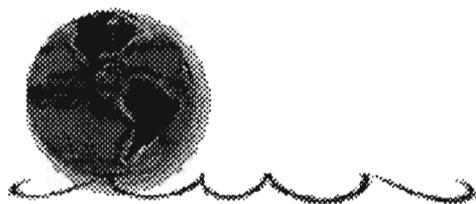


00385



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología  
Universidad Nacional Autónoma de México

**“Caracterización bioquímica y biológica de las  
toxinas del caracol marino *Conus austini*”**

**Tesis**

Que para obtener el grado académico de

Doctor en Ciencias  
(Biología Marina)

Presenta

M. en C. Alejandro Zugasti Cruz

**Director de Tesis: Dr. Edgar Heimer de la Cotera**

Comité tutorial: Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez  
Dr. Roberto Arreguín Espinosa  
Dr. José Luis Carballo Cenizo

México D.F., 2005

m. 352199



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIA**

Gracias a mi madre María Isabel Cruz, a mi hermano Carlos Zugasti y su esposa Irene Pérez, por su apoyo y amor constante. De igual manera a mis tíos Ismael Cruz y Rosa María Reséndiz, y mi primo Karim Ismael. A mis abuelos (q.e.p.d.) Felipe Cruz y María Cristina Beas.

A mi esposa Ana Cecilia por su amor, paciencia y motivación, que han cambiado mi vida. A la familia Cepeda Nieto: Francisco, Ana Cecilia, Lorena, Sandra, Gabriel y el pequeño Eduardo.

También a mis compañeros del laboratorio de Neurofarmacología, presentes y antiguos.

A Leticia y Laura por el apoyo y amistad brindados en demasía desde que tuve la fortuna de conocerlas en la maestría.



- Laboratorio de Neurofarmacología Marina, perteneciente al Instituto de Neurobiología, UNAM (Juriquilla Querétaro), a cargo de los Dres. Edgar Heimer de la Cotera y Manuel Aguilar Ramírez, donde se elaboró este trabajo.
- Al CONACYT, por proporcionar la beca de doctorado no. 144622.
- A la DGEP, por el apoyo económico recibido durante el doctorado.
- A la fundación Telmex, por el apoyo recibido durante este posgrado.
- Por el apoyo recibido de los Proyectos CONACYT # 41477Q y 30701-N, a cargo del Dr. Edgar Heimer de la Cotera, y 43754-Q, bajo la dirección del Dr. Manuel Aguilar Ramírez.
- Al Proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM, por el apoyo recibido del proyecto # IN204403; responsable: Dr. Edgar Heimer de la Cotera.

También, deseo agradecer a las siguientes personas del Instituto de Neurobiología de la UNAM el apoyo brindado:

- Biól. Exp. Andrés Falcón Alcántara, adscrito al Laboratorio de Neurofarmacología Marina, por su apoyo en diferentes técnicas bioquímicas.
- A la Biól. María Eugenia Ramos, por la recolección de los caracoles utilizados.
- Al MVZ. Martín García Servín, por proporcionar los ratones utilizados en los experimentos.

- A la Lic. María de Lourdes Lara Ayala, por encargarse de realizar las videoconferencias durante los exámenes tutorales.
- Al M. en C. Leopoldo González Santos, por la asesoría con el microscopio óptico y las imágenes obtenidas.
- A la Bib. María del Pilar Galarza Barrios y al Bib. Rafael Silva Cruz, por el material bibliográfico proporcionado.
- A la Dra. Dorothy Pless por su valiosa corrección y comentarios del artículo publicado.

También, deseo agradecer a las siguientes personas del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM el apoyo brindado:

- Al Dr. Martín Merino Ibarra, Jefe del Posgrado del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, y a su equipo de colaboradores: Chantal, Guadalupe, Diana y Gabriela.
- A los oficiales y tripulación del Buque Oceanográfico Justo Sierra (UNAM), durante la campaña SIGSBEE 5, bajo la dirección de la Dra. Elva Escobar Briones.

## CONTENIDO

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTOS	2
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	12
1. Aspectos biológicos y ecológicos de los caracoles <i>Conus</i>	13
2. Aspectos biológicos y ecológicos de <i>Conus austini</i>	15
3. Aparato venenoso de los caracoles <i>Conus</i>	18
4. Clasificación y farmacología de las toxinas de <i>Conus</i>	20
5. Actividad fisiológica de las conotoxinas	22
II. ANTECEDENTES GENERALES	26
III. ANTECEDENTES DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN MÉXICO	29
IV. JUSTIFICACIÓN	29
V. HIPÓTESIS	30
VI. OBJETIVOS	31
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Recolección de <i>C. austini</i>	32
2. Identificación de la dieta de <i>C. austini</i>	32
3. Caracterización bioquímica de algunos péptidos del veneno	
3a. Preparación del extracto venenoso	32
3b. Purificación de los péptidos por HPLC	33
3c. Reducción y alquilación de los péptidos	34
3d. Secuenciación de los péptidos	35
3e. Espectrometría de masas	35
3f. Corte enzimático del péptido as15a	36
3g. Análisis de aminoácidos de los péptidos as15a y as14b	36

4. Inyección de los péptidos purificados en diferentes sistemas biológicos	
4a. Inyección en el sistema nervioso central de roedores	37
4b. Inyección intramuscular en peces	38
4c. Inyecciones intramusculares en moluscos	39
<b>VIII. RESULTADOS</b>	
1. Aspectos morfométricos de <i>Conus austini</i>	40
2. Determinación del tipo de alimentación de <i>C. austini</i>	40
3. Caracterización bioquímica	
3a. Obtención del extracto crudo	40
3b. Purificación de las toxinas	41
3c. Reducción y alquilación	44
3d. Masas moleculares de los péptidos purificados	45
3e. Estructura primaria de los péptidos purificados	48
3f. Corte enzimático del péptido as15a	51
3g. Análisis de aminoácidos de los péptidos as15a y as14b	52
4. Actividad biológica de los péptidos	53
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	58
<b>X. CONCLUSIONES</b>	72
<b>XI. REFERENCIAS</b>	73
<b>XII. ARTÍCULO PUBLICADO</b>	85
<b>APÉNDICES</b>	91

## LISTA DE TABLAS

No.	Descripción	Pag.
1	Superfamilias y familias de conotoxinas	21
2	Conotoxinas en fase de estudios clínicos	29
3	Secuencias de aminoácidos de las toxinas del veneno de <i>C. austini</i>	48
4	Secuencias obtenidas de los fragmentos resultantes del péptido as15a	48
5	Análisis de aminoácidos de los péptidos as15a y as14b	52
6	Actividad biológica del péptido as15a de <i>C. austini</i> en ratones	55
7	Actividad biológica en ratón de los péptidos as14a y as14b de <i>C. austini</i>	56
8	Actividad biológica del péptido as7a de <i>C. austini</i> en <i>Pomacea paludosa</i>	57
9	Propiedades de conotoxinas con 6 cisteínas	60
10	Comparación entre la toxina as7a y otras $\gamma$ -conotoxinas caracterizadas	61
11	Alineamiento de secuencias de los péptidos as14a/b con el péptido Con14	62
12	Propiedades de conotoxinas con 4 cisteínas	63

## LISTA DE FIGURAS

No.	Descripción	Pag.
1	Mapa de la zona de recolección de los ejemplares estudiados	16
2A	Fotografía de la concha de <i>C. austini</i>	17
2B	Fotografía microscópica de una queta encontrada en el contenido estomacal de <i>C. austini</i>	17
3	Aparato venenoso de <i>Conus</i>	19
4	Perfil cromatográfico del veneno total de <i>C. geographus</i>	27
5	Separación cromatográfica por HPLC del extracto crudo de <i>C. austini</i>	41
6	Purificación de las toxinas de <i>C. austini</i> en una columna analítica C18	42
7	Purificación de las toxinas de <i>C. austini</i> en una columna analítica C8	43
8	Perfil cromatográfico de los péptidos reducidos y alquilados	44
9A.	Espectro de masa del péptido purificado as15a por MALDI-TOF	45
9B-C	Espectros de masas de los péptidos purificados asB y as7a por MALDI-TOF	46
9D-E	Espectros de masas de los péptidos purificados as14a y as14b por MALDI-TOF	47
10	Perfil cromatográfico del péptido as15a después del corte enzimático	51

## RESUMEN

Los caracoles predadores *Conus* producen un veneno distintivo y complejo formado principalmente por péptidos. En los últimos veinticinco años se han estudiado los venenos de diferentes especies de *Conus*, principalmente de la región del Indopacífico. En este trabajo se realizó la caracterización bioquímica de algunas toxinas extraídas de la especie *Conus austini*, recolectada en el Golfo de México, y se evaluó el efecto tóxico de los péptidos purificados en diferentes organismos –ratones, moluscos y peces-. También se identificó la alimentación de *C. austini*, que consistió de gusanos poliquetos.

Se purificaron 5 péptidos del veneno de *C. austini* por HPLC, denominados: as7a, asB, as14a, as14b y as15a. Se determinó su estructura primaria mediante reducción y alquilación, composición de aminoácidos y secuenciación automática de Edman. Se obtuvo su masa molecular (por espectrometría de masas). Las secuencias obtenidas fueron:

Péptido	Secuencia de aminoácidos
as15a	CKCPSCNFNDVTENCKCCIFRQP&
asB	SLYSOWK $\gamma$ KM $\gamma\gamma$ AAGG...
as7a	TCKQKGEGCSLDV $\gamma$ CCSSSCKPGGPLDFDC
as14a	GGVGRCIYNCMNSGGGLNFIQCKTMCY
as14b	RWDVDQCIYYCLNGVVGYSYTECQTMCS&

Se utilizó la nomenclatura estándar para los aminoácidos.  $\gamma$ = gamma-carboxiglutamato. O= hidroxiprolina. &= extremo carboxilo amidado.

La conotoxina as15a presentó un nuevo patrón en los residuos de cisteínas: C-C-C-C-CC y provocó parálisis en el sistema nervioso central de ratones, después de su inyección intracerebral. De igual forma, dos toxinas -as14a y as14b-, provocaron alteraciones en la conducta de ratones y tuvieron un patrón de cisteínas que no había sido encontrado en caracoles vermívoros (la secuencia C-C-C-C).

El péptido asB no presentó cisteínas, pero presentó otras modificaciones postraduccionales: 3 residuos de gamma-carboxiglutamato y uno de hidroxiprolina.

Por último, se caracterizó un péptido (as7a) similar a las gamma-conotoxinas. Es la segunda toxina de esta familia que se caracteriza de un caracol vermívoro. Este péptido causó síntomas tóxicos en un molusco (contracción del pie muscular), y no provocó actividad biológica aparente en vertebrados (ratones y peces).

## ABSTRACT

Venomous creatures, such as cone snails, produce and secrete venoms to defend themselves and to capture prey. Venom of the *Conus* genus is a rich source of biochemically active peptides. The majority of conopeptide characterized to date has been isolated primarily from Indopacific species. In this work, as the first stage of a systematic characterization of components of the venom of *Conus austini*, a vermivorous cone snail collected in the western Gulf of Mexico, Mexico, five novel conotoxins, named as7a, asB, as14a, as14b and as15a, were isolated by HPLC and biochemically characterized. Also the purified toxins were injected in different animals—mice, fishes and molluscs-, to define the biological effects of the purified toxins.

The amino acid sequence of the purified peptides were determined by automatic Edman sequencing after reduction and alkylation. In some cases, amino acid composition was made. The molecular masses of the native peptides were determined by MALDI-TOF mass spectrometry. The results are summarized in the next table:

Peptide	Amino acid sequence*
as15a	CKCPSCNFNDVTENCKCCIFRQP&
asB	SLYSOWK $\gamma$ KM $\gamma\gamma$ AAGG...
as7a	TCKQKGEGCSLDV $\gamma$ CCSSSCKPGGPLFDFDC
as14a	GGVGRCIYNCMNSGGGLNFIQCKTMCY
as14b	RWDVDQCIYYCLNGVVGYSYTECQTMCS&

\*Standard nomenclature was used to define amino acid.  $\gamma$ = gamma-carboxyglutamate. O= hidroxyproline. &= amidation.

Peptide as15a showed a new six cysteine pattern for conotoxins: C-C-C-C-CC. The injection of as15a in mice caused paralytic symptoms. Also, the intracerebral injection of peptides as14a/b in mice provoked behavioral distress and presented a new cysteine framework for vermivorous cone snails (i.e., C-C-C-C).

On the other hand, peptide asB presented 3 gamma-carboxyglutamate residues and one hydroxyproline, and no cysteines.

Peptide as7a showed six cysteine residues arranged in the pattern that defines the gamma-conotoxin family. The purified peptide elicited toxic effects in a mollusc after intramuscular injection, but it had no effect when injected into mice and fishes.

## I. INTRODUCCION

Los caracoles predadores del género *Comus* (único genero de la familia Conidae), producen un veneno distintivo, complejo y formado principalmente por péptidos. El veneno es el arma principal usada por estos moluscos carnívoros para capturar su presa y también se cree que es usado con propósitos defensivos y competitivos (Olivera & Cruz, 2001; Olivera, 2002). Los primeros péptidos de *Comus* fueron aislados y caracterizados hace más de dos décadas (Clark et al., 1981; Gray et al., 1981; Olivera et al., 1984, 1985a,b), y la investigación sistemática de sus toxinas ha continuado a pasos acelerados desde entonces. De manera general, el veneno de cada caracol *Comus* está constituido principalmente por péptidos, que han sido denominados conopéptidos o conotoxinas, los cuales ejercen una amplia gama de efectos biológicos en diferentes organismos. Hasta el momento, se han caracterizado las secuencias de aminoácidos de más de 100 conotoxinas, correspondientes a diferentes familias (Apéndices 1 y 2).

Una característica común de las conotoxinas es la presencia del aminoácido cisteína a lo largo de su estructura primaria, que permite de forma general la formación de puentes disulfuro usualmente con dos, tres o cuatro espacios intercisteínas. Las toxinas de escorpiones, serpientes y cnidarios siguen una tendencia similar con respecto a los componentes de su veneno: conservación de la secuencia de puentes disulfuro y variación de aquellas secuencias de los péptidos que están expuestas en la superficie de la molécula (Dauplais et al., 1997). De esta forma, los puentes bisulfuro le aportan una gran estabilidad y rigidez a las toxinas de *Comus* y otros animales, y con sólo algunos cambios en los residuos intercisteínas, se puede lograr que el péptido tenga efecto un blanco biológico diferente.

Además, las toxinas de los *Comus* presentan comúnmente una alta proporción de aminoácidos modificados postraduccionalmente. Algunas de estas modificaciones son relativamente comunes, como la amidación del carboxilo terminal y la formación de puentes disulfuro, y pueden ser encontradas en organismos diferentes del grupo *Comus*. No obstante, las conotoxinas tienen la densidad de puentes disulfuro más alta conocida en

cualquier sistema biológico (Terlau & Olivera, 2004). Por lo tanto, la identificación de los residuos de cisteína en una conotoxina es un paso clave para la caracterización bioquímica del péptido.

Otras modificaciones menos frecuentes que han sido identificadas en conotoxinas incluyen la  $\gamma$ -carboxilación del glutamato, la sulfatación de los residuos de tirosina, la bromación del triptófano, la O-glicosilación de la serina y la treonina, la ciclización N-terminal de la glutamina y la hidroxilación de la prolina (Craig et al., 1999a). Todas estas modificaciones aumentan la complejidad estructural de las conotoxinas. Sin embargo, todos los conopeptidos son traducidos a través del mecanismo ribosomal convencional, y el mRNA que codifica cada péptido puede ser identificado en el conducto venenoso (Colledge et al., 1992). De manera detallada, los péptidos de *Conus* son traducidos inicialmente como prepeptidos precursores. La organización canónica de los precursores de los conopeptidos consiste de una secuencia señal típica en el extremo N-terminal (la región “pre”), seguido por una región intermedia (la región “pro”), y finalmente se encuentra la región de la toxina madura en el extremo carboxilo. El rompimiento proteolítico del precursor para generar la toxina funcional final es un paso obligatorio en la maduración de los péptidos de *Conus* caracterizados a la fecha.

Durante 50 millones de años de evolución, los péptidos de *Conus* han sido optimizados para afectar las vías críticas de las señales del sistema nervioso de peces, moluscos o gusanos que constituyen sus presas. Las conotoxinas alcanzan sus blancos: canales iónicos, receptores superficiales celulares y transportadores, con una selectividad y afinidad muy altas (Olivera, 2002).

## 1. ASPECTOS BIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS DE LOS CARACOLES *Conus*

La mayor parte de los estudios ecológicos sobre caracoles *Conus* ha sido realizada por Alan Kohn (Universidad de Washington) desde los años 50 hasta la fecha, y se ha enfocado en la región del Indopacífico tropical, en ambientes de arrecifes coralinos y

bancos intermareales. La información siguiente corresponde a una síntesis de sus trabajos (Kohn 1956; 1959; 1967; 1971; 1983; 1997; 2001; Kohn et al., 1960; Kohn & Nybakken, 1975; Kohn & Perron, 1994):

El género *Comus* agrupa más de 500 especies y su distribución está limitada a los trópicos en ambos hemisferios. Las únicas excepciones son *C. californicus*, que habita las costas de Baja California Norte, en México, y California, en los Estados Unidos de América, y *C. ventricosus*, que se localiza en el Mar Mediterráneo. El mayor número de especies (>300) se localiza en la región del Indopacífico tropical. Esta región se extiende desde las Islas Marquesas e Islas Hawaianas, en el este, y se extiende a través de las cuencas del Océano Pacífico Tropical, y del Océano Índico, hasta el Mar Rojo y Golfo Pérsico. La diversidad en esta zona es muy alta, y en un arrecife pueden coexistir más de 30 especies de *Comus* (Kohn, 2001).

De las especies de *Comus* del Indopacífico estudiadas por Alan Kohn (~150), más del 75 % habitan arrecifes coralinos a profundidades menores de 20 m. El resto de las especies viven en bancos marinos intermareales. Estos dos ambientes, ilustran condiciones ambientales contrastantes (Kohn 1959, 1967, 1971, 1983, 1997). Los bancos intermareales son ambientes topográficamente uniformes, sujetos a condiciones físicas severas: desecación durante la marea baja, y acción del oleaje durante la marea alta. En contraste, los arrecifes coralinos son ambientes sumergidos, físicamente más estables y topográficamente más complejos, porque son un mosaico heterogéneo de diferentes tipos de sustrato, que incluye arenas calcáreas, arrecifes rocosos, coral vivo y muerto, algas calcáreas y no calcáreas, así como combinaciones intermedias de estos tipos, lo que permite diferentes hábitats para los caracoles.

Con respecto a la alimentación de los conos, las observaciones de campo, el mantenimiento en cautiverio y el estudio microscópico de los restos del contenido estomacal de diferentes especies han permitido descubrir la dieta de muchas de ellas (Kohn & Nybakken, 1975).

De esta forma, los caracoles *Conus* son divididos en tres grupos, de acuerdo al tipo de presa. El grupo más grande corresponde a las especies vermívoras (~80 %), que cazan una amplia diversidad de gusanos poliquetos, aunque algunas especies también atacan hemicordados y equiuroideos. El segundo grupo son los caracoles molusquívoros (~10 %), que atrapan caracoles de otras especies, incluidos otros conos. El tercer grupo se alimenta de peces (~10 %) (Kohn, 1956; Olivera et al., 1990).

El patrón que surge de los estudios es que las especies que cohabitan comen presas diferentes, y aquellos con dietas similares ocupan hábitats o microhábitats diferentes. Con pocas excepciones, cada especie de *Conus* caza de 2 a 10 (o más) especies diferentes de acuerdo con su grupo de alimentación (peces, moluscos o poliquetos). Los factores asociados al sustrato y al microhábitat también pueden determinar la distribución de algunas especies (Kohn, 1997). Por otra parte, los gasterópodos —el grupo *Conus* incluido—, puede tener como depredadores otros moluscos, crustáceos y peces (Floeter & Soares-Gomes, 1999; Trussell & Etter, 2001; Olivera, 2002).

## 2. ASPECTOS BIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS DE *Conus austini*

La especie *Conus austini* fue descrita por Rehder & Abbott, en 1951, y ha sido reportada en diferentes localidades del Golfo de México: Florida, Alabama, Texas; Tamaulipas, Tabasco y Banco de Campeche. También ha sido localizada en el Mar Caribe: Colombia, Antigua, Surinam (Rehder & Abbott, 1951; Abott, 1974; Coomans et al., 1981). La máxima profundidad en que ha sido recolectada la especie es de 180 m. La población estudiada de *C. austini* en este trabajo fue recolectada frente a las costas de Tamaulipas a profundidades de 50-90 m (Fig. 1).

En la plataforma continental de Tamaulipas, los sedimentos que predominan son lodos terrígenos, que provienen de los diferentes ríos que desembocan en el Golfo de México (De la Lanza-Espino, 1991; Escobar-Briones & Soto, 1997).

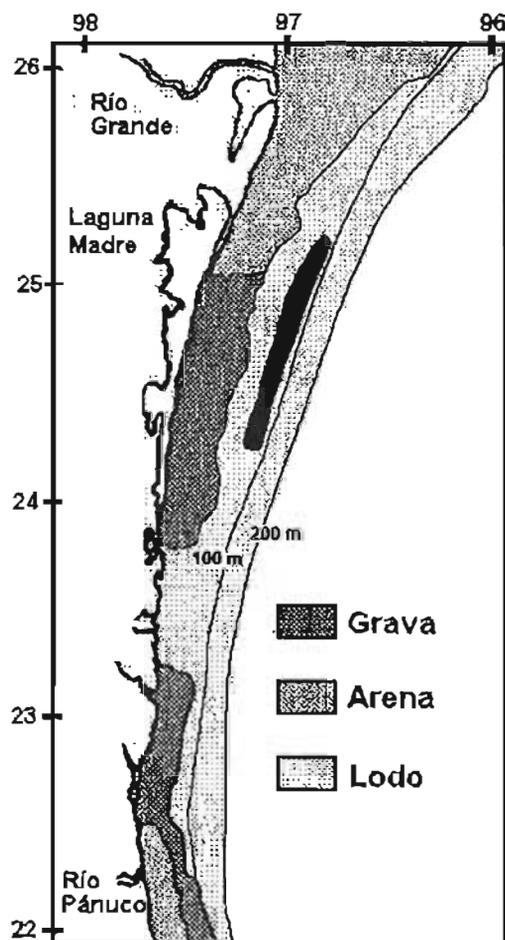


Figura 1. Zona de recolecta de *C. austini* (marcada con negro). Predominan los sedimentos compuestos por gravas y arenas en la zona costera, seguidos por lodos limosos y arcillosos a mayores profundidades. Los sedimentos provienen de las lagunas costeras y ríos aledaños a la plataforma de Tamaulipas (Tomado de Escobar-Briones & Soto, 1997).

La diversidad de *Comus* en la plataforma continental de Tamaulipas es baja, y todas las especies son vermívoras. En la zona litoral se han registrado únicamente las especies *C. mus*, *C. spurius* y *C. delessertii* (Pérez-Rodríguez, 1997). En la parte alejada de la costa, la diversidad de *Comus* está representada sólo por *C. austini* (este trabajo).

La especie *C. austini* alcanza una longitud máxima en la concha de 7 cm, de color blanco, mientras que el periostracum (la capa orgánica que la recubre) es de color amarillo o café. La concha presenta un patrón característico de marcas transversales y espirales en los costados, y un ápice pronunciado (Fig. 2A).

La alimentación de *C. austini* fue identificada en este trabajo, la cuál consistió de gusanos poliquetos. En la figura 2B se muestra los restos de una queta, estructura característica de estos gusanos.

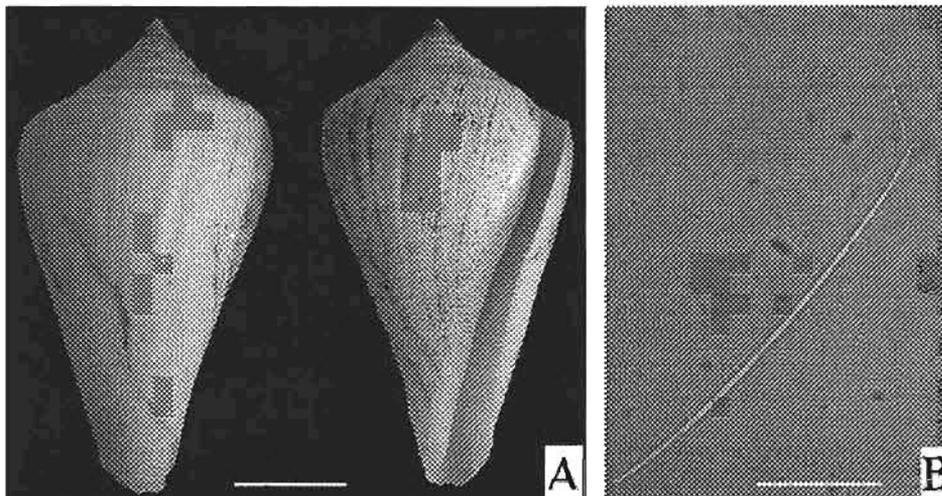


Figura 2A. *Comus austini* Rehder & Abbott, 1951. La barra representa 1 cm. Fig. 2B. Fotografía microscópica de una queta obtenida en el contenido estomacal de *C. austini*. La escala corresponde con 50  $\mu$ m.

Más de 10000 especies han sido identificadas a la fecha, correspondientes a 83 familias (Fauchald, 1977; Snelgrove et al., 1997; Hutchings, 1998). El número de especies y de individuos de poliquetos presentes en un hábitat están influenciados por el tipo de sedimento (Etter & Grassle, 1992), regímenes de salinidad (Stephenson et al., 1979), perturbaciones históricas (Gray, 1997), contenido de materia orgánica, asociaciones microbiales y disponibilidad de alimento (Snelgrove & Butman, 1994).

Se ha identificado una alta diversidad de gusanos poliquetos en la plataforma de Tamaulipas. Delgado-Blas en el 2001, reportó 88 especies de poliquetos pertenecientes a 33 familias, recolectados de fondos arenosos. La poca heterogeneidad ambiental, y la diversidad y abundancia de poliquetos en esta zona, probablemente determina en gran medida que se presenten pocas especies de *Comus*, todas ellas vermívoras.

### 3. APARATO VENENOSO DE *COMUS*

Los caracoles *Comus* son animales lentos (Fig. 3A), en contraste con peces, gusanos u otros caracoles que pueden ser más veloces. Por lo tanto, han desarrollado diversas adaptaciones para detectar, emboscar y capturar sus presas en su ambiente natural. Los caracoles cazan de noche. Cuando olfatean una presa por medio del osfradio (órgano olfativo localizado en el sifón, y considerado el más desarrollado de todos los gasterópodos), los conos extienden la probóscide, en cuya punta se encuentra colocado un diente radular. El diente es insertado en el cuerpo de la presa/depredador, y el veneno es inyectado (Kohn, 1956; Halstead & Halstead, 1988).

Se considera al aparato venenoso de los caracoles *Comus* como una de las estructuras anatómicas más complejas y sofisticadas para inyectar un veneno. El aparato venenoso (Fig. 3B), consiste de un conducto, donde el veneno es sintetizado y almacenado; un bulbo muscular, que se cree transfiere el veneno desde el conducto hacia la probóscide y, lo más sorprendente, un diente en forma de arpón que sujeta a la presa y sirve también como una aguja hipodérmica para inyectar el veneno (Fig. 3C).

La producción e inyección del veneno de *Comus* involucra 3 pasos:

- 1) Síntesis, procesamiento y empaque de las toxinas peptídicas en el conducto.
- 2) Generación y almacenaje de los dientes radulares en el saco radular, y la transferencia de un solo diente a la punta de la probóscide.
- 3) Inserción final del diente y la inyección del veneno (Halstead & Halstead, 1988).

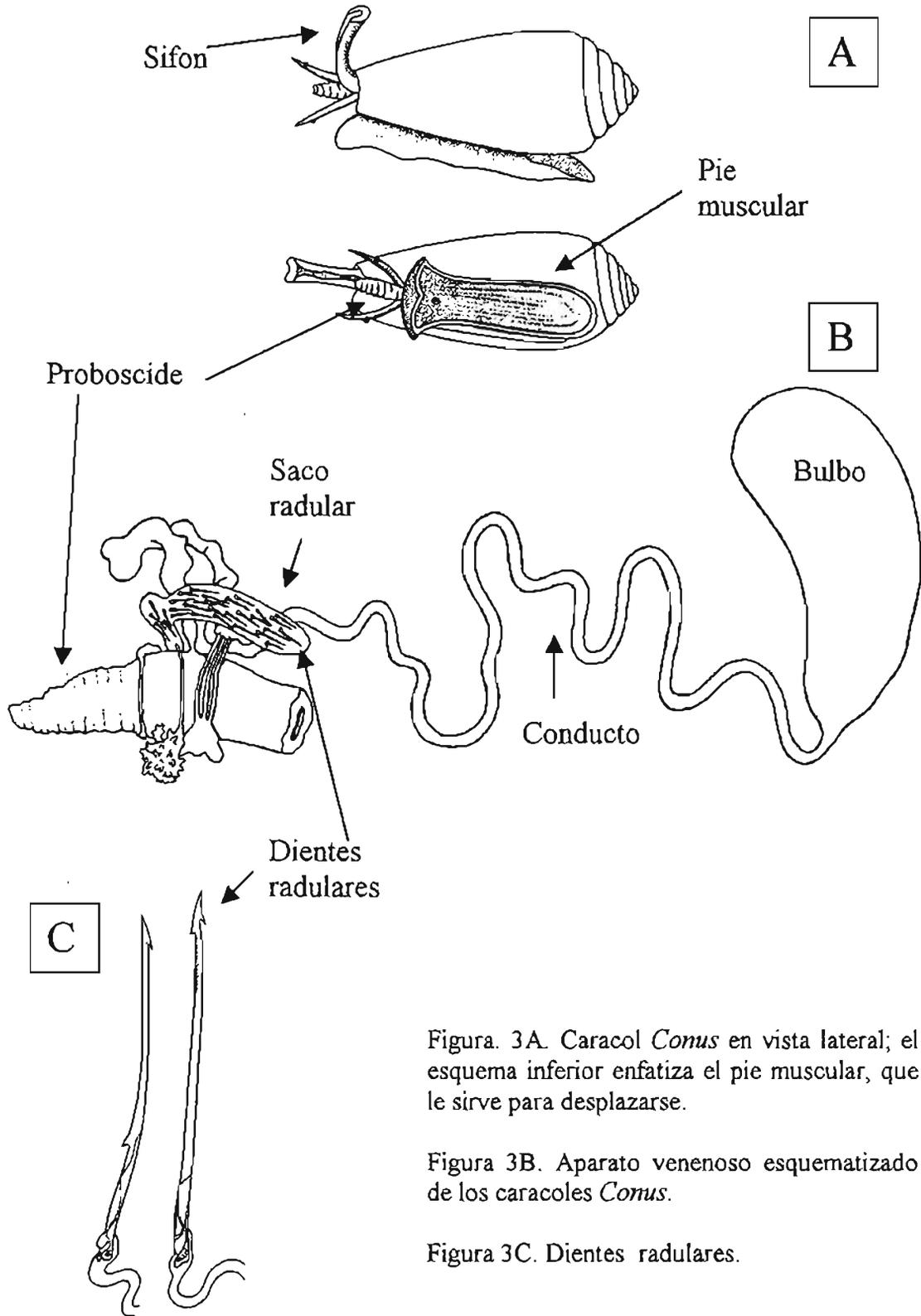


Figura. 3A. Caracol *Comus* en vista lateral; el esquema inferior enfatiza el pie muscular, que le sirve para desplazarse.

