

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS

19

EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS
NEUROACTIVOS PROVENIENTES DE ESPECIES DE
CONUS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

M. EN C. MARÍA ARACELIS MAILLO PEÑALVER

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. EDGAR PHILLIP HEIMER DE LA COTERA

Diciembre 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta Tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurofarmacología Marina, del Centro de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Edgar Phillip Heimer de la Cotera.

El Jurado encargado de la revisión del presente manuscrito estuvo integrado por los Investigadores:

Dra. Adela Rodríguez Romero

Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera

Dr. Roberto Arreguín Espinoza

Dr. Froylan Gómez Lagunas

Dr. José Jesús García Colunga

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Dr. Rogelio Arellano Ostoa,

Quienes con sus comentarios y sugerencias mejoraron la calidad de este trabajo.

Para la realización de este trabajo, la autora recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Venezuela (CONICIT), con Apoyo Institucional de las autoridades del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas venezolano, (IVIC), para el cual trabaja. También fue apoyada por el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, y por el proyecto B11 del CONCYTEQ, para la asistencia a Congresos y para la realización de una estancia de Investigación en la Universidad de Utah.

Un guerrero de la luz no olvida nunca la gratitud

Durante la lucha, las fuerzas celestiales colocaron cada cosa en su lugar, y permitieron que él pudiera dar lo mejor de sí.

Los compañeros comentan: "¡Qué suerte tiene!" Y el guerrero a veces consigue mucho más de lo que su capacidad permite.

Por eso, cuando el sol se pone, se arrodilla y agradece al Manto Protector que lo rodea.

Su gratitud, no obstante, no se limita al mundo espiritual; él jamás olvida a sus amigos, porque la sangre de ellos se mezcló con la suya en el campo de batalla.

Un guerrero no necesita que nadie le recuerde la ayuda de otros, él se acuerda sólo, y reparte con ellos la recompensa

"Manual del guerrero de la luz"
Paulo Coelho

GRACIAS

A los miembros del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), de Venezuela, que me permitieron cumplir este sueño. Muy especialmente, a los Dres. Tatsuhiro Nakano, Miguel Laufer, Egidio Romano y José Domingo Medina.

Al Dr. Edgar Phillip Heimer de la Cotera, no sólo por haber sido un excelente tutor, sino por ser total e incondicional en su apoyo a todos sus estudiantes. Ed, por ver en nosotros y esperar de nosotros "el futuro", gracias!

Al Dr. Antonio García Cubas, por su invaluable ayuda a la hora de la identificación de los especímenes.

A los investigadores que integraron mi comité tutorial junto con el doctor Heimer: los doctores Luis Vaca, Rogelio Arellano, Mauricio Díaz Muñoz y Manuel Aguilar Ramírez, muy especialmente a estos dos que menciono, por ser especiales, en último lugar. Gracias Mauricio por haber estado siempre dispuesto aunque "oficialmente" no estabas en el comité. Manuel: He aprendido muchísimo a tu lado, gracias por la paciencia que me tuviste, la experiencia que compartiste, tu dedicación, tu buena voluntad, y sobre todo, por tu amistad y cariño.

Al personal del Centro de Neurobiología de la UNAM, en especial a los miembros del Departamento de posgrado, por su excelente disposición que permitió que los trámites y requerimientos siempre se resolvieran. Gracias Leonor, Carmen, Isabel, Pilar, Tere y Leticia.

A la bióloga María Eugenia Ramos Aguilar, de la Estación de Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, y a la Campaña BATOS-1, realizada en el Golfo de México por el Buque Oceanográfico de la UNAM "Justo Sierra", en Junio de 1999, por la colecta de los ejemplares.

Al Dr. Baldomero Olivera, del Departamento de biología de la Universidad de Utah, y los miembros de su laboratorio, quienes me permitieron realizar allí una fructífera estancia que colaboró ampliamente a la culminación de este proyecto.

A los integrantes del Laboratorio de Neurofarmacología Marina, por su amistad, compañerismo y siempre oportuna ayuda y cariño: Andrés, Luz María, Claudia, Alejandra y Dorothy; y muy especialmente a Estuardo. Dorothy, ojalá podamos volver a viajar juntas!

A mis compañeros del posgrado, por haber obviado la diferencia de edad y haber hecho tan fácil mi inserción en el grupo. A todos, ¡gracias! Fue una experiencia inolvidable.

A María Luisa. Gracias por ser tan especial, y por ejercer ese papel tan importante que ocupas en el laboratorio. Gracias por esas comidas "mexicanas" exquisitas, por estar siempre pendiente de nuestras necesidades, por protegernos como lo haces, por querernos, por integrarnos y confiar en nosotros.

Quiero agradecer profundamente a mis amigos de allá: Sarah, Maty, María Isabel Hernández, María Celia, Nury, Ana María, Carmen, Dilcia, Teresa, Anibal, Eunice, Alberto, María Isabel Pita, Magaly, Loreto ybueno, a todos mis buenos y queridos amigos de Venezuela que sabiendo cuanto me costó emprender esta aventura, me apoyaron y estimularon, recordándome en todo momento que allá estaban esperando mi regreso. Siempre disponibles, nunca me olvidaron, estuvieron pendientes de mí acá, sobre todo para contrarrestar mi nostalgia. Muy especialmente, ¡Gracias Maty y Sarah, no sé que hubiese sido de mí sin ustedes dos!

Y a mis amigos de acá: Estuardo, Consuelo, Manuel, María Elena, Carmen, Liliana, Esperanza, Ana, Héctor, Gaby, Dulce y Gloria. Gracias por abrirme sus corazones, recibirme y atenderme como lo hicieron. Gracias a ustedes, a su calidez, "mi soledad estuvo acompañada", ustedes acá fueron familia, compañeros, amigos, vecinos, consejeros, ayudantes, todo lo que un extranjero necesita encontrar para que el desarraigo desaparezca. Claro que todo tiene un precio, ¿verdad? Fue muy duro dejar mis afectos para venir acá, pero ahora, gracias a ustedes, resulta casi más difícil tener que irme, porque me duele mucho, muchísimo, dejarlos. Decirles gracias no es suficiente, les deseo lo mejor, siempre. ¡Viva México, y sobre todo, Vivan los Mexicanos!

Estuardo, eres mucho más que un compañero. Te debo muchas cosas, tantas, que no sé por donde empezar ¡Hasta donde ha llegado lo que comenzó cuando me enseñaste el arte de disecar Conos! Gracias por todo lo que has compartido conmigo en estos tres años: Tu pasión por la biología que definitivamente me ha contagiado, horas interminables de conversación que devinieron en la gran confianza que nos profesamos, y sobre todo tu cariño, tu compañía y la sincera amistad que me regalaste. Gracias por haber sido mi "hijo postizo", y por haber compartido a tu familia conmigo. Elvira, Talo y Sandy: deben estar orgullosos del hijo y hermano que tienen. Estuardo, te quiero muchísimo, hasta pronto y cuenta conmigo siempre.

Y para el final, mi familia, la que asustada y con remordimiento de conciencia, dejé "abandonada" en Venezuela hace tres años para venir en pos de un sueño. No hay agradecimiento que me parezca suficiente. A mi mamá, Carmela, que me empujó a intentarlo ofreciéndome todo su apoyo, al punto de encargarse de mis hijos. A mis hijos, Oscar Manuel y José Antonio, que muchas veces disimularon sus propios temores para que yo no me desalentara, y que tomaron a mi partida las riendas de su propia vida y de la que yo dejé allí a medias; y además, se encargaron de mi mamá. Oscar: Gracias por ser como eres, mi alegría. Tu carácter y espíritu me permitió muchas veces sobreponerme a la tristeza de no tenerte, de no tenerlos cerca. Jose, ¿qué hubiese yo hecho sin ti? Sin ti, sin tu ayuda ¿estaría hoy escribiendo esto? Por eso....

....Jose, hijo querido:

Espero que estés consciente del peso específico que tienes en esta historia, tu que a mi partida, te hiciste cargo de TODO, tu que fuiste mi casero, mi banquero, mi administrador, mi mensajero, mi secretario, el enfermero de tu abuela, mi representante....y además, un excelente hijo, hermano, nieto, estudiante y trabajador. Sin quejarte, sin jamás recriminarme o presionarme a regresar....

Nunca te agradeceré lo suficiente todo lo que hiciste durante el tiempo que tu madre se tomó para ser "Doctora", porque no hay manera de hacerlo, pero ¿sabes que hijo?

La primera tesis que hice se la dediqué a mis papás, tu abuelo y tu abuela la merecían. La segunda, fue para tu papá y tu hermano Oscar, bueno....¡tu aún no habías nacido!

Y esta Tesis que ahora estas leyendo....Pues ésta es la que siempre quise hacer y no pude, y cuando ¡por fin! al crecer ustedes me permití intentarlo, intentar este sueño...bueno, ahora que lo logramos a pesar de lo que nos costó a todos, especialmente a ti, ésta, hijo querido José Antonio, esta Tesis, es tuya, esta Tesis, VA POR TI!

Una de las cosas que más me ha maravillado durante esta experiencia ha sido el cercano encuentro que he experimentado con la biología, o mejor dicho, con ese milagro llamado VIDA, con la perfección de los procesos que la conforman, con la increíble coordinación con que estos se anteceden, se suceden, y se integran a todo nivel: desde el más primitivo de los organismos, hasta el hombre, único portador reconocido de la "conciencia" y la "inteligencia".

Estoy profundamente agradecida por eso, y tal vez sea por ello que me afecta tanto que este sueño mío se realice en momentos en que la humanidad se muestra tan incongruente con esos conceptos que aparentemente le son exclusivos, al punto que, y a pesar de ellos, no haya sido capaz de evitar que el tercer milenio contabilizado de su existencia sobre el planeta, comience como lo ha hecho.

Diciembre del 2001

INDICE

Resumen	ii
Abstract	iii
Índice de Figuras	iv
Índice de Tablas	v
Antecedentes	1
Hipótesis	33
Objetivos	34
Justificación	35
Animales, materiales y métodos:	
Colección de especies de <i>Conus</i>	36
Identificación de especímenes	36
Extracción de venenos	36
Separación de los componentes de venenos	37
Purificación de conotoxinas	38
Caracterización química:	
Secuenciación de conotoxinas	39
Espectrometría de masas	39
Síntesis de péptidos	39
Purificación de péptidos sintéticos	40
Caracterización biológica	40
Corte de L-Conorfamida Sr2 con endoproteinasa Asp-N	41
Corte de L-Conorfamida Sr2 con CNBr	41
Corte de L-Conorfamida Sr2 y CNF4 con quimi tripsina	42
Resultados:	
Identificación de la especie <i>C. spurius</i>	43
Separación del veneno total	45
Purificación de conotoxinas de <i>C. spurius</i>	45
Caracterización química de ϵ -SrIXA	51
Caracterización química de Conorfamida Sr-1	52
Caracterización química de Conorfamida Sr-2	53
Caracterización química de Conorfamida Sr-3	56
Síntesis de análogos a Conorfamidas	56
Determinación de actividad biológica de conotoxinas de <i>C. spurius</i>	58
Caracterización biológica de Conorfamida Sr-1 sintética	59
Caracterización biológica de Conorfamidas análogas sintéticas	60
Discusión	
ϵ -SrIXA	64
Conorfamidas	68
Conorfamida Sr1	69
Conorfamidas Sr2 y Sr3	76
Conorfamidas análogas	81
Conclusiones	87
Bibliografía	88
Anexos	102

RESUMEN

Los caracoles marinos del género *Conus* son depredadores de los arrecifes coralinos. Los miembros del género usan su veneno principalmente para alimentarse de peces, otros moluscos o gusanos marinos. El veneno actúa rápidamente pues contiene Conotoxinas, que son péptidos cuyos blancos son los canales iónicos y receptores del sistema nervioso, a los cuales se enlazan con gran afinidad y alta especificidad, pues son más pequeños que otras neurotoxinas, pero de estructura rígida y estable gracias a la formación de puentes de disulfuro debido a la alta proporción de residuos de Cisteína que contienen. Según sus efectos, se clasifican en familias farmacológicas, entre otras las α -conotoxinas, las ω -conotoxinas, las μ -conotoxinas, y las conantokinas, que son antagonistas de canales iónicos y receptores. Los venenos de *Conus* contienen también análogos a neuropéptidos endógenos, que han resultado ser agonistas; como las Conopresinas y las Contulakinas. En este trabajo se reportan los resultados del estudio del veneno total de la especie caribeña *C. spurius*. De ellos, el de mayor relevancia lo constituye el descubrimiento y caracterización de una nueva familia de análogos a neuropéptidos endógenos en venenos de *Conus*. Hemos aislado de esta especie tres péptidos que pertenecen a la familia de los péptidos relacionados al FMRF-NH₂ (FaRPs), por lo que hemos denominado a esta nueva familia de conopéptidos como CONORFAMIDAS: Esta especie contiene además en su veneno, al péptido ϵ -SrlXA, que pertenece a la familia de las ϵ -conotoxinas, que inhiben la liberación de acetilcolina en la sinapsis colinérgica de *Aplysia*.

ABSTRACT

The venomous sea snails of the genus *Conus* are dominant predators of almost all coral reefs. *Conus* snails use their venom mainly upon prey such as fish, other mollusks, or worms. The toxins present in their venoms act quickly and specifically upon the victim because they contain a great variety of soluble peptides known as conotoxins, which target ion channels or receptors in the central nervous system with high specificity and great affinity. The high efficiency of conotoxins is due to their smaller than other toxins from venomous animals; yet they are rigid and constrained peptides because they contain a high proportion of cysteine residues, that form intramolecular disulfide bridges. Conotoxins are classified according to their pharmacological activity into different families like α -conotoxins, ω -conotoxins, μ -conotoxins and conantokins, which inhibit different classes of receptors or ion channels. *Conus* venom also contain analogs of endogenous peptides which act as agonist, such as conopresins and contulakins. Here we report here the study of venom from the Caribbean snail *Conus spurius*. As one of the remarkable results, we report the discovery of a new family of peptides analogous to endogenous neuropeptides related to the FMRF-NH₂ family (FaRPs). We have coined the term Conorfamides to name the three member isolated and chemically and biologically characterized from the venom of *C. spurius*. Also, we describe the characterization of the peptide, ϵ -SrIXA, which is a member of the ϵ -conotoxin family which reduces the release of neurotransmitter in the cholinergic synapse of *Aplysia*.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema del aparato de envenenamiento utilizado por los <i>Conus</i>	4
Figura 2	Especies de <i>Conus</i>	5
Figura 3	Distribución del género <i>Conus</i>	6
Figura 4	Bloqueo de la neurotransmisión por conotoxinas	10
Figura 5	Esquema de un propéptido de conotoxinas	13
Figura 6	Biosíntesis de conotoxinas	14
Figura 7	Modelo diagramático de macrositios para conotoxinas	16
Figura 8	Comparación de las estructuras tridimensionales de las α -conotoxinas PnIA e Iml	20
Figura 9	Mecanismo de acción de la conotoxina MVIIA (Ziconotide).	25
Figura 10	Cromatograma del veneno total de la especie <i>C. magus</i>	32
Figura 11	<i>Conus spurius</i> var. <i>atlanticus</i> y su conducto de veneno	37
Figura 12	Zona para inyección icv	41
Figura 13	<i>Conus spurius</i> var. <i>atlanticus</i>	43
Figura 14	Variedades de <i>Conus spurius</i>	44
Figura 15	Cromatograma de la separación analítica de <i>C. spurius</i> (primer lote de veneno total)	46
Figura 16	Cromatograma de la separación analítica de <i>C. spurius</i> (segundo lote del veneno)	46
Figura 17	Cromatograma de la separación semipreparativa del veneno de <i>C. spurius</i>	47
Figura 18	Purificación de la Conorfamida Sr2	47
Figura 19	Purificación de la conorfamida Sr3	48
Figura 20	Purificación de la conorfamida Sr1	49
Figura 21	Purificación de ϵ -SrIXA	49
Figura 22	Coelución de Conorfamida Sr1 nativa y sintética	53

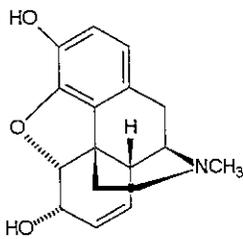
INDICE DE TABLAS

Tabla I	Clasificación estructural de Conotoxinas	9
Tabla II	Clasificación farmacología de Conotoxinas	11
Tabla III	Variabilidad de residuos inter cisteína en omega conotoxinas	15
Tabla IV	α -conotoxinas	20
Tabla V	ω -conotoxinas	25
Tabla VI	Comparación entre miembros de la O-superfamilia de Conotoxinas	28
Tabla VII	Secuencias parciales de conotoxinas aisladas de <i>C. spurius</i>	50
Tabla VIII	Secuenciación de SpIH	51
Tabla IX	Comparación entre SpIVB nativo, Conorfamida Sr1 sintética, y el péptido equivalente con el carboxilo terminal libre	52
Tabla X	Determinación estructural de las Conorfamidas Sr1 y Sr2	54
Tabla XI	Comparación entre Conorfamida Sr2 nativa, sintética y el péptido equivalente con el carboxilo terminal libre	55
Tabla XII	Corte de L-Conorfamida Sr2 sintética	56
Tabla XIII	Determinación de la estructura de Conorfamida Sr3	57
Tabla XIV	Estructura de Conorfamidas naturales y sintéticas	57
Tabla XV	Actividad biológica de péptidos nativos aislados de <i>C. spurius</i>	58
Tabla XVI	Actividad biológica de la Conorfamida Sr1	59
Tabla XVII	Resumen de actividad de péptidos sintéticos	62
Tabla XVIII	Bioactividad de Conorfamida Sr1 y Conorfamidas análogas	63
Tabla XIX	Estructuras de α -, λ - y ϵ -conotoxinas	64
Tabla XX	Secuencias de T-conotoxinas	67
Tabla XXI	Comparación estructural entre Conorfamidas aisladas de <i>C. spurius</i> y FaRPs	70
Tabla XXII	Estructura primaria de péptidos que contienen D-aminoácidos	78
Tabla XXIII	Estructura de Conorfamidas naturales y sintéticas	83

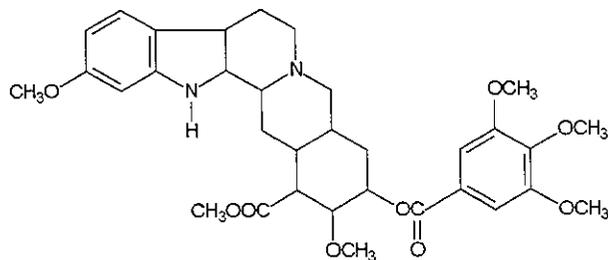
ANTECEDENTES

Es usual que ciertos grupos taxonómicos sinteticen una serie de metabolitos secundarios con el objeto de interactuar con otros organismos de su ambiente, bien sea para defenderse de los depredadores de su entorno, y/o para atacarlos y alimentarse de ellos (Marcano y Hasegawa, 1991). El estudio sistemático de estos compuestos químicos, conocido como la química de productos naturales, ha permitido el descubrimiento de una gran cantidad de sustancias que luego han sido desarrolladas como fármacos.

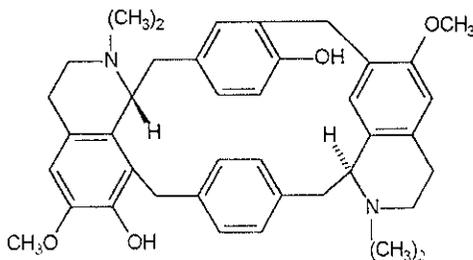
Así por ejemplo, las plantas, que al ser estáticas no pueden huir de sus depredadores, preparan como método de defensa directa contra ellos alcaloides tales como la morfina (*Papaver somniferum*) (1) y la reserpina (especies de *Rauwolfia*) (2), con acción sobre el sistema nervioso central, y la tubocurarina (*Chododendron tomentosum*) (3) y atropina (*Atropa belladonna*) (4) con acción en canales iónicos. Los microorganismos han permitido el descubrimiento y desarrollo de los antibióticos (Trease y Evans 1978), siendo ejemplo de ellos la penicilina G (especies de *Penicilium*) (5) y la tetraciclina (especies de *Streptomyces*) (6).



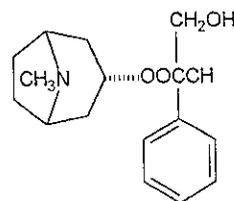
1



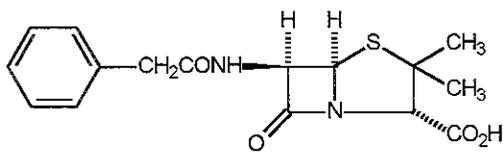
2



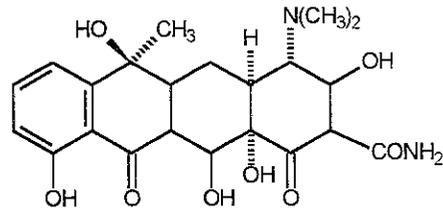
3



4

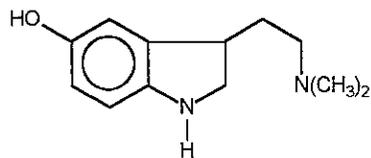


5

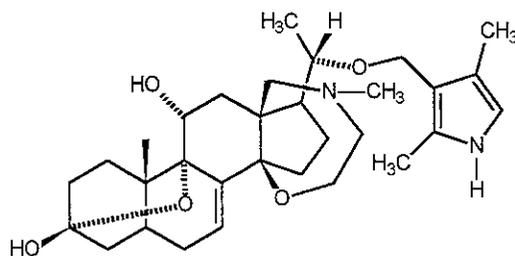


6

Los animales tienen diferentes medios de defensa contra sus depredadores, incluyendo la preparación de sustancias químicas de defensa, como ciertas especies de ranas que producen venenos destinados exclusivamente para fines defensivos, como la bufotenina (7) y la batracotoxina (8), este último alcaloide es uno de las sustancias más tóxicas que se conocen y su actividad está relacionada con canales iónicos (Russell, 1995).



7



8

Los animales venenosos pueden utilizar sus venenos indistintamente como mecanismos de defensa o como medio para capturar presas. Así, los escorpiones, serpientes, arañas y algunos invertebrados marinos, preparan venenos que, al ser aplicados a sus víctimas, les permiten servirse de ellas para alimentarse. Las relaciones entre animales ponzoñosos y sus víctimas son sumamente violentas ya que los venenos producidos por estos animales contienen péptidos cuyos blancos de acción son los receptores de los sistemas nervioso y neuromuscular (Olivera y Col., 1990b).

Se ha reconocido que la potencia de muchas de estas toxinas se relaciona con su alta especificidad para interferir en los procesos celulares, por lo que han sido usadas como

herramientas para probar rutas y mecanismos bioquímicos (Adams y Olivera, 1994), y como materia prima para el desarrollo de nuevos fármacos (Miljanich, 1997).

Los compuestos neurotóxicos presentes en los venenos de serpientes, arañas, escorpiones e invertebrados marinos son polipéptidos pequeños (de 10 a 100 aminoácidos) y muy compactos, que comparten la característica de contener una alta proporción del aminoácido cisteína (Cys, C), lo cual les permite tener múltiples patrones de uniones internas debidas a la formación de puentes de disulfuro, siendo así muy estables conformacionalmente.

Estas características son las responsables de la efectividad y rapidez de acción de los péptidos que componen a estos venenos; y permitirían igualmente definirlos como excelentes fármacos. Sin embargo, hasta hace muy poco tiempo no se había pensado que los componentes de los venenos animales podrían ser utilizados como tales, debido a su poca biodisponibilidad, la enorme dificultad de sus síntesis y la poca estabilidad de los péptidos en general debido a la facilidad con la que son degradados por proteasas. Los estudios recientes en toxinas peptídicas provenientes de caracoles marinos del género *Conus* están cambiando esta visión, ya que éstas, además de ser altamente bioactivas, no son señalizadores endógenos, por lo que no son destruidos por acción enzimática en los organismos invadidos, por el contrario, son diseñados por sus creadores para eludirla, al tener muchos de sus residuos carboxilo-terminal amidados, y una alta proporción de Cys, lo que les permite tener una conformación sumamente rígida y estable.

CONOS

Entre los animales venenosos productores de neurotoxinas naturales es necesario señalar especialmente a los caracoles del Género *Conus*, o caracoles CONOS, que son moluscos de la Clase Gastropoda, Orden Caenogastropoda, Sub orden Neogastropoda, Superfamilia Conacea (Conoidea, Toxoglossa), y Familia Conidae (Kohn, 1990; Abott y Dance, 1990).

Este género es el único de la familia Conidae, la cual, junto con las familias Turridae y Terebridae, forman la Superfamilia Conacea, caracterizada por estar formada por caracoles marinos carnívoros venenosos, que poseen un mecanismo sofisticado para la aplicación del veneno a sus

presas, consistente en un conducto venenoso unido a un diente hueco y desechable que les sirve de arpón (Figura 1).

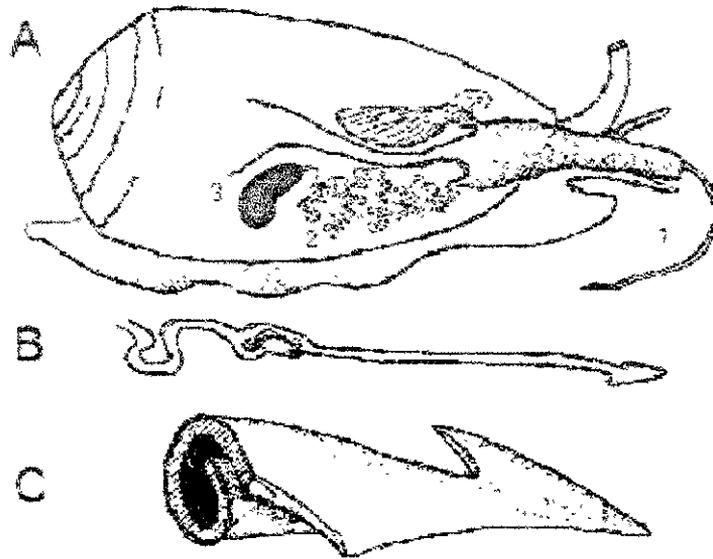


Figura 1. A) Esquema que muestra el aparato de envenenamiento utilizado por especies de *Conus*. 1: Diente radular unido a la probóscis. 2: conducto del veneno; 3: Bulbo muscular. **B)** Detalle del diente radular donde puede apreciarse la forma de arpón de su punta. **C)** Ampliación del diente radular donde se aprecia que es hueco. (Dibujo de Heriberto Pedraza Lara)

Los *Conus* han sido constantemente reportados como animales venenosos. Normalmente no atacan al hombre pero pueden hacerlo si son molestados (Kohn y Col., 1960); la especie *Conus geographus*, ha dado lugar a varias muertes humanas (Olivera y Col., 1985b, Fegan y Andersen, 1997). En general, estos accidentes ocurren debido a que las conchas de los *Conus* son hermosas y por lo tanto altamente cotizadas por los coleccionistas (Olivera y Col., 1990b) (Figura 2)

Los *Conus*, son de aparición reciente (35 millones de años), y de rápida especiación (Kohn, 1990) El género contiene alrededor de 500 especies y está ampliamente difundido. Habitan aguas tropicales a bajas profundidades y constituyen uno de los más diversos y dominantes géneros de depredadores de los arrecifes coralinos (Olivera y Col., 1985a) (Figura 3), siendo los únicos ceratales marinos conocidos por dominar y devorar vertebrados (Kohn, 1956, Gray y Olivera, 1988). Se ha sugerido que la rápida evolución y difusión de este género se debe en parte a las características especiales de adaptación que los confieren sus venenos (1), en y Fauna, 1999a y b)

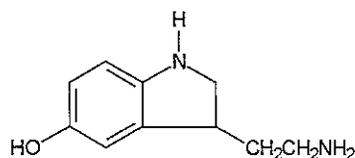
Col., 1994), que actúa como agonista a receptores de vasopresina/oxitocina; y análogos de neurotensinas, como la **Contulakina-G (2)** (Craig y Col., 1999a). Se especula que en algunos casos, la presencia de estos homólogos a neuropéptidos endógenos en el veneno de *Conus* ocupa un rol importante para facilitar el proceso de envenenamiento (Olivera y Col., 1985a). Los gránulos insolubles constituyen los precursores de los péptidos solubles; y los venenos contienen además enzimas, como la Conodipina-M de *C. magus* (McIntosh y Col., 1995a), que es una fosfolipasa formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por uno o más enlaces disulfuro. De la especie *C. imperialis* fue aislada también **serotonina (9)** (McIntosh y Col., 1993).

CFIRNCPKG*

Lys-Conopresina-G

ZSEEGGSNAT^{T&}KKPYIL

Contulakina-G



9
Serotonina

* Amidación del carboxilo terminal

T[&] Treonina glucosilada

CONOTOXINAS

Durante los últimos 25 años varios grupos han procedido al aislamiento y estudio sistemático de las neurotoxinas solubles presentes en venenos de *Conus*, principalmente el grupo de Baldomero Olivera de la Universidad de Utah. Dado que la función del veneno de los caracoles del Género *Conus* es la de inmovilizar y matar a sus presas, el blanco de acción principal de las conotoxinas recae en los canales iónicos de membranas que transmiten las señales químicas y eléctricas, y/o en los receptores que los modulan. Las conotoxinas se caracterizan por mostrar gran afinidad y alta especificidad en su unión a receptores o canales iónicos. Estas características, unidas a su pequeño tamaño, facilidad de síntesis y estabilidad conformacional, las convierte en compuestos que sirven

como excelentes pruebas de receptores y canales iónicos y como fuente para el diseño de fármacos (Olivera, 1997).

Las Conotoxinas son mucho más pequeñas (de 10 a 30 aminoácidos), que las toxinas peptídicas similares preparadas por otros animales venenosos (Olivera y Col., 1990), pero contienen igualmente una alta proporción de Cys en sus estructuras, lo que les permite estabilidad conformacional mediante el establecimiento de múltiples enlaces de disulfuro intramoleculares a medida que el péptido se pliega. Son estructuras de conformación rígida, estable, y de variadas formas, según como se establezcan los enlaces de disulfuro. Otros péptidos de *Conus* contienen, en lugar de Cys, un gran número de residuos γ -carboxilados de ácido glutámico (Gla, γ), los cuales son igualmente responsables de su estabilidad conformacional (Lin y Col., 1997).

Las conotoxinas han sido clasificadas en familias farmacológicas según el mecanismo de su acción biológica. Cada una de estas familias puede ser asociada a un esqueleto estructural de residuos de Cys, que a su vez se subdividen por su acción sobre canales iónicos y receptores. Las conotoxinas han sido agrupadas en clases estructurales las cuales están definidas por el número, la posición y la conectividad de los residuos de cisteínas que contienen (Balaji y Col., 2000). (Tabla I).

Las diferentes clases estructurales incluyen múltiples familias farmacológicas de conotoxinas; que permite agruparlas según su mecanismo de acción biológica (Craig y Col., 1999b; Olivera y Cruz, 2000). Con base en éste, hay tres categorías básicas y bien estudiadas que actúan de manera sinérgica para impedir la transmisión del impulso nervioso en la unión neuromuscular del organismo envenenado, lo cual puede ser de gran ventaja si lo que el molusco pretende es inmovilizar a su presa, que es mucho más veloz que él y puede moverse rápidamente en tres direcciones. Así, se denominaron α -**conotoxinas** a los péptidos que actúan sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina, μ -**conotoxinas** a los que actúan sobre canales de sodio regulados por voltaje, y ω -**conotoxinas** a los que actúan sobre canales de calcio regulados por voltaje. (Figura 4, Tabla II).

Tabla I: Clasificación estructural de conotoxinas

Superfamilia	# C	Secuencia de C	Ejemplos
Conantokinas	0		GE $\gamma\gamma$ LQ γ NQ γ LIR γ KSN* Conantokina-G
Contulakinas			ZSEEGGSNAT ¹ KKPYIL Contulakina-G
Contrifanos	2	C--C 	GCOWEPW [⊗] C* Contrifano-R (<i>C. radiatus</i>)
Conopresinas		C--C 	CFIRNCPKG* Lys-Conopresina-G
A	4	CC--C--C 	ECCNPACGRHYSC* α -GI
T		CC--CC 	γ CC γ DGW [⊗] CCT [^] AAO ϵ -TxIX (<i>C. textile</i>)
L		CC--C--C 	VCCGYKLCHOC λ -MrVIA
A	6	CC--C--C--C--C 	GCCGSYONAACHPCSCCKDRPSYCGQ* α A-PIVA (<i>C. purpurascens</i>)
M		CC--C--C--CC 	RDCCTOOKKCKDRQCKOQRCCA* μ -GIIIA
O		C--C--CC--C--C 	CKSOGTOCSRGMRDCCTSCLLYSNKCRRY* ω -GVIIA
P	8	C-C-C-C-C-C-C-C C-C-C-CC-C-C-C	GCNNSCQ γ HSDC γ SHCICTFRGCGAVN* Péptido espasmódico (<i>C. textile</i>) DCOTSCOTTcANGK* SCK*GYOCVNK*ACSGCTHH DeVA (<i>C. delessertii</i>) ¹
R	10	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	GCTRTC GGOKCTGTCTCTNSKCGCRYNVHPSGBGC GCACS* σ -GVIIIA

: Amidación del carboxilo terminal; Z: Ácido piroglutámico; T¹: Treonina-O-glucosilada; O: Hidroxi-prolina; W: D-triptofano; W[⊗]: Br-triptofano, κ^ : Hidroxi-lisina, γ : ácido gamacarboxiglutámico. (Los ejemplos que se muestran son péptidos aislados de la especie *C. geographus* a menos que expresamente se señale lo contrario; 1: López Vera, J. E. y Col., resultados no publicados).

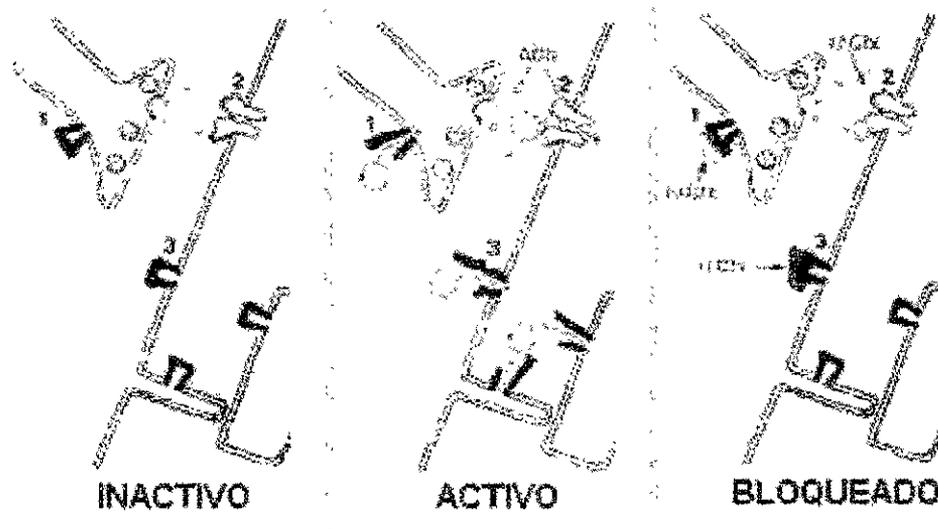


Figura 4: Bloqueo de la neurotransmisión por conotoxinas: Es usual encontrar en venenos de *Conus* tres tipos de conotoxinas que actúan de manera conjunta para bloquear la neurotransmisión. Así, las μ -conotoxinas bloquean los canales de sodio presinápticos activados por voltaje, responsables de la transmisión del impulso nervioso, las ω -conotoxinas antagonizan canales de calcio presinápticos con lo cual impiden la entrada de calcio a la célula y con ello, la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico; las α -conotoxinas bloquean receptores de acetilcolina postsinápticos, impidiendo la transmisión del impulso nervioso. (Diagrama adaptado de Olivera, 1997)

Los grandes avances logrados últimamente en la identificación de subtipos de canales iónicos y receptores, se deben en parte al descubrimiento y caracterización de diversas conotoxinas que modulan sólo algunos de los tipos o subtipos de un canal o receptor específico. Invariablemente, de cada veneno se aíslan varias conotoxinas diferentes, según su acción sobre canales o receptores; en general, el blanco de acción se relaciona al tipo de alimentación de la especie de *Conus* estudiada y a la clase de conopeptido aislado.

Esta especificidad de las conotoxinas es de gran relevancia y puede explicarse por la necesidad del caracol de ser eficiente en el proceso de envenenamiento. Si el objetivo principal del caracol es el de inmovilizar a su presa inyectando una pequeñísima cantidad de veneno, no puede perder su material permitiendo que este se una a canales que no tienen relevancia en la parálisis de su presa. Distintas clases de conotoxinas son capaces de bloquear los tres tipos de canales iónicos encargados de la transmisión neuromuscular en vertebrados, pudiendo distinguir entre canales de músculo y de nervios. Adicionalmente se ha encontrado que las Conotoxinas distinguen específicamente entre diferentes subtipos de un mismo canal y/o receptor.

Tabla II: Clasificación farmacología de Conotoxinas y conopéptidos.

