

### AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA CONOTOXINA, CON ACTIVIDAD MODULADORA DE CANALES DE CALCIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE, OBTENIDA DEL VENENO DE *Conus californicus*

Bernáldez J<sup>1</sup>, Morales, E.<sup>1</sup>, Salceda E.<sup>2</sup>, Soto E.<sup>2</sup>, Arellano R<sup>3</sup>, Licea A.<sup>1</sup>, [alicea@cicese.mx](mailto:alicea@cicese.mx)

<sup>1</sup>Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, fax (646) 1750569, <sup>2</sup>Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla. <sup>3</sup>Instituto de Neurobiología, UNAM

Palabras clave: *conotoxinas, electrofisiología, canales de calcio.*

**Introducción.** El caracol marino *Conus californicus* es una especie endémica de California y Baja California. De forma similar al resto de los miembros del género *Conus*, *C. californicus* presenta en su veneno una gran variedad de péptidos pequeños, llamados conotoxinas. Hasta el momento, las conotoxinas descritas que actúan como moduladoras de canales de calcio dependientes de voltaje, son clasificadas como  $\omega$ -conotoxinas que presentan características particulares de esa familia<sup>(1)</sup>. En este trabajo presentamos una nueva conotoxina, con características distintas a las reportadas para las  $\omega$ -conotoxinas, obtenida inicialmente de una fracción cromatográfica de *C. californicus*.

El objetivo de este trabajo fue obtener un péptido sintético, con actividad moduladora sobre canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), a partir de una fracción del veneno del caracol marino *Conus californicus*.

**Metodología.** Los organismos de la especie *C. californicus* fueron colectados en la región costera de Baja California, México. El veneno fue obtenido a partir de los ductos venenosos de los especímenes. Posteriormente, el extracto crudo fue purificado por RP-HPLC de acuerdo a su tiempo de retención, usando un gradiente de 0-60% de AcN:TFA (99.88%:12%). Las fracciones cromatográficas fueron evaluadas mediante estudios electrofisiológicos, empleando dos modelos biológicos: 1) ovocitos de *X. laevis*, usando la técnica de control de voltaje empleando dos electrodos<sup>(2)</sup>; y 2) neuronas en cultivo primario, obtenidas de los ganglios de las raíces dorsales de rata, usando la técnica de control de voltaje en su configuración de célula completa. Una vez identificado el péptido con efecto modulador sobre canales de calcio, este fue secuenciado y sintetizado para su posterior evaluación en ensayos electrofisiológicos.

**Resultados y discusión.** En los registros electrofisiológicos, obtenidos con el primer modelo, se demostró que la fracción colectada en los minutos 10-15, provocó una disminución significativa de la corriente de  $Ca^{2+}$ , en un 38% con respecto al control (n=3), acción que resultó parcialmente reversible con el lavado. En los registros electrofisiológicos obtenidos con el segundo

modelo, la fracción colectada en el minuto 13 redujo de manera significativa ( $p < 0.01$ , prueba t de Student) la corriente de calcio ( $34.2 \pm 3.3\%$  con respecto al control (n=12)). La secuencia obtenida del péptido con actividad sobre canales de calcio es: NCPAGCRSQGCCM. Dada la secuencia, fueron sintetizados dos péptidos con patrones de enlaces disulfuro 1-3, 2-4 (P1Cc) y 1-4, 2-3 (P2Cc). A continuación se muestra en la figura 1, los resultados obtenidos de la evaluación de los péptidos sintéticos sobre corrientes de calcio, empleando el segundo modelo biológico aquí descrito.

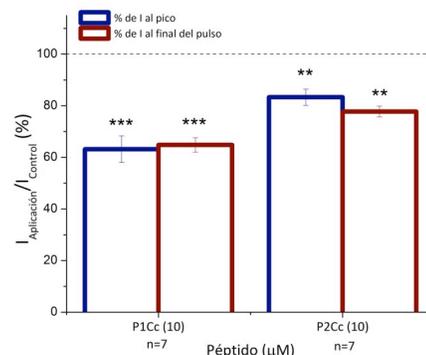


Fig. 1. Estudio de los péptidos sintéticos P1Cc y P2Cc

La reducción de la corriente al aplicar P1Cc fue de  $36.8 \pm 5.17\%$  de la corriente medida al pico, la reducción fue significativa al aplicar un prueba t pareada (\*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ). El lavado produjo un 95 % de recuperación de la corriente. El péptido P2Cc redujo un  $16.7 \pm 3.16\%$  de la corriente medida al pico. La recuperación fue del 93 % luego del lavado.

**Conclusiones.** El péptido sintético P1Cc de 13 aa, obtenido originalmente de *C. californicus*, presenta actividad moduladora de CCDV y difiere totalmente de las características generales de las  $\omega$ -conotoxinas.

#### Bibliografía.

1. Cruz, J., Olivera, B., (1986). Calcium channel antagonists.  $\omega$ -conotoxins defines a new high affinity site. The Journal of Biological Chemistry. 261:6230-6233.
2. Miledi, R. (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocyte. Proc R Soc Lond B. 215:491-497.