Figura 3B. Aparato venenoso esquematizado de los caracoles *Comus*.

Figura 3C. Dientes radulares.

#### 4. CLASIFICACIÓN Y FARMACOLOGÍA DE LAS TOXINAS DE *Conus*

Aunque se estima que pueden existir más de 50 000 secuencias únicas en los venenos de *Conus*, estos péptidos pueden ser clasificados en dos categorías principales: 1) péptidos que presentan varias cisteínas, referidos como “conotoxinas”; 2) aquellos péptidos (que han sido minoría), con ninguna o sólo un par de cisteínas, referidos como “conopéptidos” (Terlau & Olivera, 2004). En este trabajo de tesis se utilizará el término de conotoxina para designar cualquier péptido extraído del veneno de *Conus*.

Para nombrar los péptidos de *C. austini*, se utilizó el sistema de clasificación para las conotoxinas de Olivera y Cruz (2001). En este sistema, cuando se designa el nombre de una conotoxina (por ejemplo,  $\omega$ -conotoxina MVIIIC), la letra griega designa su acción farmacológica (es decir, canales de calcio). Un código de una o dos letras designa a la especie de *Conus* (La M designa a la especie *C. magus*), mientras que un número romano indica su patrón de cisteínas (en este caso, el patrón VII); por último, se coloca una letra mayúscula que designa la variante del péptido. Si la conotoxina no tiene el blanco farmacológico identificado (por ejemplo, tx9a), se utiliza el criterio anterior, pero se utilizan letras minúsculas y se designa el patrón de cisteínas con un número arábigo.

Para péptidos con el mismo blanco farmacológico pero diferente patrón de cisteínas, se usa una letra mayúscula después de la letra griega para designar una familia diferente (por ejemplo,  $\alpha$  y  $\alpha A$ ,  $\kappa$  y  $\kappa A$ ). Por otro lado, los péptidos que no presentan, o sólo tienen un puente disulfuro (que son los menos diversos y han sido encontrados en pocas especies), se les da un nombre dado de acuerdo a su blanco de acción o por alguna característica especial del compuesto, seguido por la letra mayúscula de la especie (por ejemplo, conopresina-S, de *C. striatus*, que actúa a niveles de receptores de vasopresina; el nombre conantocina-G, de *C. geographus*, se deriva del vocablo filipino conantokin, que significa sueño, por la actividad biológica que produce en el sistema nervioso de ratones).

Las toxinas de *Comus* han sido divididas además en superfamilias y familias. Los miembros de una superfamilia tienen una secuencia señal conservada altamente en sus precursores, y los de cada familia tienen en común la secuencia de residuos de cisteína en los péptidos maduros y un blanco farmacológico similar (Tabla 1).

Tabla 1. Superfamilias y familias de conotoxinas.

Superfamilia	Arreglo de cisteínas	Familia	Actividad farmacológica	Ejemplo
A	CC-C-C	$\alpha$	Antagonista R. ACh nicotínico	$\alpha$ -GI
	CCC-C-C-C	$\alpha A$	Antagonista R. ACh nicotínico	$\alpha$ -SII
	CC-C-C-C-C	$\alpha A$	Antagonista R. ACh nicotínico	$\alpha A$ -EIVA
	CC-C-C-C-C	$\kappa A$	Bloqueador canal K <sup>+</sup> AV	$\kappa A$ -SIVA
?	CC-C-C	$\rho$	Antagonista R. adrenérgico $\alpha 1$	$\rho$ -TIA
T	CC-CC	$\tau$ (ó $\epsilon$ )	Bloqueador canal Ca <sup>2+</sup> presináptico	$\epsilon$ -TxIX
	C-C-CPC	$\chi$ (ó $\lambda$ )	Inhibidor transportador NA	$\chi$ -MrI
O	C-C-CC-C-C	$\omega$	Bloqueador canal Ca <sup>2+</sup> AV	$\omega$ -GVIA
	C-C-CC-C-C	$\kappa$	Bloqueador canal K <sup>+</sup> AV	$\kappa$ -PVIA
	C-C-CC-C-C	$\delta$	Retrasa inactivación canal Na <sup>+</sup> AV	$\delta$ -TxVIA
	C-C-CC-C-C	$\mu O$	Bloqueador canal Na <sup>+</sup> AV	$\mu O$ -MrVIB
?	C-C-CC-C-C	$\gamma$	Modulador canal marcapaso	$\gamma$ -PnVIA
M	CC-C-C-CC	$\mu$	Bloqueador canal Na <sup>+</sup> AV	$\mu$ -GIIIA
	CC-C-C-CC	$\psi$	Antagonista R. ACh nicotínico	$\psi$ -PIIIE
	CC-C-C-CC	$\kappa M$	Bloqueador canal K <sup>+</sup> AV	$\kappa M$ -RIIIK
	CCC-C-C-C	No asignada	Bloqueador canal Na <sup>+</sup> AV	Vx2
P	C-C-C-C-C-C	Espasmódicos	?	gm9a, tx9a
I	C-C-CC-CC-C-C	Excitatorios	?	r11a, r11b
	C-C-CC-CC-C-C	$\kappa I$	Modulador canal K <sup>+</sup> AV Tipo BK	$\kappa I$ -BtX
S	C-C-C-C-C-C-C-C-C	$\sigma$	Antagonista R. 5-HT <sub>3</sub>	$\sigma$ -GVIIIA
?	C-C-C-C-C-C-C-C-C	$\alpha S$	Antagonista R. ACh nicotínico	$\alpha S$ -RVIIIA
	C-C	Conopresinas	Agonista R. vasopresina RPG	Conopresina-S
	C-C	Contrifanos	Modulador canal K <sup>+</sup> Tipo L	Contrifano-R
	No cisteínas	Conantoquinas	Antagonista R. NMDA	Conantoquina-G
	No cisteínas	Contulaquinas	Antagonista R. neurotensina	Contulaquina-G
	No cisteínas	Conorfamidas	?	Conorfamida Sr1

R= receptor; ACh= acetilcolina; AV=activado por voltaje; NA= noradrenalina; 5-HT<sub>3</sub>= 5-hidroxitriptamina; RPG= Receptor acoplado a proteínas G; NMDA= N-metil-D-aspartato. ? = no descubierto.

Basados en estos principios, se han descubierto 7 superfamilias (Tabla 1). Una superfamilia puede tener varias familias con actividades farmacológicas distintas: superfamilia A ( $\alpha$ -,  $\alpha A$ -,  $\kappa A$ - y  $\rho$ -conotoxinas); superfamilia T ( $\tau$ - y  $\chi$ -conotoxinas); superfamilia O ( $\omega$ -,  $\kappa$ -,  $\delta$ - y  $\mu O$ -conotoxinas); superfamilia M ( $\mu$ -,  $\kappa M$ - y  $\psi$ -conotoxinas); superfamilia P (conotoxinas espásticas); superfamilia I (péptidos excitatorios); superfamilia S ( $\sigma$  y  $\alpha S$ -conotoxinas). Algunas otras superfamilias no han sido designadas e incluyen las conopresinas, conantoquinas, contulaquinas, contrifanos y conorfamidas.

Así como existe una gran diversidad en las superfamilias y familias de las toxinas de *Conus*, una gran variedad de blancos farmacológicos han sido identificados, incluyendo muchos canales iónicos activados por voltaje y por ligando y receptores acoplados a proteínas G. Las familias de péptidos dentro de la superfamilia A incluyen las  $\alpha$ -conotoxinas y las  $\alpha A$ -conotoxinas, ambas antagonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina (Hopkins et al., 1995; Martínez et al., 1995); también se encuentran las  $\kappa A$ -conotoxinas, que bloquean los canales de potasio sensibles a voltaje (Craig et al., 1998). En la superfamilia M existen las  $\mu$ -conotoxinas, que bloquean los canales de sodio sensibles a voltaje. También están las  $\psi$ -conotoxinas, antagonistas no competitivos de receptores de acetilcolina nicotínicos. La superfamilia O ha sido la más diversa en términos de funciones farmacológicas. Los miembros de esta familia incluyen las  $\omega$ -conotoxinas, que bloquean los canales de calcio sensibles a voltaje, las  $\mu O$ -conotoxinas, que bloquean canales de sodio de células sensibles a voltaje y las  $\kappa$ -conotoxinas, que bloquean canales de potasio activados por voltaje (McIntosh & Jones, 2001).

## 5. ACTIVIDAD FISIOLÓGICA DE LAS CONOTOXINAS

Como grupo, los caracoles *Conus* son especialistas en neurofarmacología. Para lograr el efecto fisiológico deseado en la presa inyectada, predador o competidor, múltiples conopéptidos actúan en una forma conjunta. El término “camarilla de toxinas” ha sido aplicado a un conjunto de conopéptidos que actúan coordinadamente para lograr un efecto fisiológico paralítico.

El análisis sistemático de los componentes del veneno de caracoles piscívoros, principalmente de la especie *C. purpurascens*, definió la presencia de dos diferentes camarillas de toxinas en el veneno (Shon et al., 1995; 1997; 1998b), cuyos efectos son separables tanto en tiempo como en espacio.

El primero es un choque excitotóxico que causa la inmovilización inmediata de la presa inyectada; los componentes tóxicos incluyen péptidos que inhiben la inactivación del canal de sodio activado por voltaje, así como también péptidos que bloquean canales de potasio activados por voltaje. De esta forma, se realiza una despolarización masiva de los axones en la vecindad inmediata del sitio de la inyección, causando un efecto similar a una “electrocución” en el pez (Olivera, 2002).

El segundo efecto fisiológico consiste en la total inhibición de la transmisión neuromuscular, en sitios remotos del sitio de la inyección. Los péptidos que realizan esta acción solo se han encontrado en los venenos de conos piscívoros, e incluyen péptidos que inhiben canales de calcio presinápticos que controlan la liberación de neurotransmisores, así como a canales de sodio que intervienen en la generación del potencial de acción muscular (Terlau & Olivera, 2004).

Se desconoce si los componentes de los venenos de los conos molusquívoros y vermívoros también ejercen la acción combinada para lograr una parálisis más potente y rápida de la presa. Hay que tener en cuenta que los peces son presas rápidas que requieren de igual forma una parálisis rápida, a diferencia de moluscos y poliquetos, que pueden ser de movimientos más lentos, o como ciertos gusanos poliquetos, estáticos (por ejemplo, familia Sabellidae (Olivera, 2002; Terlau & Olivera, 2004)). No obstante, cada péptido tiene un efecto biológico específico en un blanco de manera independiente.

Las conotoxinas que tienen actividad en canales iónicos han sido ampliamente estudiadas. De esta manera, tres diferentes familias de péptidos de *Conus* son conocidas por enlazarse a canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje: las  $\mu$ - conotoxinas, que son bloqueadoras del canal; las  $\mu\text{O}$ - conotoxinas, que inhiben la conductancia del canal de

sodio, y las  $\delta$ - conotoxinas que retrasan o inhiben la inactivación rápida del canal de sodio.

Los péptidos de *Conus* que se enlazan a canales de  $K^+$  activados por voltaje apenas comienzan a caracterizarse; dos péptidos,  $\kappa$ -PVIIA y  $\kappa$ MRIIIK han sido investigados en considerable detalle (Shon et al., 1997; Ferber et al., 2003). Un aspecto contrastante entre péptidos que bloquean canales de  $K^+$  y aquellos que bloquean canales de  $Na^+$  es que los péptidos de *Conus* enlazados a canales de  $Na^+$  parecen estar ampliamente conservados en un amplio rango de especies de conos.

Las toxinas mejor caracterizadas han sido las  $\omega$ - conotoxinas, que bloquean canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje. Por ejemplo,  $\omega$ -GVIA es el péptido de *Conus* probablemente más usado en la neurociencia; más de 2000 publicaciones en la literatura muestran el uso de  $\omega$ -GVIA como una herramienta farmacológica, primariamente para inhibir la transmisión sináptica. A la fecha, las  $\omega$ -conotoxinas han sido identificadas principalmente en caracoles piscívoros, aunque también los conos molusquívoros presentan algunas toxinas, y probablemente los conos vermívoros han desarrollado un repertorio de péptidos que se enlazan a canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje (Jones & Bulaj, 2000; Livett et al., 2004).

Una familia de conopéptidos bastante estudiada ha sido las  $\alpha$ -conotoxinas, que tienen como blancos selectivos diversos subtipos del receptor nicotínico, tanto muscular como neuronal (Santos et al., 2004). Algunas  $\alpha$ -conotoxinas tienen un gran uso como ligandos selectivos en las neurociencias básica o con potencial para el desarrollo clínico (Tabla 2).

Determinar el blanco molecular en el que actúa una conotoxina no es una tarea fácil, dada la gran diversidad de funciones farmacológicas que han mostrado. Por lo tanto, la evaluación biológica de los componentes de un veneno puede iniciarse desde su inyección directa en un organismo. En el caso de las conotoxinas, para evaluar la actividad biológica de los péptidos se ha usado el ensayo de la inyección intracraneal de

los péptidos purificados en ratones, debido a que se puede obtener indicios rápidos de actividad tóxica en el sistema nervioso central de un vertebrado, y en algunas ocasiones, del canal o receptor iónico en el que están actuando (Olivera et al., 1999).

Para la evaluación farmacológica de diferentes conotoxinas también se han utilizado preparaciones biológicas de tejidos aislados de diferentes especies de vertebrados, por ejemplo útero de cobayo, músculo de rana, músculo cardíaco de rata, entre otros. Cada una de estas preparaciones presenta diferentes canales iónicos activados por ligando o voltaje, y mediante el uso de agonistas o antagonistas se trata de precisar el mecanismo de acción del compuesto evaluado.

Dado que la función del veneno de los caracoles del género *Comus* es la de inmovilizar y matar a sus presas, el blanco de acción principal de las conotoxinas recae en los canales iónicos de membranas que transmiten las señales químicas y eléctricas, o en los receptores que los modulan (Terlau & Olivera, 2004). Para determinar el canal iónico en el que actúa la conotoxina, las técnicas electrofisiológicas constituyen la herramienta más sensible. Se ha extendido el uso de ovocitos de *Xenopus laevis*, transfectados con un canal iónico particular, conectados por medio de electrodos a un sistema de registro; a estas células se les agregan las toxinas, y si existe un cambio particular en el flujo de iones se puede determinar el mecanismo de acción del veneno o la fracción evaluada.

La diversidad en los blancos de acción de las conotoxinas está asociada con un proceso de duplicación de *loci* muy rápido y una divergencia sin precedentes (Duda & Palumbi, 1999; Duda et al., 2001; Duda & Kohn, 2005). Además, se postula que las conotoxinas están bajo fuerte selección genética en respuesta a variaciones en la disponibilidad de un tipo de presas a través del tiempo, es decir, se presenta una “lucha estratégica (arms race)” entre las conotoxinas y los receptores de las presas. La coevolución del depredador y la presa pueden generar fuerzas evolutivas similares a las que tienen los hospederos-patógenos, y puede proveer de los mecanismos por los que *loci* genéticos ecológicamente relevantes se diversifican rápidamente (Duda et al., 2001).

## II. ANTECEDENTES

Las primeras investigaciones de los componentes activos de los venenos de *Conus* fueron motivadas por los reportes médicos de las personas que sufrieron picaduras, algunas de ellas mortales, de algunas especies de *Conus* de la región del Indopacífico (Halstead & Halstead, 1988; Cruz & White, 1995).

Los trabajos pioneros en la toxicología de *Conus* fueron hechos por Edean y colaboradores (Edean & Rudkin, 1963; 1965), quienes evaluaron el efecto de los venenos crudos de una gran variedad de especies de *Conus* en diferentes animales (peces, gasterópodos y poliquetos). Encontraron que existe selectividad de los venenos totales de *Conus* hacia el grupo de presas. No obstante, las interacciones detalladas entre una sola especie de *Conus* y los otros animales en su ambiente son en su mayor parte desconocidos; de esta forma, el espectro biológico que se encuentra en cualquier veneno no puede ser predicho *a priori*.

El primer péptido de *Conus* del que se determinó la secuencia de aminoácidos completa y subsecuentemente fue confirmada por síntesis química, fue la  $\alpha$ -GI, un péptido de 13 aminoácidos con dos puentes bisulfuro de *C. geographus* (Cruz et al., 1978; Gray et al., 1981). Después siguió la caracterización de las  $\mu$ -conotoxinas, el otro grupo mayor de péptidos paralizantes en mamíferos (Stone & Gray, 1982; Cruz et al., 1985a). La presencia de estos dos péptidos en el veneno de *C. geographus* explicó la letalidad que tuvo el veneno en los humanos (Cruz & White, 1995).

Los estudios realizados en la Universidad de Utah por Baldomero Olivera desde los años ochenta hasta la fecha han sido los más extensos con respecto a la caracterización bioquímica y farmacológica de péptidos aislados de *Conus*, principalmente de la región del Indopacífico. Sus investigaciones demostraron que los péptidos de *Conus*, cuando son inyectados en el sistema nervioso central de roedores, pueden alterar drásticamente la conducta de los animales (Clark et al., 1981; Olivera et al., 1990; 1999).

Las conotoxinas fueron identificadas inicialmente con base en la acción que ejercían cuando se inyectaban en el sistema nervioso central (SNC) del ratón. Uno de los estudios iniciales con la especie *Conus geographus* consistió en la inyección en el SNC de cada uno de las diferentes fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del veneno total, observándose que la mayor parte de éstas ejercían efectos que modificaban el comportamiento normal de los ratones, y que estas modificaciones eran de naturaleza variable según el péptido (Spence et al., 1977; Cruz et al., 1978; Clark et al., 1981; Olivera et al., 1985b) (Figura 4).

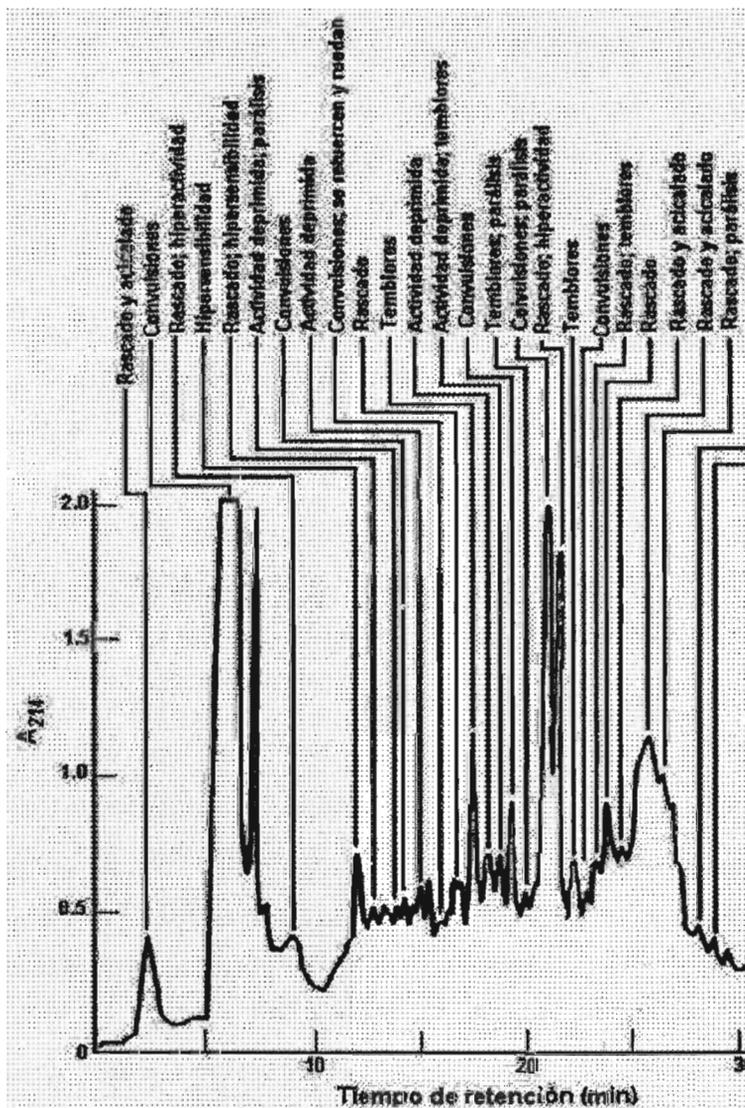


Figura 4.

Perfil cromatográfico del veneno total de *C. geographus*. Se muestran los efectos producidos por los diferentes péptidos en la conducta de los ratones. Tomado de Olivera, 2000.

La sintomatología característica que provocaban las toxinas en los ratones permitió definir algunas familias de conotoxinas. De esta forma, la inyección de  $\alpha$ - y  $\mu$ -conotoxinas en ratones, invariablemente produce la parálisis y muerte del animal; y las conopresinas producen un notable incremento en la actividad de “rascarse” y “acicalarse” de los ratones (Olivera et al., 1999).

Uno de los ejemplos más evidentes fue el aislamiento de las toxinas que provocan fuertes temblores en los animales, las que fueron denominadas  $\omega$ -conotoxinas (Olivera et al., 1984). De esta familia de conotoxinas se han aislado dos péptidos muy importantes: la  $\omega$ -conotoxina GVIA, que ha sido una de las toxinas más ampliamente usadas en neurociencia, ya que es útil para inhibir la transmisión sináptica y para evaluar si están presentes subtipos tipo N de los canales de calcio (Olivera et al., 1984). El otro caso es la  $\omega$ -conotoxina MVIIA, que ya ha sido aprobada como analgésico para bloquear el dolor en algunas enfermedades; su nombre comercial es Prialt (Wermwling, 2005).

Otros péptidos, después de la inyección intracraneal en los ratones, provocaron síntomas de adormecimiento/actividad trepadora en los animales (Fig. 4); después se demostró que estos compuestos eran antagonistas de los receptores NMDA y tienen potencial terapéutico para tratar la epilepsia (White et al., 2000).

De esta manera, se ha demostrado que los venenos producidos por estos animales contienen toxinas cuyos blancos de acción son los receptores del sistema nervioso y muscular donde actúan rápida, potente y específicamente.

Por lo tanto, la capacidad de las conotoxinas para actuar también como ligandos selectivos para canales y receptores del sistema nervioso de mamíferos, ha provocado un gran interés en la química y la neurofarmacología, por la capacidad de estos péptidos para discriminar subtipos de canales y receptores iónicos, y por su posible aplicación como fármacos (Alonso et al., 2003; Livett et al., 2004) (Tabla 2).

Tabla 2. Péptidos de *Comus* que se encuentran en etapa de investigación médica.

Especie	Conotoxina	Aplicación	Etapa clínica	Compañía
<i>C. victoriae</i>	$\alpha$ -Vc1.1	Dolor neuropático	Preclínica	Metabolic (Australia)
<i>C. catus</i>	$\omega$ -CVID	Dolor neuropático	Fase II	Amrad (Australia)
<i>C. marmoreus</i>	$\chi$ -MrIA/MIRV	Dolor neuropático	Preclínica	Xenome (EUA)
<i>C. geographus</i>	Contulaquina-G	Dolor crónico	Fase II	Cognetix (EUA)
<i>C. geographus</i>	Conantoquina-G	Epilepsia	Preclínica	Cognetix (EUA)

Tomado de Livett et al., 2004.

### III. ESTUDIOS REALIZADOS EN MÉXICO

Los estudios toxicológicos de *Comus* realizados en México han sido realizados en el Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología, bajo la supervisión del Dr. Edgar Heimer de la Cotera y del Dr. Manuel Aguilar Ramírez. De las investigaciones realizadas, Maillo y colaboradores (2002) lograron aislar y caracterizar una toxina -la conorfamida Sr1-, de la especie *C. spurius*, correspondiente a una nueva familia de péptidos. Asimismo, de la especie *C. delessertii*, se aisló un péptido similar a una  $\gamma$ -conotoxina (Aguilar et al., 2005a), y un péptido (de13a), el cual presentó un nuevo patrón de 8 cisteínas (Aguilar et al., 2005b). Con respecto a la especie *C. austini* que se trabajó en este proyecto, sólo existe un reporte acerca del efecto del veneno total en íleon aislado de cobayo (Feregrino-Pérez, 2004).

### IV. JUSTIFICACIÓN

Es conocido que la familia Conidae está conformada mundialmente por más de 500 especies que habitan principalmente regiones tropicales, constituyendo uno de los más diversos y dominantes géneros de depredadores. El uso de neurotoxinas ha sido la clave de su éxito: cada especie puede tener en promedio más de 100 diferentes péptidos con una actividad biológica definida. No obstante, a pesar de la riqueza natural que existe de las conotoxinas, sólo unos pocos péptidos de algunas especies de *Comus* han sido caracterizados.

Por lo tanto, se estudiaron las características bioquímicas y los efectos biológicos de los componentes purificados del veneno de *C. austini*, ya que no existían antecedentes publicados hasta el momento. De igual forma, también se estudió el tipo de alimentación de la especie *C. austini*.

Desde un aspecto bioquímico (y con cierta implicación evolutiva), fue de particular interés determinar si los componentes tóxicos de un caracol vermívoro del Golfo de México (*C. austini*), son similares en su estructura primaria (secuencia de aminoácidos) con toxinas aisladas de los caracoles de la región del Indopacífico. Además, las toxinas de los caracoles vermívoros han sido las menos estudiadas (Apéndices 1 y 2).

Desde un punto de vista farmacológico, se pretendió descubrir si los péptidos aislados presentaban actividad tóxica en un modelo de mamífero. Se seleccionó la especie *Mus musculus* (ratón), porque ha sido extensivamente usada para evaluar el efecto biológico de conotoxinas. Por otro lado, se investigó si las conotoxinas aisladas de *C. austini* tendrían un efecto biológico en otros organismos en los que se han evaluado otras conotoxinas, como son los peces y los moluscos. Por ejemplo, se ha demostrado que las conotoxinas de conos vermívoros pueden ejercer actividad biológica tóxica en ciertos peces –por ejemplo, el contrifano-Vn de *C. ventricosus* (Massilia et al., 2001). En el caso de los moluscos, se decidió utilizarlos como ensayos porque la  $\gamma$ -conotoxina aislada de *C. austini* fue similar estructuralmente a las  $\gamma$ -conotoxinas de conos molusquívoros (es decir, la toxina TxVIIA, de *C. textile* y la toxina PnVIIA, de *C. pennaceus*), que presentaron actividad biológica en moluscos dulceacuícolas o marinos (Fainzilber et al., 1998).

## V. HIPÓTESIS

El grupo de los caracoles vermívoros ha sido el menos estudiado con respecto a las propiedades bioquímicas de sus conotoxinas, y los estudios toxinológicos se han enfocado en su mayor parte a los caracoles del Indopacífico; por lo tanto, se esperan encontrar nuevas secuencias de toxinas de *C. austini*, una especie aislada geográficamente de las anteriores.

Se ha demostrado que los caracoles *Comus* producen una gran variedad de sustancias neurotóxicas, algunas de las cuales tienen un efecto biológico en animales que no son sus presas naturales; por lo tanto, los péptidos purificados de la especie *C. austini* ejercerán un efecto sobre canales iónicos y/o receptores del sistema nervioso de los modelos biológicos seleccionados.

## **VI. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Caracterizar bioquímicamente algunos de los componentes peptídicos mayoritarios del veneno de *Comus austini*, así como evaluar la especificidad y efectos biológicos de las toxinas aisladas en el sistema nervioso de diferentes animales.

### **Objetivos específicos**

1. Identificación del tipo de alimentación de la especie *Comus austini*.
2. Caracterización bioquímica de algunas conotoxinas del veneno de *C. austini*.
  - a) Purificación total de 5 péptidos del veneno de *C. austini*.
  - b) Determinación de la secuencia de aminoácidos de los péptidos.
3. Evaluación de la especificidad y actividad biológica tóxica de los péptidos purificados de *C. austini* en las especies *Mus musculus* (ratón), *Lebistes reticulatus* (pez), *Pomacea paludosa* y *Patella opaea* (moluscos).

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. RECOLECCIÓN DE LA ESPECIE *C. austini*

Los caracoles fueron recolectados del 14 al 19 de octubre del 2000 en la plataforma de Tamaulipas (a profundidades de 50-80 m), y fueron congelados inmediatamente a -20°C. Posteriormente fueron transportados al laboratorio de Neurofarmacología Marina, del Instituto de Neurobiología (Juriquilla, Querétaro), donde fueron congelados a -70 °C, hasta su estudio.

### 2. IDENTIFICACIÓN DEL TIPO DE ALIMENTACIÓN DE *C. austini*

La concha de 60 ejemplares fue rota con una prensa. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se observó el sistema digestivo -esófago, estómago e intestino- de los ejemplares, y se aislaron los contenidos estomacales. Los contenidos estomacales fueron preservados en formol al 5 % (formalina al 5 %; 95 % agua marina), luego colocados en portaobjetos y observados en un microscopio óptico.

