

03040

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y BIOLÓGICA DE CONOTOXINAS T DE LA
ESPECIE *Conus spurius*

TESIS

Que presenta para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología)

PRESENTA:

LETICIA LEZAMA MONFIL

Tutores: Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ

Dr. MIGUEL CONDÉS LARA

INB

Campus Juriquilla, Querétaro. Mayo de 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y BIOLÓGICA DE CONOTOXINAS T DE LA ESPECIE *Conus spurius*.

El sistema nervioso controla y regula la mayoría de los procesos fisiológicos; cambios en estos procesos pueden ser provocados entre otros por la inyección de los componentes (neurotóxicos) de venenos de diversos tipos de animales. Así, a pesar del considerable número de toxinas caracterizadas a partir de especies terrestres, las que provienen de animales marinos, como son los conos o caracoles cónicos (género *Conus*) son una alternativa para el estudio y descripción de sus mecanismos de acción sobre el SNC de mamíferos, debido a su gran diversidad.

Este trabajo forma parte del estudio de cuatro péptidos (PI, PII, PIII y PIIB) parcialmente caracterizados obtenidos del veneno de *Conus spurius* y que tienen semejanzas con los péptidos de la superfamilia T de conotoxinas obtenidos de otras especies. Las toxinas o péptidos se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución y se determinó así: a) su composición de aminoácidos mediante hidrólisis y derivación de los aminoácidos; b) su estructura primaria por secuenciación de Edman, después de reducción y alquilación; c) el arreglo de puentes disulfuro de tres de los péptidos (PI, PII y PIII) mediante reducción parcial y alquilación con N-etilmaleimida, seguida de reducción total y alquilación con 4-vinilpiridina, y secuenciación de los péptidos resultantes. Se probó la actividad del péptido PI sobre el umbral al dolor inducido por presión en ratas, sin encontrar un efecto significativo. La actividad biológica de dos de los péptidos PI y PIIB, sobre el SN (sistema nervioso), se evaluó por inyección intraventricular a una concentración de 1.2 nmoles/15 μ L analizando el efecto en la ejecución motora en un cilindro giratorio; de la misma forma también se probaron dos fracciones (V y 25sr, 6.8 μ g/15 μ L) del veneno. La evaluación de la duración en la ejecución motora de los animales tratados con los péptidos no mostró un efecto estadísticamente significativo sobre la ejecución motora; sin embargo se observó un efecto discreto de la fracción V.

A partir de la caracterización estructural de los cuatro péptidos antes mencionados se observó que tres de ellos tienen una secuencia de aminoácidos y distribución de los puentes disulfuro (S-S) muy parecida, conteniendo los cuatro el patrón de cisteínas característico de las conotoxinas T. Podemos decir que las conotoxinas aquí caracterizadas en este trabajo pertenecen a la superfamilia de conotoxinas T.

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-UAQ Juriquilla, en el Laboratorio de Neurofarmacología Marina y Unidad de Bioquímica Analítica del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular.

Las Instituciones que otorgaron becas para la realización de este estudio fueron:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Beca para estudios del programa de Maestría.

Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM. Complemento de beca para estudios del programa de Maestría.

Este trabajo fue apoyado por los donativos 30701-N y el 41477-Q del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y B-11 del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (CONCYTEQ) al Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera, así como por el donativo 99-127 RG/BIO/LA de The Third World Academy of Sciences (TWAS) al Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Agradecimientos

A los directores de tesis que hicieron posible la realización de este proyecto

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Dr. Miguel Condés Lara

A los miembros del comité tutorial, por su ayuda y comentarios durante estos estudios

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

Dr. Carlos Arámburo de la Hoz

A los miembros del jurado de examen de grado por aceptar tan amablemente revisar este trabajo

Dra. Ma. Magdalena Giordano Noyola

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

Dr. Miguel Condés Lara

Dr. Alfonso Cárabez Trejo

Al Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera, por permitirme formar parte de su Laboratorio

A la Dra. Magdalena Giordano Noyola por su valiosa asesoría académica, así como por el apoyo con material de su laboratorio en el desarrollo de la parte del bioensayo motor de este trabajo.

Al Dr. Miguel Condés Lara por su tutoría, así como por el apoyo con material de su laboratorio para la realización de los bioensayos en este trabajo.

Al Biól. Andrés Falcón Alcántara, por su valioso e incondicional apoyo técnico

A la Biól. María Eugenia Ramos Aguilar por su valiosa ayuda técnica

A la Lic. Pilar Galarza Barrios, así como a todo el personal de la biblioteca del INB, por su invaluable ayuda

Al M.V.Z. Martín García Servín, así como al personal a su cargo, por su valioso apoyo en le manejo de los animales utilizados

Al personal del Departamento de Posgrado del Instituto de Neurobiología: Leonor Casanova, Isabel Bolaños y Carmen Vázquez

Al Dr. Raúl G. Paredes Guerrero, por el apoyo con material de su laboratorio

A la Dra. Ma. Guadalupe Martínez Lorenzana, por su gran disposición y ayuda técnica

Al M.V.Z. Javier Rodríguez Jiménez, por su apoyo incondicional

A la Biól. Soledad Mendoza Trejo, por su ayuda técnica

Al M.V.Z. Fernando Rodríguez Flores, por su disposición y apoyo

Al Nutr. Fernando López Barrera, por su ayuda incondicional

Dedicatoria

Agradezco con gran orgullo y devoción a mi familia, por ser una gran parte de mí para ser feliz y para ser lo que soy.

DIEGO LEZAMA GARCÍA

EVELIA MONFIL TORRES

ESTELA

OFELIO

FRANCISCO

ELISA

ROSA ISELA

ELENA

LETICIA

ANA MARÍA

A todos los que me consideren su amiga, POR LO MUCHO QUE RECIBÍ Y APRENDÍ DE ELLOS, que de verdad me lo llevo todo. Y queriendo que se queden con algo de mí y siempre cuenten conmigo para seguir compartiendo lo que no se puede partir.

A las queridas Dorothy D. Pless y Esther Martínez Trejo

NADA ES PARA SIEMPRE, PERO BIEN VALEN LA PENA LOS PRINCIPIOS - PORQUE SIN ELLOS, NO EXISTIRÍA LA ETERNIDAD EN UNA VIDA CORTA, LLENA DE ESPERANZAS, DONDE LA ACTITUD DE SIEMPRE INTENTAR VIVIR, NOS HARÁ OLVIDARNOS DEL FIN

CAMILLE SEBASTIÁN 2004

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|---|
| GENERALIDADES..... | 1 |
| FUNCIONES Y ACCIONES DE LAS CONOTOXINAS..... | 3 |
| SUPERFAMILIA T..... | 6 |

| | |
|-------------------|---|
| ANTECEDENTES..... | 9 |
|-------------------|---|

| | |
|--------------------|----|
| JUSTIFICACIÓN..... | 11 |
|--------------------|----|

| | |
|----------------|----|
| HIPÓTESIS..... | 13 |
|----------------|----|

| | |
|----------------|----|
| OBJETIVOS..... | 14 |
|----------------|----|

| | |
|-------------------------------|----|
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 15 |
|-------------------------------|----|

MATERIAL Y MÉTODOS

| | |
|---|----|
| I. ANIMALES..... | 15 |
| II. AISLAMIENTO DE LAS CONOTOXINAS T..... | 16 |
| III. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL..... | 18 |
| IV. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA..... | 25 |

RESULTADOS

| | |
|--|----|
| I. PURIFICACIÓN DE CUATRO T CONOTOXINAS..... | 33 |
| II. COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS..... | 35 |
| III. ESTRUCTURA PRIMARIA..... | 38 |
| IV. ARREGLO DE LOS PUENTES DISULFURO..... | 43 |

| | |
|---|----|
| V. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: BIOENSAYO SENSORIAL EN LA RATA..... | 50 |
| VI. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: BIOENSAYO MOTOR EN LA RATA..... | 52 |
| DISCUSIÓN | |
| I. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL..... | 72 |
| II. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA..... | 77 |
| CONCLUSIONES | 84 |
| REFERENCIAS | 85 |

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

Las neurotoxinas son herramientas poderosas en la investigación del sistema nervioso; ejemplos sobresalientes son el trabajo clásico de Narahashi *et al.* (1964) sobre la tetrodotoxina con la cual se evidenció que distintos canales iónicos están involucrados en el cambio de conductancia observado por Hodgkin y Huxley (1952); y el descubrimiento de la α -bungarotoxina por Chang y Lee (1963), que allanó el camino para la caracterización del receptor a acetilcolina, que fue el primer receptor dependiente de ligando en haber sido definido a nivel molecular. Los venenos de animales son una de las grandes fuentes de toxinas y otros agentes farmacológicamente activos que actúan en el sistema nervioso. Hoy en día muchos de los agentes de gran interés para los neurocientíficos están siendo caracterizados a partir del veneno de reptiles, arañas, escorpiones, anémonas y caracoles marinos, principalmente para la elucidación de la relación entre las estructuras de las toxinas y los efectos sobre sus blancos moleculares (o sitios de acción) en mamíferos. El estudio de los diferentes receptores y canales iónicos, junto con la expresión y clonación de sus subunidades a través de la identificación de varias neurotoxinas que interactúan con estos receptores y canales iónicos de maneras altamente selectivas, se ha convertido por lo tanto en uno de los grandes intereses de la neuroquímica.

Dentro de los caracoles marinos, los *Conus* representan un interés especial de investigación debido a estudios recientes sobre los compuestos peptídicos de sus venenos, que podrían derivar potencialmente en compuestos farmacéuticos. Este género está representado por aproximadamente 500 especies; son carnívoros venenosos, están distribuidos geográficamente en hábitats tropicales, y en su mayoría son altamente selectivos en su tipo de alimentación (gusanos, peces, moluscos). El género como tal, tiene un sorprendente intervalo filogenético de presas que comprende animales en cinco diferentes fila. Su rádula está perfectamente modificada para la captura de sus presas; una glándula carga los dientes radulares con un veneno muy tóxico; si un *Conus* siente la presencia de una presa, su diente radular se desliza desde

su posición a la punta de la probóscide y cuando ésta toca a la presa, el diente es lanzado como un arpón inyectándole su veneno el cual la paraliza (Figura 1).

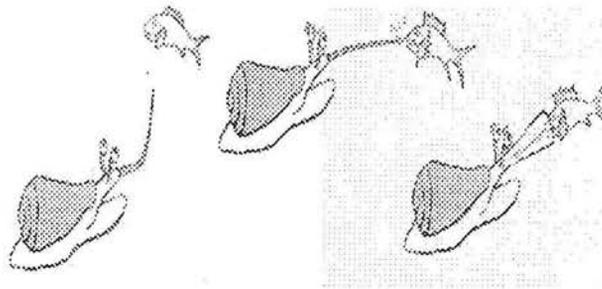


Figura 1. Esquema representativo de la estrategia de caza de un caracol marino.

El veneno de cada especie de *Conus* consiste en una mezcla compleja de unos 50 a 200 péptidos (Olivera *et al.*, 1990). Los péptidos farmacológicamente activos pueden ser divididos en: 1) Péptidos que contienen dos o más puentes disulfuro (referidos genéricamente en la literatura como **conotoxinas**); 2) Péptidos que contienen uno o ningún puente disulfuro (conocidos como **conopéptidos**), como las conopresinas (la actividad biológica provocada al ser inyectadas intracerebroventricularmente es muy similar a la provocada por las hormonas neurohipofisarias vasopresina y oxitocina de vertebrados); las conantokinas (antagonistas de los receptores al ácido N-metil-D-aspartico (NMDA)); y el contrifano Vn (modula la actividad de canales de K^+ activados por voltaje y dependientes de Ca^{++}); 3) péptidos más grandes (con más de 100 aminoácidos), tales como la conodipina, una nueva fosfolipasa A2 (McIntosh *et al.*, 1999). El veneno de los *Conus* también contiene compuestos no polipeptídicos, aunque su distribución en el género es ecléctica; algunos ejemplos son la serotonina en el veneno del *Conus imperialis* (McIntosh *et al.*, 1993), y el ácido araquidónico en el de *Conus textile* (Nakamura *et al.*, 1982).

Los componentes más característicos y predominantes de los venenos son las conotoxinas, las cuales comprenden múltiples familias. Éstas son grupos de pequeños péptidos de entre 10-35 aminoácidos (Olivera *et al.*, 1985; 1990), que comparten un arreglo común de puentes disulfuro y sitios homólogos para unión a un receptor dado

(típicamente sitios en subunidades de un canal iónico). Estas familias son a su vez agrupadas en superfamilias, cuyos miembros comparten una secuencia de aminoácidos altamente conservada (secuencia señal) en sus precursores y sus péptidos maduros tienen un arreglo característico de sus residuos de cisteínas, con excepción de las superfamilias A y T, cuyos miembros pueden contener dos arreglos de cisteínas distintos (Tabla 1).

En ciertos grupos, como la superfamilia O, se presenta un patrón único de residuos de cisteínas, que corresponde a un arreglo específico de puentes disulfuro de todos los péptidos dentro de ella; en otras superfamilias los péptidos muestran más de un arreglo de puentes disulfuro, pero tienen la misma secuencia señal altamente conservada; miembros de algunas superfamilias llegan a tener un arreglo de puentes disulfuro distinto de los de otras (McIntosh *et al.*, 1999).

Tabla 1. Patrones de residuos de cisteínas de algunas familias de conotoxinas y sus respectivas superfamilias.

| SUPERFAMILIA | PATRÓN DE CISTEÍNAS | FAMILIA DE CONOTOXINAS |
|--------------|----------------------------|--|
| A | CC--C--C CC--C--C--C--C | α , ρ αA , κA |
| M | CC--C--C--CC | μ , ψ , κM |
| S | C-C-C-C-C-C-C-C-C-C | σ |
| O | C--C--CC--C--C | ω , δ , μO , κ |
| T | CC-----CC CC-----C-C | ϵ λ/χ |
| P | C--C--C--C--C--C | π |
| I | C--C--CC-CC--C--C | κX |

FUNCIONES Y ACCIONES DE LAS CONOTOXINAS

La actividad biológica de muchas conotoxinas puede ser agrupada dentro de tres categorías: a) las que producen choques excitatorios; b) las que producen parálisis; y c) aquellas que inhiben circuitos sensoriales, en sus presas, predadores o competidores.

Se considera que de los 50 a 200 péptidos que pueden estar contenidos en el veneno de cada una de las casi 500 especies de *Conus* muy pocos han sido caracterizados estructural y funcionalmente. Sin embargo de los péptidos (conotoxinas) cuya función se ha demostrado, sus principales sitios de acción son de tres clases: 1) canales iónicos activados por voltaje; en este caso se ha observado, que algunas conotoxinas provocan un retraso en la inactivación del canal (canales de Na⁺), mientras que otros bloquean específicamente al canal (canales de Na⁺, de Ca⁺⁺ y de K⁺); también hay conotoxinas que modulan canales de K⁺ dependientes de Ca⁺⁺; 2) canales iónicos "dependientes" de ligando (canal-receptor); en este caso, hay conopéptidos y conotoxinas antagonistas de receptores tipo NMDA, de receptores a serotonina, así como antagonistas competitivos y no competitivos de receptores nicotínicos; 3) receptores asociados a proteínas G; en este caso se ha mostrado que ciertas conotoxinas actúan como agonistas de receptores de neurotensina y vasopresina, mientras que los péptidos ρ TIA y el χ Mrl inhiben al adrenoceptor α 1 y al transportador de noradrenalina, respectivamente (Sharpe *et al.*, 2001). Ejemplos de la variedad de conotoxinas y sus sitios de acción se muestran en la Tabla 2.

Las conotoxinas α son los péptidos mayormente caracterizados de la superfamilia A y han sido encontradas en venenos de especies de *Conus* cazadores de peces (piscívoros), cazadores de otros caracoles (molusquívoros) y cazadores de gusanos (vermívoros); las α A conotoxinas han sido encontradas solamente en especies de *Conus* piscívoros que no viven en el Pacífico-Índico (McIntosh *et al.*, 1999).

Al parecer, la selectividad de los sitios de acción y los arreglos de puentes disulfuro (combinados con la hipervariabilidad de los aminoácidos entre las asas formadas por éstos) de las conotoxinas de una especie dada de *Conus*, pueden estar relacionados con el tipo de presas y la localización geográfica de la especie. Así, un patrón general de sitios de acción de las conotoxinas se está configurando entre las superfamilias; cada familia de toxinas podría actuar de forma particular sobre una familia de canales. Por ejemplo, se ha observado que diferentes formas moleculares de la familia de conotoxinas α son en sí ligandos de distintos subtipos moleculares de receptores nicotínicos (McIntosh *et al.*, 1999).

Tabla 2. Superfamilias genéticas, familias farmacológicas, blancos moleculares, ejemplos prototípicos y efectos de conotoxinas y conopeptidos (modificada de McIntosh & Jones, 2001).

| SUPERFAMILIA | FAMILIA | BLANCO MOLECULAR | EJEMPLO PROTOTÍPICO |
|--------------|--------------|--|---|
| A | α | nAChR | α -GI (antagonista) |
| | αA | nAChR | αA -EIVA (antagonista) |
| | κA | canal de K^+ | κ -SVIA (antagonista) |
| | ρ | α_1 | ρ -TIA (antagonista) |
| M | μ | canal de Na^+ | μ -PIIIA (bloqueador) |
| | ψ | nAChR | ψ -PIIIIE (antagonista no competitivo) |
| O | δ | canal de Na^+ | δ -TxVIA (retrasa la inactivación) |
| | μO | canal de Na^+ | μO -MrVIB (bloqueador) |
| | ω | canal de Ca^{++} | ω -MVIIA (bloqueador) |
| | κ | canal de K^+ | κ -PVIIA (bloqueador) |
| | γ | canales tipo marcapasos | γ -PnVIIA (bloqueador) |
| P | π | desconocido | Tx9a |
| S | σ | 5-HT ₃ | σ -GVIIIA (antagonista) |
| T | τ | canal de Ca^{++} presináptico | ϵ -TxIX (tx5a) (bloqueador) |
| | χ | transportador de Noradrenalina | χ -Mrl (Inhibidor) |
| | conopresina | Receptor a vasopresina | Conopresina S (agonista) |
| | contrifanos | Canales de K^+ dependientes de voltaje y dependientes de Ca^{++} | Contrifano - Vn (modulador) |
| C | conantokinas | Receptor de Glutamato, tipo NMDA | Conantokina - G (antagonista) |
| | contulakinas | Receptor a neurotensina | Contulakina - G (antagonista) |

Las conotoxinas ω aisladas de *Conus* piscívoros y *Conus* molusquívoros poseen determinantes que facilitan la interacción selectiva con subtipos de canales de Ca^{++} (N, P, y Q) que regulan la liberación de neurotransmisores (Olivera *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 1993).

SUPERFAMILIA T

Mediante técnicas de secuenciación de proteínas y de ADNcs, han sido identificadas ocho conotoxinas, que componen a una nueva superfamilia, denominada superfamilia T. Estos péptidos comparten en sus precursores una misma secuencia señal y un arreglo conservado de residuos de cisteínas (--CC---CC-), con cinco aminoácidos entre los pares de cisteínas (excepto el Tx5a que tiene cuatro). Estas nuevas conotoxinas T fueron purificadas de venenos de cinco diferentes especies de *Conus* de diversos hábitos alimenticios, *C. purpurascens* (piscívoro), *C. imperialis* (vermívoro, especializado en poliquetos), y *C. aulicus*, *C. textile* y *C. gloriamaris* (molusquívoros). De las dos últimas especies cada una expresa dos secuencias de péptidos ampliamente divergentes pertenecientes a esta superfamilia, lo que sugiere que ésta puede estar integrada por un grupo grande y diverso de péptidos ampliamente distribuido entre las 500 especies de *Conus*. Estos péptidos (11-13 aminoácidos) son de los más pequeños entre las conotoxinas que contienen más de un puente disulfuro. Los puentes disulfuro fueron determinados como $\text{Cys}^1\text{-Cys}^3$, $\text{Cys}^2\text{-Cys}^4$ (como en las conotoxinas α) para los casos de los péptidos purificados de *C. purpurascens* (p5a) y de *C. aulicus* (au5a). La actividad biológica de péptidos aislados de tres especies (p5a, de *C. purpurascens*; tx5a, de *C. textile*; au5a, de *C. aulicus*) fue probada mediante inyecciones intracerebroventriculares en ratones e intramusculares en pez Siamés (*Betta splendens*). Solamente el péptido de *C. textile* tuvo efecto en ratón (hiperactividad y espasticidad), aunque los tres péptidos tuvieron efecto en el pez Siamés (inhibición de la conducta de despliegue de los opérculos de las branquias frente a un espejo) (Walker *et al.*, 1999) (Tabla 3).

Rigby *et al.* (1999) aislaron de *C. textile* un péptido idéntico a la toxina tx5a estudiada por Walker *et al.* y lo denominaron ϵ -TxIX. Estos autores determinaron los puentes disulfuro y encontraron el mismo patrón ($\text{Cys}^1\text{-Cys}^3$, $\text{Cys}^2\text{-Cys}^4$) que existe en

las conotoxinas α y en las conotoxinas T estudiadas por Walker *et al.* (1999). El péptido ε -TxIX redujo selectivamente la liberación de acetilcolina y la entrada de Ca^{++} presináptica en una sinapsis colinérgica del molusco nudibranquio *Aplysia californica*, lo que sugiere que su blanco molecular podrían ser canales de Ca^{++} o receptores acoplados a proteínas G presinápticos (Rigby *et al.*, 1999) (Tabla 3).

El péptido mr10a, purificado del veneno de *Conus marmoreus*, tiene una secuencia altamente divergente de otras conotoxinas (NGVCCGYKKLCHOC, O = 4-trans-hidroxiprolina), un patrón de puentes disulfuro único ($\text{Cys}^1\text{-Cys}^4$ y $\text{Cys}^2\text{-Cys}^3$) y una aparente actividad antinociceptiva o analgésica en ratones (McIntosh *et al.*, 2000). El análisis de su ADNc indicó que es un miembro de la superfamilia T descrita por Walker *et al.* (1999) (Tabla 3).

Tres conotoxinas (CMrVIA, CMrVIB y CMrX) que fueron purificadas del veneno *C. marmoreus* han sido clasificadas como una nueva familia: las conotoxinas λ (Balaji *et al.*, 2000). Estos péptidos tienen puentes disulfuro y secuencias semejantes a las del péptido mr10a (McIntosh *et al.*, 2000) y por lo tanto pertenecen a la superfamilia T. Balaji *et al.* (2000) mostraron que las conotoxinas CMrVIA y CMrX inducen diferentes efectos biológicos en ratones: ataques y parálisis flácida, respectivamente; también demostraron que un péptido sintético (CMrVIA) con una conformación de conotoxina λ (puentes disulfuro, $\text{Cys}^1\text{-Cys}^4$ y $\text{Cys}^2\text{-Cys}^3$; forma tridimensional de "listón") es 1150 veces más potente para provocar ataques en los ratones al ser comparada con un isómero, también sintético, con el patrón de puentes disulfuro de las conotoxinas α ($\text{Cys}^1\text{-Cys}^3$, $\text{Cys}^2\text{-Cys}^4$), cuya conformación tridimensional es globular; lo anterior sugiere que el patrón de puentes disulfuro de estas conotoxinas, y por lo tanto su conformación de "listón", determina su actividad biológica (Balaji *et al.*, 2000) (Tabla 3).

Sharpe *et al.* (2001) encontraron que el péptido χ -MrIA (y probablemente el péptido χ -MrIB) de *C. marmoreus* inhibe reversiblemente y de manera no competitiva a los transportadores de noradrenalina de rata y humano expresados en células COS-1. Este compuesto es idéntico a los péptidos CMrVIB (Balaji *et al.*, 2000) y mr10a (McIntosh *et al.*, 2000). En el mismo trabajo, Sharpe *et al.* (2001) reportaron el estudio de un péptido (ρ -TIA) de *C. tulipa* que inhibe reversiblemente y de manera no competitiva al receptor de adrenalina α_1 de hámster (*Cricetus cricetus*) expresado en

células COS-1. La distribución de las cuatro Cisteínas y los dos puentes disulfuro del péptido ρ -TIA son idénticos a las de la conotoxinas α 4/7 (Tabla 3).

En resumen, los péptidos de la superfamilia T de conotoxinas son producidos por *Conus* de todos los tipos de alimentación, forman un grupo muy diverso desde el punto de vista estructural, y pueden tener blancos moleculares en mamíferos (roedores y humanos).

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos y puentes disulfuro de conotoxinas de la superfamilia T y de otras familias de conotoxinas que tienen cuatro residuos de cisteína.

| FAMILIA | SECUENCIA | PATRÓN DE PUENTES DISULFURO |
|--|--|-----------------------------|
| Superfamilia T | | |
| tx5a | γ CC γ DGW" CCT ^{&} AAO | |
| p5a | GCCPKQMRCTL* | |
| au5a | FCCPFIRYCCW | |
| au5b | FCCPVIRYCCW | |
| ϵ -TxIX | γ CC γ DGW" CCT ^{&} AAO | |
| Conotoxinas λ/χ | | |
| mr10a | NGVCCGYKLCHOC | |
| CMrVIA | VCCGYKLCHOC | |
| CMrVIB | NGVCCGYKLCHOC | |
| CMrX | GICCGVSFCYOC | |
| χ -MrIA | NGVCCGYKLCHOC | |
| χ -MrIB | VGVCCGYKLCHOC | |
| Conotoxinas ρ | | |
| ρ -TIA | FNWRCCLIPACRRNHKKFC* | |
| Conotoxinas α | | |
| MI | GRCCHPACGKNYSC* | |
| MII | GCCSNPVCHLEHSNLC* | |
| ImI | GCCSDPRCAWRC* | |
| AuIB | GCCSYPPCFATNPDC* | |

W" = bromotriptofano; γ = γ carboxiglutamato; T[&] = treonina O-glicosilada; * = carboxilo terminal amidado.

ANTECEDENTES

En el Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la UNAM se caracterizó parcialmente, a nivel estructural y biológico, un péptido (ϵ -SrIXA, PI en esta Tesis) hidrofóbico y abundante en el veneno de *Conus spurius atlanticus* (*sp.* encontrada en México), que es considerado tentativamente como una ϵ -conotoxina y miembro de la superfamilia T (Maillo, 2001). Esta consideración se deriva del hecho que dicho péptido tiene aparentemente cuatro cisteínas en forma de dos pares de cisteínas adyacentes separados por cinco residuos de aminoácidos entre la segunda y tercera cisteína (CCLIFYQCC); estas características son distintivas de los miembros de la superfamilia T. Además, el péptido de *Conus spurius* comparte una bioactividad (temblor luego de la inyección intracraneal en ratones; incremento del rascado y acicalamiento; síndrome hiperactivo; Maillo, 2001) con la conotoxina tx5a/ ϵ -TxIX de *C. textile* (Walker *et al.*, 1999; Rigby *et al.*, 1999).

La masa molecular del péptido ϵ -SrIXA, obtenida mediante ESI-MS (ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry) fue de 1616.6 Da, lo que indicaba la presencia de 14 residuos de aminoácido, aproximadamente (considerando una masa molecular promedio de 112.5 Da/residuo). La secuencia obtenida mediante degradación de Edman automática fue: IINWXXLIFYQXX, donde X indica un residuo no identificado, probablemente Cisteína. La combinación de los resultados de los análisis de masas y de secuencia (considerando los cuatro residuos X como Cys y formando dos puentes disulfuro) sugería que la estructura estaba completa y que el extremo carboxilo se encontraba amidado. Se llegó a esta última conclusión debido a que el peso molecular calculado (por la suma teórica del peso de cada residuo; considerando los cuatro residuos X como Cisteína y formando dos puentes disulfuro, y como libre el extremo carboxilo; IINWCCLIFYQCC-OH), fue de 1618.0 Da, mientras que la masa teórica calculada para el péptido amidado correspondiente (IINWCCLIFYQCC-NH₂) fue de 1617.0 Da (Tabla 4). El último valor teórico de la masa molecular del péptido ϵ -SrIXA concuerda mejor con el valor obtenido experimentalmente. Esta conotoxina se denominó ϵ -SrIXA porque existe evidencia de que en el veneno del *C. spurius atlanticus*

hay, en cantidad pequeña, otros dos péptidos (ϵ -SrIXB y ϵ -SrIXC; PII y PIII, respectivamente, en esta Tesis) hidrofóbicos con secuencia similar a la de ϵ -SrIXA.

