



Universidad Autónoma de Baja California



Facultad de Ciencias Marinas

“Evaluación del efecto analgésico de seis α J2- conotoxinas provenientes de *Conus californicus* en respuesta a estímulos nociceptivos”

Trabajo de Graduación:
Para optar al grado de Licenciada en Oceanología

Presentado por:
Fernanda Isabel Ariza Pérez

Agosto de 2015

EMISIÓN DE VOTO APROBATORIO
SOBRE TRABAJO DE TESIS PROFESIONAL

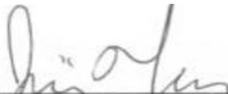
Ensenada, B.C., a 4 de Agosto del 2015.

Dr. Victor Zavala Hamz
Subdirector de la Facultad de
Ciencias Marinas

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de Tesis presentado por la **C. FERNANDA ISABEL ARIZA PÉREZ** para poder presentar su examen profesional y obtener el título de **LICENCIADO EN OCEANOLOGÍA** nos permitimos comunicarle que le hemos dado nuestro voto aprobatorio sobre su trabajo titulado: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANALGÉSICO DE SEIS α 2-CONOTOXINAS PROVENIENTES DE *Conus californicus* EN RESPUESTA A ESTÍMULOS NOCICEPTIVOS”**.

Esperando reciba de conformidad, quedamos de usted, muy atentamente.

Atentamente



Director de Tesis

Msc. Samanta Mireya Jiménez Flores



Sinodal
Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro



Sinodal
Dra. Ivone Giffard Mena

Agradecimientos

En primero lugar, agradezco a el Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro por concederme el privilegio de formar parte del grupo de trabajo del Departamento de Innovación Biomédica del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, B.C. Así como por el apoyo en la gestión de una beca de tesis de licenciatura durante el tiempo que desarrolle el trabajo.

A la Msc. Samanta Mireya Jiménez Flores, por su atención y apoyo técnico, así como por su solidaridad durante los largos periodos de arduo trabajo. También quisiera agradecer su esmero en la revisión y corrección del estilo de este escrito.

A el Biol. Pablo Eladio Guevara Reyna, por su compañía y auxilio incondicional durante la estandarización y aplicación de las pruebas nociceptivas.

A la Dra. Ivonne Giffard Mena, por su buena disposición y comprensión en una serie de eventos desafortunados para los cuales me redimió fortuitamente.

A la Dra. Graciela Guerra Rivas por sus consejos y esmero en la revisión y corrección del escrito.

A mi familia por todo su apoyo incondicional económico y emocional durante la realización de mi carrera, así como por ser un ejemplo vivo de trabajo, persistencia y dedicación para mi. En especial a mis Patitos, el Dr. Alberto Díaz Mata y la Msc. Ma. de los Ángeles Silvia Ampudia Rueda, por inspirarme inconscientemente a unirme a los esfuerzos dirigidos a la búsqueda de alternativas para tratar el dolor crónico. Este trabajo se lo dedico en particular a mi Patito, quien como muchas otras personas luchadoras del mundo, prefiere sobrellevar su malestar sin el uso de opiáceos, como la morfina, y merece contar con mejores alternativas de tratamiento biomédico para aliviar su dolor.

Índice

1. Introducción
 - 1.1 Género *Conus*
 - 1.2 Aparato venenoso
 - 1.3 Conotoxinas
 - 1.4 Blancos moleculares de las conotoxinas
 - 1.5 Definición de dolor; sistema nociceptivo
 - 1.6 Canales iónicos implicados en la nocicepción: receptores nicotínicos de acetilcolina
2. Antecedentes
3. Justificación
4. Hipótesis
5. Objetivos generales y particulares
6. Metodología
7. Resultados
8. Discusión
9. Conclusión
10. Perspectivas
11. Anexos
12. Referencias

Resumen

Desde los años 70's existe un fuerte interés por la química de los productos marinos a raíz de una búsqueda por soluciones novedosas a problemáticas de salud globales, entre ellas el creciente padecimiento de dolor crónico; un mal que afecta al 20% de la población mundial y se diagnostican un 10% de nuevos casos cada año. En el tratamiento del dolor crónico se recurre al uso de analgésicos opioides, los cuales tienen limitantes debido a los efectos secundarios asociados a ellos como la tolerabilidad y dependencia que se originan por una falta de especificidad entre blancos farmacológicamente relevantes y aquellos con estructura similar pero con función distinta. Ante esta problemática, se han obtenido resultados prometedores con los componentes bioactivos presentes en el veneno de los caracoles marinos del género *Conus*, por su capacidad para apuntar con exquisita especificidad a sus respectivos receptores, canales iónicos y transportadores en el sistema nervioso. En esta línea de investigación se inscribe el presente trabajo que evalúa la actividad analgésica de seis α J2- conotoxinas sintéticas, nombradas como: CCJ1, CCJ2, CCJ3, CCJ4, CCJ5, y CCJ6 en referencia al orden en que fueron reportadas por Biggs *et al.*, 2010, así como la especie de la cual provienen: *Conus californicus*, utilizando dos modelos murinos de nocicepción; prueba del ácido acético o *Writhing Test* y prueba del coletazo por inmersión en agua caliente o *Tail Immersion Test* (TIT por sus siglas en inglés). Ambas pruebas nociceptivas forman parte de la fase preclínica del estudio de fármacos, una fase que requiere de muchos esfuerzos para lograr la estandarización adecuada de su uso en el laboratorio. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un efecto antinociceptivo estadísticamente significativo entre el control negativo y los tratamientos con α J2- conotoxinas: CCJ1 y CCJ5, siendo el tratamiento con CCJ5 administrada a 3.0 μ g/g el más efectivo después de CCJ1 administrada a 0.85 μ g/g. El efecto analgésico observado para CCJ1 y CCJ5 a dichas dosis fue similar al obtenido utilizando morfina como control positivo en ambas pruebas nociceptivas implementadas.

1.- Introducción

“Los océanos albergan la capacidad de contribuir enormemente a la cura y la comprensión de enfermedades humanas, sin duda representan la siguiente gran frontera biomédica”, dijo el Dr. William Fenical, pionero en el estudio sobre la química de productos marinos y director del “Scripps Center for Marine Biotechnology and Biomedicine” en una entrevista hecha en 1997 por la revista, “Explorations Magazine”. Estas palabras se han ido reconociendo cada vez más a medida que se dificulta la búsqueda de soluciones alternativas y novedosas para combatir problemáticas de salud global. En particular, el estudio sobre el dolor crónico se encuentra a la vanguardia del interés biomédico, pues de acuerdo a estadísticas recientes, el 20% de la población mundial padece dolor crónico y un 10% de personas son diagnosticadas cada año. Aquellos individuos que viven con dolor crónico, sufren de depresión, incapacidad para trabajar; y en general de una calidad de vida más deteriorada que personas que no lo padecen (Goldberg y Mcgee, 2011). Los fármacos actualmente utilizados para tratarlo incluyen el uso de opiáceos, que muchas personas prefieren no utilizar por precaución a los efectos secundarios asociados a ellos, como es la adicción. Por lo que su estudio y tratamiento todavía representa un reto muy grande en la medicina.

En contraste, el océano ocupa alrededor del 70% de la superficie de nuestro planeta y está casi en su totalidad sin explorar. Lo que esperaríamos es que pudiéramos encontrar en él las medicinas que no se han podido encontrar a partir de fuentes terrestres para combatir las problemáticas de salud (Howard, 1997).

En particular, desde principios del siglo XX se ha desarrollado un interés especial por la investigación de los subproductos del Phylum Mollusca, ya que la mayor parte de ellos posee una pronunciada actividad farmacológica u otras propiedades útiles en materia biomédica. Estos subproductos consisten de diferentes moléculas bioactivas, en especial, neuromusculares y fármacos para tratar padecimientos del sistema nervioso central. Entre las moléculas, bioactivas

se encuentran las aminos y péptidos; tetra-aminas, murexina o urocanilcolina; sustancias fotodinámicas, antibacteriales (paolin I) y antivirales (paolin II); factores antitumorales e inhibidores de crecimiento; aminos bioactivas como tiramina, histamina, serotonina, y lotoxina; una glicoproteína; eledoisina, un péptido; agentes hipotensores; y compuestos aromáticos heterocíclicos de bromo, conocidos como aplisina y aplisinol con propiedades hipotensoras y cardioactivas (Arumugam *et al.*, 2013). En la Tabla I se reportan algunas de las actividades encontradas en compuestos químicos aislados de moluscos, de los cuales algunos de los más interesantes para la neurociencia son aquellos derivados de los caracoles marinos del género *Conus*.

Tabla I. Lista de componentes provenientes de moluscos. Modificada de Arumugam *et al.*, (2013).

Molusco	Toxina/ Química	Compuesto químico	Actividad	Referencia
<i>Conus radiates</i>	Neurotoxina	Conantokin-R	Antiepiléptica	Mortari <i>et al.</i> (2007)
<i>Conus lynceus</i>	Neurotoxina	Conantokin-L	Antiepiléptica	Mortari <i>et al.</i> (2007)
<i>Conus geographus</i>	Neurotoxina	Conantokin-G	Antiepiléptica	Mortari <i>et al.</i> (2007)
<i>Dolabella auricularia</i>	Péptido	Dolabellainin B2	Antibacterial	Ijima <i>et al.</i> (2003)
<i>Dolabella auricularia</i>	-	Dolastatin	Antineoplásico	Pettit <i>et al.</i> (1989)
<i>Dolabella auricularia</i>	-	Dolastatin-10	Anticancer	Yamada <i>et al.</i> (2000)
<i>Elysia rufescens</i>	Polipéptido	Kahalalide A y F	Antituberculosis	Hamann <i>et al.</i> (1996).
<i>Kelletia kelletti</i>	Tetra esterasa	Kelletin I y II	Antibacterial	Tymiak y Rinehart (1983)

1.1.- Género *Conus*

Los conos marinos son moluscos gasterópodos que pertenecen a la familia Conidae de alrededor de 500 a 700 especies. Este grupo es uno de los más estudiados entre la superfamilia Conoidea de donde también provienen las familias Turridae y Terebridae (Figura 1) (Biggs *et al.*, 2010). Sus conchas cónicas figuran una amplia variedad de colores y tamaños, que van desde 1 cm a 22 cm en ejemplares adultos (Figura 1), (Röckel *et al.*, 1995 en Jiménez Flores, 2011).



Figura 1. Diversidad de Conoidea: de derecha a izquierda, un Terebridae, un Conidae y un Turridae. Imagen editada de Puillandre (2007).

Estos organismos de movimiento lento evolucionaron a predadores a través de la incorporación de un aparato venenoso especializado que les permite someter rápidamente a presas de movimientos veloces. Dependiendo del tipo de presa que tenga, el caracol cono se clasificará en ya sea en una especie vermívora, moluscívora o piscívora, siendo las especies vermívoras las más comunes (Jiménez-Flores, 2011) y las piscívoras las más letales, por su capacidad de causarle la muerte a vertebrados más grandes, como los humanos. Bajo este contexto resulta destacable mencionar que la especie de donde provenían las conotoxinas utilizadas en este experimento, *Conus californicus*, se alimenta de los tres grupos de presas mencionadas (Cervantes-Luévano, 2014), generando

especulación en torno a la potencia de su veneno, el cual debe ser uno muy versátil y por ende convirtiendo a esta especie en un interesante objeto de estudio científico.

Típicamente los especímenes del género *Conus* se distribuyen a través de aguas tropicales de todo el mundo donde se pueden encontrar en o cerca de arrecifes coralinos, (Nghia, 2013). Aunque también se pueden encontrar en aguas subtropicales, donde suele encontrárseles viviendo en sustratos arenosos, rocosos, camas de pastos marinos o adheridos a las rocas (Díaz *et al.*, 2005 en Jiménez-Flores, 2011), como es el caso de *Conus californicus*. Esta especie se distribuye desde San Francisco, CA hasta Los Cabos, B.C.S (Hanna y Strong, 1949 en Jiménez-Flores, 2011). Debido a que *Conus californicus* es una de las pocas especies que se ha adaptado a aguas frías, ha ocupado nichos enteros que de otra manera serían compartidos entre varias especies de *Conus*. Esto ha hecho que esta especie genere formas de caza peculiares y nunca antes vistas en otras especies de *Conus*, como son los ataques organizados y cooperativos para atacar otros caracoles. Esta manera de cazar, les permite cazar presas más grandes que podrían depredarlos, así como ahorrar veneno (Biggs *et al.*, 2010).

1.2.- Aparato venenoso

El aparato venenoso de los conos (Figura 3) consiste del bulbo venenoso que está conectado a un largo ducto que se abre dentro de la faringe; el papel que juega el bulbo dentro del sistema es incierto. El ducto se ha identificado como el sitio donde el veneno es producido y posteriormente alcanza su madurez. Para inyectar el veneno a la presa, los *Conus* desarrollan dientes dentro del saco radular, el cual está compuesto de dos partes, el brazo largo, donde los dientes se desarrollan y el brazo corto donde los dientes se encuentran disponibles para usarse. Al encontrarse con una presa, el caracol lanza fuertemente un diente a través de su larga probóscide y el veneno es inyectado a través de un canal hueco

ubicado dentro del diente. En un solo ataque puede lanzar varios dientes (Nghia, 2013).

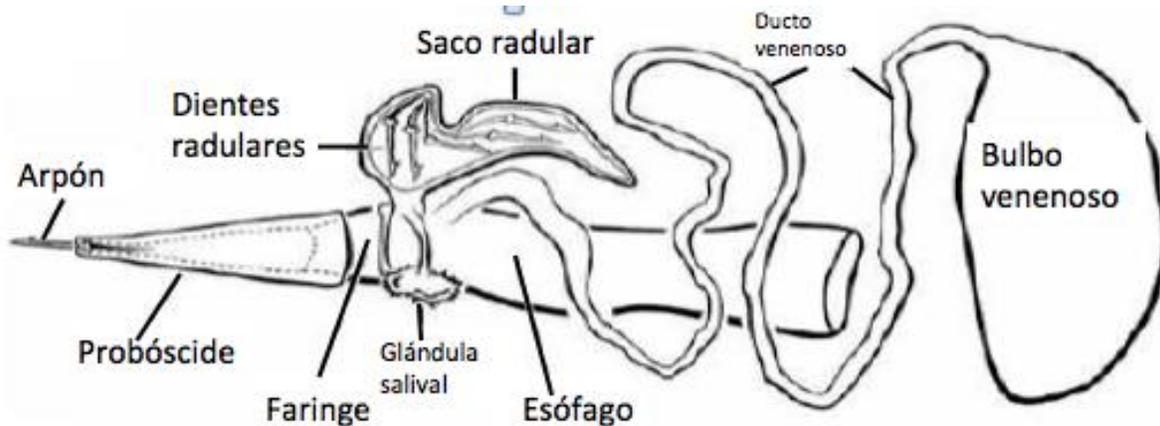


Figura.3 El aparato venenoso de los cónidos consta en general de un bulbo que se piensa sirve para propulsar el veneno, seguido de un ducto que es el lugar de síntesis del veneno, el cual después entra a la faringe hacia el saco radular que contiene los dientes que serán luego cargados de veneno en la faringe generando el arpón venenoso, estructura similar a una aguja hipodérmica, a través del cual será inyectado el veneno. Modificado de Olivera (2008) en Cervantes –Luévano (2014).

1.3.- Conotoxinas

El veneno de caracol marino atrajo el interés científico por primera vez en los años 60's en un intento de comprender la base farmacológica para explicar las fatalidades humanas ocasionadas por piquetes de caracoles conos. Estos primeros estudios mostraron que el veneno de *Conus* es una mezcla compleja de componentes biológicamente activos, incluyendo una enorme colección de péptidos neuroactivos denominados conotoxinas. Por mucho tiempo, se pensó que cada especie de cono expresaba un set distinto de alrededor de 50-200 péptidos, el cual estaba influenciado por factores ambientales y dietéticos. En base a estos números, los cuales fueron originalmente derivados por fraccionamiento con HPLC y análisis utilizando espectrofotometría de masas (MS), un repertorio de más de 70,000 péptidos (en su mayoría neuroactivos) para cada

especie fueron estimados. Sin embargo, con la llegada de tecnología más sensible y métodos alternativos para medir esta diversidad, hoy en día se les atribuye la capacidad de producir cientos de miles de conopéptidos neuroactivos distintos a cada especie de *Conus*, (Akondi *et al.*, 2014), de los cuales apenas el 2% de ellos ha sido secuenciado, (Lavergne *et al.*, 2013).

