor) y el efecto de interacción entre ambos factores.

Además se realizó una Prueba de Comparaciones Múltiples (*post hoc*) debido a que se obtuvo un valor de F significativo con la prueba de ANOVA factorial. Las pruebas *post hoc* se utilizan para saber que media en concreto difiere de que otra. Permiten controlar la tasa de error al efectuar varias comparaciones utilizando las mismas medias, es decir, permiten controlar la probabilidad de cometer errores de tipo I al tomar varias decisiones. Se realizó la prueba *post hoc* de HSD de Tukey debido a que es una de las más estrictas y utilizadas, además de que supone varianzas poblacionales iguales y de esta manera proporciona información necesaria para poder interpretar correctamente un efecto principal significativo.

VIII. RESULTADOS

8.1 Compuestos Comerciales

Los resultados obtenidos de las inyecciones realizadas con 4.6 nl de la Solución de Ringer en las cepas *yw* y *eag* de *Drosophila melanogaster* mostraron una sobrevivencia promedio similar de los adultos que emergieron del estadio de pupa, estos resultados se muestran en la Tabla 2. Para los compuestos como 4-AP y TEA se inició inyectando concentraciones de 3 μ M hasta una concentración máxima de 100 mM para ambas cepas (en 4.6 nl). Se observó que para ambos compuestos comerciales los comportamientos de la sobrevivencia entre *yw* y *eag* comenzaron a ser notablemente diferentes hasta concentraciones milimolares (mM), a excepción de la concentración 10 mM donde la sobrevivencia de la cepa *eag* aumentó a valores similares a los de *yw*. En concentraciones superiores como lo fueron 30 mM, 50 mM y 100 mM la sobrevivencia de *eag* respecto a la cepa control (*yw*) fue visiblemente menor (Gráfica 1).

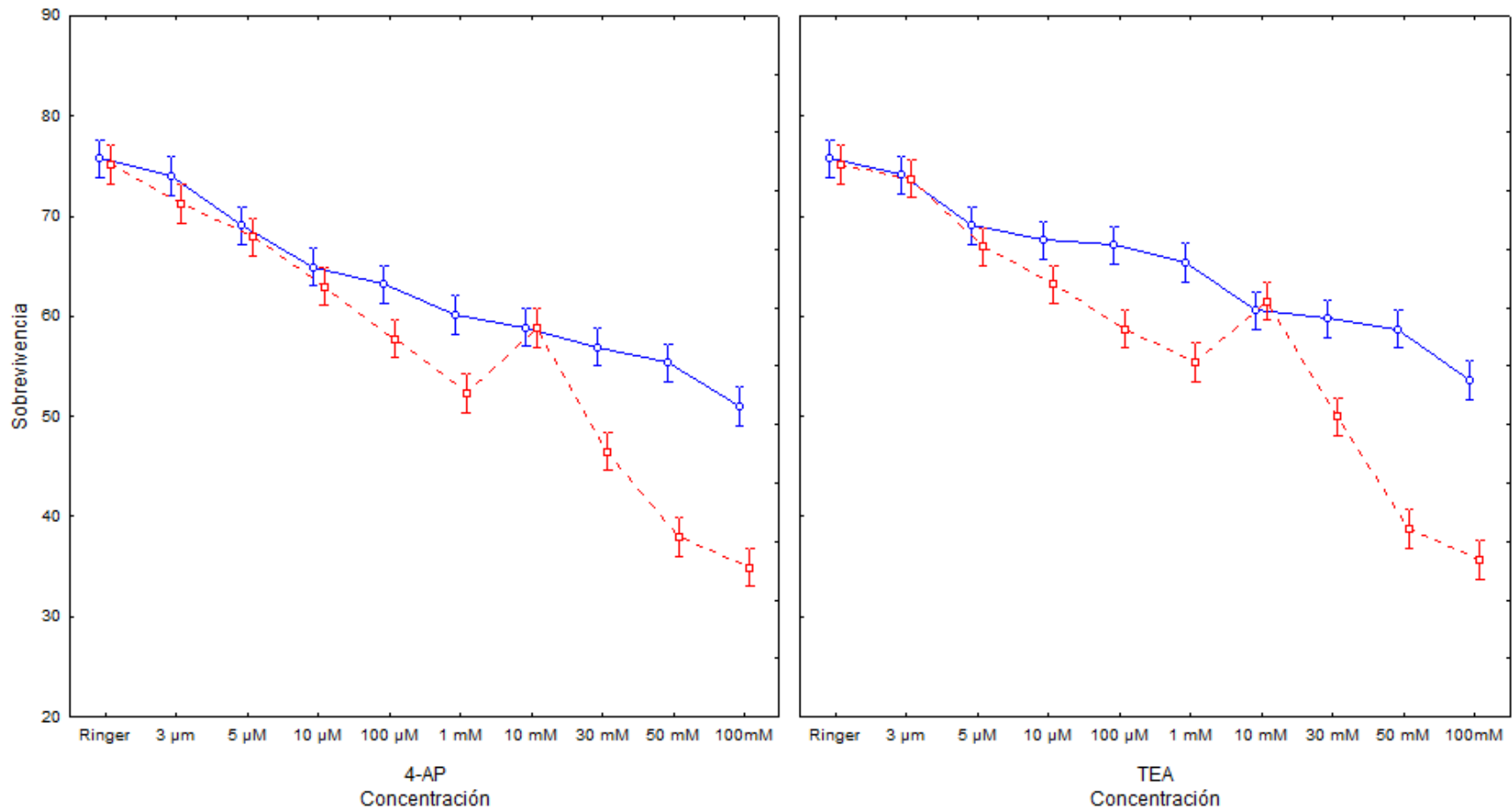
Tabla 2. Resultados normalizados del porcentaje de sobrevivencia obtenidos al inyectar 4.6 nanolitros de Solución de Ringer (Solución salina 0.9%) en larvas de dos cepas de *Drosophila melanogaster*.

Ensayo	Cepa	
	<i>yw</i>	<i>eag</i>
1	78.46	73.57
2	74.65	75.82
3	72.54	74.65
4	74.65	77.07
5	78.46	74.65
\bar{x}	75.75	75.15