Las evidencias experimentales y los razonamientos que permiten considerar tentativamente a los péptidos ϵ -SrIXB y ϵ -SrIXC como miembros de la superfamilia T son similares a los discutidos para el péptido ϵ -SrIXA. Dada las coincidencias (en secuencia y masa molecular) entre los péptidos ϵ -SrIXA y ϵ -SrIXB es posible que difieran en el patrón de puentes disulfuro. En el caso de ϵ -SrIXC la diferencia entre la masa experimental y la calculada indica la presencia de un residuo adicional con respecto a ϵ -SrIXA, posiblemente Leucina, Isoleucina o Hidroxiprolina (Tabla 4).

Además, en el extracto del veneno de esta especie se ha caracterizado parcialmente un péptido (SplIB, PIIB en esta Tesis) abundante con características hidrofílicas, que aparentemente contiene cuatro cisteínas, entre ellas un par de cisteínas adyacentes, y que también puede ser considerado tentativamente como un miembro de la superfamilia T. En este caso, la diferencia entre la masa experimental y la calculada indica la presencia de un residuo de Arginina que no fue detectado durante la secuenciación de Edman (Tabla 4).

Tabla 4. Conotoxinas T putativas de *Conus spurius atlanticus*

| PÉPTIDO | MASA MOLECULAR (Da) (ESI-MS) | SECUENCIA (EDMAN) | SECUENCIAS PROPUESTAS / MASA CALCULADA (Da) |
|--------------------------|------------------------------|-------------------|--|
| ϵ -SrIXA (PI) | 1,616.6 | IINWXXLIFYQXX | IINWCCLIFYQCC-OH IINWCCLIFYQCC-NH ₂ \leftarrow 1,617.0 |
| ϵ -SrIXB (PII) | 1,616.6 | IINWXXLIFYQXX | IINWCCLIFYQCC-OH IINWCCLIFYQCC-NH ₂ \leftarrow 1,617.0 |
| ϵ -SrIXC (PIII) | 1,729.7 | IINWXXLIFYQXXX | IINWCCLIFYQCCL/I/O-OH IINWCCLIFYQCCL/I/O-NH ₂ \leftarrow 1,730.1-1,730.2 |
| ϵ -SrIIB (PIIB) | 1,548.6 | AGXXPRFYXYXLX | AGCCPRFYCYCLR-OH AGCCPRFYCYCLR-NH ₂ \leftarrow 1,549.9 |

O = hidroxiprolina.

JUSTIFICACIÓN

El veneno de los *Conus* contiene una gran variedad de toxinas peptídicas que se unen con afinidad muy alta (a concentraciones nM) tanto a sus receptores (blancos celulares en sus presas, depredadores o competidores) como a receptores en organismos con los que los *Conus* no interactúan naturalmente (p. ej. mamíferos).

Algunas conotoxinas se unen exclusivamente a ciertos subtipos de su blanco molecular debido a que tienen afinidad y especificidad de unión extremadamente elevadas, lo que les confiere un gran potencial como sondas moleculares. Dado que estas mismas características (afinidad y especificidad de unión elevadas) son consideradas como propiedades ideales de los fármacos, las conotoxinas tienen también potencial como agentes terapéuticos. Se sabe que diferentes enfermedades del sistema nervioso central son debidas a defectos en la función y expresión de canales iónicos activados por voltaje, receptores canal o receptores asociados a proteínas G, que son precisamente los blancos moleculares de las conotoxinas conocidas.

Los péptidos de la superfamilia T (grupo de conotoxinas descubierto recientemente), producidos por *Conus* de todos los tipos de alimentación, forman un grupo muy diverso desde el punto de vista estructural. Se ha demostrado que algunos de estos péptidos tienen blancos moleculares en mamíferos (roedores y humanos). Debido a esto, los miembros de esta superfamilia podrían utilizarse como herramientas moleculares y como fármacos potenciales.

En la especie *Conus spurius*, presente en el Mar Caribe mexicano, se han caracterizado parcialmente tres péptidos de carácter hidrofóbico (ϵ -SrIXA, ϵ -SrIXB, ϵ -SrIXC; PI, PII, PIII, respectivamente) y uno más de tipo hidrofílico (ϵ -SrIIB; PIIB) que, aparentemente, pertenecen a la superfamilia T; se ha demostrado que el péptido ϵ -SrIXA tiene actividad biológica en ratón (Maillo, 2001)

Dada la utilidad potencial de las conotoxinas T en general, se decidió: 1) confirmar la estructura de las conotoxinas T putativas de *C. spurius*, y 2) continuar el estudio de los efectos biológicos (sobre mamíferos) de las toxinas más abundantes en el veneno, una hidrofílica y otra hidrofóbica. Este último aspecto puede facilitar el

camino para la identificación de sus posibles blancos moleculares, con el fin de poder utilizarlas en el futuro como herramientas moleculares o fármacos dirigidos a receptores específicos de mamíferos.

HIPÓTESIS

Los péptidos PI, PII, PIII y PIIB, del veneno de *Conus spurius*, pertenecen a la familia estructural de las conotoxinas T.

Los péptidos PI y PIIB producen efectos biológicos diferentes en el SNC de la rata debido a sus estructuras primarias distintas, actuando sobre blancos moleculares similares a los receptores en sus presas naturales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la estructura y la actividad biológica de varias conotoxinas putativas (PI, PII, PIII y PIIB) de la superfamilia T producidas por *Conus spurius atlanticus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Purificar las conotoxinas T en cantidades adecuadas para su caracterización estructural y biológica.

Confirmar la estructura primaria de las conotoxinas pertenecientes a la superfamilia T.

Determinar los puentes disulfuro de los conotoxinas pertenecientes a la superfamilia T.

Evaluar el posible efecto de las conotoxinas T más abundantes (PIIB, hidrofílica, y PI, hidrofóbica) sobre preparaciones biológicas de mamíferos (ratas):

- efecto sobre el umbral al dolor por presión
- efecto sobre la coordinación motora

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Esta fue establecida para: 1) La caracterización estructural de los péptidos en estudio, mediante su purificación, su cuantificación, el análisis de su composición de aminoácidos, la determinación del patrón de los residuos de cisteínas en la estructura primaria, y la comprobación del arreglo de los puentes disulfuro; 2) La caracterización biológica de los péptidos, fue a través de la valoración de los efectos provocados al ser administrados en ratas por diferentes vías (intratecal, intracerebroventricular e intravenosa), a nivel de sus respuestas sensitivas (valorando su umbral al dolor por presión) y de sus respuestas motoras (coordinación o ejecución motora).

MATERIAL Y MÉTODOS

I - ANIMALES

Los péptidos objeto de este estudio fueron obtenidos a partir del veneno de caracoles marinos de la especie *Conus spurius*.

I.A - RECOLECCIÓN DE CARACOLES

Los caracoles que se utilizaron para la extracción del veneno fueron capturados por arrastre entre 37 y 100 metros de profundidad en aguas del Mar del 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 (Maillo, 2001).

I.B - IDENTIFICACIÓN DE CARACOLES

Los especímenes usados fueron identificados como *Conus 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; Figura 2). La concha es cónica, de color

marfil, con manchas cafés oscuras con el patrón característico de la especie, que está compuesto de rectángulos grandes y pequeños en vueltas concéntricas en la misma dirección del último giro de la concha; el interior de la concha es de color blanco y puede apreciarse que la abertura y el canal sifonal son amplios. En general la relación entre la longitud de la espira y el cuerpo del caracol es de 1.8 y aún en especímenes muy grandes la longitud de la corona no excede 1 cm. Las conchas son lisas sin tubérculos y el canal sifonal es recto) (Maillo, 2001).



Figura 2. A) Caracol marino *Conus spurius*; su distribución abarca una gran área del Golfo de México (desde los arrecifes de Carolina del Sur y de la Florida hasta la península de Yucatán); *C. spurius* es una especie común que alcanza medidas de hasta 12 centímetros en longitud y se encuentra en aguas poco profundas. B) Ejemplo representativo del aparato venenoso de los caracoles marinos (1, saco y dientes radulares; 2, bulbo venenoso; 3, conducto del veneno; 4 faringe; 5 probóscide).

II - AISLAMIENTO DE LAS CONOTOXINAS T

II.A - OBTENCIÓN DEL CONDUCTO VENENOSO

Se aislaron los conductos venenosos de cuatro ejemplares de *C. spurius var. atlanticus*, de entre 7 y 11 cm de longitud, por quebrantamiento de las conchas en forma mecánica, para disecar el cuerpo del caracol (Maillo, 2001).

II.B - PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DEL VENENO

Se obtuvo el extracto de veneno haciendo un homogenizado de los conductos de los cuatro ejemplares, utilizando para ello 8 mL de una solución al 0.5% de ácido

trifluoroacético (TFA), en una mezcla de acetonitrilo (MeCN) al 40% en agua (mezcla de extracción, ME). La mezcla homogenizada fue centrifugada por 15 min a 12,000 rpm, usando para ello una centrífuga de mesa SORVALL, modelo MC12. El sobrenadante fue separado y almacenado. El botón fue nuevamente homogenizado con 8 mL de ME, tras lo cual la muestra fue sonicada (Sonifier B-12, Branson Ultrasonics Corp.; Danbury, CT), cuatro veces durante 30 s cada vez a 0 °C; después de esto, el homogenado fue centrifugado por 15 min a 12,000 rpm, y separado el sobrenadante. Los sobrenadantes fueron repartidos en diez fracciones de aproximadamente de 1.5 mL cada uno y fueron entonces liofilizados (Speed Vac Plus SC110A, Savant; Holbrook, NY). En total se obtuvieron 198.2 mg de veneno crudo (Maillo, 2001). Los residuos de los sobrenadantes fueron disueltos en ME y se cromatografiaron por separado; a partir de cada una de las fracciones se purificaron posteriormente las conotoxinas de interés .

II.C - AISLAMIENTO DE LOS PÉPTIDOS

Los componentes peptídicos de las fracciones de veneno crudo obtenidas fueron separados mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (siglas en inglés HPLC–RP), en un cromatógrafo BIO-RAD compuesto de un módulo de bombeo (Model 2800 Solvent Delivery System), un detector Ultravioleta/visible (Bio-Dimension UV/VIS Monitor), y un inyector manual (Rheodyne, 7125-081). Se usó una columna analítica C18 (Vydac, 218TP54; 4.6 x 250 mm, tamaño de partícula 5 μm , tamaño de poro 300 Å) con una precolumna C18 (Vydac, 218GK54; 4.6 x 10 mm, tamaño de partícula 5 μm , tamaño de poro 300 Å), y filtro (Alltech, 28689; 4 mm, 2 μm tamaño de poro). Para la elución se emplearon dos soluciones: TFA al 0.1% (v/v) (solución A), y TFA al 0.085% (v/v) en una solución de MeCN al 90% (v/v) en agua (solución B). Para el fraccionamiento del veneno crudo, el gradiente de elución empleado comenzó con una mezcla de 95% de solución A y 5% de solución B, incrementándose la proporción de solución B a razón de 1% por minuto; la elución se realizó a temperatura ambiente con un flujo de 1 mL/min y se empleó un asa de 200 μL para cargar la muestra; las fracciones se colectaron en tubos de polipropileno de 1.5 mL, con base en el cambio de absorción a 220 nm (cortes de recolección) (Figura 3).

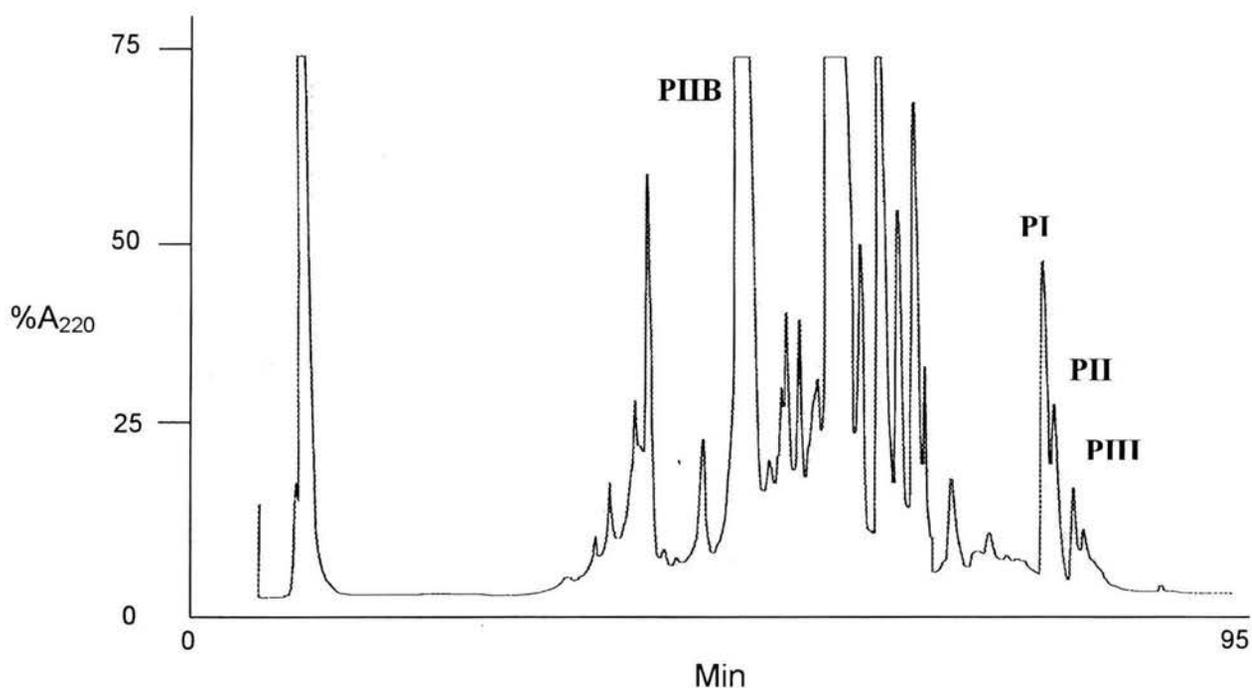


Figura 3. Perfil cromatográfico de una de las fracciones del extracto de veneno de *Conus spurius* (monitoreado a 220 nm, 1.0 AUFS) donde se muestran los péptidos SpIIB, PI, PII, PIII, que fueron seleccionados por el antecedente de que eran miembros putativos de la superfamilia de conotoxinas T.

III - CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

III.A - PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS

Los péptidos puros del extracto crudo se purificaron mediante de inyecciones de 1 mL (aproximadamente: 7 nmoles de PI, 2 nmoles de PII, y 1 nmol de PIII y PIIB) por HPLC-RP en un cromatógrafo Agilent de la serie 1100, compuesto de un módulo de bombeo (G1311A QuatPump), un detector Ultravioleta/visible de arreglo de diodos (G13158 DAD), un desgasificador en línea (G1322A Degasser) y un inyector manual (Rheodyne, 7725i) y con un cromatógrafo Varian equipado con una bomba ternaria (Pro Star, modelo 230), un detector Ultravioleta/visible (modelo 310) y un inyector manual (Rheodyne, 7725i). Se usó una columna analítica C18 (Vydac, 218TP54; 4.6 x 250 mm, tamaño de partícula 5 μm , tamaño de poro 300 Å) con una precolumna C18 (Vydac, 218GK54; 4.6 x 10 mm, tamaño de partícula 5 μm , tamaño de poro 300 Å), y filtro

(Alltech, 28689; 4 mm, 2 μ m tamaño de poro). Para la elución se emplearon dos soluciones: TFA al 0.1% (v/v) (solución A), y TFA al 0.085% (v/v) en una solución de MeCN al 90% en agua (solución B). La elución se realizó a temperatura ambiente con un flujo de 1 mL/min y se empleó un asa de 1000 μ L para cargar la muestra; las fracciones se colectaron en tubos de polipropileno de 1.5 mL, con base en el cambio de absorción a 220 nm. Los gradientes lineales empleados fueron: péptidos PI, PII y PIII: 45-50% solución B en 15 min; péptido PIIB: 22-30% solución B en 80 minutos.

III.B - DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS PURIFICADOS

Para confirmar la estructura primaria se utilizó un secuenciador automático de proteínas basado en la degradación de Edman; el mismo equipo puede usarse para cuantificar los péptidos ya puros para realizar los diferentes estudios, tanto bioquímicos como biológicos.

III.B.1 - FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

En términos generales, en la degradación de Edman, los residuos de aminoácido son removidos uno por uno (como la anilinothiazolinona del aminoácido), convertidos a un derivado estable (feniltiohidantoín-aminoácido, PTH-AA), e identificados de acuerdo a sus tiempos de elución (al comparados con los de patrones conocidos de los 20 PTH-AA) mediante HPLC-RP; este proceso se repite un número de veces igual al número de aminoácidos que interesa conocer. Al comparar el área bajo la curva del PTH-AA obtenido en cada ciclo de degradación con el área bajo la curva del PTH-AA patrón correspondiente (en cantidad conocida) es posible estimar la cantidad de cada residuo. Por lo tanto, al determinar la secuencia de un péptido es posible también cuantificar la cantidad de éste que fue degradado.

III.B.2 - EQUIPO

Se usó un secuenciador de proteínas Applied Biosystems (Procise 491 Protein Sequencer) acoplado a un cromatógrafo compuesto por un módulo de bombeo binario (140C Microgradient System) y un detector Ultravioleta/visible (785 Programmable Absorbance Detector). Para el control del secuenciador y del cromatógrafo, así como para la recolección y análisis de datos se usó una computadora personal (Power Macintosh 7200/120) con un programa especializado para este fin (The Model 610A Data Analysis Program).

III.B.3 - MODOS DE SECUENCIACIÓN, CROMATOGRAFÍA Y DETECCIÓN

Se usó un método que primero cromatografía un patrón de PTH-AA y luego procede a la degradación secuencial mediante una técnica basada en la entrega, en forma de "pulsos", de los reactivos en forma líquida (LIQ-STD-4,11,20,48; los números representan los porcentajes de solución B (a los 0, 0.2, 0.4 y 18 min del programa de elución).

Para la cromatografía de los PTH-AA se empleó una columna C18 (Spheri-5 PTH, 2.1 x 220 mm, tamaño de partícula 5 μ m) y un gradiente de pasos lineales de las soluciones A3 (tetrahidrofurano en agua al 3.5% (v/v), más 15% (v/v) de Premix Buffer Concentrate [contiene 10-20% de ácido acético glacial, <10% de acetato de sodio anhidro, <10% de 1-hexanosulfonato de sodio, y 65-75% de agua]) y B2 (isopropanol al 12% (v/v) en MeCN) a 325 μ L/min. Los PTH-AA fueron detectados a una longitud de onda de 269 nm.

III.B.4 - PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se coloca un filtro de fibra de vidrio sobre uno de los bloques de vidrio del cartucho del secuenciador y se le agregan 15 μ L de Biobrene Plus (polibreno: polímero de 1,3-dibromopropano y N,N,N',N'-tetrametilhexametildiamina), que ayuda a la adhesión del péptido. El filtro es secado con una corriente de un gas inerte (Argón) y colocado en el cartucho. Luego se somete a un preciclo de secuenciación, que consiste en: una simulación de la reacción degradación de Edman incluyendo solamente los pasos de acoplamiento y corte (método PRECYCLE). Posteriormente, la muestra a

secuenciar o cuantificar es aplicada al filtro (en alícuotas de 15 μ L) y se seca con Argón.

III.B.5 - SECUENCIACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se determinan los ciclos a realizar de acuerdo al número de residuos esperados en el péptido, conjuntamente con un estándar de PTH-AA (10 pmol de cada uno). Las cuantificaciones generalmente se llevaron a cabo sometiendo a los péptidos a uno o dos ciclos de degradación; por extrapolación del área del pico del residuo obtenido con el área equivalente a los 10 pmol del correspondiente residuo en el estándar, a través de una regla de tres se determinan los pmoles totales del péptido en la muestra.

III.C - CUANTIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES V Y 25Sr

Las fracciones V y 25Sr del veneno del *Conus spurius* fueron disueltas en DMSO al 10% en agua, y su concentración determinada por el método de Lowry *et al.*, (1951), empleando un juego de reactivos comercial (D_C Protein Assay, Bio-Rad; Hercules, CA).

III.D - COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS

Para la determinación de las estructuras primarias completas de los péptidos PIII y PIIB que por secuencia de aminoácidos no se habían podido observar completamente, se decidió emplear la técnica de análisis de la composición de aminoácidos; los péptidos PI y PII se usaron como patrones. La determinación de la composición de aminoácidos consiste en tres etapas: 1) hidrólisis de los péptidos; 2) derivación de los aminoácidos (resultantes de la hidrólisis) con el reactivo de Edman (fenilisotiocianato, PITC); 3) separación y cuantificación de los derivados de aminoácidos mediante HPLC-RP. Se utilizó la técnica de derivación pre-columna o prederivación de Bidlingmeyer *et al.*, (1984).

III.D.1 - HIDRÓLISIS

Los péptidos y los respectivos controles (agua, patrón de aminoácidos, proteína estándar [cadena B de la insulina, oxidada]) secos en tubos individuales de 6 x 50 mm (Kimax-51 $\text{\textcircled{R}}$; Kimble Glass Inc.) fueron colocados en un frasco con 6 mL de HCl (30%)

y 60 μL de fenol fundido. El recipiente fue cerrado y colocado en hielo; después de 5 min se conectó al vacío y al alcanzar éste 2 Torr, aproximadamente, se cerró la válvula del frasco y se sacó del hielo. Después de que alcanzó la temperatura ambiente, el frasco fue introducido en un baño seco (Dry Bath Incubator; Fischer Scientific) a una temperatura 110 °C durante 96 horas.

III.D.2 - DERIVACIÓN

Después de la hidrólisis, las diferentes muestras fueron tratadas con 20 μL de solución secante (metanol (MeOH):agua:triethylamina (TEA), 4:1:1 [v/v/v]) para neutralizar cualquier resto de ácido; después de disolver los residuos con la solución secante, las muestras fueron secadas al vacío. Enseguida se sometieron al proceso de acoplamiento con 20 μL de la solución de derivación (MeOH:agua:TEA:PITC, 7:1:1:1 [v/v/v/v]) por 20 minutos a temperatura ambiente. Los feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC- aminoácidos) resultantes se secaron al vacío y se almacenaron a -20 °C, hasta su análisis cromatográfico.

III.D.3 - SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PTC-AMINOÁCIDOS

Se llevó a cabo mediante HPLC-RP en un cromatógrafo Agilent de la serie 1100, compuesto de un módulo de bombeo (G1311A QuatPump), un detector Ultravioleta/visible de arreglo de diodos (G13158 DAD), un desgasificador en línea (G1322A Degasser) y un inyector manual (Rheodyne, 7725i) con asa de 20 μL . La temperatura de la separación se controló a 62 °C mediante un horno para columna (TC-50, Eppendorf). Los patrones enpleados fueron: 1) aminoácidos: 125 pmol / 20 μL ; 2) proteína conocida: (cadena B de insulina, oxidada) 112 pmol / 20 μL . Se usó una columna Nova-Pak C18 (3.9 x 300 mm; 4 μm tamaño de partícula, 60 Å tamaño de poro; Waters), con una precolumna (0.46 x 1.0 cm; tamaño de partícula 5 μm tamaño de poro 300 Å; Vydac). Se usaron las siguientes soluciones para la cromatografía: solución A (14 mM acetato de sodio, 6% MeCN, 0.05% TEA, pH 6.4); solución B (60% MeCN). Se usó un gradiente con varios pasos lineales: 0-12% B en 5 minutos; 12-35.5% B en 8 min; 35.5- 60% B en 1 min; 60-100% B en 0.5 minutos; 100% B durante 5.5 minutos;

100-0% B en 1min; 0% B durante 4 minutos. La detección se hizo a una longitud de onda de 254 nm.

III.E - CONFIRMACIÓN DEL PATRÓN DE CISTEÍNAS

Para poder detectar los residuos de Cisteína durante la secuenciación de Edman y confirmar la localización de las cisteínas en la secuencia de aminoácidos de cada péptido es necesario modificarlos con un reactivo alquilante. Para esto, los péptidos purificados fueron reducidos, alquilados con 4-vinilpiridina (para observar los residuos de Cisteínas como derivados denominados PTH-piridiletilcisteínas, PTH-PEC), repurificados por HPLC-RP y sometidos a secuenciación de Edman automática.

III.E.1 - REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN

Esto se hizo tomando aproximadamente un nmol de cada péptido (PIIB, PI, PII, y PIII) y reduciendo los puentes disulfuro entre las cisteínas con una solución que contenía 100 mg de guanidina (concentración final, 6 M), en 100 μ L de amortiguador TRIS 0.1M pH 8 y 40 μ L de DTT 50 mM; la reacción se llevó a cabo a 65 °C por 25 min. La alquilación de las cisteínas libres (reducidas) fue hecha agregando 4 μ L de 4-vinilpiridina, dejando reaccionar por 18 h a temperatura ambiente (bajo atmósfera de N₂).

III.E.2 - REPURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS PIRIDILETILADOS

Los péptidos piridiletilados fueron separados de los reactivos usados para la reducción y alquilación mediante HPLC-RP en las condiciones descritas en la sección IIIA, con un gradiente de solución B de 10–60%B en 50 minutos; los péptidos derivados fueron llevados a sequedad.

III.E.3 - SECUENCIACIÓN

Los péptidos piridietilados fueron disueltos en 40 μ L de TFA:agua, 2:1 (v/v), aplicados a un filtro apropiadamente tratado (ver sección IIIB.4), y secuenciados para la observación de la estructura primaria o secuencia de aminoácidos, incluyendo a las cisteínas.

III.F - DETERMINACIÓN DEL ARREGLO DE PUENTES DISULFURO

Para determinar el patrón de enlaces disulfuro entre las cisteínas de los péptidos PI, PII y PIII, éstos fueron sometidos a una reducción parcial y alquilación con N-etilmaleimida en condiciones ácidas, repurificación, reducción total y alquilación con 4-vinilpiridina en condiciones básicas, repurificación, y secuenciación. Esta estrategia incluye reducciones y alquilaciones distintas para la diferenciación de los residuos de cisteínas involucradas en cada puente disulfuro reducido. Para el ensayo se tomaron aproximadamente 20 nanomoles del PI, 12 nanomoles del PII y 1.5 nmoles del PIII (debido a la escasez de muestra el péptido III sólo se redujo parcialmente y se alquiló con N-etilmaleimida). La estrategia utilizada para este ensayo fue la descrita por van de Hooven (2001).

III.F.1 - REDUCCIÓN PARCIAL Y ALQUILACIÓN CON N-ETILMALEIMIDA

La reducción parcial se llevó a cabo después de disolver los péptidos en 10 μ L de amortiguador de citrato (0.18 M, pH 3) que contenía 6 M de guanidina-HCl en agua. La reacción fue iniciada adicionando 27.2 μ L (240 equivalentes de TCEP) de una solución 0.1 M de TCEP (Tris-2-carboxietil-fosfina) en amortiguador de citrato (en 0.1 M pH 3) que contenía 6 M de guanidina-HCl; la mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos, seguida directamente por una reacción de alquilación con N-etilmaleimida; ésta fue realizada adicionando 68 μ L de 0.1 M de N-etilmaleimida (600 equivalentes), en amortiguador de citrato 0.1 M pH 3 y 6 M de guanidina-HCl en agua, e incubando 30 minutos a temperatura ambiente.

III.F.2 - REPURIFICACIÓN

Los péptidos N-etilsuccinimidados fueron separados de los reactivos usados para la reducción y alquilación mediante HPLC-RP en las condiciones descritas en la sección IIIA, con un gradiente de solución B de 35-50 % en 90 minutos; los péptidos derivados fueron llevados a sequedad.