Estos péptidos son inicialmente sintetizados como proteínas precursoras por las células epiteliales que recubren el conducto venenoso de los caracoles del género *Conus*. El precursor conopéptido consta de cuatro regiones; una región pre conservada constituida por una secuencia señal para el direccionamiento al retículo endoplásmico, una región-pro N-terminal, la región del péptido maduro, y la región-pro C-terminal (Figura 4). Durante el proceso de maduración, la secuencia señal y las pro-regiones N y C terminales son separadas mediante un procesamiento proteolítico; algunos aminoácidos en la región madura pueden llegar a tener modificaciones post-traduccionales, formar enlaces disulfuro, y finalmente plegarse en su configuración tridimensional activa. La longitud de secuencia de los conopéptidos maduros reportados a la fecha, es de 8-86 residuos de aminoácidos, siendo los péptidos con 26 residuos los más comunes (Nghia, 2013). La toxina madura se caracteriza por propiedades como: una elevada especificidad, potencia, estabilidad y estructura pequeña, (Cervantes-Luévano, 2014).

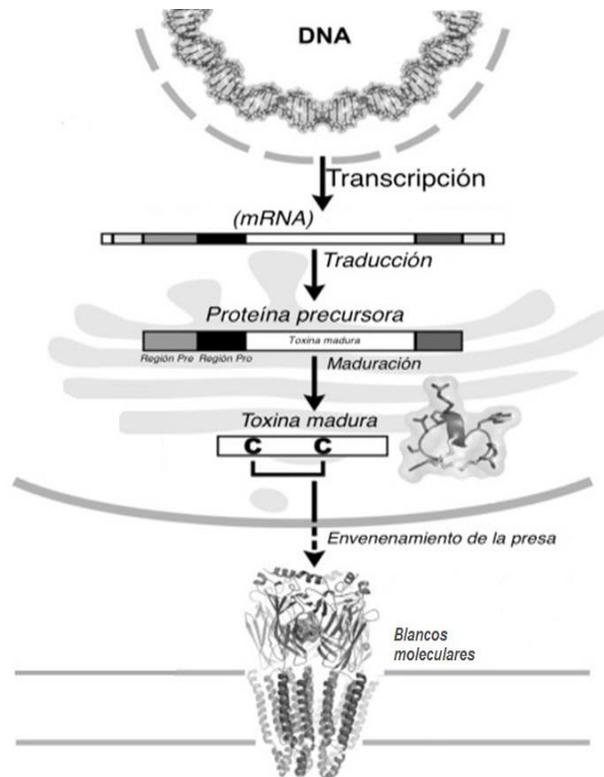


Figura 4. Muestra el proceso que tiene la post-traducción del precursor conopéptido que consta de 4 regiones: una región pre conservada, una región pro N-terminal, la región de la toxina madura, y la pro región C terminal.

La clasificación de las conotoxinas va de acuerdo a tres esquemas; superfamilias genéticas, arreglos cisteínicos y familias farmacológicas (Nghia, 2013). Se ha demostrado que estas toxinas son codificados por un número relativamente pequeño de superfamilias de genes, (Biggs et al., 2010). Esta clasificación va de acorde a la conservación de su secuencia señal. Aquellos péptidos caracterizados han sido catalogados en 26 superfamilias de genes (A, B1, B2, B3, C, D, E, F, G, H, I1, I2, I3, J, K, L, M, N, O1, O2, O3, P, S, T, V, Y) y 13 familias de menor importancia utilizadas para clasificar a péptidos identificados en las especies clado divergentes tempranas. Aún más, los conopéptidos suelen dividirse en clases secundarias dependiendo del número de enlaces disulfuro que contengan (los conopéptidos ricos en disulfuro que contengan al menos dos enlaces disulfuro se conocen coloquialmente como conotoxinas, mientras que aquellos que posean cero o al menos un enlace disulfuro se llaman conopéptidos

pobres en disulfuros) ó en base al patrón de cisteínas presente en la región madura de conopéptidos ricos en disulfuro, (Lavergne *et al.*, 2013).

La función específica de las conotoxinas estará basada en el marco cisteínico que posea. Este marco es definido por los siguientes aspectos: el número de cisteínas (pueden exhibir uno de los tres arreglos de residuos de cisteína característicos: el de dos, tres o cuatro marcos de espiral), la distribución de los pares de cisteínas, la distancia en términos del número de aminoácidos diferentes (de 0 a 6) entre dos cisteínas, y el número y la posición de la conectividad del enlace disulfuro, (Nghia, 2013). Existen 26 marcos de cisteína reportados a la fecha (Tabla II), (Kaas Q. *et al.*, 2015).

Tabla II. Marco de Cisteínas para Conotoxinas. Modificado de Kaas, Q. *et al.* (2010).

Marco	Patrón Cisteínico	Número de Cisteínas
I	CC-C-C	4
II	CCC-C-C-C	6
III	CC-C-C-CC	6
IV	CC-C-C-C-C	6
V	CC-CC	4
VI/VII	C-C-CC-C-C	6
VIII	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	10
IX	C-C-C-C-C-C	6
X	CC-C(PO)C	4
XI	C-C-CC-CC-C-C	8
XII	C-C-C-C-CC-C-C	8
XII	C-C-C-CC-C-C-C	8
XIV	C-C-C-C	4
XV	C-C-CC-C-C-C-C	8
XVI	C-C-CC	4
XVII	C-C-CC-C-CC-C	8
XVIII	C-C-CC-CC	6
XIX	C-C-C-CCC-C-C-C-C	10
XX	C-CC-C-CC-C-C-C-C	10
XXI	CC-C-C-C-CC-C-C-C	10
XXII	C-C-C-C-C-C-C-C	8
XXIII	C-C-C-CC-C	6

XXIV	C-CC-C	4
XXV	C-C-C-C-CC	6
XXVI	C-C-C-C-CC-CC	8

Por otra parte, existen conopéptidos, que no pertenecen a ninguna de las superfamilias mencionadas anteriormente, pero que poseen los mismos blancos moleculares. Aunque algunos muestran regiones señal conservadas, o modificaciones post-traduccionales específicas, estas conotoxinas se han incorporado a 14 clases adicionales denominadas: conantokin, conodipine, conohyal, conolysin, conomap, conomarfin, conopéptido Y, conofan, conoporin, conopressin, conorfamide, conotoxina-similar, contryfan, y contulakin, (Lavergne *et al.*, 2013).

1.4.- Blancos moleculares de la conotoxinas

Las conotoxinas, se clasifican en diferentes familias farmacológicas en base a los receptores y la actividad fisiológica que posean. Estas familias son: α , γ , δ , ϵ , ι , κ , μ , ρ , σ , χ , y ω (Nghia, 2013), las cuales se pueden observar en la Tabla III que se muestra a continuación.

Tabla III. Familias farmacológicas correspondientes a la familia de receptores de membrana, el número de conotoxinas de tipo silvestres identificadas, y sus superfamilias de genes. Modificado de Kaas *et al.* (2010) en Nghia (2013).

Familias Farmacológicas	Familia de receptor membranal	Conotoxinas maduras	Superfamilia de Genes
α (alfa)	Receptor acetilcolina nicotínico (nAChR)	55	A,D,L,M,S
χ (chi)	Transportador de noradrenalina neuronal	4	T

	Canales de Na dependientes de voltaje		
δ (delta)	Canales de Ca presinápticos o pares de proteína G	18	O1
ϵ (epsilon)	Corriente catiónica de marcapasos neuronal	1	T
γ (gamma)	Canales de Na dependientes de voltaje	4	01,02
	Canales de K dependientes de voltaje		
i (iota)	Canales de Na dependientes de voltaje	2	I1,M
κ (kappa)	Canales de Ca dependientes de voltaje	8	A,I2,J,M,O1
μ (mu)	α 1-adrenoceptores	23	M,O1,T
ω (omega)	Canales iónicos dependientes de Serotonina	31	O1
ρ (rho)		1	A
σ (sigma)		1	S

Desde 1985, después del descubrimiento del péptido omega-MVIIA, aislado de *Conus magus* y que dio origen al Ziconotide (fármaco para el tratamiento del dolor en pacientes con cáncer) se han descrito diferentes toxinas aisladas de conos que han llevado al desarrollo de otros agentes terapéuticos y a la descripción de procesos involucrados en la neuroquímica (Pereañez y Varga, 2009). Algunas de las que se encuentran actualmente en estudios preclínicos o clínicos se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Conotoxinas usadas en estudios preclínicos y clínicos para el tratamiento de algunas enfermedades. Modificado de Pereañez y Vargas (2009).

Toxina	Clase	Especie	Condición	Estado del estudio	Sitio web de la compañía
Vc1.1	α	<i>C. victoriae</i>	Dolor neuropático	Preclínico	www.metabolic.com.au
CVID	ω	<i>C. catus</i>	Dolor neuropático	Fase II	www.amrad.com.au
MVIA	ω	<i>C. magus</i>	Dolor en pacientes con cáncer	Fase III	www.elan.com
MRIA/B	χ	<i>C. marmoreus</i>	Dolor neuropático	Preclínico	www.xenome.com
Contulakina-G	Contulakina	<i>C. geographus</i>	Dolor crónico	Fase II	www.cognetix.com
Conantokin-G	Conantokina	<i>C. geographus</i>	Epilepsia	Preclínico	www.cognetix.com

1.5.- Definición del dolor; sistema nociceptivo

Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, el dolor es un tipo de sensación somática que ocurre en respuesta a una lesión tisular real o posible (Bader *et al.*, 2009). La sensación del dolor es iniciada por estímulos químicos nocivos, extrema temperatura o presión que activa una variedad de proteínas en los nociceptores (las terminales de fibras nerviosas periféricas específicas), dando como resultado la despolarización y generación de los potenciales de acción. Las señales provenientes de los nociceptores periféricos, mediante la liberación de neurotransmisores, activan receptores en neuronas de la columna dorsal que se transfieren por varias vías hacia el talo cerebral, tálamo y finalmente a la corteza cerebral donde se procesa la información y se manda una reacción (Figura 5), (Nghia, 2013).

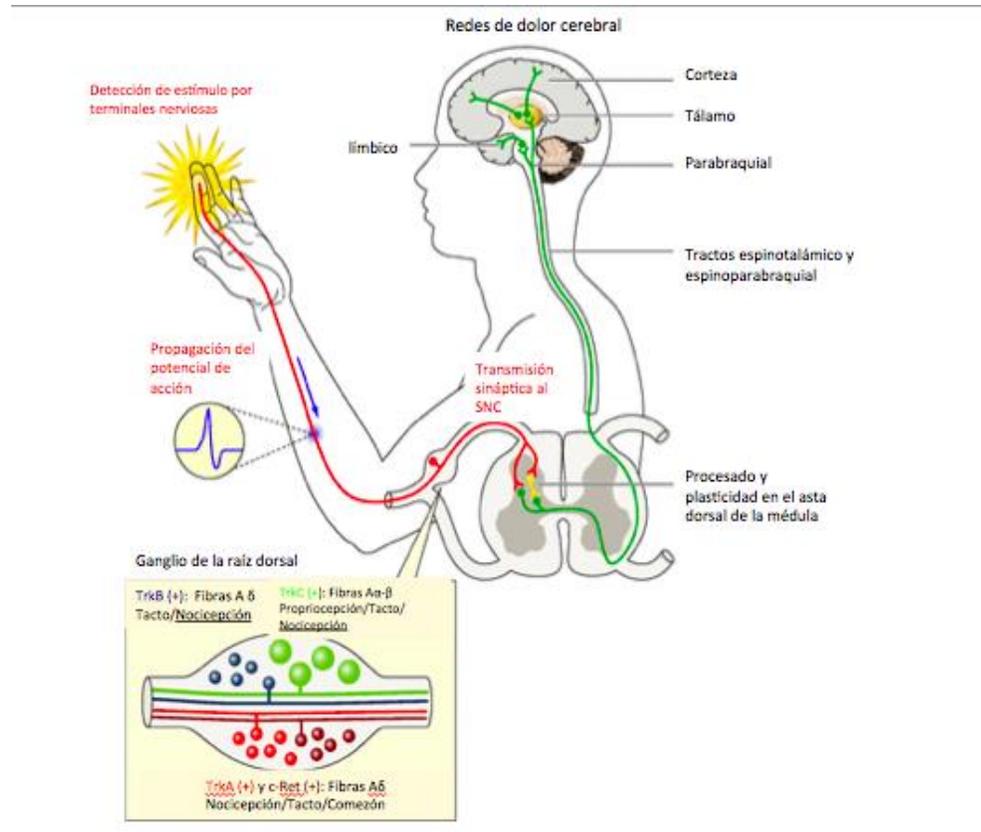


Figura 5. Funcionamiento del Sistema Nociceptivo. Modificado de Bourinet *et al.* (2014),

Los estados de dolor están separados en dos categorías; agudos y crónicos. El dolor agudo tiene una función comunicativa que sirve para alertar al organismo de que algo malo está sucediendo en alguna parte del cuerpo para que este pueda tomar acción sobre el problema. Cuando los nociceptores son dañados, el dolor pierde su función preventiva y se convierte en un padecimiento conocido como dolor crónico. El dolor crónico es el resultado de una reorganización disfuncional del sistema nociceptivo (usualmente mucho tiempo después de que haya sanado una herida). Este tipo de dolor es el que se presenta usualmente en enfermedades como el dolor de espalda, el dolor ocasionado por los estragos del cáncer, la neuropatía diabética y la neuropatía producida por VIH/SIDA, entre otros (Nghia, 2013).

La necesidad de estrategias efectivas de tratamiento para el dolor crónico persiste a causa de la baja eficacia o efectos secundarios indeseados de los tratamientos utilizados actualmente (Nghia, 2013). Esa necesidad impulsa el estudio sobre la exploración y el desarrollo de nuevos fármacos orientados a solucionar esta problemática. Dicho estudio implementa modelos de nocicepción en animales en su fase preclínica (Tabla V). La fase preclínica es la etapa previa a las pruebas clínicas de un fármaco, que incluye experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando una amplia gama de dosis del fármaco en prueba, para obtener información sobre la eficacia preliminar, toxicidad y farmacocinética. Dichas pruebas ayudan a las compañías farmacéuticas a decidir si el mérito científico que tuvo el componente a prueba, fue suficiente como para continuar su desarrollo como un producto farmacéutico.

Tabla V. Ensayos algiesiométricos comunes (excluyendo los modelos orofaciales). Para la duración persistente, las mediciones son dependientes de la duración total de respuestas como lamidos o estiramientos de la zona afectada, aunque también se puede demostrar hipersensibilidad subsecuente a los estímulos evocados. Para la duración crónica, las mediciones son hechas semanalmente o quincenalmente e incluyen cambios en la sensibilidad hacia estímulos de naturaleza aguda. Modificado de Mogil (2007).

Duración	Modalidad	Prueba	Intensidad ó concentración de estímulo
Aguda (seg)	Calor	Placa Caliente, "Hot Plate" Retirada de pata por calor radiante, "Radiant- heat paw withdrawal" Coletazo ó retirada de cola, "Tail-flick/withdrawal"	46-56°C no reportado 46-56°C
	Frio	Gota de acetona, "Acetone drop" Placa fría, "Cold Plate" Coletazo frío, "Cold tail-flick"	20uL 0-5°C
	Mecánico	Presión en la pata, "Paw pressure (Randall-Selitto)" Corte de cola, "Tail clip" von Frey	variable 100-500g 0.1-1.5g
Persistente (min -hr)	Químico	acido Acético Veneno de abeja Capsaicina Formalina Sulfato de Magnesio	0.1-1.0% 0.05-0.5mg 0.1-50ug 1-5% 120mg/kg
Crónico (hr-semana)	Inflamatorio	Carragenano Adyuvante completo de Freund, "Complete- Freund's Adjuvant" Prostaglandinas Zimosano, "Zymosan"	1-5% 50% 10ng 0.25-1.0mg
	Neuropático	Lesión por constricción crónica Ligadura parcial del nervio ciático Lesión a nervios exceptuando uno, "Spared- nerve injury" Ligadura del nervio espinal	N.A. N.A. N.A. N.A.