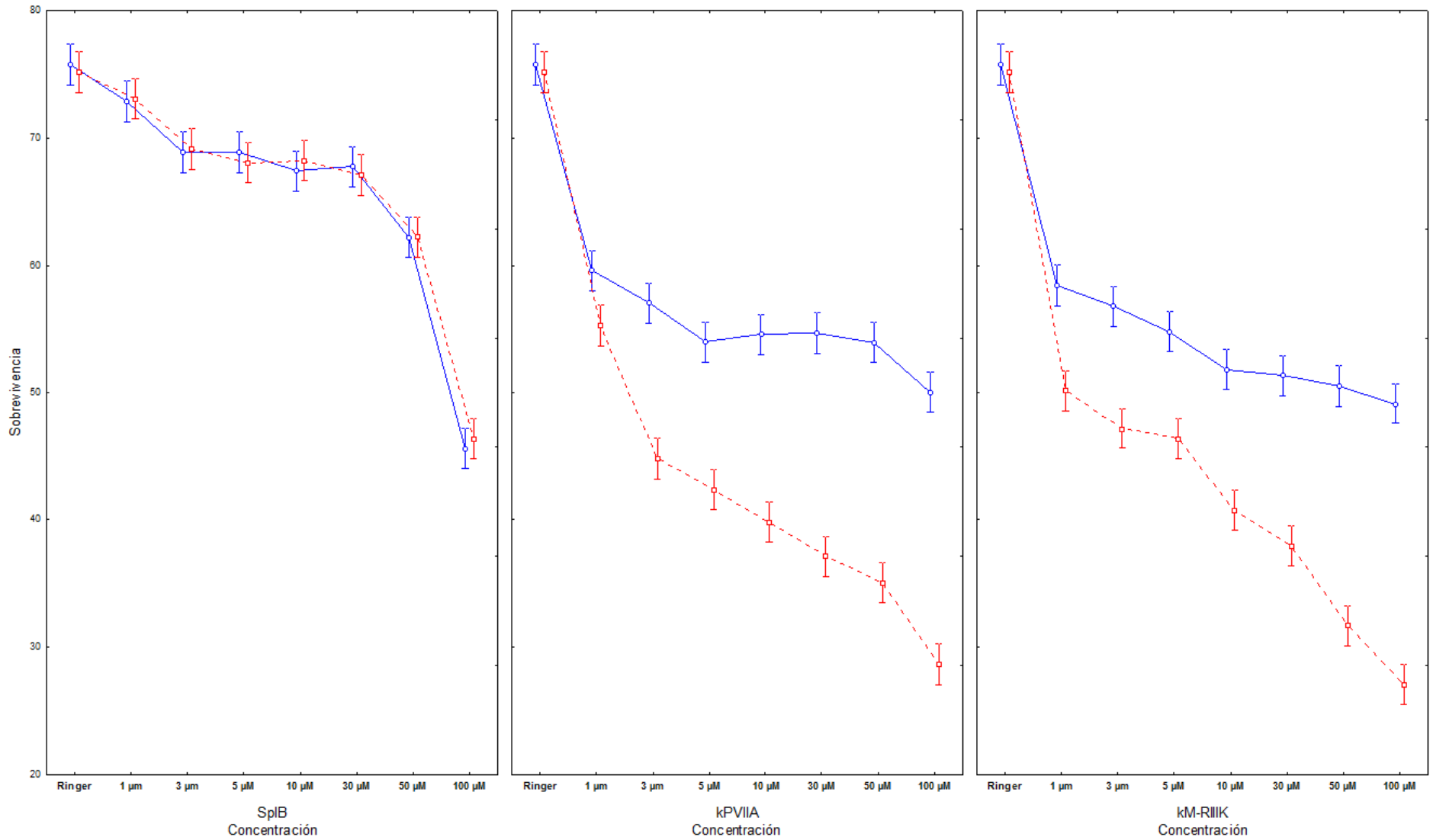
8.2 Conotoxinas

Se comenzó inyectando volúmenes en el orden micromolar (μM) de las diferentes conotoxinas; κPVIIA , $\kappa\text{M-RIIK}$ y SpIB, tomando a 1 μM como la concentración mínima hasta una máxima de 100 μM , además de concentraciones intermedias.

Las curvas dosis-respuesta efectuadas con los resultados que arrojaron las inyecciones de las conotoxinas κPVIIA y $\kappa\text{M-RIIK}$ permitieron observar una clara diferencia en la sobrevivencia entre las cepas *yw* y *eag*. La sobrevivencia de la cepa *yw* siempre fue mayor con estas dos conotoxinas en cada una de sus concentraciones, notándose que el comportamiento de la sobrevivencia de esta cepa es más o menos uniforme. Caso contrario es el que ocurrió en la cepa *eag*, en la cual comenzó a disminuir considerablemente la sobrevivencia conforme aumentaba la concentración de estas dos conotoxinas, llegando a valores menores de 45 (~50%) a partir de concentraciones de 10 μM (Gráfica 2). En la gráfica 2 se puede apreciar que los resultados de la conotoxina SpIB, que a diferencia de las conotoxinas κPVIIA y $\kappa\text{M-RIIK}$, no se observaron diferencias entre las sobrevivencias de ambas cepas en ninguna de las concentraciones inyectadas.



Gráfica 1. Muestra la sobrevivencia de las cepas *yw* (—○—) y *eag* (-□-) de *D. melanogaster* que fueron inyectadas con las distintas concentraciones de 4-Aminopiridina (4-AP) y Tetraetilamonio (TEA). Cada punto representa la Media ± E. E. para 4-AP ($F = 20.8780$, $p = 0.0000$) y TEA ($F = 30.7620$, $p = 0.0000$).



Gráfica 2. Registro de la sobrevivencia de las cepas *yw* (—○—) y *eag* (---□---) de *D. melanogaster* que fueron inyectadas con las distintas concentraciones de las conotoxinas SpIB, kPVIIA y kM-RIIIK. Cada punto representa la Media ± E. E. para SpIB ($F = 0.2480$, $p = 0.9710$), kPVIIA ($F = 51.0880$, $p = 0.0000$) y kM-RIIIK ($F = 35.6790$, $p = 0.0000$).

IX. DISCUSIÓN

La alta especificidad de las toxinas presentes en el veneno de *Conus* hacia un blanco fisiológico en específico ha influenciado la investigación de estos organismos [56]. Tal investigación se ha enfocado mayoritariamente en especies piscívoras, debido a que el veneno de las especies molusquívoras y vermívoras presentan una baja actividad en vertebrados y no se cuenta con suficientes bioensayos en invertebrados [45]. En este trabajo se realizaron microinyecciones de compuestos comerciales y conotoxinas con volúmenes de nanolitros, con larvas deficientes en canales de potasio (*eag*) y en larvas normales (*yw*) con la finalidad de implementar un microsistema para caracterizar rápidamente y particularmente conotoxinas con efecto en este tipo de canales.

Al observar los resultados al inyectar 4.6 nl de la solución Ringer (Control) en ambas cepas no se encontraron diferencias en la sobrevivencia, ya que en ambos casos la sobrevivencia promedio fue muy cercano a 90 (~100%), lo que indica que el trauma hecho por la misma lesión de la inyección así como la solución Ringer no afectan la sobrevivencia *per se* (Tabla 2). De la misma manera Mejía y colaboradores (2010) obtuvieron resultados similares cuando observaron que solo una de quince moscas que inyectaban con 23 nl de dicha solución llegaba a morir [50].