III.F.3 - REDUCCIÓN TOTAL Y ALQUILACIÓN CON 4-VINILPIRIDINA

Los derivados (secos) fueron sometidos a una reducción total, incubándolos en 200 μ L de una solución acuosa conteniendo 20 mM de TCEP y 250 mM de Tris-acetato, pH 8 durante 30 minutos a 50 °C; después de 10 minutos a temperatura ambiente se adicionaron 4 μ L de 4-vinilpiridina (VP, para alquilar o marcar los residuos de cisteínas que estaba formando el segundo puente) y se incubó la mezcla por 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

III.F.4 - REPURIFICACIÓN

La mezcla fue inmediatamente purificada por HPLC (gradiente de solución B: 30-50% en 120 minutos); los derivados recuperados fueron concentrados y entonces disueltos en TFA:agua (1:1, v/v) y secuenciados para la observación del patrón de alquilación de las cuatro cisteínas y así determinar el arreglo de los puentes disulfuro.

III.F.5 - SECUENCIACIÓN

Los péptidos piridiletalados/N-etilsuccinimidados fueron disueltos en 30 μ L de TFA:agua, 2:1 (v/v), aplicados a un filtro apropiadamente tratado (ver sección IIIB.4), y secuenciados para la observación de la estructura primaria o secuencia de aminoácidos, incluyendo a las cisteínas marcadas diferencialmente.

IV - CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

Dado que se había demostrado que una de las conotoxinas T putativas (PI) objeto de este trabajo tiene actividad biológica en ratones (Maillo, 2001), se decidió evaluar la actividad biológica, en ratas, de los dos péptidos más abundantes purificados en este trabajo (PIIB y PI), así como de dos fracciones (fracción V y fracción 25Sr) que contenían los péptidos más hidrofóbicos del veneno (entre los cuales estaba al menos el péptido PI).

IV.A - EFECTO SOBRE EL UMBRAL AL DOLOR POR PRESIÓN

Debido a que se ha encontrado que algunas conotoxinas de la superfamilia T (mr10a, ver pág. xix) producen efectos analgésicos o antinociceptivos en ratones, se decidió evaluar el efecto de la conotoxina T putativa más abundante (PI) de *C. spurius* sobre el umbral al dolor por presión en ratas, administrándola por vía intratecal.

IV.A.1 - IMPLANTACIÓN DE LA CÁNULA

Se utilizaron 18 ratas macho (2 meses de edad) de la cepa Wistar, a los que les fueron implantadas cánulas intratecales bajo anestesia de una mezcla con ketamina y rompum (40 mg/kg). Las cánulas fueron previamente llenadas con solución salina y selladas en el extremo externo, las cánulas medían alrededor de 180 mm de longitud para permitir realizar las inyecciones en los niveles lumbares de la médula espinal.

Los músculos del cuello fueron separados y la membrana atlanto-occipital fue cuidadosamente descubierta; a través de un orificio en esta membrana se deslizó el catéter o cánula, observando que el animal no tuviese movimientos de los miembros anteriores y posteriores. Las cánulas fueron fijadas mediante hilo quirúrgico a los músculos del cuello, dejando sobresalir varios milímetros para efectuar las inyecciones intratecales. Los animales se dejaron recuperar por un periodo mínimo de dos días después de la operación.

IV.A.2 - INYECCIONES INTRATECALES

Las ratas fueron sujetadas de manera que quedaran inmovilizadas para su fácil manipulación; la cánula fue abierta con unas tijeras, y la aguja de la jeringa (Hamilton de 25 μ L) fue introducida en la punta de la cánula y la muestra fue inyectada lentamente; inmediatamente el animal fue colocado en su caja, donde permaneció durante 9 minutos hasta la valoración.

IV.A.3 - VALORACIÓN DEL EFECTO SOBRE EL UMBRAL AL DOLOR

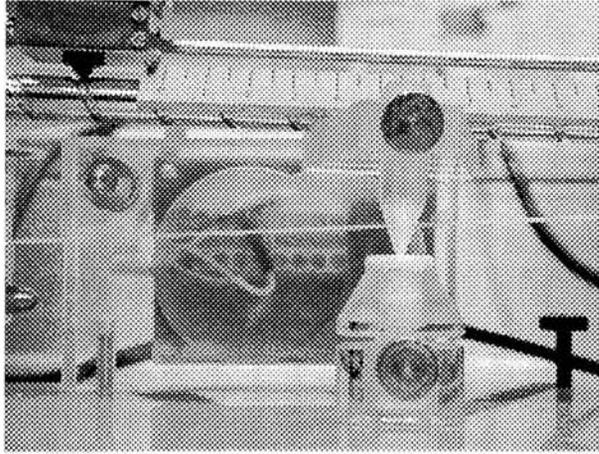
Antes de las valoraciones (control o de prueba), los animales fueron manipulados de manera tal que no mostraran un efecto por la novedad ante la manipulación y medición del umbral al dolor. Cada valoración del umbral al dolor por presión consistió

en la medición de dos veces en cada una de las patas posteriores. Los animales fueron sometidos a tres valoraciones del umbral al dolor por presión: 1) antes de la cirugía (implantación de la cánula); 2) después de la recuperación de la cirugía; y 3) después de la inyección del péptido (prueba) o del vehículo de inyección (control).

Los animales fueron divididos en cuatro grupos, con cuatro o cinco animales por grupo. El primer grupo fue utilizado para inyectar el vehículo (dimetilsulfóxido en agua, DMSO) al 8% en el cual iba disuelto el péptido PI. El segundo grupo fue utilizado para inyectar el péptido I purificado (disuelto en DMSO al 8%). El tercer y cuarto grupo fueron utilizados para valorar la concentración de 10% del vehículo y del péptido disuelto en el vehículo a esta última concentración.

IV.A.4 - MEDICIÓN EN EL ANALGESIÓMETRO

Después de 9 minutos de haber inyectado a los animales éstos fueron inmovilizados, dejando libres las patas posteriores. Para realizar las mediciones del umbral al dolor por presión cada una de las patas fue colocada en una pequeña plataforma del analgesiometro (Paw Pressure Analgesia Instrument, type 7200; Biological Research Apparatus; Varese, Italy). Un área pequeña de la pata fue sometida en a una presión con una pesa (ver foto, página 27) que progresivamente iba aumentando de peso. El valor que se tomó como dato fue el marcado en la pesa en el momento en que el animal libremente retiraba la pata de la plataforma; los valores o unidades de la pesa iban de 0-25 que corresponden aproximadamente a un máximo de 250 gramos.



IV.A.5 - ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos en este experimento fueron valorados mediante la aplicación a dichos datos de un análisis de varianza de una vía, comparando las diferencias entre los grupos control y los tratados con el péptido I antes y después de la inyección, tomando en consideración una diferencia estadísticamente significativa entre los datos de cada uno de los grupos, si estos representaban una probabilidad debida al azar de 0.5 %.

IV.B - EFECTO SOBRE LA COORDINACIÓN MOTORA ROTACIONAL

Debido a que se ha encontrado que algunas conotoxinas de la superfamilia T (tx5a/ε-TxIX, ver pág. 8) producen espasticidad (modo de andar irregular o intermitente) en ratones, se decidió evaluar el efecto de las conotoxinas T putativas más abundantes (PI y PIIB) de *C. spurius* sobre la coordinación motora en ratas, administrándolas por las vías intracerebroventricular e intravenosa.

IV.B.1 - VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

IV.B.1.a - VÍA INTRACEREBROVENTRICULAR

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 280 a 310 g de peso, las cuales fueron mantenidas en condiciones de temperatura y luz controladas (23 °C +/- 1 °C con

un ciclo luz oscuridad 12:12), con agua y alimento *ad libitum*. Se formaron 6 grupos experimentales: 2 grupos controles (DMSO 10% (vehículo de inyección) y solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%, SSF) y 4 grupos con tratamiento (Fracción V disuelta en DMSO al 10% (FV, 6.8 µg/15 µL), Fracción 25Sr disuelta en DMSO al 10% (F25Sr, 6.8 µg/15 µL), péptido P1 (disuelto en DMSO 10%, 1.2 nmoI/15 µL), péptido IIB disuelto en NaCl al 9% (250 pmoI/15 µL, día 1; 1.2 nmoI/15 µL, día 2). Cada animal fue inyectado con 15 µL de la muestra correspondiente a su grupo.

IV.B.1.a.1 - IMPLANTACIÓN DE LA CÁNULA

Los animales fueron anestesiados con una dosis 7:3 de ketamina y rompum (40 mg/kg de peso) vía intraperitoneal (i.p). Una vez anestesiado, el animal se colocó en un aparato estereotáxico para realizar el implante, el cual se logra haciendo un trépano del lado izquierdo del cráneo del animal siguiendo las siguientes coordenadas: antero-posterior 8.6 mm, lateral 1.25 mm, altura 6.5 mm, línea interaural (Paxinos y Watson, 1982). La cánula se fijó en el cráneo por medio del pegamento "Super bond" y acrílico dental; después de la implantación los animales fueron sometidos a un periodo de recuperación de por lo menos tres días hasta una semana antes de las inyecciones.

IV.B.1.a.2 - INYECCIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR

Las ratas eran inmovilizadas de manera tal que no se movieran al momento de la inyección. La inyección de las fracciones V y 25sr así como de los péptidos PI y IIB, fue llevada acabo con una jeringa Hamilton de 25 µL; con ayuda de un catéter de 1.4 cm de longiotud, la aguja fue conectada con la cánula e inyectadose lentamente la muestra respectiva. Enseguida los animales eran depositados en sus cajas y dejados ahí por los periodos establecidos para la evaluación del efecto de cada una de las fracciones y péptidos puros inyectados (9, 30 60 y 120 minutos); a cada tiempo después de la realización de la prueba de locomoción, cada uno de los animales era colocado igualmente en su caja hasta finalizar las pruebas y entonces transportado al bioterio.

IV.B.1.b - VÍA INTRAVENOSA

Se formaron tres grupos: dos grupos controles (DMSO 10% (vehículo de inyección), SSF, y un grupo con tratamiento (FV, 6.8µg/15 µL).

IV.B.1.b.1 - INYECCIONES INTRAVENOSAS

Las ratas fueron inmovilizadas en una trampa donde quedaba expuesta la cola para su fácil manipulación e inyectadas en la vena caudal, estos animales fueron evaluados y sacrificados como los animales inyectados i.c.v (ver abajo).

IV.B.2 - EVALUACIÓN DEL EFECTO SOBRE LA COORDINACIÓN MOTORA

El parámetro que se evaluó para analizar el posible efecto de las conotoxinas PI y IIB así como de las dos fracciones FV y F25Sr, fue la ejecución motora de las ratas, mediante un aparato de aceleración rotacional (Omni-Rotor Treadmill, Omnitech Electronics; Columbus, OH). El aparato consiste de un rodillo giratorio controlado por una unidad motora que permite crear un programa de diferentes fases de velocidades mediante un programa computacional. Los animales fueron manipulados en este aparato con el programa 1 de ensayo antes del primer día de inyección (Tabla 5). Una hora antes de cada inyección las ratas se sometieron a un ensayo para registrar su actividad basal y luego, a los 9, 30, 60 y 120 minutos después de cada inyección con el programa 2 (Tabla 6).

Tabla 5. Programa 1

| FASE | DURACIÓN (segundos) | VELOCIDAD (rpm) |
|------|------------------------|--------------------|
| 1 | 20 | 10 |
| 2 | 40 | 20 |
| 3 | 80 | 40 |
| 4 | 40 | 20 |
| 5 | 10 | 0 |

Tabla 6. Programa 2

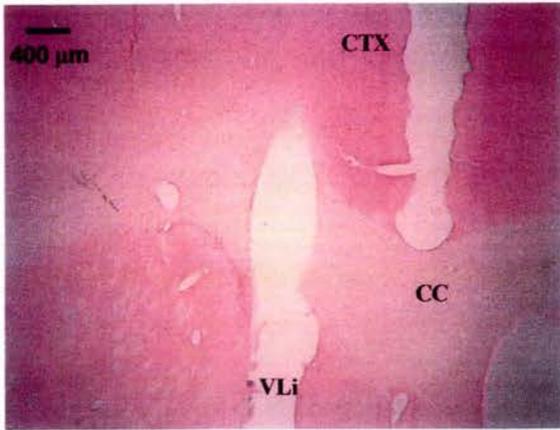
| FASE | DURACIÓN (segundos) | VELOCIDAD (rpm) |
|------|------------------------|--------------------|
| 1 | 40 | 20 |
| 2 | 80 | 40 |
| 3 | 160 | 80 |
| 4 | 80 | 40 |
| 5 | 20 | 0 |

IV.B.3 -VERIFICACIÓN DEL SITIO DE IMPLANTE DE LA CÁNULA

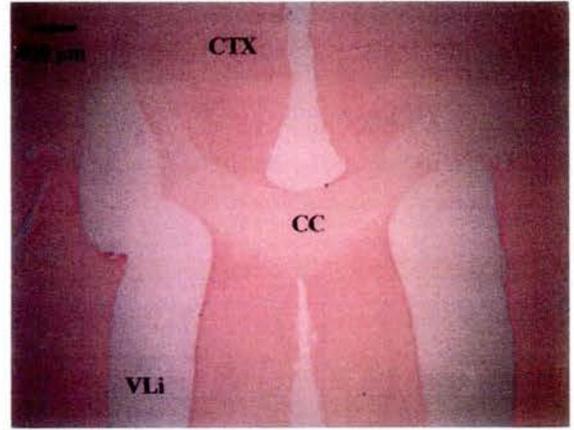
Debido a que no se observó efecto de la fracción FV (que fue la primera probada) más allá de los treinta minutos, se decidió sacrificar a los animales media hora después de la última inyección (tercer día de prueba); esto mismo se hizo con todos los experimentos en que se usó esta vía de administración. Los animales tratados con la fracción FV fueron perfundidos vía intracardíaca con SSF y paraformaldehído al 4%; los cerebros fueron mantenidos en el fijador durante una hora y después fueron almacenados en refrigeración en una solución de sacarosa al 16%. Para el caso de los demás animales tratados, los cerebros fueron fijados con formol al 10% en agua y dejados al menos dos días y posteriormente se pasaron a sacarosa al 30%. La confirmación del sitio de implante fue hecha mediante cortes histológicos coronales de 40 micras de espesor en un microtomo de congelación (el cerebro se colocó en posición postero-anterior identificando cada lado por una muesca a lo largo del hemisferio derecho). Los cortes se colectaron en solución amortiguadora 0.1 M de fosfatos pH 7.4 y fueron almacenados en la misma a 4 °C hasta ser montados (portaobjetos gelatinizados); después fueron contrateñidos con safranina al 0.1% por 30 segundos y fijados con una resina sintética (Entellan, medio de inclusión rápida para microscopía que contiene Xileno) después de la deshidratación de los cortes con un tren de alcoholes (70%, 95% 100% y xilol). Para los análisis estadísticos se tomaron en cuenta sólo los animales con la cánula en ventrículo izquierdo (figura 4).

IV.B.3 - ANÁLISIS ESTADÍSTICO

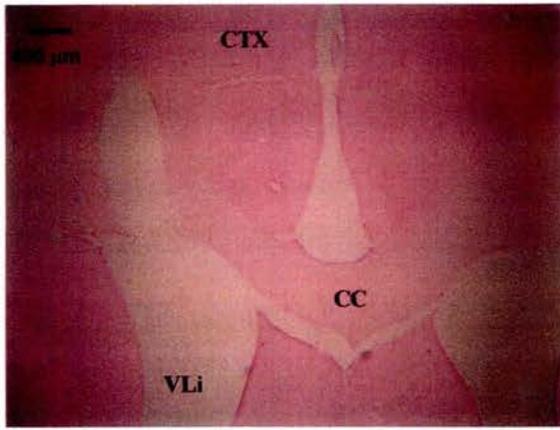
Las diferencias entre los grupos fueron analizadas mediante un análisis de varianza de dos vías para medidas repetidas seguido de la prueba post-hoc de Student Newman-Keuls. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando la probabilidad de que éstas fueran cero, fue menor al 5%.



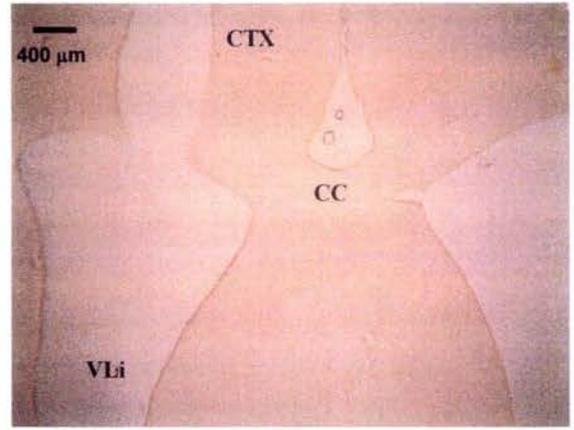
SALINA



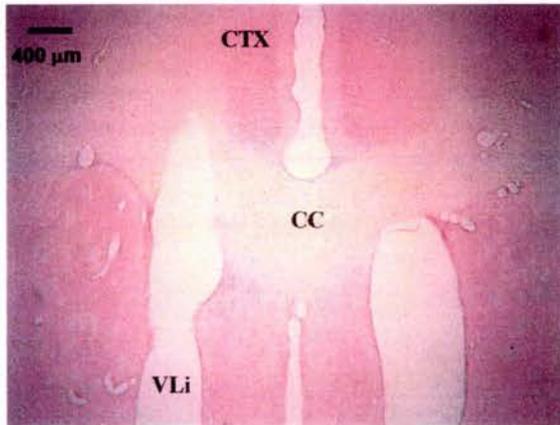
DMSO 10%



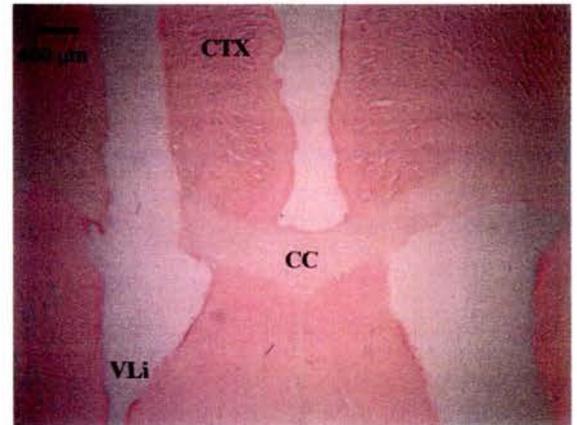
PI



IIB



FRACCIÓN V



FRACCIÓN 25sr

Figura 4 . En estas microfotografías se muestran un ejemplo (por grupo de animales) de la confirmación del sitio de implante de la cánula es decir el ventrículo lateral izquierdo (Vli), señalando algunas de las áreas o regiones cerebrales cercanas a este sitio: CTX (corteza) y CC (cuerpo calloso).

RESULTADOS

I. PURIFICACIÓN DE CUATRO T CONOTOXINAS

Se logró purificar a las cuatro conotoxinas T putativas a partir de varias fracciones semipurificadas del extracto crudo del veneno (estableciéndose los gradientes de purificación con base a sus tiempos de elución); se mezclaron varias de las fracciones o péptidos puros en una sola muestra para tener alrededor de 10 nmoles o más (en el caso de los péptidos PII y PIII la recuperación era insuficiente, de menos de 1 nmol, como se puede ver en las Figuras 7 y 8) y poder hacer los diferentes ensayos tanto químicos como biológicos. Se decidió sólo trabajar con los péptidos PIIB y PI para los ensayos biológicos debido a: 1) que son de los que se tenía más muestra, y 2) el interés de comparar la actividad biológica de dos conopéptidos con características estructurales similares (el patrón de cisteínas, que las clasifica dentro de la superfamilia de las T conotoxinas) pero con características químicas diferentes, en particular su hidrofobicidad, siendo el péptido PIIB hidrofílico y el PI hidrofóbico (Figura 3).

En las purificaciones se observa claramente la presencia de un pico mayoritario (mayor absorbencia a 220 nm) , identificado como el correspondiente péptido puro, en relación, a su tiempo de elución de acuerdo con el gradiente establecido para dicha purificación (Figuras 5-8); la pureza fue también corroborada por la secuencia del péptido, donde pudimos observar con cada ciclo de la reacción, la correspondencia a un solo péptido.

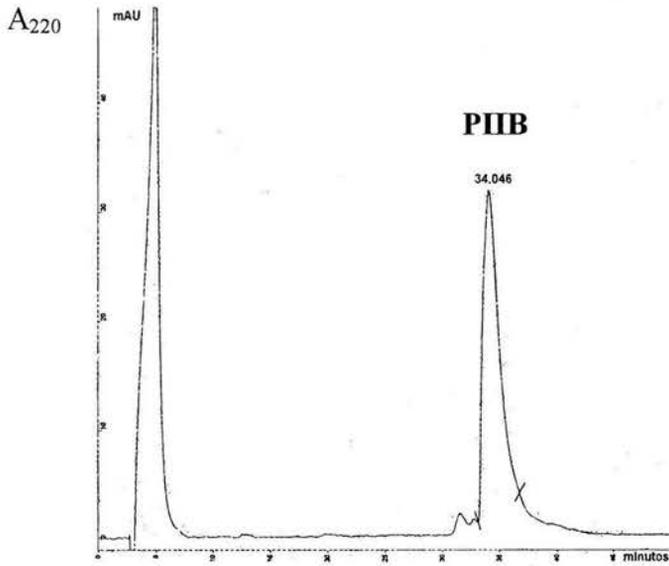


Figura 5. Cromatograma representativo de varias fracciones purificadas del péptido PIIIB, hecho en una columna C-18, con un gradiente de de elución de solución B (MeCN 90, 0.085 % TFA) de 22-30 % en 80 minutos. Se muestran los sitios de corte de recolección (barras transversales) y tiempos de elución (minutos).

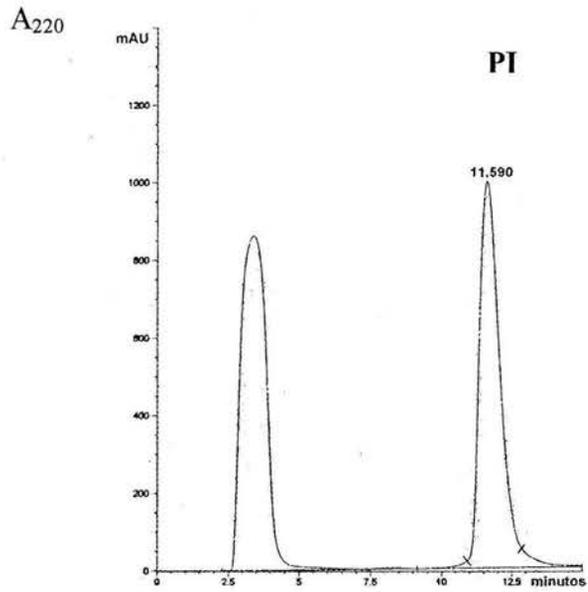


Figura 6. Cromatograma representativo de varias fracciones purificadas del péptido PI, hecho en una columna C-18, con un gradiente de elución de solución B (MeCN 90, 0.085 % TFA) de 45-50 % en 15 minutos. Se muestran los sitios de corte de recolección (barras transversales) y tiempos de elución (minutos).

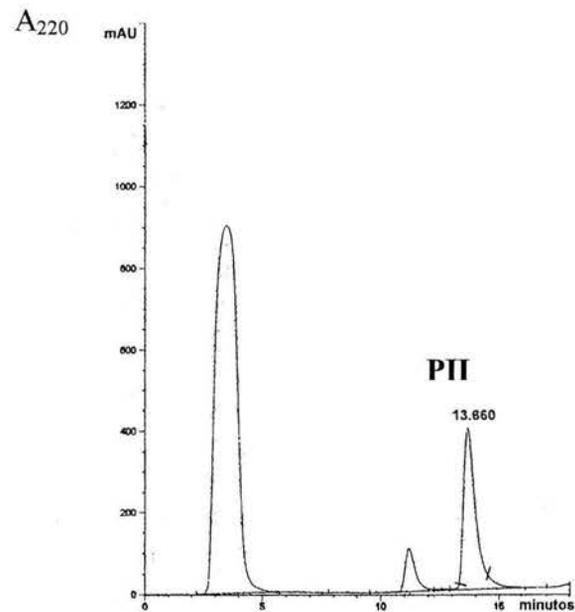


Figura 7. Cromatograma representativo de varias fracciones purificadas del péptido PII, hecho en una columna C-18, con un gradiente de de elución de solución B (MeCN 90, 0.085 % TFA) de 45-50 % en 15 minutos. Se muestran los sitios de corte de recolección (barras transversales) y tiempos de elución (minutos).

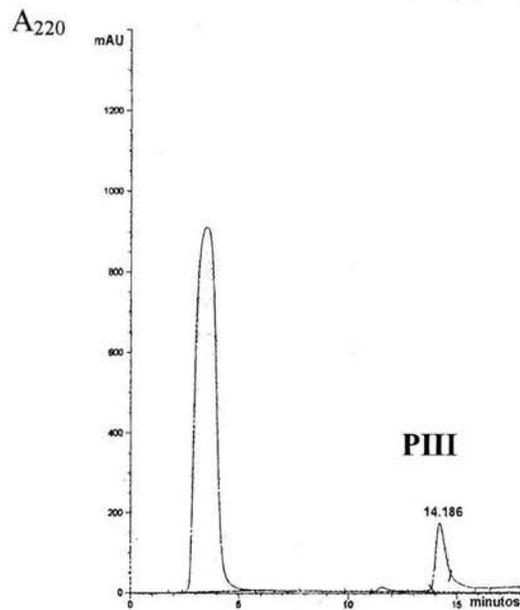


Figura 8. Cromatograma representativo de varias fracciones purificadas del péptido PIII, hecho en una columna C-18, con un gradiente de de elución de solución B (MeCN 90, 0.085 % TFA) de 45-50 % en 15 minutos. Se muestran los sitios de corte de recolección (barras transversales) y tiempos de elución (minutos).

II. COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS

Las secuencias de los péptidos PIII y PIIB se confirmaron mediante el análisis de la composición de aminoácidos, así como la de los péptidos PI y PII. Dado que la secuencia de estos dos últimos había sido ya determinada por secuenciación, su análisis permitió usarlos como patrones. Se usó la técnica de hidrólisis ácida y la derivación de los residuos de aminoácidos a PTC-aminoácidos con su posterior separación y cuantificación por HPLC, usando para esto aproximadamente 1 nmol de cada péptido. Las muestras de PTC-aminoácidos generalmente se disolvieron con 60 μ L de agua y se hicieron tres repeticiones con inyecciones de 20 μ L.

Para cada péptido (patrón o problema) se promediaron los valores del área bajo la curva de las tres repeticiones (para cada uno de los distintos aminoácidos) para los cálculos cuantitativos. La cantidad (en pmoles) de cada aminoácido en cada péptido (patrón o problema) se calculó con base en los valores de área bajo la curva de los aminoácidos del patrón de aminoácidos hidrolizado. Luego, se calculó el cociente molar, tomando como unidad a la Fenilalanina, en los casos de los péptidos patrón PI y PII y de los péptidos problema PIIB y PIII, y a la Arginina en el caso de la proteína patrón (cadena B de insulina, oxidada) (Figura 12 y Tabla 6). Debido a las condiciones empleadas durante la hidrólisis ácida, los residuos de Cisteína y Triptofano fueron destruidos (Tabla 6).

La determinación de la composición de aminoácidos de los péptidos PIIB y PIII confirmó las hipótesis acerca de sus estructuras, es decir, que el péptido PIIB tiene un residuo más de Arginina (con respecto a lo observado durante la secuenciación del péptido intacto) y que en el péptido PIII el residuo de masa 113.1-113.2 es Leucina, y no Isoleucina ni Hidroxiprolina.

Sin embargo, a pesar de este resultado satisfactorio, se observaron algunas anomalías aparentes. En los casos de los péptidos PI, PII y PIII, el contenido de Isoleucina resultó inferior al encontrado por secuenciación (3 residuos por molécula); este resultado no es inesperado ya que se sabe que los enlaces Ile-Ile son más resistentes que otros a la hidrólisis ácida, y dichos péptidos contienen la secuencia Ile-Ile; la diferencia en los valores encontrados para PI por un lado y para PII y PIII por el otro, sugiere alguna diferencia estructural (ver Discusión).