Familia	Blanco	Modo de acción	Esqueleto de C
<u>Péptidos con acción en canales iónicos activados por voltaje</u>			
μ -conotoxinas	Canales de Na	Bloquea el canal, sitio I	CC-C-C-CC
μ O-conotoxinas	Canales de Na	Bloquea la conductancia, en un sitio diferente a I	C-C-CC-C-C
δ -conotoxinas	Canales de Na	Retrasa la inactivación, enlaza al sitio IV	C-C-CC-C-C
κ -conotoxinas	Canales de K	Bloquea el canal	C-C-CC-C-C
κ A-conotoxinas	Canales de K	Inhibe la conductancia	CC-C-C-C-C
ω -conotoxinas	Canales de Ca	Bloquea el canal	C-C-CC-C-C
<u>Péptidos con acción en canales iónicos activados por ligando</u>			
Conantokinas	Receptor de NMDA	Antagonista Competitivo	Sin C
α -conotoxinas	Receptor nicotínico	Antagonista Competitivo	CC-C-C
α A-conotoxinas	Receptor nicotínico	Antagonista Competitivo	CC-C-C-C-C
ψ -conotoxinas	Receptor nicotínico	Antagonista No Competitivo	CC-C-C-CC
σ -conotoxinas	Receptor de 5HT3	Antagonista Competitivo	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C
<u>Péptidos con acción en receptores ligados a proteínas G</u>			
Conopresinas	Receptor de vasopresina	Agonista	C-C
Contulakinas	Receptor de neurotensina	Agonista	Sin C
<u>Otros Conopéptidos</u>			
ε -conotoxinas	¿Canales de Calcio?	Reduce liberación de ACh	CC-CC

Los primeros estudios de los venenos de *Conus* se realizaron en especies piscívoras, por lo que los efectos biológicos de los péptidos aislados se estudiaron en modelos de receptores y canales para vertebrados; no se conocía su mecanismo específico de acción en sus otros géneros de presa, como moluscos o gusanos marinos. Recientemente se ha ampliado el espectro de especies de *Conus* estudiadas, además de las especies piscívoras, se han estudiado especies molusquicívoras y vermívoras, y se ha determinado la acción de los péptidos aislados en otros modelos de receptores o ligandos, por ejemplo en modelos de invertebrados (Spira y Col., 1993; Kits y Col., 1996; Fainzilber y Col., 1991 y 1998; McIntosh y Col., 1995b), lo cual ha permitido encontrar nuevos tipos o familias de conotoxinas con acciones biológicas diferentes.

BIOSÍNTESIS DE CONOTOXINAS

Las conotoxinas son traducidas genéticamente como precursores o propéptidos de mayor tamaño los cuales son postrasduccionalmente procesados para dar lugar a las toxinas “maduras” (Woodward y Col., 1990).

La mayoría de los venenos animales están formados por polipéptidos que contienen residuos de Cys responsables de uniones disulfuro intramoleculares, que están uniformemente distribuidos a todo lo largo de la secuencia del péptido. Lo mismo ocurre en ciertos ligandos de origen no venenoso. Uno de los ejemplos mejor estudiados es el inhibidor de tripsina pancreático bovino (BPTI), que es un polipéptido de 58 aminoácidos, con seis residuos de Cys que forman tres enlaces intramoleculares (Olivera y Col, 1990). Este polipéptido puede ser desnaturalizado *in vitro*, pero después de ello la molécula es capaz de regresar a la estructura rígida inicial y de enlazarse fuertemente a su enzima blanco e inhibir su funcionamiento. Aunque hay 15 maneras diferentes en las cuales los seis residuos de Cys pueden unirse, esta molécula contiene información suficiente para cerrarse de una manera específica.

Esta estrategia de síntesis parece haber sido adoptada por los Conos para la elaboración de sus venenos. Muchas conotoxinas contienen, al igual que el BPTI, seis residuos de Cys y una estructura rígida y estable conformacionalmente, pero a diferencia de este inhibidor, son mucho más

pequeños, por lo que los residuos de Cys están mucho más concentrados a lo largo de la molécula, y las vueltas que ellos generan al cerrarse son más pequeñas.

Los propéptidos pueden ser observados en los venenos de *Conus* como gránulos microscópicos suspendidos en el líquido lechoso. El análisis bioquímico de estos gránulos muestra que la proporción de residuos de Cys es menor que la de las conotoxinas maduras, y que además, éstos (que forman los enlaces disulfuro y actúan como grupos de cierre durante el proceso de corte de la conotoxina), están concentrados cerca del grupo carboxílico terminal (Bandyopadhyay y Col., 1998; Colledge y Col., 1992).

El tratamiento de estos gránulos con enzimas digestivas da lugar a la liberación de la toxina activa (Figura 5). Los venenos de *Conus* también contienen proteasas que permiten el corte proteolítico de los propéptidos durante la maduración, liberando las conotoxinas de acuerdo a la demanda.



Figura 5: Esquema de un propéptido de conotoxinas. La región roja corresponde a la conotoxina una vez liberada. la flecha indica el sitio de ruptura proteolítica para dar lugar a la conotoxina madura, rica en Cys.

El análisis de las secuencias de los propéptidos permite diferenciar en ellos dos regiones, una grande y bien conservada entre los propéptidos que corresponden a la misma familia estructural, y una pequeña e hipervariable, que contiene todos los residuos de Cys (Figura 6). Las regiones constantes dirigen la configuración de los enlaces disulfuro intramoleculares, y son responsables de las modificaciones postraduccionales en las secuencias de las conotoxinas maduras. Las regiones hipervariables permiten la formación de familias de conotoxinas, luego del corte, y explican la diversidad de conopéptidos encontrados con similar afinidad por un receptor y/o canal, y la alta especificidad de las conotoxinas de cada familia.

El proceso de liberación de conotoxinas a partir de los propéptidos sería entonces: plegado de la molécula precursora, formación de los enlaces disulfuro y corte de la región cercana al carboxilo terminal péptido para producir las conotoxinas pequeñas con alto contenido de residuos de Cys. Este método de "plegado-cerrado-corte" permite que los aminoácidos que contienen la información adecuada para el correcto plegado del péptido sean luego desechados en el clivaje, dejando en la molécula de la toxina madura solamente los aminoácidos necesarios para la interacción con los receptores.

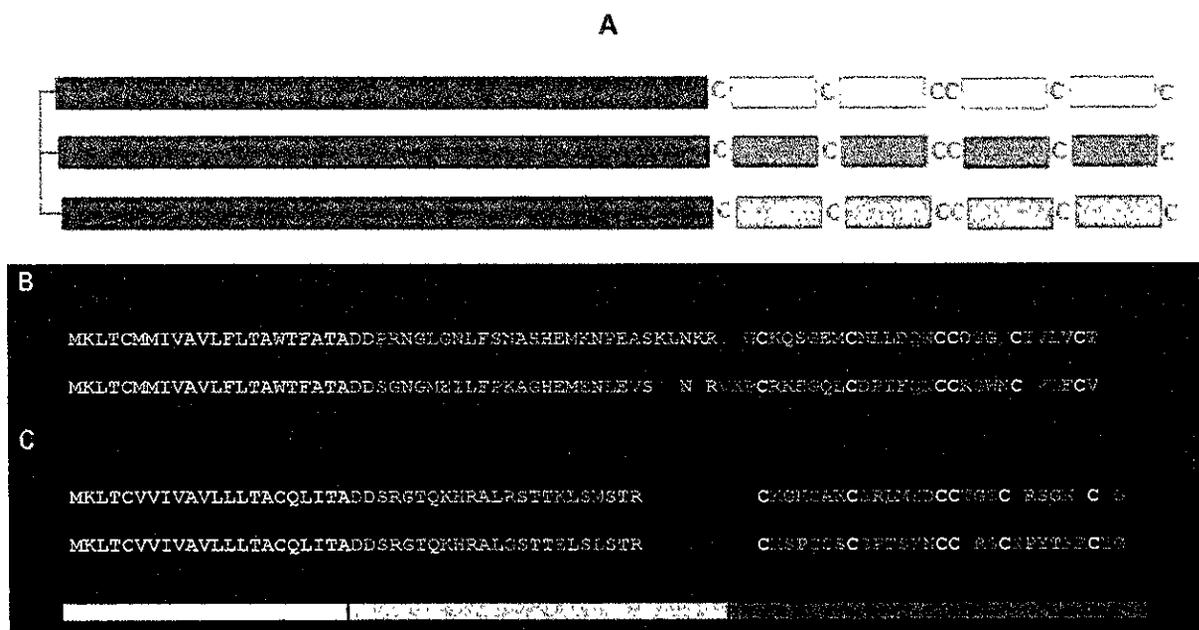


Figura 6. Biosíntesis de conotoxinas: A) Evolución de nuevas conotoxinas. Las regiones constantes de los propéptidos dan lugar a la conservación del esqueleto de cisteína en la familia de conotoxinas maduras, el intercambio a nivel genético de los residuos intercisteína en las regiones hipervariables, origina una diversidad de péptidos maduros que pueden o no tener la misma actividad biológica. B) Comparación de las secuencias del precursor en dos δ -conotoxinas, TxVIA (arriba) y GmVIA (abajo), provenientes de *C. textile* y *C. gloriamaris*. C) Comparación de las secuencias del precursor en dos ω -conotoxinas, MVIIA y GVIA, de *C. magus* y *C. geographus*. Los aminoácidos en amarillo representan la secuencia señal, en rojo se muestra la región pro y en azul la secuencia de los péptidos "maduros". En blanco se muestran los residuos de cisteína de las toxinas, y en rosa, las divergencias.

Este mecanismo de biosíntesis para las conotoxinas les permite la preparación de péptidos de conformación adecuada, pero mucho más pequeños que otros ligandos de receptores, lo cual facilita su enlace con receptores (alta afinidad de conotoxinas en relación a ligandos más grandes) y hace a estas toxinas mucho más específicas que ligandos afines de mayor tamaño, permitiéndoles

así distinguir entre diferentes subtipos de receptores. En este respecto, estos propéptidos se asemejan a los anticuerpos.

VARIABILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE CONOTOXINAS

Se ha encontrado gran variabilidad entre los residuos diferentes a Cys en conotoxinas homólogas. Se ha sugerido que esta capacidad de los *Conus* para preparar toxinas tan diversas y específicas constituye una ventaja adaptativa de la especie, ya que les ha permitido adaptarse a las variaciones filogenéticas de los canales y/o receptores presentes en los organismos que depredan. Cada especie está en capacidad de elaborar toxinas que actuarían según el esquema llave-cerradura, específicamente sobre el sitio adecuado del canal y/o receptor blanco de su acción.

Son múltiples los ejemplos de conotoxinas con muy poca homología estructural en cuanto a los residuos intercisteína, aisladas tanto de la misma especie como de especies diferentes, que se unen exactamente al mismo tipo o subtipo de canal que tienen una sorprendente diferencia en sus secuencias. Como ejemplo de esta afirmación, en las ω -conotoxinas **GVIA y MVIIA**, que compiten entre ellas por el mismo sitio de enlace en canales de calcio, solo el 44% de los aminoácidos, incluyendo las Cys, se conserva, y el 70% de los aminoácidos diferentes a Cys que las componen, son diferentes (Myers y Col, 1993) (Tabla III).

Tabla III. Variabilidad de residuos inter cisteína en omega conotoxinas

GVIA (1)	CKSOGSSCSOTSYNCCR	SCNOYTKRCY
MVIIA (1)	CKGKGAKCSRLMYDCCTG	SCRSK C
AA conservados	CK	G CS Y CC SC K C

1. GVIA de *C. geographus* y MVIIA de *C. magus*, ambas ω -conotoxinas con el mismo tipo de especificidad farmacológica.

Por otra parte, muchas drogas usadas para fines médicos se enlazan al sitio esperado para ejercer su acción terapéutica, pero lo hacen igualmente a otros sitios relacionados, lo cual da lugar frecuentemente a efectos colaterales no deseados. Al contrario de la mayoría de las drogas, las conotoxinas pueden discriminar entre subtipos de receptores muy relacionados. Como ejemplo de

esta afirmación, drogas usadas para bloquear canales de calcio, como la dihidropiridina, se enlazan a esos receptores tanto en músculos lisos, esqueléticos y cardíacos, como en tejido neuronal; en cambio, las ω -Conotoxinas, como la conotoxina **GVIA**, de *C. Geographus* se UNE a sitios en canales de calcio neuronales que no son enlazados por derivados de dihidropiridina (Takemura y Col., 1989).

Existen dos hipótesis para explicar la similitud de actividad de conotoxinas con poca homología estructural. La primera establece que la superficie del conopéptido que interactúa con el receptor (o "farmacóforo") tiene la misma conformación aunque tenga secuencias primarias distintas, pues diferentes secuencias entre residuos de Cys podrían dar lugar a la misma conformación (Olivera y Col., 1991). La segunda hipótesis sugiere que dos conotoxinas estructuralmente divergentes, pero con la misma especificidad farmacológica, pueden interactuar con el "macrositio" del receptor, que puede tener varios "micrositios" diferentes como se muestra en la figura 7.

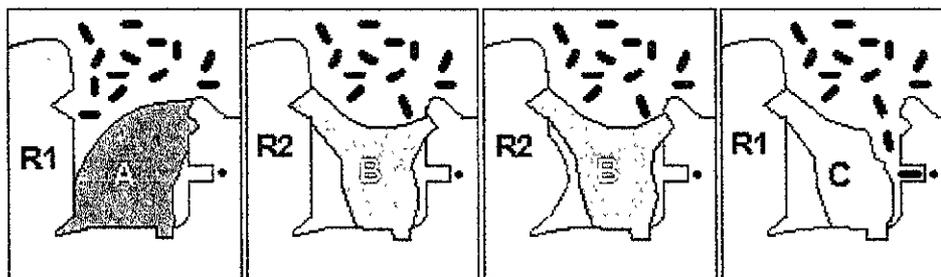


Figura 7: Modelo diagramático de macrositios para conotoxinas. **A** y **B** son conotoxinas antagonistas diferentes (estructural y/o conformacionalmente) que inhiben el enlace del agonista para el receptor **R1**, cada una se enlaza a tres micrositios, ambas comparten dos, ambas dejan uno libre. Una ligera modificación del receptor (un subtipo, **R2**), impediría el enlace de **A**, pero no de **B**. **C** representa el enlace de una posible antitoxina preparada sintéticamente que inhibiría el sitio de enlace de las toxinas sin impedir el enlace del agonista. El sitio para el agonista (elipsoides negras), está marcado por el asterisco.

Este modelo explicaría la afinidad similar, aunque ambos péptidos no sean conformacionalmente equivalentes o provengan de especies diferentes, y las diferencias en la misma entre conopéptidos no homólogos con la misma actividad. Las pequeñas diferencias de forma en diferentes subtipos del mismo receptor explicarían la selectividad filogenética de las conotoxinas de la misma actividad biológica entre receptores homólogos. Así, la ω -conotoxina **MVIC** inhibe el canal de calcio activado por voltaje tipo P en el sistema nervioso central de mamíferos mientras que

la ω -conotoxina **GVIA** no lo hace, aunque todos estos péptidos son activos a nivel de las uniones neuromusculares de los peces. Esta característica convierte a las conotoxinas en compuestos que sirven como excelentes pruebas de receptores y canales iónicos (Myers y Col., 1993).

Las conotoxinas constituyen una sonda promisorio para el receptor con el cual interactúan, siendo capaces de indicar la estructura sobre la cual ocurre el anclaje mediante marcado de residuos por reacciones químicas de rutina. La elevada variabilidad de los residuos inter-Cys encontrada en las conotoxinas homólogas estudiadas, permite la síntesis de una enorme cantidad de péptidos diferentes pertenecientes a la misma categoría de actividad biológica. El análisis a través de técnicas multidimensionales de resonancia magnética nuclear (Farr-Jones y Col., 1995), de series de conotoxinas naturales y sintéticas para establecer sus estructuras tridimensionales, unido a la caracterización de la actividad en diferentes subtipos de canales permite tanto el avance de la investigación sobre la estructura y función de receptores, como el diseño y la preparación de conotoxinas miméticas que pueden resultar fármacos promisorios en la terapia de desórdenes neurológicos como el mal de Parkinson, la isquemia espinal o la esquizofrenia (Olivera y Col., 1990)

FARMACOLOGÍA DE CONOTOXINAS

Hasta ahora han sido caracterizados más de 75 Conotoxinas de venenos de por lo menos 10 especies. Según su modo de acción, hay tres categorías básicas y bien estudiadas, y algunas otras de reciente descubrimiento. Cada una de estas estructuras puede ser asociada a un esqueleto estructural de residuos de Cys. A continuación se describen los diferentes tipos de conotoxinas con base en sus efectos farmacológicos.

CONOTOXINAS CON ACTIVIDAD EN CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR LIGANDO

Receptor nicotínico de acetilcolina

Las primeras conotoxinas que fueron aisladas de venenos de especies de *Conus* fueron designadas α -**CONOTOXINAS**, porque su acción biológica se asemejaba a la de las α -neurotoxinas aisladas de venenos de serpientes, tal como la α -bungarotoxina, que inhibe el receptor nicotínico. Son las conotoxinas más pequeñas aisladas de especies de *Conus*. Contienen dos enlaces disulfuro (entre el primer y tercer residuo de Cys, y entre el segundo y el cuarto), con sólo una excepción, la α -conotoxina **SII**, aislada de *C. striatus*, que tiene tres (Ramilo y Col. 1992); y causan inhibición postsináptica de la unión neuromuscular en vertebrados, causando parálisis y muerte. Los síntomas se parecen a los de envenenamiento con curare, con falla respiratoria final.

El receptor nicotínico de acetilcolina es un canal iónico activado por ligando. Se forma por la unión de la proteína oligómera de la membrana con la acetilcolina, que es el neurotransmisor. También se une a agonistas tales como la nicotina o a antagonistas como la α -bungarotoxina. La unión de acetilcolina o nicotina al receptor induce un cambio conformacional que permite la entrada de sodio y calcio a la célula, lo cual causa la despolarización de la membrana plasmática. Se conocen receptores nicotínicos musculares y neuronales. El receptor nicotínico de acetilcolina es un pentámero formado por diferentes combinaciones de varios tipos de subunidades α , β , δ y γ ó ϵ .

Los receptores musculares tienen la fórmula general $\alpha_2\beta\delta\gamma$ (o ϵ), y dos sitios de unión para acetilcolina ubicados en las subunidades α . En cambio, los receptores nicotínicos de acetilcolina neuronales en general están formados por combinaciones de diversos subtipos de las subunidades α y β (McIntosh y Col., 1999), con dos sitios para la unión de acetilcolina, aunque se han reportado receptores nicotínicos neuronales formados exclusivamente por la unión homomérica de subunidades α (Johnson y Col., 1995).

Las α -conotoxinas compiten por los sitios de unión de acetilcolina en los receptores nicotínicos, y se han reportado tanto α -conotoxinas que antagonizan exclusivamente receptores

nicotínicos de acetilcolina de tipo muscular, como aquellas que solamente antagonizan receptores nicotínicos neuronales. En general, las α -conotoxinas de especies de *Conus* piscívoras inhiben los receptores nicotínicos musculares en mamíferos (Martínez y Col., 1995); los receptores nicotínicos neuronales son inhibidos por α -conotoxinas de especies de *Conus* molusquícivas (Fainzilber y Col., 1994).

Las α -conotoxinas constituyen el único grupo que mantiene una alta homología estructural que permite correlacionar estructura y función. Como puede apreciarse en la tabla IV, las α -conotoxinas presentes en los venenos de especies de *Conus* piscívoras, con la única excepción de **MII** de *C. magus*, actúan sobre receptores nicotínicos musculares y presentan la relación 3/5 en cuanto al número de residuos contenidos entre la segunda y tercera, y tercera y cuarta cisteína. Esta relación es de 4/7 para las α -conotoxinas de especies molusquícivas, con acción sobre receptores nicotínicos neuronales en vertebrados. Además, los residuos intercisteína están sumamente conservados en los diferentes péptidos.

La α -conotoxina **ImI** es la única excepción para este tipo de conopéptidos, pero estudios de estructura de este compuesto demuestran que los tres residuos entre la tercera y cuarta Cys son suficientes para mantener la proporción estructural con el resto de las α -conotoxinas de especies molusquícivas (Maslennikov y Col., 1999) (Figura 8).

El receptor nicotínico de acetilcolina también es inhibido por las α A- y φ -conotoxinas, como la α **A-PIVA** (Hopkins y Col., 1995) y φ **PIIE** (Shon y Col., 1997), respectivamente, ambas aisladas de la especie *C. purpurascens*. Las α A-conotoxinas no muestran similitud estructural con las α -conotoxinas aunque muestran la misma actividad que éstas; mientras que las φ -conotoxinas, que pertenecen a la superfamilia estructural **M**, producen inhibición no competitiva del receptor nicotínico de acetilcolina por unión a un sitio diferente al de unión de la bungarotoxina.

Tabla IV. α -conotoxinas

α -CTx	Secuencia		RNACH
Cnl	GRCC HPACGKYYS C	p	α/δ y α/γ
Gl	ECC NPACGRHYS C*	p	α/δ y α/γ
Ml	GRCC HPACGKNYS C*	p	α/δ y α/γ
Sl	ICC NPACGPKYS C*	p	α/δ y α/γ
MII	GCCSNFVCHLEHSNLC*	p	$\alpha 3\beta 2$
AulA	GCCSYPPCFATNSDYC*	m	$\alpha 3\beta 4$
EI	RDOCCYHPTCNMSMPQIC*	m	α/δ y α/γ
Epl	GCCSDPRCNMNNPDYC*	m	$\alpha 3\beta 2$
PnlA	GCCSLPPCAANNPDYC*	m	$\alpha 3\beta 2$
PnlB	GCCSLPPCALSNPDYC*		$\alpha 7$
lml	GCCSDPRCAWR C*	v	$\alpha 7$

p: piscívoros, m: molusquicívoros, v: vermívoros

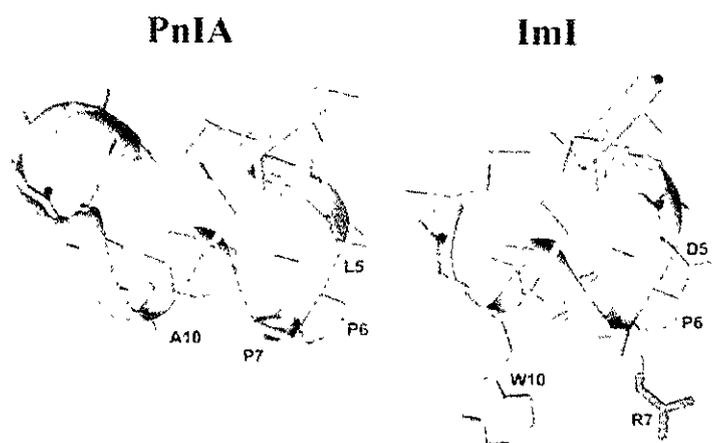


Figura 8: Comparación de las estructuras tridimensionales de las α -conotoxinas PnlA e lml; representación en forma de cinta de las estructuras de las α -conotoxinas PnlA e lml, determinadas mediante resonancia magnética nuclear. (Ilustración tomada de Maslennikov, y Col., 1999)

α -SII

GCCC NPACGPNYG CGTSCS

α A-PIVA

G GGSYONAA THO DS KDRSY LGQ*

ϕ -PIIE

HOCCLYGKCRRYOGCSSASCCQR*

Receptor de glutamato

Las conantokinas actúan inhibiendo un subtipo del receptor de glutamato: el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Haak y Col., 1990). La mayor parte de las sinapsis responsables de la transmisión rápida y excitatoria en vertebrados, usa glutamato como neurotransmisor para la activación de los canales iónicos asociados a este tipo de receptor ionotrópico. Se conocen varios tipos; y éstos se han clasificado según el agonista que los activa.

Los receptores glutamatérgicos de NMDA se activan con N-metil-D-aspartato; son permeables a sodio, potasio y calcio; y son bloqueados por magnesio. Se reconocen diversos subtipos de estos receptores ionotrópicos, de acuerdo al tipo de subunidades (NR1 y NR2) que los formen, y es posible la detección localizada de cada subtipo en diferentes regiones de un organismo.

El glutamato es el neurotransmisor más abundante en el cerebro, y media más del 50% de la transmisión sináptica en el sistema nervioso de los vertebrados. La neurotransmisión a través de glutamato está implicada en casi todos los aspectos del funcionamiento normal del cerebro, incluyendo la memoria, el movimiento, el desarrollo, y la neurodegeneración, y la neurotransmisión anormal de glutamato forma parte de la patofisiología de la mayor parte de los desórdenes psiquiátricos incluyendo la epilepsia, la esquizofrenia, las adicciones, la depresión, la ansiedad y el mal de Parkinson.

Las conantokinas producen una serie de extrañas actividades en los sujetos de experimentación: sueño en ratones jóvenes e hiperactividad en ratones adultos, lo cual sugiere la presencia de diferentes subtipos de receptores de NMDA en animales jóvenes y adultos. Estas conotoxinas se caracterizan por no contener residuos de Cys y presentar una elevada proporción de residuos de γ -carboxiglutamato, que es una modificación postraducciona frecuente en las conotoxinas y que les confiere rigidez conformacional (Lin y Col, 1997). La primera conantokina reportada fue la **Conantokina-G** de *C. geographus*.

Receptor de Serotonina

La serotonina interacciona con una serie de receptores para modular muchos procesos tanto en el sistema nervioso central como en el periférico de mamíferos. De estos receptores, sólo uno, el receptor 5HT₃ es un canal iónico activado por ligando, el resto, son receptores acoplados a proteínas G. El receptor 5HT₃ es similar a los receptores nicotínicos de acetilcolina tanto funcional como estructuralmente.

De la especie *C. geographus*, ha sido aislada la conotoxina σ -GVIIIA, que inhibe el receptor 5HT₃ para serotonina (England y Col., 1998). Este nuevo tipo de péptido, que define a la familia estructural S, tiene 41 residuos de aminoácido de los cuales 10 son Cys, pero la conectividad de éstas aún no ha sido determinada.

CONOTOXINAS CON ACTIVIDAD EN CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR VOLTAJE

Canales de sodio:

Los canales de sodio activados por voltaje son los responsables de la transmisión de señales a través de nervios y membranas musculares. Los canales de sodio activados por voltaje están formados por una sola proteína en la que se reconocen cuatro subunidades homólogas, que tienen cuatro sitios de unión conocidos. La tetrodotoxina (TTX) y saxitoxina (STX) se enlazan al sitio 1 bloqueando la conductancia del canal. La unión de toxinas lipofílicas como batracotoxina y veratridina al sitio 2 implica la activación del canal. Las toxinas de anémonas marinas y las α -toxinas de escorpiones se enlazan al sitio 3 y retardan el proceso de desactivación. Las β -toxinas de escorpiones, al enlazarse al cuarto sitio, promueven la activación del canal.

Las μ -conotoxinas actúan sobre canales de sodio activados por voltaje (Gray y Col., 1988) de músculos pero no de nervios (Cruz y Col., 1985); compitiendo por los sitios de unión para STX y TTX; por lo que bloquean la respuesta de músculo esquelético a estimulación eléctrica directa. El

efecto de las μ -conotoxinas es dependiente del voltaje. Tienen seis residuos de Cys y presentan esqueleto estructural de superfamilia **M**, como la μ -**GIIIA** de *C. geographus*.

Las μ O-conotoxinas, como la μ **O-MrVIA** de la especie molusquívora *C. marmoreus*, poseen esqueleto de superfamilia **O**, similar a los de las ω -conotoxinas, y bloquean los canales de sodio activados por voltaje en un sitio diferente al de unión de STX (McIntosh y Col., 1995b); y las δ -conotoxinas, como la δ -**GmVIA** de *C. gloriamaris*, retardan la inactivación del canal (Shon y Col., 1994). Por otra parte, su estructura química contiene un núcleo de enlaces disulfuro que no permite el arreglo usual de aminoácidos hidrófobos en el interior de la molécula. Se ha pensado por esta razón que estos péptidos se disuelven en la membrana lipídica e interfieren con la apertura y cierre del canal de sodio ejerciendo su efecto en la interfase de la membrana, en lugar de hacerlo desde el ambiente acuoso.

μ - GIIIA	RDCC¹TOOKKCKDRQCKOQRCCA*
μ O-MrVIA	ACRKKWEYCI¹VPIIIGFIYCCPGLICGPFV¹CV
δ - GmVIA	VKPCRKEGQLCDPIFQNC¹CRGWNCVLF¹CV

Canales de calcio

El calcio es un importante regulador de varios procesos bioquímicos en la célula: Los potenciales de acción de la mayor parte de los músculos de invertebrados, y en músculo liso de vertebrados, se logran a través de canales de calcio y no de sodio; estos canales son importantes en el control de la concentración interna de calcio en células musculares, secretoras y en las terminales nerviosas, siendo que el calcio regula la actividad secretora de la célula (hormonas y neurotransmisores); y dado que el calcio actúa como mensajero intracelular para una gran variedad de procesos celulares, los canales de calcio son responsables de los sistemas de control, además de los efectos que tienen en el potencial de la membrana celular.

Los canales de calcio activados por voltaje (CCAV) están formados por el arreglo de una subunidad principal denominada α_1 y de topología similar a la de los canales de sodio,

complementada por subunidades auxiliares α_2 , β , γ y δ .; y son polimórficos, aunque hasta hace muy poco tiempo, el reconocimiento de los diferentes subtipos se basaba únicamente en sus propiedades electrofisiológicas, según su sensibilidad al voltaje, y mediante el uso de dihidropiridinas (DHP) que actúan como antagonistas. Así, se había demostrado que existen CCAV que requieren de mayor voltaje para la activación y son sensibles a las DHP (Tipo L), y aquellos que requieren de menor voltaje y no son sensibles a las DHP. Un tercer tipo, que requiere mayor voltaje para su activación, pero es insensible a las DHP ha sido llamado tipo N ("ni L ni T"); pudiéndose distinguir entre subtipos neuronales y musculares de cada uno de estos tipos. El descubrimiento de las ω -conotoxinas, ha significado el hallazgo de una serie de herramientas farmacológicas fundamentales que permitieran reconocer diferentes subtipos de CCAV (Olivera y Col., 1994).

Las ω -conotoxinas antagonizan canales de calcio neuronales presinápticos regulados por voltaje, evitando así la liberación de neurotransmisores. Contienen seis residuos de Cys en esqueleto estructural de superfamilia **O**, que son los péptidos más abundantes presentes en los venenos de *Conus*. A diferencia de lo que ocurre en el caso de las α -conotoxinas, los miembros de esta familia son sorprendentemente divergentes entre sí en cuanto a los residuos distintos a Cys, tanto inter como intra especies, con influencia en la actividad de los péptidos (Gray y Olivera, 1988) (Tabla V).

La enorme variabilidad en los residuos de aminoácidos diferentes a Cys entre un tipo y otro de ω -conotoxinas tiene influencia en la actividad de los péptidos. Al comparar la actividad de las ω -conotoxinas **GVIA** y **GVIIA**, ambas de *C. geographus*, y **MVIA** y **MVIC** de *C. magus*, todos con secuencias notablemente divergentes, se encontró que aunque todas paralizan y matan a los peces, las tres primeras no tienen actividad sobre sinapsis de mamíferos; únicamente **GVIA** bloquea canales de calcio presinápticos en ranas (Olivera y Col., 1985a) y **MVIC** es un inhibidor efectivo de la actividad sináptica resistente a **GVIA** (Hillyard y Col., 1992).

La ω -**GVIA** (*C. geographus*), se ha convertido en un reactivo usual para medir la inhibición de la liberación de neurotransmisores a través de canales de calcio activados por voltaje. Bloquea la unión neuromuscular del músculo esquelético por inhibición de los canales de calcio sin interferir con los potenciales de acción celulares. Esta toxina bloquea los subtipos L y N en neuronas, pero solamente afecta los subtipos N en músculos. La ω -**MVIA** bloquea los canales de calcio tipo N, y es

de 100 a 1000 veces más potente como analgésico que la morfina, pero no causa adicción. Esta conotoxina (conocida también como **SNX-111** o **Ziconotide**) esta siendo revisada por la FDA de los EE UU en pruebas clínicas para el alivio del dolor intratable (Gibbs, 1996) (Figura 9).

Tabla V: ω -conotoxinas.

Péptido	Estructura	Especie
GVIA	CKSOGSSCSOTSYNCC RSCNOYTKRC Y*	<i>C. geographus</i>
GVIIA	CKSOGTOCSRGMRDCC TSCLLYSNKERRY*	
MVIA	CKGKGAKCSRLMYDCCTGSC RSGKC*	<i>C. magus</i>
MVIIB	CKGKGASCHRTSYDCCTGSCNR GKC*	
MVIIC	CKGKGAPCRKTMVDCCSGSCGRRGKC*	
MVIID	CQGRGASCRKTMVNCCSGSCNR GRC*	
SVIA	CRSSGSOCGVTSI CC GRCYR GK CT*	<i>C. striatus.</i>
SVIB	CKLKGQSCRKTSYDCCSGSCGRSGK C*	

Se muestran en rojo los residuos que se conservan en todos los péptidos. En azul, se muestran los residuos conservados intra-especie. Como puede apreciarse, las ω -conotoxinas son muy divergentes entre sí, siendo que, además del esqueleto de Cys, el único residuo que se conserva en todos los ejemplos es la Gly5

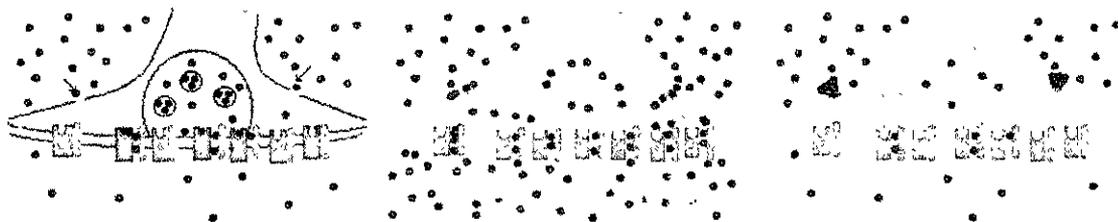


Figura 9: Mecanismo de acción de la conotoxina MVIIA (Ziconotide). **A)** En condiciones normales, la entrada de calcio a los terminales nerviosos presinápticos, a través de canales de calcio activados por voltaje tipo N (CCAV-N), provoca la liberación de glutamato, el paso del calcio al interior celular y la propagación de la señal neuronal. **B)** La sobrestimulación de neuronas nociceptivas con el consiguiente exceso de paso de calcio intracelular, conduce a los síndromes de dolor crónico. **C)** El bloqueo de los CCAV-N con el antagonista específico **Ziconotide** (péptido sintético idéntico a MVIIA), inhibe la inadecuada liberación de glutamato y previene la entrada excesiva de calcio a la célula, protegiéndola de los daños producidos por calcio en estados isquémicos, o bloqueando la sensación de dolor en las neuronas nociceptivas.

Canales de potasio

Recientemente se han aislado conotoxinas con actividad en canales de potasio. La κ -**PVIA**, aislada de la especie *C. purpurascens* inhibe el canal de potasio SHAKER, causando parálisis rígida inmediata en la presa envenenada, al producir un choque excitotóxico (Shon y Col., 1998). Este tipo de conotoxinas presenta esqueleto de Cys similar al de las ω -conotoxinas. La κ **A-SIVA**, aislada de la especie piscívora *C. striatus* antagoniza canales de potasio activados por voltaje. Presenta esqueleto de Cys que pertenece a la superfamilia estructural **A**, y es el primer ejemplo de conotoxina que contiene un elevado número de residuos distintos de Cys en el extremo amino, antes de la primera Cys.

κ - PVIA	CRIONQKCFQHLDDCCSRKCNRFNKCV
κ A-SIVA	EKSLVPSVTTTCCGYDOGTMCOOCRCTNSC*

CONOTOXINAS DE BLANCO DESCONOCIDO

Uno de los péptidos pertenecientes a la superfamilia T de conotoxinas, la ε -**TxIX**, aislada de *C. textile*, selectivamente reduce la liberación de neurotransmisores en la sinapsis colinérgica de *Aplysia* mediante reducción de la entrada de calcio presináptico (Rigby y Col., 1999); sin embargo, a pesar de que se demuestra que tanto la entrada de Ca^{+2} como la liberación de acetilcolina se reducen al exponer el tejido a la acción de la ε -**TxIX**, los autores concluyen que el efecto de la conotoxina podría deberse tanto a la inhibición de canales de calcio presinápticos activados por voltaje, como a la acción de este péptido sobre otras estructuras macromoleculares como receptores presinápticos acoplados a proteínas G.

Los miembros de la superfamilia T de conotoxinas contienen, al igual que las α -conotoxinas, cuatro residuos de Cys que mantienen la secuencia $\text{C}_1\text{C}_2\text{-C}_3\text{-C}_4$, (C_1 y C_2 adyacentes); y conectividad inter Cys $\text{C}_1\text{-C}_3$ y $\text{C}_2\text{-C}_4$, variando el número de residuos intercisteína. Recientemente ha sido descubierta en la especie molusquívora *C. marmoreus*, una nueva familia de conotoxinas

de cuatro Cys, las λ -conotoxinas (Balaji y Col., 2000). Este nuevo tipo mantiene la secuencia de Cys conocida para α - y ε -conotoxinas, pero a diferencia de estas, la conectividad intercisteína es C₁-C₄ y C₂-C₃. Aún no se conoce con precisión el blanco molecular de estos péptidos, aunque se ha reportado que la especie amidada de **CMrVIB** inhibe el transportador de noradrenalina (Sharpe y Col., 2001). Sin embargo, la inyección intra-cerebro-ventricular (icv) en ratones de **CMrVIA** produce convulsiones mientras que **CMrX** produce parálisis flácida, por lo que los mecanismos de acción de los péptidos de esta familia aún no están claramente definidos.

CMrVIA	VCCGYKLCHOC
CMrVB	VGVC CGYKLCHOC
CMrX	GICCGVSFCYOC

Recientemente, han sido aisladas nuevas familias de conotoxinas en base a los cambios conductuales que ocasiona la inyección icv en ratones de los péptidos puros. Así, se ha aislado de la especie *C. textile* un péptido de nueva secuencia de Cys que se ha denominado “Péptido espasmódico”, ya que los ratones inyectados con este péptido adquieren el comportamiento de una línea mutada de ratones conocida como “ratones espasmódicos” (Lirazán y Col., 2000). Este mismo bioensayo en ratones, ha permitido el descubrimiento de la familia de los Contrifanos, que son octa-péptidos que contienen dos Cys, con alta conservación de los residuos intercisteína, y que contienen D-Trp o D-Leu en la cuarta posición. Estos péptidos producen el síndrome de “cola tiesa” al ser inyectados icv a ratones, a dosis medias, y a dosis altas producen convulsiones y muerte. Sin embargo, aún no se ha determinado el blanco molecular de estas dos nuevas familias de conotoxinas (Jiménez y Col., 1996; Jacobsen y Col., 1998).