La prueba de ANOVA realizada con los resultados de 4-AP y TEA indica que no hay diferencia significativa en la sobrevivencia de las cepas utilizadas al comparar el efecto de estos dos compuestos entre sí ($F = 0.8561$, $p = 0.5658$), es decir, ambos compuestos afectan de forma similar la sobrevivencia tanto de *yw* como de *eag* (Ver anexo I). Sin embargo la prueba HSD de Tukey indica diferencias significativas en la sobrevivencia entre la cepa *eag* respecto a *yw* a concentraciones superiores a los 10 mM por cada compuesto ($p < 0.05$) (ver anexo II). Estos resultados se asemejan a los obtenidos por otros autores cuyos experimentos realizados en células de médula espinal de rata y células humanas de riñón observaron un bloqueo parcial de canales de potasio tras utilizar concentraciones de 20 a 50 mM de TEA y 30 mM de 4-AP [10, 12]. Aunque, si se considera un factor de dilución de 100 veces (como referencia) dado a que una larva

de tercer estadio tiene de 50 a 300 nl de hemolinfa, las concentraciones reales serían menores a 1 mM. No obstante, otros estudios utilizando técnicas electrofisiológicas realizados por Aréchiga *et al.* (2010) en miocitos de conejo y Soto *et al.* (2002) en neuronas aferentes vestibulares de rata indican un efecto bloqueador de canales de potasio al usar concentraciones de 1 a 10 mM tanto de 4-AP como de TEA [6, 77]. Estos resultados pueden ser comparados con la baja sobrevivencia observada en *eag* tras inyectar los mismos compuestos a concentraciones de 50 mM y 100 mM.

Es importante igualmente mencionar que la prueba HSD de Tukey indica que al utilizar 4-AP y TEA con una concentración de 10 mM para ambos compuestos no hubo diferencia significativa en la sobrevivencia entre las dos cepas (4-AP y TEA $p = 1$) (ver anexo II). A manera de especulación y considerando que la concentración real fuera de 0.1 mM, esta concentración estaría restableciendo la inactivación rápida de los canales de K^+ a las condiciones normales en la cepa *eag*, dado a que el valor de sobrevivencia obtenido fue similar al de *yw*.

En el caso de las dos conotoxinas (κ PVIIA y κ M-RIIIK) inyectadas en las dos cepas de *D. melanogaster*, las cuales son bloqueadoras del canal de potasio tipo *Shaker*, para ambas toxinas la sobrevivencia se mantiene más o menos constante en la cepa *yw* (cerca de 56.78, aprox. 70%), mientras que la sobrevivencia de la cepa *eag* presenta sobrevivencias menores a la cepa control en cualquiera de las concentraciones inyectadas (ver Gráfica 2). Se encontraron diferencias significativas entre la cepa *eag* y la cepa *yw* desde la concentración de $1\mu\text{M}$ con ambas toxinas ($p < 0.05$). En la cepa mutante para el canal de potasio (*eag*) se observa un aumento significativo en el porcentaje de decesos con la conotoxina κ PVIIA al pasar de la concentración de $1\mu\text{M}$ a $3\mu\text{M}$ ($p = 0.0001$), mientras que para la conotoxina κ M-RIIIK no ocurre el mismo fenómeno ($p = 0.3607$), si no hasta al pasar de la concentración de $5\mu\text{M}$ a $10\mu\text{M}$ ($p = 0.0005$) (ver anexo II).

Al inyectar concentraciones superiores a $30\mu\text{M}$ de las conotoxinas κ -PVIIA y κ M-RIIIK en la cepa *eag* se observó una considerable disminución en la sobrevivencia, siendo menor a 45 (~50%). Considerando que la concentración real en el interior de la larva fuera de $0.5\mu\text{M}$ y $1\mu\text{M}$ para dichas concentraciones (50 y $100\mu\text{M}$), los resultados obtenidos se pueden comparar con los que

obtuvo Naranjo (2002) y Verdier (2005), que observaron un efecto de bloqueo total en canales de potasio tipo *Shaker* al ser expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* y en los cuales se utilizaron concentraciones que van de 0.5 μM a 2 μM de las conotoxinas k-PVIIA y kM-R11K [52, 84].

Al observar la gráfica dosis-respuesta de las cepas utilizadas tras inyectarles una conotoxina no específica para el canal de potasio, como lo es la conotoxina Sp1B, se observó que la sobrevivencia se comportaba de forma similar, además el análisis estadístico no indicó que existiera un aumento significativo en la cantidad de decesos entre ambas cepas ($p = 0.971$) (ver anexo I). Lo anterior se puede explicar debido a que esta conotoxina tiene efecto antagónico sobre receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) de células de mamífero a concentraciones de 1 μM y 10 μM [43]. Solamente se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia a concentraciones de 50 μM y 100 μM para ambas cepas con la conotoxina Sp1B (ver anexo II). Evidencia de ello es un estudio realizado por Mejía y colaboradores (2010) tras inyectar 46 nl del veneno crudo de *C. brunneus* en la fibra del axón gigante de *D. melanogaster* con genes mutantes para ciertos tipos de nAChR, observando mediante la técnica de patch-clamp el bloqueo de este tipo de receptores en músculos dorso trocaterales (GF-TTM) y músculos dorso longitudinales (GF-DLM) en 9 de 11 moscas. Resultados similares se obtuvieron en esa misma investigación, cuando probaron la conotoxina Iml, que es una α -conotoxina aislada de *C. imperialis* y que tiene efecto antagónico sobre nAChR [50].

Si bien, las toxinas provocaron una disminución de la sobrevivencia a concentraciones en el orden de micromolar, este efecto pudiera ser debido a un efecto de osmolaridad. Sin embargo, López-Vera y colaboradores (2004) [40] realizaron inyecciones de 4.6 nl en larvas de tercer estadio de *D. melanogaster*, utilizando la turrtoxina PalA aislada de *P. albida* a concentraciones en el orden de micromolar y observaron efectos de toxicidad al disminuir el porcentaje de sobrevivencia. En el mismo estudio se realizaron inyecciones con concentraciones en el orden milimolar de albumina sérica bovina, esto como control de osmolaridad, obteniendo sobrevivencias superiores al 85% (~67.21). Lo cual no indica una deficiencia en nuestro procedimiento experimental al utilizar altas concentraciones.

De esta manera los resultados que se obtuvieron al inyectar compuestos comerciales y conotoxinas ofrecen una utilidad más del uso de la mosca de la fruta como un modelo para evaluar conotoxinas. Debido a que este tipo de bioensayo basado en microinyecciones *in vivo*, es una alternativa para la evaluación rápida de conotoxinas, porque permite aprovechar toxinas difíciles de obtener, ya que para realizarse se necesita solo de pequeñas cantidades de toxina. No obstante, una limitante de este microsistema es que no muestra el blanco molecular específico ni la bioactividad de la conotoxina, sin embargo produce evidencia acerca de los posibles receptores y/o canales iónicos que tiene como blanco tras utilizar cepas mutantes para receptores o canales proteicos.