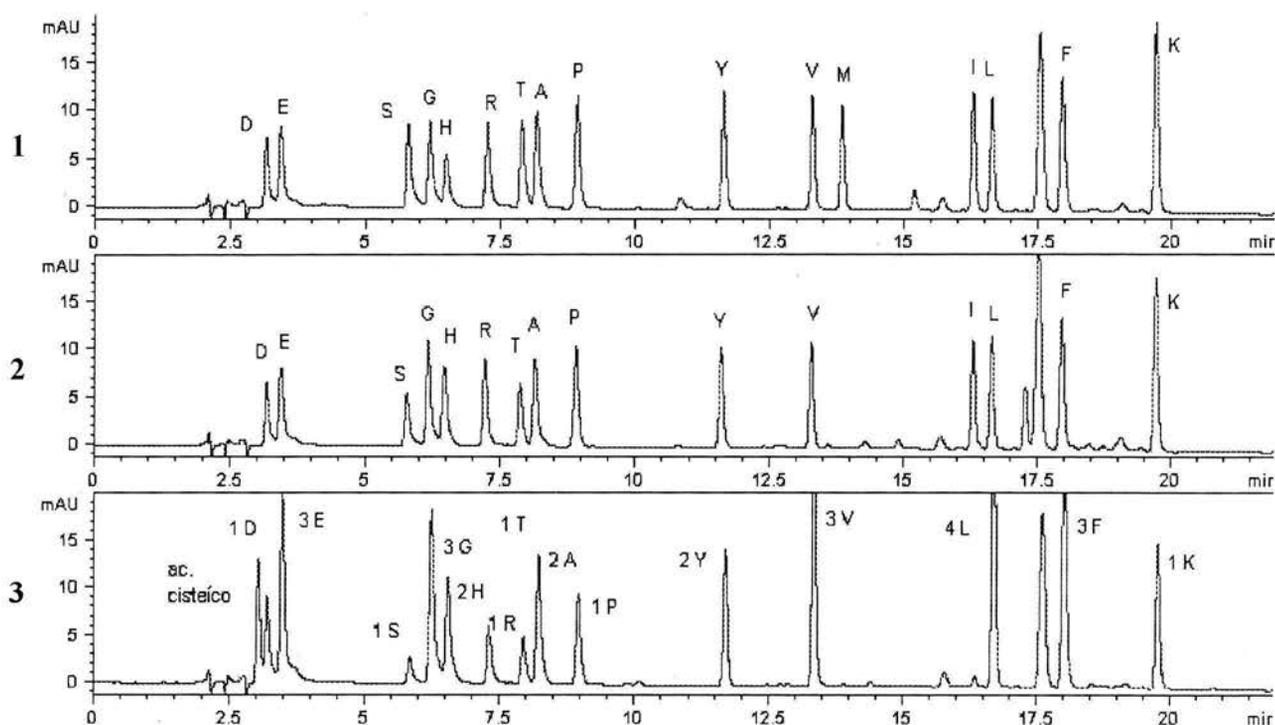


Figura 12. Cromatogramas de PTC-aminoácidos: 1) patrón de PTC-aminoácidos bajo condiciones de no hidrólisis (125 pmol); 2) patrón de PTC -aminoácidos bajo condiciones de hidrólisis (125 pmol), utilizados como estándares en los análisis de la proteína patrón (cadena B de insulina oxidada) y de las cuatro conotoxinas estudiadas; y 3) cromatograma que muestra la composición de aminoácidos (PTC-aminoácidos) de la cadena B de insulina (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA, 112 pmol), extrapolados con base en el área de los PTC-aminoácidos estándares hidrolizados. El ácido cisteico mostrado en el cromatograma 3 de la cadena B de la insulina, representa los residuos de cisteína. No se muestran los residuos de aminoácidos como el triptofano que no se pueden detectar mediante esta técnica (ya que se degrada por las condiciones de hidrólisis). La glutamina se detecta como ácido glutámico y la asparagina como ácido aspártico. Claves de los residuos de aminoácidos. G (glicina), A (alanina), V (valina), L (leucina), I (isoleucina), S (serina), T (treonina), M (metionina), P (prolina), F (fenilalanina), Y (tirosina), H (histidina), K (lisina), R (arginina), D (ácido aspártico), E (ácido glutámico).

Los valores elevados de Alanina y Prolina en el péptido PIIB pudieron deberse a contaminación de la muestra con aminoácidos del ambiente.

Tabla 6. Datos experimentales de la composición de aminoácidos de las cuatro conotoxinas analizadas; los valores redondeados de los cocientes molares se indican entre paréntesis. Debido a las condiciones de hidrólisis, los residuos de Cisteína (C) y Triptofano (W) no fueron determinados (n.d.) en este análisis.

| Residuos por molécula (normalizados con respecto a F) | | | | | | | | |
|--|-----------|-----|------------|-----|-------------|-----|-------------|------|
| Aminoácido | PI | | PII | | PIII | | PIIB | |
| D | 0.86 | (1) | 1.09 | (1) | 0.83 | (1) | | |
| E | 0.81 | (1) | 1.07 | (1) | 0.94 | (1) | | |
| G | | | | | | | 1.33 | (1) |
| R | | | | | | | 2.11 | (2) |
| A | | | | | | | 1.91 | (2) |
| P | | | | | | | 1.69 | (2) |
| Y | 0.55 | (1) | 0.71 | (1) | 0.81 | (1) | 1.95 | (2) |
| I | 1.09 | (1) | 2.40 | (2) | 2.28 | (2) | | |
| L | 0.78 | (1) | 1.09 | (1) | 1.81 | (2) | 1.19 | (1) |
| C | n.d. | | n.d. | | n.d. | | n.d. | |
| W | n.d. | | n.d. | | n.d. | | n.d. | |
| F | 1.00 | (1) | 1.00 | (1) | 1.00 | (1) | 1.00 | (1) |
| TOTAL | | (6) | | (7) | | (8) | | (11) |

| | | |
|-------------|-------------------------|--|
| PI | IINWCCLIFYQCC * | 1617 masa calculada 1616.6 masa experimental |
| PII | IINWCCLIFYQCC * | 1617 masa calculada 1616.6 masa experimental |
| PIII | IINWCCLIFYQCCL * | 1730.2 masa calculada 1729.7 masa experimental |
| PIIB | AGCCPRFYCCLR * | 1549.9 masa calculada 1548.6 masa experimental |

III. ESTRUCTURA PRIMARIA

La determinación de la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de los péptidos purificados fue el siguiente paso para su caracterización química, empezando por la secuenciación de cada péptido (1 nmol de muestra) mediante el método de secuenciación de proteínas de Edman. Se utilizó la técnica de reducción y alquilación (marcaje) con 4-vinilpiridina, para la observación de la posición de los residuos de cisteínas en la secuencia lineal de cada péptido y obtener así las secuenciadas completas. De esta manera, se logró corroborar las estructuras primarias de dichos péptidos y el patrón de cisteínas en la secuencia, que evidencia su clasificación dentro de la superfamilia de conotoxinas T (ver figuras 9-12).

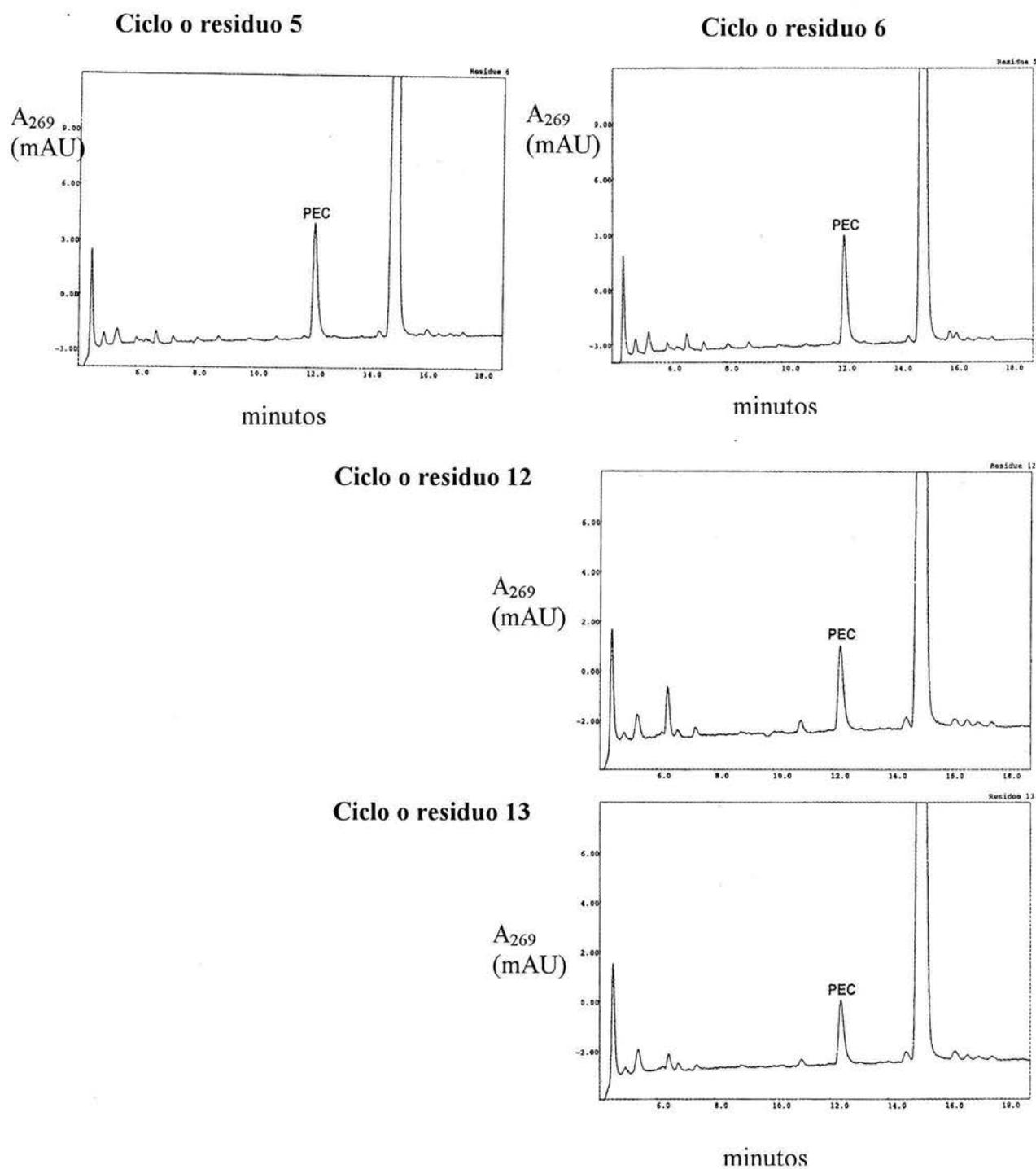


Figura 9. Cromatogramas donde se muestran sólo los ciclos de secuenciación correspondientes a los residuos de cisteínas en la estructura primaria (IINWCCLIFYQCC) de la conotoxina PI. El péptido nativo fue totalmente reducido y sus cisteínas marcadas con 4-vinilpiridina (agente alquilante), para que pudieran ser detectadas como PTH-piridileticisteínas (PTH-PEC), mostrando el patrón de estos residuos en el péptido.

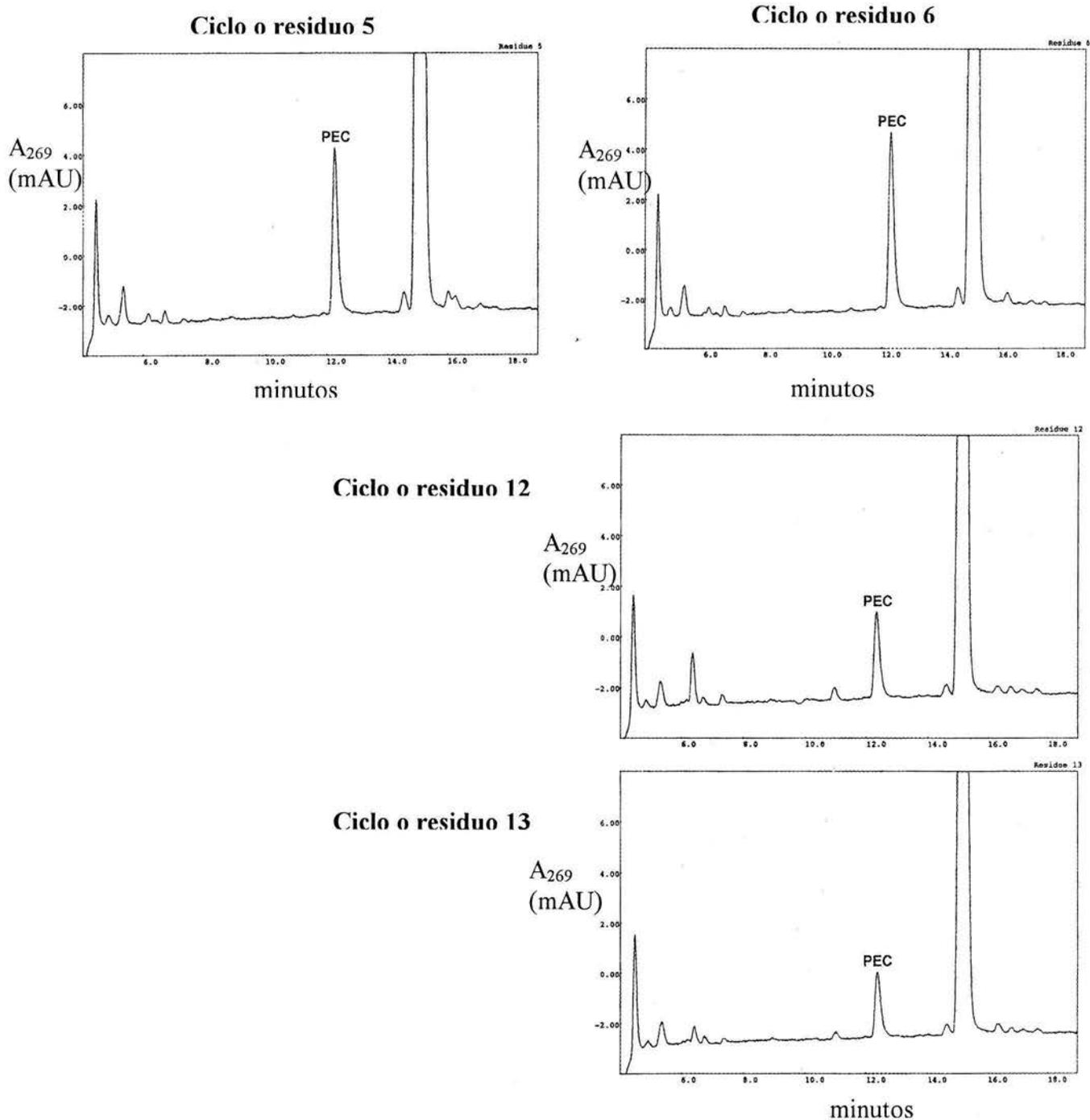


Figura 10. Cromatogramas donde se muestran sólo los ciclos de secuenciación correspondientes a los residuos de cisteínas en la estructura primaria (IINWCCLIFYQCC) de la conotoxina PII. El péptido nativo fue totalmente reducido y sus cisteínas marcadas con 4-vinilpiridina (agente alquilante), para que pudieran ser detectadas como PTH-piridiletilcisteínas (PTH-PEC), mostrando el patrón de estos residuos en el péptido.

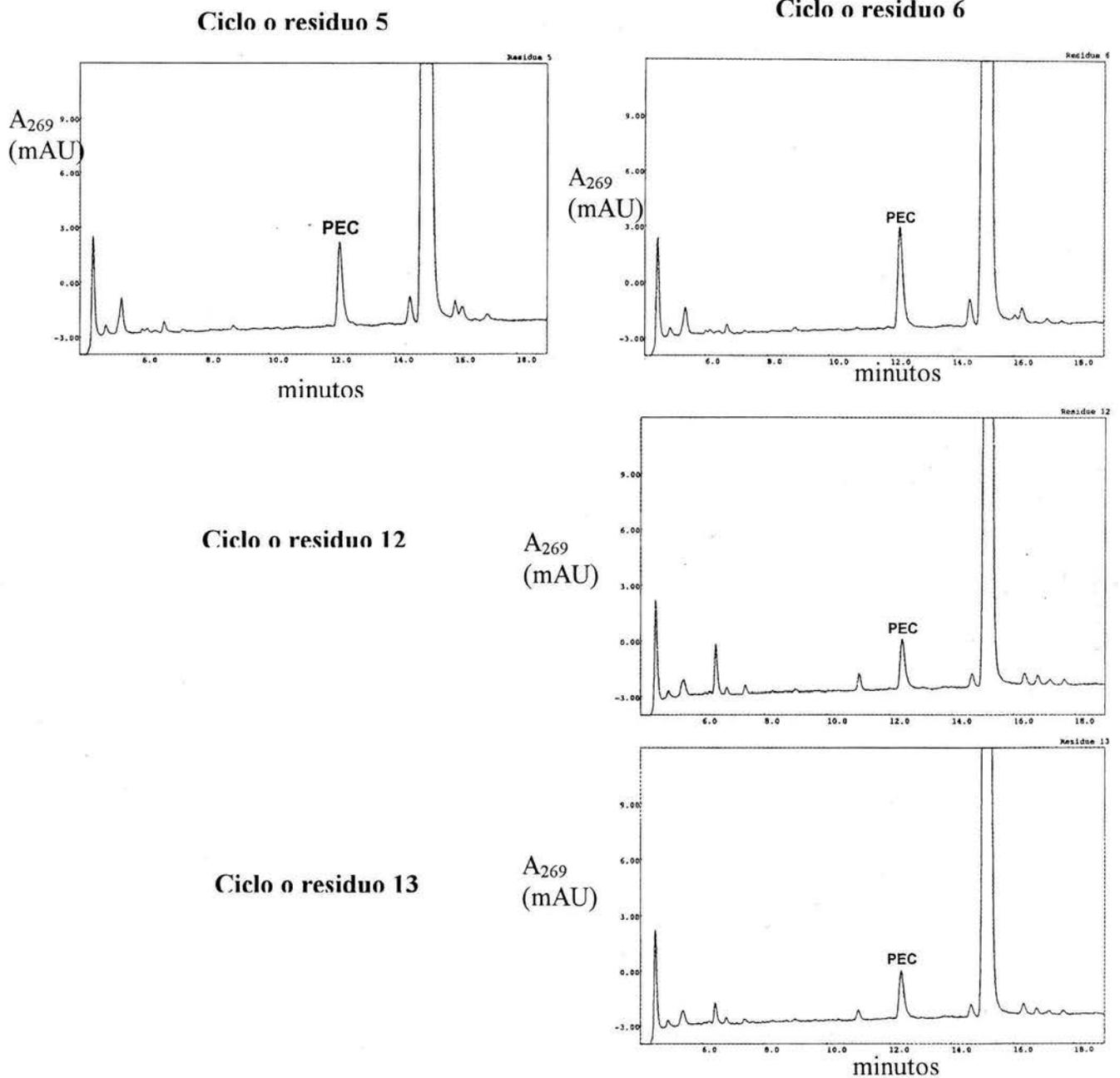


Figura 11. Cromatogramas donde se muestran sólo los ciclos de secuenciación correspondientes a los residuos de cisteínas en la estructura primaria (IINWCCLIFYQCCL) de la conotoxina PIII. El péptido nativo fue totalmente reducido y sus cisteínas marcadas con 4-vinilpiridina (agente alquilante), para que pudieran ser detectadas como PTH-piridiletilelcisteínas (PTH-PEC), mostrando el patrón de estos residuos en el péptido.

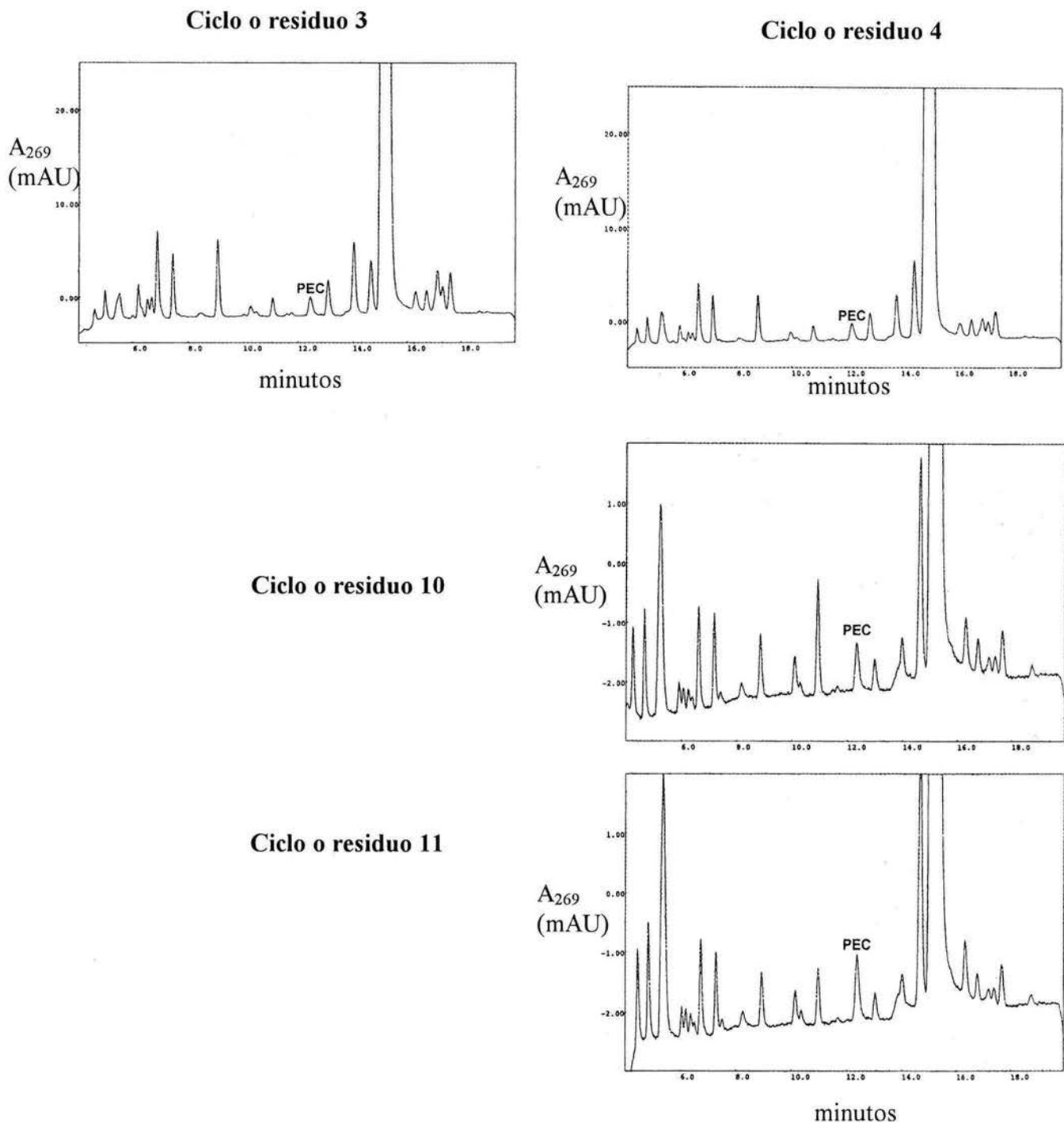


Figura 12. Cromatogramas donde se muestran solo los ciclos de secuenciación correspondientes a los residuos de cisteínas en la estructura primaria (AGCCPRFYCCLR) de la conotoxina PIIB. El péptido nativo fue totalmente reducido y sus cisteínas marcadas con 4-vinilpiridina (agente alquilante), para que pudieran ser detectadas como PTH-piridileticisteínas (PTH-PEC), mostrando el patrón de estos residuos en el péptido.

IV. ARREGLO DE LOS PUENTES DISULFURO

Un punto importante en la caracterización estructural de las conotoxinas es la determinación del arreglo de los puentes disulfuro entre sus residuos de cisteínas. Para esto se sometieron cada uno de los péptidos a una reducción parcial y alquilación con N-etilmaleimida dándonos un derivado de las cisteínas libres denominado N-etilsucinimidocisteínas. Con 20 nmoles del péptido PI se lograron obtener 5 especies derivadas del péptido nativo (D1-D5) los cuales mostraron un incremento en su tiempos de retención como se puede ver en la Figura 13, en comparación con el tiempo de retención del péptido nativo o sin la modificación de sus puentes disulfuro; cada una de estas especies o derivados del PI representa algunas de las modificaciones del péptido debidas a la reducción parcial y alquilación (reducción de uno u otro de los dos puentes disulfuro y la marcación con NEM, de los respectivos residuos de cisteínas reducidos o libres). Cada uno de los derivados obtenidos fueron sometidos a un segundo procesamiento de reducción (total) y alquilación, para la doble corroboración del arreglo de los puentes. Como fue ya mencionado, teóricamente con la reducción parcial logramos romper o reducir uno de los dos puentes; entonces era necesario romper el otro puente y marcar los residuos de cisteínas involucrados en éste segundo puente con 4-vinilpiridina, para diferenciarlos de los marcados con NEM. Posteriormente se purificaron por HPLC y se secuenciaron por separado. Al obtener las secuencias completas de cada derivado se determinó que la organización de los puentes es la siguiente: C₁-C₃, C₂-C₄ (Figura 14).

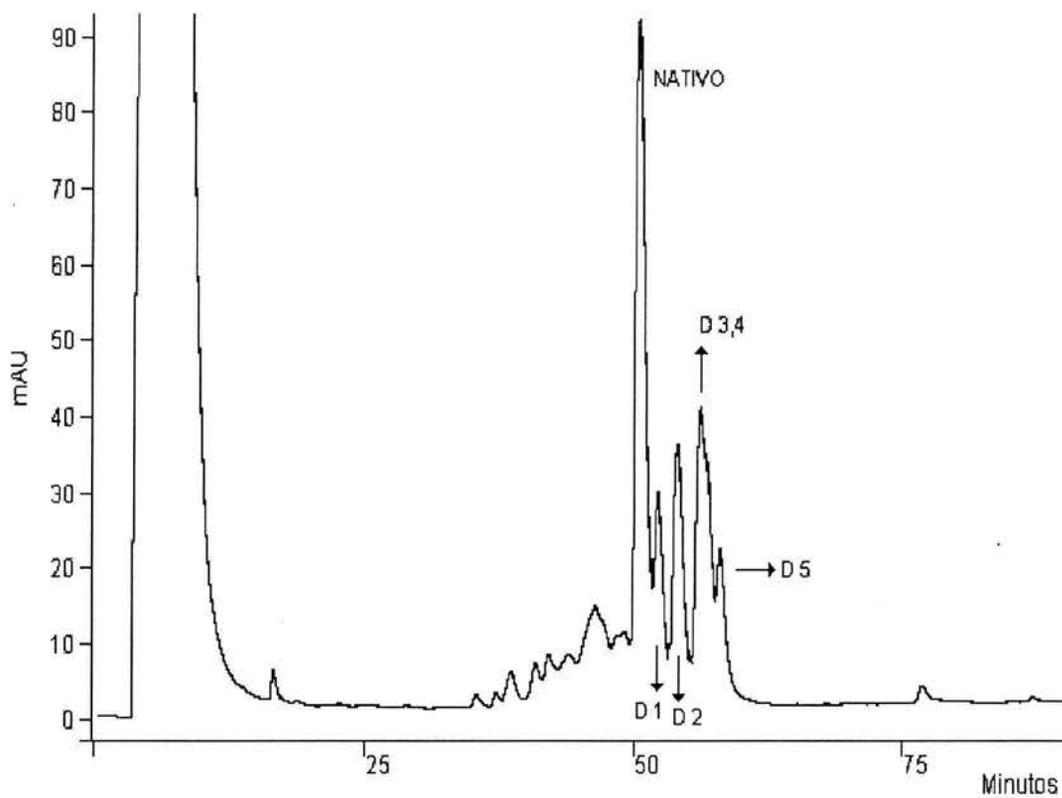
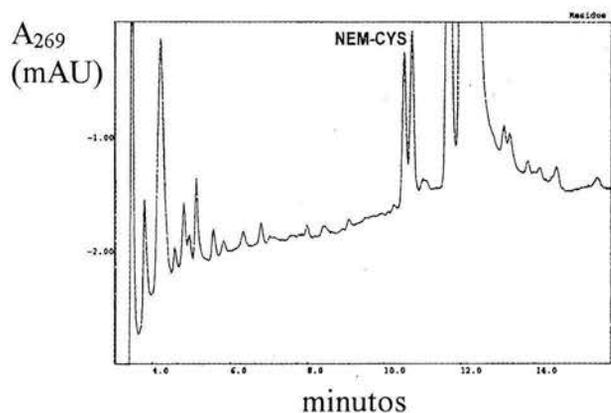
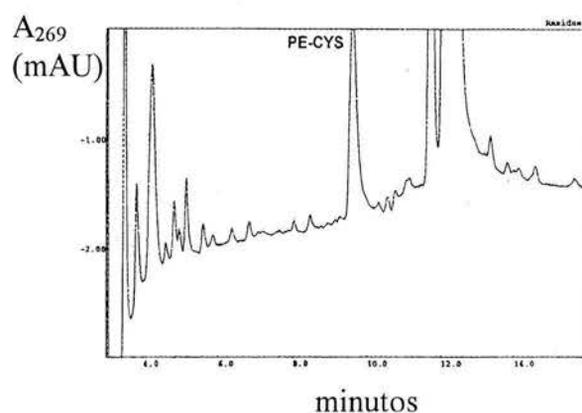


Figura 13. Cromatograma de la reducción parcial y alquilación con N-etilmaleimida (NEM) del péptido PI, donde se señalan los derivados obtenidos (D1-D5), que fueron posteriormente reducidos totalmente, alquilados con 4-vinilpiridina, purificados (HPLC) y secuenciados. Se señala también la fracción correspondiente al péptido nativo (sin reducción de sus puentes disulfuro).