CONOTOXINAS QUE ACTUAN COMO AGONISTAS DE CANALES IÓNICOS Y RECEPTORES

La mayor parte de los estudios realizados en venenos del género *Conus* ha sido realizada sobre especies piscívoras, por lo que resulta razonable que estos contengan una serie de toxinas que actúan sinérgicamente para bloquear la transmisión neuromuscular de la presa mucho más

rápida que el caracol; es por esto que las conotoxinas reseñadas hasta ahora actúan inhibiendo el funcionamiento normal de su blanco.

El estudio del veneno de la especie molusquívora *C. pennaceus* ha permitido el aislamiento de un nuevo tipo de conotoxinas, que en este caso resultan ser agonistas. Para especies de *Conus* que se especializan en alimentarse de otros moluscos, bien sean caracoles o bivalvos, no es conveniente que la presa sea paralizada luego de la inyección del veneno, por cuanto esto implicaría que el animal paralizado se retraería en su concha por lo que para el caracol sería casi imposible usarlo como alimento. Las especies molusquívoras, como *C. textile* y *C. pennaceus*, que se alimenta de otros caracoles (incluyendo otros *Conus*), contiene en su veneno toxinas que permiten la relajación de los músculos de la presa de manera que esta salga de su concha.

De esta última especie ha sido aislada una conotoxina que es agonista de canales catiónicos de tipo marcapaso en neuronas de *Lymnaea* (Fainzilber y Col., 1998). Esta conotoxina, llamada γ -PnVIIA, tiene esqueleto de Cys de la O-superfamilia, pero sus residuos intercisteína no tienen homología estructural con las ω -, μ O o δ -conotoxinas, sino con la toxina excitatoria TxVIIA aislada de *C. textile*, de la que se ha reportado que incrementa la excitabilidad de membrana en *Aplysia* (Lev-Ram y Col., 1993). La tabla VI muestra las secuencias de las conotoxinas PnVIIA y TxVIIA y las compara con otras conotoxinas de la superfamilia O.

Tabla VI. Comparación entre miembros de la O-superfamilia de Conotoxinas

Péptido	Secuencia			Especie
γ -PnVIIA	DCTSWFGRCTVNS γ	CCS NSCDQTYC γ	LYAFOS	<i>C. pennaceus</i> (m)
γ -TxVIIA	CGGYSTYC γ	VDS γ	CCSDN CVRSYCTLF*	<i>C. textile</i> (m)
ω -GVIIA	CKSOGTCC	SRGMRDCCTS	CLLYSNKCRRY	<i>C. geographus</i> (p)
μ O-MrVIA	ACRKKWEYCVIPLIGFIYCCPGLICGPFV	CV		<i>C. marmoreus</i> (m)
δ -PVIA	EACYAOGTFC	GIKOGLEC	SEFCLPGV CFG	<i>C. purpurascens</i> (p)

m: molusquívoro; p: piscívoro

También han sido aisladas de especies de *Conus* dos familias de análogos a neuropéptidos endógenos, que en ambos casos han resultado ser agonistas. En 1987 Cruz y Col. aislaron de la especie *C. geographus* el primer miembro de la familia de las Conopresinas, la **Lys-Conopresina-G**; este péptido produce un incremento en el rascado cuando es inyectado icv a ratones. Aunque las conopresinas son probablemente péptidos endógenos de moluscos, claramente homólogos a la familia de vasopresina/oxytocina, se ha especulado que su presencia en el veneno de los *Conus*, más que cumplir con la función endógena prevista para este tipo de neuropéptidos, puede ayudar en el proceso de envenenamiento; facilitando, por ejemplo, la movilización del veneno en la víctima (Olivera y Col., 1985a).

Recientemente, Craig y Col. han caracterizado en la misma especie *C. geographus*, el único análogo a neurotensinas aislado de un invertebrado, que ha sido denominado **Contulakina-G** (Craig y Col., 1999a). Este péptido fue aislado del veneno siguiendo el comportamiento de ratones inyectados icv (que se hacían lentos luego de la inyección y sólo caminaban si eran forzados a hacerlo). La porción de la secuencia cercana al carboxilo terminal se asemeja a la de neurotensinas, por lo que el efecto de la inyección icv en ratones de este péptido fue comparado con el producido por la inyección de neurotensina, encontrándose que ambos efectos son equivalentes; y se determinó la afinidad de enlace de este péptido a receptores de neurotensina.

Contulakina-G (<i>C. geographus</i>)	ZSEEGGSNAT ⁺ KKPYIL
Neurotensina (Hipotálamo bovino)	ZLYENKPRRPYIL
Xenina (Mucosa gástrica humana)	MLTKFETKSARVKGLSFHPKRPWIL

INFLUENCIA DE LAS CONOTOXINAS EN EL COMPORTAMIENTO DE RATONES

Al presente, se han caracterizado más de 75 conotoxinas y/o conopéptidos de venenos de por lo menos 10 especies. El género *Conus* está formado por alrededor de 600 especies, y cada una de ellas contiene aproximadamente 100 péptidos diferentes en su veneno, y se ha demostrado la importancia de algunos de ellos como herramientas para investigar el sistema nervioso.

Muchas de estas conotoxinas actualmente bien caracterizadas tanto bioquímica como fisiológica y farmacológicamente, fueron inicialmente purificadas con base en la acción que ejercían cuando se inyectaban en el sistema nervioso central del ratón. Así, uno de los estudios iniciales con la especie *C. geographus* consistió en la inyección icv de cada uno de las diferentes fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del veneno total, observándose que la mayor parte de estas ejercían efectos que modificaban el comportamiento normal de los ratones, y que estas modificaciones eran de naturaleza variable según el péptido (Olivera y Col., 1990). Este mismo experimento se realizó luego con las fracciones separadas mediante cromatografía de la especie *C. magus*, y los resultados se ilustran en la figura 10. Las ω -conotoxinas MVIIA y MVIIB fueron purificadas de las fracciones que provocaron un constante temblor en los ratones inyectados. Igualmente, las fracciones de la cromatografía del veneno total de *C. geographus* que provocaron temblor al ser inyectados en ratones, resultaron luego ser ω -conotoxinas.

Muchas otras clases de conopéptidos han sido igualmente purificados con base en la modificación que producen al ser inyectados en el cerebro de ratones, así, las conantokinas producen sueño en ratones menores a 14 días e hiperactividad en ratones de mayor edad; los ratones inyectados icv con contulakinas se ponen lentos o “perezosos”, y solamente caminan si son forzados a hacerlo; la inyección icv de contrifanos produce rigidez y horizontalidad de la cola de los ratones; la inyección icv de α - y μ -conotoxinas en ratones, invariablemente produce la parálisis y muerte del animal; y las conopresinas producen un notable incremento en la actividad de “rascarse” y “acicalarse” de los ratones.

Las modificaciones de comportamiento producidas por la inyección icv de conotoxinas en ratones han sido empleadas para la búsqueda y caracterización de los péptidos de la misma familia. Como ejemplo de esto, se aprovechó el resultado de este bioensayo para obtener una conopresina de la especie *C. imperialis*, que fue repurificada de la fracción del veneno total que producía incremento en el rascado luego de la inyección icv en ratones. Así, fue posible ubicar las conopresinas de especies vermívoras, dado que las primeras conopresinas aisladas se obtuvieron de especies piscívoras (Nielsen y Col., 1994).

Igualmente, el bioensayo mediante inyección icv en ratones permite la caracterización fisiológica de las conotoxinas. Las conopresinas dan lugar a dos conductas distintas luego de la inyección icv en ratones que se observan inmediatamente después que el ratón es levantado por la cola durante un segundo y luego colocado sobre un mesón de trabajo. En primer lugar, el animal camina unos pocos pasos y luego descansa con sus patas traseras abiertas y el vientre sobre el mesón, y así permanece a menos que sea empujado; y luego el animal continúa lento o "perezoso", pero la posición de sus patas traseras se asemeja a la de los ratones control, o inyectados solamente con solución salina normal. Los mismos efectos se producen por la inyección de neurotensina; el tiempo de aparición y recuperación de cada uno de estos síntomas puede ser registrado a diferentes dosis de inyección de contulakina-G, y luego comparado con la duración de los mismos luego de la inyección de neurotensina, lo que permite afirmar que la contulakina-G es el primer péptido análogo a neurotensinas aislado de invertebrados. En este estudio, se realizaron ensayos de enlace entre contulakina-G y neurotensina a receptores de neurotensina, que permitieron corroborar este resultado (Craig y Col., 1999a).

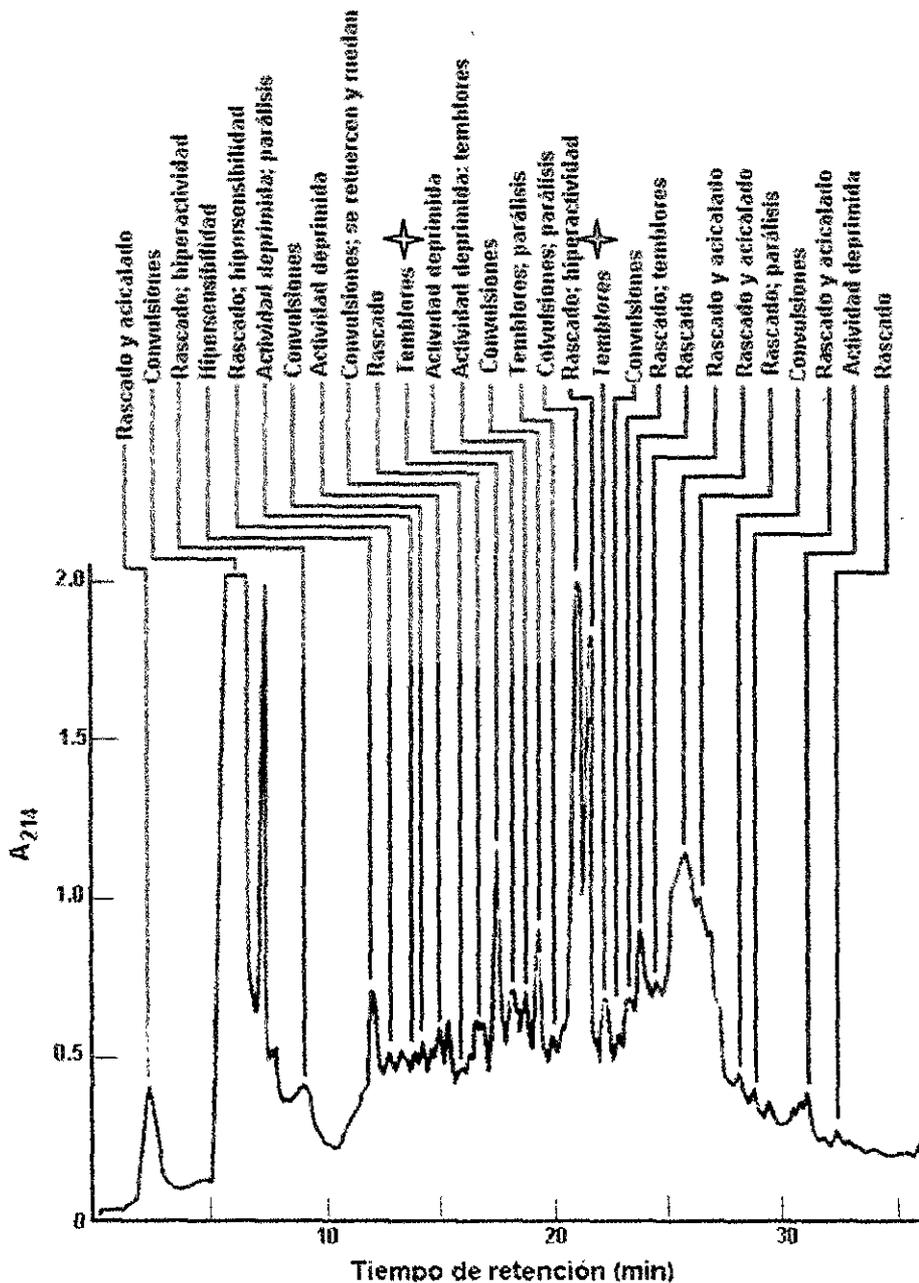


Figura 10: Cromatograma del veneno total de la especie *C. magus* mostrando las modificaciones en el comportamiento de ratones producidas por la inyección icv en ratones. La estrella roja marca la fracción donde MVIIIB fue purificada y la azul corresponde a la fracción que permitió la purificación de MVIIA. (ilustración adaptada de Olivera, 2000).

HIPÓTESIS

- La especie *Conus spurius* var. *atlanticus*, contiene en su veneno un gran número de péptidos diferentes.
- Los péptidos puros separados de venenos de *Conus spurius* var. *atlanticus*, tienen actividad sobre canales iónicos y/o receptores del SNC (receptores nicotínicos de acetilcolina, canales de Na⁺ activados por voltaje, canales de Ca⁺² activados por voltaje, receptores de glutamato, etc.).
- Los péptidos puros separados de venenos de *Conus spurius* var. *atlanticus*, actúan a nivel del sistema nervioso de vertebrados, produciendo cambios en su comportamiento

OBJETIVOS

GENERAL

El objetivo de esta Tesis fue estudiar los extractos de venenos de la especie *Conus spurius*, desde el punto de vista químico y biológico. Se logró la separación de las conotoxinas presentes en el veneno este caracol, e identificar química y biológicamente algunos de los compuestos separados del veneno.

ESPECÍFICOS

- Obtención del veneno total de la especie *C. spurius*.
- Separación de los componentes del veneno.
- Purificación de algunas conotoxinas.
- Determinación de la estructura primaria de las conotoxinas aisladas y purificadas, mediante secuenciación y espectrometría de masas.
- Determinación de la actividad biológica de las conotoxinas aisladas y purificadas mediante biensayo a través de la inyección icv en ratones.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de conotoxinas de especies de conos es de relevancia fundamental por varias razones:

- Por sus características individuales de alta especificidad y gran afinidad, las Conotoxinas pueden ser usadas para el estudio de moléculas clave del sistema nervioso central (SNC).
- El estudio de la acción específica de cada conotoxina en canales iónicos del mismo tipo en diferentes especies animales, permite la ampliación del conocimiento en cuanto a los canales en sí, al permitir la detección de nuevos subtipos de cada receptor.
- Por tratarse de moléculas relativamente pequeñas, la síntesis de conotoxinas es un proceso relativamente fácil, lo cual permite la obtención de cantidades suficientes de los neuropéptidos plenamente identificados y de actividad interesante, y su marcaje radiológico, para facilitar los estudios de estructura-función.
- La preparación de conotoxinas sintéticas con modificación de los residuos originales intercisteína, permite la localización exacta de sitios de acción ligando-receptor.
- El conocimiento de la estructura tridimensional o espacial de las uniones conotoxina-receptor (sitios), permite el diseño de otras especies miméticas (**Olivera y Col., 1991**), capaces de enlazarse de manera eficiente y única al receptor deseado, siendo esto fuente de diseño de drogas con nuevas propiedades y especificidades.
- Por último, la especificidad que han mostrado algunas conotoxinas, y la facilidad de su síntesis, las convierte en promisorios agentes farmacológicos.

ANIMALES, MATERIALES Y MÉTODOS

COLECCIÓN DE ESPECIES DE *CONUS*

La especie *Conus spurius*, se colectó por arrastre entre 37 y 100 metros de profundidad, en aguas del Mar Caribe, alrededor de Puerto Morelos, Quintana Roo. Inmediatamente después de colectados, los ejemplares se congelaron, y así fueron enviados al laboratorio, donde se mantuvieron a -70°C hasta ser usados.

IDENTIFICACIÓN DE ESPECÍMENES

Los ejemplares colectados fueron identificados como *C. spurius* var. *atlanticus*, por observación de las características externas de sus conchas, y comparación de éstas con prototipos reportados para la especie (Abbott y Dance, 1990; www.Gastropods.com; www.coneshell.net).

EXTRACCIÓN DE VENENOS

En una primera etapa, cuatro ejemplares pequeños (de 4 a 5 cm de largo), de *C. spurius* var. *atlanticus* fueron disecados para aislar el conducto del veneno (Figura 11). Los conductos fueron homogeneizados juntos usando para ello 2 ml de una solución al 0.5% de ácido trifluoroacético (TFA), en una mezcla de ACN al 40% en agua (Mezcla de extracción, ME). La mezcla homogeneizada fue centrifugada por 15 min a 12,000 rpm, usando para ello una centrífuga de mesa SORVAL, modelo MC12. El sobrenadante fue separado y guardado. El botón fue nuevamente homogeneizado con otros 2 ml de ME, tras lo cual la mezcla fue sonicada en un sonicador BRANSON SONIC POWER, modelo Sonifier B-12 (Smith Kline), cuatro veces durante 30 s cada vez a 0°C ; tras lo cual fue centrifugada por 15 min a 12,000 rpm, y separado el sobrenadante. Los dos sobrenadantes unidos fueron secados a vacío usando un evaporador SAVANT modelo Speed Vac Plus SC110A; obteniéndose una pequeña cantidad de veneno crudo liofilizado (primer lote de

empleado comenzó con una mezcla 95:5% de soluciones A y B respectivamente, y se incrementó la proporción de solución B a razón de 1% por minuto; la elución se realizó con un flujo de 1 ml/min. Se empleó un asa de 200 μ l para cargar la muestra, y las fracciones se recolectaron en tubos Eppendorff de 1.5 ml, con base en el cambio en la absorción a 220 nm.

A fin de comparar el perfil cromatográfico del segundo lote de veneno crudo con el del primero, parte del segundo lote de veneno fue separado en sus componentes mediante CLAE-FR analítica. Para ello, porciones del veneno total fueron disueltas en 400 μ l de ME e inyectadas en dos porciones de 200 μ l cada una usando un asa de 200 μ l para cargar la muestra, en la misma columna analítica empleada para la separación del primer lote de veneno. Posteriormente, el veneno crudo fue separado en forma gruesa en sus componentes, mediante el uso de una columna semipreparativa de CLAE-FR de C-18, (Vydac, 218TP510, 10 x 250 mm, 5 μ m de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro) equipada con precolumna de C-18 (Vydac, 218GK54, 4.6 x 10 mm, 5 μ m de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro), y filtro (Alltech, 28689; 4 mm, 2 μ m tamaño de poro). Para esta separación, una alícuota de la muestra fue disuelta en 1.5 ml de ME, se cargó al cromatógrafo en un asa de 2 ml, y se empleó un flujo de 5 ml/min. En todos los casos se emplearon las mismas soluciones (Solución A y Solución B), y el mismo gradiente de elución (5 a 100% de solución B en 95 minutos).

PURIFICACIÓN DE CONOTOXINAS

La purificación de cada una de las conotoxinas estudiadas se realizó mediante CLAE-FR analítica, empleando las mismas soluciones de elución (Solución A y Solución B), y diferentes gradientes de elución.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Secuenciación de conotoxinas.

La estructura primaria de cada uno de los péptidos purificados fue determinada mediante secuenciación química automática, empleando el método de degradación de Edman, en un secuenciador de Applied Biosystems modelo PROCISE 491.

Espectrometría de masas.

Los espectros de masa fueron obtenidos a través de la técnica de ionización mediante rocío de electrones (Electrospray ionization mass spectra; ESIMS), usando un espectrómetro de masas Micromass Quattro II de triple cuadrupolo, en el departamento de Química de la Universidad de Utah, Salt Lake City. Las muestras (aproximadamente 100 pmoles de cada una), fueron disueltas en 100 μ l de una mezcla al 50% de metanol y agua, e inyectadas automáticamente en el mismo sistema de solvente a un flujo de 0.05 ml/min. El instrumento fue calibrado para realizar un barrido en el rango de relación masa a carga (m/z) de 50 a 2000, con un voltaje capilar de 2.7 kV y un voltaje cónico de 50 V; Los datos resultantes fueron analizados mediante el programa MassLynx.

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

Los péptidos fueron sintetizados mediante la técnica estándar de acoplamiento de N-(9-fluorenilo)metoxycarbonil-aminoácidos (Fmoc), usando tetrafluorborato de 2-(1H-benzotrazol-1-il)1,1,3,3-tetrametiluronio) y dicitclohexilcarbodiimida para efectuar el acoplamiento; mediante un sintetizador automático de péptidos de Applied Biosystems modelo 431A, en la Universidad de Utah, Salt Lake City, USA. Todos los aminoácidos fueron comprados en Bachem, Torrance, California USA. Las conorfamidas Sr1 y L-Sr2 fueron sintetizadas sobre una resina Fmoc-amido comprada a Applied Biosystems, y la Conorfamida Sr1 con el extremo carboxilo libre fue preparada sobre resina fenilica Fmoc tipo Wang comprada a Torrance. Después de la síntesis, el grupo Fmoc-terminal fue removido *in situ*, por tratamiento con 20% de piperidina en N-metil-pirrolidona. En un procedimiento estándar de liberación del péptido de la resina, la conorfamida Sr1 acoplada a 134 mg de resina fue cortada de ésta por agitación suave durante 2 h con 2 ml de TFA/H₂O/etanoditiol/fenol/tioanisol

(80/5/2.5/7.5/5 v/v) a temperatura ambiente(TA). La mezcla de reacción fue filtrada sobre 200 ml de metil-t-butil éter (MTBE) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo cual permite la precipitación del péptido liberado. El recipiente de reacción fue lavado con 1 ml de TFA que fue posteriormente filtrado sobre la misma solución de MTBE. Esta solución fue centrifugada a 5,000g por 5 min para obtener el botón de la precipitación del péptido. El sobrenadante se descarta y el botón se lava dos veces con MTBE, tras lo cual es disuelto en 25 ml de solución al 0.1% de TFA en 60% de acetonitrilo en agua (Solución B60) y guardada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS

La solución de péptido sintética fue diluida a 250 ml con Solución B60, y purificada mediante CLAE-FR preparativa en una columna de C18 (Vydac 218TP152022; 25 x 250 mm, 5 μm de tamaño de partícula, 300 A de tamaño de poro), equipada con precolumna de C-18 (Vydac, 218GK54, 4.6 x 10 mm, 5 μm de tamaño de partícula, 300 A de tamaño de poro), y filtro (Alltech, 28689; 4 mm, 2 μm tamaño de poro). La elución se efectuó a 20 ml/min, empleando diferentes gradientes de mezcla de Solución A y Solución B60; se recogieron fracciones de 12 ml con base en la absorción a 220 nm. El contenido y pureza de cada fracción fue verificado por CLAE-FR analítica, y algunas fracciones fueron repurificadas mediante CLAE-FR semipreparativa.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

Los péptidos fueron bioensayados mediante inyección icv en ratones Swiss Webster, de 12 a 24 días de nacidos, en la zona indicada en la figura 12. Para ello, dosis variables de cada uno de los péptidos purificados disueltos en 20 μl de solución salina normal (SSN) se inyectaron en el ventrículo derecho de la cabeza de los ratones como se muestra en la figura 12, usando jeringas para insulina Becton Dickinson Ultra Fine de 0.3 ml, con agujas de calibre 29. Una vez inyectados, los ratones fueron colocados en una caja para observar su comportamiento, lo cual se realizó por períodos de entre 1 y 4 horas. En cada experimento se inyectaron ratones con 20 μl de SSN como controles. Para la determinación del lugar exacto de inyección que permite la entrada de la toxina al

ventrículo, dos ratones de 17 días de nacidos fueron inyectados con 20 μ l de azul de pontamina, tras lo cual los ratones fueron perfundidos con solución salina primero, y con formaldehído al 10% después, y posteriormente fueron decapitados, el cerebro aislado, congelado y cortado. Fotografías de los cortes demuestran la presencia de colorante en el ventrículo luego de inyectar en el lugar que se muestra en la figura 12.

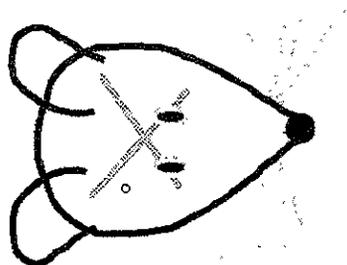


Figura 12: Zona para inyección icv.

CORTE DE L-CONORFAMIDA Sr2 CON ENDOPROTEINASA Asp-N

La conorfamida L-Sr2 fue sometida a corte enzimático con endoproteinasa Asp-N de Roche. Para ello, 2 μ g de la endoproteinasa Asp-N se disolvieron en 50 μ l de agua lo que permite obtener la enzima disuelta en Tris-HCl 10 mM a pH 7.5. Luego, varias porciones de 2.0 nmol (3.08 μ g) del péptido se disolvieron en 500 μ l de solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM a pH 8.0, y sobre cada una de ellas, se añadieron cantidades que variaron entre 1 μ l (0.04 μ g) y 6 μ l (0.24 μ g) de la enzima disuelta; la mezcla de reacción fue burbujeada con N₂, e incubadas por períodos de entre 2 y 18 h, a 37 °C. Al finalizar cada reacción, la mezcla fue diluída con 500 μ l de solución A y separada mediante CLAE-FR analítica usando un gradiente de elución de 0 a 45% de solución B en 45 minutos. Para cada una de las diferentes condiciones de corte enzimático se corrió un blanco sin péptido.

CORTE L-CONORFAMIDA Sr2 CON CNBr

L-Conorfamida Sr2 (2 nmol), se disuelven en 400 μ l de solución de CnBr 4.5 mM en 70% de HCOOH, la mezcla se burbujea con N₂ y se deja a TA por 24 h. tras lo cual fue diluída con 600 μ l de

solución A y evaporada a sequedad y luego disuelta otra vez en 600 μl de solución A y evaporada nuevamente. La mezcla de reacción seca se separó mediante CLAE-FR analítica usando un gradiente de 5 a 45 % de Solución B en 40 minutos. Como control, se incubó una mezcla en las mismas condiciones pero sin péptido.

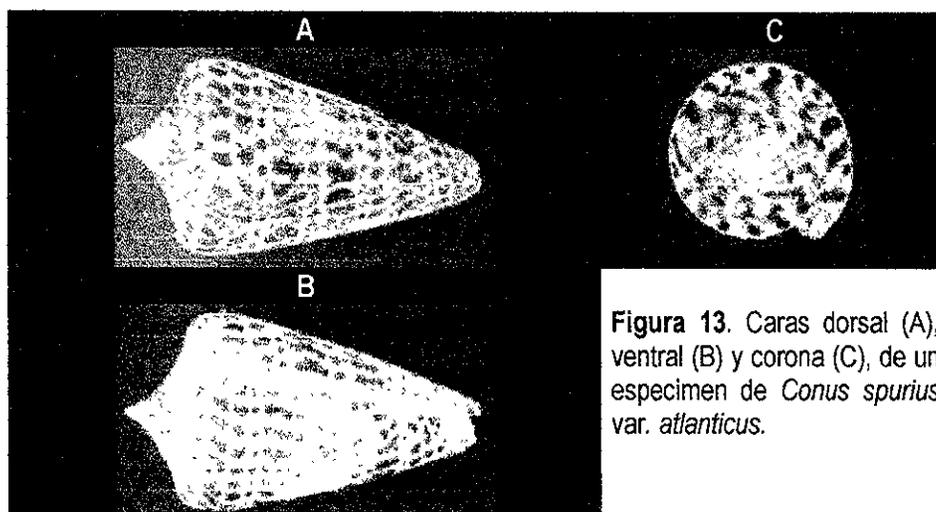
CORTE DE L-CONORFAMIDA Sr2 Y CNF4 CON QUIMIOTRIPSINA

L-Conorfamida Sr2 (8.8 nmol), se disuelven en 500 μl de Tris.HCl 100mM y 10 mM CaCl_2 a pH 8.0, y a la mezcla se añaden 2 μg de quimiotripsina disueltos en 2 μl de HCl 1 mM, se burbujea con N_2 y se incuba a TA. A los 45 minutos, una alícuota de 250 μl de esta mezcla se diluye a 500 μl con Solución A y se analiza mediante CLAE-FR analítica, usando un gradiente de elución den 10 a 45 % de Solución B en 35 minutos. Los restantes 250 μl de mezcla de reacción son diluidos a 500 μl con solución A y analizados usando igualmente CLAE-FR analítica. Bajo estas mismas condiciones, 9.5 nmoles de CNF4 sintético se cortan con 2 μg de quimiotripsina. Alícuotas correspondientes a los 45 minutos y 2 horas de reacción fueron analizados por CLAE-FR analítica usando el mismo gradiente de elución.

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN DE ESPECÍMENES

En la figura 13 se muestran las caras dorsal y ventral y la corona de uno de los especímenes colectados y trabajados en este estudio. Tanto el patrón del dibujo de la concha como su coloración, y el lugar de donde fueron colectados (Mar Caribe Mexicano), permite señalar que se trata de la especie *Conus spurius*, que se encuentra presente en la provincia caribeña, desde el este del estado Florida (EE UU), hasta el este de Venezuela en el océano Atlántico.



Los especímenes colectados de *C. spurius* presentan las siguientes características: de 3 a 11 cm de largo, concha cónica color marfil con manchas cafés oscuras en el patrón característico para la especie, que está compuesto de rectángulos grandes y pequeños en vueltas concéntricas en la misma dirección del último giro de la concha. La corona es en general chata y presenta entre 10 y 11 vueltas en la espira desde la protoconcha o ápice hasta el hombro. En ocasiones, es posible observar parte de un periostraco café más claro que el de las manchas. No presenta hendiduras en los canales anal ni posterior. El interior de la concha es de color blanco y puede apreciarse en la abertura y canal sifonal que son amplios. En general, la relación entre la longitud de la espira y el

cuerpo del caracol es de 1.8, y aún en los especímenes muy grandes la longitud de la corona no excede de 1 cm. Las conchas son lisas sin tubérculos o rugosidades y el canal sifonal es recto.

En la figura 14, se compara uno de los especímenes que fueron colectados y trabajados (Fig. 14 A) con prototipos de las diferentes variedades reportadas para esta especie (Abbott y Dance, 1990; Pagina Web de G. Paganelli; Guía Internet de Gastrópodos Marinos de Hardy). Algunos de los ejemplares trabajados presentaron restos de periostraco oscuro, tal y como se ha observado en la variedad *atlanticus* de la especie *C. spurius* (Ver figura 14 H) (Guía Internet de Gastrópodos Marinos de Hardy).

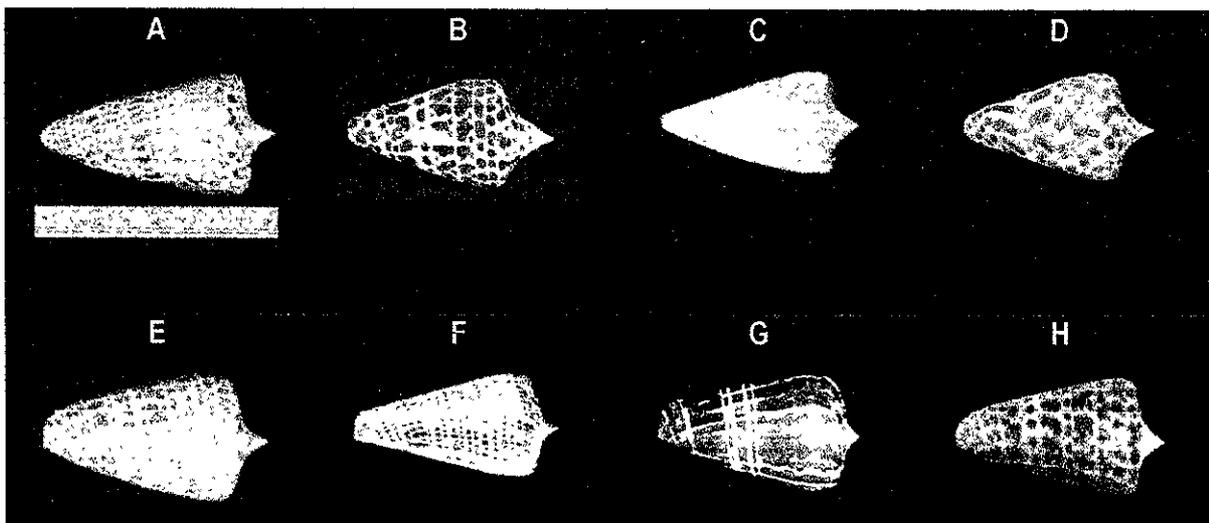


Figura 14: Variedades de *C. spurius*. **A:** Especimen de *C. spurius* var. *atlanticus*, de 8.5 cm de longitud; procesado durante la elaboración de este trabajo; **B:** *C. spurius*; **C:** *C. spurius* var. *aerofasciatus*; **D:** *C. spurius* var. *arubaensis* **E:** *C. spurius* var. *atlanticus*; **F:** *C. spurius* var. *lorenzianus*; **G:** *C. spurius* var. *ochraceus*; **H:** *C. spurius* var. *atlanticus* con periostraco.

Como puede apreciarse en la figura 14, el patrón de dibujo de la concha de los especímenes colectados no es comparable al que presentan las variedades *C. spurius aerofasciatus* o *C. spurius ochraceus*; y el holotipo reportado para la especie *C. spurius* presenta la espira más elevada con relación a la longitud del cuerpo del caracol, que la observada en los ejemplares colectados. Además, el interior de la concha de *C. spurius* presenta una coloración café, ausente en los especímenes recogidos. La variedad *arubaensis* tiene un patrón de dibujo ligeramente diferente, y es endémica de la zona caribeña comprendida entre el noroeste de Venezuela y el sur de las Indias

Occidentales. Finalmente, la subespecie *lorenzianus*, muestra una forma característica en la parte inferior del último giro, y diferente a la del resto de las variedades que se afinan de manera uniforme en esta zona.

La comparación entre los caracoles colectados con las diferentes variedades reportadas para la especie *C. spurius* permite afirmar que esta especie corresponde a la variedad *C. spurius atlanticus*.

SEPARACIÓN DEL VENENO TOTAL

La figura 15 muestra el cromatograma de la separación analítica del primer lote del veneno total de *C. spurius*; del cual fueron separados y purificados los tres péptidos que se señalan en la figura.

La Figura 16 muestra el cromatograma de la separación analítica del segundo lote de veneno, y en la figura 17, el patrón cromatográfico de la separación semipreparativa de este mismo lote de veneno. En la figura 16 se señalan los péptidos que fueron separados y purificados de este segundo lote de veneno.

PURIFICACIÓN DE CONOTOXINAS DE *C. spurius*

Del veneno total de la especie *C. spurius*, fueron separados y purificados once péptidos, a los cuales se les determinó su estructura primaria parcial, según se muestra en la tabla VII. En este trabajo se presentan resultados correspondientes a cuatro de estos péptidos: Conorfamida Sr2 (SpIIA, Figura 15 B), Conorfamida Sr3 (SpIVA, Figura 16 G), Conorfamida Sr1 (SpIVB, Figura 16 H) y ϵ -SrIXA (SpIH, Figura 16 K).