X. CONCLUSIONES

- La mosca de la fruta *D. melanogaster* representa ser un buen modelo, sencillo (sin necesidad de utilizar técnicas electrofisiológicas) para la rápida evaluación de conotoxinas con actividad antagónica sobre canales de potasio;
- Además, solo se requiere cantidades muy pequeñas del compuesto a ensayar para alcanzar concentraciones altas (hasta milimolar) de éste, dado el bajo volumen utilizado de inyección (4.6 nanolitros) y ser cuantificado cualitativamente su efecto mediante la sobrevivencia de la mosca.

ANEXO I. Pruebas de ANOVA factorial

Univariate Tests of Significance for Sobrevivencia (4-AP) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	356882.9	1	356882.9	72685.36	0.0000
Cepa	1018.5	1	1018.5	207.44	0.0000
Concentración	10389.1	9	1154.3	235.10	0.0000
Cepa*Concentración	922.6	9	102.5	20.878	0.0000
Error	392.8	80	4.9		

Univariate Tests of Significance for Sobrevivencia (TEA) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	378661.7	1	378661.7	86675.05	0.0000
Cepa	1316.1	1	1316.1	301.26	0.0000
Concentración	9011.5	9	1001.3	229.19	0.0000
Cepa*Concentración	1209.5	9	134.4	30.762	0.0000
Error	349.5	80	4.4		

Univariate Tests of Significance for Sobrevivencia (Compuestos Comerciales) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	735383.4	1	735383.4	158509.7	0.0000
Cepa*Concentración	2096.4	9	232.9	50.2	0.0000
Cepa*Compuesto	9.5	1	9.5	2.1	0.1539
Concentración*Compuesto	84.6	9	9.4	2.0	0.0396
Cepa*Concentración*Compuesto	35.7	9	4.0	0.8561	0.5658
Error	742.3	160	4.6		

Univariate Tests of Significance for Sobrevivencia (kPVIIA) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	209094.4	1	209094.4	82718.69	0.0000
Cepa	3223.6	1	3223.6	1275.25	0.0000
Concentración	8656.3	7	1236.6	489.21	0.0000
Cepa*Concentración	904.0	7	129.1	51.088	0.0000
Error	161.8	64	2.5		

Univariate Tests of Significance for Sobrevivencia (kM-RIIHK) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	202557.4	1	202557.4	64987.15	0.0000
Cepa	2666.9	1	2666.9	855.64	0.0000
Concentración	9329.6	7	1332.8	427.61	0.0000
Cepa*Concentración	778.4	7	111.2	35.679	0.0000
Error	199.5	64	3.1		

Univariate Tests of Significance for Sobrevivencia (SpIB) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	350289.1	1	350289.1	86161.45	0.0000
Cepa	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
Concentración	5735.1	7	819.3	201.52	0.0000
Cepa*Concentración	7.1	7	1.0	0.248	0.9710
Error	260.2	64	4.1		

ANEXOII. Prueba Post-hoc HSD-Tukey (Diferencia Honestamente Significativa de Tukey)

		Tukey HSD test; variable Sobrevivencia (Ringer 4-AP)																				
		Approximate Probabilities for Post Hoc Tests																				
		Error: Between MS = 4.9100, df = 80.000																				
Cell No.	Cepa	Concentración	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}	{20}
			75.757	74.027	69.076	64.918	63.217	60.155	58.865	56.939	55.337	51.019	75.157	71.258	67.910	62.958	57.733	52.299	58.828	46.491	37.935	34.913
1	yw	Ringer		0.99943	0.00143	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	1.00000	0.16309	0.00021	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
2	yw	3 µm	0.99943		0.07240	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.99999	0.90258	0.00557	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
3	yw	5 µM	0.00143	0.07240		0.27514	0.01027	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00809	0.98981	0.99999	0.00556	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
4	yw	10 µM	0.00017	0.00017	0.27514		0.99954	0.10303	0.00851	0.00020	0.00017	0.00017	0.00324	0.82861	0.99712	0.00049	0.00017	0.00596	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
5	yw	100 µM	0.00017	0.00017	0.01027	0.99954		0.80073	0.20627	0.00379	0.00021	0.00017	0.00019	0.11680	1.00000	0.02407	0.00017	0.19471	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
6	yw	1 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.10303	0.80073		0.99999	0.73180	0.09297	0.00017	0.00017	0.00029	0.89278	0.96987	0.00021	0.99998	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
7	yw	10 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00851	0.20627	0.99999		0.99767	0.57486	0.00021	0.00017	0.00017	0.00017	0.30120	0.99999	0.00188	1.00000	0.00017	0.00017	0.00017
8	yw	30 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00020	0.00379	0.73180	0.99767		0.99980	0.00892	0.00017	0.00017	0.00017	0.00705	1.00000	0.12816	0.99817	0.00017	0.00017	0.00017
9	yw	50 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00021	0.09297	0.57486	0.99980		0.21751	0.00017	0.00017	0.00017	0.00025	0.97289	0.81032	0.59405	0.00017	0.00017	0.00017
10	yw	100mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00021	0.00892	0.21751	0.00892		0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00132	0.99999	0.00022	0.15508	0.00017	0.00017
11	eag	Ringer	1.00000	0.99999	0.00809	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017		0.38734	0.00044	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
12	eag	3 µm	0.16309	0.90258	0.98981	0.00324	0.00019	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.38734		0.66704	0.00018	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
13	eag	5 µM	0.00021	0.00557	0.99999	0.82861	0.11680	0.00029	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00044	0.66704		0.07232	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
14	eag	10 µM	0.00017	0.00017	0.00556	0.99712	1.00000	0.89278	0.30120	0.00705	0.00025	0.00017	0.00017	0.00018	0.07232		0.04177	0.00017	0.28628	0.00017	0.00017	0.00017
15	eag	100 µM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00049	0.02407	0.36987	0.99999	1.00000	0.97289	0.00132	0.00017	0.00017	0.00017	0.04177	0.02681	0.99999	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
16	eag	1 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00021	0.00188	0.12816	0.81032	0.99999	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.02681		0.00205	0.01158	0.00017	0.00017
17	eag	10 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00596	0.19471	0.99998	1.00000	0.99817	0.59405	0.00022	0.00017	0.00017	0.00017	0.28628	0.99999	0.00205		0.00017	0.00017	0.00017
18	eag	30 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.15508	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.01158	0.00017		0.00017	0.00017
19	eag	50 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017		0.81708
20	eag	100mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.81708	