### 3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ALGUNOS PÉPTIDOS DEL VENENO

#### a) PREPARACIÓN DEL EXTRACTO VENENOSO

Los conductos venenosos de 60 ejemplares se aislaron; los conductos fueron colocados en una solución de extracción de proteínas (2% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), 40% (v/v) de acetonitrilo (ACN)), y fueron homogenizados utilizando un homogenizador de tejidos de vidrio con punta de teflón, y centrifugados a 10 000 gravedades. El sobrenadante (extracto crudo) fue separado, y se le determinó la concentración de proteína total mediante el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar para la curva de calibración.

## b) PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS POR HPLC

Existen muchos métodos basados en líquidos para separar péptidos o proteínas de una mezcla compleja de compuestos biológicos. No obstante, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) ha sido una de las técnicas principales usadas para la separación de moléculas biológicas contenidas en los venenos animales.

Las separaciones por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) fueron hechas en un equipo Varian modelo Prostar 310. Se utilizó un asa de inyección de 1 ml. La detección de los péptidos fue realizada con un espectrofotómetro de flujo ajustado a 220 nm de longitud de onda. Se preparó la siguiente composición de disolventes: solución A (0.1 % de TFA en agua desionizada) y solución B (0.085 % TFA en ACN al 90 %).

Para la separación cromatográfica por RP-HPLC del extracto crudo de *C. austini*, se utilizó una columna analítica C18 (Vydac 218TP54, 4.6 x 250 mm; tamaño de partícula de 5  $\mu$ m), provista con una precolumna (Vydac, 218GK54, 5  $\mu$ m tamaño de partícula). A la columna se le aplicó 5% de solución B por 10 minutos; posteriormente, se desarrolló un gradiente de 5-55% de solución B en 100 minutos a un flujo de 1ml/min. En cada paso de purificación se cargó en la columna ~1 mg/ml de veneno crudo.

Para la primera purificación de los péptidos (denominados **as15a**, **asB**, **as7a**, **as14a** y **as14b**), se utilizó una columna analítica C18 (Vydac 218TP54, 4.6 x 250 mm; tamaño de partícula de 5  $\mu$ m), provista con una precolumna (Vydac, 218GK54, 5  $\mu$ m tamaño de partícula). Se realizó un paso isocrático de separación de 20% de solución B durante 20 min, seguido de un gradiente lineal de 20% a 35% de solución B en 60 minutos. El flujo fue de 1ml/min.

La segunda separación cromatográfica involucró una columna analítica C8 (Vydac 208TP54, 4.6 x 250 mm; tamaño de partícula de 5  $\mu$ m), provista con una precolumna (MetaGuard Nucleosil C8, 4.6 mm x 10 mm, 5  $\mu$ m tamaño de partícula)

Los péptidos as15a, as14a y as14b fueron separados utilizando un gradiente lineal de 20 % de solución B durante 10 minutos, seguido de un gradiente lineal de separación de 20% a 35% de solución B durante 60 minutos. Los péptidos asB y as7a fueron separados utilizando un gradiente lineal de 20 % de solución B durante 10 minutos, seguido de un gradiente lineal de separación de 20% a 35% de solución B durante 150 minutos. En todas las purificaciones se midió la absorbencia a 220 nm. ).

### c) REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN DE LOS PÉPTIDOS PURIFICADOS

Para detectar los residuos de cisteína en el proceso de secuenciación de Edman, es necesario reducir los péptidos para romper los puentes bisulfuro de las cisteínas, y modificarlos mediante la introducción de un grupo alquilo, para evitar que se formen los puentes nuevamente. De esta forma se obtuvieron derivados denominados PTH-piridileticisteínas (PTH-PEC), que permitieron confirmar la localización de las cisteínas en la secuencia de aminoácidos de cada péptido.

Para reducir los compuestos, se utilizó ~1 nmol de cada péptido y se añadió una solución que contenía 100 mg de guanidina (concentración final, 6 M), en 100  $\mu$ l de amortiguador TRIS 0.1M pH 8 y 40  $\mu$ l de ditionitro 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 $\mu$ l de 4-vinilpiridina, dejando reaccionar por 18 h a temperatura ambiente (bajo atmósfera de N<sub>2</sub>). Los péptidos piridiletalados fueron separados de los reactivos usados para la reducción y alquilación mediante RP-HPLC utilizando una columna analítica Vydac C18 (Vydac 218TP54, 4.6 x 250 mm; tamaño de partícula de 5  $\mu$ m), provista con una precolumna (Vydac, 218GK54, 5  $\mu$ m tamaño de partícula). A la columna se le aplicó 10% de solución B por 20 minutos; posteriormente, un gradiente de solución B de 10–60%B en 50 min, a un flujo de 1ml/min. Los péptidos derivados fueron llevados a sequedad.

#### d) SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LOS PÉPTIDOS

El análisis de la secuencia de aminoácidos por degradación de Edman ha sido una de las técnicas más usada para la determinación *de novo* de péptidos y proteínas debido a su alta sensibilidad.

La secuenciación automatizada utiliza el reactivo de Edman, fenilisotiocianato. La reacción libera el aminoácido amino-terminal como un derivado de la feniltiohidantoína, el cual se identifica mediante HPLC. El aminoácido próximo por secuenciar entonces se deriva y se elimina, luego se repite el proceso. Una secuencia de 30-40 residuos de aminoácidos se determina en una operación continua.

Los péptidos piridiletalados (300-500 pmol) fueron disueltos en 30  $\mu$ l de TFA: agua, 2:1 (v/v), y fueron analizados mediante un secuenciador automático de proteínas (Procise 491 Protein Sequencing System, Applied Biosystems, Foster City, CA), bajo el principio de degradación de Edman. Las modificaciones postraduccionales se determinaron a partir de secuenciar toxinas conocidas que presentan los residuos modificados de  $\gamma$ -carboxiglutamato e hidroxiprolina, con el propósito de conocer el tiempo de elución de las modificaciones resultantes en el cromatograma.

#### e) ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El perfil espectrométrico de las masas de los péptidos purificados tuvo dos propósitos: evaluar la pureza de la muestra y conocer la masa molecular del péptido. Se utilizó la espectrometría MALDI-TOF que utiliza una técnica de generación de iones por desorción/ionización mediante láser inducida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, MALDI). Estos iones son acelerados en un campo eléctrico para a continuación penetrar en un tubo de recorrido o vuelo libre sin campo eléctrico alguno.

Para un voltaje de aceleración dado, el tiempo de vuelo (Time-Of-Flight, TOF) que lleva a un ion alcanzar el detector es proporcional a su relación masa/carga,  $m/z$ . Esta técnica puede detectar tanto iones de carga positiva y negativa. La instrumentación

MALDI-TOF es altamente sensible para el análisis de proteínas y péptidos originando espectros sencillos (las especies se cargan normalmente +1) y con una cantidad mínima de muestra.

Las muestras de los péptidos nativos as15a, asB, as7a, as14a y as14b (~100 pmol) fueron evaluadas en un equipo Voyager DE (Applied Biosystems). Los espectros fueron obtenidos en el modo reflector positivo, con un voltaje de aceleración de 20 000 voltios, usando ácido sinapínico como matriz.

#### f) CORTE ENZIMÁTICO DEL PÉPTIDO as15a

El péptido as15a se fragmentó con  $\alpha$ -quimotripsina. La  $\alpha$ -quimotripsina hidroliza péptidos y proteínas en el lado carboxilo de los aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina y fenilalanina, y también en el extremo carboxilo de leucina y metionina.

Previamente a la fragmentación enzimática del péptido, éste fue desnaturalizado y solubilizado para una digestión rápida y completa. La digestión se realizó con 200  $\mu$ l de solución de bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 0.1 M y cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0.1 mM. El pH (8-8.5) se ajustó con  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Se agregó 1  $\mu$ l de quimotripsina (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y se incubó a 37°C por una hora. Inmediatamente después fue separado por RP-HPLC; se utilizó una columna analítica C8 (Agilent, Eclipse XDB-C8, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm) y un asa de inyección de la muestra de 5 ml, con un gradiente de 0-50% de solución B por 50 minutos.

#### g) ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS DE LOS PÉPTIDOS as15a y as14b

El análisis de aminoácidos fue realizado para los péptidos as15a y as14b, de acuerdo a las técnicas de Heinrikson & Meredith (1984) y Cohen y colaboradores, 1986, para corroborar las estructuras primarias obtenidas inicialmente por la técnica de la degradación de Edman.

El análisis de aminoácidos se basó en la hidrólisis ácida gaseosa de los péptidos, seguida por la formación del derivado feniltiocarbamilo (PTC) de los aminoácidos, vía derivación con fenilisotiocianato (PITC). Posteriormente, los derivados PTC-aminoácidos fueron separados mediante RP-HPLC, detectando a 254 nm.

Los péptidos (500 pmol) fueron hidrolizados a 110°C por 24 horas empleando la técnica de hidrólisis en fase gaseosa con ácido clorhídrico (HCl) al 30% conteniendo 1% de fenol (v/v). Se removió al vacío el exceso de HCl, y los péptidos fueron neutralizados con un exceso de trietilamina (TEA) y derivados con una mezcla de metanol-TEA-PITC-agua (7:1:1:1). Después de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, las muestras fueron reconstituidas en la siguiente mezcla: solución de fosfato de sodio dibásico 5 mM-acetonitrilo-metanol (19:1:5); después las muestras separadas mediante RP-HPLC.

Las muestras se inyectaron en volúmenes de 20 µl (100 pmol) en un cromatógrafo Waters 2487, con detección de la absorbencia a 254 nm. Se utilizó una columna NovaPak C18, y se utilizó un asa de inyección de 20µl. La separación se realizó a temperatura de 45 °C. El gradiente fue de 10-51% de solución B en 30 minutos y el flujo fue 1 ml/min. Las soluciones empleadas para eluir las muestras fueron: solución A: acetato de sodio 0.14 M con TEA (0.5 ml/l); ajustando el pH con ácido acético glacial hasta 6.34. Solución B: ACN al 60% en agua.

#### 4. BIOENSAYOS

##### a) INYECCIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE ROEDORES

El efecto biológico de las toxinas purificadas as15a, as7a, as14a y as14b se evaluó mediante la inyección intracerebral (i.c.) en ratones CD-1, machos, de 28 días de edad. El peso promedio de los animales fue de  $20 \pm 2$  g. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto de Neurobiología, bajo las siguientes condiciones: un periodo de iluminación de 16 h y 8 h de oscuridad, bajo una humedad y temperatura controladas. Se

inyectaron 30  $\mu$ l del péptido (disueltos en solución salina 0.9% NaCl), vía intracerebral, de acuerdo con la técnica de Clark et al., 1981. Se utilizó una jeringa de insulina de 0.5 ml (aguja no. 27).

La manipulación de los animales se realizó de la siguiente manera: el ratón fue colocado sobre una toalla de papel y la cabeza fue sujeta con los dedos pulgar e índice. La aguja fue insertada perpendicularmente al cráneo en el hemisferio derecho del cerebro, a través del cráneo. La profundidad de penetración de la aguja fue de 2.5 mm. Después de la inyección de los 30  $\mu$ l de muestra, los animales fueron colocados en una caja para su observación. Tanto en controles como en grupos experimentales, se utilizaron tres individuos por tratamiento. Se aplicó al menos una dosis de cada una de las toxinas en concentraciones desde 120 pmol hasta 500 pmol. El tiempo de la inyección fue registrado, y de igual manera se registró el tiempo en el que el ratón comenzó a desplegar síntomas anormales, el cuál fue comparado con animales controles, que sólo fueron inyectados con solución salina normal (0.9% NaCl).

#### b) INYECCIÓN INTRAMUSCULAR EN PECES

Peces macho adultos de la especie *Lebistes reticulatus* (peso promedio de 0.215 g  $\pm$  0.015 g) fueron utilizados. Los peces fueron adquiridos en un acuario local y fueron aclimatados posteriormente en un acuario de agua dulce, localizado en el bioterio del Instituto de Neurobiología. Los peces fueron mantenidos, antes de aplicarles las toxinas, en un acuario con agua dulce durante una semana, en la que la temperatura se mantuvo a 23  $\pm$  1  $^{\circ}$ C, bajo condiciones constantes de aireación y filtración, y alimentación diaria. Se les inyectaron a los peces 10  $\mu$ l de los péptidos as15a y as7a disueltos en solución salina normal (NaCl 0.9 %), vía intramuscular (250 pmol/pez, n=3) (Favreu et al., 1999). Se registró cualquier cambio en el comportamiento de los animales, y se compararon con un grupo control. Se utilizaron tres individuos por tratamiento en el grupo control y en el grupo experimental.

### c) INYECCIONES INTRAMUSCULARES EN MOLUSCOS

1) Ejemplares adultos del molusco *Pomacea paludosa* (peso promedio de  $18 \pm 3$  g) se utilizaron. Los caracoles fueron obtenidos de un distribuidor local y fueron mantenidos en un acuario con las condiciones descritas anteriormente para los peces. Se inyectaron en los moluscos alícuotas de 30  $\mu$ l del péptido as7a por vía intramuscular (250 pmol/caracol, n=3), específicamente en la parte anterior del pie. Los caracoles de esta especie se encuentran comúnmente adheridos a los vidrios de los acuarios. Por lo tanto, se consideró una respuesta tóxica positiva si los caracoles se desprendían del vidrio y sufrían algún efecto paralítico o encogimiento del cuerpo en la concha (Shon et al., 1994; Hasson et al., 1995). Los animales utilizados como control no se desprendieron del vidrio al ser inyectados con solución salina normal. Tanto en controles como en grupos experimentales, se utilizaron tres individuos por tratamiento.

2) También caracoles adultos de la especie *Patella opea* se utilizaron (peso promedio  $0.2 \pm 0.028$  g). Los moluscos fueron recolectados en Mazatlán, Sinaloa. Los animales fueron aclimatados -previoamente a los experimentos- durante 3 días, en un acuario marino, con filtración y oxigenación, a una temperatura de  $23 \pm 1$  °C; la salinidad fue de 35 g/l. Se inyectaron en los moluscos alícuotas de 30  $\mu$ l de los péptidos as15a y as7a, en la parte posterior del músculo pedal del caracol. (250 pmol/caracol, n=3). El animal inyectado fue colocado posteriormente en su posición normal en una caja de Petri con agua marina con aire. Una respuesta positiva fue definida como una contracción extrema del músculo del pie, resultando en un endurecimiento obvio del pie y la pérdida de habilidad para mantenerse adherido a la superficie (Fainzilber & Zlotkin, 1992). En el grupo control y en el grupo experimental, se utilizaron tres individuos por tratamiento.

## VIII. RESULTADOS

### 1. ASPECTOS MORFOMETRICOS DE *Comus austini*

La concha y del aparato venenoso (bulbo y conducto) fueron medidos, así como el peso del organismo completo y de cada una de las estructuras del aparato venenoso:

Numero de ejemplares=10

Peso promedio del organismo con concha:  $8.00 \pm 1.5$  g

Longitud de la concha:  $37 \pm 3$  mm

Peso del conducto:  $24.05 \pm 3$  mg

Peso del bulbo:  $20.95 \pm 2$  mg

Longitud del conducto:  $25 \pm 4$  mm

Longitud del bulbo:  $5 \pm 1$  mm

### 2. DETERMINACIÓN DEL TIPO DE ALIMENTACIÓN DE *C. austini*

El contenido estomacal de 60 ejemplares *C. austini*, recolectados en la región de Tampico, Tamaulipas, fue analizado microscópicamente. De las 60 muestras analizadas, en 8 de ellas se encontraron quetas de poliquetos, lo que demostró una alimentación vermívora (Fig. 2B). Se descartó otro tipo de alimentación, ya que no se encontraron restos de escamas o vértebras de peces, o restos del cuerpo y opérculo de moluscos.

### 3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ALGUNOS PÉPTIDOS DEL VENENO

#### a) OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

Se extrajeron los conductos venenosos de *C. austini* bajo un microscopio estereoscópico. Los conductos venenosos pesaron en promedio 24 mg, y se obtuvieron 500  $\mu$ g de proteínas solubles de cada uno de ellos (el resto del material lo constituyeron los componentes citoplasmáticos del conducto).

## b) PURIFICACIÓN DE 5 TOXINAS DEL VENENO DE *Comus austini*

La estrategia general que se ha utilizado comúnmente para separar y purificar los péptidos de los venenos de *Comus* involucra una separación inicial por HPLC de fase reversa con columnas C18 eluidas con un gradiente lineal de acetonitrilo en 0.1 % de TFA.

La separación de los componentes del veneno produjo más de 25 fracciones que se pueden observar en el cromatograma de la figura 5. Se seleccionaron 5 fracciones del veneno que presentaron una alta concentración para su purificación total. Las fracciones fueron definidas como as15a, asB, as7a, as14a y as14b (Fig. 5).

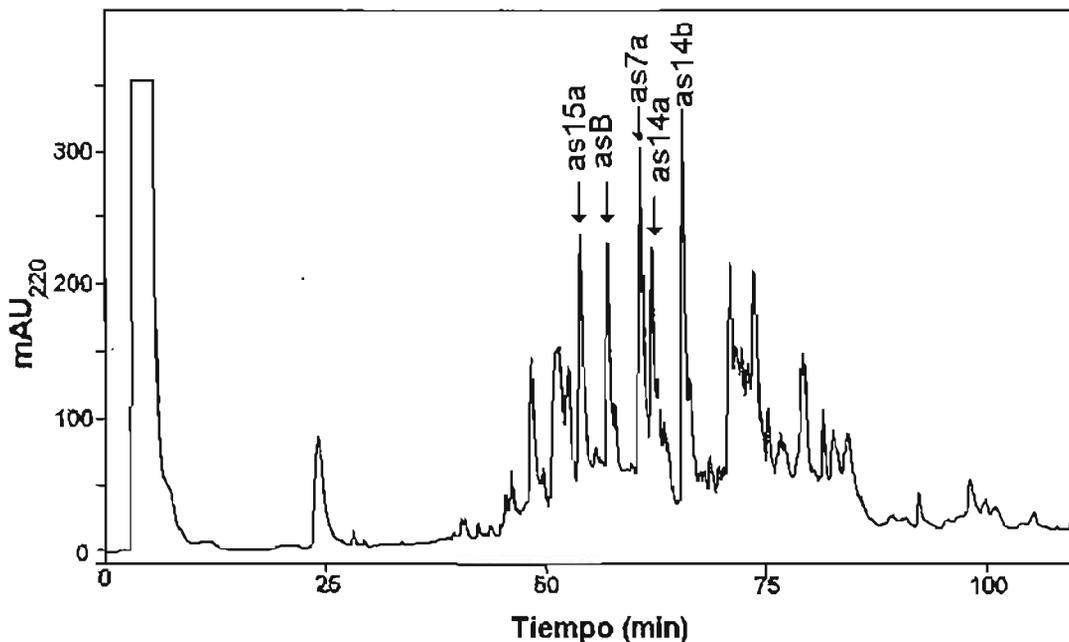


Figura 5. Separación cromatográfica por RP-HPLC del extracto crudo de *C. austini*. Se utilizó una columna C18 (Vydac, 218 TP54; 4.6 x 250 mm; tamaño de partícula de 5  $\mu$ m). A la columna se le aplicó 5% de solución B por 10 min; posteriormente, se desarrolló un gradiente de 5-55 % de solución B en 100 min a un flujo de 1 ml/min. La detección de los péptidos se realizó a 220 nm. Se utilizó como solución A: TFA al 0.1 %. Solución B: TFA 0.085 % + 90 % ACN.

La purificación de cada uno de los péptidos se llevó a cabo en dos procedimientos; primeramente, con una columna cromatográfica analítica C18 (Fig. 6), y en un segundo paso, utilizando una columna cromatográfica analítica C8 con gradientes variables de acuerdo al péptido (Fig. 7).

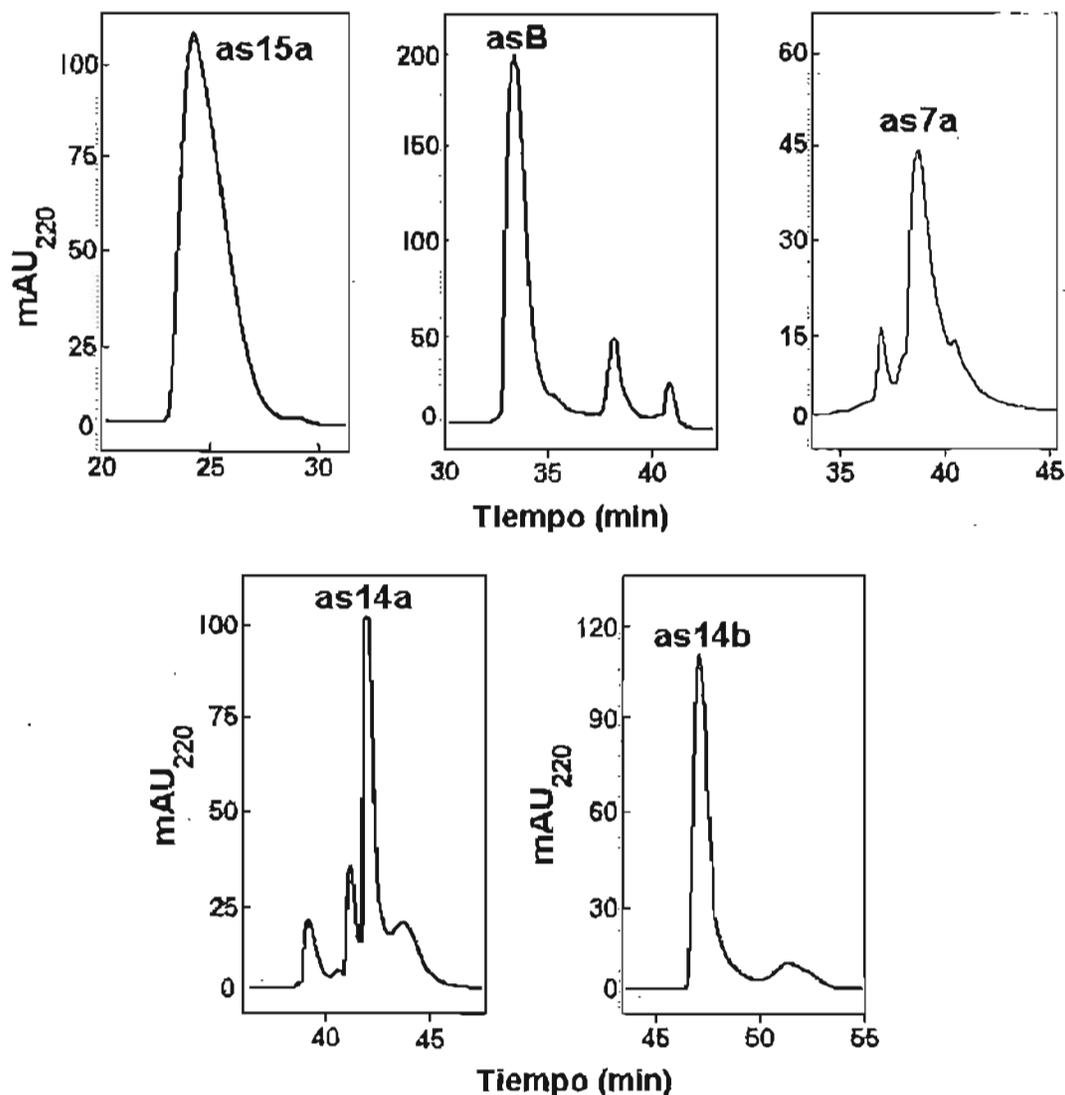


Figura 6. Purificación de los péptidos as15a, asB, as7a, as14a y as14b en una columna analítica C18 (Vydac, 218 TP54; 4.6 x 250 mm; tamaño de partícula de 5  $\mu$ m), utilizando un gradiente de separación de 20% de solución B en 10 minutos, y de 20-35% de solución B en 60 minutos. El flujo fue de 1ml/min.

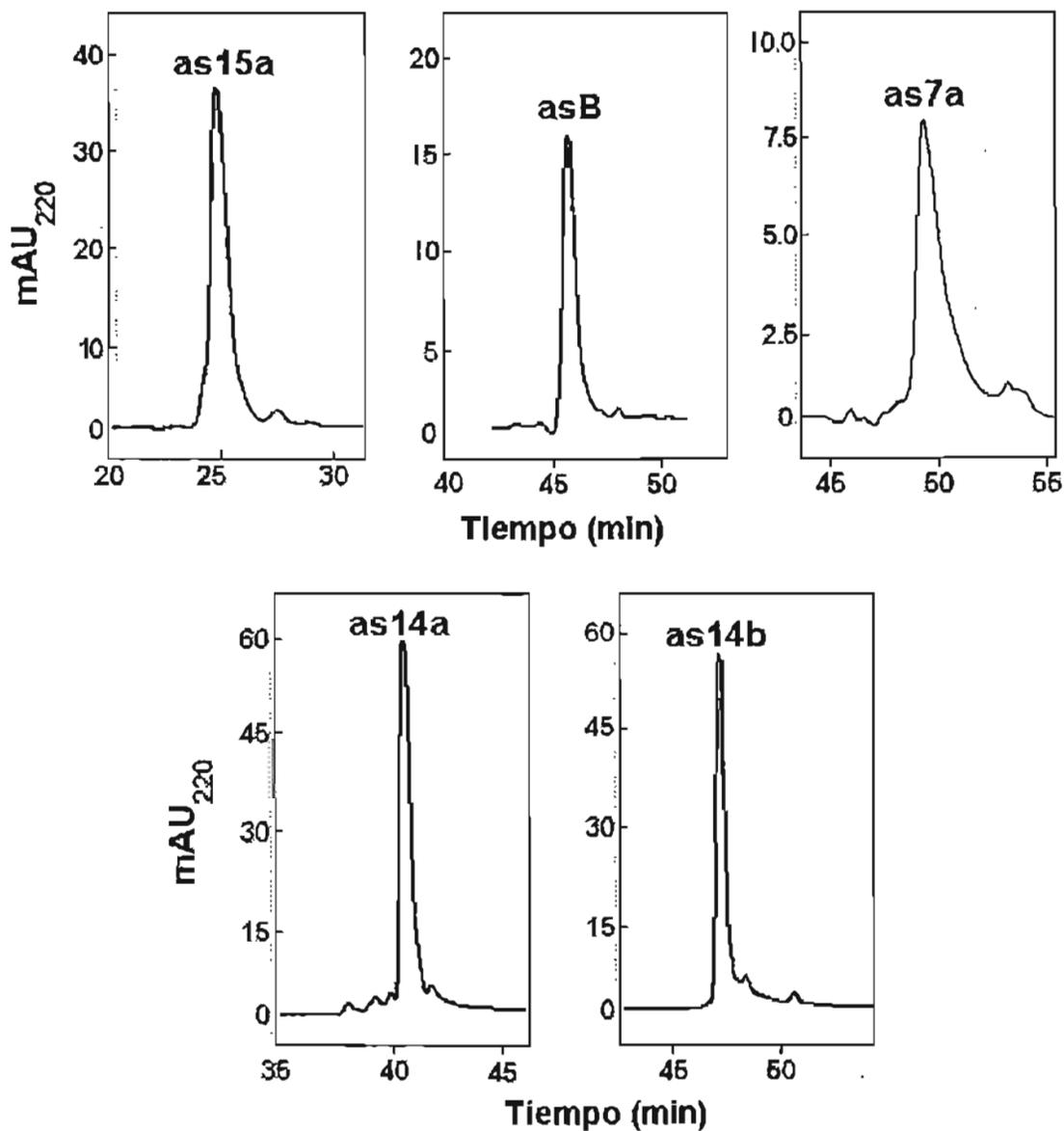


Figura 7. La purificación final de los péptidos fue hecha con una columna C8 (208TP54, 4.6 x 250 mm; tamaño de partícula de 5 $\mu$ m). Los péptidos as15a, as14a y as14b fueron separados utilizando un gradiente de separación de 20 % de solución B/10 min, y de 20% a 35% de solución B/60 minutos. Los péptidos asB y as7a fueron separados mediante un gradiente de separación más lento que los casos anteriores (de 20 a 35 % B en 150 min, después de un paso isocrático a 20 % de solución B durante 20 min). En todos los casos se utilizó como solución A: TFA al 0.1 %, y como solución B: TFA 0.085 % + 90 % ACN.

### c) REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN DE LOS PÉPTIDOS

La formación de puentes disulfuro es la modificación postraduccional que más se presenta en las conotoxinas. Por lo tanto, determinar la posición y número de los residuos de cisteínas fue un paso vital para la caracterización de las conotoxinas. La reducción de los péptidos tuvo la finalidad de romper los puentes bisulfuro, y la alquilación evitó que se formen nuevamente dichos puentes. Estos procedimientos químicos son imprescindibles para observar los residuos de cisteína durante la secuenciación del péptido por la técnica de degradación de Edman. Las fracciones obtenidas por la reducción y alquilación de los péptidos as15a, asB, as7a, as14a y as14b se muestran en la figura 8.

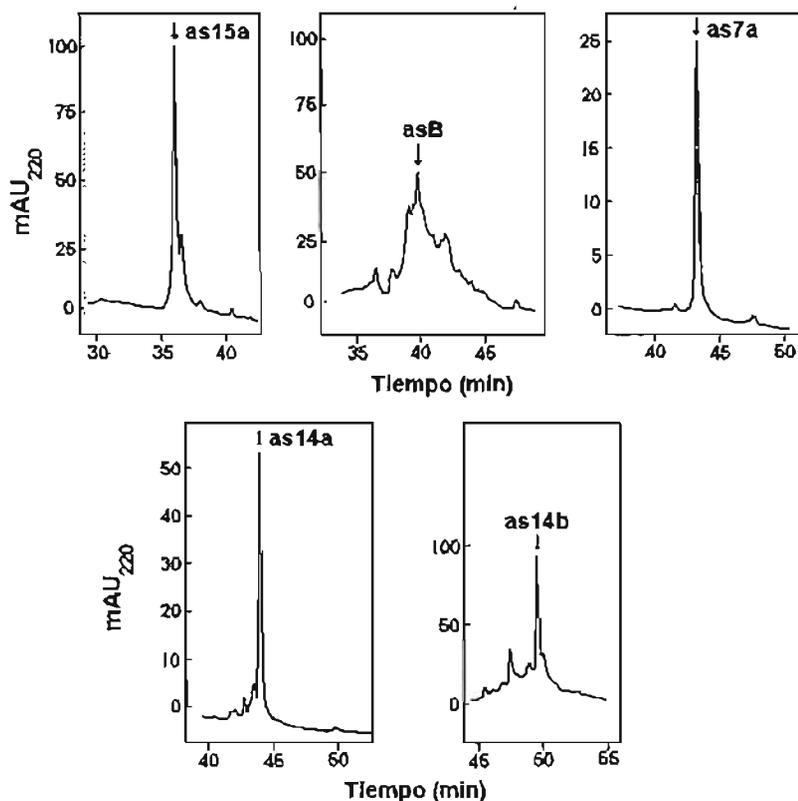


Figura 8. Perfil cromatográfico de los péptidos purificados y alquilados. Se utilizó una columna C18 (Vydac 218TP54, 4.6 x 250 mm; tamaño de partícula de 5  $\mu$ m). A la columna se le aplicó 10% de solución B por 20 minutos, seguido de un gradiente de 10-40% de solución B/30 min, a un flujo de 1 ml/mín. La detección de los péptidos piridiletilados se realizó a 220 nm.