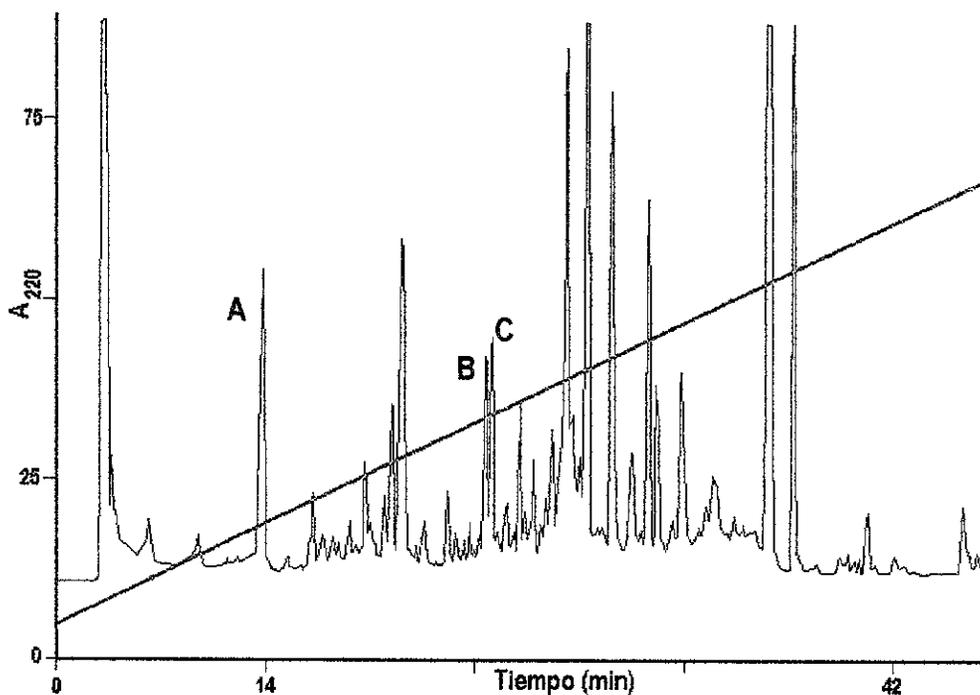


Figura 15. Cromatograma de la separación analítica del primer lote del veneno total de *C. spurius*. A: SpIA; B: Conorfamida Sr2 (SpIIA) y C: SpIIB. (AUFS = 1.5)

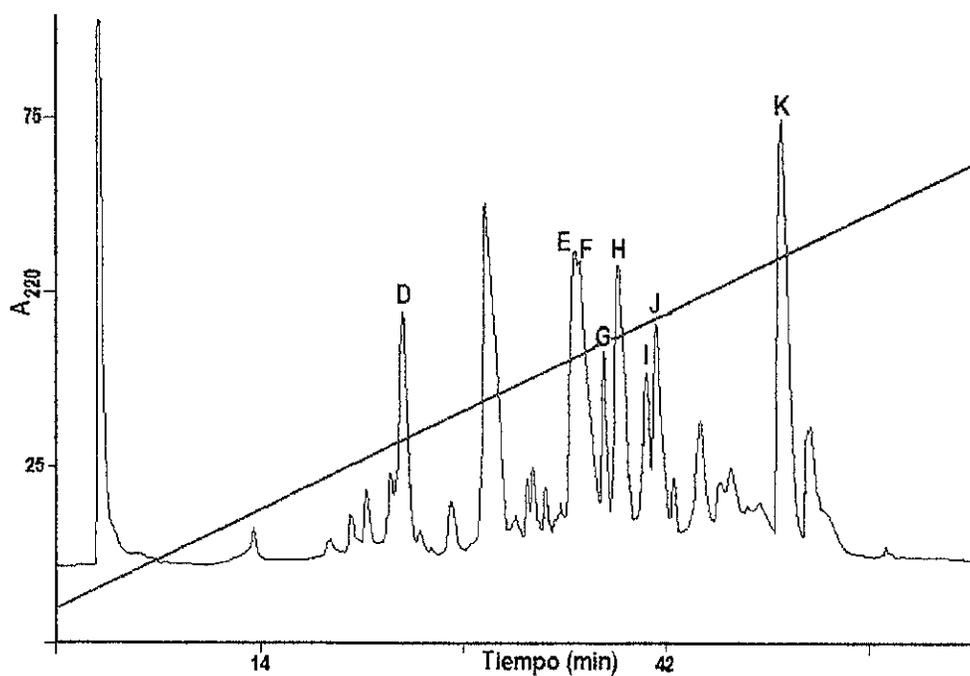


Figura 16. Cromatograma de la separación analítica del segundo lote del veneno total de *C. spurius*. D: SpIB; E: SpIIIA; F: SpIIIB; G: Conorfamida Sr3 (SpIVA), H: Conorfamida Sr1 (SpIVB); I: SpIVC; J: SpIVD; K: ϵ -SrIXA (SpIH) (AUFS = 4.0)

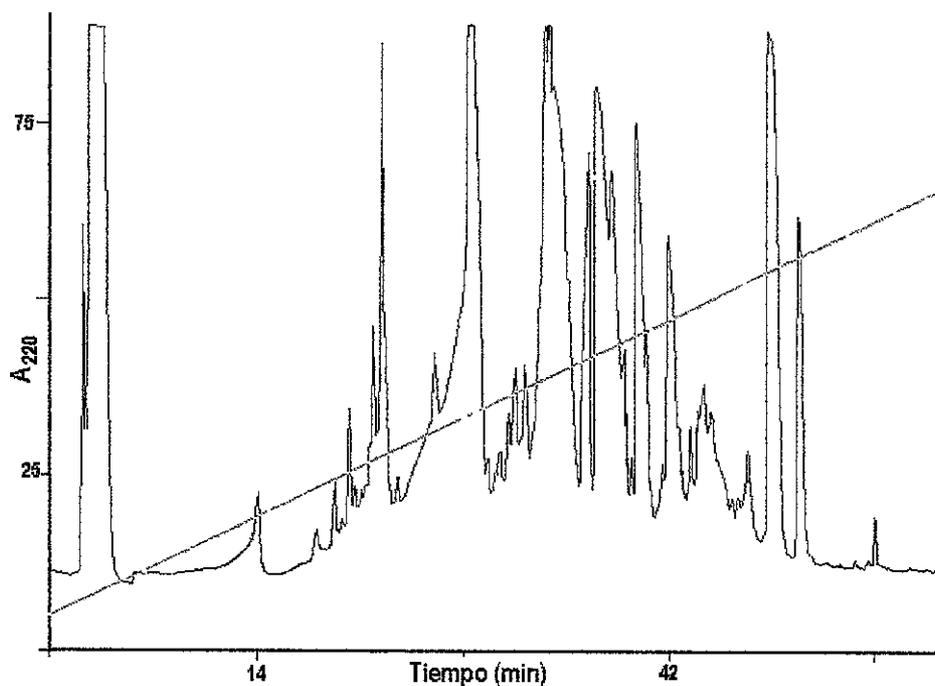


Figura 17. Cromatograma de la separación semipreparativa del segundo lote del veneno total de *C. spurius*. (AUFS = 2.0)

La Conorfamida Sr2 (SpIIA) fue separada del primer lote de venenos, donde eluye a los 28.5 minutos, que representan 33.5% de solución B. Para su purificación, se empleó un gradiente que comenzó en 80% de Solución A, incrementándose el porcentaje de solución B a razón de 1% cada tres minutos. Bajo estas condiciones, la Conorfamida Sr2 eluye a los 28 minutos, equivalentes a 29.3% de solución B (Figura 18).

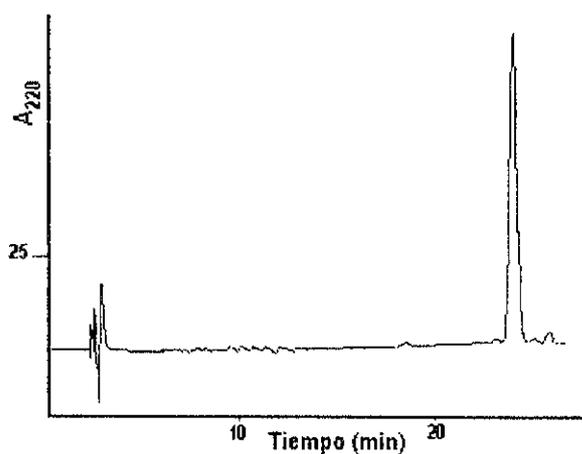


Figura 18. Cromatograma de la repurificación de la Conorfamida Sr2 (SpIIA), separada del primer lote de veneno total (AUFS = 0.1)

Los péptidos Conorfamida Sr3 (SpIVA), Conorfamida Sr1 (SpIVB) y ϵ -SrIXA (SpIH), fueron separados del segundo lote de veneno procesado.

La Conorfamida Sr3 (SpIVA), tiene un tiempo de retención de 37.5 minutos (42.5% de solución B), y fue repurificada mediante un gradiente que va de 30 a 40% de solución B en 30 minutos, eluyendo a 17.2 minutos (35.7% de solución B), tal y como se muestra en la figura 19A. El péptido, fue repurificado usando un gradiente más lento (de 30 a 40 % de solución B en 40 minutos. Figura 19B)

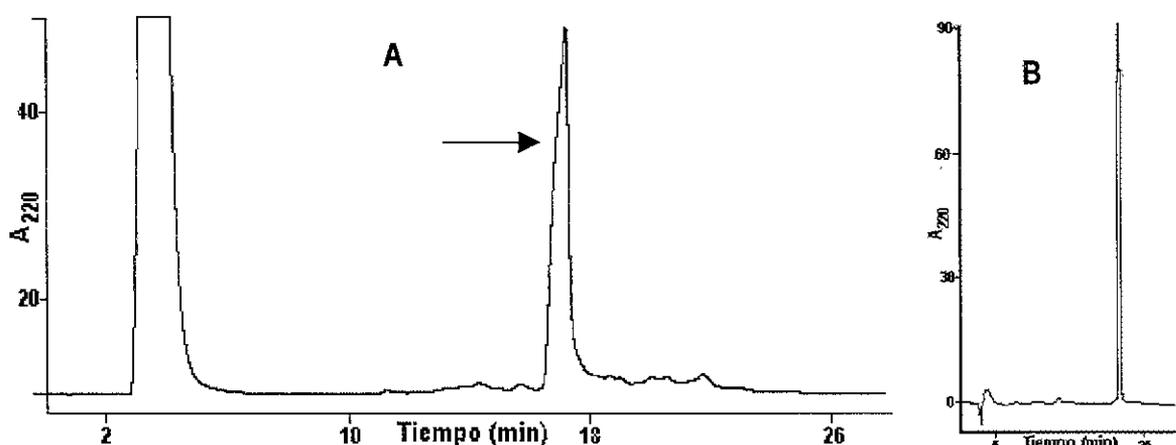


Figura 19. A: Purificación de la conorfamida Sr3 (SpIVA), separada del segundo lote del veneno total. **B:** Repurificación del péptido que se señala con la flecha en A, el péptido puro eluye a los 20.5 minutos (35.1 % de solución B) ($AUFS_A = 2.0$; $AUFS_B = 1.0$)

El siguiente péptido que eluye a los 38 minutos (43% de solución B), durante la separación del segundo lote del veneno total de *C. spurius*, identificado inicialmente como SpIVB (Conorfamida Sr1), fue purificado usando el mismo gradiente de elución empleado para la purificación de SpIVA (de 30 a 40% de solución B en 30 minutos). Bajo estas condiciones, la Conorfamida Sr1 presenta un tiempo de retención de 19.4 minutos (36.5 % de solución B); y fue posteriormente repurificado usando un gradiente más lento (De 32 a 42% de solución B en 40 minutos, figura 20).

Finalmente, el péptido ϵ -SrIXA (SpIH), que presenta un tiempo de retención de 49.5 minutos (54.5% de solución B), fue purificado empleando un gradiente de elución que comienza en 45 % de

solución B, que se incrementa a razón de 1% cada 5 minutos. El péptido purificado eluye a los 12 minutos (47.4% de solución B), tal y como se muestra en la figura 21.

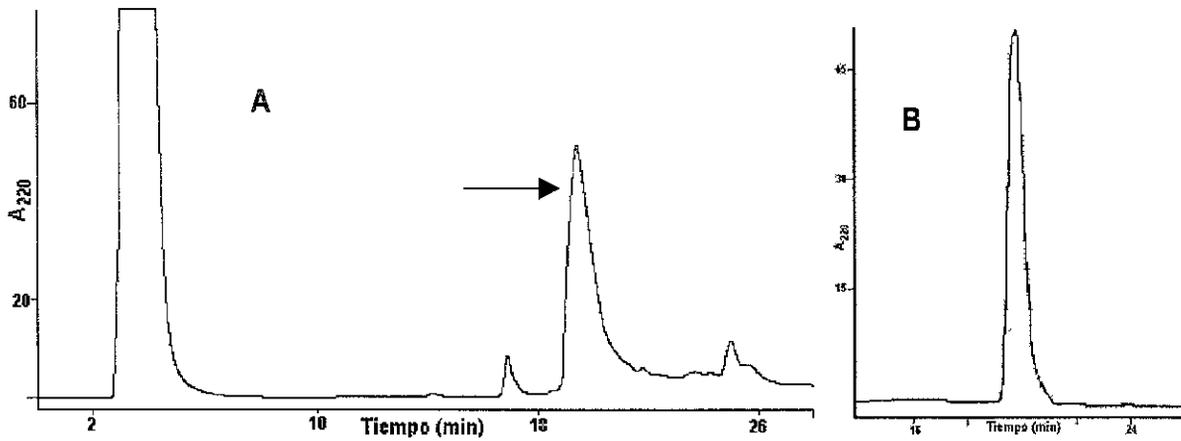


Figura 20. A: Purificación de la conorfamida Sr1 (SpIVB), separada del segundo lote del veneno total. **B:** Repurificación del péptido que se señala con la flecha en A, el péptido puro eluye a los 20.0 minutos (37.0 % de solución B) (AUFS_A = 2.0; AUFS_B = 1.0)

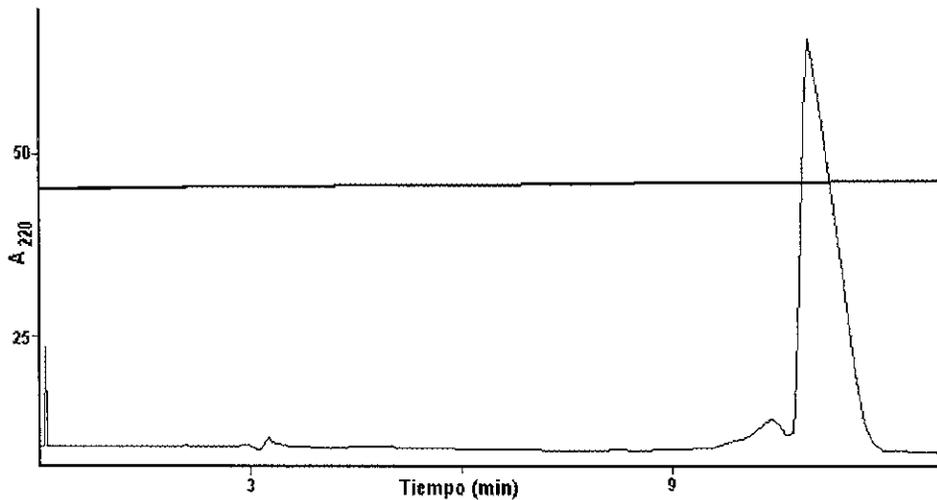


Figura 21. Purificación del péptido ε-SrIXA (SpIH), separado del segundo lote de veneno total (AUFS = 1.0)

Tabla VII. Secuencias parciales de conotoxinas aisladas de *C. spurius*

<u>Péptido</u>	<u>Estructura derivada de</u> <u>Secuenciación</u>	<u>PM</u>		<u>Estructura definitiva</u>	<u>Nombre</u>
		(Calc.)	(Obs.)		
SpIA	DPQGGATCSNWGIAQHQQNSCCV...	2404.5	4362.8		SpIA
SpIB	CRTEGVSCEENQQCCWRSCCCGECEAPC...	3109.1	3649.0		SpIB
SpIIA	GPM γ PPDFIRY	1538.7	1537.8	GPMγPPDFIRY-NH₂	Conorfamida Sr2
SpIIB	AGCCPRFYCYCL	1394.7	1548.6		SpIIB
SpIIIA	DYPCHVWCWHLRCCDCGASCEKKK R	3223.6	-		SpIIIA
SpIIIB	CLGAGYWCSYEAFFCCNGCHKYWNVCL	3117.6	-		SpIIIB
SpIVA	(1)	889.1	1614.9	ZVIIPVAGGTLFRY-NH₂	Conorfamida Sr3
SpIVB	GPMGWVPVIFYFR	1455.7	1454.8	GPMGWVPVIFYFR-NH₂	Conorfamida Sr1
SpIVC	GEVSDNLMHCWLPEFRGGLTDCWNVFS RY	3431.0	10069.7		SpIVC
SpIVD	GEVSDNLLHCWLPEFRGCLLDCWN	2818.3	10037.8		SpIVD
SpIH	IINWCCLIFYQCC	1618.0	1616.6	IINWCCLIFYQCC-NH₂	ϵ-SrIXA

1 En resultados se explica la falta de una secuencia parcial para este péptido

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE CONOTOXINAS AISLADAS DE *C. spurius*

ϵ -SrlX (SplH)

La estructura del péptido **SplH**, aislado de la especie *C. spurius*, fue determinada mediante secuenciación automática según el método de Edman y los resultados de la determinación estructural se muestran en la tabla VIII. Se procedió a secuenciar el péptido sin reducir ni alquilar, por lo que no es posible determinar Cys por este método, pero el alto rendimiento obtenido para los ciclos 4 y 7 (1047.8 y 1114.3 pmoles respectivamente), permite asumir que las posiciones 5 y 6 están ocupadas por Cys, y lo mismo se asume para las posiciones 12 y 13 del péptido.

Tabla VIII. Secuenciación de SplH

Ciclo	Aminoácido asignado	Rendimiento (pmoles)
1	I	3381.3
2	I	3753.0
3	N	2548.6
4	W	1047.8
5	*	-
6	*	-
7	L	1114.3
8	I	1090.3
9	F	1178.7
10	Y	1236.3
11	Q	1104.3
12	*	-
13	*	-
14	-	-
15	-	-

❖ Los residuos 5, 6, 12 y 13 se asumen como Cys.

La secuencia obtenida fue corroborada por espectrometría de masas. El peso molecular calculado para la secuencia **IINWCCLIFYQCC** es de 1618.0; obteniéndose para el mismo un peso molecular de 1616.6 Da, que indica que la estructura del péptido está completa y que el carboxilo terminal está amidado (Calc. para **IINWCCLIFYQCC-NH₂** = 1617.0).

Sobre la base de la determinación estructural, es posible incluir al péptido **SplH** como una ϵ -**conotoxina** de la superfamilia de las **T-conotoxinas**, por lo que se designa a este péptido como ϵ -**Sr1XA**.

Conorfamida Sr1

La estructura del péptido **SplVB**, aislado del segundo lote de veneno total de la especie *C. spurius*, fue analizada mediante secuenciación automática, obteniéndose la estructura primaria parcial que se muestra en las tablas IX y X. Esta estructura, fue corroborada por espectrometría de masas y síntesis química. Para la corroboración de la estructura de este péptido mediante síntesis química, se sintetizaron tanto el péptido con el carboxilo terminal libre, como el péptido amidado, como se muestra en la tabla IX; y esto permitió comprobar que el péptido nativo tiene el extremo carboxilo amidado. En la figura 22 se muestra el cromatograma de coelución de los péptidos nativo y sintético.

Tabla IX. Comparación entre SplVB nativo, Conorfamida Sr1 sintética, y el péptido equivalente con el carboxilo terminal libre.

Secuencia	PM (e. m.)	TR (min)
GPMGWVPVIFYRF-OH (Sintético) ¹	Calc.: 1555.73	23.2
GPMGWVPVIFYRF-NH ₂ (Sintético) ¹	Calc.: 1554.8 Obs.: 1554.8	18.6
GPMGWVPVIFYRF-NH₂ (Nativo)	Calc.: 1554.8 Obs.: 1554.8	18.8

1. Se empleó un gradiente que comenzó en 32 % de solución B, que incrementa a razón de 1% de solución B cada tres minutos.

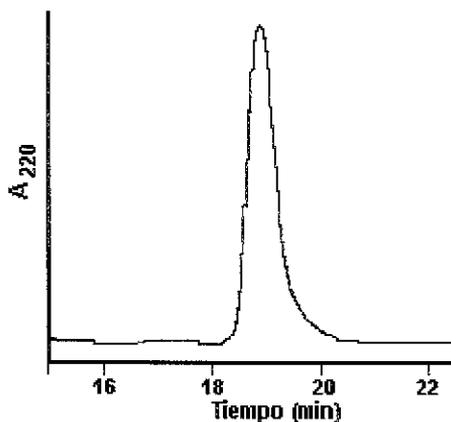


Figura 22: Coelución de Conorfamida Sr1 nativa y sintética: Se empleó un gradiente que va de 32 a 47% de solución B en 45 minutos. En estas condiciones la mezcla eluye como un solo pico a los 18.9 minutos, equivalentes a 38.3% de solución B. (AUFS = 0.1)

Desde el punto de vista estructural, el péptido **SpIVB** se asemeja a los miembros de la familia de los neuropéptidos endógenos derivados de la FMRF-NH₂. La acción biológica de este péptido fue comparada con la ejercida por el péptido FMRF-NH₂, que define a la familia de los FMRFamido péptidos. **SpIVB**, al igual que el FMRF-NH₂, produce hiperactividad en ratones mayores de 14 días de nacidos, por lo que este péptido constituye el primer FMRFamido péptido aislado del veneno de una especie de *Conus*, y define a una nueva familia de conopéptidos que hemos denominado **CONORFAMIDAS**, siendo **SpIVB** renombrado como **Conorfamida Sr1**.

Conorfamida Sr2

La estructura determinada mediante secuenciación del péptido **SpIIA**, aislado del primer lote de veneno total de la especie *C. spurius*, presenta gran similitud estructural con la Conorfamida Sr1, tal y como se muestra en la tabla X, por lo que este péptido se renombra como **Conorfamida Sr2**. Este péptido contiene dos residuos de ácido γ -carboxiglutámico (Gla), que es una modificación postransduccional usual en las conotoxinas.

La estructura propuesta para este péptido fue corroborada mediante espectrometría de masas, lo cual permite afirmar que, al igual que la Conorfamida Sr1, este péptido tiene su extremo carboxilo amidado, ya que el peso molecular obtenido mediante espectrometría de masas es de 1537.8 (Calculado para **GPM γ γ PPDFIRY-NH₂**: 1537.7).

Tabla X. Determinación estructural de las Conorfamidas Sr1 y Sr2

Conorfamida Sr1			Conorfamida Sr2		
Ciclo	Aminoácido asignado	Rendimiento (pmoles)	Ciclo	Aminoácido asignado	Rendimiento (pmoles)
1	G	400	1	G	185
2	P	580	2	P	120
3	M	680	3	M	150
4	G	500	4	*	-
5	W	480	5	*	-
6	V	690	6	P	100
7	P	530	7	P	140
8	V	680	8	D	90
9	F	620	9	F	85
10	Y	680	10	I	70
11	R	325	11	R	40
12	F	155	12	Y	25
13	-	-	13	-	-
			14	-	-
			15	-	-
			16	-	-

<p>Secuencia obtenida: GPMGWVPVYRF</p> <p>PM calculado 1455.8</p> <p>PM (E. M.) 1454.8</p> <p>Secuencia propuesta: GPMGWVPVYRF-NH₂</p>	<p>* Se observa una pequeña señal atribuible a ácido γ-carboxiglutámico.</p> <p>Secuencia obtenida: GPMγPPDFIRY</p> <p>PM calculado: 1538.7</p> <p>PM (E. M.) 1537.8</p> <p>Secuencia propuesta: GPMγPPDFIRY-NH₂</p>
---	---

Con base en la secuencia obtenida, se realizó la síntesis química de la Conorfamida Sr2; sin embargo, el producto sintético, de masa igual al producto nativo, no coeluye con éste, por lo que se sugiere la posibilidad de que alguno de los residuos del péptido nativo tenga configuración D. En la tabla XI se muestran las diferencias de elución en HPLC entre la Conorfamida Sr2 nativa y la L-Conorfamida Sr2 sintética.

Se iniciaron los estudios necesarios para determinar la estructura absoluta del péptido denominado Conorfamida Sr2, esto es, para determinar la posición del D aminoácido en la estructura. Para ello, la L-Conorfamida Sr2 sintética fue sometida a dos tipos de fragmentación, con

el fin de identificar en cada caso, los diferentes segmentos mediante HPLC y espectrometría de masas. Una vez determinada la ubicación de cada fracción obtenida a partir del corte del péptido sintético, se pretendía repetir el procedimiento con el péptido nativo, y comparar la posición de cada uno de los fragmentos mediante HPLC, y así ubicar, por el segmento que contiene el D aminoácido en base a la diferencia de tiempo de retención entre éste y el fragmento equivalente obtenido del péptido sintético.

Tabla XI. Comparación entre Conorfamida Sr2 nativa, sintética y el péptido equivalente con el carboxilo terminal libre.

Secuencia	PM (e. m.)	TR¹ (min)
GPM$\gamma\gamma$PPDFIRY-NH₂ (Nativa)	Calc.: 1537.7 Obs.: 1537.8	30.5
GPM$\gamma\gamma$PPDFIRY-NH₂ (Sintética)	Calc.: 1537.7 Obs.: 1537.8	28.0
GPM$\gamma\gamma$PPDFIRY-OH (Sintética)	Calc.: 1538.7 Obs.: 1538.7	28.9

1. Se empleó un gradiente que comenzó en 10 % de solución B, que incrementa a razón de 1% de solución B/minuto.

Se empleó el corte enzimático con Asp-N, que permitiría obtener los fragmentos GPM $\gamma\gamma$ PP (P. M. calc. 843.8); y el fragmento DFIRY, (P. M: calc.: 712.9); sin embargo, con éste método solamente fue posible identificar el segundo de los segmentos esperados. Igualmente, se intentó cortar el péptido con CNBr para obtener las fracciones GPM (P. M. calc. 256.3) y $\gamma\gamma$ PPDFIRY (P. M. calc. de 1254.3), y también en este caso únicamente fue posible identificar uno de los fragmentos, de peso molecular 256.1. Los resultados de los intentos por determinar la posición del D aminoácido en la Conorfamida Sr2 se muestran en la tabla XII.

Tabla XII. Corte de L-Conorfamida Sr2 sintética

Reactivo/Enzima	Secuencia del fragmento	Fragmentos esperados	Fragmentos obtenidos
		Masa (Calc.)	Masa (Obs.)
Asp-N	GPM γ PP	843.8	-
	DFIRY	712.9	712.3
CNBr	GPM	256.2	256.1
	γ PPDFIRY	1252.3	-
	E γ PPDFIRY	1208.3	1208.4
	EEPPDFIRY	1164.3	-

Conorfamida Sr3

El péptido inicialmente denominado **SpIVA**, uno de los componentes mayoritarios del segundo lote de veneno total de la especie *C. spurius*, resultó sumamente difícil de secuenciar. Luego de tres intentos seguidos sólo fue posible obtener la secuencia **CLFRYCP** en muy bajo rendimiento, por lo que se consideró que la primera posición estaba impedida, intentándose un corte con la enzima Piroglutamato amino peptidasa (PAP). La estructura del producto obtenido luego del corte enzimático, fue determinada mediante secuenciación química y comparación de los pesos moleculares obtenidos mediante espectrometría de masas, tanto del producto obtenido luego del corte enzimático, como del péptido intacto. La similitud estructural entre éste péptido y las Conorfamidas Sr1 y Sr2 permite colocarlo como un miembro más de esta familia, por lo que es renombrado como Conorfamida Sr3. Los resultados de la determinación estructural se muestran la tabla XIII.

SÍNTESIS DE CONORFAMIDAS ANÁLOGAS

Con el fin de analizar las relaciones estructura - función, se sintetizaron dos péptidos análogos a las **Conorfamidas Sr1 y Sr2**. En primer lugar se sintetizó un péptido análogo a la Conorfamida Sr2 pero que contiene ácido glutámico en lugar de ácido γ -carboxiglutámico, con el fin de determinar qué tan importante es la presencia de estos dos residuos para la actividad del péptido.

En segundo lugar, se sintetizó un péptido análogo a las conorfamidas diseñado para contener en su primera sección los residuos de la Conorfamida Sr2; pero terminando con los cuatro últimos residuos de la Conorfamida Sr1, que tiene en su porción carboxilo terminal más similitud con los FMRFamido péptidos que la Conorfamida Sr2. La tabla XIV muestra las estructuras de las Conorfamidas Sr1 y Sr2 y de sus análogos sintetizados.

Tabla XIII. Determinación de la estructura de Conorfamida Sr3 mediante corte enzimático, secuenciación y espectrometría de masas.

Péptido	Estructura	masa
Conorfamida Sr3	ZVIIVPVAGGTLFRY-NH₂	1615.4 (Calc.: 1615.1)
	Fragmento: PVAGGTLFRY-NH ₂	1079.4 (Calc. 1079.4)
Producto del tratamiento con PAP	VIIVPVAGGTLFRY-NH ₂	1504.8 (Calc. 1505.1)
	Fragmento: PVAGGTLFRY-NH ₂	1079.4 (Calc. 1079.4)
Conorfamida Sr1	GPMGWVPVFYRF-NH₂	
Conorfamida Sr2	GPMγPPDFIRY-NH₂	
Conorfamida Sr3	ZVIIVPVAGGTLFRY-NH₂	

Tabla XIV. Estructura de Conorfamidas naturales y sintéticas.

Péptido	Estructura
Conorfamida Sr1 (CNF1)	GPMGWVPVFYRF-NH₂
L-Conorfamida Sr2 (CNF2)	GPMγPPDFIRY-NH₂
Conorfamida Sr A1 (CNF3)	GPMϵPPDFIRY-NH₂
Conorfamida Sr A2 (CNF4)	GPMγPPDFYRF-NH₂

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE CONOTOXINAS DE *C. spurius*

Se determinó la actividad biológica de los péptidos nativos **SpIB**, ϵ -**SrlXA** (SpIH), **Conorfamida Sr3** (SpIVA), **Conorfamida Sr1** (SpIVB), **SpIVC** y **SpIVD**, mediante bioensayos en ratones; y los resultados se muestran en la tabla XV. El bioensayo consistió en la inyección intracerebro ventricular (icv), de una dosis determinada de los péptidos nativos o sintéticos, en ratones de 12 a 24 días de nacidos, según se señala en animales, materiales y métodos.

Tabla XV. Actividad biológica de péptidos nativos aislados de *C. spurius*

PÉPTIDO	DOSIS nmol/animal	BIOACTIVIDAD
SpIB (parcial) (13 días de edad)	5.0	Insensibilidad en la parte inferior del cuerpo(1)
ϵ - SrlXA (SpIH-completo) (2) (12 y 22 días de edad)	1.0-10.0	Tremor luego de la inyección, incremento del rascado y acicalamiento, síndrome hiperactivo (3)
Conorfamida Sr3 (SpIVA-Completo) (13-23 días de edad)	6.0	Síndrome Hiperactivo
Conorfamida Sr1 (SpIVB-Completo) (12-22 días de edad)	10.0-20.0	Síndrome Hiperactivo
SpIVC (parcial) (13 días de edad)	5.0	Movimiento circular (4)
SpIVD (parcial) (13 días de edad)	5.0	Hipersensibilidad al tacto (5)

1. El ratón parece cansado todo el tiempo, solamente se mueve si es forzado a hacerlo y la característica más relevante de su comportamiento luego de la inyección es que parece no tener sensibilidad en la parte inferior del cuerpo, es decir, es insensible a la presión ejercida con el dedo o una pluma, por ejemplo.
2. Este péptido solamente pudo ser ensayado a bajas concentraciones debido a su escasa solubilidad en solución salina normal. A dosis más bajas (1 y 5 nmoles por animal), no presenta efectos.
3. El Síndrome Hiperactivo está caracterizado por el movimiento rápido y constante del ratón alrededor del interior de la caja de observación, siempre en la misma dirección, y deteniéndose brevemente en las esquinas para intentar asomarse al borde de la caja. En ratones de entre 17 y 20 días de nacidos, se incrementa igualmente la frecuencia de saltos, dentro y hacia fuera de la caja de observación. Igualmente, se incrementa la frecuencia de rascado y acicalamiento de los ratones.
4. El ratón se mueve en círculos alrededor de sí mismo, siempre en la misma dirección (en el sentido de las manecillas del reloj), y la velocidad de giro se incrementa con el tiempo. Solamente se detiene como respuesta a ruidos o al intento de ser tocado, cuando salta (ruidos como el producido al aplaudir dentro de la caja), o huye (intento de tocarlo)
5. Con este péptido el ratón se mueve en general menos que los ratones control, de hecho, solamente se mueve si se hacen intentos por tocarlo, es decir, como reacción al tacto.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE CONORFAMIDA Sr1 SINTÉTICA

El bioensayo empleado para determinar la actividad biológica de los péptidos nativos sugiere que la **Conorfamida Sr1** produce Síndrome Hiperactivo. Para caracterizar esta actividad, se utilizaron tanto el péptido sintético, como el péptido sintetizado análogo a éste que tiene el extremo carboxilo terminal libre. Ambos péptidos fueron bioensayados mediante inyecciones icv en ratones, cubriendo el rango de edades comprendidas entre los 11 y 24 días de nacidos; y dosis entre 0.05 y 4.67 nmoles/gr. La acción biológica de este péptido fue comparada con la ejercida por el péptido FMRF-NH₂, que define a la familia de los FMRFamido péptidos; y la droga Naloxona, que al igual que el FMRF-NH₂, es un inhibidor de receptores opiáceos. Como control, ratones de 11 a 24 días de nacidos fueron inyectados con el mismo volumen (20 µl) de solución salina normal (SSN, NaCl al 0.9%). La Conorfamida Sr1 sintética, al igual que el FMRF-NH₂ y la Naloxona, produce hiperactividad en ratones mayores de 14 días de nacidos, y este péptido es más potente que la Conorfamida Sr1-OH. Los resultados de este estudio se muestran en las tablas XVI y XVII.

Tabla XVI. Actividad biológica de la Conorfamida Sr1

Conorfamida Sr1	Edad (días)	Dosis (nmol/gr. de peso)	Síndrome hiperactivo
Nativo	16-22	1.0-4.0	+
Sintético	11-13	0.15-3.2	-
	17-24	0.09-1.6	+
	17-24	1.6-3.8	+
Sintético, COOH	14	1.5-3.5	-
	16-23	0.1-1.6	-
	16-23	3.5-9.5	+
FMRF-NH ₂	13	3.2	-
	19	1.8-4.2	+
Naloxona	13	4.0-4.9	-
	19-24	1.6-3.2	+

La conorfamida Sr1 produce SÍNDROME HIPERACTIVO en ratones de más de 13 días de nacidos, definiéndose por Síndrome Hiperactivo, al comportamiento presentado por los ratones cuando, una vez recuperados de la inyección, caminan rápidamente o corren alrededor de la caja de observación, siempre en el mismo sentido, y deteniéndose brevemente en las esquinas para tratar de subir al borde de la caja. En ratones de entre 17 y 20 días de nacidos, se incrementa considerablemente el número de saltos dentro y hacia fuera de la caja de observación, en comparación con los ratones control inyectados con solución salina normal.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE CONORFAMIDAS ANÁLOGAS SINTÉTICAS

El bioensayo descrito fue empleado para analizar la actividad biológica de las conorfamidas análogas sintéticas CNF3 y CNF4 y de la L-Conorfamida Sr2 sintética y los resultados obtenidos se esquematizan en las tablas XVII y XVIII. Al igual que la Conorfamida Sr1, los péptidos sintéticos análogos a este producen Síndrome Hiperactivo luego de la inyección icv en ratones de más de 14 días de nacidos; pero a diferencia de la Conorfamida Sr1, éste no es el único efecto, ni el principal en algunos casos, producido por los péptidos.

La inyección icv en ratones de L-Conorfamida Sr2 sintética produce, como efecto principal la sensibilidad al ruido de bajo volumen, en la mayoría de los ratones inyectados, independientemente de la edad del ratón. En el caso de este péptido, luego de la recuperación el ratón comienza con Síndrome Hiperactivo, pero, al ser expuesto a ruido de bajo volumen (RBV), como el producido por el chasquear los dedos dentro de la caja de observación, el ratón se paraliza, echando sus orejas hacia atrás, por tiempo variable que depende de la dosis de L-Conorfamida Sr2 inyectada. A dosis pequeñas el efecto dura 1 o 2 minutos, pero a dosis elevadas, aun si el ratón comienza con hiperactividad, el efecto del RBV no permite la recuperación de ésta. Con este péptido se observa igualmente sensibilidad al tacto, pero en menor proporción en relación a la sensibilidad al RBV, excepto para ratones de entre 11 y 14 días de nacidos.

Las Conorfamidas análogas sintéticas CNF3 y CNF4, en cambio, producen además de Síndrome Hiperactivo una elevada sensibilidad al tacto, caracterizada por que el ratón huye y en

ocasiones chillar como respuesta a los intentos por ser tocado. Esta sensibilidad puede inclusive aumentar la cantidad de movimiento observado y la velocidad del ratón, como respuesta a intentos de tocarlo o agarrarlo. En los anexos se encuentran los resultados de todos los bioensayos efectuados durante la realización de éste trabajo.

Tabla XVII. Resumen de actividad de péptidos sintéticos.

Péptido	n	Tiempo Rec. promedio (min)			Duración promedio actividad (min)			Duración promedio Hiperactividad (min)			Duración promedio Saltos (min)			Promedio en que el ratón se duerme (min)		
		#	Valor	%	#	Valor	%	#	Valor	%	#	Valor	%	#	Valor	%
Control	65	65	5	100	36	15	55				6	8	9	51	41	78
CNF1	72	72	7	100	61	47	85	53	54	74	24	33	33	34	70	47
CNF1-OH	17	17	9	100	16	25	95	9	45	53	10	17	59	10	59	59
L-CNF2	25	25	8	100	20	48	80	15	64	60	10	29	40	16	79	64
CNF3	23	21	10	91	21	42	91	15	65	88	8	39	35	19	78	83
CNF4	26	23	6	88	23	46	88	20	53	77	11	35	42	19	64	73
Naloxona	9	9	5	100	7	44	78	7	44	78	7	23	78	6	58	67
FMRF-NH ₂	4	4	3	100	4	55	100	4	56	100	3	33	75	2	60	50

Tabla XVIII. Bioactividad de Conorfamida Sr1 y Conorfamidas análogas

Síntoma	<u>Hiperactividad</u>			<u>Sens. al tacto</u>			<u>Sens. a ruido de bajo volumen</u>			
	Edad (Días)	11-14	15-19	20-24	11-14	15-19	20-24	11-14	15-19	20-24
<u>Péptido</u>										
CNF1	0%	100%	72%	47%	0%	15%	35%	2%	8%	
L-CNF2	0%	80%	33%	100%	36%	22%	80%	45%	78%	
CNF3	0%	85%	20%	60%	0%	80%	40%	38%	0%	
CNF4	0%	82%	40%	100%	13%	20%	0%	38%	0%	

DISCUSIÓN

ϵ -SrIX (SpIH)

El péptido más abundante presente en el veneno de *C. spurius* es el péptido identificado inicialmente como **SpIH**, así que los estudios de bioactividad comenzaron con éste péptido. Este péptido es sumamente hidrofóbico y muy poco soluble en solución salina normal, por lo que solamente pudo ser bioensayado a dosis bajas; aún así, el péptido demostró ser activo al ser inyectado intra-cerebro-ventricularmente (icv) a ratones. El péptido provoca un continuo tremor después de la inyección, y este síntoma es seguido por hiperactividad caracterizada por un incremento en el rascarse y acicalarse, y en el movimiento alrededor de la caja, en comparación con los ratones control.

La estructura primaria determinada mediante secuenciación para este péptido, y corroborada por espectrometría de masas (**IINWCCLIFYQCC-NH₂**), contiene cuatro residuos de cisteína. Al presente, se han reportado tres clases diferentes de conotoxinas que contienen cuatro residuos de cisteína: α -, ϵ - y λ -conotoxinas; pero sólo en una de ellas, las ϵ -conotoxinas (Rigby y Col., 1999), los residuos de Cys están colocados en pares contiguos separados por cuatro o cinco residuos. Ejemplos de estos tres tipos de conotoxinas se muestran en la tabla XIX.