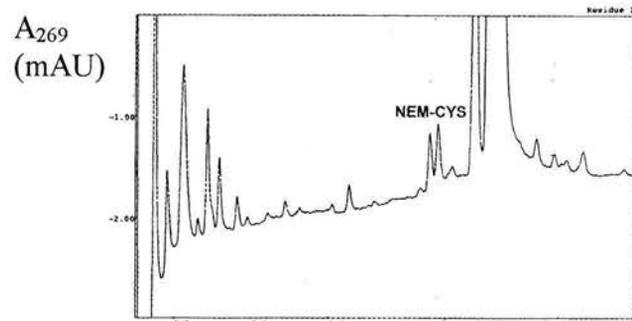
Residuo 5 (cisteína 1)



Residuo 6 (cisteína 2)



Residuo 12 (cisteína 3)



Residuo 13 (cisteína 4)

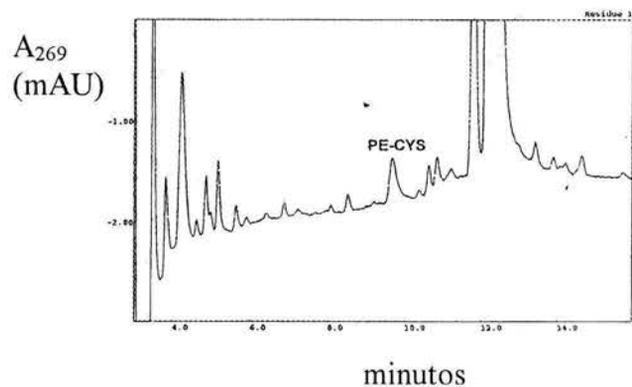


Figura 14. Cromatogramas de los ciclos de secuenciación por el método de Edman correspondientes a las cisteínas modificadas del derivado D3 del péptido I, después de su purificación por HPLC. Se muestra así que el arreglo de los puentes disulfuro es, uno entre la Cys 1 y la Cys 3 y el otro entre la Cys 2 y la Cys 4. Los derivados de las cisteínas son nombrados con claves dadas por el marcador que se usó para su alquilación: PE-CYS = cisteínas marcadas con 4-vinilpiridina, NEM-CYS = cisteínas marcadas con N-etilmaleimida.

La conotoxina PII (12 nmoles de muestra) fue igualmente sometida a una reducción parcial de cuya reacción se obtuvieron 5 derivados o especies del péptido nativo (Figura 15); la mayor parte de la muestra del péptido no sufrió cambio o reducción ante las condiciones experimentales como en el caso del péptido PI. Sin embargo, la cantidad de muestra obtenida de los derivados fue suficiente para realizar una reducción total y doble alquilación. Los resultados, con los que se concluye que el arreglo de los puentes de este péptido es el mismo que el del péptido PI, son mostrados en la Figura 16.

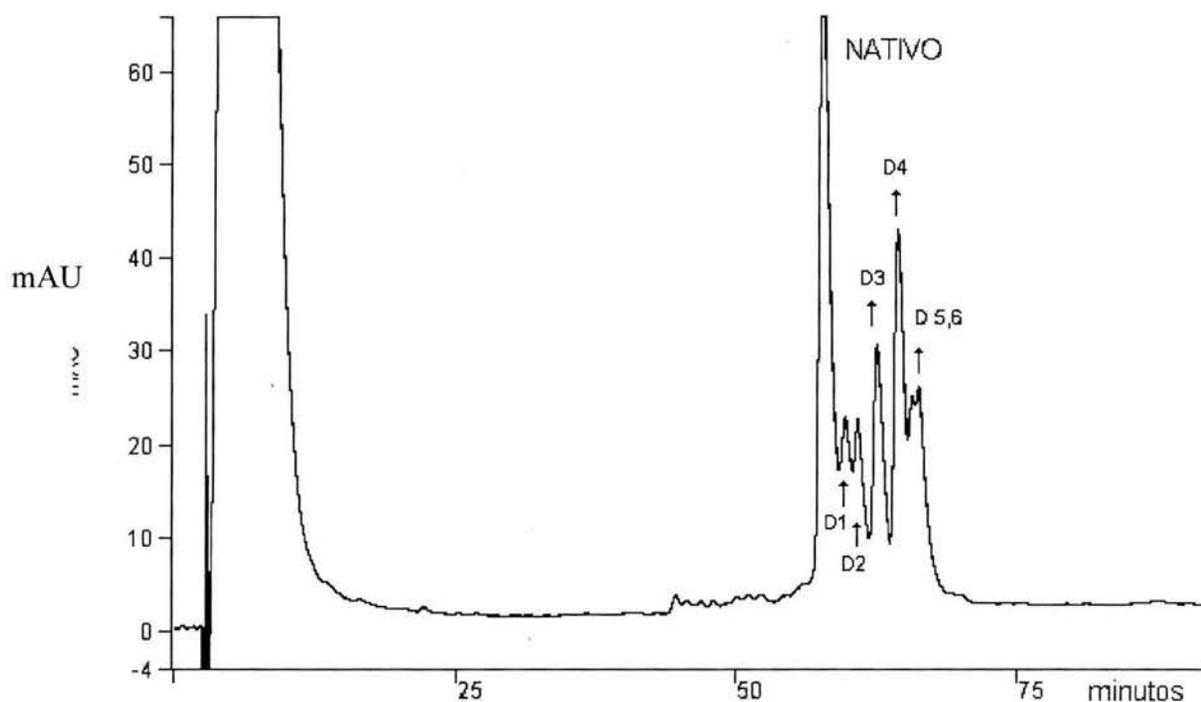
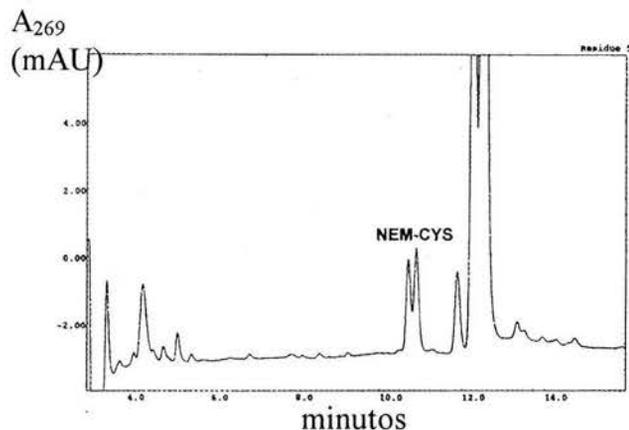
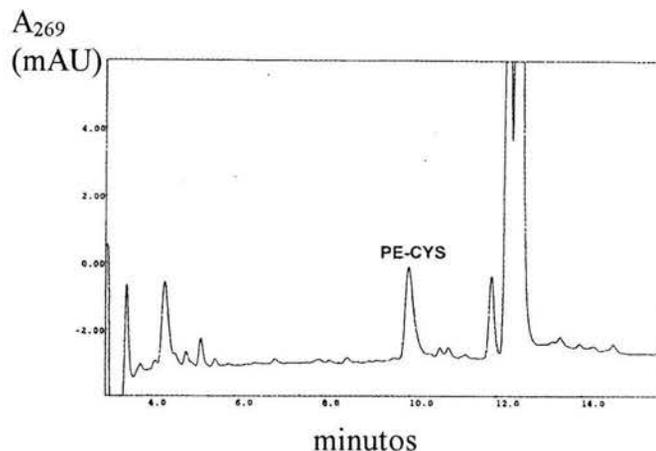


Figura 15. Cromatograma de la reducción parcial y alquilación con N-etilmaleimida (NEM) del péptido PII, donde se señalan los derivados obtenidos (D1-D6), que fueron posteriormente reducidos totalmente, alquilados con 4-vinilpiridina, purificados (HPLC) y secuenciados. Se señala también la fracción correspondiente al péptido nativo (sin reducción de sus puentes disulfuro).

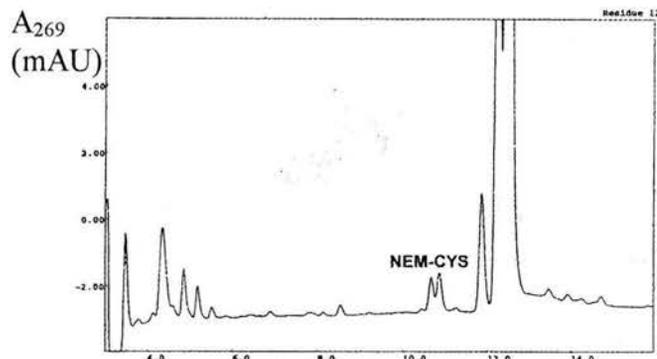
Residuo 5 (cisteína 1)



Residuo 6 (cisteína 2)



Residuo 12 (cisteína 3)



Residuo 13 (cisteína 4)

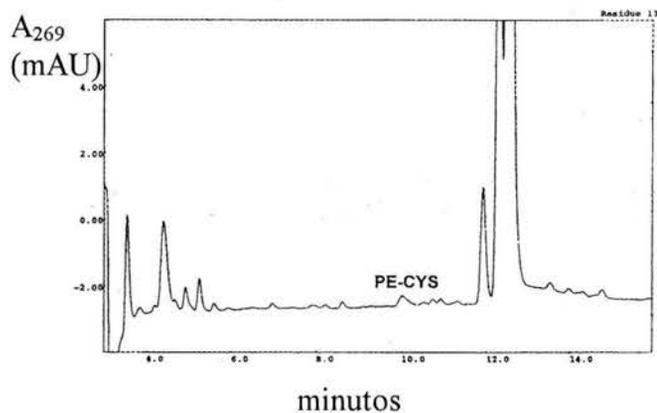


Figura 16. Cromatogramas de los ciclos de secuenciación por el método de Edman, correspondientes a las cisteínas modificadas del derivado D4 del péptido PII, después de su purificación por HPLC. Se muestra así que el arreglo de los puentes disulfuro es entre la Cys 1 y la Cys 3 y el otro entre la Cys 2 y la Cys 4. Los derivados de las cisteínas son nombrados con claves dadas por el marcador que se usó para su alquilación: PE-CYS = cisteínas marcadas con 4-vinilpiridina, NEM-CYS = cisteínas marcadas con N-etilmaleimida

Debido a las limitaciones en la cantidad de la muestra obtenida después de la purificación del péptido PIII (1.5 nmoles), solamente se le realizó una reducción parcial y alquilación con N-etilmaleimida; de este proceso se obtuvieron dos derivados (D1, D2) del péptido nativo. A pesar de que las condiciones experimentales de reducción y alquilación fueron similares a las empleadas para los péptidos PI y PII, en el caso del péptido PIII los productos o derivados obtenidos fueron sólo dos (Figura 17). Es posible que, teniendo este péptido un aminoácido más con respecto a los péptidos PI y PII, su tamaño influya en la accesibilidad del TCEP (reactivo reductor) a los puentes. También es posible que la menor cantidad (y por lo tanto, menor concentración) de muestra usada en este caso haya influido en el grado de reacción. En la Figura 18 se muestra que la organización o arreglo de los puentes es el mismo que el de los dos anteriores péptidos (C1-C3, C2-C4).

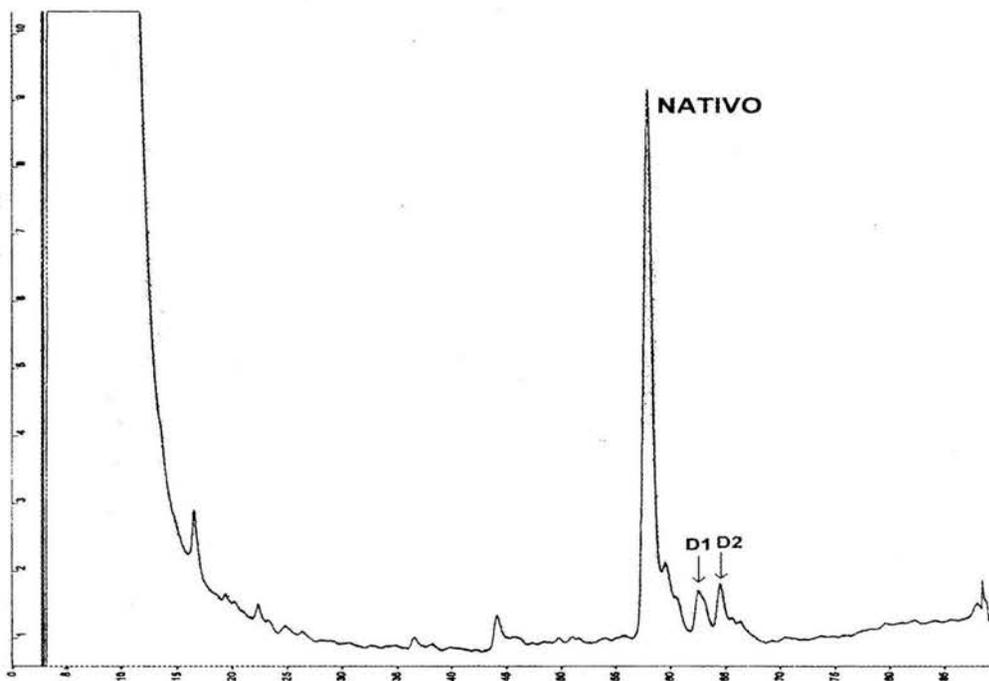
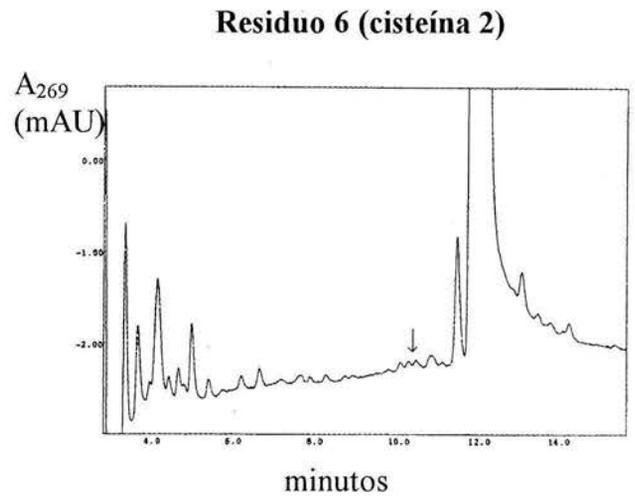
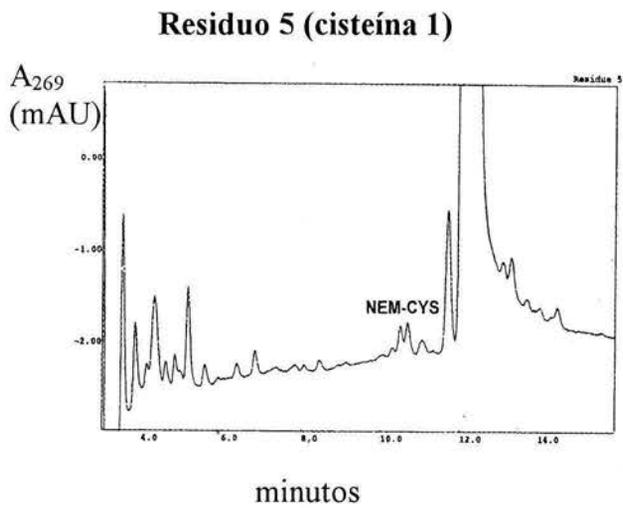
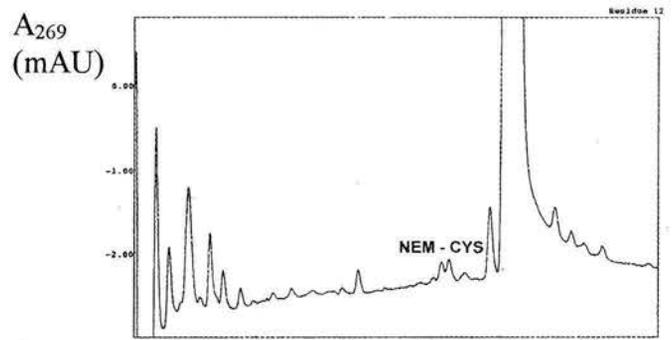


Figura 17. Cromatograma de la reducción parcial del PII y alquilación con N-etilmaleimida (NEM), donde se señalan los derivados obtenidos (D1, D2), que fueron posteriormente reducidos totalmente, alquilados con 4-vinilpiridina, purificados (HPLC) y secuenciados. Se señala también la fracción correspondiente al péptido nativo (sin reducción de sus puentes disulfuro).



Residuo 12 (cisteína 3)



Residuo 13 (cisteína 4)

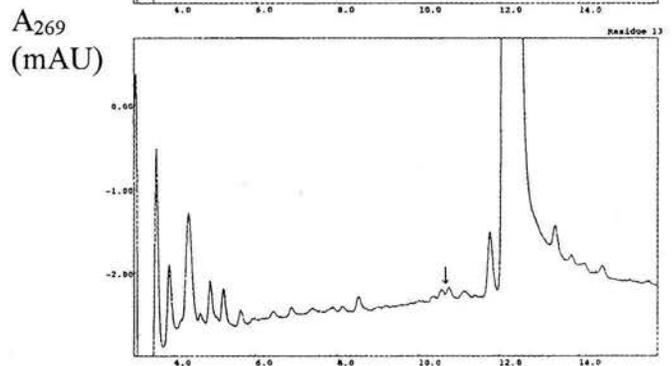


Figura 18. Cromatogramas de los ciclos de secuenciación por el método de Edman, correspondientes a las cisteínas modificadas de derivado D2 del péptido III después de su purificación por HPLC. Se muestra así que el arreglo de los puentes disulfuro es entre la Cys 1 y la Cys 3 y el otro entre la Cys 2 y la Cys 4. Los derivados de las cisteínas son nombrados con claves dadas por el marcador que se usó para su alquilación NEM-CYS = cisteínas marcadas con N-etilmaleimida. Las flechas en los ciclos 6 y 13 que corresponden a las cisteínas 2 y 4 señalan que no fueron marcadas debido a que el puente formado por ellas no fue reducido. Esto se deduce ya que no se ve en el cromatograma un aumento del marcaje que es lo que se esperaría si se hubiesen reducido y alquilado las respectivas cisteínas localizadas en esa posición de la secuencia; más bien lo que solamente se observa es la disminución del residuo detectado en el ciclo anterior.

V. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: BIOENSAYO SENSORIAL EN LA RATA

En una primera valoración no encontramos diferencias significativas en dos grupos de ratas cuando se administró el vehículo (DMSO 10%, n = 5) y el vehículo más el péptido PI (182 pmol/17 μ L, n = 4) al compararse los valores obtenidos en el umbral al dolor (presión con peso en gramos, siendo las unidades (1-25) el porcentaje correspondiente de un máximo de 250 gramos netos) con los controles (basales) de cada grupo ni tampoco al compararlos entre ellos. Los resultados no mostraron diferencias significativas de los valores obtenidos mediante las mediciones hechas en cada una de las patas posteriores de los animales (Figura 19).

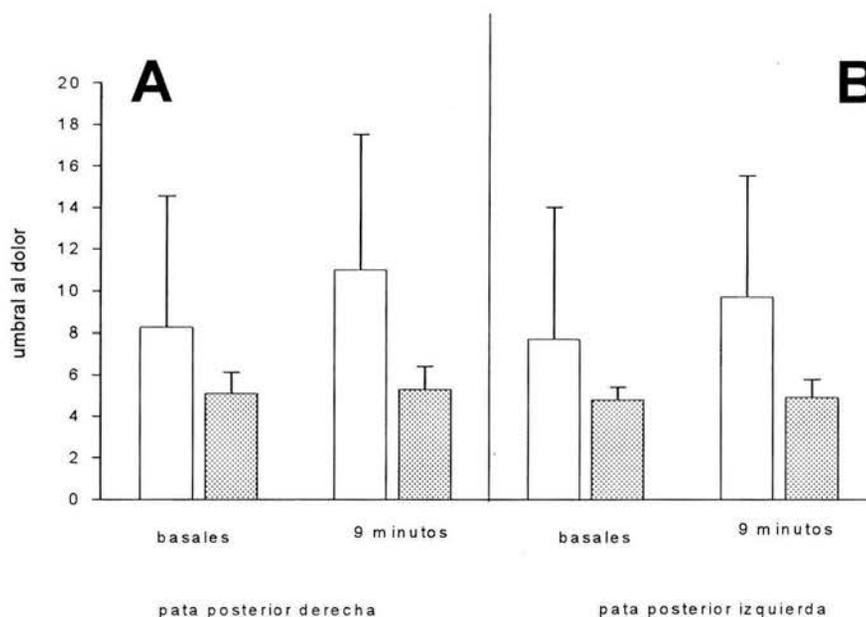


Figura 19. Histogramas del umbral al dolor antes (basales) y después (9 minutos) de la administración de DMSO 10% y DMSO 10% más péptido PI. Las barras blancas muestran los valores promedios de cada grupo antes y después de la inyección del vehículo y las barras punteadas muestran los valores promedios del umbral al dolor antes y después de la administración del vehículo y más el péptido. A) valores promedios para la pata posterior derecha; B) valores promedios para la pata posterior izquierda, con una muestra de cuatro animales (n=4).

Para comparar los valores del umbral al dolor con diferentes concentraciones tanto del vehículo de inyección como del péptido en valoración, se utilizaron dos grupos

de ratas inyectándole al primer grupo el vehículo (DMSO 8%, n = 4) y al segundo grupo el vehículo conteniendo el péptido PI (336 pmol / 16µL, n = 5). Los resultados obtenidos no mostraron cambios significativos con la administración del péptido I, no obstante el grupo al que se le inyectó el vehículo más el péptido se valoró en una segunda ocasión (cuatro días después de la primera administración del péptido, Figura 20).

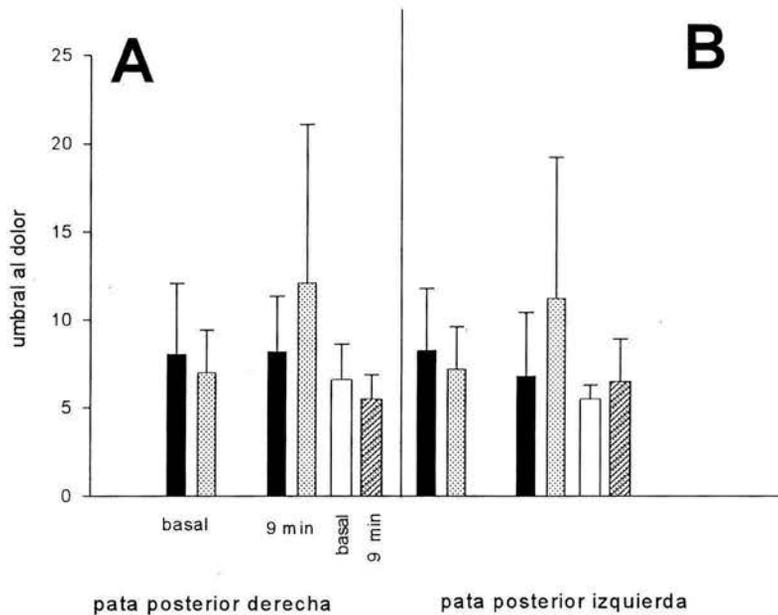


Figura 20. Histogramas de los valores promedios del umbral al dolor en situación control (basal o antes de la inyección) y al administrar DMSO 8% y DMSO 8% más el péptido (9 minutos después de la inyección). La gráfica A muestra los valores promedios obtenidos para la pata posterior derecha y la gráfica B para la pata posterior izquierda. Las barras negras representan el promedio de las mediciones del grupo control, las barras grises el promedio de las mediciones del grupo tratado con el péptido. Los resultados de las mediciones después de la segunda administración se muestran con las las barras blancas (antes de la segunda inyección) y rayadas (9 minutos después la segunda inyección del péptido). No se observaron valores significativamente diferentes; sin embargo, se observa una variabilidad grande de los datos después de la primera inyección del vehículo más el péptido. En las mediciones de la segunda inyección del vehículo más el péptido la variabilidad observada fue semejante a la del nivel basal o control.

VI. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: BIOENSAYO DE LOCOMOCIÓN EN LA RATA

VI.A. VÍA INTRACEREBROVENTRICULAR

Las conotoxinas PI y PIIB y dos fracciones hidrofóbicas del veneno en estudio (fracción V y fracción 25Sr) fueron evaluadas mediante inyecciones intracerebroventriculares en ratas macho. Sus efectos fueron valorados mediante la medición de la duración de su ejecución motora (segundos) a 9, 30, 60, y 120 minutos post-inyección (primer día) y a 9 y 30 minutos (segundo día). El análisis de los resultados fue hecho a través de comparaciones de la latencia en la ejecución motora de cada grupo de animales tratados con la de su respectivo control. También se realizó una comparación entre los grupos de animales controles (tratados con los dos vehículos de inyección utilizados: DMSO 10 %, y solución salina, 0.9%). Lo que se observa en la Figura 21 es el análisis estadístico de la comparación entre los dos grupos de animales controles.