1. 6 Canales iónicos implicado en el dolor; receptores nicotínicos de acetilcolina.

Las conotoxinas muestran alta selectividad por blancos asociados al dolor, evitando efectos colaterales como el caso de la adicción en los opioides (Nghia, 2013). Entre los blancos asociados al dolor más estudiados están los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR, por sus siglas en inglés). Estos receptores son los responsables de la transmisión de impulsos nerviosos de los nervios motores a fibras musculares (tipos musculares) y de la transmisión sináptica en el ganglio autónomo (en los tipos neuronales), que es la encargada de la función de los

órganos viscerales. También están presentes en el cerebro donde se asume que son responsables de la adicción a la nicotina, aunque se sabe poco de la función fisiológica típica que ahí desempeñan.

Los receptores nicotínicos forman canales iónicos selectivos de cationes. Cuando se libera un pulso de acetilcolina (ACh) en la sinapsis neuromuscular, los canales en la membrana post-sináptica de la célula muscular se abren y la fuerza conductora electroquímica inicial es mayoritariamente para que los iones de sodio pasen del espacio extracelular hacia el interior de la célula. Sin embargo, conforme la membrana se despolariza, la fuerza conductora aumenta para que los iones de potasio vayan en dirección contraria. Los canales nicotínicos, (particularmente algunos del tipo neuronal) también son permeables a cationes divalentes, como el calcio.

Los receptores nicotínicos son los canales iónicos del tipo de los neurotransmisores más estudiados. Se conoce mucho más de los receptores nicotínicos del tipo muscular que del tipo neuronal. Una de las razones de ello, es que existe un receptor similar al del tipo muscular en el órgano eléctrico de la mantarraya Torpedo, dicho órgano ha servido como modelo biológico para la comprensión de la estructura y función del receptor (Abraham, 2003).

Cada nAChR está compuesto por 5 subunidades y cada subunidad contiene 4 dominios de transmembrana. En tejidos neuronales y sensoriales de mamíferos, se han encontrado 11 subunidades de nAChR, las que se conocen como $\alpha 2$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$. Las composiciones de las distintas subunidades representan estructuras diferentes de nAChRs y muestran la diversidad de propiedades farmacológicas y fisiológicas del canal. Los nAChR están involucrados en el aprendizaje, antinocicepción, adicción nicotínica, desórdenes neurológicos como Parkinson y la enfermedad del Alzheimer (Nghia, 2013).

Entre los péptidos aislados de caracoles marinos, la clase de las α - conotoxinas provee de una herramienta poderosa para ir más allá en el estudio de la estructura y función de los subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina. Es por esto que en el presente trabajo se probará el efecto antinociceptivo de seis α J2-conotoxinas sintéticas provenientes de *Conus californicus* utilizando dos modelos murinos; uno de naturaleza nociceptiva química y otro que involucra estímulos térmicos.

Tabla VI. Muestra las secuencias peptídicas de las seis α J2-conotoxinas provenientes de *Conus californicus* con las que se trabajaron (Cl14.1a – Cl14.3) y su similitud con otras α conotoxinas con efecto analgésico previamente reportado (lt14a-Vc1.1). El margen de cisteínas es denotado por el delineado de la letra 'C' en cada secuencia peptídica, y la semejanza entre aminoácidos de las secuencias peptídicas lt14.a y qc1.1 es denotado por letras en negrita.

Toxina	Secuencia de toxina madura	Especie de <i>Conus</i>	Patrón Cis	Conexiones disulfuro	Referencia
Cl14.1a	G D <u>C</u> P P W <u>C</u> V G A R <u>C</u> R A E K <u>C</u> -	<i>C. californicus</i>	C-C-C-C	1-3, 2-4	Biggs <i>et al.</i> (2010).
Cl14.1b	G D <u>C</u> P P W <u>C</u> V G A R <u>C</u> R A G K <u>C</u> -	<i>C. californicus</i>	C-C-C-C	1-3, 2-4	Biggs <i>et al.</i> (2010).
Cl14.2a	R E <u>C</u> P P W <u>C</u> P T S H <u>C</u> N A G T <u>C</u> -	<i>C. californicus</i>	C-C-C-C	1-3, 2-4	Biggs <i>et al.</i> (2010).
Cl14.2b	R E <u>C</u> P P R <u>C</u> P T S H <u>C</u> N A G T <u>C</u> -	<i>C. californicus</i>	C-C-C-C	1-3, 2-4	Biggs <i>et al.</i> (2010).
Cl14.2c	R D <u>C</u> P P W <u>C</u> P T S H <u>C</u> N A G T <u>C</u> -	<i>C. californicus</i>	C-C-C-C	1-3, 2-4	Biggs <i>et al.</i> (2010).
Cl14.3	R Q <u>C</u> P P W <u>C</u> S G E P <u>C</u> R K G T <u>C</u> -	<i>C. californicus</i>	C-C-C-C	1-3, 2-4	Biggs <i>et al.</i> (2010).
lt14.a	- Z <u>C</u> P P M <u>C</u> N P G - <u>C</u> E N - - <u>C</u> S / - - M <u>C</u> P - P L <u>C</u> K P S <u>C</u> T N - <u>C</u> G - - -	<i>C. litteratus</i>	C-C-C-C	1-3, 2-4	Biggs <i>et al.</i> (2010). / Peng <i>et al.</i> (2006).
qc1.1	DE <u>C</u> <u>C</u> P D P P <u>C</u> K A S N P D L <u>C</u> DWRS	<i>C. quercinus</i>	CC-C-C	1-3, 2-4	Peng <i>et al.</i> (2006).
Vc1.1	- G <u>C</u> <u>C</u> S D P R <u>C</u> N Y D H P E I <u>C</u> G	<i>C. victoriae</i>	CC-C-C	1-3, 2-4	Lebbe <i>et al.</i> (2014).

2.- Antecedentes

A principios de los años 70s, Lourdes J. Cruz y Baldomero M. Olivera comenzaron la colecta sistemática de venenos de *Conus* y la purificación de los componentes biológicamente activos de los venenos de varios conos piscívoros. El primer componente de un veneno caracterizado fue el de α -conotoxina GI, un pequeño péptido de 13 aminoácidos que mostró ser un antagonista nicotínico competitivo (Olivera, 2000).

Poco después, se encontraron otras α -conotoxinas, así como 3 μ - conotoxinas las cuales eran bloqueadoras de canales dependientes de voltaje de sodio del subtipo muscular. Estos péptidos causaban parálisis en ratones. La caracterización de las conotoxinas α y μ explicó la alta frecuencia de fatalidades por piquetes de especies de conos como *Conus geographus*; su piquete es equivalente a una combinación entre la mordida de una cobra, la cual expone a la víctima a un antagonista nicotínico competitivo, fisiológicamente similar al de los caracoles conos y el consumo de una dosis letal de tetrodotoxina (bloqueador de un canal de sodio) proveniente de un pez globo japonés. Este trabajo bioquímico estableció que los componentes activos de los venenos de *Conus* son péptidos pequeños y altamente reticulados. Sin embargo, la enorme diversidad farmacológica presente en estos venenos no fue aparente hasta la aparición de Ziconotide, el primer ejemplo de un polipéptido de invertebrado usado clínicamente (Olivera, 2000).

Por su parte, Pereañez y Vargas (2009) publicaron un artículo en donde se presentan los tipos de α -conotoxinas, mencionando que existen dos subclases, que son capaces de discriminar entre nAChR ubicados en el músculo y en las neuronas. Concluyen que la especificidad sobre los subtipos de receptores convierte a este tipo de toxinas en una herramienta valiosa para el estudio de subtipos de nAChR y el desarrollo de fármacos analgésicos. Un ejemplo de una toxina que tiene como blanco a los receptores nicotínicos de acetilcolina es el

péptido Vc1.1 aislado de *Conus victoriae*. Este péptido pertenece al subgrupo estructural 4/7, que interactúa con receptores nicotínicos de acetilcolina neuronales de mamíferos. Vc1.1 inhibe las siguientes subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina: $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 4$ y $\alpha 9$, $\alpha 10$ y es la primera α -conotoxina con un efecto analgésico en modelos de dolor que ha demostrado disminuir la respuesta vascular al dolor en ratas (Lebbe *et al.*, 2014).

Biggs *et al.* (2010) reportaron una biblioteca de ADNc para *Conus californicus*, de donde definieron quince diferentes secuencias de toxinas maduras con el patrón cisteínico #XIV [C-C-C-C]. De estos quince péptidos, seis eran altamente similares entre ellos, con dos péptidos aislados directamente del veneno. Este grupo de seis conotoxinas (nombradas: CI 14.1a, CI 14.1b, CI 14.2a, CI 14.2b, CI 14.2c, CI 14.3) guarda una alta identidad con el péptido It14a de *Conus litteratus* que tiene una actividad reportada como antagonista de receptores nicotínicos y antinociceptiva (Peng *et al.*, 2006). Lo anterior sumado a la ausencia de miembros de la superfamilia A en esta especie de *Conus* hizo suponer que estas toxinas son los principales antagonistas nicotínicos presentes en el veneno de *C. californicus*. Aún más se clasificaron en una nueva superfamilia genética denominada como: J2, por compartir el mismo patrón de cisteína que la previamente definida superfamilia genética-J, pero diferir de ella en su secuencia señal y probablemente en su distribución filogenética, (Biggs *et al.*, 2010).

Bernáldez *et al.* (2012) identificaron actividad antinociceptiva en una conotoxina aislada del ducto venenoso de *Conus regularis* llamada, RsXXIVA, utilizando modelos murinos de nocicepción de naturaleza térmica y química, (prueba de la placa caliente, *Hot plate*, y prueba de dolor crónico inducido por formalina, respectivamente). La dosis administrada de la conotoxina que rindió dicho efecto antinociceptivo en ambos protocolos fue de 0.85 mg/kg.

Se-Kwon Kim (2013), menciona que los péptidos que se han reportado con propiedades analgésicas hasta la fecha son: MVIIA (Prialt), CVID (AM336), contulakin-G (CGX-1160), MrIA (Xen-2174), conantokin-G (CGX-1007), Vc1.1(ACV-1) y MrVIB(CGX-1001). Entre los péptidos reportados, sólo Prialt ha sido aprobado y los otros están bajo desarrollo o están siendo explorados.

Nghia (2013), reporta que las α -conotoxinas pertenecientes al subgrupo estructural 3/5, como GI, MI y SI poseen propiedades de unión selectiva y bloqueo competitivo, atribuyéndoseles un alto potencial para convertirse en nuevos fármacos de bloqueo neuromuscular. Este marco es generalmente encontrado en α -conotoxinas aisladas de caracoles piscívoros y actúan sobre peces así como receptores nicotínicos de acetilcolina neuromusculares en mamíferos (Lebbe *et al.*, 2014).

Cervantes-Luévano (2014) realizó pruebas utilizando conotoxinas sintéticas elaboradas a partir de las secuencias de toxina madura pertenecientes a la nueva superfamilia genética-J2, reportadas por Biggs *et al.*, 2010 para evaluar su presunta acción sobre receptores nicotínicos de acetilcolina (considerando su similitud con la toxina It14a). Lo que encontró fue evidencia estadísticamente significativa de que en efecto, estos péptidos tienen acción sobre receptores nicotínicos de acetilcolina al modular (incrementar o disminuir) la tasa de transcripción de ciertos genes involucrados en la expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en macrófagos.

Considerando, lo reportado por Cervantes-Luévano (2014), en el presente escrito se evaluó el efecto antinociceptivo de las mismas seis conotoxinas sintéticas reportadas por Biggs *et al.*, 2010 (nombradas en este trabajo como: CCJ1, CCJ2, CCJ3, CCJ4, CCJ5, y CCJ6), utilizando dos modelos murinos de nocicepción; prueba del ácido acético o *Writhing Test* y prueba del coletazo por inmersión en agua caliente o *Tail Immersion Test* (TIT por sus siglas en inglés).

3.- Justificación

La necesidad de estrategias efectivas de medicamentos contra el dolor crónico persiste a causa de la baja eficacia o de efectos secundarios indeseados de los medicamentos utilizados actualmente. La especificidad por blancos asociados al dolor que presentan los componentes bioactivos del veneno del caracol marino, los convierte en un grupo con potencial farmacológico, con la ventaja de evitar los efectos secundarios indeseables.

4.- Hipótesis

Al menos una α J2-conotoxina de las seis que se evaluarán en modelos murinos implementando dos pruebas nociceptivas de naturaleza química y térmica mostrará efecto antinociceptivo.

5.- Objetivos

- Estandarizar la prueba del ácido acético o *Writhing Test*.
- Estandarizar la prueba del coletazo por inmersión en agua caliente o *Tail Immersion Test* (TIT por sus siglas en inglés).
- Evaluar el efecto antinociceptivo de seis α J2-conotoxinas sintéticas, CCJ1, CCJ2, CCJ3, CCJ4, CCJ5 y CCJ6, por medio de las dos pruebas nociceptivas previamente estandarizadas.

6.- Metodología

6.1- Ensayos biológicos

Los sujetos de prueba fueron ratones CD1 machos los cuales fueron mantenidos en cajas con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas y una temperatura ambiente controlada de $(23 \pm 2^{\circ}\text{C})$. Se reguló la dieta con comida estándar de laboratorio y se mantuvieron en un peso constante de 22 ± 2 g. Para ambos protocolos, cada ratón fue utilizado una sola vez. El número de animales y la intensidad del estímulo nociceptivo estuvieron dentro del rango mínimo necesario para demostrar efectos consistentes de la toxina y tratamientos con fármacos.

Estandarización de pruebas de nocicepción

Se realizaron dos pruebas de nocicepción, la prueba de las contorsiones inducidas por ácido acético y la prueba del coletazo por inmersión en agua caliente.

Se comenzó a trabajar de manera rutinaria con ratones CD1 de un peso de 35 ± 5 g para familiarizarse con su manejo y cuidado, así como para determinar el grado de estímulo (intensidad) adecuado en base a los rangos reportados por la literatura para cada protocolo.

Prueba de las contorsiones inducidas por ácido acético

Según Mogil (2007), el intervalo de concentración que puede tener el irritante, para la prueba del ácido acético, va de 0.1% a 1%. Las concentraciones evaluadas

fueron dos: de 0.6%, (Dogrul y Yesilyurt, 1998; Montijo-Diniz *et al.*, 2014) y 0.7% (Sora *et al.*,1999), respectivamente.

Para evaluar la respuesta nociceptiva emitida por la administración de las diferentes concentraciones de ácido acético se utilizó la escala de dolor de Schmauss y Yaksh (1984) en Ness (1999). Esta forma de evaluación emplea una escala que va del 0 al 3: 0=posición corporal normal; 1=posición inclinada del cuerpo favoreciendo un lado; 2=estiramiento de las patas traseras y dorsiflexión de las patas traseras frecuentemente con la pelvis rotando hacia un lado; 3=contracciones de los músculos abdominales seguido por un estiramiento del cuerpo y una extensión de las patas traseras. En la Figura 6 se muestra el aspecto de esta escala.

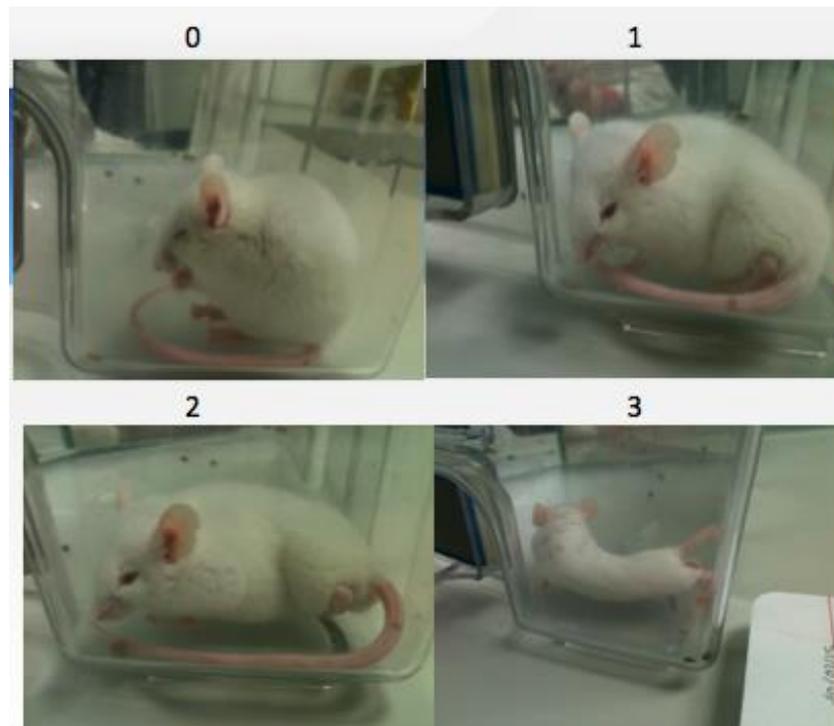


Figura 6. Fotografías tomadas durante los 60 min posteriores a la administración de ácido acético 0.7%, donde se evidencia del 0 al 3 el aspecto de la escala cualitativa de dolor reportada por Schmauss y Yaksh (1984) en Ness *et al.* (1999) para complementar el análisis cuantitativo de dicha prueba.