Tabla XIX: Estructuras de α -, λ - y ϵ -conotoxinas:

α -GI	<i>C. geographus</i> (p)	ECC NPACGRHYS C-NH₂
α -Aul	<i>C. aulicus</i> (m)	GCCSYPPCFATNSDYC-NH₂
α -ImI	<i>C. imperialis</i> (v)	GCCSDPRCAWR C-NH₂
λ -MrVIA	<i>C. marmoreus</i> (m)	VCCGYKLC²HO C
p5a (ϵ)	<i>C. purpurascens</i> (p)	GCCPKQMRCC²TL-NH₂
au5a (ϵ)	<i>C. aulicus</i> (v)	FCCPFIRYCCW

Hasta hace muy poco tiempo, las únicas conotoxinas con cuatro residuos de Cys que se conocían eran las α -conotoxinas, que constituyen además el grupo de conopeptidos más estudiados hasta ahora. Este tipo de conotoxinas ha sido aislado de casi todas las especies de *Conus* estudiadas, independientemente de cual sea su tipo de alimentación, y actúan sobre receptores nicotínicos de acetilcolina (RNACH). Todos los ejemplos aislados hasta ahora tienen el primer par de cisteínas contiguas, y el segundo separado por un número determinado de residuos; y la conectividad inter-cisteína es C1-C3 y C2-C4. En general, las α -conotoxinas aisladas de especies piscívoras contienen 3 residuos entre la segunda y tercera cisteína y 5 entre ésta y la cuarta, y actúan inhibiendo diferentes subtipos de RNACH musculares; y las α -conotoxinas aisladas de especies molusquicívoras y vermívoras son antagonistas de diferentes subtipos neuronales de RNACH, y contienen 4 y 7 residuos entre el segundo y tercero, y tercero y cuarto residuo de cisteína, respectivamente, con la única excepción de lml, que contiene tres residuos entre la tercera y cuarta Cys, aunque se ha demostrado que esta región de la toxina ocupa el mismo espacio que ocupa la región equivalente del resto de las α -conotoxinas que tienen 7 residuos allí (Maslennikov y Col., 1999; ver tabla IV y Fig 8).

En 1999, Rigby y Col. reportaron el aislamiento de una conotoxina de la especie molusquicívora *C. textile*, de estructura novedosa. La ϵ -TxIX contiene, al igual que las α -conotoxinas, cuatro residuos de Cys y la misma conectividad de éstas; sin embargo, los cuatro residuos se presentan en pares contiguos separados por cuatro residuos. Esta conotoxina, de sólo 13 residuos, presenta además un elevado número de modificaciones postraduccionales: dos residuos de ácido γ -carboxiglutámico (Gla, γ), Br-Triptofano y Treonina glucosilada. Los autores demuestran que la ϵ -TxIX selectivamente reduce la liberación de acetilcolina en la sinapsis colinérgica de *Aplysia* mediante reducción de la entrada de calcio presináptico, sin embargo, a pesar de que se demuestra que tanto la entrada de Ca^{+2} como la liberación de acetilcolina se reducen al exponer el tejido a la acción de la ϵ -TxIX, los autores concluyen que el efecto de la conotoxina podría deberse tanto a la inhibición de canales de calcio presinápticos activados por voltaje, como a la acción de este péptido sobre otras estructuras macromoleculares como receptores presinápticos acoplados a proteínas G. Reportan igualmente que esta toxina produce temblores y cambios en la forma de caminar (que ellos denominan forma de caminar espasmódica), cuando es inyectada icv en ratones de menos de 14 días de nacidos.

El descubrimiento de esta nueva familia de conotoxinas es corroborado casi de inmediato por el grupo de Olivera en la Universidad de Utah (Walker y Col., 1999). Estos autores reportan la existencia de una nueva superfamilia de conotoxinas, que denominan la **T-superfamilia**, con base en el descubrimiento de todo un conjunto de propéptidos de los cuales puede inferirse una serie de conotoxinas con estructuras semejantes a la descrita por Rigby y Col, incluyendo a esta misma estructura. Estos hallazgos se realizan en especies de *Conus* tanto piscívoras, molusquicívoras, como vermívoras, por lo que concluyen que es probable que representantes de este nuevo grupo de conotoxinas se encuentren en todas las especies de *Conus*. Como características generales del grupo, resalta la presencia de cuatro Cys en pares contiguos separadas en general por cinco residuos, conectividad intercisteínas idéntica a la que presentan las α -conotoxinas (C1-C3 y C2-C4), y una enorme divergencia inter e intra especie en cuanto a los residuos intercisteína. En el mismo trabajo, Walker y Col. reportan las estructuras de cuatro toxinas pertenecientes a este grupo, efectivamente aisladas del veneno total de varias especies de *Conus*. Una de las conotoxinas aisladas por Walker de la especie *C. textile*, la **tx5a**, es equivalente a la ε -conotoxina **TxIX**, aislada de esta misma especie y de manera independiente por Rigby y Col.; e igual que en ese trabajo, se reporta que **tx5a** produce hiperactividad y movimientos espasmódicos al ser inyectada intracranealmente a ratones.

Un nuevo esqueleto de conotoxinas conteniendo cuatro Cys en la especie *C. marmoreus* Mucho ha sido reportado de manera independiente por dos grupos (McIntosh y Col., 2000; Balaji y Col., 2000). En este caso, la secuencia de los residuos se asemeja más a la que se presenta en las α -conotoxinas, pero estos péptidos, denominados λ -conotoxinas, presentan una característica novedosa, la interconexión de las Cys es C1-C4 y C2-C3; lo cual es demostrado por ambos grupos mediante la síntesis de los péptidos. McIntosh y Col. reportan también la secuencia del propéptido obtenida mediante clonación, y sugieren que la elevada homología en la región correspondiente a la secuencia señal de los propéptidos de las λ -conotoxinas, con los correspondientes para las ε -conotoxinas permite colocar a estos dos grupos en la misma superfamilia, esto es, en la T-superfamilia.

λ -MrVIA	VCCGYKLCHOC	Balaji y Col., 2000
λ -MrVIB = mr10a	NGVCCGYKLCHOC	Balaji y Col., 2000; McIntosh y Col., 2000
λ -MrX	GICCGVSFCYOC	Balaji y Col., 2000

En la tabla XX se muestran las secuencias deducidas de clones que presentarían diferentes T-conotoxinas, según los propéptidos identificados en las especies *C. purpurascens* (piscívoro), *C. gloriamaris* y *textile* (molusquicívoros), y *C. imperialis* (vermívoro); y las ϵ -conotoxinas que han sido efectivamente aisladas de venenos de *Conus* hasta ahora. Estas estructuras se comparan con la secuencia del péptido **SpIH**. Como puede apreciarse en la tabla, los residuos intercisteína son notablemente divergentes entre los diversos ejemplos reportados, aunque se mantiene la presencia de entre cuatro y cinco residuos entre la segunda y la tercera Cys, tal y como ocurre con el péptido aislado de *C. spurius*, que contiene cinco residuos (**LIFYQ**) entre los dos pares de Cys.

Tabla XX: Secuencias de T-conotoxinas

Deducidas de clones

P5.1	GCCPKQMRCCTLG	<i>C. purpurascens</i>
Gm5.1	LCCVTEDWCCCEWW	<i>C. gloriamaris</i>
Gm5.2	VCCRPVQDCCSGK	
Tx5.1	CCQTFYWCCVQGQ	<i>C. textile</i>
Tx5.2	ECCEDG WCCTAAPLTGR	
Im5.1	DWNSCCGKNPGCCPWGK	<i>C. imperialis</i>

aislados de especies de *Conus*

p5a	GCCPKQMRCCTL-NH ₂	<i>C. purpurascens</i>
tx5a	γ CC γ DGW* ⁶ CCT ⁶ AAO	<i>C. textile</i>
TxIX	γ CC γ DGW* ⁶ CCT ⁶ AAO	
au5a	FCCPFIRYCCW	<i>C. aulicus</i>
au5b	FCCPVIRYCCW	
SpIH	IINWCCLIFYQCC	<i>C. spurius</i>

W* = 7-Br-W; T⁶ = Gal-Nac-Gal-T

La evidencia estructural presentada permite sugerir que este péptido, **SpIH**, es una ϵ -conotoxina, y esta asignación se refuerza al comparar la bioactividad determinada para el péptido nativo con la reportada el péptido ϵ -TxIX (tx5a).

Tanto la estructura como la bioactividad de este péptido, **SpIH**, están determinados, y al pertenecer a la T-superfamilia, se sugiere el cambio de nombre como una ϵ -conotoxina; y dado que tenemos evidencia de que hay más de un ejemplar de este tipo de conotoxinas en el veneno de *C. spurius*, este péptido se renombra como ϵ -**SrIXA**. Para completar el estudio de esta conotoxina, sólo es necesario el ensayo de la misma en alguna preparación presináptica que permita corroborar (o modificar), si efectivamente la proteína blanco de su acción son canales de Ca^{+2} activados por voltaje.

CONORFAMIDAS

Es hoy en día bien conocido que el veneno de los caracoles marinos del género *Conus* contiene una alta proporción de toxinas caracterizadas por contener una alta proporción del aminoácido Cys en su estructura, que constituyen potentes y específicos antagonistas de receptores y canales iónicos encargados de la transmisión sináptica. Estos péptidos exclusivos y característicos de los *Conus* que han sido denominados conotoxinas, pueden ser agrupados en sólo unas pocas familias estructurales, dependiendo de la cantidad, secuencia y conectividad de sus residuos de Cys.

Sin embargo, también han sido aislados de venenos de *Conus*, péptidos que pertenecen o son análogos a familias de neuropéptidos endógenos conocidos tanto en invertebrados como en vertebrados. Sabemos ahora que los venenos de *Conus* contienen conopresinas (Cruz y Col. 1987), que son análogos de oxitocina/vasopresina, y contulakinas (Craig y Col. 1999a), que actúan sobre receptores a neurotensinas. En estos casos, y al contrario de lo que ocurre con las Conotoxinas, los péptidos han resultado ser siempre agonistas.

Como resultado principal de la realización de este proyecto, se reporta el descubrimiento, en el veneno de la especie *C. spurius*, de varios miembros de una nueva familia de análogos a

neuropéptidos endógenos, que hemos denominado **CONORFAMIDAS** debido a su similitud a los miembros de la familia de los FMRF-amidopéptidos. Parte de este trabajo ha sido publicado en *Toxicon*, y la publicación se anexa al final de este trabajo (Maillo y Col., 2001)

CONORFAMIDA Sr1 (SpIVB)

La estructura primaria de uno de los componentes mayoritarios del veneno de la especie *C. spurius*, inicialmente denominado **SpIVB**, fue determinada mediante secuenciación química y espectrometría de masas, y corroborada mediante síntesis química (tanto del péptido equivalente al nativo, como de aquel con el carboxilo terminal libre), siendo ésta **GPMGWVPVFYRF-NH₂**.

La secuencia previa al carboxilo terminal de este péptido, (-FYRF-NH₂) presenta una alta similitud a la porción correspondiente de los péptidos derivados del **FMRF-NH₂**, que son una extensa y rica familia de neuropéptidos presentes en casi todos los organismos (Tabla XXI). Por otra parte, tanto el péptido nativo como el sintético producen un evidente incremento de la actividad motriz en ratones mayores de 14 días al ser inyectados icv, y el comportamiento de los ratones inyectados con este péptido es semejante al de ratones inyectados icv con el péptido cardioactivo FMRF-NH₂, por lo que resulta evidente que el péptido **SpIVB** es un análogo a este tipo de neuropéptidos, (los péptidos relacionados al FMRF-NH₂ o **FaRPs**). Siendo la primera vez que un péptido de este tipo es encontrado en el veneno de una especie de *Conus*, y dada la evidencia de que hay más péptidos relacionados a éste en el veneno de esta especie, se acuña el término **CONORFAMIDAS**, para nombrar a los péptidos pertenecientes a esta familia de péptidos presentes en venenos de especies de *Conus*; debido a ello este primer ejemplar de tal tipo de conopéptidos, esto es **SpIVB**, es renombrado como **Conorfamida Sr1**.

Dado que la **Conorfamida Sr1** nativa resultó activa en ratones, se procedió a la caracterización de esta actividad biológica a través del análisis de los cambios de comportamiento que produce luego de la inyección icv de dosis variables en ratones, para lo cual se emplearon el péptido sintético idéntico al nativo y el péptido sintético con el carboxilo terminal libre; los resultados

se compararon con los efectos producidos por la inyección icv del neuropéptido FMRF-NH₂ en ratones.

Tabla XXI. Comparación estructural entre Conorfamidas aisladas de *C. spurius* y FaRPs. (1)

Organismo	Secuencia	Referencia
Conorfamidas		
<i>C. spurius</i>	GPMGWVPVFYRF-NH ₂	Este trabajo
<i>C. spurius</i>	GPMγPPDFIRY-NH ₂	Este trabajo
<i>C. spurius</i> (2)	ZVIIVPVAGGTLFRY-NH ₂	Este trabajo
Invertebrados		
<i>M. nimbosea</i>	FMRF-NH ₂	Price y Greenberg, 1977
<i>S. officinalis</i>	FIRF-NH ₂	Loi y Tublitz, 1997
<i>H. aspersa</i>	ZFYRF-NH ₂	Price y Col., 1996
<i>L. stagnalis</i> (3)	ZFYRI-NH ₂	Santama y Col., 1995
<i>A. californica</i>	GSLFRF-NH ₂	Greenberg y Price, 1992
<i>D. melanogaster</i>	SDNFMRF-NH ₂	Chin y Col., 1990
<i>A. californica</i>	GGAALFRF-NH ₂	Greenberg y Price, 1992
<i>L. migratoria</i>	GQERNFLRF-NH ₂	Lange y Col., 1994
<i>S. officinalis</i>	ALSGDAFLRF-NH ₂	Loi y Tublitz, 1997
<i>M. sexta</i>	ZDVVHSFLRF-NH ₂	Kingan y Col., 1996
<i>A. californica</i>	SAPSWRPQGRF-NH ₂	Greenberg y Price, 1992
<i>L. migratoria</i> (4)	ZLASDDYGHMRF-NH ₂	Schoofs y Col., 1997
<i>C. elegans</i>	DFDGAMPGVLRN-NH ₂	Li y Col., 1999
<i>C. vomitoria</i>	APNQPSDNMIRF-NH ₂	Duve y Col., 1992
<i>A. suum</i>	SDIGISEPNFLRF-NH ₂	Cowden y Stretton, 1995
<i>C. elegans</i>	SADDSAPFGTNRN-NH ₂	Nelson y Col., 1998
Vertebrados		
<i>G. domesticus</i>	LPLRF-NH ₂	Dockray y Col., 1983
<i>R. norvegicus</i>	SLAAPQRF-NH ₂	Vilim y Col., 1999
<i>H. sapiens</i>	SQAFLFQPQRF-NH ₂	Perry y Col., 1997
<i>H. sapiens</i>	AGEGLNSQFWSLAAPQRF-NH ₂	Perry y Col., 1997

- 1 Todos los FaRPs están amidados en el carboxilo terminal
- 2 Z es ácido piroglutámico
- 3 Codificado y expresado mediante el gen para FaRPs
- 4 7-Tirosina Glucosilada

El péptido sintético equivalente al nativo fue probado en ratones de 11 a 24 días de nacidos y en concentraciones entre 0.09 a 3.8 nmoles/gr. Invariablemente ocasiona hiperactividad en ratones mayores de 13 días de nacidos, en todo el rango de las dosis probadas. La hiperactividad está caracterizada por un elevado incremento en el movimiento de los ratones alrededor de la caja de observación, deteniéndose en cada esquina para tratar de salir de ella (trepar las paredes). En ratones entre 17 y 20 días de nacidos, se presenta igualmente un notable incremento en la frecuencia de saltos dentro y hacia fuera de la caja de observación. El péptido es inactivo en ratones jóvenes. Se probó igualmente el péptido sintético desamidado, a fin de determinar si la amidación del carboxilo terminal es importante para la bioactividad, concluyéndose que este péptido es mucho menos potente que el péptido amidado, por cuanto se requieren dosis mucho mayores para obtener la misma respuesta.

Como ya se ha mencionado, debido a la secuencia que presenta en la región cercana al carboxilo terminal, se ha asumido que la **Conorfamida Sr1** es un FaRPs; por lo que se determinó, mediante el mismo bioensayo, la bioactividad del péptido que da origen a la familia de estos neuropéptidos. Para ello, ratones de las mismas edades fueron inyectados con dosis variables de FMRF-NH₂, obteniéndose los mismos resultados, síndrome hiperactivo en ratones mayores de 14 días de nacidos. Se tiene conocimiento de los diferentes efectos producidos por la inyección icv del péptido FMRF-NH₂, en el comportamiento de mamíferos (Raffa, 1988; Kavaliers, 1990; Kavaliers y Colwell, 1993, Raffa y Jacoby, 1990), que incluyen un aumento en la actividad de acicalado en ratones (Raffa y Col., 1986).

Los resultados de estos experimentos, resumidos en la tabla XIV demuestran que, al igual que el FMRF-NH₂, la **Conorfamida Sr1** produce hiperactividad en ratones de más de 13 días de nacidos, y que, al igual que ocurre con los FaRPs, la actividad disminuye considerablemente si se elimina la amidación del carboxilo terminal. La determinación de la estructura y bioactividad de éste péptido permite asignarlo como perteneciente a la familia de los FMRFamido péptidos, siendo entonces el primero de una nueva familia de conopéptidos que se ha denominado **CONORFAMIDAS**, siendo éste péptido, **Conorfamida Sr1**, el miembro que la define.

En 1977, Price y Greenberg separaron e identificaron al tetrapéptido FMRF-NH₂ de extractos del sistema ganglionar de la almeja *Microcallista nimbosa*, determinando que se trataba de un péptido capaz de aumentar y prolongar las contracciones del corazón y otros músculos en la especie (Price y Greenberg, 1977). Estudios posteriores determinaron que este péptido se encontraba presente en una gran variedad de especies de moluscos, y que en todas ellas resultaba cardioexcitatorio.

Desde entonces, una enorme cantidad de péptidos relacionados a esta estructura ha sido aislada tanto en invertebrados como vertebrados (Greenberg y Price, 1992; Espinoza y Col., 2000). Aparentemente, todos los animales producen FaRPs (Boer y Col., 1980; Dockray y Col., 1983; Chin y Col., 1990; Price y Col., 1990; Boersma y Col., 1993; Johnston y Col., 1995; Fujimoto y Col., 1998; D'Aniello y Col., 1999; Rastogi y Col., 2001, entre otros). En general, los genes de los FMRFamido péptidos codifican diferentes estructuras que pueden repetirse muchas veces en el mismo gen (Lutz y Col., 1992), por lo que esta la familia de neuropéptidos es sumamente rica en cada organismo estudiado. Sin embargo, se ha determinado que en general esta abundancia de péptidos relacionados no resulta redundante (Hewes y Col., 1998), ya que cada uno parece tener una función específica, que además está definida por mecanismos variados y diferentes (Raffa, 1988). Por otra parte se ha sugerido que las acciones de los FaRPs son ejercidas en los organismos por un conjunto de estos péptidos que actúan como co-moduladores (Santama y Col., 1995).

Luego de la determinación del genoma de la especie *Caenorhabditis elegans*, se ha encontrado que los FMRFamido péptidos se expresan en por lo menos 10% de las neuronas del nemátodo, tanto motoras como sensoriales, incluyendo a interneuronas que están encargadas del movimiento, la alimentación, la defecación y la reproducción del nemátodo (Li y Col., 1999); y los diferentes miembros de esta compleja familia de FaRPs en *C. elegans* cumplen variados papeles en todos los estadios del nemátodo, desde su desarrollo hasta la etapa adulta (Nelson y Col., 1998). En este organismo se han identificado 20 genes para FaRPs, y si todos ellos fueran expresados y completamente procesados, darían lugar a 56 FaRPs diferentes (Bargmann, 1998). Recientemente, se ha identificado el gen que codifica a los FMRFamido péptidos en el hombre (Perry y Col., 1997).

Por otra parte, se ha determinado que esta familia de neuropéptidos cumple una amplia y variada gama de funciones tanto en invertebrados como en vertebrados. En invertebrados, donde esta familia ha sido ampliamente estudiada, sus miembros, además de su función cardioexcitatoria, tienen acción sobre músculo no cardíaco, y nervios, estando involucrados en la cardioregulación (Fujiwara-Sakata y Col., 1992), cardiorespiración (Santama. y Benjamin, 2000), control neuromuscular (Loi y Col., 1996; Graham y Col., 2000; Davis y Stretton, 2001), reproducción (Armstrong y Col., 1997; Fellowes y Col., 1998; Henry y Col., 1999), osmoregulación (Khan y Col., 1999); movimiento (Day y Col., 1994) y alimentación (Geary y Col., 1999; Brownlee Col., 2000). Los FaRPs son igualmente moduladores de una serie de procesos celulares en invertebrados (Fossier y Col., 1994; Nachman y Col., 1999; Ellis y Huddart, 2000).

En vertebrados también se han reportado acciones diversas, actuando como neurotransmisores, neuromoduladores, o neurohormonas (Raffa, 1988; Skerrett y Col., 1995; Pinelli y Col., 1999). En mamíferos, se ha demostrado su acción sobre receptores opiáceos, donde actúan como moduladores (Kavaliers, 1990; Yang y Majane, 1990; Gouarderes y Col., 1993; Devillers y Col., 1995; Raffa y Col., 1994; Gupta y Col., 1999); pero además, se han reportado efectos sobre la tensión arterial (Mues y Col., 1982; Wong y Col., 1985; Thiemermann y Col., 1991), comportamiento (Raffa y Col., 1986; Robert y Col., 1989), la función endocrina (Mitsuma y Col., 1985), y se ha sugerido que también pueden ocupar un papel en procesos de aprendizaje (Kavaliers y Colwell, 1993).

Si bien la evidencia inicial derivada de la observación de los efectos causados por los FaRPs sugería que estos péptidos actuaban modulando la acción de neurotransmisores, es bien conocida actualmente la existencia de diversos receptores exclusivos para ellos, y más aún; la evidencia disponible parece apuntar a la existencia de toda una gama de receptores para este tipo de neuropéptidos (Payza y Col., 1989; Chin y Col., 1994; Marco y Col., 1995; Wang y Col., 1995; Tensen y Col., 1998; Elshourbagy y Col., 2000). En este sentido, tal vez el descubrimiento más importante en cuanto a estos receptores para FaRPs, haya sido la reciente clonación de miembros de la primera familia de canales iónicos activada por péptidos (Lingueglia y Col., 1995; Cotrell, 1997). Los canales iónicos activados por FMRF-NH₂ y sus péptidos relacionados pertenecen a una familia de canales catiónicos que permite principalmente el paso de sodio y son bloqueados por el

diurético amilorida. Estructuralmente, estos canales están relacionados a la familia de las Degenerinas (DEG), y canales de sodio epiteliales (ENaC), presentes en invertebrados y vertebrados, y que están implicados en la mecanosensación, la propiocepción, la percepción del dolor, la gametogénesis y el transporte de sodio epitelial (García-Añoveros y Col., 1997; Coscoy y Col., 1998; Mano y Driscoll, 1999).

Muy recientemente, canales de sodio activados por ácido y estructuralmente relacionados a las DEG/EnaC y por ende a los canales activados por FaRPs, han sido clonados de tejido nervioso de mamíferos (Waldmann y Col., 1997; Chen y Col., 1998; Waldman y Lazdunski, 1998). Se ha propuesto que estos canales iónicos sensibles a ácido (ASIC) presentes en las terminales nerviosas sensoriales son responsables de la sensación de dolor que acompaña procesos infecciosos, inflamatorios y condiciones de isquemia; situaciones que igualmente producen incremento en la expresión de FaRPs en los tejidos afectados (Devillers y Col., 1995; Vilim y Col., 1999). Si bien los FaRPs no activan a este tipo de canales, se ha demostrado que tanto FMRF-NH₂ como el FaRPs FF (FLFQPQRF-NH₂) potencian las corrientes generadas por la apertura de ASIC en medio ácido (Askwith y Col., 2000).

Las Conorfamidas representan el tercer grupo de péptidos claramente análogos a familias de neuropéptidos, presente en venenos de *Conus*. El primero de ellos (familia de vasopresina/oxitocina), fue descubierto con el aislamiento de Conopresina-G del veneno de *C. geographus* (Cruz y Col., 1987), y posteriormente se demostró que este péptido es un neuropéptido endógeno de la familia de la vasopresina, presente en una variedad de moluscos (Nielsen y Col., 1994). No puede decirse lo mismo de la segunda familia de análogos a neuropéptidos endógenos proveniente de especies de *Conus*; la Contulakina-G, aislada también del veneno de *C. geographus*, representa el primer ejemplo conocido de miembros de la familia de las neurotensinas provenientes de una fuente de invertebrados (Craig y Col., 1999a).

Aún así, no han sido aún elucidadas las razones por las cuales neuropéptidos endógenos, o análogos a éstos y por ello con funciones específicas, son expresados en los venenos de *Conus*; pero se ha argumentado que su presencia en el veneno podría formar parte de la estrategia empleada por estos caracoles en el proceso de envenenamiento. Así, la presencia de Conopresinas

en el veneno de *Conus* podría acelerar la entrada del veneno, gracias a la constricción de las arterias en el sitio de la inyección producida por las vasopresinas presentes en el veneno (Nielsen y Col., 1994); pero también se ha especulado que muchos de los péptidos presentes en la mezcla que forma el veneno de los *Conus* podrían estar allí para fines diferentes al proceso de envenenamiento, como defenderse de sus propios depredadores, o desalentar a posibles competidores (Olivera, 1999).

Cada una de las más de 500 especies de *Conus* contiene en su veneno entre 50 y 200 péptidos diferentes, cada uno de los cuales produce evidentes cambios de comportamiento cuando es introducido en el sistema nervioso de un animal (Olivera y Col., 1990); sin embargo existe evidencia de que no todos estos péptidos están directamente involucrados en el proceso de envenenamiento de la presa, sino que pueden igualmente estar allí para otro tipo de interacciones bióticas, tales como la de defensa contra depredadores o para competir con otras especies del género en la caza de presas (Olivera 1999).

Ha sido ampliamente reportado el efecto de los FaRPs tanto en la alimentación, la reproducción y el movimiento de varios invertebrados, especialmente en nemátodos donde la expresión de FaRPs es abundante y variada (Armstrong y Col., 1997; Brownlee y Walker, 1999; Fellowes y Col., 1998; Graham y Col., 2000; Henry y Col., 1999; Johnston y Col., 1995; Kimber y Col., 2001; Loi y Tublitz, 1997; entre otros). Por otra parte, también ha sido reportada la reacción cruzada de los FaRPs entre especies de diferentes phyla, especialmente aquellas que ocurren entre especies de helmintos (Geary y Col., 1999; Marks y Col., 1997; Walker y Col., 1993); más aún, se ha reportado que FaRPs de *C. elegans* paralizan a *A. suum* (Reinitz y Col., 2000).

Esta evidencia permite teorizar en cuanto a las razones de la presencia de Conorfamidas en el veneno de *Conus spurius*; que es una especie vermívora. La expresión de análogos a FaRPs en el veneno podría estar dirigida a intervenir en el movimiento de la posible presa, inclusive produciéndole parálisis; o a influir en posibles depredadores o competidores afectando su apetito o capacidad de reproducción. En todo caso, es muy posible, tal y como ocurre en la mayor parte de los moluscos hasta ahora estudiados, que los *Conus* posean su propio conjunto de FaRPs, por lo que la suposición de que la presencia de Conorfamidas en el veneno de estos caracoles obedece a

propósitos biológicos diferentes a los endógenos, requiere investigar si las Conorfamidas aisladas de *C. spurius* se expresan en otros tejidos del molusco y cumplen alguna función en ellos.

Conorfamida Sr2 (SpIIA) y Conorfamida Sr3 (SpIVA)

La estructura del péptido inicialmente denominado **SpIIA**, presente también en el veneno de *C. spurius* fue determinada mediante secuenciación química y espectrometría de masas, y resulta sorprendentemente similar a la que corresponde a la **Conorfamida Sr1**.

Conorfamida Sr1

GPMGWVPVFYRF-NE₂

SpIIA

GPMYγPPDFIRY-NE₂

La bioactividad de **SpIIA** nativo no pudo ser ensayada debido a la poca cantidad disponible de péptido, así que se procedió a su síntesis química con el fin, tanto de corroborar la estructura, como de hacer los ensayos de bioactividad de este conopéptido. El producto obtenido mediante síntesis química tiene el mismo PM que el péptido nativo, pero al ser purificado mediante HPLC mostró un tiempo de retención diferente. La posibilidad de que esta diferencia se debiera a la amidación del carboxilo terminal fue definitivamente descartada mediante síntesis (corroborada por espectrometría de masas), de los dos péptidos (ver tabla XI), por lo que se presume que la diferencia entre los tiempos de retención de los péptidos nativo y sintético, se deba a la presencia en el primero de al menos un D-aminoácido.

Con el fin de determinar la posición del (os) D-aminoácido(s), se procedió, como primer paso, a realizar hidrólisis enzimática de **L-SpIIA** sintética con Asp-N, y corte del mismo péptido con CNBr. Se pretendía emplear al péptido sintético para optimizar las condiciones de estas dos reacciones y lograr reconocer, mediante espectrometría de masas y HPLC, cada uno de los fragmentos obtenidos; y repetir luego el proceso con el material nativo. Comparando entonces los tiempos de retención de los diferentes fragmentos obtenidos tanto de SpIIA nativo como de la especie sintética L-SpIIA, sería posible determinar en cuál de ellos se encuentra el D-aminoácido. En

la tabla XII se muestran los fragmentos esperados y obtenidos luego de ambos cortes efectuados sobre **L-SpIIA**.

La hidrólisis enzimática con Asp-N da lugar a una mezcla de reacción compleja, que varía según la concentración usada de la enzima y el tiempo de reacción. Uno de los fragmentos fue identificado mediante espectrometría de masas como DFIRY-NH₂, por lo que se deduce que es probable que el fragmento adyacente al grupo NH₂ que resta de la molécula también se produzca durante el corte enzimático, sin embargo, esto no ha podido ser corroborado aún mediante espectrometría de masas. Esta parte de la molécula (GPM_γPP) es la que contiene los dos residuos de Gla, por lo que es posible que en el medio de reacción uno de ellos, o ambos sufran descarboxilación transformándose en ácido glutámico lo que permitiría nuevos cortes enzimáticos por cuanto la enzima Asp-N puede hidrolizar también a este residuo. La reacción con CNBr da lugar a tres fragmentos. El análisis por espectrometría de masas del primero de ellos, sumamente hidrofílico, indica que éste corresponde al tripéptido adyacente al NH₂; y uno de los otros dos fragmentos corresponde al resto de la molécula con uno de sus residuos de Gla descarboxilado. Estos resultados no garantizan que será posible, por esta vía, determinar la posición del D-aminoácido en SpIIA si no se dispone de cantidad suficiente del péptido nativo.

La presencia de un D-aminoácido en la estructura de **SpIIA** es una modificación postraducciona, que ha sido previamente encontrada en otras conotoxinas (Jiménez y Col., 1996). También el ácido γ -carboxiglutámico es una modificación postraducciona usualmente encontrada en conotoxinas (Craig y Col., 1999b), y sitios de reconocimiento para la carboxilación del Glu han sido reconocidos en la secuencia de los precursores de conotoxinas (Bush y Col., 1999). La tabla XXII muestra las estructuras de varios péptidos que contienen un D-aminoácido, entre ellos, se muestra un FaRP aislado del molusco *Mytilus edulis*, y los Contrifanos, aislados de especies de *Conus*. Como puede verse en la tabla, independientemente de cual sea el D-aminoácido, en todos los péptidos pequeños que no contienen Cys, éste ocupa la penúltima posición, mientras que en los Contrifanos, que son también péptidos pequeños pero que están constreñidos por el puente disulfuro que se establece entre los dos residuos de Cys, el D-aminoácido ocupa la cuarta posición.

secuencia de **SpIIA** con la de la **Conorfamida Sr1**, (más del 50% de homología entre los residuos de ambos péptidos), permite considerar a estos dos péptidos dentro de la misma familia, por lo que el péptido **SpIIA** es renombrado como **Conorfamida Sr2**.

Sin embargo, la **Conorfamida Sr2** presenta al aminoácido Tyr en lugar de Phe en la última posición de su estructura y, hasta el presente, no existen reportes del aislamiento de algún otro FaRPs que presente al aminoácido Tyr en esta posición; siendo que, en general, esta posición está ocupada por el aminoácido Phe (ver tabla XXI). La existencia de una "familia" de péptidos relacionados a FMRF-NH₂ fue inicialmente propuesta por Morris en 1992 en estudios de péptidos cardiactivos pequeños; y sugirió entonces que la unidad clave que define la actividad de esta familia es -F_XR_Y-NH₂, donde X e Y son aminoácidos hidrofóbicos (Morris y Col., 1982), y que el penúltimo residuo de Arg y la amidación del carboxilo terminal resultaban imprescindibles para la funcionalidad y/o la estabilidad del péptido. Espinoza y Col., en un reciente recuento efectuado sobre todos los integrantes de esta familia reportados en la literatura, han definido dos conceptos diferentes: FLPs son péptidos que terminan en RF-NH₂, y FaRPs son péptidos evolucionariamente relacionados al FMRF-NH₂ (Espinoza y Col., 2000). En ese reporte, presentan una secuencia consenso para los FLPs aislados de moluscos, (o predichos por las secuencias de los genes que los codifican en moluscos), que termina en -(F,L,R,Y)-(F,L,G,I,M,P,T,Y)-(R)-(F)-NH₂, pero tal y como lo aclaran los autores, consideran en su reporte únicamente a los FLPs, para "evitar la demostración de verdadera homología evolucionaria entre los FaRPs que frecuentemente es difícil o imposible".

El hecho de que hasta el presente no haya otro reporte de péptidos pertenecientes a la familia de los FMRFamido péptidos que terminen en Tyr, sin embargo, no imposibilita que la Conorfamida Sr2 pudiese catalogarse como tal, ya que, en esencia, cumple con la definición que hicieron Morris y Col. en 1982 para este tipo de péptidos. La literatura presenta además dos casos que difieren de la secuencia consenso presentada hasta ahora, y que apoyan la designación de la **Conorfamida Sr2** como un FaRPs: En primer lugar, los péptidos EFLRI-NH₂ Y ZFYRI-NH₂ han sido identificados en *Lymnaea stagnalis* (Santama y Col., 1995); ambos péptidos están codificados en el gen para FaRPs del caracol, y se ha detectado que cumplen funciones similares al resto de los FaRPs expresados por el organismo. Luego, se ha reportado que uno de los genes que codifican los FaRPs del nemátodo *C. elegans* predice la existencia de una copia de un péptido terminado en

PNFMRY-NH₂ (Day y Maule, 1999). En ambos casos, se cumple el motivo funcional -F_xR_y-NH₂, sugerido por Morris y Col., como requisito funcional de los FaRPs; más aún, la secuencia del péptido codificado por el gen (*flp*)-1 de *C. elegans* terminaría específicamente con el aminoácido Tyr amidado. En todo caso, la asignación de la Conorfamida Sr2 como un FaRPs se sustenta también con el descubrimiento de la tercera Conorfamida en el veneno de *C. spurius*, esto es, la **Conorfamida Sr3**, cuya estructura termina también con el aminoácido Tyr amidado.

El péptido inicialmente denominado **SpIVA** es otro de los productos mayoritarios que conforman el veneno de *C. spurius*, y su estructura, determinada mediante corte enzimático, secuenciación y espectrometría de masas, presenta homología con las **Conorfamida Sr1** y **Sr2**, y por ende, con los FaRPs, por lo que ha sido renombrada como **Conorfamida Sr3**. Cabe señalar que este nuevo miembro de la familia de las Conorfamidas contiene Leu en lugar de Phe en la cuarta posición a partir del carboxilo terminal, pero este aminoácido es uno de los que usualmente ocupan esta posición en FaRPs de moluscos, por lo que su presencia allí no impide la asignación efectuada. En la tercera posición a partir del carboxilo terminal, la Conorfamida Sr2 tiene al aminoácido Ile. Por otra parte y al igual que la **Conorfamida Sr1**, este péptido nativo produce hiperactividad cuando es inyectada icv en ratones.

Péptido	Estructura
Conorfamida Sr1	GPMGWVPVγYRF-NH₂
Conorfamida Sr2	GPMγYPPDγIIRY-NH₂
Conorfamida Sr3	ZVIIVPVAGGTLFRY-NH₂

Nuevamente es válido preguntarse si las **Conorfamidas Sr2** y **Sr3** forman parte del conjunto de los FaRPs que sin duda debe procesar el caracol *C. spurius* para ser usado por su propio sistema peptidérgico, o si la expresión de estos péptidos en el veneno se realiza con fines específicos de defensa o ataque. Es bien sabido que los moluscos expresan una amplia y variada gama de FaRPs, en general estructuralmente relacionados, lo que sustentaría la existencia de estas otras Conorfamidas en *C. spurius*, quedando solamente por elucidar si también estos péptidos son

igualmente expresados en otros tejidos del animal, y si se encuentran codificados, junto con la Conorfamida Sr1, en un gen típico para FaRPs, es decir, un gen que codifica varias copias de diferentes FaRPs.