		Tukey HSD test; variable Sobrevivencia (Ringer TEA)																				
		Approximate Probabilities for Post Hoc Tests																				
		Error: Between MS = 4.3688, df = 80.000																				
Cell No.	Cepa	Concentración	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}	{20}
			75.757	74.108	69.057	67.579	67.080	65.348	60.604	59.749	58.723	53.629	75.157	73.741	66.945	63.212	58.734	55.429	61.485	49.956	38.761	35.657
1	yw	Ringer		0.99934	0.00057	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	1.00000	0.99191	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
2	yw	3 µm	0.99934		0.03177	0.00093	0.00032	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.99999	1.00000	0.00028	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
3	yw	5 µM	0.00057	0.03177		0.99985	0.99354	0.37227	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00238	0.07027	0.98657	0.00461	0.00017	0.00017	0.00019	0.00017	0.00017	0.00017
4	yw	10 µM	0.00017	0.00083	0.99985		1.00000	0.97819	0.00034	0.00018	0.00017	0.00017	0.00019	0.00204	1.00000	0.13038	0.00017	0.00017	0.00243	0.00017	0.00017	0.00017
5	yw	100 µM	0.00017	0.00032	0.99354	1.00000		0.99874	0.00094	0.00022	0.00017	0.00017	0.00017	0.00062	1.00000	0.29822	0.00017	0.00017	0.00869	0.00017	0.00017	0.00017
6	yw	1 mM	0.00017	0.00017	0.37227	0.97819	0.99874		0.06204	0.00858	0.00067	0.00017	0.00017	0.00017	0.99957	0.98473	0.00069	0.00017	0.30054	0.00017	0.00017	0.00017
7	yw	10 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00034	0.00094	0.06204		1.00000	0.99842	0.00034	0.00017	0.00017	0.00130	0.90362	0.99667	0.02395	1.00000	0.00017	0.00017	0.00017
8	yw	30 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00018	0.00022	0.00858	1.00000		1.00000	0.00227	0.00017	0.00017	0.00025	0.50030	1.00000	0.14228	0.99869	0.00017	0.00017	0.00017
9	yw	50 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00067	0.99842	1.00000		0.02896	0.00017	0.00017	0.00017	0.10371	1.00000	0.59335	0.85199	0.00017	0.00017	0.00017
10	yw	100mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00034	0.00227	0.02896		0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.02813	0.99793	0.00018	0.38966	0.00017	0.00017
11	eag	Ringer	1.00000	0.99999	0.00238	0.00019	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017		0.99992	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
12	eag	3 µm	0.99191	1.00000	0.07027	0.00204	0.00062	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.99992		0.00047	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
13	eag	5 µM	0.00017	0.00028	0.98657	1.00000	1.00000	0.99957	0.00130	0.00025	0.00017	0.00017	0.00017	0.00047		0.35986	0.00017	0.00017	0.01213	0.00017	0.00017	0.00017
14	eag	10 µM	0.00017	0.00017	0.00461	0.13038	0.29822	0.98473	0.90362	0.50030	0.10371	0.00017	0.00017	0.00017	0.35986		0.10596	0.00018	0.99879	0.00017	0.00017	0.00017
15	eag	100 µM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00069	0.99667	1.00000	1.00000	0.02813	0.00017	0.00017	0.00017	0.10596		0.58719	0.85615	0.00017	0.00017	0.00017
16	eag	1 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.02395	0.14228	0.59335	0.99793	0.00017	0.00017	0.00017	0.00018	0.58719		0.00267	0.01175	0.00017	0.00017
17	eag	10 mM	0.00017	0.00017	0.00019	0.00243	0.00869	0.30054	1.00000	0.99869	0.85199	0.00018	0.00017	0.00017	0.01213	0.99879	0.85615	0.00267		0.00017	0.00017	0.00017
18	eag	30 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.38966	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.01175	0.00017		0.00017
19	eag	50 mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.89613
20	eag	100mM	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.89613	

Tukey HSD test; variable Supervivencia (Ringer kPVIIA)																		
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests																		
Error: Between MS = 2.5278, df = 64.000																		
Cell No.	Cepa	Concentración	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}
			75.757	59.613	57.053	53.990	54.597	54.712	53.982	50.072	75.157	55.307	44.771	42.358	39.814	37.102	35.060	28.642
1	yw	Ringer		0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	1.00000	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
2	yw	1µM	0.00014		0.45350	0.00019	0.00062	0.00087	0.00019	0.00014	0.00014	0.00588	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
3	yw	3µM	0.00014	0.45350		0.17953	0.52443	0.60523	0.17676	0.00014	0.00014	0.92873	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
4	yw	5µM	0.00014	0.00019	0.17953		1.00000	0.99999	1.00000	0.01949	0.00014	0.99411	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
5	yw	10µM	0.00014	0.00062	0.52443	1.00000		1.00000	1.00000	0.00290	0.00014	0.99999	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
6	yw	30µM	0.00014	0.00087	0.60523	0.99999	1.00000		0.99999	0.00199	0.00014	1.00000	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
7	yw	50µM	0.00014	0.00019	0.17676	1.00000	1.00000	0.99999		0.01991	0.00014	0.99378	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
8	yw	100µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.01949	0.00290	0.00199	0.01991		0.00014	0.00035	0.00031	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
9	eag	Ringer	1.00000	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014		0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
10	eag	1µM	0.00014	0.00588	0.92873	0.99411	0.99999	1.00000	0.99378	0.00035	0.00014		0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
11	eag	3µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00031	0.00014	0.00014		0.55493	0.00074	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
12	eag	5µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.55493		0.46393	0.00034	0.00014	0.00014
13	eag	10µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00074	0.46393		0.35545	0.00138	0.00014
14	eag	30µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00034	0.35545		0.79894	0.00014
15	eag	50µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00138	0.79894		0.00014
16	eag	100µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014

Tukey HSD test; variable Supervivencia (Ringer kM-RIIHK)																		
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests																		
Error: Between MS = 3.1169, df = 64.000																		
Cell No.	Cepa	Concentración	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}
			75.757	58.451	56.809	54.838	51.844	51.362	50.537	49.141	75.157	50.189	47.187	46.380	40.739	37.935	31.689	27.084
1	yw	Ringer		0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	1.00000	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
2	yw	1µM	0.00014		0.98220	0.11675	0.00015	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
3	yw	3µM	0.00014	0.98220		0.91943	0.00345	0.00086	0.00019	0.00014	0.00014	0.00015	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
4	yw	5µM	0.00014	0.11675	0.91943		0.36484	0.15486	0.02217	0.00045	0.00014	0.00855	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
5	yw	10µM	0.00014	0.00015	0.00345	0.36484		1.00000	0.99823	0.54015	0.00014	0.98071	0.00837	0.00082	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
6	yw	30µM	0.00014	0.00014	0.00086	0.15486	1.00000		0.99999	0.82235	0.00014	0.99948	0.03083	0.00328	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
7	yw	50µM	0.00014	0.00014	0.00019	0.02217	0.99823	0.99999		0.99641	0.00014	1.00000	0.19844	0.03228	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
8	yw	100µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00045	0.54015	0.82235	0.99641		0.00014	0.99986	0.92424	0.50291	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
9	eag	Ringer	1.00000	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014		0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
10	eag	1µM	0.00014	0.00014	0.00015	0.00855	0.98071	0.99948	1.00000	0.99986	0.00014		0.36077	0.07535	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014
11	eag	3µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00837	0.03083	0.19844	0.92424	0.00014	0.36077		0.99999	0.00017	0.00014	0.00014	0.00014
12	eag	5µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00082	0.00328	0.03228	0.50291	0.00014	0.07535	0.99999		0.00052	0.00014	0.00014	0.00014
13	eag	10µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00017	0.00052		0.47706	0.00014	0.00014
14	eag	30µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.47706		0.00019	0.00014
15	eag	50µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00019		0.00974
16	eag	100µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00974	