Prueba del coletazo por inmersión en agua caliente.

Según Mogil (2007), el intervalo de temperatura que se debe usar para no crear daño tisular al momento de someter al organismo al estímulo térmico es de entre 46-56°C. Por ello se probaron cuatro temperaturas dentro de ese intervalo, con el fin de determinar cual producía la respuesta basal más consistente que se manifestara entre “3 a 5 segundos”, según Shanmugasundaram y Venkararaman (2005). Las temperaturas probadas fueron las siguientes: 47.5 °C, 49 °C, 51 °C, y 55 °C. La metodología utilizada para este protocolo fue basada en lo reportado por Elhabazi *et al.* (2014), que consiste en la inmersión de 2/3 partes de la cola de un ratón (de manera recta) en un baño maría a una temperatura dada y la medición del tiempo en que el ratón reacciona con un coletazo o removiendo la cola del agua. En la Figura 7 se puede observar el procedimiento de inmersión y la reacción esperada ante el estímulo por parte del ratón. El tiempo de corte, (tiempo máximo para aplicar un estímulo nociceptivo) fue de 20 segundos. El procedimiento con cada animal se repitió 3 veces, con el fin de obtener un promedio de la respuesta basal para cada temperatura medida.

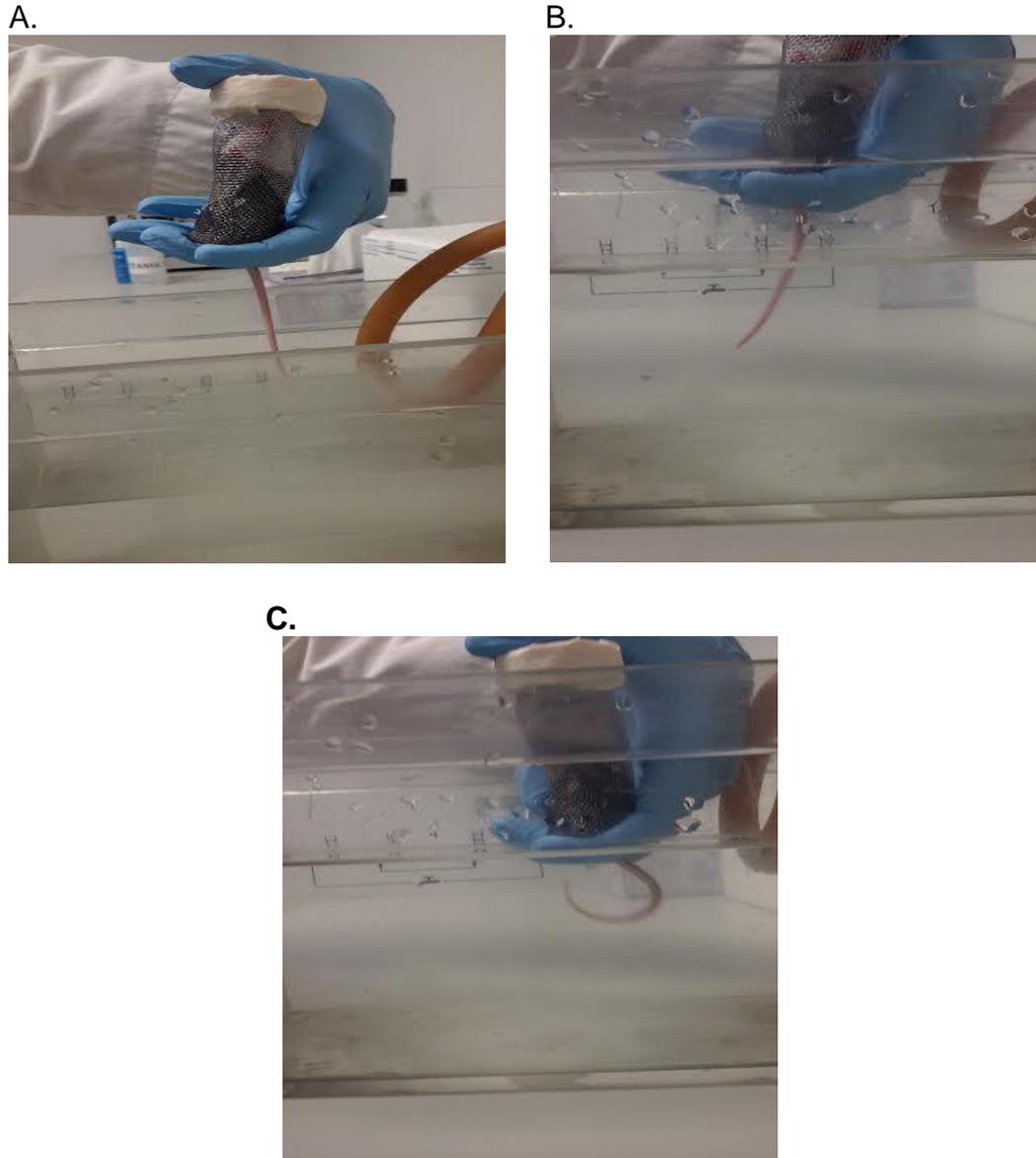


Figura 7. Muestra en la imagen A, la manera vertical en que sostuvo al ratón al momento de sumergirle la cola en el baño maría; imagen B: muestra, la inmersión de 2/3 partes de la cola y la imagen C, muestra la reacción ante el estímulo, representada por un coletazo o retracción de la cola caracterizada por un encorvamiento.

Preparación de tratamientos

Se prepararon tres dosis: 0.85 $\mu\text{g/g}$, 1.5 $\mu\text{g/g}$ y 3.0 $\mu\text{g/g}$, a partir de una solución madre hecha originalmente en una proporción 1:1 con agua desionizada

y la muestra liofilizada de seis α J2-conotoxinas (nombradas como: CCJ1, CCJ2, CCJ3, CCJ4, CCJ5, CCJ6) elaboradas por *GenicBio Limited* utilizando como templete las secuencias de aminoácidos reportadas por Biggs, *et al.*, 2010 para seis α J2-toxinas maduras provenientes de *Conus californicus*. Se implemento una solución amortiguadora de sales PBS 1X como vehículo excipiente.

Todas las alícuotas fueron hechas en tubos Eppendorf de 1.5 ml, forrados con papel aluminio y se mantuvieron en hielo durante el lapso entero del experimento con el fin de evitar cualquier tipo de degradación. Su almacenamiento posterior fue congelación a -20°C .

Implementación de pruebas de nocicepción: prueba de las contorsiones inducidas por ácido acético y coletazo por inmersión en agua caliente previamente estandarizados

Después de recibidos los ratones CD1, se dejaron acondicionar de 2 a 3 días antes de comenzar a experimentar con ellos. Durante este tiempo se les reguló la dieta con el fin de que estuvieran en peso para el experimento.

Se comenzó con la prueba de las contorsiones inducidas por ácido acético al 0.7%, (que fue la concentración que generó los resultados más consistentes en el momento de estandarizar el protocolo) en donde para cada grupo experimental se asignaron 3 ratones por cada dosis a utilizar (0.85 $\mu\text{g/g}$, 1.5 $\mu\text{g/g}$ y 3.0 $\mu\text{g/g}$) administradas en 200 μl cada una y 3 ratones para cada control (positivo y negativo). Se utilizó como control negativo una dosis de 0.1 ml de PBS 1X por cada 10 g de peso del animal y como control positivo, una dosis de 10 mg de morfina por cada Kg de peso del animal, esto último de acuerdo a lo reportado por Sora *et al.* (1999).

Previo a la implementación de la prueba de las contorsiones inducidas por ácido acético 0.7%, se habituó un solo ratón por caja durante 30 minutos; la caja fue acondicionada con dos espejos, para facilitar una visión global del animal durante el transcurso del experimento. Los ratones se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* para evitar estresarlos. Este acondicionamiento se realizó con el fin de que el ratón se acostumbrará a las nuevas condiciones ambientales del cuarto de experimentación (luz, sonidos, temperatura).

. Posterior a los 30 minutos de habituación se inyectó cada ratón vía intraperitoneal (IP), con el tratamiento y se dejó transcurrir 30 minutos antes de aplicar el estímulo nociceptivo correspondiente. Durante este tiempo, se observó y registró detalladamente el comportamiento del ratón para identificar cualquier malestar ocasionado por la manipulación del ratón al momento de administrarle el tratamiento o a causa del mismo tratamiento. Al pasar dicho tiempo, se le administró vía IP 0.1 ml de ácido acético al 0.7 % por 10g de peso del animal. Inmediatamente después se comenzó a registrar el número de contorsiones a intervalos de 5 minutos durante 60 minutos, siguiendo la escala de dolor reportada por Schmauss y Yaksh (1984) en Ness (1999).

Por otra parte, para la prueba del coletazo por inmersión en agua caliente, se siguió el mismo diseño experimental que el descrito para el protocolo de ácido acético donde se evaluó el efecto antinociceptivo de las conotoxinas CCJ1 a CCJ6 a dosis de: 0.85 µg/g, 1.5 µg/g y 3.0 µg/g, las cuales fueron establecidas considerando un peso de 22 ± 2 g y administradas en un volumen de 200 µl. Se utilizaron 3 ratones para cada dosis, junto con sus respectivos controles negativos y positivos.

Su acondicionamiento se inicio con dos días de anticipación, durante los cuales se manipuló cuidadosamente a cada ratón durante 5 min para que entrara a un sujetador de manera natural. El sujetador fue fabricado previamente a la medida a partir de una malla metálica de 1 mm de luz, la cual se engrapó

alrededor de una tapa proveniente de un tubo tipo Falcon de 50 ml, el cual era el diámetro adecuado para que los ratones pudieran entrar sin necesidad de forcejeo. En el caso de que el ratón fuera más pequeño, y que con ello pudiera darse vueltas dentro del sujetador, se introdujo papel secante para reducir el diámetro del sujetador. Al entrar el ratón al sujetador se recreaban las condiciones del experimento (para ello se sujetó de manera vertical sobre un baño maría a una temperatura de 49°C (que fue la temperatura que generó los resultados más consistentes en el momento de estandarizar el protocolo) por 30 segundos sin sumergirles la cola, para que el ratón se habituara y de esta manera se mitigó su nivel de estrés durante el experimento real.

Posterior a su acondicionamiento, se evaluó la respuesta basal de cada ratón, con el fin de crear grupos con tiempos semejantes, previamente a la administración de cada tratamiento. Posterior a ello, se inició la administración vía IP de cada tratamiento a su correspondiente dosis, y se dejaron transcurrir 30 minutos antes de la primera evaluación. Durante este tiempo se observó y registró el grado de actividad presentada por el ratón en base a lo reportado por Mogil (2007). La segunda medición se realizó después de transcurridos 60 minutos de la administración del tratamiento.

6. 2.- Análisis estadísticos

Se calcularon los siguientes parámetros estadísticos: media, desviación estándar, error estándar, índice de confianza (considerando una $\alpha = 0.05$ y un $n=3$) para los resultados obtenidos de cada prueba realizada utilizando el programa Microsoft Excel 2011. También se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido por una prueba Dunnet de comparaciones múltiples, para comparar el resultado obtenido para cada tratamiento con el control negativo (considerando una $*p<0.05$ como significativo para este último) utilizando el programa Graphpad Prism. Con la ayuda de este programa se elaboraron gráficas de barras representativas del error estándar asociado a la media de los datos obtenidos para

cada prueba. Se realizaron curvas de dosis-tiempo de respuesta (intervalos de 5 min) para la prueba del ácido acético utilizando Excel.

Por otra parte, para el protocolo de TIT, se calculó el porcentaje de inhibición de dolor (PIP por sus siglas en inglés), el cual es obtenido a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{PIP} = ((T1 - T0) / T0) \times 100.$$

Donde, T1 es el tiempo en que el ratón tarda en reaccionar (latencia) post-fármaco y T0 es la latencia pre-fármaco.

7.- Resultados

7.1 Actividad de las conotoxinas CCJ1- CCJ6 en la prueba de contorsiones inducidas por ácido acético 0.7%

El resultado del análisis ANOVA y Dunnet de comparaciones múltiples mostró que la conotoxina CCJ1 aplicada a una dosis de 0.85 $\mu\text{g/g}$ presentó una significancia estadística similar al del control positivo (morfina 0.1 ml/10g). Esto es representado en la Figura 8 por tres asteriscos (***) sobre una gráfica de histogramas representativos del error estándar asociado a la media de los datos.

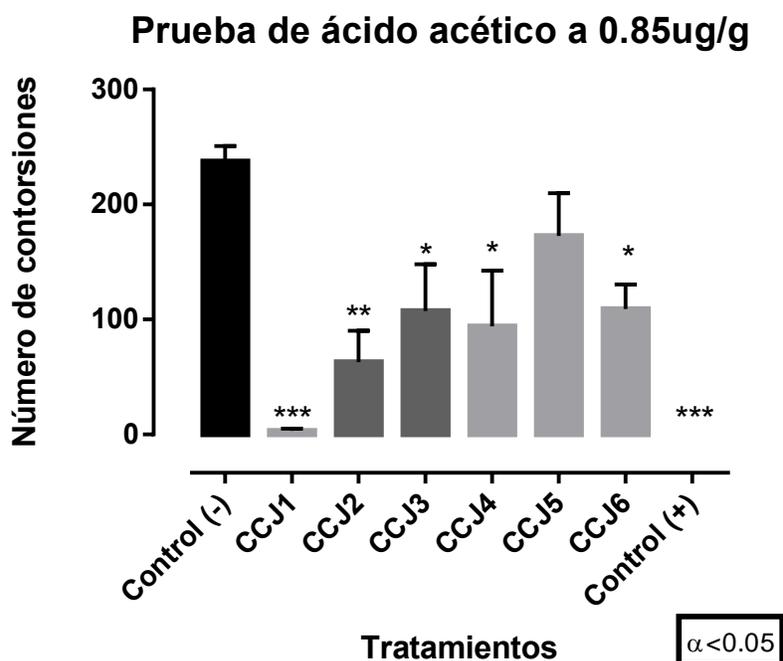


Figura 8. Efecto de los tratamientos con conotoxinas: CCJ1-CCJ6 administradas vía intraperitoneal (IP) a una dosis de 0.85 μg por g de peso animal y los controles negativo (PBS 1X administrado vía IP a una concentración de 0.1 ml por 10 g de peso animal) y positivo (10 mg de morfina por Kg de peso animal) en la prueba del ácido acético. Los datos representan el promedio del número de contorsiones \pm SEM de 3 animales al ser inyectados vía IP con 0.1 ml/10g de ácido acético glacial 0.7%. El nivel de significancia utilizado en un ANOVA de una vía seguida por una prueba Dunnet de comparaciones múltiples fue de $\alpha < 0.05$. Los asteriscos representan los siguientes valores de P: *P<0.05, **P<0.01, y ***P<0.001 en comparación al control negativo.

Por el contrario, las otras dos dosis (1.5 $\mu\text{g/g}$ y 3.0 $\mu\text{g/g}$) disminuyeron su nivel de significancia (ver Figuras 9 y 10 que representan el efecto de los diferentes tratamientos a dichas dosis).