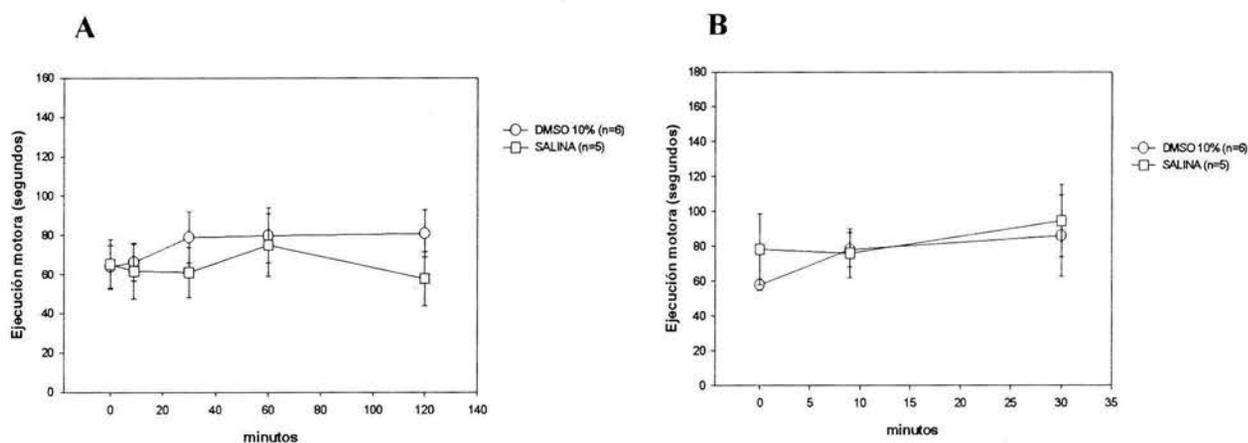


Figura 21. Ejecución motora de los dos grupos de animales inyectados I.C.V con solución salina y con DMSO al 10%: A) primer día de prueba: comparación de la duración (latencia) de la ejecución motora de los dos grupos de animales, medida a 0, 9, 30 y 120 minutos post-inyección; B) segundo día de prueba: comparación de la ejecución motora de los mismos grupos de animales medida a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las líneas representan la duración promedio \pm esm (3 ensayos consecutivos por animal) de la ejecución motora de cada grupo de animales. No se observó diferencia significativa entre grupos, ni tampoco entre los diferentes tiempos post-inyección en cada uno de los días (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

La duración promedio del desarrollo de la ejecución motora de cuatro animales tratados con la fracción FV a una dosis de 6.8 μg en un volumen de vehículo de inyección de 15 μL (como grupo) fue estadísticamente diferente de la de seis animales tratados (grupo control) con el vehículo de inyección, DMSO 10%; es decir las ratas, en general, se mantuvieron por más tiempo en el rodillo giratorio después de haber sido inyectadas con la fracción FV (Figuras 22a y 22b).

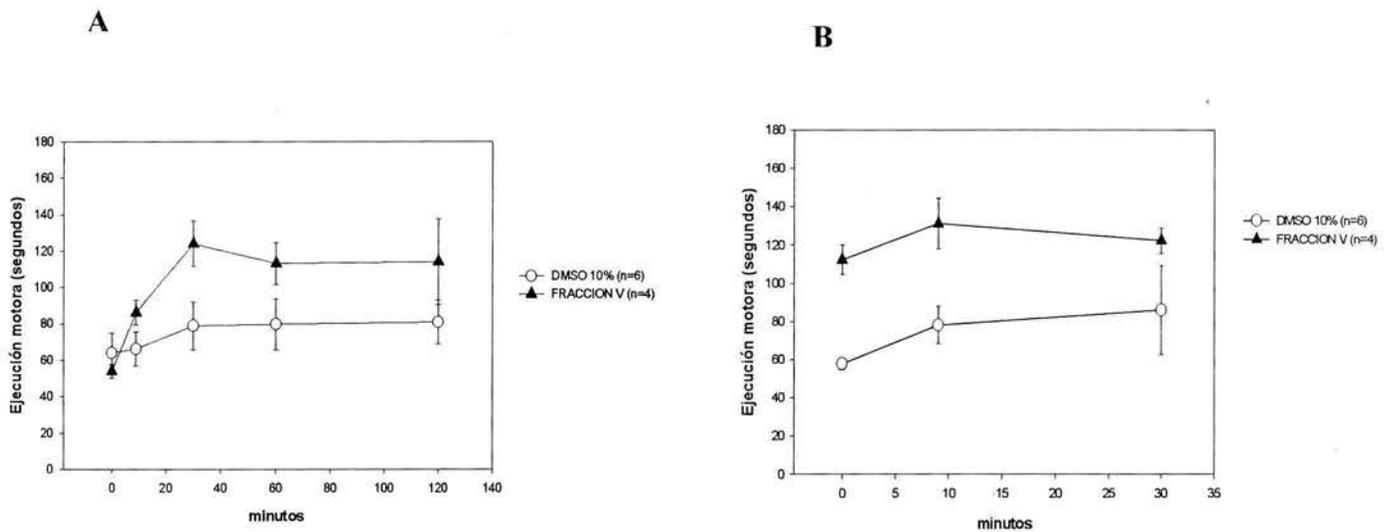


Figura 22a. Ejecución motora de dos grupos de animales: el grupo control (vehículo de inyección = DMSO 10%) y el grupo tratado con la fracción V, inyectados I.C.V. Las líneas representan la duración promedio \pm esm (3 ensayos consecutivos por animal) de la ejecución motora de cada grupo de animales. A) primer día de prueba: comparación de la duración (latencia) de la ejecución motora de los dos grupos de animales, medida a 0, 9, 30 y 120 minutos post-inyección; B) segundo día de prueba: comparación de la ejecución motora de los mismos grupos de animales medida a 0, 9 y 30 minutos post-inyección (Figura 22b).

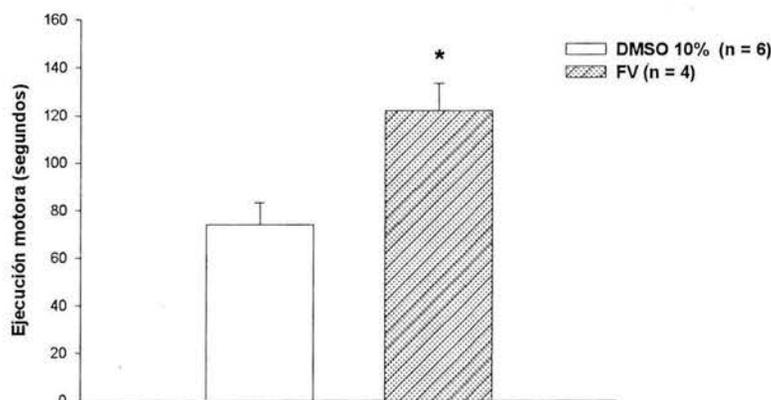


Figura 22b. Efecto del tratamiento con la fracción V del veneno del *Conus spurius* sobre la ejecución motora de ratas. Barra blanca : grupo control (vehículo de inyección = DMSO 10%); barra rayada: grupo tratado con la fracción V, ambos inyectados I.C.V. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora del grupo. Se observó una diferencia significativa ($F_{(1, 8)} = 10.53$, $P < 0.05$) en la duración de la ejecución motora del grupo tratado con la fracción V en comparación con el grupo control tratado con DMSO 10% en el segundo día de prueba , (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

Un grupo de cuatro ratas tratadas intracerebroventricularmente, con la fracción denominada 25Sr (6.8 μ g en 15 μ L de DMSO 10%), no mostraron un cambio o efecto a dicho tratamiento sobre la ejecución motora, en comparación con la duración de la ejecución motora del grupo de animales inyectados i.c.v. con 15 μ L de DMSO 10% (vehículo de inyección) (Figura 23).

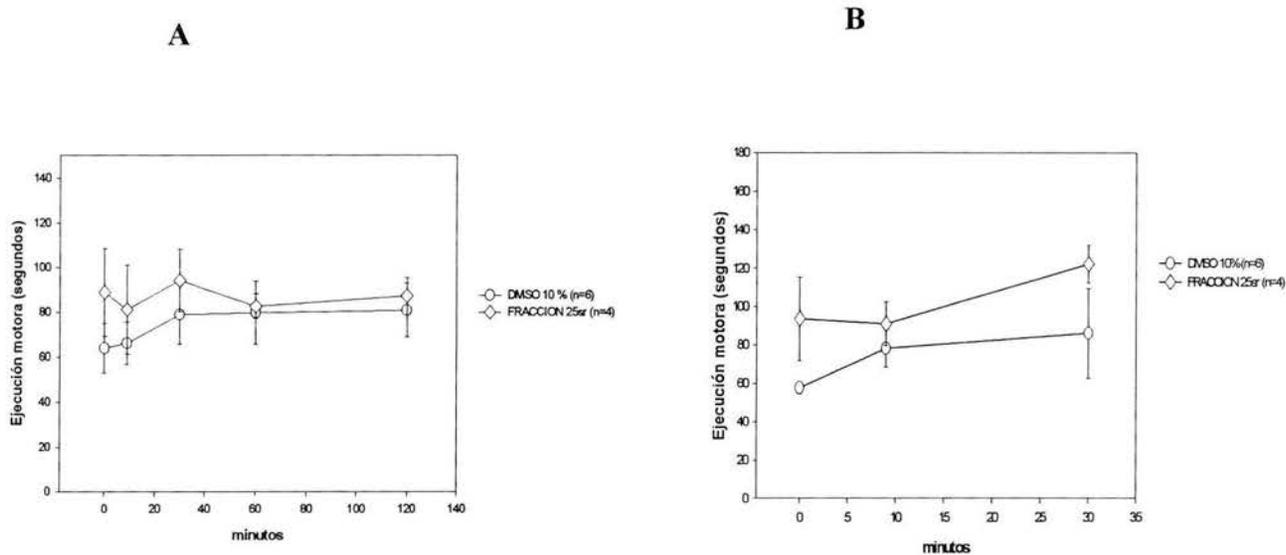


Figura 23. Ejecución motora de dos grupos de animales: el grupo control (vehículo de inyección = DMSO 10%) y el grupo tratado con la fracción 25Sr inyectados I.C.V. A) primer día de prueba: comparación de la duración (latencia) de la ejecución motora de los dos grupos de animales, medida a 0, 9, 30 y 120 minutos post-inyección; B) segundo día de prueba: comparación de la ejecución motora de los mismos grupos de animales medida a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las líneas representan la duración promedio \pm esm (3 ensayos consecutivos por animal) de la ejecución motora de cada grupo de animales. No se observó diferencia significativa entre grupos, ni tampoco entre los diferentes tiempos post-inyección en cada uno de los días (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

El tratamiento a cinco ratas con una inyección intracerebroventricular de 15 μ L del péptido I (PI), a una dosis de 1 nmol disuelto en DMSO al 10% no produjo ningún cambio estadísticamente diferente de la duración de su ejecución motora, en comparación con la duración de la ejecución motora de seis animales, que recibieron una inyección de 15 μ L de DMSO al 10% bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 24).

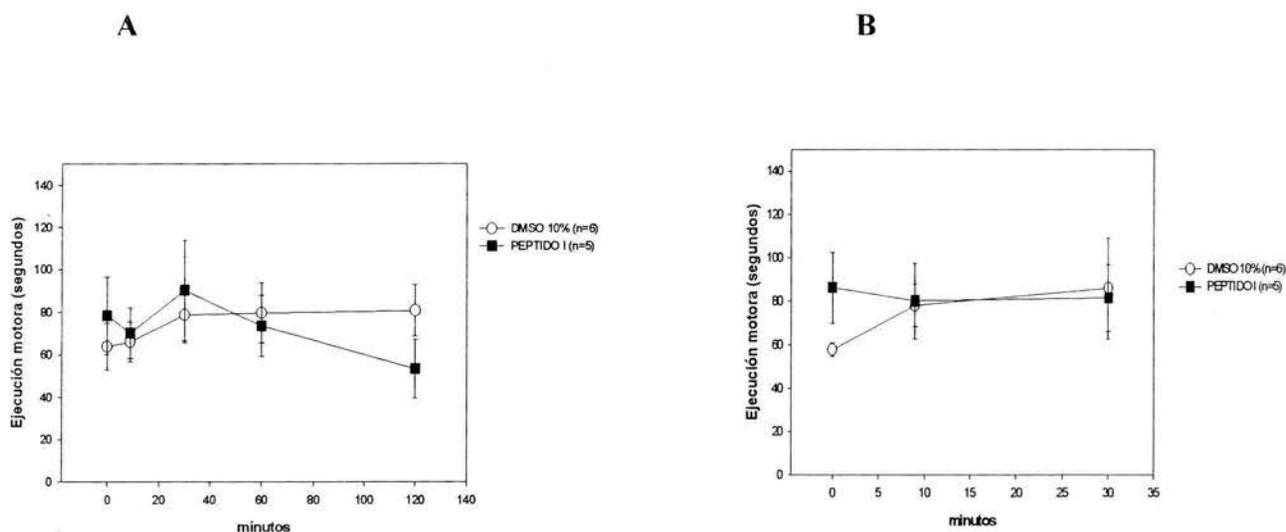


Figura 24. Ejecución motora de dos grupos de animales: el grupo control (vehículo de inyección = SALINA) y el grupo tratado con el péptido PI inyectados I.C.V. A) primer día de prueba: comparación de la duración (latencia) de su ejecución motora de los dos grupos de animales, medida a 0,9,30 y 120 minutos post-inyección B) segundo día de prueba: comparación de la ejecución motora de los mismos grupos de animales medida a 0,9 y 30 minutos post-inyección. Las líneas representan la duración promedio \pm esm (3 ensayos consecutivos por animal) de la ejecución motora de cada grupo de animales. No se observó diferencia significativa entre grupos, ni tampoco entre los diferentes tiempos post-inyección en cada uno de los días (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

El péptido IIB fue probado a una dosis de 250 pmol (primer día) y 1.2 nmol (segundo día) i.c.v en un grupo de cuatro ratas. Igualmente, se evaluó su efecto sobre la ejecución motora de los animales, analizando estadísticamente el efecto de dicho péptido comparando la duración promedio de la ejecución motora de este grupo de ratas con un grupo de cinco ratas inyectadas i.c.v. con 15 μ L de solución salina (vehículo de inyección de éste péptido). No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos grupos de ratas (Figura 25).

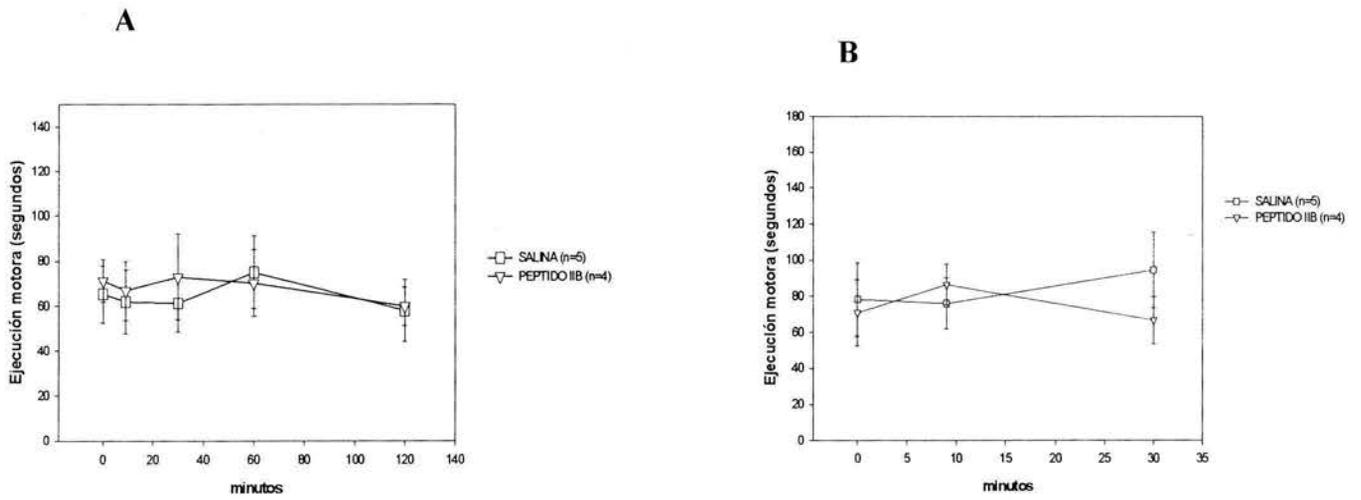


Figura 25. Ejecución motora de dos grupos de animales: el grupo control (vehículo de inyección = DMSO 10%) y el grupo tratado con el péptido IIB, inyectados I.C.V. A) primer día de prueba: comparación de la duración (latencia) de la ejecución motora de los dos grupos de animales, medida a 0, 9, 30 y 120 minutos post-inyección; B) segundo día de prueba: comparación de la ejecución motora de los mismos grupos de animales medida a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las líneas representan la duración promedio \pm esm (3 ensayos consecutivos por animal) de la ejecución motora de cada grupo de animales. No se observó diferencia significativa entre grupos, ni tampoco entre los diferentes tiempos post-inyección en cada uno de los días (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

Se hizo también una comparación por grupo experimental para determinar si la ejecución motora era mejorada por el aprendizaje motriz, es decir, para averiguar si el aprendizaje estaba enmascarando algún cambio o efecto debido a alguna de las muestras probadas. El análisis entonces se realizó con respecto al efecto del tiempo (comparando el día uno con el día dos) para evaluar si este influyó en la duración promedio de la ejecución motora de los animales por habituación a la prueba. Al comparar el efecto del tiempo en el grupo de cinco ratas después de ser inyectadas i.c.v., lo que se observó fue una ausencia de diferencias estadísticamente significativas en dicho grupo (Figura 26).

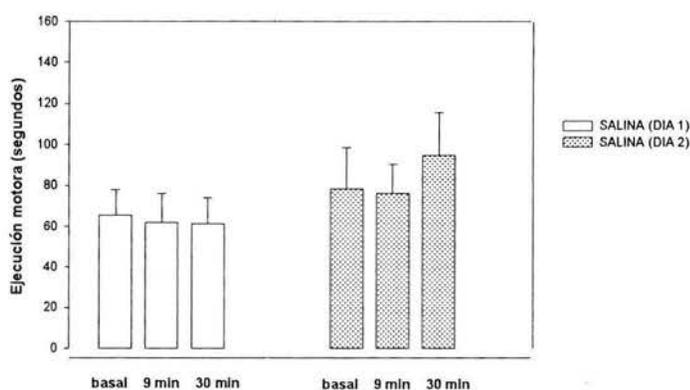


Figura 26. Comparación de la ejecución motora del grupo de animales (n=5) inyectados I.C.V. con solución salina los días 1 y 2, a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora del grupo. No se observó diferencia significativa entre ambos días, ni tampoco entre los diferentes tiempos post-inyección (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

Así mismo, al comparar la duración promedio de la ejecución motora del día uno de un grupo de seis ratas tratadas i.c.v. con DMSO al 10% con la duración promedio de la ejecución motora de este mismo grupo de animales al segundo día de tratamiento, no hubo cambio significativo por algún efecto del factor tiempo (Figura 27).

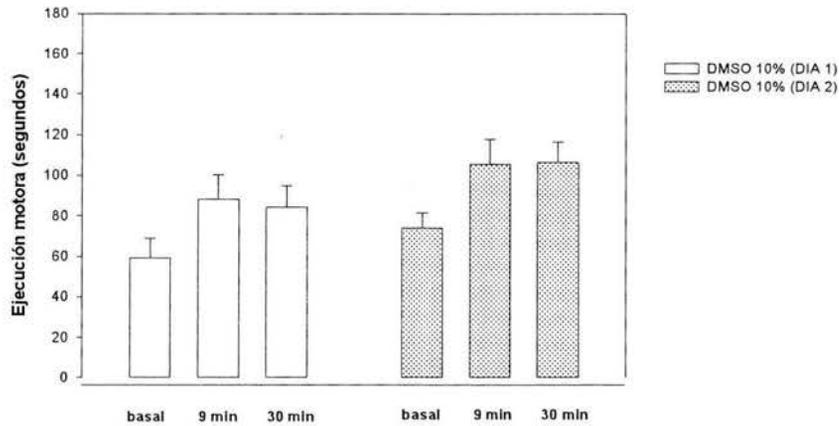


Figura 27. Comparación de la ejecución motora del grupo de animales (n=6) inyectados I.C.V. con DMSO 10 %, los días 1 y 2, a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora del grupo. No se observó diferencia significativa entre ambos días, ni tampoco entre los diferentes tiempos post-inyección (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

Durante el análisis del tratamiento con la fracción FV se vio un cambio significativo (mayor latencia) en la duración de la ejecución motora de los animales inyectados i.c.v. con dicha fracción (Figuras 28a y 28b). Este cambio se ve también reflejado al evaluar el papel del tiempo (o días de tratamiento) en dicho cambio, observándose una mayor duración de la ejecución motora de las ratas al segundo día de tratamiento (Figura 28c).

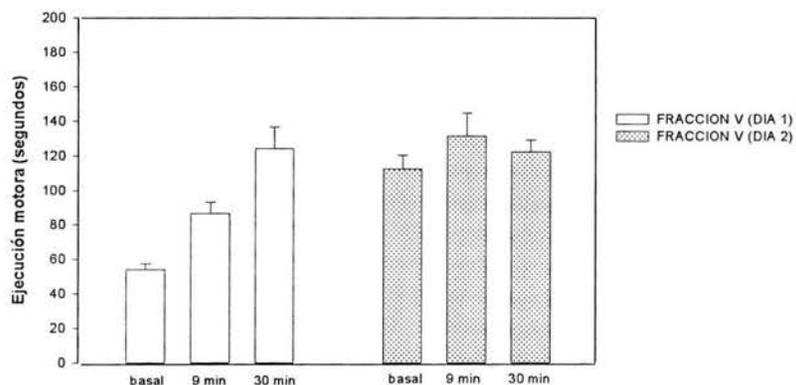


Figura 28a. Comparación de la ejecución motora del grupo de animales (n=4) inyectados I.C.V. con 6.8 $\mu\text{g}/15 \mu\text{L}$ de la fracción FV, los días 1 y 2, a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora del grupo.

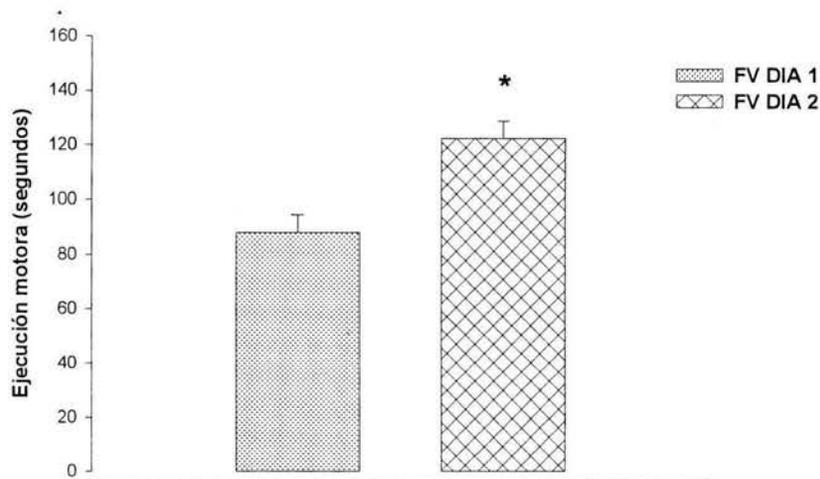


Figura 28b. Efecto del tiempo sobre la ejecución motora del grupo de animales (n=4) inyectados I.C.V. con 6.8 $\mu\text{g}/15 \mu\text{L}$ de la fracción FV. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata)

de la ejecución motora del grupo al día 1 y al día 2 respectivamente. Se observó una diferencia significativa (*) del día 1 al día 2, $F_{(1,3)} = 22.4$, $p < 0.05$. (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

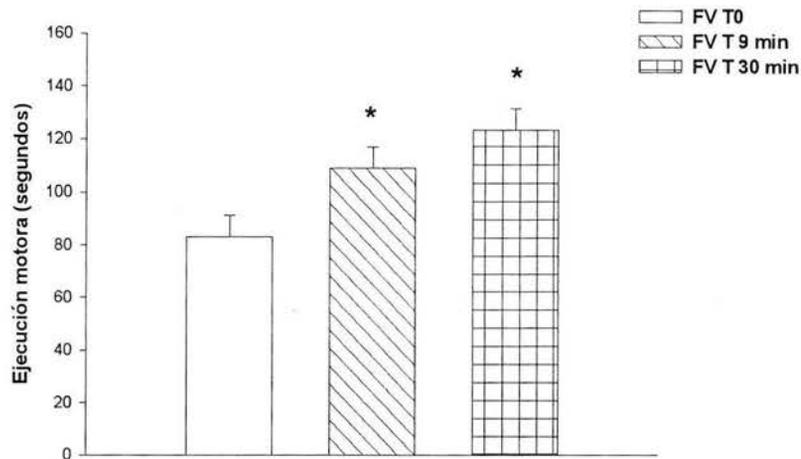


Figura 28c. Efecto del tratamiento sobre la ejecución motora del grupo de animales ($n=4$) inyectados I.C.V. con $6.8 \mu\text{g}/15 \mu\text{L}$ de la fracción FV. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora del grupo, a 0, 9, 30 minutos postinyección. Se observó una diferencia significativa (*) a los 9, y 30 minutos en relación a tiempo cero o valor basal (antes de la inyección), $F_{(2,6)} = 8.84$, $p < 0.05$. (ANOVA de medidas repetidas de dos vías, seguido por una prueba post-hoc Student-Newman-Keuls).

Lo anterior corrobora en parte que la habituación o aprendizaje motriz de los animales no causa directamente un cambio en la ejecución motora de las ratas, pues a excepción del efecto observado en las ratas a las que se les administró la fracción FV, todos los demás grupos tratados con las diferentes sustancias (como es también el caso de los cuatro animales inyectados con la fracción 25Sr) no mostraron cambio alguno en su ejecución motora (ni mayor, ni menor duración) del primer día con respecto a su ejecución motora al segundo día de tratamiento (Figura 29).

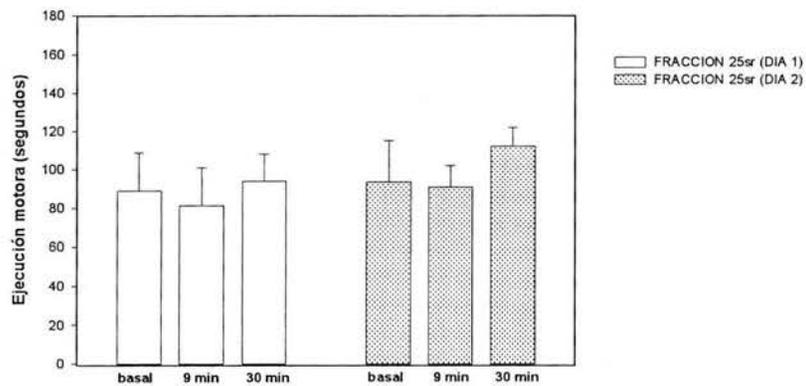


Figura 29. Comparación de la ejecución motora del grupo de animales (n=4) inyectados I.C.V. con 6.8 $\mu\text{g}/15 \mu\text{L}$ de la fracción 25Sr, entre el día 1 y 2, a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora del grupo. No se observó diferencia significativa entre ambos días, ni tampoco entre los diferentes tiempos post-inyección (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

La Figura 30 muestra de la misma manera que el tiempo o una posible habituación a la tarea o ensayo (ejecución motora) no evocó un cambio significativo en la duración y/o latencia promedio de los ensayos, del grupo de ratas tratadas con el péptido I (PI).

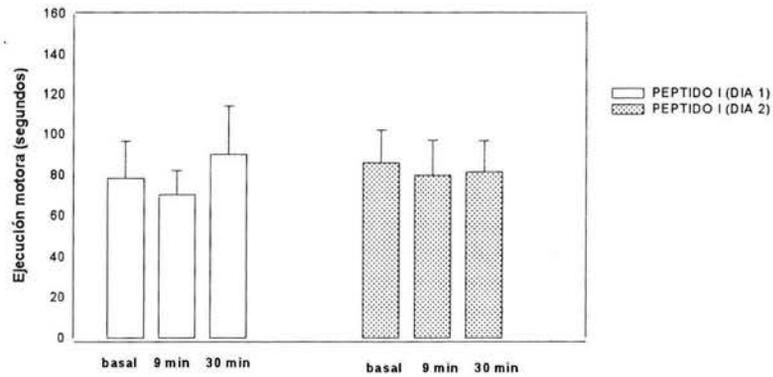


Figura 30. Comparación de la ejecución motora del grupo de animales (n=5) inyectados I.C.V. con 1.2 nmol /15 μ L del péptido PI, entre el día 1 y 2, a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora del grupo. No se observó diferencia significativa entre ambos días, ni tampoco entre los diferentes tiempos post-inyección (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

Los animales a los que se les administró I.C.V. el péptido IIB, tampoco presentaron una diferencia en su ejecución motora por efecto del tiempo, al comparar la duración promedio de su ejecución motora al día uno de tratamiento con su duración promedio al segundo día (Figura 31).