#### d) MASAS MOLECULARES DE LOS PÉPTIDOS PURIFICADOS

Medir el peso molecular es una tarea básica para conocer si la secuencia de aminoácidos está completa, así como también para determinar si el extremo carboxilo terminal está amidado o en forma libre. En las figuras 9A-E se muestran los resultados obtenidos de la espectrometría de masas por MALDI-TOF de los péptidos as15a, asB, as7a, as14a y as14b, respectivamente.

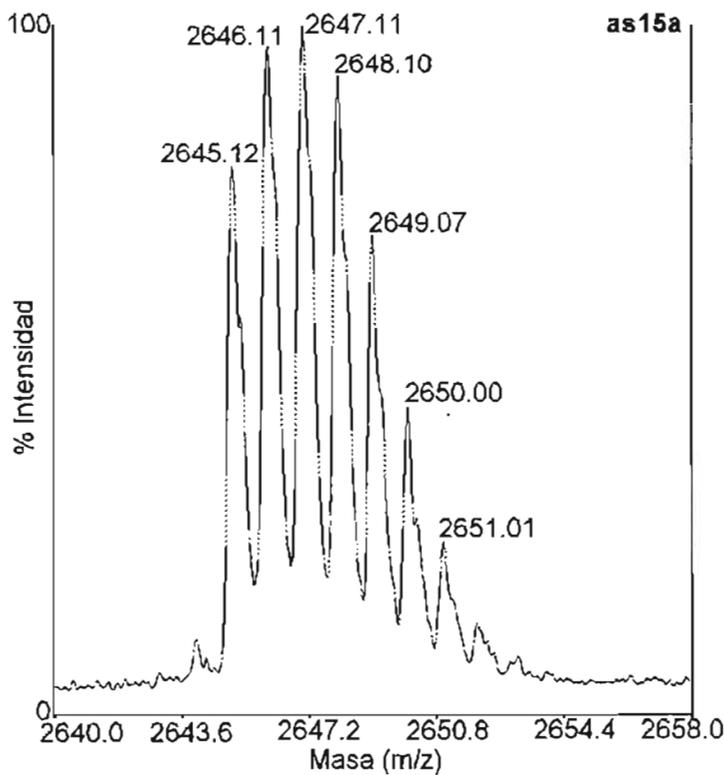


Figura 9A. Espectro de masas del péptido as15a. La señal m/z de 2645.12 corresponde con la masa molecular monoisotópica de 2644.12 Da.

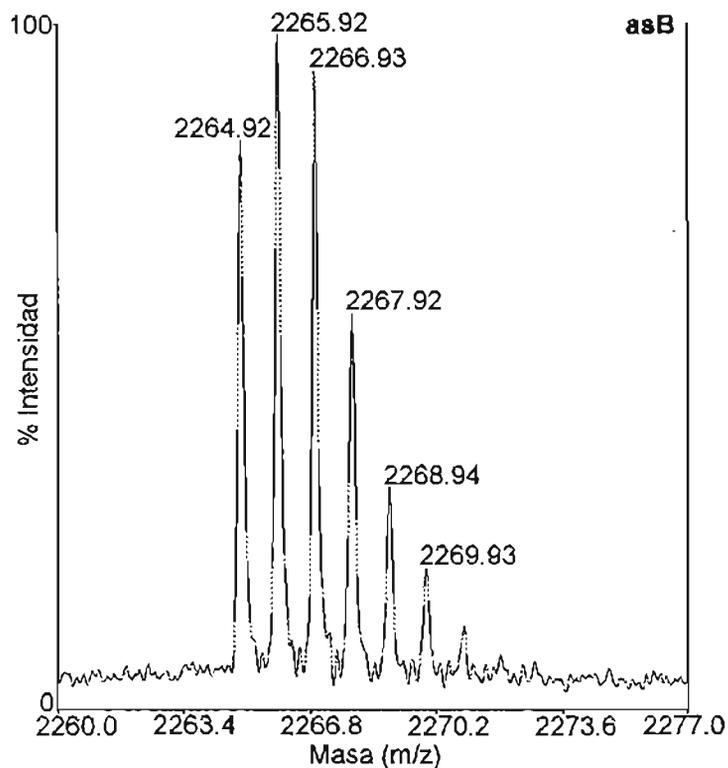


Figura 9B.

Espectro de masa molecular del péptido asB. La señal 2264.92 corresponde con la masa monoisotópica de 2263.92 Da.

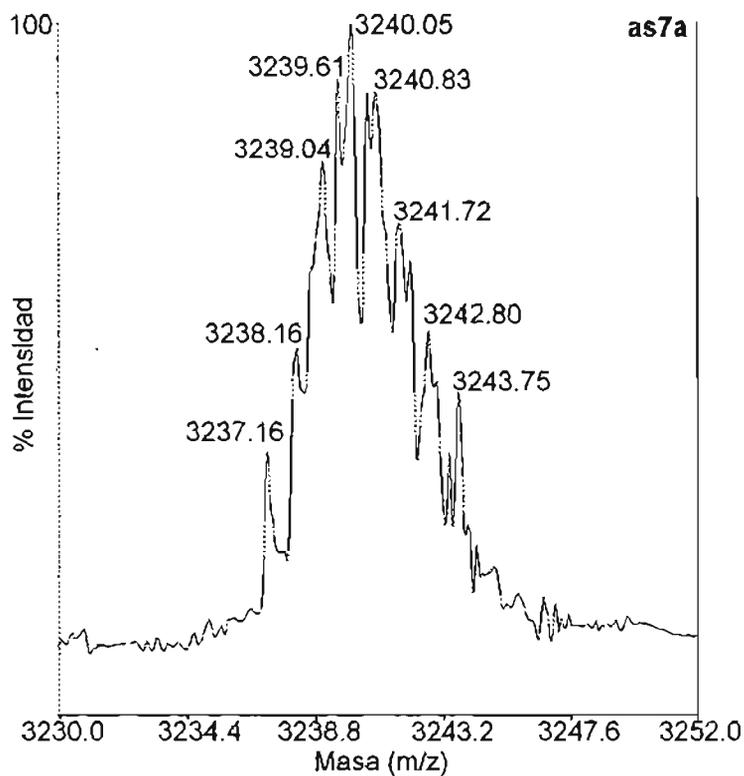
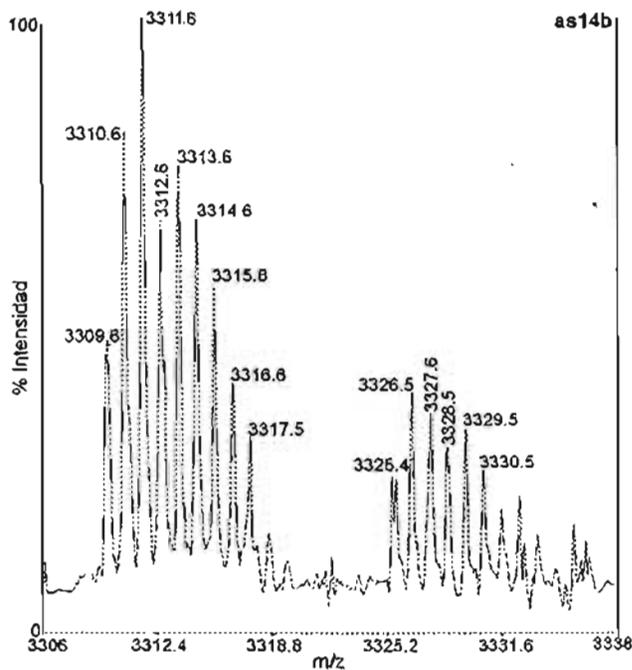
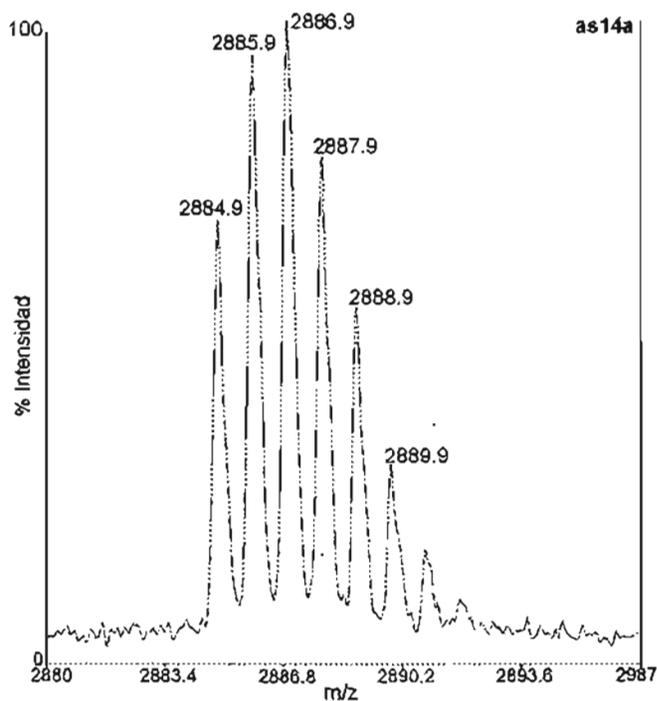


Figura 9C.

Perfil de masa molecular del péptido as7a. La señal de 3237.16 corresponde con la masa monoisotópica de 3236.16 Da.



Figuras 9D-E. Los espectros de masas moleculares de los péptidos purificados as14a y as14b mostraron señales  $m/z$  de 2884.92 y 3309.63, correspondientes con las masas monoisotópicas de 2883.92 (as14a) y 3308.63 Da (as14b), respectivamente. Se observaron en ambos casos, señales con valores mayores a 16 Da, que corresponden probablemente con la oxidación del residuo metionina. En el caso de as14a, también se observaron señales con un valor de 22 unidades más altas que la masa monoisotópica, y corresponde probablemente a aductos de sodio.

### e) ESTRUCTURA PRIMARIA DE LOS PÉPTIDOS PURIFICADOS

Las secuencias obtenidas y la masa calculada (la suma de la masa molecular de cada uno de los residuos de aminoácidos que componen al péptido), así como la masa monoisotópica experimental (obtenida por la técnica de MALDI-TOF), se muestran en la Tabla 3. Los residuos de cisteína y los residuos modificados postraduccionalmente están resaltados en negrillas.

Tabla 3. La secuencia lineal de aminoácidos de los péptidos purificados de *C. austini*.

Péptido	Secuencia de aminoácidos	No. aa	Masa calcul.	Masa experim. <sup>a</sup>
as15a	CKCPSCNFNDVTENCKCCIFRQP&	23	2644.06	2644.12
asB	SLYSOWK $\gamma$ KM $\gamma\gamma$ AAGG...	16	1797.82	2263.92
as7a	TCKQKGEGCSLDV $\gamma$ CCSSSCKPGGPLDFDC	31	3236.27	3236.16
as14a	GGVGRCIYNCMNSGGGLNFIQCKTMCY	27	2884.20	2883.92
as14b	RWDVDQCIYYCLNGVVGYSYTECQTMCS&	28	3308.35	3308.63

<sup>a</sup> Masa molecular experimental obtenida por espectrometría de masas MALDI-TOF. Las abreviaciones estándares usadas para designar a los aminoácidos son: A, alanina; C, cisteína; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptófano, y Y, tirosina. Los aminoácidos modificados postraduccionalmente son:  $\gamma$ ,  $\gamma$ -carboxyglutamato, y O, hidroxiprolina. &= extremo COOH amidado.

## **Péptido as15a**

El número de aminoácidos del péptido as15a fue 23. La secuencia de 6 cisteínas que presentó, C-C-C-C-CC, es nueva en el campo de las conotoxinas (Tabla 6). Se propuso el número 15 (o XV) para la secuencia de cisteínas de as15a, de acuerdo con el criterio propuesto por Olivera y Cruz, 2001.

Con respecto a la masa molecular del péptido as15a, la diferencia entre el peso molecular calculado (2644.06 Da), y el peso molecular experimental (2644.12 Da) fue 0.06 Daltons, consistente con la presencia de 6 cisteínas formando 3 puentes disulfuro, y el extremo carboxilo amidado. Es importante mencionar que la prolina en el extremo carboxilo no fue comprobada por secuenciación automática; la presencia de la prolina fue detectada en la composición de aminoácidos (que será explicado en el inciso 3g, página 52); además, la diferencia (96.13) entre la suma calculada de la masa de los primeros 22 residuos (2547.99 Da), con respecto a la masa experimental (2644.12 Da), correspondió con la masa molecular de dicho residuo (97.1 Da), en forma amidada.

## **Péptido asB**

De la conotoxina asB se ha obtenido una secuencia de aminoácidos de 16 residuos. El péptido asB presentó 3 residuos de  $\gamma$ -carboxiglutamato y un residuo de hidroxiprolina. La diferencia entre el peso molecular calculado (1797.82) y el peso molecular experimental (2263.92 Da) fue 466.09. Se consideró, para los cálculos de la masa molecular, que la técnica de MALDI-TOF descarboxila totalmente los residuos de  $\gamma$ -carboxiglutamato.

El péptido asB fue secuenciado al menos en dos ocasiones diferentes, y en ambas la secuencia fue incompleta. El peso promedio de un residuo es de 110 daltons, por lo que faltarían probablemente 4 residuos por identificar.

## **Péptido as7a**

Se determinó la secuencia de aminoácidos completa del péptido as7a (31 residuos). La masa molecular calculada fue 3236.27 Da -considerando 3 puentes disulfuro y el extremo carboxilo libre-, mientras que la masa molecular monoisotópica experimental fue 3236.16 Da. La secuencia de aminoácidos resultó similar a las  $\gamma$ -conotoxinas que han sido caracterizadas, en las que la combinación de los residuos  $\gamma$ -CCS-, es característica de esta familia de conotoxinas. El patrón estructural de cisteínas -C-C-CC-C-C-, correspondió con la superfamilia O.

## **Péptidos as14a y as14b**

El péptido as14a tuvo 27 residuos, obtenidos en una sola secuencia. La masa molecular calculada fue 2884.20 Da -consistente con la presencia de 2 puentes disulfuro y el extremo carboxilo libre-, mientras que la masa molecular monoisotópica experimental fue 2883.92, lo que da una diferencia de 0.32 Da.

Con respecto al péptido as14b, se obtuvo una masa molecular monoisotópica experimental de 3308.63 Da, y una masa calculada de 3308.35 Da (diferencia de 0.28 Da). No obstante, se obtuvieron por secuencia sólo 27 residuos, ya que el extremo carboxilo no fue detectado en el último ciclo de la secuencia. Una evidencia que sugirió la identidad de la serina fue la diferencia entre la masa experimental (3308.63 Da) y la masa calculada de los primeros 27 residuos (3222.3 Da), 86.33 Da, lo que correspondió con la masa molecular de la serina (87.1 Da), en forma amidada. Para conocer la identidad del residuo, se utilizó la técnica de composición de aminoácidos. El residuo faltante en la secuencia, y que fue detectado por esta técnica fue una serina (Tabla 5).

Los péptidos as14a/b tuvieron identidad en 11 residuos (39 %), incluyendo las 4 cisteínas (Tabla 3). Los residuos de cisteínas presentaron la secuencia C-C-C-C, no reportada previamente para conotoxinas de conos vermívoros.



Las secuencias de los fragmentos 3 y 4 permitieron confirmar la asparagina (N) de la posición 9 del péptido, localizada en la primera posición del fragmento 3, y en la novena posición del fragmento 4.

### 3g. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS DE LOS PÉPTIDOS as15a y as14b

El análisis de aminoácidos para los péptidos as15a y as14b se realizó para determinar la estructura primaria completa del péptido as15a, debido a que faltaba un residuo por confirmar (la asparagina en la posición 9), y también la prolina probable en el extremo carboxilo terminal no fue detectada en la secuenciación automatizada (Tabla 5). Con respecto al péptido as14b, el residuo en el extremo carboxilo –la serina–, tampoco fue evidente en la secuencia.

Tabla 5. Análisis de aminoácidos de los péptidos as15a y as14b.

as15a			as14b		
aa	No. secuencia	Cociente molar(R=1.0)	aa	No. secuencia	Cociente molar (R=1.0)
D	2D+1N = 3	4.15	D	2D+1N = 3	3.05
E	1E+1Q = 3	2.28	E	1E+2Q = 3	2.77
S	1	1.31	S	1	1.74
G	0	0.75	G	2	1.95
H	0	0.00	H	0	0.00
R	1	1.00	R	1	1.00
T	1	0.99	T	2	2.09
A	0	0.00	A	0	0.00
P	1	1.81	P	0	0.00
Y	0	0.00	Y	4	2.05
V	1	0.82	V	3	1.78
M	0	0.63	M	1	0.28
I	1	0.11	I	1	0.58
C	6	N.D	C	4	N.D
L	0	0.00	L	1	0.67
F	2	1.36	F	0	0.00
W	0	N.D	W	1	N.D
K	2	1.30	K	0	0.00
Total	21		Total	27	

Cada experimento se analizó por triplicado con un estándar de 17 aminoácidos, con el péptido ensayado, y con un control (cadena B de la insulina). En la técnica de la composición de aminoácidos los residuos de asparagina se transforman en ácido aspártico. Los residuos de metionina se destruyen en gran parte por el proceso, y los de triptófano se destruyen totalmente. Las abreviaciones estándares usadas para designar a los aminoácidos son: A, alanina; C, cisteína; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptófano, y Y, tirosina. N.D. No determinado. Los análisis se llevaron a cabo según la descripción en la parte experimental empleando la técnica de derivación pre-columna (Biddingmeyer et al., 1984; Cohen et al., 1986).

Los resultados obtenidos con la composición de aminoácidos del péptido as15a permitieron detectar 4 residuos de asparagina (cuantificados como residuos de ácido aspártico, ya que la asparagina se transforma en dicho residuo durante el procesamiento químico). De igual manera, se detectaron 2 residuos de prolina mediante la composición de aminoácidos del péptido as15a. Este resultado corroboró la presencia de la prolina en el extremo carboxilo terminal, ya que por secuencia solo fue posible detectar una prolina (Tabla 5).

Con relación al péptido as14b, la composición de aminoácidos tuvo por objeto detectar la identidad del extremo carboxilo. La serina se presentó en una relación molar de 1.7, mientras que en la secuencia sólo se había detectado una serina (Tabla 5). Por lo tanto, se determinó que la serina era el residuo que se localizaba en el extremo carboxilo del péptido as14b.

#### 4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PÉPTIDOS PURIFICADOS

##### **Péptido as15a**

El péptido as15a fue evaluado en los ratones adultos de 28 días, variedad CD-1, con peso promedio de 20 g. Se evaluaron dos dosis: 120 pmol/ratón (~6 pmol/g de ratón) y 240 pmol/ratón (~12 pmol/g de ratón). El péptido fue disuelto en solución salina normal (0.9 % NaCl), y fue inyectado intracerebralmente, tal como se describió en la sección de métodos. Por cada evaluación de una dosis de una toxina (realizada en tres ratones), también se inyectaron 3 animales con la solución salina normal (grupo control).

Con la dosis de 120 pmol/ratón (~6 pmol/g de ratón) se observó parálisis, con extensión de las patas traseras, inmediatamente después de la inyección. No obstante, el efecto de la parálisis duró muy poco tiempo –menos de un minuto–, y el efecto se presentó sólo en un ratón (n=3). Algunos minutos después el ratón fue recuperándose paulatinamente hasta llegar a un estado de actividad normal a los 10 minutos (la actividad “normal” fue definida como la actividad exploratoria en la caja, además de rascado y

acicalado ocasionales (generalmente menores de 15 segundos) (Tabla 6). Los otros dos ratones inyectados con la toxina no presentaron síntomas aparentes de actividad paralítica. Los síntomas que presentaron estos dos ratones –respiración agitada y encogimiento del cuerpo-, gradualmente desaparecieron en un promedio de 10 minutos. Estos síntomas también aparecieron en los ratones utilizados como control, probablemente como resultado del proceso de la manipulación y la inyección efectuada en los animales.

La inyección del péptido as15a con dosis de 240 pmol/ratón (~12 pmol/g de ratón), provocó efectos paralíticos irreversibles en dos ratones a los 15 y 23 minutos, respectivamente, que culminaron con la muerte de los animales. Uno de los ratones no presentó ningún efecto aparente debido a la inyección del péptido. Con respecto a los animales utilizados como control, tampoco manifestaron algún efecto paralítico, y sólo mostraron el efecto de la manipulación y la inyección con los síntomas descritos anteriormente (Tabla 6). Aunque cada inyección fue realizada con rapidez y precisión para evitar en el mayor grado posible el estrés físico a los animales, la sujeción y la inyección provocaron cierto grado de perturbación en los animales. No obstante, la técnica de inyección intracerebral en ratones ha sido usada ampliamente y de forma rutinaria, ya que proporciona evidencia preliminar de la actividad biológica que producen las conotoxinas en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos (Clark et al., 1981; Gray et al., 1981; Olivera et al., 1985a; Abogadie et al., 1990; Jacobsen et al., 1998; Craig et al., 1999b; Lirazan et al., 2000; Maillo et al., 2002; Miles et al., 2002; Sudarśai et al., 2004).

También se evaluó la actividad tóxica del péptido as15a en los peces *Lebistes reticulatus*. Se inyectaron tres peces (vía i.m.) con el péptido as15a con una dosis de 250 pmol/pez (~1163 pmol/g de pez). No se observó ningún efecto tóxico en los animales inyectados, ni en los animales utilizados como controles. La inyección del péptido as15a en el molusco marino *Patella opaea* (n=3, vía i.m., dosis de 250 pmol/molusco (~1250 pmol/g de molusco)) no provocó tampoco ningún efecto tóxico aparente. De igual forma, la inyección del péptido as15a en el caracol dulceacuícola *Pomacea paludosa* no produjo

ningún cambio conductual aparente en este invertebrado (n=3, vía i.m., dosis de 250 pmol/molusco (~14 pmol/g de molusco)).

Tabla 6. Actividad biológica del péptido as15a de *C. austini*<sup>a</sup> en ratones.

Tiempo (min)	Control	Péptido as15a*	Péptido as15a**
0-10	Respiración agitada, con el cuerpo contraído.	Respiración agitada, inmóviles, con el cuerpo contraído (2 ratones). Un ratón presentó parálisis con extensión de las extremidades posteriores durante 45 segundos.	Respiración agitada, inmóviles, con el cuerpo contraído. Dos ratones (min. 15 y min. 23) presentaron movimientos corporales rápidos en forma de círculo que terminaron en la parálisis de las extremidades; los animales murieron un minuto después.
10-30	Actividad normal***	Acicalamiento y rascado moderados.	Un ratón no presentó ningún síntoma de toxicidad aparente y presentó actividad normal después del minuto 13.
>30	Actividad normal***	Actividad normal***	Actividad normal***

<sup>a</sup> Disuelto en solución salina normal. \*Concentración 120 pmol/30 µl. \*\*Concentración 240 pmol/30 µl. \*\*\* Rascado y acicalado esporádico; conducta exploratoria. n= 3 en cada tratamiento.

### Péptidos as14a y as14b

Los péptidos purificados as14a/b fueron inyectados en ratones CD-1 machos de 28 días de edad. Cada péptido fue inyectado vía i.c. en tres ratones, utilizando la misma dosis (~6 pmol/g de ratón). Se utilizaron tres ratones como grupo control para cada uno de los péptidos evaluados. La inyección de la toxina as14a produjo síntomas de

acicalamiento y rascado moderados en los tres ratones, pero de mayor duración e intensidad que en los ratones control. Es decir, los ratones inyectados con solución salina se rascaron y acicalaron por periodos de algunos segundos, mientras que los ratones inyectados con el péptido as14a manifestaron durante mayor tiempo este comportamiento (de 2 a 4 minutos). De igual manera, los síntomas mostrados por los ratones después de la inyección del péptido, as14b incluyeron rascado y acicalado, pero los animales manifestaron estas actividades por periodos hasta de 8 minutos, y con una mayor intensidad (Tabla 7). No obstante, el síntoma más evidente que causó la inyección del péptido as14b en los ratones fue la parálisis de las extremidades posteriores y el síndrome de cola rígida. Estos síntomas se presentaron en los 3 ratones inmediatamente después de la inyección del péptido y duraron menos de 5 minutos (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad biológica en ratón de los péptidos as14a y as14b de *C. austini*<sup>a</sup>

Tiempo (min)	Control	Péptido as14a*	Péptido as14b*
0-10	Respiración agitada, inmóviles, con el cuerpo contraído.	Respiración agitada, inmóviles, con el cuerpo contraído.	Extensión rígida del cuerpo y de las extremidades posteriores; cola en posición erecta.
15-30	Actividad normal**	Acicalamiento y rascado moderados.	Conducta convulsiva de acicalamiento y rascado.
>30	Actividad normal**	Actividad normal**	Actividad normal **

<sup>a</sup> Disuelto en solución salina normal. \*Concentración 120 pmol/30  $\mu$ L

\*\*Rascado y acicalado esporádico; conducta exploratoria. n= 3 en cada tratamiento.

## Péptido as7a

La actividad tóxica del péptido as7a de *C. austini* se evaluó en el músculo pedal del molusco *Pomacea paludosa* (molusco dulceacuícola). Los caracoles utilizados como control (30  $\mu$ l, n=3) se mantuvieron adheridos por el pie muscular al vidrio del cristal del acuario durante todo el tiempo del bioensayo. La toxina as7a, con dosis de 250 pmol/caracol (~14 pmol/g de caracol), provocó síntomas tóxicos en dos de los moluscos, que consistieron en la contracción del pie muscular y plegamiento del opérculo, poco después de despegarse del vidrio. (Tabla 8).

En contraste, la inyección i.m. del péptido as7a en el molusco marino *Patella opaea*, no provocó ningún efecto biológico aparente, y se utilizó una dosis mayor, 250 pmol/caracol (~1250 pmol/g de caracol), con respecto a la utilizada con la especie *Pomacea paludosa*.

De igual manera, la inyección del péptido as7a en ratones, vía intracerebral, no tuvo actividad aparente en receptores neuronales de este vertebrado, a dosis de 500 pmol/ratón (~25 pmol/g de ratón). El péptido as7a tampoco causó ningún efecto tóxico en el pez dulceacuícola *Lebistes reticulatus*, con dosis de 250 pmol/pez (~1163 pmol/g de pez), vía intramuscular.

Tabla 8. Actividad biológica del péptido as7a de *C. austini* en *Pomacea paludosa*<sup>a</sup>

Tiempo (min)	as7a*
0-2	Los caracoles se desprendieron del vidrio al que estaban adheridos por el pie muscular. Dos de ellos presentaron contracción del pie. Uno de ellos cerró inmediatamente el opérculo después de la inyección
>3	Dos caracoles se adhirieron al vidrio nuevamente. Un caracol estuvo explorando el acuario.

<sup>a</sup> Disuelto en solución salina normal.\* (250 pmol/30  $\mu$ l), n=3.

## IX. DISCUSIÓN

Hoy en día es bien conocido que el veneno de los caracoles del género *Comus* -con más de 500 especies actuales-, contiene un elevado número de toxinas (50-200), caracterizadas por contener una alta proporción del aminoácido cisteína en su estructura, y que constituyen potentes y específicos antagonistas de receptores y canales iónicos encargados de la transmisión sináptica. Estos péptidos exclusivos y característicos de los *Comus*, que han sido denominados conotoxinas, pueden ser agrupados en sólo unas pocas familias estructurales, dependiendo de la cantidad, posición relativa y conectividad de sus residuos de cisteínas.

Fue importante estudiar una especie vermívora del Atlántico americano -*C. austini*-, ya que la mayor parte de los estudios se han hecho con toxinas de conos piscívoros y molusquívoros del Indopacífico, los que está sumamente documentado y, en menor parte, con toxinas de conos vermívoros. Por ejemplo, de las 32 especies de *Comus* estudiadas, se han aislado más de 115 conotoxinas, y de ellas, más del 75 % corresponde a especies provenientes del Océano Indopacífico. Del 25 % restante, sólo han sido aisladas 7 toxinas de conos del Atlántico y 4 del Pacífico americanos (Apéndices 1 y 2). En este trabajo de tesis se presentaron 5 nuevas secuencias de conotoxinas provenientes de la especie *Comus austini*, recolectada en el Atlántico americano. De estas secuencias, una presentó un nuevo patrón estructural de los residuos de cisteína, mientras que otras dos presentaron un nuevo patrón de cisteínas para caracoles vermívoros. También se caracterizó un nuevo péptido similar a las  $\gamma$ -conotoxinas, y se obtuvo la secuencia parcial de un péptido con varias modificaciones postraduccionales, y sin cisteínas.

Con respecto a los estudios biológicos de *Comus*, de igual forma, la mayor parte de los estudios se han realizado con especies del Indopacífico. Del Atlántico americano (Brasil), sólo se había descubierto la alimentación de la especie *C. regius* (poliquetos anfínómidos) (Vianna-Braga et al., 2005).