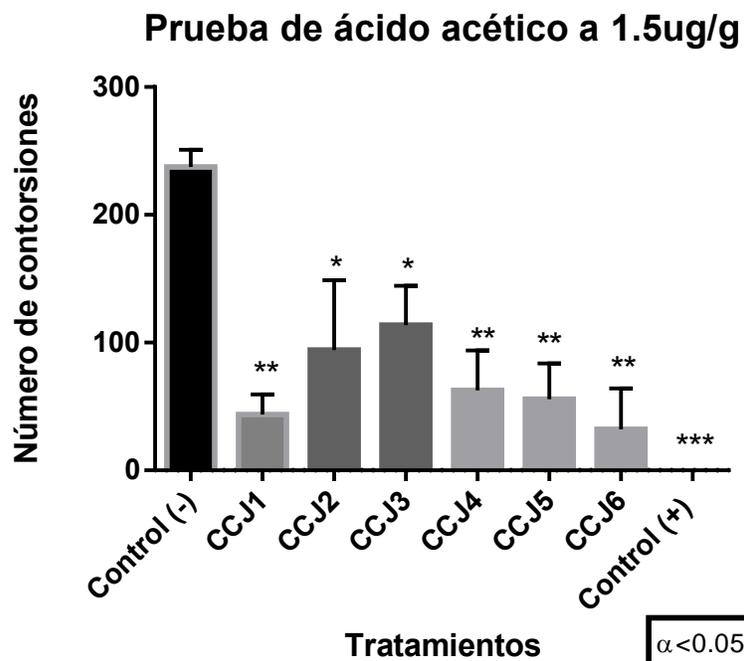


Figura 9. Efecto de los tratamientos con conotoxinas: CCJ1-CCJ6 administradas vía intraperitoneal (IP) a una dosis de 1.5 μg por g de peso animal y los controles negativo (PBS 1X administrado vía IP a una concentración de 0.1 ml por 10 g de peso animal) y positivo (10 mg de morfina por Kg de peso animal) en la prueba del ácido acético. Los datos representan el promedio del número de contorsiones \pm SEM de 3 animales al ser inyectados vía IP con 0.1 ml/10g de ácido acético glacial 0.7%. El nivel de significancia utilizado en un ANOVA de una vía seguida por una prueba Dunnet de comparaciones múltiples fue de $\alpha < 0.05$. Los asteriscos representan los siguientes valores de P: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, y *** $P < 0.001$ en comparación al control negativo.

En la Figura 9 se observa que para el tratamiento con **CCJ1** hay un nivel de significancia de ** $P < 0.01$ mientras que en la Figura 10 ya no se observa significancia entre esta conotoxina y el grupo control negativo.

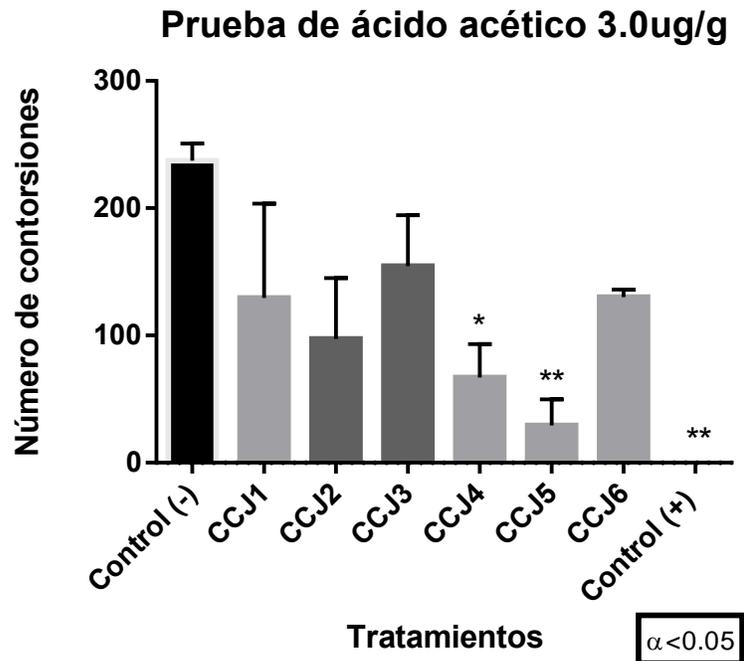


Figura 10. Efecto de los tratamientos con conotoxinas: CCJ1-CCJ6 administradas vía intraperitoneal (IP) a una dosis de 0.85 μg por g de peso animal y los controles negativo (PBS 1X administrado vía IP a una concentración de 0.1 ml por 10 g de peso animal) y positivo (10 mg de morfina por Kg de peso animal) en la prueba del ácido acético. Los datos representan el promedio del número de contorsiones \pm SEM de 3 animales al ser inyectados vía IP con 0.1 ml/10g de ácido acético glacial 0.7%. El nivel de significancia utilizado en un ANOVA de una vía seguida por una prueba Dunnet de comparaciones múltiples fue de $\alpha < 0.05$. Los asteriscos representan los siguientes valores de P: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, y *** $P < 0.001$ en comparación al control negativo.

A continuación se muestra el análisis estadístico obtenido para el promedio del número de contorsiones inducidas por la administración vía IP de 0.1 ml/10g de ácido acético después de haber suministrado **CCJ1** a dosis de 0.85 $\mu\text{g}/\text{g}$, 1.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ y 3.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ en 3 ratones cada una (Tabla VII).

Tabla VII. Análisis estadístico del número de contorsiones que resultaron de cada dosis administrada de CCJ1.

CCJ1	0.85 µg/g	1.5 µg/g	3.0 µg/g
Promedio del número de contorsiones/ ratón	3.33	43.7	130
desviación estándar	1.02	9.02	42.6
error estándar	0.59	5.21	24.6
índice de confiabilidad	1.15	10.2	48.2

Observamos que al aumentar la dosis de conotoxina, el promedio del número de contorsiones así como los demás parámetros estadísticos aumentan de manera proporcional a la dosis, esta tendencia se puede evidenciar en el inciso A de la Figura 11. Otra cosa interesante que observamos de esta figura está dada por el inciso B, el cual nos muestra una gráfica del promedio del número de contorsiones presentadas por cada dosis en función del tiempo. Observamos que cada dosis manifestó un efecto antinociceptivo representado por una disminución en el promedio del número de contorsiones a diferentes tiempos. **CCJ1** administrada a 0.85 µg/g por ejemplo, presentó menor número de contorsiones durante los primeros 30 minutos mientras que al ser administrada a dosis de 1.5 µg/g ó 3.0 µg/g presentó un mayor efecto posterior a los primeros 30 minutos.

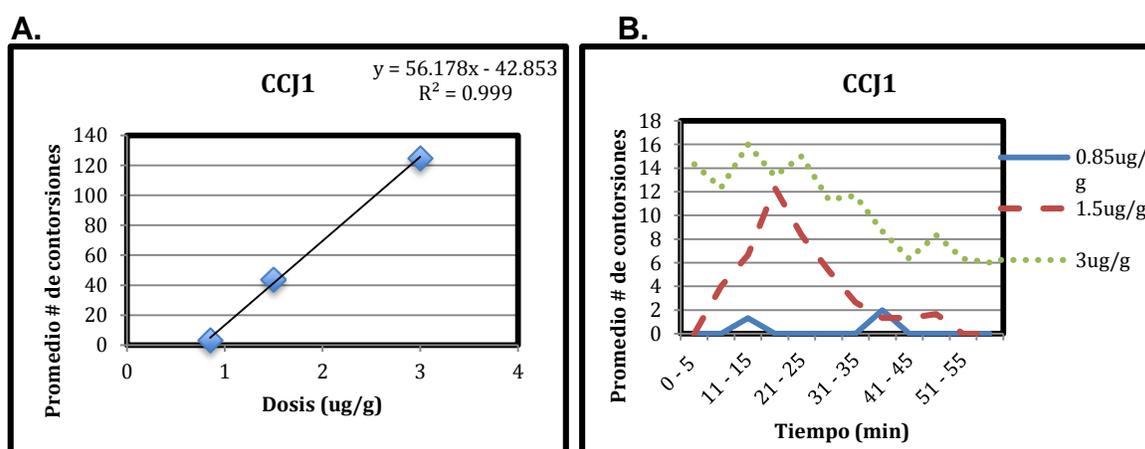


Figura 11. A) Curva de dosis-respuesta de las 3 dosis administradas (0.85 µg/g, 1.5 µg/g y 3.0 µg/g) para CCJ1 donde el número de contorsiones aumenta conforme la dosis incrementa. B) Promedio del número de contorsiones en función del tiempo para las diferentes dosis administradas de CCJ1.

Más adelante se presenta el análisis estadístico obtenido para el promedio del número de contorsiones inducidas por la administración vía IP de 0.1 ml/10g de ácido acético después de haber suministrado previamente **CCJ2** a dosis de 0.85 µg/g, 1.5 µg/g y 3.0 µg/g en 3 ratones cada una (n=3) (Tabla VIII).

Tabla VIII. Análisis estadístico del número de contorsiones que resultaron de cada dosis administrada de CCJ2.

CCJ2	0.85 µg/g	1.5 µg/g	3.0 µg/g
Promedio del número de contorsiones/ ratón	63.0	94.0	97.3
desviación estándar	15.7	31.7	27.6
error estándar	9.05	18.3	15.9
índice de confiabilidad	17.7	35.8	31.2

En esta tabla se puede observar que el promedio del número de contorsiones aumenta conforme se incrementa la dosis. Las dosis 1.5 µg/g y 3.0 µg/g presentaron promedios y parámetros estadísticos muy cercanos entre ellos, a diferencia de aquellos presentados por la dosis de 0.85 µg/g. Sin embargo fue esta última dosis la que presentó mayor significancia estadística entre las 3 dosis mencionadas (**P<0.01, ver Figura 8).

Esta tendencia de **CCJ2** se evidencia en el inciso A de la Figura 12 que muestra su comportamiento dosis-respuesta similar al presentado por CCJ1 pero con un coeficiente de correlación más pequeño que aquel obtenido para CCJ1. En el inciso B de la misma figura podemos observar que a las 3 dosis esta conotoxina fungió mejor su efecto después de los 30 minutos.

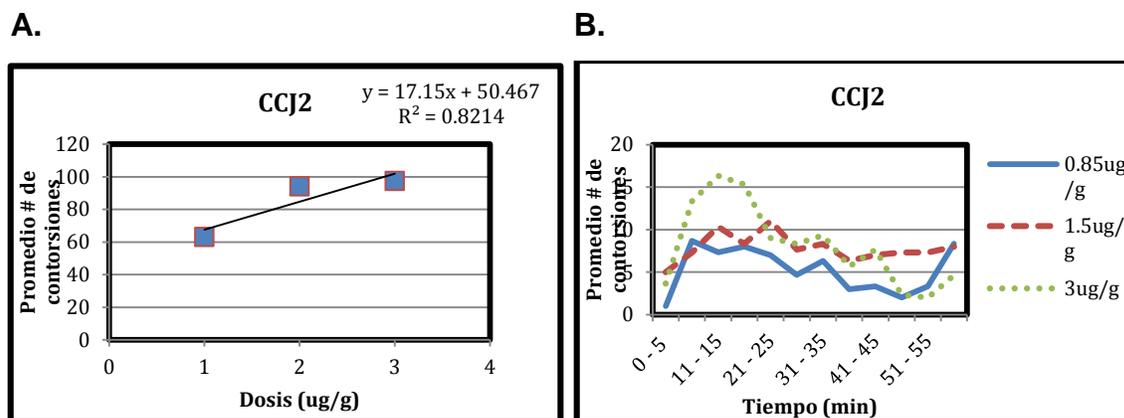


Figura 12. A) Curva de dosis-respuesta de las 3 dosis administradas (0.85 $\mu\text{g/g}$, 1.5 $\mu\text{g/g}$ y 3.0 $\mu\text{g/g}$) para CCJ2 donde el número de contorsiones aumenta conforme la dosis incrementa. B) Promedio del número de contorsiones en función del tiempo para las diferentes dosis administradas de CCJ2.

A continuación se presenta el análisis estadístico obtenido para el tratamiento con **CCJ3**, (Tabla IX), donde seguimos observando un aumento del número de contorsiones conforme se incrementa la dosis, como en las otras conotoxinas descritas previamente. Sin embargo a diferencia de aquellas conotoxinas, notamos que el promedio del número de contorsiones presentadas con este tratamiento es mucho mayor que los promedios presentados por CCJ1 y CCJ2 respectivamente. Esto es evidenciado en la Figuras 8 y 9 que muestran su comportamiento a una dosis de 0.85 $\mu\text{g/g}$ y 1.5 $\mu\text{g/g}$ respectivamente, donde notamos que **CCJ3** comienza presentando significancia estadística en comparación con el control negativo de $*P < 0.05$ en ambas, y a una dosis de 3.0 $\mu\text{g/g}$ no presenta diferencia significativa, representada por la Figura 10.

Tabla IX. Análisis estadístico del número de contorsiones que resultaron de cada dosis administrada de CCJ3.

CCJ3	0.85 $\mu\text{g/g}$	1.5 $\mu\text{g/g}$	3.0 $\mu\text{g/g}$
Promedio del número de contorsiones/ ratón	107.3	113.7	154.6
desviación estándar	23.44	17.67	23.05
error estándar	13.53	10.20	13.31
índice de confiabilidad	26.53	19.99	26.08

El aumento del promedio del número de contorsiones conforme aumenta la dosis observado en la Tabla IX, es evidenciado por la gráfica presentada en el inciso A de la Figura 13. Aún más, notamos del inciso B de la Figura 13 que tanto la dosis de 0.85 $\mu\text{g/g}$ y 1.5 $\mu\text{g/g}$ (aquellas que presentaron significancia estadística), fungieron mejor su efecto después de los primeros 30 minutos de observación.

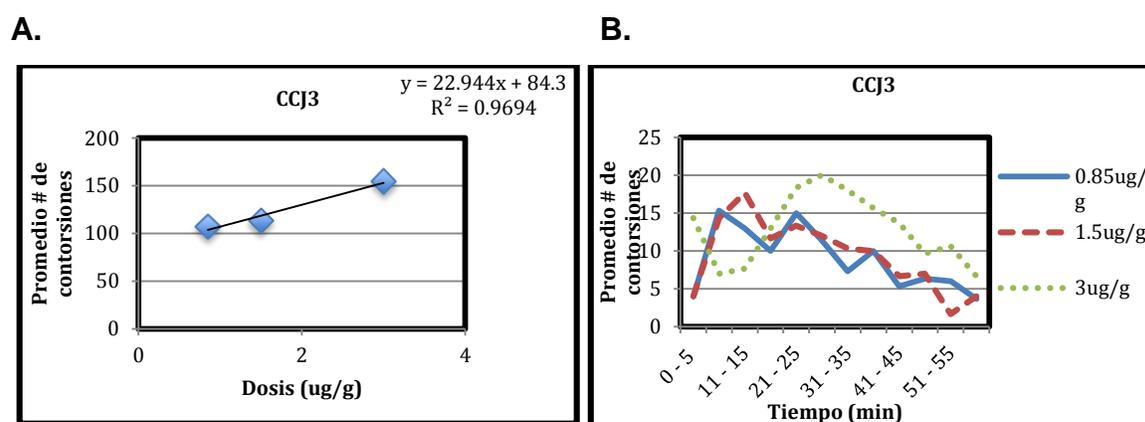


Figura 13. A) Curva de dosis-respuesta de las 3 dosis administradas (0.85 $\mu\text{g/g}$, 1.5 $\mu\text{g/g}$ y 3.0 $\mu\text{g/g}$) para CCJ3 donde el número de contorsiones aumenta conforme la dosis incrementa. B) Promedio del número de contorsiones en función del tiempo para las diferentes dosis administradas de CCJ3.

Por otra parte, al analizar el tratamiento con **CCJ4** notamos que la significancia estadística va en ascenso de una $*P < 0.05$ presentada a la dosis de 0.85 $\mu\text{g/g}$ a una $**P < 0.01$ mostrada a una dosis de 1.5 $\mu\text{g/g}$ (representados por las Figuras 8 y 9, respectivamente), mientras que al incrementar la dosis a 3.0 $\mu\text{g/g}$, observamos que la significancia estadística vuelve a descender a una $*P < 0.05$ (ver Figura 10).