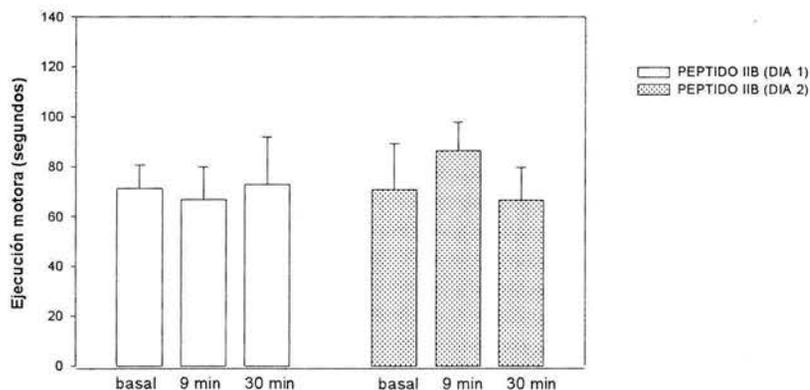


Figura 31. Comparación de la ejecución motora del grupo de animales ($n=4$) inyectados I.C.V. con 250 pmol/ 15 μL en el día 1, y 1.2nmol /15 μL día 2, del péptido IIB, entre el día 1 y 2, a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora (rotacional) del grupo. No se observó diferencia significativa entre ambos días, ni tampoco entre los diferentes tiempos post-inyección (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

VI.B. VÍA INTRAVENOSA

La fracción FV fue probada mediante inyecciones intravenosas en ratas macho evaluando su efecto sobre la duración de la ejecución motora después de 9, 30, 60 y 120 minutos de haberlas tratado con 6.8 μg en 15 μL de DMSO al 10% el primer día de prueba, y su efecto después de un segundo día de tratamiento a los 9, 30 minutos post-inyección. Igualmente que con las ratas inyectadas i.c.v., estos animales fueron sometidos a una manipulación previa a cualquier ensayo para evitar que su reacción ante la novedad influyera sobre las posteriores mediciones de su ejecución; además, se hizo una medición “basal” (tiempo 0) una hora antes de la inyección, en cada uno de los días de tratamiento. Se hizo la comparación con su grupo control (animales inyectados con el vehículo de inyección, DMSO al 10%). El análisis indicó la ausencia de efecto de la inyección de la fracción FV sobre la duración de la ejecución motora del grupo de cuatro ratas tratadas, pues no se observó una diferencia estadísticamente significativa (Figura 32).

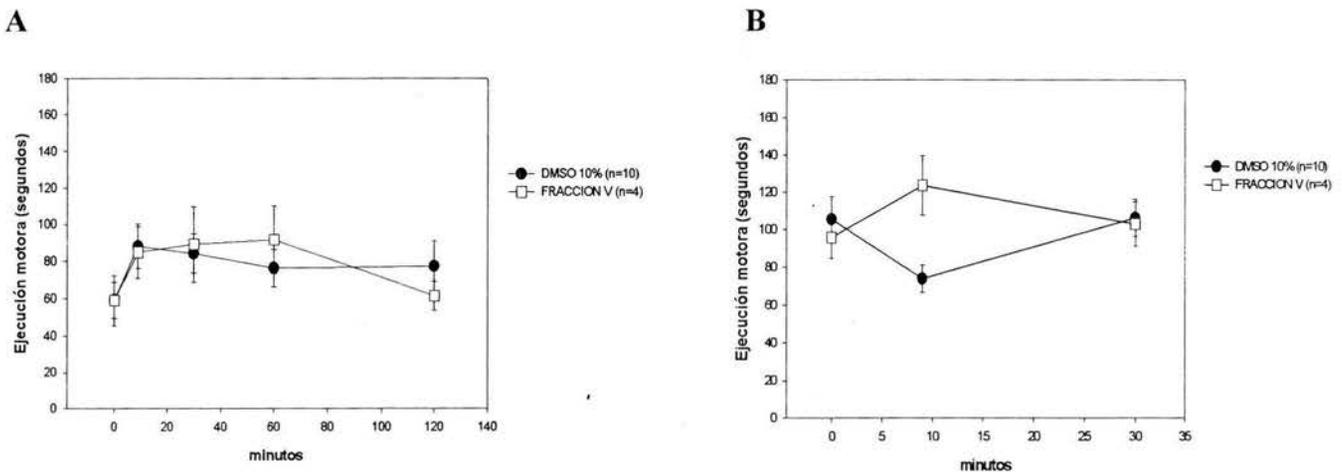


Figura 32. Ejecución motora de dos grupos de animales: el grupo control (vehículo de inyección = DMSO 10%) y el grupo tratado con la fracción FV inyectados I.V. A) primer día de prueba: comparación de la duración (latencia) de la ejecución motora de los dos grupos de animales, medida a 0, 9, 30 y 120 minutos post-inyección; B) segundo día de prueba: comparación de la ejecución motora de los mismos grupos de animales medida a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las líneas representan la duración promedio \pm esm (3 ensayos consecutivos por animal) de la ejecución motora de cada grupo de animales. No se observó diferencia significativa entre grupos, ni tampoco entre los diferentes tiempos post-inyección en cada uno de los días (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

Se realizó también una comparación del grupo de animales inyectados con el vehículo (DMSO 10%), con un grupo de animales inyectados con solución salina (NaCl 0.9%), sin observar una diferencia significativa; esto se hizo para observar si las condiciones experimentales (administración en la cola de los animales) estuvieran teniendo un efecto (Figura 33a). Se observó una diferencia significativa en el grupo tratado con DMSO 10% (Figura 33b).

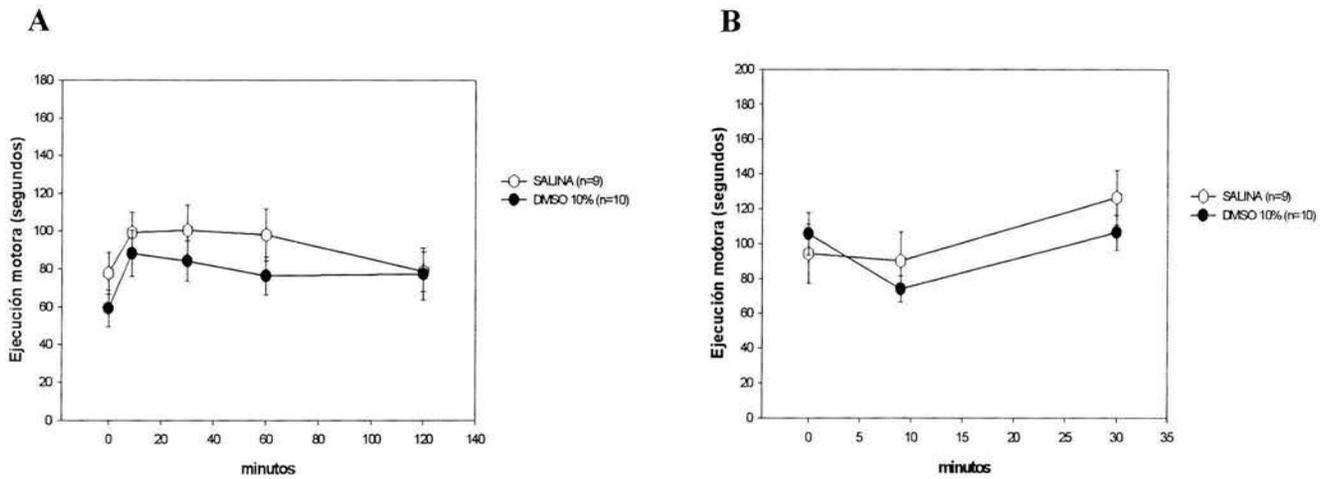


Figura 33a. Ejecución motora de dos grupos de animales: el grupo control (vehículo de inyección = DMSO 10%) y el grupo tratado con solución salina, inyectados I.V. A) primer día de prueba: comparación de la duración (latencia) de la ejecución motora de los dos grupos de animales, medida a 0, 9, 30 y 120 minutos post-inyección; B) segundo día de prueba: comparación de la ejecución motora de los mismos grupos de animales medida a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las líneas representan la duración promedio \pm esm (3 ensayos consecutivos por animal) de la ejecución motora de cada grupo de animales. No se observó diferencia significativa entre grupos, en ninguno de los días. (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

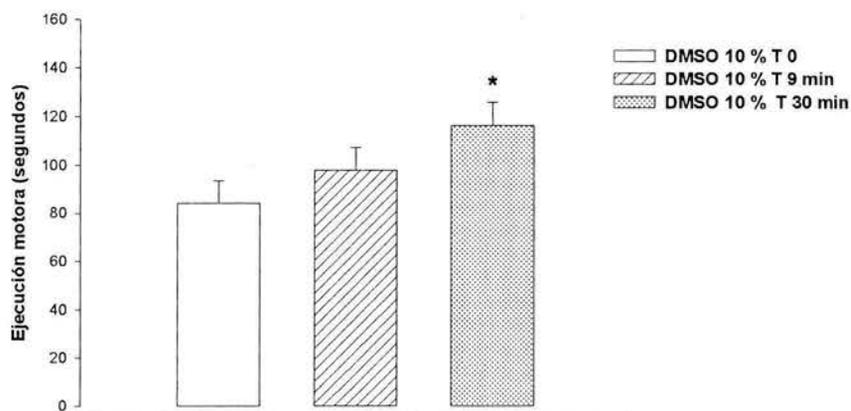


Figura 33b. Efecto del tratamiento sobre la ejecución motora de ratas inyectadas I.V. con DMSO al 10%. Las barras representan la duración promedio \pm esm (3 ensayos consecutivos por animal) de la ejecución motora del grupo de animales. Se observó una diferencia significativa a los 30 min post-inyección en el día 2 con respecto a la ejecución motora basal o tiempo 0 ($F_{(2,34)} = 4.7$, $P < 0.05$) (ANOVA de medidas repetidas de dos vías, seguido por una prueba post-hoc de Student-Newman-Keuls).

Se hizo un análisis comparativo, por grupo experimental, para determinar si había un efecto del tiempo (si la ejecución motora era mejorada por el aprendizaje motriz) y descartar que el aprendizaje estuviera enmascarando algún efecto de las sustancias administradas por esta vía (Figura 34a). Se observó una diferencia significativa de tiempo post-inyección en la duración de la ejecución motora del grupo de ratas tratadas con la fracción FV (Figura 34b).

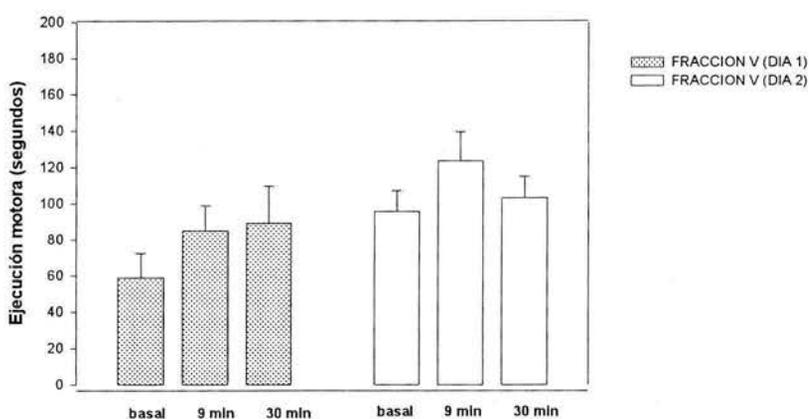


Figura 34a. Comparación de la ejecución motora del grupo de animales inyectados I.V. con 6.8 $\mu\text{g}/15 \mu\text{L}$ de la fracción FV, entre el día 1 y 2. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora (rotacional) del grupo. No se observó diferencia significativa entre ambos días. (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

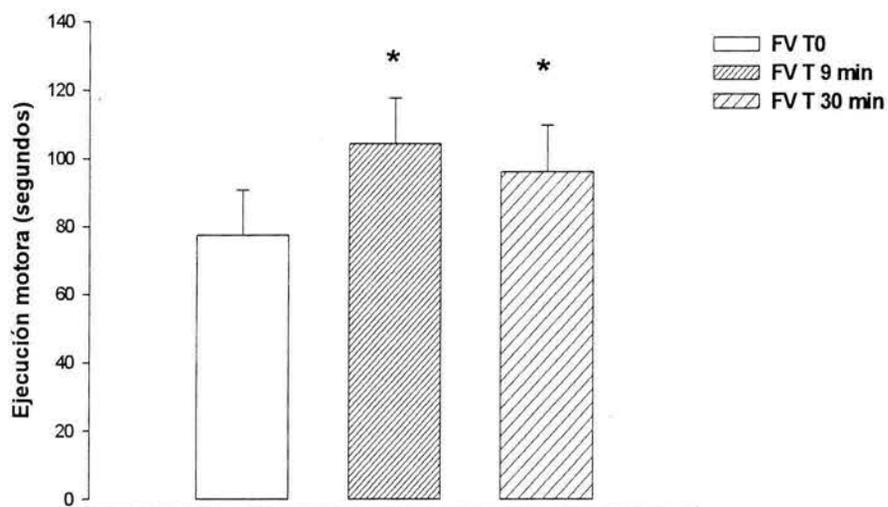


Figura 34b. Efecto del tratamiento con la fracción V del veneno de *Conus spurius* sobre la ejecución motora del grupo de animales inyectados I.V. con 6.8 $\mu\text{g}/15 \mu\text{L}$ de la fracción FV. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora (rotacional) del grupo. Se observó una diferencia significativa de tiempo 9 y 30 minutos post-inyección con respecto al tiempo 0 ó basal, $F_{(2,6)} = 11.7$, $p < 0.05$. (ANOVA de medidas repetidas de dos vías seguido por una prueba post-hoc Student-Newman-Keuls).

En el caso del grupo inyectado con DMSO al 10%, igualmente, se observó un cambio significativo al comparar la duración promedio de la ejecución de este grupo de ratas al día uno contra el día dos de tratamiento (Figuras 35a y 35b).

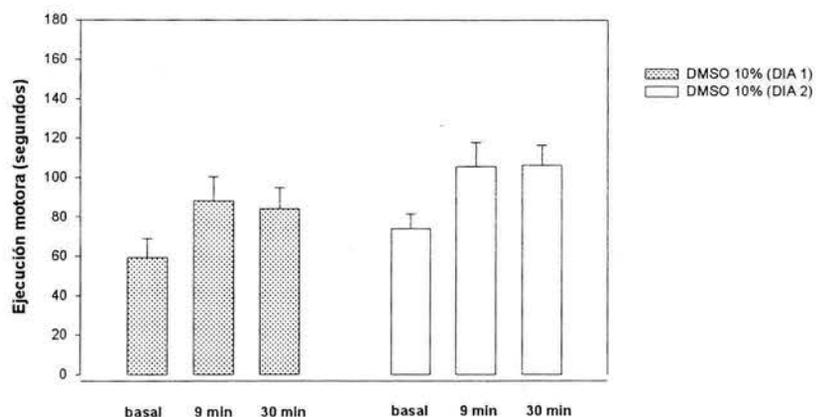


Figura 35a. Comparación de la ejecución motora del grupo de animales inyectados I.V. con el vehículo de inyección (DMSO al 10%), entre el día 1 y 2. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora del grupo. No se observó diferencia significativa entre ambos días. ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

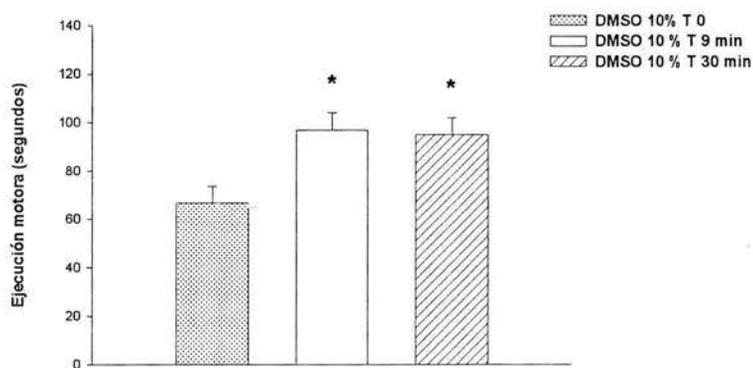


Figura 35b. Efecto del tratamiento con DMSO al 10% sobre la ejecución motora del grupo de animales inyectados I.V. a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora del grupo. Se observó una diferencia significativa de tiempo 9 y 30 minutos post-inyección con respecto al tiempo 0 ó basal, $F_{(2,18)} = 6.6$, $p < 0.05$ (ANOVA de medidas repetidas de dos vía seguido por una prueba post-hoc Student-Newman-Keuls).

En el grupo de ratas inyectadas con solución salina vía i.v., la diferencia en la duración promedio de su ejecución motora entre el primer y segundo día de tratamiento no llegó a ser significativa; no obstante, se notó la misma tendencia de mayor duración en la ejecución motora de este grupo de animales en el segundo día con respecto a su ejecución en el día uno (Figura 36). Lo que sugiere que el efecto de mejoramiento en la ejecución motora de estos grupos de animales se deba al entrenamiento (días de ensayo), que deja la evidente importancia de llevar a los animales a una ejecución motora estable, para descartar el efecto de entrenamiento ya que esto mismo, no se observó con los animales inyectados I.C.V.

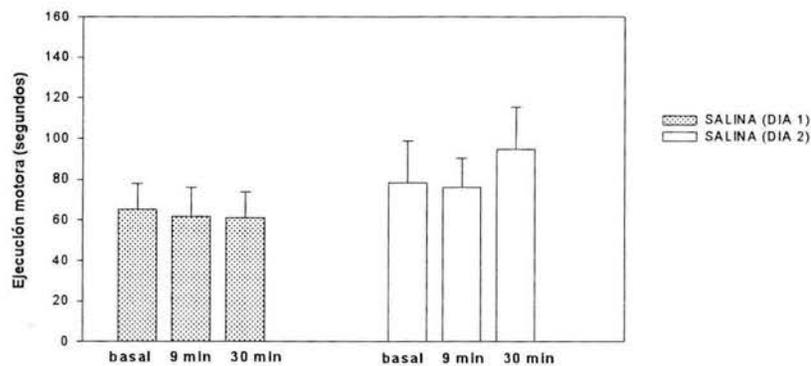


Figura 36. Comparación de la ejecución motora del grupo de animales inyectados I.V. con solución salina los días 1 y 2, a 0, 9 y 30 minutos post-inyección. Las barras representan la duración promedio (\pm esm) de ensayos consecutivos (3/rata) de la ejecución motora del grupo. No se observó diferencia significativa entre ambos días, ni tampoco entre los diferentes tiempos post-inyección (ANOVA de medidas repetidas de dos vías).

DISCUSIÓN

Los caracoles marinos venenosos del género *Conus* pertenecen a la familia Conidae y son clasificados ecológicamente de acuerdo a su tipo de alimentación en piscívoros (peces), molusquicívoros (moluscos, incluso otros conos) y vermívoros (gusanos) (Kohn *et al.*, 1975). Las primeras evidencias de la existencia de múltiples componentes tóxicos en el extracto crudo de los venenos, son: 1) la obtenida mediante los estudios con los extractos de veneno de varias especies de *Conus*, piscívoros, molusquívoros y vermívoros en los cuales se observó un complejo cuadro farmacológico en ratones, peces y poliquetos, que sugería la presencia de más de una sustancia activa (Endean *et al.*, 1963), y 2) los estudios electrofisiológicos del efecto del veneno de *Conus magus* sobre la contracción de los músculos esquelético y liso de ratón y/o musculatura cardíaca de rana (Endean *et al.*, 1965).

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Las conotoxinas son péptidos biológicamente activos (antagonismo competitivo o no competitivo, agonismo, bloqueadores o inactivadores) sobre canales iónicos dependientes de voltaje, canales iónicos activados por ligando, receptores asociados a proteínas G, y transportadores de neurotransmisores. Cada conopéptido parece unirse específicamente a un subtipo de receptor macromolecular, interfiriendo sobre sus actividades normales. Típicamente, las conotoxinas son péptidos pequeños (contienen en su mayoría 11-30 residuos de aminoácidos) y con un alto porcentaje de residuos de cisteínas conservados, los cuales forman 2-4 puentes disulfuro.

En este trabajo se aislaron y purificaron cuatro péptidos con características estructurales de T conotoxinas, a partir del extracto crudo del veneno de la especie *Conus spurius* (especie vermívora); tres de ellas son altamente hidrofóbicas (PI, PII, PIII) y una es hidrofílica PIIB, de acuerdo a sus tiempos de elución en cromatografía (% de la fase móvil, o solución B) en fase inversa (Figura 3). Al comparar las secuencias obtenidas de las cuatro conotoxinas se observa que las conotoxinas PI, PII y PIII son prácticamente idénticas con respecto a su estructura primaria, siendo la PIII diferente

sólo por el contenido de un residuo de leucina (L) adicional en su secuencia (Tabla 4). El residuo que faltaba confirmar en la secuencia del péptido PIIB resultó ser el que se pensaba (arginina) de acuerdo a la masa determinada experimentalmente y a la secuencia que se conocía; este aminoácido tiene una cadena lateral ionizable que contribuye a la hidrofiliidad global del péptido. Los datos bioquímicos muestran también que las cuatro comparten un patrón de residuos de cisteínas definido como dos pares de cisteínas adyacentes separados por cinco residuos (Tabla 6). Este patrón ha sido encontrado en las recién caracterizadas conotoxinas T aisladas de varias especies de *Conus* de los tres tipos de alimentación antes mencionados (Rigby *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 1999). Otras características estructurales de las conotoxinas T son su número de aminoácidos, que varía entre 10 y 17 residuos, y la firma de 5 residuos (excepto para la conotoxina tx5a/ε-TxIX) entre sus dos pares de cisteínas (Walker *et al.*, 1999). A este respecto las T conotoxinas putativas estudiadas aquí cumplen con este rasgo estructural además de contener 13-14 aminoácidos; cabe mencionar que las estructuras primarias de las conotoxinas PIIB y PIII fueron caracterizadas en la totalidad mediante el análisis de la composición de aminoácidos (Tabla 4). Así, los péptidos caracterizados en este trabajo han agregado cuatro miembros a la lista de conotoxinas T del tipo T-1 (Olivera, 2002) aisladas de venenos; anteriormente se habían aislado cuatro (tx5a, p5a, au5a y au5b). Además, *C. spurius* es la segunda especie vermívora de la que se sabe que produce conotoxinas T-1; la primera era *C. imperialis*. Los péptidos PI, PII y PIII son las conotoxinas T-1 más hidrofóbicas conocidas hasta la fecha. Sus secuencias de aminoácidos están compuestas predominantemente de residuos no polares, con sólo dos residuos polares no cargados y una carga neta teórica de (+1) a pH neutro. A pesar de algunas conotoxinas T-1 tienen igual carga neta en las mismas condiciones, todas ellas tienen de tres a cinco grupos ionizables; en los casos de los péptidos PI, PII y PIII, el único grupo cargado se encuentra en el extremo amino de cada uno.

La alta afinidad y especificidad de los conopéptidos es dependiente de sus conformaciones altamente restringidas y relativamente rígidas; en la mayoría de los conopéptidos, los residuos de cisteínas, los cuales están involucrados en formación de múltiples puentes disulfuro, constituyen del 20-50 % del total de aminoácidos de cada

péptido (Olivera *et al.*, 1990). Debido a su tamaño, se esperaría que los conopéptidos normalmente no tuvieran una conformación específica, sino que se equilibraran entre muchas conformaciones alternativas en condiciones fisiológicas; se sabe que, usualmente, se necesitan cerca de 50 aminoácidos para que un polipéptido asuma una conformación específica. La suma de fuerzas no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas) son insuficientes para establecer en un péptido pequeño una única conformación, pero en la mayoría de los conopéptidos las uniones covalentes establecidas por los puentes disulfuro son los que presumiblemente estabilizan la conformación biológicamente activa. Los puentes disulfuro formados entre los residuos de cisteínas juega un papel clave en la estabilidad molecular al imponer un doblamiento definido a cada péptido con una orientación específica de sus regiones hipervariables o regiones intercisteínas en las cuales son diferentes en número y tipo de aminoácidos de una a otra conotoxina (lazos o "loops").

En este trabajo se ha elucidado el arreglo de los puentes disulfuro de las conotoxinas PI, PII y PIII (Figuras 14, 16 y 18) siendo esta conectividad I-III, II-IV, en los tres casos. Esta es otra característica que comparten también con las conotoxinas T-1 ya mencionadas (Rigby *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 1999). Dado que PI y PII tienen el mismo arreglo de puentes disulfuro (I-III, II-IV), surge la posibilidad de un D-aminoácido como diferencia entre PI y PII.

Inesperadamente, la notable hidrofobicidad de los péptidos PI, PII y PIII reveló algunos aspectos del plegamiento y las características de superficie de las moléculas. En los tres casos, al determinar los puentes disulfuro, la ausencia de derivados alquilados en las posiciones 6 y 13, durante la fase de reducción parcial y alquilación con NEM, indica que el puente disulfuro formado por dichos residuos (II-IV) no está expuesto en la superficie de la molécula nativa, sino probablemente oculto por el segmento hidrofóbico N-terminal formado por los residuos (IINW). Sólo hasta que el puente I-III es reducido y las cisteínas 5 y 12 son alquiladas, la estructura se abre lo suficiente para permitir que la molécula voluminosa y cargada (al pH de la reducción total) del TCEP alcance y reduzca al puente II-IV. En los casos de PI y PII, la presencia de derivados marcados con NEM sólo en la posición 5 sugiere que poco después de la reducción del puente I-III la cisteína en la posición 12 se oculta en la región hidrofóbica,

donde no es accesible a las moléculas polares de la NEM. Se podría especular que la hidrofobicidad alta de los péptidos PI, PII y PIII podría tener implicaciones en el modo de unión a sus todavía desconocidos blancos moleculares.

La presencia de más de una conotoxina con características estructurales similares en el veneno de una especie en particular es frecuente (Jiménez *et al.*, 2003); un ejemplo es el de las ya bien conocidas α conotoxinas, de las que se pueden encontrar seis o más clases (McIntosh *et al.*, 2001). Esta situación también ocurre con los péptidos de la superfamilia T, tanto con las conotoxinas T-1 como con las T-2. En el caso de las primeras, En el veneno de la especie *Conus spurius* hemos encontrado tres T conotoxinas muy similares, PI, PII y PIII. Su caracterización indica que PI y PII tienen secuencias idénticas y que PIII sólo difiere de las otras dos por un residuo adicional de leucina. Es posible de que éstas como otras conotoxinas que han sido caracterizadas biológicamente compartan subtipos de un mismo blanco molecular, como en el caso de las pertenecientes a la nueva superfamilia I (Jiménez *et al.*, 2003)

Hasta el momento podemos concluir que las conotoxinas PI, PII, PIII y PIIB pertenecen a la superfamilia T, ya que tienen varias características de las T conotoxinas: el patrón de cisteínas, el espaciamiento entre los pares de cisteínas, y el arreglo de los puentes disulfuro. La Tabla 7 muestra la comparación de las estructuras primarias de las conotoxinas PI, PII, PIII y PIIB con las de tres T conotoxinas recientemente caracterizadas tanto estructuralmente como biológicamente.

| Secuencia | Actividad biológica | Referencia |
|--|--|------------------------------|
| tx5a: γ CC γ DGW''CCT ^{&} AAO | Ratones: Hiperactividad; movimientos espasmódicos durante dos horas. Pez Beta: Supresión del desplegamiento de la aleta en una situación de pelea. | Walker et al., 1999 |
| ϵ -TxIX: γ CC γ DGW''CCT ^{&} AAO | Ratones: Tremores y caminar espasmódico Sinapsis colinérgica de Aplysia: Disminución selectiva de la liberación de acetilcolina; reducción del flujo presináptico de Ca ⁺⁺ , de una forma lenta y reversible | Rigby et al., 1999 |
| p5a: GCCPKQMRCTL* | Ratones: No hay efectos | Walker et al., 1999 |
| au5a: FCCPFIRYCCW | Pez Beta: Supresión del desplegamiento de la aleta en una situación de pelea | |
| PI: IINWCCLIFYQCC* | Ratones: Hiperactividad Ratas: no efecto | Maillo, 2001 Este trabajo |
| PII: IINWCCLIFYQCC* | No determinado | Este trabajo |
| PIII: IINWCCLIFYQCCL* | No determinado | Este trabajo |
| PIIB: AGCCPRFYCCLR* | Ratas: no efecto | Este trabajo |

Tabla 7. Secuencias completas de los péptidos o conotoxinas PI, PII, PIII y PIIB alineadas con tres conotoxinas T ya caracterizadas. Se mencionan los cambios biológicos provocados en ratones y peces, inyectados por vía intracerebroventricular e intramuscular, respectivamente. Las dosis empleadas en ratones de menos de dos semanas fueron: tx5a, 0.5 nmoles; p5a, 100 nmoles; au5a, 5 nmoles; ϵ -TxIX, 0.3-100 μ g. En un ensayo electrofisiológico con una sinapsis colinérgica identificada en el ganglio bucal de *A. californica*, ϵ -TxIX se usó una concentración de 30 μ M.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

Varios de los péptidos o conotoxinas que han llegado a ser usados como herramientas farmacológicas importantes en el campo de las neurociencias fueron originalmente aislados con base en las inusuales sintomatologías conductuales provocadas por la inyección de estos péptidos en el sistema nervioso central, principalmente en ratones. Algunos de los cambios conductuales observados en estos animales son hiperactividad, parálisis, convulsiones, movimientos circulares, etc. (Olivera *et al.*, 1999). Los venenos de los *Conus* piscívoros fueron los primeros en ser estudiados y hasta la fecha son los más ampliamente conocidos; contienen las primeras conotoxinas caracterizadas molecularmente, de las que se sabe que actúan como antagonistas competitivos de receptores a acetilcolina en la unión neuromuscular (elucidación de sus blancos); subsecuentemente fueron descubiertas las conotoxinas con efecto sobre canales de Ca^{++} dependientes de voltaje, canales de Na^+ , canales de K^+ , receptores a serotonina (5-HT_3), receptores a NMDA, receptores a vasopresina y neurotensina (Harvey *et al.*, 2001). No obstante se han encontrado también conotoxinas producidas por *Conus* cuya alimentación consta de gusanos (poliquetos, generalmente), con efectos en blancos moleculares de sistemas de vertebrados del tipo de los antes mencionados, como es el caso de conopresinas producidas por la especie *Conus imperialis* (Nielsen *et al.*, 1994, McIntosh *et al.*, 1993, 1994).