Esta Tesis sería el segundo caso en el que se reporta la alimentación de un *Conus* del Atlántico americano. Se tenían ciertos indicios que la especie *C. austini* se alimentaba de gusanos porque la apertura de su concha es estrecha (a diferencia de los caracoles piscívoros y molusquívoros, que atrapan presas mayores, y que tienen una apertura de la concha más amplia (Lim, 1970)). De los 60 ejemplares de *C. austini* analizados del contenido estomacal, sólo 8 de tuvieron restos localizados en los intestinos, ya en avanzado estado de digestión (en algunas especies se han registrado que los conos pueden asimilar el alimento en menos de 24 horas (Kohn, 1959)). No obstante, fue posible identificar la presa consumida por los restos encontrados: quetas y mandíbulas de poliquetos (para una alimentación vermívora). En caso de piscivoría, se podrían encontrar escamas y vértebras de peces, o el opérculo o restos de la concha, cuando es una alimentación molusquívora (Kohn & Nybakken, 1975).

Además del estudio biológico que permitió conocer la dieta de la especie estudiada, este proyecto tuvo dos aspectos principales: por una parte, la caracterización bioquímica de algunos péptidos (purificación y secuencia de aminoácidos) y, por otro lado, la caracterización biológica (pruebas de especificidad biológica de los péptidos purificados en diferentes animales).

El análisis de la estructura primaria de las conotoxinas de *C. austini* requirió de múltiples métodos de análisis químico, debido a que las conotoxinas presentan la mayor cantidad de modificaciones postraduccionales encontradas en cualquier péptido o proteína de origen animal. Por ejemplo, la secuencia del bromocontrifano, un octapéptido, tiene dos cisteínas que forman un puente bisulfuro, el extremo terminal amidado, la hidroxilación de la prolina, la epimerización de un triptófano y la bromación del otro triptófano (Terlau & Olivera, 2004). Definitivamente las conotoxinas son unas de las moléculas más compactas, pero a la vez unas de las más complejas de la naturaleza.

Con relación a la purificación del veneno de *C. austini*, este presentó numerosos componentes. Al menos 25 fracciones se obtuvieron en el primer paso de purificación (Fig. 5), y las purificaciones posteriores de algunas de las fracciones mayoritarias

permitieron distinguir dos o más componentes individuales (Fig. 6). Se seleccionaron cinco fracciones mayoritarias del veneno, porque cada extracto venenoso puede tener más de 150 componentes proteicos. Además, es común que la cantidad purificada del péptido sea muy baja (en el orden de nano o picomoles), por lo que no siempre es suficiente el material puro para realizar los ensayos biológicos (Aguilar et al., 2005a; b). Este fue el caso también con *Conus austini*: la baja cantidad de los péptidos purificados (en el intervalo de nanomoles), sólo permitió realizar pocos bioensayos en los diferentes modelos biológicos. En el caso del péptido asB, ni siquiera fue posible su evaluación en ningún animal.

La variabilidad estructural que pueden presentar las conotoxinas en el veneno de una especie quedó manifestada en este trabajo. Por ejemplo, la conotoxina as15a presentó 23 aminoácidos, con un patrón estructural de 6 cisteínas nuevo para el campo de las conotoxinas: -C-C-C-C-CC- (Tabla 9).

Tabla 9. Propiedades de conotoxinas con 6 cisteínas

Arreglo de cisteínas	Familia	Referencias
CC - C - C - C - C	$\alpha A$	Santos et al., 2004.
CCC - C - C - C	$\alpha$	Ramilo et al., 1992; Jiang et al., 2005.
C - C - CC - C - C	$\mu, \psi$	Cruz et al., 1985; Shon et al., 1997.
CC - C - C - CC	$\omega, \kappa, \delta, \mu O$	Terlau & Olivera, 2004.
CC - C - C - CC	$\gamma$	Fainzilber et al., 1998.
C - C - C - C - C - C	Espasmódicos	Lirazan et al., 2000.
C - C - C - C - CC	?	Este trabajo.

Se propuso el número 15 (o XV) para el arreglo de cisteínas de as15a, de acuerdo con el criterio propuesto por Olivera y Cruz (2001).

El patrón estructural de 6 cisteínas se ha presentado ampliamente en las conotoxinas (Tabla 9) (Terlau & Olivera, 2004). No obstante, también existen toxinas con 6 cisteínas que han sido aisladas de otros animales venenosos: en particular, el diseño denominado “nudo de cisteínas” (CC-C-C-CC), que está presente en una gran diversidad

de especies de anémonas marinas, arañas y escorpiones y, de manera sorprendente, también se han aislado toxinas de estas características en hongos y plantas (Craik et al., 2001).

No obstante, las conotoxinas presentan ciertas características exclusivas con respecto a otras toxinas: las conotoxinas generalmente son mucho más pequeñas (de 10 a 30 aminoácidos), que las toxinas peptídicas similares preparadas por otros animales venenosos (Olivera et al., 1990), pero contienen igualmente una alta proporción de cisteína en sus estructuras, lo que les permite estabilidad conformacional mediante el establecimiento de múltiples enlaces de disulfuro intramoleculares a medida que el péptido se pliega. Son estructuras de conformación rígida, estable, y de variadas formas, según como se establezcan los enlaces disulfuro. Además, sólo con pequeños cambios en los residuos intercisteínas se puede modificar la selectividad de la toxina hacia un subtipo de canal o receptor iónico. Debido a estos factores se ha presentado esta convergencia evolutiva para toxinas pequeñas, estructuralmente muy resistentes y con una gran selectividad para bloquear o modular los canales o receptores iónicos u otras moléculas involucradas en la transmisión de los impulsos nerviosos y/o musculares (Craik et al., 2001).

De *Comus austini* también se aisló una secuencia de aminoácidos con un patrón estructural de nudo de cisteínas. Se trató de la secuencia de aminoácidos del péptido as7a (31 residuos), que resultó similar a las  $\gamma$ -conotoxinas que han sido caracterizadas previamente de dos caracoles molusquívoros -*Comus textile* y *C. pennaceus*- (Fainzilber et al., 1998), así como de un cono vermívoro del Atlántico -*C. delessertii*- (Aguilar et al., 2005a). (Tabla 10).

Tabla 10. Comparación de las secuencias de las  $\gamma$ -conotoxinas conocidas.

TxVIIA	CGGYSTYCYVD--S $\gamma$ CCSDNC-----VRSYCTLF&
$\gamma$ -PnVIIA	DCTSWFGRCTVN--S $\gamma$ CCSNSC-----DQTYCYLYAFOS
de7a	ACKOKNNLCAIT $\gamma$ MA $\gamma$ CCSGFC-----LIYRCS&
as7a	TCKQKGECSLD--V $\gamma$ CCSSSCKPGGPLDFDC
	*            *            ****    *            *

\*= muestra los residuos idénticos entre las diferentes conotoxinas. &= amidación del extremo carboxilo.  $\gamma$  =  $\gamma$ -carboxiglutamato; O = hidroxiprolina.

Aunque las  $\gamma$ -conotoxinas tienen el arreglo de cisteínas C...C...CC...C...C, que comparten con otras familias de toxinas ( $\delta$ ,  $\mu$ O,  $\kappa$  y  $\omega$ -conotoxinas), los péptidos de la familia de las  $\gamma$ -conotoxinas presentan la combinación de residuos  $\gamma$ CCS, que permiten separarla de las otras familias de péptidos de la superfamilia O (Tabla 10).

Otro ejemplo de toxinas de pequeño tamaño pero con varias cisteínas fueron aisladas de *C. austini* en este trabajo. Los péptidos as14a y as14b, presentaron un patrón de 4 cisteínas separadas; este espaciamiento de cisteínas es la primera vez que se reporta para caracoles vermívoros. Se propuso el número 14 (o XIV) para el arreglo de cisteínas de as14a/b. Hasta ahora, la única conotoxina que comparte este arreglo es la conotoxina Con14 (Olivera et al., 1990), un péptido de 19 residuos aislado de *C. geographus*, una especie piscívora del Indopacífico. Sin embargo, el péptido Con14 comparte sólo 3 y 2 residuos con as14a y as14b, respectivamente. Además, el número de residuos intercisteínas es claramente diferente para el péptido Con14 con respecto a los péptidos de *C. austini*, es decir, inucamente el primer espacio entre las primeras dos cisteínas tiene el mismo número de residuos, es decir, tres (Tabla 11).

Tabla 11. Alineamiento de secuencias de los peptidos as14a/b con el péptido Con14.

Con14	KFLSGGFK $\gamma$ IVCHRYCAK-GIAKEF--CN--CPD&
	**      *  *  *  *  *  *
as14a	GGVGR--CIYNCMNSGGGLNFIQCKTMCY
	*      *** * *  *      * ***
as14b	RWDVDQ-CIYYCLNGVVGYSYTECQTMCS&
	*  *                  *  *

\*= muestra los residuos idénticos entre las diferentes conotoxinas. &= amidación del extremo carboxilo.  $\gamma$  =  $\gamma$ -carboxiglutamato; O = hidroxiprolina.

Existen otras clases de conotoxinas con 4 cisteínas en sus secuencias - $\alpha$ -conotoxinas y T-conotoxinas-, que presentan arreglos de cisteínas característicos, que definen diferentes patrones estructurales y blancos farmacológicos definidos (y generalmente de pequeño tamaño) (Tabla 12).

Tabla 12. Características de las conotoxinas con 4 cisteínas.

Patrón	No. aa	Clase farmacológica	Blanco	Referencias
CC-C-C	12-19	$\alpha$ -conotoxinas $\rho$ -conotoxina TIA	R. acetilcolina nicotínicos R. adrenérgico $\alpha 1$	Santos et al., 2004 Sharpe et al., 2001
CC-CC	11-19	Superfamilia T: $\epsilon$ -TxIX $\chi$ -MrIA	Reduce flujo de $Ca^{2+}$ Transportador de norepinefrina	Rigby et al., 1999 Sharpe et al., 2001
C-C-C-C	29	Con14	?	Olivera et al., 1990
	27	as14a	?	Este trabajo
	28	as14b	?	Este trabajo

Otras diferencias también son observadas en conopeptidos con 4 cisteínas: conotoxinas que contienen al menos un par de cisteínas adyacentes, como las  $\alpha$ -conotoxinas y las  $\rho$ -conotoxinas (12-19 residuos), las  $\chi$  y  $\epsilon$ -conotoxinas (11-15 residuos), que son más cortas que los péptidos con 4 cisteínas no adyacentes (patrón estructural XIV o 14), que incluyen a los péptidos as14a y as14b de *C. austini* con 27 y 28 residuos, respectivamente, y el péptido Con14 de *C. geographus*, con 29 aminoácidos (Tabla 11).

Otros péptidos de *Conus* contienen, en lugar de cisteínas, un gran número de residuos  $\gamma$ -carboxilados de ácido glutámico ( $\gamma$ ), los cuales son igualmente responsables de su estabilidad conformacional (Bandyopadhyay et al., 1998; 2002).

Este es el caso del péptido asB de *C. austini*, que presentó 3 residuos de  $\gamma$ -carboxiglutamato y un residuo de hidroxiprolina. Los caracoles *Conus* son los únicos invertebrados que se conoce hasta el momento que sintetizan  $\gamma$ -carboxiglutamato (Bandyopadhyay et al., 1998; 2002). Las toxinas que tienen la mayor cantidad de residuos de  $\gamma$ -carboxiglutamato son las conantoquinas, con 5 (Haack et al., 1990). En las conantoquinas el carboxiglutamato, en presencia de calcio, provoca una conformación alfa hélice. En las conantoquinas, el carboxiglutamato también en un componente es vital para mantener la actividad biológica de los peptidos. Por ejemplo, se pierde el efecto biológico de la conantoquina-G cuando todos los residuos de  $\gamma$ -carboxiglutamato son descarboxilados a glutamato (Myers et al., 1990). Otras conotoxinas que contienen  $\gamma$ -

carboxiglutamato han sido descritas: TxVIIA (Fainzilber et al., 1991); de7a (Aguilar et al., 2005a),  $\gamma$ -PnVIIA (Fainzilber et al., 1998),  $\epsilon$ -TxIX (Rigby et al., 1999) y el péptido “bromosleeper” (Craig et al., 1997). En el caso del conopéptido de *C. austini*, probablemente la alta cantidad de residuos de carboxiglutamato le confieren estabilidad estructural y probablemente también son importantes en la actividad biológica.

Respecto a la actividad biológica, los primeros estudios de los venenos de *Comus* se realizaron en especies piscívoras, por lo que los efectos biológicos de los péptidos aislados se estudiaron en modelos de receptores y canales para vertebrados; por ello no se conocía su mecanismo específico de acción en sus otros géneros de presa, como moluscos o gusanos marinos. Recientemente se ha ampliado el espectro de especies de *Comus* estudiadas; además de las especies piscívoras, se han estudiado especies molusquívoras y vermívoras, y se ha determinado la acción de los péptidos aislados en otros modelos de canales y receptores, por ejemplo en modelos de invertebrados (Spira et al., 1993; Kits et al., 1996; Fainzilber et al., 1991; 1996; 1998; McIntosh et al., 1994), lo cual ha permitido encontrar nuevos tipos o familias de conotoxinas con acciones biológicas diferentes.

La actividad biológica de muchas conotoxinas ha sido evaluada por la inyección directa de la fracción venenosa o del péptido purificado en el sistema nervioso central del ratón, y ha sido probado que este método es efectivo para identificar componentes activos en mamíferos, aun cuando los péptidos fueron aislados de conos vermívoros. Como ejemplos tenemos las conotoxinas  $\alpha$ -ImI y  $\alpha$ -ImII, de *C. imperiales* (provocan convulsiones y temblores) (Macintosh et al., 1994); contrifano-Vn, de *C. ventricosus* (síndrome de cola rígida) (Massilia et al., 2001). Otro aspecto importante del uso de los ratones como modelo biológico, es que se conoce detalladamente la función de numerosos canales y receptores iónicos que expresan diferentes células nerviosas de esta especie (Gad & Changelis, 1992; Hille, 2001). Además, en algunas ocasiones, el comportamiento manifestado por los ratones puede dar un indicativo del blanco de acción molecular de la conotoxina evaluada (Olivera et al., 1999).

Así, uno de los estudios iniciales con la especie *C. geographus* consistió en la inyección intracerebral (i.c.) de cada una de las diferentes fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del veneno total, observándose que la mayor parte de estas ejercían efectos que modificaban el comportamiento normal de los ratones, y que estas modificaciones eran de naturaleza variable según el péptido (Olivera, 2000). Este mismo experimento se realizó luego con las fracciones separadas mediante cromatografía de la especie *C. magus*, y los resultados se ilustran en la figura 11. Las  $\omega$ -conotoxinas MVIIA y MVIIIB fueron purificadas de las fracciones que provocaron un constante temblor en los ratones inyectados. Igualmente, las fracciones de la cromatografía del veneno total de *C. geographus* que provocaron temblor al ser inyectados en ratones, resultaron luego ser  $\omega$ -conotoxinas.

Muchas otras clases de conopéptidos han sido igualmente purificados con base en la modificación que producen al ser inyectados en el cerebro de ratones; así, las conantoquinas producen sueño en ratones menores a 14 días e hiperactividad en ratones de mayor edad; los ratones inyectados i.c. con contulaquinas se ponen lentos o “perezosos”, y solamente caminan si son forzados a hacerlo; la inyección i.c. de contrífanos produce rigidez y horizontalidad de la cola de los ratones; la inyección i.c. de  $\alpha$ - y  $\mu$ -conotoxinas en ratones, invariablemente produce la parálisis y muerte del animal; y las conopresinas producen un notable incremento en la actividad de “rascarse” y “acicalarse” de los ratones (Olivera & Cruz, 2001).

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

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

Por lo tanto, se decidió evaluar biológicamente, con base en el comportamiento de los ratones, las conotoxinas aisladas de *C. austini*.

La toxicidad de as15a fue evaluada mediante la inyección intracerebral de ratón, utilizando dos dosis -120 y 240 pmol/ratón (6 y 12 pmol/ g de ratón, respectivamente). Se observó un efecto paralítico con extensión de las extremidades en los ratones con ambas dosis, aunque hay que considerar que, en el caso de la dosis de 120 pmol/ratón, el efecto se presentó únicamente en un animal (n=3), mientras que con la dosis de 240 pmol/ratón, el efecto paralítico fue observado en dos ratones y causó la muerte de ellos. Es importante mencionar que la parálisis observada en los ratones tratados con toxinas no se presentó en los ratones inyectados con solución salina, aunque también debe notarse que el número de ratones utilizado en cada grupo (control y experimental), fue reducido.

Probablemente la parálisis provocada en los ratones por la inyección del péptido as15a de *C. austini* podría dar un indicativo del blanco farmacológico. Por ejemplo, se ha demostrado que las alfa conotoxinas, que tienen como blanco farmacológico receptores de acetilcolina nicotínicos, provocan efectos paralíticos en los ratones después de su inyección intracerebral (Olivera et al., 1999). En el caso de *C. austini*, se tienen los antecedentes de Feregrino-Pérez (2004), quien evaluó la actividad del extracto crudo de esta especie en ileón de cobayo. El veneno crudo provocó alteraciones en la neurotransmisión colinérgica del modelo evaluado. No obstante, tendría que evaluarse la actividad biológica del péptido as15a en un modelo electrofisiológico que exprese canales colinérgicos para comprobar esta hipótesis.

También se evaluó la actividad tóxica del péptido as15a en los peces *Lebistes reticulatus* y en los moluscos *Pomacea paludosa* y *Patella opaea*. La inyección intramuscular (i.m.) del péptido as15a no produjo ningún efecto tóxico aparente en estos animales. Se decidió evaluar las toxinas purificadas en peces porque han sido utilizados para evaluar la actividad biológica de las conotoxinas purificadas.

Como ejemplo tenemos la conotoxina  $\alpha$ -E1, de *C. ermineus*, que fue activa en peces y ratones a una dosis de 1 nmol/pez (Martínez et al., 1995). De igual forma, el conotripano-Vn, de *C. ventricosus*, fue activo en peces *Gambusia affinis* provocando secreción abundante, mientras que en los ratones causó el síndrome de cola rígida (Massilia et al., 2001). No obstante, también existen casos de toxinas activas en peces y no en ratones: la conotoxina  $\alpha$ -CnIA, de *C. consors*, provocó parálisis flácida en peces *Gambusia affinis* con una dosis de 650 pmol/pez, vía i.m. No obstante, la toxina no tuvo efecto en ratones vía i.c. con la misma concentración (Favreau et al., 1999). Por otro lado, la conotoxina  $\alpha$ -SII, que fue tóxica en peces con dosis de 100 pmol, 1 y 5 nmol/pez, no produjo ningún síntoma en los ratones en concentraciones de 20 nmol/raton (1000 pmol/g de raton (Ramilo et al., 1992)). Se decidió utilizar en este trabajo, para evaluar el efecto tóxico de los péptidos as15a y as7a de *Conus austini*, la especie *Lebistes reticulatus*, porque pertenecen a la misma familia –Poecilidae-, que los peces *Gambusia affinis*; además, el tamaño es similar (<2 cm).

Debido a que la conotoxina as15a sólo presentó actividad en ratones y no en peces ni moluscos, probablemente podría ser una herramienta farmacológica selectiva para estudiar alguna vía de comunicación crítica del sistema nervioso central de los ratones.

Por otro lado, la inyección intracraneal de as14a y as14b provocó en los ratones una conducta de rascado y de acicalamiento de diferente intensidad (concentración de 120 pmol/ratón (~6 pmol/g de ratón)), que fue similar a la respuesta producida por el péptido Con14 de *C. geographus* (no se especificó la dosis utilizada (Olivera et al., 1990)). A pesar que los síntomas de rascado y acicalado producidos por los péptidos de *C. austini* fueron reversibles, la dosis utilizada también fue muy baja (debido a la baja disponibilidad de la toxina no se evaluaron mayores dosis).

No obstante, la similitud estructural entre los péptidos as14a/as14b y el péptido Con14 (Tabla 11), sugiere que los tres péptidos pueden compartir el blanco biológico en el SNC de los ratones, aunque en ninguno de los casos se ha determinado el blanco de acción molecular.

Existen otros péptidos que provocan el síntoma de rascado que han sido aislados de caracoles vermívoros también: Lys-conopresina-G de *C. imperialis* (Nielsen et al., 1994), que actúa sobre los receptores de vasopresina, y los péptidos QcIIIa, QcIIIb y QcVIa, de *C. quercinus*, cuyo blancos farmacológicos aun no se identifican (Abogadie et al., 1990).

Con relación a los péptidos de *C. austini*, la estructura del péptido as14b presentó varios residuos que podrían estar relacionados con su actividad biológica (Tabla 11). Por ejemplo, los residuos de valina presentes en las posiciones 26 y 27, también los presenta el péptido opioide deltorfina C (secuencia YAFEVVG), que produce analgesia (Ji et al., 1995). El péptido as14b tuvo otra característica estructural importante: la doble tirosina-, que también ha sido encontrada en la familia peptídica pancreática, formada por el polipéptido pancreático (abreviado PP), el neuropéptido Y (abreviado YY), y el péptido PYY.

Es posible que la combinación de dobles tirosinas presentes en el péptido as14b aumentara el sitio de reconocimiento de los canales o receptores del modelo ensayado y, por lo tanto, los ratones manifestaron efectos mayores en el SNC, comparado con as14a, en el que sólo presentaron efectos moderados (Tabla 7). Presumiblemente los verdaderos receptores del péptido Con14, de *C. geographus* (una especie piscivora), sean canales iónicos o receptores presentes en los peces que componen su dieta, y los síntomas de rascado que se producen en los ratones se deban a que existen canales iónicos o receptores homólogos a los de los peces.

En el caso de los péptidos as14a/b, de *C. austini*, probablemente los receptores blancos moleculares sean canales iónicos o receptores presentes en los gusanos poliquetos que cazan. Desafortunadamente, no se evaluó la toxina de *C. geographus* en peces, ni las de *C. austini* en poliquetos para corroborar esta hipótesis. Aunque existe cierta evidencia que los canales iónicos y receptores son moderadamente conservados en diferentes sistemas filogenéticos (Anderson & Greenberg, 2001). Así que, dada la similitud estructural y en actividad biológica de los péptidos Con14, de *C. geographus*, y los péptidos as14a/b de *C. austini*, presumiblemente algunos blancos biológicos entre los mamíferos, los peces y los gusanos deben ser moderadamente conservados.

A pesar de lo dicho anteriormente, la complejidad farmacológica de los venenos de *Conus* no puede ser explicada solamente por la estrategia de producir toxinas que paralizan las presas (Fainzilber et al., 1991). Por ejemplo, los efectos conductuales producidos por  $\delta$ -TxVIA en langostas, claramente no son un efecto paralítico (esta toxina, aislada del caracol moluscívoro *C. textile*, provoca que los crustáceos se tornen muy agresivos, por lo que originalmente se le denominó péptido “King Kong”). Tal fenómeno puede sugerir una interacción de  $\delta$ -TxVIA con blancos moleculares de langosta con funciones muy diferentes a los de blancos neuronales de moluscos, que son canales de sodio activados por voltaje (Hillyard et al., 1989). Otra posible explicación es que los blancos biológicos de una conotoxina pueden ser a nivel de un subtipo de un canal o receptor iónico que únicamente está presente en una de las especies evaluadas.

La siguiente explicación de actividad biológica de las  $\gamma$ -conotoxinas podría cumplir con este último aspecto:

Se aisló un péptido de *C. austini* (as7a), similar a las  $\gamma$ -conotoxinas de *C. textile* (Fainzilber et al., 1991) y *C. pennaceus* (Fainzilber et al., 1998), ambos caracoles molusquívoros, y de *C. delessertii*, un caracol vermívoro (Aguilar et al., 2005a). Con respecto a la actividad biológica de las  $\gamma$ -conotoxinas, sólo se han evaluado las toxinas TxVIIA de *C. textile* y PnVIIA de *C. pennaceus*: la toxina TxVIIA tuvo actividad biológica en neuronas caudodorsales de *Lymnaea* (un caracol dulceacuícola), pero no presentó actividad en neuronas de *Aplysia* (un nudibranquio) (Fainzilber et al., 1998). Por otro lado, la toxina PnVIIA tuvo el efecto contrario a la toxina TxVIIA: presentó actividad en la especie marina pero no en la dulceacuícola (Fainzilber et al., 1998). Respecto al péptido de *C. austini*, la especificidad biológica fue similar a la toxina PnVIIA de *C. pennaceus*: sólo se presentó en el molusco dulceacuícola *Pomacea paludosa*, pero no en la especie marina *Patella opaea* (aunque habría que aclarar que los moluscos nudibranquios de la especie *Aplysia* no están relacionados filogenéticamente con los caracoles *Patella*, aunque ambos pertenezcan al Phylum Gastropoda). Así que, hasta el momento, las  $\gamma$ -conotoxinas tienen diferentes especificidades a nivel del molusco evaluado, pero los mecanismos que favorecen esta especificidad biológica son aún desconocidos.

De esta forma, las  $\gamma$ -conotoxinas evaluadas biológicamente hasta el momento podrían ser herramientas útiles para estudiar el sistema nervioso de ciertos moluscos. También, al parecer, las  $\gamma$ -conotoxinas no presentan actividad en los modelos ensayados de mamíferos: la inyección intracraneal del péptido as7a de *C. austini*, no causó ninguna actividad en ratones; por su parte, la toxina TxVIIA tampoco provocó toxicidad en ratas (Fainzilber et al., 1998).

Así que en este trabajo se muestra la complejidad estructural de las conotoxinas presentes en el veneno de *C. austini*. Los péptidos caracterizados del veneno de *Comus austini* permiten suponer que los caracoles vermívoros también tienen una estrategia

bioquímica similar a los conos piscívoros y molusquívoros, que es la producción de péptidos con 15-35 aminoácidos en promedio, con una alta proporción del residuo cisteína, formando generalmente 2-3 puentes bisulfuro. La variabilidad en los patrones de cisteínas obtenidas de los péptidos de *C. austini* quedaron evidenciados con el péptido as15a, que presentó un nuevo espaciamiento de 6 cisteínas, y con los péptidos as14a/b, con cuatro cisteínas, en un nuevo patrón para caracoles vermívoros. Probablemente la colonización de nuevos ambientes por parte de alguna especie de *Comus*, a partir de alejamiento de su centro de radiación ecológica –el Indopacífico–, permitió la evolución de conotoxinas con nuevas estructuras y probablemente blancos biológicos ante la presencia de nuevas presas y/o depredadores (Kohn, 1990). De esta manera, los resultados obtenidos muestran que seguramente seguirán encontrándose nuevas familias de conotoxinas conforme se amplíe la investigación de especies de *Comus* aisladas geográficamente con respecto a las especies del Indopacífico, que han sido las especies mayormente estudiadas (Apéndices 1 y 2).

Con respecto a los ensayos biológicos, los resultados mostraron que las conotoxinas de *C. austini* presentaron actividad en ratones y moluscos, aunque son estudios preliminares y será necesario, en el futuro, utilizar modelos en tejidos o células para determinar la actividad biológica precisa en receptores o canales iónicos. También, como un aspecto prospectivo y aunque se ha comprobado que los ratones son un modelo muy utilizado para evaluar la actividad de las conotoxinas, ya que ocasionan trastornos de la conducta normal del ratón, será necesario utilizar un mayor número de muestra, así como las concentraciones utilizadas, para aumentar la evidencia toxicológica para el ratón y cualquiera otra especie utilizada.

## X. CONCLUSIONES

1. Este es el segundo reporte acerca del tipo de alimentación de un cono del Atlántico mexicano, y permitió determinar que *C. austini* es una especie vermívora
2. Se descubrió una conotoxina (as15a) que presentó un nuevo patrón de los residuos de cisteínas: C-C-C-C-CC. La conotoxina tuvo actividad biológica en ratones, aunque no se identificó el blanco de acción.
3. Se ha caracterizado parcialmente una toxina (asB), que presentó varias modificaciones postraduccionales: tres residuos de  $\gamma$ -carboxiglutamato y uno de hidroxiprolina.
4. Se caracterizó un péptido (as7a) similar a las  $\gamma$ -conotoxinas. Es la segunda toxina de esta familia que se caracteriza de un caracol vermívoro. Este péptido causó síntomas aparentes de toxicidad en un molusco.
5. Se descubrieron dos toxinas (as14a y as14b), que tienen un patrón de cisteínas nuevo para caracoles vermívoros: C-C-C-C. Ambos péptidos provocaron alteraciones en la conducta de ratones, aunque el blanco preciso de acción no fue determinado.

## REFERENCIAS

- Abogadie FC, Ramilo CA, Corpuz GP, Cruz LJ. (1990). Biologically active peptides from *Comus quercinus*, a worm-hunting species. *Trans. Natl. Acad. Sci. Tech. (Philippines)* 12: 219-232.
- Abott RT. (1974). *The marine mollusca of the Atlantic and Pacific Coasts of North America*. 2nd ed., Van Nostrand Reinhold, New York.
- Aguilar MB, López-Vera E, Imperial JS, Falcón A, Olivera BM. (2005a). Putative  $\gamma$ -conotoxins in vermivorous cone snails: the case of *Comus delessertii*. *Peptides* 26: 23-27.
- Aguilar MB, López-Vera E, Ortiz E, Becerril B, Posani LD, Olivera BM, Heimer de la Cotera EP. (2005b). A novel conotoxin from *Comus delessertii* with posttranslationally modified lysine residues. *Biochemistry* 44: 11130-11136.
- Alonso D, Khalil Z, Satkunanthan N, Livett BG. (2003). Drugs from the sea: conotoxins as drugs leads for neurophatic pain and other neurological conditions. *Mini Rev. Med. Chem.* 3: 785-787.
- Anderson PAV, Greenberg RM. (2001). Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp. Biochem. Physiol. B* 129:17-28.
- Azam L, Dowell C, McIntosh JM. (2002). Characterization of nicotine-mediated dopamine release from striatal synaptosomes using a novel  $\alpha$ -conotoxin. *Soc. Neurosci. Abstr. Program no.* 2429.
- Balaji RA, Ohtakes A, Kazuki S, Gopalakrishnakone P, Kini RM, Tong-Seow K, Bay BH. (2000).  $\lambda$ -conotoxins, a new family of conotoxins with unique disulphide pattern and protein folding. *J. Biol. Chem.* 275: 39516-39522.
- Bandyopadhyay PK, Colledge CJ, Walker CS, Zhou LM, Hillyard DR, Olivera BM. (1998). Conantokin-G precursor and its role in  $\gamma$ -carboxylation by vitamin K-dependent carboxylase from a *Comus* snail. *J. Biol. Chem.* 273: 5447-5450.
- Bandyopadhyay PK, Garrett JE, Shetty RP, Keate T, Walker CS, Olivera BM. (2002).  $\gamma$ -Glutamyl carboxylation: an extracellular post-translational modification that antedates the divergence of molluscs, arthropods and chordates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1264-1269.
- Bidlingmeyer BA, Cohen SA, Tarvin TL. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J Chromatogr.* 336:93-104.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cartier GE, Yoshikami D, Gray WR, Luo S, Olivera BM, McIntosh JM. (1996). A new  $\alpha$ -conotoxin which targets  $\alpha_3\beta_2$  nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 271: 7522-7528.