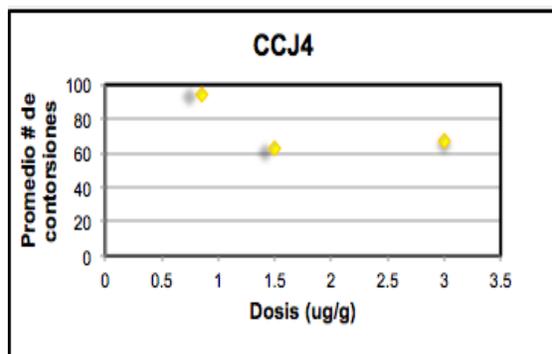
A continuación se muestra el análisis estadístico del número de contorsiones presentadas por **CCJ4**, donde notamos una tendencia a disminuir el promedio del número de contorsiones al aumentar la dosis.

Tabla X. Análisis estadístico del número de contorsiones que resultaron de cada dosis administrada de CCJ4.

CCJ4	0.85 $\mu\text{g/g}$	1.5 $\mu\text{g/g}$	3.0 $\mu\text{g/g}$
Promedio del número de contorsiones/ ratón	109	62.7	67.0
desviación estándar	12.3	18.0	15.2
error estándar	7.12	10.4	8.77
índice de confiabilidad	14.0	20.3	17.2

A partir de los promedios reportados por la Tabla X, notamos que este tratamiento tiende a disminuir el número de contorsiones conforme se aumenta la dosis. Lo anterior se puede observar aún más por el inciso A de la Figura 14. El inciso B nos denota que este tratamiento tuvo mayor efecto antinociceptivo después de los primeros 30 minutos en las tres dosis.

A.



B.

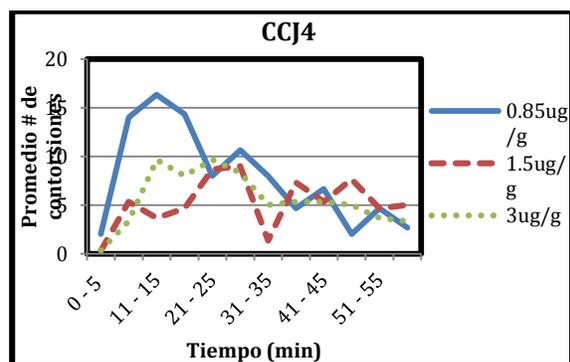


Figura 14. A) Curva de dosis-respuesta de las 3 dosis administradas (0.85 $\mu\text{g/g}$, 1.5 $\mu\text{g/g}$ y 3.0 $\mu\text{g/g}$) para CCJ4 donde el número de contorsiones disminuye conforme la dosis incrementa. B) Promedio del número de contorsiones en función del tiempo para las diferentes dosis administradas de CCJ4.

Más adelante se presenta el análisis estadístico obtenido para el promedio del número de contorsiones inducidas por la administración vía IP de 0.1 ml/10g

de ácido acético después de haber suministrado previamente **CCJ5** a dosis de 0.85 µg/g, 1.5 µg/g y 3.0 µg/g en 3 ratones cada una (n=3) (Tabla XI).

Tabla XI. Análisis estadístico del número de contorsiones que resultaron de cada dosis administrada de CCJ5.

CCJ5	0.85 µg/g	1.5 µg/g	3.0 µg/g
Promedio del número de contorsiones/ ratón	172	56.3	29.3
desviación estándar	21.4	15.7	11.9
error estándar	12.4	9.08	6.86
índice de confiabilidad	24.2	17.8	13.4

Observamos que al aumentar la dosis de conotoxina, el promedio del número de contorsiones así como los demás parámetros estadísticos disminuyen de manera proporcional, esto se puede observar claramente en el inciso A de la Figura 15. Por su parte el inciso B de la misma figura nos muestra que esta conotoxina comienza a presentar menos contorsiones después de transcurridos los primeros 30 minutos en cualquiera de las 3 dosis administradas. **CCJ5** es la única conotoxina que a una dosis de 3.0 µg/g presenta significancia estadística equiparable a aquella presentada por el control positivo.

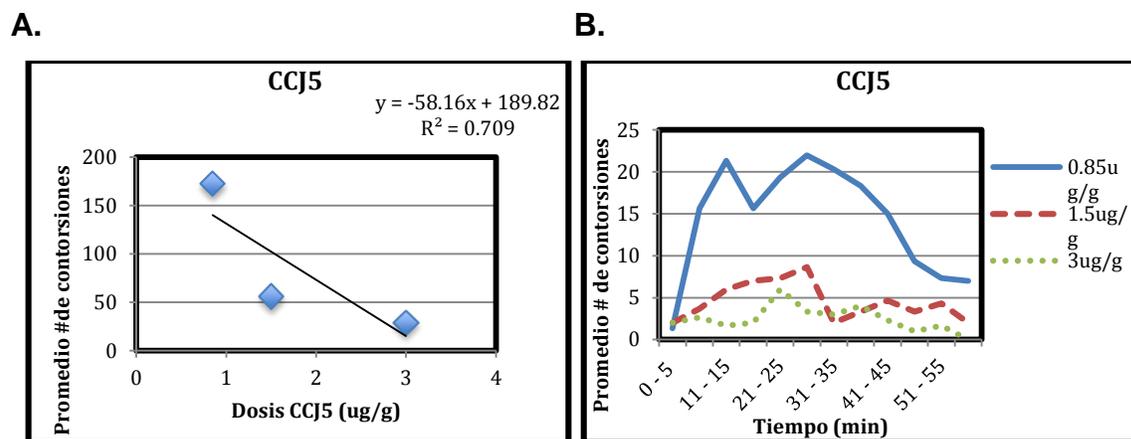


Figura 15. A) Curva de dosis-respuesta de las 3 dosis administradas (0.85 $\mu\text{g/g}$, 1.5 $\mu\text{g/g}$ y 3.0 $\mu\text{g/g}$) para CCJ5 donde el número de contorsiones disminuye conforme la dosis incrementa B) Promedio del número de contorsiones en función del tiempo para las diferentes dosis administradas de CCJ5.

Por su parte al observar la Tabla XII del análisis estadístico del promedio de número de contorsiones presentadas con el tratamiento de **CCJ6**, notamos que comienza presentando la misma tendencia que CCJ4 para las dos primeras dosis, iniciando con 109 contorsiones a 0.85 $\mu\text{g/g}$ y disminuyendo a 32 al incrementar la dosis a 1.5 $\mu\text{g/g}$. Sin embargo a diferencia de lo observado con CCJ4 al aumentar la dosis a 3.0 $\mu\text{g/g}$, el número de contorsiones sube a 130, perdiendo así cualquier nivel de significancia que pudo haber tenido en las dosis previas al ser comparadas con el control negativo.

Tabla XII. Muestra el análisis estadístico del número de contorsiones que resultaron de cada dosis administrada de CCJ6.

CCJ6	0.85 $\mu\text{g/g}$	1.5 $\mu\text{g/g}$	3.0 $\mu\text{g/g}$
Promedio del número de contorsiones/ ratón	109	32	130
desviación estándar	12.3	18.5	3.51
error estándar	7.12	10.7	2.03
índice de confiabilidad	14.0	20.9	3.97

Esta conducta inusual se puede apreciar en el inciso A de la Figura 16 que muestra el comportamiento dosis respuesta para CCJ6.

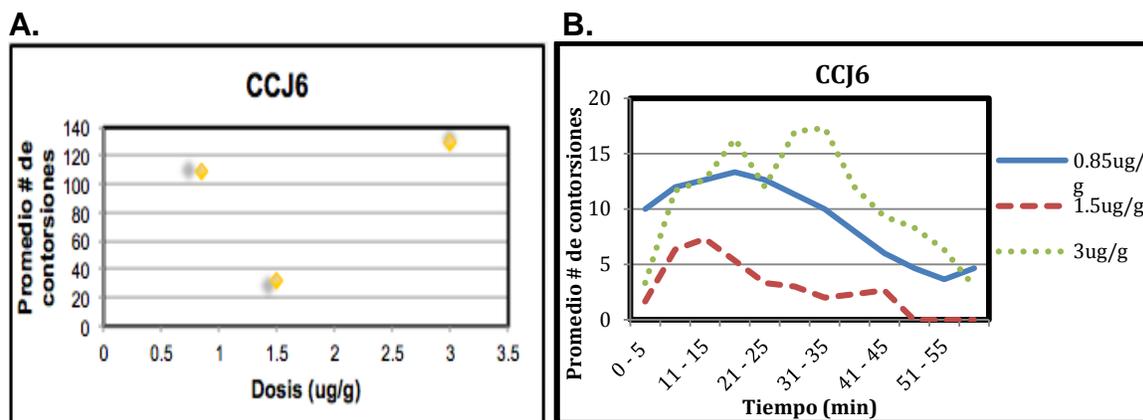


Figura 16. A) Curva de dosis-respuesta de las 3 dosis administradas (0.85 $\mu\text{g/g}$, 1.5 $\mu\text{g/g}$ y 3.0 $\mu\text{g/g}$) para CCJ6 donde se observa una distribución dispersa de los datos. B) Promedio del número de contorsiones en función del tiempo para las diferentes dosis administradas de CCJ6.

7. 2 Actividad de las conotoxinas en la prueba de TIT.

El tiempo en el que el ratón tardó en reaccionar con un coletazo (latencia) se analizó por medio de un ANOVA de una vía, seguido por una prueba Dunnet de comparaciones múltiples, y las gráficas obtenidas a partir de estos análisis son mostradas a continuación.

Del inciso A, de la Figura 17, notamos que para una dosis de 0.85 $\mu\text{g/g}$ el único tratamiento que mostró significancia estadística (* $P < 0.05$) fue el de CCJ1 a los 30 minutos post-inyección, mientras que a esta misma dosis ningún tratamiento mostró significancia estadística a los 60 minutos (observar inciso B de la Figura 17).

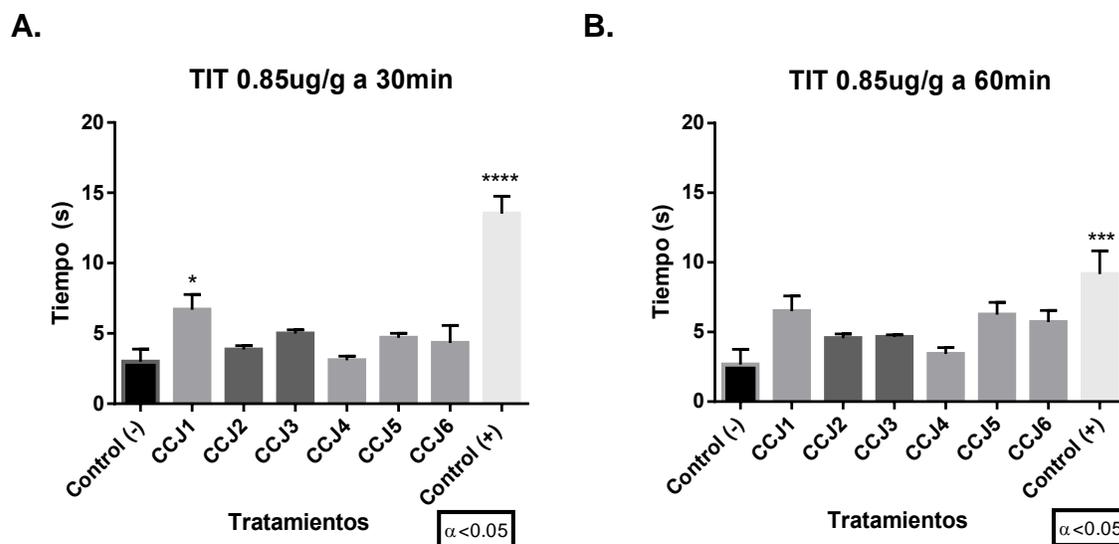


Figura 17. Histogramas del error estándar asociada a la media de las latencias resultantes de la prueba TIT de los tratamientos evaluados a 0.85 $\mu\text{g/g}$, a 30 min (inciso A) y 60 min (inciso B). El nivel de significancia utilizado en un ANOVA de una vía seguida por una prueba Dunnet de comparaciones múltiples fue de $\alpha < 0.05$. Los asteriscos representan los siguientes valores de P: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, y *** $P < 0.001$ en comparación al control negativo.

Por otra parte, al incrementar la dosis a 1.5 $\mu\text{g/g}$, se observa que el tratamiento de CCJ1 presenta un efecto significativo a los 60 minutos, mientras que CCJ5 fue más consistente con su efecto antinociceptivo, pues comienza a mostrar significancia estadística de manera más acentuada a los 30 minutos con una ** $P < 0.01$ que se prolonga hasta los 60 minutos con una * $P < 0.05$.

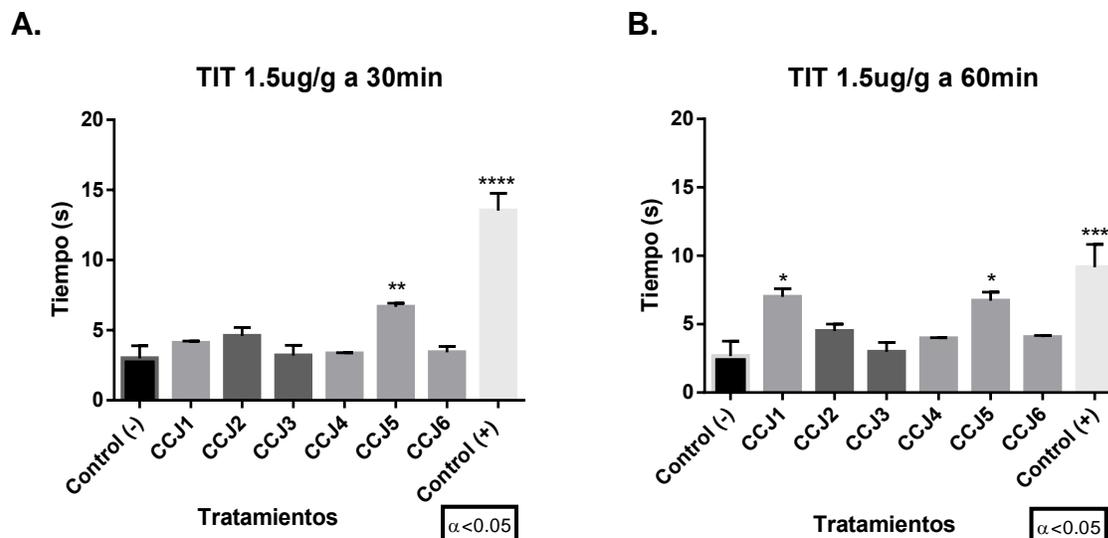


Figura 18. Histogramas del error estándar asociada a la media de las latencias resultantes de la prueba TIT de los tratamientos evaluados a 1.5 $\mu\text{g/g}$, a 30 min (inciso A) y 60min (inciso B). El nivel de significancia utilizado en un ANOVA de una vía seguida por una prueba Dunnet de comparaciones múltiples fue de $\alpha < 0.05$. Los asteriscos representan los siguientes valores de P: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, y *** $P < 0.001$ en comparación al control negativo.

En contraste, observamos que a una dosis de 3.0 $\mu\text{g/g}$, CCJ1 sigue presentando significancia estadística de * $p < 0.05$ sólo hasta los 60 min post inyección (tal como se observó para la dosis de 1.5 $\mu\text{g/g}$), mientras que CCJ5 ahora solo se ve reflejada de manera significativa hasta los 60 min, (contrario a lo que se observó a una dosis de 1.5 $\mu\text{g/g}$).