Tukey HSD test, variable Sobrevivencia (Ringer SpiB)																			
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests																			
Error: Between MS = 4.0655, df = 64.000																			
Cell No.	Cepa	Concentración	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	
			75.757	72.863	68.894	68.877	67.422	67.762	62.214	45.573	75.157	73.069	69.124	68.077	68.228	67.106	62.234	46.379	
1	yw	Ringer		0.64657	0.00025	0.00025	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	1.00000	0.75317	0.00038	0.00014	0.00015	0.00014	0.00014	0.00014	
2	yw	1µm	0.64657		0.15513	0.15056	0.00616	0.01422	0.00014	0.00014	0.90771	1.00000	0.22852	0.02981	0.04137	0.00277	0.00014	0.00014	
3	yw	3µm	0.00025	0.15513		1.00000	0.99848	0.99993	0.00033	0.00014	0.00078	0.10626	1.00000	0.99999	1.00000	0.98856	0.00034	0.00014	
4	yw	5µM	0.00025	0.15056	1.00000		0.99867	0.99994	0.00034	0.00014	0.00075	0.10288	1.00000	0.99999	1.00000	0.98957	0.00035	0.00014	
5	yw	10µM	0.00014	0.00616	0.99848	0.99867		1.00000	0.01100	0.00014	0.00014	0.00368	0.99291	1.00000	0.99999	1.00000	0.01156	0.00014	
6	yw	30µM	0.00014	0.01422	0.99993	0.99994	1.00000		0.00472	0.00014	0.00016	0.00862	0.99937	1.00000	1.00000	1.00000	0.00498	0.00014	
7	yw	50µM	0.00014	0.00014	0.00033	0.00034	0.01100	0.00472		0.00014	0.00014	0.00014	0.00024	0.00211	0.00143	0.02325	1.00000	0.00014	
8	yw	100µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014		0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.99999
9	eag	Ringer	1.00000	0.90771	0.00078	0.00075	0.00014	0.00016	0.00014	0.00014		0.95475	0.00137	0.00020	0.00023	0.00014	0.00014	0.00014	
10	eag	1µm	0.75317	1.00000	0.10626	0.10288	0.00368	0.00862	0.00014	0.00014	0.95475		0.16205	0.01845	0.02616	0.00163	0.00014	0.00014	
11	eag	3µm	0.00038	0.22852	1.00000	1.00000	0.99291	0.99937	0.00024	0.00014	0.00137	0.16205		0.99997	0.99999	0.96592	0.00024	0.00014	
12	eag	5µM	0.00014	0.02981	0.99999	0.99999	1.00000	1.00000	0.00211	0.00014	0.00020	0.01845	0.99997		1.00000	0.99999	0.00222	0.00014	
13	eag	10µM	0.00015	0.04137	1.00000	1.00000	0.99999	1.00000	0.00143	0.00014	0.00023	0.02616	0.99999	1.00000		0.99994	0.00151	0.00014	
14	eag	30µM	0.00014	0.00277	0.98856	0.98957	1.00000	1.00000	0.02325	0.00014	0.00014	0.00163	0.96592	0.99999	0.99994		0.02435	0.00014	
15	eag	50µM	0.00014	0.00014	0.00034	0.00035	0.01156	0.00498	1.00000	0.00014	0.00014	0.00014	0.00024	0.00222	0.00151	0.02435		0.00014	
16	eag	100µM	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.99999	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	

REFERENCIAS;

- [1] Ackerman M. J., Clapham D. E. Mechanisms of disease. The New England journal of Medicine, 1997. 336 (22): 1575-1586.
- [2] Aggarwal S. K., Mackinnon R. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. Neuron, 1996. 16:1169-1177.
- [3] Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Biología Molecular de la Célula. Tercera edición. Ediciones Omega. Barcelona, España. 2002. pp 558-583, 1154-1156.
- [4] Alonso D., Khalil Z., Satkunathan N., Livvet B. G. Drugs from the sea: conotoxins as drugs leads for neuropathic pain and other neurological conditions. Mini reviews in Medicinal Chemistry, 2003. 3 (7): 785-787.
- [5] Anderson D. T. Invertebrate Zoology. Primera edición. Oxford. Auckland. New York, 1999. pp. 125-130.
- [6] Aréchiga F. I. A., Rodríguez M. M., Albarado A., Torres J. J., Sanchez C. J. A. Multiple effects of 4-aminopyridine on feline and rabbit sinoatrial node myocytes and multicelular preparations. European Journal of Physiology, 2010. 459 (3): 345-355.
- [7] Arias H R., Blanton M. P. α -Conotoxinas. IJBCB, 2000. 32: 1017-1028.
- [8] Ashburner M., 1989. Drosophila: A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press. E.U.A. pp.140.
- [9] Barnes R. D. Zoología de los Invertebrados, Cuarta edición. Editorial Interamericana. México, 1985. pp. 335-385.
- [10] Bostock H., Sears T. A., Sherratt R. M. The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium ion on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. J. Physiol., 1981. 313: 301-315.
- [11] Brusca R. C., Brusca G. J., 2005. Invertebrados. Segunda edición. McGraw-Hill, Interamericana. Impreso en España. Pp. 757-759, 772-775.
- [12] Choi K. L., Aldrich R. W., Yellen G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. Biophysics, 1991. 88 5092-5095.
- [13] Cook N. S., Quast U. Potassium channel pharmacology. Potassium channels: structure, classification, function and therapeutic potential. Chichester, UK. Ellis Horwood, 1989: 181:285
- [14] Conticello S. G., Gilad Y., Avidan N., Ben-Asher E., Levy Z., Fainzilber M. Mechanisms for Evolving Hypervariability: The Case of Conopeptides. Mol. Biol. Evol., 2001. 18 (2): 120-131.