Chen J, Fan C, Hu K, Wei K, Zhong M. (1999). Studies on conotoxins of *Conus betulinus*. J. Nat. Toxins 8: 341-349.

Clark C, Olivera BM, Cruz LJ. (1981). A toxin from *Conus geographus* venom which acts on the vertebrate central nervous system. Toxicon 19: 691-699.

Cohen SA, Bidlingmeyer BA, Tarvin TL. (1986). PITC derivatives in amino acid analysis. Nature 320: 769-770.

Colledge CJ, Hunsperger JP, Imperial JS, Hillyard DR. (1992). Precursor structure of  $\omega$ -conotoxin GVIA determined from a cDNA clone. Toxicon 30: 1111-1116.

Coomans HE, Moolenbeek RG, Wils E. (1981). Alphabetical revision of the (sub)species in recent Conidae 4. *aphrodite* to *azona* with the description of *Conus arenatus bizona*, nov. subspecies. Basteria 45: 38.

Craig AG, Jimenez EC, Dykert J, Nielsen DB, Gulyas J, Abogadie FC, Porter J, Rivier JE, Cruz LJ, Olivera BM. (1997). A novel post-translational modification involving bromination of tryptophan. Identification of the residue, L-6-bromotryptophan, in peptides from *Conus imperialis* and *Conus radiatus* venom. J. Biol. Chem 272: 4689-4698.

Craig AG, Zafaralla G, Cruz LJ, Santos AD, Hillyard DR, Dykert J, Rivier JE, Gray WR, Imperial J, Delacruz RG, Sporning A, Terlau H, West PJ, Yoshikami D, Olivera BM. (1998). An *O*-glycosylated neuroexcitatory *Conus* peptide. Biochemistry 37: 16019-16025.

Craik DJ, Daly NL, Waine C. (2001). The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. Toxicon 39: 43-60.

Craig AG, Bandyopadhyay PK, Olivera BM. (1999a). Post-translationally modified peptides from *Conus* venoms. Eur. J. Biochem. 264: 271-275.

Craig AG, Norberg, T, Griffin D, Hoeger C, Akhtar M, Schmidt K, Low W, Dykert J, Richelson E, Navarro V, Macella J, Watkins M, Hillyard D, Imperial J, Cruz LJ, Olivera BM. (1999b). Contulakin-G, an *O*-glycosylated invertebrate neurotensin. J. Biol. Chem. 274: 13752-13759.

Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM. (1978). Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus* venom. Arch. Biochem. Biophys. 190: 539-548.

Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM, Zeikus RD, Kerr L, Yoshikami D, Moczydlowski E. (1985). *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. J. Biol. Chem. 260: 9280-9288.

Cruz LJ, De Santos V, Zafaralla GC, Ramilo CA, Zeikus R, Gray WR, Olivera BM. (1987). Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs. Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus striatus* venoms. J. Biol. Chem. 262: 15821-15824.

Cruz LJ, White J. (1995). Clinical toxicology of *Comus* snail stings. En: Meier J, White J. (Eds). Clinical Toxicology of Animal Venoms. CRC. Boca Raton.

Dauplais M, Lecoq A, Song J, Cotton J, Jamin N, Gilquin B, Roumestand C, Vita C, De Medeiros, C, Rowan EG, Harvey AL, Ménez A. (1997). On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. J. Biol. Chem. 272: 4802-4809.

Delgado-Blas VH. (2001). Distribución espacial y temporal de poliquetos (Polychaeta) bénticos de la plataforma continental de Tamaulipas, Golfo de México. Rev. Biol. Trop. 49: 141-147.

Duda TF, Palumbi SR. (1999). Molecular genetics of ecological diversification: duplication and rapid evolution of toxin genes of the venomous gastropod *Comus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 6820-6823.

Duda TF, Kohn AJ, Palumbi SR. (2001). Origins of diverse feeding ecologies within *Comus*, a genus of venomous marine gastropods. Biol. J. Linn. Soc. London 73: 391-409.

Duda TF, Kohn AJ. (2005). Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Comus*. Molec. Phylog. Evol. 34: 257-272.

Ellison M, McIntosh JM, Olivera BM. (2003).  $\alpha$ -Conotoxins ImI and ImII: similar  $\alpha$ 7 nicotinic receptor antagonists act at different sites. J. Biol. Chem. 278: 757-764.

Endean R, Rudkin C. (1963). Studies of the venoms of Conidae. Toxicon 1: 49-64.

Endean R, Rudkin C. (1965). Further studies of the venoms of Conidae. Toxicon 2:225-249.

England LJ, Imperial J, Jacobsen R, Craig AG, Gulyas J, Akhtar M, Rivier J, Julius D, Olivera BM. (1998). Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. Science 281: 575-578.

Escobar-Briones EG, Soto LA. (1997). Continental shelf benthic biomass in the western Gulf of Mexico. Cont. Shelf Res. 6: 585-604.

Etter RJ, Grassle JF. (1992). Patterns of species diversity in deep sea as a function of sediment particle size diversity. Nature 360: 576-578.

Fainzilber M, Gordon D, Hasson A, Spira M, Zlotkin E. (1991). Mollusc-specific toxins from the venom of *Conus textile neovicarius*. Eur. J. Biochem. 202: 589-595.

Fainzilber M, Zlotkin E. (1992). A new bioassay reveals mollusk-specificity in molluscivorous *Comus* venoms. Toxicon 30: 464-469.

Fainzilber M, Hasson A, Oren R, Burlingame AL, Gordon D, Spira ME, Zlotkin E. (1994). New mollusc-specific  $\alpha$ -conotoxins block *Aplysia* neuronal acetylcholine receptors. Biochemistry 33: 9523-9529.

- Cruz LJ, White J. (1995). Clinical toxicology of *Comus* snail stings. En: Meier J, White J. (Eds). *Clinical Toxicology of Animal Venoms*. CRC. Boca Raton.
- Dauplais M, Lecoq A, Song J, Cotton J, Jamin N, Gilquin B, Roumestand C, Vita C, De Medeiros, C, Rowan EG, Harvey AL, Ménez A. (1997). On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *J. Biol. Chem.* 272: 4802-4809.
- Delgado-Blas VH. (2001). Distribución espacial y temporal de poliquetos (Polychaeta) bénticos de la plataforma continental de Tamaulipas, Golfo de México. *Rev. Biol. Trop.* 49: 141-147.
- Duda TF, Palumbi SR. (1999). Molecular genetics of ecological diversification: duplication and rapid evolution of toxin genes of the venomous gastropod *Comus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6820-6823.
- Duda TF, Kohn AJ, Palumbi SR. (2001). Origins of diverse feeding ecologies within *Comus*, a genus of venomous marine gastropods. *Biol. J. Linn. Soc. London* 73: 391-409.
- Duda TF, Kohn AJ. (2005). Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Comus*. *Molec. Phylog. Evol.* 34: 257-272.
- Ellison M, McIntosh JM, Olivera BM. (2003).  $\alpha$ -Conotoxins ImI and ImII: similar  $\alpha 7$  nicotinic receptor antagonists act at different sites. *J. Biol. Chem.* 278: 757-764.
- Endean R, Rudkin C. (1963). Studies of the venoms of Conidae. *Toxicon* 1: 49-64.
- Endean R, Rudkin C. (1965). Further studies of the venoms of Conidae. *Toxicon* 2:225-249.
- England LJ, Imperial J, Jacobsen R, Craig AG, Gulyas J, Akhtar M, Rivier J, Julius D, Olivera BM. (1998). Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science* 281: 575-578.
- Escobar-Briones EG, Soto LA. (1997). Continental shelf benthic biomass in the western Gulf of Mexico. *Cont. Shelf Res.* 6: 585-604.
- Etter RJ, Grassle JF. (1992). Patterns of species diversity in deep sea as a function of sediment particle size diversity. *Nature* 360: 576-578.
- Fainzilber M, Gordon D, Hasson A, Spira M, Zlotkin E. (1991). Mollusc-specific toxins from the venom of *Conus textile neovicarius*. *Eur. J. Biochem.* 202: 589-595.
- Fainzilber M, Zlotkin E. (1992). A new bioassay reveals mollusk-specificity in molluscivorous *Comus* venoms. *Toxicon* 30: 464-469.
- Fainzilber M, Hasson A, Oren R, Burlingame AL, Gordon D, Spira ME, Zlotkin E. (1994). New mollusc-specific  $\alpha$ -conotoxins block *Aplysia* neuronal acetylcholine receptors. *Biochemistry* 33: 9523-9529.

- Fainzilber M, Nakamura T, Gaathon A, Lodder JC, Kits KS, Burlingame AL, Zlotkin E. (1995). A new cysteine framework in sodium channel blocking conotoxins. *Biochemistry* 34: 8649-8656.
- Fainzilber M, Lodder JC, Van der Schors RC, Li KW, Yu Z, Burlingame AL, Geraerts WP, Kits KS. (1996). A novel hydrophobic  $\omega$ -conotoxin blocks molluscan dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Biochemistry* 35: 8748-8752.
- Fainzilber M, Nakamura T, Lodder JC, Zlotkin E, Kits KS, Burlingame AL. (1998).  $\gamma$ -conotoxin-PnVIIA, a  $\gamma$ -Carboxyglutamate-containing peptide agonist of neuronal pacemaker cation currents. *Biochemistry* 37: 1470-1477.
- Fan CX, Chen XK, Zhang C, Wang LX, Duan KL, He LL, Cao Y, Liu SY, Zhong MN, Ulens C, Tytgat J, Chen JS, Chi CW, Zhou Z. (2003). A novel conotoxin from *Conus betulinus*,  $\kappa$ -BtX, unique in cysteine pattern and in function is a specific BK channel modulator. *J. Biol. Chem.* 278: 12624-12633.
- Fauchald K. (1977). The polychaete worms, definitions and keys to the Orders, Families and Genera. *Nat. Hist. Mus. LA County Mus. Sci. Ser.* 28: 1-190.
- Favreau P, Krimm I, Le Gall F, Bobenieth MJ, Lamthanh H, Bouet F, Servent D, Molgo J, Ménez A, Letourneux Y, Lancelin JM. (1999). Biochemical characterization and nuclear magnetic resonance structure of novel alpha-conotoxins isolated from the venom of *Conus consors*. *Biochemistry* 11: 6317-6326.
- Favreau P, Gilles N, Lamthanh H, Bournaud R, Shimahara T, Bouet F, Laboute P, Letourneux Y, Ménez A, Molgó J, Le Gall F. (2001). A new omega-conotoxin that targets N-type voltage-sensitive calcium channels with unusual specificity. *Biochemistry* 4: 14567-14575.
- Ferber M, Sporning A, Jeserich G, Delacruz R, Watkins M, Olivera BM, Terlau H. (2003). A novel *Conus* peptide ligand for  $K^+$  channels. *J. Biol. Chem.* 278: 2177-2183.
- Feregrino-Pérez AG. (2004). Determinación del efecto de extractos de glándulas y conductos venenosos de gasterópodos marinos sobre la contractilidad del músculo liso intestinal. Tesis de Maestría. Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Floeter SR, Soares-Gomes A. (1999). Biogeographic and species richness patterns of gastropoda on the southwestern Atlantic. *Rev. Brasil. Biol.* 59: 567-575.
- Gad SC, Changelis CP. (1992). *Animal Models in Toxicology*. Marcel Dekker Inc, New York, 1992.
- Gray JS. (1997). Marine biodiversity, patterns, threats and conservation needs. *Biodiv. Conserv.* 6: 153-175.
- Gray WR, Luque A, Olivera BM, Barrett J, Cruz LJ. (1981). Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *J. Biol. Chem.* 256: 4734-4740.

- Haack JA, Rivier J, Parks TN, Mena EE, Cruz LJ, Olivera BM. (1990). Conantokin T: a  $\gamma$ -carboxyglutamate-containing peptide with *N*-methyl-D-aspartate antagonist activity. *J. Biol. Chem.* 265: 6025-6029.
- Halstead BW, Halstead LG. (1988). Poisonous and venomous marine animals of the world. Darwin Press, New Jersey.
- Hansson K, Furie B, Stenflo J. (2004). Isolation and characterization of three novel Gla-containing *Conus marmoreus* venom peptides, one with a novel cysteine pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 1081-1087.
- Hasson A, Shon KJ, Olivera BM, Spira ME. (1995). Alterations of voltage-activated sodium current by a novel conotoxin from the venom of *Conus gloriamaris*. *J. Neurophys.* 73: 1295-1301.
- Heinrikson RL, Meredith SC. (1984). Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisocyanate. *Anal. Biochem.* 136: 65-74.
- Hille B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed., Sinauer. Sunderland.
- Hillyard DR, Olivera BM, Woodward S, Corpuz GP, Gray WR, Ramilo CA, Cruz LJ. (1989). A molluscivorous *Conus* toxin: conserved frameworks in conotoxins. *Biochemistry* 10: 358-361.
- Hillyard DR, Monje VD, Mintz IM, Bean BP, Nadasdi L, Ramachandran J, Miljanich G, Azimi-Zoonooz A, McIntosh JM, Cruz LJ, Imperial JS, Olivera BM. (1992). A new *Conus* peptide ligand for mammalian presynaptic  $Ca^{2+}$  channels. *Neuron* 9: 69-77.
- Hopkins C, Grilley M, Miller C, Shon K, Cruz LJ, Gray WR, Dykert J, Rivier J, Yoshikami D, Olivera BM. (1995). A new family of *Conus* peptides targeted to the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 22361-22367.
- Hutchings P. (1998). Biodiversity and functioning of polychaetes in benthic sediments. *Biodiv. Conserv.* 7: 1133-1145.
- Jacobsen R, Yoshikami D, Ellison M, Martinez J, Gray WR, Cartier GE, Shon KJ, Groebe DR, Abramson SN, Olivera BM, McIntosh JM. (1997). Differential targeting of nicotinic acetylcholine receptors by novel  $\alpha$ A-conotoxins. *J. Biol. Chem.* 272: 22531-22537.
- Jacobsen R, Jimenez EC, Grilley M, Watkins M, Hillyard D, Cruz LJ, Olivera BM. (1998). The contryphans, a D-tryptophan-containing family of *Conus* peptides: interconversion between conformers. *J. Peptide Res.* 51: 173-179.
- Jacobsen R, Delacruz RG, Grose JH, McIntosh JM, Yoshikami D, Olivera BM. (1999). Critical residues influence the affinity and selectivity of  $\alpha$ -conotoxin MI for nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry* 38: 13310-13315.

- Ji H, Zhang R, Hu X, Lai L, Xu X. (1995). Synthesis, conformation and opioid activity of deltorphins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207: 99-104.
- Jiang H, Wang CZ, Xu CQ, Fan CX, Dai XD, Chen JS, Chi CW. (2005). A novel M-superfamily conotoxin with a unique motif from *Comus vexillum*. *Peptides*, en prensa.
- Jimenez EC, Olivera BM, Gray WR, Cruz LJ. (1996). Contryphan is a D-tryptophan-containing *Comus* peptide. *J. Biol. Chem.* 281: 28002-28005.
- Jimenez EC, Donevan SD, Walker C, Zhou LM, Nielsen J, Cruz LJ, Armstrong H, White HS, Olivera BM. (2002). Conantokin-L, a new NMDA receptor antagonist: determinants for anticonvulsant potency. *Epilepsy Res.* 51: 73-80.
- Jimenez EC, Watkins M, Olivera BM. (2004). Multiple 6-bromotryptophan residues in a sleep-inducing peptide. *Biochemistry* 43: 12343-12348.
- Jones RM, Bulaj G. (2000). Conotoxins: new vistas for peptide therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* 6: 1249-1255.
- Kaufenstein S, Huys I, Lamthanh H, Stöcklin R, Sotto F, Ménez A, Tytgat J, Mebs D. (2003). A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. *Toxicon* 42: 43-52.
- Kits KS, Lodder JC, van der Schors R, Li KW, Geraerts WPM, Fainzilber M. (1996). Novel  $\omega$ -conotoxins block dihydropyridine-insensitive high voltage-activated calcium channels in molluscan neurons. *J. Neurochem.* 67: 2155-2163.
- Kohn AJ. (1956). Piscivorous gastropods of the genus *Comus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42: 168-171.
- Kohn AJ. (1959). The ecology of *Comus* in Hawaii. *Ecol. Monogr.* 29: 47-90.
- Kohn AJ. (1967). Environmental complexity and species diversity in the gastropod genus *Comus* on Indo-West Pacific reef platforms. *Am. Nat.* 101: 251-259.
- Kohn AJ. (1971). Diversity, utilization of resources, and adaptive radiation in shallow-water marine invertebrates of tropical oceanic islands. *Limnol. Oceanogr.* 16: 332-348.
- Kohn AJ. (1983). Microhabitat factors affecting abundance and diversity of *Comus* on coral reefs. *Oecologia* 60: 293-301.
- Kohn AJ. (1990). Tempo and mode of evolution in *Comus*. *Malacologia* 32: 55-67.
- Kohn AJ. (1997). Why are coral reef communities so diverse?. En: Ormond RFG, Gage JD, Angel MV. (Eds.). *Marine biodiversity*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kohn AJ. (2001). Maximal species richness in *Comus*: diversity, diet and habitat on reefs of northeast Papua New Guinea. *Coral Reefs* 20: 25-38.

Kohn AJ, Nybakken JW. (1975). Ecology of *Comus* on eastern Indian Ocean fringing reefs: diversity of species and resource utilization. *Mar. Biol.* 29: 211-234.

Kohn AJ, Perron FE. (1994) Life history and biogeography: patterns in *Comus*. Oxford University Press, Oxford.

Kohn AJ, Saunders PR, Wiener S. (1960). Preliminary studies of the venom of the marine snail *Comus*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 90: 706-725.

Lewis RJ, Nielsen KJ, Craik DJ, Loughnan ML, Adams DA, Sharpe IA, Luchian T, Adams DJ, Bond T, Thomas L, Jones A, Matheson JL, Drinkwater R, Andrews PR, Alewood PF. (2000). Novel  $\omega$ -conotoxins from *Comus catus* discriminate among neuronal calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.* 275: 35335-35344.

Lim CF. (1970). Identification of the feeding types in the Genus *Comus* Linnaeus. *The Veliger* 12: 160-164.

Lirazan MB, Hooper D, Corpuz GP, Ramilo CA, Bandyopadhyay P, Cruz LJ, Olivera BM. (2000). The spasmodic peptide defines a new conotoxin superfamily. *Biochemistry* 39: 1583-1588.

Livett BG, Khalil Z, Gayler K, Down J. (2002). Alpha conotoxin peptides with analgesic properties. Proceedings of the World Intellectual Property Organization, International Bureau, WO 02/079236 A1.

Livett BG, Ken R, Gayler KR, Zeinab Z. (2004). Drugs from the sea: conopeptides as potential therapeutics. *Curr. Med. Chem.* 11: 1715-1723.

Loughnan M, Bond T, Atkins A, Cuevas J, Adams DJ, Broxton NM, Livett BG, Down JG, Jones A, Alewood PF, Lewis RJ. (1998).  $\alpha$ -Conotoxin EpI, a novel sulfated peptide from *Comus episcopatus* that selectively targets neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 273: 15667-15674.

Loughnan M, Nicke A, Jones A, Adams DJ, Alewood PF, Lewis RJ. (2004). Chemical and functional identification and characterization of novel sulfated  $\alpha$ -conotoxins from the snail *Comus amemone*. *J. Med. Chem.* 47: 1234-1241.

Luo S, Kulak JM, Cartier GE, Jacobsen RB, Yoshikami D, Olivera BM, McIntosh JM. (1998).  $\alpha$ -conotoxin AuIB selectively blocks  $\alpha_3\beta_4$  nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *J. Neurosci.* 18: 8571-8579.

Maillo M, Aguilar MB, López-Vera E, Craig AG, Bulaj G, Olivera BM, Heimer de la Coteria EP. (2002). Conorfamide, a *Comus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides. *Toxicon* 40: 401-417.

Martinez JS, Olivera BM, Gray WR, Craig AG, Groebe DR, Abramson SN, McIntosh JM. (1995).  $\alpha$ -Conotoxin EI, a new nicotinic acetylcholine receptor antagonist with novel selectivity. *Biochemistry* 34: 14519-14526.

- Massilia GR, Schinina ME, Ascenzi P, Polticelli F. (2001). Contryphan-Vn: a novel peptide from the venom of the Mediterranean snail *Comus ventricosus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 908-913.
- McIntosh JM, Jones RM. (2001). Cone venom -from accidental stings to deliberate injection. *Toxicon* 39: 1447-1451.
- McIntosh JM, Cruz LJ, Hunkapiller MW, Gray WR, Olivera BM. (1982). Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Comus magus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 218: 329-334.
- McIntosh JM, Yoshikami D, Mahe E, Nielsen DB, Rivier JE, Gray WR, Olivera BM. (1994). A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity,  $\alpha$ -conotoxin ImI. *J. Biol. Chem.* 269: 16733-16739.
- McIntosh JM, Hasson A, Spira ME, Gray WR, Li W, Marsh M, Hillyard DR, Olivera BM. (1995). A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels. *J. Biol. Chem.* 270: 16796-16802.
- McIntosh JM, Dowell C, Watkins M, Garret JE, Yoshikami D, Olivera BM. (2002). Alpha-conotoxin GIC from *Comus geographus*, a novel peptide antagonist of nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 277: 33610-33615.
- Miles LA, Dy CY, Nielsen J, Barnham KJ, Hinds MG, Olivera BM, Bulaj G, Norton RS. (2002). Structure of a novel P-superfamily spasmodic conotoxin reveals an inhibitory cysteine knot motif. *J. Biol. Chem.* 277: 43033-43040.
- Monje VD, Haack JA, Naisbitt SR, Miljanich J, Ramachandran J, Nasdasdi L, Olivera BM. (1993). A new *Comus* peptide ligand for  $Ca^{2+}$  channel subtypes. *Neuropharmacology* 32: 1141-1149.
- Myers RA, McIntosh JM, Imperial J, Williams RW, Oas T, Haack JA, Hernandez JF, Rivier J, Cruz LJ, Olivera BM. (1990). Peptides from *Comus* venoms which affect  $Ca^{2+}$  entry into neurons. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* 9: 179-202.
- Myers RA, Zafaralla GC, Gray WR, Abbot J, Cruz LJ, Olivera BM. (1991). Alpha-conotoxins, small peptide probes of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry* 24: 9370-9377.
- Nicke A, Loughnan ML, Millard EL, Alewood PF, Adams DJ, Daly NL, Craik DJ, Lewis RJ. (2003). Isolation, structure, and activity of GID, a novel alpha 4/7-conotoxin with an extended N-terminal sequence. *J. Biol. Chem.* 31: 3137-3144.
- Nielsen DB, Dykert J, Rivier JE, McIntosh JM. (1994). Isolation of Lys-conopressin-G from the venom of the worm-hunting snail *Comus imperialis*. *Toxicon* 32: 845-848.
- Olivera BM. (2000).  $\omega$ -conotoxin MVIIA: From marine snail venom to analgesic drug. *Drugs From The Sea*, Fusetani, N. (ed). Basel, Karger, pp 74-85.

- Olivera BM, Cruz LJ, Yoskikami D. (1999). Effects of *Comus* peptides on the behavior of mice. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 772-777.
- Olivera BM, Imperial JS, Bulaj G. (2002). Cone snails and conotoxins: evolving sophisticated neuropharmacology. En: Menez A. (Ed.). *Perspectives in Molecular Toxinology*. Wiley, United Kingdom.
- Olivera BM, McIntosh JM, Cruz LJ, Luque FA, Gray WR. (1984). Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Comus geographus* venom. *Biochemistry* 23: 5087-5090.
- Olivera BM, McIntosh JM, Clark C, Middlemas D, Gray WR, Cruz LJ. (1985a). A sleep-inducing peptide from *Comus geographus* venom. *Toxicon* 23: 277-282.
- Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, Vargas J, Rivier J, De Santos V, Cruz LJ. (1985b). 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, Cruz LJ. (1990). Diversity of *Comus* neuropeptides. *Science* 249: 257-263.
- Olivera BM. (2002). *Comus* venom peptides: reflections from the biology of clades and species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33: 25-42.
- Olivera BM, Cruz LJ. (2001). Conotoxins, in retrospect. *Toxicon* 39: 7-14.
- Pérez-Rodríguez R. (1997). Moluscos de la plataforma continental del Atlántico Mexicano. UAM, Unidad Xochimilco, México.
- Pisarewicz K, Mora D, Pflueger FC, Fields GB, Mari F. 2005. Polypeptide chains containing D- $\gamma$ -hydroxyvaline. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 6207-6215.
- Ramilo CA, Zafaralla GC, Nadasdi L, Hammerland LG, Yoshikami D, Gray WR, Kristipati R, Ramachandran J, Miljanich G, Olivera BM. (1992). Novel alpha- and omega-conotoxins from *Comus striatus* venom. *Biochemistry* 31: 9919-9926
- Rehder HA, Abbott RT. (1951). Two new recent cone shells from the western Atlantic (Conidae). *J. Wash. Acad. Sci.* 41: 22-24.
- Rigby AC, Lucas-Meunier E, Kalume DE, Czerwiec E, Hambe B, Dahlqvist I, Fossier P, Baux G, Roepstorff P, Baleja JD, Furie BC, Furie B, Stenflo J. (1999). A conotoxin from *Comus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5758-5763.
- Santos AD, McIntosh JM, Hillyard DR, Cruz LJ, Olivera BM. (2004). The A-superfamily of conotoxins: structural and functional divergence. *J. Biol. Chem.* 279: 17596-17606.
- Sato S, Nakamura H, Ohizumi Y, Kobayashi J, Hirata Y. (1983). The amino acid sequences of homologous hydroxyproline containing myotoxins from the marine snail *Comus geographus* venom. *FEBS Lett.* 155: 277-280.

- Sharpe IA, Gehrmann J, Loughnan ML, Thomas L, Adams DA, Atkins A, Palant E, Craik DJ, Adams DJ, Alewood PF, Lewis RJ. (2001). Two new classes of conopeptides inhibit the  $\alpha 1$ -adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nat. Neurosci.* 4: 902-907.
- Shon K, Hasson A, Spira ME, Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM. (1994).  $\delta$ -Conotoxin GmVIA, a novel peptide from the venom of *Conus gloriamaris*. *Biochemistry* 33: 11420-11425.
- Shon K, Grilley MM, Marsh M, Yoshikami D, Hall AR, Kurz B, Gray WR, Imperial JS, Hillyard DR, Olivera BM. (1995). Purification, characterization and cloning of the lockjaw peptide from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry* 34: 4913-4918.
- Shon K, Grilley M, Jacobsen R, Cartier GE, Hopkins C, Gray WR, Watkins M, Hillyard DR, Rivier J, Torres J, Yoshikami D, Olivera BM. (1997). A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry* 36: 9581-9587.
- Shon K, Olivera BM, Watkins M, Jacobsen RB, Gray WR, Floresca CZ, Cruz LJ, Hillyard DR, Bring A, Terlau H, Yoshikami D. (1998a).  $\mu$ -Conotoxin PIIIA, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na channel subtypes. *J. Neurosci.* 18: 4473-4481.
- Shon K, Stocker M, Terlau H, Stühmer W, Jacobsen R, Walker C, Grilley M, Watkins M, Hillyard DR, Gray WR, Olivera BM. (1998b).  $\kappa$ -conotoxin PVIIA: a peptide inhibiting the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 273: 33-38.
- Snelgrove PVH, Blackburn TH, Hutchings PA, Alongi DM, Grassle JF, Hummel H, King G, Koike I, Lamshead PJD, Ramsing NB, Solis-Weiss V. (1997). The importance of marine sediment biodiversity in ecosystem processes. *Ambio.* 26: 578-583.
- Snelgrove PVR, Butman CA. (1994). Animal-sediment relationships revisited: cause versus effect. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 32: 111-177.
- Spence I, Gillesen D, Gregson RO, Quinn RJ. (1977). Characterization of the neurotoxic constituents of *Conus geographus* venom. *Life Sci.* 21: 1759-1770.
- Spira ME, Hasson A, Fainzilber M, Gordon D, Zlotkin E. (1993). Chemical and electrophysiological characterization of new peptide neurotoxins from the venom of the molluscivorous snail *Conus textile neovicarius*: a review. *Isr. J. Med. Sci.* 29: 530-543
- Stephenson W, Saenger P, Cook SD. (1979). Problems in establishing a benthic baseline during a macrobenthos survey near Gladstone, Queensland. *Proc. R. Soc. Qd.* 90: 21-32.
- Stone BL, Gray WR. (1982). Occurrence of hydroxyproline in a toxin from the marine snail *Conus geographus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 216: 756-767.
- Sudarshani S, Majumdar S, Ramasamy P, Dhawan R, Pal PP, Ramaswami M, Lala AK, Sikdar SK, Sarma SP, Krishnan KS, Balaram P. (2003). Sodium channel modulating activity in a delta-conotoxin from an Indian marine snail. *FEBS Lett.* 553: 209-212.