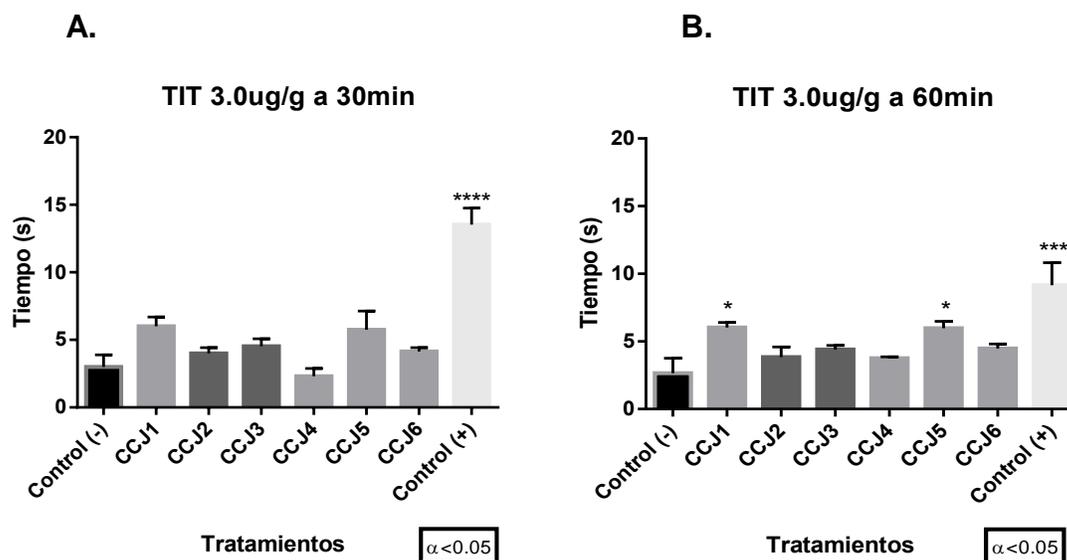


Figura 19. Histogramas del error estándar asociada a la media de las latencias resultantes de la prueba TIT de los tratamientos evaluados a 3.0 $\mu\text{g/g}$, a 30 min (inciso A) y 60min (inciso B). El nivel de significancia utilizado en un ANOVA de una vía seguida por una prueba Dunnet de comparaciones múltiples fue de $\alpha < 0.05$. Los asteriscos representan los siguientes valores de P: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, y *** $P < 0.001$ en comparación al control negativo.

De manera complementaria a las gráficas mostradas previamente, a continuación se muestran los análisis estadísticos calculados a partir de los resultados obtenidos de cada tratamiento administrado a dosis de: 0.85 $\mu\text{g/g}$, 1.5 $\mu\text{g/g}$ y 3.0 $\mu\text{g/g}$.

En la Tabla XIII que se muestra a continuación, se observan los resultados obtenidos para 0.85 $\mu\text{g/g}$. En esta tabla resaltan dos cosas importantes, la primera es que el promedio de las latencias obtenidas por los controles negativo y positivo cambia de los 30 min a los 60 min y la segunda es que CCJ1 es el tratamiento con conotoxina que presentó la mayor latencia en ambos tiempos de medición.

Tablas XIII. Muestra el análisis estadístico de las latencias en segundos obtenidos a partir de la administración de 0.85 $\mu\text{g/g}$ de cada tratamiento con conotoxina en la prueba de TIT a los 30 minutos (inciso A) y a los 60 minutos (inciso B).

A.

30min	CCJ1	CCJ2	CCJ3	CCJ4	CCJ5	CCJ6	control (-)	control (+)
Media	6.68	3.86	4.99	3.10	4.70	4.32	2.99	13.52
Desviación estándar	0.63	0.16	0.16	0.17	0.18	0.73	0.52	0.71
Error estándar	0.36	0.09	0.09	0.10	0.10	0.42	0.30	0.41
Índice de confianza	0.71	0.18	0.18	0.20	0.20	0.82	0.59	0.81

B.

60min	CCJ1	CCJ2	CCJ3	CCJ4	CCJ5	CCJ6	control (-)	control (+)
Media	6.49	4.56	4.64	3.42	6.24	5.70	2.65	9.16
Desviación estándar	0.63	0.18	0.09	0.27	0.51	0.49	0.63	0.96
Error estándar	0.36	0.10	0.05	0.15	0.29	0.28	0.37	0.55
Índice de confianza	0.71	0.20	0.10	0.30	0.58	0.55	0.72	1.09

Por otra parte, en el análisis estadístico obtenido para la dosis de 1.5 $\mu\text{g/g}$ que se muestra a continuación por la Tabla XIV, observamos que a los 30 min, CCJ5 fue el tratamiento con conotoxina que presentó el mayor efecto antinociceptivo, con una latencia de 6.66 s; esta latencia se mantuvo constante a lo largo de las dos mediciones (60 min = 6.70s). Otra cosa que resalta de los resultados obtenidos a partir de esta dosis, es el comportamiento de CCJ1, este tratamiento empezó con una latencia menor a los 30 min y aumentó considerablemente para los 60 min.

Tablas XIV. Muestra el análisis estadístico de las latencias en segundos obtenidos a partir de la administración de 1.5 $\mu\text{g/g}$ de cada tratamiento con conotoxina en la prueba de TIT a los 30 minutos (inciso A) y a los 60 minutos (inciso B).

A.

30min	CCJ1	CCJ2	CCJ3	CCJ4	CCJ5	CCJ6	control (-)	control (+)
Media	4.09	4.60	3.20	3.35	6.66	3.42	2.99	13.5
Desviación estándar	0.07	0.34	0.42	0.02	0.15	0.24	0.52	0.71
Error estándar	0.04	0.20	0.24	0.01	0.09	0.14	0.30	0.41
Índice de confianza	0.08	0.39	0.48	0.02	0.17	0.27	0.59	0.81

B.

60min	CCJ1	CCJ2	CCJ3	CCJ4	CCJ5	CCJ6	control (-)	control (+)
Media	6.99	4.49	2.98	3.96	6.70	4.04	2.65	9.16
Desviación estándar	0.35	0.30	0.39	0.03	0.37	0.08	0.63	0.96
Error estándar	0.20	0.17	0.22	0.02	0.21	0.05	0.37	0.55
Índice de confianza	0.40	0.34	0.44	0.04	0.42	0.09	0.72	1.09

En contraste observamos que a una dosis de 3.0 $\mu\text{g/g}$ (Tabla XV), CCJ1 obtuvo una latencia mayor a los 30 minutos (6.01 s), que la que obtuvo al ser administrada a 1.5 $\mu\text{g/g}$ (4.09 s). Aún más, vemos que su latencia se mantuvo constante a lo largo de la segunda medición (60 min = 6.02 s). Por el contrario CCJ5, que había estado incrementando su latencia de manera dosis dependiente, disminuyó su latencia al ser administrada a 3.0 $\mu\text{g/g}$ en ambos tiempos de medición por 0.92 y 0.96 milisegundos respectivamente.

Tablas XV. Muestra el análisis estadístico de las latencias en segundos obtenidos a partir de la administración de 3.0 $\mu\text{g/g}$ de cada tratamiento con conotoxina en la prueba de TIT a los 30 minutos (inciso A) y a los 60 minutos (inciso B).

A.

30min	CCJ1	CCJ2	CCJ3	CCJ4	CCJ5	CCJ6	control (-)	control (+)
Media	6.01	3.98	4.53	2.32	5.74	4.14	2.99	13.5
Desviación estándar	0.40	0.25	0.32	0.32	0.81	0.16	0.52	0.71
Error estándar	0.23	0.15	0.18	0.18	0.46	0.09	0.30	0.41
Índice de confianza	0.45	0.29	0.36	0.36	0.91	0.18	0.59	0.81

B.

60min	CCJ1	CCJ2	CCJ3	CCJ4	CCJ5	CCJ6	control (-)	control (+)
Media	6.02	3.85	4.41	3.76	5.97	4.48	2.65	9.16
Desviación estándar	0.22	0.43	0.17	0.06	0.30	0.19	0.63	0.96
Error estándar	0.13	0.25	0.10	0.03	0.17	0.11	0.37	0.55
Índice de confianza	0.25	0.49	0.19	0.07	0.34	0.21	0.72	1.09

La Tabla XVI muestra los valores obtenidos del cálculo del porcentaje de inhibición de dolor (PIP por sus siglas en inglés), de los controles negativo y positivo y de cada conotoxina evaluada, a los 30 y 60 minutos. De entre todas las conotoxinas CCJ1, (inciso A) fue la que obtuvo los PIPs más consistentes con los resultados reportados por el análisis estadístico y ANOVA mostrados en las gráficas y tablas anteriores.

Tabla XVI. Muestra de los incisos A-F tablas del porcentaje de inhibición de dolor (PIP por sus siglas en inglés) para las conotoxinas CCJ1-CCJ6 a los 30 min y 60 min respectivamente.

A.			B.		
CCJ1	PIP (30 min)	PIP (60 min)	CCJ2	PIP (30 min)	PIP (60 min)
Control (-)	41.2	25.6	Control (-)	41.2	25.6
Control (+)	392	233	Control (+)	392	233
0.85ug/g	73.9	69.0	0.85ug/g	12.5	33.0
1.5ug/g	23.2	110	1.5ug/g	-1.80	-4.10
3.0ug/g	64.1	64.3	3.0ug/g	-1.80	-5.20
C.			D.		
CCJ3	PIP (30 min)	PIP (60 min)	CCJ4	PIP (30 min)	PIP (60 min)
Control (-)	41.2	25.6	Control (-)	41.2	25.6
Control (+)	392	233	Control (+)	392	233
0.85ug/g	9.27	1.53	0.85ug/g	14.7	26.70
1.5ug/g	-2.64	-9.33	1.5ug/g	16.30	37.40
3.0ug/g	-4.70	-7.22	3.0ug/g	-8.70	48.20
E.			F.		
CCJ5	PIP (30 min)	PIP (60 min)	CCJ6	PIP (30 min)	PIP (60 min)
Control (-)	41.2	25.6	Control (-)	41.2	25.6
Control (+)	392	233	Control (+)	392	233
0.85ug/g	29.7	72.28	0.85ug/g	-21.8	3.20
1.5ug/g	-28.70	-28.23	1.5ug/g	-31.2	-18.7
3.0ug/g	0.64	4.80	3.0ug/g	-2.13	5.83

8.- Discusión

Los protocolos de ácido acético y TIT, son métodos de naturaleza química y térmica, respectivamente, que sirven para evaluar analgésicos que actúan sobre el sistema nervioso central y periférico. La prueba del ácido acético administrada de manera intraperitoneal es útil para evaluar analgesia, tanto central como periférica (Shanmugasundaram y Venkararaman, 2005). Esto es porque la zona parietal-peritoneo presenta una innervación somática que al someterla a un estímulo nociceptivo químico, activa nociceptores en la periferia, pero también produce un dolor visceral comparable al de la peritonitis, el cual involucra al sistema nervioso visceral que tiene neuronas que pasan por el sistema nervioso central (Le Bars *et al.*, 2001). Por su parte, el protocolo de TIT, también es sensible a analgésicos que actúan sobre el sistema nervioso central. Como ya se mencionó en la introducción, las $\alpha 2$ -conotoxinas tienen como blanco farmacológico a los receptores nicotínicos de acetilcolina; esto es relevante porque la acetilcolina está presente en el sistema nervioso visceral como neurotransmisor pregangliónico para el sistema simpático y parasimpático, así como neurotransmisor postgangliónico en neuronas parasimpáticas (Chudler, 2014), de tal manera que ambos métodos de nocicepción proporcionan un buen indicio del potencial que tienen estas conotoxinas para inhibir receptores nicotínicos de acetilcolina.

Al analizar los resultados obtenidos para ambas pruebas notamos que los tratamientos con CCJ1 y CCJ5 fueron los únicos que rindieron resultados constantes entre protocolos, es decir el efecto antinociceptivo que tuvieron en un protocolo puede corroborarse en el otro; tanto en el nivel de significancia presentada por cada una de sus dosis administrada, así como en el tiempo en el que se observó mayor efecto antinociceptivo en el transcurso de su evaluación.

Para el caso de CCJ1 en la prueba del ácido acético notamos que el efecto antinociceptivo presentado es menor al aumentar la dosis. Esto se evidencia por un aumento en el número de contorsiones presentadas por el ratón. Según Cervantes-Luévano (2013), esta conotoxina tiene propiedades pro-inflamatorias,

las cuales en base a la gráfica dosis-respuesta que es representada por el inciso A de la Figura 11, parecen manifestarse conforme se incrementa la dosis. Sin embargo, al observar el comportamiento de CCJ1 a 0.85 $\mu\text{g/g}$ en función del tiempo mostrado por el inciso B de la Figura 11, es evidente que a dosis menores, CCJ1 tiene potencial analgésico, pues a lo largo de 60 minutos de observación mostró un promedio de 3.33 contorsiones, (ver Tabla VI). Este promedio fue el menor obtenido a partir de un tratamiento con conotoxina a cualquiera de las dosis evaluadas en la prueba del ácido acético.

Aún más, el efecto antinociceptivo de CCJ1 a 0.85 $\mu\text{g/g}$ continúa mostrándose en el protocolo de TIT, pues similar a lo observado en la prueba del ácido acético, este tratamiento fue el único que presentó significancia estadística ($P < 0.05$) en comparación al control negativo (ver Figura 17). Esta significancia estadística sólo se observó a los 30 minutos pos-inyección de CCJ1 a 0.85 $\mu\text{g/g}$. Sin embargo, cabe resaltar que en la Tabla XVII, se observa que la diferencia entre las latencias obtenidas a los 30 min y a los 60 min fue de milisegundos (6.68 s a los 30 min vs 6.49 s a los 60 min). Considerando lo anterior, se puede decir que aunque la prueba estadística no encontró una diferencia estadística significativa entre la latencia obtenida a los 60 min y el control negativo, el efecto antinociceptivo continua prolongándose hasta los 60 min, tal y como se observó en la prueba del ácido acético, donde el efecto analgésico se sostuvo durante los 60 minutos de observación (Inciso B, Figura 11).

En contraste, observamos que CCJ1 evaluada a 1.5 $\mu\text{g/g}$ y 3.0 $\mu\text{g/g}$ parece disminuir el efecto nociceptivo después de los 30 min de observación (60 min pos-inyección) en la prueba del ácido acético (Inciso B, Figura 11). Lo mismo se observa en la prueba de TIT, donde mostró significancia estadística a los 60 min respecto al control negativo. El hecho de que se hayan observado los mismos resultados en ambas pruebas resulta útil para poder corroborar un efecto antinociceptivo para dichos tratamientos a ese tiempo. Sin embargo cabe mencionar que según Michael-Titus y Costentin (1988) en Le Bars *et al.*, (2001), el

número de contorsiones tiende a disminuir espontáneamente después de que el efecto nociceptivo llega a su máxima expresión (alrededor de los 30 minutos según Collier *et al.*, (1968)). Por lo anterior es difícil establecer si la disminución del efecto nociceptivo observado a los 60 minutos para CCJ1 a 1.5 $\mu\text{g/g}$ y 3.0 $\mu\text{g/g}$ es propiamente debido a los inicios de un efecto antinociceptivo producido por los tratamientos o una consecuencia propiciada por una disminución espontánea del estímulo nociceptivo. Para aclarar esta incertidumbre se podría volver a administrar CCJ1 a dosis de 1.5 $\mu\text{g/g}$ y 3.0 $\mu\text{g/g}$, cambiando el tiempo de 30 min pre-inyección de ácido acético a 60 min posterior a la inyección del tratamiento, de tal manera que si verdaderamente dichos tratamientos comienzan a proporcionar un efecto antinociceptivo hasta los 60 min, se debería de observar una disminución del número de contorsiones en los primeros 30 minutos de observación, (tiempo en que el estímulo nociceptivo producido por el ácido acético es más fuerte).

Por otra parte, para el caso de CCJ5, Cervantes-Luévano (2013) reportó que esta conotoxina había tenido un efecto anti-inflamatorio. Dicho efecto se puede observar en la prueba del ácido acético por una disminución en el número de contorsiones conforme aumenta la dosis (inciso A, Figura 15). En la Tabla XI, que muestra el análisis estadístico de CCJ5, se reporta que el promedio de número de contorsiones al ser administrada a una dosis de 0.85 $\mu\text{g/g}$ fue de 172 contorsiones y disminuyó progresivamente hasta 29.3 contorsiones al subir la concentración a 3.0 $\mu\text{g/g}$. El mismo comportamiento dosis-dependiente se observó en el protocolo de TIT, donde CCJ5 fue aumentando la latencia de manera significativa a medida que se aumentaba la dosis.