En el caso de las conotoxinas T-1 de especies no piscívoras también se han reportado efectos en vertebrados: una conotoxina T-1 hidrofílica (tx5a/ ϵ -TxIX) de *Conus textile* (molusquívoro) tiene efectos motores (hiperactividad, espasticidad) en ratones (Walker *et al.*, 1999; Rigby *et al.*, 1999), mientras que el péptido hidrofóbico PI de *C. spurius* (vermívoro) produce hiperactividad en dichos roedores (Maillo, 2001). También existía el antecedente de que una conotoxina T-2 (mr10a) tiene efectos analgésicos en ratones (McIntosh *et al.*, 2000). Por lo tanto, se decidió caracterizar a las conotoxinas T-1 de *C. spurius* en un organismo similar (ratas). Además de ser un sistema a partir del cual se pueden hacer (en principio y con las precauciones pertinentes) extrapolaciones a otros mamíferos, las ratas tienen la ventaja de que la evaluación de sustancias en su sistema nervioso es regularmente práctica; esto deriva de que los efectos se pueden

medir en primera instancia por medio de los cambios conductuales evidentes ya mencionados antes.

Esta estrategia permitiría, en principio, abordar el comienzo de la caracterización biológica de los péptidos de *C. spurius*, y al mismo tiempo tener una idea de su utilidad potencial. Decidimos no estudiar la actividad en las presas naturales (poliquetos) de *C. spurius* ya que, además de que son muy difíciles de conseguir, una actividad en ellas no sería un indicio tan directo de su posible utilidad.

De las cuatro conotoxinas T-1 caracterizadas hasta el momento, se decidió iniciar la evaluación biológica de los péptidos PI y PIIB, por ser los más abundantes. Además, era de interés comparar los posibles efectos de una conotoxina hidrofílica (PIIB) con los de una hidrofóbica (PI).

Para explorar la utilidad potencial de este bioensayo, decidimos analizar primero el efecto de una fracción hidrofóbica (fracción V) del mismo veneno. Aunque no se observó un cambio muy marcado a consecuencia de la inyección de la fracción V, se vio un efecto discreto en la duración de la ejecución motora de los animales tratados. Esta evaluación fue repetida con otra fracción (25Sr) teóricamente equivalente a la fracción V, a la misma dosis; la idea era aumentar el número de experimentos y tener un resultado más significativo estadísticamente. Sin embargo, en esta ocasión, los resultados fueron claramente negativos. Una explicación posible para esta diferencia es que, a pesar de ser en teoría cromatográficamente equivalentes, pudo haber una diferencia entre las fracciones V y 25Sr como resultado de provenir de dos lotes distintos de conductos venenosos.

A pesar del antecedente de que algunas conotoxinas (mr10a) de la superfamilia T tienen efectos analgésicos en roedores (ratones; McIntosh et al., 2000), la evaluación del efecto del péptido purificado PI (182 y 336 pmol/17 μ L) de *Conus spurius* sobre el umbral al dolor por presión en la rata no dio resultados significativos estadísticamente. Este resultado no sería del todo inesperado, considerando que la toxina mr10a, si bien pertenece a la superfamilia T, es del tipo T-2. Además, la dosis más baja de mr10a que produjo un efecto significativo fue tres veces mayor a la dosis más alta de PI empleada. Cabe mencionar que al momento de hacer estos experimentos no se disponía de una cantidad elevada de PI. La síntesis de PI en cantidad suficiente permitiría repetir las

evaluaciones de efecto sobre el umbral al dolor por presión con mayores dosis, y así poder determinar con certeza si PI tiene o no efectos analgésicos en la rata.

Dados los antecedentes mencionados anteriormente de conotoxinas T-1 (tx5a/ε-TxIX) con efectos "motores" en roedores (Walker et al., 1999; Rigby et al., 1999), parecía conveniente evaluar los péptidos de *C. spurius* poniendo a prueba su efecto sobre la coordinación motora de ratas, en un cilindro giratorio (ver Material y Métodos). Por las razones ya mencionadas, se decidió evaluar los péptidos PI y PIIB. A pesar de que PI tuvo efectos "motores" en ratones (Maillo, 2001), las evaluaciones de los péptidos PI y PIIB, no mostraron un efecto o cambio significativo producido por alguno de los dos péptidos purificados inyectados.

Existe la hipótesis de que la producción de los componentes del veneno de los *Conus* depende de cierta manera de la especificidad de su alimentación (Fainzilber et al., 1991). De hecho, estudios farmacológicos de los venenos de más de cuarenta especies de *Conus* indicaron que sólo las especies piscívoras tienen un efecto de parálisis exclusivo en ratones y no en moluscos y poliquetos (otros de los bioensayos utilizados) (Endean and Rudkin, 1963). Los venenos de especies vermívoras tuvieron efecto sobre la coordinación de los movimientos en poliquetos; inmediatamente después de la inyección, los gusanos se retorcieron y sus movimientos con el tiempo se hicieron muy lentos, hasta llegar a la ausencia de respuesta ante una estimulación; 24 horas después, los gusanos habían muerto aparentemente. Al probar dichos venenos sobre moluscos, éstos no fueron paralizados; una explicación posible es que los venenos son también utilizados como defensa contra otros moluscos (predadores), que en este caso no son las presas naturales de los *Conus* vermívoros. También observaron que sólo tres de las siete especies vermívoras paralizaron a anélidos de la especie *Phyllodoce malmgremi*, lo que sugiere que ciertas especies de *Conus* vermívoras son tóxicas en especies específicas de poliquetos.

Una posible explicación de los resultados negativos obtenidos en las evaluaciones de los péptidos PI y PIIB podría ser que estas conotoxinas no tengan blancos en este sistema biológico, por no ser parecidos a los receptores en sus presas naturales; esta explicación concuerda con la hipótesis de Fainzilber et al. (1991), mencionada antes. Otra evidencia que apoya dicha hipótesis son los resultados de

estudios biológicos de conotoxinas de *Conus* molusquicívoros (probadas en moluscos, insectos y peces) que mostraron la especificidad y alta afinidad hacia sus receptores selectivamente en moluscos (Fainzilber *et al.*, 1991; Fainzilber and Zlotkin 1992; Hasson *et al.*, 1995). Por otra parte, se sabe que para un bloqueo completo de la entrada de sodio en neuronas de *Aplysia*, un molusco nudibranquio, se requiere una concentración de tetrodotoxina mucho mayor (0.2 mM) que la necesaria para ver este mismo efecto sobre mamíferos (Byrne, 1980).

Otro aspecto a considerar es que la diversidad de las conotoxinas no sólo está dada entre superfamilias y familias de estos péptidos, sino que también está determinada por una excepcional variedad conferida por las características estructurales tridimensionales de las conotoxinas de cada familia (Conticello *et al.*, 2001; Duda and Palumbi, 2000; Olivera *et al.*, 1999; Woodward *et al.*, 1990). La importancia de la relación estructura-actividad, es decir la especificidad de las conotoxinas, es posible relacionarla con los datos obtenidos por Walker *et al.* (1999) con ensayos biológicos de conotoxinas T (a cuya familia, sabemos ahora, pertenecen las conotoxinas caracterizadas en este estudio). Los resultados fueron los siguientes: de las conotoxinas aisladas de *Conus* molusquicívoros (tx5a y au5a) y piscívoros (p5a) evaluadas en ratones y peces, sólo la tx5a (denominada ϵ -TxIX por Rigby *et al.*, 1999), la cual tiene un gran número de las modificaciones postraduccionales (Tabla 3) observadas dentro de las conotoxinas (Craig *et al.*, 1999), tuvo efecto tanto en ratones como en peces, mientras que las otras dos sólo tuvieron actividad en peces.

Al comparar las conotoxinas valoradas biológicamente en este estudio con otras T conotoxinas se observa que PIIB y PI son más parecidas (por la ausencia de modificaciones postraduccionales y la conservación de 7 residuos incluyendo a los residuos de cisteína) a las conotoxinas que sólo tuvieron efecto en sus presas naturales (Tabla 7). Por lo tanto, se puede especular sobre la ausencia de efecto de nuestras conotoxinas; aunque comparten algunas características estructurales (espaciamiento entre los pares de cisteínas y puentes disulfuro) con las conotoxinas de la superfamilia T, por sus características estructurales particulares (secuencia), las toxinas PIIB y PI pudieran tener efecto sólo en sus presas naturales, y no en ratas. Algunos estudios con conopéptidos aislados soportan el cuadro de la especificidad filogenética del veneno de

los *Conus*; un conopéptido del veneno de una especie particular es generalmente específico sobre blancos en el Phylum al cual sus presas pertenecen. Por ejemplo, las α conotoxinas GI y MI, de *C. geographus* y *C. magus*, respectivamente, son generalmente activos sobre sistemas de vertebrados; influyen en la función de receptores nicotínicos a acetilcolina, no sólo en peces sino también en otros sistemas de probados (mamíferos). En contraste, la α conotoxina SI parece ser filogenéticamente más restringida en su actividad biológica: este péptido puede inhibir receptores nicotínicos acetilcolinérgicos en peces y en elasmobranquios (torpedo), pero su actividad en sistemas de mamíferos es de un orden de magnitud menor. Aunque las secuencias son no muy diferentes, hay una diferencia extraordinaria en la conformación de estos péptidos (Pardi *et al.*, 1989). Variaciones considerables en la actividad de ω conotoxinas en diferentes sistemas de vertebrados han sido también observadas (Ramilo *et al.*, 1992).

Otro ejemplo de la importancia de la estructura tridimensional de las conotoxinas en la determinación de su especificidad está dado por el papel de la hipervariabilidad de las regiones intercisteínas en la actividad de ciertas conotoxinas. Éste se manifiesta en la alta diversidad que han alcanzado los *Conus* en sus toxinas, con tan sólo la variación del uso de andamios estructurales de 2 o 3 tres lazos o "loops" generados por la conectividad entre cisteínas. En los lazos, las cadenas laterales de sus residuos de aminoácidos hipervariados actúan como grupos funcionales que influyen en su selectividad hacia distintos subtipos de receptores (Craik and Dutton, 2001). Experimentalmente, se ha observado que la sustitución de un único residuo en estos andamios es suficiente para alterar, en dos órdenes de magnitud, su perfil de selectividad para un subtipo dado de receptor (Luo *et al.*, 1999). Otro ejemplo, son las contribuciones de varios grupos funcionales sobre el "farmacóforo" de la ω conotoxina GVIA la cual bloquea a canales de calcio tipo N. Estas contribuciones han sido investigadas haciendo estudios estructurales y estudios de funcionalidad *in vitro* de análogos con sustitución de uno o dos posiciones con aminoácidos no nativos; una quimera con dos sustituciones de las ω conotoxinas GVIA y MVIIA fue más potente que cualquier molécula nativa GVIA o MVIIA). Estos resultados señalan la importancia del estudio estricto de la complejidad estructural de los conopéptidos en el diseño futuro de

análogos (péptidos truncados y péptidomiméticos) (Flinn *et al.*, 1999a). Con análogos de la conotoxina GVIA con la eliminación del puente disulfuro entre la Cys-15 y la Cys-26 (por la sustitución de estos residuos por serinas) se encontró que dicho enlace es esencial para la estabilidad de su estructura tridimensional y para su actividad bloqueadora sobre la función de los canales de calcio (Flinn *et al.*, 1999b).

Aunque se ha mostrado la alta afinidad y selectividad general de las conotoxinas, no se puede descartar que la ausencia de efecto de los péptidos PIIB y PI se haya debido a las concentraciones usadas. Un ejemplo claro es la conotoxina-GVIA que bloquea canales de Ca^{++} dependientes de voltaje (Olivera *et al.*, 1990) con una K_d en el rango de 10 a 500 pM en vertebrados (McCleskey *et al.*, 1987); esta sugerencia es también apoyada por las dosis similares usadas en bioensayos de otras conotoxinas probadas por inyecciones intracerebroventriculares en ratas y ratones con las que sí se observó efecto o actividad (Olivera *et al.*, 1990, Fu *et al.*, 1999, Bush *et al.*, 2000).

Hasta este momento no descartamos la posibilidad de que las T conotoxinas PIIB y PI de *C. spurius* presenten blancos en sistemas de mamíferos; probablemente otras técnicas más sensibles y específicas como la unión específica ("binding") o la electrofisiología nos permitan reconocer algún blanco en sistemas biológicos diferentes a sus presas naturales. Hay evidencia de que ciertas conotoxinas específicas hacia sus receptores naturales muestran también unión específica, pero de manera silenciosa o sin actividad, en blancos homólogos de ratas (Schinchor *et al.*, 1996). También podría ser conveniente hacer ensayos biológicos en las presas naturales, por la alta especificidad que los *Conus* llegan a tener por ellas, y por lo tanto por los tipos de receptores en éstas.

La purificación y caracterización estructural de los péptidos estudiados fue importantemente complementada por la valoración de su actividad biológica (sobre el umbral al dolor por presión y sobre la coordinación motora rotacional) a través de la administración de éstos y de algunas fracciones del veneno de *C. spurius* por diferentes vías de administración como la intramuscular (datos no reportados), la intracerebroventricular, la intravenosa y la intratecal. Sin embargo, en términos farmacológicos no se pudo realizar un ensayo de dosis respuesta por la escasez de los péptidos puros; este problema puede solucionarse generalmente mediante la síntesis

de los compuestos. No obstante, cabe resaltar que si bien no se obtuvieron datos significativos con respecto a la caracterización biológica, la importancia de la metodología utilizada para dichos bioensayos es ampliamente reconocida para el estudio de sustancias con tan alto potencial farmacológico.

Las conotoxinas son moléculas que presentan una extrema hipervariabilidad de secuencias. Incluso entre toxinas homólogas de diferentes especies de *Conus* (Olivera et al., 1991) diversas secuencias pueden ser encontradas donde todos los péptidos tiene el mismo blanco en su presa (es decir, inactivan un receptor o canal específico). Cuando estas secuencias divergentes de conotoxinas homólogas son probadas en sistemas nerviosos tan complejos como el cerebro de los mamíferos alguno de los conopéptidos con frecuencia exhibe algo distinto en su actividad de unión específica.

Por lo tanto, la caracterización, tanto estructural como biológica, de las conotoxinas es crítica para poder usarlas como herramientas moleculares en el descubrimiento de variantes de ciertos tipos de receptores en los diferentes Phyla. También es fundamental para usarlas como base para el diseño de fármacos; esto último puede hacerse a partir del estudio valorativo del funcionamiento del sistema nervioso en mamíferos y los efectos tóxicos de moléculas exógenas (toxinas) que mimetizan la función de moléculas endógenas.

CONCLUSIONES

1.- Se determinaron las estructuras primarias completas de cuatro T conotoxinas, PIIB, PI, PII y PIII, con la corroboración del arreglo de sus cuatro cisteínas. Se encontró que la conotoxina PIII tiene una leucina más en su secuencia, con respecto a sus homólogos PI y PII, y que la conotoxina PIIB tiene una arginina en su extremo carboxilo.

2.- Se determinaron los puentes disulfuro de las T conotoxinas hidrofóbicas, PI, PII y PIII (I-III, II-IV, en los tres casos). Se encontró que el enlace entre la Cys-II y la Cys-IV no se encuentra expuesto en la superficie molecular de ninguna de los péptidos.

3.- No se encontró efecto de la conotoxina PI sobre el umbral al dolor por presión en la rata.

4.- No se encontró efecto de las conotoxinas PIIB y PI sobre la coordinación motora rotacional de la rata.

5.- Se encontró un efecto discreto de la fracción V sobre la duración en la ejecución motora de la rata.

6.- Se pusieron las bases para sintetizar los péptidos PI, PII, PIII y PIIB en cantidades suficientes para realizar los estudios farmacológicos necesarios para identificar su tipo y subtipo de blanco molecular.

REFERENCIAS

Abbott RT y Dance SP. 1990. Compendium of seashells 4th Edition EP Ductton, Inc., New York , USA Pp 267.

Adams ME, Myers RA, Imperial JS y Olivera BM. 1993. Toxotyping rat brain calcium channels with ω -toxins from spider and *Conus* snails venoms. *Biochemistry* **32**, 12566-70.

Balaji RA, Ohtakes A, Sato K, Gopalakrishnakone P, Kini RM, Seow KT y Bay B-H. 2000. λ -Conotoxins, a new family of conotoxins with unique disulfide pattern and protein folding. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 39516-22.

Bush LI, McCabe T y Hason GR. 2000. Selective antagonism of nigral neuropeptide responses to methamphetamine by conantokin G a naturally occurring conopeptide. *European Journal of Pharmacology* **387**, 55-58.

Bidlingmeyer BA, Cohen SA y Travin TL. 1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization *Journal of Chromatography* **336**,93-104.

Byrne JH. 1980. Analysis of ionic conductance mechanisms in motor cells mediating inking behavior in *Aplysia californica* *Journal of Neurophysiology* **43**, 630-650.

Conticello SG, Gilad Y, Avidan N, Ben-Asher E, Levy Z y Fainzilber M. 2001. Mechanisms for evoking hypervariability: the case of conopeptides. *Molecular Biology & Evolution* **18**, 120-131

Chang CC; y Lee CY. 1963. Isolation of neurotoxins from venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Archives of International Pharmacodynamics and Therapeutics* **144**, 241-257.

Craig AG, Bandyopadhyay P y Olivera BM. 1999. Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. *European Journal of Biochemistry* **264**, 271-275.

Craik JD y Dutton JL. 2001. α – conotoxins: nicotinic acetylcholine receptor antagonists as pharmacological tools and potential drug leads. *Current Medical Chemistry* **8**, 327

Duda TF y Palumbi RS. 2000. Evolutionary diversification of multigene families: allelic selection of toxins in predatory cone snails. *Molecular Biology & Evolution* **17**, 1286-1293

Endean R y Izat J. 1963. Pharmacological study of venom of the gastropod *Conus magus*. *Toxicon* **3**, 81-93

Endean R y Clare R. 1965. Studies of venoms of some Conidae. *Toxicon* **1**, 49-64.

Fainzilber M, Gordon D, Hasson A, Spira ME y Zlotkin E. 1991. Mollusc-specific toxins from venom of *Conus textile neovicarius*. *European Journal of Biochemistry* **202**, 589-595.

Fainzilber M y Zlotkin E. 1992. A new bioassay reveals mollusk-specific toxicity in molluscivorous *Conus* venom. *Toxicon* **30**, 465-469.

Flinn JP, Pallaghy PK, Lew MJ, Murphy R, Angus A y Norton RS. 1999a. Roles of key functional groups in ω conotoxin GVIA synthesis, structure and functional assay of selected peptide analogues. *Europe Journal Biochemistry* **262**, 447-455.

Flinn JP, Pallaghy PK, Lew MJ, Murphy R, Angus JA y Norton RS. 1999b. Role of disulfide bridges in the folding, structure and biological activity of ω conotoxin GVIA. *Biochimica et Biophysica Acta* **1434**, 177-190.

Fu Y, Matta SG, McIntosh JM y Sharp BM. 1999. Inhibition of nicotine—induced hippocampal norepinephrine release in rats by alpha-conotoxins MII and Aulb microinjected into the locus coeruleus. *Neuroscience Letters* **266**, 113-116.

Gray WR y Olivera BM. 1988. Peptide toxins from venomous conus snails. *Annual Review Biochemistry* **57**, 665-700.

Hasson A, Fainzilber M, Zlotkin E y Spira M. 1995 Electrophysiological characterization of a novel conotoxin that blocks molluscan sodium channels. *European journal of Neuroscience* **7**, 815-818.

Harvey AL. 2002. Toxins R Us: more pharmacological tools from nature's superstore. *Trends in Pharmacological Science* **23**, 201- 203.

Hodking AL y Huxley AF. 1952 Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *Journal Physiology* **116**, 449-472.

Jimenez EC, Shetty RP, Lirazán M, Rivier J, Walker C, Abogadie FC, Yoshikami D, Cruz LJ y Olivera BM. 2003. Novel excitatory *Conus* peptides define a new conotoxin superfamily. *Journal of Neurochemistry* **85**, 610-621.

Kohn AJ y Nybakken JM. 1975. Ecology of *Conus* on Eastern Indian ocean fringing reefs: diversity of species and resource utilization. *Marine Biology* **29**, 211- 234.

Luo S, Nguyen TA, Cartier GE, Olivera BM, Yoshikami D y McIntosh JM. 1999. Single-residue alteration in ω -conotoxin PnIA switches its nAChR subtype selectivity. *Biochemistry* **38**, 14542-14548.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr IL y Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265 – 275.

Maillo Peñalver María Aracelis 2001. Extracción, purificación y caracterización química y biológica de péptidos neuroactivos provenientes de especies de *Conus*. Tesis Doctoral (Instituto de Neurobiología UNAM) Pp 50-53.

McCleskey EW, Fox AP, Feldman DH, Cruz LJ, Olivera BM, Tsien RW y Yoshikami D. 1987. *Proceedings. National Academic of Science USA* **84**, 4327-4331.

McIntosh JM, Foderaro TA, Li W, Ireland CM y Olivera BM. 1993. Presence of serotonin in the venom of *Conus imperialis* *Toxicon* **32**,1561-66.

McIntosh JM, Yoshikami D, Li W, Mahe E, Nielsen DB, Rivier JE, Gray WR y Olivera BM. 1994. A nicotine acetylcholine receptor ligand of unique specificity α Conotoxin Iml. *Journal of biological Chemistry* **269**, 16733-17639.

McIntosh DS, Ghomashchi F, Gelb MH, Dooley DJ, Stoehr SJ, Giordani AB, Nabisbitt SR y Olivera BM. 1995. Conodipine-M, a novel phospholipase A₂ isolated from venom of marine snail *Conus magus*. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 3518-26.

McIntosh JM, de Santos A y Olivera BM. 1999. *Conus* peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annual Review Biochemistry* **68**, 59 -88

McIntosh JM, Corpuz GO, Layer RT, Garrett JE, Wagstaff JD, Bulag G, Vyazovkina A, Yoshikami D, Cruz LJ y Olivera BM. 2000. Isolation and characterization of a novel *Conus* peptide with apparent antinociceptive activity. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 32391-97.

McIntosh JM y Jones RM. 2001. Cone venom- from accidental stings to deliberate injection. *Toxicon* **39**, 1447-1451.

Nakamura H, Kobayashi J, Ohizumi Y y Hirata Y. 1982. The occurrence of arachidonic acid in the venom duct of the marine snail *Conus textile*. *Experientia* **38**, 897

Narahashi T, Moore JW y Scott WR. 1964. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant neurons. *Journal of General Physiology* **47**, 965-974.

Nielsen DB, Dykert J, Rivier JE y McIntosh JM 1994. Isolation of Lys-conopressin-G from the venom of the worm-hunting snail *Conus imperialis*. *Toxicon* **32**, 845-848.

Olivera BM, Gray WR, Zeikus T, McIntosh JM, Varga J, Rivier J, De Santos V, Cruz LJ. 1985. Peptide neurotoxins from fish hunting cone snails. *Science* **230**, 1338-1343.

Olivera BM, Rivier J, Clark C, Ramilo CA, Corpuz GP, Abogadie FC, Mena EE, Woodward SR, Hillyard DR y Cruz JL. 1990. Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science* **249**, 257-263.

Olivera BM, Rivier J, Scott JK, Hillyard DR y Cruz LJ. 1991. Conotoxins. *Journal of biological Chemistry* **33**, 22067-22070.

Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J y Adams ME. 1994. Calcium Channel Diversity and Neurotransmitter Release: The ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Annual. Review of Biochemistry* **63**, 823-67.

Olivera BM, Cruz JL y Doju Y. 1999. Effects of *Conus* peptides on the behavior of mice. *Neurobiology of Behavior* **9**, 772-777.

Olivera BM. 2002. *Conus* venom peptides: reflections from the biology of clades and species. *Ann. Rev Ecol Syst* **33**, 25-42.

Pardi A, Goldes J, Florance J y Manicomte D. 1989. Solution structures of α conotoxins determined by two-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* **28**, 5494-5501.

Paxinos G y Watson CH. 1982. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.

Ramilo CA, Zafaralla GC, Nadasdi L, Hammerland LG, Yoshikami D, Gray WR, Kristipati R, Ramachandran J, Miljanich G, Olivera BM y Cruz LJ. 1992. Novel α and ω conotoxins from *Conus striatus* venom. *Biochemistry* **31**, 9919-9926.

Rigby AC, Lucas-Meunier E, Kalume ED, Czerwiec E, Hambe B, Dahlqvist I, Fossier P, Baux G, Roepstorff P, Baleja JD, Furie BC, Furie B y Stenflo J. 1999. A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca^{2+} influx. *Proceedings National Academic Science. USA* **96**, 5758-63.

Sharpe IA, Gehrmann J, Marion L, Loughnan L, Thomas L, Adams DA, Atkins A, Palant E, Craik DJ, Adams JD, Alewood PF y Lewis RJ. 2001. Two new classes of conopeptides inhibit the α 1- adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nature neuroscience* **4**, 902-907.

Shinchor I, Fainzilber M, Pelhate M, Malecot CO, Zlotkin E y Gordon D. 1996. Interactions of δ conotoxins with alkaloid neurotoxins reveal differences between the silent and effective binding sites on voltage sensitive sodium channels. *Journal of Neurochemistry* **67**, 2451-2460.

Van den Hooven HW, van den Burg HA, Vossen P, Boeren S, Wit PJGM y Vervoort J. 2001. Disulfide bond structure of the AVR9 elicitor of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: Evidence for a cystine knot. *Biochemistry* **40**, 3458-3466.

Walker CS, Steel D, Jacobsen R, Lirazan MB, Cruz LJ, Hopper D, Shetty R, de la Cruz C, Nielsen JS, Zhou LM, Bandyopadhyay, P, Craig AG y Olivera BM. 1999. The T-superfamily of conotoxins. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 30664-77

Woodward SR, Cruz LJ, Olivera BM y Hillyard DR. 1990. Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *The EMBO Journal* **9**, 1015-1020.