- Sudarslal S, Singaravadivelan G, Ramasamy P, Ananda K, Sarma SP, Sujit K, Sikdar SK, Krishnan KS, Balaram P. (2004). A novel 13 residue acyclic peptide from the marine snail, *Conus monile*, targets potassium channels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 317: 682-688.
- Teichert RW, Rivier JR, Dykert J, Cervini L, Gulyas J, Bulaj G, Ellison M, Olivera BM. (2004).  $\alpha$ A Conotoxin-OIVA defines a new  $\alpha$ A conotoxin subfamily of nicotinic acetylcholine receptor inhibitors. *Toxicon* 44: 207-214.
- Teichert RS, Jimenez EC, Olivera BM. (2005).  $\alpha$ S-conotoxin RVIIIA: a structurally unique conotoxin that broadly targets nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry* 44: 7897-7902.
- Terlau H, Olivera BM. (2004). *Conus* venom: a rich source of novel ionic channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* 84: 41-68.
- Terlau H, Shon KJ, Grilley M, Stocker M, Stuhmer W, Olivera BM. (1996). Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature*: 381: 148-151.
- Trussell GC, Etter RJ. (2001). Integrating genetic and environmental forces that shape the evolution of geographic variation in marine snail. *Genetica* 112-113: 321-337.
- Vianna-Braga MC, Konno K, Portaro FC, de Freitas JC, Yamane T, Olivera BM, Pimenta DC. (2005). Mass spectrometric and high performance liquid chromatography profiling of the venom of the Brazilian vermivorous mollusk *Conus regius*: feeding behavior and identification of one novel conotoxin. *Toxicon.* 45: 113-122.
- Walker C, Steel D, Jacobsen RB, Liraz MB, Cruz LJ, Hooper D, Shetty R, Delacruz RC, Nielsen JS, Zhou L, Bandyopadhyay P, Craig A, Olivera BM. (1999). The T-superfamily of conotoxins. *J. Biol. Chem.* 274: 30664-30671.
- Wermeling DP. (2005). Ziconotide, an intrathecally administered N-type calcium channel antagonist for the treatment of chronic pain. *Pharmacotherapy* 25:1084-1094.
- West PJ, Bulaj G, Garrett JE, Olivera BM, Yoshikami D. (2002).  $\mu$ -Conotoxin SmIIIA, a potent inhibitor of TTX-resistant sodium channels in amphibian sympathetic and sensory neurons. *Biochemistry* 41: 15388-15393.
- White HS, McCabe RT, Armstrong H, Donevan S, Cruz LJ, Abogadie FC, Torres J, Rivier JE, Paarman I, Hollmann M, Olivera BM. (2000). In vitro and in vivo characterization of conantokin-R, a selective NMDA antagonist isolated from the venom of the fish-hunting snail *Conus radiatus*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 425-432.
- Yanagawa Y, Abe T, Satake M, Odani S, Susuki J, Ishikawa K. (1988). A novel sodium channel inhibitor from *Conus geographus*: purification, structure, and pharmacological properties. *Biochemistry* 27: 6256-6262.
- Zafaralla GC, Ramilo C, Gray WR, Karlstrom, Olivera BM, Cruz LJ. (1988). Phylogenetic specificity of cholinergic ligands: alpha-conotoxin SI. *Biochemistry* 6: 7102-7105.

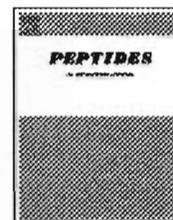
Zugasti-Cruz A, Maillo M, López-Vera E, Falcón A, Heimer de la Cotera EP, Olivera BM, Aguilar MB. (2005). Amino acid sequence and biological activity of a  $\gamma$ -conotoxin-like peptide from the worm-hunting snail *Comus austini*. Peptides. En prensa.



available at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides



# Amino acid sequence and biological activity of a $\gamma$ -conotoxin-like peptide from the worm-hunting snail *Conus austini*

Alejandro Zugasti-Cruz<sup>a,b</sup>, María Maillo<sup>b,1</sup>, Estuardo López-Vera<sup>b,2</sup>, Andrés Falcón<sup>b</sup>, Edgar P. Heimer de la Cotera<sup>b</sup>, Baldomero M. Olivera<sup>c</sup>, Manuel B. Aguilar<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, Mexico

<sup>b</sup> Laboratory of Marine Neuropharmacology, Institute of Neurobiology, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Querétaro 76230, Mexico

<sup>c</sup> Department of Biology, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112, USA

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 27 May 2005

Accepted 20 July 2005

### Keywords:

Conoidea

Conidae

Cone snail

*Conus austini*

Conotoxins

Vermivorous

Worm-hunting

$\gamma$ -Conotoxin

## ABSTRACT

A novel 31-residue toxin, named as7a, was isolated and characterized from the venom of *Conus austini*, a vermivorous cone snail collected in the western Gulf of Mexico. The complete amino acid sequence, TCKQKGECSLDV $\gamma$ CCSSCKPGGPLDFDC, was determined by automatic Edman sequencing after reduction and alkylation. The sequence shows six Cys residues arranged in the pattern that defines the O-superfamily of conotoxins, and the sequence motif  $-\gamma$ CCS-, which has only been found in the  $\gamma$ -conotoxin family. The molecular mass of the native peptide was determined by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, which confirmed the chemical analyses and suggested a free C-terminus. The purified peptide elicited toxic effects in the freshwater snail *Pomacea paludosa* after intramuscular injection, but it had no effect when injected intracerebrally into mice. The structural similarity of peptide as7a to other  $\gamma$ -conotoxins suggests that modulation of pacemaker channels could be responsible for its biological activity.

© 2005 Published by Elsevier Inc.

## 1. Introduction

The venoms of numerous marine animals, such as jellyfish, anemones, and cone snails have been shown to contain a variety of proteinaceous compounds that facilitate prey immobilization and digestion and that are also used for

defense [10]. These compounds may include enzymes that expedite tissue invasion and peptide toxins that interact with specific cell surface receptors and ion channels. In *Conus*, the toxins (named "conotoxins") are primarily used to stun, immobilize, and kill prey, although they could be used for defensive purposes [17]. Although, the vast majority of *Conus*

\* Corresponding author. Tel.: +52 442 238 1043; fax: +52 442 238 1043.

E-mail address: maguilar@servidor.unam.mx (M.B. Aguilar).

<sup>1</sup> Present address: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Química, Lab. Síntesis Orgánica y Productos Naturales, Apartado 21827, Caracas 1020-A, Venezuela.

<sup>2</sup> Present address: Department of Biology, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112, USA.

0196-9781/\$ - see front matter © 2005 Published by Elsevier Inc.

doi:10.1016/j.peptides.2005.07.021

species (~75%) specifically prey on polychaete worms, most studies on conotoxins have been done on fish- and mollusc-eating species. In fact, only ~10–15% of the family envenomate fish, and a similar percentage preys on other gastropods [12]. Almost all the species studied have been collected from coral reefs of the Indo-Pacific region [20]. It has been estimated that the venom of each *Conus* species has between 50 and 200 biologically active peptides, most of which are cysteine-rich peptides of 7–40 amino acids. The majority of the conotoxins contain 1–4 disulfide bridges, and cysteine residues are usually separated by 0–6 amino acids. Cysteines are arranged in only a few patterns, which are diagnostic of the gene superfamily that encodes the peptide, and in many cases they can indicate the pharmacological target of the conotoxin [16]. The O-superfamily is among the best studied, and it consists of  $\delta$ -,  $\mu$ O-,  $\kappa$ -,  $\omega$ -, and  $\gamma$ -conotoxins that share a common cysteine pattern (C-C-CC-C-C, three disulfide bonds) but have different targets:  $\delta$ - and  $\mu$ O-conotoxins affect Na<sup>+</sup> channels either by inhibiting the fast inactivation of Na<sup>+</sup> currents ( $\delta$ -conotoxins) or by inhibition of Na<sup>+</sup> conductance ( $\mu$ O-conotoxins);  $\kappa$ -conotoxins block voltage gated K<sup>+</sup> channels;  $\omega$ -conotoxins inhibit Ca<sup>2+</sup> channels [22].  $\gamma$ -Conotoxins cause excitatory effects in different molluscan neuronal systems: TxVIIA from *C. textile* provokes strong excitatory effects in neurons of *Aplysia* (a marine mollusc) [7], whereas  $\gamma$ -PnVIIA from *C. pennaceus* causes similar excitatory effects in neurons of *Lymnaea* (a freshwater snail) [8]. Toxin  $\gamma$ -PnVIIA acts as an agonist of neuronal pacemaker cation currents, and it is the prototype of the  $\gamma$ -conotoxin family [8]. Recently, a  $\gamma$ -conotoxin-like peptide, de7a, was purified from a vermivorous cone snail (*C. delessertii*) [1]. All these toxins have in common a distinct motif (- $\gamma$ CCS-) that distinguishes them from other conotoxin families (i.e.,  $\delta$ -,  $\mu$ O-,  $\kappa$ -, and  $\omega$ -conotoxins).

Here, we describe the isolation and sequencing of a novel  $\gamma$ -conotoxin-like peptide from the cone snail *Conus austini* collected at depths of 60–80 m in muddy areas of the Gulf of Mexico. This peptide, which we have tentatively named as7a, contains 31 residues, and it is a major component of *C. austini*

venom. Peptide as7a showed toxic effects in *Pomacea paludosa* (intramuscular injection), but had no significant effect on mice (intracranial injection). The biology of *C. austini* has also been investigated: microscopic analysis of the stomach content of several specimens revealed the presence of chaetae in all cases, which shows that the feeding type of this species is vermivorous.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Octadecyl (C18) and octyl (C8) reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) columns were from Vydac (Hesperia, CA). Reagents for N-terminal sequencing were from Applied Biosystems (Foster City, CA). HPLC-grade acetonitrile (ACN) was purchased from Caledon (Georgetown, Ontario, Canada); 4-vinylpyridine from Sigma (St. Louis, MO) was distilled under vacuum and trifluoroacetic acid (TFA) was from Fluka (Buchs, Switzerland).

### 2.2. Specimen collection and feeding type determination

Adult *C. austini* specimens (Fig. 1A) were collected at a depth of ~80 m along the coast of Tamaulipas, Mexico. The digestive tracts were opened under a dissecting microscope, and any contents were removed and mounted on a microscope slide. The slides were then examined to identify the remains and thus determine the type of prey ingested [15].

### 2.3. Venom separation and fractionation

Venom ducts were dissected from the animals. Crude venom extract was obtained by homogenization of 10 venom ducts in 5 ml of extraction buffer (40% ACN containing 0.1% TFA) at 4 °C. The homogenate was centrifuged at 10,100 × g at 4 °C for 20 min, and the supernatant was lyophilized and stored at

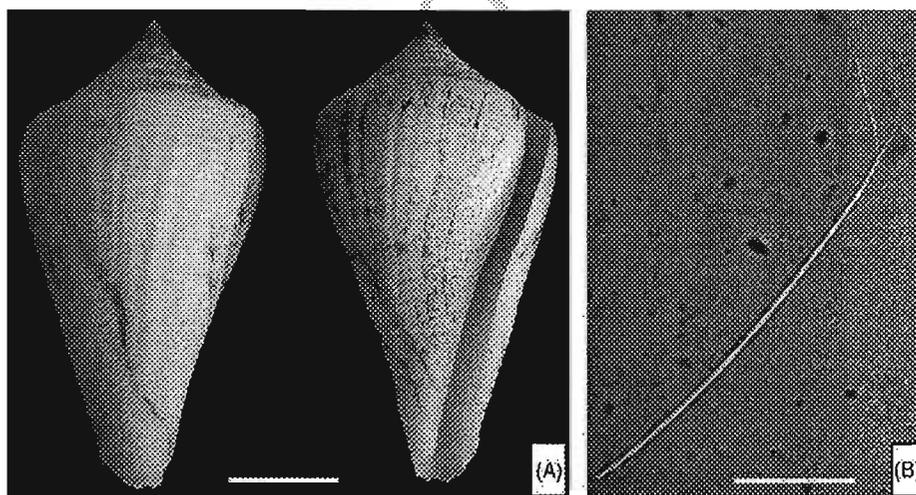


Fig. 1 - (Panel A) The worm-hunting cone *C. austini* from the Gulf of Mexico, Mexico. Bar length is equivalent to 1 cm. (Panel B) There are numerous kinds of chaetae that can be found in polychaetes. The picture shows just one example of chaetae (200  $\mu$ m length) obtained from the residual stomach contents of one *C. austini* specimen. Bar = 50  $\mu$ m.

-20 °C. Lyophilized whole venom was dissolved in deionized water containing 0.1% of TFA and then centrifuged at 10,100 × g at 4 °C for 20 min. Total protein was quantified by the Bradford method [4] using the Protein Assay Kit with bovine serum albumin as standard (Bio-Rad, Hercules, CA). For isolation of the peptides from the crude venom and all subsequent purification steps, solution A consisted of 0.1% of TFA in water, and solution B was 0.085% TFA in 90% ACN. Venom was loaded ~1 mg at a time onto an analytical RP-HPLC C18 column (Vydac 218TP54; 4.6 mm × 250 mm, 5 μm particle size) provided with a C18 guard column (Vydac 218GK54; 4.6 mm × 10 mm, 5 μm particle size). Components were eluted at room temperature, first isocratically (5% solution B for 10 min) and then by a linear gradient (5–55% of solution B for 90 min) at a flow rate of 1 ml/min. The absorbance was monitored at 220 nm.

#### 2.4. Toxin purification

One fraction, as7a, was further purified at room temperature. The first step used the same analytical C18 column employed for the fractionation of the venom, using an isocratic step (20% solution B for 20 min) followed by a gradient of 20–35% solution B for 60 min, at a flow rate of 1 ml/min. The second purification step involved an analytical C8 column (Vydac 208TP54; 4.6 mm × 250 mm, 5 μm particle size) provided with a MetaGuard Nucleosil C8 column (4.6 mm × 10 mm, 5 μm particle size) (Varian 0120-MG; Torrance CA), using an isocratic step (20% solution B for 20 min) followed by a gradient of 20–35% solution B for 150 min, at a flow rate of 1 ml/min.

#### 2.5. Molecular mass characterization

Samples of the native peptide (~100 pmol) were subjected to matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry on a Voyager DE Mass Spectrometer (Applied Biosystems) equipped with delayed ion extraction. Spectra were obtained in positive reflector mode using sinapinic acid as matrix.

#### 2.6. Sequence determination

Because of the possible presence of disulfide bonds in the peptide, a sample of as7a was subjected to reduction and alkylation before sequencing. The peptide was dissolved in 100 μl of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, and 100 mg of guanidine hydrochloride was added and dissolved. Forty-five microliters of 50 mM dithiothreitol was added, and the mixture was incubated at 65 °C for 25 min under nitrogen. Subsequently, 4 μl of 4-vinylpyridine was added, and the solution was incubated at room temperature for 16 h under nitrogen [21].

The sample was desalted at room temperature using an analytical C18 column eluted with an isocratic step (10% buffer B for 20 min) followed by a linear gradient (10–40% buffer B for 30 min), with a flow rate of 1 ml/min.

Amino acid sequencing of the pyridylethylated peptide was performed by automated Edman degradation using a Procise 491 Protein Sequencing System (Applied Biosystems).

#### 2.7. Biological assay

Molluscan toxicity was determined by injection of toxin as7a into the foot of adult specimens of the snail *Pomacea paludosa* (17–19 g body weight) using a 29-gauge hypodermic needle. The peptide as7a was dissolved in normal saline solution (0.9% NaCl). Snails were injected with 30 μl of the peptide sample (250 pmol/snail, n = 3). Control animals were injected with 30 μl of 0.9% normal saline solution (n = 3). A positive response was defined as the animal's loss of ability to stay attached to the vertical glass surface of the aquarium and the subsequent contraction of the foot [7,9].

Four-week-old male mice (strain CD-1, 24–27 g body weight) were also used. Samples of as7a were dissolved in 0.9% normal saline solution. Mice were injected intracerebrally with 30 μl of the peptide sample (500 pmol/mouse, n = 3). The animals were observed at regular intervals for up to 2 h to detect any behavioral change or death post-injection. Control animals were injected with 30 μl of 0.9% normal saline solution (n = 3) [5].

#### 2.8. Sequence alignment

In order to make sequence comparisons, one of the most robust multiple sequence alignment programs, CLUSTAL W (1.82), was employed using the default settings (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> [23]).

### 3. Results

#### 3.1. Feeding type identification

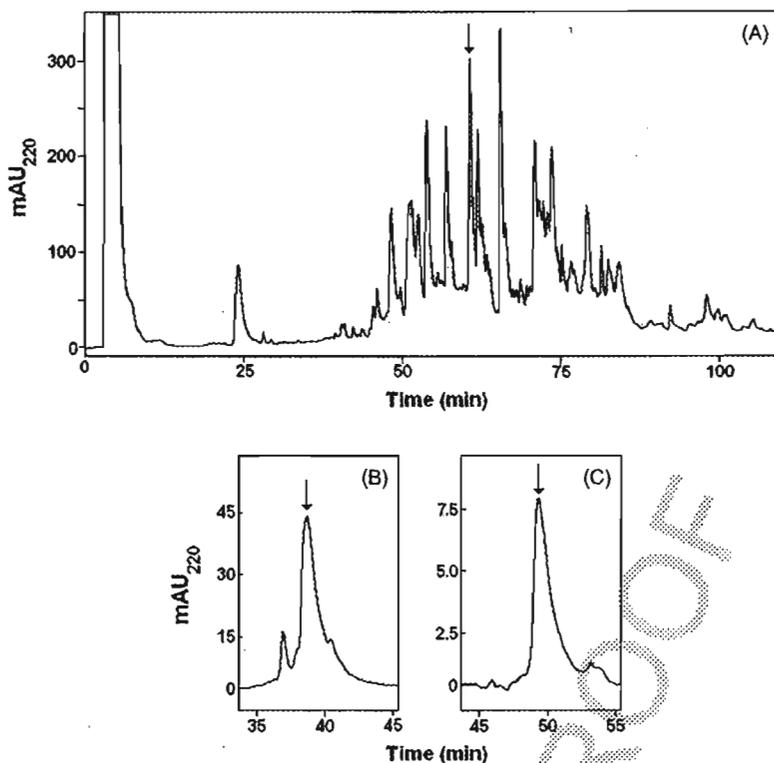
The alimentary tracts of 2 out of 10 *C. austini* specimens contained remains of prey parts. These were found to be chaetae, the chitinous bristles protruding from the bodies of polychaetes. The chaetae found in a given sample were very similar to those found in any other sample, suggesting that *C. austini* preys on a rather limited number of closely related polychaete species. The species to which the chaetae belong are unknown (Fig. 1B).

#### 3.2. Venom fractionation and toxin purification

A systematic characterization of the venom components of *C. austini* was initiated by purifying one prominent peak, named as7a, from the RP-HPLC eluate of the venom crude extract (Fig. 2A). Further purification of as7a by RP-HPLC was carried out in two different systems, as shown in Fig. 2 (B and C). Both HPLC and MALDI-TOF (see below) were consistent with the presence of a single peptide.

#### 3.3. Mass spectrometry

The MALDI-TOF mass spectra of the native peptide as7a yielded a [M+H]<sup>+</sup> signal at m/z 3237.16, which corresponds to a monoisotopic molecular mass of 3236.16 Da (Fig. 3). The analysis of γ-carboxy-Glu-containing peptides in the reflector mode of MALDI-TOF has been shown to produce decarboxylation of this type of post-translationally modified residue



**Fig. 2 – Purification of as7a.** (Panel A) Fractionation of the venom extract (~1 mg total protein) by an analytical C18 column eluted with a linear gradient from 5% to 55% solution B in 100 min at 1 ml/min. HPLC solutions were: 0.1% (v/v) TFA in water (solution A), and 0.085% (v/v) TFA in 90% aqueous ACN (solution B). The absorbance was monitored at 220 nm and is displayed as milli-absorbance units (mAU). (Panel B) The peak highlighted by arrow in panel A (as7a) was further purified on the same column, using an isocratic step (20% solution A for 20 min) and increasing solution B by 0.25%/min for 60 min at 1 ml/min. (Panel C) The peak highlighted by arrow in panel B (as7a) was further purified on an analytical C8 column using an isocratic step (20% solution B for 20 min) followed by a gradient of 20–35% solution B for 150 min, at a flow rate of 1 ml/min.

[6,11]. Thus, the experimental monoisotopic mass obtained corresponds to the decarboxylated form of as7a.

### 3.4. Determination of amino acid sequence

The amino acid sequence of as7a was determined by automated Edman sequencing after reduction and pyridylethylation (Fig. 4). An unambiguous sequence of 31 residues was obtained in one run, including six cysteines in the typical framework of the O-superfamily. Based on the chemical sequence, assuming three disulfide bridges and a free acid C-terminus, and taking into account the expected decarboxylation of the  $\gamma$ -carboxy-Glu residue, the predicted monoisotopic mass (3236.26 Da) agrees well with the experimental monoisotopic mass (3236.16 Da). Thus, the mass spectrometry analysis confirms the sequence and indicates that Cys residues are present as disulfides in the peptide and that the C-terminus is not amidated.

### 3.5. Biological effects of the purified peptides

Aliquots of 250 pmol of as7a were injected in the rear part of the foot of the freshwater snail *P. paludosa*. The animals were

attached with their foot to the front of the aquarium glass. Immediately upon injection, the snails dropped off and the foot muscles shrank. The symptoms disappeared after 2 min. In contrast, the control animals remained attached to the glass side of the aquarium.

The intracerebral injection of peptide as7a (500 pmol/mouse) in mice did not cause any behavioral distress, as compared with control mice. Either control or test mice showed the transient symptoms associated with the injection, i.e., stillness and agitated breathing for 3–5 min, followed by inactivity up to 13–15 min after the injection, displacement in the cage and scratching and grooming behavior for 11–15 min; then they became still and fell asleep. For comparison, lower doses (120 pmol/mouse) of other toxic fractions of *C. austini* venom (data not published) provoke paralytic effects in mice.

## 4. Discussion

The predatory cone snails use their biochemically and pharmacologically complex venoms to capture prey, defend against predators, and compete with other animals in their environment. Therefore, it is important to understand the

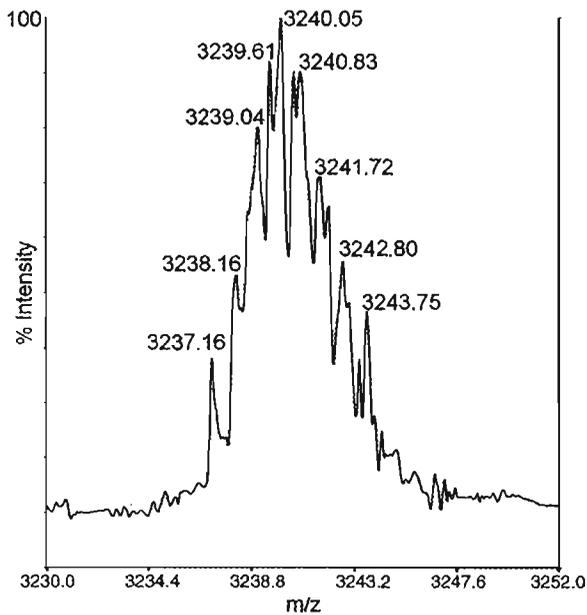


Fig. 3 – MALDI-TOF mass spectrum of conotoxin as7a. The  $m/z$  signal obtained at 3237.16 for as7a ( $[M+H]^+$ ) indicates a monoisotopic mass of 3236.16 Da.

correlation between the feeding ecology of the various species and the specificity of their neurotoxins towards different animal taxa. The present study reports the purification and the biochemical and biological characterization of a  $\gamma$ -conotoxin-like peptide isolated from the venom of *C. austini*, a cone snail found in the Gulf of Mexico. This peptide was named as7a, according to the nomenclature of conotoxins [18]. The feeding type of *C. austini* was previously unknown. Microscopic analysis of the digestive tract content of *C. austini* demonstrated the presence of chaetae (Fig. 1B) but not of anatomical structures expected if fish (otoliths, bones, and scales) or molluscs (opercula) had been ingested. Thus, we conclude that *C. austini* is a vermivorous species, in agreement with the relationship between feeding type and shell characters proposed by Lim [13].

Until recently,  $\gamma$ -conotoxins had only been isolated from two molluscivorous cone snails (*C. textile* [7,14] and *C.*

TxVIIA	CGKHSYTCVND--SYCCSDNC-----VRSYCTLF*
$\gamma$ -PnVIIA	DCTSRFRGRCVH--SYCCSNSC-----DQTYCYLYAFQ*
de7a	ACKQKHHLCAITMAYCCSGFC-----LIYRCS*
as7a	TCNQKSGCSLD--Y <sup>γ</sup> CCSSCKPQGGPLFD <sup>4</sup> FC
	* * * * *

Fig. 4 – The primary structure of as7a from *C. austini* and other  $\gamma$ -conotoxins (TxVIIA from *C. textile* [7,14],  $\gamma$ -PnVIIA from *C. pennaceus* [8], de7a from *C. delessertii* [1]). The result of the CLUSTAL alignment has been edited to show post-translational modifications. The one-letter code is employed for standard amino acids. For post-translational modifications:  $\gamma$ , $\gamma$ -carboxyglutamate, amidated C-terminus and O,4-trans-hydroxyproline. Identical residues among all the peptides (\*) are displayed in bold face at the bottom line.

*pennaceus* [8]) dwelling in coral reef habitats in the Indo-Pacific. Thus, it was surprising to find putative  $\gamma$ -conotoxins in the venom of a worm-hunting cone snail (*C. delessertii* [1]) that inhibits sandy areas of the American Atlantic Ocean. Based on the present work, *C. austini* is the fourth species known to produce this uncommon type of conotoxin and one of two that are vermivorous.

$\gamma$ -Conotoxins, TxVIIA and  $\gamma$ -PnVIIA share a structural motif  $-S\gamma CCS-$ , that has not been found in the other four-loop conotoxins of the *O*-Superfamily (i.e.,  $\delta$ -,  $\mu O$ -,  $\omega$ -, and  $\kappa$ -), and that could be important for the three-dimensional structure and biological activity of these peptides. Generally, the disulfide bond arrangement and loop size determine the selectivity for a particular receptor subtype; hence, conotoxins from different *Conus* species that bind to a particular site on a receptor complex often exhibit the same disulfide framework as well as highly conserved amino acid sequences [2]. The peptide studied in this work, as7a, has some resemblance to  $\gamma$ -conotoxins from molluscivorous *Conus*, including the sequence  $-\gamma CCS-$  that is included in the motif  $(-S\gamma CCS-)$  that characterizes  $\gamma$ -conotoxins (Fig. 4). If the sequences of peptide de7a [1] and of peptide as7a reported in this work are taken into account, this motif could be redefined as  $-\gamma CCS-$ . It should be noted that, apart from this motif and the other four Cys residues, these peptides show little sequence identity, only four amino acids in two toxins from the molluscivorous species, and only two residues in those from the vermivorous cones; when the toxins from the mollusc-eating species are compared with those of the worm-hunting species, only one residue is shared by toxin TxVIIA and peptide as7a. The toxins from the molluscivorous cones have a strong negative charge (TxVIIA, 4-;  $\gamma$ -PnVIIA, 5-), whereas the worm eating species produce molecules that are neutral (de7a) or have a low negative charge (as7a, 1-). Particularly noteworthy is the presence of six additional residues in the fourth intercysteine loop of as7a in comparison with the other known  $\gamma$ -conotoxins (Fig. 4).

The biological activity of  $\gamma$ -conotoxins seems to be directed toward mollusc species:  $\gamma$ -PnVIIA caused some flaccidity or relaxation of the foot musculature of *Patella caerulea* (50 pmol/100 mg body weight) [8], whereas TxVIIA produced marked paralysis in this marine snail with a dose of 8.6 pmol/100 mg body weight [7]. In the case of *C. austini*, peptide as7a provoked the contraction of the foot of *P. paludosa*. Although the effect elicited by as7a was not as pronounced as the effects produced by TxVIIA, the dose injected was  $\sim$ 6-fold lower, 1.4 pmol/100 mg body weight. On the other hand, the intracranial injection in mice with peptide as7a ( $\sim$ 2 pmol/100 mg body weight) did not elicit any abnormal symptomatology; this result is consistent with the absence of effect when toxin TxVIIA was injected intraventricularly in rats at a dose of  $\sim$ 6 pmol/100 mg body weight [7]. The injection of venom peptides into the CNS of rodents has proven to be an effective method for identifying components active in vertebrates [19].

The biological specificity of the two  $\gamma$ -conotoxins from molluscivorous *Conus* venoms is clearly different: peptide TxVIIA triggers action potential bursting in isolated medial neurons from the pleuropedal ganglia of *Aplysia* (a marine mollusc) [7], and it has no effect on the caudodorsal neurons from *Lymnaea* (a freshwater snail), the target of  $\gamma$ -PnVIIA [8].

Thus, the structural similarities between peptide as7a from *C. austini* and TxVIIA from *C. textile*, and  $\gamma$ -PnVIIA from *C. pennaceus*, as well as their similar biological effects in molluscs suggest the same, as yet unidentified, pacemaker channels in the nervous system of a mollusc as a possible target for peptide as7a.

The presence, in a worm-hunting species such as *C. austini*, of one  $\gamma$ -conotoxin (as7a) with biological activity in a mollusc suggest that this peptide is the part of a defensive mechanism. It has been documented that marine gastropods are subjected to strong predation by crustaceans, fishes, and other gastropods [24]. An alternative explanation is that some receptors in the nervous system of polychaete worms (the natural prey of *C. austini*) and other invertebrates (such as molluscs) are moderately conserved. In fact, evidence from cloning of ion channels and receptors suggests that these proteins appeared early in the evolution of the Eukaryotes [3]. Conotoxins with a narrow range of phylogenetic specificity, such as the novel  $\gamma$ -conotoxin peptide as7a from *C. austini* described in this work, might become a useful tool to study the structure, function, and evolution of receptors and ion channels that determine the physiology of the nervous system of molluscs. Further investigation into the effects of this toxin is needed to reveal its specific target and mechanism of action.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants GM 48677, from The National Institute of General Medical Sciences (B.M.O.) and IN-204403, from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM, Mexico) (E.P.H.C.). This work was also supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico) to E.P.H.C. (30701-N and 41477-Q) and to M.B.A. (43754-Q). A.Z.-C. was supported by fellowships from CONACYT (144622) and from Dirección General de Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México (DGEP-UNAM). We thank the officers and crew of the RV *Justo Sierra* during the campaign SIGSBEE V, under the direction of Dr. Elva Escobar. We also thank the Mass Spectrometry Facility of the Chemistry Department, University of Utah, Salt Lake City [supported by the National Science Foundation (grant CHE-9708413) and the University of Utah Institutional Funds Committee] for the mass analysis. We gratefully acknowledge the assistance of María Eugenia Ramos Aguilar for the collection of *C. austini* specimens, of Dr. Dorothy D. Pless for revision of the manuscript, of Leopoldo González-Santos of the Digital Imaging Unit, Institute of Neurobiology, National University of México, for Fig. 1B, and of Lic. Pilar Galarza for the retrieval of bibliographic references.