De manera adicional al análisis estadístico de los resultados obtenidos de la prueba de TIT, se calculó el porcentaje de inhibición de dolor (PIP) para cada tratamiento. En la Tabla XVI que muestra los PIP's obtenidos para cada tratamiento, notamos que la mayoría de las conotoxinas, (a excepción de CCJ1) obtuvieron resultados distintos a los sugeridos por los análisis estadísticos

realizados para esta prueba. Estas diferencias son a causa de las variaciones presentadas entre los tiempos basales obtenidos para cada ratón evaluado. En la metodología se había planteado utilizar una temperatura que estuviera dentro del rango admisible reportado por Mogil (2007), para no ocasionar daño tisular así como la obtención de tiempos basales entre 3 a 5 s, según lo reportado por Shanmugasundaram y Venkararaman (2005). La temperatura que proporcionó las latencias más consistentes fue la de 49 °C, razón por la cual se estandarizó el protocolo de TIT con ella. Sin embargo hubo ratones que durante el experimento presentaron tiempos basales fuera de este rango de tiempo, y que aún así se tuvieron que utilizar por fines prácticos (aunque se trataron de agrupar y utilizar con una sola dosis de conotoxina con el fin de disminuir la varianza entre ratones de un mismo grupo). Este fue el caso para el tratamiento con CCJ5 administrado a una dosis de 1.5 µg/g, donde los tres ratones utilizados para la evaluación de esta dosis, presentaron los tiempos basales más altos (10, 9 y 8 s). Es por esto que a diferencia de lo observado en el análisis ANOVA (mostrado por la Figura 18), se observan valores negativos de PIP en el inciso E de la Tabla XV, que muestra los resultados a esta dosis. La misma situación explica el resultado de PIP obtenido para CCJ5 a dosis de 3.0 µg/g, donde los ratones presentaron tiempos basales de 6 s en promedio y por ende no se observa una correlación entre el análisis estadístico ANOVA (Figura 19) y PIP. Por el contrario, CCJ5 a 0.85 µg/g fue administrada a ratones con tiempos basales entre 3 a 5 s y vemos como ahora sí se correlacionan los resultados del ANOVA (Figura 17) y PIP. Por lo que la evidencia apunta a que la razón de la disyunción entre los resultados del análisis estadístico y aquellos obtenidos a partir del cálculo de PIP, se debe a una falta de constancia entre los tiempos basales utilizados. De tal manera, que para mitigar varianzas como las observadas para este caso, sólo se debe utilizar organismos que cumplan con el rango del tiempo basal predeterminado.

Finalmente, cabe resaltar que los demás tratamientos con conotoxinas presentaron algún nivel significativo en al menos una de las 3 dosis evaluadas en la prueba del ácido acético, pero al no ver el mismo resultado en la prueba de TIT,

(como fue el caso de CCJ1 y CCJ5) surge una cuestión que se ha discutido previamente para el protocolo de ácido acético en varios artículos, y es que otra de sus desventajas más importantes radica en que es una prueba inespecífica, lo que quiere decir que también funciona con otras sustancias que no necesariamente tienen propiedades analgésicas. Algunos ejemplos reportados en Le Bars *et al.* (2001) de sustancias con efectos positivos sobre este estímulo químico son los siguientes: bloqueadores adrenérgicos, antihistamínicos, relajadores de músculo, inhibidores de monoamina oxidasa y neurolépticos. Es por esta razón, que un resultado positivo en esta prueba no necesariamente significa que hay una actividad analgésica.

Debido a lo anterior, resultó útil implementar otro protocolo con un estímulo de naturaleza distinta (pero que presentara las mismas vías de señalización para confirmar su efecto), como fue el caso del uso del protocolo de TIT. Este último protocolo resaltó entre otros porque tiene la ventaja de que la respuesta nociceptiva es menos ambigua, a diferencia de otros métodos que son popularmente utilizados para este tipo de ensayos como el *Hot Plate*. Esto se debe a que como se estimula una región puntual en la cola, se observa una reacción clara la cual consiste en un coleteo o en la remoción completa de la cola de la fuente de estímulo. Por otra parte, en el caso del Hot Plate, (un protocolo que consiste en el estímulo térmico de las cuatro patas del ratón en una placa caliente a temperatura regulada), se abarcan más regiones con nociceptores, lo cual incita diferentes reacciones en el ratón, que a su vez cada una tiene diferentes connotaciones, haciendo confusa la respuesta nociceptiva.

Considerando lo anterior es evidente por qué se hicieron esfuerzos previos a la administración de los tratamientos para estandarizar ambos protocolos. Para el caso de TIT, su estandarización previa fue decisiva para determinar la temperatura óptima a usar, con el fin de evitar problemas de hiperalgesia o cualquier otro tipo de tolerancia generada al momento de provocar daño tisular. Otros factores que se tomaron en cuenta al momento de implementar este último

protocolo fue lo reportado por Mogil (2007), el cual encontró que después de que el ratón CD1 ha superado la fase exploratoria, pasa aproximadamente 25% de su tiempo aseándose, 25% de su tiempo descansando o en un sueño ligero, 25% en sueño profundo y menos del 15% en estado alerta. En este estudio se observa que se obtiene una respuesta distinta dependiendo del estado de actividad en que se encuentre el ratón, siendo el estado de aseo la más propensa a presentar un efecto analgésico en función del grado de atención por parte del ratón. Aún más, Mogil (2007) encontró que el ratón era mucho más sensible al estímulo térmico cuando se encontraba alerta. Por lo anterior se decidió trabajar con los ratones entre las 8 de la mañana a 4 de la tarde; un horario en el que los ratones se encontraban considerablemente activos e inclusive se les llegó a mantener separados durante el experimento con el fin de tenerlos incomunicados, y que ello no representara un factor de varianza en los resultados (algo que también es sugerido por Mogil (2007)).

Cada una de estas consideraciones en conjunto dieron como resultado datos reproducibles en ambos protocolos. Esto nos permitió identificar actividad antinociceptiva en las conotoxinas CCJ1 a las tres dosis administradas, pero con mayor efecto a la de 0.85 $\mu\text{g/g}$, y CCJ5, a una dosis de 3.0 $\mu\text{g/g}$.

9.- Conclusión

- Utilizando la escala de dolor reportada por Schmauss y Yaksh (1984) en Ness (1999) se encontró que la concentración óptima para generar los resultados más claros y consistentes en la prueba de contorsiones inducidas al administrar ácido acético a ratones CD1 machos de peso controlado (35 ± 5 g) es de 0.7%.
- La temperatura que rindió los resultados más consistentes en la estandarización de la prueba del coletazo por inmersión en agua caliente utilizando ratones CD1 machos de peso controlado (22 ± 2 g) fue de 49°C.
- Mediante la prueba de contorsiones inducidas por el ácido acético y la prueba del coletazo por inmersión en agua caliente previamente estandarizadas, se encontró que CCJ1 y CCJ5, a dosis de 0.85 μ g/g y 3.0 μ g/g respectivamente, presentan efecto antinociceptivo equiparable al de la morfina. Lo anterior demuestra que estas dos α 2-conotoxinas pueden reducir el dolor visceral causado por un irritante como el ácido acético a una concentración de 0.7% y dan resistencia al dolor para tolerar el estímulo térmico de 49°C similar a lo que puede soportar un ratón bajo los efectos de la morfina.

10.- Perspectivas

Realizar más pruebas nociceptivas con las conotoxinas CCJ1 y CCJ5 utilizando estímulos de la misma naturaleza y vía de administración que los que fueron empleados en este trabajo con el fin de corroborar el efecto observado. Estas pruebas podrían ser las siguientes para el caso de un estímulo químico: la prueba con capsaicina y formol, mientras que para un estímulo de naturaleza térmica están: la prueba del coletazo con laser, o por inmersión en baño maría a temperatura fría utilizando ratas. En Elhabazi *et al.*, (2014), se menciona que la implementación de la prueba del coletazo por inmersión con ratas es más sencillo que con ratones debido a que el organismo es más grande y por ende más fácil de manipular. Por otro lado las alternativas mencionadas de implementar la prueba del coletazo podrían proporcionar tiempos basales más consistentes que los obtenidos en este trabajo con el uso de temperaturas calientes. También resultará adecuado aumentar el tamaño de muestra poblacional para validar los análisis estadísticos y tener un resultado más robusto.

Hacer estudios de electrofisiología para identificar el marco estructural de las conotoxinas CCJ1 y CCJ5 para saber específicamente si atacan receptores nicotínicos de acetilcolina del tipo neuromuscular o neuronal. Una vez identificado el tipo de receptor se pueden dirigir estudios con estas conotoxinas en otras áreas de la neurología, además del estudio del dolor, ej., enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson.

Hacer estudios de toxicidad y farmacocinética de las conotoxinas CCJ1 y CCJ5.

11.- Anexos

Preparación de ácido acético 0.7% (irritante utilizado como estímulo nociceptivo en la prueba del ácido acético)

Se añadieron 105 µl de ácido acético glacial a un tubo tipo Falcon de 15 ml, aforar hasta 15 ml con PBS 1X.

Preparación de PBS 1X (Sustancia utilizada como control negativo en la prueba de ácido acético y TIT)

Cantidad	Sustancia
8.0 g	NaCl
0.2 g	KCl
1.7 g	Na ₂ HPO ₄
0.2 g	KH ₂ PO ₄
100 ml	H ₂ O destilada

A esta solución se le ajusta el pH a 7.4 con HCl.

12.- Referencias

1. Abraham, D.J. (ed). (2003). *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. U.S.A: John Wiley and Sons, Inc. 6th Ed., Vol. 2: Drug Discovery and Drug Development. p 361-397.
2. Akondi, K.B., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Kaas, Q., Craik, D.J., Lewis, R.J., Alewood, P.F. (2014). "Discovery, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Conotoxins" en *Chemical Reviews*, Vol. (2014).
3. Arumugam, M., Balasubramanian, T., y Se-Kwon, K. (2013). "Marine Toxins for Natural Products Drug Discovery" en Se-Kwon K. *Marine Biomaterials: Characterization, Isolation and Applications*. 6000 Broken Sound Parkway N.W, Suite 300. Boca Raton, FL 33487-2742: Taylor & Francis Group. p 93-94.
4. Bader, P., Echtele, D., Fonteyne, V., Livadas, K., De Meerleer, G., Paez-Borda, A., Papaioannou, E.G., Vranken, J.H., (2009). "Guía clínica sobre el tratamiento del dolor". *European Association of Urology*.
5. Bernáldez, J., Roman, S., Martínez, O., Jiménez, S., Vivas, O., Arenas, I., Corzo, G., Arreguín, R., García, D.E., Possani, L.D., Licea, A. (2012). "A *Conus regularis* conotoxin with a novel eight-cysteine framework inhibits Cav2.2 channels and displays a nociceptive behavior" en *Marine Drugs*, 2012, 10, 1-x manuscripts.
6. Biggs, S. J., Watkins, M., Puillandre, N., Ownby, J.P., Lopez-Vera, E., Christensen, S., Juarez-Moreno, K., Bernáldez, J., Licea-Navarro, A., Showers-Corneli, P., Olivera, B.M. (2010). "Evolution of *Conus* peptide toxins: Analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844" en *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 2010. (56). p 1-12. Archivo pdf.
7. Bourinet, E., Altier, C., Hildebrand, M.E., Trang, T., Salter, M.W., Zamponi, G.W. (2014). "Calcium- Permeable Ion Channels in Pain Signaling" en *APS Journals*. Vol. 94, Número 1.
8. Cervantes-Luévano, K.E. (2014). *Aislamiento y caracterización de péptidos inmunomoduladores procedentes del veneno de caracoles marinos del genero Conus*. Trabajo Final de Doctorado. Ensenada: Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California. Archivo pdf.
9. Collier, H.O.J., Dinneen, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C. (1968). "The abdominal constriction response and its supression by analgesic drugs in the mouse" en *Br. J. Pharmacol. Chemother.* Volumen (1968), Número 32. P. 295-310.

10. Chudler, E.H. (2014). "Autonomic Nervous System" en Neuroscience for Kids. <<https://faculty.washington.edu/chudler/auto.html>>. [Consulta: 28 de abril de 2015].
11. Dogrul, A., y Yesilyurt O. (1998). "Effects of Intrathecally Administered Aminoglycoside Antibiotics, Calcium-Channel Blockers, Nickel and Calcium on Acetic Acid-Induced Writhing Test in Mice" en *Gen. Pharmac.* USA: Elsevier Science Inc. Vol.30, No.4, p.613-616.
12. Elhabazi, K., Ayachi, S., Ilien, B., Simonin, F. (2014). *Assessment of Morphine-induced Hyperalgesia and Analgesic Tolerance in Mice Using Thermal and Mechanical Nociceptive Modalities. J. Vis. Exp.* (89), e51264.
13. Goldberg, D.S. y Mcgee, S.J. (2011). "Pain as a global public health priority" en *BMC Public Health* 2011, 11:770. <<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/11/770>> [Consulta: 06 de Marzo de 2015].
14. Howard, J. (1997). "Marine Medicine Men: Searching Tropical Oceans for New Cures" en *Explorations Magazine*, Volumen 4. Número 1.
15. Jiménez-Flores, S.M. (2011). *Aislamiento y caracterización de toxinas de Anthopleura sp y tres caracoles marinos del Género Conus con efecto en la respuesta nociceptiva*. Trabajo Final de Maestría. Ensenada: Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California. Archivo pdf.
16. Kaas, Q., Yu, R., Jin, A.H., Dutertre, S., Craik, D.J. (2015). "Conoserver: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database" en *Nucleic Acids Research*, Vol. (2012). Número 40 (Database issue):D325-30.
17. Lavergne, V., Dutertre, S., Jin, A.H., Lewis, R.J., Taft, R.J., Alewood, P.F. (2013). "Systematic interrogation of the *Conus marmoreus* venom duct transcriptome with ConoSorter reveals 158 novel conotoxins and 13 new gene superfamilies" en *BMC Genomics*, Vol. (2013). Número 14. p. 708.
18. Lebbe, E.K.M., Peigneur, S., Wijesekara, I., Tytgat, J. (2014). "Conotoxins Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors: An Overview" en *Marine Drugs*, Vol. (2014). Número 1. p. 2970-3004.
19. Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, W. (2001). "Animal Models of Nociception" en *Pharmacological Reviews*, Volumen 53, Número 4.

20. Mogil, J.S (2007). *The surprising Complexity of Pain Testing in the Laboratory Mouse*. Department of Psychology and Centre for Research on Pain. McGill University, Montreal. Quebec, Canada.
21. Montijo Diniz, D. *et al.* (2014). "Effects of the calcium channel blockers $\text{Pax1}\beta$ and ω -conotoxin MVIIA on capsaicin and acetic acid-induced visceral nociception in mice" en *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*,
22. Ness, T.J. (1999). *Models of visceral nociception*. Vol. 40, Número 3. Archivo pdf.
23. Nghia N. D. (2013). "Conotoxins: A Source of Biomaterial for Pharmacology and Neuroscience" en Se-Kwon K. *Marine Biomaterials: Characterization, Isolation and Applications*. 6000 Broken Sound Parkway N.W, Suite 300. Boca Raton, FL 33487-2742: Taylor & Francis Group. p.107-116.
24. Olivera B.M. (2000). " ω -conotoxin MVIIA: from Marine Snail Venom to Analgesic Drug" en Fusetani N. *Drugs from the Sea*. Switzerland: S. Karger AG. p. 74-85.
25. Pereañez J. A y Vargas L. J. (2009). "Neurotoxinas de invertebrados como alternativas terapéuticas y herramientas en investigación básica" en *Revista de la Facultad de Química y Farmacéutica*, Vol. 16, Número 1. p.155-163.
26. Puillandre Nicolas., 2007. Diversité des Conoidea.
<<http://acces.ens-lyon.fr/santo/donnees/biodivmarine/blog-des-chercheurs-du-module-biodiversite-marine-1/blog/nicolas-puillandre-diversite-des-conoidea>>. [Consulta: 30 de Marzo de 2015].
27. Se-Kwon, K. (ed)., 2013. *Marine Biomaterials: Characterization, Isolation and Applications*. CRC PRESS. Taylor & Francis Group. 6000 Broken Sound Parkway N.W, Suite 300. Boca Raton, FL 33487-2742.
28. Shanmugasundaram, P y Venkataraman, S. (2005). "Anti-nociceptive Activity of *Hygrophila auriculata* (Schum) Heine" en *Afr. J. Trad. CAM*, Volumen 2. Número 1. p.62-69.
29. Sora, I., Li, X.F., Funada, M., Kinsey, S., Uhl, G.R. (1999). "Visceral chemical nociception in mice lacking μ -opioid receptors: effects of morphine, SNC80 and U-50,488" en *European Journal of Pharmacology*. USA: Elsevier Science B.V.