- [15] Craig A. G., Bandyopadhyay P., Olivera B. M. Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. *Eur. J. Biochem.*, 1999. 264: 271-275.
- [16] Cruz L. J., Gray W. R., Olivera B. M. Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978. 190:539-548.
- [17] Díaz G. F., Pizarro L. M., Ramírez C. M., Molina H. Y., Solarte G. D., Bravo G. D., Hurtado G. A., Cardenas H. H. Evaluation of two culture media and heritability of productivity and development time for three mutants of *Drosophila melanogaster* (*Drosophilidae*). *Acta Biol. Colomb.*, 2008. 13(1): 161-174.
- [18] Drysdale R., Warmke J., Kreber R., Ganetzky B. Molecular characterization of *eag A* gene affecting potassium channels in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1991. 127: 497-505.
- [19] Edean R., Parish G., Gyr P. Pharmacology of the venoms of *Conus geographus*. *Toxicon*, 1974. 12(2): 131-138.
- [20] Favreau P., Stöcklin R. Marine snail venoms: use and trends in receptor and channel neuropharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 2009. 9: 594-601.
- [21] Flores Torres A. 2009. Purificación y caracterización de péptidos del veneno del caracol marino *Conus delesserti*. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México, D.F. Tesis de Maestría.
- [22] Folk D. G., Han C., Bradley T. J. Water acquisition and partitioning in *Drosophila melanogaster*: effects of selection for desiccation-resistance. *The Journal of Experimental Biology*, 2001. 204: 3323-3331.
- [23] Gray W. R., Luque A., Olivera B. M., Barret J., Cruz L. J. Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *Journ. Biol. Chem.*, 1981. 256: 4734-4740.
- [24] Hällström I., Grafström R. The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila melanogaster*. II. Enzyme induction and metabolism of benzo[a]pyrene. *Chemico-Biological Interactions*, 1981. 34(2):145-159.
- [25] Hartmann H. A., Glenn K. E., Drewe J. A., Tagliatela M., Joho R. H., Brown A. M. Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels. *Science*, 1991. 251 942-944.
- [26] Heinemann S. H., Leipold E. Conotoxins of the O-superfamily affecting voltage-gated sodium channels. *Cellular and molecular life Sciences*, 2007. 64 (11): 1329-1340.
- [27] Herrera-Bazán J. J. H. Comparación de los niveles de enzimas antioxidantes y la frecuencia de alteraciones somáticas de moscas (*Drosophila melanogaster*) expuestas a concentraciones bajas de genotóxicos. 2009. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F.

- [28] Hille, B. Ion Channels of Excitable Membranes. 3ª edición. Sunderland. Sinauer. 2001. pp. 1-6, 24-26, 74-79.
- [29] Jeong S., Rokas A., Carroll S. B. Regulation of body pigmentation by the abdominal-B Hox protein and its gain and loss in *Drosophila* evolution. Cell, 2006. 125: 1387-1399.
- [30] Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B. T., Mackinnon R. X-ray structure of voltage-dependent K⁺ channel. Nature, 2003. 423 33-41.
- [31] Jimenez E. C., Shetty R. P., Lizaran M., Rivier J., Walker C., Abogadie Fe. C., Yoshikami D., Cruz L. J., Olivera B. M. Novel excitatory Conus peptides define a new conotoxins superfamily. Journal of Neurochemistry, 2003. 85 610-621.
- [32] Jimeno J., Faircloth G., Fernandez Sousa-Faro J. M., Scheuer P., Rinehart K. New Marine Derived Anticancer Therapeutics: A Journey from the Sea to Clinical Trials, Mar. Drugs, 2004. 2:14-29.
- [33] Jones R. M., Bulaj G. Conotoxins-new vistas for peptide therapeutics. Current Pharmaceutical Design, 2000. 6(12): 1249-1285.
- [34] Kohn A. J. Tempo and mode of evolution in Conidae. Malacología, 1990, 32 (1): 55-67.
- [35] Lainé M., Lin M. A., Bannister J. P. A., Silverman W. R., Mock A. F., Roux B., Papazian D. M. Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels. Neuron, 2003. 39 467-481.
- [36] Lewis R. J., García M. L. Therapeutic potential of venom peptides. Nature Reviews, 2003. 2: 790-802.
- [37] Lindsley L. D., Zimm G. G. The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, E. U. A. 1992. pp. vi, 189.
- [38] Lindsley L. D., Zimm G. G. The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, E. U. A. 1992. pp. vii, 785, 759, 760.
- [39] López J. Conotoxinas. Spira, 2001. 1(1) 7-11.
- [40] López-Vera E., Heimer de la Cotería E. P., Maillo M., Riesgo-Escovar J. R., Olivera B. B., Aguilar M. B. A novel structural class of toxins: the methionine-rich peptides from the venoms of turrid marine snails (Mollusca, Conoidea). Toxicon, 2004. 43: 365-374.
- [41] López-Vera E., 2005. Actividad biológica de péptidos de caracoles de la Superfamilia Conoidea. Instituto de Neurobiología, UNAM. Querétaro, Qro. Tesis Doctorado.
- [42] López-Vera E., Aguilar R. M. B., Heimer de la Cotería E. P. Toxinas de caracoles marinos del género *Conus*. Revista Ciencia, 2006. 57(3): 47-51.

- [43] López-Vera E., Aguilar M. B., Schiavon E., Marinzi C., Ortiz E., Restano-Cassulini R., Batista C. V. F., Possani L. D., Heimer de la Cotera E. P., Peri F., Becerril B., Wanke E. Novel α -conotoxins from *Conus spurius* and the α -conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine. *FEBS Journal*, 2007. 274: 3972-3985.
- [44] López-Vera. J. E. Los Receptores nicotínicos de Acetilcolina y las α -Conotoxinas. *REB*, 2010, 29 (1): 8-12.
- [45] Luna Ramírez K S. 2006. Purificación y caracterización química y biológica de péptidos del veneno de *Conus spurius*. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México, D.F. Tesis de Maestría.
- [46] Marshall A. J., Phil D. Zoología Invertebrados. Séptima edición. Editorial Reverté. Barcelona, España, 1985. pp. 683-685, 705.
- [47] Mayer A. M. S. Current marine pharmacology contributions to new drug development in the biopharmaceutical industry. *Pharmaceutical New*, 2002. 9: 479-482.
- [48] McIntosh J. M., Santos A. D., Olivera B. M. *Conus* peptides targeted to specific Nicotinic Acetylcholine receptor subtypes. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999. 68: 59-88.
- [49] McIntosh J. M., Jones R. M. Cone venom – from accidental stings to deliberate injection. *Toxicon*, 2001. 39: 1447-1451.
- [50] Mejia M., Heghinian M. D., Busch A., Armishaw C. J., Marí Frank., Godenschwege T. A. A novel approach for *in vivo* screening of toxins using the *Drosophila* Giant Fiber circuit. *Toxicon*, 2010. 56: 1398-1407.
- [51] Menéndez J. C., 2005. Nuevos antitumorales de origen marino. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 71: 341-363.
- [52] Naranjo D. Inhibition of single *Shaker* K channels by κ -conotoxin-PVIIA. *Biophysical Journal*, 2002. 82: 3003-3011.
- [53] Norse E. A., 1995. Maintaining the world's marine biological diversity. *Bull. Mar. Sci.* 57: 10-13.
- [54] Olivera B. M., Gray W. R., Zeikus R., McIntosh M., Varga J., Rivier J., Santos V. D., Cruz L. J. Peptide Neurotoxins from Fish-Hunting Cone Snails. *Science*, 1985. 230 (4732) 1338-1343.
- [55] Olivera B. M., Rivier J., Clark C., Ramilo C. A., Corpuz G., Abogadie F. C., Mena E. E., Woodward S. R., Hillyard D. R., Cruz L. J. Diversity of *Conus* Neuropeptides. *Science*, 1990. 249 (4966): 257-263.
- [56] Olivera B. M. *Conus* Venom Peptides: Reflections from the Biology of Clades and Species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 2002. 33: 25-47.