#### REFERENCES

[1] Aguilar MB, López-Vera E, Imperial JS, Falcón A, Olivera BM, Heimer de la Cotera EP. Putative gamma-conotoxins in vermivorous cone snails: the case of *Conus delessertii*. *Peptides* 2005;26:23-7.

[2] Alewood P, Hopping G, Armishaw C. Marine toxins as sources of drug leads. *Aust J Chem* 2003;56:769-74. 370  
371

[3] Anderson PAV, Greenberg RM. Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp Biochem Physiol B* 2001;129:17-28. 372  
373  
374

[4] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54. 375  
376  
377  
378

[5] Clark C, Olivera BM, Cruz LJ. A toxin from *Conus geographus* venom which acts on the vertebrate central nervous system. *Toxicon* 1981;19:691-9. 379  
380  
381

[6] Craig AG. The characterization of conotoxins. *J Toxicol Tox Rev* 2000;19:53-93. 382  
383

[7] Fainzilber M, Gordon D, Hasson A, Spira ME, Zlotkin E. Mollusc-specific toxins from the venom of *Conus textile neovicarius*. *Eur J Biochem* 1991;202:589-95. 384  
385  
386

[8] Fainzilber M, Nakamura T, Lodder JC, Zlotkin E, Kits KS, Burlingame AL.  $\gamma$ -Conotoxin-PnVIIA, a  $\gamma$ -carboxylglutamate-containing peptide agonist of neuronal pacemaker cation currents. *Biochemistry* 1998;37:1470-7. 387  
388  
389  
390

[9] Fainzilber M, Zlotkin E. A new bioassay reveals mollusk-specificity in molluscivorous *Conus* venoms. *Toxicon* 1992;30:464-9. 391  
392  
393

[10] Halstead BW. Poisonous and venomous marine animals of the world. New Jersey: The Darwin Press, 1988. 394  
395

[11] Kalume DE, Stenflo J, Czerwiec E, Hambe B, Furie BC, Furie B, et al. Structure determination of two conotoxins from *Conus textile* by a combination of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and electrospray ionization mass spectrometry and biochemical methods. *J Mass Spectrom* 2000;35:145-56. 396  
397  
398  
399  
400  
401

[12] Kohn AJ, Ferron FE. Life history and biogeography: patterns in *Conus*. Oxford: Oxford University Press, 1994. 402  
403

[13] Lim CF. Identification of the feeding types in the genus *Conus* Linnaeus. *The Veliger* 1970;12:160-4. 404  
405

[14] Nakamura T, Yu Z, Fainzilber M, Burlingame AL. Mass spectrometric-based revision of the structure of a cysteine-rich peptide toxin with  $\gamma$ -carboxylglutamic acid, TxVIIA, from the sea snail, *Conus textile*. *Protein Sci* 1996;5:524-30. 406  
407  
408  
409

[15] Nybbaken J. Population characteristics and food resource utilization of *Conus* in the Galapagos islands. *Pac Sci* 1978;32:271-80. 410  
411  
412

[16] Olivera BM. *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol Biol Cell* 1997;8:2101-9. 413  
414  
415

[17] Olivera BM. *Conus* venom peptides: reflections from the biology of clades and species. *Annu Rev Ecol Syst* 2002;33:25-42. 416  
417  
418

[18] Olivera BM, Cruz LJ. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon* 2001;39:7-14. 419  
420

[19] Olivera BM, Cruz LJ, Yoshikami D. Effects of *Conus* peptides on the behaviour of mice. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:772-7. 421  
422

[20] Rockel D, Korn W, Kohn AJ. Manual of the living Conidae, vol. 1. Indo-Pacific Wiesbaden: Verlag Christa Hemmen, 1995. 423  
424  
425

[21] Tarr GE. Manual Edman sequencing system. In: Shively JE, editor. *Methods of protein microcharacterization*. Clifton: Humana Press; 1986. p. 155-94. 426  
427  
428

[22] Terlau H, Olivera BM. *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol Rev* 2004;84:41-68. 429  
430

[23] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 1994;22:4673-80. 431  
432  
433  
434  
435

[24] Trussell GC, Etter RJ. Integrating genetic and environmental forces that shape the evolution of geographic variation in marine snail. *Genetica* 2001;112-113:321-37. 436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469

**a) Conopéptidos sin cisteínas**

**Familia de las Contulaquinas**

Contulaquina G (P) Z S E E G G S N A T. K K P Y I L Craig et al., 1999b

**Conantoquinas**

Conantoquina G (P) G E γ γ L Q γ N Q γ L I R γ K S N \* Olivera et al., 1985a

Conantoquina L (P) G E γ γ V A K M A A γ L A R γ D A V N \* Jimenez et al., 2002

Conantoquina R (P) G E γ γ V A K M A A γ L A R γ N I A K G C K V N C Y P \* White et al., 2000

Conantoquina T (P) G E γ γ Y V Q K M L γ N L R γ A E V K K N A \* Haack et al., 1990

**Conorfamidas**

Conorfamida Sr1 (V) G P M G W V P V **F Y R F** \* Maillo et al., 2002

**b) Conopéptidos con 2 cisteínas**

**Conopresinas**

Lys conopresina G (P) **C** F I R N **C** P K G Nielsen et al., 1994

Leu conopresina G (P) **C** F I R N **C** P L G \* Cruz et al., 1987

Arg conopresina S (P) **C** I I R N **C** P R G Cruz et al., 1987

**Contrífanos**

Contrífanos P (P) G **C** O W D P W **C** Jacobsen et al., 1998

Contrífanos Sm (P) G **C** O W Q P W **C** Jacobsen et al., 1998

Bromocontrífanos R (P) G **C** O W E P W **C** Jimenez et al., 1996

Contrífanos Vn (V) G D **C** P W K P W **C** Massilia et al., 2001

**c) Conopéptidos con múltiples cisteínas**

**SUPERFAMILIA A**

**α conotoxinas**

α CnIA	(P)	G R	<b>C C</b>	H P A	<b>C</b>	G K Y Y S	<b>C</b>		Fraveau et al., 1999
α CnIB	(P)	G R	<b>C C</b>	H P A	<b>C</b>	G K Y Y S	<b>C</b>		Fraveau et al., 1999
α EI	(P)	R D O	<b>C C</b>	Y H P T	<b>C</b>	N M S N P Q I	<b>C</b>	*	Martinez et al., 1995
α GI	(P)	E	<b>C C</b>	N P A	<b>C</b>	G R H Y S	<b>C</b>	*	Gray et al., 1981
α GIA	(P)	E	<b>C C</b>	N P A	<b>C</b>	G R H Y S	<b>C</b>	G K	Gray et al., 1981
α GIC	(P)	G	<b>C C</b>	S H P A	<b>C</b>	A G N Q H I	<b>C</b>	*	McIntosh et al., 2002
α GID	(P)	I R D γ	<b>C C</b>	S N P A	<b>C</b>	R V N N O H V	<b>C</b>		Nicke et al., 2003
α GII	(P)	E	<b>C C</b>	H P A	<b>C</b>	G K H F S	<b>C</b>		Gray et al., 1981
α MI	(P)	G R	<b>C C</b>	H P A	<b>C</b>	G K N Y S	<b>C</b>	*	McIntosh et al., 1982; Jacobsen et al., 1999
α MII	(P)	G	<b>C C</b>	S N P V	<b>C</b>	H L E H S N L	<b>C</b>	*	Cartler et al., 1996
α PIA	(P)	R D P	<b>C C</b>	S N P V	<b>C</b>	T V H N P Q I	<b>C</b>	*	Azam et al., 2002
α SI	(P)	I	<b>C C</b>	N P A	<b>C</b>	G P K Y S	<b>C</b>		Zafarralla et al., 1998
α SIA	(P)	Y	<b>C C</b>	H P A	<b>C</b>	G K N F D	<b>C</b>		Myers et al., 1991
α Vc1.1	(P)	G	<b>C C</b>	S D P R	<b>C</b>	N Y D H P E I	<b>C</b>	*	Livett et al., 2002
α AulA	(M)	G	<b>C C</b>	S Y P P	<b>C</b>	F A T N S D Y	<b>C</b>		Luo et al., 1998
α AulB	(M)	G	<b>C C</b>	S Y P P	<b>C</b>	F A T N P D	<b>C</b>	*	Luo et al., 1998
α AulC	(M)	G	<b>C C</b>	S Y P P	<b>C</b>	F A T N S G Y	<b>C</b>		Luo et al., 1998
α Epl	(M)	G	<b>C C</b>	S D P R	<b>C</b>	N M N N P D Y	<b>C</b>		Loughnan et al., 1998
α PnIA	(M)	G	<b>C C</b>	S L P P	<b>C</b>	A A N N P D Y	<b>C</b>	*	Fainzilber et al., 1994
α PnIB	(M)	G	<b>C C</b>	S L P P	<b>C</b>	A L S N P D Y	<b>C</b>	*	Fainzilber et al., 1994
α AnIA	(V)		<b>C C</b>	S H P A	<b>C</b>	A A N N Q D Y	<b>C</b>	*	Loughnan et al., 2004
α AnIB	(V)	G G	<b>C C</b>	S H P A	<b>C</b>	A A N N Q D Y	<b>C</b>	*	Loughnan et al., 2004
α AnIC	(V)	G G	<b>C C</b>	S H P A	<b>C</b>	F A S N P D Y	<b>C</b>	*	Loughnan et al., 2004
α lml	(V)	G	<b>C C</b>	S D P R	<b>C</b>	A W R	<b>C</b>	*	McIntosh et al., 1994
α lmlI	(V)	A	<b>C C</b>	S D R R	<b>C</b>	R W R	<b>C</b>	*	Ellison et al., 2003
α SII	(P)	G	<b>C C C</b>	N P A	<b>C</b>	G P N Y G	<b>C</b>	G T S <b>C</b> S	Ramilo et al., 1992

**ρ conotoxinas**

ρ TIA	(P)	F N W R	<b>C C</b>	L I P A	<b>C</b>	R R N H K K F	<b>C</b>	*	Sharpe et al., 2001
-------	-----	---------	------------	---------	----------	---------------	----------	---	---------------------

### $\alpha$ A conotoxinas

$\alpha$ A EIVA (P) G **C C** P Y O N A A **C** H O **C** G **C** K V G R O O Y **C** D R O S G G \*

$\alpha$ A EIVB (P) G **C C** G K Y O N A A **C** H O **C** G **C** T V G R O O Y **C** D R O S G G \*

$\alpha$ A OIVA (P) **C C** G V O N A A **C** H O **C** V **C** K N T **C**

$\alpha$ A PIVA (P) G **C C** G S Y O N A A **C** H O **C** S **C** K D R O S Y **C** G K \*

Jacobsen et al., 1997  
 Jacobsen et al., 1997  
 Teichert et al., 2004  
 Hopkins et al., 1995

### $\kappa$ A conotoxinas

$\kappa$ A SIVA (P) Z K S L V P S V I T T **C C** G Y D O G T M **C** O O **C** R **C** T N S **C** \*

$\kappa$ A SIVB (P) Z K  $\gamma$  L V P S V I T I **C C** G Y D O G T M **C** O O **C** R **C** T N S **C** O T K O K K O

$\kappa$ A SmIVA (P) Z T W L V P S T I T T **C C** G Y D O G T M **C** O T **C** M **C** D N T **C** K O K O K K S

$\kappa$ A SmIVB (P) A O W L V P S T I T T **C C** G Y D O G S M **C** O O **C** M **C** N N T **C** K O K O K K S

Craig et al., 1998  
 Santos et al., 2004  
 Santos et al., 2004  
 Santos et al., 2004

## SUPERFAMILIA T

### $\chi$ $\delta$ $\lambda$ conotoxinas

$\lambda$  CMrVIA (M) V **C C** G Y K L **C** H O **C**

$\lambda$  CMrVIB ( $\chi$ -MrIA) (M) N G V **C C** G Y K L **C** H O **C**

$\lambda$  CMrX (M) G I **C C** G V S F **C** Y O **C**

Balaji et al., 2000  
 McIntosh et al., 2000; Balaji et al., 2000  
 Balaji et al., 2000

### $\epsilon$ conotoxinas

au5a (M) F **C C** P F I R Y **C C** W

au5b (M) F **C C** P V I R Y **C C** W

tx5a ( $\epsilon$ -TxIX) (M)  $\gamma$  **C C**  $\gamma$  D G W **C C** T. A A O

p5a (P) G **C C** P K Q M R **C C** T L

Walker et al., 1999  
 Walker et al., 1999  
 Rigby et al., 1999; Walker et al., 1999  
 Walker et al., 1999

# SUPERFAMILIA O

## δ conotoxinas

δ NgVIA (P) S K **C** F S O G T F **C** G I K O G L **C C** S V R **C** F S L F **C** I S F E  
 δ PVIA (P) E A **C** Y A O G T F **C** G I K O G L **C C** S E F **C** L P G V **C** F G  
 δ Am2766 (M) **C** K Q A G E S **C** D I F S Q N **C C** V G T **C** A F I **C** I E  
 δ GmVIA (M) W K P **C** R K E G Q L **C** D P I F Q N **C C** R G W N **C** V L F **C** V  
 δ TxIB (M) W **C** K Q S G E M **C** N V L D Q N **C C** D G Y **C** I V F V **C** T  
 δ TxVIA (M) W **C** K Q S G E M **C** N L L D Q N **C C** D G Y **C** I V L V **C** T

Fainzilber et al., 1995  
 Shon et al., 1995  
 Sudarsial et al., 2003  
 Shon et al., 1994  
 Fainzilber et al., 1991  
 Fainzilber et al., 1995

## μO conotoxinas

μO GS (P) A **C** S G R G S R **C** P P Q **C C** M G L R **C** G R G N P Q K **C** I G A H E D  
 μO MrVIA (M) A **C** R K K W E Y **C** I I G F I Y **C C** P G L I **C** G P F V **C** V  
 μO MrVIB (M) A **C** S K K W E Y **C** I L G F V Y **C C** P G L I **C** G P F V **C** V

Yanagawa et al., 1988  
 McIntosh et al., 1995  
 McIntosh et al., 1995

## κ conotoxinas

κ PVIIA (P) **C** R I O N Q K **C** F Q H L D D **C C** S R K **C** N R F N K **C** V

Tertau et al., 1996; Shon et al., 1998b

## ω conotoxinas

ω CVID (P) **C** K S K G A K **C** S K L M Y D **C C** T G S **C** S G T V G T **C** \*  
 ω CnTVIIA (P) **C** K G G A O **C** T R L M Y D **C C** H G S **C** S S S K G R **C**  
 ω GVIA (P) **C** K S O G S S **C** S O T S Y N **C C** R S **C** N O Y T R **C** Y \*  
 ω GVIB (P) **C** K S P G S S **C** S P T S Y N **C C** R S **C** N P Y T K R R **C** Y G  
 ω GVIC (P) **C** K S P G S S **C** S P T S Y N **C C** R S **C** N P Y T K R **C**  
 ω GVIIA (P) **C** K S P G T P **C** S R G M R D **C C** T S **C** L L Y S N K **C** R R Y  
 ω GVIB (P) **C** K S P G T P **C** S R G M R D **C C** T S **C** L S Y S N K **C** R R Y  
 ω MVIIA (P) **C** K G K G A K **C** S R L M Y D **C C** T G S **C** R S G K **C** \*  
 ω MVIB (P) **C** K G K G A S **C** H R T S Y D **C C** T G S **C** N R G K **C**  
 ω MVIC (P) **C** K G K G A P **C** R K T M Y D **C C** S G S **C** G R R G K **C** \*  
 ω MVID (P) S T R **C** Q G R G A S **C** R K T M Y N **C C** S G S **C** N R G R **C** G  
 ω PnVIA (M) G **C** L E V D Y F **C** G I P F A N N G L **C C** S G N **C** V F V **C** T P Q  
 ω PnVIB (M) D D D **C** E P P G N F **C** G M I K I G P P **C C** S G W **C** F F A **C** A

Lewis et al., 2000  
 Favreu et al., 2001  
 Olivera et al., 1984  
 Olivera et al., 1985b  
 Hillyard et al., 1992  
 Monje et al., 1993  
 Kits et al., 1996  
 Kits et al., 1996

**γ conotoxinas**

γ PnVIIA  
 γ TxVIIA  
 de7a  
 as7a

(M)	D	<b>C</b>	T	S	W	F	G	R	<b>C</b>	T	V	N	S	<b>γ</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>S</b>	N	S	<b>C</b>	D	Q	T	Y	<b>C</b>	γ	Y	A	F	O	S
(M)		<b>C</b>	G	G	Y	S	T	Y	<b>C</b>	γ	V	D	S	<b>γ</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>S</b>	D	N	<b>C</b>	V	R	S	Y	<b>C</b>	T	L	F			
(V)	A	<b>C</b>	K	O	K	N	N	L	<b>C</b>	A	I	T	γ	M	A	<b>γ</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>S</b>	G	F	<b>C</b>	L	I	Y	<b>C</b>	S	*			
(V)	T	<b>C</b>	K	Q	K	G	E	G	<b>C</b>	S	L	D	V	<b>γ</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>S</b>	S	<b>C</b>	K	P	G	G	P	L	D	F	<b>C</b>			

Fainzilber et al., 1998  
 Fainzilber et al., 1998  
 Aguilar et al., 2005a  
 Zugasti-Cruz et al., 2005

**SUPERFAMILIA M**

**μ conotoxinas**

μ GIIIA  
 μ GIIIB  
 μ GIIIC  
 μ PIIIA  
 μ SmIIIA  
 μ PIIIA  
 μ PnIVA  
 μ PnIVB

(P)			R	D	<b>C</b>	<b>C</b>	T	O	O	K	K	<b>C</b>	K	D	R	Q	<b>C</b>	K	O	Q	R	<b>C</b>	<b>C</b>	A	*
(P)			R	D	<b>C</b>	<b>C</b>	T	O	O	R	K	<b>C</b>	K	D	R	R	<b>C</b>	K	O	M	K	<b>C</b>	<b>C</b>	A	*
(P)			R	D	<b>C</b>	<b>C</b>	T	P	P	K	K	<b>C</b>	K	D	R	R	<b>C</b>	K	P	L	K	<b>C</b>	<b>C</b>		
(P)		Z	R	L	<b>C</b>	<b>C</b>	G	F	O	K	S	<b>C</b>	R	S	R	Q	<b>C</b>	K	O	H	R	<b>C</b>	<b>C</b>	*	
(P)		Z	R	<b>C</b>	<b>C</b>	N	G	R	R	G	<b>C</b>	S	S	R	W	<b>C</b>	R	D	H	S	R	<b>C</b>	<b>C</b>	*	
(P)	E	K	R	Q	R	L	<b>C</b>	<b>C</b>	G	F	P	K	S	<b>C</b>	R	Q	C	K	P	H	R	<b>C</b>	<b>C</b>	G	R
(M)			<b>C</b>	<b>C</b>	K	V	G	W	T	<b>C</b>	L	L	G	<b>C</b>	S	P	<b>C</b>	S	P	<b>C</b>	G	<b>C</b>			
(M)			<b>C</b>	<b>C</b>	K	Y	G	W	T	<b>C</b>	W	L	G	<b>C</b>	S	P	<b>C</b>	S	P	<b>C</b>	G	<b>C</b>			

Sato et al., 1983; Cruz et al., 1985  
 Sato et al., 1983; Cruz et al., 1985  
 Cruz et al., 1985  
 Shon et al., 1998  
 West et al., 2002  
 Shon et al., 1998a  
 Fainzilber et al., 1995  
 Fainzilber et al., 1995

**ψ conotoxinas**

ψ PIIIE

(P) H O O **C** **C** L Y G K **C** R R Y O G **C** S S A S **C** **C** Q R \*

Shon et al., 1997

**κM conotoxinas**

κM RIIIK

(P) L O S **C** **C** S L N L R L **C** O V O A **C** K R N O **C** **C** T \*

Ferber et al., 2002

**Sin familia asignada**

vx2

W I D P S H Y **C** **C** **C** G G G **C** T D D **C** V N **C**

Jiang et al., 2005

## SUPERFAMILIA P

### Péptidos "espasmódicos"

tx9a	(M)	G	C	N	N	S	C	Q	γ	H	S	D	C	γ	S	H	C	I	C	T	F	R	G	C	G	A	V	N	*
gm9a	(M)	S	C	N	N	S	C	Q	S	H	S	D	C	A	S	H	C	I	C	T	F	R	G	C	G	A	V	N	

Lirazán et al., 2000  
Miles et al., 2002

## SUPERFAMILIA I

### (Familia no definida)

kBtX	(V)	C	R	E	G	T	Y	C	E	N	D	S	Q	C	C	L	N	E	C	C	W	G	G	C	G	H	P	C	R	H	P	*	Fan et al., 2003													
ViTx	(V)	S	R	C	F	P	P	G	I	Y	C	T	S	Y	L	P	C	C	W	G	I	C	C	S	T	C	R	N	V	C	H	L	R	I	G	K	Kaufenstein et al., 2003									
rg11a	(V)	C	Q	A	Y	G	E	S	C	S	A	V	V	R	C	C	D	P	N	A	V	C	C	Q	Y	P	E	D	A	V	C	V	T	R	G	Y	C	R	P	P	A	T	V	L	T	Vianna-Braga et al., 2005

## SUPERFAMILIA S

### σ conotoxinas

σ GVIIIA	(P)	G	C	T	R	T	C	G	G	O	K	C	T	G	T	C	T	C	T	N	S	S	K	C	G	C	R	Y	N	V	H	P	S	G	B	G	G	C	A	C	S	England et al., 1998								
αS RVIIIA	(P)	K	C	N	F	D	K	C	K	G	T	G	V	Y	N	C	G	γ	S	C	S	C	γ	G	L	H	S	C	R	C	T	Y	N	I	G	S	M	K	S	G	C	A	C	I	C	T	Y	Y	*	Teichert et al., 2005

**d) Péptidos sin familia asignada**

Con14- G	(P)	K F L S G G K K $\gamma$ I V C H R Y C A K G I A K E F C N C P D *	Olivera et al., 1990
Bromosleeper R	(P)	<u>W</u> A T I D $\gamma$ C $\gamma$ $\gamma$ T C N V T F K T C C G O O G D W Q C V $\gamma$ A C P V	Craig et al., 1997
Péptido sleeper G	(P)	W F G H $\gamma$ $\gamma$ C T Y <u>W</u> L G P C $\gamma$ V D D T C C S A S C $\gamma$ S K F C G L <u>W</u>	Jimenez et al., 2004
GlaMrII	(M)	S C D S $\gamma$ F S S $\gamma$ F C $\gamma$ Q P $\gamma$ $\gamma$ R I C S C S T H V C C H L S S S K R D Q ... C M T W N R C L S A Q T G N	Hansson et al., 2004
GlaMRIII	(M)	F C C R T <u>Q</u> $\gamma$ V C C $\gamma$ A I K N	Hansson et al., 2004
GlaMrIV	(M)	C C I T E $\gamma$ S C C $\gamma$ F D L	Hansson et al., 2004
Bromoheptapéptido Im	(V)	Z C G Q A <u>W</u> C	Craig et al., 1997
Mo1659	(V)	F H G G S W Y R F P W G Y	Sudarslal et al., 2004
gld-V*	(V)	A O A N S <u>V</u> W S	Pizarewicz et al., 2005
gld-V**	(V)	A O A N S <u>V</u> W S (estereoisómero de gdl-V*)	Pizarewicz et al., 2005
mus-V*	(V)	S O A N S <u>V</u> W S (estereoisómero de mus-V*)	Pizarewicz et al., 2005
mus-V**	(V)	S O A N S <u>V</u> W S	Pizarewicz et al., 2005
QcVIA	(V)	N Q S C O W C G F T C C L P N Y C Q G L T C	Abogadie et al., 1990
Qc	(V)	N C P Y C V V Y C C P P A Y C E A S G C R P P	Olivera et al., 1990
Qc	(V)	C C R T C F G C T P C C	Olivera et al., 1990
QcIIIA	(V)	C C S Q D C L V C I O C C P N	Abogadie et al., 1990
QcIIIB	(V)	C C S R H C W V C I O C C P N	Abogadie et al., 1990
BeTxIa	(V)	C C K Q S C T T C M P C C W	Chen et al., 1999
BeTxIb	(V)	C C E L P C H G C V P C C W P	Chen et al., 1999
BeTxIIa	(V)	R C A H G T Y Y S N D S Q Q C L L N C C W W G G G D H C C R	Chen et al., 1999
de13a	(V)	D C O T S C O T T C A N G W E C C K G Y O C V N K A C S G C T H	Aguliar et al., 2005b

De este trabajo con  
*C. austini* (V):

as15a

C K C P S C N F N D V T E N C K C C I F R Q P \*

asB

S L Y S O W K M γ γ A A γ γ ....

as7a

T C K Q G E G C S L D V γ C C S S C K P G G P L F D F D C

as14a

G G V G R C I Y N C M N S G G G L N F I Q C K T M C Y

as14b

R W D V D Q C I Y Y C L N G V V G Y S Y T E C Q T M C S \*

Zugasti-Cruz et al., 2005

## ABREVIATURAS:

### Símbolo de la especie asociada a la conotoxina

A) Piscívobros		C) Vermívobros	
<i>C. catus</i>	C	<i>C. anemone</i>	An
<i>C. consors</i>	Cn	<i>C. austini</i>	as
<i>C. ermineus</i>	E	<i>C. betulinus</i>	Be, Bt
<i>C. geographus</i>	G	<i>C. delessertii</i>	de
<i>C. lynceus</i>	L	<i>C. gladiator</i>	gld
<i>C. magus</i>	M	<i>C. imperialis</i>	Im
<i>C. nigropunctatus</i>	Ng	<i>C. monile</i>	Mo
<i>C. obscurus</i>	O	<i>C. mus</i>	mus
<i>C. purpurascens</i>	P, p	<i>C. quercinus</i>	Qc
<i>C. radiatus</i>	R	<i>C. regius</i>	rg
<i>C. stercusmuscarum</i>	Sm	<i>C. spurius</i>	Sr
<i>C. striatus</i>	S	<i>C. ventricosus</i>	Vn
<i>C. tulipa</i>	T	<i>C. virgo</i>	Vi
<i>C. victoriae</i>	Vc		
B) Molusquívobros			
<i>C. amadis</i>	Am		
<i>C. aulicus</i>	Au, au		
<i>C. episcopatus</i>	Ep		
<i>C. gloriamaris</i>	Gm, gm		
<i>C. marmoreus</i>	Mr		
<i>C. pennaceus</i>	Pn		
<i>C. textile</i>	Tx, tx		

### Aminoácidos estándar

A = alanina  
C = cisteína  
D = ácido aspártico  
E = ácido glutámico  
F = fenilalanina  
G = glicina  
H = histidina  
I = isoleucina  
K = lisina  
L = leucina  
M = metionina  
N = asparagina  
P = prolina  
Q = glutamina  
R = arginina  
S = serina  
T = treonina  
V = valina  
W = triptófano  
Y = tirosina

### Modificaciones postraduccionales

\* = extremo carboxilo amidado  
 $\gamma$  = ácido carboxiglutámico  
O = hidroxiprolina  
S. = serina glucosilada  
T. = treonina glucosilada  
W = bromotriptófano  
W. = D-triptófano  
Y = sulfotirosina  
V = D- $\gamma$ -hidroxivalina  
Z = ácido piroglutámico

Apéndice 2 Familias de conotoxinas caracterizadas a la fecha

ESPECIE	TA	DG	SUPERFAMILIA								Fam. no deter.	
			Péptidos sin cisteínas	P. con dos cisteínas	A	T	O	M	P	I		S
<i>C. catus</i>	P	IP					ω					
<i>C. consors</i>	P	IP			α		ω,μO					
<i>C. ermineus</i>	P	AT			α,αA	ε						
<i>C. geographus</i>	P	IP	contulaquina, conantoquina	conopresina, contrífano	α		ω,μO	μ			σ	1 péptido
<i>C. lynceus</i>	P	IP	conantoquina									
<i>C. magus</i>	P	IP			α		ω	κM				
<i>C. nigropunctatus</i>	P	IP					δ					
<i>C. obscurus</i>	P	PA			αA							
<i>C. purpurascens</i>	P	PA		contrífano	αA		δ,κ	ψ				
<i>C. radiatus</i>	P	IP	conantoquina	contrífano, bromocontrífano				κM			αS	Bromosleeper
<i>C. stercusmuscarum</i>	P	IP		contrífano	κA			μ				
<i>C. striatus</i>	P	IP		conopresina	α,κA		ω					
<i>C. tulipa</i>	M	IP	conantoquina			ρ	ω					
<i>C. victoriae</i>	P	IP			α							
<i>C. amadis</i>	M	IP					δ					
<i>C. aulicus</i>	M	IP			α	ε						
<i>C. episcopatus</i>	M	IP			α							
<i>C. gloriamaris</i>	M	IP					δ		Espasmódico			
<i>C. marmoreus</i>	M	IP				λ	μO					
<i>C. pennaceus</i>	M	IP			α		ω,γ	μ				
<i>C. textile</i>	M	IP				ε	δ,ω,γ		Espasmódico			
<i>C. anemone</i>	V	IP			α							
<i>C. austini</i>	V	AT	asB				γ (as7a)					3 péptidos
<i>C. betulinus</i>	V	IP							Espasmódico	1		3 péptidos
<i>C. delessertii</i>	V	AT					γ					1 péptido
<i>C. gladiator</i>	V	PA	2 γ-hidroxiconofanos									
<i>C. imperialis</i>	V	IP	bromoheptapéptido		α							
<i>C. monile</i>	V	IP	1 péptido									
<i>C. mus</i>	V	AT	2 γ-hidroxiconofanos									
<i>C. quercinus</i>	V	IP										5 péptidos
<i>C. regius</i>	V	AT										1 péptido
<i>C. spurius</i>	V	AT	conorfamida									
<i>C. ventricosus</i>	V	ME		contrífano								
<i>C. virgo</i>	V	AT								1		

DG= Distribución geográfica

PA= Pacífico americano

ME= Mediterráneo

Tipo de alimentación: P= piscívoro, M= molusquívoro, V= vermívoro

IP= Indopacífico

AT= Atlántico americano