Sin embargo, la presencia de tres Conorfamidas diferentes en el veneno de *C. spurius*, aunado a los hechos de que es la primera vez que se aísla un FaRPs de veneno de *Conus* y que la especie *C. spurius* es vermívora, apoya el dirigir la especulación en cuanto a que esta nueva familia de neuropéptidos, las Conorfamidas, cumplen funciones específicas en el veneno: Al igual que las especies piscívoras de *Conus* contienen en su veneno una serie de conotoxinas que interactúan específicamente con la capacidad de movimiento de su presa natural, los vertebrados; el caracol vermívoro *C. spurius* expresa en su veneno una serie de estructuras de FaRPs que podrían ser capaces de influir sobre el movimiento y la supervivencia de sus presas, depredadores o posibles competidores.

CONORFAMIDAS ANÁLOGAS

Como ya se ha indicado, es bien conocida la capacidad que tienen los diferentes componentes de los venenos de los *Conus* de modificar el comportamiento cuando estos son inyectados en el sistema nervioso central de ratones; y luego es posible realizar un reconocimiento integrativo de este fenómeno al detectar tanto el receptor blanco del péptido, como la localización de éste y de otras moléculas co-expresadas con el receptor en el organismo (Olivera y Col., 1999). Una vez conocidos los efectos sobre el comportamiento ejercidos por la inyección central ejercido por un determinado tipo de molécula, resulta útil conocer como éste es afectado por diversas modificaciones del compuesto inicial. Esto ha permitido determinar qué porciones de la molécula son cruciales para la actividad, y ha abierto el camino para el descubrimiento de subtipos diferentes del receptor blanco, o de nuevos receptores, entre otros.

Las Conorfamidas presentes en el veneno de *C. spurius* tienen actividad biológica en mamíferos. La inyección icv de las Conorfamidas Sr1 y Sr3 nativas en ratones mayores de 14 días de nacidos ocasionan hiperactividad, tal como lo hace el péptido FMRF-NH₂, prototipo de los

FMRFamido péptidos. Aunque la bioactividad de la Conorfamida Sr2 nativa no pudo ser probada debido a la poca cantidad disponible de éste péptido, es posible suponer que su actividad debe ser parecida.

En este trabajo se determinaron los efectos que producidos por la Conorfamida Sr1 y análogos sintéticos a ésta, mediante la inyección icv en ratones. Se demuestra que la Conorfamida Sr2 debe contener en su estructura al menos un D-aminoácido, por comparación con el péptido sintetizado con solamente L-aminoácidos. Si bien la presencia de un D-aminoácido en la Conorfamida Sr2 podría ser fundamental para la actividad, tal y como ocurre en el caso de las dermorfinas y deltorfinas (Negri y Col., 2000), también se ha reportado que el [L-Trp⁴]contrifano tiene actividad similar al contrifano natural que contiene D-Trp en esta posición (Jiménez y Col., 1996), por lo que la determinación de la actividad para el análogo sintético todo L resulta interesante, y este péptido sintético, la L-Conorfamida Sr2 (**CNF2**), es una de las conorfamidas análogas estudiadas. Por otra parte, al comparar las estructuras de las Conorfamidas Sr1 y Sr2 se observan dos aspectos resaltantes. En primer lugar, la Conorfamida Sr2 presenta dos residuos de Gla para sustituir los residuos de Gly y Trp de la 4^a y 5^a posición, que podrían resultar son importantes para la actividad; además, este péptido presenta una porción cercana al carboxilo terminal que difiere considerablemente del patrón más frecuente de terminación de los FMRFamido péptidos (RF-NH₂).

Por estas razones se decidió emplear las estructuras base de las Conorfamidas Sr1 y Sr2 para preparar análogos sintéticos que permitieran estudiar la relación entre la estructura y la bioactividad para estos péptidos. Para ello, se sintetizaron, además de la Conorfamida Sr1 (**CNF1**) y la L-Conorfamida Sr2 (**CNF2**), dos péptidos análogos cuyas estructuras se muestran en la tabla XXIII. En el primero de ellos, **CNF3**, los dos residuos de Gla de **CNF2** se sustituyeron con Glu, a fin de determinar que tan importantes son aquellos para la bioactividad; el segundo péptido análogo sintético, **CNF4**, se preparó como un híbrido entre la Conorfamidas Sr1 y **CNF2**, los primeros 8 residuos son los mismos de la L-Conorfamida Sr2, y los últimos cuatro son idénticos a los de la Conorfamida Sr1, y similares a los usuales para la porción final de los FaRPs. Estos cuatro péptidos sintéticos fueron utilizados para determinar la bioactividad en vertebrados las Conorfamidas.

Los péptidos sintéticos análogos fueron bioensayados en ratones, tal y como se hizo con la **Conorfamida Sr1**, mediante inyección icv de dosis variables en ratones de 11 a 23 días de nacidos. Dada la evidente hiperactividad producida por la inyección de la Conorfamida Sr1 sintética, este péptido fue empleado como control positivo, además de la usual inyección de ratones control solamente con solución salina normal (control negativo).

Tabla XXIII. Estructura de Conorfamidas naturales y sintéticas.

Péptido	Estructura
CNF1	GPMGWVPVFYRF-NH ₂
CNF2	GPM γ PPDFIRY-NH ₂
CNF3	GPM W PPDFIRY-NH ₂
CNF4	GPM γ PPDFYRF-NH ₂

Los resultados de estos bioensayos, resumidos en las tablas XVII y XVIII, demuestran que todos los análogos ensayados producen SINDROME HIPERACTIVO, que ya se ha descrito como el incremento de la duración y la velocidad del movimiento del ratón alrededor de la caja de observación, de la tendencia a trepar las paredes en las esquinas, y de la frecuencia de saltos dentro y hacia fuera de la caja. Igualmente se observó que, además de la hiperactividad, los análogos sintéticos CNF2, CNF3 y CNF4 producen SENSIBILIDAD AL TACTO (definido como el comportamiento de los ratones que al tratar de ser tocados huyen violentamente, e inclusive chillan al ser tocados), y SENSIBILIDAD A RUIDOS DE BAJO NIVEL (donde se dice que los ratones presentan este síntoma si al ser sometidos a un ruido de muy bajo volumen, como el chasquear los dedos dentro de la caja, el ratón se paraliza echando las orejas hacia atrás, y luce aterrorizado, permaneciendo en este estado por unos minutos, tras lo cual prosigue con su comportamiento hiperactivo si la dosis aplicada no es muy alta).

El análisis de los ensayos de bioactividad muestra aspectos sumamente interesantes, en cada uno de los síntomas observados, que varían según la edad de los animales ensayados. Como

ya se ha mencionado, la Conorfamida Sr1 produce hiperactividad solamente en ratones de más de 14 días, y lo mismo ocurre luego de la inyección de los análogos sintéticos, lo cual parece indicar que la (o las) molécula blanco de éstos péptidos, responsable del comportamiento hiperactivo, podría no estar aún desarrollado en ratones jóvenes.

La inyección de **Conorfamida Sr1** en ratones jóvenes produce sensibilidad al tacto en casi la mitad de los casos, mientras que este síntoma se presentan en cambio en la casi totalidad de los ratones jóvenes inyectados con los péptidos análogos CNF2, CNF3 y CNF4. En el caso particular del péptido análogo CNF2, la sensibilidad al tacto se presenta como un síntoma constante, independientemente de la edad del ratón, y acompañando a la hiperactividad en ratones de más de 14 días, mientras que la sensibilidad al tacto parece sustituir a la hiperactividad. Un porcentaje considerable de ratones jóvenes inyectados con Conorfamida Sr1, CNF2 y CNF3 presentan además, sensibilidad a los ruidos de bajo nivel, siendo de nuevo este síntoma una constante que acompaña la hiperactividad en ratones inyectados con el péptido análogo CNF2. En todos los casos además, la hiperactividad constituía casi el único efecto a dosis muy bajas.

Los resultados obtenidos de estos bioensayos permiten hacer algunas especulaciones en cuanto a *relación estructura/actividad de los péptidos analizados*. En primer lugar, resulta evidente que el péptido análogo CNF2 es mucho más activo que el resto de las estructuras estudiadas: Además de la hiperactividad, este péptido, equivalente a la **L-Conorfamida Sr2** produce sensibilidad al tacto y a los ruidos de bajo nivel en casi todos los casos, y resulta oportuno recordar que esta molécula contiene dos residuos de Gla en su estructura. La presencia de modificaciones postraduccionales en conotoxinas es muy frecuente (Craig y Col., 1997), en particular, abunda la amidación del carboxilo terminal, que pretende estabilizar al péptido frente a la acción de proteasas; y la carboxilación del ácido glutámico, que se ha reportado como responsable de la estabilización de la estructura tridimensional de los péptidos (Lin y Col., 1997). La presencia de estos dos residuos de Gla en la estructura de la Conorfamida Sr2 podría significar una ventaja adaptativa de la especie destinada a incrementar el efecto perseguido en los organismos con los que interactúa.

La sensibilidad al tacto se mantiene luego de la inyección de los péptidos sintéticos análogos CNF3 y CNF4, siendo que estos dos péptidos son muy similares entre sí en la primera porción de su

estructura, y la sensibilidad a ruidos de bajo nivel no es un efecto importante luego de la inyección del péptido CNF4, que termina con los mismos residuos presentes en la Conorfamida Sr1, que por otra parte son similares a los que presentan la mayoría de los FaRPs. Estos péptidos podrían estar actuando sobre subtipos diferentes de un mismo blanco molecular, y las variaciones podrían significar diferencia en las afinidades de cada uno de los péptidos derivadas de los cambios en su estructura, o indicar diferencias en cuanto al sitio por el cual se unen al mismo receptor; pero también es posible que las diferencias se deban a las dosis empleadas, y sea necesario una mayor cantidad de péptido para interferir con algunos de los posibles blancos o sitios de unión en los mismos. En todo caso, resulta necesario ubicar el receptor blanco de las Conorfamidas y realizar ensayos en presencia de diferentes tipos de agonistas y antagonistas a fin de clarificar los resultados obtenidos.

En todo caso, el síntoma principal que se observa luego de la inyección tanto de Conorfamida Sr1 como de sus análogos sintéticos no resulta extraño dado que los péptidos bioensayados pertenecen a la familia de los FMRFamido péptidos, ya que es bien conocida la influencia de estos péptidos en los procesos relacionados con el dolor: Por una parte se ha demostrado la modulación que ejercen algunos FaRPs en la apertura de canales de sodio activados por ácido, que están implicados en la sensación del dolor (Chen y Col., 1998 y Askwith y Col., 2000). Esta acción se confirma cuando se demuestra la sobre-expresión de FaRPs de mamíferos que ocurre en tejidos expuestos a modelos de dolor inflamatorio (Vilim y Col., 1999); además, diferentes FaRPs de mamíferos son capaces de ejercer potente actividad anti- (Roumy y Zajac, 1998), o pro-opioide (Gouarderes y Col., 1993), según la ruta de administración, y se ha demostrado que estos efectos no están mediados por la unión de FaRPs a los receptores opiáceos (Raffa y Col., 1994), sino a otros que le son propios (Marco y Col., 1995).

Es bien conocido el hecho de la inyección central de péptidos opiáceos y sus análogos en ratones produce alteraciones de la actividad locomotora; así, inyecciones icv del μ -opioideo apomorfina en ratones produce incrementos de la locomoción lineal, movimiento circular y acicalamiento (Ukai y Col., 1991), e inyecciones icv de nociceptina, agonista del receptor opioide ORL1, estimulan la locomoción en ratones (Florin y Col., 1996). El análisis de estos cambios en el comportamiento permiten determinar otro tipo de interacciones; como ejemplo, el evidente

incremento en la locomoción causada por la inyección icv del opiáceo dinorfina y algunos de sus análogos en ratones es reducida por la co-administración de diversos antagonistas del receptor a glutamato agonizado por NMDA, indicando que los efectos de los opiáceos (caracterizados por el correr de manera incontrolada, incrementos en el salto, movimiento circular y rodar), envuelven la participación del receptor excitatorio de NMDA (Shukla y Col., 1997). Por otra parte, también se ha reportado una dependencia entre la concentración de los opiáceos y el tipo de los efectos presentados, así, el opiáceo Nociceptina/orfanina FQ estimula la locomoción espontánea en ratones cuando es inyectado icv a dosis bajas, mientras que a dosis altas, la inhibe (Rizzi y Col., 2001). También se ha reportado incremento de la actividad locomotora debida a la inyección icv de diversos opiáceos a cobayos (Bot y Col., 1992).

En todo caso, el descubrimiento de las Conorfamidas en el veneno de *C. spurius* abre todo un mundo de posibilidades. Actualmente los FaRPs constituyen una familia de neuropéptidos de excelente potencial en cuanto a sus posibles aplicaciones, no solamente en cuanto a su posible acción en la modulación del dolor, sino en su uso como antiparasitarios. La morbilidad mundial debida a la infección por helmintos en humanos es alarmante, y constantemente se hacen grandes esfuerzos en la búsqueda de una quimioterapia efectiva contra estas infecciones, ya que el uso indiscriminado de los antihelmínticos disponibles conduce a la generación de parásitos con resistencia a los fármacos en uso (Day y Maule, 1999). La atención de muchos parasitólogos se ha centrado recientemente en el estudio de los neuropéptidos de los helmintos, especialmente en los FaRPs abundantes en nemátodos no parásitos, como la especie *C. elegans*, ya que debido al cruce inter-phyla en las acciones de estos neuropéptidos, su empleo como antiparasitarios luce prometedor.

CONCLUSIONES

- Se aislaron, purificaron y caracterizaron químicamente cuatro péptidos del veneno de la especie *Conus spurius*.
- Tres de los péptidos aislados, modifican el comportamiento de ratones cuando se inyectan en su sistema nervioso central.
- Uno de los péptidos aislados y caracterizados, la ϵ -SrlXA, pertenece a la superfamilia de las T-conotoxinas, previamente reportada en especies del género *Conus*, con actividad sobre la liberación de neurotransmisores en la sinapsis colinérgica de *Aplysia*.
- Los otros tres péptidos aislados y caracterizados son análogos a los miembros de la familia de los FMRFamido péptidos, siendo la primera vez que se demuestra la presencia de este tipo de péptidos en el veneno de una especie de *Conus*. Estos péptidos han sido denominados CONORFAMIDAS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott, R. T. y Dance, S. P. (1990). *Compendium of Seashells*, 4th Edition, E.P. Dutton, Inc., New York, USA. Pp 267.
2. Adams, M. E. y Olivera, B. M. (1994). Neurotoxins: Overview of an emerging research technology. *TINS*, **17**: 151-155.
3. Armstrong, E. P., Halton, D. W., Tinsley, R. C., Cable, J., Johnston, R. N., Johnston, C. F. y Shaw, C. (1997). Immunocytochemical evidence for the involvement of an FMRFamide-related peptide in egg production in the flatworm parasite *Polystoma nearcticum*. *J. Comp. Neurol.* **377**(1): 41-48.
4. Askwith, C. C., Cheng, C., Ikuma, M., Benson, C., Price, M. P. y Wesh, M. J. (2000). Neuropeptide FF and FMRFamide Potentiate Acid-Evoked Currents from Sensory Neurons and Proton-Gated DEG/EnaC Channels. *Neuron* **26**: 133-141.
5. Balaji, R. A., Ohtakes, A., Kazuki, S., Gopalakrishnakone, P., Kini, R. M., Tong-Seow, K. y Bay, B-H. (2000). λ -Conotoxins, a New Family of Conotoxins with Unique Disulphide Pattern and Protein Folding. *J. Biol. Chem.* **275**: 39516-39522.
6. Bandyopadhyay, P.K., Colledge, C.J., Walker, C.S., Zhou, L.M., Hillyard, D.R. y Olivera, B.M. (1998) Conantokin-G precursor and its role in γ -carboxylation by vitamin K-dependent carboxylase from a *Conus* snail. *J. Biol. Chem.* **273**: 5447-5450.
7. Bargmann, C. I. (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* **282**: 2028-2033.
8. Boer, H. H., Schot, L. P., Veenstra, J. A. y Reichelt, D. (1980). Immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous systems of a snail, some insects, a fish, and a mammal with an antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRFamide. *Cell Tissue Res* **213**(1):21-27.
9. Boersma, C.J., Sonnemans, M. A. y Van Leeuwen, F. W. (1993). Immunocytochemical localization of neuropeptide FF (FMRF amide-like peptide) in the hypothalamo-neurohypophyseal system of Wistar and Brattleboro rats by light and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* **336**(4): 555-570.
10. Bot, G., Chahl, L. A., Brent, P. J. y Johnston, P. A. (1992). Effects of intracerebroventricularly administered mu-, delta-, and kappa-opioid agonist on locomotor activity of the guinea pig and the pharmacology of the locomotor response to U50,488H. *Neuropharmacology* **31**(9): 825-833.
11. Broccardo, M., Erspamer, V., Falconieri-Erspamer, G., Improta, G., Linari, G., Melchiorri, P., y Montecicchi, P. C. (1981). Pharmacological data on dermorphins, a new class of potent opioid peptides from amphibian skin. *Br. J. Pharmacol.* **73**: 625-631.

25. Cruz, L. J., de Santos, V., Zafaralla, G. C., Ramilo, C. A., Zeikus, R., Gray, W. R. y Olivera, B. M. (1987). Invertebrate Vasopressin/Oxytocin Homologs. *J. Biol. Chem.* **262**: 15821-15824.
26. D'Aniello, B., Pinelli, C., Jadhao, A. G., Rastogi, R. K. y Meyer, D. L. (1999). Comparative analysis of FMRFamide-like immunoreactivity in caiman (*Caiman crocodilus*) and turtle (*Trachemys scripta elegans*) brains. *Cell Tissue Res.* **298**(3): 549-559.
27. Davis, R. E. y Stretton, A. O. (2001). Structure-activity relationships of 18 endogenous neuropeptides on the motor nervous system of the nematode *Ascaris suum*. *Peptides* **22**(1): 7-23 (2001).
28. Day, T. A., Maule, A. G., Shaw, C., Halton, D. W., Moore, S., Bennett, J. L. y Pax R. A. (1994). Platyhelminth FMRFamide-related peptides (FaRPs) contract *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Digenea) muscle fibres in vitro. *Parasitology* **109**(4): 455-459.
29. Day, T. A. y Maule, A. G. (1999). Parasitic peptides! The structure and function of neuropeptides in parasitic worms. *Peptides* **20**: 999-1019.
30. Devillers, J. P., Boisserie, F., Laulin, J. P., Larcher, A. y Simonnet, G. (1995). Simultaneous activation of spinal antiopioid system (neuropeptide FF) and pain facilitatory circuitry by stimulation of opioid receptors in rats. *Brain Res.* **700**(1-2): 173-181.
31. Dockray, G. J., Reeve, J. R., Shively, J., Gayton, R. J. y Barnard, C. S. (1983). A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide. *Nature* **305**(5932): 328-330.
32. Duda, T. F. y Palumbo, S. R. (1999a). Molecular genetics of ecological diversification: Duplication and rapid evolution of toxin genes of the venomous gastropod *Conus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **96**(12): 6820-6823.
33. Duda, T. F. y Palumbo, S. R. (1999b). Developmental shifts and species selection in gastropods. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **96**(18): 10272-10277.
34. Duve, H., Johsen, A. H., Sewell, J. C., Scott, A. G., Orchard, I., Rehfeld, J. F. y Thorpe, A. (1992). Isolation, structure, and activity of Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ neuropeptides (designated calliFMRFamides) from the blowfly *Calliphora vomitoria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**: 2326-2330.
35. Ellis, A. M. y Huddart, H. (2000). Excitation evoked by FMRFamide and FLRFamide in the heart of *Buccinum undatum* and evidence for inositol 1,4,5-trisphosphate as an RF-tetrapeptide second messenger. *J. Comp. Physiol. B* **170**(5-6): 351-356.
36. Elshourbagy, N. A., Ames, R. S., Fitzgerald, L. R., Foley, J. J., Chambers, J. K., Szekeres, P. G., Evans, N. A., Schmidt, D. B., Buckley, P. T., Dytko, G. M., Murdock, P. R., Milligan, G., Groarke, D. A., Tan, K. B., Shabon, U., Nuthulaganti, P., Wang, D. Y., Wilson, S., Bergsma,

- D. J., y Sarau, H. M. (2000). Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **275**(34): 25965-71.
37. England, L. J., Imperial, J., Jacobsen, R., Craig, A. G., Gulyas, J., Akhtar, M., Rivier, J., Julius, D. y Olivera, B. M. (1998). Inactivation of a Serotonin-Gated Ion Channel by a Polypeptide Toxin from Marine Snails. *Science* **281**: 575-578.
 38. Erspamer, V., Melchiorri, P., Falconieri-Erspamer, G., Negri, L., Corsi, R., Severini, C., Barra, D., Simmanco, M., y Kreil, G. (1989). Deltorphins: a family of naturally occurring peptide with high affinity and selectivity for δ -opioid binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **86**: 5188-5192.
 39. Espinoza, E., Carrigan, M., Thomas, S. G., Shaw, G. y Edison, A. S. (2000). A Statistical View of FMRFamide Neuropeptide Diversity. *Mol. Neurobiol.* **21**: 35-56.
 40. Fainzilber, M., Gordon, D., Hasson, A., Spira, M. Y Zlotkin, E. (1991). Mollusk-specific toxins from the venom of *Conus textile neovicarius*. *Eur. J. Biochem.* **202**: 589-595.
 41. Fainzilber, M., Hasson, A., Oren, R., Burlingame, A. L., Gordon, D., Spira, M. E. y Zlotkin, E. (1994). New mollusk-specific α -conotoxins block *Aplysia* neuronal acetylcholine receptors. *Biochem.* **33**: 9523-9529.
 42. Fainzilber, M., Nakamura, T., Lodder, J. C., Zlotkin, E., Kits, K. S., y Burlingame, A. L. (1998). γ -Conotoxin-PnVIIA, A γ -Carboxyglutamate-Containing Peptide Agonist of Neuronal Pacemaker Cation Currents. *Biochem.* **37**: 1470-1477.
 43. Farr-Jones, S., Miljanich, G. P., Nadashi, L., Ramachandran, J. y Basus, W. (1995). Solution Structure of ω -Conotoxin MVIIc, a High Affinity Ligand of P-type Calcium Channels, using ^1H NMR Spectroscopy and Complete Relaxation Matrix Analysis. *J. Mol. Biol.*, **248**: 106-124.
 44. Fegan, D. y Andersen, D. (1997). *Conus geographus* envenomation. *The Lancet* **349**: 1672.
 45. Fellowes, R. A., Maule, A. G., Marks, N. J., Geary, T. G., Thompson, D. P., Shaw, C. y Halton, D. W. (1998). Modulation of the motility of the vagina vera of *Ascaris suum* in vitro by FMRF amide-related peptides. *Parasitology* **116**(3): 277-287.
 46. Florin, S., Suaudeau, C., Meunier, J. C. y Costentin, J. (1996). Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **317**(1): 9-13.
 47. Fossier, P., Baux, G. y Tauc, L. (1994). Presynaptic mechanisms regulating Ca^{2+} concentration triggering acetylcholine release at an identified neuro-neuronal synapse of *Aplysia*. *Neuroscience* **63**(2): 405-414.
 48. Fujimoto, K., Kobota, I., Yasuda-Kamatani, Y., Minakata, H., Nomoto, K., Yoshida, M., Harada, A., Muneoka, Y. y Kobayashi, M. (1991). Purification of achantin-I from the atria of

the African giant snail *Achantina fulica*, and its possible function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**: 847-853.

49. Fujimoto, M., Takeshita, K., Wang, X., Takabatake, I., Fujisawa, Y., Teranishi, H., Ohtani, M., Muneoka, Y. y Ohta, S. (1998). Isolation and characterization of a novel bioactive peptide, Carassius RFamide (C-RFa), from the brain of the Japanese crucian carp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**(2): 436-440.
50. Fujisawa, Y., Ikeda, T., Nomoto, K., Yasuda-Kamatani, Y., Minakata, H., Kenny, P. T., Kubota, I. y Muneoka, Y. (1992). The FMRFamide-related decapeptide of *Mytilus* contains a D-amino acid residue. *Comp. Biochem. Physiol. C* **102**(1): 91-95.
51. Fujiwara-Sakata, M. y Kobayashi, M. (1992). Neuropeptides regulate the cardiac activity of a prosobranch mollusc, *Rapana thomasi*. *Cell. Tissue. Res.* **269**(2): 241-247.
52. García-Añoveros, J., Derfler, B., Neville-Golden, J., Hyman, B. T. y Corey, D. P. (1997). BnaC1 and BnaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **94**: 1459-1464.
53. Geary, T. G., Marks, N. J., Maule, A. G., Bowman, J. W., Alexander-Bowman, S. J., Day, T. A., Larsen, J., Kubiak, T. M., Davis, J. P. y Thompson, D. P. (1999). Pharmacology of FMRFamide-related peptides in helminths. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **897**: 212-227.
54. Gibbs, W. W. (1996). A new way to spell relief: V-e-n-o-m, a toxin from killer sea snails promises a better painkiller. *Scientific American* **274**: 20-21.
55. Gouarderes, C., Sutak, M., Zajac, J. M. y Jhamandas, K. (1993). Antinociceptive effects of intrathecally administered F8Famide and FMRFamide in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **237**(1): 73-81.
56. Graham, M. K., Fairweather, I. y McGeown, J. G. (2000). Second messengers mediating mechanical responses to the FARP GYIRFamide in the fluke *Fasciola hepatica*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**(6): R2089-2094.
57. Gray, W. R y Olivera, B. M. (1988). Peptide Toxins from venomous *Conus* Snails. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 665-700.
58. Greenberg, M. J. y Price, D. A. (1992). Relationships among the FMRFamide-like peptides. *Prog. Brain Res.* **92**: 25-37.
59. Gupta, S., Pasha, S., Gupta, Y. K. y Bhardwaj, D. K. (1999). Chimeric peptide of Met-enkephalin and FMRFa induces antinociception and attenuates development of tolerance to morphine antinociception. *Peptides*, **20**(4): 471-478.
60. Haack, J. A., Rivier, J., Parks, T. N., Mena, E. E., Cruz, L. J. y Olivera, B. M. (1990). Conantokin-T. A γ -carboxyglutamate containing peptide with N-methyl-D-aspartate antagonist activity. *J. Biol. Chem.* **265**: 6025-6029.

61. Henry, J., Zatylny, C. y Boucaud-Camou, E. (1999). Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. *Peptides* **20**(9): 1061-1070.
62. Hewes, R. S., Snowdeal, E. C., Saitoe, M. y Taghert, P. H. (1998). Functional redundancy of FMRFamide-related peptides at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **18**(18): 7138-7151.
63. Hillyard, D. R., Monje, V. D., Mintz, I. M., Bean, B. P., Nadasdi, L., Ramachandran, J., Miljanich, G., Azimi-Zoonooz, A., McIntosh, J. M., Cruz, L. J., Imperial, J. S. y Olivera, B. M. (1992). A New *Conus* Peptide Ligand for Mammalian Presynaptic Ca²⁺ Channels. *Neuron* **9**: 69-77.
64. Hopkins, C., Grilley, M., Miller, C., Shon, K. J., Cruz, L. J., Gray, W. R., Dykert, J., Rivier, J., Yoshikami, D. y Olivera, B. M. (1995). A New Family of *Conus* Peptides Targeted to the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 22361-22367.
65. Jacobsen, R. B., Jimenez, E. C., Grilley, M., Watkins, M., Hillyard, D., Cruz, L. J., y Olivera, B. M. (1998). The contryphans, a D-tryptophan containing family of *Conus* peptides: interconversion between conformers. *J. Peptide Res.* **51**: 173-179.
66. Jiménez, E. C., Olivera, B. M., Gray, W. R., y Cruz, L. J. (1996). Contryphan Is a D-Tryptophan containing *Conus* Peptide. *J. Biol. Chem.* **271**(45): 28002-28005.
67. Johnson, D. S., Martínez, J., Elgoyhen, A. B., Heinemann, S. S., y McIntosh, J. M. (1995) α -Conotoxin ImI Exhibits Subtype-Specific Nicotinic Acetylcholine Receptor Blockade: Preferential Inhibition of Homomeric $\alpha 7$ and $\alpha 9$ Receptors. *Mol. Pharmacol.* **48**: 194-199.
68. Johnston, R. N., Shaw, C., Halton, D. W., Verhaert, P. y Baguna, J. (1995). GYIRF-amide: a novel FMRFamide-related peptide (FaRP) from the triclad turbellarian, *Dugesia tigrina*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**(2): 689-697.
69. Kavaliers, M. (1990). Inhibitory influences of mammalian FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-amide)-related peptides on nociception and morphine- and stress-induced analgesia in mice. *Neurosci. Lett.* **115**(2-3): 307-312.
70. Kavaliers, M. y Colwell, D. D. (1993). Neuropeptide FF (FLQPRFamide) and IgG from neuropeptide FF antiserum affect spatial learning in mice. *Neurosci. Lett.* **157**: 75-78.
71. Khan, H. R., Price, D. A., Doble, K. E., Greenberg, M. J. y Saleuddin, A. S. (1999). Osmoregulation and FMRFamide-related peptides in the salt marsh snail *Melampus bidentatus* (Say) (Mollusca: Pulmonata). *Biol. Bull.* **196**(2): 153-162.
72. Kimber, M. J., Fleming, C. C., Bjourson, A. J., Halton, D. W. y Maule, A. G. (2001). FMRFamide-related peptides in potato cyst nematodes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **116**(2): 199-208.

73. Kingan, T., Shabanowitz, J., Hunt, D. y Witten, J. (1996). Characterization of two myotrophic neuropeptides in the FMRFamide family from the segmental ganglia of the moth *Manduca sexta*: candidate neurohormones and neuromodulators. *J. Exp. Biol.* **199**(5): 1095-1104.
74. Kits, K. S., Lodder, J. C., van der Schors, R., Li, K. W., Geraerts, W. P. M., y Fainzilber, M. (1996). Novel ω -Conotoxins Block Dihydropyridine-Insensitive High Voltage-Activated Calcium Channels in Molluscan Neurons. *J. Neurochem.* **67**: 2155-2163.
75. Kohn, A. J. (1956). Piscivorous Gastropods of the Genus *Conus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **42**: 168-171.
76. Khon, A. J., Saunders, P. R. y Wiener, S. (1960). Preliminary Studies on the Venom of the Marine Snail *Conus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **90**: 706-725.
77. Kohn, A. J., Nybakken, J. W. y Van Mol, J-J (1972). Radula Tooth Structure of the Gastropod *Conus imperialis* Elucidated by Scanning Electron Microscopy. *Science* **176**: 49-51.
78. Kohn, A. J. (1990). Tempo and mode of evolution in *Conidae*. *Malacologia* **32**(1): 55-67.
79. Kreil, G. (1997). D-Amino acids in animal peptides. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 337-345.
80. Lange, A. B., Peef, N. M. y Orchard, I. (1994). Isolation, sequence, and bioactivity of FMRFamide-related peptides from the locust ventral nerve cord. *Peptides* **15**: 1089-1094.
81. Lev-Ram, V., Olivera, B. M. y Levitan, I. B. (1993). A toxin from the venom of the predator snail *Conus textile* modulates currents in *Aplysia* bursting pacemaker neuron. *Brain. Res.* **640**: 48-55.
82. Li, C., Kim, K. y Nelson, L. S. (1999). FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Brain Res.* **848**(1-2): 26-34.
83. Lin, C. H., Chen, C. S., Hsu, K. S., King, D. S. y Lyu, P. C. (1997). Role of modified glutamic acid in the helical structure of conantokin-T. *FEBS Letters* **407**: 243-248.
84. Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M. y Barbry, P. (1995). Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel. *Nature* **378**(6558): 730-733.
85. Lirazan, M., Hooper, D., Corpuz, G. P., Ramilo, C. A., Brandyopadhyay, P., Cruz, L. J. y Olivera, B. M. (2000). The Spasmodic Peptide Defines a New Conotoxin Superfamily. *Biochem.* **39**(7): 1583-1588.
86. Loi, P. K., Saunders, R., Young, D. y Tublitz, N. (1996). Peptidergic regulation of chromatophore function in the European cuttlefish *Sepia officinalis*. *J. Exp. Biol.* **199**(5): 1177-1187.
87. Loi, P. K. y Tublitz, N. (1997). Molecular analysis of FMRFamide- and FMRFamide-related peptides (FaRPS) in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *J. Exp. Biol.* **200**(10): 1483-1489.

88. Lutz, E. M., MacDonald, M., Hettles, S., Price, D. A., Cotrell, G. A. y Sommerville, J. (1992). Structure of cDNA clones and genomic DNA encoding FMRFamide-related peptides (FaRPs) in *Helix*. *Mol. Cell Neurosci.* 3: 373-382.
89. Maillo, M., Aguilar, M. B., López-Vera, E., Craig, A. G., Bulaj, G., Olivera, B. M. y Heimer de la Cotera, E. P. (2001). Conorfamide, a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides. *Toxicon* (en prensa).
90. Mano, I. y Driscoll, M. (1999). DEG/EnaC channels: a touchy superfamily that watches its salt. *BioEssays* 21: 568-578.
91. Marcano, D. y Hasegawa, M (1991). *Fitoquímica Orgánica*. Ediciones Universidad Central de Venezuela, CDCH, Caracas Venezuela. Pp. 307, 312, 336 y 361.
92. Marco, N., Stinus, L., Allard, M., Le Moal, M. y Simonnet, G. (1995). Neuropeptide FLFQRFamide receptors within the ventral mesencephalon and dopaminergic terminal areas: localization and functional antioxioid involvement. *Neuroscience* 64(4): 1035-1044.
93. Marks, N. J, Maule, A. G., Halton, D. W., Geary, T. G., Shaw, C. y Thompson, D. P. (1997). Pharmacological effects of nematode FMRFamide-related peptides (FaRPs) on muscle contractility of the trematode, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 114(6): 531-539.
94. Martínez, J. S., Olivera, B. M., Gray, W. R., Craig, A. G., Groebe, D. R., Abramson, S. N. y McIntosh, J. M. (1995). α -conotoxin EI, a new nicotinic acetylcholine receptor antagonist with novel selectivity. *Biochem.* 34: 14519-14526.
95. Maslennikov, I.V., Shenkarev, Z.O., Zhmak, M.N., Ivanov, V.T., Methfessel, C., Tsetlin, V.I. y Arseniev, A.S.(1999). NMR spatial structure of α -conotoxin Iml reveals a common scaffold in snail and snake toxins recognizing neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS Lett.* 444: 275-280.
96. Miljanich, G. P. (1997). Venom Peptides as Humans Pharmaceuticals. *Science and Medicine* 4(5): 6-15.
97. Mitsuma, T., Nogimori, T., De Heng, S. y Chaya, M. (1985). Stimulatory effect of PMRPFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) on thyrotropin secretion in rats. *Endocrinol. Exp.* 19(4): 205-211.
98. Morris, H. R., Panico, M., Karplus, A., Lloyd, P. E. y Riniker, B. (1982). Elucidation by FAB-MS of the structure of a new cardioactive peptide from *Aplysia*. *Nature* 300: 643-645.
99. Mues, G., Fuchs, I., Wei, E. T., Weber, E., Evans, C. J., Barchas, J. D. y Chang, J. K. (1982). Blood pressure elevation in rats by peripheral administration of Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe and the invertebrate neuropeptide, Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Life Sci.* 31(23): 2555-2561.
100. Myers, R. A., Cruz, L. J., Rivier, J. y Olivera, B. M. (1993). *Conus* peptides as chemical probes for receptors and ion channels. *Chem. Rev.* 93: 1923-1936.

101. McIntosh, J. M., Foderaro, T. A., Li, W., Ireland, C. M. y Olivera, B. M. (1993). Presence of Serotonin in the Venom of *Conus imperialis*. *Toxicon* **31**: 1561-1566.
102. McIntosh, J. M., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Dooley, D. J., Stoehr, S. J., Giordani, A. B., Naisbitt, S. R. y Olivera, B. M. (1995a). Conodipine-M, a Novel Phospholipase A₂ Isolated from the Venom of the Marine Snail *Conus Magus*. *J. Biol. Chem.* **270**: 3518-3526.
103. McIntosh, J. M., Hasson, A., Spira, M. E., Gray, W. R., Li, W., Marsh, M., Hillyard, D. R. y Olivera, B. M. (1995b). A New Family of Conotoxins That Blocks Voltage-gated Sodium Channels. *J. Biol. Chem.* **270**: 16796-16802.
104. McIntosh, J. M., Santos, A. D. and Olivera, B. M. (1999) Conus Peptides Targeted to Specific Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes. *Ann. Rev. Biochem.*, **68**: 59-88.
105. McIntosh, J. M., Corpuz, G. O., Layer, R. T., Garret, J. E., Wagstaff, J. D., Bulaj, G., Vyazovkina, A., Yoshikami, D., Cruz, L. J., y Olivera, B. M. (2000). Isolation and Characterization of a Novel *Conus* Peptide with Apparent Antinociceptive Activity. *J. Biol. Chem.* **275**(42): 32391-32397.
106. Nachman, R. J., Giard, W., Lange, A. y Favrel, P. (1999). Stimulation of alpha-amylase release in the scallop *Pecten maximus* by the myosuppressins. Structure-activity relationships. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **897**: 273-81.
107. Negri, L., Melchiorri, P. y Lattanzi, R. (2000). Pharmacology of Amphibian Opiate Peptides. *Peptides* **21**: 1639-1647.
108. Nelson, L. S., Kim, K., Memmott, J. E. y Li, C. (1998). FMRFamide-related gene family in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Brain Res.* **58**(1-2): 103-111.
109. Nielsen, D. B., Dykert, J., Rivier, J. E. y McIntosh, J. M. (1994). Isolation of Lys-Conopressin-G from the Venom of the worm-hunting snail *Conus imperialis*. *Toxicon* **32**: 845-848.
110. Ohta, N., Kubota, I., Takao, T., Shimonishi, Y., Yasuda-Kamatani, Y., Minakata, H., Nomoto, K., Muneoka, Y., y Kobayashi, M. (1991). Fulicin, a novel neuropeptide containing a D-amino acid residue isolated from the ganglia of *Achantina fulica*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **178**(2): 486-493.
111. Olivera, B. M., Gray, W. R., Zeikus, R., McIntosh, J. M., Varga, J., Rivier, J., de Santos, V. y Cruz, L. J. (1985a). Peptide Neurotoxins from Fish-Hunting Cone Snails. *Science* **230**: 1338-1343.
112. Olivera, B. M., McIntosh, J. M., Clark, C., Middelmas, D., Gray, W. R. y Cruz, L. J. (1985b). A Sleep-Inducing Peptide from *Conus geographus* Venom. *Toxicon* **23**(2): 277-282.
113. Olivera, B. M., Rivier, J., Clark, C., Ramilo, C., Corpuz, G. P., Abogadie, F. C., Mena, E. E., Woodward, S. R., Hillyard, D. R. y Cruz, L. J. (1990). Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science* **249**: 257-263.