- [57] Olivera B. M. Conus Peptides: Biodiversity-based discovery and exogenomics. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006. 281 (42): 31173-31177.
- [58] Papazian D. M., Schwartz T. L., Tempel B. L. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*, 1987. 237: 749-753.
- [59] Papazian D. M., Shao X. M., Sehh S. A., Mock A. F., Huang Y., Walnstock D. H. Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in shake K⁺ channel. *Neuron*, 1995. 14: 1293-1301.
- [60] Papazian D. M. Potassium channels some assembly required. *Neuron*, 1999. 23: 7-10.
- [61] Paredes C., Cardoso F., Altamirano K., Baltazar P., Romero L. La familia Conidae en el Mar Peruano. *Rev. Peru. Biol.*, 2010. 17 (1): 065-073.
- [62] Pereañez J. A., Vargas L. J. Neurotoxins from invertebrates as alternative therapeutic agents and tool in basic research. *VITAE*, 2009, 16 (1): 155-163.
- [63] Pérez Reyes L. I. 2009. Bloqueo de canales de potasio Kv1 por la conotoxina Sr11a. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México, D.F. Tesis de Maestría.
- [64] Pérez-Rueda F. de J. 2010. Búsqueda de péptidos modulares de receptores de glicina, a partir de venenos de caracoles marinos de la Superfamilia Conoidea (*Conus spurius*). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- [65] Piyankarage S. C., Augustin H., Grosjean Y., Featherstone D. E., Shippy S. A. Hemolymph Amino Acid Analysis of Individual *Drosophila* Larvae. *Anal. Chem.*, 2008. 80(4): 1201-1207.
- [66] Polaczyk P. J., Gasperini R., Gibson G. Naturally occurring genetic variation affects *Drosophila photoreceptor* determination. *Dev. Genes Evol.*, 1998. 207: 462-470.
- [67] Powell J. R., DeSalle R. *Drosophila* molecular phylogenies and their uses. *Evol. Biol.*, 1995. 28:87-138.
- [68] Rajendra W., Armugam A., Jeyaseelan K. Neuroprotection and peptide toxins. *Brain Research Reviews*, 2004. 45:125-141.
- [69] Randall D., Burggren W., French K., 2002. ECKERT: Fisiología Animal. 4^a edición. McGraw-Hill. Madrid, España. Pp: 144-165, 181-184.
- [70] Remane A., Storch V., Welsch U. Zoología Sistemática; Clasificación del Reino Animal. Primera edición. Ediciones Omega. Barcelona, España, 1980. pp. 122-128, 135, 143.
- [71] Rincón-Limas D. E., Fernández S. P., Reséndez P. D., 2009. De la Genética de la mosca a la salud humana. *Ciencia UANL*. 12 (1): 83-89.

- [72] Rodríguez-Arnaiz R., 2003 b. *Drosophila* como organismo modelo en la biología experimental. En: Jiménez L. F., Merchant H. (eds.). Biología Celular y Molecular. Editorial Prentice Hall. México. pp. 761-762.
- [73] Rodríguez-Arnaiz R., Becerra A., Castañeda-Partida L., Castañeda-Sortibrán A.N., Delaye L. J., Ordar-Téllez M. G., Valadéz-Graham V., Vázquez-Cuevas M. J., 2005. Manual de Prácticas de Genética y Cuaderno de Trabajo. Las Prensas de Ciencias (UNAM). pp. 13-15, 292.
- [74] Russel P. J., 1992. Genetics. Tercera edición. HarperCollins Publishers. E.U.A. pp. 545-546.
- [75] Seoh S. A., Sigg D., Papazian D. M., Bezanilla F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron*, 1996. 16 1159-1167.
- [76] Soni N., Kam P. 4-aminopyridine: A review. *Anaesth. Intens. Care*, 1982. 10: 120-126.
- [77] Soto E., Limón A., Artega A., Vega R. Características morfológicas y electrofisiológicas de las neuronas del ganglio vestibular en cultivo. *Gaceta Médica de México*, 2002. 138 (1): 1-13.
- [78] Spence I., Gillissen D., Gregson R. P., Quinn R. J. Characterization of the neurotoxic constituents of *Conus geographus* (L) venom. *Life Sciences*, 1977. 21(12): 1759-1769.
- [79] Tamargo M. J. Los poros y canales ionicos regulan la actividad celular. *An. R. Acad. Farm.*, 2004. 70 9-31.
- [80] Taylor J. D., Kantor Y. I., Sysoev A. V., Foregut anatomy, feeding mechanism, relationships and classification of the Conoidea (=Toxoglossa)(Gastropoda). *Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. (Zool.)*, 1993.59:125-170.
- [81] Terlau H., Shon K., Grilley M., Stocker M., Stühmer W., Olivera B.M. Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting cone snail. *Nature*, 1996. 381: 148-151.
- [82] Terlau H., Olivera B. M. Conus Venoms A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides. *Physiol. Rev.*, 2004. 84 41-68.
- [83] Valía-Vera J. C., Villanueva V. L., Asensio-Samper J. M., López-Alarcón M. D., de Andrés J. A. Ziconotide una alternativa innovadora en el dolor crónico neuropático intenso. *Rev. Neurol.*, 2007.
- [84] Verdier L., Al-Sabi A., rivier J. E. F., Olivera B. M., Terlau H., Carlomagno T. Identification of a novel pharmacophore for peptide toxins interacting with K⁺ channels. *The journal of biological chemistry*, 2005. 280 (22); 21246-21255.
- [85] Vicario M. J., Velasco A. Effect of nortriptyline hydrochloride on several preparations of isolated organ of guinea-pig and rat "in vitro". *Psiquis*, 2001. 22 (2): 89-93.

- [86] Walsh P J, Smith S L, Fleming L E, Solo-Gabriele H M, Gerwick W H. Oceans and Human Health: risks and remedies from the seas. Primer edición ilustrada. Academic Press. San Diego California, 2008. Pp. 495-502.
- [87] Xiang W. D., Juan J. Y., Ping A., Peng L., He S. L. Aberrant expression of ether-á-go-go potassium channel in colorectal cancer patients and cell lines. World J. Gastroenterol., 2007. 13 (8): 1257-1261.
- [88] Yellen G., Jurman M. E., Abramson T., MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ Channel. Science, New Series, 1991. 251 (4996) 939-942.
- [89] Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. Nature, 2002. 419 35-42.
- [90] Yu W., Xu J., Li M. NAB domain is essential for the subunit assembly of both α - α and α - β complexes of Shaker-like potassium channels. Neuron, 1996. 16441-16453.

Referencias electrónicas

- Tree of Life Web Project. 1995. Mollusca. Snails, clams, mussels, squids, octopi, chitons, and tusk shells. Version 01 January 1995 (temporary). <http://tolweb.org/Mollusca/2488/1995.01.01> in The Tree of Life Web Project.
- <http://flymove.uni-muenster.de/>
- <http://www.coneshell.net/index.html>