114. Olivera, B. M., Rivier, J., Scott, J. K., Hillyard, D. R. y Cruz, L. J. (1991). Conotoxins. *J. Biol. Chem.* **266**: 22067-22070.
115. Olivera, B. M., Miljanich, G., Ramachandran, I. y Adams, M. E. (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Ann. Rev. Biochem.* **63**: 823-867.
116. Olivera, B. M. (1997). *Conus* Venom Peptides, Receptor and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50 Million Years of Neuropharmacology. *Mol. Biol. Cell* **8**: 2101-2109.
117. Olivera, B. M. (1999). *Conus* Venom Peptides: correlating chemistry and behavior. *J. Comp. Physiol. A* **185**: 353-359.
118. Olivera, B. M., Cruz, L. J. y Yoshikami, D. (1999). Effects of *Conus* peptides on the behavior of mice. *Curr. Opinion in Neurobiology*, **9**: 772-777.
119. Olivera, B. M. (2000). ω -Conotoxin MVIIA: From Marine Snail Venom to Analgesic Drug. *Drugs From The Sea*, Fusetani, N. (ed). Basel, Karger, pp 74-85.
120. Olivera, B. M. y Cruz, L. J. (2000). Conotoxins, in retrospect. *Toxicon* **39**: 7-14.
121. Payza, K., Greenberg, M. J. y Price, D. A. (1989). Further characterization of *Helix* FMRFamide receptors: kinetics, tissue distribution, and interactions with the endogenous heptapeptides. *Peptides* **10**(3): 657-661.
122. Perry, S. J., Yi-Kung Huang, E., Cronk, D., Bagust, J., Sharma, R., Walker, R. J., Wilson, S., y Burke, J. F. (1997). A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPFF and FMRFamide. *FEBS Lett.* **409**(3): 426-30.
123. Pinelli, C., D'Aniello, B., Fiorentino, M., Calace, P., Di Meglio, M., Iela, L., Meyer, D. L., Bagnara, J. T. Y Rastogi, R. K. (1999). Distribution of FMRFamide-like Immunoreactivity in the Amphibian Brain: Comparative Analysis. *J. Comp. Neurol.* **414**: 275-305.
124. Price, D. A. y Greenberg, M. J. (1977). Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* **197**: 670-671.
125. Price, D. A., Doble, K. E., Lesser, W., Greenberg, M. J., Swiderek, K. M., Lee T. D., Lutz, E. M., Sommerville, J., Falconer, S. y Cottrell, G. A. (1996). The peptide pQFYRFamide is encoded on the FMRFamide precursor of the snail *Helix aspersa* but does not activate the FMRFamide-gated sodium current. *Biol. Bull.* **191**(3): 341-352.
126. Price, D. A., Lesser, W., Lee, T. D., Doble, K. E. y Greenberg, M. J. (1990). Seven FMRFamide-related and two SCP-related cardioactive peptides from *Helix*. *J. Exp. Biol.* **154**: 421-437.
127. Raffa, R. B., Heyman, J. y Porreca, F. (1986). Intrathecal FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) induces excessive grooming behavior in mice. *Neurosci. Lett.* **65**(1): 94-98.

128. Raffa, R. B. (1988). The Action of FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) and Related Peptides on Mammals. *Peptides* **9**: 915-922.
129. Raffa, R. B. y Jacoby, H. I. (1990). Effect of Phe-D-Met-Arg-Phe-NH₂ and other Phe-Met-Arg-Phe-NH₂-related peptides on mouse colonic propulsive motility: a structure-activity relationship study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**(3): 809-814.
130. Raffa, R. B., Kim, A., Rice, K. C., de Costa, B. R., Codd, E. E. y Rothman, R. B. (1994). Low Affinity of FMRFamide and Four FaRPs (FMRFamide-related peptides), Including the Mammalian-Derived FaRPs F-8-Famide (NPFF) and A-18-Famide, for Opioid μ , δ , κ_1 , κ_{2a} , or κ_{2b} Receptors. *Peptides* **15**(3): 401-404.
131. Ramilo, C.A., Zafaralla, G. C., Nadashi, L., Hammerland, L. G., Yoshikami, D., Gray, W. R., Kristipati, R., Ramachandran, J., Miljanich, G., Olivera, B. M. y Cruz, L. J. (1992). Novel α - and ω -Conotoxins from *Conus striatus* Venom. *Biochem.* **31**: 9919-9926.
132. Rastogi, R. K., D'Aniello, B., Pinelli, C., Fiorentino, M., Di Fiore, M. M., Di Meglio, M. y Iela, L. (2001). FMRFamide in the amphibian brain: A comprehensive survey. *Microsc. Res. Tech.* **54**(3): 158-172.
133. Reinitz, C. A., Herfel, H. G., Messinger, L. A. y Stretton, A. O. (2000). Changes in locomotory behavior and cAMP produced in *Ascaris suum* by neuropeptides from *Ascaris suum* or *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **111**(1): 185-97.
134. Rigby, A. C., Lucas-Meunier, E., Kalume, D. E., Czerwiec, E., Hambe, B., Dahlqvist, I., Fossier, P., Baux, G., Roepstorff, P., Baleja, J. D., Furie, B. C., Furie, B., and Stenflo, J. (1999) A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca²⁺ influx", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **96**: 5758-5763.
135. Rizzi, A., Bigoni, R., Marzola, G., Guerrini, R., Salvadori, S., Regoli, D. Y Calo, G. (2001). Characterization of the locomotor activity-inhibiting effect of nociceptin/orphanin FQ in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **363**: 161-165.
136. Robert, J. J., Orosco, M., Rouch, C., Jacquot, C. y Cohen, Y. (1989). Unexpected responses of the obese "cafeteria" rat to the peptide FMRF-amide. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **34**(2): 341-344.
137. Roumy, M. y Zajac, J. M. (1998). Neuropeptide FF, pain and analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* **345**(1): 1-11.
138. Russell, F. E. (1995). Toxic Effects of Animals Toxins, en Casarett & Doull's TOXICOLOGY. The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill. U. S. A., Capitulo 26, Pp. 801-839.
139. Santama, N., Wheeler, C. H., Skingsley, D. R., Yeoman, M. S., Bright, K., Kaye, I., Burke, J. F. y Benjamin, P. R. (1995). Identification, distribution and physiological activity of three novel

- neuropeptides of *Lymnaea*: EFLRlamide and pQFYRlamide encoded by the FMRFamide gene, and a related peptide. *Eur. J. Neurosci.* **7**(2): 234-246.
140. Santama, N. y Benjamin, P. R. (2000). Gene expression and function of FMRFamide-related neuropeptides in the snail *Lymnaea*. *Microsc. Res. Tech.* **49**(6): 547-56
 141. Schoofs, L., Veelaert, D., Vanden Broeck, J. y De Loof, A. (1997). Peptides in the locusts, *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Peptides*, **18**(1): 145-156.
 142. Sharpe, I. A., Gehrmann, J., Loughnan, M. L., Thomas, L., Adams, D. A., Atkins, A., Palant, E., Craik, D. J., Alewood, D. J. y Lewis, R. J. (2001). Two new classes of conopeptides inhibit the $\alpha 1$ -adrenoreceptor and noradrenaline transporter. *Nature Neurosci.*, **4**(9): 902-907.
 143. Shon, K. J., Hasson, A., Spira, E., Cruz, L., Gray, W. y Olivera, B. (1994). δ -Conotoxina GmVIA, a Novel Peptide from the Venom of *Conus gloriamaris*. *Biochem.* **33**: 11420-11425.
 144. Shon, K. J., Grilley, M., Jacobsen, R., Cartier, E., Hopkins, C., Gray, W. R., Watkins, M., Hillyard, D. R., Rivier, J., Torres, J., Yoshikami, D. y Olivera, B. M. (1997). A Noncompetitive Peptide Inhibitor of the Nicotinic Acetylcholine Receptor from *Conus purpurascens* Venom. *Biochem.* **36**: 9581-9587.
 145. Shon, K. J., Stocker, M., Terlau, H., Stuhmer, W., Jacobsen, R., Craig, W., Grilley, M., Hillyard, D. R., Gray, W. R. y Olivera, B. M. (1998). κ -Conotoxin PVIIA Is a Peptide Inhibiting the *Shaker* K^+ Channel. *J. Biol. Chem.* **273**(1): 33-38.
 146. Shukla, V. K., Prasad, J. A. y Lemaire, S. (1997). Nonopioid motor effects of dynorphin A and related peptides: structure dependence and role of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**(2): 604-610.
 147. Skerrett, M., Peaire, A., Quigley, P. y Mercier, A. (1995). Physiological effects of two FMRFamide-related peptides from the crayfish *Procambarus clarkii*. *J. Exp. Biol.* **198**(1): 109-116.
 148. Spira, M. E., Hasson, A., Fainzilber, M., Gordon, D. y Zlotkin, E. (1993). Chemical and electrophysiological characterization of new peptide neurotoxins from the venom of the molluscivorous snail *Conus textile neovicarius*: A review. *Israel J. Med. Sci.* **29**: 530-543.
 149. Takemura, M., Kishino, J., Yamatodani, A. y Wada, H. (1989). Inhibition of histamine from rat hypothalamic slices by ω -conotoxin GVIA, but not by nilvadipine, a dihydropyridine derivative. *Brain Res.* **49**: 351-356.
 150. Tensen, C. P., Cox, K. J. A., Smit, A. B., van der Schors, R. C., Meyerhof, W., Richter, D., Planta, R. J., Hermann, P. M., van Minnen, J., Geraerts, W. P. M., Knol, J. C., Burke, J. F., Vreugdenhil, E. y van Heerikhuizen, H. (1998). The *Lymnaea* cardioexcitatory peptide (LyCEP) receptor: a G-protein-coupled receptor for a novel member of the RFamide neuropeptide family. *J. Neurosci.* **18**: 9812-9821.

151. Terlau, H., Shon, K. J., Grilley, M., Stocker, M., Stuhmer, W. y Olivera, B. M. (1996). Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature* **381**: 148-151.
152. Thiernemann, C., al-Damluji, S., Hecker, M. y Vane, J. R. (1991). FMRF-amide and L-Arg-L-Phe increase blood pressure and heart rate in the anaesthetised rat by central stimulation of the sympathetic nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**(1): 318-324.
153. Trease, G. E. y Evans, W. C. (1978). *Pharmacognosy*. Cassell & Collier MacMillan Publishers Ltd. London, England. Pp.218-219.
154. Ukai, M., Toyoshi, T. y Kameyama, T. (1991). DAGO ([D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly-ol]enkephalin) specifically reverses apomorphine-induced increase in rearing and grooming in the mouse. *Brain Res.* **557**: 77-82.
155. Vallarino, M., Trabucchi, M. y Vaudry, H. (1998). Neuropeptides in the lungfish brain: phylogenetic implication. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **839**: 53-59.
156. Vilim, F. S., Aarnisalo, A. A., Nieminen, M-L, Lintunen, M., Karlstedt, K., Kontinen, V. K., Kalso, E., States, B., Panula, P. y Ziff, E. (1999). Gene for Pain Modulatory Neuropeptide NPFF: Induction in Spinal Cord by Noxious Stimuli. *Mol. Pharmacol.* **55**: 804-811.
157. Waldman, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C. y Lazdunski, M. (1997). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* **386**: 173-177.
158. Waldman, R. y Lazdunski, M. (1998). H⁺-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr. Op. Neurobiol.* **8**: 19-31.
159. Walker, R. J., Holden-Dye, L. y Franks, C. J. (1993). Physiological and pharmacological studies on annelid and nematode body wall muscle. *Comp. Biochem. Physiol. C* **106**(1): 49-58.
160. Walker, C. S., Steel, D., Jacobsen, R. B., Lirazan, M. B., Cruz, L. J., Hooper, D., Shetty, R., DelaCruz, R. C., Nielsen, J. S., Zhou, L. M., Bandyopadhyay, P., Craig, A. G. Y Olivera, B. M. (1999). The T-superfamily of Conotoxins. *J. Biol. Chem.* **274**(43): 30664-30671.
161. Wang, Z., Orchard, I., Lange, A. B., Chen, X. y Starratt, A. N. (1995). A single receptor transduces both inhibitory and stimulatory signals of FMRFamide-related peptides. *Peptides* **16**(7): 1181-1186.
162. Wong, T. M., Greenberg, M. J. y Tse, S. Y. (1985). Cardiovascular effects of intraventricular injection of FMRFamide, Met-enkephalin and their common analogues in the rat. *Comp. Biochem. Physiol. C* **81**(1): 175-179
163. Woodward, S. R., Cruz, L. J., Olivera, B. M. y Hillyard, D. R. (1990). Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *EMBO* **9**(4): 1015-1020.

164. Yang, H. Y. y Majane, E. A. (1990). Mammalian Phe-Met-Arg-Phe-NH₂-like peptides: structure, biological activity and distribution. *Prog. Clin. Biol. Res.* **342**: 86-91
165. Guía Internet de Gastrópodos Marinos de Hardy (www.Gastropods.com)
166. Página Web de Giancarlo Paganelli (www.coneshell.net)

Anexo 1. Resultados de bioensayos: CONTROLES

#	n	Péptido	Edad ratón (días)	Peso ratón (gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración actividad (min)	Duración saltos (min)	Se duerme (min DI)
1		Control	11	6.14	N	4	0	0	13
2	2	Control	11	6.21	N	7	0	0	32
Promedio				6.18		6	0	0	23
3		Control	12	5.68	N	7	0	0	*
4		Control	12	6.23	N	2	0	0	68
5	3	Control	12	7.47	N	5	10	0	26
Promedio				6.46		5	3	0	31
Promedio si hay actividad				6.46		5	10	0	47
6		Control	13	5.43	N	2	0	0	43
7		Control	13	5.47	N	2	0	0	44
8		Control	13	6.30	N	1	0	0	*
9		Control	13	6.46	N	8	10	0	23
10		Control	13	6.96	N	3	5	0	20
11		Control	13	6.71	N	4	5	0	24
12		Control	13	6.72	N	3	12	0	43
13	8	Control	13	9.14	N	6	14	0	40
Promedio				6.65		4	6	0	30
Promedio si hay actividad						4	9	0	34
14		Control	14	5.94	N	5	0	0	15
15		Control	14	6.64	N	6	0	0	61
16	3	Control	14	7.47	N	3	0	0	55
Promedio				6.68		5	0	0	44
Promedio si hay actividad				6.68		5	0	0	44

N Reacción normal a la inyección: Después de inyectado el ratón se queda quieto por un lapso variable. Se considera recuperado de la inyección cuando comienza a moverse, a oler, o a rascarse y acicalarse.

* No llegó a dormirse durante el tiempo de observación.

Anexo 1. Resultados de bioensayos: CONTROLES (Continuación)

#	n	Péptido	Edad ratón (días)	Peso ratón (gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración actividad (min)	Duración saltos (min)	Se duerme (min DI)
17		Control	15	5.50	N	8	27	6	60
18		Control	15	8.02	N	1	0	0	16
19		Control	15	8.06	N	4	0	0	24
20		Control (1)	15	8.60	N	3	4	0	56
21	5	Control	15	8.83	N	10	2	0	32
Promedio				7.80		5	6	1	38
Promedio si hay actividad				7.80		5	11	6	38
22		Control	16	5.77	N	3	0	0	*
23		Control (2)	16	5.90	N	3	37	0	64
24		Control (3)	16	6.66	N	3	3	0	*
25		Control	16	6.78	N	5	0	0	49
26		Control	16	6.98	N	5	0	0	*
27	6	Control	16	7.13	N	8	0	0	21
Promedio				6.54		5	7	0	22
Promedio si hay actividad				6.54		5	20	0	45
28		Control	17	5.83	N	4	13	0	49
29		Control	17	5.86	N	3	5	0	25
30		Control	17	6.20	N	4	25	11	*
31		Control	17	6.66	N	4	9	0	27
32		Control	17	7.08	N	6	0	0	43
33		Control	17	7.17	N	5	0	0	12
34		Control	17	7.21	N	4	9	0	45
35		Control	17	7.45	N	9	0	0	36
36		Control	17	7.52	N	6	12	0	83
37		Control	17	7.58	N	10	4	0	41
38		Control	17	7.58	N	6	27	2	42
39		Control	17	7.89	N	5	0	0	11
40		Control	17	8.23	N	12	0	0	49
41		Control (4)	17	8.57	N	6	21	0	59
42		Control	17	8.74	N	9	3	0	57

- 1 El ratón saltó una vez a los 12' después de la inyección; tres veces a los 40'; luego salta a los 46 y a los 48', una vez cada vez. El resto del tiempo estuvo quieto.
- 2 Saltó dos veces, a los 49 y a los 51' respectivamente.
- 3 Saltó una vez a los 9'.
- 4 Saltó una vez a los 34'

Anexo 1. Resultados de bioensayos: CONTROLES (Continuación)

#	n	Péptido	Edad ratón (días)	Peso ratón (gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración actividad (min)	Duración saltos (min)	Se duerme (min DI)
43		Control	17	10.20	N	8	0	0	*
44	17	Control	17	10.95	N	8	0	0	*
Promedio				7.69		6	7	1	34
Promedio si hay actividad				7.69		6	12	6	41
45		Control	18	6.35	N	3	28	17	61
46		Control	18	7.19	N	2	17	0	30
47	3	Control	18	7.73	N	7	0	0	35
Promedio				7.09		4	15	6	42
Promedio si hay actividad				7.09		4	23	17	42
48		Control (5)	19	5.02	N	2	10	7	21
49		Control	19	5.10	N	5	12	0	40
50		Control	19	5.60	N	2	16	0	*
51	4	Control	19	5.81	N	5	35	5	*
Promedio				5.38		4	18	3	15
Promedio si hay actividad				5.38		4	18	6	31
52		Control	21	9.19	N	7	8	0	*
53	2	Control (6)	21	10.24	N	8	15	0	35
Promedio				9.72		8	12	0	18
Promedio si hay actividad				9.72		8	12	0	35
54		Control	22	6.22	N	5	23	0	39
55		Control	22	7.24	N	1	0	0	40
56		Control (7)	22	7.94	N	3	30	0	56
57	4	Control	22	11.86	N	6	10	0	77
Promedio				8.32		4	0	0	53
Promedio si hay actividad				8.32		4	0	0	53

5 Este ratón se empleó para medir la frecuencia de saltos para los controles, que es de un máximo de 8 saltos por minuto.

6 Saltó una vez a los 30'.

7 Saltó una vez a los 23'.

Anexo 1. Resultados de bioensayos: CONTROLES (Continuación)

#	n	Péptido	Edad ratón (días)	Peso ratón (gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración actividad (min)	Duración saltos (min)	Se duerme (min DI)
58		Control	23	9.90	N	7	11	0	33
59		Control	23	10.19	N	1	0	0	47
60		Control	23	10.23	N	2	0	0	72
61		Control	23	11.73	N	7	28	0	53
62		Control	23	12.80	N	8	0	0	*
63	6	Control	23	14.47	N	5	0	0	*
Promedio				11.55		5	7	0	34
Promedio si hay actividad				11.55		5	20	0	51
64		Control	24	10.62	N	3	23	0	*
65	2	Control	24	11.62	N	3	9	0	43
Promedio				11.12		3	16	0	22
Promedio si hay actividad				11.12		3	16	0	43

NOTAS GENERALES:

- Todos los ratones empleados como control presentaron reacción normal a la inyección, y los tiempos de recuperación fueron cortos.
- Inmediatamente después de la inyección, los ratones permanecen inmóviles; se consideran recuperados de la inyección cuando comienzan a acicalarse y rascarse. Estas características se consideran la condición de RECUPERACIÓN, para todos los bioensayos realizados.

PROMEDIOS GENERALES:

Reacción normal a la inyección: 100%

Tiempo Promedio de recuperación: 5 minutos

Tiempo Promedio general para dormirse: 41 minutos.

Se duermen durante el período de observación: 80%.

Anexo 2. Resultados de bioensayos: PEPTIDOS NATIVOS

#	n	Péptido	Edad ratón (días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración actividad (min)	Duración saltos (min)	Se duerme (min DI)
1		SpIVB (8)	12	7.15	1.40	Y, CP	6	52	0	72
2		SpIVB (8)	12	7.06	2.83	CT, SMF	22	26	0	52
3		SpIVB (8)	16	5.62	1.78	N	5	35	0	60
4		SpIVB (8)	16	4.95	4.04	N	6	51	0	120
5		SpIVB (8)	22	7.64	1.31	N	10	53	0	90
6	6	SpIVB (8)	22	7.23	2.77	N	5	45	0	60
Promedio				6.61	2.35		9	44	0	76
7		SpIH	12	6.34	0.16	N	2	12	0	*
8		SpIH	12	5.98	0.84	N	4	14	0	35
9		SpIH (9)	12	6.85	1.46	T, Na	8	47	0	90
10		SpIH	22	9.47	0.11	N	5	6	0	28
11		SpIH	22	9.02	0.55	N	5	26	0	*
12	6	SpIH (9)	22	9.16	1.09	Y, SMF	10	46	0	71
Promedio (actividad)				7.80	0.70		6	25	0	56
13	1	SpIB (10)	13	9.88	0.51	N	3	123	0	170

8 La actividad fue hiperactividad.

9 Después de la inyección se presentan temblores. Una vez recuperado, el ratón presenta un periodo de hiperactividad.

10 El ratón parece cansado todo el tiempo, solamente se mueve si es forzado a hacerlo, y lo más relevante es que parece no sentir nada en la parte inferior del cuerpo, es decir, es insensible a toques con el dedo o una bolígrafo, por ejemplo.

Y El ratón yace sobre su vientre con las patas traseras abiertas

CP Contracción de las patas delanteras

CT La cola está levantada y tiesa

SMF Solamente se mueve si es forzado a hacerlo

T Temblores en todo el cuerpo.

Na Náuseas, el ratón parece querer volver el estómago.

Anexo 2. Resultados de bioensayos: PEPTIDOS NATIVOS (Continuación)

#	n	Péptido	Edad ratón (días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración actividad (min)	Duración saltos (min)	Se duerme (min DI)
14		SpIVA	13	6.62	0.86	N	7	45	0	72
15		SpIVA (11)	13	6.86	0.86	N	6	44	0	*
16		SpIVA	16	7.38	0.80	N	4	26	0	58
17		SpIVA	17	8.17	0.31	Y	4	64	0	*
18		SpIVA	17	6.70	0.37	N	4	63	0	*
19		SpIVA	17	7.19	0.70	N	4	65	45	77
20	7	SpIVA	23	13.96	0.41	N, MM	9	55	0	75
Promedio				8.13	0.61		5	52	6	40
21	1	SpIVC (12)	13	6.07	0.82	N	5	39	0	96
22	1	SpIVD (13)	13	10.70	0.93	N	9	39	0	90

- 11 Este ratón mostró un enorme incremento de la actividad de rascado y acicalado, mas que la hiperactividad propiamente dicha.
- 12 El ratón comienza a moverse en círculos alrededor de sí mismo, en el sentido de las manecillas del reloj, la velocidad de giro se incrementa con el tiempo y solamente se detiene como respuesta a ruidos (salta), o al intento de ser tocado (huye).
- 13 con este péptido el ratón se mueve en general menos que los ratones control, de hecho, solamente se mueve si se hacen intentos por tocarlo, es decir, como reacción al tacto.

MM Micción masiva.

Anexo 3. Resultados de bioensayos: CONORFAMIDA-Sr1 sintética (CNF1).

#	n	Péptido	Edad ratón (Días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración HIPER (min)	Duración saltos (min)	Se duerme (min DI)
1		CNF1	11	6.23	0.16	N	8	8	0	*
2		CNF1 (14)	11	6.06	0.17	N	5	0	0	59
3		CNF1	11	6.18	0.81	N	7	0	0	*
4		CNF1 (15)	11	6.00	0.83	Y	9	0	0	*
5		CNF1 (16)	11	6.45	1.55	C, RR, PE	9	18	0	*
6		CNF1 (17)	11	6.27	1.59	C, MC	4	10	0	*
7		CNF1 (18)	11	6.38	3.13	RR, Y	24	0	0	*
8	8	CNF1 (18)	11	6.18	3.24	C, Y, A	8	0	0	*
Promedio				6.22	1.44		9	5	0	7
Promedio si hay actividad				6.22	1.44		9	12	0	59
9		CNF1 (19)	13	6.74	0.15	N	5	22	1	*
10		CNF1	13	6.12	0.16	RR	16	0	0	39
11		CNF1 (20)	13	6.58	0.23	N	10	15	0	36
12		CNF1	13	6.46	0.31	N	5	15	0	*
13		CNF1 (21)	13	5.58	0.36	N	2	8	0	26
14		CNF1 (22)	13	6.69	0.75	MC	8	25	0	44
15		CNF1 (23)	13	5.53	0.90	R	0	0	0	*

- 14 Este ratón solamente se movía si era forzado a hacerlo, a los 14' dio vueltas sobre sí mismo y parecía no tener balance; a los 24' presentó temblores y desde ese momento estuvo muy sensible al tacto; a los 44' contrajo una de las patas delanteras.
- 15 Solo caminó si era forzado a hacerlo; muy sensible al tacto; a los 18' presentó temblores.
- 16 Este ratón estuvo asustado y sensible todo el tiempo. No hubo hiperactividad propiamente dicha, sino reacción a los intentos de tocarlo, salta también como reacción al ruido de bajo volumen (RBV).
- 17 Reacción muy fuerte al ruido de bajo nivel, y al final del período de observación, sensibilidad al tacto.
- 18 Muy sensible a los RBV.
- 19 alta una vez a los 19'.
- 20 Este ratón mostró sensibilidad al tacto desde los 30' después de la inyección.
- 21 No mostró hiperactividad, a los 45 minutos se determina que es sensible a ruido de bajo volumen.
- 22 Este ratón mostró sensibilidad al tacto desde los 33' después de la inyección.
- 23 Nunca caminó ni mostró signos de recuperación (rascado y acicalado), a los 29 minutos se determina que es sensible al tacto y al ruido de bajo volumen.

- C Convulsiones.
 RR Respiración rápida
 PE Patas estiradas y contracción de manos delanteras
 MC Movimiento en círculos sobre sí mismo
 A Se arrastra
 R Rueda sobre sí mismo.

Anexo 3. Resultados de bioensayos: CONORFAMIDA-Sr1 sintética (CNF1). (Continuación)

#	n	Péptido	Edad ratón (Días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración HIPER (min)	Duración saltos (min)	Se duerme (min DI)
16	8	CNF1 (24)	13	6.92	1.45	Y, R	13	10	0	*
Promedio				6.33	0.54		7	12	0	18
Promedio si hay actividad				6.33	0.54		8	16	0	36
17		CNF1	14	6.83	0.15	N	4	10	0	*
18		CNF1 (25)	14	6.85	0.23	N	6	14	0	*
19		CNF1	14	7.23	2.77	N	4	0	0	51
20	4	CNF1	14	6.85	2.92	N	11	0	0	75
Promedio				6.94	1.52		6	6	0	32
Promedio si hay actividad				6.94	1.52		6	12	0	63
21		CNF1	15	8.18	0.24	N	7	76	50	
22		CNF1 (26)	15	8.82	0.57	Y	6	64	0	-
23		CNF1	15	7.89	0.63	N	5	66	25	76
24	4	CNF1	15	5.74	1.74	R	4	117	51	-
Promedio				7.66	0.80		6	81	32	19
Promedio si hay actividad				7.66	0.80		6	81	42	76
25		CNF1	16	7.34	1.36	Y, R	8	35	16	*
26		CNF1	16	6.78	1.47	Y, R	7	37	0	*
27		CNF1 (27)	16	7.22	2.77	Y, R	7	20	0	*
28	4	CNF1 (28)	16	7.00	2.86	Y, R	10	35	0	*
Promedio				7.09	2.12		8	32	4	0
Promedio si hay actividad				7.09	2.12		8	32	16	0

24 Este ratón mostró sensibilidad al tacto desde que fue inyectado y hasta ser sacrificado.

25 Este ratón se mostró muy sensible al ruido de bajo volumen a partir de los 35' después de la inyección.

26 Salta una vez a los 31'.

27 Salta una vez a los 18'.

28 Salta una vez a los 19'.

Anexo 3. Resultados de bioensayos: CONORFAMIDA-Sr1 sintética (CNF1). (Continuación)

#	n	Péptido	Edad ratón (Días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración HIPER (min)	Duración saltos (min)	Se duerme (min DI)
29		CNF1	17	4.40	0.23	N	1	128	116	*
30		CNF1	17	8.48	0.24	N	5	61	25	141
31		CNF1	17	8.49	0.24	R	5	76	31	82
32		CNF1	17	6.01	0.27	N	9	33	20	90
33		CNF1	17	5.57	0.36	N	2	27	0	49
34		CNF1	17	5.32	0.38	N	5	38	19	45
35		CNF1	17	8.30	0.60	N	5	51	17	61
36		CNF1	17	8.39	0.60	C, R	10	33	0	*
37		CNF1	17	6.27	0.80	N	6	90	59	50
38		CNF1	17	7.67	0.86	N	2	86	28	110
39		CNF1	17	10.10	0.91	N	8	54	0	98
40		CNF1	17	9.79	0.94	N	10	68	0	*
41		CNF1	17	6.71	1.49	Y	10	33	0	*
42		CNF1 (29)	17	7.08	1.55	Y, RR	5	75	16	49
43		CNF1	17	7.24	1.80	Y	6	46	0	89
44		CNF1	17	10.43	1.92	N	7	48	0	65
45		CNF1	17	9.64	2.07	N	6	43	0	*
46		CNF1	17	7.35	2.72	N	9	79	41	*
47		CNF1	17	10.22	2.94	Y	7	25	0	100
48		CNF1	17	9.15	3.28	Y	9	40	0	*
49		CNF1	17	5.90	3.39	N	5	74	59	*
50		CNF1	17	7.84	3.83	C, Y	5	59	28	95
51		CNF1	17	6.42	4.67	C, OA	8	55	20	70
52	24	CNF1	17	5.05	3.96	N	3	112	57	71
Promedio				7.58	1.67		6	60	22	53
Promedio si hay actividad				7.58	1.67		6	60	38	79
53		CNF1	18	8.00	0.13	N	3	60	28	*
54		CNF1	18	8.94	0.56	Y	8	59	46	75
55		CNF1	18	8.57	1.17	Y	14	36	0	75
56		CNF1	18	11.43	2.62	Y	11	60	0	60
57	5	CNF1	18	7.50	2.67	Y	15	39	0	*
Promedio				8.89	1.43		10	51	15	42
Promedio si hay actividad				8.89	1.43		10	51	37	70

29 Saltó una vez a los 20'.

Anexo 3. Resultados de bioensayos: CONORFAMIDA-Sr1 sintética (CNF1). (Continuación)

#	n	Péptido	Edad ratón (Días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración HIPER (min)	Duración saltos (min)	Se duerme (min DI)
58		CNF1	21	10.43	0.05	N	5	53	10	*
59		CNF1 (30)	21	8.00	0.13	N	5	70	0	*
60		CNF1	21	10.45	0.19	N	3	30	0	85
61	4	CNF1	21	8.48	0.50	Y	5	43	0	*
Promedio				9.34	0.21		4	49	2	21
Promedio si hay actividad				9.34	0.21		4	49	10	85
62	1	CNF1	22	10.10	0.20	R, Y	6	55	0	*
64		CNF1 (31)	23	11.13	0.11	OA, R, Y	0	0	0	*
65		CNF1	23	11.79	0.17	Y	7	75	0	*
66		CNF1	23	9.88	0.20	N	12	23	0	110
67	4	CNF1	23	10.09	0.50	N	8	26	0	66
Promedio				8.58	0.20		7	31	0	44
Promedio si hay actividad				8.58	0.20		9	45	0	88
68		CNF1	24	12.17	0.08	Y	5	30	0	*
69		CNF1	24	11.40	0.09	CT	7	21	0	45
70		CNF1	24	9.55	0.10	N	5	39	0	33
71		CNF1	24	12.34	0.12	R	3	72	29	53
72	5	CNF1	24	10.43	0.19	RR	9	26	0	91
Promedio				8.74	0.10		5	32	6	44
Promedio si hay actividad				8.74	0.10		5	32	29	56

30 Este ratón mostró sensibilidad al tacto desde los 45' después de la inyección.

31 Nunca se recuperó ni se durmió después de casi tres horas de observación (161'). Se caía de lado al intentar moverse y resultó sumamente sensible al tacto. Al final de la observación, también resultó sensible al ruido de bajo volumen.

Anexo 4. Resultados de bioensayos: CONORFAMIDA-Sr1 No amidada sintética (CNF1-OH).

#	n	Péptido	Edad ratón (Días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/g r)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración HIPER (min)	Duración saltos (min)	Se duerme (min DI)
1		CNF1-OH	14	6.29	1.59	N	10	20	0	
2		CNF1-OH	14	6.00	1.67	N	10	0	0	61
3	3	CNF1-OH	14	5.58	3.58	N, SMF	19	12	0	17
Promedio				5.96	2.28		13	11	0	26
Promedio si hay actividad				5.96	2.28		13	16	0	39
4		CNF1-OH (32)	16	6.14	0.12	N	1	40	24	
5		CNF1-OH (32)	16	5.63	0.36	N	2	72	5	53
6		CNF1-OH (32)	16	5.61	0.89	N	1	87	66	86
7		CNF1-OH (32)	16	6.21	1.61	OA	15	87	43	91
8		CNF1-OH	16	6.70	7.46	N	9	59	51	-
9		CNF1-OH	16	7.66	7.64	N	7	25	0	79
10		CNF1-OH	16	6.13	9.54	Y, ST	7	36	0	-
11	8	CNF1-OH	16	6.60	9.09	N	5	51	24	-
Promedio				6.34	4.59		6	57	24	39
Promedio si hay actividad				6.34	4.59		6	57	36	77
12		CNF1-OH	20	6.99	0.11	OA	7	40	0	
13		CNF1-OH	20	6.77	0.30	N	3	38	14	52
14		CNF1-OH	20	6.11	0.82	OA	13	27	20	48
15	4	CNF1-OH	20	6.34	1.58	OA	12	23	16	43
Promedio				6.55	0.70		9	32	13	36
Promedio si hay actividad				6.55	0.70		9	32	17	48
16	5	CNF1-OH	23	14.20	3.52	Y	7	66	23	42
17	6	CNF1-OH	23	13.82	4.34	ST, SMF, Y	18	23	0	78
Promedio				14.01	3.93		13	45	12	60
Promedio si hay actividad				14.01	3.93		13	45	23	60

32 Muy sensible al tacto

SMF Solamente se mueve si es forzado a hacerlo

ST Sensible al tacto

Anexo 5. Resultados de bioensayos: L-CONORFAMIDA-Sr2 sintética (L-CNF2).

#	n	Péptido	Edad ratón (Días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración HIPER (min)	Duración Saltos (min)	Se duerme (min DI)
1		L-CNF2 (33)	12	6.53	0.31	R	5	59	0	98
2		L-CNF2 (34)	12	6.05	0.83	C, R, MC	4	75	0	97
3		L-CNF2 (34)	12	6.12	1.63	Y, R	6	64	0	96
4		L-CNF2 (34)	12	6.04	3.31	R	10	80	0	100
5	5	L-CNF2 (35)	12	6.37	4.71	R	1	45	0	*
Promedio				6.22	2.16		5	65	0	78
Promedio si hay actividad				6.22	2.16		5	65	0	98
6		L-CNF2 (36)	15	8.26	0.24	N	6	71	20	82
7		L-CNF2 (37)	15	7.66	0.65	N	5	15	0	81
8		L-CNF2 (38)	15	7.93	1.26	Y	10	61	15	*
9		L-CNF2	15	5.74	1.74	N	7	83	75	122
10		L-CNF2 (39)	15	8.39	2.38	N	3	10	0	69
11	6	L-CNF2 (40)	15	8	3.75	Y	8	60	5	*
Promedio				7.66	1.67		7	50	19	59
Promedio si hay actividad				7.66	1.67		7	50	29	89
12		L-CNF2	17	7.15	0.28	N	1	58	48	65
13		L-CNF2	17	8.17	0.61	R, y	8	45	0	84
14		L-CNF2	17	8.81	1.14	R	10	7	0	31

- 33 Todo el tiempo sensible al tacto, y la hiperactividad no es tan notoria en cuanto al movimiento, sino al exagerado rascado y acicalado.
- 34 Todo el tiempo sensible al tacto y al ruido de bajo volumen (RBV). Se paralizaba con las orejas hacia atrás, y temblaba. Parecía aterrorizado y gritaba al tratar de ser tocado, y la hiperactividad no es tan notoria en cuanto al movimiento, sino al exagerado rascado y acicalado.
- 35 Se distinguieron dos periodos diferentes. El primero, inmediato a la inyección se caracterizó por alta sensibilidad al tacto y al RBV, y la hiperactividad no es tan notoria en cuanto al movimiento, sino al exagerado rascado y acicalado. A los 44' entra en una fase de tranquilidad que dura 30' tras lo cual hay una fase de 45' de hiperactividad típica. El ratón sigue agitado al finalizar la observación.
- 36 A los 27' se determina que es muy sensible al tacto, este síntoma se mantiene hasta que el ratón se duerme, sin embargo, su actividad principal es la hiperactividad.
- 37 Salta una vez a los 71'.
- 38 La hiperactividad cesaba por espacio de uno o dos minutos, cuando era sometido a RBV. Igualmente se mostró sensible al tacto.
- 39 A los 19' se determina que es sensible al RBV y al tacto, tras lo cual no se recupera la hiperactividad.
- 40 Este ratón muestra hiperactividad y alta sensibilidad al RBV y al tacto, mientras dura la hiperactividad.

Anexo 5. Resultados de bioensayos: L-CONORFAMIDA-Sr2 sintética (L-CNF2). (Continuación)

#	n	Péptido	Edad ratón (Días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración HIPER (min)	Duración Saltos (min)	Se duerme (min DI)
15		L-CNF2 (41)	17	8.47	2.36	N	9	23	0	60
16	5	L-CNF2 (41)	17	8.88	3.38	MC, R	6	13	3	54
Promedio				8.30	1.55		7	29	10	59
Promedio si hay actividad				8.30	1.55		7	29	26	59
17	1	L-CNF2 (42)	22	11.95	0.17	C	6	68	0	*
18	2	L-CNF2 (42)	22	12.25	0.41	R, MC	10	10	0	*
19	3	L-CNF2 (42)	22	11.39	0.88	G	18	0	0	73
20	4	L-CNF2 (42)	22	13.39	1.49	R, Y	29	0	0	*
21	5	L-CNF2 (42)	22	12.09	2.48	T, Y	7	0	0	72
Promedio general				12.21	1.09		14	16	0	29
Promedio si hay actividad				12.21	1.09		14	16	0	73
22	1	L-CNF2	23	12.53	0.12	R	5	58	33	*
24	2	L-CNF2 (34)	23	10.18	0.15	R	4	0	0	*
25	3	L-CNF2 (33)	23	8.4	0.18	R, OA	8	57	25	*
Promedio				10.37	0.15		6	38	19	0
Promedio si hay actividad				10.37	0.15		6	38	29	0
23	1	L-CNF2- (44)	24	10.9	0.14	C, Y	15	0	0	83

41 En este caso el comportamiento hiperactivo finaliza al aplicar ruido de bajo volumen.

42 Sensible a ruido de bajo volumen, e hiperactivo.

43 El síntoma principal que presenta este ratón es la sensibilidad a ruidos de bajo volumen.

44 Este ratón comienza a moverse y al ser sometido a RBV se paraliza echando las orejas hacia atrás, permaneciendo así 40', cuando parece recuperarse del efecto del RBV, se le vuelve a hacer y se paraliza de inmediato otra vez.

G Se golpea repetidamente la cara.

Anexo 6. Resultados de bioensayos: Conorfamida sintética análoga CNF3.

#	n	Péptido	Edad ratón (Días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración HIPER (min)	Duración Saltos (min)	Se duerme (min DI)
1		CNF3	12	6.58	0.30	Y	11	27	0	78
2		CNF3 (45)	12	6.03	0.83	Y	28	10	0	90
3		CNF3 (46)	12	5.87	1.70	Y, T	1	53	0	89
4		CNF3 (47)	12	6.7	2.99	Y	0	0	0	*
5	5	CNF3 (47)	12	6.27	4.78	Y	0	0	0	*
Promedio				6.29	2.12		8	18	0	51
Promedio si hay actividad				6.29	2.12		13	30	0	86
6		CNF3	15	8.72	0.57	N	8	71	39	*
7		CNF3	15	7.42	0.67	CP	6	67	42	82
8	3	CNF3	15	5.9	1.69	R	8	73	61	121
Promedio				7.35	0.98		7	70	47	68
Promedio si hay actividad				7.35	0.98		7	70	47	102
9	1	CNF3	17	7.95	0.25	R, Y	3	59	0	-
10	2	CNF3 (48)	17	7.43	0.67	N	2	15	0	61
11	3	CNF3 (48)	17	8.47	1.18	N	11	6	0	55
12	4	CNF3 (49)	17	8.72	2.29	R, Y	10	35	0	64
13	5	CNF3 (40)	17	8.4	3.57	N	8	39	0	62
Promedio				8.19	1.59		7	31	0	48
Promedio si hay actividad				8.19	1.59		7	31	0	60

45 Sensible al tacto. La hiperactividad en cuanto al movimiento es corta. Exagerado rascado y acicalado.

46 Muy sensible al tacto. La hiperactividad en cuanto al movimiento es corta. Exagerado rascado y acicalado.

47 El ratón no se recupera de la inyección; solo camina si se le obliga; muy sensible al tacto y al RBV.

48 En este caso el comportamiento hiperactivo finaliza al aplicar ruido de bajo volumen.

49 Sensible al RBV, hiperactivo.

Anexo 6. Resultados de bioensayos: Conorfamida sintética análoga CNF3. (Continuación)

#	n	Péptido	Edad ratón (Días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración HIPER (min)	Duración Saltos (min)	Se duerme (min DI)
14	1	CNF3	18	6.38	0.31	RR	3	57	28	70
15	2	CNF3 (50)	18	5.83	0.86	R, OA	13	44	25	63
16	3	CNF3	18	6.06	1.65	R	7	51	42	68
17	4	CNF3	18	5.84	3.42	Y, R	5	35	23	65
18	5	CNF3	18	5.92	5.07	R, C	4	70	50	89
Promedio				6.01	2.26		6	51	34	71
Promedio si hay actividad				6.01	2.26		6	51	34	71
19	1	CNF3 (32)	23	12.3	0.16	C, R, OA	10	58	0	80
20	2	CNF3 (51)	23	11.77	0.42	R, OA	14	15	0	*
21	3	CNF3 (52)	23	14.00	0.71	Y, OA, CP	17	47	0	100
22	4	CNF3 (32)	23	13.24	1.51	C, OA, R, Y	15	34	0	98
23	5	CNF3 (32)	23	13.22	2.27	C, Y, OA	23	12	0	95
Promedio				12.91	1.02		16	33	0	75
Promedio si hay actividad				12.91	1.02		16	33	0	93

50 Muy sensible a ruido de bajo nivel al principio.

51 Muy sensible al tacto. Este ratón tuvo un segundo período de hiperactividad de 29 minutos que comenzó a los 63' después de la inyección.

52 Salta una vez a los 92'.

Anexo 7. Resultados de bioensayos: Conorfamida sintética análoga CNF4.

#	n	Péptido	Edad ratón (Días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración HIPER (min)	Duración Saltos (min)	Se duerme (min DI)
1		CNF4 (53)	13	5.80	0.34	R	12	19	0	42
2		CNF4 (54)	13	5.71	0.88	N	1	33	0	57
3		CNF4 (55)	13	5.08	1.97	N	6	8	0	51
4		CNF4 (56)	13	5.71	3.50	Y	0	0	0	54
5	5	CNF4 (56)	13	4.72	6.36	R	0	0	0	*
Promedio				5.40	2.61		4	12	0	41
Promedio si hay actividad				5.40	2.61		6	20	0	51
6		CNF4	15	8.15	0.61	CP	9	73	58	*
7		CNF4	15	8.77	1.71	N	3	50	13	61
8	3	CNF4	15	5.60	1.79	MC	5	85	54	*
Promedio				7.51	1.37		6	69	42	20
Promedio si hay actividad				7.51	1.37		6	69	42	61
9	1	CNF4 (57)	17	7.46	0.27	N	4	70	0	91
10	2	CNF4	17	7.55	0.66	Y	5	49	36	64
11	3	CNF4 (57)	17	7.33	0.68	N	7	70	62	*
12	4	CNF4	17	5.08	0.98	N	9	39	0	67
13	5	CNF4	17	8.12	1.23	R, Y	11	41	5	65
14	6	CNF4 (50)	17	5.82	1.72	N	3	100	68	*
15	7	CNF4	17	4.73	2.11	N	4	51	21	63
16	8	CNF4 (50)	17	7.62	2.62	Y, R	5	91	33	109
17	9	CNF4	17	6.00	3.33	R	4	48	34	67
18	10	CNF4 (58)	17	8.65	3.47	N	4	45	0	60

53 o hay hiperactividad, el ratón en todo momento se mostró muy sensible al tacto.

54 La hiperactividad no es muy marcada y no dura mucho, a los 41', cuando ya el ratón esta quieto, se determina que es muy sensible al tacto.

55 No hay hiperactividad, solo camina unos minutos, después de esto, se determina que es muy sensible al tacto pues cuando se toca, deja de caminar. Desde ese momento solo camina si es forzado. Este comportamiento (sensibilidad al tacto) dura hasta que se se duerme.

56 Nunca pareció recuperarse, solo se movió si fue forzado y esto permitió determinar que siempre fue sensible al tacto.

57 Muy sensible al RBV.

58 Muy sensible a ruido de bajo nivel y al tacto, al principio. Se paraliza por el ruido de bajo volumen.

Anexo 7. Resultados de bioensayos: Conorfamida sintética análoga CNF4. (Continuación).

#	n	Péptido	Edad ratón (Días)	Peso ratón (gr)	Dosis (nmol/gr)	Reacción a la inyección	Rec. (min DI)	Duración HIPER (min)	Duración Saltos (min)	Se duerme (min DI)
19	11	CNF4 (59)	17	5.53	3.62	R	5	11	0	64
20	12	CNF4	17	7.14	4.20	Y	6	39	0	50
21	13	CNF4 (60)	17	5.53	5.42	N	5	44	0	55
Promedio				6.66	2.33		6	54	20	58
Promedio si hay actividad				6.66	2.33		6	54	37	69
22	1	CNF4	23	10.65	0.19	N	7	37	0	69
23	2	CNF4	23	10.06	0.50	N	8	25	1	68
24	3	CNF4 (61)	23	11.21	0.89	R	6	15	0	66
25	4	CNF4 (61)	23	10.00	2.00	Y	14	21	0	*
26	5	CNF4 (62)	23	10.74	2.79	R, Y	0	0	0	0
Promedio				10.53	1.27		7	20	0	41
Promedio si hay actividad				10.53	1.27		9	25	0	68

- 59 Este ratón comienza con comportamiento hiperactivo, pero cuando es sometido a ruido de bajo volumen se detiene, solo camina si es forzado y también es muy sensible al tacto.
- 60 Este ratón no mostró hiperactividad sino que solo caminaba si era forzado a hacerlo.
- 61 Salta una vez a los 7'.
- 62 Antes de recuperarse y comenzar a caminar, se muestra muy sensible al tacto. La actividad no dura mucho.
- 63 Este ratón nunca se recupera y muere con convulsiones a los 2 minutos después de la inyección



Conorfamide, a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides

M. Maillo^{a,b}, M.B. Aguilar^a, E. Lopez-Vera^a, A.G. Craig^c, G. Bulaj^d, B.M. Olivera^{d,*},
E.P. Heimer de la Cotera^a

^aCentro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México in Juriquilla, Queretaro, Mexico

^bCentro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela

^cThe Clayton Foundation Laboratories for Peptide Biology, The Salk Institute, San Diego, CA, USA

^dDepartment of Biology, University of Utah, Salt Lake City, UT, USA

Received 17 November 2000; accepted 1 June 2001

Abstract

A novel *Conus* peptide, conorfamide-Sr1, has been characterized. The sequence of the natural peptide was determined using standard Edman sequencing methods and mass spectrometry, and confirmed by chemical synthesis. The peptide has 12 amino acids and no cysteine residues. The following sequence was obtained: GPMGWVPVFYRE-NH₂.

No other peptide from a vermivorous Atlantic *Conus* species has previously been characterized. Conorfamide-Sr1 belongs to the RFamide neuropeptide family, and is the first RFamide peptide to be found in any venom. The presence of conorfamide-Sr1 as a major peptide in *Conus spurius* venom suggests that *Conus* lineages in the Atlantic may have evolved novel *Conus* venom peptide families. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Conus* venom; neuropeptide; RFamide peptides; Molluscs; ENaC channels

1. Introduction

The venoms of the marine snails belonging to the genus *Conus* have been characterized over the last two decades (Olivera et al., 1990), and it is now well established that each venom contains a diverse set of small, biologically-active peptides. The known mechanisms that underlie the biological activity of *Conus* venom peptides are, in most cases, potent modulation of the activity of either voltage-gated or ligand-gated ion channels. Thus, one fish-hunting cone snail has been shown to use at least five different classes of peptides for prey capture, each targeted to a different ion channel site (Terlau et al., 1996).

However, there are clearly *Conus* peptides that resemble endogenous neuropeptides from nervous systems. The first of these characterized was conopressin-G, which belongs to the vasopressin-oxytocin neuropeptide family (Cruz et al., 1987). More recently, a peptide from *Conus geographus*

venom, conutalakin-G, was shown to be a member of the neurotensin family (Craig et al., 1999), and to have promising analgesic properties (Gurkoff et al., 2000; Wagstaff et al., 2000). In this report, we characterize a third example, conorfamide-Sr1, which was found in the Caribbean/Western Atlantic species *Conus spurius*, which we show is a member of the RFamide neuropeptide family, the best known of which is FMRFamide. Although RFamide peptides have been found in a wide variety of biological systems, this is the first report of a member of this neuropeptide family being a major venom component. This family of neuropeptides is conventionally referred to as the FMRFamide family, but it has become clear in recent years that FMRFamide-related peptides are more widespread phylogenetically and more diverse functionally than originally envisioned. We therefore refer to the entire broad group of FMRF-NH₂-related peptides as the RFamide family in this article (for a recent review, see Espinosa et al., 2000).

The genus *Conus* has 500 different species, and the vast majority of all of the venom peptides that have been characterized are from the venoms of piscivorous *Conus*

* Corresponding author. Tel. +1-801-581-8370, fax: +1-801-585-5010

E-mail address: olivera@biology.utah.edu (B.M. Olivera)

(i.e. fish-hunting), mostly from species found in the Indo-Pacific. *C. spurius* belongs to the largest feeding group of *Conus* species, the vermivorous cone snails that prey primarily on polychaete worms. No peptides from nonpiscivorous *Conus* venoms from the Atlantic Ocean have been described in the literature; thus, the characterization of a novel *Conus* neuropeptide as the very first venom component from *C. spurius* suggests that novel families of *Conus* peptides may have evolved in lineages of *Conus* found in the Atlantic/Caribbean marine province.

2. Materials and methods

2.1. Crude venom extraction

Specimens of *C. spurius* were collected in the Caribbean Sea off the Yucatan peninsula, Mexico and immediately frozen and stored at -70°C until used. The venom ducts dissected from four specimens were homogenized in 40% aqueous acetonitrile containing 0.5% trifluoroacetic acid (TFA). The mixture was centrifuged at $17,000 \times g$ for 30 min at 4°C , and the supernatant was saved and lyophilized. Crude venom (194 mg) was suspended in 5 ml of 50% aqueous acetonitrile containing 0.5% trifluoroacetic acid (TFA), and sonicated for three 30-s periods over ice, centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min and the supernatant saved. This procedure was repeated twice and the supernatants combined and stored at -20°C until purified.

2.2. Crude venom purification

Purification of the pooled venom extract was achieved at room temperature by RP-HPLC (model 2800 Solvent Delivery System, Biodimension UV/Vis monitor, Bio-Rad), using a C_{18} semipreparative column (Vydac, 218TP510, 10×250 mm; 250×4.6 mm; 5 μm particle diameter; 300 \AA pore size; 5 ml/min) equipped with a C_{18} guard column (Vydac, 218GK54; 10×4.6 mm; 5 μm particle diameter, 300 \AA pore size), and filter (Alltech; 28689; 4 mm, 2 μm pore size). Further purification was achieved in an analytical C_{18} column (Vydac, 218TP54, 4.6×250 mm; 5 μm particle diameter; 300 \AA pore size, 1 ml/min) equipped with guard column and filter. HPLC gradient buffers were: (A) 0.1% TFA in water, and (B) 0.085% TFA in 90% acetonitrile. A 5 ml sample-loading loop was used in all chromatography and the effluents were monitored at 220 nm.

2.3. Bioassays

A standard assay for biological activity routinely used in our laboratories for the purification of *Conus* peptides is intracranial injection of venom fractions into mice (12–24 days old) (Olivera et al., 1999). Mice were injected with different doses of lyophilized native or synthetic peptide dissolved in 20 μl of normal saline solution or with an equal volume of normal saline solution alone in control experiments and

placed in a cage after injection for observation. FMRF-NH₂ was from Sigma; Naloxone was from Research Biochemicals International. Conorfamide-Sr1-injected mice exhibited hyperactive behavior characterized by a much higher frequency observed in walking or running around the cage, climbing walls and jumping when compared with the control mice injected with saline. In a typical experiment, control mice moved randomly around the observation cage, with occasional climbing of the corner walls, for periods no longer than 15 min, after which the mice would usually go to sleep; conorfamide-Sr1-injected mice moved faster and continuously for periods between 40 and 120 min.

2.4. Peptide sequencing

Automated chemical sequence analysis of the peptide was performed by standard Edman's degradation in a Applied Biosystems Protein Sequencing System model 491 at the Marine Pharmacology laboratory at the Centro de Neurobiología/UNAM.

2.5. Mass spectrometry

Electrospray ionization mass spectra were measured using a Micromass Quattro II Triple Quadrupole Mass Spectrometer with MassLynx operating system. The samples (approximately 100 pmoles) were resuspended in 0.1 ml of 50% methanol/water and automatically infused with a flow rate of 0.05 ml/min in same the solvent system. The instrument was scanned over the m/z range 50–2000, with a capillary voltage of 2.7 kVolts and a cone voltage of 50 Volts. The resulting data were analyzed using MassLynx software. For samples with MW \sim 1000, the accuracy was estimated to be 100 ppm.

2.6. Peptide synthesis and purification

Peptides were synthesized by standard Fmoc (N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl) chemistry, with 2-(1H-benzotriole-1-yl)-1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborate and dicyclohexylcarbodiimide coupling, using an Applied Biosystems model 431A peptide Synthesizer, at the Protein/DNA Core Facility at the University of Utah Cancer Center. All the amino acids were purchased from Bachem (Torrance, CA, USA). Conorfamide-Sr1 was synthesized on Fmoc-amide resin from Applied Biosystems, and the free COOH peptide on Wang Fmoc Phe resin (Bachem, Torrance, CA, USA). After synthesis, the terminal Fmoc was removed in situ by treatment with 20% piperidine in N-methylpyrrolidone. In the usual procedure, the peptide was cleaved from 134 mg of the resin by treatment with 2 ml of trifluoroacetic acid/water/ethanedithiol/phenol/trioanisole (90/5/2.5/7.5/5 by volume) for 2 h at room temperature. The released peptide was precipitated by filtering the reaction mixture into 200 ml of methyl-*t*-butyl ether cooled at -20°C . The reaction vessel was washed with 1 ml of 100% trifluoroacetic acid which was filtered into the methyl-*t*-butyl ether

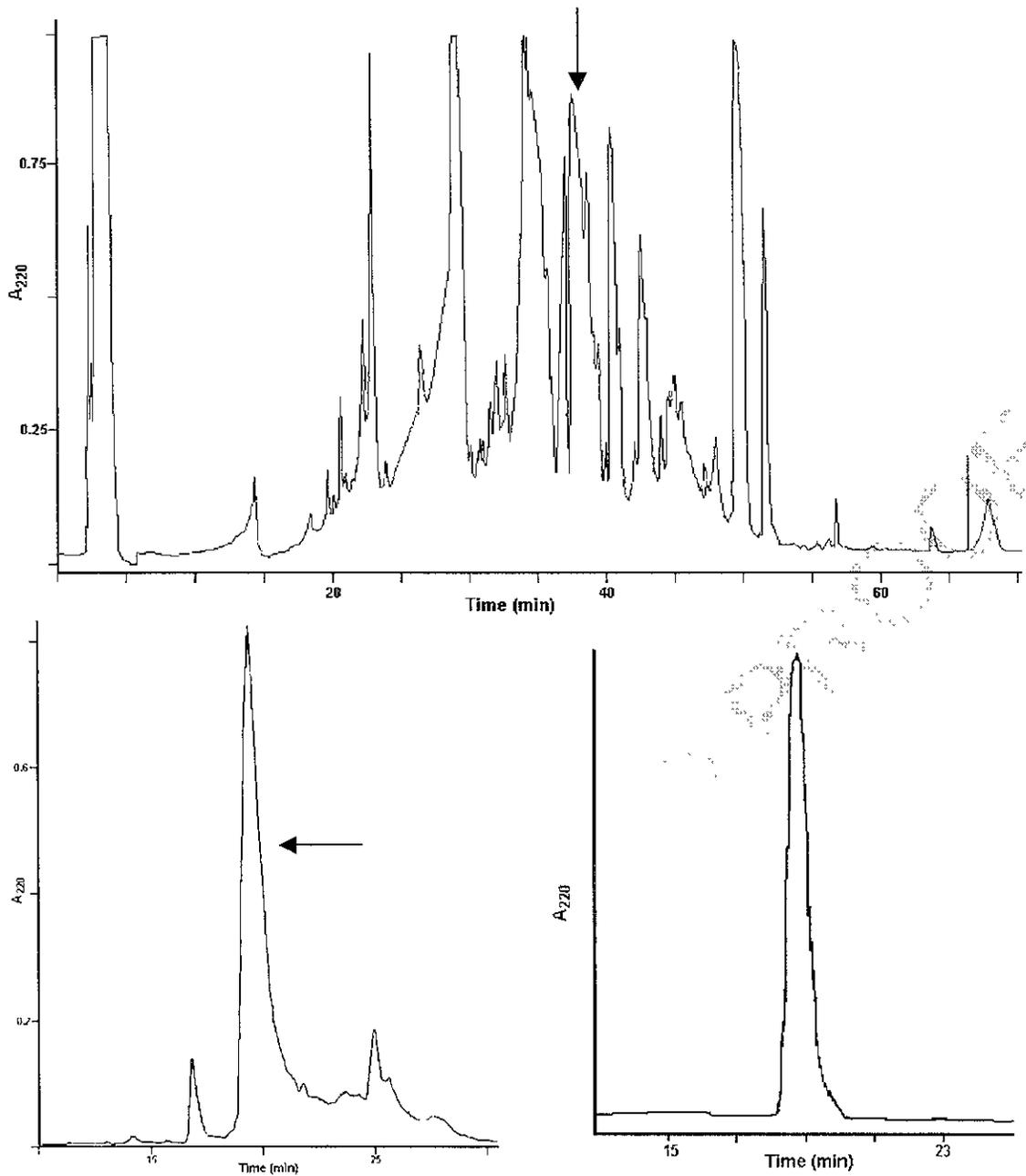


Fig 1 The shell of *C. spurius*.

solution. The peptide was collected by centrifugation of the methyl-*t*-butyl ether solution at $5000 \times g$ for 5 min, the supernatant was discarded and the pellet washed twice with methyl-*t*-butyl ether. The pellet was dissolved in 25 ml of 0.1% trifluoroacetic acid in 60% acetonitrile, diluted to 250 ml with 0.1% trifluoroacetic acid and purified by RPLC on a preparative C_{18} column (Vydac, 25×250 mm) eluted at 20 ml/min with 30–60% buffer B gradient over 60 min

3. Results

3.1. Purification and biochemical characterization of conorfamide-Sr1

Conorfamide-Sr1 was identified from the venom of *C. spurius* (Fig. 1). *C. spurius* specimens were collected by shrimp fishing vessels off the Yucatan Peninsula, Mexico. Extracts of the venom ducts from four large specimens were

Table 2
The RFamide family of peptides

Organism	Sequence	Reference
Invertebrates		
<i>M. nimbosa</i>	FMRF-NH ₂	Price and Greenberg (1977)
<i>G. demussa</i>	FLRF-NH ₂	Price (1986)
<i>S. officinallis</i>	FIRF-NH ₂	Loi and Tublitz (1997)
<i>H. aspersa</i>	pQFYRF-NH ₂	Price et al. (1996)
<i>C. sapidus</i>	pQLGRF-NH ₂	Yasuda et al. (1993)
<i>A. granulata</i>	GSLLRN-NH ₂	Greenberg and Price (1992)
<i>H. aspersa</i>	NGHYMRF-NH ₂	Lutz et al. (1992)
<i>C. elegans</i>	AGAKFIRF-NH ₂	Nelson et al. (1998)
<i>C. elegans</i>	EIPGVLRN-NH ₂	Li et al. (1999)
<i>S. officinallis</i>	ALSGDAFLRF-NH ₂	Loi and Tublitz (1997)
<i>M. sexta</i>	pQDVVHSFLRF-NH ₂	Kingan et al. (1990)
<i>A. californica</i>	SAPSWRPQGRF-NH ₂	Greenberg and Price (1992)
<i>C. elegans</i>	DFDGAMPGVLRN-NH ₂	Li et al. (1999)
<i>C. spurius</i>	GPMGWVPVYRF-NH ₂	This work
<i>C. elegans</i>	SADDSAPFGTMRN-NH ₂	Nelson et al. (1998)
<i>H. aspersa</i>	STQML-SPPERPREFRHPNELRQY-LKELNEYAIMGRTRN-NH ₂	Leung et al. (1992)
Vertebrates		
<i>G. domesticus</i>	LPLRF-NH ₂	Dockray et al. (1983)
<i>R. norvegicus</i>	SLAAPQRF-NH ₂	Vilim et al. (1999)
<i>H. sapiens</i>	SQAFLFQPDF-NH ₂	Perry et al. (1997)
<i>H. sapiens</i>	AGE-GLNSQFWSLAAPQRF-NH ₂	Perry et al. (1997)

4. Discussion

In this work, we characterized a novel *Conus* venom peptide which has proven to be the defining member of a new family of *Conus* neuropeptides, the conorfamides, belonging to the RFamide neuropeptide family. This is the third group of *Conus* peptides that are clearly homologous to an established neuropeptide family: previously characterized were the conopressins, that belong to the vasopressin/oxytocin family (Cruz et al., 1987), and the conotulakins, which belong to the neurotensin family (Craig et al., 1999). Our preliminary evidence for a second RFamide peptide in *C. spurius* venom, distinct from the peptide characterized here suggests that some *Conus* venoms may have multiple conorfamides. We note that all of the *Conus* peptides that exhibit homology to endogenous neuropeptides appear to be agonists; at this time, no antagonists have been reported from any venom.

We speculate on the function and origins of this peptide. The first bone fide neuropeptide-like *Conus* venom component discovered, conopressin-G, was later shown to be the endogenous vasopressin family member, found in a wide variety of molluscan systems (van Kesteren et al., 1992; Nielsen et al., 1994). Thus, one possibility is that conorfamide-Sr is an endogenous RFamide peptide of *C. spurius*. The presence of the peptide in venom would therefore be the result of expression in the venom duct of an endogenous gene also expressed in other tissues of the snail.

Greenberg and Price (1992) did a survey of RFamide

peptides present in molluscan systems, and originated the concept that a 'bouquet of peptides' was present in every mollusc. In each molluscan species they surveyed, over a dozen different RFamide family members were typically found: Based on the different peptide sequences available at the time, a consensus C-terminal sequence was established for RFamide peptides in molluscs: (F,Y)-(M,L,I,F)-(R)-(F)-NH₂. It is noteworthy that the conorfamide sequence, although similar to the consensus above, differs in the presence of a Y in position 10, which had not been reported for any molluscan peptide in the 1992 Greenberg and Price survey. However, more recently, a pentapeptide with the sequence ZFYRF-NH₂ (where Z = pyroglutamate) has been reported from two gastropod species, *C. nemoralis* and *H. aspersa* (Lutz et al., 1992; Price et al., 1996). Some of the RF-amide peptides that have been described are shown in Table 2; although conorfamide-Sr1 is somewhat longer than many of the well-known members of this peptide family (such as FMRF-NH₂ and FLRF-NH₂), even longer peptides have been found in both invertebrate and vertebrate systems (see Table 2).

Most of the RF-NH₂ sequences from gastropods were obtained primarily from pulmonate snails or from nudibranchs. Thus, while conorfamide may be a venom peptide adapted for envenomation of the annelid prey of *C. spurius*, we cannot eliminate alternative explanations, i.e. either that toxoglossate neogastropods such as *C. spurius* use conorfamide for endogenous purposes, or perhaps to defend against predators or to gain an advantage over competitors. A

comprehensive characterization of RFamide genes of *C. spurius* expressed in other tissues would be desirable before this question can be productively addressed.

We demonstrate that conorfamide-Sr1 is biologically active, and for a peptide from a worm-hunting *Conus* venom, it is surprisingly potent in the mammalian central nervous system. The RFamide peptide family has a host of diverse functions in invertebrate nervous systems. In the mammalian CNS, these peptides act to moderate opioid function (Gouarderes et al., 1993). Additional effects on mammals include cardiovascular effects (Roth et al., 1987) and stimulation of pancreatic somatostatin secretion (Fehmann et al., 1990). One mechanism which may be the basis for some of the activities of RFamide peptides reported in mammalian systems is the effect of RF-NH₂ peptides on H⁺-gated ENaC channels (Askwith et al., 2000).

Our data strongly suggest that conorfamide-Sr1 belongs to the RFamide family. As shown in Table 1, the overall in vivo effects of conorfamide are similar to those observed when FMRF-NH₂ is injected into mice. Conorfamides may prove to be useful in understanding why the RFamide neuropeptide family has diversified to such an extreme extent in molluscs and other organisms such as *Caenorhabditis elegans*. In addition, the activity of the peptide in the mammalian CNS provides a tool for understanding the roles of RFamide peptides in mammalian systems.

Acknowledgements

This work was supported by NIH Grant GM 48677 from the National Institute of General Medical Sciences. This work was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Grant 30701-N; and Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (CONCYTEQ), Grant B-11, (EPH, México) M.A.M. was supported by a fellowship from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, (CONICIT, Venezuela). Manuel B. Aguilar was supported by 99-127RG/BIO/LA (Third World Academy of Sciences). ESI-MS analysis was performed in the Mass Spectrometry Facility in the Chemistry Department at the University of Utah, supported by the National Science Foundation (Grant CHE-9708413) and the University of Utah Institutional Funds Committee. We thank Maria Eugenia Ramos Aguilar for the collection of *C. spurius* specimens.

References

- Askwith, C.C., Cheng, C., Ikuma, M., Benson, C., Price, M.P., Welsh, M.P., 2000. Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron* 26, 133–141.
- Craig, A.G., Norberg, T., Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., Low, W., Dykert, J., Richelson, E., Navaro, V., Macella, J., Watkins, M., Hillyard, D., Imperial, J., Cruz, L.J., Olivera, B.M., 1999. Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. *J. Biol. Chem.* 274, 13752–13759.
- Cruz, L.J., de Santos, V., Zafaralla, G.C., Ramilo, C.A., Zeikus, R., Gray, W.R., Olivera, B.M., 1987. Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs: characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus striatus* venoms. *J. Biol. Chem.* 262, 15821–15824.
- Dockray, G.J., Reeve, J.R.J., Shively, J., Gayton, R.J., Barnard, C.S., 1983. A novel active pentapeptide from the chicken brain identified by antibodies to FMRFamide. *Nature* 305, 328–330.
- Espinosa, E., Carrigan, M., Thomas, S.G., Shaw, G., Edison, A.S., 2000. A statistical view of FMRFamide neuropeptide diversity. *Mol. Neurobiol.* 21, 35–56.
- Fehmann, H.C., McGregor, G., Weber, V., Eissele, R., Goke, R., Goke, B., Arnold, R., 1990. The effects of two FMRFamide related peptides (A-18-F-amide and F-8-F-amide; 'morphine modulating peptides') on the endocrine and exocrine rat pancreas. *Neuropeptides* 17, 87–92.
- Gouarderes, C., Satak, J., Zajac, J.M., Jhamandas, K., 1993. Antinociceptive effects of intrathecally administered F8Famide and FMRFamide in the rat. *Eur. J. Biochem.* 237, 73–81.
- Greenberg, M.J., Price, D.A., 1992. Relationships among the FMRFamide-like peptides. *Prog. Brain Res.* 92, 25–37.
- Gurkoff, G.G., Wagstaff, J.D., Layer, R.T., McCabe, T., Basbaum, A.I., 2000. Antinociceptive effects of spinal contulakin-G, a cone snail-derived neurotensin. *Soc. Neurosci. Abst.* 26, 936.
- Kingan, T.G., Teplow, D.B., Phillips, J.M., Riehm, J.P., Rao, K.R., Hildebrand, J.G., Homberg, U., Krammer, A.E., Jarine, I., Griffin, P.R., 1990. A new peptide in the PMRFamide family isolated from the CNS of the hawkmoth, *Manduca sexta*. *Peptides* 11, 849–856.
- Leung, P.S., Shaw, C., Maule, A.G., Thim, L., Johnson, C.F., Irvine, G.B., 1992. The primary structure of neuropeptide F (NPF) from the garden snail *Helix aspersa*. *Regul. Pept.* 42, 71–81.
- Li, C., Kim, K., Nelson, L.S., 1999. FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Brain Res.* 848, 26–34.
- Loi, P.K., Tublitz, N., 1997. Molecular analysis of FMRFamide and FMRFamide-related peptides (FaRPs) in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *J. Exp. Biol.* 200, 1483–1489.
- Lutz, E.M., Macdonald, M., Hettle, S., Price, D.A., Cottrell, G.A., Somerville, J., 1992. Structure of cDNA clones and genomic DNA encoding FMRFamide-related peptides (FaRPs) in *Helix*. *Mol. Cell. Neurosci.* 3, 373–382.
- Nelson, L.S., Kim, K., Memmott, J.E., Li, C., 1998. FMRFamide-related gene family in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Brain Res.* 58, 103–111.
- Nielsen, D., Dykert, J., Rivier, J., McIntosh, J.M., 1994. Isolation of Lys-conopressin-G from the venom of the worm-hunting snail, *Conus imperialis*. *Toxicon* 32, 845–848.
- Olivera, B.M., Rivier, J., Clark, C., Ramilo, C.A., Corpuz, G.P., Abogadie, F.C., Mena, E.E., Woodward, S.R., Hillyard, D.R., Cruz, L.J., 1990. Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science* 249, 257–263.
- Olivera, B.M., Cruz, L.J., Yoskikami, D., 1999. Effects of *Conus* peptides on the behavior of mice. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 772–777.
- Perry, S.I., Yi-Kung Huang, E., Cronk, D., Bagust, I., Sharma, R., Walker, R.J., Wilson, S., Burke, J.F., 1997. A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPF and FMRFamide. *FEBS Lett.* 409, 426–430.

673	Price, D.A., 1986. Evolution of a molluscan cardioexcitatory neuro-	van Kesteren, R.E., Smit, A.B., Dirks, R.W., de With, N.D.,	729
674	peptide. <i>Am. Zoologist</i> 26, 1007–1015.	Geraerts, W.P.M., Joosse, J., 1992. Evolution of the vasopres-	730
675	Price, D.A., Greenberg, M.J., 1977. Structure of a molluscan cardi-	sin/oxytocin superfamily: characterization of a cDNA encoding	731
676	oexcitatory neuropeptide. <i>Science</i> 197, 670–671.	a vasopressin-related precursor, preproconopressin, from the	732
677	Price, D.A., Doble, K.E., Lesser, W., Greenberg, M.J., Swiderek,	mollusc, <i>Lymnaea stagnalis</i> . <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 89,	733
678	K.M., Lee, T.D., Lutz, E.M., Sommerville, J., Falconer, S.,	4593–4597.	734
679	Cottrell, G.A., 1996. The peptide pQFYRFamide is encoded	Vilim, F.S., Aarnisalo, A.A., Nieminen, M.L., Lintunen, M., Karl-	735
680	on the FMRFamide precursor of the snail <i>Helix aspersa</i> but	stedt, K., Kontinen, V.K., Kalso, E., States, B., Panula, P., Ziff, E.,	736
681	does not activate the FMRFamide-gated sodium current. <i>Biol.</i>	1999. Gene for pain modulatory neuropeptide NPFF: induction in	737
682	<i>Bull.</i> 191, 341–352.	spinal cord by noxious stimuli. <i>Mol. Pharmacol.</i> 55, 804–811.	738
683	Roth, B.L., Disimone, J., Majane, E.A., Yang, H.Y., 1987. Eleva-	Wagstaff, J.D., Layer, R.T., Smith, L.B., Bulaj, G., Wei, S., Nielsen,	739
684	tion of arterial pressure in rats by two new vertebrate peptides	J., Jones, R.M., Craig, A.G., McCabe, R.T., 2000. Glycosylation	740
685	FLFQPQRF-NH ₂ and AGEGLSSPFWSLAAPQRF-NH ₂	is critical for the pharmacologic properties of conatulakin, a	741
686	which are immunoreactive to FMRF-NH ₂ antiserum. <i>Neuro-</i>	potent, broad-spectrum analgesic conopeptide. <i>Soc. Neurosci.</i>	742
687	<i>peptides</i> 10, 37–42.	<i>Abst.</i> 26, 936.	743
688	Terlau, H., Shon, K., Grilley, M., Stocker, M., Stühmer, W.,	Yasuda, A., Naya, Y., Nakanishi, K., 1993. Isolation of Antho-	744
689	Olivera, B.M., 1996. Strategy for rapid immobilization of prey	RFamide related peptides from the eyestalks of blue crab.	745
690	by a fish-hunting cone snail. <i>Nature</i> 381, 148–151	<i>Comp. Biochem. Physiol.</i> 104B, 235–240.	746
691			747
692			748
693			749
694			750
695			751
696			752
697			753
698			754
699			755
700			756
701			757
702			758
703			759
704			760
705			761
706			762
707			763
708			764
709			765
710			766
711			767
712			768
713			769
714			770
715			771
716			772
717			773
718			774
719			775
720			776
721			777
722			778
723			779
724			780
725			781
726			782
727			783
728			784